

スギ花粉症診断における Polystyrene Bead を用いた Enzyme Immunoassay の応用について

群馬大学医学部第一内科学教室

松井 茂 中沢次夫 稲沢正士

梅枝愛郎 小林節雄

群馬大学教育学部生物学教室

巨智部直久

群馬大学医療技術短期大学部

佐藤久美子

Key words: enzyme immunoassay — β -D-galactosidase — Japanese cedar pollinosis —
polystyrene bead — specific IgE antibody

(受付: 10月8日, 1984)

はじめに

1973年 Hoffman¹⁾がアルカリホスファターゼを標識酵素とした競合反応固相法を用いる酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: 以後 EIA) を開発して以来, 特異的 IgE 抗体の検出の分野においても, β -D-ガラクトンダーゼやペルオキシダーゼなどを標識酵素として用いる EIA が応用されており, その成績が radioallergosorbent test (RAST) の成績とほぼ一致する上, その操作が比較的簡便であり, ラジオアイソトープによる放射能汚染の危険が無いことなどの利点のため, その臨床的有用性が高まっている。

特に担体として, polystyrene bead を用いる方法は, paper disc を用いる場合に比べ, CNBr による活性化も必要としないし, 固相化も物理的吸着によるため, その操作がより安全かつ簡単であるとされている。

われわれも²⁾すでに mite (*Dermatophagoides farinae*) に対する特異的 IgE 抗体やこんじゃく舞粉抗原に対する特異的 IgE 抗体の検出に polystyrene ball を用いる EIA を応用し, その有用性を報告してきたが, 今回はスギ花粉症の診断に EIA を利用することと, 担体として polystyrene bead を応用し paper disc の代

りになりうるか否かの検討を目的として, スギ花粉症患者血清中の特異的 IgE 抗体の検出, RAST との比較などの基礎的検討を行った。

また, EIA が種々の利点のために, 将来的に RAST と共にかなり広く用いられるだろうと考え, これを用いた抗原分析への応用をも試みその結果と皮膚反応との関連性も検討したのであわせて報告する。

対象・材料・方法

1. 対象

実験対象はスギ花粉症と臨床的に診断された12症例であり, 男2名, 女10名で, 年齢は18歳より56歳まで, 平均29.3歳で, 被検血清は季節中に採血された血清を用いた。ほかにスギ花粉に対して症状を示さない健康人12名から採血した血清を対照とした。これら血清は使用時まで -80°C に保存した。

2. 材料

担体として Pierce Chemical Co. 製の直径6.35mm の洗浄済み polystyrene bead を用いた。

スギ花粉, ヒノキ花粉, サワラ花粉, イブキ花粉, コウヤマキ花粉は昭和57-58年の飛散期に採集したものを用いた。なお使用時まで乾燥条件下 5°C で保存した。

抗ヒト IgE 抗体は, β -D-ガラクトンダーゼ標識抗ヒ

Abbreviations: cpm counts per minute; EIA enzyme immunoassay; Ig immunoglobulin; PRU Phadebas RAST unit; RAST radioallergo-sorbent test; RIA radioimmunoassay

ト IgE 特異抗血清(ヤギ, MBL 社製)を用いた, この場合に酵素は抗体の Fab 部に標識されている。

酵素基質は, 2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド(和光純薬製)を0.05M リン酸緩衝液(pH 7.2)に0.1%になるように溶解したものをを用いた。

緩衝液は, 緩衝液(I)と緩衝液(II)を用いた, すなわち緩衝液(I)は, 0.15M リン酸緩衝液(pH 7.2)1容に生理的食塩水4容を加えた液に0.1%Tween 20と0.05%アジ化ナトリウムを添加したものであり, 緩衝液(II)は緩衝液(I)に0.3%ウシ血清アルブミンを添加したものである。

3. 方法

EIA の測定原理は基本的には RAST のそれと同一のサンドイッチ法である, すなわち抗原を結合した抗体と被検血清とをインキュベートする〔一次反応〕, これを洗浄したのち, 酵素標識抗 IgE 抗体を加え再びインキュベートする〔二次反応〕, 十分に洗浄したのち, 酵素反応を必要十分だけおこさせるように酵素基質中でインキュベートし, 最後に反応停止薬を加えて反応を停止させ, 比色計にて吸光度を測り酵素活性を測定するものである(図1)。

1) 抗原の polystyrene bead による固相化

スギ粗抗原を0.05M 炭酸緩衝液(pH 9.6)で適当な濃度(400, 200, 100, 50 μ g protein/ml)に調整した, 1ml の抗原溶液にあらかじめ0.05M 炭酸緩衝液(pH 9.6)で洗浄した polystyrene beads 6個の割合で加え, 45℃で3時間インキュベートし, 次いで4℃で20-24時間放置した, 更に緩衝液(I)で充分洗浄し, 使用時まで緩衝液(I)中で保存した。

2) 特異的 IgE 抗体の測定

試験管(栄研チューブ2号)に, 緩衝液(II)で4倍に希釈した被検血清160 μ l をとり, 抗原固相化 beads を各1個ずつ加え, 37℃で2時間静置してインキュベートした〔一次反応〕, インキュベーション終了後, 緩衝液(I)を加えて3回洗浄し, 最後に緩衝液(II)で洗浄した。次にティッシュペーパーにて作製した紙こよりを用いて水分を充分吸収し, 160ml の β -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒト IgE 特異抗血清を加え, 37℃で3時間静置してインキュベートした〔二次反応〕, 反応終了後は緩衝液(I)にて3回よく洗浄した。

基質 2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを0.05M リン酸緩衝液(pH 7.2)で0.1%になるように溶解し, 試験管に600 μ l ずつ注入した, これに二次反応終了済みの bead を加え, パラフィルムで栓をして

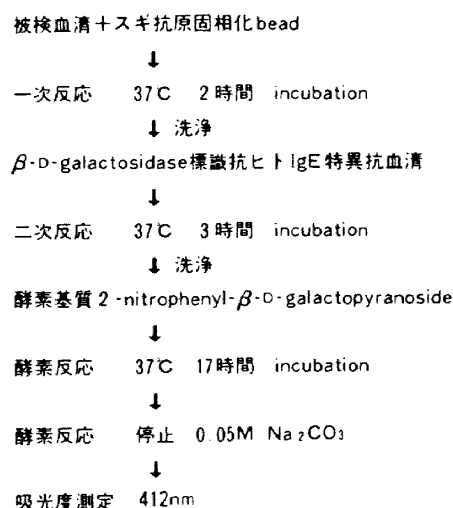


図1. EIA 法の原理。

37℃で17時間インキュベートした〔酵素反応〕。

最後に600 μ l の0.05M 炭酸ナトリウム溶液を加えて反応を停止させた後, 黄色に発色した反応液の吸光度を分光光度計セミシッパシステム(島津製作所)を用い412nmで測定した。

3) RAST

RAST は, Ceska ら³⁾の方法に準じ Pharmacia Diagnostics Co. 製の Phadebas RAST キットを用いて型どおり行った, ただし paper disc はキットの一部と自家製のものと2種を用いた, 自家抽出したスギ粗抗原の自家製 paper disc へのカップリングは, 粗抗原をホウ酸緩衝液(pH 8.0)に溶かし, 抗原液1ml に disc 20枚の割合で加えて行った, 抗原の蛋白濃度は, 100, 50, 25 μ g/ml に調整したが, 濃度による測定値の大きな変動はみられなかった。

なお, 蛋白量の測定は, Bio-Rad protein assay のキットを用いて行い, 対照としたウシ血清アルブミンによる検量線から蛋白量を算出した。

4) スギ花粉抗原および抗原分析

原則として安枝ら⁴⁾の方法に準じて行った, すなわち図2のようにスギ花粉をアセトン, 次いでクロロホルム-メタノール(2:1)にて脱脂したのち, 0.125M NH_4HCO_3 中に一夜浮遊させた, 上清を蒸留水に対して2日間透析し, 更に80%飽和硫酸にて塩析したものを凍結乾燥して粗抗原(粗抽出物, 分画1)を得, また抽出液残渣より swollen pollen を得た。

分画1を50mM Na-PB (pH 7.2)で平衡化した DEAE-セルロースカラムにかけ, 溶出液の塩濃度を0.2M NaCl, 1.0M NaCl と高めて段階的溶出を行い, それぞれ分画2, 分画3を得た。

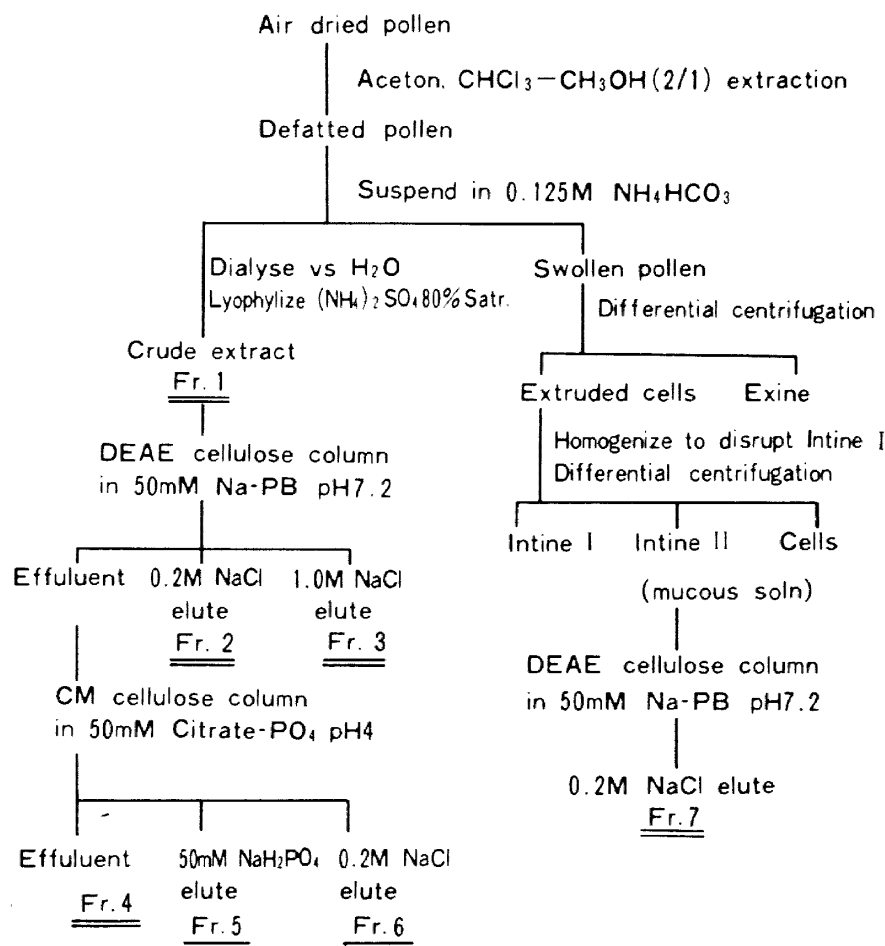


図2. スギ花粉アレルゲンの分画

次に、この非吸着部分をCM-セルローズカラムにかけて、溶出液の組成を50mM citrate- PO_4 (pH 4.0) から、50mM NaH_2PO_4 , 0.2M NaCl と変化させて段階的溶出を行い、非吸着画分から分画4を、吸着溶出画分からそれぞれ分画5、分画6を得た。

swollen pollen 部分からは、遠心法によって花粉外壁を取り除いて細胞を純化したのち、短時間ホモジナイズして透明な内壁を破壊した。この遠心上清に存在する多糖体成分を50mM Na-PB (pH 7.2) で平衡化した DEAE セルローズカラムにかけて、0.2M NaCl で溶出される部分を分画7とした。

ヒノキ花粉、サワラ花粉、イブキ花粉、コウヤマキ花粉でも、スギ花粉の場合と同様の操作にて抽出を行い、それぞれの粗抗原を得た。

5) 各分画を用いた抗原競合阻止試験

図3の方法のように、試験管に緩衝液(II)で4倍に希釈した症例2の被検血清160 μl をとり、阻止抗原として図2の各分画とヒノキ、サワラ、イブキ、コウヤマキなどの裸子植物花粉粗抗原を蛋白量として各々

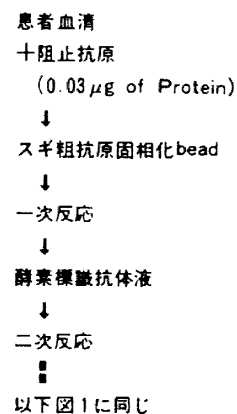


図3. 各分画を用いた抗原競合阻止試験。

0.03 μg 加えて37 $^{\circ}\text{C}$, 30分間インキュベートし、その後、スギ粗抗原をコーティングした bead を加え、以下同様操作にて EIA を行い、吸光度を測定した。対照としては抗原液の代りに緩衝液を用いて、その吸光度との比較で、抗原活性を吸光度の低下により測定した。

6) ブリックテスト

生体へのテストとしてブリックテストを施行した。

すなわち、前述のスギ花粉抗原の各分画と類縁裸子植物花粉抗原を生理食塩水で希釈し、それらの希釈液を用いて、対象者の前腕屈側部でブリックテストを行った。15分後に出現してくる膨疹の直径が対照に比し、3mm 以上の場合は陽性と判定した。

結 果

1. 特異的 IgE 抗体の測定

表 1 のようにスギ花粉症患者血清では吸光度 0.546-0.097 であり、健常人血清の場合の 0.047-0.025 に比し著明に高いことから、polystyrene bead を用いる EIA でも患者と健常人の両者を識別することが可能であり、更に患者血清中の特異的 IgE 抗体を半定量することも可能であることが推測された。

2. 測定条件の基礎的検討

1) 抗原濃度の影響

表 2 のように抗原濃度を、400, 200, 100, 50 μg protein/ml に変化させ、そのおのおのについて抗原液 1ml あたり 6 個の割合で bead を加え固相化を行ったが、その吸光度に著明な差は認められなかったため、少なくとも抗原濃度が 400-50 μg protein/ml の範囲では、抗原過剰による反応抑制もなく、抗原不足による反応低下もないと思われた。

2) 被検血清の濃度の影響

表 3 のように被検血清の濃度を変えて EIA を行ってみると、希釈するに従い、その吸光度の低下がみられた。したがって、従来からの他のアレルゲンにおける報告²⁾と同様に血清希釈濃度は 4 倍が最良の条件と考えられた。

更に表に呈示してあるように、RAST の場合にも希釈に応じて、その測定値の低下がみられた。

なお患者血清は症例 1 の血清を、対照としての健常人血清は症例 17 の血清を用い、抗原はスギ粗抗原（分画 1）を用いた。

3) 抗原コーティングにおける個々の bead の差異

図 4 のように 10 個の beads について、同一の抗原量、同一の血清を用いて吸光度を測定したが、症例 5 の血清を用いた場合には、0.292-0.422 平均 0.383 $\pm$ 0.036 であり、症例 10 の血清を用いた場合には、0.175-0.223 平均 0.202 $\pm$ 0.017 となり、bead 間の抗原結合量の差異はほとんど認められなかった。

表 1 EIA による特異的 IgE 抗体の測定

患 者	年齢	性	吸光度	健常者	年齢	性	吸光度
1. J.G.	24	F	0.546	13. C.A.	18	F	0.047
2. M.K.	18	F	0.486	14. K.O.	18	F	0.047
3. M.S.	18	F	0.460	15. C.A.	18	F	0.045
4. K.S.	28	F	0.335	16. M.I.	18	F	0.043
5. A.M.	32	M	0.309	17. M.K.	18	F	0.035
6. J.Y.	18	F	0.285	18. Y.A.	18	F	0.035
7. M.H.	18	F	0.240	19. H.H.	20	F	0.031
8. U.I.	56	F	0.219	20. Y.O.	18	F	0.031
9. K.S.	26	F	0.200	21. S.O.	21	F	0.030
10. H.H.	40	F	0.153	22. S.A.	54	M	0.029
11. Y.A.	35	F	0.137	23. Y.M.	20	F	0.028
12. T.T.	38	M	0.097	24. F.H.	43	F	0.025

表 2 bead との結合における抗原濃度の影響

抗原濃度 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	吸 光 度		
	患 者		健常者
	症例 5	症例 10	症例 22
400	0.443	0.170	0.018
200	0.380	0.163	0.036
100	0.356	0.158	0.024
50	0.338	0.156	0.029

表 3 被検血清の濃度の影響

希釈倍数	EIA (O.D.412)	RAST (Pharmacia 製)			RAST (自家製)
		[cpm]	[スコア]	[PRU/ml]	[cpm]
1	—	8183	III	7.4	12807
2	—	6051	III	4.7	11766
4	0.582	5108	III	3.7	7881
8	0.335	6762	III	5.5	5608
16	0.201	2309	II	1.2	3432
32	0.110	1365	I	0.35	2052
64	0.073				—
128	0.059				—
256	0.043				—
対照	0.044	510			516

*レファレンス

- A 12339cpm
- B 4897cpm
- C 1744cpm
- D 718cpm

3. RAST との比較 (表 4)

bead を用いた EIA の吸光度と Pharmacia 製の paper disc を用いた RAST の cpm との比較では、図 5 に示すように、 $R=0.874$, $Y=964.6+9374X$ とな

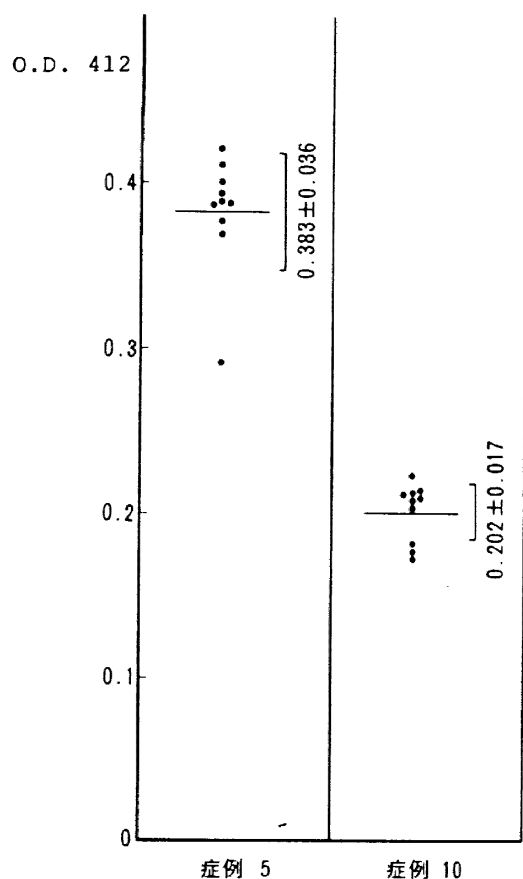


図4. 抗原コーティングにおける個々の bead の差異.

り、有意の相関が得られた。

更に、自家製の paper disc を用いた RAST の cpm との比較でも、図6に示すように、 $R=0.868$, $Y=3920+19962X$ となり、EIA による成績と RAST による成績との間には有意の相関が認められた。特に表4のように RAST の単位を cpm から PRU/ml とすると、 $R=0.900$, $Y=0.1589+13.04X$ となり、より高い相関が得られた。

また念のため行った Pharmacia 製と自家製の2種の paper disc を用いた RAST 間の比較では両者間には $R=0.840$, $Y=3072+1.801X$ と有意に相関が認められた。

4. 各分画を用いた抗原競合阻止試験による抗原活性の測定 (表5)

各分画とも患者血清の吸光度0.697より有意に吸光度が低下したので、全ての分画に抗原活性が存在すると思われた。特に分画2, 分画3, 分画5にはスギ粗抗原の分画1と等しいか、又はそれ以上に強い吸光度の低下が認められたが、分画7ではほとんど吸光度の低下が認められなかった。更に類縁裸子植物のヒノキ、

表4 EIA と RAST との成績比較

症 例 患 者	EIA (O.D.412)	RAST (Pharmacia 製)			RAST (自家製)
		[cpm]	[スコア]	[PRU/ml]	
1. J.G.	0.546	5321	III	6.2	12792
2. M.K.	0.486	5762	III	7.6	14325
3. M.S.	0.460	5024	III	5.7	12612
4. K.S.	0.335	4543	III	4.7	11032
5. A.M.	0.309	3326	II	3.4	12593
6. J.Y.	0.285	3880	III	3.9	10793
7. M.H.	0.240	4183	III	4.2	8955
8. U.I.	0.219	3986	III	4.1	5991
9. K.S.	0.200	3804	III	4.0	10307
10. H.H.	0.153	2207	II	2.1	7662
11. Y.A.	0.137	1196	II	0.86	4707
12. T.T.	0.097	843	I	0.36	4486
健常者					
17. M.K.	0.035	510	0		516
22. S.A.	0.029	117	0		315

表5 抗原競合阻止試験

阻止抗原(分画)	吸光度	
分画 1	0.078	
分画 2	0.067	
分画 3	0.104	
分画 4	0.491	
分画 5	0.038	
分画 6	0.430	
分画 7	0.521	
(ヒノキ)	0.470	
(サワラ)	0.498	
(イブキ)	0.494	
(コウヤマキ)	0.545	
(-)	0.030	健常者
(-)	0.697	症例 2

スギ花粉抗原各分画と類縁裸子植物花粉粗抗原を用いた抗原競合阻止試験による抗原活性の測定。

サワラ、イブキ、コウヤマキの花粉粗抗原には吸光度低下が余り認められず、阻止試験陰性と考えられた。

5. ブリックテストによる抗原活性の測定 (表6)。

生体へのテストとしてスギ花粉抗原の各分画と前述の類縁裸子植物の花粉抗原を用いてブリックテストを行った。スギ花粉抗原に対する特異的 IgE 抗体の高い症例5, 症例8, 症例10の3例については、陽性の結果が得られたが、その強度については必ずしも EIA による抗原競合阻止試験とは一致しなかった。類縁裸子

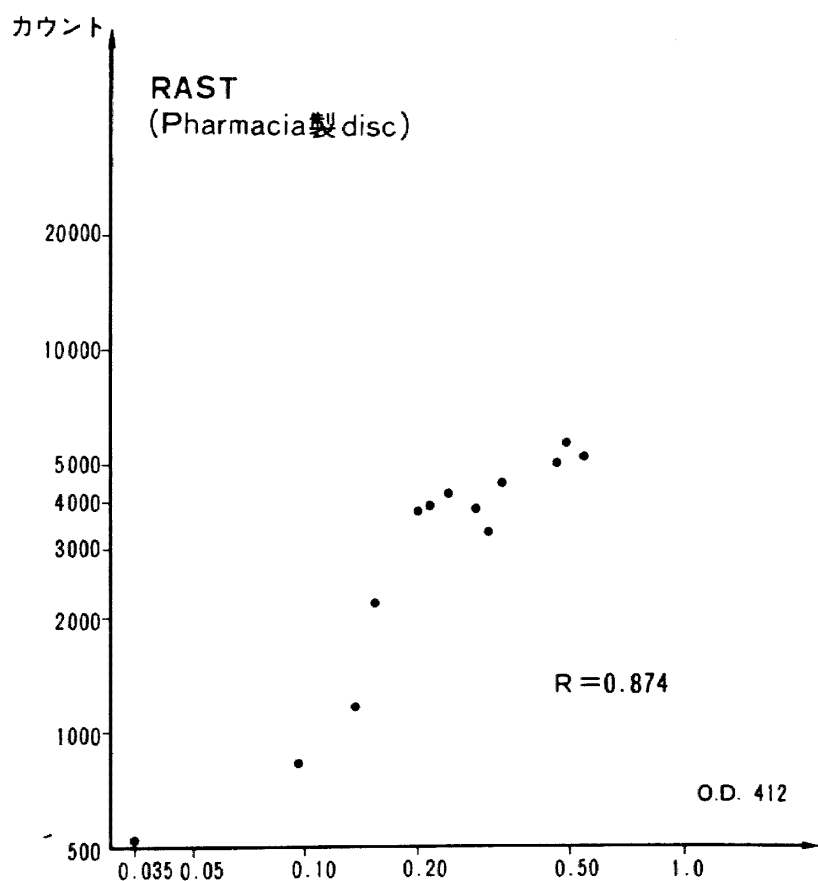


図5. EIA と Pharmacia 製 disc を用いた RAST との相関.

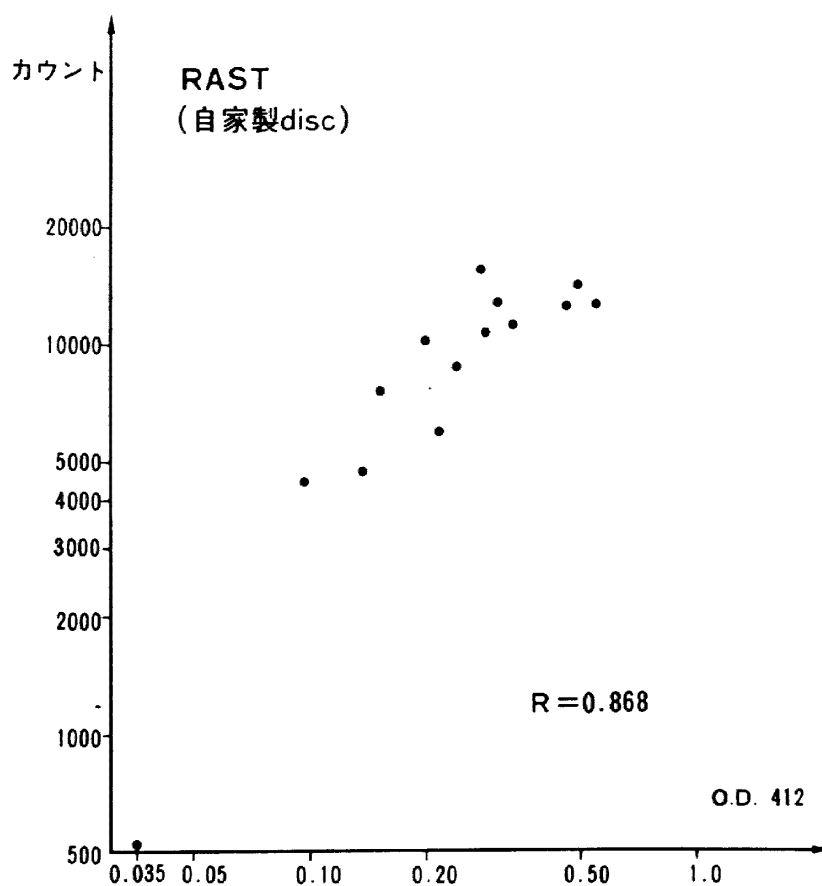


図6. EIA と自家製 disc を用いた RAST との相関.

表6 ブリックテストによる抗原活性の測定

	症例 5	症例 8	症例 10	症例 12
分画 1	—	+++	++	—
分画 2	++	++	+++	+
分画 3	±	++	++	—
分画 4	±	+	++	—
分画 5	—	±	++	—
分画 6	—	++	++	—
分画 7	—	+	+	—
(ヒノキ)	+++	+++	++	—
(サワラ)	—	++	+	—
(イブキ)	++	++	+++	—
(コウヤマキ)	—	++	++	—

スギ花粉抗原各分画と類縁裸子植物花粉粗抗原を用いたブリックテスト。

(—)：膨疹はなく、多少の発赤を伴うことがあるが掻爬傷痕のみがみられたもの。

(+)：紅斑と小膨疹を認めたもの。

(++)：膨疹が(+)の約3倍を示し、紅斑を伴ったもの。

(+++): (++)の膨疹に偽足を伴ったり、あるいは(++)より以上の大きさを示し、紅斑を伴ったもの。

註) 対照が(+)を示した場合は、これを陰性と考えて陽性をきめる。

植物の花粉粗抗原の場合は、抗原競合阻止試験ではほとんど吸光度の低下が認められなかったにもかかわらず、ブリックテストでは多くの陽性例が認められた。

考 察

EIA による特異的 IgE 抗体の測定には、橋本ら⁵⁾の paper disc (Pharmacia 製), Eriksson ら⁶⁾の plastic tube, 更に Sepulveda ら⁷⁾の polystyrene microplates を担体として用いた場合の報告があり、いずれも良好な結果が得られている。

また特異抗原として、ダニ、卵白アルブミン、ハウスダスト、アスベルギルス、花粉などの系に用いられ、やはり良好な結果が得られている。

しかし、Weltman ら⁸⁾のガラクトシダーゼを用いた immunosorbent test は、CNBr 活性化セルロースディスクを用いることに伴う危険のあることや、三次反応まで必要とする複雑性など、いくつかの難点がある。

今回われわれの行った EIA は、担体として paper disc を使用するかわりに polystyrene bead を用いたため、抗原を物理的吸着により比較的簡単にコーティングしうること、また二次反応までで直ちに酵素反応

に入れるという利点をもっている。

polystyrene bead は、抗原と疎水性結合（アルカリ性）による物理的吸着で結合されているので CNBr による活性化が不要であり、ラジオアイソトープを使わないため操作や保存が簡単かつ便利である。更に disc に比し表面積が大きいので抗原が多く付きやすい。以上の特性のため、主要なアレルゲンが蛋白質でも多糖体でも十分な結合が得られるものと考えられ、上記のような種々のアレルゲンにも応用されている。

佐藤ら⁹⁾は、蛋白質の多いフィラリア抗原に polystyrene bead を用いており、われわれも²⁾また、ダニ抗原や多糖体の多い舞粉抗原などにも応用して良好な結果を得、その有用性を確認している。

また星¹⁰⁾も、今回われわれが用いた polystyrene bead に類似していると思われる bead を使用してその有用性を報告している。

今回おそらくは糖蛋白であろうスギ抗原について polystyrene bead を用いて EIA を行った結果、結論的にはこれが十分 RIA に代り得ると思われるので、これまで RAST が応用しづらかった真菌などの糖蛋白アレルゲンについても、簡便で正確かつ再現性の良い測定法として本法は有用と思われる。

しかしながら bead を用いる場合、他の抗原については基礎的な点で、それぞれのアレルゲンに応じた条件設定などの検討が必要なことも事実であるので、今回もいくつかの基礎的な検討を試みてみたわけである。

まず抗原と bead との結合条件については、スギ抗原の場合、抗原濃度 50 μ g/ml 以上であれば十分 bead と結合しうる事が観察され、また 400 μ g/ml までの濃度であれば抗原過剰による抑制現象も起こらないと考えられる成績であった。稲沢ら²⁾はダニ抗原の場合 100 μ g/ml 以上あれば十分だが、舞粉抗原の場合 100 μ g/ml では反応が弱く 400 μ g/ml は必要であるとの報告をしたが、佐藤ら⁹⁾はフィラリア抗原と bead との結合では 100 μ g/ml の抗原濃度で十分との報告をしている。また polystyrene microplate とアスベルギルス抗原との結合においても 100 μ g/ml の抗原濃度が必要であるとの報告⁷⁾もあり、bead と結合させる抗原濃度は、抗原の組成によって多少の差異はみられるが、蛋白濃度として 100 μ g/ml 前後を目安と考えれば、ほぼ良好な結果が得られると思われ、スギ抗原の場合もほぼ同様と考えてよい成績であった。

抗原の種類によって至適抗原濃度に変動があるのは、アレルゲンとしての強度の違い、例えば市販のアレルゲンを用いる場合のロット差や、今回のスギでは採取地域や採取時期の差などと共に、抗原の主要アレルゲンの組成つまり蛋白質や多糖体などの比率が bead との疎水性結合に影響を及ぼすためではないかとも考えられる。

次に被検血清の濃度は、EIA でも RAST でも希釈によって活性が低下し、EIA では4倍希釈で十分に測定可能との結果が得られた。paper discを用いる RAST では原血清を用いるが、polystyrene beadを用いる EIA の場合、4倍希釈血清で測定できるため、血清中の反応抑制因子の関与などの可能性も少ないし、使用する血清が少量で済むなどの利点があると思われる。

最後に、同時再現性については、同一検体でかつ同一条件下で実施し、その存在を確認し得た。稲沢²⁾の用いた ball (MBL 社製)では、約10個に1個の割合で全く再現性の得られない場合が存在した。この場合の再現性不良の原因は、吸光度がほとんど0に近いことから、おそらくは ball 自体の不均一性に起因するものと考えられた。その点では今回われわれの用いた Pierce Chemical Co. 製の polystyrene bead では、良い再現性が得られたことから、類似製品に比し、その均一性において、より優れていると思われた。更に、星¹⁰⁾われわれの用いた polystyrene bead に類似していると思われる bead で再現性を確認しており、やはり全体としては、bead や ball を用いた場合にも、paper disc を用いた場合とほぼ同様の再現性が得られるものと推測された。

以上より、polystyrene bead を用いる EIA が、ダニ、舞粉、フィラリアなどの諸抗原の場合と同様に、多糖類の多いスギ花粉についても、上記条件下では特異的 IgE 抗体の測定に十分利用できることが確かめられた。

次に、bead を用いる EIA と RAST との成績比較であるが、ダニ抗原系については、前回の稲沢²⁾の報告でも有意の相関があり、こんにゃく喘息の舞粉抗原系でも比較的良い相関を認めている。

今回、われわれはスギ抗原系にも良い相関を認め得た。従ってこの polystyrene bead を用いる EIA が、感度、安定度、再現度においても信頼に足るし、安全性、経済性、簡便性においても利用しやすいことなどから、上記以外の抗原系の場合でも、RAST に代って十分使

用され得ることを確認した。

更に、polystyrene bead を用いた EIA によって抗原分析の解析も可能であると考えられる。そこで、図2のように花粉浸出物(粗抗原)と細胞質(swollen pollen)を出発物質として得た分画を阻止抗原として抗原競合阻止試験を行ってみたが、表5に示したように粗抗原を出発物質とする分画2、分画3、分画5に強い抗原活性が認められ、swollen pollen から得られた分画7には抗原活性がほとんど認められなかった。これらの結果は安枝⁴⁾の報告とほぼ同様であるが、分画7の蛋白含量が粗抗原に比べ少量であるためなのか、swollen pollen 自体に抗原性が低いためなのかを判断するには、今後の検討を待つ必要がある。

いずれにしても本法による結果が、ブリックテストの結果と定性的にはほぼ一致する上に、ブリックテストに比べ in vitro で行え、結果の判定がわかりやすいことなどから、この polystyrene bead を用いる EIA は、スギ花粉のみならず、他の種々の抗原分析に際し、解析の一手段として非常に有用であると考えられる。

まとめ

担体として polystyrene bead を、酵素系として β -D-ガラクトシダーゼを用いる EIA (酵素免疫測定法)にて、抗スギ花粉 IgE 抗体を検出し、その際の種々の条件について基礎的検討を行い、臨床への応用並びに抗原分析など研究手段への適用を試み、以下の結果を得た。

1) polystyrene bead にはスギ花粉抗原が良く結合する。この際の抗原量は、50 μ g protein/ml 以上が必要である。

2) bead を用いた EIA による特異的 IgE 抗体測定において同時再現性の存在が確認され、本法の精度は高いものと考えられた。

3) bead を用いる EIA と paper disc を用いる RAST との成績は良く相関した。

4) bead を用いる EIA は、抗原競合阻止試験を用いることにより、抗原分析の際の抗原活性の測定にも非常に有用である。

以上のことから、bead を用いる EIA は、アレルギー疾患において、臨床への応用として特異的 IgE 抗体の測定、基礎的研究として抗原分析の際の抗原活性の測定の面で、RAST と共に有用性の高い検査法であるこ

とが推察された。

本論文の要旨は、1983年10月、第33回日本アレルギー学会総会において発表した。

なお RAST の実験にご協力下さった前橋赤十字病院検査部早川清也氏他の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Hoffman, D.R.: Estimation of serum IgE by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Allergy Clin. Immunol.* 51, 303-307, 1973.
- 2) 稲沢正士, 中沢次夫, 佐藤久美子, 小林節雄: 担体として polystyrene ball を用いる enzyme immunoassay 法についての基礎的検討. アレルギーの臨床 4, 481-486, 1984.
- 3) Ceska, M., Eriksson, R. and Varga, M.: Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 49, 1-9, 1972.
- 4) 安枝 浩, 油井泰雄, 清水章治, 遠藤久子, 信太隆夫: スギ花粉アレルゲンの分析. アレルギー

- 22, 584-593, 1973.
- 5) 橋本正勝, 熊坂一成, 土屋達行, 河野均也, 土屋俊夫, 大岡久雄, 山口道也: enzyme-immunoassay 法によるアレルゲン特異的 IgE の測定. 医学のあゆみ 110, 693-695, 1972.
- 6) Eriksson, N.E. and Ahlstedt, S.: Diagnosis of reaginic allergy with house dust, animal dander and pollen allergens in adult patients. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 54, 88-95, 1977.
- 7) Sepulveda, R., Longbottom, J.L. and Pepys, J.: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgE antibodies to protein and polysaccharide antigens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. Allergy* 9, 359-371, 1979.
- 8) Weltman, J.K., Frackelton, A.R. Jr., Szaro, R.P. and Rotman, B.: A galactosidase immunosorbent test for human immunoglobulin E. *J. Allergy Clin. Immunol.* 58, 426-431, 1976.
- 9) 佐藤久美子, Thomas, V., 鈴木 守: フィラリア症の免疫学的診断法の研究—皮内反応抗原 FST3 を用いた IgE 酵素抗体法の開発. 群大医短紀要 2, 117-125, 1981.
- 10) 星 恵子: 酵素免疫測定法による総 IgE および特異的 IgE 抗体の測定. アレルギー 30, 1052-1059, 1981.

ENZYME IMMUNOASSAY USING POLYSTYRENE BEADS IN THE DIAGNOSIS OF JAPANESE CEDAR POLLINOSIS

Shigeru Matsui, Tsugio Nakazawa, Masahito Inazawa,

Yoshio Umegae and Setsuo Kobayashi

First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Gunma University

Naohisa Kochibe

Department of Biology, Faculty of Education, Gunma University

Kumiko Sato

College of Medical Care and Technology, Gunma University

We have developed an enzyme immunoassay (EIA) using polystyrene beads as an antigen carrier and β -D-galactosidase as the enzyme marker for measuring specific IgE antibodies semiquantitatively in Japanese cedar pollinosis.

- 1) Polystyrene beads can be well coated with the allergen extract from Japanese cedar pollen. 50 or more μ g protein/ml of allergen is needed for the coating.
- 2) Reproducibility of this method was accepted because there was little difference in the results from each bead.
- 3) Specific IgE antibody levels measured by this method correlated well with those by RAST using paper discs.
- 4) Inhibition tests using antigen coated beads and absorbed sera with various kinds of antigens showed that this method is also useful in the detection of activities of fractionated antigens.

These results suggest that EIA using polystyrene beads is of value, in place of RAST, in isolation studies of allergen as well as in the diagnosis of Japanese cedar pollinosis.