

イムノクロマト法による
呼気凝縮液中の好中球マーカーの検出

岡山大学大学院保健学研究科
検査技術科学専攻
兵田朋子



岡山大学
OKAYAMA UNIVERSITY

気管支喘息とは

気管支の慢性的な炎症

気管支の狭小化・閉塞により呼吸が苦しくなる病気

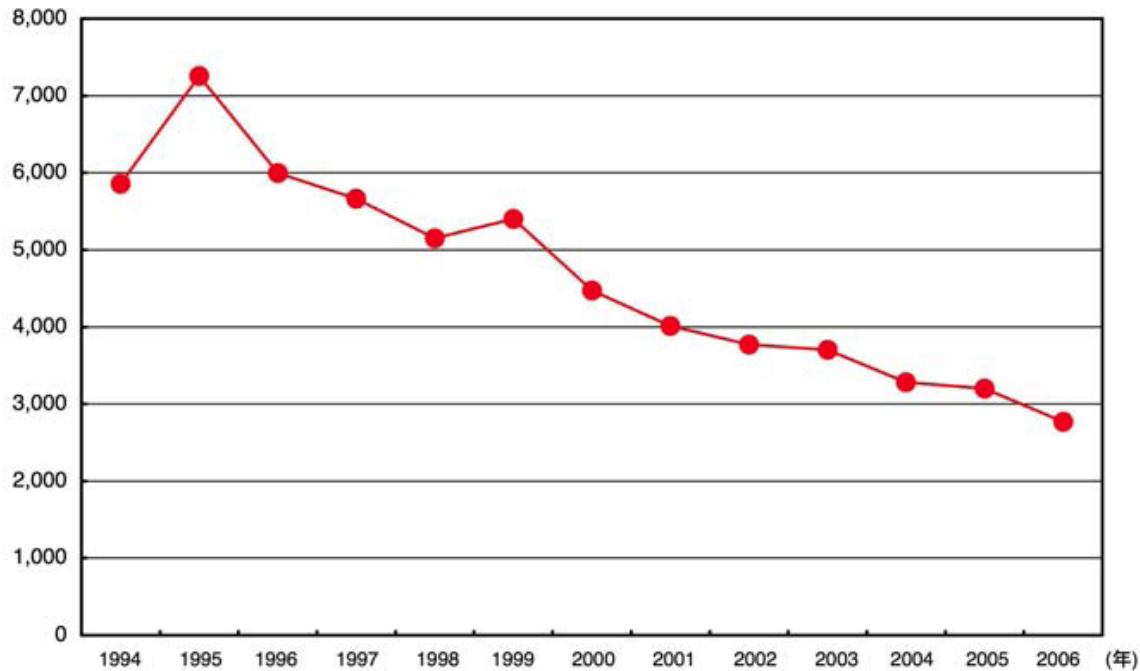


アレルギーの一種

〈アレルギーとは〉

免疫反応が、特定の抗原(外来の異物)に対して過剰に起こること

図1 わが国の喘息の死亡者実数の経年変動



厚生労働省「人口動態調査」

〈喘息の死亡者〉

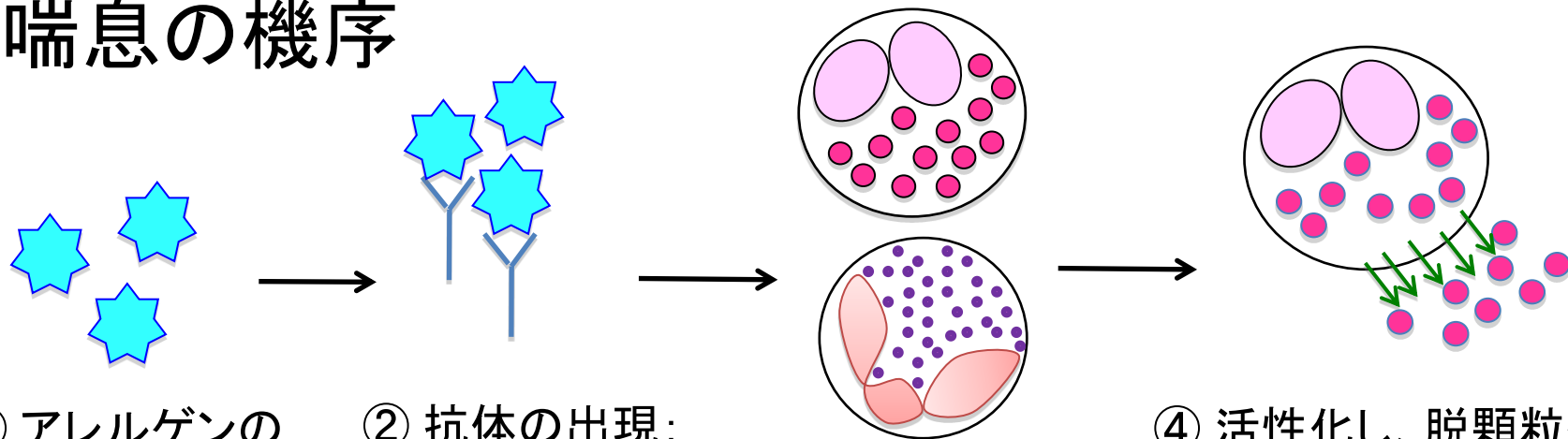
年間2000人超

(原因: 難治性喘息、喘息発作)



適切な治療を行えば
日常生活を送ることができる

喘息の機序



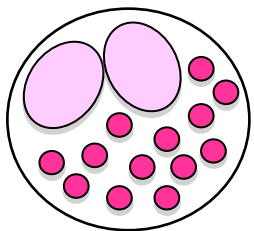
① アレルゲンの
体内への侵入

② 抗体の出現:
抗原抗体反応

③ 白血球の出現

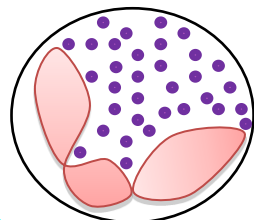
④ 活性化し、脱顆粒を起こす
→脱顆粒蛋白が呼気中に
出現

〈炎症に関与する白血球の種類〉



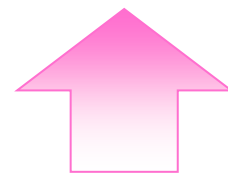
〈好酸球〉

アレルギー・慢性炎症に関与



〈好中球〉

難治性喘息への影響が示唆

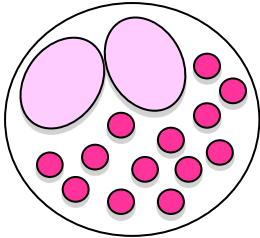
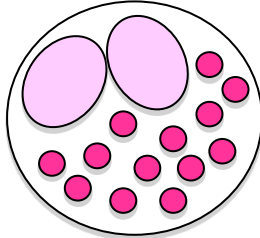
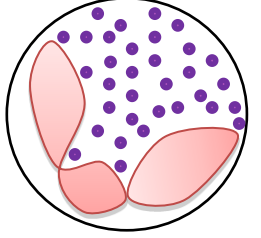


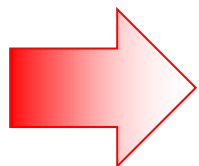
呼気中の脱顆粒蛋白
を検出



喘息の重症度判定。

喘息の2つのタイプ

患者特性	小児	成人
タイプ	アトピー型喘息 (アレルギー性喘息)	非アトピー型喘息 (非アレルギー性喘息)
原因	アレルギー	外界からの刺激
	(例)ハウスダスト、ダニ、 花粉、動物の毛など	(例)タバコ、強い匂い、ウイルス、 気温・湿度の急激な変化など
特徴	多くは治癒する	進行すると難治化する
主に呼気中 に出現する 白血球	<p>好酸球</p> 	<p>好酸球</p>  <p>→ 進行 → すると</p> <p>好中球</p> 



簡便な検査法 → 喘息の治療へ

イムノクロマト法のメリット

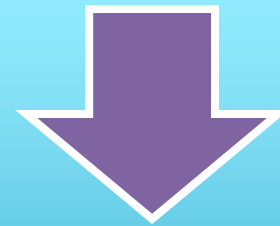
- ① 所要時間が少なく、操作法が容易
- ② 自宅や病院のベットサイド等どこでも使用可能
- ③ データを喘息コントロールに利用

(A) 喘息の重症度を判定



何性が優位か判断
治療指針、薬剤選択に利用

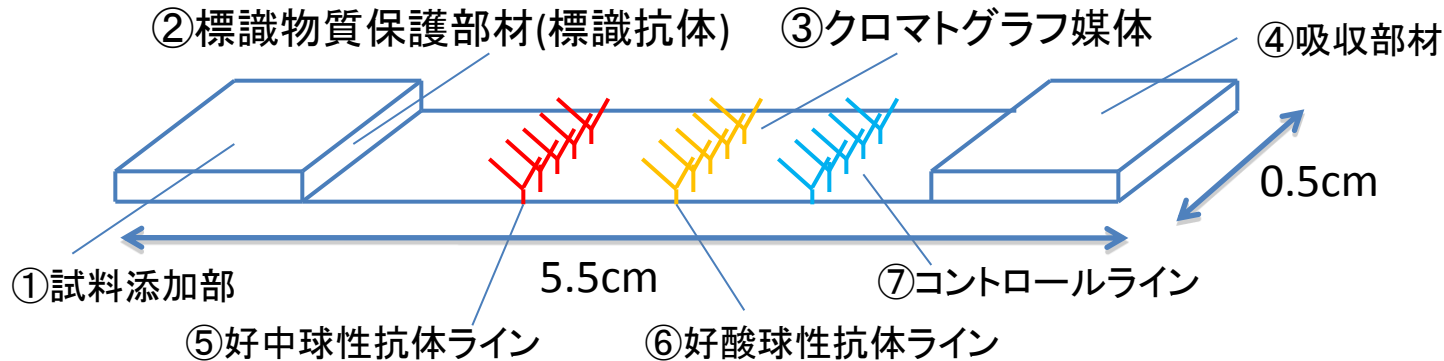
(B) 重症度の進行が見られる場合



適切な治療へ変更
喘息死の防止

イムノクロマト作成方法

〈設計図〉



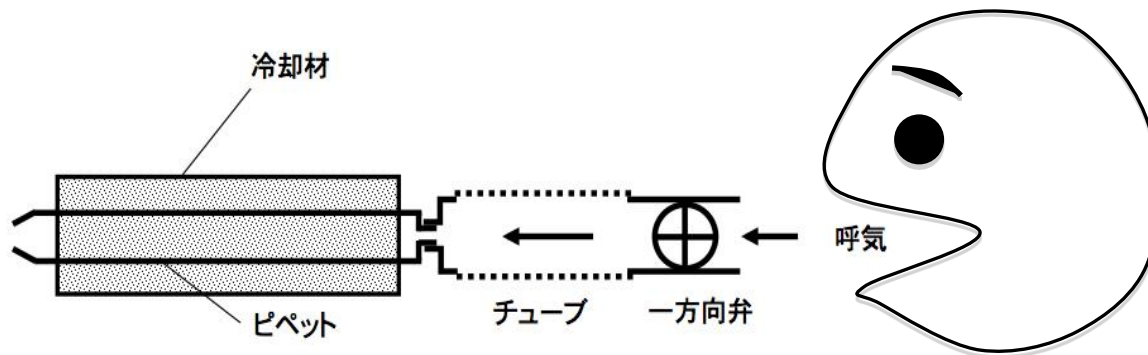
〈②標識保護部材〉

- (1) 金コロイド液に抗好中球・抗好酸球性抗体を加える。
- (2) ブロッキング液を添加。
- (3) 乾燥。

〈③クロマトグラフ媒体〉

- (1) 抗好中球性・抗好酸球性抗体を塗布。
- (2) 乾燥。
- (3) ブロッキング液に静置。
- (4) 洗浄・安定化液に静置。
- (5) 乾燥。

呼気凝縮液採取方法



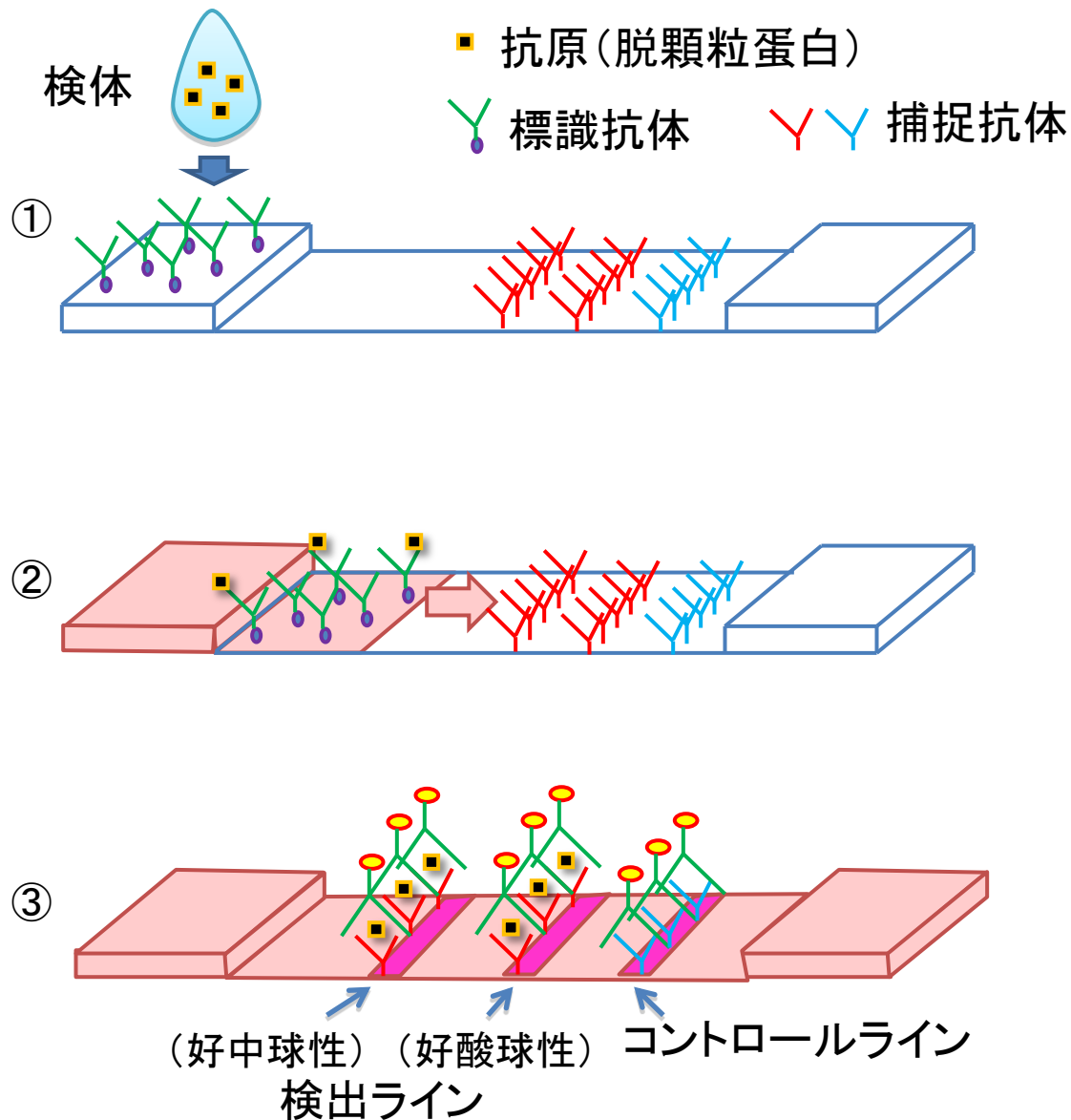
〈目的〉

上記キットを用いて収集した呼気を検査に利用する。
収集方法は簡便で、外国製品より安価。

〈使用方法〉

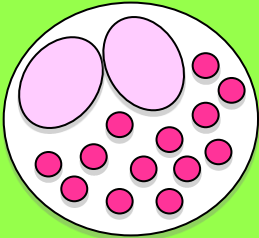
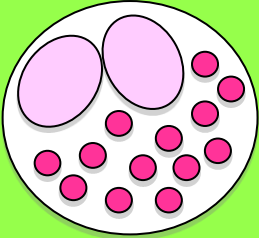
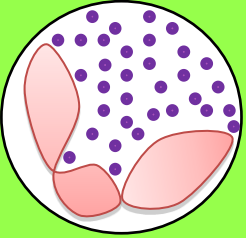
- ① 10分間安静呼吸。
- ② 10分後、たまった水滴をイムノクロマト試験具の試料添加部に滴下。
- ③ 15分後、早見表を用いて目視判定。

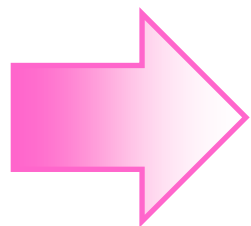
イムノクロマト法



判定目安:色調の違い	重症度
0	正常
+1~+2	軽度
+3~+4	中等度
+5	重症

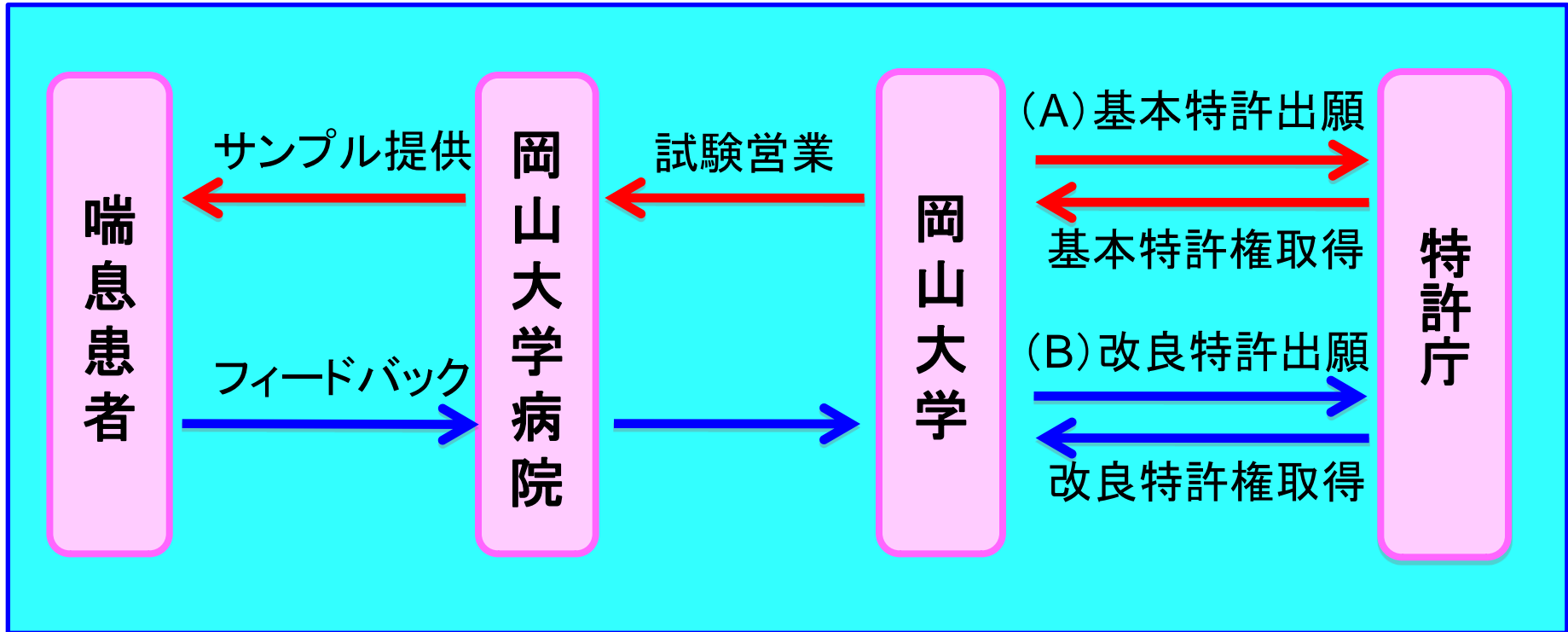
喘息の2つのタイプ

患者特性	小児:アトピー型	成人:非アトピー型
特徴	多くは完治	進行すると難治化
主に呼気中に出現する白血球	<p>好酸球</p> 	<p>好酸球</p>  <p>→ 進行 →</p> <p>すると</p> <p>好中球</p> 



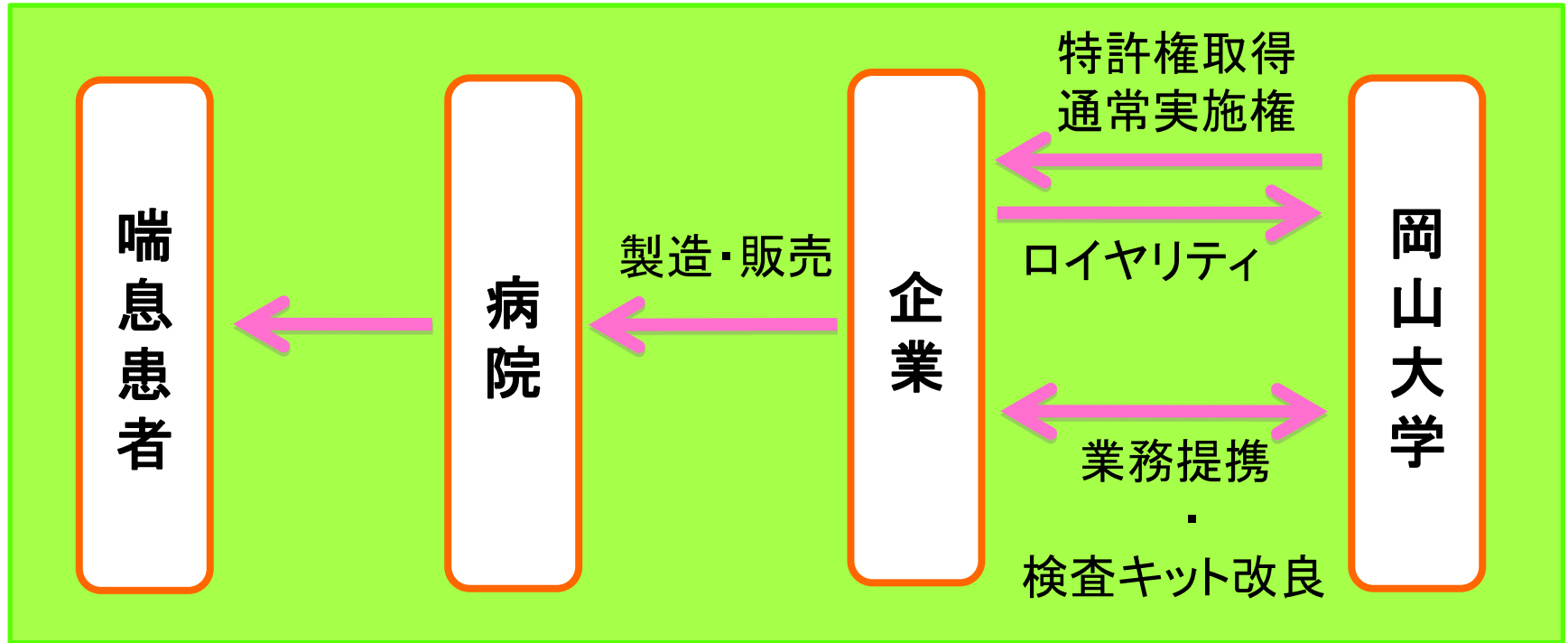
QOL (Quality Of Life) の向上

事業の展開方法 〈初年度〉



- ① 基本特許(A)出願後、試験営業実施
- ② イムノクロマトグラフキットサンプルを大学院で100個作成
喘息患者に配布→データの収集・改良
- ③ 改良特許(B)を出願、(A)および(B)の特許権取得

事業の展開方法 〈2年度～5年度〉



① 2～3の企業と交渉し、製造・販売等を委託し、2年目から販売開始

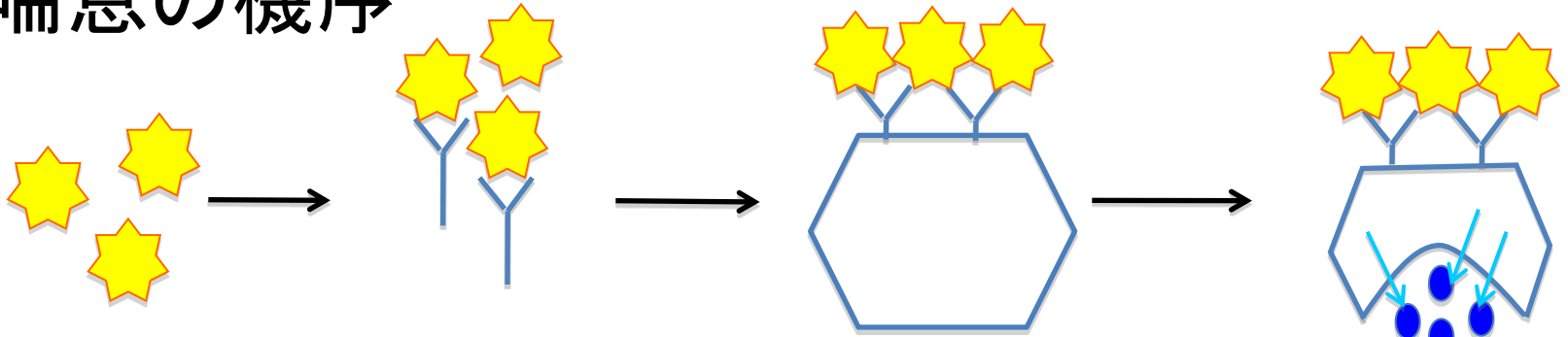
② 海外特許出願予定

③ 販売目標

年次	販売単価	喘息患者
2	1000円	約 5千人(約 0.01%)
5	800円	約 5万人(約 0.1%)

ご静聴ありがとうございました

喘息の機序

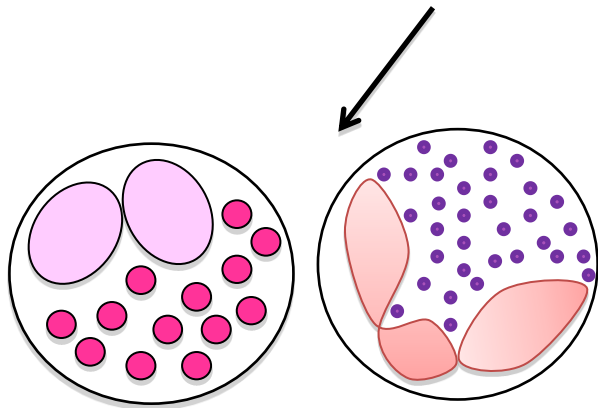


① アレルゲンの
体内への侵入

② 抗体の出現：
抗原抗体反応

③ 抗体の受容体：
肥満細胞の出現

④ 活性化し、脱顆粒。
「即時型反応」

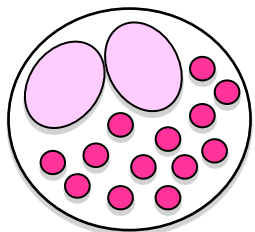


⑤ 白血球の出現

⑥ 活性化し、脱顆粒。
→組織の慢性的な炎症・破壊
「遅発型反応」

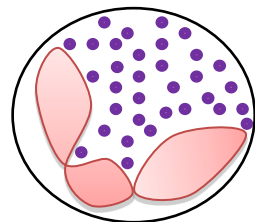
本研究は、脱顆粒蛋白を検出。

〈喘息の炎症に関与する白血球の種類〉



〈好酸球〉

アレルギー・慢性炎症に関与



〈好中球〉

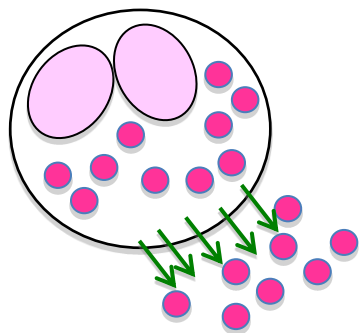
難治性喘息への影響



活性化すると

脱顆粒を起こす

→脱顆粒蛋白が呼気中に出現



〈今までの検査法〉

検体採取時に患者さんへの体の負担が大きい

特定の機関に行かないと行えない

〈本提案の検査法〉

検体採取が容易

特定の機関で無くても行える

喘息の検査法

〈病態を測る検査法〉

- ◇ 誘発喀痰検査
- ◇ 気管支肺胞洗浄検査
- ◇ 気道過敏性検査

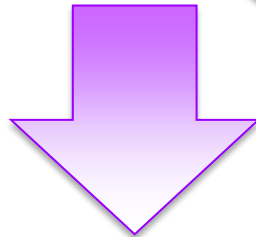
〈デメリット〉

- ・ 検体採取時の侵襲性が高い
- ・ 特定の機関でしか行えない

〈喘息コントロール検査法〉

- ◇ 喘息コントロールテスト
- ◇ ピークフローメーター

- ・ 客観的な病態の把握には劣る



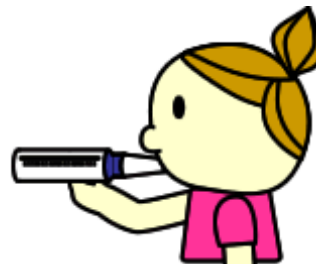
〈呼気凝縮液採取によるイムノクロマト法〉

- ・ 検体採取時の侵襲性が低い
- ・ 喘息病態を把握できる→薬剤選択が容易

現在使用されている喘息の自己コントロール

ぜんそく 喘息コントロールテスト(ACT)

ピークフローメーター



- ・気管支の広がり具合を調べる。
- ・気管支が狭くなるほど、測定値は低下。
→症状の把握、治療薬の効果を見るのによい。
→喘息の病態は把握できない。

Step 1 各質問について該当する点数を丸で囲み、その数字を右の四角の欄に書き入れてください。できる限り率直にお答えください。喘息の現状について担当医師に相談する際、役立ちます。

質問1 この4週間に、喘息のせいで職場や家庭で思うように仕事はかどらなかったことは時間的にどの程度ありましたか？

	いつも	かなり	いくぶん	少し	全くない	点数
	1	2	3	4	5	

質問2 この4週間に、どのくらい息切れがしましたか？

	1日に2回以上	1日に1回	1週間に3~6回	1週間に1,2回	全くない	点数
	1	2	3	4	5	

質問3 この4週間に、喘息の症状(ゼイゼイする、咳、息切れ、胸が苦しい、痛い)のせいで夜中に目が覚めたり、いつもより朝早く目が覚めてしまうことがどのくらいありましたか？

	1週間に4回以上	1週間に2,3回	1週間に1回	1,2回	全くない	点数
	1	2	3	4	5	

質問4 この4週間に、発作止めの吸入薬(サルタノール[®]やメブチン[®]など)をどのくらい使いましたか？

	1日に3回以上	1日に1,2回	1週間に数回	1週間に1回以下	全くない	点数
	1	2	3	4	5	

質問5 この4週間に、自分自身の喘息をどの程度コントロールできたと思いますか？

	全くできなかった	あまりできなかった	まあまあできた	十分できた	完全にできた	点数
	1	2	3	4	5	

Step 2 各項目の点数を足してあなたの総合点を出してください。

合計

Step 3 裏面を見て、総合点からあなたの喘息状態を、すぐ確認しましょう。

著作権 © QualityMetric Incorporated, 2009 禁無断転載・使用

喘息の症状や苦しさの感じ方は個人差があり、客観的な評価としては不十分。

製作にかかるコスト

1キットは約500円と見積もり、1000円で販売する。

◇ イムノクロマトグラフ用試験具

内訳	単価(円)
抗好酸球抗体(5万円)	50
抗好中球抗体(5万円)	50
金コロイド	250
媒体等の紙、ケース	10
<hr/>	
合計	310

◇ 呼気凝縮液採取キット

内訳	単価(円)
弁付きマウスピース(2回使用)	50
チューブ、ピペットその他付属品	110
<hr/>	
合計	160

事業採算①

〈初年度の収益見込み〉

販売数 100個

販売単価 1000円

	売上高(千円)	必要経費(千円)
	0	
特許出願費用(国内)		500
設備投資		1,500
イムノクロマトグラフ用試験具		31
呼気凝縮液採取キット		16
諸経費 営業・宣伝		10
雑費		12
合計	0	2,069
利益	<u>-2,069</u>	

事業採算②

〈5年目の収益見込み〉

販売数 60万個 (50000人 × 12回/年)

販売単価 800円

	売上高(千円)	必要経費(千円)
	480,000	
特許ロイヤリティ(売り上げ額の5%)	24,000	
設備投資		1,500
研究開発費		70
諸経費 営業・宣伝費		200
人件費(450万円 × 2)		9,000
雑費		104
合計	24,000	10,874
利益	13,126	

〈2年目の収益見込み〉

販売数 6万個(5000人×12回/年)

販売単価 1000円

	売上高(千円)	必要経費(千円)
	60,000	
特許ロイヤリティ	3,000	
特許海外出願費用		5,000
設備投資		1,500
研究開発費		70
諸経費 営業・宣伝費		200
特許契約料		100
人件費(300万円×1)		3,000
雑費		104
合計	3,000	9,974
利益	<u>-6,974</u>	

〈3年目の収益見込み〉

販売数 12万個(10000人×12回/年)

販売単価 900円

	売上高(千円)	必要経費(千円)
	108,000	
特許ロイヤリティ	5,400	
設備投資		1,500
研究開発費		70
諸経費 営業・宣伝費		200
人件費(300万円×1)		3,000
雑費		104
合計	5,400	4,874
利益	526	

〈4年目の収益見込み〉

販売数 24万個(20000人×12回/年)

販売単価 900円

	売上高(千円)	必要経費(千円)
	216,000	
特許ロイヤリティ	10,800	
設備投資		1,500
研究開発費		70
諸経費 営業・宣伝費		200
人件費(400万円×2)		8,000
雑費		104
合計	10,800	2,674
利益	8,126	

喘息の重症度

重症度		ステップ1 軽症間欠型	ステップ2 軽症持続型	ステップ3 中等症持続型	ステップ4 重症持続型
喘息症状の特徴	頻度	週1回未満	週1回以上だが毎日ではない	毎日	毎日
	強度	症状は軽度で短い	月1回以上日常生活や睡眠が妨げられる。	週1回以上日常生活や睡眠が妨げられる。	日常生活に制限
				短時間作用性吸入β ₂ 刺激薬頓用がほとんど毎日必要	治療下でもしばしば増悪
	夜間症状	月に2回未満	月2回以上	週1回以上	しばしば
PEF	%FEV1.0 %PEF	80%以上	80%以上	60%以上80%未満	60%未満
FEV1.0	変動	20%未満	20～30%	30%を超える	30%を超える