

炎症反応惹起物質の検出方法

摂南大学 薬学部 薬学科
教授 山岸 伸行

2021年3月11日

Smart and Human

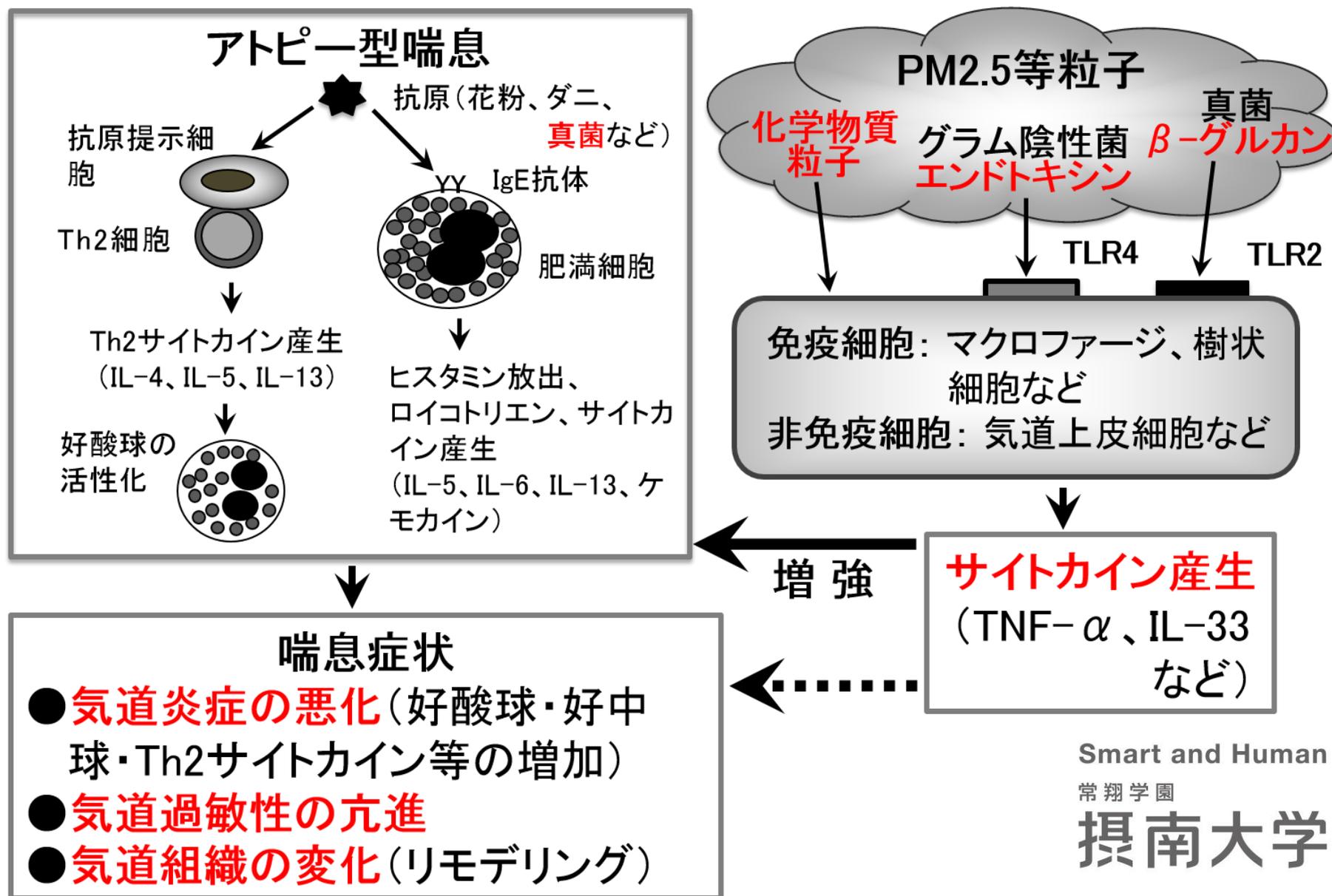
常翔学園

摂南大学 

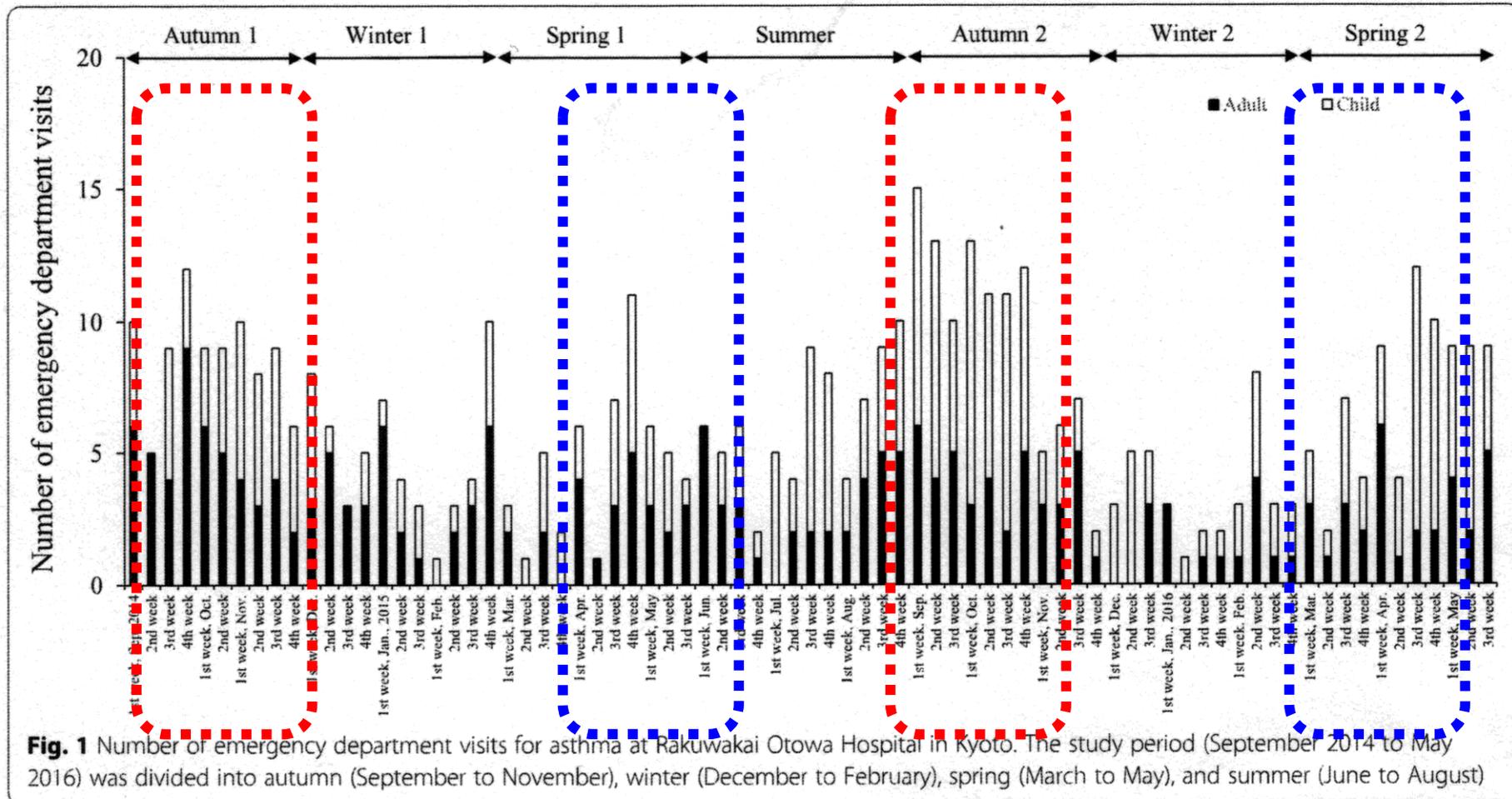
研究分野の概要

本技術は、医薬品、食品、化粧品、生体試料、大気中浮遊物、ハウスダスト、水などに含まれる炎症反応惹起物質や、医療器具、医薬又は食品の製造装置などに付着した炎症反応惹起物質を検出する方法、並びにそれに用いるレポーター発現カセット及びレポーター細胞に関するものである。

大気粉塵による気管支喘息増悪機構



喘息発作来院患者数（京都市）



M.S. Khan, S. Coulibaly, T. Matsumoto, Y. Yano, M. Miura, Y. Nagasaka, M. Shima, N. Yamagishi, K. Wakabayashi, T. Watanabe (2018) Association of airborne particles, protein, and endotoxin visits for asthma in Kyoto, Japan. *Environ. Health Prev. Med.* 23 (1) 41. with emergency department

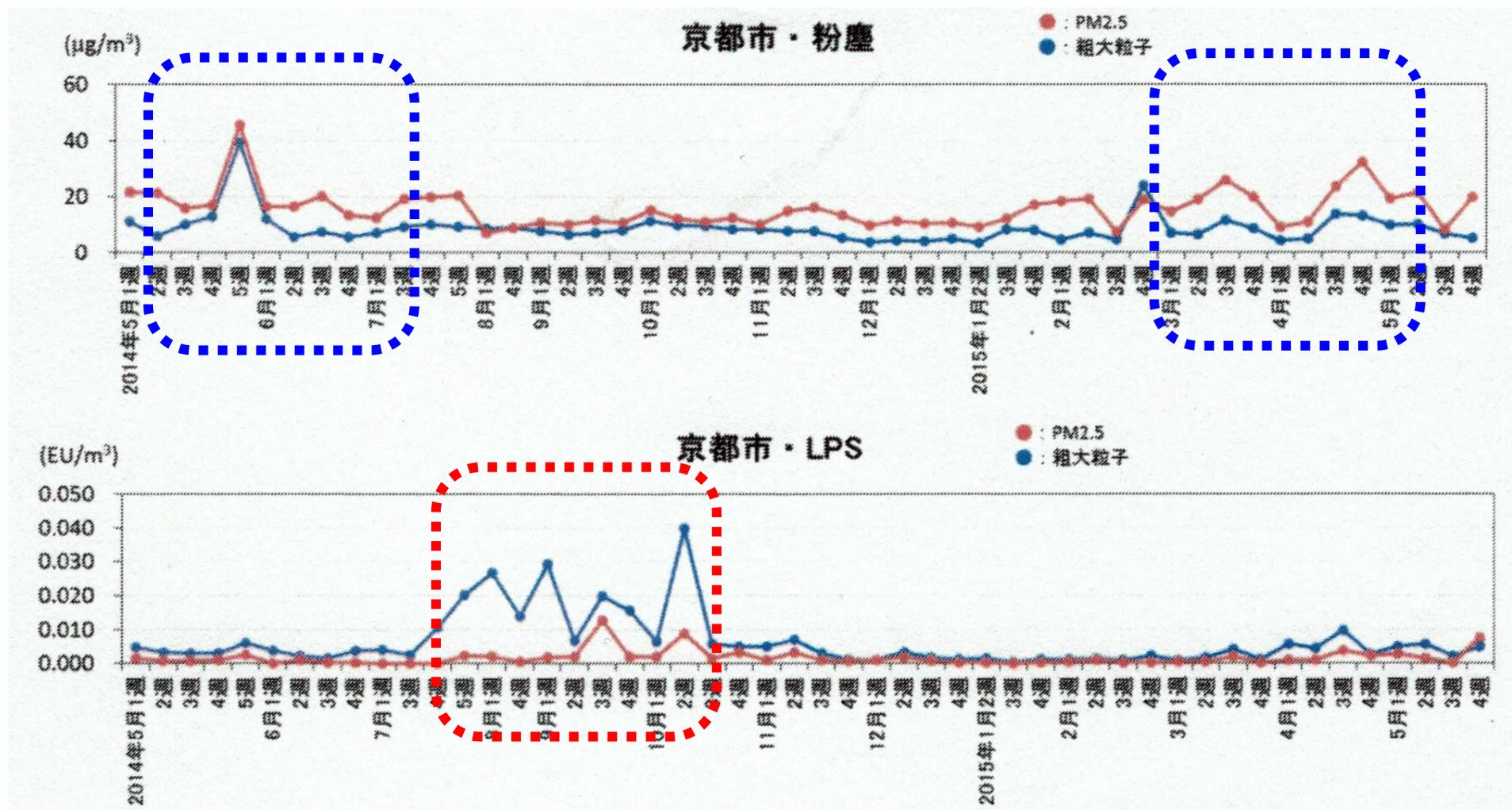
Smart and Human

常翔学園

摂南大学



大気中の粉塵およびエンドトキシン量

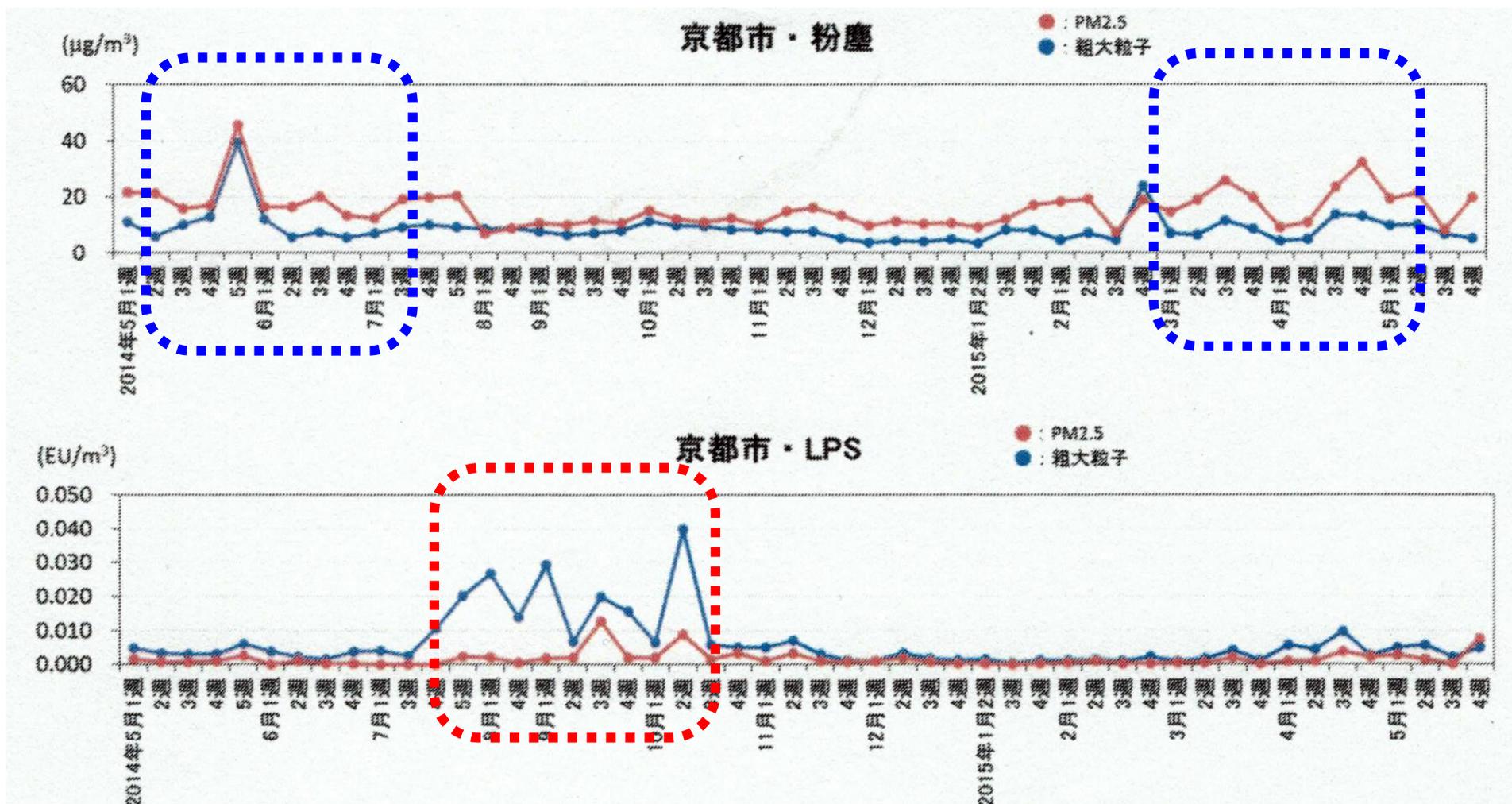


Smart and Human

常翔学園

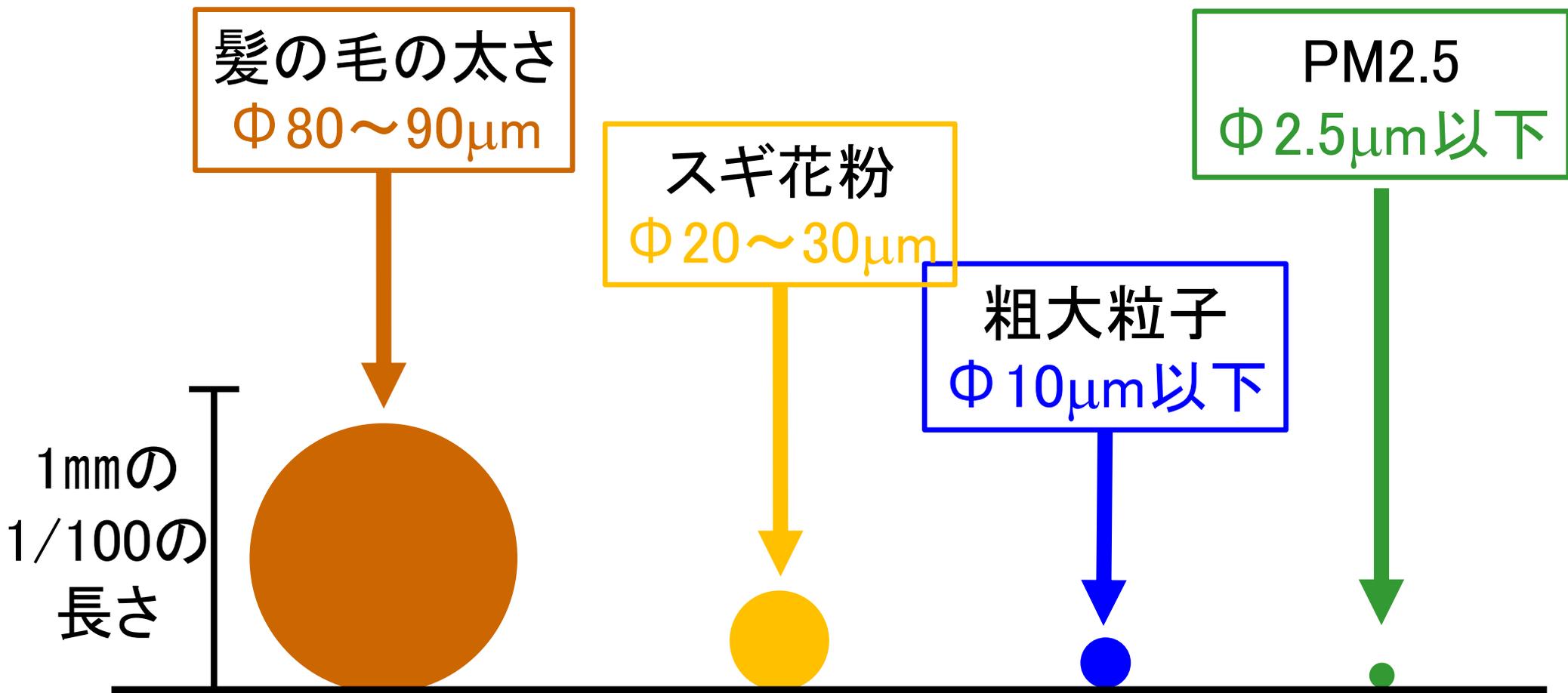
摂南大学 

大気中の粉塵およびエンドトキシン量



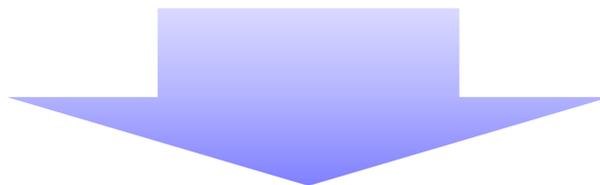
秋季での喘息発作患者数の増加に大気中エンドトキシン量の上昇が関与することが示唆された

大気粉塵の粒子サイズ



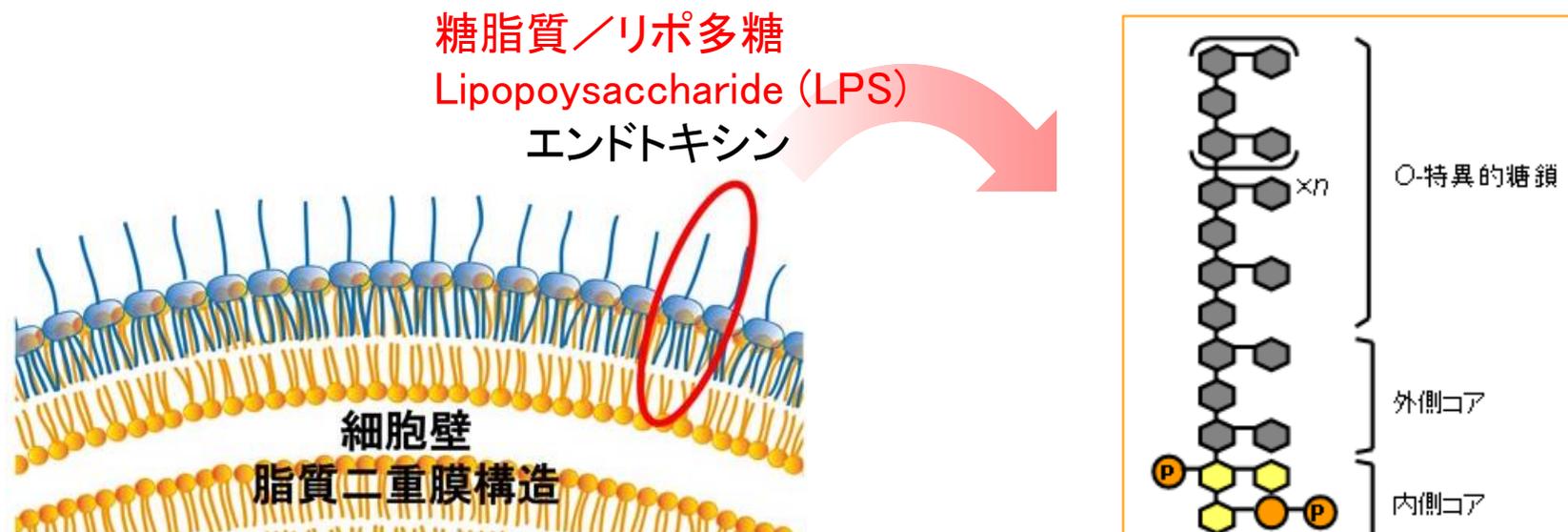
大気粉塵中の喘息増悪因子のモニタリング

大気中に含まれる黄砂やPM2.5などの浮遊粒子状物質は、循環器疾患、呼吸器疾患、アレルギー疾患の発病・増悪に関与する。



- 粉塵量をモニタリングするだけでは不十分
- 生物学的活性を測定できる評価系が必要

リポポリサッカライド: グラム陰性細菌に共通の外膜成分



マクロファージ、樹状細胞、気道上皮細胞等を活性化し、
炎症反応を惹起する



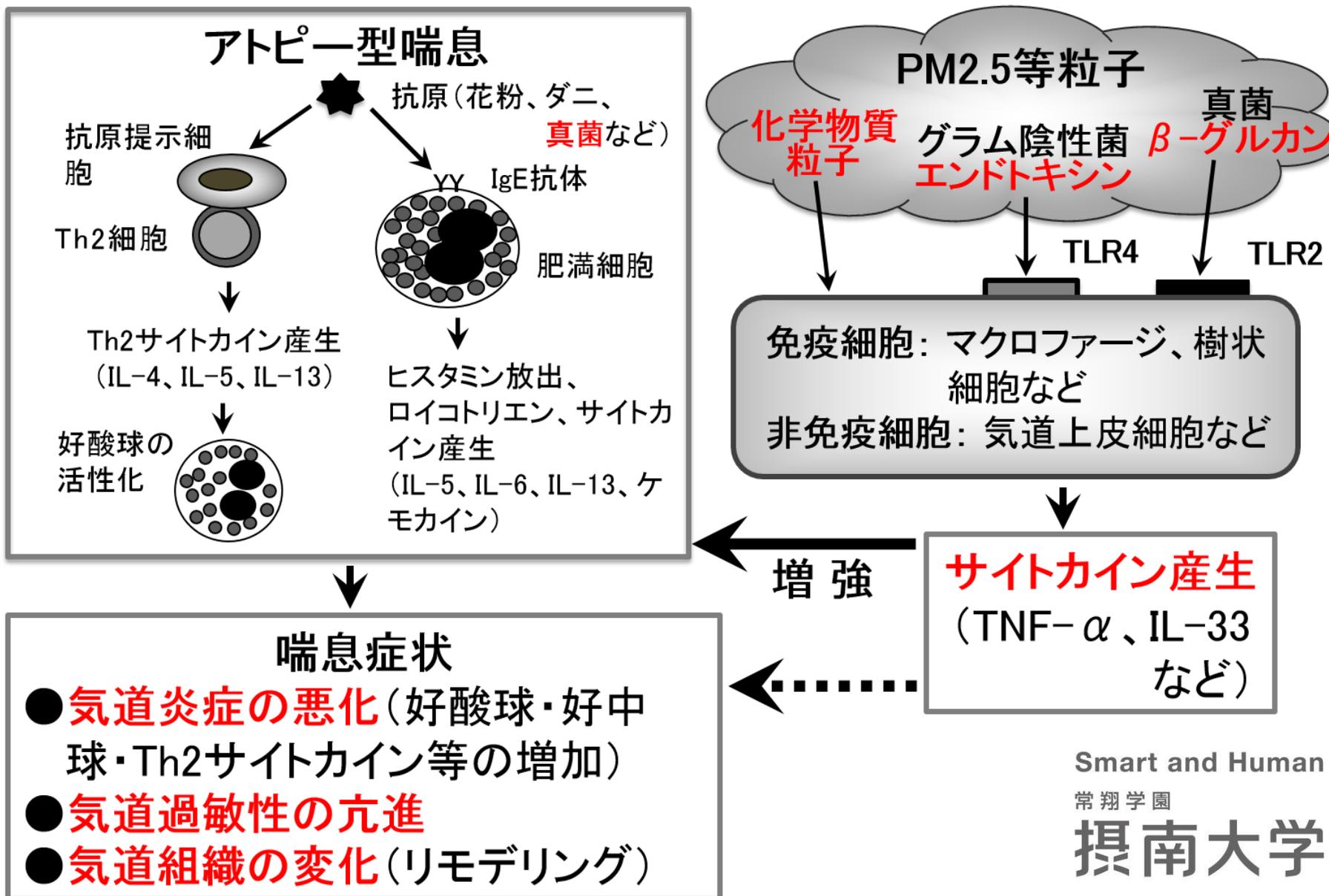
Smart and Human

常翔学園

摂南大学



大気粉塵による気管支喘息増悪機構



従来技術とその問題点①

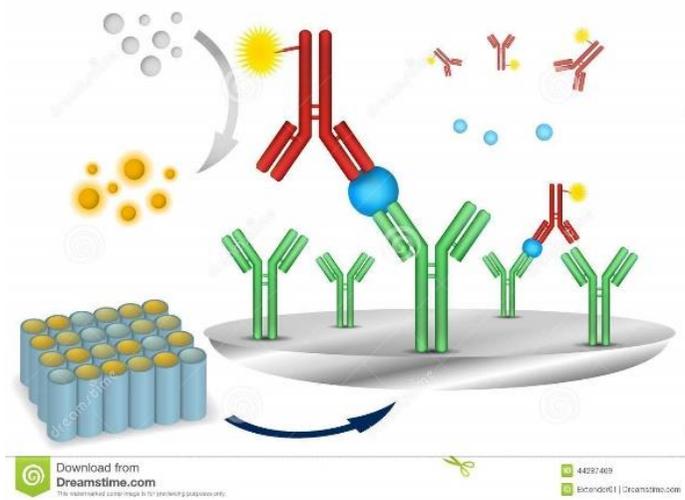


ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

TNF-a, IL6, IL33などの炎症性サイトカインを定量する試薬が既に多く実用化されている。

炎症反応惹起物質によって産生された炎症性サイトカインそのものを定量できる

- ・試薬が高価
- ・測定終了までに時間がかかる
- ・操作が煩雑
- ・感度

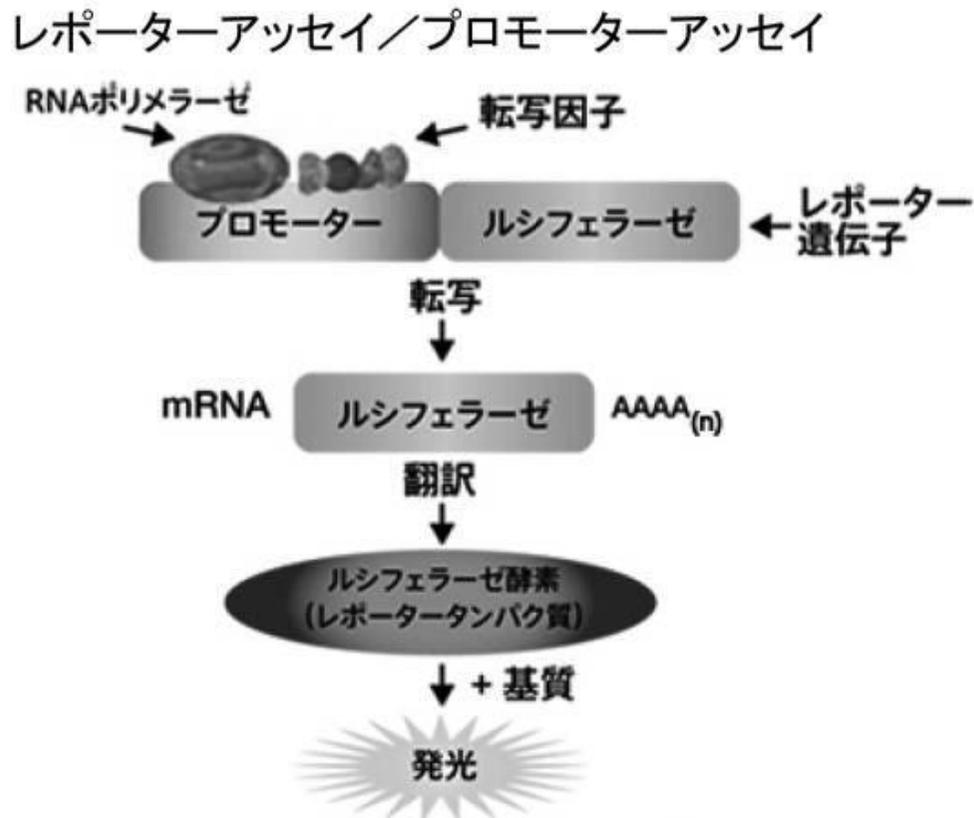


Smart and Human

常翔学園

摂南大学 

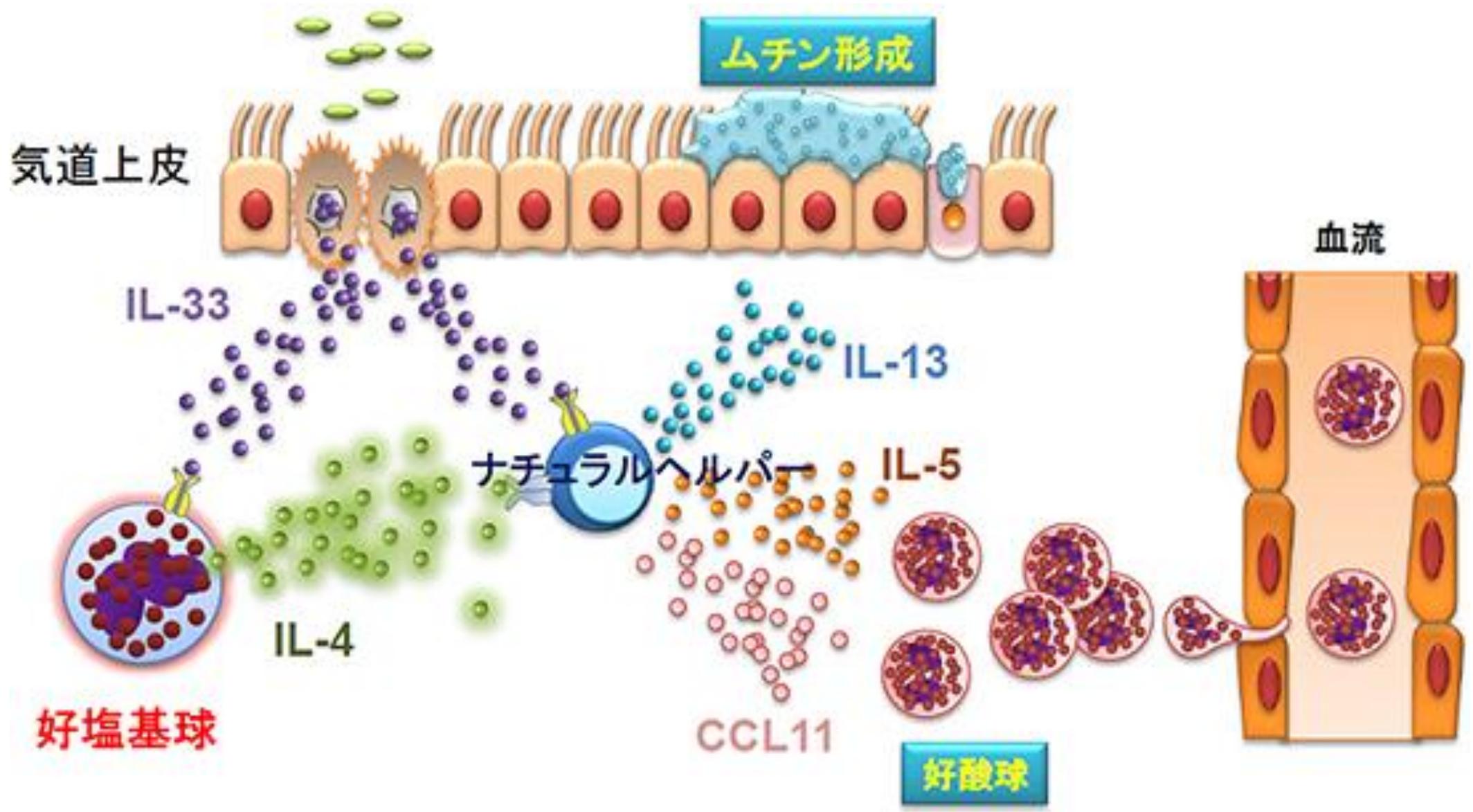
従来技術とその問題点②



発光シグナル＝ルシフェラーゼ発現量＝プロモーター活性

IL-8遺伝子のプロモーター配列と、
該プロモーター配列の下流に作動
可能に連結されたレポーター遺伝
子配列とを有する発現カセットが導
入されたマクロファージ系細胞

- ・浮遊系細胞なので、洗浄作業の際に遠心分離操作が必要
- ・感度



Smart and Human

常翔学園

摂南大学

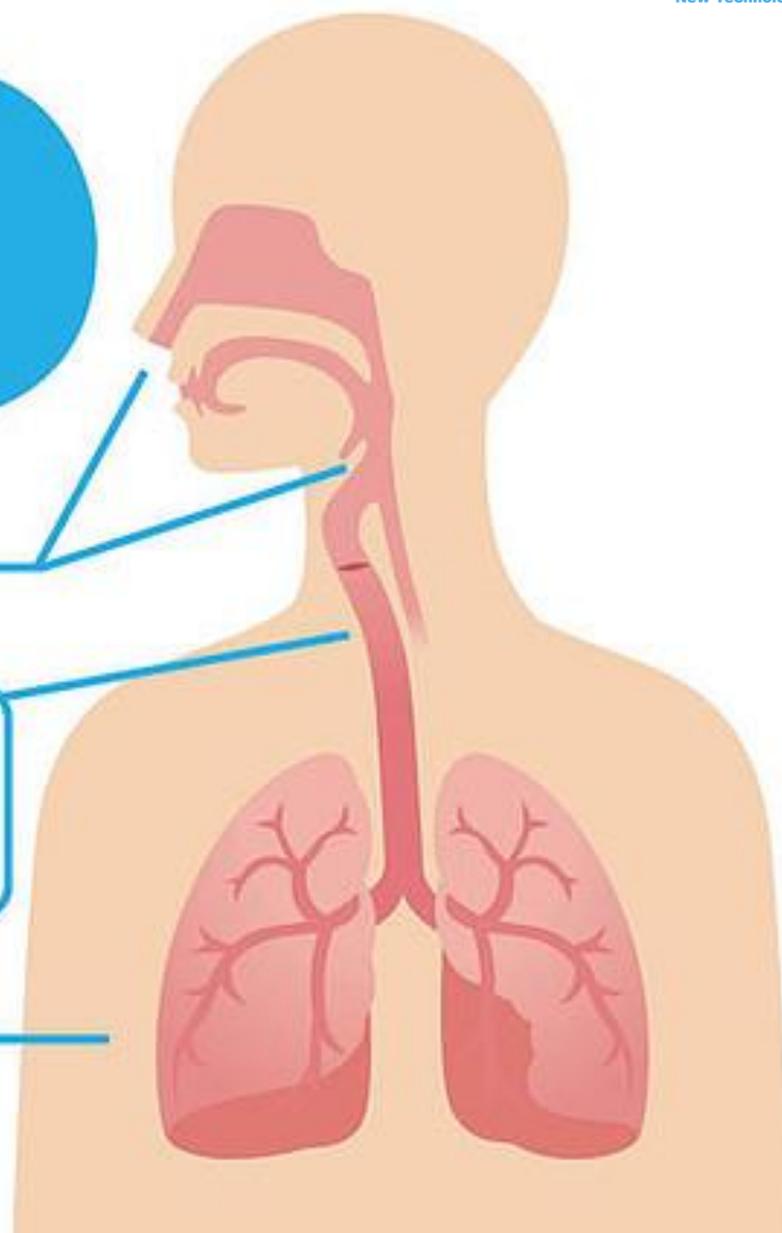


吸い込まれる 粒子のサイズ

鼻・のど
4.7~11 μm

気管支
2.1~4.7 μm

肺胞
2.1 μm 以下

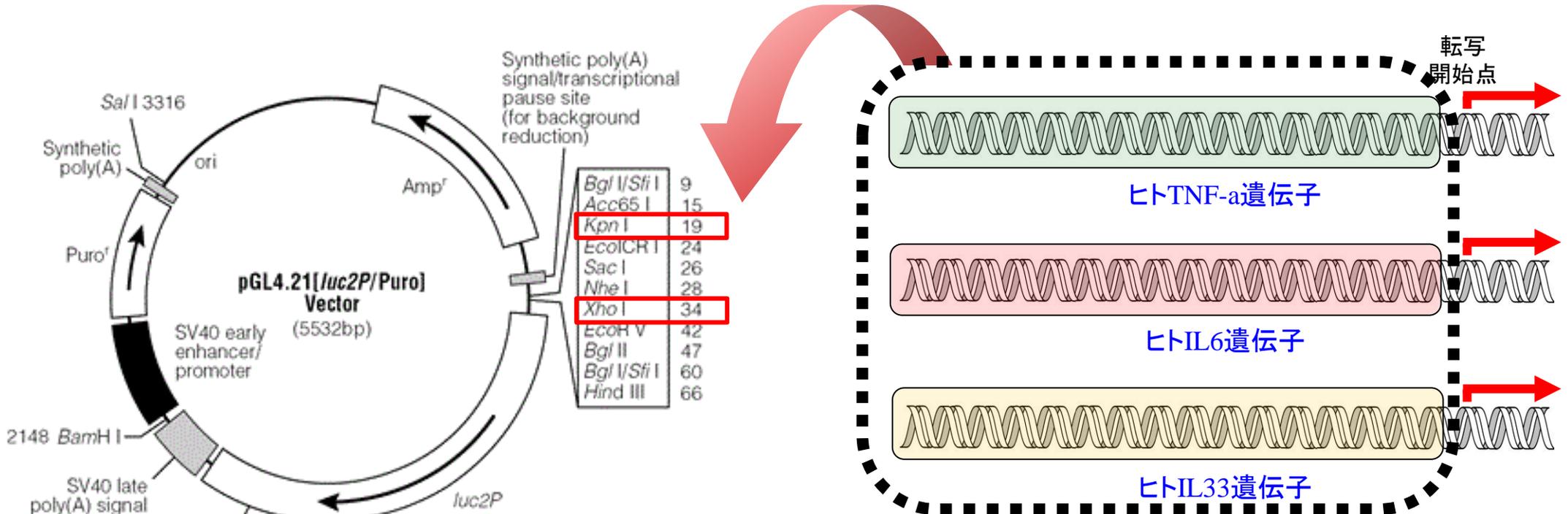


Smart and Human

常翔学園

摂南大学 

炎症性サイトカイン遺伝子レポータープラスミド



各炎症性サイトカイン遺伝子の
転写開始点より上流に位置する
遺伝子プロモーター領域を単離

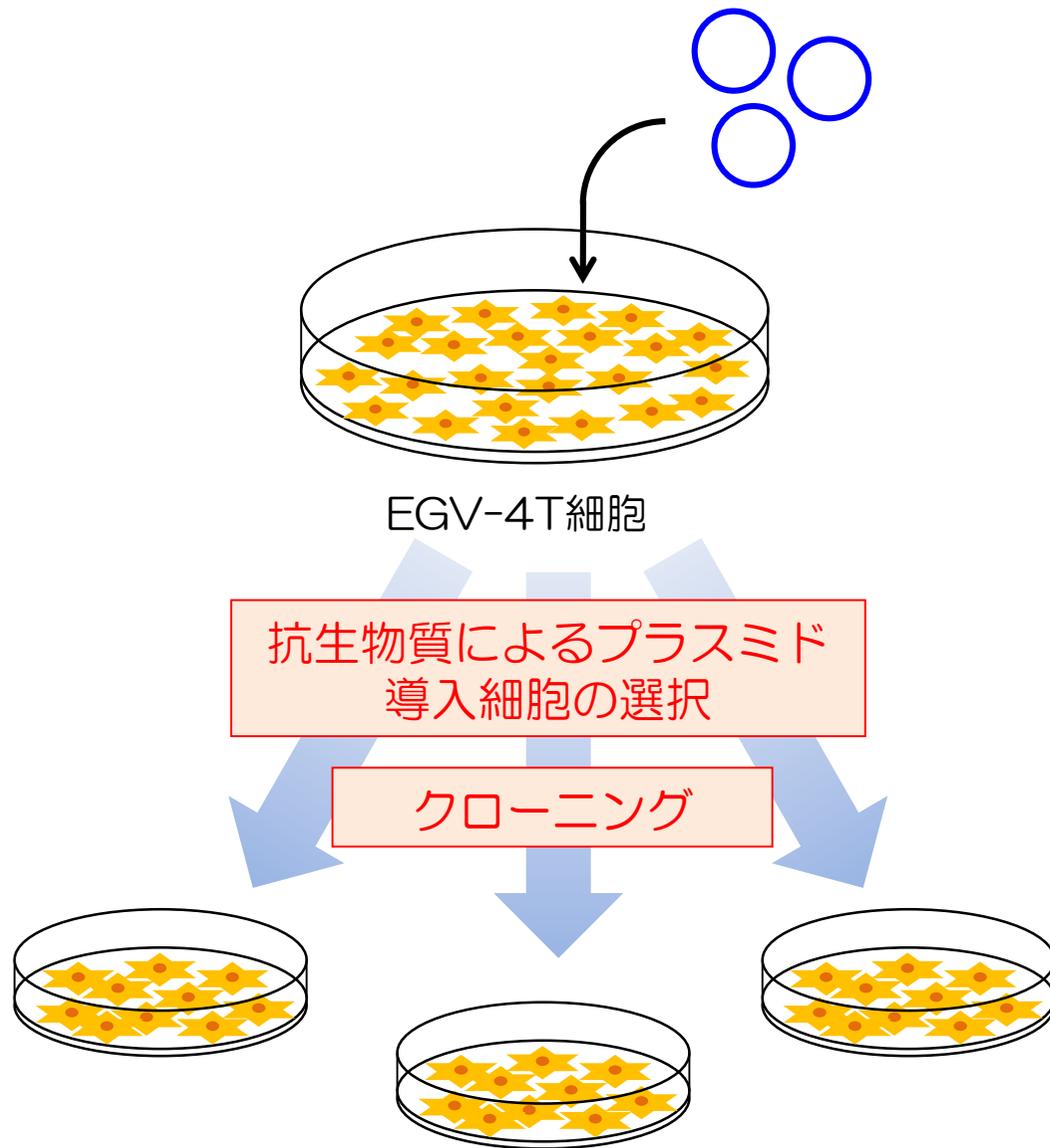
Smart and Human

常翔学園

摂南大学



レポータープラスミドを安定に保持したEGV-4T細胞の選択



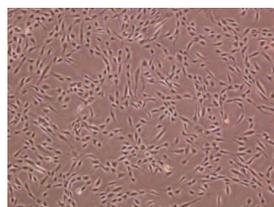
Samples		Luc activity	Absorbance at 595nm			protein concentration	Relative Luc activity		
			①	②	Average				
IL33-V1-1	control 1	1259	0.190	0.189	0.190	4.90	256.88	245.05	1.00
	control 2	1321	0.241	0.197	0.219	5.66	233.23		
	Endotoxin 1	2012	0.184	0.196	0.190	4.91	409.44		
IL33-V1-2	control 1	69.26	0.174	0.162	0.168	4.35	15.94	16.10	1.00
	control 2	72.5	0.188	0.157	0.173	4.46	16.25		
	Endotoxin 1	160.5	0.167	0.141	0.154	3.98	40.30		
IL33-V1-3	control 1	7.747	0.125	0.129	0.127	3.28	2.36	2.43	1.00
	control 2	7.414	0.107	0.122	0.115	2.96	2.50		
	Endotoxin 1	16.7	0.109	0.085	0.097	2.51	6.66		
IL33-V1-6	control 1	1.92	0.111	0.117	0.114	2.95	0.65	0.74	1.00
	control 2	3.076	0.151	0.138	0.145	3.74	0.82		
	Endotoxin 1	8.105	0.143	0.149	0.146	3.78	2.15		
IL33-V5-1	control 1	0.113	0.036	0.050	0.043	1.11	0.10	0.11	1.00
	control 2	0.113	0.039	0.034	0.037	0.94	0.12		
	Endotoxin 1	0.118	0.036	0.034	0.035	0.91	0.13		
IL33-V5-3	control 1	0.03	0.153	0.135	0.144	3.72	0.01	0.01	1.00
	control 2	0.043	0.117	0.092	0.105	2.70	0.02		
	Endotoxin 1	0.2	0.107	0.107	0.107	2.77	0.07		
IL33-V5-4	control 1	0.123	0.158	0.161	0.160	4.13	0.03	0.02	1.00
	control 2	0.015	0.125	0.161	0.143	3.70	0.00		
	Endotoxin 1	0.014	0.142	0.147	0.145	3.74	0.00		
IL33-V5-5	control 1	0.017	0.077	0.064	0.071	1.82	0.01	0.01	1.00
	control 2	0.015	0.029	0.091	0.060	1.55	0.01		
	Endotoxin 1	0	0.109	0.113	0.111	2.87	0.00		
IL33-V5-6	control 1	55.15	0.122	0.097	0.110	2.83	19.47	20.90	1.00
	control 2	38.7	0.067	0.067	0.067	1.73	22.33		
	Endotoxin 1	109.6	0.074	0.086	0.080	2.07	52.97		
IL6-1	control 1	1.242	0.238	0.204	0.238	6.16	0.20	0.21	1.00
	control 2	1.378	0.263	0.229	0.246	6.36	0.22		
	Endotoxin 1	5.634	0.211	0.210	0.211	5.44	1.03		
IL6-2	control 1	0.016	0.170	0.172	0.171	4.42	0.00	0.00	1.00
	control 2	0.017	0.160	0.174	0.167	4.32	0.00		
	Endotoxin 1	0.014	0.163	0.173	0.168	4.35	0.00		
IL6-3	control 1	0	0.158	0.146	0.152	3.93	0.00	0.00	1.00
	control 2	0.015	0.163	0.145	0.154	3.98	0.00		
	Endotoxin 1	0	0.166	0.147	0.157	4.05	0.00		
TNFa-1	control 1	104.6	0.248	0.247	0.248	6.40	16.34	14.80	1.00
	control 2	91.71	0.246	0.289	0.268	6.92	13.26		
	Endotoxin 1	201.5	0.232	0.208	0.220	5.69	35.41		
TNFa-3	control 1	10.26	0.183	0.194	0.189	4.88	2.10	1.93	1.00
	control 2	8.672	0.189	0.195	0.192	4.97	1.75		
	Endotoxin 1	20.42	0.187	0.226	0.207	5.34	3.82		
TNFa-4	control 1	2.01	0.205	0.203	0.204	5.28	0.38	0.39	1.00
	control 2	2.14	0.202	0.203	0.203	5.24	0.41		
	Endotoxin 1	4.248	0.190	0.199	0.195	5.03	0.84		
TNFa-5	control 1	266.4	0.223	0.237	0.230	5.95	44.78	47.06	1.00
	control 2	266.7	0.225	0.193	0.209	5.41	49.34		
	Endotoxin 1	370.2	0.163	0.167	0.165	4.27	86.75		
	control 1	266.7	0.225	0.193	0.209	5.41	49.34	82.12	1.74
	control 2	266.7	0.225	0.193	0.209	5.41	49.34		
	Endotoxin 2	403.8	0.190	0.213	0.202	5.21	77.48		

実験方法

細胞播種

5×10^4 cells/well
(96-well plate)

37°C、5%CO₂下で24時間培養



試料添加

100 μ L



検体調製

細胞をPBSで洗浄後、40 μ L
の細胞溶解液で溶解



ルシフェラーゼ活性

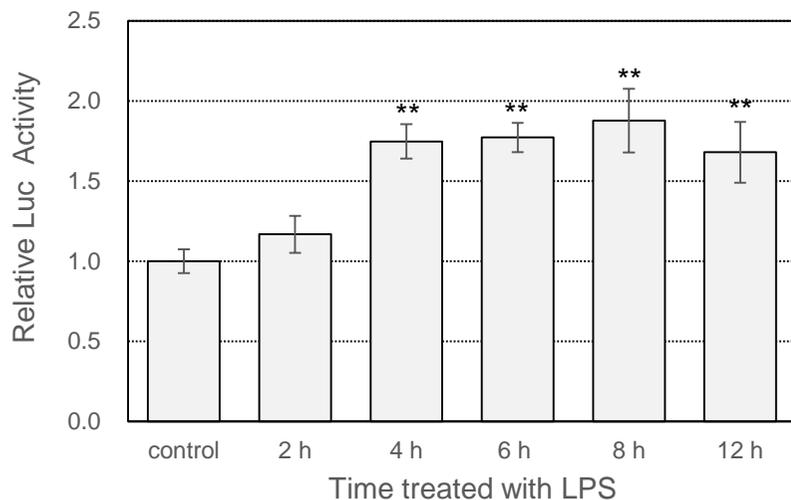
Smart and Human

常翔学園

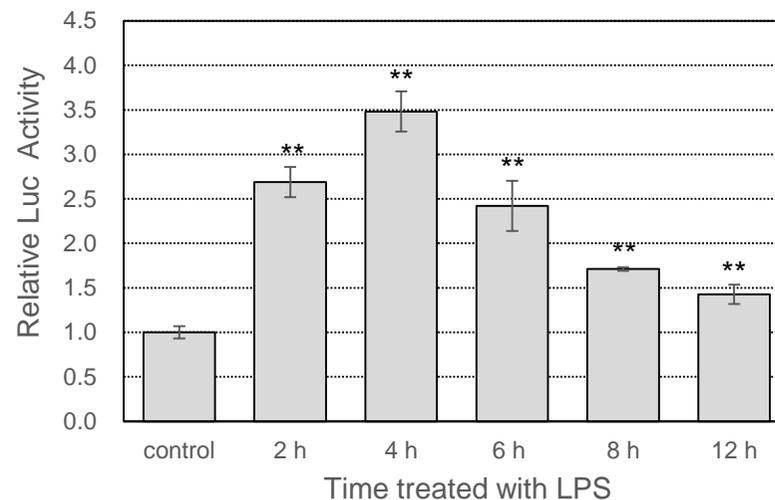
摂南大学

炎症性サイトカイン遺伝子レポータープラスミドを安定に保持した細胞におけるLPS応答性

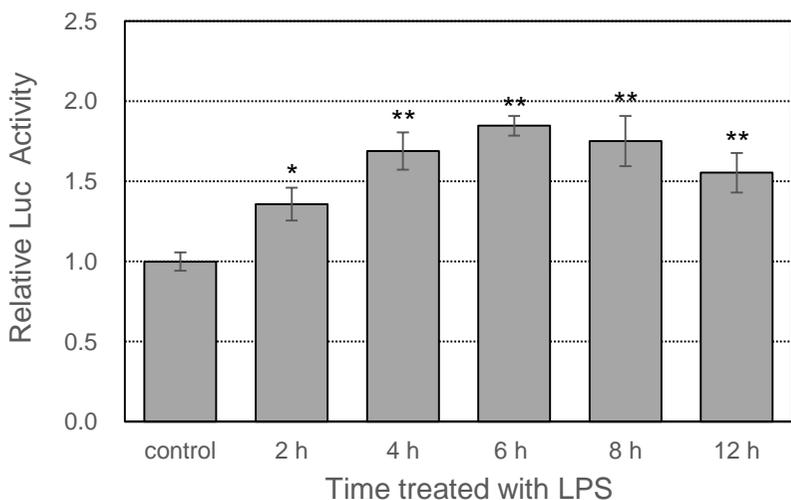
(A) EGV-4T/TNFA-1



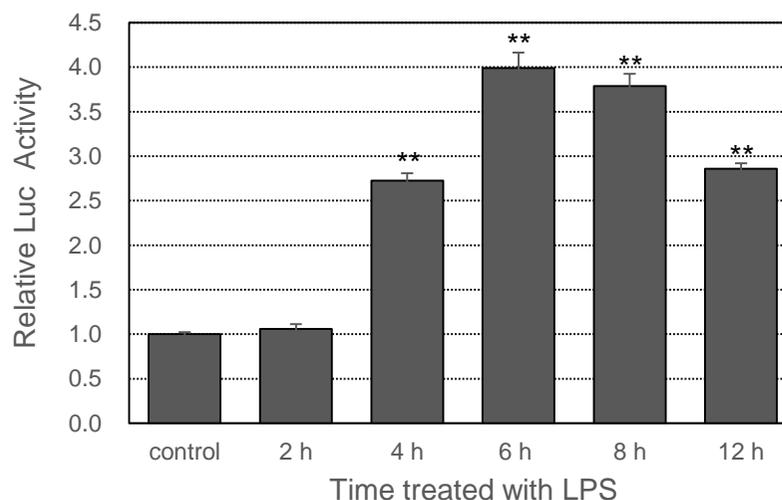
(B) EGV-4T/IL6-1



(C) EGV-4T/IL33v1-6

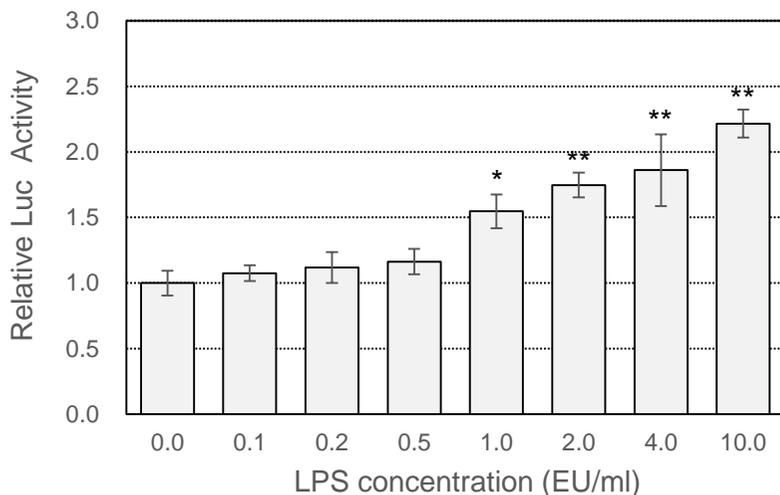


(D) EGV-4T/IL33v5-6

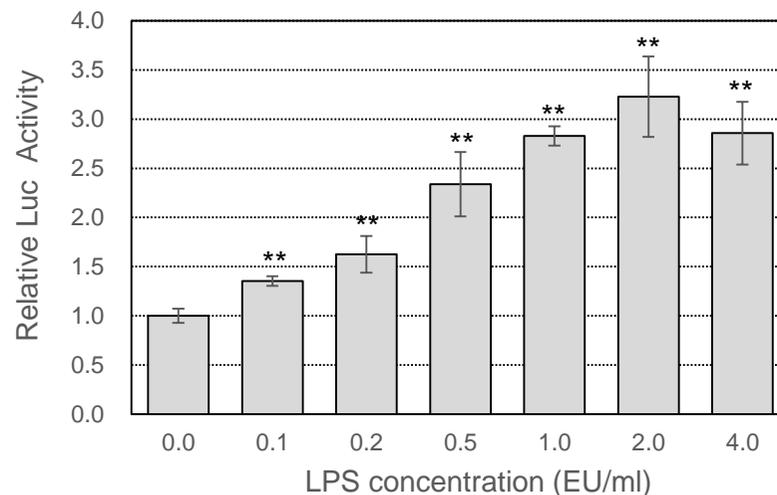


炎症性サイトカイン遺伝子レポータープラスミドを安定に保持した細胞におけるLPS応答性

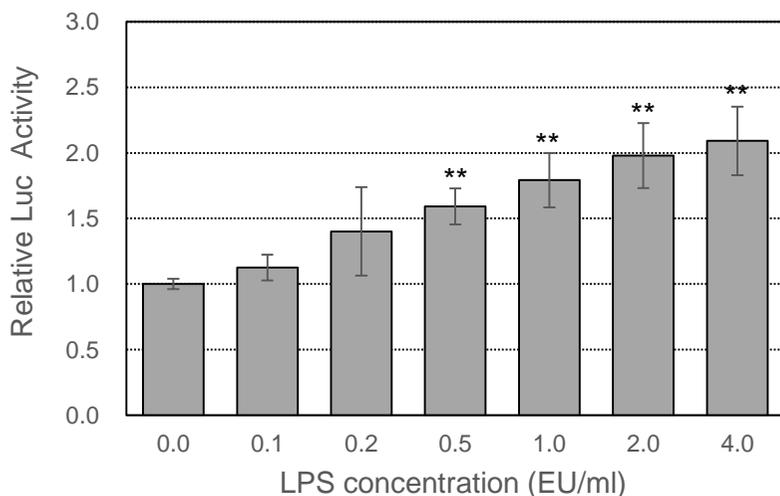
(A) EGV4T/TNFA-1



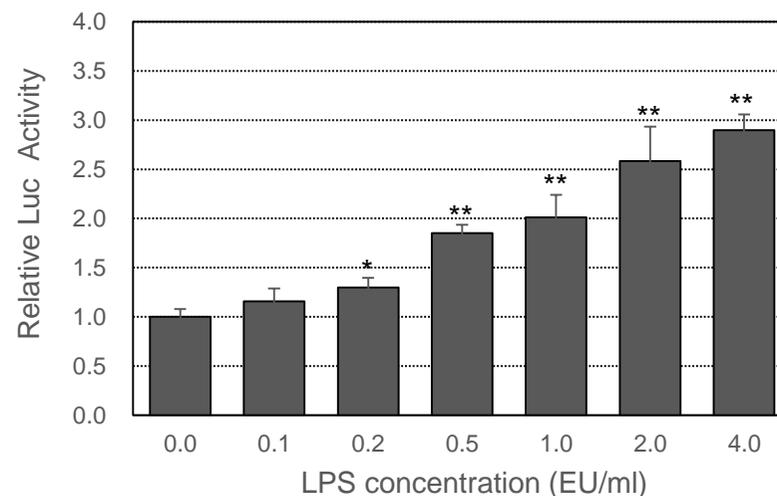
(B) EGV4T/IL6-1



(C) EGV4T/IL33v1-6



(D) EGV4T/IL33v5-6



大気粉塵(佐世保市)量およびエンドトキシン含有量

Sample	Coarse particles		Fine particles	
	Particle ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Endotoxin (EU/m^3)	Particle ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Endotoxin (EU/m^3)
October 4 th week, 2014	13.3	0.0412	14.6	0.0160
June 2 nd week, 2015	16.0	0.0244	13.2	0.0038
October 2 nd week, 2015	18.0	0.0447	17.5	0.0156

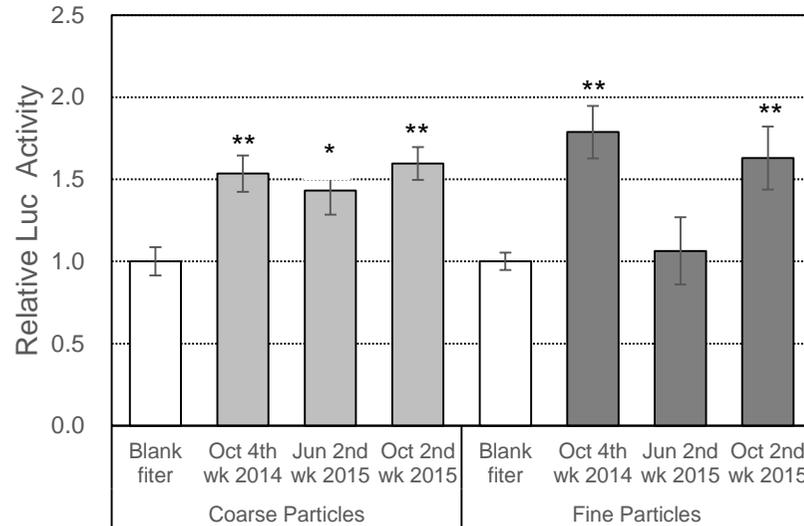
Smart and Human

常翔学園

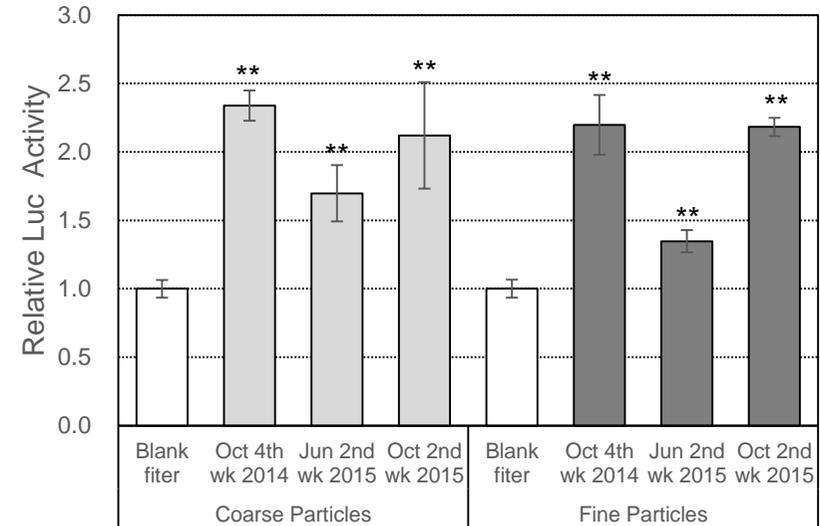
摂南大学 

大気粉塵(佐世保市)曝露による炎症性サイトカイン遺伝子プロモーター活性の誘導

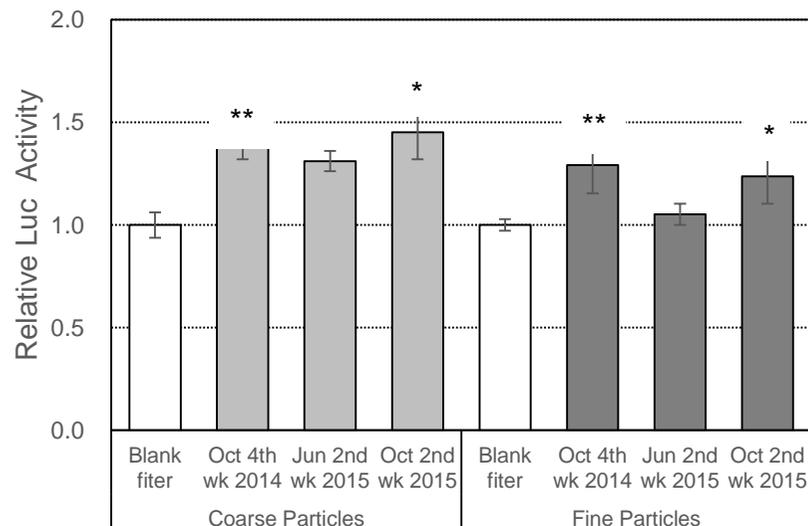
(A) EGV-4T/TNFA-1



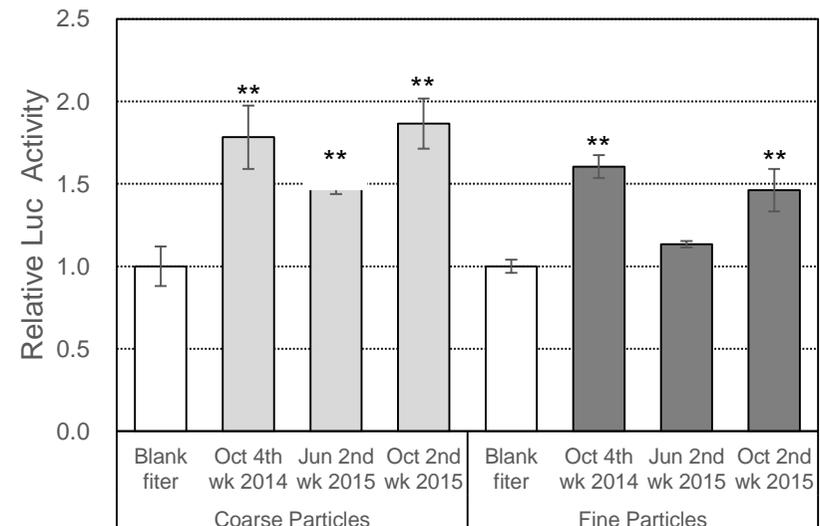
(B) EGV-4T/IL6-1



(C) EGV-4T/IL33v1-6

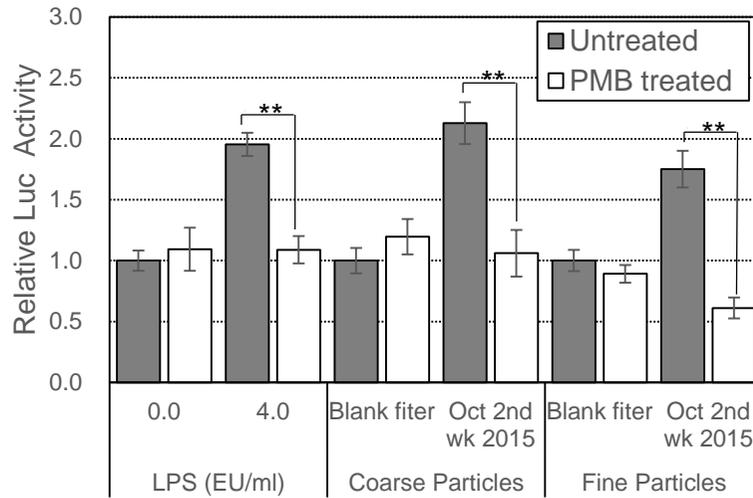


(D) EGV-4T/IL33v5-6

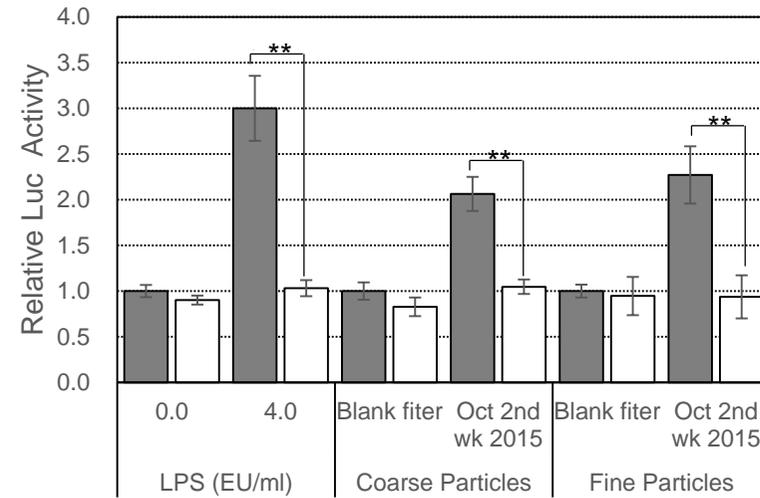


大気粉塵曝露による炎症性サイトカイン遺伝子プロモーター活性の誘導には大気粉塵中のエンドキシンが関与する

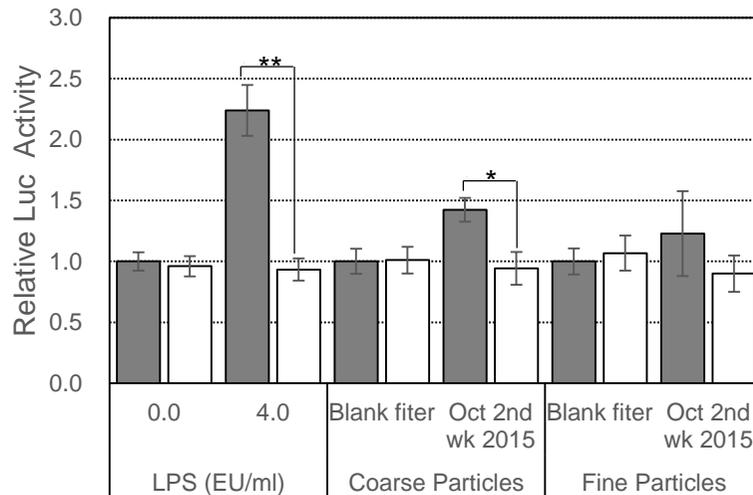
(A) EGV-4T/TNFA-1



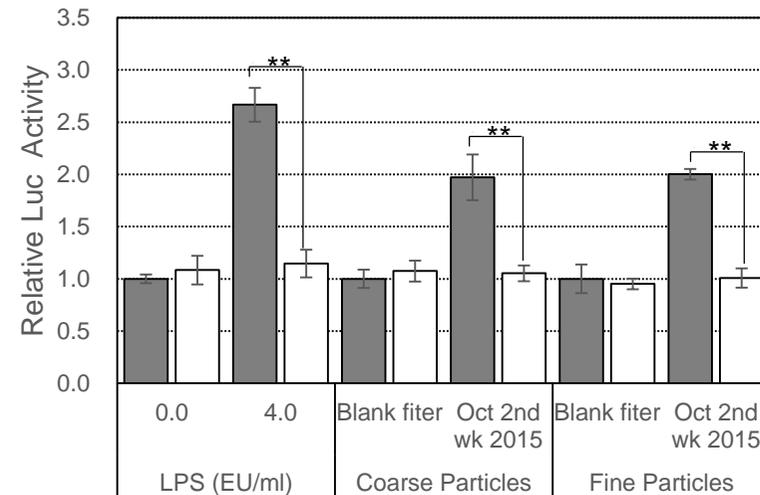
(B) EGV-4T/IL6-1



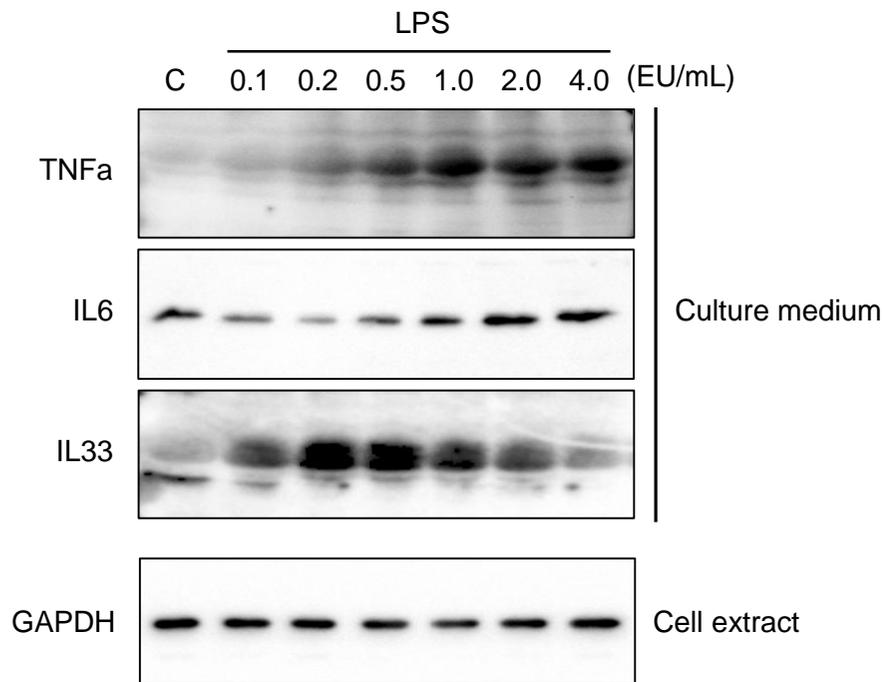
(C) EGV-4T/IL33v1-6



(D) EGV-4T/IL33v5-6



新技術の特徴・従来技術との比較



Antibodies

anti-TNF α monoclonal antibody (52B83, Santa Cruz Biotechnology)
 anti-IL6 monoclonal antibody (10E5, Santa Cruz Biotechnology)
 anti-IL33 monoclonal antibody (EPR17831, Abcam)
 anti-GAPDH monoclonal antibody (5A12, Wako Pure Chemical).

▪ EGV-4T cells, 4×10^5 cells in 1 mL of culture medium



▪ Supernatant was lyophilized and resolved with 100 μ L of 4 x SDS-sample buffer

▪ Cells were lysed with 200 μ L of SDS sample buffer



▪ Aliquots of samples were subjected to PAGE and the separated protein bands were transferred onto Immobilon-P transfer membranes

Smart and Human

常翔学園

摂南大学



新技術の特徴・従来技術との比較

ELISA法との比較

- **迅速化**: 従来技術に比べ、検体試料の細胞への処理時間や試料中の炎症反応惹起物質の検出時間を短縮
- **高い検出感度**
- **低コスト化**: 本技術では、高価な抗体などの試薬を用いないため、測定コストが約1/10～1/100程度まで削減できる。

新技術の特徴・従来技術との比較

従来のレポーター細胞との比較

- **操作性向上**: 従来技術で必要であった複数回の遠心操作が不要
- **検出感度の向上**: 従来のマクロファージ系細胞を用いたレポーター細胞より検出感度が約10~100倍高い
- **低コスト化**

想定される用途

- ・ 炎症反応惹起物質を迅速・高感度に検出できることから、大気中浮遊物（大気中浮遊粒子状物質、花粉、黄砂、粉塵など）、水（水道水、環境水など）などに含まれる炎症反応惹起物質のモニタリングなど環境衛生分野における応用が考えられる。
- ・ 上記以外に、医療器具、医薬又は食品の製造装置などに付着したエンドトキシンの検出など用途に展開することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

大気中に含まれる黄砂やPM2.5など浮遊粒子状物質の健康影響をリアルタイムでモニタリングできるシステム構築には、

- さらなる高感度化を目指し、レポーター遺伝子を改良
- 大気粉塵の捕集からサンプル調製（粉塵抽出液の調製）に要する時間の更なる短縮

企業への期待

- 大気中に含まれる黄砂やPM2.5など浮遊粒子状物質の健康影響をリアルタイムでモニタリングできるシステムを構築するには、大気粉塵の捕集からサンプル調製（粉塵抽出液の調製）に要する時間の更なる短縮が求められる
- 大気粉塵の捕集に関してノウハウを持つ、企業との共同研究を希望
- 本技術に興味を持たれ何らかの事業化に向けた取り組みを検討される企業との共同研究を希望

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 炎症反応惹起物質の検出方法
- 出願番号 : 特願2019-187111
- 出願人 : 学校法人常翔学園、
学校法人京都薬科大学
- 発明者 : 山岸 伸行、久家 貴寿、
谷口 将济、渡辺 徹志

お問い合わせ先

摂南大学

研究支援・社会連携センター

TEL 072-800-1160

FAX 072-800-1161

e-mail SETSUNAN.Kenkyu.Shakai@josho.ac.jp

Smart and Human

常翔学園

摂南大学 