

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4509452号
(P4509452)

(45) 発行日 平成22年7月21日(2010.7.21)

(24) 登録日 平成22年5月14日(2010.5.14)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 V
GO 1 N 33/577 (2006.01) GO 1 N 33/577 B

請求項の数 5 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2001-554069 (P2001-554069)	(73) 特許権者	502253490
(86) (22) 出願日	平成13年1月17日 (2001.1.17)		株式会社プロジェクトユニー
(86) 国際出願番号	PCT/JP2001/000240		茨城県つくば市倉掛741番地16
(87) 国際公開番号	W02001/053832	(74) 代理人	100106611
(87) 国際公開日	平成13年7月26日 (2001.7.26)		弁理士 辻田 幸史
審査請求日	平成20年1月17日 (2008.1.17)	(74) 代理人	100087745
(31) 優先権主張番号	特願2000-9281 (P2000-9281)		弁理士 清水 善廣
(32) 優先日	平成12年1月18日 (2000.1.18)	(74) 代理人	100098545
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 阿部 伸一
		(72) 発明者	内田 義之
			茨城県つくば市竹園3丁目26番地612 棟201号
		審査官	三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 気管支喘息発作の検査方法および検査用キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被検試料中のE - カドヘリン分解物の存在量に基づくことを特徴とする気管支喘息発作の検査方法。

【請求項2】

E - カドヘリン分解物が可溶性E - カドヘリンであることを特徴とする請求項1記載の検査方法。

【請求項3】

被検試料が喀痰であることを特徴とする請求項1記載の検査方法。

【請求項4】

E - カドヘリン分解物に反応性を有する抗体を用い、免疫学的手法によることを特徴とする請求項1記載の検査方法。

【請求項5】

被検試料中のE - カドヘリン分解物の存在量に基づいて気管支喘息発作の検査を行うために、少なくともE - カドヘリン分解物に反応性を有する抗体を含有することを特徴とする気管支喘息発作の検査用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、病態を反映した気管支喘息発作の検査方法および検査用キットに関する。

【 0 0 0 2 】

【 従来 の 技術 】

気管支喘息は、現代病の一つとされ、患者数も増加の一途をたどっており、多くの関心が払われていることは周知の通りである。気管支喘息発作は、予知することが困難である。従って、臨床場においては、患者の病態がどのような状態にあるかを見極め、その状態に応じた治療・処置を行う必要がある。現在のところ、患者のモニタリングには気管支閉塞の程度をモニターするピークフローメータが使用されているが、被検試料を用いて簡易に行うことができ、しかも病態を反映した検査方法が望まれている。

ところで、近年、気管支喘息は慢性気道炎症疾患として位置付けられており、そのような観点からのメカニズムの解明にも勢力が注がれている。

一方、E - カドヘリンは、Ca²⁺イオン依存性の膜貫通型糖タンパク質であり、上皮細胞などに主に発現し、上皮細胞間の接着分子の一つとして機能していることが知られている。種々の研究結果から、E - カドヘリンの正常な発現と機能の発揮は、上皮細胞間の密着結合（タイトジャンクション）の維持や細胞間バリアの正常な作用の維持に寄与していることが報告されている。

それ故、気管支喘息と気道上皮細胞に発現したE - カドヘリンとの関連性について興味もたれるところであるが、これに関する報告は見当たらない。

【 0 0 0 3 】

【 発明 が 解決 し よう と す る 課 題 】

本発明は、病態を反映した気管支喘息発作の検査方法および検査用キットを提供することを目的とする。

【 0 0 0 4 】

【 課 題 を 解決 す る た め の 手 段 】

本発明者は、上記の点に鑑み、気管支喘息を慢性気道炎症疾患としての視点から着目して種々の検討を行った結果、気管支喘息発作の際には、気道上皮細胞に発現したE - カドヘリンが分解し、その分解物が細胞から離脱すること、かかる離脱がさらなる発作の引き金となって、症状の悪化につながることを見出した。

【 0 0 0 5 】

本発明は、上記の知見に基づいてなされたものであり、本発明の気管支喘息発作の検査方法は、請求項 1 記載の通り、被検試料中のE - カドヘリン分解物の存在量に基づくことを特徴とする。

また、請求項 2 記載の検査方法は、請求項 1 記載の検査方法において、E - カドヘリン分解物が可溶性E - カドヘリンであることを特徴とする。

また、請求項 3 記載の検査方法は、請求項 1 記載の検査方法において、被検試料が喀痰であることを特徴とする。

また、請求項 4 記載の検査方法は、請求項 1 記載の検査方法において、E - カドヘリン分解物に反応性を有する抗体を用い、免疫学的手法によることを特徴とする。

また、本発明の気管支喘息発作の検査用キットは、請求項 5 記載の通り、被検試料中のE - カドヘリン分解物の存在量に基づいて気管支喘息発作の検査を行うために、少なくともE - カドヘリン分解物に反応性を有する抗体を含有することを特徴とする。

【 0 0 0 6 】

【 発明 の 実施 の 形 態 】

本発明の気管支喘息発作の検査方法は、被検試料中のE - カドヘリン分解物の存在量に基づくことを特徴とする。上述の如く、気管支喘息発作の際には、気道上皮細胞に発現したE - カドヘリンが分解し、その分解物が細胞から離脱する。従って、健常人や気管支喘息患者であっても発作の兆候が見られない患者では、被検試料中の細胞から離脱したE - カドヘリン分解物の含量は皆無か皆無に等しい。一方、気管支喘息発作を起すとその含量は増加する。故に、E - カドヘリン分解物をマーカーとし、被検試料中にE - カドヘリン分解物がどれだけ含まれているかを検出することで、患者の病態がどのような状態にあるかを見極めることが可能となり、その状態に応じた治療・処置を行うことが可能となる。

10

20

30

40

50

【0007】

本発明において、E - カドヘリン分解物とは、気管支喘息発作の際に気道上皮細胞から離脱し、被検試料中に含まれてくるE - カドヘリン由来のタンパク質、ペプチドなどを意味するが、主要な分解物は可溶性E - カドヘリンである。可溶性E - カドヘリンは、E - カドヘリンの細胞外領域部分であり、分子量が約85 kDaのタンパク質である。E - カドヘリンの分解は、好酸球などの炎症細胞に由来する種々の因子によって引き起こされるプロテオリシスによるものと考えられる。

【0008】

被検試料は、体外診断医療において採取されうる試料であれば特に限定されるものではなく、例えば、喀痰（誘発喀痰を含む）、気道洗浄液、血清、血漿、尿などが挙げられるが、被検試料調製の容易性や患者への負担軽減の観点からは喀痰が望ましい。喀痰はそのまま被検試料として用いてもよいし、遠心分離などを行うことで喀痰から得られる上清を用いてもよい。

10

【0009】

被検試料中のE - カドヘリン分解物の存在量を検出する方法は特に限定されるものではないが、E - カドヘリン分解物に反応性を有する抗体を用い、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ、免疫比濁法、ラテックス凝集法、ウエスタンブロット法などの免疫学的手法によることが簡便性などの点において望ましい。なお、いずれの手法を用いる場合でも、各手法における一般的な手順に従って行えばよい。

20

【0010】

E - カドヘリン分解物に反応性を有する抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、また、抗体由来動物は、マウス、ラット、ウサギなど一般に用いられる動物で特段の不都合はない。また、かかる抗体に対して、当業者において公知の技術を用いて、適宜に断片化、標識化、固定化、修飾化などの処理を施してもよい。実用的な抗体としては、例えば、可溶性E - カドヘリンに特異的反応性を有する、ラット由来のモノクローナル抗体であるECCD - 2、マウス由来のモノクローナル抗体であるHECD - 1やSHE78 - 7（以上、宝酒造）などが挙げられる。

【0011】

例えば、それぞれ異なる抗原決定部位を認識するECCD - 2とHECD - 1を用い、一方をマイクロプレートなどの固相に吸着し、他方をペルオキシダーゼ酵素で標識することによってサンドイッチタイプのエンザイムイムノアッセイシステムを構築することができる。この場合、ECCD - 2とHECD - 1の他、免疫学的手法において通常用いられる種々の補助剤、例えば、酵素活性測定基質、反応停止剤、洗浄剤などをまとめてキットとしておくことにより、気管支喘息発作の検査をより簡便に行うことができる。

30

【0012】

被検試料中のE - カドヘリン分解物の存在量から患者の病態がどのような状態にあるかを見極めるために、例えば、被検試料中のE - カドヘリン分解物の存在量を検出するための検量線を作成し、健常値との比較を行ってもよい。この場合、検量線の作成においては、必要に応じて被検試料中のアルブミンなどで補正を行ってもよい。

以下の実施例において、本発明の気管支喘息発作の検査方法を詳細に説明するが、本発明は以下の記載に何ら制限されるものではない。

40

【0013】

【実施例】

（実験方法）

1．モルモット喘息モデルの作成：

本発明者らによって報告された手順（Uchida, Y. et al.; J.Pharmacol.Exp.Ther.277:1622-1629,1996）に従って作成した。簡単に説明すると以下の通りである。体重250g～300gの雌のハートレイ系モルモット（SLCファーム）に対し、シクロホスファミドを30mg/kg腹腔内投与して前処理を行った。2日後に100mgの水酸化アルミニウムに1mgの卵アルブミン（OVA）を乳化後、これを腹腔内注射して感作を行った。

50

感作を行ってから3週間後、ブースターとして100mgの水酸化アルミニウムに10μgのOVAを乳化したものを腹腔内注射した。ブースター投与から3週間後、モルモットにOVA(OVA2mg/ml食塩水)を吸入させて抗原暴露を行い、喘息発作を起させ、モデルとした。

【0014】

2. 細胞間透過性の測定:

モルモット喘息モデルを4群(抗原暴露前、抗原暴露後30分、3時間および6時間の各測定群)に分け(1群3匹)、以下のようにして行った。

抗原暴露前、抗原暴露後30分、3時間および6時間に、モルモットに50mg/kgのペントバルビタールを腹腔内注射し、麻酔下で刺絡して犠牲にし、Rnagaraらによって報告された手順(Rnaga, V. et al.; Am.Res.Respir.Dis.28:1065-1070,1983)に従って行った。簡単に説明すると以下の通りである。2.5mgの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(シグマ; type IV)を0.5mlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.4)に溶解し、これを1mlシリンジに装着した27G針を用いて気管上部に滴下した。5分後に滴下位置末端の気管部分を除去し、これを2.0%のグルタルアルデヒドを含有する0.1Mリン酸緩衝液(PB)(pH7.4)中に浸漬固定化した。その後、これを縦方向に3片に分割し、PBで徹底的にゆすいだ。HRPは、ジアミノベンジジン(シグマ; 3,3'-ジアミノベンジジントラ塩酸、グレードII)(DAB)(同仁化学研究所)を含有する、0.01%の過酸化水素を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)を用いて組織を30分間処理することによって視覚化した。

組織を再度PBでゆすいだ後、1%四酸化オスニウム水溶液で1時間固定化し、アルコール、引き続いてプロピレンオキシドで脱水し、その後、エポキシ樹脂(商品名)(デュボン)に包埋した。ガラスナイフで分割した厚さ1μmのセミチン(準超薄: semi-thin)細片をトルイジンブルーで着色した。近位細胞間空隙の数は、1細片あたり1000以上であった。これらの空隙数は、光学顕微鏡で数えた。細胞間透過性は、HRPが浸透した細胞間空隙の百分率で示した。ウルトロトームIII(LKB)を使用し、ダイヤモンドナイフで分割した厚さ100nmの超薄細片は、H-7000電子顕微鏡(日立)で観察した。

【0015】

3. 免疫組織学的分析:

上記と同様にして抗原暴露前、抗原暴露後30分および6時間にモルモットを犠牲にした。すぐに気管を除去し、10%リン酸緩衝ホルマリン(和光純薬)を用いて2時間固定化を行った。得られた標本をPBSで洗浄し、5%、10%、20%の蔗糖を含むPBS中でインキュベートした後、凍結させた。厚さ10μmの風乾低温保冷細片を緩衝液(0.5M塩化ナトリウム、0.02Mトリス、0.01M塩化カルシウム、0.1% Tween 20、pH7.4)で5分間洗浄して再度水和した後、内因性のペルオキシダーゼをブロックするために30分間0.3%の過酸化水素を含むメタノールとともにインキュベートした。得られた標本は、正常ヤギ血清(ダコ・ジャパン)とダコ・プロテイン・ブロック・シーラムフリー(商品名)(ダコ・ジャパン)との混合物で1時間ブロックした後、緩衝液で洗浄した。

可溶性E-カドヘリンを検出するために、E-カドヘリンの細胞外領域に対して特異性を有するラット由来のモノクローナル抗体であるECCD-2(宝酒造)を一次抗体として用いた。細片を上記の抗体とともに室温で30分間インキュベートした。緩衝液を用いて細片を3回洗浄した後、ビオチン化ヤギ由来抗ラット二次抗体(オルガノンテクニカ)とインキュベートし、続いて、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(ベクターラボラトリーズ)とともにインキュベートした。

免疫反応部位は、DABと過酸化水素を含む溶液に細片を浸漬することによって視覚化した。

電子顕微鏡分析のために、細片を2.5%のグルタルアルデヒドを含有する0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)で2時間固定化した後、DABと反応させた。その後

、細片を2%四酸化オスニウム水溶液で4時間固定化し、エタノール(50% - 100%)、引き続きプロピレンオキシドで脱水し、その後、Poly/Bed 812樹脂(ポリサイエンス)に包埋した。ウルトロトーム LKB 2088(エルケービープロダクター)を使用し、ダイヤモンドナイフで分割した厚さ150nmの超薄細片は、H-7000電子顕微鏡で観察した。

【0016】

4. ウエスタンブロット分析:

上記と同様にして抗原暴露前、抗原暴露後1時間、3時間および6時間にモルモットを犠牲にした。すぐに気管を除去し、除去した気管の内腔側をプロテアーゼ阻害剤のカクテル(商品名complete)(ベーリンガーマンハイム)を含む0.5mlの氷冷PBSで洗浄することで気管洗浄液を集めた。この気管洗浄液に対して4で5分間400xgにて遠心分離を行い、その後、セントリコン10(商品名)(ミリポア)を用いて10倍に濃縮した。その濃縮液を同じ容量のローディング緩衝液(125mMトリス-塩酸、pH6.8; 4%ドデシル硫酸ナトリウム塩、20%グリセロール、0.05%ブロムフェノールブルー、5% -メルカプトエタノール)と混合し、そして3分間沸騰させた。得られたサンプルについて、アクリルアミドゲル(バイオ-ラッドラボラトリーズ)上でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをPVDF膜(バイオ-ラッドラボラトリーズ)上に移した。ゲルを移したPVDF膜を5%の乾燥ミルク粉末を含む緩衝液で1時間ブロックした後、ECCD-2とともに室温で30分間インキュベートした。緩衝液を用いてこれを3回洗浄した後、ビオチン化ヤギ由来抗ラット二次抗体とインキュベートし、続いて、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体とともにインキュベートした。

【0017】

(実験結果)

1. 細胞間透過性:

細胞間透過性の測定において、抗原暴露前には細胞間空隙ではHRP反応がほとんど見られなかった。抗原暴露30分後及び6時間後では細胞間空隙の広範囲にわたってDAB沈積物が観察された。しかし、抗原暴露3時間後ではあまり観察されなかった。抗原暴露後30分及び3時間での上皮では狭い細胞間空隙であった。一方、抗原暴露後6時間後での上皮の細胞間空隙はこれより広がっていた。

細胞間空隙におけるHRPの透過は、抗原暴露後30分で見られ、抗原暴露後3時間では急速に減少し、その後、抗原暴露後6時間で再び増加した。

【0018】

2. 気道上皮におけるE-カドヘリンの局在化:

免疫組織学的分析において、抗原暴露前と抗原暴露後30分ではE-カドヘリン免疫反応は細胞質内に広がって拡散しており、特に、接着結合(アドヘレンスジャンクション)が存在する上皮細胞の側膜や側膜頂端に局在化していた。しかしながら、抗原暴露後6時間では上皮細胞の側膜における免疫反応は減少していた。

【0019】

3. 気管洗浄液中の可溶性E-カドヘリンの検出:

上記のように、免疫組織学的分析において、抗原暴露後6時間では接着結合部位におけるE-カドヘリン免疫反応が減少していることが明らかになったので、ウエスタンブロット分析により気管洗浄液中の可溶性E-カドヘリンの検出を行ったところ、抗原暴露前、抗原暴露後1時間及び3時間では検出できなかった分子量約85kDaの可溶性E-カドヘリンが抗原暴露後6時間で検出された。

【0020】

(まとめ)

抗原暴露後6時間では、気道上皮細胞に存在するE-カドヘリンが分解し、その細胞外領域である可溶性E-カドヘリンが細胞から脱離することによって、気管洗浄液に含まれてくることが判明した。この時、気道上皮の細胞間空隙が広がり、HRPの透過性が増加す

るのは、E - カドヘリンの分解によって、細胞間接着機能が損なわれることに起因するものと考えられた。

気管支喘息発作は抗原暴露直後に見られる即時型反応と抗原暴露後約6時間頃に見られる遅発型反応に大別され、ヒトの発作においては、遅発型反応がより重要視されている。上記の実験により、遅発型反応時には、E - カドヘリンの細胞外領域が切断されること、それとともに水分などが気道内に滲出すること、E - カドヘリンが分解されることによって細胞間空隙が広くなること、切断された可溶性E - カドヘリンが気道内に増加することなどが明らかとなった。

事実、本発明者は気管支喘息発作患者の喀痰中には可溶性E - カドヘリンが健常人よりも多く含まれていること、また、病態が重症になる程高値を呈することを確認した。従って、この現象を利用すれば、臨床検査分野において、喀痰や気道洗浄液などの被検試料中に可溶性E - カドヘリンどれだけ含まれているかを検出することで、発作が生じているかなど、気管支喘息患者の病態がどのような状態にあるかを見極めることが可能となる。

10

【0021】

【発明の効果】

本発明によれば、E - カドヘリン分解物をマーカーとし、被検試料中にE - カドヘリン分解物がどれだけ含まれているかを検出することで、発作が生じているかなど、気管支喘息患者の病態がどのような状態にあるかを見極めることが可能となり、その状態に応じた治療・処置を行うことが可能となる。

フロントページの続き

- (56)参考文献 Am Rev Respir Dis , 1 9 9 3年 , Vol.148, No.6, Pt.2, Page.S31-S37
J Allergy Clin Immunol , 1 9 9 8年 , Vol.101, No.1, Part.2, Page.S111 459
Am J Respir Cell Mol Biol , 2 0 0 0年 1 2月 , Vol.23, No.6, Page.712-718
週間医学のあゆみ , 1 9 9 5年 , Vol.174, No.1, Page.56-61
呼吸 , 1 9 9 5年 , Vol.14, No.5, Page.464-474

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G01N 33/53
G01N 33/577
CABIus/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)