

〔速報〕

ESR 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

¹⁾生物ラジカル研究所, ²⁾山形県衛生研究所

青山正明¹⁾ 高橋裕一²⁾

p-アセタミドフェノールとヒドロキシルアミン体を併用したスギ花粉抗原 Cry j 1 の測定系を開発した。本測定系による最低検出感度は 3.5 pg/ml であり一個以下の花粉数でも Cry j 1 の検出が可能であった。測定系の高感度化により患者の発症前に飛散している微量の Cry j 1 の検出ならびに情報発信が可能となった。

Key words : Cry j 1 — ESR — radical immunoassay

目 的

サンドイッチ ELISA 法による空中 Cry j 1 測定ではスギ花粉飛散開始日前の超微量濃度の Cry j 1 を捉えることができなかった。榎本らが開発した高感度 Cry j 1 測定法¹⁾においても大気中の Cry j 1 はスギ花粉数にして 13 個以上ないと測定できなかった。馬場はスギ花粉症の発症や症状の経過と花粉飛散との関係を検討し、スギ花粉の初観測日からの累積花粉数の平方根と累積発症率がよく相関することを見出しており、ごく微量の花粉抗原により感受性が亢進するとしている²⁾。このことからスギ花粉飛散開始日前の大気中に存在するごく微量の Cry j 1 が重要で、その微量の Cry j 1 を測定する価値があると考えられる。最近、著者の一人、青山らにより開発された酵素基質 (p-AP) とヒドロキシルアミン体 (HTIO) を併用した高感度 HRP 検出系³⁾ (ラジカルイムノアッセイ法) で HBs 抗原等を超高感度に検出できるとの報告がなされている⁴⁾⁵⁾。我々は大気中のスギ花粉アレルギー (Cry j 1) にこの方法を応用できないかを検討した。

方 法

1. 測定方法

Nunc 社の 8 穴マイクロプレートに抗 Cry j 1 MAb (林原, 013) を定法により固定し (1μg/well), Stabil-Guard 300μl を加え 4°C にて一晚ブロッキングを行った。測定時に必要枚数のプレートを取り出し、超純水で洗浄後に使用した。MOPS 緩衝液 (0.1M, pH7.0, 10% のウシ胎児血清を含む) で希釈された試料抽出液 100μl に同緩衝液で 1000 倍に希釈した HRP 標識 Cry j 1 MAb (林原, 053) 50μl を加え室温下で 40 分間反応させた。エルジア・F 用洗浄液にて洗浄後, p-AP (4mM), HTIO (0.34mM) と過酸化水素 (0.01%) を含む基質緩衝液 150μl を加え 37°C で 30 分間反応させた。酵素反応の結果生成した安定ニトロキシドラジカルの量は ESR (FR30, JEOL) で測定した。ESR の測定は, Center Field : 336.100±5mT, Power : 4 mW, Modulation Width : 0.1mT, Time Constant : 0.3sec, Sweep Time : 4 min, Amplitude : ×400~×10 にて行った。測定の一例を Fig. 1 に示す。安定ニトロキシドラジカルは等価な 3 本線より構成されるため最も低磁場側のシグナルの高さを測定し、比較した。

2. 大気試料からの Cry j 1 抽出法

大気中の Cry j 1 は Cyclone sampler (Burkard C 90M) を用いて採集した。試料は 24 時間間隔で採集した。試料の交換は午前 6 時に行った。試料の吸引容量は 16.6 l/min なので、1 時間で約 1m³ サンプリングされることになる。したがって、24 時間では 24m³ 採集さ

Received : July 8, 2004

Accepted : September 7, 2004

Abbreviations : HTIO 1-hydroxy-2, 2, 5, 5-tetramethyl-3-imidazoline 3-oxide ; p-AP p-acetamidophenol

青山正明 : 生物ラジカル研究所ラジカル応用分析研究室 [山形県山形市松栄二丁目 2 番 1 号]

E-mail : aoyama@yat.ymgmt-techno.or.jp

れる。サンプリング後の試料は 0.125M の NH_4HCO_3 (0.1%BSA 含む) 溶液 100 μl で 2 時間攪拌しながら室温で抽出した。2 時間抽出した後に 3000rpm で 10 分間遠心し上清を分取し測定に用いた。ダーラム捕集器は同一地点に設置し、Cyclone sampler の試料と同様午前 6 時にスライドガラスを交換し、18 $\times$ 18 cm^2 のカ

バークラスの全面を計数し 1 cm^2 当たりの数に換算した。

結果及び考察

同一条件で行ったサンドイッチ ELISA 法では 400 pg/ml が Cry j 1 の測定限界であったが、ラジカルイムノアッセイ法では 3.5pg/ml まで検出でき、患者が発症する前から情報を提供することができた。Fig. 2 は 2004 年のスギ花粉シーズンのごく初期の時期(スギ花粉の初観測日(2 月 29 日)前から飛散開始日(3 月 11 日)の後に、山形市にてダーラム捕集器で日ごとに測定したスギ花粉数とラジカルイムノアッセイ法で測定した Cry j 1 の値を示したものである。図のようにラジカルイムノアッセイ法ではダーラム捕集器で花粉が検出される 5 日前からの Cry j 1 測定が可能であった。

榎本ら¹⁾は固相化抗体にモノクローナル抗体を用い、第二標識抗体にポリクローナル抗体を用いた ELISA 法で、空中の Cry j 1 を高感度に測定できる方法を開発した。彼らの方法ではスギ花粉 13 個に相当する花粉濃度まで測定することが可能であった。しかし、スギ花粉飛散開始日前の微量の Cry j 1 は測定できなかった。今回我々が開発した方法では Cry j 1 の検出感度は 3.5pg/ml であった。スギ花粉 1 個の Cry j 1 量は約 6pg と見積もられている¹⁾。したがって、ラジカルイムノアッセイ法ではスギ花粉が 1 個以下でも充分に

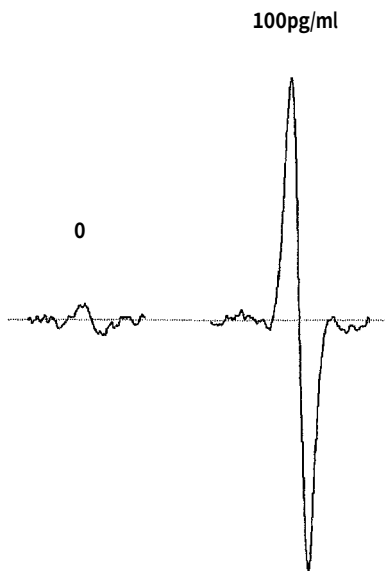


Fig. 1. Cry j 1 detection limit (3.5pg/ml) was estimated to a signal equal to the 1.5-fold of blank signal.

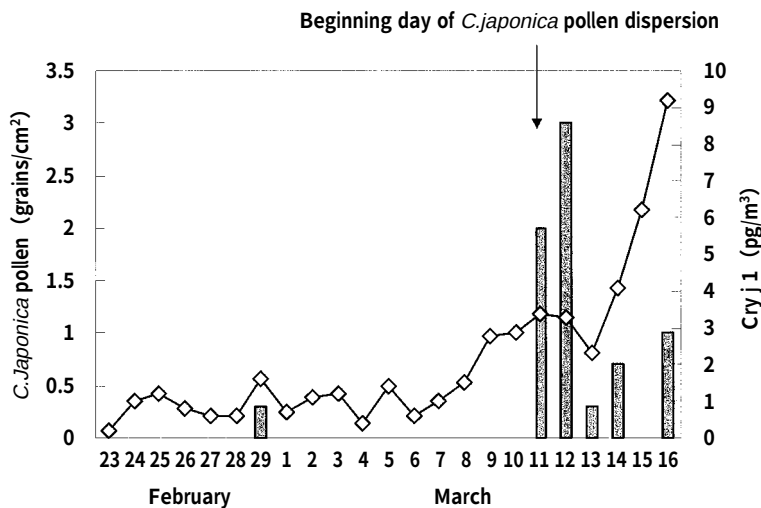


Fig. 2. Amounts of Cry j 1 (line graph) and numbers of *C. japonica* pollen (bar graph) at the beginning of *C. japonica* pollen season.

検出することが可能である。同一地区に居住する患者の発症状況のデータと対比することにより数 pg/m³ の Cry j 1 で症状のである患者がいることもわかった(別途報告予定)。また花粉量と抗原量は定性的には相関するものの大きく食い違う日の存在も明らかになった。今回開発した方法を用いればその時期のアレルゲン量を情報化することができるようになる。

文 献

- 1) 榎本雅夫, 大西成雄, 安枝 浩, 嶽 良博, 碓田 猛真, 斎藤優子, 十河英世, 藤村 聡, 藤木嘉明, 瀬野悟史, 井出 武: 高感度 Cry j 1 測定法について. 日本花粉学会会誌 **46**, 9-16, 2000.
- 2) 馬場廣太郎: スギ花粉症修飾因子としての花粉飛散量(特集; 鼻アレルギー・花粉症の修飾因子). アレルギーの臨床 **230**(18), 170-174, 1998.
- 3) Aoyama, M., Shiga, M., Ohya, H., and Kamada, H.: A novel ESR method for horseradish peroxidase activity using a combination of *p*-acetamidophenol and hydroxylamine, and its application to enzyme immunoassays. *Anal. Sci.* **14**, 1107, 1998.
- 4) Matsuo, T., Shinzawa, H., Togashi, H., Aoki, M., Sugahara, K., et al.: Highly sensitive hepatitis B surface antigen detection by measuring stable nitroxide radical formation with ESR spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 929-935, 1998.
- 5) Aoki, M., Saito, T., Watanabe, H., Matsuo, T., Saito, K., et al.: Clinical significance of a highly sensitive enzyme immunoassay of hepatitis B surface antigen using a novel electron spin resonance technique. *J. Med. Virol.* **66**, 166-170, 2002.

DEVELOPMENT OF SUPER-SENSITIVE RADICAL IMMUNOASSAY FOR CRY J 1

Masaaki Aoyama¹⁾ and Yuichi Takahashi²⁾

¹⁾Institute for Life Support Technology, ²⁾Yamagata Prefectural Institute of Public Health

We have been developed super-sensitive method of Cry j 1 measurement by ESR radical immunoassay using *p*-acetamidophenol and hydroxylamine system. The detection limit for Cry j 1 was 3.5 pg/ml. It is reported that the average content of Cry j 1 in each *Cryptomeria japonica* pollen is about 6 pg, therefore, we can detect one grain or even less one grain of the pollen by our method. It was possible to inform the useful information for sensitive *C. japonica* pollinosis patients before development their symptoms due to the super-sensitive measurement.