

〔原 著〕

ラテックス凝集反応を利用した空中 Cry j 1 の簡易測定法の開発

山形県衛生研究所

高橋裕一

山形県産業技術振興機構

青山正明

【目的】特別な機械や器具を必要としない簡便な空中スギ花粉アレルゲン (Cry j 1) の測定法を開発する。

【方法】ラテックス粒子に抗 Cry j 1 ポリクローナル抗体を物理吸着させ、BSA でブロッキング処理し感作ビーズを作成した。Cry j 1 濃度は、大気試料の 2 倍希釈系列に感作ビーズを加え 2 時間静置し得られた凝集の有無から求めた。

【結果】日本アレルギー学会提供のスギ花粉エキス標準品では Cry j 1 濃度が 5ng/ml まで凝集が認められた。大気試料は 20p/m³ まで測定可能であった。

【結語】ラテックス凝集反応を利用した空中 Cry j 1 の簡易測定法を開発した。この方法の長所には、1) 日々の測定が容易である。特に大飛散期の測定が容易である。2) 特殊な装置を必要としない。3) 発症原因物質そのものを測定しているなどである。

Key words : airborne pollen — Cry j 1 — latex agglutination — pollen allergen

はじめに

方 法

我々は空中を飛散する花粉を花粉の数ではなくアレルゲンの量として測定できないか種々検討してきた。なかでも表面プラズモン共鳴現象を利用した方法¹⁾²⁾はリアルタイムに近い短時間に結果を得ることができる。また最近開発した ESR ラジカルイムノアッセイ法³⁾はごく微量の大気中 Cry j 1 を超高感度に測定できることがわかった。しかし、これらの方法は高価な装置を必要とするため多くの施設で利用する汎用性にはならない。今回はできるだけ手間暇をかけず、特殊な装置も必要としない簡便な方法であることを念頭におき、空中花粉アレルゲンを測定する方法を検討した。

1. 試薬の調整方法

IMMUTEX (H1007CR, 日本合成ゴム) 200μl を超純水 1ml に懸濁し 40μl の抗 Cry j 1 ポリクローナル抗体 (抗 Cry j 1 抗体: 林原生物化学研究所, 500μg/ml) を加え、室温で 3 時間物理吸着した。3% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む 0.1M MOPS 緩衝液 pH7.0 (MOPS 液) の 1ml を添加し混合後 4℃ で一晩ブロッキング処理した。4℃, 500×g で 10 分間遠心した後に上清を吸引除去した。3ml の MOPS 液で 3 回遠心洗浄し、1% BSA 含有 MOPS 液 (assay buffer) の 2ml に懸濁し保存用の抗 Cry j 1 抗体感作ビーズ (感作ビーズ) とした。

Cry j 1 の値は平成 11 年 12 月にアレルギー学会から提供されたスギ花粉エキス標準品に記載されている値を用いた。原液を assay buffer で希釈し 100ng/ml 液を作成した。作成後の液は小分けして -30℃ に保存した。100ng/ml 濃度の標準液は使用時に assay buffer にて希釈し 20ng/ml 液, 10ng/ml 液, 5ng/ml 液, 2.5 ng/ml 液を調整した。

2. 大気試料のサンプリング法およびアレルゲンの抽出法

Received : June 22, 2005

Accepted : November 9, 2005

Abbreviations : BSA bovine serum albumin ; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay ; MOPS 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid

高橋裕一 : 山形県衛生研究所 [〒990-0031 山形市十日町 1-6-6]

E-mail : takahashiyui@pref.yamagata.jp

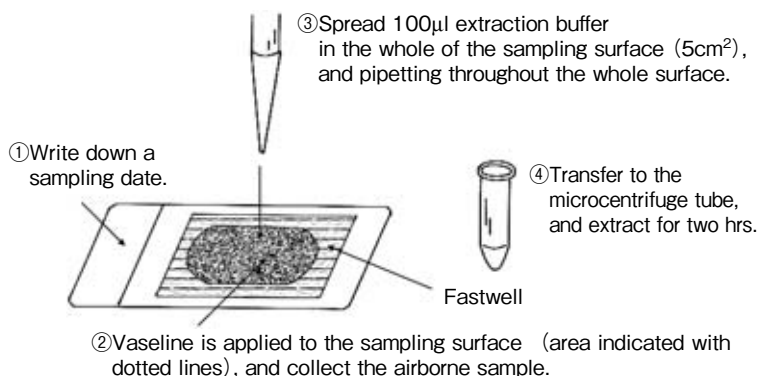


Fig. 1. Procedure for measuring airborne Cry j 1 by Durham sampler.

大気中の花粉アレルゲンはサイクロンサンプラー (Burkard C90M, Burkard Manufacturing Co. Ltd, UK) 及びダーラム型花粉捕集器を用い捕集した。両サンプラーは同一地点に1mくらい離し設置した。いずれも当日の午前6時から翌日の午前6時まで24時間の間隔で捕集した。両サンプラーからの試料の抽出は同一抽出液で行った。

サイクロンサンプラーの大気吸引容量は16.6 l/分であり、24時間で24m³の大気が捕集される。試料はプラスチック製のマイクロ遠心管 (graduated microcentrifuge tube, Cat# 509-GRD, QSP (Quality Scientific Plastics), USA) に捕集される。抽出は0.1% BSAを含む0.125MのNH₄HCO₃溶液 (抽出液) の100μlで室温で2時間攪拌しながら抽出した。抽出後900×gで10分間遠心し花粉等の粒子を分離し上清を測定に用いた。飛散初期の一時期は測定感度を上げるため25μlの試料抽出液で抽出した。その際も同一条件で抽出した。

ダーラム型花粉捕集器を用いた大気中の花粉アレルゲンの捕集には、スライドガラス (マツナミ, S-2215) の中央部に Fastwell (19mm×32mm, 商品コード FW 19×32, IGR 社, USA) を貼り、スライドガラスの捕集面に白色ワセリンを薄く塗り大気試料を捕集した。Fastwell は Fig. 1 の横線で示す透明な厚さ 0.5mm ほどの薄い膜で、底面には粘着性の物質が塗ってある。Fastwell を用いたのはスライドガラスのワセリン塗布面 (Fig. 1 で点々で示した 5cm² の領域) から大気試料を確実に抽出するためである。捕集後のスライドのワセリン塗布面に 100μl の抽出液を滴下し全面に広げピペティングしながらキャップ付きのマイクロ遠心管 (Cat# 509-GRD) に移した。抽出は室温で2時間行っ

た。抽出する試料を遠心管に移したのは抽出液の蒸発を防ぐためである。ダーラム型花粉捕集器による大気試料の捕集法と Cry j 1 の抽出法は Fig. 1 に示した。

3. 測定方法

20μl の Cry j 1 標準液あるいはスギ花粉飛散期の大気試料抽出液をプラスチック製 96 穴の丸底マイクロプレート (TC microwell 96U, 143761, ナルジェンシステムインターナショナル (株), 東京) に分注し、等量の assay buffer にて 2 倍希釈系列を作成した。2 倍希釈系列は通常 8 段階調整した。作成した系列の各ウェルに使用時 assay buffer で 5 倍に希釈した感作ビーズを 15μl ずつ注入した。マイクロプレートミキサーで混合した後に室温 (20~25℃) に静置し 2 時間後の凝集パターンを目視で判定した。

目視による判定の基準は以下の通りである。ラテックス粒子がウェルの中央に集まって点状に見える場合を陰性 (Fig. 2 の Blank 参照)、陰性に比べ多少大きな凝集がみられる場合を弱陽性 (Fig. 2 の 2.5ng/ml 参照)、ラテックス粒子がウェル一面に広がって見える場合を陽性 (Fig. 2 の 5ng/ml~20ng/ml 参照) とした。陽性の凝集ウェルを凝集ありと判定し、2 倍希釈試料の最高希釈倍率をもって凝集力価 (agglutination titer) とした。

結 果

抗 Cry j 1 抗体の IMMUTEX への最適な感作量を知るため、200μl の IMMUTEX に対し 10, 20, あるいは 40μl の抗 Cry j 1 抗体を感作させたところ、40μl が

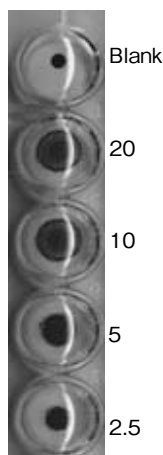


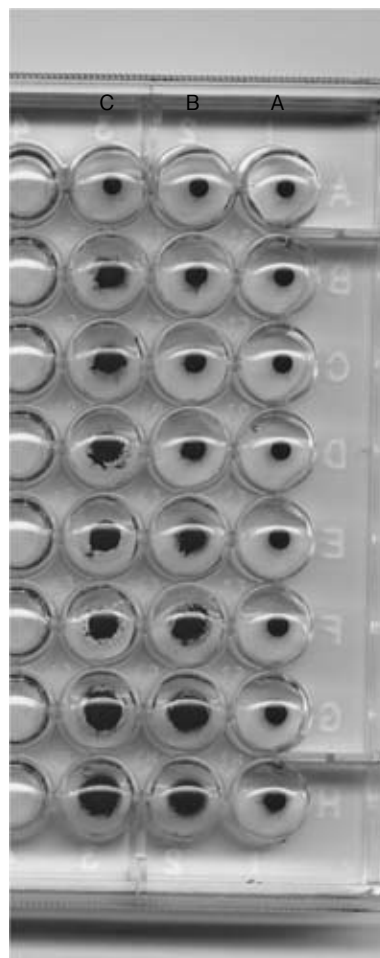
Fig. 2. Evaluation of minimum concentration of Cry j 1 needs for agglutinate the latex beads.

感度良好であった (Fig. 3). つまり抗 Cry j 1 抗体の至適感作量は, IMMUTEX の 100 μ l に対し 20 μ g であった. この結果にもとづき以降の実験では, IMMUTEX の 100 μ l に抗 Cry j 1 抗体を 20 μ g 反応させ感作ビーズを作成した.

次に, 大気試料の抽出に用いた 0.125M NH_4HCO_3 抽出液がこの測定系で非特異的な凝集を起こすかどうかを調べた. NH_4HCO_3 液の希釈系列を原液から 64 倍液まで作り, 上記の測定条件で調べたところ, 原液でも非特異的な凝集が認められなかった. したがって, 大気試料の抽出液は原液で使うことが可能なことがわかった.

Cry j 1 の検出下限値を求めるために日本アレルギー学会提供のスギ花粉エキス標準品を希釈し 20, 10, 5, 2.5ng/ml 液を作成し凝集の有無を調べた. 陽性は 5ng/ml まで認められた. したがって, 今回用いた条件では Cry j 1 の検出下限値は 5ng/ml となる (Fig. 2). 大気試料を抽出するのに用いた抽出液の量は 100 μ l で, 捕集した空気量 (捕集空気量) は 24m³ なので, これらの値から凝集力価が 1 の大気試料の Cry j 1 濃度を計算すると 20pg/m³ となった.

2005 年のスギ花粉飛散ピーク期に得られた日ごとの大気試料測定結果を Fig. 4 に示した. 図は 100 μ l の抽出液で抽出した液を assay buffer にて 10 倍に希釈し, 各 10 倍液をスタートとして 2 倍希釈系列を作り, ラテックス粒子を添加混合し 2 時間後に得られた凝集パターンである. 抗原と抗体が適比のウェルでは凝集



(A : 10 μ l, B : 20 μ l, C : 40 μ l)

Fig. 3. Examination of proper concentration of anti-Cry j 1 polyclonal antibody adheres onto the surface of latex beads.

は一面に広がった. 抗原濃度が低くなるにつれて凝集は弱くなり中央部に集まった. 一方, 抗原大過剰のウェルでも中央部に集まった凝集像がみられた. ただし希釈系列を作成しているため誤認識には至っていない.

次に大気試料のサンプリング法を検討した. サンプラーにはサイクロンサンプラーとダーラム型花粉捕集器を用いた. サイクロンサンプラーは体積法のサンプラーなので一定体積 (1m³) あたりの Cry j 1 量を求めることができるが, ダーラム型花粉捕集器は重力法のサンプラーなので一定体積あたりの Cry j 1 量を求めることができない. そこで一定捕集面積 (1cm²) あたりの Cry j 1 量を求めた. 捕集法の違いによるラテック

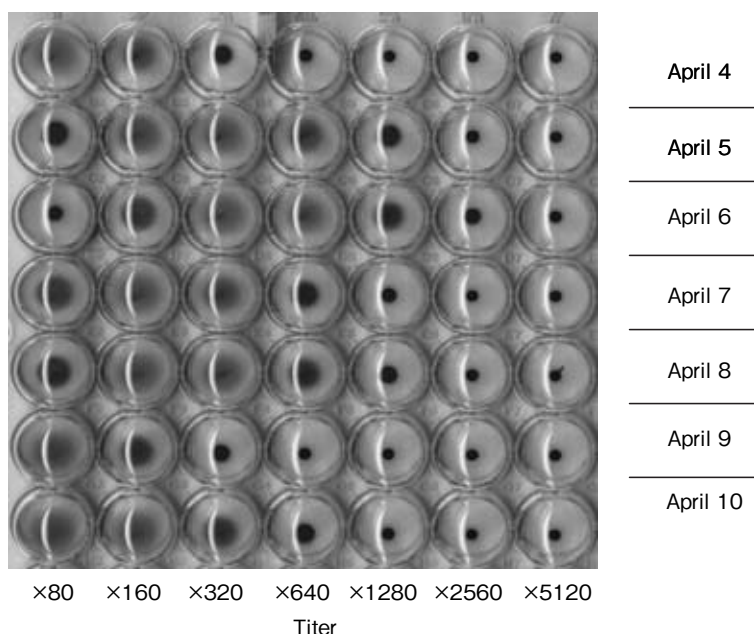


Fig. 4. An example of Cry j 1 agglutination pattern obtained with airborne samples collected daily at the maximum pollen dispersion period in 2005.

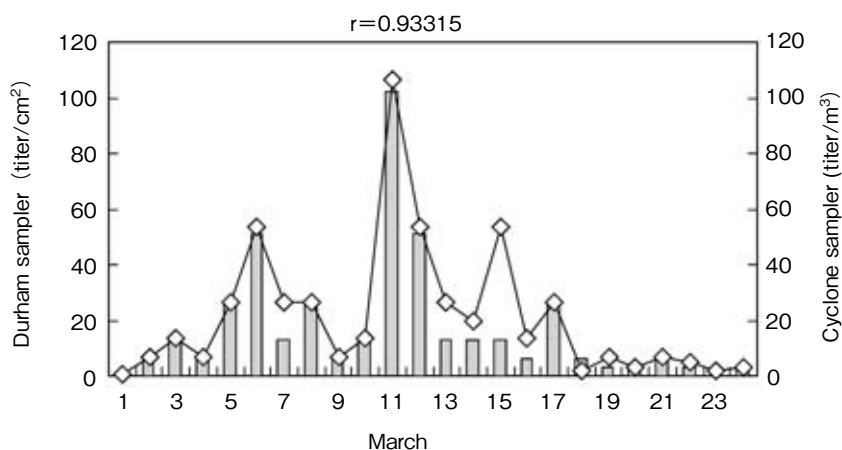


Fig. 5. Comparison of airborne Cry j 1 collected with Cyclone sampler (line) and Durham sampler (bar) examined with latex agglutination.

ス凝集反応の結果を Fig. 5 に示した。両サンプラーからの値は良く一致した ($r=0.93315$, $p<0.01$, $n=24$)。このことからダーラム型花粉捕集器を用い Cry j 1 を測定できることがわかった。ただし、ダーラム型花粉捕集器で実際に捕集される Cry j 1 の量はサイクロンサンプラーの 1/10 程度でしかなかった。

最後に、ラテックス凝集反応で測定した Cry j 1 の値

が他の測定法で得た値と一致するかを調べた。結果は Fig. 6 に示すように、ラテックス凝集反応で得られた Cry j 1 値は ESR ラジカルイムノアッセイ法³⁾で得られた値と良く一致した ($r=0.95253$, $p<0.01$, $n=21$)。

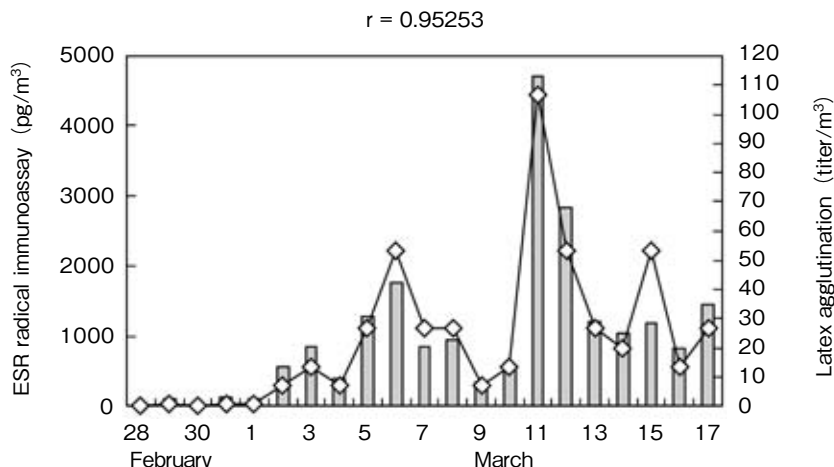


Fig. 6. Comparison of airborne Cry j 1 measured with latex agglutination (line) and ESR radical immunoassay (bar).

考 察

現在の花粉情報は空中に存在するスギ花粉の個数を情報としている。最近、林学分野の研究からスギの木ごとに集めたスギ花粉の重量あたりの Cry j 1 量には大きな違いがあることがわかってきた⁴⁾⁵⁾。このことから花粉症の発症原因物質の量としては花粉の数よりは花粉アレルゲンの量を用いるのが望ましいと考えられる。Cry j 1 の測定は従来から ELISA 法が用いられてきた。感度はスギ花粉の個数を数える方法よりも低く、スギ花粉が 10 個以上ないと検出できなかった⁶⁾。そこで我々は飛散開始日前の測定も可能な方法として ESR ラジカルイムノアッセイ法³⁾を開発した。この方法は ELISA 法より 100 倍ほど感度が良く平均的な Cry j 1 含量のスギ花粉であれば 1/10 個くらいで検出できる。飛散開始日前後の情報は花粉情報の中で重要な情報なので感度良く測定できる方法は貴重である。この測定法の難点は ESR (電子スピン共鳴) 装置 (約 700 万円) を必要とすることである。花粉情報のために多くの施設に ESR が導入されるとは考えられないので、簡便な方法を模索した。その結果ラテックス凝集反応が見出された。この方法の特長は操作が簡単で高価な装置を必要としないことである。得られた値は他の方法 (ESR ラジカルイムノアッセイ法) と良く一致した。感度は凝集力価 1 が約 20pg/m³ で ELISA 法より約 3 倍感度が良い。それでも花粉飛散開始日の後でないと利用できない。ラテックス凝集反応は操作が簡

単で日々の測定に向いており、測定結果は 3 時間後には情報化できる。現行のダーラム型捕集器による花粉測定のように短時間に結果を得ることはできないが、大飛散時も測定操作は同じなので花粉数を数えるより容易になる。

残る課題は、①測定に要する時間をどれだけ短縮できるか、②大気試料をどのようにサンプリングするかである。①についてはさらに検討の余地がある。②についてはサイクロンサンプラー (Burkard C90M) は高価 (約 60 万円) なので、ダーラム型花粉捕集器をサイクロンサンプラーの代わりに使用できないかと考え検討したところ、ダーラム型花粉捕集器を大気中の花粉アレルゲンサンプラーとして使用できることがわかったので、花粉情報に広く利用される道が開けたといえる。ただし、アレルゲンのサンプリング量は吸引捕集しているサイクロンサンプラーのように多くないので本格的飛散開始期に限った使用となる。

ダーラム型花粉捕集器からの試料を顕微鏡でカウントする現行の方法に比べラテックス凝集反応は、1) 大飛散している時期の測定が容易である、2) 花粉数に左右されない、3) 特殊な装置を必要としない、4) 発症原因物質そのものを測定しているなどの長所がある。難点は情報化まで数時間を必要とすることである。

文 献

- 1) Takahashi Y, Ohashi T, Nagoya T, Sakaguchi M,

- Yasueda H, Nitta H. Possibility of real-time measurement of an airborne *Cryptomeria japonica* pollen allergen based on the principle of the surface plasmon resonance. *Aerobiologia* 2001 ; 17 : 313-8.
- 2) 高橋裕一, 大橋 武. 表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した空中花粉アレルゲンのリアルタイム測定. *アレルギー* 2002 ; 51 : 24-9.
 - 3) 青山正明, 高橋裕一. ラジカルイムノアッセイ法による Cry j 1 の超高感度測定法の開発. *アレルギー* 2004 ; 53 : 1088-90.
 - 4) 後藤陽子, 近藤禎二, 安枝 浩. 関東地方周辺のスギ精英樹花粉における Cry j 1 含量の変異. *花粉学会会誌* 1999 ; 45 : 149-52.
 - 5) 近藤禎二. アレルゲンの遺伝的変異と選抜基準の検討, スギ花粉症克服に向けた総合研究 (第一期平成9年度~11年度) 成果報告書, 科学技術庁研究開発局 2000 ; 466-71.
 - 6) 榎本雅夫, 岳良 博, 十河英世, 藤村 聡, 藤木嘉明, 瀬野悟史, 他. 高感度 Cry j 1 測定法について, *花粉学会会誌* 2000 ; 46 : 9-16.

DEVELOPMENT OF THE SIMPLE METHOD FOR MEASUREMENT THE CONTENT OF CRY J 1 IN THE AIR BY LATEX AGGLUTINATION TEST

Yuichi Takahashi¹⁾ and Masaaki Aoyama²⁾

¹⁾Yamagata Prefectural Institute of Public Health

²⁾RADIA Project, Yamagata Promotional Organization for
Industrial Technology Institute for Life Support Technology

Background : In order to develop an easy method for measure the airborne *C. japonica* pollen allergen (Cry j 1) without any utensils or a special apparatus, we examined latex agglutination test for the purpose.

Methods : The latex beads were reacted with the anti-Cry j 1 polyclonal antibody, and the beads were blocked with bovine serum albumin (sensitized beads). The measurement is as follows : two-fold diluted series of solutions of airborne samples are reacted with the sensitized beads, and the results are examined after 2 hrs.

Results : Agglutination was recognized with 5ng/ml Cry j 1 standard solution and 20pg/m³ of airborne samples.

Conclusion : We have developed a simple method for measure the airborne Cry j 1 by use of latex agglutination test. The strong point of the method is 1) measurement is easy and does not affect the numbers of pollen, 2) do not need any utensils or a special apparatus, 3) measure the disease causative materials themselves.