

〔原著〕

蛍光 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による 抗スギ花粉 IgE 抗体の測定

国立公衆衛生院衛生微生物学部

阪口雅弘 井上 栄

東京大学医学部物療内科

鈴木修二

われわれは、抗スギ花粉 IgE 抗体を測定するために、蛍光 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を確立した。すなわち、マイクロプレートにスギ花粉から抽出した粗蛋白分画を吸着させ、固相抗原とした。血清を反応後、酵素標識抗体として β -ガラクトシダーゼ結合抗ヒト IgE 抗体を用いた。酵素基質として、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを用い、生じた反応物質 4-メチルウンベリフェロンの蛍光を測定し、血清 IgE 抗体値とした。スギ花粉症患者 52 名のすべての血清は陽性に反応し、スギ花粉症のないインドネシア人の血清はすべて反応陰性であった。また、ペーパーディスクを用いた“Phadezym RAST”とも高い相関を示した。この蛍光 ELISA は、従来の RAST に比べ、簡便かつ低費用でおこなえるため、多数の血清検体の IgE 抗体測定が可能になった。

Key words: fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay — β -galactosidase-conjugated anti-IgE antibody — 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside — microplate — *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) pollinosis

緒言

近年スギ花粉症の患者数が増加しており¹⁾、公衆衛生上の問題ともなりつつある。われわれは、患者発生の実態を一般集団におけるスギ花粉アレルギーに対する血清中の特異 IgE 抗体の保有状況の面から捉えようとした。

そのような血清疫学調査をおこなうためには、IgE 抗体を測定する簡便で低費用の方法がまず必要とされる。IgE 抗体測定の標準法である radioallergosorbent test (RAST) は、この目的にかなわない。そこでわれわれは、酵素免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) を利用しようとした。IgE 抗体の濃度は IgG 抗体に比べてはるかに低いので、感度を上げるために、酵素として β -ガラクトシ

ダーゼ、その基質として 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド、反応産物として蛍光物質 4-メチルウンベリフェロンを用いる系²⁾を利用することにした。

本論文は、われわれの確立した抗スギ花粉 IgE 抗体測定のための蛍光 ELISA 法、およびそれをスギ花粉症患者血清に応用した成績についての報告である。

材料および方法

1. 被検血清：スギ花粉症患者 (20-65 歳) 52 名より採取した血清を用いた。抗体陰性対照として、スギのないインドネシア・ジャカルタ市に住む成人 (20-60 歳) の血清 215 検体を用いた。

2. 抗原：スギアレルギーの抽出は、安枝ら³⁾の方法に準じておこなった。スギ花粉に 20 倍量の 0.125 M NaHCO₃ を加えて抽出、その上清に硫酸を 80% 飽和になるように加えた。3100 × g 10 分遠心後、沈渣を 0.01 M リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.4) に溶解し、低速遠心した上清を ELISA 用抗原とした。

蛋白定量は、Bio-Rad 社の protein assay kit を用い、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準とした。

Received: November 16, 1985.

Accepted: January 22, 1986.

Abbreviations: BSA bovine serum albumin;

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay;

FU fluorescence unit; PBS phosphate buffered

saline; RAST radioallergosorbent test

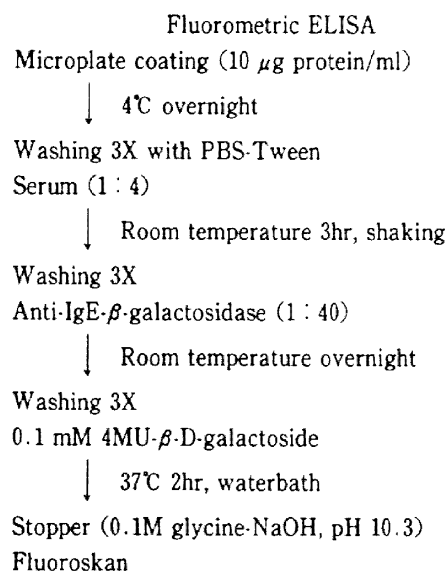


Fig. 1. Procedure for fluorometric ELISA.

3. ELISA 術式 (Fig. 1): マイクロプレート (Immulon II, Dynatech 社) の各穴に, 0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で, 10µg 蛋白/ml の濃度にあわせた抗原液を100µl ずつ加え, 4°C 一夜静置し, 抗原を固相に吸着させた。洗浄液 (PBS+0.05% Tween 20) で3回洗浄後, 血清希釈液 (PBS+0.05% Tween 20, 1% BSA, 0.1% NaN₃) で1:4に希釈した被検血清を100µl ずつ加え, プレートにマイクロミキサー (MX-4, 光和機材) で室温3時間振盪させた。ふたたび洗浄後, β-ガラクトシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体 (Phadezym kit, Pharmacia 社) を酵素希釈液 (0.01M Na-リン酸, pH 7.0, 0.1M NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1% NaN₃, 0.1% BSA) で1:40に希釈し, 各穴に100µl ずつ加えた。プレートをテープでシールし, 室温で一夜静置した。ふたたび, 洗浄後, 上記希釈液で作成した0.1mM 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド液を100µl ずつ加えて, プレートをシールし恒温槽水中に沈め, 37°C 2時間反応させた。次にシールをはがしてから0.1M グリシン-NaOH (pH 10.3) を100µl ずつ加え, 反応を停止させた。酵素反応によって生じた4-メチルウンベリフェロンの蛍光を, 自動蛍光光度測定機 (Fluoroskan, Flow 社) で測定した。

4. Phadezym RAST: スギ花粉抗原を結合させたペーパーディスク (塩野義製薬) を用い, Phadezym RAST kit (Pharmacia 社) で測定した。

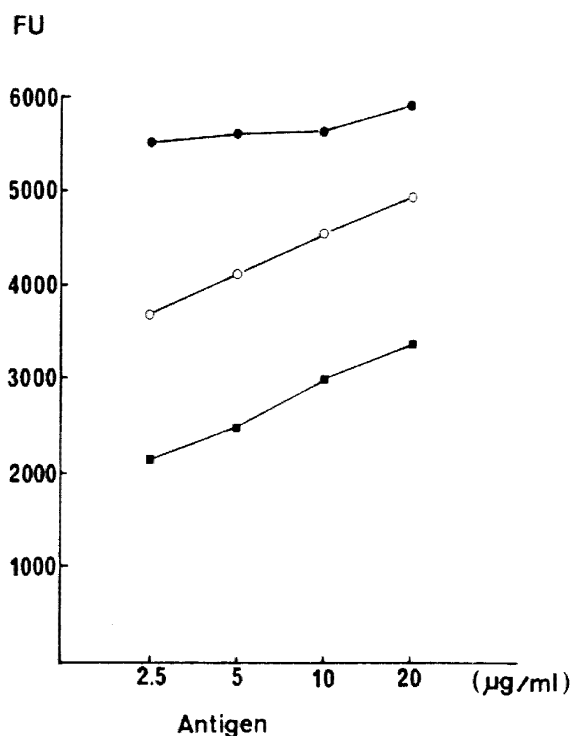


Fig. 2. Fluorometric ELISA with various concentrations of antigen and various dilutions of β-galactosidase-conjugated anti-human IgE antibody.
● 1:10; ○ 1:20; ■ 1:40 dilution of anti-IgE. FU fluorescence unit.

結果

1. ELISA の条件の検討

まず, 至適な抗原濃度および酵素標識抗体希釈を決定した。条件決めには, 予備試験によって特異 IgE 抗体値の高いものと判明した患者血清を用いた。この血清を1:4希釈に固定して, 抗原濃度・標識抗体希釈をそれぞれ変えて ELISA をおこなった結果は Fig. 2 のようになった。蛍光測定装置 fluoroskan の特性として, 0-3500 蛍光単位 (fluorescence unit; FU) の範囲において4-メチルウンベリフェロンの濃度と FU とが直線関係にある。そこで IgE 抗体濃度が最も高い血清の FU 値がこの範囲内にくるような抗原濃度・標識抗体希釈の組み合わせを選ぶことが望ましい。経済性も考えて, われわれは抗原を10µg 蛋白/ml, 標識抗体を1:40希釈で使うことにした。

次に, IgE 抗体と固相抗原との反応においてプレートを振盪させることの効果を調べた。IgE 抗体は IgG 抗体に比較して濃度が低いので, 振盪によってその反応性が増大するかもしれないと考えたのである。Table 1に示すように, 血清が高希釈になるにつれて,

Table 1 Effect of microplate-shaking on antigen-antibody reaction

Serum dilution	Fluorescence unit		*Percent of increase (%)
	Shaking (A)	No-shaking (B)	
2 ⁻¹	3107	3009	3
2 ⁻³	2143	1728	24
2 ⁻⁵	1440	1051	42
2 ⁻⁷	725	486	49
2 ⁻⁹	263	170	55

$$* \frac{A-B}{B} \times 100$$

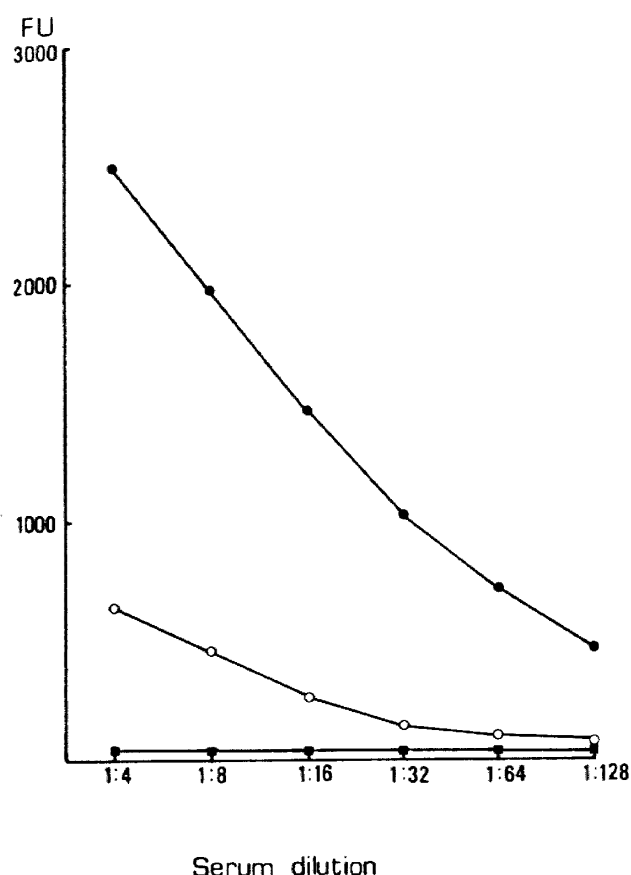


Fig. 3. Antibody titration curves of different sera.

- serum with high-positive IgE antibody;
- serum with low-positive IgE antibody;
- antibody-negative serum.

振盪による効果が明瞭になっている。Fig. 3には、IgE抗体強陽性、弱陽性および陰性血清を2倍階段希釈し、プレート振盪してELISAをおこなった結果を示す。両陽性血清ともに、1:4希釈においてFU値の頭打ちが認められなかった。一方、陰性血清では1:

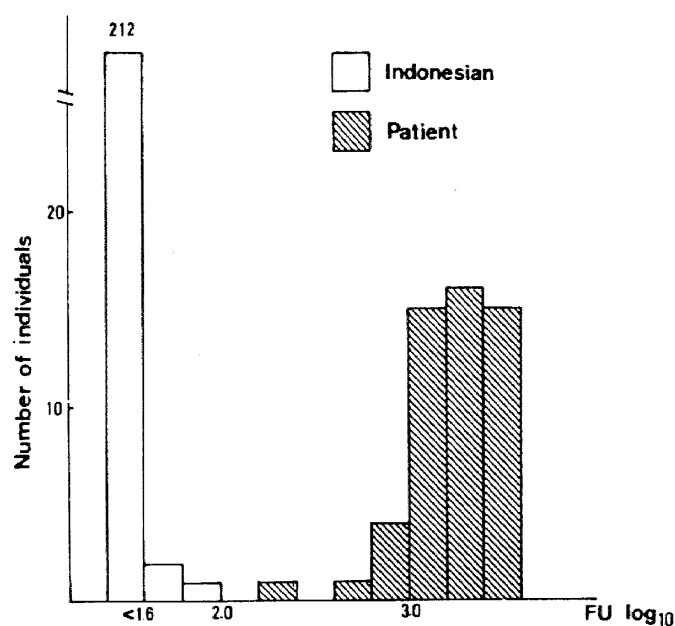


Fig. 4. Distribution of IgE antibody concentrations in Japanese patients and Indonesian non-patients.

4希釈でもFUは0であった。したがって低濃度IgE抗体を検出するために、以下のELISAにおいては、血清希釈は1:4の1希釈のみとし、血清の反応にはプレートを振盪することにした。

また、再現性の検討として同一プレートのwell間の測定誤差を調べた。抗体弱陽性血清のFU値を同一プレート32穴を使って調べたところ、平均値538、標準偏差49.7であり、変動係数(coefficient of variation)が9.2%であった。次に同一ロットの4枚のプレートについて、プレート間による違いを調べたところ、プレートの平均値がそれぞれ、553、545、538、560FUとほとんど変わらなかった。

2. スギ花粉症患者血清中のIgE抗体の測定

上記の方法を使って、患者血清52検体、および抗体陰性対照としてインドネシア成人血清215検体のスギ抗原に対するIgE抗体値を調べた。インドネシア人血清では、3例が40(=10^{1.6}) - 100(=10^{2.0})FU間であったが、残り212検体すべて40(=10^{1.6})FU以下であった。しかるに患者血清は214(=10^{2.3}) - 3434(=10^{3.5})FUの間に分布し、両者の血清は明瞭に区別できた。Fig. 4に、抗体値別の頻度分布を示す。

次に、4人の患者の抗体応答を調べた。国立予防衛生研究所では、ウイルス関係の部の職員の血清が保存してある。現在、花粉症になっている職員の過去の血清についてIgE抗体値を調べた結果は、Fig. 5のよう

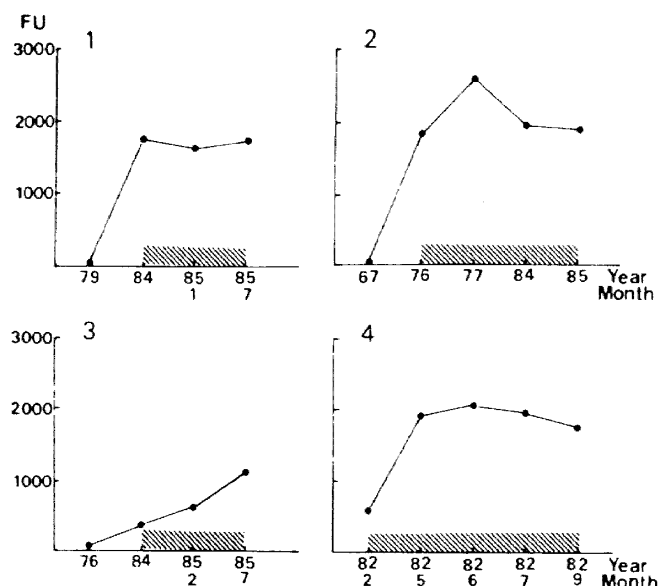


Fig. 5. IgE antibody response to *Cryptomeria japonica* pollen in 4 patients. ▨ pollinosis.

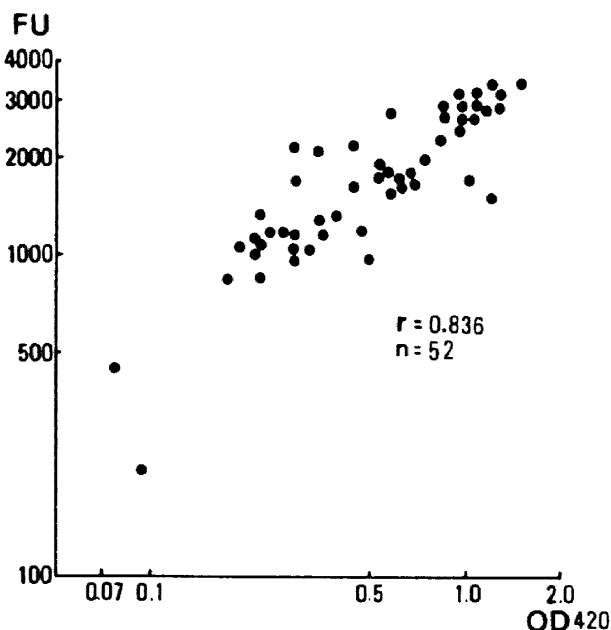


Fig. 6. Correlation between the fluorometric ELISA and the Phadezym RAST.

になった。興味あることに患者3と4では、同一年のスギ花粉散布季節の前後で抗体値の上昇があり、花粉抗原刺激によるIgE抗体のブースター現象が観察できた。抗体値はいったん高値にまで上昇すると、以後変動しないようにみえる。これら患者において、抗体陰性であった時には花粉症の症状がなく、病状の出現とともにIgE抗体が上昇していることが確かめられた。

3. Phadezym RAST との比較

蛍光 ELISA の蛍光光度 (FU) とペーパーディスク抗原を用いた“Phadezym RAST”の吸光度 (OD_{420}) との比較では、Fig. 6に示すように相関係数 $r=0.836$ ($p<0.0001$) と高い相関がみられた。

考 察

スギ花粉に対するIgE抗体測定には、従来、RASTが使われてきたが、これに代わるものとして、固相にポリスチレン・ビーズを用いたELISAが報告されている⁴⁾。

本報では酵素基質に4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを用いた蛍光ELISAをおこなった。これにより、IgE抗体検出の感度を上げることができた。また、“Phadezym RAST”と高い相関を示した。さらに大量の血清検体を扱うためには、マイクロプレートの方がビーズよりも洗浄が簡便であり、また、自動蛍光光度計が使用できる点で便利である。一般住民集団についての血清疫学データについては、別に発表する予定である。

結 語

われわれは、抗スギ花粉IgE抗体を測定するために蛍光ELISAを確立した。すなわち、マイクロプレートにスギ花粉から抽出した粗蛋白分画を吸着させ、固相抗原とした。血清を反応後、酵素標識抗体として β -ガラクトシダーゼ結合抗ヒトIgE抗体を用いた。酵素基質として、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを用い、生じた反応物質4-メチルウンベリフェロンの蛍光を測定し、血清IgE抗体値とした。スギ花粉症患者52名のすべての血清は陽性に反応し、スギ花粉症のないインドネシア人の血清はすべて反応陰性であった。また、ペーパーディスクを用いた“Phadezym RAST”とも高い相関を示した。この蛍光ELISAは、従来のRASTに比べ、簡便かつ低費用でおこなえるため、多数の血清検体のIgE抗体測定が可能になった。

本研究をおこなう上で御協力いただいた次の方々に深謝します。スギ花粉を採取していただいた富山県林業試験所・沢田隆司氏および栃木県衛生研究所の方々、患者血清を提供

いただいた日光古河総合病院長・小泉一弘博士、血清を提供
いただいた国立予防衛生研究所および国立公衆衛生院の職
員の方々、スギ花粉 RAST 用ディスクを提供いただいた塩
野義製薬株式会社・大西成雄氏、インドネシア人血清を提供
いただいた国立予防衛生研究所部長・松橋直博士。

本研究は、第34回日本アレルギー学会総会で発表した。

文 献

- 1) 村中正治, 小泉一弘, 石田房子, 宮本睦子, 鈴木
修二: 花粉アレルギーの増加と大気汚染-ディー
ゼル排出微粒子の検討, 日本医事新報 No. 3180,
26-32, 1985.
- 2) Kato, K., Fukui, H., Hamaguchi, Y. and Ishikawa,
E.: Enzyme-linked immunoassay: Con-
jugation of the Fab' fragment of rabbit IgG
with β -D-galactosidase from *E.coli* and its use
for immunoassay. *J. Immunol.* 116, 1554-1560,
1976.
- 3) 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.
- 4) 松井 茂, 中沢次夫, 稲沢正士, 梅枝愛郎, 小林
節雄, 巨智部直久, 佐藤久美子: スギ花粉症診断に
おける polystyrene bead を用いた enzyme im-
munoassay の応用について, アレルギー 34,
6-14, 1985.

FLUOROMETRIC ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE MEASUREMENT OF IgE ANTIBODY TO *CRYPTOMERIA JAPONICA* POLLEN

Masahiro Sakaguchi and Sakae Inouye

Department of Microbiology, Institute of Public Health

Shuji Suzuki

Department of Medicine and Physical Therapy, School of Medicine, University of Tokyo

We have developed a fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay for measuring IgE antibody to *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) pollen. Polystyrene microplates were coated with proteins extracted from the pollen. IgE antibody which attached to the solid-phase antigen was detected by β -galactosidase-conjugated anti-IgE antibody. 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside was used as the enzyme substrate and the fluorescence intensity of the reaction product was measured. The antibody levels determined by this method well correlated with those determined by the "Phadezym RAST". This method is simpler and less expensive to carry out when dealing with a large number of serum specimens in the study of seroepidemiology of the pollinosis.