

[原 著]

エアロアレルゲンイムノブロット法による花粉アレルゲン (Cry j 1, Dac g) を有する花粉種および大気浮遊粒子の同定

山形県衛生研究所, 興和総合科学研究所, 山形大学医学部耳鼻科

高橋裕一 名古屋隆生 太田伸男

バーカード型捕集器を用いてアクリル製の透明・易圧性粘着テープに捕集した大気試料を PVDF 膜と圧着させたまま酵素免疫学的な処理を行うことにより抗原性を有する花粉の種類を同定できることがわかった。この方法を用いれば従来は同定することができなかった形のくずれた抗原性を有する花粉も同定できるようになった。さらに大気浮遊粒子のなかに抗原性を有する粒子があることもわかった。大気試料はスギ花粉及びイネ科花粉の飛散期に捕集した。これらの試料は、スギ花粉飛散期には抗 Cry j 1 モノクローナル抗体で、イネ科花粉飛散期には抗 Dac g ウサギ IgG で処理した。さらにスギ花粉およびイネ科花粉の飛散ピーク期の試料は各々の花粉症患者血清で処理した。その結果いずれの大気試料でも、花粉由来のスポットに加え大気浮遊粒子に由来するスポットが観察された。また、粒子としてはとらえることが出来ない抗原の存在も示された。

Key words : airborne pollen — allergen — Cry j 1 — Dac g — immunoblotting

はじめに

大気中を飛散している花粉のうちで抗原性を有する花粉の種類を知ることが出来れば花粉症患者の診療に際し有意義な情報を提供できると期待される。大気中の花粉抗原を検出する方法としてはニトロセルローズや Polyvinylidene difluoride 膜 (PVDF と略) などに花粉抗原を転写し、それを蛍光抗体法¹⁾あるいは酵素免疫法で処理する方法 (aeroallergen immunoblotting 法)^{2)~8)}が用いられてきた。最近では大気試料を捕集したフィルター上の花粉抗原を化学発光で検出する方法なども開発されている⁹⁾¹⁰⁾。しかし、これらの方法は、いずれも転写された花粉抗原を検出しており、抗原が由来した花粉の種類を同定することができなかった。最近、シドニー大学の研究グループは我々の開発した方法²⁾をもとに、捕集テープに改良を加えてスポット

が由来する粒子を直接、顕微鏡で観察できる方法を報告した¹¹⁾。我々はこの方法で Cry j 1 及びカモガヤ花粉抗原 (Dac g) を有する花粉の種類および大気浮遊粒子の存在を知るため形態を観察した。

方 法

大気試料は Burkard seven-day recording volumetric spore trap (バーカード型捕集器と略) を用いアクリル製の易圧性粘着テープ (Avery Dennison, Painesville, Ohio, USA)¹²⁾ に捕集した。このテープは厚手の透明な樹脂に粘着物が塗布してあるもので PVDF 膜と圧着したまま水溶液中で抗原抗体反応を行うことができる。PVDF 膜は Amersham Life Science 製の Hybound-P タイプを用いた。まず、大気試料を捕集した粘着テープを PVDF 膜と乾燥状態で圧着しサンドイッチ状にした。そして花粉抗原を PVDF 膜に転写するため 20% エタノールを含む TRIS-0.04M グリシン緩衝液 (pH7.6) で 24 時間処理した。次いで 5% ウシ血清アルブミンで blocking 処理を行った後に 0.05M リン酸緩衝食塩水 pH7.6 (PBS と略) で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。続いて 1 次抗体として抗 Cry j 1 モノク

Received : May 10, 2002

Accepted : July 4, 2002

Abbreviations : PVDF polyvinylidene difluoride

高橋裕一 : 山形県衛生研究所 [山形県山形市十日町 1-6-6]

E-mail : ytak4810@eiken.yamagata.yamagata.jp

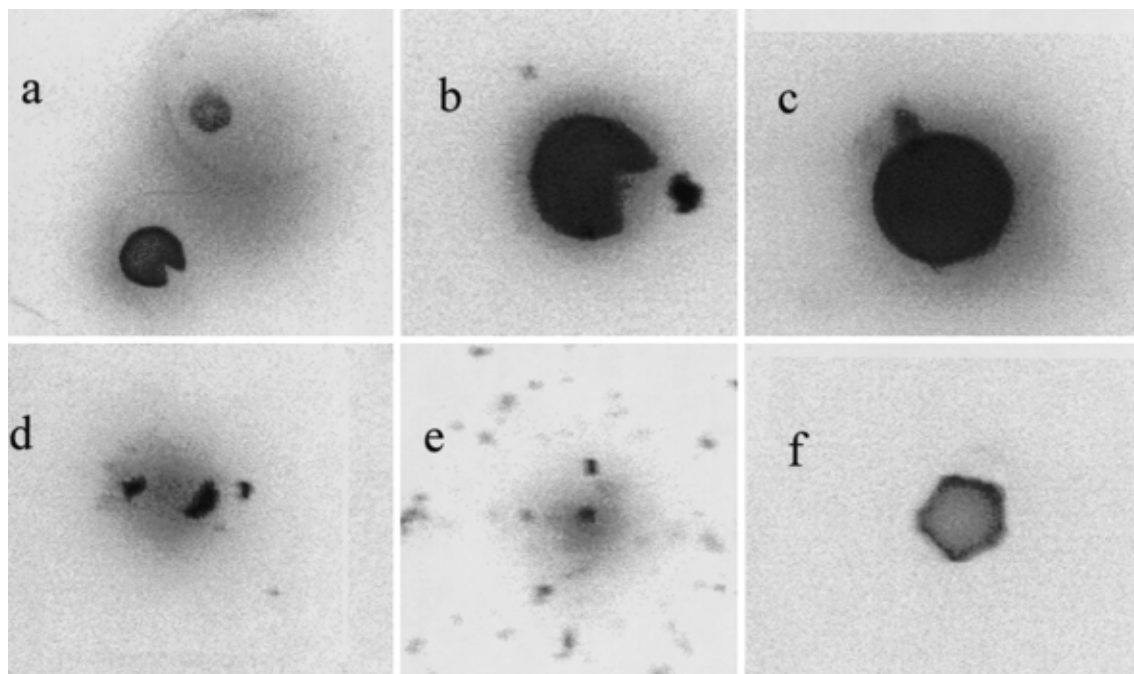


Fig. 1. Cry j 1 spots from airborne sample at *C. japonica* pollen season treated with anti-Cry j 1 Mab.

a, b, c : *C. japonica* pollen. d, e : airborne particulate matter. f : *Alnus* spp. pollen (spot is not obtained).

ローナル抗体 (抗 Cry j 1 Mab と略) の 500 倍希釈液で室温, 2 時間反応させた. 抗 Dac g ウサギ IgG 抗体の場合は 1000 倍に希釈し, スギ花粉症の患者血清は原液を用いた. イネ科花粉症患者血清は RAST スコアにより原液または PBS で 2 倍希釈した液を用いた. 反応後 PBS で 3 回洗浄し, 続いて 2 次抗体を反応させた. 2 次抗体として Cry j 1 の場合は 500 倍に希釈したビオチン標識抗マウス IgG (H+L) ヤギ血清を用い室温で 2 時間反応させた. 抗 Dac g ウサギ IgG では PBS で 500 倍に希釈したビオチン標識抗ウサギ IgG (H+L) ヤギ血清, 花粉症の患者由来のヒト IgE では PBS で 500 倍に希釈したビオチン標識抗ヒト IgE (ϵ 鎖) ヤギ血清を使用した. 反応後 PBS で 3 回洗浄し, 続いてアビジン-アルカリホスファターゼの 500 倍希釈液で室温, 2 時間反応させた. PBS で 3 回洗浄してから BCIP/NBT 基質で処理して花粉抗原を発色させた後, カルベラ液 (グリセリン 5ml, 95% エチルアルコール 10ml, 蒸留水 15ml に飽和塩基性フクシン 3 滴を加える) で染色して光学顕微鏡で観察した. 抗 Dac g ウサギ IgG の作

製は, オーチャード花粉抗原 (Greer Laboratories, Inc. Lenoir NC28645US; 入手先フナコシ株式会社, 蛋白の濃度は 20000PNU) を完全フロイントアジュバントと 1:1 で混合してウサギに 1 週間隔で 5 回免疫した. 抗体価が ELISA 法で 9000 倍の時点で全採血して抗血清 (0~17 F-1) を得た. 抗血清は 35% 飽和硫酸で沈殿画分を集めプロテイン A セファローズ 4B カラムにより IgG を分取した. ビオチン標識抗マウス IgG (H+L) ヤギ血清は KPL Europe, PO Box174, Guildford, UK から, 抗ウサギ IgG (H+L) ヤギ血清と抗ヒト IgE (ϵ 鎖) ヤギ血清は Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA からフナコシ株式会社を通して入手した. 抗 Cry j 1 モノクローナル抗体は興和総合科学研究所製; KW-S91 を用いた. スギ花粉症の患者血清は RAST スコアが 3 の 8 検体をプールした. イネ科花粉症患者血清は RAST スコアが 3 の 2 検体をプールし原液で使用した. また RAST スコアが 4 の 3 検体をプールしたものは一部 2 倍希釈して使用した. 患者のプール血清は各々 10ml ずつ得られたので, 2ml ずつ分

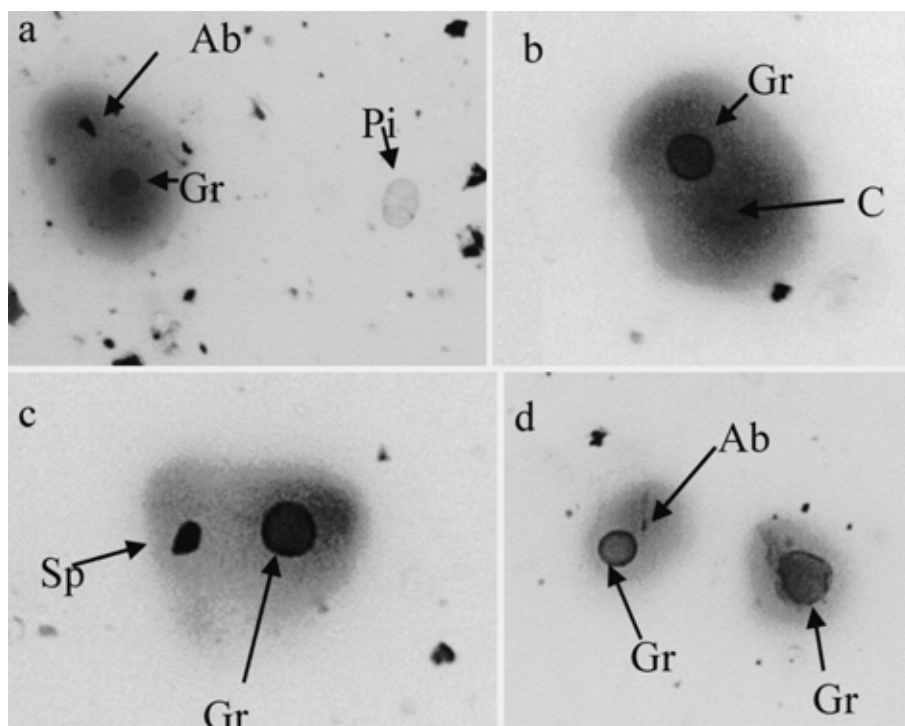


Fig. 2. Dac g spots from airborne samples at grass pollen season treated with anti-Dac g rabbit IgG.

Abbreviations are as follows : Ab ; airborne particles, Gr ; grass pollen, Pi ; *Pinus* Pollen, Sp ; spore, C ; clear particle is not found.

注し、使用時まで -20°C に保存した。プール血清は1回のみを使用した。

結 果

1) 抗 Cry j 1 Mab

抗 Cry j 1 Mab の代わりに正常マウス血清を用い、2次抗体以後の処理を同様に行った場合にはスポットは検出されなかった。スギ花粉の飛散期間に得られた大気試料を抗 Cry j 1 Mab で処理した結果を Fig. 1 に示した。スポットはスギ花粉の周囲にみられ、中心が濃く周囲が薄かった (Fig. 1a~c)。スポットの直径は $50\sim 70\mu\text{m}$ あった。スギ花粉粒子以外の大気浮遊粒子に由来するスポットも観察された (Fig. 1の d と e)。同時期にみられるハンノキ属の花粉ではスポットはみられなかった。

2) 抗 Dac g ウサギ IgG

抗 Dac g ウサギ IgG のかわりに正常ウサギ血清を用い、2次抗体以後の処理を同様に行った場合にはスポットは検出されなかった。イネ科花粉の飛散期間に捕集した大気試料を抗 Dac g ウサギ IgG と反応させた結果を Fig. 2 に示した。形態学的にイネ科花粉と確認されたスポットは Cry j 1 スポットよりサイズが大きく濃いスポットで、直径は $100\sim 150\mu\text{m}$ あった。同時期に飛散するマツ属花粉 (Fig. 2-a の Pi) は抗 Dac g ウサギ IgG とは反応しなかった。大気浮遊粒子に花粉抗原が吸着したと思われるスポット (Fig. 2-a, Fig. 2-d の Ab) やカビの胞子と思われるスポット (Fig. 2-c の Sp) もみられた。またスポットの場所に明らかな粒子を見出せない場合もあった (Fig. 2-b の C)。すでに形がくずれ形態学的にイネ科花粉と同定できない花粉でもスポットが検出された場合はこの方法で同定することが可能であった。

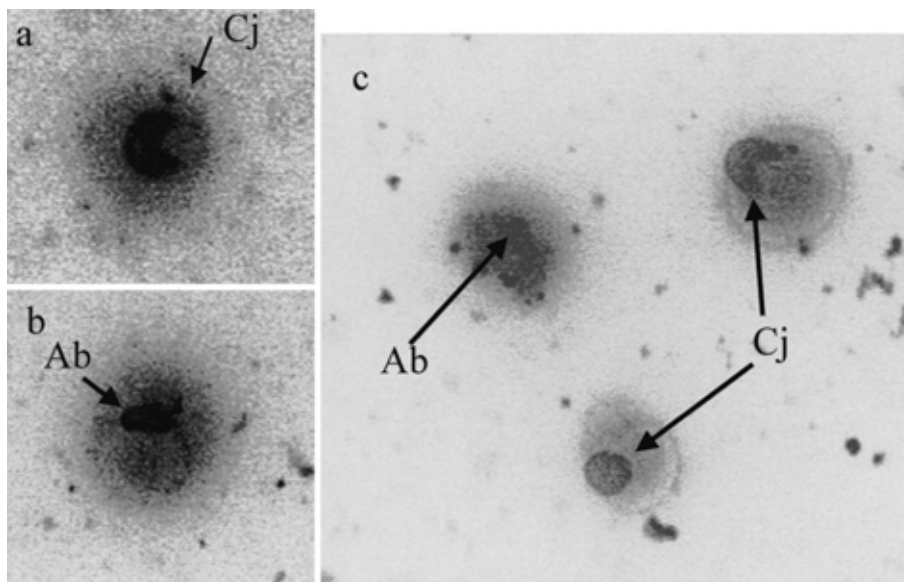


Fig. 3. *Cryptomeria japonica* antigens spots from airborne pollen sample at *C. japonica* pollen season treated with pollinosis patient serum.
Cj ; *C. japonica* pollen, Ab ; airborne particular matter.

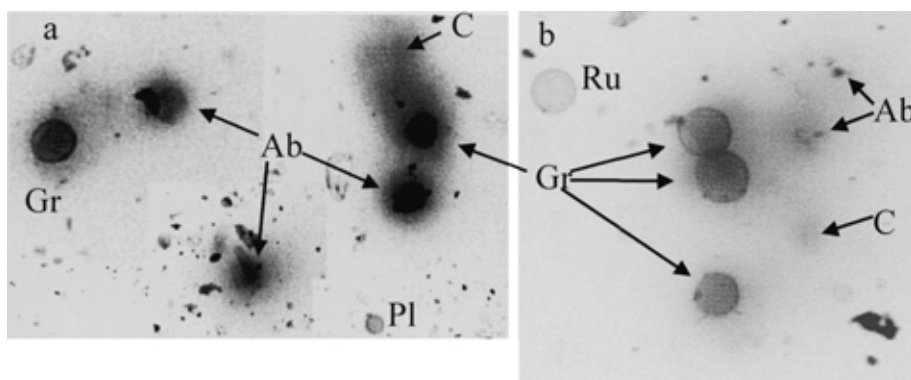


Fig. 4. Grass antigen spots from airborne samples at grass pollen season treated with pollinosis patient serum.
Gr ; grass pollen, Ab ; airborne particular matter, Pl ; *Plantago* spp. pollen, Ru ; *Rumex* spp. pollen, C ; clear particle is not found.

3) 花粉症患者血清

花粉症患者の血清の代わりに陰性コントロールとして花粉症でないヒトの血清を用い2次抗体以後の処理を同様に行ってもスポットは検出されなかった。RAST スコアが3以上の患者血清では, Cry j 1 の場合でも Dac g の場合でも明白なスポットを得ることが

できた。RAST スコアが4の血清では2倍希釈血清を使用した場合でも明白な Dac g スポットが得られた。スギ花粉症患者及びイネ科花粉症の患者の血清を用い, それぞれの花粉飛散ピーク期に捕集した大気試料と反応させた。スギ花粉症患者の血清ではスギ花粉粒子 (Fig. 3 の Cj) に, イネ科花粉症患者の血清ではイネ

科花粉粒子 (Fig. 4 の Gr) に由来するスポットが観察された。花粉に由来すると思われるスポットの他に、大気浮遊粒子に花粉抗原が吸着したと思われるスポット (Fig. 3-b, Fig. 3-c の Ab, Fig. 4 の Ab) もみられた。またスポットの場所に明らかな粒子を見出せない場合もあった (Fig. 4 の C)。

考 察

バーカード型捕集器で捕集した大気中の飛散花粉の抗原性を花粉形態と対比させることで従来は同定することが不可能であった形がくずれた花粉を同定できるようになった。Fig. 2-d の Gr (写真で右側の花粉) がその一例で、詳細に調べると花粉管口は 1 個でイネ科花粉の花粉管口に酷似していた。したがって、我々はこの形がくずれた花粉はイネ科花粉と考えている。またスポットのサイズが無傷のイネ科花粉に比べ小さく薄いことからすでにこの花粉に残存する抗原の量は無傷の花粉よりは少ないと考える。この方法は大気試料中の花粉のうちで抗原性を有する花粉の形態を知る手法としても利用できる。さらに花粉症患者の血清を用いれば、患者が有している IgE 抗体と反応する花粉の形態を知ることが出来る。手法は先に我々が報告した酵素免疫学的方法^{2)~6)}に準ずるが、大気試料を捕集した後のテープは PVDF 膜 (アレルゲンを転写させる) と常時密着させた状態で処理しなければならない。そのため転写時間は従来法に比べ長時間を要するという難点がある。さらにバーカード捕集器専用のテープのメリネックステープに白色ワセリンを塗布して使用した場合に比べ花粉の捕集効率が低かった。特にスギ花粉では測定値が 1/2~1/3 に低下した。したがって、この粘着テープは花粉を常時測定し情報提供するという目的には向いていない。上記のように抗原性を有する花粉を同定する目的に適した方法といえる。

各種抗体を使い酵素免疫学的な染色を行った結果、Cry j 1 および Dac g ではいずれもそれぞれの花粉に由来するスポットの他に大気浮遊粒子に由来するスポットがみられた。花粉抗原を吸着した大気浮遊粒子の性状については明らかではないが、DEP (diesel-exhausted particulates) のように炭素を主成分とするものであれば、周囲の蛋白質を容易に吸着するため可能性としては高いと考えている。現在、X 線アナライザーを装備した SEM での解析を試みている。DEP な

どの大気汚染粒子に吸着した花粉抗原は感作の過程に関与している¹³⁾ことは十分に考えられる。花粉症対策は飛散花粉の量に注目するだけでなく、再飛散のキャリアーとなる大気浮遊粒子にも注目して早期にそれらの粒子を特定して削減を図る事が重要と考える。この論文では、花粉そのものの他にその花粉の抗原性を有する大気浮遊粒子が花粉飛散期には存在することを明らかにした。また従来は同定することが不可能であった抗原性を有する形のくずれた花粉を同定することもできた。

本研究は平成 13 年度山形県企画調整課の産学官連携研究プロジェクト推進事業「花粉アレルギー情報提供システムの開発」として行われた。論文作成は結城留美氏の協力を得た。

文 献

- 1) Schumacher, M.J., Griffith, R.D. and O'Rourke, N. K. : Recognition of pollen and other particulate aeroantigens by immunoblot microscopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **82**, 608-616, 1988.
- 2) Takahashi, Y., Nagoya, T., Watanabe, M., Inouye, S., Sakaguchi, M., et al. : A new method of counting airborne Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens by immunoblotting. *Allergy* **48**, 94-98, 1993.
- 3) 高橋裕一, 井上 栄, 阪口雅弘, 片桐 進 : イムノブ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.
- 4) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., Inouye, S., Nagoya, T., Watanabe, M., et al. : Confirmation of the airborne occurrence of micron-size airborne pollen antigen carrying particles by immunoblotting. *Allergie et Immunologie* **25**, 60-62, 1993.
- 5) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., Inouye, S., Yasueda, H., Shida, T., et al. : Airborne grass pollen antigens in a grassland as studied by immunoblotting with anti-Lol p 1 antibody. *Grana* **32**, 302-307, 1993.
- 6) Takahashi, Y., Nilsson, S. and Berggren, B. : Aeroallergen immunoblotting with human IgE antibody. *Grana* **34**, 357-360, 1995.
- 7) Yli-Panula, E., Takahashi, Y. and Rantio-Lehtimäki, A. : Comparison of direct immunostaining and electroimmunoassay for analysis of airborne

- grass-pollen antigens. *Allergy* **52**, 541-546, 1997.
- 8) 高野雅子, 村上功啓, 村野正知, 尾上洋一, 高柳幹, 他: 空中スギ花粉抗原の定量的測定—重力法, イムノブロット法の比較と気象因子の影響. アレルギー **42**, 803-808, 1993.
 - 9) Holmquist, L. and Vesterberg, O.: Luminescence immunoassay of pollen allergens on air sampling polytetrafluoroethylene filters. *J. Biochem. Biophys. Methods* **41**, 49-60, 1999.
 - 10) Acevedo, F., Versterberg, O. and Bayard, C.: Visualization and quantification of birch-pollen allergens directly on air-sampling filters. *Allergy* **53**, 594-601, 1998.
 - 11) Razmovski, V., O ' Meara, T.J., Taylor, D.J.M. and Tovey, E.R.: A new method for simultaneous immunodetection and morphologic identification of individual sources of pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 725-731, 2000.
 - 12) Razmovski, V., O ' Meara, T., Hjelmroos, M., Marks, G. and Tovey, E.R.: Adhesive tapes as capture surfaces in Burkard sampling. *Grana* **37**, 305-310, 1998.
 - 13) Takafuji, S., Suzuki, S., Koizumi, K., Tadokoro, K., Miyamoto, T., et al.: Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **79**, 639-645, 1987.

IDENTIFICATION OF AIRBORNE POLLEN AND AIRBORNE PARTICLES WITH POLLEN ALLERGEN (CRY J 1, DAC G) BY AEROALLERGEN IMMUNOBLOTTING TECHNIQUE

Yuichi Takahashi¹⁾, Takao Nagoya²⁾ and Nobuo Ohta³⁾

¹⁾*The Yamagata Prefectural Institute of Public Health*

²⁾*Kowa Research Institute, Kowa Co., Ltd.*

³⁾*Department of ENT, School of Medicine, Yamagata University*

After collection of airborne particles with a seven-day recording volumetric spore trap (Burkard model) using optically clear, pressure sensitive acrylic adhesive tapes, a dry PVDF membrane was pressed down firmly onto the adhesive tape, antigen-antibody reaction was performed in full contact with the tapes and PVDF membrane. Dark purple spots from airborne pollen allergens were examined under a light microscope to evaluate the form of pollens and particles with the antigenicity. It is clarified that identification of the form of pollens with the antigenicity is possible not only pollens with the antigenicity but a pollen has already lost its shape, and it is also clarified that some airborne particular matters have the pollen antigenicity. Airborne samples were collected during the *Cryptomeria japonica* or grass pollen season. Samples collected during the *C. japonica* pollen season were treated with anti-Cry j 1 monoclonal antibody, and those during the grass pollen season with anti-Dac g rabbit IgG. Samples collected during the *C. japonica* and the grass pollen peak season were treated with antibodies from sera of pollinosis patients. Spots originated not only from relevant pollen grains but also from parts of airborne particular matter have the pollen antigenicity and some spots could not observed for any kind of particles.