

Fig. 1A

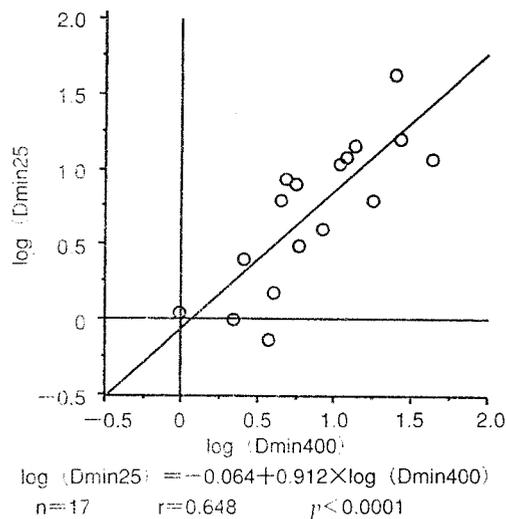


Fig. 1B

Fig. 1. Correlation between Dmin measured by the 25 mg/ml method and that by the 400 mg/ml method. Serial twofold dilutions from 25 mg/ml or from 400 mg/ml of methacholine were used to measure respiratory resistance.

や喘息の家族歴の有無によっても、補正 log(Dmin) に有意差は認められなかった。特異的 IgE 抗体陽性の有無を調査できた 135 人について、抗体の有無で 2 群に分けたが、補正 log(Dmin) に有意差は認められなかった。

一方、性別は男性の方が有意に気道過敏性が亢進していた ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3)。

そこで次に、log(Dmin) を従属変数、年齢、性別、アレルギー性鼻炎の罹患の有無、喘息の家族歴の有無、log(末梢血好酸球数)、特異的 IgE 抗体陽性の有無、1

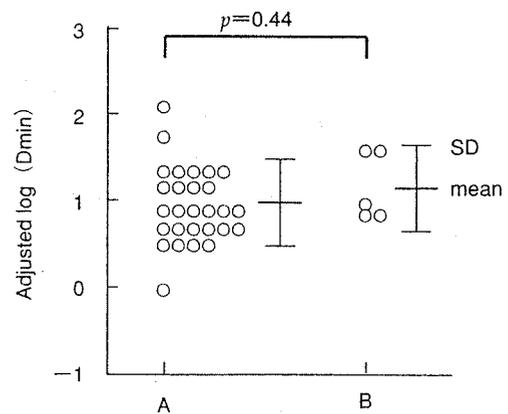


Fig. 2. Comparison of Dmin between 28 non-atopic asymptomatics without allergic rhinitis and a family history of asthma (A) and 5 atopic asymptomatics with allergic rhinitis and a family history of asthma (B) (mean  $\pm$  SD).

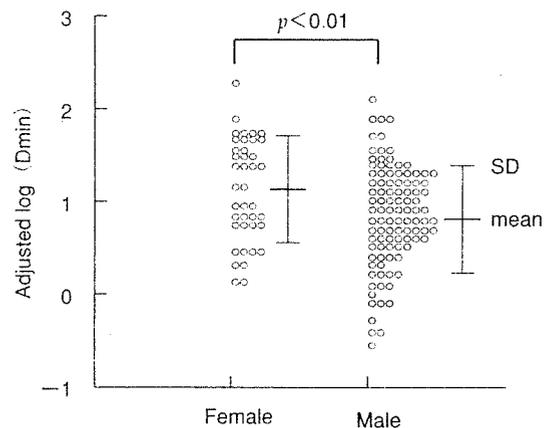


Fig. 3. Comparison of Dmin between 101 male and 40 female (mean  $\pm$  SD).

秒率、自宅ベッドのダニ抗原量を独立変数として多変量分散分析を上記のデータのそろう 93 人に対して行った。末梢血好酸球数と 1 秒率が Dmin に影響を与える傾向がみられたが、有意な因子は検出されなかった (Table 2)。

患者群でも、検査前の治療の影響を検討するために、検査前に副腎皮質ステロイド薬を含む治療を受けた患者 33 人、副腎皮質ステロイド薬以外の喘息治療を受けた患者 50 人、および無治療の患者 22 人の log(Dmin) を比較した。治療された群に若干気道過敏性が亢進し

Table 2 Multivariable analysis of log (Dmin) in non-asthmatic asymptomatics (n = 93)

	df	F value	p value
Age	1	0.769	0.383
Sex	1	0.075	0.786
Presence of allergic rhinitis	1	0.142	0.707
Family history of asthma	1	0.182	0.671
Log (number of peripheral blood eosinophil)	1	3.416	0.068
Specific IgE antibody	1	1.228	0.271
FEV <sub>1</sub> /FVC	1	3.100	0.082
Mites in bed	1	0.668	0.416

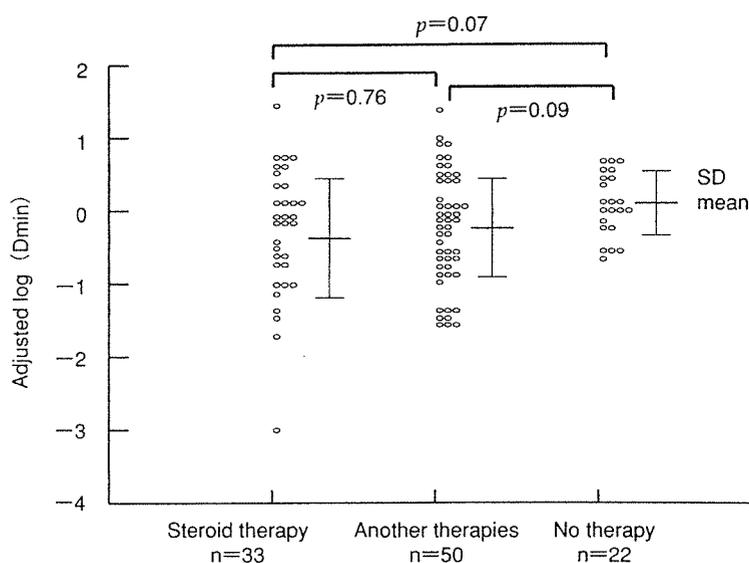


Fig. 4. The comparison of Dmin according to the presence or absence of therapy (mean ± SD).

ている傾向が認められたが、有意差は認められなかった (Fig. 4).

喘息群の Dmin は 0.001~28.70 単位、無症候群の補正 Dmin は 0.28~190 単位であり、喘息群の log (Dmin) と無症候群の補正 log (Dmin) の分布を、平滑折れ線グラフにすると、かなり広い範囲にわたって明らかな重なりが認められた (Fig. 5)。分布より、喘息群の 95% は Dmin 7 単位未満に入り、無症候群の 95% は Dmin 0.9 単位以上に入った。

無症候者と喘息患者のデータから作成した受信者操作特性曲線 (receiver operating characteristic curve : ROC 曲線) で、喘息の感度と特異度の差が最少となるのは Dmin 3.3 であり、感度 80.0%、特異度 80.1

%であった (Fig. 6)。

また、呼吸抵抗曲線の傾きを示す SGr<sub>s</sub>/Grs cont を対数変換すると、喘息群で測定されている 101 人は  $-0.72 \pm 0.06$  (平均 ± 標準偏差) で、無症候群 141 人は  $-0.73 \pm 0.04$  であり、統計学的有意差を認めなかった ( $p = 0.55$ )。

今回の検討結果で最も重要な点は、喘息患者と無症候者の Dmin の分布に、かなり広い範囲にわたって明らかな重なりが認められたことである。これまでの多くの報告<sup>17)23)-28)</sup>と比較すると、喘息群の分布はほぼ同様だが、無症候群の分布は大きく異なっている。

そこでまず、アストグラフ法の Dmin の意義について考えたい。

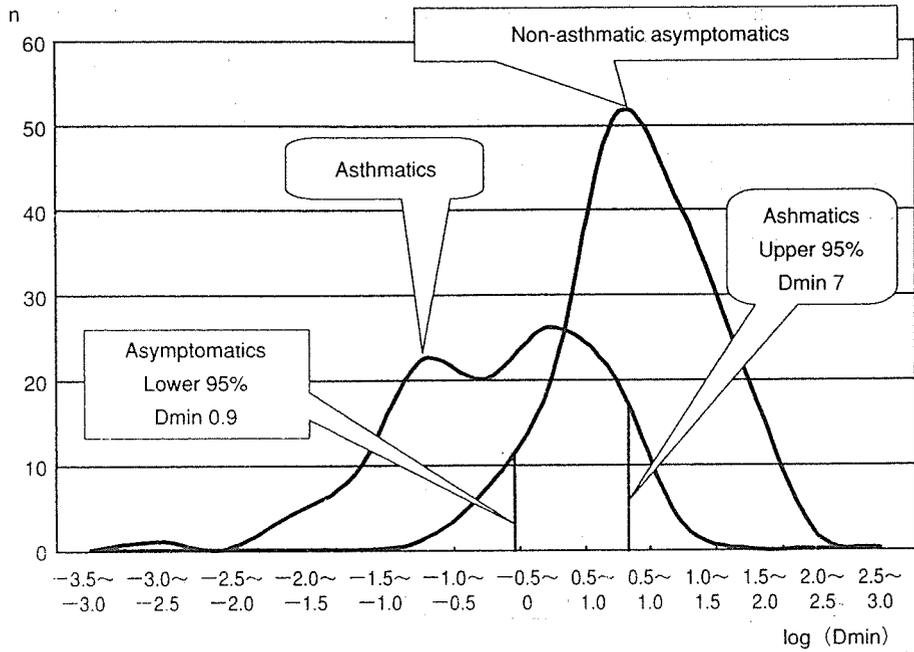


Fig. 5. Distribution of logarithm of Dmin expressed by a smoothed line graph (1 unit = one minute inhalation of 1mg/ml of methacholine).

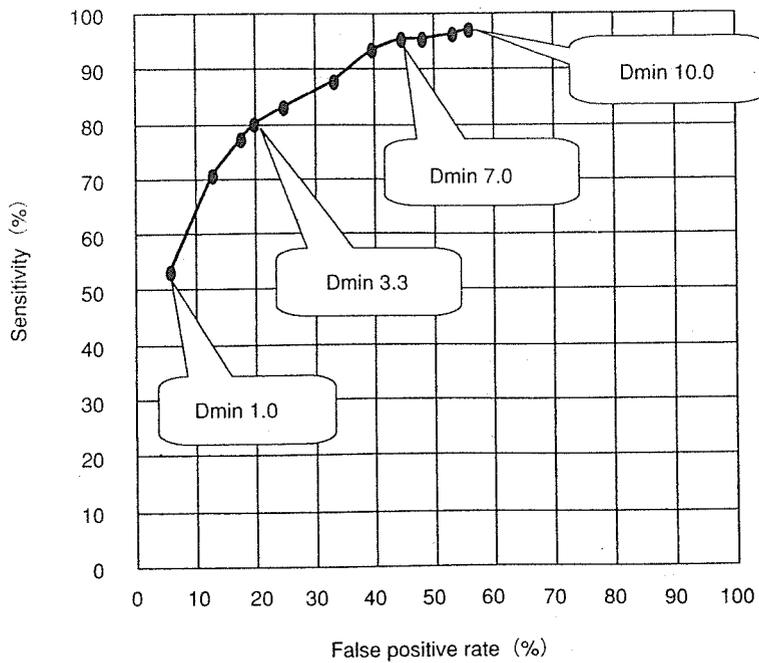


Fig. 6. The receiver operating characteristic curve.

Table 3 Reports on the comparison of Dmin between asthmatics and non-asthmatic asymptomatics

Author (reference)	Year	Dmin	0 ~ 1	1 ~ 10	10 ~ 50	50 ~	Mean
Takishima (17)	1981	Healthy volunteers	0	0	0	10	50
		Asthmatics	44	14	2	0	1.47
Ohkuma (23)	1986	Healthy volunteers	0	3	9	8	21.9
		Asthmatics	12	7	0	0	0.51
Kimura (24)	1987	Healthy volunteers	0	0	12	4	36.8
		Asthmatics	29	15	1	0	0.59
Kitani (27)	1990	Healthy volunteers	0	1	4	17	42.51
		Asthmatics	21	14	1	0	1.78
Hasegawa (28)	1992	Healthy volunteers	0	6	16	9	N.D.
		Asthmatics	62	34	1	0	N.D.
Present data	2003	Asymptomatics	8	71	49	13	17.8
		Asthmatics	56	46	3	0	2.13

N.D. : not described

気道過敏性検査には、間欠吸入法として dosimeter 法<sup>30)</sup>, tidal breathing 法<sup>31)</sup>, 日本アレルギー学会標準法<sup>32)</sup>, などがあり、連続吸入法としてアストグラフ®法<sup>17)</sup>などがある。気道過敏性の指標としては、アストグラフ®法は呼吸抵抗の上昇開始点である Dmin を用いるのが一般的である。それに対し、他の 3 法では、FEV<sub>1</sub> を用いるのが一般的である。ただしどちらも目的に応じて、Grs または Grs を機能的残気量 (functional residual capacity : FRC) で除した特異的気道コンダクタンス (specific airway conductance : SGaw) を 35% 低下させる薬物累積投与量である PD<sub>35</sub>Grs や PD<sub>35</sub>SGaw を用いることがある。

FEV<sub>1</sub> と、呼吸抵抗を基にした Dmin や Grs, SGaw のどちらの指標が優れているかについては、FEV<sub>1</sub> の方が SGaw よりも気管支喘息と他疾患の分布の重なりが少ないとの報告があり<sup>33)34)</sup>, 喘息の鑑別において優れているといわれている<sup>23)35)</sup>。ただし、非喘息者の場合、FEV<sub>1</sub> を測定する際の深吸気による気道拡張効果のために、薬剤による気管支収縮が解消されることが示されており<sup>35)36)</sup>, FEV<sub>1</sub> に基づく気道過敏性検査での喘息患者と非喘息者の結果の差は誇張されたものである可能性も考えられる。

次に、アストグラフ®法に関して、呼吸抵抗の変化開始点のみで変化率を考慮に入れない Dmin と、変化開始点と変化率を考慮に入れる PD<sub>35</sub>SGaw や PD<sub>35</sub>Grs, 変化率のみの指標である SGrs/Grs cont のどれが気道過敏性の指標として最も適当であるかを考えたい。SGrs/Grs cont は、我々の検討で喘息群と無症候群と

で有意差を認めず、同様の報告も多いため<sup>23)24)26)</sup>, 喘息かどうかの判定に用いることは出来ない。次に PD<sub>35</sub>SGaw や PD<sub>35</sub>Grs については、アストグラフ®法同士で Dmin でも PD<sub>35</sub>Grs でも健常者と喘息を有意に識別できた<sup>25)</sup>という報告はあるが、少なくとも PD<sub>35</sub>SGaw や PD<sub>35</sub>Grs が Dmin より優れているとする報告は無い。更に Dmin は以前より汎用されており、報告も多い。以上より、現時点ではアストグラフ®法を用いた場合、Dmin を以て検討するのが良いと考えられた。

現在、アストグラフ®法も含めた上述の検査法以外の、気道過敏性の絶対的評価法は確立していない。したがって今回我々が観察した結果の解釈は、気道過敏性について両群の特性をどのように捉えるかに左右されるように思われる。すなわち、第一に喘息患者のほとんどは気道過敏性が亢進しており、かつ無症候者のほとんどは気道過敏性が亢進していないと仮定すると、今回の結果は説明できない。第二に、無症候者であれば気道過敏性が亢進していないとだけ仮定すると、喘息患者の半数近くは気道過敏性が亢進していないという解釈になる。最後に、喘息患者のほとんどは気道過敏性が亢進しているとだけ仮定すると、無症候者の半数近くは気道過敏性が亢進しているという結論になる。どの仮定が正しいかを決定することは困難であるが、今回検討対象とした喘息患者は気道過敏性測定以前に喘息症状を呈しており、喘息が寛解状態ではなかったと考えられること、喘息の定義に気道過敏性亢進があることなどから、第三の仮定に立つのが最も

自然であると考えた。

そうすると前述のように無症候者のかかなりの割合で、気道過敏性が亢進していることになる。これに関しては、元々健常者の気道過敏性はこのような分布を示すものであった可能性と、健常者の気道過敏性が経年的に亢進してきた可能性の2つが考えられる。いくつかの報告を見ると、健常者の気道過敏性は、時代が下るにつれて喘息患者との重なりが大きくなっているかのような印象を受ける<sup>17,22),28)</sup> (Table 3)。しかし、各報告での無症候群の均一性は証明できないため、今回の検討では結論を述べることはできない。

一方、今回の検討では、被験者141人全員を対象とすると、女性に比べて男性の気道過敏性が亢進していた。前述したように、各項目で補正した多変量解析を行うと性別の関与は有意なものではなくなる。この乖離に最も大きく寄与しているものは自宅ベッドのダニ抗原量であった。つまりダニ抗原量測定に協力してくれた97人では、補正log(Dmin)が男性 $0.9 \pm 0.5$  (平均 $\pm$ 標準偏差)、女性 $0.9 \pm 0.5$  ( $p=0.69$ )であり、協力が得られなかったか測定キットを使い切ったために測定できなかった44人では男性 $0.8 \pm 0.5$ 、女性 $1.6 \pm 0.4$  ( $p<0.01$ )と差があり、ダニ抗原量を含めた多変量解析を行うと、気道過敏性が亢進していなかった女性が脱落してしまったことが要因と考えられた。それでもダニ抗原量以外の、年齢、性別、アレルギー性鼻炎の罹患、喘息の家族歴、log(末梢血好酸球数)、特異的IgE抗体の有無、1秒率を独立変数としてデータのそろった130人について多変量分散分析を行った場合、性別の関与は $p=0.162$ であり、各種背景因子の補正を加えると性別による有意差はみられなかった。健常者の咳受容体感性は女性の方が亢進しているという報告はあるが<sup>37)</sup>、健常者の気道過敏性について性差があったとの報告はない。今後の検討課題と考えられた。

また、本研究の喘息群は検査前に何らかの治療を受けている者も対象に含めた。その理由は、日常臨床で、喘息の鑑別目的の気道過敏性検査が必ずしも全ての例で治療前に施行できるとは限らないため、治療後の症例も入れた上で検討することは、今後の一般臨床に寄与することを考慮すると、有意義と考えられたからである。しかし、治療をしていない群は軽症で、治療をした群は元々気道過敏性が亢進していた可能性や、治療により、喘息群の気道過敏性の分布が影響を受けた可能性は否定できない。

その他には気道過敏性を規定する因子として有意な

ものは、見出せなかった。これは気道過敏性亢進には、気道炎症や、気道を支配する神経系の異常、気道上皮障害、遺伝的因子など幾つかの因子が関与しているため<sup>2)</sup>、個々の影響が統計学的に明らかな差として見えにくくなっている可能性が考えられる。

結論として、アストグラフ法のDminを気道過敏性の指標としてみると、喘息患者と若年成人無症候者との間には、その分布にかかなりの重なりがある。アストグラフ<sup>®</sup>検査でDminが7単位以上であれば喘息の可能性は低く、0.9単位未満であれば喘息の可能性が高い。尚、今回の結果は、近年若年成人の気道過敏性が全体として亢進している可能性を示唆するかもしれない。今後そのような集団の長期経過観察に興味を持たれる。

## 文 献

- 1) National Heart, Lung, and Blood Institute. Global initiative for asthma. NHLBI WHO workshop Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention, revised 2002. NIH Publication No. 02-3659, 2002.
- 2) 藤村政樹: 気道過敏性試験. 呼吸 17, 35-41, 1998.
- 3) 戸蔭雅文, 一ノ瀬正和: 気道過敏性(反応性)検査. 日本臨床 59, 1945-1949, 2001.
- 4) Townley, R.G., Dennis, M. and Itkin, I.H.: Comparative action of acetyl-beta-methylcholine, histamine, and pollen antigens in subjects with hay fever and patients with bronchial asthma. *J. Allergy* 36, 121-137, 1965.
- 5) Masuda, T., Naito, A., Kinoshita, M., Harada, S., Sasagawa, S., et al.: Acetylcholine inhalation test in atopic dermatitis. *J. Allergy* 40, 193-201, 1967.
- 6) 大橋裕二, 本島新司, 福田 健, 小泉一弘, 牧野莊平: 気道過敏性をもつ健康人女性の経過観察中に発症した気管支喘息の2例. 日胸疾会誌 22, 419-422, 1984.
- 7) Laprise, C. and Boulet, L.-P.: Asymptomatic airway hyperresponsiveness: A three-year follow-up. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 156, 403-409, 1997.
- 8) Xu, X., Rijcken, B., Schouten, J.P. and Weiss, S.T.: Airways responsiveness and development and remission of chronic respiratory symptoms in adults. *Lancet* 350, 1431-1434, 1997.
- 9) Laprise, C., Laviolette, M., Boulet, M. and Boulet, L.-P.: A symptomatic airway hyperresponsiveness; relationships with airway inflammation

- and remodelling. *Eur. Respir. J.* **14**, 63-73, 1999.
- 10) Sears, M.R., Burrows, B., Flannery, E.M., Herbison, G.P., Hewitt, C.J., et al. : Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1067-1071, 1991.
  - 11) Sunyer, J. and Munoz, A. : Concentration of methacholine for bronchial responsiveness according to symptoms, smoking, and Immunoglobulin E in a population-based study in Spain. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 1273-1279, 1996.
  - 12) Soriano, J.B., Tobias, A., Kogevinas, M., Sunyer, J., Saez, M., et al. : Atopy and Nonspecific bronchial responsiveness ; a population-based assessment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1636-1640, 1996.
  - 13) Boezen, H.M., Postma, D.S., Schouten, J.P., Kerstjens, H.A.M. and Rijcken, B. : PEF variability, bronchial responsiveness and their relation to allergy markers in a random population (20~70 yr). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 30-35, 1996.
  - 14) Omenaas, E., Bakke, P., Eide, G.E., Elsayed, S. and Gulsvik : Serum house dust mite antibodies ; predictor of increased bronchial responsiveness in adults of a community. *Eur. Respir. J.* **9**, 919-925, 1996.
  - 15) Chinn, S., Jarvis, D., Luczynska, C. and Burney, P. : Individual allergens as risk factors for bronchial responsiveness in young adults. *Thorax* **53**, 662-667, 1998.
  - 16) Fujimura, M., Kasahara, K., Yasui, M., Myou, S., Ishiura, Y., et al. : Atopy in cough sensitivity to capsaicin and bronchial responsiveness in young women. *Eur. Respir. J.* **11**, 1060-1063, 1998.
  - 17) Takishima, T., Hida, W., Sasaki, H., Suzuki, S. and Sasaki, T. : Direct-writing recorder of the dose-response curves of the airway to methacholine. *CHEST* **80**, 600-606, 1981.
  - 18) 新実彰男, 網谷良一, 松井保憲, 杉田孝和, 鈴木雄二郎, 他 : cough variant asthma の臨床的検討. 日胸疾患誌 **30**, 1077-1084, 1992.
  - 19) 樋口清一, 井上洋西 : 気道過敏性検査. 呼吸 **13**, 678-683, 1994.
  - 20) 藤森勝也, 鈴木栄一, 荒川正昭, 下条文武 : 慢性持続咳嗽の鑑別診断における気道過敏性検査の役割. アレルギー **48**, 713-718, 1999.
  - 21) 吉田真智子, 草刈悦子, 大場幸子, 古瀬真弓, 松岡稔 : 長引く咳嗽を主訴とした患者に対するアストグラフ法下気道過敏性検査の有用性. 山形県病医誌 **23**, 266-271, 1989.
  - 22) 飯島秀弥, 井上洋西, 瀧島 任 : 気道過敏性試験. 最新内科学大系第23巻アトピー・アレルギー性疾患(井村裕夫, 尾形悦郎, 高久史磨, 垂井清一郎編). 中山書店, 東京, pp. 129-141, 1992.
  - 23) 大熊昭晴, 安部幹雄, 金高真人, 杉山 比, 赤柴恒人, 他 : 気道過敏性検査における dosimeter 法とアストグラフ法との比較. 日大医誌 **45**, 823-829, 1986.
  - 24) 木村啓二, 井上洋西, 滝島 任 : 気道過敏性検査. 臨床検査 **31**, 133-142, 1987.
  - 25) Suzuki, S., Ishii, M., Sasaki, H., Takishima, T. : The use of the dose-response curve in the assessment of normal and asymptomatic asthmatic patients. *Ann. Allergy* **62**, 143-148, 1989.
  - 26) 横田欣児, 中野 博, 川村治子, 西間三馨, 井上魁夫, 他 : アストグラフ法で測定した健康者の気道過敏性について. アレルギー **36**, 22-29, 1987.
  - 27) 木谷崇和 : 気道アレルギー性疾患患者の気道過敏性と遺伝因子. アレルギー **39**, 465-475, 1990.
  - 28) 長谷川明子, 鈴木俊介 : 気道過敏性の測定と評価. 日常臨床のための気管支喘息と閉塞性肺疾患(原沢道美編). 現代医療社, 東京, pp. 124-131, 1992.
  - 29) Crapo, R.O., Casaburi, R., Coates, A.L., Enright, P.L., Hankinson, J.L., et al. : Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 309-329, 2000.
  - 30) Chai, H., Farr, R.S., Froehlich, L.A., Mathison, D.A., Mclean, J.A., et al. : Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J. Allergy Clin. Immunol.* **56**, 323-327, 1975.
  - 31) Cockcroft, D.W., Killian, D.N., Mellon, J.J.A. and Hargreave, F.E. : Bronchial reactivity to inhaled histamine ; a method and clinical survey. *Clin. Allergy* **7**, 235-243, 1977.
  - 32) 牧野莊平, 小林節雄, 宮本昭正, 信太隆夫, 高橋昭三, 他 : 気管支喘息および過敏性肺臓炎における吸入試験の標準法. アレルギー **31**, 1074-1076, 1982.
  - 33) Fish, J.E. and Kelly, J.F. : Measurements of responsiveness in bronchoprovocation testing. *J. Allergy Clin. Immunol.* **64**, 592-596, 1979.
  - 34) Cockcroft, D.W. and Berscheid, B.A. : Measurement of responsiveness to inhaled histamine ; comparison of FEV<sub>1</sub> and SGaw. *Ann. Allergy* **51**, 374-377, 1983.
  - 35) 魚谷浩平, 藤村政樹, 東 博司, 高橋美文, 一二三宣秀, 他 : 気道過敏性試験における1秒量と呼吸インピーダンスの相関—慢性気管支炎と気管支喘息における検討—. 日胸 **45**, 154-158, 1986.
  - 36) 上尾友美恵, 矢伝淳子, 二俣秀夫, 松原藤継, 藤村政樹, 他 : メサコリン吸入による気道過敏性試験における深吸気の影響—partial and maximum expiratory flow-volume curve による解析—. 臨床病

- 理 36, 1447-1453, 1988. minant of cough threshold to inhaled capsaicin.  
37) Fujimura, F., Kasahara, K., Kamio, Y., Naruse, M., *Eur. Respir. J.* 9, 1624-1626, 1996.  
Hashimoto, T., et al. : Female gender as a deter-

STUDIES ON AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS BY THE ASTOGRAPH® METHOD  
IN ASTHMATICS AND YOUNG ADULT NON-ASTHMATIC ASYMPTOMATICS

Yoshinobu Fukui, Etsuro Yamaguchi, Nobuyuki Hizawa, Yukiko Maeda, Daisuke Takahashi,  
Satoshi Konno, Motoko Kobayashi, Takeshi Hosokawa, Eisei Jinushi,  
Kei Takamura, Yasuyuki Nasuhara and Masaharu Nishimura  
*First Department of Medicine, Hokkaido University School of Medicine*

We investigated airway hyperresponsiveness (AHR) by the continuous inhalation method using an Astograph® in 105 asthmatics and 141 non-asthmatic asymptomatics. The range of Dmin (1 U = one minute inhalation of 1 mg/ml of methacholine) of asthmatics was 0.001 to 28.70 U, and that of adjusted Dmin of non-asthmatic asymptomatics was 0.28 to 190 U; thus, an apparent overlap was recognized in the distributions of Dmin.

Ninety-five percent of asthmatics had a Dmin lower than 7 U, and 95% of non-asthmatic asymptomatics had a Dmin higher than 0.9 U. Presuming that almost all asthmatics had AHR, it was inferred that nearly half of non-asthmatic asymptomatics had AHR, too. Comparison with previous reports suggests that AHR in healthy people may be increasing generally. When Dmin is determined to be >7 U by the Astograph® method, it is likely that the patient does not have asthma. When a patient has a Dmin <0.9 U, it is highly probable that the patient has asthma.

---

## 気管支喘息の遺伝子多型

■山口 悦郎

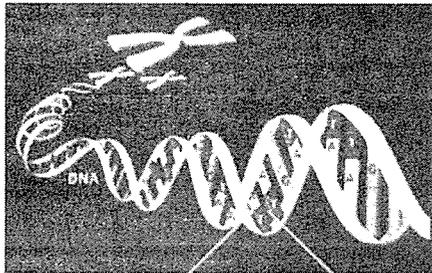
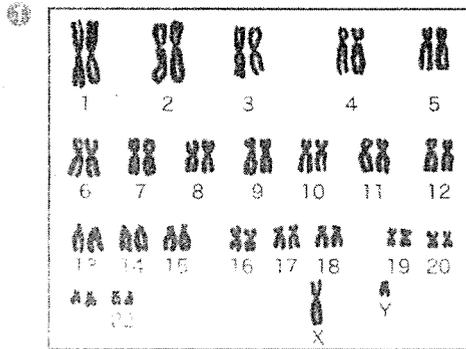
ヒトの染色体 DNA に含まれる情報の総体をゲノム (genome) と呼ぶ。第 1 番染色体から第 22 番染色体までの 22 対 (44 本) の常染色体と 1 対 (2 本) の性染色体には、30 億塩基対の DNA が含まれ、約 3 万の遺伝子がコードされていると考えられている (①)。遺伝素因の本態は、遺伝子の構造や発現を調節する DNA の塩基配列の個体差 (遺伝子多型) に起因する。遺伝子多型にはいくつかの種類があるが、大部分は一つの塩基が他の一つの塩基に置き換わる一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) である (②)<sup>1)</sup>。

疾患や関連形質の遺伝子を同定するための手法として、大きく分けて positional cloning と candidate gene approach がある。前者は、ゲノム全域の遺伝子多型と、疾患の有無や関連形質を多くの家系について調査し、その対応関係 (連鎖解析) から、染色体のどの座位に知りたい遺伝子があるか見当をつけるものである (③)<sup>2)</sup>。検索に用いられる遺伝子は、染色体上での局在はわかっているが、通常機能がないかそれが知られていない “マーカー遺伝子” で、多型は SNP ではなく、繰り返し配列の数の相違によるものを用いる (variable number of tandem repeat : VNTR)。遺伝子座の見当がつくと、そこを中心にさらに詳細な連鎖解析を行い、候補遺伝子を絞り込んでいく。

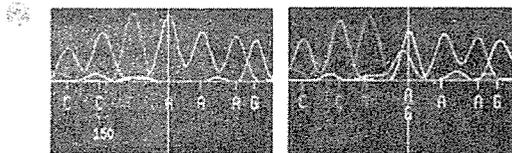
後者は、疾患の病態に深く関与していることが明らかである既知遺伝子について、その多型と疾患の発症や病像および関連形質との連鎖や相関を検討するものである。用いられる多型は SNP が多く (④)、その変異により遺伝子発現量、ひいてはタンパクの産生量や構造の変化がもたらされる。すなわち、genome の個体差が遺伝子転写産物の総体 (transcriptome, ④) に反映され、それが翻訳されるタンパクの総体 (proteome) の質的、量的変化をもたらす (⑤)。多くの遺伝子について同様な現象が相互作用を及ぼし合いながら生じ (interactome)、さらにアレルゲンや感染などの外因の影響を受けて、疾患の発症や (⑥)、IgE 値 (⑦) などの形質の個人差の総体 (phenome) が決定される<sup>3)</sup>。

気管支喘息の遺伝素因研究は、個体差の観点から genome と phenome の対応関係を明らかにすることである。

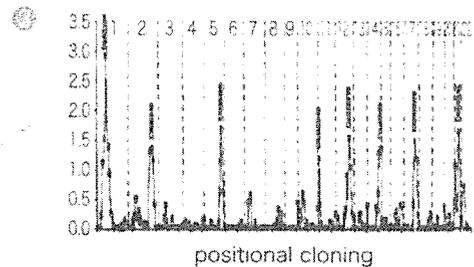
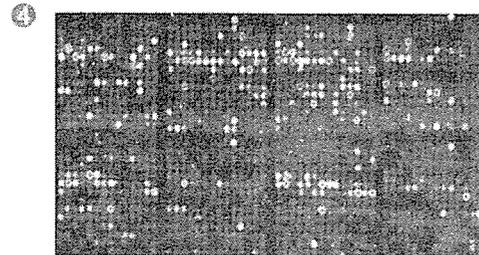
## Genome



SNP

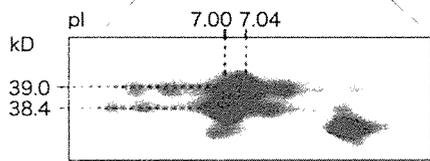
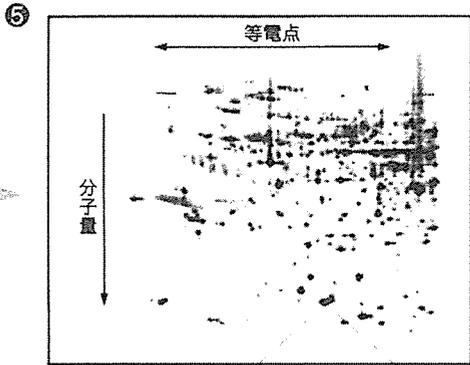


## Transcriptome

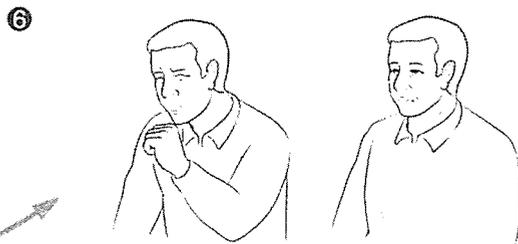


- ① ヒト染色体
- ② 一塩基多型 (SNP) を示すシーケンサーの electrophoregram. 左が遺伝子型 AA, 右が AG を示す.
- ③ 連鎖解析の強さを示すグラフ. 縦軸は連鎖がない場合と比較したオッズ比を示し, 高い値を示す染色体座位付近に目的とする遺伝子があることを示す.
- ④ マイクロアレイで示される transcriptome の 1 例. 色の違いは, 対照と比較した各遺伝子の発現量の差を示す.
- ⑤ 二次元電気泳動で示される proteome の 1 例. タンパクの質的变化は, 等電点や分子量の変化として現れる (拡大図参照).
- ⑥ 喘息などの common disease の発症は, 一般に 1 つの遺伝子のみで規定されるものではない. したがって, いわゆる喘息遺伝子なるものは存在しない可能性もある.
- ⑦ phenome の 1 例として, 喘息患者と健康者 730 名の血清総 IgE 値のヒストグラム. 対数変換値で, ほぼ正規分布する.

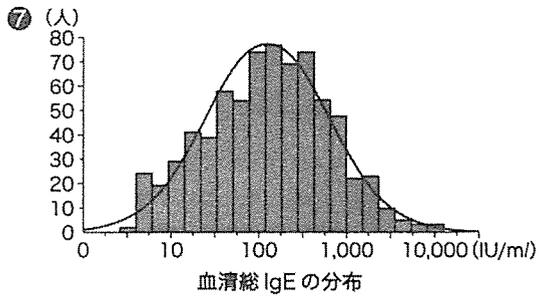
Proteome



Phenome



喘息発症の有無



文献

- 1) Haga H et al : Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project : identification of 190,562 genetic variations in the human genome : single-nucleotide polymorphism. J Hum Genet 47(11) : 605, 2002
- 2) 山口悦郎 : 呼吸器疾患の分子疫学 : 気管支喘息の遺伝子多型. 日内会誌 92 : 1190, 2003
- 3) Li S : The human phenome project. Science 303(5657) : 540, 2004

やまぐち えつろう : 愛知医科大学呼吸器・アレルギー内科

# PHOTO REPORT

## BCG ワクチン接種後に壊疽性丘疹状結核疹を呈した5ヵ月乳児例

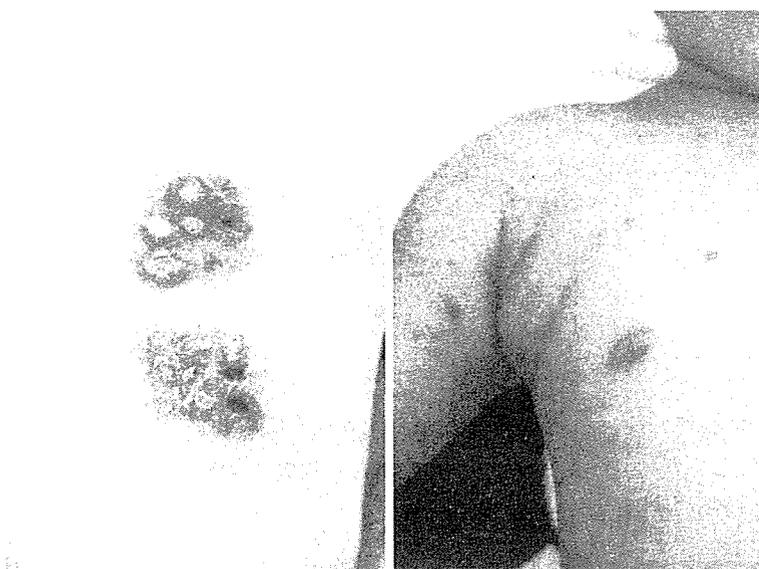


Fig. 1. 皮疹

左：本例の BCG 接種痕とその周囲の丘疹。

右：本例で認められた丘疹。同様の発疹が、顔面・体幹・四肢に多発していた。

症 例 5ヵ月、男児。BCG 接種後2ヵ月して顔面、体幹、四肢に丘疹が出現したため、当院を受診した。受診時 BCG 接種痕は痂皮化、膨隆し、皮疹は当初単純疱疹と考え (Fig. 1)、aciclovir を投与したが軽快しなかった。血液検査上は、免疫系も含めて異常を指摘しえなかった。結核疹を疑い、丘疹の組織片の抗酸菌培養と結核菌の PCR 法を行ったが、いずれも陰性であった。組織像では、真皮表層の壊死を伴う類上皮細胞性肉芽腫がみられ、同部位で CD 68 陽性組織球が確認された (Fig. 2)。以上の所見より、皮疹は BCG 接種後による壊疽性丘疹状結核疹と診断し、抗結核薬は使用せず、clemastine fumarate 内服にて経過観察したところ、皮疹は1ヵ月で消失した。

皮膚結核は、真性皮膚結核と結核疹に大別されるが、後者は他臓器の結核病巣の結核菌に対するアレルギー反応として皮膚に病変を生ずるとされる。成人では、肺結核の初発症状として結核疹を認めた報告がある。1994 (平成6) 年から、予防接種後副反応を市町村長に報告するよう求められているが、予防接種後健康状態調査の1999 (平成11) 年度における BCG 接種後の皮膚結核の報告は、4例 (3.4%) のみとまれである。

BCG 接種後に治療抵抗性の皮疹を診た場合、本症を念頭に置いて検索を進める必要がある。

### 文 献

- 1) 西部明子ほか：BCG ワクチンにより乳児に生じた壊疽性丘疹状結核疹の2例。皮の臨 **42** : 376, 2000
- 2) 秋葉 香ほか：BCG ワクチン接種後に結核疹を呈し

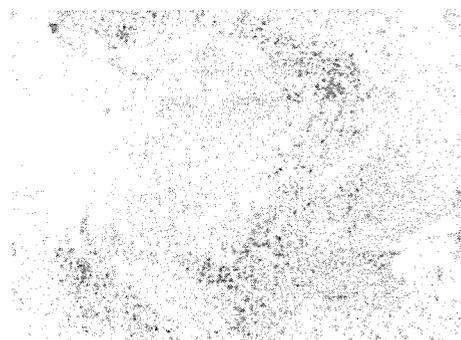


Fig. 2. 皮疹部の CD 68 組織染色

肉芽腫の部分は CD 68 陽性で組織球による類上皮と考えられたが、Ziehl-Neelsen 染色は陰性であった。

た5ヵ月の男児例。小児臨 **55** : 1943, 2002

- 3) 藤田昌樹ほか：壊疽性丘疹状結核疹を初発症状とした肺結核症の1例。感染症誌 **76** : 558, 2002

水口市民病院小児科

吉田 忍・安齋祐子・三村由卯

同 内科

深野美也

(☎ 528-0049 滋賀県甲賀郡水口町大字貴生川 293)

## 綜 説

## 気管支喘息の遺伝素因

山口悦郎\* 周 艶秋\*

## 内 容 紹 介

呼吸器疾患の中で気管支喘息の遺伝性はこれまで多くの疫学的、分子遺伝学的検討から確認されている。近年の分子遺伝学的解析手法の進歩と、ヒトゲノム計画の予想を超えた急速な進捗により、ゲノム全域で喘息遺伝子を探索するゲノムスキャンプロジェクトの実施が促進された。しかし、多数のプロジェクトの結果をみても喘息遺伝子と呼ぶにふさわしい遺伝子は今までのところ発見されていない。その代り環境因子の大きな影響のもと、多くの遺伝子が相互作用を及ぼしあいながら発症に関与しているとの構図がより確からしいと思われる。今後の喘息診療に関する遺伝学的研究の方向としては、形質としてより直接的に生化学的現象を反映している抗喘息薬の代謝や効果と副作用の個体差を検討する薬理遺伝学的アプローチが有用と思われる。

## — Key words —

気管支喘息、遺伝素因、ゲノム、アトピー、気道過敏性、薬理遺伝学、 $\beta_2$ 刺激薬、テオフィリン、ロイコトリエン

\*Etsuro Yamaguchi, Yanqiu Zhou:

愛知医科大学医学部呼吸器・アレルギー内科

## は じ め に

ヒトの染色体 DNA に含まれる情報の総体をゲノム (genome) と呼ぶ。第 1 番染色体から第 22 番染色体までの 22 対の常染色体と 2 本の性染色体には、30 億塩基対強の DNA が含まれ、約 2 万強の遺伝子がコードされていると考えられている。生命科学のアポロ計画とも称され、国際的な協力のもとに進められたヒトゲノム計画は、30 億塩基対の全配列の解読を完了し、2003 年 4 月 14 日に、米国、日本、英国、フランス、ドイツ、中国 6 カ国首脳による共同宣言が出された。この発見は 1901 年のメンデルの法則の再発見、1953 年の DNA 二重らせん構造の発見に引き続くもので、生命科学にとって最重要とも言える革命的な出来事がおよそ 50 年の周期で起こったことは大変興味深い。

遺伝素因の本態は、遺伝子の構造を決定したりその発現を調節する DNA の塩基配列の個人的多様性 (遺伝子多型) である。遺伝子多型にはいくつかの種類があるが、大部分は一つの塩基が他の一つの塩基に置き換わる一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) である。疾患や関連形質の遺伝子を同定することは、その原因となっている遺伝子多型を同定することである。そのための代表的な手法には、positional cloning と candidate gene approach がある。前者は遺伝子多型と疾患の

有無や関連形質を多くの家系について調査し、その対応関係の強さから(連鎖解析)染色体のどの座位に知りたい遺伝子があるか見当をつけるものである。その座位に機能的に喘息病態と関連が深い遺伝子が発見されれば、それが喘息遺伝子である可能性が高いと判断される。後者は疾患の病態に深く関与していることが明らかである既知遺伝子について、その多型と疾患の発症や病像および関連形質との連鎖や相関を検討するものである。用いられる多型はSNPが多く、その変異により遺伝子発現量ひいては蛋白の産生量や構造の変化がもたらされる。

一般に生命体の疾患に関与する形質(Phenotype)の形成過程を全体としてみると、まずGenomeはmRNAの合成を通して遺伝子転写産物の総体(Transcriptome)に反映される<sup>2)</sup>。次いでTranscriptomeが翻訳されて蛋白の総体(Proteome)が形成される。Proteomeは相互作用を及ぼしあいながら(Interactome)アレルゲンや感染などの外因の影響を受けて、最終的には疾患の発症や重症度、予後などの形質の総体(Phenome)が決定される<sup>3)</sup>。ここでゲノムレベルでの多様性は順次以後の生命現象に投影され、Phenomeの多様性すなわち個体差をもたらす。したがって疾患の遺伝素因研究とは、個体差の観点からGenomeとPhenomeの対応関係を明らかにすることである。

疾患の遺伝性はアレルギーや免疫が関与するもので強いと考えられている。その考えの背景にあるのは抗原応答性や微生物に対する生体防御反応である。本稿ではTh2免疫応答を基盤とすることが多い喘息の遺伝素因研究の現況を解説する。

## I. 喘息の遺伝疫学

喘息の有病率は小学校入学前の小児で8~9%、成人で約3~4%と言われ、全世界的に増加傾向にある。これは喘息を初めとするアレルギー疾患共通の現象で、主に環境要因の変化によると考えられている。しかながら一方で、それらの疾患には強い遺伝傾向があることが臨床家には17世紀頃から認識されていた。時代が下

って、5800名の学生について気管支喘息とアレルギー性鼻炎の家族歴を調査したVan ArsdellとMotulskyによると、両親ともこれらいずれかの疾患に罹患していれば子の58%がやはりいずれかの疾患を有していた。その割合は片親のみが罹患していれば38%、両親とも罹患していなければ13%と低下した<sup>4)</sup>。また喘息の家族集積性を他疾患と比較すると、喘息の一般人口での有病率はおよそ4%程度であるが、喘息患者を発端者とする家系の一親等親族では、それが20~25%程度であり、両者の比である家族集積性の指標λは約5~6となる。これはI型糖尿病の15、II型糖尿病の3.5、統合失調症の8と比較してもかなりの遺伝性を示すと言える<sup>5)</sup>。

疾患の家族集積性を認めても、それは遺伝性のみならず、家族共通の環境因子の影響を反映している可能性は否定できない。そこで双生児研究が行われる。初期の報告ではEdfors-Lubsの報告が有名で、彼女は7000組の双生児において、双方とも気管支喘息を有している割合を調査した<sup>6)</sup>。その結果、一卵性では少なくとも一方が罹患している組の19%であったのに対し、二卵性では4.8%であった。同様な報告は、近年の双生児研究においてもみられる。ノルウェーのHarrisらは、約2600組の双生児を25歳まで追跡し、喘息の発症を調査した。その結果やはり一卵性双生児では、二卵性に比して喘息発症の一致率が高いこと、双生児の片方が喘息でない場合、他方が喘息となる危険率に比べて、片方が喘息であれば一卵性では18倍、二卵性では2倍の喘息発症相対危険率を有することを示した<sup>7)</sup>。以上より喘息の遺伝性については、確固とした根拠があると言える。

## II. 喘息遺伝子の同定

疾患の責任遺伝子を探索する祭に、標的形質の定め方は決定的に重要である。なぜなら責任遺伝子の同定は、長大なヒトゲノムに含まれる数多くの遺伝子と形質との対応関係を探る作業であり、少なくとも一方(この場合は形質)が明確に規定されていなければ、目的遺伝子が発見されないか、逆に一貫性のない様々な結果が

生み出される可能性が容易に推測される。今日喘息という病態にはアトピー素因と気道過敏性というふたつの異なった形質が深く関与していることには異論が少ない。

アトピー素因とは一般に抗原特異的 IgE 応答を意味し、具体的には即時型皮内反応や血清中の抗原特異的 IgE の存在から証明される。アトピーの定義に非特異的 IgE の高値を含める場合もある<sup>8)</sup>。喘息遺伝子の同定を目的とする研究の端緒は、1989年に発表された英国の Cookson らによるものである。彼らは喘息患者を発端者とする家系を対象とした連鎖解析によって、アトピー遺伝子が染色体11q13に存在すると報告した<sup>9)</sup>。その後彼らは、その本態が高親和性 IgE Fc 受容体の  $\beta$  鎖の SNP であることを見出した<sup>9)</sup>。その後我々も同遺伝子のプロモーター領域の SNP が、血清の総 IgE 値と相関することを認めている<sup>10)</sup>。

IgE は Th2細胞から産生される IL-4や IL-13により、免疫グロブリンを産生する B細胞において、クラススイッチを経て分泌される。1995年に Rosenwasser らは、IL-4のプロモーター領域の SNP と血清総 IgE 値との相関を報告した<sup>11)</sup>。我々もその SNP と連鎖不平衡にある IL-4遺伝子+33の SNP について、同様な結果を得た<sup>12)</sup>。その受容体については、 $\alpha$  鎖の50番目アミノ酸のイソロイシンからバリンへの変異が、日本人小児アトピー型喘息と相関するという報告や<sup>13)</sup>、それと478の変異(セリン→プロリン)の組み合わせが総 IgE 値と相関するなどの報告がある<sup>14)</sup>。また IL-13については、110(アルギニン→グルタミン)が日本人と白人の双方において、IgE 値ではなく喘息と相関しているとの報告がある<sup>15)</sup>。

### III. 気道過敏性・喘息に関するヒトゲノムスキャン

連鎖解析を特定の候補遺伝子についてのみ実施する場合もあるが、それをヒトゲノム全域にわたり、およそ300~400のマーカー遺伝子を用いて行うのがゲノムスキャンである。本法は、未知の遺伝子をすべて発見できる期待感もある

が、多くのマーカーを用いるために、一方で偽陽性結果の山が生まれる危険性もある。多くの検討では喘息に加えて総 IgE 値、アトピー、気道過敏性、好酸球数などの喘息関連形質も標的形質として解析されている。これまで少なくとも10以上の報告があり、対象は白人を初め、黒人、ヒスパニック、日本人、中国人などほとんどの主要な人種を含んでいる(表)。

最近のゲノムスキャンで非常に注目されたのは、Van Eerdewegh らの報告である。彼らは米国と英国の460白人家系を対象にゲノムスキャンを実施したところ、それまでの研究ではまったく指摘されていなかった染色体20p13と喘息が高度に有意な連鎖を示した<sup>16)</sup>。その領域に存在する23遺伝子の計135遺伝子多型を用いて、さらに連鎖領域の絞込みを行った結果、ADMA33という遺伝子が連鎖の本態であろうという結論に達した。ADMA33はメタロプロテアーゼの1種で、サイトカインやその受容体の放出と関連している可能性がある。また肺線維芽細胞や気道平滑筋で発現されているので、気道リモデリングへの関与が示唆されている<sup>16)</sup>。本遺伝子と喘息との連鎖は、ごく最近の検討でも大筋において追認されたが、今だ生物学的に機能的な SNP は発見されておらず、真に ADMA33が喘息遺伝子といえるのか結論は得られていない。

### IV. 喘息と薬理遺伝学

疾患の発症を規定する遺伝子の同定は、純粋に科学的に興味を引くテーマであるが、実際に発症した患者ではその情報が直接治療に役立つ可能性は低い。むしろ各種の抗喘息薬の効果や副作用を規定する遺伝子とその仕組みが明らかにされ、それらの予測がつくようになれば有益である。今日遺伝子解析結果の応用がもっとも期待されているのは、そのような目的である。

染色体5q31-33には、気道過敏性や  $\beta_2$  刺激薬の反応性と関連が深いと考えられる  $\beta_2$  アドレナリン受容体遺伝子 (*ADRB2*) が存在する。Liggett らのグループは *ADRB2* の塩基配列を調査し、当初9つの SNP を見出したが、そのう

表 喘息および関連形質に関するヒトゲノムスキャン結果

著者	報告年	形質	人種	染色体
Daniels S, et al.	1996	気道過敏性	オーストラリア白人	4q35, 7p14
		喘息	オーストラリア白人	11q13, 16q23
		総 IgE	オーストラリア白人	7p14, 11q13, 16q23
		好酸球数	オーストラリア白人	6p22
		即時型皮内反応	オーストラリア白人	11q13
CSGA (米国喘息遺伝子研究グループ)	1997	喘息	アフリカ系米国人	5p15, 11p15
			米国人	2q33, 6p21.3-23, 12q14-24.2, 13q21.3-qter, 14q11.2-13, 19q13
			スペイン系米国人	12q14-24.2, 21q21
Ober C, et al.	1998	喘息あるいは 気道過敏性	米国人 (Hutterite)	5q23-31, 12q15-24.1, 19q13, 21q21
Wjst W, et al.	1999	気道過敏性	ドイツ白人	2pter, 9p23, 12q21
		喘息	ドイツ白人	2pter, 6p21.3, 9q31
		総 IgE	ドイツ、スウェーデン白人	1p33, 1pter, 2pter, 2q32, 6p21.3, 9q22, 15q22, Xq25
		RAST	ドイツ、スウェーデン白人	2pter, 2p13, 4q35, 6p25, 6p23, 6p22.3, 6p21.3, 7pter, 7p15, 9q22
		好酸球数	ドイツ、スウェーデン白人	6p21.3, 6q13, 12q13, Xq25
Dizier M, et al.	2000	喘息	本人・両親ともフランス で出生した喘息患者と同胞	17q12-21, 1p31
		気道過敏性		19q13
		好酸球数		12q24
Yokouchi Y, et al.	2000	喘息	日本人	4q35, 5q31-33, 6p22-p21.3, 12q21-q23, 13q11, 13q14.1-q14.3
		喘息	フィンランド人	7p14-15
Van Eerdedewegh P, et al.	2002	喘息あるいは 気道過敏性	白人	20p13 (ADAM33)
Hakonarson H, et al.	2002	喘息	アイスランド人	14q24
Xu X, et al.	2002	気道過敏性	中国人	2p25, 19p11
		1秒量	中国人	2p25, 10p15, 22q11.2
		努力肺活量	中国人	1q24, 16p11.2
		総 IgE	中国人	1q24
		ゴキブリ特異 IgE	中国人	4q22
Allen M, et al.	2003	喘息	白人	2q14 (DPP 10)
Blumenthal M, et al.	2004	アトピー	米国人黒人、米国人白人	11q23.1, 20p
			スペイン系米国人	
Blumenthal M, et al.	2004	ダニアレルギー反応性	米国人黒人、米国人白人 スペイン系米国人	19q12, 20p

ちアミノ酸変異を伴うものは4種類であった<sup>17)</sup>。その中で16(アルギニン→グリシン)では $\beta_2$ 刺激剤による受容体の発現低下を来しやすく、27(グルタミン→グルタミン酸)では逆にそれがほとんど起こらないことを示した<sup>18)</sup>。それらの多型は全体として喘息の発症との相関は認められなかったが、16(アルギニン→グリシン)はステロイド依存性の重症喘息や、夜間悪化型喘息との関連を認めた<sup>19)</sup>。後年 Liggette らは *ADRB2* の5'非翻訳領域を含む13ヶ所の SNP について、12種のハプロタイプ(同一染色体上の多型の組み合わせ)を同定した<sup>20)</sup>。その中で頻度の高いハプロタイプの組み合わせについて、喘息患者における  $\beta_2$ 刺激薬吸入後の1秒量

の変化率を検討したところ、特定のハプロタイプとの有意な相関を認めた。個別のハプロタイプの発現ベクターを用いた *in vitro* の実験では、特定のハプロタイプで *ADRB2* の mRNA や蛋白の発現が亢進していた。

しかしながら *ADRB2* 遺伝子多型とその機能との関連は今一つはっきりしない。すなわち最近の報告によると、リンパ球の cAMP の基礎値やイソプロテレノール刺激時の cAMP の上昇量、およびメサコリンによる気道収縮に対するフォルモテロールの抑制効果などは、遺伝子多型によりほとんど影響を受けない<sup>21)</sup>。*ADRB2* の遺伝子多型が、喘息の病像とりわけ  $\beta_2$ 刺激薬に対する効果と真に何らかの相関があ

るか否か、未だに不透明である。

喘息では強い気道平滑筋収縮作用を有するロイコトリエン C<sub>4</sub>やロイコトリエン D<sub>4</sub>が、マスト細胞や好酸球から産生される。その特異的拮抗薬は喘息において60%以上の有効率を示すので、ロイコトリエンが実際に喘息の病態で働いているのは疑いようがない。その合成酵素の一つであるロイコトリエン C<sub>4</sub>合成酵素 (LTC<sub>4</sub>S) の-444 (A/C) 多型は、特にロイコトリエンの関与が大きいと考えられるアスピリン喘息の発症と相関を示した<sup>14)</sup>。さらに日本人を対象とした検討では、ロイコトリエン受容体拮抗薬であるプラナルカストに対する効果も、同多型と関連があると報告されている<sup>22)</sup>。ポーランドからも同様な傾向が報告されている<sup>23)</sup>。しかしそれらの結果が、ロイコトリエン受容体拮抗薬の一般的な有効率である60%強をどの程度説明できるのかは明らかではない。

一方、LTC<sub>4</sub>S 遺伝子について興味ある報告は、デキサメタゾンによりプロモーター活性の上昇が見られることである<sup>24)</sup>。すなわち喘息において今や抗喘息薬の主軸となった吸入ステロイドの使用により、ロイコトリエンの合成が逆に誘導される可能性あることになる。そのことは吸入ステロイド使用時に、ロイコトリエン受容体拮抗薬を併用することが推奨される根拠となる。ところが同遺伝子で-1072A/-444A のハプロタイプでは、デキサメタゾンによる誘導が低い<sup>24)</sup>。したがってそれらの患者では、ロイコトリエン受容体拮抗薬を併用するメリットは少ないと言えよう。

テオフィリンは古くから喘息治療に使用されている薬物であるが、成人ではその90%が肝臓で代謝される。主な代謝酵素はチトクローム P450分子種のひとつである CYP1A2で一部 CYP3A4やその他の酵素も関与する。CYP には多くの分子変異と、分子構造の変異を伴わない遺伝子多型が知られている (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>)。CYP1A2活性の個体差は、最初コーヒー飲用後のカフェイン代謝により検討された。その結果、5'上流の SNP である-3860 (G/A) に関し (原論文では-2964)、

遺伝子型-3860 (GG) はそれ以外の遺伝子型に比べて、喫煙者で有意に高い酵素活性を示した<sup>25)</sup>。Obaseらはそれを受けて多数の非喫煙喘息患者においてテオフィリン代謝を検討した。ベイズ推定により求められたテオフィリンクリアランス値は、やはり-3860 (GG) において有意に高かった<sup>26)</sup>。今後このような情報は遺伝子多型が容易に同定できる方法が普及すると、より適切な薬物治療に広く利用されることが期待される。

## おわりに

家族集積性の存在と遺伝子解析法の急速な進歩から、一時は気管支喘息の遺伝子が容易に同定されると期待された時期があった。しかし多くの報告によって逆に混沌とした状況になり、研究の現状にはやや停滞感がある。それは喘息のもっとも特徴的な形質といえる気道過敏性が、多くの因子によって規定されていることを正に反映しかつ証明しているとも考えられる。しかし一方で、大規模連鎖解析の結果発見された新規遺伝子の報告により、これまで喘息の病態に関与すると認識されていなかった分子が浮上し、新たな研究が展開されている。しかし当面は、喘息治療薬関連の分子の個体差とその臨床的意義が遺伝子多型との関連で検討されることの方に、より興味を持たれる。

## 文 献

- 1) Haga H, Yamada R, Ohnishi Y et al : Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project : identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet* 47 : 605-610, 2002.
- 2) 山口悦郎 : 気管支喘息の遺伝子多型. *内科* 93 : 965-967, 2004.
- 3) Freimer N, Sabatti C : The human phenome project. *Nat Genet* 34 : 15-21, 2003.
- 4) Van Arsdel Jr P, Motulsky A : Frequency and heritability of asthma and allergic rhinitis in college students. *Acta Genetica* 9 : 101-114, 1959.
- 5) Werner M, Herbon N, Gohlke H et al : Asthma is

- associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33. *Clin Exp Allergy* **114** : 26–31, 2004.
- 6) Edfors-Lubs ML : Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* **26** : 249–285, 1971.
  - 7) Harris JR, Magnus P, Samuelsen SO et al : No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins. *Am J Respir Crit Care Med* **156** : 43–49, 1997.
  - 8) Blumenthal MN, Ober C, Beaty TH et al : Genome scan for loci linked to mite sensitivity : the Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Clin Exp Allergy* **34** : 226–231, 2004.
  - 9) Shirakawa T, Li A, Dubowitz M et al : Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* **7** : 125–129, 1994.
  - 10) Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E et al : A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* **161** : 906–909, 2000.
  - 11) Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK et al : Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* **25 Suppl 2** : 74–78 discussion 95–96, 1995.
  - 12) Suzuki I, Hizawa N, Yamaguchi E et al : Association between a C+33T polymorphism in the IL-4 promoter region and total serum IgE levels. *Clin Exp Allergy* **30** : 1746–1749, 2000.
  - 13) Huang SK, Mathias RA, Ehrlich E et al : Evidence for asthma susceptibility genes on chromosome 11 in an African-American population. *Hum Genet* **113** : 71–75, 2003.
  - 14) Sanak M, Simon HU, Szczeklik A : Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet* **350** : 1599–1600, 1997.
  - 15) Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M et al : Genetic variants of IL-13 signaling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* **9** : 549–559, 2000.
  - 16) Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J et al : Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* **418** : 426–430, 2002.
  - 17) Reihnsaus E, Innis M, MacIntyre N et al : Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8** : 334–339, 1993.
  - 18) Green SA, Turki J, Innis M et al : Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* **33** : 9414–9419, 1994.
  - 19) Turki J, Pak J, Green SA et al : Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. *J Clin Invest* **95** : 1635–1641, 1995.
  - 20) Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB et al : Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 10483–10488, 2000.
  - 21) Lipworth BJ, Hall IP, Tan S et al : Effects of genetic polymorphism on ex vivo and in vivo function of beta2-adrenoceptors in asthmatic patients. *Chest* **115** : 324–328, 1999.
  - 22) Asano K, Shiomi T, Hasegawa N et al : Leukotriene C4 synthase gene A(-444)C polymorphism and clinical response to a CYS-LT(1) antagonist, pranlukast, in Japanese patients with moderate asthma. *Pharmacogenetics* **12** : 565–570, 2002.
  - 23) Mastalerz L, Nizankowska E, Sanak M et al : Clinical and genetic features underlying the response of patients with bronchial asthma to treatment with a leukotriene receptor antagonist. *Eur J Clin Invest* **32** : 949–955, 2002.
  - 24) Sayers I, Sampson AP, Ye S et al : Promoter polymorphism influences the effect of dexamethasone on transcriptional activation of the LTC4 synthase gene. *Eur J Hum Genet* **58** : 619–622, 2003.
  - 25) Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M et al : Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene : effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem (Tokyo)* **125** :

- 803-808, 1999.
- 26) Obase Y, Shimoda T, Kawano T et al :  
Polymorphisms in the CYP1A2 gene and theo-  
phylline metabolism in patients with asthma.  
Clin Pharmacol Ther 73 : 468-474, 2003.

# Development of Fluorescence-linked Immunosorbent Assay for High Throughput Screening of Interferon- $\gamma$

Eiji Matsukuma<sup>1</sup>, Zenichiro Kato<sup>1</sup>, Kentaro Omoya<sup>1</sup>, Kazuyuki Hashimoto<sup>1</sup>, Ailian Li<sup>1</sup>, Yutaka Yamamoto<sup>1</sup>, Hidenori Ohnishi<sup>1</sup>, Hidenori Hiranuma<sup>2</sup>, Hisakazu Komine<sup>2</sup> and Naomi Kondo<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**Background:** Human interferon-gamma (hIFN- $\gamma$ ) is produced by lymphocytes and has a variety of biological properties. Measurement of hIFN- $\gamma$  is widely used for various immunological responses for allergic or autoimmune diseases. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an established immunoassay used to quantify cellular metabolites or cytokines. ELISA requires many incubation and wash steps and is not practically suitable for screening large numbers of samples.

**Methods:** We have developed a fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA) method for the detection of hIFN- $\gamma$ . We measured the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) value of the hIFN- $\gamma$  production by interleukin (IL)-18 binding protein and anti-IL-18 monoclonal antibody. The IC<sub>50</sub> described by FLISA was compared with that by ELISA.

**Results:** We developed a new system for measuring hIFN- $\gamma$  using Allophycocyanine (APC) fluorescent protein and compared it with the previous method using Cy5.5. The proposed FLISA had a smaller coefficient of variation than ELISA, and the means of coefficient of variation using the same samples measured by ELISA and FLISA were, respectively, 11.1% and 3.8%, suggesting that the edge effect often giving non-specific results may be smaller in FLISA than in ELISA.

**Conclusions:** The improved FLISA system proposed is ideally suited for efficient measurements of hIFN- $\gamma$ . This homogeneous and multiplex method will be a powerful tool for high throughput screening for drug discovery research.

## KEY WORDS

enzyme-linked immunosorbent assay, fluorescence-linked immunosorbent assay, fluorometric microvolume assay technology, high-throughput screening, interferon-gamma

## INTRODUCTION

Several studies have shown that cytokines participate in the induction and effector phases of inflammatory responses in allergies. Studies of the cytokine network are important for identifying candidates for drugs or drug targets. In addition, measurement of cytokines is required for screening of drugs.<sup>1</sup> The regulation of human interferon-gamma (hIFN- $\gamma$ ) is particularly important for protective immunity in Th1 cells.<sup>2</sup> hIFN- $\gamma$  is implicated with interleukin (IL)-12 in the adoption of a Th1 phenotype. On the other hand, Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13 af-

fect allergic responses.<sup>3,4</sup> Many studies have shown that hIFN- $\gamma$  secretion associated with IL-12 or 18 plays an important role in the Th1 and Th2 balance.<sup>5,6</sup> Hence, measurement of hIFN- $\gamma$  has been widely used for monitoring immune responses in allergic diseases such as atopic dermatitis.<sup>7,8</sup>

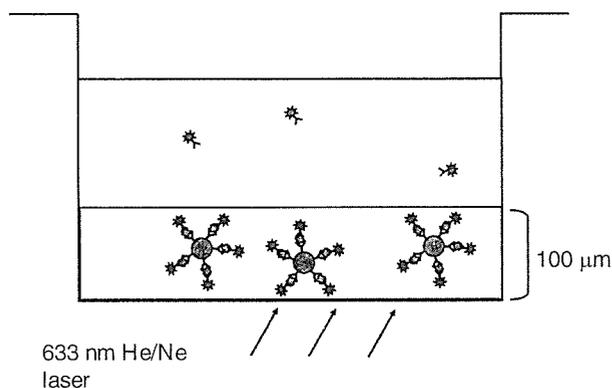
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an established immunoassay used to quantify various cytokines. Conventional ELISA, which is not readily amenable for screening large numbers of samples in drug screenings, requires many processes and large quantities of antibody. For drug discovery and development, high throughput screening (HTS) would

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu and <sup>2</sup>Applied Biosystems Japan, Ltd., Tokyo, Japan. Correspondence: Zenichiro Kato, M.D., Ph.D., Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, 1-1 Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193, Japan.

Email: zen-k@cc.gifu-u.ac.jp

Received 4 February 2005. Accepted for publication 5 July 2005.

©2006 Japanese Society of Allergology



**Fig. 1** Homogeneous assay is the main characteristic of FLISA. An FMAT® 8100 HTS has a macro confocal imaging system with a helium/neon laser, which automatically focuses on and scans fluorescent-bound beads resting on the bottoms of multiwell trays. Because the depth of focus, 100  $\mu\text{m}$ , is small in comparison with the remaining volume, background fluorescence is minimal in relation to bead-bound fluorescence; thus, there are no washing steps to remove unbound fluorophores.

benefit from an immunoassay that requires minimal manipulation and uses just a small amount of the compounds required. Fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA) is particularly well suited for HTS.<sup>9</sup>

We have developed a FLISA method for the measurement of hIFN- $\gamma$ . We constructed the assembly of capture antibody and fluorescent conjugated detection antibody for our FLISA system. This system enables high throughput measurement of hIFN- $\gamma$  and could be applied to the assessment of other cytokines or chemical mediators in allergic responses.

## METHODS

### INSTRUMENTATION

A fluorescent microvolume assay technology (FMAT®) instrument consists of a detector (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) integrated with a bar code reader and robotic plate handler (Zymark Corp, MA, USA) that can accommodate 60 plates. An FMAT® 8100 HTS has a macro confocal imaging system with a helium/neon (He/Ne) laser (633 nm) which automatically focuses on and scans fluorescent-bound beads resting on the bottoms of multiwell trays. The laser performs 256 scans across an area 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  100  $\mu\text{m}$  deep (Fig. 1). Because the depth of focus, 100  $\mu\text{m}$ , is small in comparison with the remaining volume, background fluorescence is minimal in relation to bead-bound fluorescence; thus, there are no washing steps to remove unbound fluorophores. The emitted fluorescence passes through the same optical path as the excitation beam and through a dichroic beam splitter for detection by photomultiplier

tubes through the filters (680–730 nm).

### PREPARATION OF ANTIBODY COATED BEADS

200  $\mu\text{l}$  of streptavidin beads (0.5% w/v; 6  $\mu\text{m}$  bead diameter; SVP-60-55, Spherotech, were diluted in 800  $\mu\text{l}$  of phosphate-buffered saline (PBS) + 0.01% sodium azide (NaN<sub>3</sub>). After centrifugation at 10,000 *g* for 2 minutes, the supernatant was discarded and resuspended in 1 ml of PBS + 0.01% NaN<sub>3</sub>. Next, a 4  $\mu\text{g}$  portion of biotinylated mouse anti-hIFN- $\gamma$  monoclonal antibody (mAb) (AHC4539, Biosource, California, USA) was added to the streptavidin beads solution and incubated with gentle mixing for 18 hours at room temperature. Washing was repeated 2 times and the capture antibody coated beads were stocked in PBS + 0.01% NaN<sub>3</sub> ( $8.4 \times 10^6$  beads/ml) at 4°C.

### PREPARATION OF RECOMBINANT hIL-18 PROTEIN

We used recombinant wild-type hIL-18 for the inhibition assay. Expression and purification were carried out as described previously with minor modifications.<sup>10-12</sup> The concentration of purified hIL-18 protein was estimated using the absorbance constant (6160) for hIL-18.

### PREPARATION OF hIFN- $\gamma$ BIOLOGICAL SAMPLE

hIL-18 inhibition assay based on hIFN- $\gamma$  induction was carried out as previously described.<sup>13,14</sup> Briefly, human myelomonocytic KG-1 cells (ATCC CCL246) were grown in a culture medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (2 mmol/L), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). hIL-18 prepared at our laboratories (in a final concentration of 2 ng/ml) was preincubated with anti-hIL-18 mAb (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan) or hIL-18 binding protein Fc chimera (IL-18BP) (Research and Development Systems Inc, Minneapolis, USA) (in final concentrations between 0 and 500 ng/ml) at 37°C for 1 hour and then 100  $\mu\text{l}$  of the mixture added to 100  $\mu\text{l}$  of KG-1 cells ( $3 \times 10^6$  cells/ml) per well in a 96-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark), followed by incubation at 37°C for 24 hours in 5% CO<sub>2</sub>. The culture supernatants were collected, and the hIFN- $\gamma$  production in each of the samples was determined by ELISA (Japan Immunoresearch Laboratories, Co. Ltd., Takasaki, Japan) and FLISA. Data are presented as the percent inhibition of total hIFN- $\gamma$  production in the absence of hIL-18 antagonists. IC<sub>50</sub>, the concentration of antagonists required to inhibit 50% of hIFN- $\gamma$  production by KG-1 cells stimulated with hIL-18, was then calculated.

### FLUOROMETRIC MICROVOLUME IMMUNOASSAY FOR hIFN- $\gamma$

A 50  $\mu\text{l}$  aliquot of sample or hIFN- $\gamma$  standard (Research and Development Systems Inc) was placed