

シオノリア特異 IgE による False Cypress (*Chamaecyparis obtusa*,
Hinoki) 花粉特異 IgE 抗体の測定

和歌山赤十字病院耳鼻咽喉科

榎本雅夫

塩野義製薬診断薬部

大西成雄

スギ, ヒノキ科花粉飛散時期に, 鼻アレルギー症状を有し受診した152例の患者を対象に, ヒノキ SIST (特異的 IgE テストシオノギ) の基礎的・臨床的検討を行った。その結果, 添付の標準血清を用いた標準曲線は直線性を示した。希釈試験, 阻止試験, 吸収試験でも満足すべき成績であった。同時再現性, 日差再現性, 測定者間再現性の成績も優れていた。非アレルギーおよび臍帯血の測定では, クラス0のリファレンス血清の値以下であった。また, ヒノキ SIST の感度は89.9%, 特異性は86.3%, 一致性は88.2%で, 皮膚反応との良好な関連性があった。これらの結果は本キットの優秀性を裏付けている。ところで, 阻止試験において, ヒノキ陽性血清がスギとヒノキエキ스로阻止される症例とヒノキエキスのみ阻止される症例の存在すること, 吸収試験でも同様の知見を得たことは興味がある。スギ花粉との共通抗原部分でヒノキアレルゲンを認識している患者とそうでない患者の存在を示唆するものであろう。

Key words: *Chamaecyparis obtusa* — *Cryptomeria japonica* — SIST — specific IgE measurement

緒言

スギ花粉症は, その症状の強いこと, 発症頻度が高いこと, 増加しつつあることなどから, 本邦における重要な花粉症であることは言うまでもない。

ヒノキ花粉とスギ花粉が共通抗原性を持つことはよく知られる¹⁾²⁾が, スギ花粉症患者をよく観察すると, 大部分の症例はヒノキ花粉飛散期間でも症状を起こすが, 一部はスギ花粉飛散期間中に症状が軽くてヒノキ花粉飛散の期間にのみ症状が増悪したり, ヒノキ花粉飛散期間にのみ症状の発現するヒノキ花粉症とすべき患者も存在する。

ところで, ヒノキ花粉症と診断するには, 皮膚試験や特異 IgE 抗体の測定による原因アレルゲンの同定

が必須である。しかし, 本邦で市販されている皮膚反応用のエキスを(鳥居薬品 KK)はヒノキ材の抽出物でヒノキ花粉由来ではなく, 特異 IgE を測定する RAST や CAP (Pharmacia 社) および SIST の品目には, 同じヒノキ科としてのビャクシンの花粉があるだけで, その感度も低い。したがって, ヒノキ花粉特異 IgE を測定できるキットの開発が望まれている。

今回, SIST (特異的 IgE テスト シオノギ) の系で, ヒノキ花粉 (以下ヒノキと略) 特異 IgE 抗体の測定できるディスクが開発されたので, 基礎的・臨床的検討を加えた。

対象および方法

1. 対象

1991年2月から5月のスギ・ヒノキ花粉飛散時期に, いわゆる鼻アレルギー症状を呈して受診した患者血清を対象とした。

対象患者を皮内反応の成績で以下の4群に分けた。特に, B群の血清を多く集めた。

A群: スギ(+), ヒノキ(+), 46例

Received: April 9, 1993

Accepted: December 18, 1993

Abbreviations: ARU allercoat RAST unit; CAP cap RAST FEIA; CV% coefficient of variations; D.P. *Dermatophagoides pteronyssinus*; HSA human serum albumin; RAST radioallergosorbent test; SIST Shionoria specific IgE (specific IgE test Shionogi)

B群：スギ（－），ヒノキ（＋），31例

C群：スギ（＋），ヒノキ（－），33例

D群：スギ（－），ヒノキ（－），42例

また，対照群として16例の臍帯血とアレルギー性鼻炎の既往歴のない健常人38例の血清を用いた。

2. 方法

1) 皮膚試験

(1) スギ花粉(以下スギと略)の皮内反応はスギ診断用エキス，皮内反应用(鳥居薬品 KK)を用いた。方法と判定は奥田の方法³⁾に従った。

(2) ヒノキは市販の皮膚試験液がないので，自家製のものを作成した。すなわち，採取したヒノキ花粉を花粉重量の20倍量の Tris-HCl (0.1M, pH 8.0) で 4℃，3時間振盪，遠心分離後，上清を蒸留水で透析，凍結乾燥した。凍結乾燥末を鳥居薬品 KK の希釈液で希釈し140 μ g/ml (W/V) に調製，短期保存用とした。使用時さらに40倍に希釈し，皮内反応液として使用した。

2) SIST の測定方法について

市販の SIST キットにあるスギ，ビャクシンディスクを用いて特異 IgE 抗体を測定した。ヒノキの測定キットは，塩野義製薬診断薬部が開発中のヒノキディスクの提供を受けて測定した。

(1) SIST の原理

測定原理は RAST とほぼ同様で，アレルゲンを結合したディスクと患者血清を反応させ，その後，¹²⁵I ラベル抗 IgE 抗体を反応させる RIA 法（サンドイッチ法）で IgE 抗体を測定するものである。

(2) 測定手順

操作手順としてはまずアレルゲンディスクおよびリファレンスディスクを試験管に入れ，検体および各リファレンス血清を50 μ l ずつ加えた。その後，25℃で3時間静置してインキュベートした。洗浄液(精製水1000 ml に NaCl 9g) 2ml を勢いよく加え1～2分静置した後，液を吸引除去した。この操作を2回繰り返した後，さらに洗浄液を2ml 加え10分間静置，その後洗浄液を吸引除去した。ついで，各試験管に¹²⁵I ラベル抗 IgE 抗体を50 μ l 加えた。室温で20時間静置してインキュベートし，洗浄を行い，各試験管のディスクの放射能活性を γ カウンターで測定した。

(3) SIST の判定方法 (Fig. 1)

リファレンス血清 A, B, C, D から得たカウント数をそれぞれ A, B, C, D とし，これと検体から得られたカウント数を図に示す SIST クラス 0, 1, 2, 3,

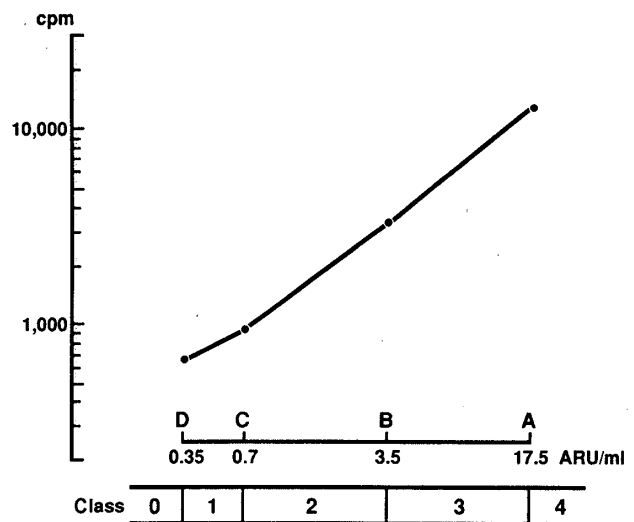


Fig. 1. Reference curve.

4 に分類した。クラス 2 以上を陽性とした。

3) ヒノキ SIST 測定系の基礎的評価

(1) 希釈試験

症例番号001～005の5症例のヒノキ特異 IgE 抗体を持つ患者血清を0.1% HSA/0.9% NaCl で希釈し，ヒノキ SIST で抗体価を測定した。

(2) 阻止試験

ヒノキ SIST の特異性を知る目的で阻止試験を行った。症例006 (ヒノキ SIST クラス 2・スギクラス 3)，症例007 (ヒノキ SIST クラス 2・スギクラス 2)，症例008 (ヒノキ SIST クラス 2・スギクラス 2) の3症例で検討した。ヒノキエキスを蛋白濃度500 μ g/ml から5倍希釈で8段階調整し，被検血清50 μ l と希釈エキスを polypropylene チューブに等量とり，スギまたはヒノキディスクと25℃ 3時間インキュベートし，0.05% Tween20を含む0.9% NaCl で3回洗浄した。その後，¹²⁵I ラベル抗ヒト IgE 抗体50 μ l を試験管にいれ，25℃ 20時間インキュベートした。上記洗浄液で3回洗浄した後， γ カウンターで cpm を測定した。スギエキスを阻止するときは，スギのエキスをを用いて同様の操作を行った。

(3) 吸収試験

ヒノキ SIST，スギ SIST に陽性を示す血清 (009, 010, 011, 012) を100 μ l 試験管にとり，ヒノキまたはスギのディスクを1枚，または2枚いれ，ローテーターで25℃ 3時間反応させた。その後，血清のみをとり通常の方法でヒノキ SIST を行った。

(4) 再現性

3種の血清 (013, 014, 015) を用いて10回測定で同

時再現性を行った。日差再現性は同一 lot を用いて、1, 3, 7, 10, 14, 17日の6回行った。測定者間再現性は4人の測定者で行った。

4) SIST と皮膚反応との関連性

対象152例の皮内反応とスギ, ヒノキ, ビャクシン SIST の成績について、感度, 特異性, 一致性等を検討した。

結 果

1. 標準曲線 (Fig. 1)

まず、添付の標準血清を用いて、標準曲線を作成し評価した。その結果、標準曲線は直線性を示し、リファレンス血清 A, B, C, D における半定量性が認められた。

2. ヒノキ SIST の評価

1) 希釈試験 (Fig. 2)

5例のヒノキ SIST 陽性血清は希釈倍率に応じ、カウント数は直線性にかつ平行性をもって低下し、陰性領域のリファレンス D 以下までとなった。ヒノキに陽性を示さない血清はいずれの希釈倍率でも陽性を示さず、ヒノキ SIST の測定系が成立していることを確認した。

2) 阻止試験 (Fig. 3)

症例006, 007ではスギ, 阻止に用いるスギおよびヒノキエキスの濃度を増加するに従い、ヒノキ SIST の

反応は阻止された。症例008ではヒノキエキスを阻止されるものの、スギエキスの阻止はわずかであった。

3) 吸収試験 (Fig. 4)

症例009, 012ではヒノキディスクを用いてもスギディスクを吸収に用いても、ディスクの枚数を増加するに従い吸収の程度が強くなった。

症例010と011ではヒノキディスクでは吸収が強いか

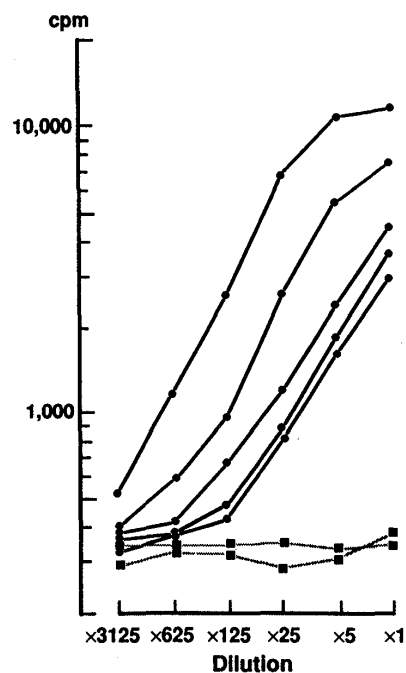


Fig. 2. Dilution test.

(●—●: False cypress SIST positive sera,
■—■: False cypress SIST negative sera)

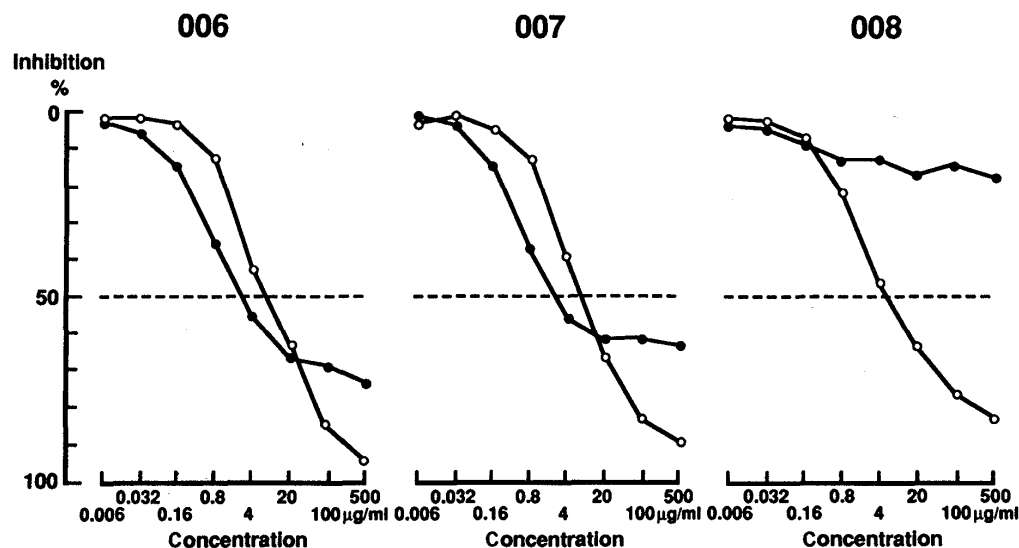


Fig. 3. Inhibition test.

(○—○: Inhibited with false cypress pollen extract, ●—●: Inhibited with Japanese cedar pollen extract)

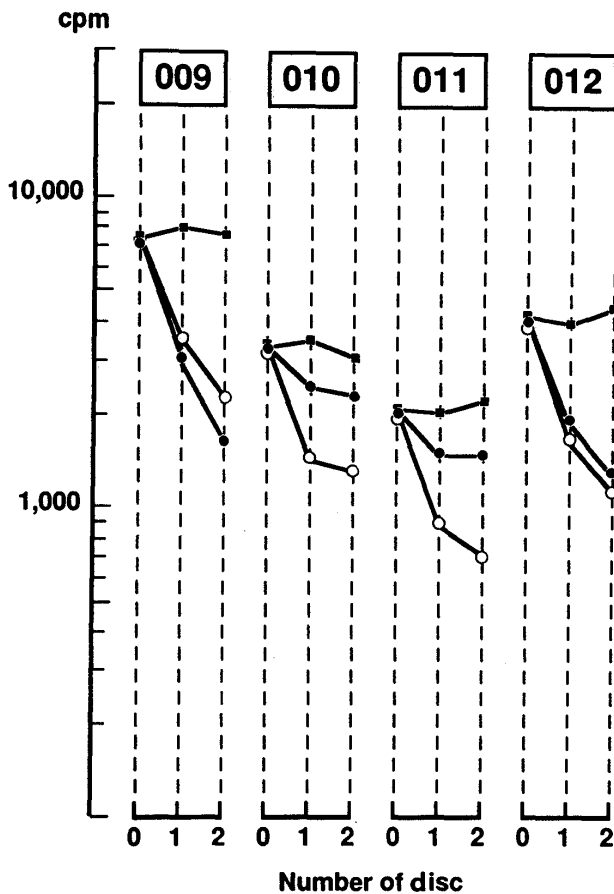


Fig. 4. Absorption Test.

(○—○: Absorbed with false cypress pollen discs, ●—●: Absorbed with Japanese cedar pollen discs, ■—■: Absorbed with D.P. discs)

かるものの、スギディスク1枚と2枚でその吸収は弱く、D.P. ディスクでは殆ど吸収されなかった。

4) 非アレルギーおよび臍帯血における測定 (Fig. 5)

対照であるアレルギーの既往のない症例38例や16例の臍帯血ヒノキ特異 IgE 抗体価はいずれも SIST クラス 0 のリファレンス D 血清の値以下であり、臍帯血は更に低値を示した。

5) 再現性 (Table 1)

同時再現性で、cpm の C.V.% は 3.23~6.80% で満足できる再現性であった。日差再現性の、C.V.% も 2.16~6.69% であった。測定者間再現性の C.V.% は 2.16~5.29% でこれも満足できる成績であった。

3. SIST と皮膚反応との関連性 (Table 2)

対象152例のスギ、ヒノキ皮内反応とスギ、ヒノキ、バックシン SIST の関係について検討した。

ヒノキ SIST の感度は 77.9%、特異性は 90.7%、一致率は 84.2% に対して、スギ SIST はそれぞれ 89.9%、

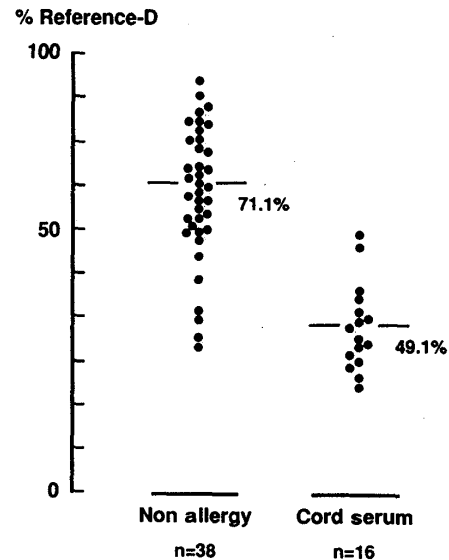


Fig. 5. False cedar SIST in non-allergic sera.

86.3%、88.2% ですぐれた皮膚反応の関連性を見た。一方、バックシン SIST はヒノキの皮膚反応との関連性で検討したが、それぞれ 13.0%、93.3%、52.6% で特異性は良いものの、感度、一致率に問題があった。

考 案

本邦においてスギ花粉症の重要性については言うまでもない。スギ花粉はヒノキ花粉と共通抗原性を持つとされ¹⁾²⁾、スギ花粉とヒノキ科 (*Cupressaceae*) のヒノキ属のヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、サワラ (*Chamaecyparis pisifera*)、コノテガシワ属のコノテガシワ (*Biota orientalis*)、バックシン属のネズミサン (*Juniperus rigida*)、バックシン (*Juniperus chinensis*) との共通抗原性が報告されている²⁾。

通常スギ花粉症の患者はスギ花粉でもヒノキ花粉でも症状を発現するが、スギ花粉飛散が終了しヒノキ花粉の飛散のみが認められる時期にのみ発症し、ヒノキ単独の花粉症と考えられる症例やその時期に症状のより増悪する症例も少なくない。これらの臨床的知見をより詳細に検討し、ヒノキ花粉症を正確に診断するには、ヒノキ花粉特異 IgE 抗体を測定するシステムの開発が要求され、著者らは AlaSTAT の系で報告してきた⁴⁾⁵⁾。

ところで、特異 IgE 抗体を測定する方法には種々の方法が開発されているが^{6)~13)}、米国サノフィ社によって 1981 年に開発された特異 IgE 抗体測定法 SIST (特

Table 1 Reproducibility of false cypress SIST

Intra-assay						
	Sample A		Sample B		Sample C	
	cpm	ARU/ml	cpm	ARU/ml	cpm	ARU/ml
1	7463	8.6	4215	4.4	2135	1.92
2	6927	7.9	4704	5.0	1941	1.70
3	7155	8.1	4193	4.3	2219	2.05
4	7338	8.3	4527	4.7	2328	2.15
5	7042	8.0	4305	4.5	1946	1.72
6	6754	7.8	3928	4.0	1951	1.73
7	7139	8.1	4313	4.5	2175	1.95
8	7521	8.7	3967	4.1	2208	2.00
9	7063	8.0	3895	4.0	2312	2.14
10	6957	7.9	4213	4.4	1993	1.80
Mean	7136	8.14	4226	4.39	2121	1.916
S.D.	236.7	0.287	244.9	0.298	144.2	0.163
C.V.	3.23%	3.53%	5.79%	6.79%	6.80%	8.48%

Between-assay						
	ARU/ml	Class	ARU/ml	Class	ARU/ml	Class
Day 1	8.5	3	4.3	2	1.95	2
3	8.2	3	4.1	2	2.10	2
7	7.9	3	4.7	2	1.85	2
10	8.3	3	4.0	2	1.95	2
14	7.9	3	4.8	2	2.15	2
17	8.2		4.3		2.00	
Mean	8.17		4.37		2.00	
S.D.	0.21		0.29		0.10	
C.V.	2.16%		6.69%		5.0%	

Intra-performer						
	ARU/ml	Class	ARU/ml	Class	ARU/ml	Class
S. O.	8.5	3	4.3	2	1.95	2
K. M.	7.9	3	4.7	2	2.00	2
T. E.	8.3	3	4.4	2	1.85	2
T. I.	8.4	3	4.0	2	1.90	2
M. A.	8.1	3	4.5	2	2.10	2
Mean	8.24		4.38		1.96	
S.D.	0.22		0.23		0.09	
C.V.	2.16%		5.29%		4.39%	

異IgEテストシオノギ¹⁴⁾は、臨床で遭遇しうるアレルギー疾患患者に、従来品より幅広く、対応できるように、豊富なアレルゲンが用意されている。今回、このシステムでヒノキ特異IgEを測定できるキットが開発されたので基礎的評価や臨床的検討を加えた。

基礎的検討の結果、添付の標準血清を用いた標準曲線で直線性を示し、半定量性を確認した後に以下の検討を行った。その結果、ヒノキ陽性患者血清を用いた

希釈試験では、希釈倍率に応じ、測定に十分な直線性と平行性が得られた。また、阻止試験、吸収試験でも満足する成績を得た。

ところで、阻止試験でインヒビターとして用いたヒノキ花粉エキスを阻止されるのは当然であるが、症例006や007のようにスギエキスでも阻止される症例やスギでは阻止されない症例008があった。同様の現象が吸収試験でも認められた。このことは、個々の症例がス

Table 2 Correlation between SIST and skin test
Skin tests Pfiter juniper were substituted with
those for false cypress

文 献

[False cypress]

		Skin test			
		Positive	Negative		
S I S T	Class ≥ 2	60	1	Sensitivity (60/77)	77.9%
	1	15	6	Specificity (68/75)	90.7%
	0	2	68	Coincidence (128/152)	84.2%

[Japanese cedar]

		Skin test			
		Positive	Negative		
S I S T	Class ≥ 2	71	4	Sensitivity (71/79)	89.9%
	1	8	6	Specificity (63/73)	86.3%
	0	0	63	Coincidence (134/152)	88.2%

[Pfiter juniper]

		Skin test			
		Positive	Negative		
S I S T	Class ≥ 2	10	0	Sensitivity (10/77)	13.0%
	1	7	5	Specificity (70/75)	93.3%
	0	60	70	Coincidence (80/152)	52.6%

ギとヒノキの花粉で感作されていてもそれぞれの感作を受ける花粉成分は症例により異なっていること、さらに、共通抗原部分以外のそれぞれの抗原部分を認識している患者が存在していることを示唆する興味のある成績であった。従来スギ・ヒノキ科花粉症としてまとめて報告する研究者もいるが、それぞれの花粉症患者を分けて考える必要があろうことを示唆している。

皮膚反応との関連性についてであるが、スギ SIST、ヒノキ SIST は感度、特異性、一致性において皮内反応とよく一致し優れたものであった。また、バックシン SIST はヒノキ SIST に代用されるものではなかった。今後、飛散花粉の増加と患者数の増加が予想されるヒノキ花粉症の理解を深める上でこのキットが役に立つであろうと考えている。

- 1) 宮本昭正, 降矢和夫, 水野勝之: 花粉間の共通抗原性に関する研究. アレルギー 20, 39-46, 1971.
- 2) 井手 武, 芦田恒雄: スギ科・ヒノキ科花粉の共通抗原性. アレルギーの臨床 11, 174-178, 1991.
- 3) 奥田 稔: “鼻アレルギー”. 金原出版, 東京, pp. 157-159, 1991.
- 4) 榎本雅夫, 芦田恒雄, 井手 武: AlaSTAT によるヒノキ花粉特異 IgE 抗体の測定. アレルギーの臨床 11, 1093-1097, 1991.
- 5) 榎本雅夫, 横山道明, 新井宏紀, 畠田猛真: 自然集団におけるヒノキ特異 IgE 抗体について. 和赤医誌 10, 93-98, 1992.
- 6) Wide, L., Bennich, H.H. and Johansson, S.G.O.: Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 2, 1105-1107, 1967.
- 7) Shami, A.S.E.I. and Alaba, O.: Liquid-phase in vitro allergen-specific IgE assay with in situ immobilization. *Adv. Biosci.* 74, 191-201, 1989.
- 8) 岩本逸夫, 山崎博臣, 木村 亮, 落合賢一, 田中真, 他: アレルゲン特異的 IgE 抗体の新しいスクリーニング法 quidel allergy screen の皮膚試験・RAST との比較検討. アレルギー 38, 1157-1162, 1989.
- 9) 榎本雅夫, 横山道明, 畠田猛真, 新井宏紀, 吉内光夫: 新しい特異 IgE 抗体測定法 AlaSTAT の検討. 鼻アレルギー患者を対象として. 医学と薬学 2, 103-108, 1990.
- 10) 岩本逸夫, 山崎博臣, 木村 亮, 落合賢一, 中川典明, 他: 液相免疫測定法による IgE 抗体測定法 AlaSTAT の基礎的検討. アレルギー 39, 1374-1379, 1990.
- 11) 大塚博邦, 奥田 稔, 市川菊乃, 大西正樹: CAP システムによる鼻アレルギーの診断意義. アレルギーの臨床 10, 217-221, 1990.
- 12) 我妻義則, 松山隆治, 佐藤幹弥, 他: CAP phadiatop および CAP phadiatop FEIA の臨床的検討. 医学と薬学 23, 83-88, 1990.
- 13) 中川武正, 岩崎栄作, 馬場 実, 松下 隆, 馬場駿吉, 他: MAST アレルギーシステムによる同時多項目アレルゲン特異的 IgE 抗体の測定. アレルギー 38, 478-485, 1989.
- 14) 榎本雅夫, 横山道明, 新井宏紀, 畠田猛真: 鼻アレルギー診療における新しいシオノリア特異 IgE 試薬 (略称: SIST) の基礎的・臨床的検討. 基礎と臨床 25, 1635-1644, 1991.

MEASUREMENT OF SPECIFIC IgE ANTIBODY TO FALSE CYPRESS (*CHAMAECYPARIS*
OBTUSA, HINOKI) POLLENS USING SHIONORIA SPECIFIC IgE

Tadao Enomoto

Department of Otorhinolaryngology Wakayama Red Cross Hospital

Shigeo Ohnishi

Department of Diagnostic Reagents, Shionogi Pharmaceutical Company

A basic and clinical study was carried out to evaluate the usefulness of the Shionoria Specific IgE (SIST) kit for false cypress allergen. The test materials were sera from 152 patients who visited our clinic with symptoms of nasal allergy during the period when Japanese cedar and false cypress pollens are prevalent in the air. The standard curve drawn on the standard serum, which was part of the test kit, was linear. Dilution, inhibition and absorption tests were all satisfactory. Reproducibility studies, different-day, and inter-performers, were all excellent. Non-allergic sera and umbilical cord sera showed less reactivity than the reference serum which is classified as class 0. The sensitivity of the SIST kit for False cypress was 89.9%; specificity 86.3%, and concordance rate 88.2%. The SIST test results for the sera well correlated with the results given by skin tests. These results are good evidence of the excellence of this kit. It was of interest that in the inhibition test, some false cypress positive sera were blocked with Japanese cedar extract as well as with false cypress extract, while other false cypress positive sera were blocked only with false cypress extract. Similar results were obtained in the absorption test. This suggests that the antibodies of some patients recognize a portion of the false cypress allergen which is common to a particular portion of the Japanese cedar allergen.
