

〔原 著〕

Immunoblotting 法を用いたカモガヤ花粉 抽出液のアレルゲン分析

藤田学園保健衛生大学小児科

宇理須厚雄 児玉 央 金森俊輔 小沢 徹
増田 進 市川陽子 飯海 潔 矢崎雄彦

名古屋大学医療技術短期大学

鳥居新平

カモガヤ花粉抽出液のアレルゲン分析をカモガヤ RAST スコアー 3 以上の気管支喘息、アレルギー性鼻炎患者21人からの血清を用い SDS-PAGE ならびに immunoblotting 法によって行った。SDS-PAGE (2ME 処理) では16本の蛋白バンドが検出され、そのうちの13本が IgE 抗体と結合した。中でも OG6 (MW38K) は21例中17例 (81%)、OG1 (MW14K) は13例 (62%)、OG15 (MW78K) は12例 (57%)、OG4 (MW19K) は11例 (52%) の患者血清と反応し、主要アレルゲンと考えられた。しかし患者のうち2組が同じバンドと反応した以外、他の患者の1組も同じ結合パターンを示さず、患者のアレルゲンとの反応パターンには多様性があることがわかった。最もアレルゲン活性の強い OG6 は糖蛋白であった。

Key words: allergen analysis — immunoblotting — orchard grass

緒 言

アレルギー疾患の診断と治療のために使用されるアレルゲン抽出液は、臨床的に重要な成分を十分量含有することと同時に、刺激物質、毒性物質が除去されている必要がある¹⁾。このような、安全で有効なアレルゲン抽出液を製造し、さらに品質管理を行っていくためには、アレルゲン抽出液の標準化は大切な作業である¹⁾。

カモガヤ花粉は、アレルギー性鼻炎やアレルギー性結膜炎だけではなく気管支喘息の原因アレルゲンとなり、アレルギー疾患の原因アレルゲンとして重要な位置を占めている²⁾³⁾。そして、この花粉抽出液中には、種々のアレルゲン活性をもった物質が含まれていると報告されているが^{4)~6)}、いまだおのおのの成分は精製

されておらず、それらの性状も十分には解明されていない。

アレルゲン分析の方法には、皮膚試験、RAST inhibition test, crossed radioimmuno electrophoresis (以下 CRIE), isoelectric focusing など種々の方法が報告されているが、最近 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (以下, SDS-PAGE) でアレルゲン抽出液を分画した後、電気的に nitrocellulose (以下, NC) 膜上に転写し、その NC 膜上で、患者血清中の特異 IgE 抗体と結合するバンドを検出する、いわゆる immunoblotting 法が、アレルゲン分析にも応用されるようになった⁷⁾⁸⁾。この方法は、アレルゲン抽出液中の各成分を精製することなく、主要アレルゲンの同定や、各成分の物理化学的性状の解析が行い得え、しかも CRIE と異なってアレルゲン抽出液に対する抗血清を必要としないという利点がある。今回、カモガヤ花粉抽出液のアレルゲン分析を、この immunoblotting 法を用いて行い、主要アレルゲンの同定、ならびに各成分の物理化学的性状の解析を行った。

Received: December 23, 1987

Accepted: February 18, 1988

Abbreviation: BSA bovine serum albumin;
CRIE crossed radioimmuno-electrophoresis;
2ME 2-mercaptoethanol; NC nitrocellulose;
SDS-PAGE SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; TBS Tris buffered saline

材料ならびに方法

1. カモガヤ花粉抽出抗原：鳥居薬品 KK から供与されたカモガヤ花粉凍乾末 (Lot No. K 003) を用いた。

2. 血清：藤田学園保健衛生大学医学部小児科アレルギー外来に通院中で、Pharmacia 製 RAST キットによって、カモガヤ花粉に対する RAST スコアが 3 あるいは 4 の気管支喘息あるいは、アレルギー性鼻炎患者の血清を採取し、使用まで -20°C に凍結保存した。なお、患者の血清総 IgE 値は 100IU/ml から 1500IU/ml の範囲にあり、症例 1, 5, 6, 9, 13 にはカモガヤ花粉抽出液による減感作療法が行われていた。コントロールとして、カモガヤ花粉に対する RAST スコアが 0 の健常者血清を用いた。

3. SDS-PAGE：カモガヤ花粉凍乾末を 2-mercaptoethanol (以下, 2ME) を含む digestive buffer あるいは含まない digestive buffer に混ぜ、4 分間 boiling 処理した後、14% gel (テフコ株式会社) を用い、Laemmli の方法⁹⁾に従って電気泳動を行った。分子量を求めるため、低分子域スタンダード (Pharmacia) を用いた。

4. NC 膜への電気的転写：Towbin らの方法¹⁰⁾に準拠して、12V, 25mA (定電流) で 16 時間室温で通電することにより、前述のゲルから NC 膜へ電気的に転写した。

5. 特異的 IgE 抗体結合バンドの検出：転写後、NC を 5mm 幅のストリップに切断し、それぞれを 2% bovine serum albumin (以下, BSA) (Sigma) 50% glycerol, 1% Tween 20 を加えた pH 7.4 Tris buffered saline (20mM, Tris, 500mM NaCl) (以下, TBS) で、非特異的結合を防ぐため、室温 2 時間反応させることによって blocking 処理をした。その後、1% Tween 20 を加えた TBS で患者血清を 2 倍希釈した後、室温で一夜、攪拌しながら反応させ、0.05% Tween 20 含 TBS で 4 回洗浄後、2% HSA-1% Tween 20-TBS で 1000 倍希釈した peroxidase 結合ヤギ抗ヒト IgE 血清 (Cappel) を室温で 7 時間反応後、再び 0.5% Tween 20-TBS で洗浄、次に coloring reagents (10mg 3,3'-diaminobenzidin (同仁化学) $15\mu\text{l}$ 30% H_2O_2 , 40ml, 0.1M Tris-HCl buffer pH 7.6) を加え、発色させ、1% NaN_3 で洗浄することにより反応を停止した。

6. 染色：ゲルは、Coomassie Brilliant Blue R

250 (Bio Rad) によって蛋白、Zacharius らの方法¹¹⁾に従った PAS 染色によって糖を染色した。NC は amido black 10B (和光純薬) によって蛋白を染色した。

7. デンシトメトリーによるスキニング：Immunomedica Co, LTD Image Analyzer (model: TIF-64) を用いて、ゲルならびに NC 上のバンドをスキャンした。

結 果

1. SDS-PAGE ならびに NC 膜への転写：カモガヤ抽出液を 14% gel で電気泳動した結果、16本の Coomassie 染色でそまるバンドが検出された (Fig. 1)。その分子量の範囲は、14K dalton から 78K dalton であった。また 4% から 20% の gradient gel を用いた

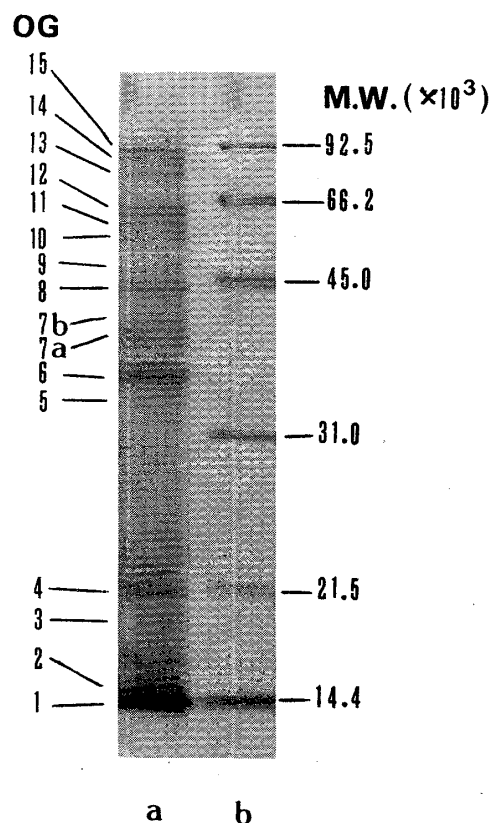


Fig. 1. Fractionation of orchard grass pollen extract by SDS-PAGE.

a; orchard grass pollen extract.

b; molecular weight markers: phosphorylase B (92500), bovine serum albumin (66200), ovalbumin (45000), carbonic anhydrase (31000), soybean trypsin inhibitor (21500), lysozyme (14400).

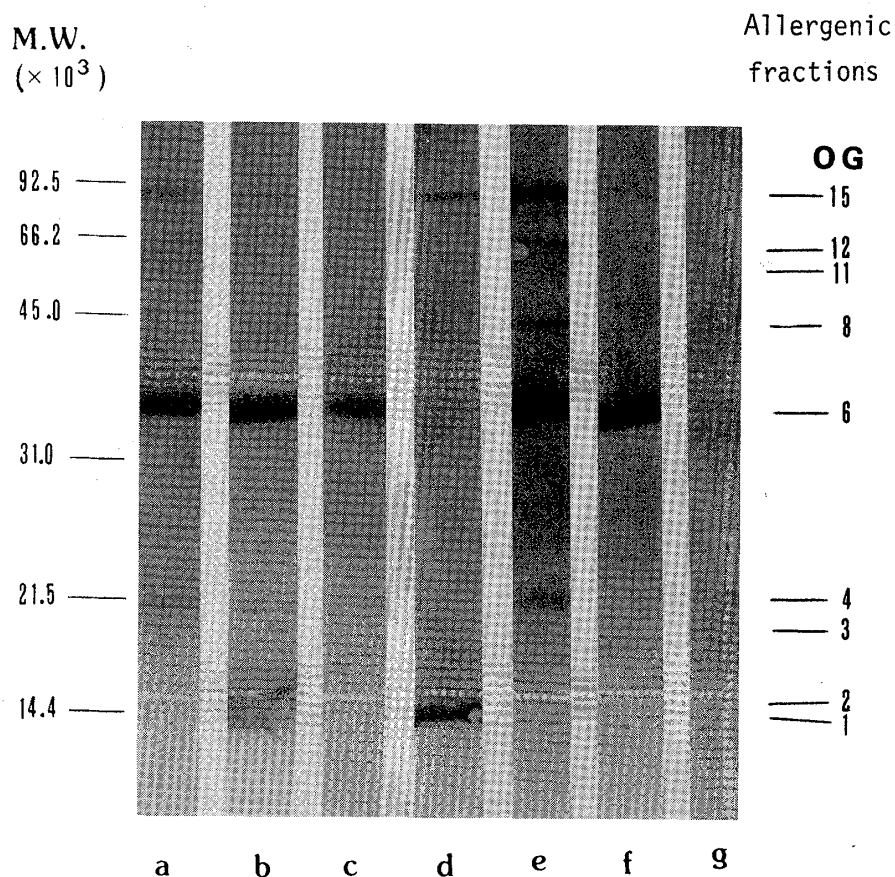


Fig. 2. Identification of IgE-binding components of orchard grass pollen extracts by immunoblotting.

a-f; allergic patients' sera. g; non-allergic control serum.

Table 1 IgE-binding activity and PAS-staining of bands obtained by transfer of SDS-PAGE separated orchard grass pollen components

Orchard grass pollen components	MW (×10 ³)	PAS staining	Patients' sera																					IgE binding	Percentage of positive (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
OG 15	78	+	○	○		○	○	○	○							○		○	○	○		○	+	57	
14	75	+																○		○			+	10	
13	72	+																				○	+	5	
12	64	+	○				○									○				○		○	+	24	
11	61				○																		+	5	
10	58																						—	0	
9	52																					○	+	5	
8	50	+					○				○							○		○		○	+	24	
7b	44	+																					—	0	
7a	43	+																					—	0	
6	38	+	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○		○		○	+	81	
5	35																○					○	+	10	
4	19	+	○	○			○		○			○		○	○	○	○		○		○		+	52	
3	18							○								○							+	10	
2	16			○						○	○	○					○						+	24	
1	14			○		○			○	○	○					○	○	○	○	○	○	○	+	62	

場合は、9本のバンドが染色され、バンドの分離は14% gelの方が優れていた。NC膜へ転写した後の amido black による染色によっても、16本のバンドが検出された。

2. カモガヤ RAST 陽性血清による IgE 抗体結合バンドの検出: Fig. 2 と Table 1 はカモガヤ花粉アレルゲンに対する特異 IgE 抗体が結合するバンドを示している。amido black で染色される16本のバンドのうち、13本が IgE 抗体と結合した。分子量38K dalton の OG6は、81%の患者血清と反応し最も陽性率

が高かった。次いで OG1 (分子量14K dalton), OG15 (分子量78K dalton), OG4 (分子量19K dalton) がそれぞれ62%, 57%, 52%の陽性率であり、以上4つの成分が主要アレルゲンと考えられた。その他、OG2(24%), OG3(10%), OG5(10%), OG8(24%), OG9(5%), OG11(5%), OG12(24%), OG13(5%), OG14(10%) も、IgE 抗体結合能を示した。今回調べた21人の患者の反応するバンドの組み合わせのパターンが同一なのは、症例12と症例13(OG4とOG6と反応)ならびに症例16と症例20(OG1と反応)のみで、他は

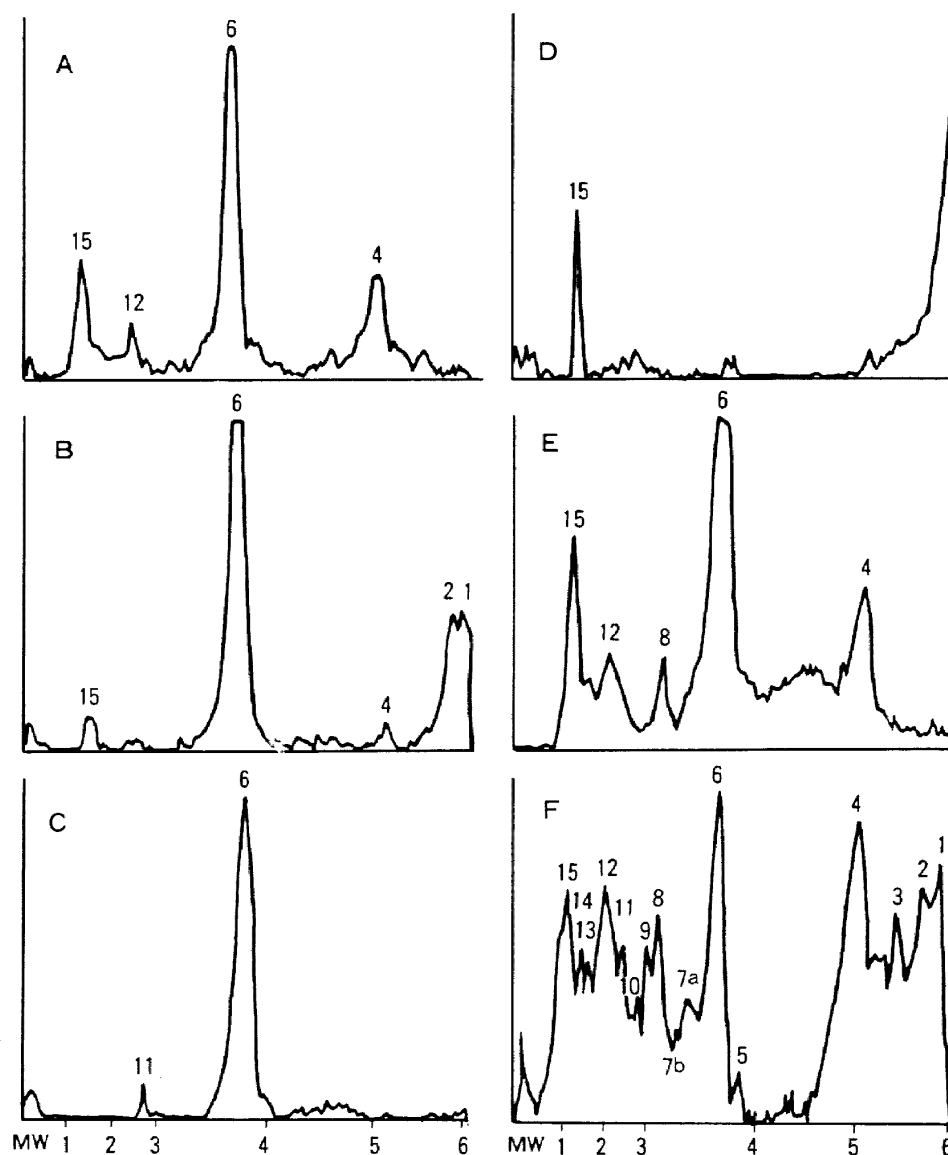


Fig. 3. Densitometric scans of IgE-binding bands (A-E) and amido black stained bands (F) on nitrocellulose membrane. A to E represents patient's sera No. 1 to No. 5, respectively. MW 1 to 6 shows the mobility position of low molecular weight protein standards consisting of phosphorylase B (92500), bovine serum albumin (66200), ovalbumin (45000), carbonic anhydrase (31000), soybean trypsin inhibitor (21500), and lysozyme (14400), respectively.

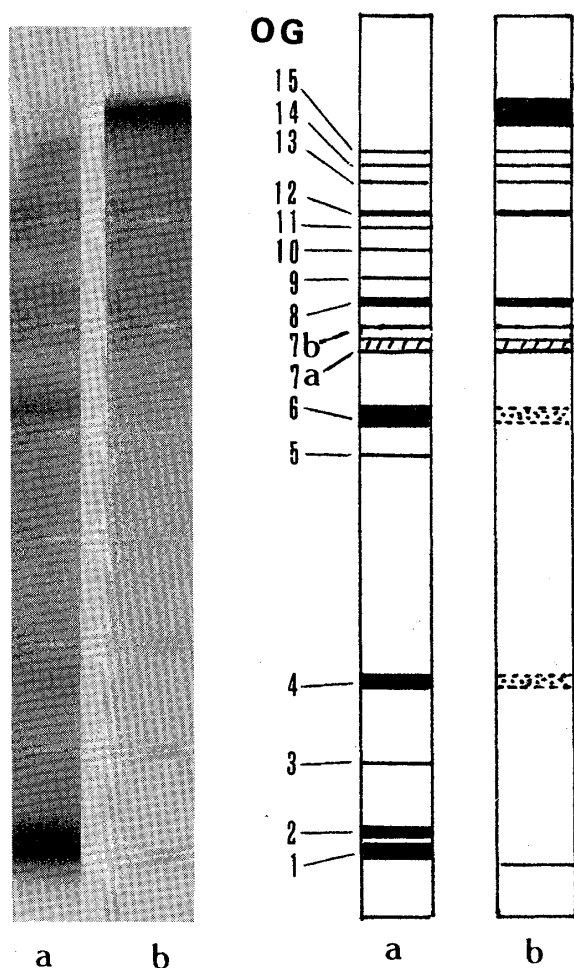


Fig. 4. Coomassie-staining (a) and PAS-staining (b) of orchard pollen extract components fractionated by SDS-PAGE.

全員異なっており、IgE 抗体の認識は、患者によるバラエティーが大きいことがわかった。なお、コントロールとして使用したカモガヤ RAST 陰性血清では、バンドは検出されなかった。

3. デンシトメトリーによるスキヤニング：Fig. 3 は amido black 染色のバンドと、患者の IgE 抗体結合バンドのスキヤニングを示す。各ピークの面積は、成分に結合している IgE 抗体量を示すと考えられる。最も多数の患者に認識された OG6 が、結合する抗体の量も最大であった。

4. PAS 染色：IgE 抗体結合能をもったバンドの PAS 染色をみてみると (Fig. 4), OG 4, 6, 8, 12, 13, 14, 15 が陽性であり、一方、IgE 抗体結合能をもたないバンドでは、OG7a, OG7b が陽性であった。

5. 2ME 処理と 2ME 未処理のカモガヤ花粉抽出液の SDS-PAGE の比較：2ME 処理と未処理のサンプルの SDS-PAGE を Fig. 5 に示す。アレルギー活性の

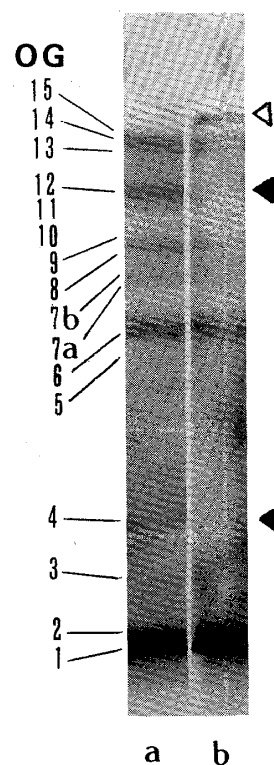


Fig. 5. Fractionation of orchard grass pollen extracts by SDS-PAGE after 2ME-treatment (a) or 2ME-untreatment (b). Solid arrowheads; bands stained only by 2ME-treatment; open arrowhead; band stained only by 2ME-untreatment.

最も強い OG6 は両者とも同じ移動度を示した。2ME 処理では観察された OG4 と OG12 が 2ME 未処理では消失、かわりに MW100K dalton の新たなバンドが観察された。

考 察

SDS-PAGE で分画すると 16 本の蛋白バンドが検出され、さらに NC 膜へ転写後、患者血清を用いて IgE 抗体と結合するバンドを検討してみたところ、16 本中 13 本が IgE 抗体と結合し、特に OG6, OG1, OG15, OG4 はそれぞれ 81%, 62%, 57%, 52% の結合率を示し、これらが主要アレルゲンと考えられた。しかし、今回、検索した 21 人の患者の IgE 抗体結合バンドをみてみると同一のパターンを示したのは 2 組だけで、他の患者はすべて異なったパターンを示し、患者によるアレルゲンの認識には大きな差異があることがわかった。Topping ら⁵⁾は、isoelectric focusing と skin test を用いて PI 4.5 と PI 6.0 の 2 つの分画がアレルギー活性を

もっていると報告している。Calam ら⁶⁾は高速液体クロマトグラフィーと RAST inhibition test によって分子量30K と15K dalton の2つの成分が主要アレルゲンであると報告している。しかし、我々と同様、SDS-PAGE と immunoblotting 法で分析している Ford ら⁸⁾によれば、19本の蛋白バンドのうち、13本が IgE 抗体と結合し、分子量14K, 24K, 26K, 28K, 30K, 32K, 36K, 43K dalton の8本のバンドが陽性率50%以上を示し、特に30K, 32K, 36K dalton の3つのバンドは85%以上の陽性率であった。これらのうち36K dalton のバンドは、38K の OG6 と一致するのかもしれない。我々の結果では、35K dalton のバンドが21人中2人(10%)と反応するのみであり、Ford らによって示された、85%以上の陽性率を示す30K, 32K dalton に相当するバンドは検出されなかった。また、38K dalton のバンドは4-20%の gradient gel や他の濃度(10%)の gel を用いても、1本のバンドしか検出できなかった。Ford らと我々の結果の差異の原因として、1) 使用した抗ヒト IgE 血清の特異性、2) 対象とした患者、3) 使用したカモガヤ花粉抽出液などに違いがあるためと考えられるが、3番目の違いによる可能性が高いと考えられた。いずれにしろ、今までの報告と比べて、アレルゲン活性をもった成分は多数存在することが判明した。患者のアレルゲン認識の多様性と、多数のアレルゲン成分が存在するという結果から、診断・治療に用いるカモガヤ抽出液は、主要アレルゲンだけを精製したものよりも、少なくとも4つの主要アレルゲンを含みさらに他の成分も含んだ粗抗原の方が都合がよいといえる。

デンストメトリーによるスキニングによって描かれるピークの面積は、それぞれの成分に結合した IgE 抗体量を示している。最多数の患者が反応した OG6 は、最も多量の IgE 抗体と結合しておりこの意味でも OG6 が、カモガヤ花粉の中で最も重要なアレルゲンであるとわかった。最高頻度に認識されるアレルゲンは多量の IgE 抗体と結合するという現象は P. Judaica¹²⁾ や Bermuda grass¹³⁾ の花粉でも報告されている。

次に PAS 染色の結果をみると、アレルゲン活性をもったバンドの中では OG4, OG6, OG8, OG12, OG13, OG14, OG15 の7本が陽性であり、これらは糖を含有していると考えられた。OG6 は2ME 処理あるいは未処理でも同じ移動度の位置に検出され、S-S 結合のような易還元性の結合による重合体にはなっていないと推

論された。

以上のごとく、immunoblotting 法は、粗抗原のまま各アレルゲン活性成分を分析でき、しかも物理化学的性状を決定できるという点で、他の分析方法にはみられない長所を持っていると考えられた。

文 献

- 1) Aas, K.: Clinical and experimental aspects of standardization and purification of allergen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 49, 44-54, 1975.
- 2) 信太隆夫, 降矢和夫, 水野勝之, 我妻義則, 松山隆治, 宮田 亮: 花粉喘息の特徴. *アレルギー* 19, 739-751, 1970.
- 3) Baldo, B.A., Sutton, R. and Wrigley, C.W.: Grass allergens with particular reference to cereals. *Prog. Allergy* 30, 1-66, 1982.
- 4) Topping, M.D., Brostoff, J., Brighton, W.D., Danks, J. and Minnis, M.: Allergenic activity of fractions of cocksfoot (*Dactylis glomerata*) pollen. *Clin. Allergy* 8, 33-38, 1978.
- 5) Topping, M.D., Brostoff, J. and Brighton, W.D.: Allergenic activity of fractions of cocksfoot (*Dactylis glomerata*) pollen. *Clin. Allergy* 11, 281-286, 1981.
- 6) Calam, D.H., Davidson, J. and Ford, A.W.: Investigations of the allergens of cocksfoot grass (*Dactylis glomerata*) pollen. *J. Chromatograph* 266, 293-300, 1983.
- 7) Sutton, R., Wrigley C.W. and Baldo, B.A.: Detection of IgE- and IgG-binding proteins after electrophoretic transfer from polyacrylamide gels. *J. Immunol. Methods* 52, 183-194, 1982.
- 8) Ford, S.A., Tovey, E.R. and Baldo, B.A.: Identification of orchard grass (*Dactylis glomerata*) pollen allergens following electrophoretic transfer to nitrocellulose. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78, 15-21, 1985.
- 9) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- 10) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354, 1979.
- 11) Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H. and Woodlock, J.J.: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal.*

- Biochem.* 30, 148-152, 1969.
- 12) Ford, S.A., Baldo, B.A., Geraci, D. and Bass, D.: Identification of parietaria judaica pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 79, 120-126, 1986.
- 13) Ford, S.A., Hons, B.Sc. and Baldo, B.A.: Identification of Bermuda grass (*Cynodon dactylon*)-pollen allergens by electroblotting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 79, 711-720, 1987.

IDENTIFICATION OF ORCHARD GRASS (*DACTYLIS GLOMERATA*) POLLEN ALLERGENS BY IMMUNOBLOTTING

Atsuo Urisu, Hiroshi Kodama, Shunsuke Kanamori, Toru Kozawa, Susumu Masuda,
Yoko Ichikawa, Kiyoshi Imai and Takehiko Yazaki

Department of Pediatrics, Fujita-Gakuen Health University, School of Medicine

Shimpei Torii

College of Medical Technology, Nagoya University

Orchard grass (*Dactylis glomerata*) pollen proteins were electrophoretically separated on polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose strips where IgE-binding components were detected by reaction with allergic patients' sera and peroxidase-labeled anti-human IgE. The subjects were 21 patients with bronchial asthma or allergic rhinitis. Of 16 bands (in the molecular weight (MW) range of 14,000 to 78,000 daltons) separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 9 bands bound to IgE. Four of the bands bound to IgE from more than 50% of the serum samples. A component of MW 38,000 daltons (OG 6) bound to IgE from 81% of the allergic sera tested and also bound to the greatest quantity of IgE. This component may be clinically most important. Only two couples of sera tested demonstrated identical IgE-binding spectra, indicating a marked diversity in response to the allergens by different patients.
