

## スギ花粉アレルギーの研究

### I. スギ花粉に対する特異 IgE 抗体検出のためのポリスチレンビーズを担体とした酵素抗体法の開発について

佐藤久美子, 巨智部直久\*, 中沢次夫\*\*

#### はじめに

我が国において花粉アレルギー症を引き起す植物はブタクサをはじめとして、およそ 200 種におよぶとされているが、そのうちスギ花粉症は季節によって全国的に多発する重要なアレルギー疾患である。スギ花粉の飛散状況と花粉症の発症は関連が深く、スギ花粉に対し特異 IgE 抗体を持つ人は、スギ花粉飛散時（2 月下旬～4 月中旬）<sup>1)2)</sup> に予じめ理学的な予防処置を講ずるか、または対療療法を行う以外、これといった効果的な治療法は確立されていない。我々はスギ花粉粗抗原を分画精製する過程で減感作療法に有効な抗原や患者血清中の特異 IgE 抗体をより鋭敏に検出できる抗原を得るために本実験を行ってきた。本報では、スギ花粉硫安分画抗原を用いて、患者血清中の特異 IgE 抗体を簡便に検出する方法を開発したので報告する。従来、種々の抗原に対するヒト血清中の特異 IgE 抗体の検出は Wide<sup>3)</sup> Johansson<sup>4)</sup> が開発した radioallergosorbent test (RAST 法) によって行われてきた。スギ花粉アレルギーの場合も RAST 法によって測定されている。しかし RAST 法はアイソトープを使用するため、鋭敏な検査法ではあるが、特殊な設備や器械器具を必要とするので、通常の検査室で実施することは困難である。一方、近年開発された酵素抗体法 (ELISA)<sup>5)</sup> は原理的には RAST 法とほとんど変わらず、測定感度も RAST 法に劣らないうえ、通常の検査室で簡便に検査できるという利点がある。そこで我々は、スギ花粉抗原に対する特異 IgE 抗体の検出に ELISA の応用を試みた。抗原固相化担体としては多数の検体を処理するのに便利なポリスチレンビーズを、また酵素標識抗ヒト IgE 抗体として、酵素反応の安定している  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗体を用いた。

#### 材料および方法

スギ花粉の採取および抗原の作製：開葯直前の雄花穂を採取し、細かく切裁することによって花粉を取り出した。集めた花粉を十分風乾した後、適当量のアセトンを加えて脱脂し、さらにクロロホルム：メタノール液（2：1）での脱脂操作を 2 回繰り返した後、減圧乾燥した。次に、花粉から蛋白成分を抽出するため、0.125 M 重炭酸アンモニウムを加えて約 2 時間攪拌し、上清を分離した後上記操作を繰り返した。同一試料について 3 回抽出した後、すべての抽出液をプールし、硫安分画を行った。すな

\*群馬大学教育学部, 生物

\*\*群馬大学医学部, 内科

わち試料液を攪拌しながら終濃度が80%になるように硫酸アンモニウムの粉末を加え、1時間後に15,000rpm, 30分間遠心し沈澱を集め、生理的食塩水に十分透析した。このようにして得た試料をスギ花粉抗原として実験に使用した。

**スギ花粉抗原のポリスチレンビーズへの固相化:** 抗原の固相化担体としてポリスチレンビーズ(直径 $\frac{1}{4}$ インチ, PIECE社製, 和光純薬KK販売)を用いた。予じめ, 0.05M炭酸バッファーで任意の濃度に希釈したスギ花粉抗原(蛋白量 $400\mu\text{g} \sim 25\mu\text{g}/\text{ml}$ )の1mlに4~5個の割合でポリスチレンビーズを加え, 45℃, 3時間インキュベーションし, さらに4℃に15時間静置することによって, ビーズ表面に抗原を吸着させた。このようにして得たビーズは緩衝液I(0.15M磷酸バッファー, pH7.2(1容)に生理的食塩水(4容)を加えた液に0.1% Tween 20と0.05% アジ化ナトリウムを添加したもので)で洗滌し, 使用直前まで4℃で緩衝液I中に保存した。

**抗原吸着ビーズと被検血清との一次反応および酵素標識抗体との二次反応:** この過程は原則として佐藤ら<sup>6)</sup>が述べた方法にしたがって行われた。すなわち, 試験管(栄研チューブ, 2号)に予じめ緩衝液II(緩衝液Iに0.3%牛血清アルブミンを添加したもので)で任意に希釈した被検血清0.16mlを採り, 抗原吸着ビーズを1個加えて37℃で2時間インキュベーションした。反応終了後, 反応液をアスピレーターで吸引し, ビーズに緩衝液Iを加えて5分後に吸引する洗滌操作を3回繰り返した後, ティッシュペーパーで作製した紙絨りを用いて試験管内の緩衝液を十分吸い取った。次に, 0.16mlの $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgGヤギ血清(MBL社製)を加えて37℃で3時間インキュベーションし, 反応終了後, 一次反応後と同様の手順で十分洗滌した。

**酵素反応:** 最終的にビーズに吸着した酵素,  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの量(間接的に被検血清中のIgG量を示す)を測るため, 酵素反応を行った。酵素基質として2-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(和光純薬製)を用い, 0.1%になるように0.05M磷酸緩衝液, pH7.2に溶解した。その0.6mlを採りビーズを加えてパラフィルムで栓をし, 37℃でインキュベーションした。17時間後, 0.6mlの0.1M炭酸ナトリウム液を加え反応を停止した。反応陽性の場合には黄色に発色するので, 412nmにおける吸光度を分光光度計のセミシッパシステム(島津製作所)によって測定した。

**血清:** 患者血清は群馬大学医学部附属病院, 内科を受診し, 皮内反応およびRAST法が陽性であったことから, スギ花粉アレルギーと診断された人から採血分離した。また, スギ花粉アレルギー疑いの血清は当短大の学生で, 自覚症状のある人から採血分離した。正常者血清はいずれも当短大の学生から得た。

**蛋白量の測定:** 抗原蛋白量の測定はBio-rad社のProtein assayのmicro methodによって行った。標準蛋白として牛血清アルブミン(Sigma社製)を用いた。

## 成績および考察

1. スギ花粉抗原のポリスチレンビーズによる固相化と抗原濃度: これまでに我々が報告したフィラリア症<sup>6)</sup>, こんにゃく喘息やダニアレルギー<sup>7)</sup>などの血清中の特異IgE抗体測定においては, 抗原の種類によってビーズへの固相化の際の最適抗原濃度にかなり差異がみられた。そこで, スギ花粉抗原を25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g protein}/\text{ml}$ の5段階に希釈し, それらにより感作したビーズを用いて他の反応

条件はすべて等しくした場合の抗原濃度と終反応との関係を3種の患者血清を用いて検討した。表1に示したように、抗原固相化の際の濃度が高いほど、同一の患者血清における終反応も高くなる傾向がみえ、一方健康人血清ではどの場合にも  $\Delta E_{412}$  の値が0.035以下であった。本法による特異IgE抗体測定の目的は患者血清中の特異IgE抗体が健康人のそれより高いかどうかを知ることであり、IgE抗体の絶対量を求めることではない。そこが本法の限界である。それゆえ、反応の鋭敏さやスギ花粉抗原の採取における困難さを考慮して、以後の実験では抗原濃度  $100 \mu\text{g protein/ml}$  で固相化したビーズを使用することとした。一般に蛋白抗原とポリスチレンビーズとの結合は疎水性の結合であるといわれ、ビーズ表面には  $1 \sim 2 \mu\text{g/ball}$  の蛋白質が結合するにすぎないので  $100 \mu\text{g protein/ml}$  で十分と考えられた。

Table 1 Effect on antigen concentration coating polystyrene beads

Antigen conc (protein $\mu\text{g/ml}$ )	$E_{412}$ of final reaction				
	Patient's sera			Healthy sera	
	M.I.	M.A.	H.Y.	S.K.	H.A.
400	0.443	0.195	0.170	0.025	0.024
200	0.380	0.178	0.163	0.034	0.025
100	0.375	0.167	0.158	0.017	0.028
50	0.338	0.149	0.156	0.024	0.018
25	0.298	0.115	0.143	0.032	0.029

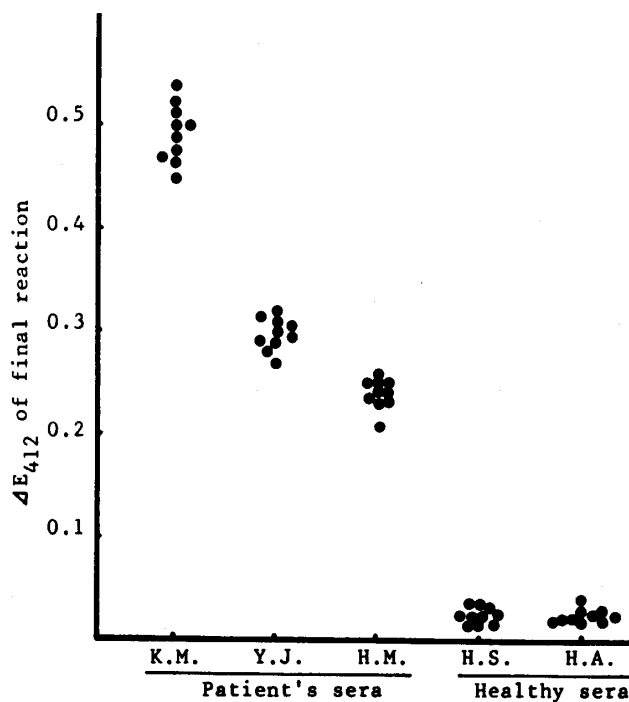


Fig.1 Variable rate coating polystyrene beads with antigen

2. 抗原のポリスチレンビーズへの結合量の変異: ポリスチレンビーズは表面を粗くして抗原が付着しやすいように工夫されているが、同一条件で抗原を固相化してもすべてのビーズに等量の抗原が吸着するとは考えられない。そこで、同一検体について同一条件で反応させた時、終反応の値ほどの程度変化するかを検討した。被検血清として、比較的特異IgE含有量の高かったK.M.の血清および特異IgE

含有量の低かったY.J., H.M.の血清を使用した。Fig1に示したように、K.M.の値は0.554~0.457 (mean value: 0.502 ± 0.29) とややばらつきがみられたが、Y.J.およびH.M.の値はそれぞれ0.317~0.265 (mean value: 0.295 ± 0.015), 0.259~0.207 (mean value: 0.239 ± 0.015)とばらつきが少なく、抗体価の高い血清でばらつく傾向がみられた。そこで実際の検査にあたっては同一検体について3回の検査を行い、得られた値のうち近似の値を合わせその平均値を検査値とした。著者らの1人、佐藤はフィラリア症の皮内反応抗原による特異IgE抗体測定の際にMBL社から購入したポリスチレンボールを使用したところ、10回の検査で1~2回 $\Delta E_{412}$ の値が極端に低い値となったことを報告した<sup>6)</sup>が、本実験のPIECE社製ビーズではそのような現象はみられなかった。

### 3. 検査の実施：以上述べた

ような方法で、スギ花粉アレルギー症患者血清、スギ花粉アレルギー症の疑いのある人の血清および健康人の血清について、特異IgE抗体量を測定した(Fig 2)。皮内反応とRAST法の結果からスギ花粉症と診断された9例は0.485~0.106と健康人血清の値0.020~0.035よりすべて高い値を示した。また、本人の自覚症状(2~6月にかけて鼻水や目のかゆみ、くしゃみなどに悩ませられる)からスギ花粉アレルギーが疑われた4名の血清もいずれも高い値(0.505~0.239)を示した。これらの結果から、本法は血清中のスギ花

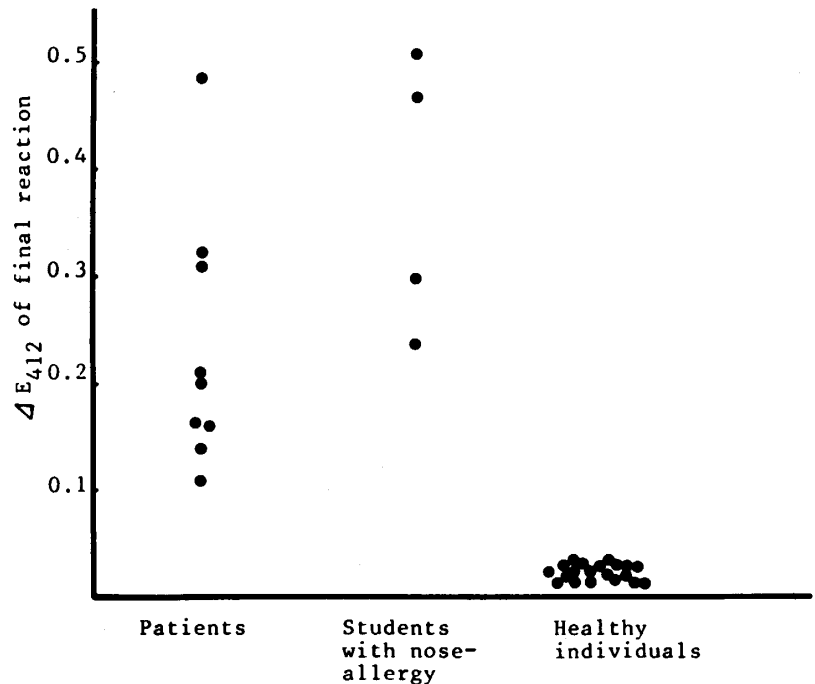


Fig.2 Final reaction values in sera from patients, students with nose-allergy and healthy individuals

粉 IgE 抗体の検出に適しており、しかも本法の操作上の簡便性やその鋭敏度から、検査室での通常の検査やスクリーニングテストに広く応用できると結論された。

4. 抗原による阻止反応を利用した血清中の特異的 Ig E 抗体定量法の検討：以上述べた酵素抗体法による特異 IgE 抗体測定法は定量法としては十分ではない。そこで定量のための一方法として、患者血清に予じめ一定量のスギ花粉抗原を加えて抗原抗体反応を起させ、残りの IgE 抗体量を既に述べた方法で測定し、血清中の IgE 抗体が抗原によって完全に飽和される点(終反応がコントロールと等しくなる点)を測定することを検討した。高い抗体価を示した K.M. の血清の 4 倍希釈液に Buffer II で希釈した精製期日の異なる 3 種類の抗原を血清 0.16 ml あたり 5~500 ng 加え、37℃ で 30 分インキュベーションした後、これまでに述べた方法にしたがって特異 IgE 量を測定した。Fig 3 に示したように、同一血清を使用しても当然のことながら使用した抗原の種類によって反応阻止に必要な量は異なり、また加える抗原量の増加とともに反応阻止量は増加したが、直線的な関係は認められなかった。これらの結果から患者

血清中の特異IgE抗体量を阻止反応によって定量することは実際上困難と考えられる。しかし本法は非常に鋭敏な方法であるから、抗原の力価を検討するには最適である。現在我々はスギ花粉からアレルギー反応に強く関与する抗原蛋白を精製しており、本法を抗原力価の検討に使用している。

前述のように、現在種々のアレルギー疾患の特異IgE抗体の測定はほとんどRAST法によって行われているが、最近酵

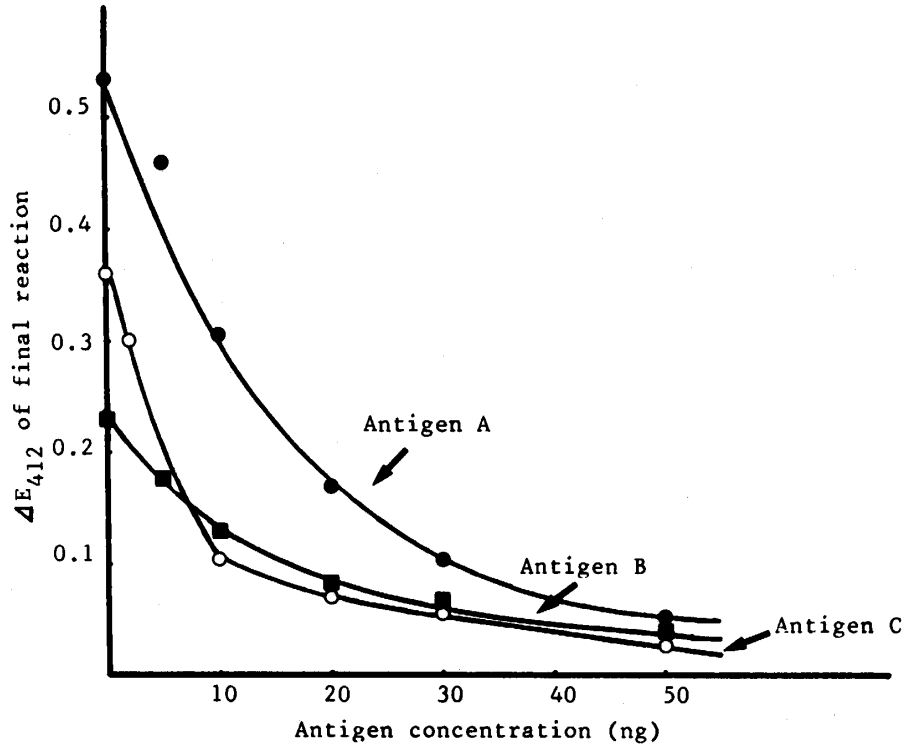


Fig. 3 Inhibition test with various antigens

素抗体法用の測定キットとしてPhadezyme RAST kit (Pharmacia Diagnostic Co.) が市販され、使用されはじめた。伊藤ら<sup>8)</sup>はPhadezyme RAST kit を使用して鼻アレルギーと診断された患者のうち、ハウスダストとダニ抗原での皮内反応が陽性であった者の血清について特異IgE抗体の測定を行ったところ、RAST法での結果と同様であったと報告した。スギ花粉アレルギーについてもPhadezyme RAST kit による特異IgE抗体の測定が除々に試みられつつある。しかしPhadezyme RAST kit は抗原固相化のためにCNBrで活性化したペーパーディスクを用いており、我々の使用したポリスチレンビーズに比べ、抗原の吸着面積が少なく、まペーパーがくずれやすいことから取り扱いにくいと考えられる。現在我々の開発した方法とRAST法やPhadezyme RAST法との比較検討を行っている。

## 要 約

ポリスチレンビーズを担体とした酵素抗体法により、スギ花粉アレルギー患者の血清について特異IgE抗体の測定を試みた。その結果、スギ花粉蛋白、100 $\mu$ g/mlの濃度の抗原液で感作したビーズを用い、酵素標識抗体として $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgEヤギ血清を用いることによって、特異IgE抗体の測定は簡便に且つ確実に行えると結論された。すなわち、RAST法および皮内反応によってスギ花粉症と診断された9名の患者および自覚症状から本症が疑われた4名の学生から得た血清について、上記方法により特異IgE抗体を測定したところ、いずれの群の値(患者;  $\Delta E_{412}$ , 0.485~0.106, 学生;  $\Delta E_{412}$ , 0.505~0.239)も健康人血清の値( $\Delta E_{412} < 0.035$ )より高かった。また抗原阻止反応を応用した酵素抗体法による特異IgE抗体の定量化を試みたが、常に一定力価の抗原を用意する必要が

あり實際上困難であると結論された。しかし上記の方法は抗原の力価を検討するためには鋭敏且つ簡便な方法と思われた。

## 文 献

1. 柏木秀雄, 服部 徹, 笠井寛司: 紀南地域におけるスギ花粉症の研究, アレルギー, 32 (8), 587, 1983.
2. 岸川礼子, 井上魁夫, 長野 準, 宗 信夫: 福岡市とその周辺における空中花粉と花粉症について (第2報), アレルギー, 32 (8), 588, 1983.
3. Wide, L., Bennich, H. and Johanson. S.G.O : Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. Lancet 2, 1105-1109, 1967.
4. Johanson, S.G.O. Bennich, H. and Berg, T. : In vitro diagnosis of atopic allergy. Int Arch. Allergy 41, 443-451, 1971.
5. Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. : Enzyme linked immunosorbent assays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull. World Health Organ., 53, 55-65, 1976.
6. 佐藤久美子, Vijayamma Thomas, 鈴木 守: フィラリア症の免疫学的診断法の研究—皮内反応抗原FST3を用いたIgE-酵素抗体法の開発— 群大医短紀要, 2, 117-125, 1981.
7. 稲沢正士, 中沢次夫, 佐藤久美子, 小林節雄: 担体としてポリスチレンボールを用いるEnzyme immuno assay 法についての基礎的検討, アレルギーの臨床, 1984年6月掲載予定
8. 伊藤博隆, 太田裕美, 馬場駿吉, 松下隆, 鈴木康夫: アレルギー 31. 431-438, 1982.