

ヒノキ特異 IgE 抗体測定法の比較検討

1) 東京慈恵会医科大学耳鼻咽喉科

2) 大森赤十字病院耳鼻咽喉科

野原 修¹⁾ 今井 透²⁾ 実吉健策¹⁾ 遠藤朝彦¹⁾永倉仁史¹⁾ 小野幹夫¹⁾ 森山 寛¹⁾

スギ花粉症患者血清308検体を対象に、ヒノキ特異 IgE 抗体を AlaSTAT 法と CAP-RAST 法により測定し、比較検討を行った。スギ花粉症患者におけるヒノキ特異 IgE 抗体陽性率は AlaSTAT 法で 52.6%、CAP-RAST 法で 80.5% となり、CAP-RAST 法で高い陽性率を示した。また、ヒノキ皮膚試験とヒノキ特異 IgE 抗体検査の比較では、皮膚試験に対する感度は CAP-RAST 法で高かった。スギ特異 IgE 抗体の測定では両測定法による差異が認められなかったことから、ヒノキ特異 IgE 抗体の測定結果が AlaSTAT 法と CAP-RAST 法で差異を生じた要因としては、主として測定系に使用しているヒノキ花粉抗原の違いが考えられた。

Key words: AlaSTAT — CAP-RAST — *Chamaecyparis obtusa* — *Cryptomeria japonica*
— IgE antibody

緒 言

対象および方法

ヒノキはスギと共通抗原性を有することが知られている¹⁾²⁾。臨床的にもスギ花粉症患者のなかでヒノキ花粉症を合併している症例は少なからず認められ、中にはヒノキ花粉の飛散時期に症状が増悪する例もみられている。ヒノキは木材としての商品的価値がスギよりも高く、近年その植林面積の増加率はスギを上まわっている。将来的には、ヒノキ花粉の飛散量の増大とそれともなうヒノキ花粉症患者の増加が懸念される。現在のところヒノキ花粉症の診断に際しては、ヒノキ花粉抗原エキスが市販されておらず、皮膚試験や抗原誘発試験は不可能である。したがって、血清中のヒノキ特異 IgE 抗体を測定することは重要であり、その検査法に対する信頼性が問題となる。ヒノキ特異 IgE 抗体の測定法としては、液相法を用いた AlaSTAT キット（米国 DPC 社製）と固相法を用いた CAP-RAST キット（スウェーデン Pharmacia 社製）などの方法が開発されている。今回、これら 2 つの方法によるヒノキ特異 IgE 抗体の測定結果について比較検討した。

1) 対象

春期における自覚症状（鼻症状および眼症状）を訴え、他覚的所見、血清特異 IgE 抗体測定、鼻汁好酸球検査、および皮膚試験からスギ花粉症と診断され、当施設に通院している患者 221 例（男性 97 例、女性 124 例）を対象とした。年齢は 7 歳から 72 歳におよび、平均年齢は 39.3 歳であった。このうちスギ、ヒノキ花粉のみに感作されている症例は 60 例、スギ、ヒノキ花粉以外の抗原に対し重複感作を有する症例は 161 例であった。なお、鳥居社製スギ花粉治療エキスによる減感作療法を施行中の症例は 205 例であった。平成 5 年 12 月より平成 6 年 6 月にかけてこれらの患者より血清を採取した。スギ・ヒノキ花粉の飛散期前後に 2 回採血を行った症例が 87 名存在するため、221 名 308 血清を今回の測定対象とした。

2) 特異 IgE 抗体測定法

308 検体の血清特異 IgE 抗体の測定に関して、ヒノキおよびスギ特異 IgE 抗体価を AlaSTAT 法および CAP-RAST 法の 2 つの方法で採血順に順次測定し、それぞれの測定法におけるスコア値および測定値に関して比較検討した。特異 IgE スコア値は AlaSTAT 法の場合スコア 0～4、CAP-RAST 法の場合スコア 0～6 で示し、いずれの測定法もスコア 1 以上を陽性とした。また、特異 IgE 抗体価の比較に際しては、統計

Received: January 16, 1996

Accepted: May 7, 1996

Abbreviations: IgE immunoglobulin E; RAST
radioallergosorbent test

処理上の理由から測定範囲 (AlaSTAT 法; 0.35~30 IU/ml, CAP-RAST 法; 0.35~100UA/ml) を超えた検体は除外した。

3) 皮膚試験

皮膚試験は抗原エキスを0.02ml 用いて行い, 判定は15~30分後に発赤径20mm 以上または膨疹径9mm 以上を陽性とした³⁾。スギ抗原エキ스는鳥居社製の診断用エキス1000倍希釈液を用いた。ヒノキの場合は井手²⁾の方法に準じ, AlaSTAT 製ヒノキ花粉を用いて診断用エキスを調整した。すなわち, 花粉重量の20倍量の0.1M Tris-HCl (pH 8.0) で4°C, 3時間振盪抽出し, 遠心分離上清を蒸留水に対して透析後, 凍結乾燥物とした。さらに, これを鳥居社製対照液により10000倍に希釈したものをヒノキ皮膚試験用エキスとして, 患者の同意のもとに使用した。

4) 特異 IgE 反応抑制試験

AlaSTAT 法およびCAP-RAST 法にてスギ, ヒノキともにスコア1以上を示した血清を対象に, 特異IgE 反応抑制試験を施行した。AlaSTAT 製のスギおよびヒノキ花粉を0.1M phosphate-buffered saline (PBS: pH 7.4) で抽出したエキス10 μ l (蛋白量: スギ1.2 μ g, ヒノキ3.0 μ g)をインヒビターとして検体50 μ lに加え, 室温にて30分間インキュベートした。その後, この混合液の特異IgE 抗体測定をAlaSTAT 法およびCAP-RAST 法により行った。対照としてインヒビターの代わりに, PBS 10 μ lを用い, 同様の操作を行った。抑制率(%)は対照における吸光度を100%としたときの吸光度の低下率で表した。

5) データ解析

データ解析には, Macintosh 版 StatView ver. 4.5を使用した。特異IgE 抗体価の比較では, 測定値を正規分布に近似させるため, 対数変換した上で行った。測定値の相関の程度の評価には Pearson の相関係数を用い, 回帰直線は最小2乗法で求めた。相関係数の有意性の検定および相関係数の差の検定は, Z変換による正規分布検定を用いた。また, 特異IgE 反応抑制試験における抑制率の比較には Student's unpaired t-testを用いた。これらの検定により $p < 0.05$ をもって統計学的に有意とした。

結 果

1) AlaSTAT 法とCAP-RAST 法の一致率および相

関

308検体のスギ花粉症患者血清におけるヒノキ特異IgE 抗体測定に関し, AlaSTAT およびCAP-RAST スコアの比較ではAlaSTAT 法による陽性率は52.6%, CAP-RAST 法による陽性率は80.5%であり, 両測定法の陽性, 陰性の一致率は63.0%であった (Table 1A)。なお, スギ特異IgE 抗体のAlaSTAT およびCAP-RAST スコアの比較を65検体で行ったところ, AlaSTAT 法での陽性率は100%, CAP-RAST 法での陽性率は98%で, 一致率は98.5%となった (Table 1B)。また, Fig. 1 は両測定法によるヒノキ特異IgE 抗体測定値の相関をみたものである。いずれの測定法においても測定範囲を超えた血清 (AlaSTAT 法: 0.35 IU/ml-30IU/ml, CAP-RAST 法: 0.35UA/ml-100 UA/ml)を除外しているため, 158検体で比較した。両測定法におけるヒノキ特異IgE 抗体値の相関係数は0.45となり, 有意な相関を認めた ($p < 0.0001$)。なお, データには示していないが, スギにおける両測定法の抗体測定値を36検体で比較したところ, 相関係数は0.57 ($p < 0.001$)であった。

2) スギ特異IgE 値とヒノキ特異IgE 値の相関

AlaSTAT 法およびCAP-RAST 法におけるヒノキ特異IgE 抗体測定値とスギCAP-RAST 値との相関

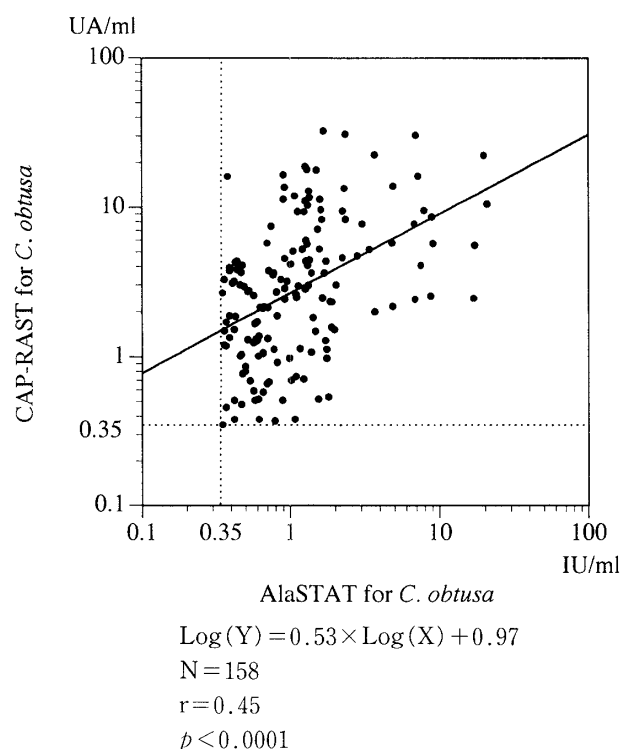


Fig. 1. Correlation of the titer in RAST for *C. obtusa* pollen between AlaSTAT and CAP-RAST.

Table 1 Relationship of the score in RAST for *Chamaecyparis obtusa* (A) and for *Cryptomeria japonica* (B) between AlaSTAT and CAP-RAST

A <i>C. obtusa</i>									
AlaSTAT score	total	19.5%	80.5%					N=308	
		60	45	129	67	7			
	4			1	1	1	3	52.6%	
	3	1		4	9	2	16		
	2	3	2	7	10	2	24		
	1	10	17	55	35	2	119		
	0	46	26	62	12		146	47.4%	
		0	1	2	3	4	5	6	total
CAP-RAST score									
AlaSTAT									
Positive									
Negative									
Negative Positive									
CAP-RAST									
Correspondent 63.0%									
B <i>C. japonica</i>									
AlaSTAT score	total	2 %	98%					N=65	
		1	4	12	26	20	2		
	4			2	19	19	2	42	100%
	3			9	6			15	
	2	1	2	1				4	
	1		2		1	1		4	
	0							0	0%
		0	1	2	3	4	5	6	total
CAP-RAST score									
AlaSTAT									
Positive									
Negative									
Negative Positive									
CAP-RAST									
Correspondent 98.5%									

を検討した。スギ CAP-RAST 値とヒノキ AlaSTAT 値との相関係数は 0.31 ($p < 0.0001$) (Fig. 2A), スギ CAP-RAST 値とヒノキ CAP-RAST 値との相関係数は 0.71 ($p < 0.0001$) となり (Fig. 2B), 相関係数の差の検定からはスギ CAP-RAST 値とヒノキ CAP-RAST 値との間で有意に高い相関性を認めた ($p < 0.01$)。また, スギとヒノキの測定値を CAP-RAST 法で比較すると, ヒノキの方が高い値を示したものはわずかに 3 検体であり, ほとんどの検体でスギの CAP-RAST 値が高い測定値を示した (Fig. 2B)。

3) 皮膚試験とヒノキスコアの比較

ヒノキにおける皮膚試験と特異 IgE 抗体スコアの比較を両測定法で行った (N=65)。皮膚試験に対する感度は CAP-RAST 法 (82.9%) で高く, 特異性は AlaSTAT 法 (83.3%) で高かった (Table 2A)。皮膚試験とヒノキスコアの一致率は両測定法でほとんど差が認められなかった。また, 同様の検索をスギでも試みたが, いずれの測定法においても皮膚試験と比べ RAST 陽性率が高かった (Table 2B)。

4) 両測定法における抑制試験の比較

抑制試験では, ヒノキ特異 IgE 反応はヒノキ花粉抽

出液の添加により AlaSTAT 法で完全に (93.2%), CAP-RAST 法ではほぼ完全に (80.2%) 抑制された (Fig. 3A)。また, スギ特異 IgE 反応はいずれの測定法でもスギ花粉抽出液の添加で完全に (AlaSTAT 法; 96.4%, CAP-RAST 法; 94.4%) 抑制された (Fig. 3B)。次に, 異種花粉による抑制試験では, ヒノキ特異 IgE 反応はスギ花粉抽出液の添加により両測定系ではほぼ完全に (AlaSTAT 法; 84.5%, CAP-RAST 法; 82.3%) 抑制された (Fig. 3A)。スギ特異 IgE 反応は, ヒノキ花粉抽出液の添加により AlaSTAT 法で 61.4%, CAP-RAST 法では 30.7% と部分的に抑制された (Fig. 3B)。

考 察

平成 6 年の当科におけるスギ, ヒノキ花粉の飛散数測定では, 飛散総数はスギが 233 個/cm², ヒノキは 41 個/cm² でスギとヒノキを併せた飛散総数は 274 個/cm² となり, 例年と比べかなり少ない飛散状況であった。当科では, 昭和 62 年よりスギおよびヒノキ花粉数の測

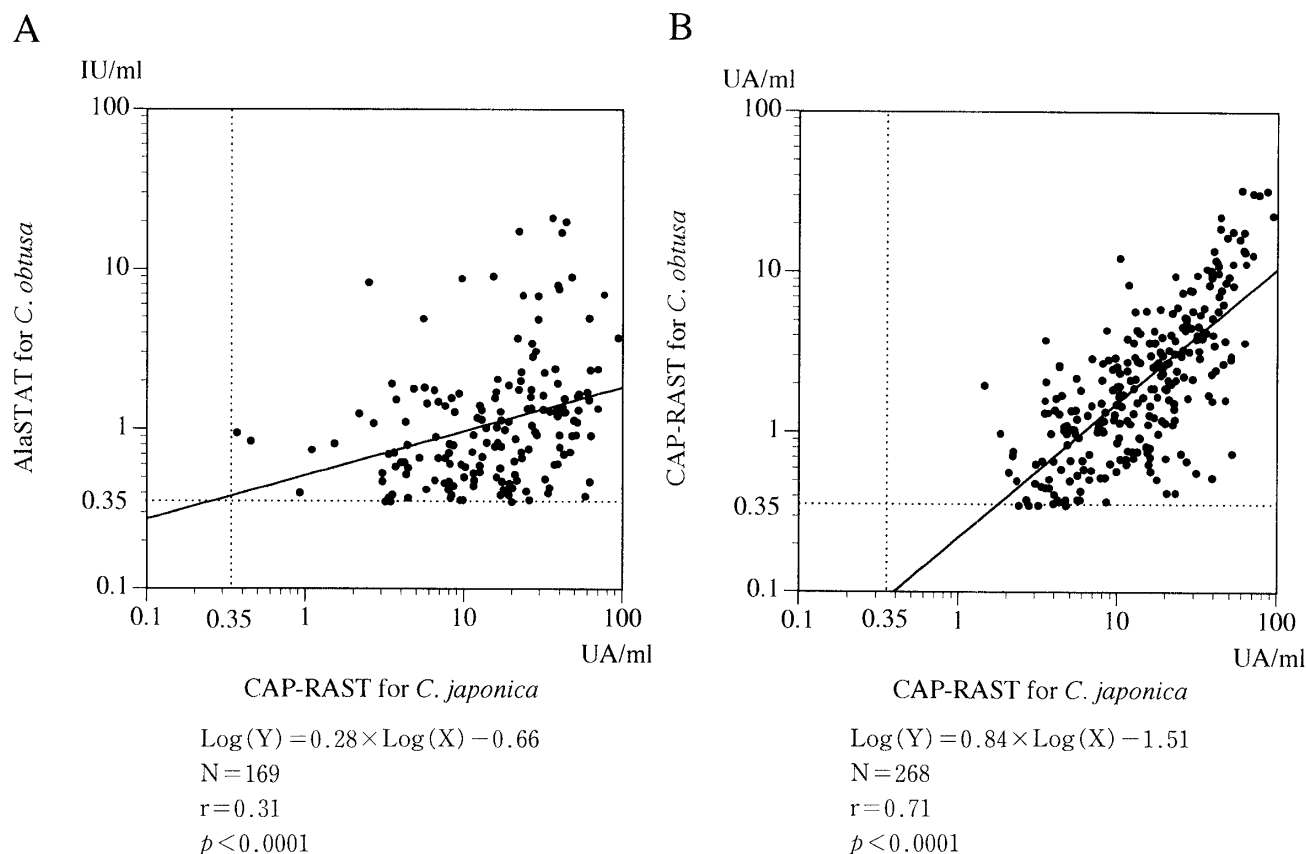


Fig. 2. Correlation of the titer in RAST between *C. japonica* and *C. obtusa* (A: CAP-RAST for *C. japonica* and AlaSTAT for *C. obtusa*, B: CAP-RAST for *C. japonica* and CAP-RAST for *C. obtusa*)

定を行っているが、例年の測定ではヒノキ花粉の飛散量はスギ花粉飛散量の約1/3～1/6と少なく、飛散期間もスギと比べて短い。ヒノキとスギの特異 IgE 抗体測定値は総じてスギの方が高い傾向にあり、CAP-RAST法で比較した場合268検体中スギ特異 IgE 抗体値よりもヒノキ特異 IgE 抗体値が高い値を示したものはわずかに3検体のみであった。これは、花粉暴露量の違いが多分に影響しているものと思われる。また、今回の検索ではスギ花粉症患者を対象としているが、当施設で春期花粉症患者の中でヒノキのみに陽性を示した症例は、現在までのところ1例も存在しない。岡野ら⁴⁾は、春期花粉症患者の中で AlaSTAT 法により7.9%にヒノキ単独陽性者を認めたと報告している。また、伊藤ら⁵⁾は CAP-RAST 法を用いて267症例中ヒノキ単独陽性者が2例存在したと述べている。報告によりヒノキ単独陽性者数に差がある要因の1つとして、ヒノキとスギの飛散数の割合の地域差が考えられる。ヒノキ花粉の飛散は東日本と比べ西日本にやや優位である。したがって、東日本の方が西日本よりヒノキ単独

陽性例を見出しにくいのではないかと推察される。また、花粉の飛散パターンをみると、東京地区ではヒノキ花粉の飛散時期がかなりスギ花粉の飛散時期と重複する。特に、平成6年の我々の測定ではヒノキ花粉の飛散時期がほぼスギ花粉と重複した。したがって、臨床症状からヒノキ花粉症を評価することは困難であった。

ヒノキ特異 IgE 抗体測定値における AlaSTAT 法および CAP-RAST 法の相関は相関係数で0.45となり、さらにヒノキ陽性率をスコア値で比較すると、AlaSTAT 法52.6%、CAP-RAST 法80.5%と両者で大きく異なった結果を示した。CAP-RAST 法ではスコア1を臨床的に疑陽性として評価する場合もあるが、スコア2以上を陽性とした場合でもヒノキ CAP-RAST 陽性率は65.9%となり、AlaSTAT 法とはなお10%以上の差があった。AlaSTAT 法および CAP-RAST 法はいずれも測定原理は ELISA に基づいているが、AlaSTAT 法はビオチン化した可溶性ポリマーにアレルゲンを結合させた液相アレルゲンを使用して

Table 2 Relationship between the skin test and RAST

A <i>C. obtusa</i>				CAP-RAST score N=65			
AlaSTAT score				CAP-RAST score			
Positive	4	31		Positive	8	34	
Negative	20	10		Negative	16	7	
	Negative	Positive			Negative	Positive	
	Skin test				Skin test		
	Sensitivity	75.6%			Sensitivity	82.9%	
	Specificity	83.3%			Specificity	66.6%	
	Correspondent	78.5%			Correspondent	76.9%	
B <i>C. japonica</i>				CAP-RAST score N=65			
AlaSTAT score				CAP-RAST score			
Positive	11	54		Positive	10	54	
Negative	0	0		Negative	1	0	
	Negative	Positive			Negative	Positive	
	Skin test				Skin test		
	Sensitivity	100%			Sensitivity	100%	
	Specificity	0%			Specificity	9.1%	
	Correspondent	83.1%			Correspondent	84.6%	

いるのに対し⁷⁾, CAP-RAST 法はスポンジ状構造の親水性ポリマーに固相化したものをアレルゲンとして使用している⁸⁾. 比較した検体数に違いはあるものの, スギにおけるスコア陽性率の両測定法における一致率をみると98.5%と非常に高かった (Table 1B). 永倉⁶⁾は, スギ花粉で AlaSTAT, CAP-RAST 法の比較を行っているが, スコア陽性, 陰性一致率はやはり94.4%と良好な結果であったとしている. また, 榎本⁹⁾は各種抗原による AlaSTAT 法と CAP-RAST 法における比較を行っているが, 抗原によっては一致率にやや違いを生じたと述べている. 今回の検索から, スギ特異 IgE 抗体の測定では両測定法による差異が認められなかったことから, ヒノキ特異 IgE 抗体の測定結果が AlaSTAT 法と CAP-RAST 法で差異を生じた要因としては, 測定系の違いよりもむしろ測定で使用しているヒノキ花粉抗原の抗原性あるいは抗原蛋白濃度の違いが強く影響したものと推察される.

皮膚試験と抗体スコア値の比較では, 両測定法で一致率にはほぼ差を認めなかったものの, 感度は CAP-RAST 法が高かった. Houte ら¹⁰⁾はプリックテストとの比較で CAP-RAST 法が AlaSTAT 法より高感度であったとしているが, 我々もヒノキに関しては同様な結果を得た. ただし, 現在のところ規格化されたヒノキの皮膚試験用エキ스는なく, 今回皮膚試験に用い

たエキスもその抽出方法によっては抗原力価が変化する可能性がある. この点については今後さらに検討が必要と考えられるが, いずれにせよヒノキ皮膚試験用エキスの開発は早期に望まれるところであろう. 一方, スギの皮膚試験においては, スギ花粉症患者を対象としたにもかかわらず陽性率が83.1%であり, AlaSTAT 法のスギ陽性率100%および CAP-RAST 法の98.5%と比較して低かった. スギの市販エキ스에問題があるとの報告もあり¹¹⁾, そのために陽性率が低かった可能性がある.

ヒノキはスギと共通抗原性を有していることが知られているが, CAP-RAST 値におけるスギとヒノキの相関係数は0.71と相関性が認められた. 清水¹²⁾は, スギ花粉に対する感受性の高いものほどヒノキ花粉にも強く感作されていると述べているが, 我々の検索からもスギ特異 IgE 抗体価が高い症例ではヒノキ特異 IgE 抗体価も高くなる傾向を認め, スギ, ヒノキの共通抗原性が示唆された.

さらに, 抑制試験ではスギとヒノキの抗原の共通性や特異性が明らかとなった. 同種花粉による抑制試験では, スギ, ヒノキともに花粉エキス添加で高い抑制反応が両測定系で認められ, 特異 IgE 抗体の存在が確認された. 一方, 異種花粉による抑制試験では, ヒノキ特異 IgE 反応がスギ花粉エキスにより

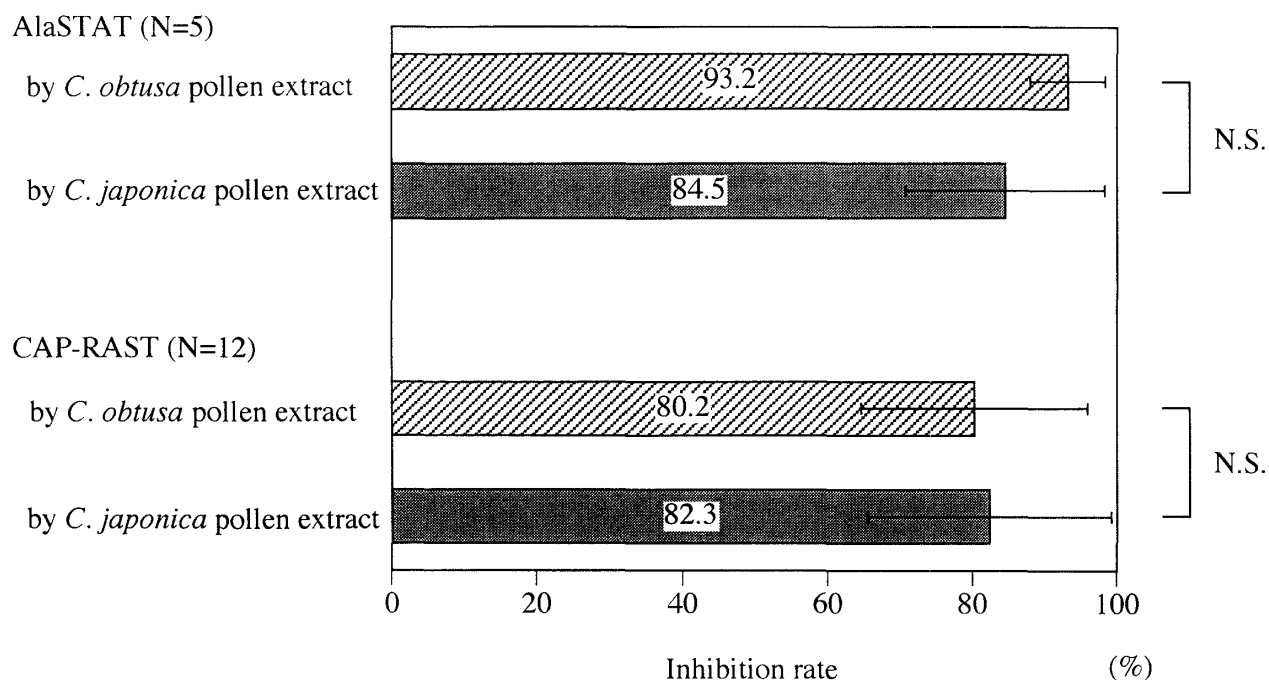
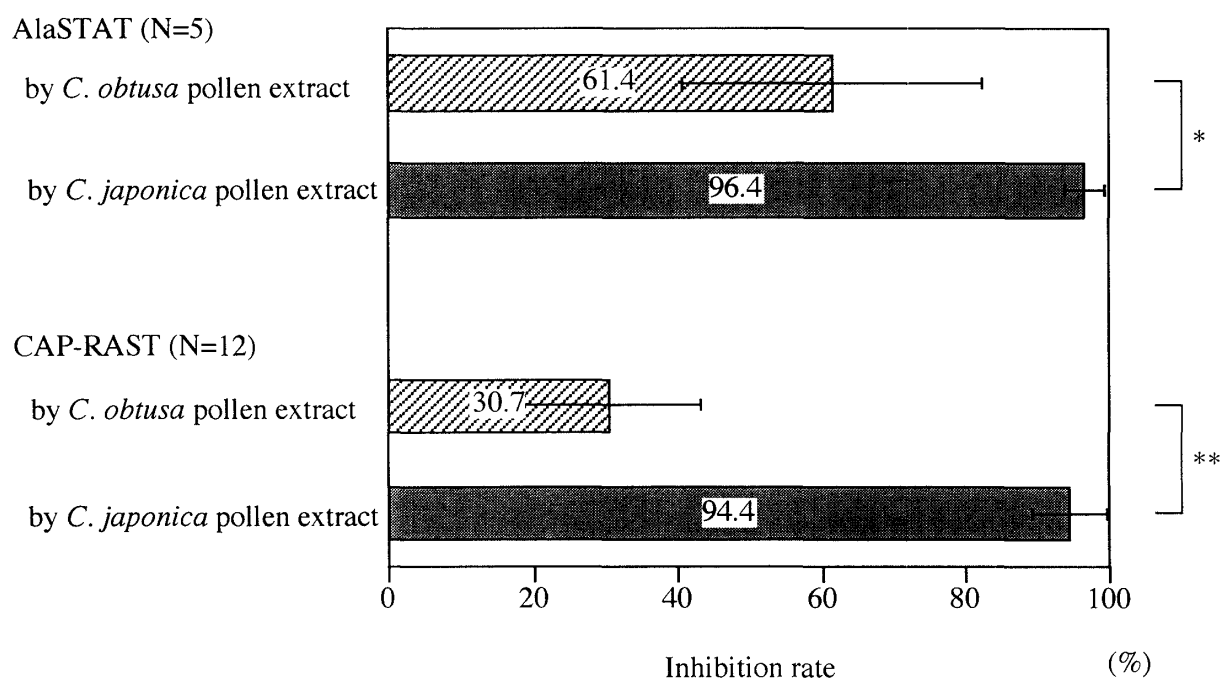
A Inhibition test in RAST for *C. obtusa*B Inhibition test in RAST for *C. japonica*

Fig. 3. Comparison of the inhibition test in RAST for *C. obtusa* (A) and *C. japonica* (B) between AlaSTAT and CAP-RAST. Each column is the mean $\pm$ SD of the inhibition rate. (* p < 0.01, ** p < 0.001, N.S.: not significant)

82.3～84.5%抑制されたのに対し、スギ特異 IgE 反応のヒノキ花粉エキスによる抑制率は30.7～61.4%と低い値を示した。これらの結果から、スギとヒノキの共通抗原性ととともに、スギとヒノキそれぞれに共通抗原以外の独自の抗原性を示す部分もあり、今回の検討からはスギの方がヒノキより独自の抗原性を示す部分が多いことなどが推察された。ただし、今回の抑制試験ではインヒビターとして粗抗原エキスをを用いており、スギとヒノキの抗原の共通性あるいは独自性¹³⁾に関しては、ヒノキ花粉の主要抗原が同定されつつある中で今後さらに精製した抗原での検討が望まれる。

結 語

1) スギ花粉症患者221名を対象にヒノキ特異 IgE 抗体を AlaSTAT 法と CAP-RAST 法により測定した。その結果、スギ花粉症患者におけるヒノキ特異 IgE 抗体陽性率は AlaSTAT 法で52.6%、CAP-RAST 法で80.5%となり、CAP-RAST 法で高い陽性率を示した。

2) 皮膚試験とヒノキ特異 IgE 抗体検査の比較では、皮膚試験に対する感度は CAP-RAST 法で高かった。

3) スギ特異 IgE 抗体の測定では両測定法による差異が認められなかったことから、ヒノキ特異 IgE 抗体の測定結果が AlaSTAT 法と CAP-RAST 法で差異を生じた要因としては、主として測定系に使用しているヒノキ花粉抗原の違いが考えられた。

本論文の主旨は、第44回日本アレルギー学会総会(1994年10月28日、東京)において発表した。

文 献

1) 宮本昭正, 降矢和夫, 水野勝之: 花粉間の共通抗原

- に関する研究. アレルギー 20, 39-46, 1971.
- 2) 井手 武, 芦田恒雄: スギ科・ヒノキ科樹木花粉の共通抗原性. アレルギーの臨床 11, 174-178, 1991.
- 3) 石崎 達: 即時皮内反応—陽性判定基準を中心に—アレルギー 12, 14-32, 1963.
- 4) 岡野光博, 西岡慶子, 永野稔明, 太田伸生, 増田 游: ヒノキ特異的 IgE 抗体陽性患者の臨床的検討—ヒノキ AlaSTAT 検査を用いて—. アレルギー 43, 1179-1184, 1994.
- 5) 伊藤博隆, 西村 稔, 鈴木元彦, 間宮紳一郎, 佐藤 薫, 他: ヒノキ花粉に対する特異 IgE 抗体の検索. 耳鼻臨床 86, 957-962, 1993.
- 6) 永倉仁史, 小野幹夫, 若盛和雄, 野原 修, 遠藤朝彦, 他: ヒノキ花粉症に対するヒノキ特異的 IgE 抗体測定法 AlaSTAT の検討—スギ花粉症との共通性について—. アレルギーの臨床 14, 138-142, 1994.
- 7) 伊藤幸治, 宮本昭正, 牧野莊平, 福田 健, 九嶋 敦, 他: 新しい IgE 抗体測定法, AlaSTAT の有用性の検討. アレルギー 40, 444-453, 1991.
- 8) 我妻義則, 松山隆治, 佐藤幹弥, 河野通史, 小崎秀夫: CAP Phadiatop RIA および CAP Phadiatop FEIA の臨床的検討. 医学と薬学 23, 83-88, 1990.
- 9) 榎本雅夫, 横山道明, 畠田猛真, 新井宏紀, 吉内光夫: 新しい特異 IgE 抗体測定法 AlaSTAT の検討—鼻アレルギー患者を対象として—. 医学と薬学 24, 103-108, 1990.
- 10) Houte, A. and Bartels, P.: Comparative evaluation of the Pharmacia CAP system and the DPC AlaSTAT system for *in vitro* detection of allergen-specific IgE with the skin prick test. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30, 101-105, 1992.
- 11) 安枝 浩: スギ花粉アレルギーエキスの標準化. アレルギー 40, 862, 1991.
- 12) 清水章治, 信太隆夫: スギ花粉症におけるヒノキ科花粉の意義. アレルギー 26, 318-319, 1977.
- 13) Ito, H., Nishimura, J., Suzuki, M., Mamiya, S., Sato, K., et al.: Specific IgE to Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) in patients with nasal allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 74, 299-303, 1995.

COMPARATIVE STUDY ON THE ASSAY FOR IgE ANTIBODIES SPECIFIC FOR
CHAMAECYPARIS OBTUSA POLLEN BETWEEN AlaSTAT AND CAP-RAST

Osamu Nohara¹⁾, Toru Imai²⁾, Kensaku Saneyoshi¹⁾, Tomohiko Endo¹⁾,
Hitoshi Nagakura¹⁾, Mikio Ono¹⁾ and Hiroshi Moriyama¹⁾

¹⁾*Department of Otorhinolaryngology, The Jikei University School of Medicine*

²⁾*Department of Otorhinolaryngology, Ohmori Red Cross Hospital*

Titers of IgE antibody specific for the pollen of *Chamaecyparis obtusa* (*C. obtusa*) were determined by AlaSTAT and CAP-RAST in 221 patients with Japanese cedar pollinosis.

IgE antibody to *C. obtusa* tested positive by CAP-RAST at a higher rate (80.5%) than by AlaSTAT (52.6%). The results obtained from the two assays were compared with those from intradermal skin test. CAP-RAST had a higher sensitivity than that of AlaSTAT. Because the two methods showed no differences in the determination of IgE antibody specific for *Cryptomeria japonica*, the above differences between AlaSTAT and CAP-RAST are surmised to be ascribable to the differences of *C. obtusa* antigen used in the both assays.
