

表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した空中花粉 アレルギーのリアルタイム測定

山形県衛生研究所

高橋裕一

ビアコア株式会社

大橋 武

空中花粉アレルギーの濃度をリアルタイムに近い短時間に測定するシステムを確立することを目的としてスギ花粉の主要アレルギーの一つである Cry j 1 についてその可能性を検討した。空中花粉アレルギーはサイクロンサンプラーを用いて採集した。大気試料からの Cry j 1 の抽出は 0.125 M NH_4HCO_3 を含む 10 mM HEPES 緩衝液で行った。Cry j 1 のリアルタイム測定には Biacore®3000 および Biacore®Q を用いた。このシステムの測定感度は Cry j 1 では 5 ng/ml であった。抽出試料は 0.1 ml 必要であったので 500 pg まで測定できたことになる。大気中の Cry j 1 濃度は試料を採集して 40 分後には得られた。つまり抽出操作に 15 分間、花粉と抽出液の分離に 10 分間、そして測定に 10 分間を要した。

Key words : allergen — Biacore — biosensor — Cry j 1 — surface plasmon resonance

はじめに

現在実施されている花粉情報のもとになっている空中花粉の測定はダラム型花粉捕集器と呼ばれる落下花粉の数を数える装置でなされている。ごく最近になって、空中花粉の数を自動で計数する花粉モニターが開発され¹⁾普及しつつある。しかし、いずれも花粉の数を計数し、花粉症の発症に関係する花粉アレルギーの量を測定するものではない。

患者の発症との関係をみるのであれば花粉アレルギーの量を情報化することが望まれる。花粉アレルギーの量を情報化する試みは 1998 年の春からフィンランドのツルク大学の研究グループが行っている²⁾。彼女らは花粉数の情報と同時に花粉アレルギーの量を情報化している。空中花粉アレルギーの量を測定するための方法は種々開発されているが³⁾⁻⁷⁾、一般に ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法⁸⁾⁻¹⁰⁾による定量が行われてきた。この方法の感度は良好ではあるが測定に長時間を要する。高感度の方法を用いた場合、

試料を採集してから結果を得るまで 11 時間を要する。そのため先のフィンランドの情報は 1 日遅れの情報となっており重症患者からリアルタイムに近い情報提供や明日の予報についての要望が出されている。

我々は表面プラズモン共鳴現象¹¹⁾¹²⁾を利用したリアルタイムに近い花粉アレルギー測定の可能性を検討した¹³⁾。その結果、Biacore®3000 または Biacore®Q を用いれば空中の試料を採集して約 40 分後には Cry j 1 量を求めることができることがわかった。

材料と方法

1. 空中花粉アレルギーの採集および花粉アレルギーの抽出

空中の花粉アレルギーはサイクロンサンプラー (バーカード C90M, バーカード社, 英国) を用いて採集した¹⁴⁾。試料は 1.5 ml-エッペンドルフチューブに乾燥状態で採集される。吸引容量は 1 m³/h であり, 1 μm 直径の粒子が 90% の効率で採集される。抽出は 200 μl の 150 mM NaCl, 0.125 M NH_4HCO_3 , 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 を含む 10 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) で 15 分間行い, 4000 rpm で 5 分間遠

Received : September 26, 2001

Accepted : December 27, 2001

Abbreviations : ELISA enzyme-linked immunosorbent assay ; RU Resonance unit

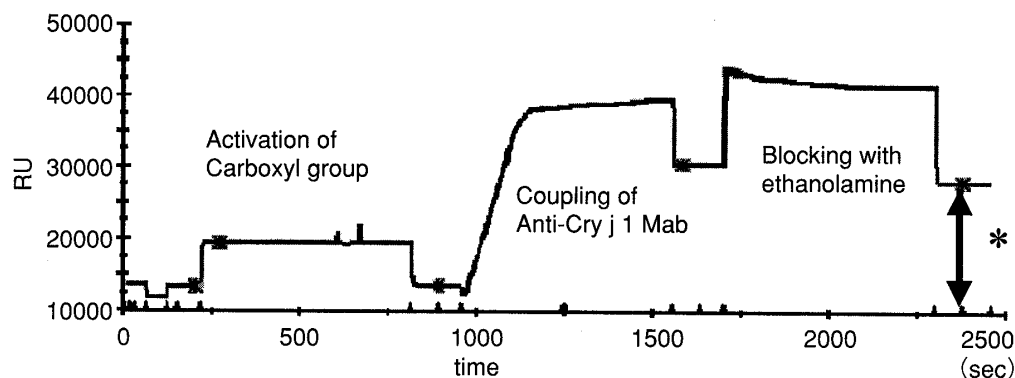


Fig. 1. Immobilization of Cry j 1 Mab on the surface of the sensor chip.

* Amounts of Cry j 1 immobilized on the surface of the chip, 1000 RU is defined as 0.1° of SPR angle change and equivalent of protein concentration on the surface of 1 ng/mm² of the sensor chip.

心し、花粉とアレルゲンを分離した。両者の分離はろ過法でも可能であった。ろ過には蛋白に対する結合が極度に低い再生セルロースフィルター（クロマコール・シリンジフィルタ、 $\phi 4$ mm, 0.2 μ m, Chromacol Ltd.）を使用した。

2. センサー表面の作成

スギ花粉アレルゲン定量用には抗 Cry j 1 モノクローナル抗体（KOWA；KW-S131）を専用のセンサーチップ CM5（Biacore AB, Uppsala, Sweden）表面に固定化して用いた。このセンサーチップはガラスの支持体に 50 nm の厚さの金膜が貼ってあり、その表面にはカルボキシル化デキストラン層を 100 nm の厚さにコートしてある。すべての処理は HBS 緩衝液（150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.01% Surfactant P20 を含む 10 mM HEPES, pH 7.4）で 25℃、流速 10 μ l/min の条件で行った。

まず、カルボキシル化したデキストラン層を 50 mM の N-ヒドロオキシサクシニミド（NHS）と 200 mM N-エチル-N'-(3-ジメチルプロピル)カルボジイミドハイドロクロリド（EDC）で 15 分間活性化し、酢酸ナトリウム（pH 4.7）に溶解した 50 μ g/ml の抗 Cry j 1 モノクローナル抗体（抗 Cry j 1 Mab）を反応させ、その後、活性残基を 1M エタノールアミン-ハイドロクロリド-NaOH（pH 8.5）で 15 分処理した。ブロッキング処理の後に 50 mM NaOH を 1 分間通しセンサーチップの表面を洗浄した。

3. Cry j 1 濃度の測定

標準 Cry j 1 は日本アレルギー学会より提供されたものを用いた。標準 Cry j 1 は濃度が 3.9 ng/ml から

500 ng/ml になるように HBS 緩衝液で希釈した。Cry j 1 の測定は、各希釈液の 50 μ l を 5 μ l/min の流速で注入することで行った。また標準 Cry j 1 については、再現性をみるために 2 回ずつ繰り返し行った。Cry j 1 は 10 mM グリシン-HCl（pH 2.0）の 25 μ l を 50 μ l/min の流速で注入することでセンサーチップの表面から完全に取り除くことができた（再生操作）。

結 果

1. センサーチップ表面への Cry j 1 Mab の固定化

センサーチップ表面への Cry j 1 Mab の固定化の過程を Fig. 1 に示した。横軸は時間を表す。縦軸は SPR シグナルを Resonance Unit（RU 値）で示した。カルボキシル化したデキストラン層の活性化、リガンドである抗 Cry j 1 Mab のカップリング、エタノールアミンによる活性化残基の除去の順で行った。その結果、SPR シグナルは 1 mm² 当たり 1 ng の物質が結合した場合 1000 RU と定義しているので約 14700 RU、つまり 14.7 ng/mm² の Cry j 1 がセンサーチップ表面に固定化された（Fig. 1 の*）ことになる。

2. 抽出液と抽出時間

ランニング緩衝液としては HBS 緩衝液を用いた。バッファーのみでは抽出効率が良くなかったため、0.125 M NH₄HCO₃ 液を加えた HEPES 緩衝液を用いて抽出した。通常、花粉アレルゲンの抽出には 0.125 M NH₄HCO₃ 液を用い 24 時間抽出する。しかし、通常の方法では長時間を要するため本目的には適さない。

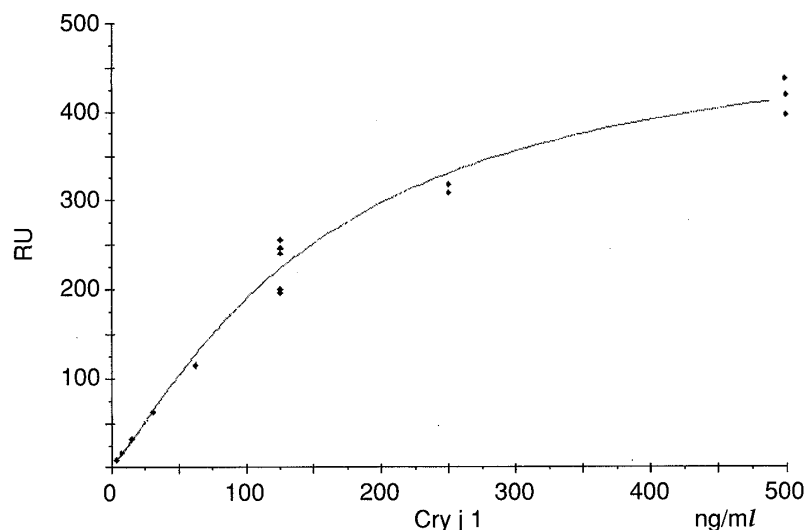


Fig. 2. Calibration curve obtained with standard Cry j 1 at the concentration of 3.9 ng/ml to 500 ng/ml.

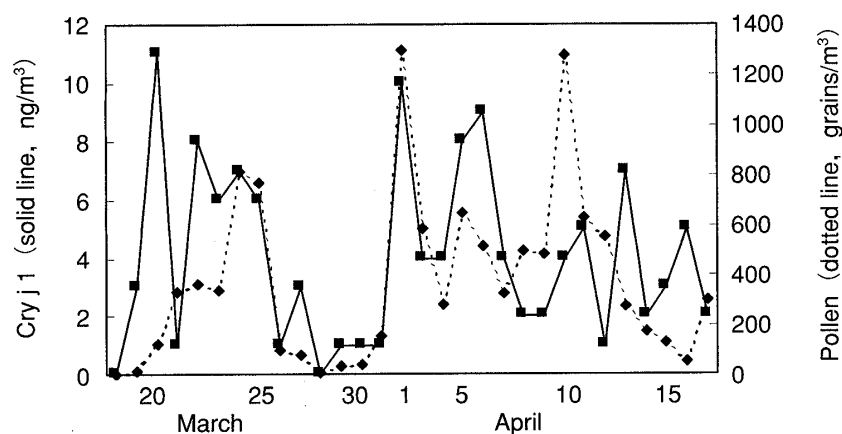


Fig. 3. Comparison of the amount of Cry j 1 (solid line) and the number of pollen (dotted line) in samples in Yamagata City in 2001.

そこで最小抽出時間を求めるために抽出時間と抽出効率との関係を調べた。0.125 M NH_4HCO_3 を含む HEPES 緩衝液で 15 分間抽出した場合 (76 RU) と 2 時間抽出した場合 (99 RU) では抽出効率に大きな違いがみられなかった。このことから抽出時間を 15 分とした。

3. Biacore® システムによる Cry j 1 の定量

標準 Cry j 1 (3.9~500 ng/ml) の検量線を Fig. 2 に示した。Cry j 1 濃度が 62.5 ng/ml までは RU 値との間に直線関係がみられた。この系の測定感度は 5 ng/ml で、試料は 0.1 ml 必要なので Cry j 1 の検出限界は 500 pg

であった。センサーチップは 10 mM グリシン-HCl (pH 2.0) を添加することで再生できた。標準 Cry j 1 の再現性は良好であった。

4. 野外実験

Fig. 3 は 2001 年に得られた試料中の Cry j 1 濃度をスギ花粉数と対比して示した。同一試料の上清で Cry j 1 を定量し、ベレットでスギ花粉数を測定した結果である。Cry j 1 と花粉との比の値は一定しておらず、スギ花粉数と Cry j 1 量とは一致しなかった。2000 年と 2001 年の 2 年間について比の値をみると、2001 年の方が花粉当りの Cry j 1 の値が大きかった。2001 年は寒

Table 1 Procedure for the measurement of airborne antigen (Cry j 1) by SPR

Extraction of pollen antigen (Cry j 1)	15 min
↓	
Separation from pollen grains	10
↓	
Quantification with SPR	10
↓	
Removal of Cry j 1 from the sensor chip	1
↓	
Regeneration of sensor chip with the running buffer	1

のもどりがあり、花粉がほとんどみられない時期が1週間ほどあり、その後、急に温かくなって新鮮なスギ花粉が大量に飛散した時期には両ピークは一致したが、その後は一致しなかった。大気試料の場合は非特異的に吸着する物質がありチップ表面の再生は不十分であった。非特異的な吸着物質等を取り除くため、9回に1回の割合で25 mM NaOHを添加することで、完全に初期状態に復帰できた。25 mM NaOHで洗浄した後に125 ng/mlの標準Cry j 1を添加し、固定化抗体の活性を調べたところ、レスポンスは常に250RU前後の値が得られ抗体の失活はなかったと考えられる。空中試料中のCry j 1を測定する際の処理行程と必要時間をTable 1に示した。表には最小必要な時間が示してある。Biacore®システムによる測定では全行程が約40分で終了した。

考 察

試料と接触していない側の表面に光を当て、光を反射させることで表面プラズモン波の共鳴による特定波長の特定角度の反射光強度が低下する現象がみられる。この現象を用いればリアルタイムにアレルゲンの量を測定できる。方法の利点は、従来のイムノアッセイのようにアレルゲンを標識することなく測定できる点にある。反応が平衡になるまでインキュベーションする時間を要しないのも特徴である。Biacore®システムではこの原理を測定系に応用することでごく短時間に結果を得ることができるようになった。ところが、今回の大気試料のようにさまざまな物質を含む場合には非特異的に吸着する物質がありグリシン・塩酸 (pH 2.0) のみではセンサーチップ表面の再生が不十分であっ

た。このような非特異的な吸着物は25 mM NaOH液で除去することができた。空中のCry j 1測定では測定部のセンサーチップ表面にあらかじめCry j 1抗体を固定化させておき、そこに大気試料を流しCry j 1濃度を求めることができた。必要な試薬はCry j 1に対する抗体と濃度が既知のCry j 1標準品である。

現在までの検討でリアルタイムに近い短時間にCry j 1の値を得ることができるようになった。リアルタイム測定を目的としたものではあるが、我々は最近普及しつつあるリアルタイム花粉モニターとここで検討したシステムは役割が異なると考えている。このシステムは全自動というよりは検査機関に持ち込まれた種々の環境アレルゲンを測定し情報化するシステムと位置づけている。将来はBiacore®システム等から得られた花粉アレルゲンをはじめとした環境アレルゲンに関する情報がインターネット、携帯電話やデジタル放送等から入手できるようになるであろう。このような将来構想は描けるものの、前途にはさまざまな難関が待ち受けている。まずは市販の装置が高価であるため現在普及しつつあるリアルタイム花粉モニターのように、即座に情報提供に応用されることはないであろう。また、恒温室での使用を前提としているため大気試料をサンプリングする装置の脇に設置できない。低コストのSPR装置の販売も開始されたが、装置にセットされる抗体や各種試薬の交換・定期的なメンテナンスなど諸々の事情を考えると、屋外での設置には適していないと思われる。この点については、Biacore®システムに限らず、酵素免疫定量に基づくELISA法のようなプレートリーダー方式の装置も同様である。しかし、Biacore®システムを中心とした生物学的親和性に基づく測定法は、前述したような従来の測定法には無い高度な情報提供が可能になるので、むしろ従来法との併用により効果を発揮すると考える。Biacore®システムは高感度な精密機器なので、管理された検査機関に設置される方が現実的である。フィールドからサンプリングされた試料溶液をセントラルの検査機関に集め、ハイスループットで試料を測定する。さらに1つのセンサーチップ上に最大4種類までの抗体をセットできるので各シーズンに対処できるものと考え、例えばtree seasonであれば、Cry j 1, Cry j 2, Cha o 1等に対する抗体を、grass seasonであればイネ科の持つ主要抗原 (Dac g, Phl p 等) に対する抗体を、weed seasonであればAmb a 1, Art v等に対する抗体を固定化したセンサーチップを作成すればアレルゲンごと

のデータを取得することができ高精度な空中アレルゲンに関する情報を診断治療などの現場に提供可能となる。

今回スギ花粉は Cry j 1 について、イネ科花粉は粗抗原に対する抗体 (Dac g 抗体) を用いて検討した。イネ科やブタクサ花粉では多くの抗原があるので単に 1 抗原と花粉粒子との比較はできない場合があるのかもしれないが、以下の理由で提供する情報は花粉の数よりはアレルゲンの量が望ましいと考える。①空中花粉の数と空中花粉アレルゲンの量とは必ずしも一致しないことがスギ花粉、イネ科花粉、カバノキ花粉などでわかってきたこと。②スギ花粉については主要アレルゲンの一つである Cry j 1 量はスギの木ごとに大きく異なる¹⁴⁾⁻¹⁶⁾こと。③花粉アレルゲンは花粉以外の浮遊粒子に存在することなどである¹⁷⁾⁻²⁰⁾。実際の空中アレルゲン情報としては、各々の抗原が持つ特徴 (出現傾向など) を加味し情報化するのが望ましい。具体的な例をあげれば、グループ 5 アレルゲンは微粒子状で存在し、イネ科花粉がほとんど検出されない降雨後に急増することがある¹⁹⁾。ブタクサ花粉抗原は花粉が出現する 2 週間ほど前から空中に出現する²¹⁾。このアレルゲンは微毛に由来することがわかっている。この辺のところをリアルタイムに情報化できればイネ科花粉喘息の患者やヨモギ・ブタクサ花粉症患者には有益な情報となろう。

過去のデータや経験則をもとに今日、翌日の予測が行えるようになれば、患者は自分の原因アレルゲンを回避できるし、臨床医にとっては治療方針を決めるのに役立つ。この方法は特に花粉が検出されない花粉シーズンの前後など、季節外の抗原量測定に有用であろう。また、花粉アレルゲンに限らず、空中に存在するあらゆるアレルゲン、例えば、カビ抗原、昆虫抗原、ダニ抗原、ペット抗原 (イヌ、ネコなど) などの現在の量の測定、特にダニ抗原のように生体外にも抗原が見出される場合の抗原測定に有用と考えられる。将来はこのような手法で種々の環境アレルゲンに関する情報が得られるようになるものと思われる。

本研究は平成 12 年度山形県企画調整課の産学官連携研究プロジェクト推進事業「花粉アレルギー情報提供システムの開発」として行われた。標準 Cry j 1 は日本アレルギー学会より提供いただいた。抗 Cry j 1 Mab は興和総合科学研究所の名古屋隆生先生のご好意で、また標準 Cry j 1 は日

本アレルギー学会のご好意で提供いただいた。論文作成は結城留美氏の協力を得た。

文 献

- 1) 深谷修司：リアルタイム花粉計数機の開発。アレルギーの臨床 **273**, 73-75, 2001.
- 2) Rantio-Lehtimäki, A. and Matikainen, M. : Alternative information about airborne allergens and pollen counts. 6th International Congress in Aerobiology, Perugia, p. 213, 1998.
- 3) Acevedo, F., Vesterberg, O. and Bayard, C. : Visualization and quantification of birch-pollen allergens directly on air-sampling filters. *Allergy* **53**, 594-601, 1998.
- 4) Holmquist, L. and Vesterberg, O. : Luminescence immunoassay of pollen allergens on air sampling polytetrafluoroethylene filters. *J. Biochem. Biophys. Methods* **41**, 49-60, 1999.
- 5) Razmovski, V., O' Meara, T.J., Taylor, D.J.M. and Tovey, E.R. : A new method for simultaneous immunodetection and morphologic identification of individual sources of pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 725-731, 1999.
- 6) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., Iouye, S., Yasueda, H., Shida, T., et al. : Airborne grass pollen antigens in a grassland as studied by immunoblotting with anti-Lol p 1 antibody. *Grana* **32**, 302-307, 1993.
- 7) Yli-Panula, E., Takahashi, Y. and Rantio-Lehtimäki, A. : Comparison of direct immunostaining and electroimmunoassay for analysis of airborne grass pollen antigens. *Allergy* **52**, 541-546, 1997.
- 8) 渡辺雅尚, 田村正宏, 名古屋隆生, 高橋裕一, 片桐進, 他 : スギ花粉抗原 (Cry j 1) に対するモノクローナル抗体を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による Cry j 1 の測定。アレルギー **41**, 1535-1539, 1992.
- 9) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., Inouye, S., Miyazawa, H., Imaoka, K., et al. : Existence of exine-free airborne allergen particles of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy* **46**, 588-593, 1991.
- 10) 榎本雅夫, 大西成雄, 安枝 浩, 嶽 良博, 畠田猛真, 他 : 高感度 Cry j 1 測定法について。日本花粉学会会誌 **46**, 9-16, 2000.
- 11) Markey, F. : What is SPR anyway? *BIA Journal* **6**, 14-17, 1999.
- 12) Löfås, S. and Johnsson, B. : A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent im-

- mobilization of ligands. *Chem. Soc. Chem. Commun.* **121**, 1526-1528, 1990.
- 13) 高橋裕一：スギ花粉アレルゲン量の迅速測定. 日本醫事新報 **4009**, 101-101, 2001.
 - 14) Mullin, J. and Emberlin, J. : Sampling pollens. *J. Aerosol. Sci.* **28**, 365-370, 1997.
 - 15) 斉藤真己, 寺西秀豊：富山県におけるスギ精英樹の花粉アレルゲン (Cry j 1) 量の変異とスギ花粉症に対する育種的対応. 花粉症研究会会報 **12**, 15-19, 2000.
 - 16) 後藤陽子, 近藤禎二, 安枝 浩：関東地方周辺のスギ精英樹における Cry j 1 含量の変異. 日本花粉学会会誌 **45**, 149-152, 1999.
 - 17) 清藤城宏, 神保智一, 野村光男, 松野 智, 山本静雄：スギ精英樹花粉におけるアレルゲン Cry j 1 含量の変動. 山梨県森林総合研究所研究報告 **20**, 1-5, 1999.
 - 18) 高橋裕一, 名古屋隆生, 太田伸男：免疫化学的手法による空中花粉アレルゲン (Cry j 1, Dac g) 保有粒子の同定. アレルギー **50**, 918-918, 2001.
 - 19) Suphioglu, C. : Thunderstorm asthma due to grass pollen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**, 253-260, 1998.
 - 20) Schäppi, G., Taylor, P., Pain, M., Cameron, P., Dent, A., et al. : Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles ; implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitised to grass pollen allergens. *Clin. Exp. Allergy* **29**, 633-641, 1999.
 - 21) Agarwal, M.K., Swanson, M.C., Reed, C.E. and Yunginger, J.W. : Airborne ragweed allergens : Association with various particle sizes and short ragweed plant parts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **74**, 687-693, 1984.

REAL-TIME MEASUREMENT OF AIRBORNE POLLEN ALLERGEN APPLIED THE SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR)

Yuichi Takahashi¹⁾ and Takeshi Ohashi²⁾

¹⁾The Yamagata Prefectural Institute of Public Health

²⁾Biacore K.K.

To examine the possibility of real-time measurement system for the concentration of airborne pollen allergens, Cry j 1 was chosen as an example to establish the system. Airborne pollen allergens were collected using Cyclone sampler from Burkard Co. Ltd. England. Cry j 1 was extracted from airborne samples with 10 mM HEPES buffer containing 0.125 M NH₄HCO₃ and measured with Biacore® 3000 and Biacore® Q. The sensitivity of the system was 5 ng/ml, and 0.1ml sample volume and at least 500 pg of Cry j 1 was required for each measurement. Amounts of Cry j 1 can be obtained ca. 40 min after collection, that is, 15 min for extraction, 10 min for separation and 10 min for measurement.