

ELISAによるスギ花粉に対する IgE抗体の測定

山口県衛生公害研究センター

數田行雄・森重徹洋・實政智恵
岩崎 明・遠藤隆二・宮村恵宣

Measurement of IgE Antibody to Japanese Cedar Pollen by ELISA

Ikuo KAZUTA, Tetsuhiro MORISHIGE, Chie SANEMASA
Akira IWASAKI, Ryuji ENDO, Shigenori MIYAMURA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health

はじめに

近年スギ花粉症の患者数が増加し¹⁻³⁾、公衆衛生上の問題となっていることから、全国各地でスギ花粉症の実態調査が行われている⁴⁻⁶⁾。著者らも、山口県のスギ花粉症の実態を把握するため、1職域集団を対象にアンケート調査を行い、また、アンケート調査に併せて、市販のキットを用いてスギ花粉に対するIgE抗体(特異IgE抗体)の測定を行っている⁷⁾。

スギ花粉症の実態を把握するためには、より多くの集団における特異IgE抗体の保有状況を調査することが必要と考えられるが、市販のキットは、高価であり、また、専用の機器を必要とするため、集団の調査に適用するには限界がある。この目的にかなう方法として、Polystyrene beadを用いた吸光度測定によるEnzyme-linked immunosorbent assay⁸⁾(ELISA)やMicroplateを用いた蛍光測定によるELISA⁹⁾が報告されている。

今回は、上記2方法のそれぞれの特長を応用する方法として、容易に多検体の測定を行うことができるMicroplateを用い、蛍光測定と比べてより一般的な吸光度測定によるELISAで特異IgE抗体を測定する方法について検討した。また、スギ花粉抗原の分析を行うために、Immunoblottingを行った。

材料及び方法

血清：1994年10月に採血したヒトの血清(-80℃保存)を用いた。

ELISA(Microplate法)：ELISAは、阪口らの方法⁹⁾を応用し、蛍光測定の代わりに吸光度測定により行った。

スギ花粉抗原は、1993年3月に山口市内で採取し-20℃で保存していたスギ花粉からYasuedaら¹⁰⁾の方法によって抽出し、タンパク質濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製して用いた。抗原溶液100 μl をMicroplateの各ウェルにコーティングし、1%BSAでブロッキングした後、4倍に希釈した被検血清100 μl を加え、室温で3時間振とうした。洗浄後、ビオチン化抗ヒトIgE抗体(1:1000)を加え、室温で一晩静置した。洗浄後、p-ニトロフェニルリン酸を酵素基質としてアビジン・ビオチン化酵素複合体キット(Vectastain ABC-AP Kit, Vector)により、特異IgE抗体を測定した。また、市販の特異IgE抗体測定キット(A社、B社)を用いて被検血清の特異IgE抗体を測定し、Microplate法の結果と比較した。

スギ花粉抗原タンパク質の分析：Laemmli法¹¹⁾によるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE, PAG濃度10%)で行った。試料(タンパク質量：5 μg)は非還元状態で泳動し、銀染色法¹²⁾でタンパク質を染色した。

特異IgE抗体-Immunoblotting：スギ花粉抗原(タンパク質量：2.5 μg)をSDS-PAGEで分離した後、セミドライ型装置によりニトロセルロース膜(NC膜)に転写した¹³⁾。転写後のNC膜は、3%BSAでブロッキングした後、10倍に希釈した被検血清1.2 ml を1次抗体として加え、以降はELISAと同じシステムでスギ花粉抗原と特異IgE抗体との反応をみた。反応は、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸ナトリウムを酵素基質として用いるBlakeら¹⁴⁾の方法により行った。

結果及び考察

84名の血清について、Microplate法と市販のキットの結果を比較した。Microplate法と市販のキットの吸光度(OD₄₀₅)の間には、A社では $r=0.904$ 、B社では $r=0.727$ と、いずれも良好な相関が認められた ($p<0.01$)。このことから、Microplate法は、特異IgE抗体の測定に十分利用できることが確かめられた。しかし、Microplate法及びA社のキットでは高い吸光度を示すが、B社のキットでは陰性のものが6例認められた(図1, ●印)。この6例は、いずれも花粉症に関するアンケート調査では、花粉の種類は分からないが、春に花粉症の症状があると答えた者であった。

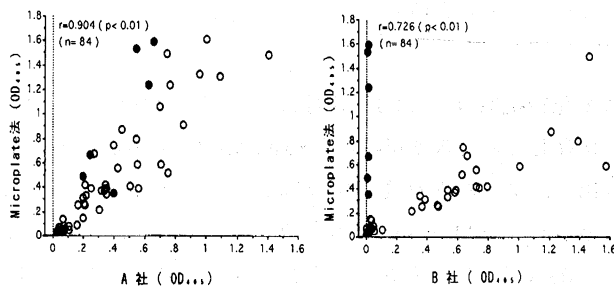


図1 Microplate法とA社及びB社キットとの比較

今回、検討したMicroplate法は、抗原のコーティング以降の測定原理は、市販のキットと同じであることから、この結果の相違は、使用した抗原の違いに由来すると思われるので、Microplate法で用いたスギ花粉抗原の分析を行った。また、Microplate法とB社のキットで結果に相違のみられた血清では、反応する抗原成分に違いがあるかを明らかにするために、特異IgE抗体-Immunoblottingを行った。

スギ花粉タンパク質のSDS-PAGE像(図2)は、分子量(MW)約50,000以下の低分子領域に主にタンパク質バンドが認められた。スギ花粉のメジャーアレルゲンとしては、Cry j I (MW46,000と41,000)¹⁰⁾とCry j II (MW37,000)¹⁵⁾が報告されている。今回、抗原として用いたスギ花粉抽出液には、Cry j Iに相当すると考えられるタンパク質バンド(○印: MWは約45,000及び40,000)及びCry j IIに相当すると考えられるタンパク質バンド(●印: MWは約37,000)が認められた。従って、今回Microplate法で用いたスギ花粉抽出液には、メジャーアレルゲンCry j I, II共に抽出されていると考えられた。

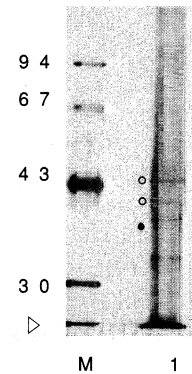
MW (×10³)

図2 スギ花粉抽出液のSDS-PAGE像

M: 分子量マーカー
1: スギ花粉抽出液
▷: 泳動先端

このスギ花粉抽出液を用いた特異IgE抗体-Immunoblot像(図3)は、Microplate法、A社及びB社のキット共に陰性の血清(血清3)では、バンドは認められなかった。一方、Microplate法、A社及びB社共に陽性の血清(血清1: 医師によりスギ花粉症と診断された者)では、2本のバンド(○印)が認められた。また、Microplate法とA社では陽性で、B社では陰性の血清(血清2: OD値はMicroplate法で1.594, A社で0.656, B社で0.013)では、血清1と同じ位置に2本のバンド(○印)が認められた。この2本のバンドの位置は、図2のCry j Iの2本のバンド(○印)の位置と一致していた。従って、血清1, 2は共にCry j Iと反応しており、血清1と血清2では反応する抗原成分に違いは認められなかった。また、図1の●印の残り5例も、血清2と同じImmunoblot像を示した。

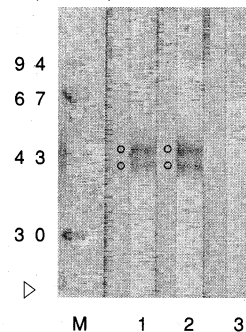
MW (×10³)

図3 抗スギ花粉IgE-Immunoblot像

M: 分子量マーカー
1: Microplate法、A社及びB社共陽性血清
2: Microplate法とA社陽性でB社陰性血清
3: Microplate法、A社及びB社共陰性血清
▷: 泳動先端

このことから、これら6例は、血清1と同様に血清学的にはスギ花粉症と推察され、Microplate法の有用性が示された。Microplate法は、一度に多検体の測定を行うことができ、また、一般に普及している吸光度測定機器で測定できることから、集団を対象とした調査に有利である。

以上のことから、今回検討したMicroplate法は、集団を対象とした特異IgE抗体を測定するのに有用な方法と考えられた。

なお、血清2がB社のキットで陰性であった理由は、今回の実験では明らかにできなかった。

まとめ

集団を対象としたスギ花粉に対するIgE抗体を測定するため、Microplate法を用いたELISAを検討した。

Microplate法は、市販の特異IgE抗体測定キットと有意 ($P < 0.01$) の相関を示し、また、Immunoblottingとも一致した結果が得られ、特異IgE抗体の測定方法として有用と考えられた。

文献

1) 中村正治ほか：日本医事新報, No.3180, 26~32 (1985)

- 2) 榎本雅夫：Pharma Medica, 4, 127~131 (1986)
- 3) 斎藤洋三：アレルギーの臨床, 11, 168~170 (1991)
- 4) 榎本雅夫ほか：日耳鼻, 92, 597~601 (1989)
- 5) 高橋裕一ほか：山形衛研所報, 24, 115~120 (1991)
- 6) 笹島 肇ほか：秋田県衛生科学研究所報, 36, 75~77 (1992)
- 7) 森重徹洋ほか：山口衛公研業報, 16, 4~10 (1995)
- 8) 松井 茂ほか：アレルギー, 34, 6~14 (1985)
- 9) 阪口雅弘ほか：アレルギー, 35, 233~237 (1986)
- 10) Yasueda, H. et al : J. Allergy Clin. Immunol., 71, 77~86 (1983)
- 11) Laemmli, U. K. : Nature, 227, 680~685 (1970)
- 12) Heukeshoven, J. et al : Electrophoresis, 6, 103~112 (1985)
- 13) Kyhse-Anderson, J. : J. Biochem. Biophys. Methods., 10, 203~209 (1984)
- 14) Blake, M. S. et al : Anal. Biochem., 136, 175~179 (1984)
- 15) Taniai, M. et al : FEBS Lett., 239, 329~332 (1988)