

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22590526
 研究課題名（和文） 呼気凝縮液中バイオマーカーの迅速診断法の開発と難治性喘息管理への応用
 研究課題名（英文） Development of rapid test for biomarkers in exhaled breath condensate in patients with asthma and its use for the management of asthmatics
 研究代表者
 片岡 幹男（KATAOKA MIKIO）
 岡山大学・大学医保健学研究科・教授
 研究者番号：50177391

研究成果の概要（和文）：呼気凝縮液（EBC）を用いて、喘息患者の気道炎症状態を反映する炎症性マーカーを見だし、point of care testing (POCT) に応用可能な迅速診断法の確立を試みた。EBC 中の好酸球性炎症マーカーとして主要塩基性蛋白（MBP）が、好中球性炎症マーカーとしてミエロペルオキシダーゼ（MPO）が ELISA 法により測定可能であった。POCT として免疫クロマト法により EBC 中の MBP と MPO を半定量的に測定できる迅速診断デバイスの構築と測定結果の評価を行った。本法により MPO と MBP が同時に測定できた喘息患者では好中球性マーカーが優位の群と、好酸球性マーカーが優位の 2 群にわかれることが判明した。気道炎症状態をベッドサイドで把握し、喘息患者の治療、管理に応用可能と考えられた。

研究成果の概要（英文）：To evaluate airway inflammation in asthmatic patients, we developed a rapid test as point of care testing detecting neutrophilic and eosinophilic biomarkers in exhaled breath condensate (EBC). Major basic protein (MBP) for eosinophilic marker and Myeloperoxidase (MPO) for neutrophilic marker were detected in EBC by ELISA methods in patients with asthma. We established immunochromatography for semi-quantification of MPO and MBP in EBC. The findings of immunochromatography indicate that asthmatic patients were divided into two groups including eosinophilic marker predominant group and neutrophilic marker predominant group. This method could be applied to the management of asthma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：呼気凝縮液、気管支喘息、免疫クロマト法

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の日常診療において、その病態を把握することは診断や治療、疾病管理

に重要である。気管支喘息の気道炎症は Th2 型の好酸球性気道炎症が中心であるが、一方その重症化に好中球性気道炎症が関与

していることが次第に明らかとなってきた。呼気凝縮液 (EBC) を用いて、喘息患者の気道中の炎症性マーカーの検出を行ってきた。そこで、呼気凝縮液を用いて好酸球性炎症と好中球性炎症を判別できる。

2. 研究の目的

迅速診断法として免疫クロマト法による気道炎症判別デバイスを作製する。これにより気管支喘息患者の呼気凝縮液により気道炎症状態をベッドサイドで把握し、喘息患者の治療、管理に応用可能なシステムを構築することを考えた。

3. 研究の方法

(1) 呼気凝縮液の採取

EBC は冷却ピペット又は EBC 採取装置 (エコスクリーン) により採取し、 -80°C に冷凍保存した。検体の採取は気管支喘息患者、健常者とも書面にて同意を得た上で採取した。検体は匿名化し、解析した。

(2) 呼気凝縮液中の好中球性炎症マーカー及び好酸球性炎症マーカーの測定

EBC 中のマーカーは ELISA 法にて行なうこととし、用いたマーカーは免疫クロマト作製のための有効なモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が存在することが必須であり、これらの点を考慮して、好中球性マーカーとしてはミエロペルオキシダーゼ (MPO) や IL-8 を検討し MPO を、好酸球性マーカーとしては好酸球性カチオン蛋白 (ECP)、好酸球由来ニューロトキシン (EDN)、主要塩基性蛋白 (MBP) を検討し MBP を選択した。MPO は Amplex red を用いる蛍光 ELISA 法で MPO 活性を測定した。MPO 活性 1mU は MPO10ng に相当する。MBP は 2 種の抗 MBP 抗体を用いて、サンドイッチ ELISA 法を構築して、測定した。

(3) 免疫クロマトデバイスの作製

①好中球性炎症判別免疫クロマトデバイス
金コロイドと抗 MPO 抗体 (ウサギポリクローナル抗体) を混和して、金コロイド標識抗体溶液を作製した。クロマト担体にテストラインに抗 MPO モノクローナル抗体を、コントロールライン用に抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体をメンブレン (ミリポア) に固相化した。コンジュゲートパッドには標識抗体溶液を滴下し、作製した。測定は検体と展開液を混和、コンジュゲートパッドに滴下し、30 分静置して、免疫クロマトリーダーでラインの発色強度を測定した。また目視で + (コントロールラインと同等以上)、± (コントロールライン以下)、- (ライン無し) の判定を行った。

②好酸球性炎症判別免疫クロマトデバイス

の作製

着色ラテックスと抗 MBP 抗体 (ウサギポリクローナル抗体) を混和して、着色ラテックス標識抗体溶液を作製した。クロマト担体の作製、検体の測定は MPO と同様の方法で行った。

③免疫クロマト作製、測定条件の検討
免疫クロマト作製に際して、標識抗体作製時の金コロイド、着色ラテックスや抗体の濃度、抗体の種類、展開液中の抗体濃度、界面活性剤の種類、濃度、ラインの作製法、ブロッキング液の種類などについて比較、検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫クロマトデバイスの作製と測定

①MPO 免疫クロマトデバイス

金コロイド (ワインレッドケミカル) は 10mM Tris pH9.2 で 2 倍に希釈し、塩類除去して Tris に溶解した抗 MPO ウサギ抗体 ($100\mu\text{g/ml}$) と等量混和した。さらに BSAPEG (BSA : PEG=9 : 1) を同量加え、15 分間静置した。2 回遠心後、保存液 (5%PEG 加 5%スクロース Tris) に溶解、保存した。金コロイド標識抗体溶液の確認はマイクロプレートリーダーにて 520nm で吸光度が 1.5 付近になることを確認するとともに、二次抗体と混和して、顕微鏡下で凝集を確認した。クロマトグラフ担体はメンブレン (High Flow Plus Cellulose membrane, Millipore) を 6mm 幅に切って使用した。メンブレン部分の左側にテストライン用の抗 MPO モノクローナル抗体を、右側にコントロールライン用の抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を $5\mu\text{L}$ ずつ線状に塗布した。30 分間乾燥後、ブロッキング液 (1%カゼイン含有 PBS) 中に 30 分間静置する。ブロッキング液を除去後、0.05w%Tween20 含有 PBS で 2 回洗浄し、最後に 5%スクロース Tris に 10 分間静置後、室温で乾燥させた。コンジュゲートパッド (Glass Fiber Conjugate Pad, Millipore) に金コロイド標識抗体溶液を 1%BSA 加 5%スクロース Tris で 6 倍に希釈して、 $50\mu\text{L}$ 滴下し、乾燥させた。クロマトグラフ担体のシール部分をはがし、コンジュゲートパッドと吸収パッドを貼る。検体 $50\mu\text{L}$ と展開液 (Tris pH9.2) $150\mu\text{L}$ を混和し、滴下した。30 分静置し、ラインを確認した。免疫クロマトリーダー (ニップン) でラインの吸光度を測定し、発色強度を算定した。(図 1)

図 1 テストライン 吸収パッド



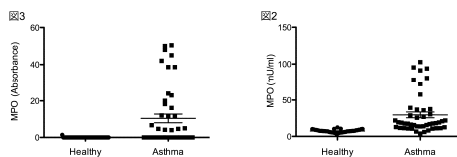
②MBP免疫クロマトデバイス

2.5%ビーズ懸濁液 (Polybead Blue Dyed Microsphere, 0.20 μ m, テクノケミカル) 0.5ml と Binding Buffer (0.1M ホウ酸バッファ pH8.5) 1ml を混和し、遠心した。更に2回洗浄後、0.5ml Binding Buffer で再懸濁する。懸濁液に抗 MBP ポリクローナル抗体 (500 μ g) を添加、一晚静置した。Binding Buffer で2回洗浄後、Storage Buffer (5%BSA 25% glycerol 加 0.1M PBS pH7.4) に懸濁して、着色ラテックス標識抗 MBP 抗体溶液とした。クロマトグラフ担体、コンジュゲートパッドの作製、測定は MPO と同様に行った。

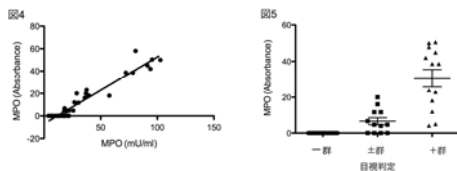
③免疫クロマトデバイスの作製において、テストラインに用いる固相化用抗体は MPO、MBP とともに特異性の高いモノクローナル抗体が適していた。展開液には金コロイド、着色ラテックスともビニール系水溶性ポリマー及び非イオン性界面活性剤を添加した Tris 緩衝液が、Blocking 液は1%カゼイン加 PBS が最も高感度であった。

(2) 呼気凝縮液中の好中球性炎症マーカー (MPO) の測定

蛍光 ELISA 法による喘息患者 (n=46) の EBC 中 MPO 活性は 29.6 ± 4.0 mU/ml と健常者 (n=43) の 7.4 ± 0.3 mU/ml に比し有意の高値を示していた ($p < 0.001$) (図2)。



免疫クロマト法による EBC 中 MPO の発色強度は喘息患者で 10.4 ± 2.4 、健常者で 0.03 ± 0.03 と喘息患者で優位の高値を示していた (図3)。MPO 活性と免疫クロマト発色強度は $r = 0.89$ 、 $p < 0.001$ と有意の関が認められた (図4)。

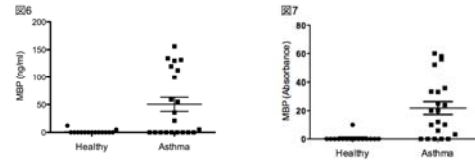


目視判定による+群の発色強度は 30.7 ± 4.7 、±群は 6.6 ± 2.0 、-群は 0.0 ± 0.0 と、-群と+群、±群と+群は有意差が認められたが、-群と±群は有意差が認められなかった。(図5)。

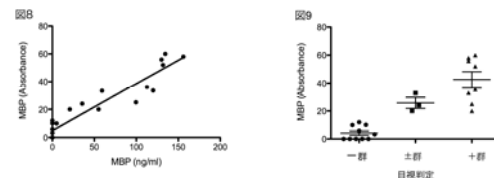
(3) 呼気凝縮液中の好酸球性炎症マーカー (MBP) の測定

ELISA 法による喘息患者 (n=21) の EBC

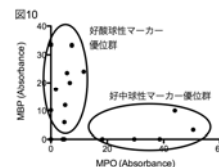
中 MBP 濃度 50.5 ± 12.8 ng/ml と健常者 (n=15) の 1.1 ± 0.8 ng/ml に比し有意に高値を示していた ($p < 0.01$) (図6)。免疫クロマト法による EBC 中 MBP の発色強度は喘息患者で 21.9 ± 4.5 、健常者で 0.7 ± 0.7 と喘息患者で優位の高値を示していた (図7)。



MBP 濃度と免疫クロマト発色強度は $r = 0.95$ 、 $p < 0.001$ と有意の相関が認められた (図8)。目視判定による+群の発色強度は 42.6 ± 5.6 、±群は 25.8 ± 3.9 、-群は 4.1 ± 1.6 と、-群と+群、-群と±群では有意差が認められたが、±群と+群では有意差は認められなかった。これは±群に免疫クロマト発色強度が高いものが含まれていた (図9)。



(4) MPO と MBP が同時に測定できた18例の喘息患者は好中球性マーカー優位群と、好酸球性マーカー優位群の2群に大別出来ることが判明した (図10)。



本法による呼気凝縮液中のバイオマーカーの測定により、気道炎症状態の判別が可能であり、気管支喘息患者の管理、個別化治療に応用可能なことが判明した。測定デバイスの更なる精度の向上が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

①Hikari Koga, Nobuaki Miyahara, Yasuko Fuchimoto, Mikio Kataoka (他7名、8番目): Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge:

neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway response. Respiratory Research, 査読有、14:8、2013.

②Etsuko Kurimoto, Nobuaki Miyahara, Arihiko Kanehiro, Mikio Kataoka (他8名、9番目) : IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. Respiratory Research, 査読有、14:5、2013.

③Waseda Koichi, Miyahara Nobuaki, Kanehiro Arihiko, Kataoka Mikio, (他7名、9番目) : Blocking the leukotriene B4 receptor 1 inhibits late-phase airway responses in established disease. Am J Respir Cell Mol Biol, 査読有、45:851-857、2011.

④Yasuko Fuchimoto, Arihiko Kanehiro, Nobuaki Miyahara, Mikio Kataoka (他7名、9番目) : Requirement for chemokine receptor 5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol, 査読有、45 : 1248-1255、2011.

⑤能島大輔、谷本 安、栗本悦子、片岡幹男 (他7名、11番目) : 原発性胆汁性肝硬変を合併したサルコイドーシスの3例. 日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会誌、査読有、30 : 27-32、2010.

⑥片岡幹男 : 呼吸器疾患 ～肺炎を中心に～. 感染防止、20 : 56-68、2010.

⑦Kouji Iio, Tomoe Ueno Iio, Mikio Kataoka (他6名、10番目) : Experimental pulmonary granuloma mimicking sarcoidosis induced by Propionibacterium acnes in mice. Acta Med Okayama, 査読有、64 : 75-83、2010.

[学会発表] (計2件)

①兵田朋子 : 呼気凝縮液 (EBC) による気管支喘息患者の気道炎症の診断. 日本臨床検査医学会、2011年11月19日、岡山市.

②能島大輔 : ステロイド薬減量中に再燃を繰り返す慢性好酸球性肺炎にシクロフォスファミドの併用が有効であった1例. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会、2010年5月8日、京都.

6. 研究組織

1) 研究代表者

片岡 幹男 (KATAOKA MIKIO)
岡山大学・大学医保健学研究科・教授
研究者番号 : 50177391

(2) 研究分担者

柴倉 美砂子 (SHIBAKURA MISAKO)
岡山大学・大学医保健学研究科・准教授
研究者番号 : 30314694