

(原著論文)

ウメ花粉特異的 IgE 抗体について

榎本 雅夫¹⁾・嶽 良博¹⁾・齊藤 優子¹⁾・裕田 猛真¹⁾・瀬野 悟史¹⁾・
 十河 英世¹⁾・藤村 聡¹⁾・藤木 嘉明¹⁾・大西 成雄²⁾・遠藤 朝彦³⁾・
 今井 透³⁾・宇井 直也³⁾・井手 武⁴⁾

¹⁾ 日本赤十字社和歌山医療センター耳鼻咽喉科 〒640-8269 和歌山市小松原通4丁目20

²⁾ LCD アレルギー研究所 〒587-0025 大阪市東成区中道2丁目9番2号

³⁾ 東京慈恵会医科大学耳鼻咽喉科 〒105-8461 東京都港区西新橋3丁目25番8号

⁴⁾ 奈良県立医科大学化学教室 〒634-0813 橿原市四条町840

(1999年11月18日 受付, 2000年1月31日 受理)

Specific IgE Antibody against Plum-Tree (Ume) Pollen

Tadao ENOMOTO¹⁾, Yoshihiro DAKE¹⁾, Yuko SAITOH¹⁾, Takema SAKODA¹⁾,
 Satoshi SENO¹⁾, Hideyo SOGO¹⁾, Satoshi FUJIMURA¹⁾, Yoshiaki FUJIKI¹⁾,
 Shigeo ONISHI²⁾, Tomohiko ENDO³⁾, Toru IMAI³⁾, Naoya Ui³⁾
 and Takeshi IDE⁴⁾

¹⁾ *Department of Otolaryngology, Japanese Red Cross Society, Wakayama Medical Center,
 Komatsubara, Wakayama-shi, 640-8269 Japan*

²⁾ *LCD Laboratory for Allergy,
 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka-shi, 587-0025 Japan*

³⁾ *Department of Otolaryngology, The Jikei University School of Medicine,
 Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo, 105-8461 Japan*

⁴⁾ *Department of Chemistry, Nara Medical University,
 Shijouchou, Kashihara-shi, Nara, 634-0813 Japan*

Using the pollen of "Nankou-bai" cultured in Minabe town of Wakayama Prefecture, a system of measuring the specific anti IgE antibody was made by us and the basic examinations, such as, dilution test, specific test, reproductivity of intra-assay and inter-assay were performed in this way. The results of this system showed satisfaction. Moreover, the reference curve was drawn on this paper. For clinical diagnosis, we used 10 sera of non-allergic persons and 10 sera of cord bloods for discriminating the positive and negative value.

To know the sensitive rate of persons living in the Minabe town of Wakayama Prefecture where they culture Plums and process them as a famous product "Ume-boshi", the mentioned above system was used. The results are as follows; 20 of 160 cases (12.5%) showed positive reaction, 5 cases of them (3.1%), pseudo-positive and 135 cases of them (84.4%), negative. The result proved a surprisingly high sensitive rate of the specific IgE antibody. Only 5 of the cases represented Ume-pollen sensitized persons, 3 of them have

clinical symptoms. It is difficult to diagnose Ume pollinosis because Ume- and Sugi-airborn pollens are in the air at the same time period.

In conclusion a long observaion time is necessary in order to know the fluctuation of the sensitivity rate and the incidence in this town.

Key Words : Plum-tree (Ume) pollen, Specific IgE antibody, System of measuring, Sensitive rate

はじめに

梅干しは和歌山県の特産品で紀州の梅干しとして名高く、日本の梅干し総生産量の約半分を生産している。和歌山県の中でも南部町、南部川村の南部郷、その隣接地の田辺市でそのほとんどが栽培されている。平成9年の統計によると、南部郷の樹林面積は約14%、栽培従事者は総戸数の約35%にも上る。ウメと同じバラ科植物による花粉症としてリンゴ⁽¹⁾、イチゴ^(2, 3)、モモ⁽⁴⁾、バラ⁽⁵⁾等が報告されている。

ウメ栽培では直接人工授粉することはないが、長期にウメ栽培に従事している人では、ウメ花粉に感作される機会も多いと考えられる。しかし、ウメ花粉特異的IgE抗体測定キットがないため、住民がどの程度に感作されているかや感作されたものの内、どの程度にウメ花粉症を発症しているかについては全く報告がない。そこで、ウメ花粉特異的IgE抗体の測定系を組み、基礎的検討を行ったので報告する。さらに、感作の状況についての成績も検討した。

対象と方法

1. 対象

和歌山県日高郡南部町において平成10年度の科学技術庁のスギ花粉症研究班の疫学調査時に得られた血清を対象とした。対象者の年齢は、10～86歳(平均50.09±17.65歳)、男61例、女99例で、対象者は町内3自治体の自由集団であった。検診の結果、スギ花粉症または通年性アレルギー性鼻炎のあるもの60例、疑い例31例、スギ花粉症や通年性アレルギー性鼻炎のないもの69例であった。

2. 方法

1) ウメ花粉粗抗原液の抽出

最も一般的な栽培種の南高梅の花序を1999年の春に採取し、芍ごと0.1M Tris-HClで抽出し、凍結乾

燥末とした。使用にあたっては凍結乾燥末400 μ gをpH7.2 PBS 1mlに溶解後、tube coatingの固相抗原とした。

2) ウメ花粉特異的IgE抗体の測定法 表1

測定法がないので、ウメ花粉特異的IgEの測定法は、図1に示すようなELISA法で行った。すなわち、NUNC社製Tubeにウメ粗抗原をcoatingし、洗浄後HSA(2%)でblocking、洗浄後対照液または検体を注入、37 $^{\circ}$ C5時間のincubation後、洗浄。次に、ビオチン化抗IgE抗体(抗ヒトIgEはSigmaのモノクローナル抗体100 μ g/vialを用いてビオチン化)を入れ、37 $^{\circ}$ C5時間インキュベートし、洗浄。さらに、ストレプトアビジン・ガラクトシダーゼ(Boeringer Mannheim社)を入れincubation。洗浄後、呈色液でincubation、反応停止液を注入後、攪拌し、プレートに液を移して、415nmで吸光度を測定した。

3) 希釈試験

測定系が成立しているかどうかを検討した。8例のウメ花粉特異的IgE抗体を持つ血清および非アレルギー例3血清を対象に、0.1% HSA/0.01M PBS(pH7.4)を用いて、2倍希釈系列で128倍まで希釈し、希釈試験を行った。

4) 特異性試験

ウメ花粉特異的IgEだけが測定できるかについて、ウメ特異的IgE抗体陽性血清2例とカモガヤ花粉、スギ花粉、ヨモギ花粉に特異的IgE抗体を持つ検体を用いて、希釈試験により特異性を検討した。

5) 再現性

3種の異なる検体を用いて、同時再現性と日差再現性について検討した。同時再現性は6回測定とした。日差再現性は5日間毎日連続して測定した。

6) Reference血清の設定

この測定系をウメ花粉症の診断に応用するために、reference血清を設定した。

7) 陽性判定ラインの設定

臨床応用するために、非アレルギー例10例および

NUNC社製Tubeにウメ抗原100 μ l(凍乾末400 μ g/ml) coating
 洗浄後Blocking(1%HSA/PBS) 300 μ l
 陰性血清および検体100 μ lの注入
 37 $^{\circ}$ C 5時間インキュベート
 洗浄, 2.5ml(0.05% Tween20/PBS), 3回
 Anti IgE Ab-Biotin 100 μ lの注入
 37 $^{\circ}$ C, 5時間インキュベート
 洗浄, 2.5ml, 3回
 Streptoavidin-Galactosidase(1 : 1000) 100 μ lの注入
 25 $^{\circ}$ C 5時間インキュベート
 洗浄, 2.5ml, 3回
 呈色液(基質) 100 μ lの注入
 37 $^{\circ}$ C 20分インキュベート(静置)
 反応停止液(Na_2NO_3)100 μ lの注入後、攪拌
 415nmで吸光度測定

図1. ウメ花粉特異的 IgE 抗体の測定方法

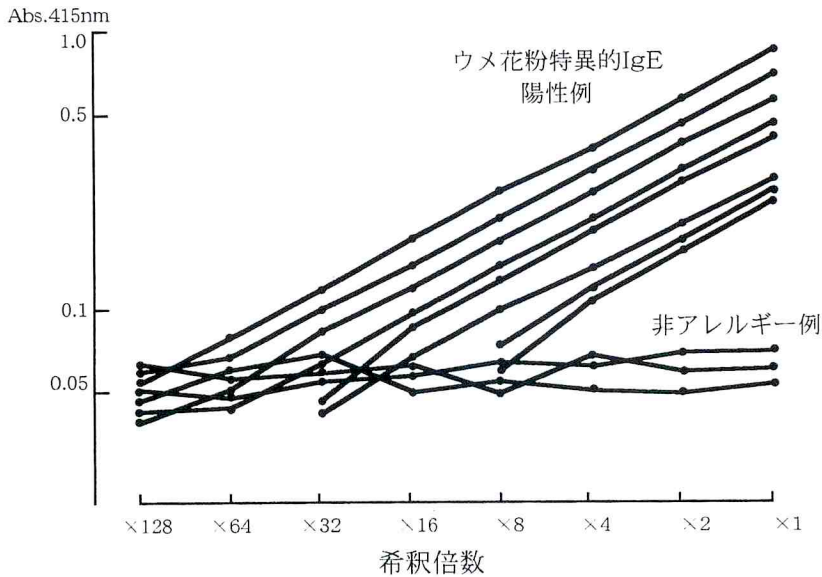


図2. 希釈試験：ウメ花粉特異的 IgE 抗体陽性例と非アレルギー例を対象にした希釈試験。陽性例では希釈倍率に依存して吸光度が減少し、希釈パターンの平行性が認められる。

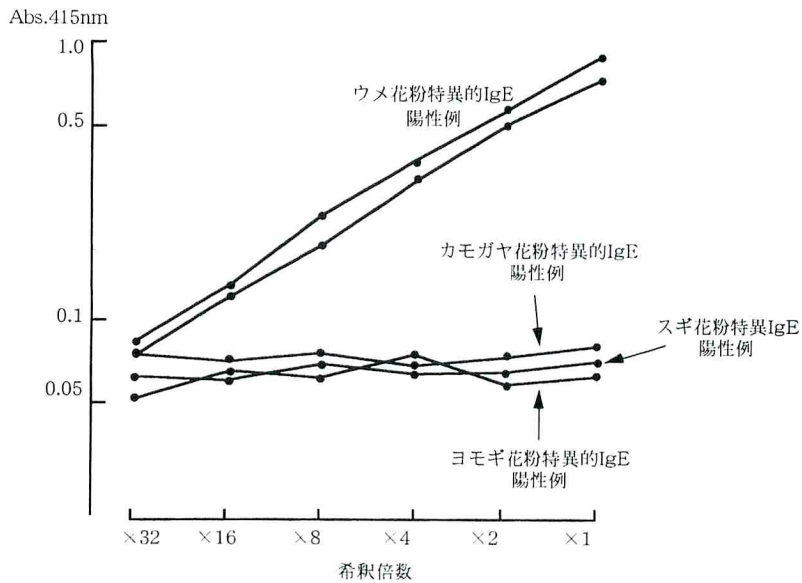


図3. 特異性試験：ウメ花粉特異的 IgE 抗体陽性例のみ希釈倍率に依って吸光度が減少するが、その他の花粉特異的 IgE 抗体陽性例ではこのような現象が見られない。

表1.

	同時再現性		
	No. 127	No. 71	No. 130
1	80.9	68.8	18.0
2	81.5	64.3	17.9
3	84.3	68.9	18.3
4	79.8	69.6	18.7
5	82.1	61.3	17.0
6	86.2	68.5	18.5
7	82.6	69.9	18.0
mean	82.43	67.33	18.14
S. D.	2.183	3.248	0.586
C. V.	2.64%	4.82%	3.23%

	日差再現性		
	No. 127	No. 71	No. 130
1日目	82.4	67.3	18.1
2日目	84.1	66.2	19.2
3日目	79.9	65.8	18.6
4日目	83.7	69.3	17.8
5日目	80.6	67.4	18.3
mean	82.14	66.4	18.40
S. D.	1.853	2.203	0.534
C. V.	2.26%	3.32%	2.90%

C. V. : Coefficient of Variation

臍帯血 10 例を本測定系で測定し、陰性判定域、疑陽性域、陽性域について、Wide ら⁽⁶⁾の提案する陰性判定ラインの 2 倍以上を陽性として、設定した。ついで、今回得た 160 例の血清を対象に南部町におけるウメ花粉感作状態について検討した。

成 績

1. 希釈試験 図2

ウメ花粉特異的 IgE の陽性例 8 例と非アレルギー

例 3 例に対して、2 倍希釈で評価した結果、陽性検体は濃度依存的に吸光度は減少し、各検体の希釈直線性および希釈パターンの平行性が認められた。非アレルギー例では、希釈による吸光度の変化はなく、全てのポイントで低値を示していた。これにより測定系の成立が確認できた。

2. 特異性試験 図3

ウメ花粉特異的 IgE 抗体測定の特異性について、その陽性血清 2 例とウメ花粉以外のカモガヤ花粉、スギ花粉、ヨモギ花粉特異的 IgE の陽性検体を用いて

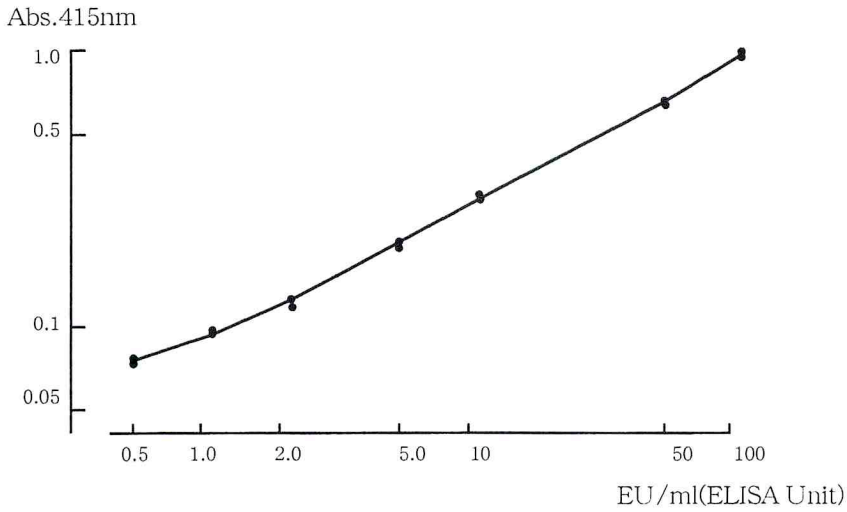


図4. ウメ花粉特異的 IgE 抗体の Reference curve

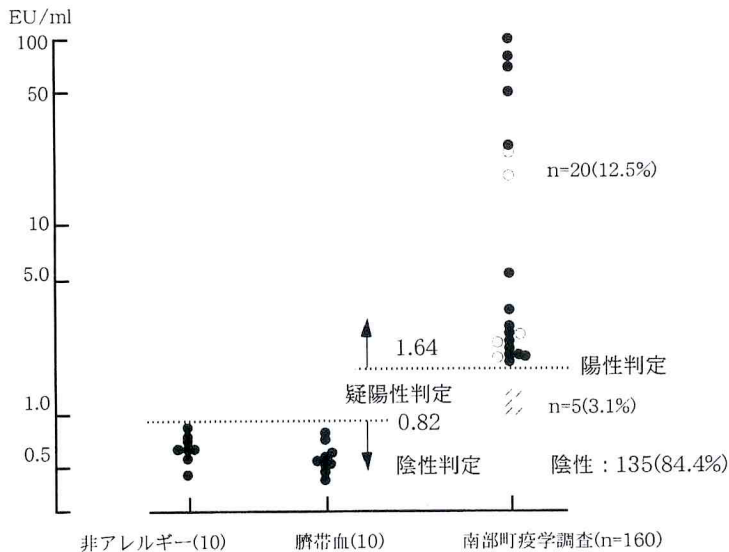


図5. ウメ花粉特異的 IgE 抗体陽・陰性の判定. ○はウメ花粉単独感作症例

希釈試験を行った。その結果、ウメ花粉特異的 IgE 陽性検体のみ、濃度依存的に吸光度が低下し、他の花粉特異的 IgE 陽性例での反応は認められなかった。また、ウメ以外の花粉との交叉性もなかった。

3. 再現性 表1

再現性を検討し結果、3種の異なる検体において、同時再現性は CV % 2.64 - 4.82%、日差再現性は CV % 2.26 - 3.32%と良好な結果を得た。

4. Reference 血清の設定 図4

測定検体中最も高い titer を示した検体を用いて reference 血清を設定した。単位は EU / ml (ELISA Unit) とすると、0.5 - 100EU / ml の範囲が読みとれた。

5. 陽・陰性の決定 図5

非アレルギー例 10 例および臍帯血 10 例を測定した結果、いずれも 0.82EU / ml 以下の値を示した。したがって、それ以下の値を陰性判定とした。さらに、RAST 法を考案した Wide ら⁽⁶⁾の提案に従い、陰性

判定ラインの2倍以上を陽性とする1.64EU/ml以上が陽性であった。その中間は疑陽性とした。

この判定基準で、疫学調査160例を判定した結果、160例中20例12.5%が陽性、5例が疑陽性3.1%、135例84.4%が陰性判定であった。

考 察

ウメ *Prunus mume*, Japanese Apricot, Plum tree は被子植物門、双子葉植物綱、離弁花亜綱、バラ目、バラ科、サクラ属に分類される植物である⁽⁷⁾。その花粉の大きさは、約30~40 μ mで、幾瀬分類によれば赤道3溝型である。極観像は鈍三角または円形、赤道観像は扁平・長円形、口は3筒で幅:長さは1:2で、花粉粒で最も多い型である。彫紋模様は指紋状である。和歌山県の梅干しは紀州梅として名高く、生産高は平成9年の統計によると、日本の総生産量136,200tの内、和歌山県は75,800tと約56%を占め、和歌山県の南部町、南部川村の南部郷、その隣接地の田辺市でそのほとんどが栽培されている。南部郷の樹林面積は約14%、栽培従事戸数は総戸数の約35%にも上る。

すでに、打越ら⁽⁸⁾は1981年は南部川村の住民の6症例のウメ花粉症を報告している。臨床症状としては、くしゃみ発作、水性鼻汁、鼻閉の鼻アレルギー症状の他、眼の掻痒感、流涙が全例に、1例に咽頭掻痒感を伴っていたが下気道症状を伴っていたものは1例もなかったとしている。

今回、南部川村と隣接する南部町が科学技術庁「スギ花粉症克服に向けた総合研究」の調査地に選ばれたので、地理的条件からウメ花粉に感作の機会が多いと考えられる住民の特異的IgE抗体を測定を試みた。ウメ特異的IgE抗体を測定するキットがなく、打越ら⁽⁸⁾は特異的IgE抗体の測定に従来のPharmacia RASTに準じた方法で、BrCN activated disc 1枚に、ウメ花粉の凍結乾燥末40 μ gをcouplingし測定している。しかし、この測定方法で果たして正確に特異的IgE抗体が測定できているのかどうかの基礎的検討の報告はされていない。特異的IgE抗体の測定方法は、彼らが報告した1981当時に比べ長足の進歩を遂げている⁽⁹⁻¹²⁾。このような測定手技を使用して、まず特異的IgE抗体の測定系を組み、基礎的検討を行った。その結果、希釈試験、特異性試験、同時・日差再現性で満足する測定系が組めたと考えている。さらに、reference血清を設定し、臨床に役立つように非アレ

ルギー例10例および臍帯血10例を対象に、陽・陰性の判定値を設定することができた。

この判定基準で、疫学調査160例を判定した結果、160例中20例12.5%が陽性、5例が疑陽性3.1%、135例84.4%が陰性判定であった。先に述べたように、同じバラ科植物による花粉症としてリンゴ、イチゴ、モモ、バラ等が報告されている。これらの花粉症は職業性花粉症として報告されている。ウメの栽培は、リンゴ、モモなどのそれとは異なり人工受粉は必要なく、作業は下草の刈り取り、殺虫剤の噴霧が主な作業である。したがって、このように高い感作率は非常に興味を引かれる。調査を行った南部町と南部川村の南部郷の樹林面積は約14%、栽培従事戸数は総戸数の約35%にも上るため、これらの町村全体がウメ花粉の感作を受ける機会があると言っても過言でなからう。ウメは虫媒花で花粉の飛散距離もさして長くはないが、この地におけるウメ樹木の密度に起因するものであろう。月岡ら⁽¹³⁾は、家族も本人もナシ栽培には従事しておらず、ナシ栽培地域に居住しているだけでナシ花粉に感作されたと思われる症例の報告をしている。このようなアレルギーをいわゆる職業性アレルギー⁽¹¹⁾として分類してしまうべきかどうかについては多少の疑問が残る。

ウメ特異的IgE抗体陽性者の20例をMAST⁽¹²⁾で測定したスギ特異的IgE抗体陽性例との関係を見たが、その中で、スギ花粉抗体陰性、ウメ花粉抗体陽性例が5例あった。これらの5例はMAST26による特異的IgE抗体が全て陰性で、ウメ花粉単独感作例であった。この内、花粉飛散時期に症状を持っているものは3例あり、これらの症例は、単独感作の発症例と考えられた。臨床症状はスギ花粉症と全く区別が付かなかった。したがって、診断としては、まず花粉飛散時における症状の発現のチェックが必要だが、花粉飛散時期がウメでは2月中旬から3月初旬とスギ花粉よりも少し早い、スギ花粉ともかなりの飛散時期が重複するのでその診断はかなり困難であろう。また、今回の調査はスギ花粉症の増悪因子に関する要因としてのウメ花粉の影響を明らかにすることを所期の目的としたものであり、ウメ花粉特異的IgE陽性がスギ花粉症の症状の増悪にどのように影響しているのかについては、現在解析を進めている。

梅干しがこの町の日本を代表する特産品であり、住民の経済がウメの栽培や加工に依存していることを考えれば、この感作を制御することは困難であろう。さらに、ウメ花粉シーズンでは、和歌山県内外から多く

の観光客がウメの花見にこの地を訪れる。

清水ら⁽¹⁴⁾は、バラ科間の共通抗原性はモモとウメが強く、サクラ、リンゴ、ナシがそれに続くとしている。今回は、このような花粉による吸収試験は行っていないので、どの程度に共通抗原を持っているかは本研究からは不明である。清水ら⁽¹⁵⁾の報告よりもより精度の高いこの測定系を用いての共通抗原性の再検討も必要であろう。強い共通抗原性があるならば、ウメで感作された人がこれらの花粉で発症することもおこりうる。

以上、ウメ特異的 IgE 抗体測定法の開発を行い、和歌山県日高郡南部町における疫学調査で得た血清を対象にその感作率を検討した。非常に高い感作率であり、今後興味深く感作率と発症率の変動を見守って行きたいと考えている。

要 約

食用ウメの一般的栽培種である南高梅の花粉を用いて、ウメ花粉特異的 IgE 抗体測定系を組み、その基礎的検討を行った。その結果、希釈試験、特異性試験、同時・日差再現性で満足する測定系が組めた。さらに、reference を設定すると共に、臨床に役立つように、非アレルギー例 10 例および臍帯血 10 例を用いて、陽・陰性の判定値を設定した。ウメ栽培や加工梅の産地である和歌山県日高郡南部町の住民の感作率を知る目的で、この測定系を用いて検討した。その結果、160 例中 20 例 12.5% が陽性、5 例が疑陽性 3.1%、135 例 84.4% が陰性判定であり、高い陽性率であった。また、他の特異的 IgE 抗体を持たないウメ花粉単独感作例は 5 例あった。その内 3 例が臨床症状を持っていた。ウメ花粉はスギ花粉飛散時期と一時期重なるので診断は比較的困難であるが、感作率の今後の変動と発症率の変動について注意深い観察を計画している。

本研究は科学技術庁「スギ花粉症克服に向けた総合研究」の一部として行った。

文 献

- (1) 沢田幸正：リンゴ花粉症について。アレルギー 27, 815-817 (1978)。
- (2) 寺尾 彬, 宮本昭正：いちご花粉症例。日本鼻副鼻腔学会誌 11, 51-52 (1972)。
- (3) 小林敏男, 大関秀雄, 稲沢生士, 福田玲子, 永田頌史, 他：イチゴ花粉症による喘息症例とその疫学的調査。アレルギー 22, 699-705 (1973)。
- (4) 信太隆夫：桃栽培業者にみられたモモ花粉症。最新医学 33, 840-841 (1978)。
- (5) 斎藤洋三, 竹田英子, 清水章治：バラ研究所職員にみられたバラ花粉症。アレルギー 28, 221-221 (1979)。
- (6) Wide L, Bennich HH, Johansson SGO : Diagnosis of allergy by in vitro test for allergen antibodies. Lancet 2, 1105-1107 (1967)。
- (7) 牧野富太郎：牧野日本植物図鑑。北隆館, 40 版, 東京, pp 285 (1984)。
- (8) 打越 進, 野村公寿, 木村廣行, 宇佐神 篤：ウメ花粉症の研究。日耳鼻 84, 374-378 (1980)。
- (9) 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)。
- (10) 中川武正, 宮本昭正, 秋山一男, 牧野莊平, 戸田正夫, 他：Lumiward イムノアッセイシステム (全自動特異 IgE, 総 IgE 測定装置) の臨床的有用性の検討。アレルギー 45, 637-648 (1996)。
- (11) 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ギー特異的 IgE 抗体の測定。アレルギー 38, 478-485 (1989)。
- (12) 中川武正, 秋山一男, 長谷川真紀, 岩崎栄作, 池澤善郎, 他：MAST-26 の臨床的有用性に関する検討。アレルギー (抄録) 48, 350 (1999)。
- (13) 月岡一治, 広野 茂, 石川和光：ナン花粉症の 2 症例。アレルギー 33, 853-858 (1984)。
- (14) 宇佐神 篤, 田中悦子, 木村滋子：職業性鼻アレルギー。アレルギーの領域 2, 491-496 (1995)。
- (15) 清水章治, 信太隆夫, 柳原行義, 守屋 弘, 飯島利彦, 他：モモ花粉症—第 2 報 近似植物との共通抗原性ならびに減感作治療成績。最新医学 35, 1089-1089 (1980)。

