

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標準化への応用

国立相模原病院臨床研究部

安枝 浩 秋山一男 前田裕二 早川哲夫
金子富志人 長谷川真紀 信太隆夫

in vitro におけるアレルゲンエキスの標準化を実用化することを目的として, **enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)** によるスギ花粉, ヒョウヒダニの **major allergen**, *Cry j I*, および *Der I (Der p I/Der f I)*, *Der II (Der p II/Der f II)* の簡便な定量法を開発した. 抗血清の **IgG** 分画を吸着させたマイクロプレートのウェルに, アレルゲンエキス, ビオチン化した **IgG** 分画, 市販のストレプトアビジン-酵素結合物を順次反応させた後, 固相に結合した酵素活性を比色法で検出した. 本法は高い検出感度 ($\sim 0.2 \text{ ng/ml}$) と満足すべき再現性 ($\text{CV}\% = 1.9 \sim 13.8\%$) を有しており, 本法での測定値は従来の **radioimmunoassay** での測定値と良好な相関関係 ($r = 0.967 \sim 0.990$) を示した. 更に, 本法で測定した3種類のロットのスギ花粉, 室内塵エキス中の **major allergen** の濃度は, 皮内テストの閾値から求めた各エキスの相対的な力価とよく一致した. 以上の結果から, この **ELISA** によるアレルゲン定量法はアレルゲンエキスの標準化に有用であると考えられた.

Key words: ELISA — quantitation of major allergen — standardization of allergen extracts

緒言

アレルゲンエキ스는アトピー性疾患における皮膚テストや各種の誘発テストによる診断, ならびに特異的減感作療法による治療の両方に欠くことのできないものである. しかしながら, アレルゲンエキ스는原材料中の種々雑多な成分を含む粗抽出液にすぎず, しかも活性成分(アレルゲン)は多くの場合不安定な蛋白質であるということから, その製品の質や安定性はさまざまな条件によって大きく影響を受けるという問題点を有している. このために, アレルゲンエキスの標準化を行う必要性は古くから指摘されているが^{1)~3)}, 我が国ではいまだに実用化されていないのが現状である. アレルゲンエキスの標準化を実用に供するために

は, エキスの力価を信頼性が高くしかも簡便に評価できる方法を確立する必要がある.

アレルゲンエキスの力価を評価する方法には, 患者の皮膚を利用する方法以外に, **radioallergosorbent test (RAST) inhibition** 法^{4)~7)}, ヒスタミン遊離試験^{7)~9)}, マウスの **IgE** 抗体を用いる **passive cutaneous anaphylaxis** 反応の抑制法¹⁰⁾ などがあるが, エキス中の **major allergen** を免疫化学的に定量する方法も信頼性の高い方法である^{8)11)~14)}. 我々はすでに, スギ花粉とヒョウヒダニの **major allergen** については **radioimmunoassay (RIA)** による高感度定量法を確立しているが¹⁵⁾¹⁶⁾, この免疫化学的定量法を用いてアレルゲンエキスの標準化を行おうとする場合, 実用性, 簡便性という面から考えれば **RIA** よりも **enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)** のほうが望ましい.

本稿では, **ELISA** によるスギ花粉とヒョウヒダニの **major allergen** の定量法, ならびにこの **ELISA** で測定したエキス中のアレルゲン濃度と皮膚テストから求めたエキスの力価との関係について検討を行った.

Received: April 16, 1991

Accepted: June 17, 1991

Abbreviations: **BSA** bovine serum albumin; **Df** *Dermatophagoides farinae*; **Dp** *Dermatophagoides pteronyssinus*; **ELISA** enzyme-linked immunosorbent assay; **PBS** phosphate buffered saline; **RAST** radioallergosorbent test; **RIA** radioimmunoassay

材料と方法

1. 精製アレルゲン¹⁷⁾

スギ花粉の *Cry j* I (SBP), コナヒョウヒダニ, *Dermatophagoides farinae* (Df) の *Der f* I (DF1), *Der f* II (DF2), およびヤケヒョウヒダニ, *D. pteronyssinus* (Dp) の *Der p* I (DP1), *Der p* II (DP2) は以前に報告した方法により得た¹⁸⁾⁻²⁰⁾.

2. ウサギ抗血清とその IgG 分画

各アレルゲンに対する特異抗血清は既報にしたがって作製した¹⁸⁾⁻²⁰⁾. 抗血清の一部から硫酸塩析と Sephadex G-150 によるクロマトグラフィで IgG 分画を得た. 更に, 抗 *Der f* I, 抗 *Der p* I IgG の一部は, *Der p* I-Sepharose, *Der f* I-Sepharose を用いて, 互いの交差反応性がなくなるまで十分に吸収した¹⁶⁾.

3. IgG のビオチン標識²¹⁾

抗血清の IgG 分画 (1mg in 0.1M NaHCO₃, 1ml) に, dimethylformamide に溶解した 1mg/ml の N-hydroxysuccinimidobiotin (Sigma) の溶液, 100 μ l を加え, 室温で静置した. 4 時間後, 反応混合物を borate buffered saline, pH 8.0 で平衡化した Sephadex G-50 のカラム (10ml) に添加し, void volume に溶出するビオチン化 IgG を得た.

4. ELISA の一般的手法

ELISA 用 96 穴ポリスチレンマイクロプレート (Maxisorp, Nunc) の各ウェルに, 0.1M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 で 10 μ g/ml の濃度に希釈した抗血清の IgG 分画 100 μ l (1 μ g/well) を加え, 1 晩静置して IgG をウェルに吸着させた. 0.2% の Tween 20 を含む phosphate buffered saline (PBS-T) で 3 回洗浄後, 1% bovine serum albumin (BSA) を含む PBS 100 μ l を加え, 37 $^{\circ}$ C, 30 分間インキュベートし, 再度 PBS-T で 3 回洗浄した. 次に, 0.2% BSA を含む PBS-T (PBS-T-BSA) で希釈した精製アレルゲンの標準溶液 (10~0.1ng/ml), あるいはアレルゲンエキスを 100 μ l を加え, 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした. 2 時間後, ウェルを PBS-T で 5 回洗浄, 次いでビオチン化した抗血清の IgG 分画 (1 μ g/ml in PBS-T-BSA), 100 μ l (100ng/well) を加え, 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし, 再び 5 回洗浄した. その後, ウェルに PBS-T-BSA で 1:4000 に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ結合物 (BRL), 100 μ l を加え, 37 $^{\circ}$ C で 1.5 時間インキュベート, 次いで 5 回洗浄後, 基質 (5mM o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, 東京化成) 溶

液, 100 μ l を加えて 37 $^{\circ}$ C, 60 分間酵素反応を行った. 最後に, 1M Na₂CO₃, 100 μ l を加えて反応を停止後, 分光光度計 (ETY-96, 東洋測器) にて 415nm の吸光度を測定した. なお, 基質は 0.1M NaCl, 1mM MgCl, 0.2% BSA, 0.05% NaN₃ を含む 20mM phosphate buffer, pH 7.2 に溶解した. 標準溶液による吸光度から標準曲線を描き, その標準曲線から各エキス中のアレルゲン濃度を求めた.

5. アレルゲンエキス

鳥居薬品製の診断用スギ花粉エキス, 室内塵エキスのそれぞれ 3 種類のロットのエキスをを使用した. 皮内テストの閾値の測定には, 1:1000 (W/V) からスギ花粉エキスは 4 倍希釈系列, 室内塵エキスは 2 倍希釈系列のエキスを作製して使用したが, 3 種類のロット間の力価にある程度の差をつけるために, あらかじめ一部のロットは 1:1000 よりも更に 2 倍, あるいは 4 倍希釈したものを 1:1000 とみなしてテストに用いた. 希釈液にはエキスの力価の低下が少ない 0.03% human serum albumin と 0.5% phenol を含む saline を使用した²²⁾⁻²⁵⁾.

6. 皮内テストによるエキスの力価測定

皮内テストは, 国立相模原病院アレルギー外来を受診した気管支喘息, あるいはアレルギー性鼻炎の患者を対象として, 石崎の方法²⁶⁾で行い, 1+以上の反応を示した最大希釈度をそのエキスによる閾値とみなし, 全対象の閾値の幾何平均値をそのエキスの力価とした.

結 果

1. ELISA によるヒョウヒダニ, スギ花粉 major allergen の測定

ヒョウヒダニには Dp, Df それぞれに 2 つのグループの major allergen, *Der* I (*Der p* I/*Der f* I) と *Der* II (*Der p* II/*Der f* II) があるが, すでに報告した RIA の場合と同様に, *Der* I は互いに十分に吸収した抗血清を用いて *Der p* I と *Der f* I を別々に測定して, その合計量を室内塵エキス中の *Der* I 量とみなし, 一方, *Der* II は *Der p* II, *Der f* II の両方に等しく反応する抗血清を用いて両者を *Der* II としてまとめて測定した¹⁶⁾. Fig. 1-A, B, C に各精製アレルゲンによる標準曲線を示した. 図には示していないが, 種々のダニ, および室内塵のエキスの希釈曲線はすでに報告

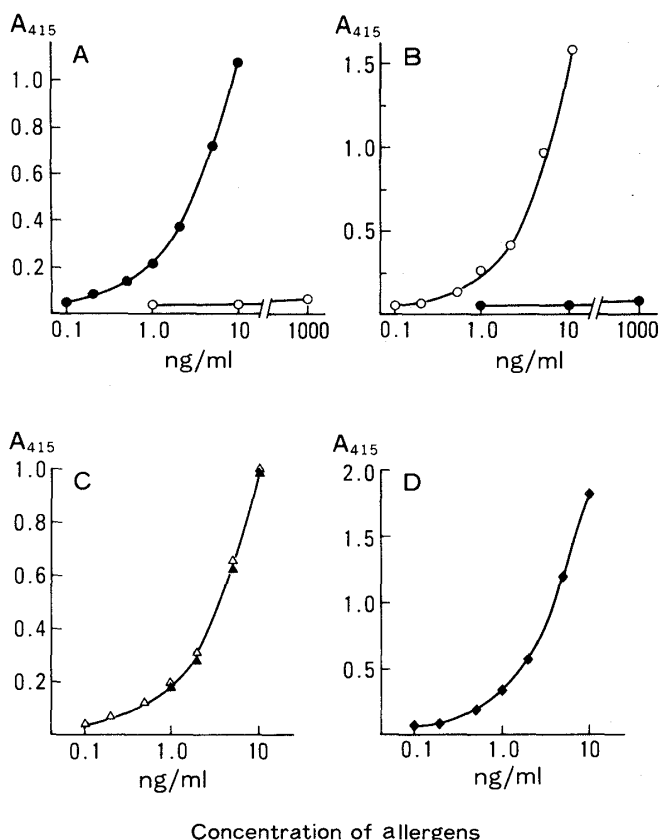


Fig. 1. Typical standard curves for *Der p I* (●—●), *Der f I* (○—○), *Der p II* (▲—▲), *Der f II* (△—△), and *Cry j I* (◆—◆) in the *Der p I*-ELISA (A), *Der f I*-ELISA (B), *Der II*-ELISA (C) and *Cry j I*-ELISA (D).

した RIA の場合と同様に、いずれも標準曲線と良好な平行性を示した¹⁶⁾。

Fig. 1-D にスギ花粉の *Cry j I* による標準曲線を示した。*Cry j I* はヒノキをはじめとするヒノキ科の花粉中の対応する成分と交差反応性があるため¹⁸⁾²⁷⁾²⁸⁾、この測定系にはヒノキ科花粉抗原も反応するが、スギ花粉エキスの標準化という目的にはなんら問題にならないので、あえて抗血清の吸収は行わなかった。

測定感度は RIA の場合と同様に、測定条件により変動したが、今回の条件ではいずれのアレルゲンも 0.2 ng/ml 程度までは検出可能であり、アレルゲンエキスの力価測定という目的には十分であると考えられた。

2. RIA での測定値との相関

相模原周辺の住居から集めた室内塵47検体中のヒョウヒダニアレルゲン量について、従来の RIA での測定値¹⁶⁾と今回の ELISA での測定値の比較を行った。両方法での測定値の対数変換後の相関係数は *Der p I* が $r=0.990$ 、*Der f I* が $r=0.967$ 、*Der II* が $r=0.974$ と、

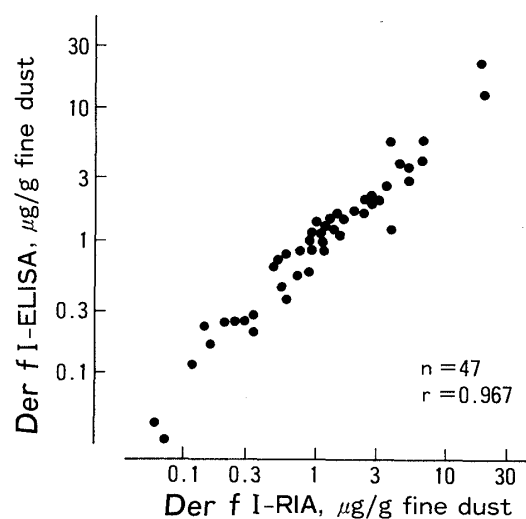


Fig. 2. Correlation between the *Der f I*-ELISA and *Der f I*-RIA. The *Der f I* levels in 47 dust samples were compared.

いずれも良好であった。一例として Fig. 2 に *Der f I* の相関図を示した。

3. 測定値の再現性

3種類のヒョウヒダニアレルゲンの ELISA において、実測値が 0.2, 0.5, 1.5, 5.0 ng/ml 付近の値を示すようにそれぞれ4種類の希釈度の室内塵エキスを調製し、そのエキスをを用いて測定内における再現性、および測定間における再現性を調べた。6重測定を行ったときの測定内における再現性の変動係数 (intra-assay coefficient of variation) は、*Der p I*、*Der f I*、*Der II* がそれぞれ 3.5~10.8%, 5.9~9.3%, 1.7~8.7% であり、一方、2重測定で日を変えて3回測定したときの測定間における再現性の変動係数 (interassay coefficient of variation) は、同じく 1.9~10.0%, 3.0~7.7%, 4.5~13.8% であった。すなわち、3種類の ELISA はいずれも測定領域の全域にわたって良好な再現性を示した。

4. 皮膚テストで求めた力価との比較

室内塵エキス、スギ花粉エキスそれぞれ3種類のロットについて、一方でそれぞれ10例の患者に行った皮内テストの閾値から力価を求め (Table 1, 2), 他方で ELISA により各アレルゲンの濃度を測定した (Table 3). Table 4 に示したように、3種類のロットの室内塵エキス中の *Der I*、*Der II*、およびスギ花粉エキス中の *Cry j I* の相対的な濃度の割合は、皮内テストの閾値から求めた各エキスの相対的な力価とよく一致した。

Table 1 Determination of the potency of three house dust extracts by intradermal skin test

Patient	End point dilution $\times 10^{-3}$		
	Lot A*	Lot B*	Lot C*
T. S.	2 ³	2 ⁴	2 ⁵
Y. Y.	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁵
K. M.	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶
S. S.	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷
T. A.	2 ⁶	2 ⁸	2 ⁹
T. N.	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁸
Y. Ik.	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁹
Y. It.	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹
T. I.	2 ¹⁰	2 ¹⁰	2 ¹²
K. O.	2 ¹⁰	2 ¹²	2 ¹³
Geometric Mean	2 ^{6.7}	2 ^{7.5}	2 ^{8.5}

*Three house dust extracts, lots A, B and C were intradermal skin test solutions obtained from Torii & Co., Ltd., Tokyo.

Table 2 Determination of the potency of three sugi pollen extracts by intradermal skin test

Patient	End point dilution $\times 10^{-3}$		
	Lot A*	Lot B*	Lot C*
Y. H.	4 ²	4 ¹	4 ⁰
M. T.	4 ³	4 ²	4 ²
S. M.	4 ³	4 ²	4 ²
A. K.	4 ³	4 ²	4 ²
I. T.	4 ⁴	4 ³	4 ²
E. K.	4 ⁴	4 ³	4 ³
H. Y.	4 ⁴	4 ³	4 ³
C. H.	4 ⁵	4 ⁴	4 ³
T. K.	4 ⁵	4 ⁴	4 ³
Y. S.	4 ⁵	4 ⁴	4 ⁴
Geometric Mean	4 ^{3.8}	4 ^{2.8}	4 ^{2.4}

*Three sugi pollen extracts, lots A, B and C were intradermal skin test solutions obtained from Torii & Co., Ltd., Tokyo.

考 察

アレルギーエキスの major allergen を免疫化学的に定量する方法がアレルギーエキスの標準化のための力価測定法として有用であることは多くの種類のエキスを確かめられている²⁾⁴⁾⁸⁾¹²⁾¹⁴⁾²⁹⁾。今回の検討においても、スギ花粉エキス、室内塵エキスの皮膚テスト

Table 3 Concentration of major allergens in house dust and sugi pollen extracts measured by ELISA

Extract*	Concentration in 1 : 1000 extract, ng/ml				
	Der p I	Der f I	Der I**	Der II	Cry j I
House dust					
Lot A	0.19	1.04	1.23	0.38	—
B	0.63	3.03	3.66	1.15	—
C	2.22	5.38	7.60	2.16	—
Sugi pollen					
Lot A	—	—	—	—	186
B	—	—	—	—	44.0
C	—	—	—	—	18.5

*See footnotes to Tables 1 and 2.

**Summed values for Der p I and Der f I was considered as the total Der I levels.

Table 4 Comparison of the relative potency determined by intradermal skin test and by ELISA

Extract*	Potency relative to Lot B (%)			
	Skin test	ELISA		
		Der I**	Der II	Cry j I
House dust				
Lot A	57	34	33	—
B	100	100	100	—
C	200	208	188	—
Sugi pollen				
Lot A	400	—	—	423
B	100	—	—	100
C	58	—	—	42

*See footnotes to Tables 1 and 2.

**See footnote to Table 3.

の閾値から求めた力価と major allergen の濃度との間には良い一致がみられた (Table 4)。この方法の利点の第1は、in vitro のテストであり、しかも RAST inhibition 法やヒスタミン遊離試験のように患者の血清や白血球も必要としないので、患者に対して全く負担をかけないという点にある。第2は、アレルギーエキスの力価を major allergen の重量濃度という絶対量で表すことができるという点にある。RAST inhibition 法や皮膚テストなどではエキスの力価はあくまでも相対的な値でしか表せないのが、異なった施設間でのデータを直接比較することは困難であるが、ng/ml,あるいは $\mu\text{g}/\text{vial}$ というような形であれば、全世界的に同じ単位で力価を表すことができ、例えば、皮

膚テストにおける患者の感受性や、減感作療法におけるアレルゲンの投与量といったものを施設間で直接比較することができる。

一方、この major allergen 定量法の問題点は、数限りなくあるアレルゲンの中で major allergen が精製されているものは限られており、すべてのアレルゲンに応用できるわけではないという点にある。しかし、臨床的に重要な吸入性のアレルゲンに関しては、真菌類を除いて大部分のものはその major allergen の同定がなされ、精製方法が確立されている¹⁷⁾。したがって将来は、スギ花粉、室内塵中のダニだけではなく、ブタクサやイネ科花粉、ネコ表皮などのエキスについてもこの標準化の方法を適用することが可能であると考えられる。

major allergen の免疫化学的定量法によるアレルゲンエキスの標準化を実際に実用に供するためには、測定操作をできるだけ簡便化する必要がある。このためにはまず、放射性同位元素を使うことのない ELISA のほうが RIA よりも明らかに有利である。更に、同じ ELISA であっても測定原理、固相、使用する試薬などの選択も重要である。ここではできるだけ簡便化をはかるという目的で、マイクロプレートを用いる sandwich ELISA で、固相化抗体には抗血清の IgG 分画を、第2抗体にはビオチン化 IgG 分画を使用し、市販のストレプトアビジン-酵素結合物による比色法で検出するという方法を用いた。この方法では、室内塵エキス中のヒョウヒダニアレルゲンのようにアレルゲン間での交差反応性が問題となる場合を除いて、アレルゲンに対する monospecific な抗血清さえ得られれば、あとは IgG 分画の調製とその一部をビオチン化するという操作だけで簡単に測定系を組み立てることができる。今回は酵素に β -ガラクトシダーゼを用いたが、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどを用いても同様に測定することは可能である。

しかし、室内塵中のヒョウヒダニアレルゲンの場合は少し複雑である。我が国には2種類のヒョウヒダニ、Dp と Df が生息し、両者の分布の割合には住居ごとに著しいバラツキがみられる¹⁶⁾³⁰⁾。しかも、それぞれに2つのグループの major allergen が存在し、Dp と Df の対応するアレルゲン間には強い交差反応性がある²⁰⁾。Dp と Df には臨床的重要性に差があるわけではなく、また *Der I* と *Der II* もアレルゲンとしてはほぼ同程度に重要であると考えられている²⁰⁾³¹⁾。したがって、これらのアレルゲンの複雑な混合物である室内塵エキス

の標準化を行うためには、Dp と Df 由来のアレルゲンの一方だけを過大評価することなく両者を同等に評価でき、なおかつ *Der I* と *Der II* の両方の測定ができる、という条件を満たす必要がある。Dp と Df のアレルゲンを同等に評価するためには、種特異的な決定基を認識する抗体を用いて、両者を完全に別のものとして測定した後に合計するか、あるいは逆に、両方に同等に反応する抗体を用いて、全く同じものとしてまとめて測定するかのどちらかで、中途半端に交差反応する抗体を用いて測定すれば、一方だけを過大評価することになり望ましいとは言えない。今回は従来の RIA¹⁶⁾と同様に、ウサギの抗血清が認識する決定基の交差反応性の程度の違いを考慮に入れて、*Der I* は *Der p I* と *Der f I* を別々に、*Der II* は *Der p II* と *Der f II* をまとめて測定した。

Der I と *Der II* は、*Der I* が主に排泄物由来、*Der II* が主に虫体由来ということから、ダニのエキスの場合には原材料の種類によって両者の割合が大きく異なることが知られている¹⁶⁾³²⁾。室内塵中の両者の割合は、各住居から集めた試料では、ほぼ 1 : 2 から 2 : 1 の間に分布していたが¹⁶⁾、今回のエキスの場合にはいずれのロットも I : II は約 3 : 1 であった。この違いを生じた理由は不明であるが、このように、単にエキス全体の見かけ上の活性だけでなくエキス中の *Der I* と *Der II* の割合、あるいは *Der p I* と *Der f I*、すなわち Dp と Df の割合というように、活性を担っている個々の成分の組成まで知ることができるということは、室内塵エキスの標準化という目的にとって非常に有用であると考えられる。

今回の ELISA による各アレルゲンの検出感度は 0.1 から 0.2 ng/ml であり、通常の 1 : 1000 のエキス中のアレルゲンを検出する目的には十分な感度であるが、以前に報告した RIA における感度¹⁶⁾に比べて10倍程度悪かった。この理由は、RIA と ELISA の違いによるものではなく、測定の簡便化をはかるために第2抗体にアフィニティー精製抗体ではなく抗血清の IgG 分画を用いたことによる。精製抗体を用いれば、ELISA によっても RIA と同程度の感度を達成することは可能であった。また、同じ測定条件であれば、感度は用いる抗血清の質に大きく影響を受け、同じ方法で免疫して作製した抗血清であっても抗体価の低い抗血清を用いれば、0.2 ng/ml という検出感度を達成することは困難であった。

ELISA に使用する抗体は、その均質性、特異性とい

う面からは現在用いているウサギのポリクローナル抗体よりもマウスのモノクローナル抗体のほうがはるかに優れている。モノクローナル抗体であれば、特異性、親和性の高いクローンがひとたび樹立されると、長期間にわたって均一な抗体をELISAに供給することが可能になり、交差反応性に考慮を払う必要もなくなる。すでに、ダニの *Der p I*/*Der f I*、ネコ表皮の *Fel d I* についてはモノクローナル抗体を用いたELISAによる定量法¹³⁾³³⁾が報告されているが、我々も *Der f I* に対する何種類かのモノクローナル抗体を作製し、その中の種特異的なエピトープを認識する2種類の抗体を用いて、*Der f I* を *Der p I* と全く交差反応することなしに測定できることを確認している（未発表データ）。今後、ELISAによるアレルゲンの定量法を普遍化、一般化するという事を考えれば、ポリクローナル抗体からモノクローナル抗体へのきりかえということも考慮する必要があると思われる。

現在、我が国で市販されているアレルゲンエキスの中でも、室内塵とスギ花粉のエキ스는、対象となる患者の数が非常に多く、その重要性、使用頻度は他のエキスに比べるとはるかに高い。少なくともこの2品目に関しては一刻も早い標準化の実施が望まれる。

文 献

- 1) Aas, K.: Standardization and regulatory control of allergen extracts. A call for immediate action. In "Advances in Allergology and Applied Immunology" (Ed. by A. Oehelg, E. Mathov, I. Glazer and C. Arbesman), Pergamon Press, Oxford, pp.521-526, 1980.
- 2) Platts-Mills, T.A.E., Rawle, F. and Chapman, M.D.: Problems in allergen standardization. *Clin. Rev. Allergy* 3, 271-290, 1985.
- 3) Reed, C.E., Yunginger, J.W. and Evans, R.: Quality assurance and standardization of allergy extracts in allergy practice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 4-8, 1989.
- 4) 安枝 浩, 油井泰雄, 清水章治, 相馬幸子, 信太隆夫, 他: 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.
- 5) Yman, L., Ponterius, G. and Brandt, R.: RAST-based allergen assay methods. *Dev. Biol. Stand.* 29, 151-165, 1975.
- 6) Seagroatt, V. and Ford, A.: A collaborative study on RAST inhibition using a common method. *Clin. Allergy* 14, 1-9, 1984.
- 7) Maasch, H.J., Fischer, B., Wahl, R. and Wahn, U.: Comparison of histamine release assay and RAST inhibition as tools for allergen extract standardization. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 73, 314-320, 1984.
- 8) Baer, H., Godfrey, H., Maloney, C.J., Norman, P.S. and Lichtenstein, L.M.: The potency and antigen E content of commercially prepared ragweed pollen antigens. *J. Allergy* 45, 347-354, 1970.
- 9) Siraganian, R.R., Baer, H., Hochstein, H.D. and May, J.C.: Allergenic and biologic activity of commercial preparations of house dust extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 64, 526-533, 1979.
- 10) Akiyama, K., Miyamoto, T. and Horiuchi, Y.: A new method of allergen standardization. Passive cutaneous anaphylaxis inhibition in a mouse-to-rat system in comparison with other methods. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 354-360, 1979.
- 11) Lind, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of major excrement allergens of house dust mite species *D. pteronyssinus*, *D. farinae* and *D. microceras*. *Allergy* 41, 442-451, 1986.
- 12) Chapman, M.D., Heymann, P.W., Wilkins, S.R., Brown, M.J. and Platts-Mills, T.A.E.: Monoclonal immunoassays for major dust mite (*Dermatophagoides*) allergens, *Der p I* and *Der f I*, and quantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 184-194, 1987.
- 13) Luczynska, C.M., Arruda, L.K., Platts-Mills, T.A.E., Miller, J.D., Lopets, M. and Chapman, M.D.: A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, *Der p I* and *Der f I*. *J. Immunol. Methods* 118, 227-235, 1989.
- 14) Lombardero, M., Carreira, J. and Duffort, O.: Monoclonal antibody based radioimmunoassay for the quantitation of the main cat allergen (*Fel d I* or Cat-1). *J. Immunol. Methods* 108, 71-76, 1988.
- 15) 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定量法について. *アレルギー* 32, 706(抄録), 1983.
- 16) Yasueda, H., Mita, M., Yui, Y. and Shida, T.: Measurement of allergens associated with dust mite allergy I. Development of sensitive radioimmunoassays for two groups of *Dermato-*

- phagoides* mite allergens, *Der I* and *Der II*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90, 182-189, 1989.
- 17) Marsh, D.G., Goodfriend, L., King, T.P., Lowenstein, H. and Platts-Mills, T.A.E.: Allergen nomenclature. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 639-645, 1987.
 - 18) 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.
 - 19) Yasueda, H., Mita, M., Yui, Y. and Shida, T.: Isolation and characterization of two allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 81, 214-223, 1986.
 - 20) Yasueda, H., Mita, M., Yui, Y. and Shida, T.: Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and the corresponding allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88, 402-407, 1989.
 - 21) Miyazawa, H., Inouye, S., Sakaguchi, M. and Koizumi, K.: A reverse-sandwich ELISA for IgG antibody to a pollen allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 407-413, 1988.
 - 22) Norman, P.S. and Marsh, D.G.: Human serum albumin and Tween 80 as stabilizers of allergen solutions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62, 314-419, 1978.
 - 23) Naerdal, A. and Vilsvik, J.S.: Stabilization of a diluted aqueous mite allergen preparation by addition of human serum albumin. *Clin. Allergy* 13, 149-153, 1983.
 - 24) 安枝 浩, 信太隆夫: 臨床アレルギーの入門講座 35. 抗原分析 2. 花粉. アレルギーの臨床 4, 642-646, 1984.
 - 25) Brown, J.S., Ledoux, R. and Nelson, H.S.: An investigation of possible immunologic reactions to human serum albumin used as a stabilizer in allergy extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76, 808-812, 1985.
 - 26) 石崎 達: 即時皮膚反応—陽性判定基準を中心として, アレルギー 17, 85-90, 1968.
 - 27) 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.
 - 28) 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.
 - 29) Einarson, R. and Dreborg, S.: 1ng major allergen=1 BU in extracts from different source materials. *Clin. Exp. Allergy* 20(Suppl 1), 66-66(Abstract), 1990.
 - 30) Ishii, A., Takaoka, M., Ichinoe, M., Kabasawa, Y. and Ouchi, T.: Mite fauna and fungal flora in house dust from homes of asthmatic children. *Allergy* 34, 379-387, 1979.
 - 31) Platts-Mills, T.A.E. and Chapman, M.D.: Dust mites: Immunology, allergic disease, and environmental control. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 755-775, 1987.
 - 32) Heymann, P.W., Chapman, M.D., Aalberse, R. C., Fox, J.W. and Platts-Mills, T.A.E.: Antigenic and structural analysis of group II allergens (*Der f* II and *Der p* II) from house dust mites (*Dermatophagoidea* spp). *J. Allergy Clin. Immunol.* 83, 1055-1067, 1989.
 - 33) Dabrowski, A.J., Van Der Brempt, X., Soler, M., Seguret, N., Lucciani, P., et al.: Cat skin as an important source of *Fel d* I allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86, 462-465, 1990.

AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR THE QUANTITATION OF
SUGI POLLEN AND *DERMATOPHAGOIDES* MITE ALLERGENS AND ITS
APPLICATION FOR STANDARDIZATION OF ALLERGEN EXTRACTS

Hiroshi Yasueda, Kazuo Akiyama, Yuji Maeda, Tetsuo Hayakawa, Fujito Kaneko,
Maki Hasegawa and Takao Shida

Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Sagamihara Hospital

A simple enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed for the quantitation of the major allergens of sugi pollen, *Cry j* I and of *Dermatophagoides* mites, *Der* I (*Der p* I/*Der f* I) and *Der* II (*Der p* II/*Der f* II) for use in the in vitro standardization of allergen extracts. Polystyrene microplates coated with a IgG fraction of rabbit antiserum were incubated first with allergen extracts and then with biotinylated antiserum IgG. The bound allergen-biotinylated antibody complex was detected with commercially available streptavidin-enzyme conjugate followed by the addition of colorimetric substrate. The assay was very sensitive (~ 0.2 ng/ml) and reproducible (CV%=1.9~13.8%). The ELISA was compared with the radioimmunoassay previously described, and the results showed a very good correlation between the assays ($r=0.967\sim 0.990$). The allergen content in three sugi pollen and three house dust extracts measured by the ELISA also demonstrated a good agreement with the relative potency of these extracts as determined by the intradermal skin test. These results indicate that the ELISA could be useful in the standardization of allergen extracts.
