

〔原 著〕

スギ花粉抗原 (*Cry j I*) 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 I* の測定

興和(株)興和総合科学研究所

渡辺雅尚 田村正宏 名古屋隆生

山形県衛生研究所

高橋裕一 片桐 進

玉野市立玉野市民病院

岡 鐵雄

スギ花粉の主要アレルゲンである *Cry j I* 蛋白の高感度な定量法として, *Cry j I* に対するモノクローナル抗体を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を確立した。すなわち, マイクロプレートのウェルにモノクローナル抗体 (KW-S131) を固相化し, 精製 *Cry j I* 又は試料, 続いてアルカリフォスファターゼ (Alp) 標識モノクローナル抗体 (KW-S10) を順に反応させた後, 基質溶液を加えて発色させ415nmの吸光度を測定するものである。本 ELISA での *Cry j I* の測定範囲は0.16~2.5 ng/ml であり, 測定感度は0.16ng/ml と非常に高いものであった。また, 共通抗原性をもつヒノキ花粉の抗原とは反応せずスギ花粉の *Cry j I* のみを測定する高い特異性を示した。この ELISA はスギ花粉エキスを含まれる *Cry j I* の定量ができ, スギ花粉エキスの標準化に応用できるものと思われる。

Key words: *Cryptomeria japonica* — *Cry j I* — enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) — monoclonal antibody — pollen allergen

緒 言

る。

スギ花粉症は空中飛散するスギ花粉により引き起こされるが, スギ花粉の主要アレルゲンは分子量40000の塩基性蛋白 (*Cry j I*) であることがわかっている¹⁾。

我々は, 先にこの *Cry j I* 蛋白に対するモノクローナル抗体を作製し, 空中飛散するスギ花粉アレルゲン粒子をイムノブロット法で測定する方法を開発した²⁾。さらに今回, 抗 *Cry j I* モノクローナル抗体を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による *Cry j I* の高感度測定法を確立したので報告す

材料及び方法

1. スギ花粉抗原 (*Cry j I*)

Cry j I は Yasueda らの方法¹⁾に従ってスギ花粉より精製し, 電気泳動によって純度を確認して ELISA 用の抗原とした。蛋白定量はウシ血清アルブミン (BSA, Fraction V, Sigma) を標準品として Lowry 法³⁾で行った。

2. 抗 *Cry j I* モノクローナル抗体

抗 *Cry j I* モノクローナル抗体は先に報告した²⁾とおり, 精製 *Cry j I* をマウスに免疫して得た。ELISA に用いる抗 *Cry j I* モノクローナル抗体の KW-S10 と KW-S131 はともに IgG₁ であり, KW-S10 のアルカリフォスファターゼ (Alp) 標識体は先の報告²⁾に従って調製したものをを用いた。

Received: May 14, 1992

Accepted: July 21, 1992

Abbreviations: Alp alkaline phosphatase; BSA bovine serum albumin; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; HSA human serum albumin; PBS phosphate buffered saline; PBS-T phosphate buffered saline containing 0.05% Tween-20; RIA radioimmunoassay

3. スギ花粉エキス

スクラッチテスト用エキス(1:20), 治療用エキス(1:100)及び診断(皮内テスト)用エキス(1:1000)は市販品(鳥居薬品)を入手し, 4℃に保存したものを使用した。さらに, 以下の方法でスギ花粉エキス(1:20)を調製した⁴⁾⁵⁾。ジエチルエーテルで脱脂したスギ花粉5gに対し, トルエン1ml, グリセリン50ml, 緩衝食塩液100mlを加え, 滅菌蒸留水で全量を250mlとし, 4℃で3日間振とうしながら抽出を行った。抽出液は100mlに濃縮, 濾過滅菌して使用した。また, 本ELISAのヒノキ花粉との交差反応性を調べるためにスギまたはヒノキの乾燥花粉を0.125M NH_4HCO_3 で4℃, 2時間抽出した抽出液を使用した。

4. ELISA

96ウェルELISA用プレート(NUNC)の各ウェルに, コーティング緩衝液(0.05M炭酸ナトリウム緩衝液, pH 9.6)で10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製した抗Cry j Iモノクローナル抗体KW-S131溶液を100 μl ずつ加え, 25℃で2時間静置して抗体をプレートに吸着させた。0.05%のTween-20を含むPBS(PBS-T)でプレートを3回洗浄後, 25%ブロックエース(大日本製薬)を100 μl ずつ各ウェルに加え, 25℃で2時間又は4℃で1晩静置してブロッキング処理をした。PBS-Tで洗浄後, PBS-Tで調製した精製Cry j Iの標準溶液(Cry j I濃度: 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5ng/ml)及びPBS-Tで希釈調製した試料(スギ花粉エキス)の希釈系列の溶液をウェル当たり100 μl ずつ加え, 25℃で2時間静置した。PBS-Tでプレートを洗浄した後, PBS-Tで1000倍希釈したAlp標識抗Cry j I抗体KW-S10を各ウェルに100 μl ずつ加えて25℃で2時間反応させた。さらにPBS-Tで洗浄後, 50mM NaHCO_3 -10mM MgCl_2 (pH 9.8)の溶液で1mg/mlの濃度に調製した基質溶液(Sigma 104, Sigma)を100 μl ずつ各ウェルに加えて30分間反応させた。5NのNaOHを50 μl ずつ加えて反応を止めた後, 415nmの吸光度を測定し, 精製Cry j I標準溶液で作製した標準曲線より試料のCry j I濃度を求めた。

結 果

1. ELISAによるスギ花粉アレルゲン(Cry j I)の測定

本ELISAで測定したCry j Iの標準曲線をFig. 1に示した。

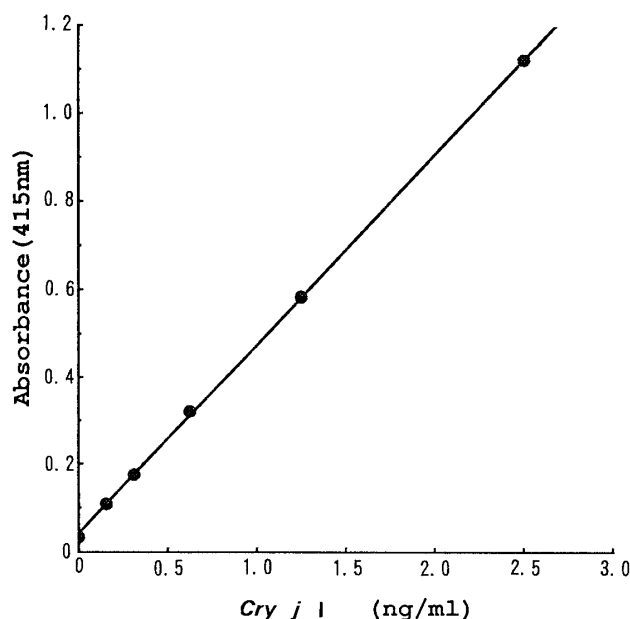


Fig. 1. Standard curve for the quantitation of Cry j I.

Cry j I濃度0~2.5ng/mlの範囲で直線関係が得られ, background値は吸光度0.03前後であり, 0.16ng/mlまで十分検出可能であった。再現性の検討として, 5種類のCry j I濃度(0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5ng/ml)でプレート内における同時再現性, 及びプレート間における再現性を検討したところ, 測定内変動係数(intra-assay coefficient of variation)は1.1~3.5%(n=6)であり, 測定間変動係数(inter-assay coefficient of variation)は0.9~4.6%(n=4)と本ELISAは測定範囲において非常に再現性の高い系であることがわかった。

さらに希釈時のCry j Iの容器への吸着による影響^{6)~8)}を調べるために, 希釈液のPBS-Tに吸着防止剤としてヒト血清アルブミン(HSA, 0.05%)を添加し, PBS-Tと測定値の比較を行った。その結果, 両群のELISAの吸光度に有意な差がみられなかった。そこで, Tween-20の添加によりCry j Iの容器への吸着は防止できていると考えられ, 以後の試料の希釈はPBS-Tで行った。

2. スギ花粉エキス中に含まれるCry j I量の測定

さらに, 今回確立したELISAにより市販のスギ花粉エキス及び我々の調製したスギ花粉エキスに含まれるCry j I量を測定した。Table 1にその結果を示した。市販のスギ花粉エキスのCry j I量のうち, スクラッチテスト用エキス(1:20)及び治療用エキス

Table 1 Concentration of *Cry j* I in Japanese cedar pollen extracts measured by ELISA

Pollen extract		<i>Cry j</i> I (ng/ml)	Converted into concentration of 1 : 20 (ng/ml) (ratio***)
Pollen extract*	(1 : 20)**	15200	15200 (47.9)
Commercial pollen extracts			
Scratch test solution	(1 : 20)**	317	317 (1.00)
Immunotherapeutic solution	(1 : 100)**	15.9	80 (0.25)
	(1 : 1000)**	0.4	20 (0.06)
Intradermal skin test solution	(1 : 1000)**	26.5	1325 (4.18)

*The pollen extract was prepared in our laboratory. See Material and methods.

**The ratio shows dry weight of the pollen to a volume of the extraction solution.

***The ratio to the concentration of *Cry j* I in the pollen extract for scratch test solution.

(1 : 100)は、先に藤野らが radioimmunoassay (RIA) で測定した *Cry j* I 含量(それぞれ305.0, 26.9ng/ml)⁶⁾ とほぼ同じ値であった。しかし、診断(皮内テスト)用エキスを(1 : 1000)はRIAの測定値(97.7ng/ml)⁶⁾ に比べ低い値(26.5ng/ml)であった。また、治療用エキスを(1 : 1000)の *Cry j* I 含量は0.4ng/mlであり、同じ治療用エキスを(1 : 100)と同一の希釈度(1 : 20 換算値)で比較した場合、*Cry j* I 含量は一致していなかった。(それぞれ、20, 80ng/ml)。一方、我々の調製したスギ花粉エキスの *Cry j* I 含量は15200ng/mlと、市販のエキスを比べ著しく高かった。

考 察

従来、スギ花粉の主要アレルゲン *Cry j* I の免疫化学的測定にはRIAが使われてきた⁹⁾¹⁰⁾。一方、ELISAは放射性同位元素を扱う特別な施設を必要とせず、測定者により簡便なためELISAによる *Cry j* I の測定が試みられている¹¹⁾。ELISAに使用する抗体はポリクローナル抗体に比べモノクローナル抗体の方が一定の品質の抗体を供給できる点やその特異性において有利である¹¹⁾。我々は、先に *Cry j* I に対するモノクローナル抗体を作製したが²⁾、今回、これらのモノクローナル抗体を用いて *Cry j* I を測定できるELISAを確立した。測定感度は0.16ng/mlであり、先の安枝らによるポリクローナル抗体を用いたELISAの測定感度(0.2ng/ml)¹¹⁾と同程度の感度が確保された。また、*Cry j* I はスギ花粉の他、ヒノキ花粉を含む多くの裸子植物花粉との間に交差反応性のあることが知られている¹⁾²⁾¹²⁾¹³⁾。したがって、スギ花粉の *Cry j* I に対する

抗血清(ポリクローナル抗体)は他の多くの裸子植物花粉と交差反応する²⁾。今回確立したELISAの酵素標識抗体に用いたモノクローナル抗体KW-S10はスギ花粉のみに特異的に反応し他の花粉とは反応しない²⁾。実際、本ELISAでヒノキ花粉抽出液を測定したところ、50μg/mlにおいても反応は認められず、本ELISAはスギ以外の花粉抗原とは交差反応しないと考えられた。

今回確立したELISAにより市販品を含むスギ花粉エキスについて *Cry j* I 含量を測定した結果、スクラッチテスト用エキスを(1 : 20)及び治療用エキスを(1 : 100)については、先のRIAの結果⁶⁾とほぼ同じ値であったものの、診断(皮内テスト)用エキスを(1 : 1000)は、RIAでの測定値(97.7ng/ml)に比べ低い値(26.5ng/ml)であった(Table 1)。しかし安枝らの報告¹¹⁾では、市販の皮内テスト用エキスを(1 : 1000)3ロットの *Cry j* I 濃度は18.5~186ng/mlであり、今回の測定値もこの濃度範囲内にあることから、皮内テスト用エキスにおける *Cry j* I 濃度の差はRIAとELISAの測定法の違いというよりロット間の差によるためと考えられる。また、各スギ花粉エキス中の *Cry j* I 濃度を同じ希釈度(1 : 20換算値)に直して比較したところ、市販のスギ花粉エキスは *Cry j* I 含量が一致していなかった。特に治療用エキスは *Cry j* I 含量が低く、1 : 1000表示のエキスはスクラッチテスト用エキスの1/15以下であり、また同じ治療用エキスの1 : 100表示のものと比べても *Cry j* I 含量はかなり低いものであった。以上のように市販のスギ花粉エキスでは、含量と表示希釈度との間に大きな差がみられた。一方、我々の調製したスギ花粉エキに含まれる *Cry j* I 量は市販のスクラッチテスト用エキスの48倍

と著しく高い値であった。しかし、この値は先の藤野らの報告⁶⁾の中で彼らの調製したスギ花粉エキスが最も効率良く抽出した場合に1:1000換算値で400~500 ng/mlのCry j Iを含むこととほぼ一致していた(我々のスギ花粉エキスは、1:1000換算値で304ng/mlのCry j Iを含む)。以上の結果より、モノクローナル抗体を用いた本ELISAはスギ花粉エキに含まれるCry j Iの定量に使用できるものと思われる。

スギ花粉エキは花粉症の診断や治療に用いられているが、近年、その品質の標準化の必要が言われている⁶⁾⁹⁾⁻¹¹⁾。本ELISAにより測定したスギ花粉エキスのCry j I含量の結果からも、従来より指摘されている⁶⁾⁷⁾市販のスギ花粉エキスの表示希釈度と実際のCry j I含量との相違や治療用エキスのCry j I含量の少なさが確認された。以上のスギ花粉エキスの問題点は診断や減感作療法の治療効果にも影響している可能性が考えられ、標準化の必要を改めて感じるものである。今回確立したELISAによりこれまでの“1:20”といった希釈度によるアレルゲン量の表示ではなく、スギ花粉エキ中に含まれるCry j I量を絶対濃度で表示することが可能となることから、本ELISAがスギ花粉エキスの標準化に応用できるものと思われる。

文 献

- 1) Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T. and Shida, T.: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria Japonica*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 77-86, 1983.
- 2) 渡辺雅尚, 田村正宏, 名古屋隆生, 高橋裕一, 片桐進: スギ花粉抗原 (Cry j I) に対するモノクローナル抗体を用いたイムノプロット法によるスギ花粉アレルゲン粒子数の測定. *アレルギー* 41, 637-644, 1992.
- 3) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 4) Sheldon, J.M.: 臨床アレルギー (堀内淑彦監訳). 広川書店, 東京, pp.490-491, 1974.
- 5) 岡 鐵雄, 堀部 徹, 難波弘行, 久常秀樹, 岡崎順哉, 他: 岡山・香川県におけるスギ科・ヒノキ科空中花粉の観察と花粉症についての研究. *医薬ジャーナル* 27, 1683-1688, 1991.
- 6) 藤野明人, 新田健太郎, 佐野 肇, 安枝 浩, 田所憲治, 他: スギ花粉エキスの力価と安定性に関する検討. *アレルギーの臨床* 10, 43-46, 1990.
- 7) 井上 栄: スギ花粉抗原エキスの使用上の問題点. *アレルギー* 40, 339, 1991.
- 8) Norman, P.S. and Marsh, D.G.: Human serum albumin and Tween 80 as stabilizers of allergen solutions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62, 314-319, 1984.
- 9) 安枝 浩, 油井泰雄, 清水章治, 相馬幸子, 勝畑有恒, 本間玲子: アレルゲンエキスの標準化に関する研究—in vitroにおけるアレルゲンエキスの力価測定法について—. *アレルギー* 32, 1054-1062, 1983.
- 10) 安枝 浩, 油井泰雄, 清水章治, 信太隆夫: アレルゲンエキスの標準化に関する検討(第2報). イムノアッセイによる抗原の測定法について. *アレルギー* 32, 706, 1983.
- 11) 安枝 浩, 秋山一男, 前田裕二, 早川哲夫, 金子富志人, 他: enzyme-linked immunosorbent assayによるスギ花粉, ヒョウヒダニアレルゲンの定量とアレルゲンエキスの標準化への応用. *アレルギー* 40, 1218-1225, 1991.
- 12) Panzani, R., Yasueda, H., Shimizu, T. and Shida, T.: Cross-reactivity between the pollens of *Cupressus sempervirens* (Common cypress) and of *Cryptomeria Japonica* (Japanese cedar). *Ann. Allergy* 57, 26-30, 1986.
- 13) 高橋裕一, 井上 栄, 阪口雅弘, 片桐 進: イムノプロット法による空中スギ, イネ科植物花粉アレルゲン粒子数の測定. *アレルギー* 39, 1612-1620, 1990.

AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE QUANTITATION OF THE MAJOR
ALLERGEN FROM JAPANESE CEDAR (*CRYPTOMERIA JAPONICA*) POLLEN,
Cry j I, USING MONOCLONAL ANTIBODIES

Masanao Watanabe, Masahiro Tamura and Takao Nagoya
Kowa Research Institute, Kowa Co., Ltd.

Yuichi Takahashi and Susumu Katagiri
The Yamagata Prefectural Institute of Public Health

Tetsuo Oka
Pharmacy, Tamano City Hospital

We have developed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using two anti-*Cry j* I monoclonal antibodies (KW-S10 and KW-S131) for the quantitation of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria Japonica*) pollen, *Cry j* I. Polystyrene microplates coated with KW-S131 were incubated with pollen allergen extracts. *Cry j* I, which bound to the antibody, was detected with alkaline phosphatase-conjugated KW-S10 using chromogenic enzyme substrate. *Cry j* I could be measured in concentration of between 0.16 and 2.5 ng/ml by this assay. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 1.1–3.5% and 0.9–4.6%, respectively. This assay was considered that it was specific for *Cry j* I of Japanese cedar pollen because it didn't react with allergens of hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) pollen which have antigenicity in common to Japanese cedar pollen. This assay would be useful for the standardization of Japanese cedar pollen allergen extracts.
