

(原著論文)

高感度 *Cry j 1* 測定法について

榎本 雅夫¹⁾・大西 成雄²⁾・安枝 浩³⁾・嶽 良博¹⁾・碓田 猛真¹⁾・
 齊藤 優子¹⁾・十河 英世¹⁾・藤村 聡¹⁾・藤木 嘉明¹⁾・瀬野 悟史¹⁾・
 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⁾ 国立相模原病院臨床研究部 〒228-8522 相模原市桜台18-1

⁴⁾ 奈良県立医科大学化学教室 〒634-0813 橿原市四条町840

(2000年3月27日受付, 2000年4月17日受理)

The Evaluation and Application of High Sensitive *Cry j 1* Assay

Tadao ENOMOTO¹⁾, Shigeo ONISHI²⁾, Hiroshi YASUEDA³⁾, Yoshihiro DAKE¹⁾,
 Takema SAKODA¹⁾, Yuko SAITOH¹⁾, Hideyo SOGO¹⁾, Satoshi FUJIMURA¹⁾,
 Yoshiaki FUJIKI¹⁾, Satoshi SENO¹⁾ 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 Clinical Reseach Center for Allergy and Reumatology,
 National Sagamihara Hospital,
 Sakuradai, Sagamihara-shi, 228-8522 Japan*

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

Approximately 10 - 15% of Japanese population are suffering from Japanese cedar pollinosis. The recommended treatment and its effectiveness of this allergen and its avoidance for cedar pollinosis suffers is unfortunately still unknown.

One reason why this problem remains unsolved is the lack of proper *Cry j 1* measuring system for small amounts of pollen grains.

The high-sensitive *Cry j 1* assay commercial kit developed by LCD allergic center has been in the market some time now. However, the amount of *Cry j 1* measurement required 100 pollen grains in case of Japanese cedar. In this study, we modified the IgE antibody and the reactionary time of the LCD-kit. The results were excellent in terms of the dilution test, specificity test and the reproductive test. Now we established very high-sensitive *Cry j 1* measurement method from using only 13 pollen grains. This method will be useful in measuring the amount of *Cry j 1* in basical and clinical applications.

Key Words : Japanese cedar pollinosis, Japanese cedar pollen, *Cry j 1*, High-sensitive assay, ELISA

緒 言

スギ花粉症は増加し⁽¹⁻⁴⁾、国民の約 10 - 15% がスギ花粉症に悩んでいる^(5, 6)。スギ花粉症では、一般に、空中飛散数が多いほど、その発症率は多く、症状も重症化する。治療としては、薬剤によるメディカルケアとアレルゲンの除去・回避などのセルフケアがあるが、とくに、後者は大切で、日本アレルギー学会の治療ガイドラインにもスギ花粉の除去・回避について詳しく記載されている⁽⁷⁾。著者らはマスクによるセルフケアの基礎的検討などについて報告してきた⁽⁸⁻¹⁰⁾。その結果、実際にマスク内に取り込まれた花粉数、衣服に付着した花粉数や室内に持ち込まれる花粉数を正確に評価することは、このようなセルフケアの妥当性を裏付けるためにも必須と考えた。しかし、このような花粉数を推定する手段は顕微鏡下での確認では困難であり、スギ花粉の主要抗原である *Cry j 1* で測定するのが正確な方法である。さらに、現在スギ花粉情報は個/cm² で報道されているが、実際には葯や花粉由来の微粒子にもアレルゲン活性があり、それが空中を飛散していて、それによってもスギ花粉症が発症するといわれている。したがって、空中のスギ花粉抗原濃度で報道することがより望ましく、このためにはどうしても *Cry j 1* 測定感度をより上昇させることが必要である。この目的のために、著者らも高感度 *Cry j 1* 測定方法の開発に取り組み、約 100 個の花粉の *Cry j 1* は測定できると報告してきた⁽¹¹⁾。今回、より高感

度の測定法を開発したので報告する。

実験方法

1. *Cry j 1* の測定方法 表 1

NUNC 社製 immunoplate に抗 *Cry j 1* 抗体（モノクローナル抗体、10ng/ml、共同著者の安枝先生提供の JIB07）を 100 μ l 注入し、37 $^{\circ}$ C 2 時間 coating し、0.5% Tween 20 / 0.01M PBS 300 μ l で 5 回洗浄後、2% BSA / 0.05M PBS 300 μ l で 37 $^{\circ}$ C 2 時間 blocking、洗浄後標準液および検体を 100 μ l 注入、37 $^{\circ}$ C 2 時間および 25 $^{\circ}$ C 10 時間の incubation 後、洗浄。次に、ビオチン化抗 *Cry j 1* 抗体（ポリクローナル抗 *Cry j 1* 抗体、自家製で、低値側に高い親和性を示す抗体）を 100 μ l 入れ、37 $^{\circ}$ C 3 時間インキュベートし、洗浄。さらに、ストレプトアビジン（1:1500）100 μ l を入れ 37 $^{\circ}$ C 1 時間の incubation。洗浄後、呈色液（10mM O-ニトロフェニール- β -D ガラクトピラノシド 100 μ l）で 37 $^{\circ}$ C 20 分間 incubation、反応停止液（1.5M Na₂CO₃ 100 μ l）を注入後、攪拌し、415nm で吸光度（プレートリーダー）を測定した。

2. 検討項目

1) 希釈試験

A, B, C, D, E の *Cry j 1* 濃度の異なるスギ花粉溶解液を用いて検討した。なお、対照として F, G のスギ花粉を含まないヨモギ花粉の溶解液を用いた。

表 1. *Cry j 1*-ELISA の測定方法

1. NUNC 社製 immunoplate に抗 *Cry j 1* 抗体（モノクローナル抗体）の coating 100 μ l
2. 洗浄後 Blocking (0.2% BSA) 300 μ l
3. 標準液および検体 100 μ l の注入
4. 37 $^{\circ}$ C 2 時間および 25 $^{\circ}$ C 10 時間インキュベート
5. 洗浄
6. ビオチン化抗 *Cry j 1* 抗体（ポリクローナル抗体）100 μ l の注入
7. 37 $^{\circ}$ C 3 時間インキュベート
8. 洗浄
9. ストレプトアビジンガラクトシダーゼ 100 μ l の注入
10. 37 $^{\circ}$ C 1 時間インキュベート
11. 洗浄
12. 呈色液（基質）100 μ l の注入
13. 37 $^{\circ}$ C 20 分インキュベート（静置）
14. 反応停止液 100 μ l の注入
15. 415nm で吸光度測定

2) 特異性試験

1例の *Cry j 1* を含むスギ花粉溶解液とカモガヤ花粉, ヨモギ, ブタクサ花粉の溶解液を用いた。花粉は米国 Greer 社製の乾燥末より蛋白濃度 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ に 0.01M PBS にて調製した。

3) 再現性

A, B, C, D, E の5例の検体について10回測定で同時再現性を, また, 測定日を変えて日差再現性について検討した。

4) 測定 *Cry j 1* からみた花粉数

スライドガラスを 3.0mm 幅にガラスカッターでカットし, スギ花粉を $7\sim 23$ 個それぞれ別々に $500\mu\text{l}$ の 0.125M NH_4HCO_3 に溶解し検体とした。 *Cry j 1* としての最低検出感度からスギ花粉数何個に相当するかを求めた。

5) *Cry j 1* 測定感度と測定範囲 従来品 (LCD アレルギー研究所)⁽¹⁾ と今回の改良法を用いて, 共通

の標準 *Cry j 1* 液を対象に *Cry j 1* を測定した。

6) 同一スギ木の花粉における *Cry j 1* の年次変動 1995年から1999年の5年間に奈良県のスギの観測木から得た花粉を, 位相差顕微鏡下に, 25, 50, 100個数え, 0.125M NH_4HCO_3 1ml に溶解し, 本測定系で *Cry j 1* を測定した。その値から年度毎の花粉一個当たりの *Cry j 1* 量に換算した。

実験結果

1. 基礎的検討

1) 希釈試験 図1

測定系が成立しているかどうかを検討した。スギ花粉 (含 *Cry j 1*) を溶解した A, B, C, D, E の5例の検体は平行性を保ちながら, $8\sim 64$ 倍まで直線性を示し, 希釈倍率の応じて吸光度は減少した。しかし, *Cry j 1* を含まない F, G 検体は, 希釈倍率と関係が

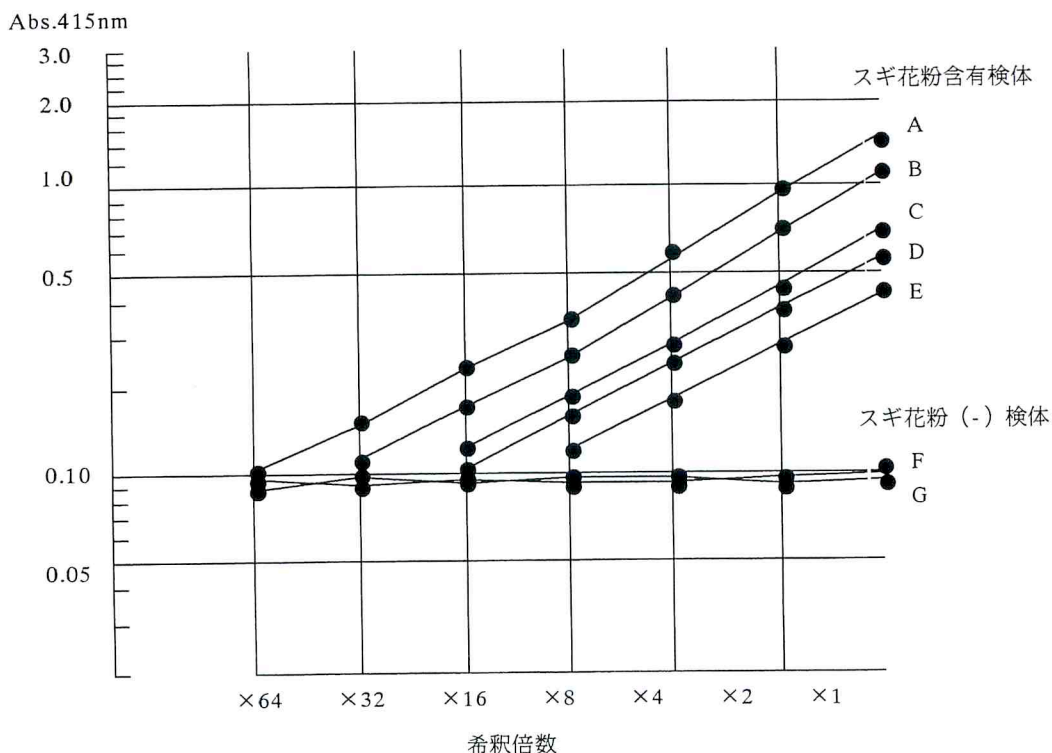


図1. 希釈試験

スギ花粉 (含 *Cry j 1*) 溶解液 A ~ E 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。F と G のスギ花粉 (含 *Cry j 1*) を含まない検体では希釈倍率にかかわらず低値のままである。

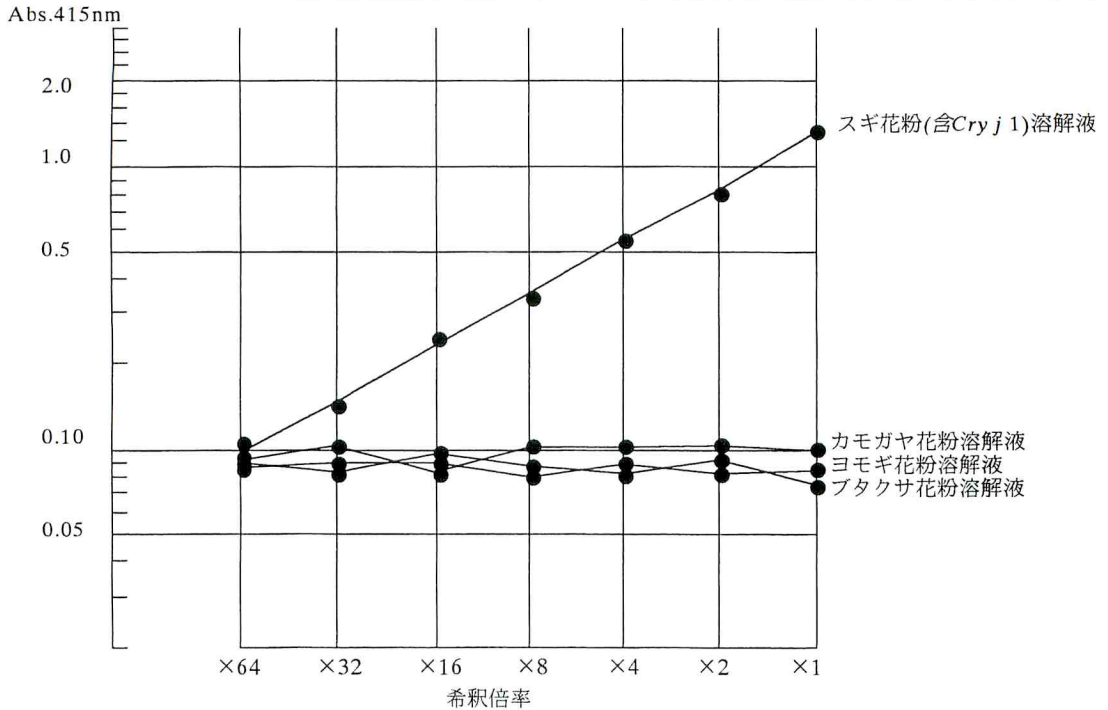


図2. 特異性試験

スギ花粉(含 *Cry j 1*) 検体のみ希釈倍率に依存して吸光度が減少するが、その他の花粉検体ではこのような現象が見られない。

なく吸光度は低値のままであった。従って、測定系が成立していたと判断された。

2) 特異性試験 図2

次いで、*Cry j 1* の標準液を用いて、25ng/ml からスギ花粉(含 *Cry j 1*) を高濃度に溶解した液を64倍まで2倍希釈し、希釈直線性の評価を行った。平均ODは希釈倍率に応じて、ほぼ直線性を持って減少し、64倍まで測定できた。カモガヤ花粉、ヨモギ花粉、ブタクサ花粉溶解液の吸光度は1～64倍まで低値のままであり反応を示さなかった。スギ花粉(含 *Cry j 1*) に対して特異的であった。

3) 再現性 表2, 3

A, B, C, D, E 検体を用いてこの測定系の同時再現性について検討した。10回測定したが *Cry j 1* でみたCV (Coefficient of Variation) % は2.1% - 6.2% と良好であり、満足な成績であった。日を変えて測定した日差再現性は、CV% は2.8% - 6.5% と良好な成績であった。

4) 測定 *Cry j 1* からみた花粉数 図3

図3にスギ花粉7～23個それぞれを測定した吸光度を示した。23～13個までがほぼ直線的に吸光度の

減少が認められたが、12個以下では検出感度以下となった。このことは13個以上は測定可能であることを意味し、それぞれの *Cry j 1* 値を求め、花粉1個相当の値をプロットした。その結果、ほぼ5.53pg/mlのライン上にプロットされた。

5) *Cry j 1* 測定感度と測定範囲 図4

測定法は共通で抗体の種類を変えることにより判定レンジは高値側、低値側へと変化させることができた。従来品と改良品に共通した標準 *Cry j 1* 液を検討した結果、今回、低値側への感度上昇を可能にできた。従来品(LCDアレルギー研究所製)より約10倍感度(約50pg/ml)で測定できるようになった。

6) 同一スギ木の花粉における *Cry j 1* の年次変動 表4

本測定系の応用として、1995年から1999年の5年間に奈良県のスギの同一観測木から得た花粉を、位相差顕微鏡下に、25-100個数え、本測定系で *Cry j 1* を測定し、年度毎の花粉1個当たりの *Cry j 1* 量に換算した。その結果、花粉1個当たりの *Cry j 1* 量は少ない年で4.8pg/mlから多い年で5.7pg/mlであった。

表 2. 同時再現性

	A 検体	B 検体	C 検体	D 検体	E 検体
1	24.3	14.0	6.2	5.0	2.6
2	24.0	14.5	5.9	4.7	2.3
3	23.8	13.4	6.5	4.6	2.5
4	23.5	14.6	6.7	5.0	2.5
5	23.6	13.1	6.0	5.2	2.8
6	24.3	13.7	6.1	5.0	2.8
7	24.0	13.9	5.4	5.1	2.4
8	23.4	14.5	6.4	5.3	2.5
9	24.5	14.0	6.2	4.7	2.5
10	25.0	14.2	5.9	4.6	2.5
mean	24.04	13.99	6.13	4.92	2.54
S. D.	0.497	0.491	0.365	0.253	0.158
C. V.	2.1%	3.5%	5.9%	5.1%	6.2%

表 3. 日差再現性

	A 検体	B 検体	C 検体	D 検体	E 検体
1 日目	24.2	13.1	6.2	5.4	2.8
2 日目	23.5	13.5	6.8	5.2	2.9
3 日目	23.1	14.2	5.6	4.8	2.7
4 日目	22.7	14.0	5.9	5.1	2.6
5 日目	23.6	13.8	6.5	5.0	2.8
6 日目	24.9	14.3	6.4	5.8	3.0
7 日目	23.5	13.6	6.1	4.9	2.8
mean	23.61	13.79	6.21	5.17	2.80
S. D.	0.664	0.422	0.398	0.340	0.129
C. V.	2.8%	3.1%	6.3%	6.5%	4.6%

考 察

スギ花粉症は最近増加しつつあり、社会的関心事になっている。有病率は、報告により調査方法や判定方法が異なり一概にいえないが、国民の約 10-15% と推定されている⁽¹⁻⁷⁾。本症の主たる発症メカニズムは I 型アレルギーであるので、アレルゲンである花粉とそれに対する特異的 IgE 抗体がその発症に大きく影響する。このことは、スギ花粉が多く飛散すればそれだけ発症者が多くなるし、症状は重くなることを意味する。したがって、大気中のスギ花粉による汚染度を知ることが大切で、従来は落下スギ花粉数による方法が行われてきた。しかし、落下スギ花粉数を数える方法は、煩雑で測定に要する時間もかかる。そこで、近年の免疫学的手法の進歩によりスギ花粉の濃度を測

定しようとする手技が発達してきた。スギ花粉のアレルゲンとしての抗原は Yasueda ら⁽¹²⁾ によって報告された分子量約 40000 の *Cry j 1* の塩基性糖蛋白と Sakaguchi ら⁽¹³⁾ によって報告された約 44000 の *Cry j 2* が主要抗原とされている。安枝ら⁽¹⁴⁾ はこれらの抗原を用いて、空中や落下したスギ花粉数をカウントすることなしに、*Cry j 1* 濃度を免疫学的手法を用いた方法で測定し、スギ花粉数の間の極めて高い相関を報告している。実際に花粉が飛散していなくても、大気中にはアレルゲン活性を有するスギ花粉由来の微粒子が空中に飛散していると言われ、花粉粒子を吸入しなくても、このような微粒子を吸入することで花粉症の症状がおこってくる。このような事実を考慮すれば、現在の飛散個数に基づいたスギ花粉情報を将来、大気中の *Cry j 1* 濃度として情報化することが必要だし、こ

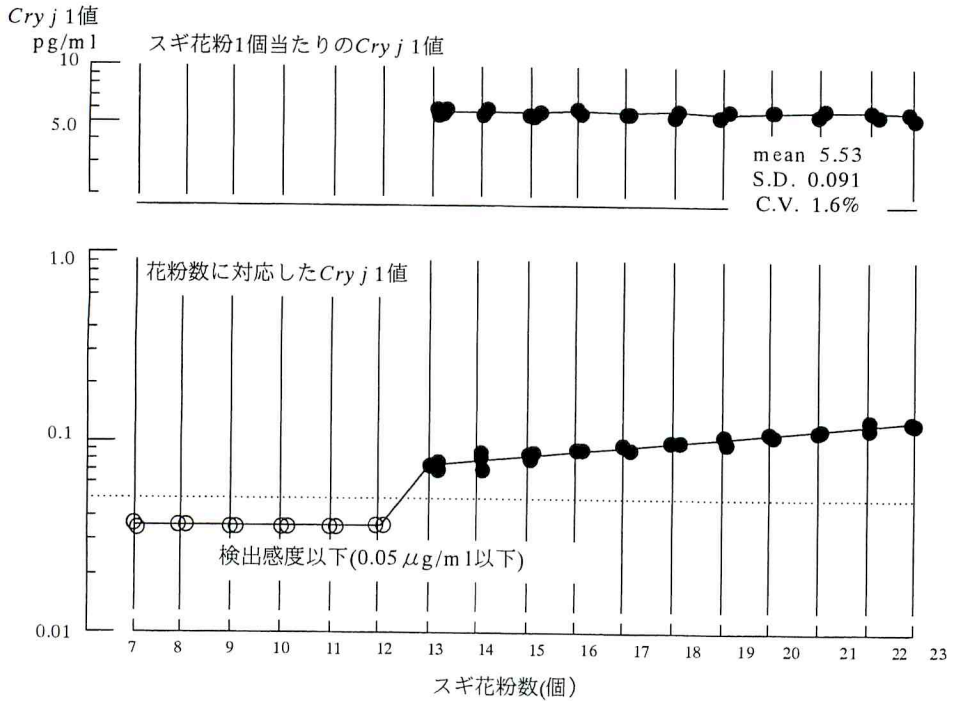


図3. 測定Cry j 1値からみたスギ花粉数

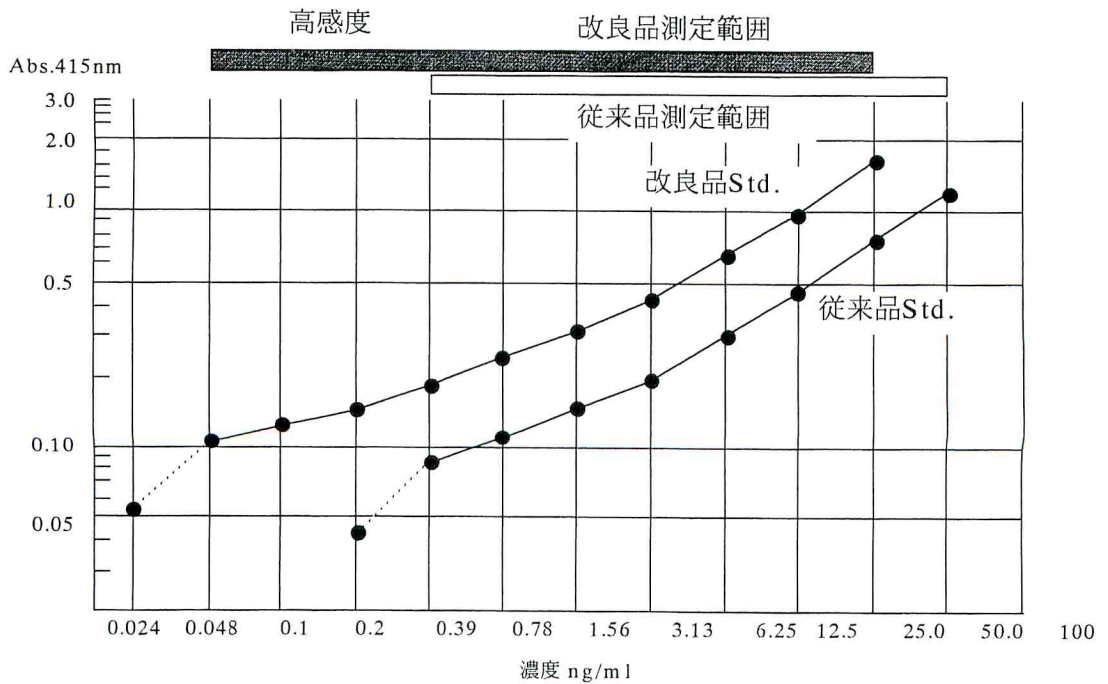


図4. Cry j 1 測定感度と測定範囲

表 4. 年による同一スギ木の *Cry j 1* の変動スギ花粉各個数当たりの *Cry j 1* の年による変動: ng/ml

	1995	1996	1997	1998	1999
100 個	0.473	0.493	0.539	0.512	0.562
50 個	0.226	0.265	0.262	0.251	0.283
25 個	0.128	0.125	0.143	0.120	0.137

スギ花粉花粉 1 個当たりの *Cry j 1* の年による変動: pg/ml/個

	1995	1996	1997	1998	1999
100 個	4.7	4.9	5.4	5.1	5.6
50 個	4.5	5.3	5.2	5.0	5.6
25 個	5.1	5.0	5.7	4.8	5.5
mean	4.8	5.1	5.4	5.0	5.7

5 年間平均 *Cry j 1* 量 / スギ花粉 1 個: 5.2pg/ml

の方が花粉症患者により有益な情報を提供できる。今回のこの測定法の応用で示した同一木でのスギ花粉の年による *Cry j 1* 活性の変動は 1.2 倍しかなかったが、スギの品種によっては抗原性に大きな差のあることが報告されていること⁽¹⁵⁾を考慮すれば、この考えを支持するものであろう。さらに、先に述べたように、スギ花粉症のセルフケアに関しては、衣服やマスク内に持ち込まれた花粉数、さらに室内塵に存在する花粉数などは肉眼的にカウントできないので、このような方法で *Cry j 1* を測定し、花粉数を算出する以外に方法はない。

これらの目的のためにも、より高感度な *Cry j 1* 測定が望まれるが、従来法では花粉約 300 個までの *Cry j 1* 量は測定できるがそれ以下の花粉数を測定したという報告はなかった。そこで、著者らは *Cry j 1* 測定感度を上昇させることを目的に LCD アレルギー研究所と共同で測定キットの開発を行ったが、それでも花粉約 100 個までの *Cry j 1* しか測定し得なかった⁽¹¹⁾。今回、方法論のところでも述べたような改良を行い、約 13 個以上のスギ花粉より *Cry j 1* を測定することが出来た。本キットでは NUNC 社製 immunoplate を用い一次抗体の固相を安定化したこと、従来用いていた抗 *Cry j 1* 抗体を変更したこと、また反応時間を変えるなどの操作を改良したことで、このように低値の *Cry j 1* まで測れるようになったと考えている。スギ花粉抗原濃度による花粉情報の提供には、測定時間の短縮などの高いハードルを越えなければならないが、本邦におけるスギ花粉症はまだ増加するであろうことを考えあわせれば、この測定方法は基礎的、臨床

的に応用価値が高いと考えている。

ま と め

著者らが開発した高感度 *Cry j 1* 測定法の基礎的研究を行い、この方法が希釈試験、特異性試験、再現性で優れたキットであり、応用範囲の広いものであることを報告した。

本研究は平成 11 年度「科学技術庁；スギ花粉克服に向けた総合研究」に助成され行った。

引用文献

- (1) 岸川禮子, 西間三馨: スギ花粉症増加の要因. MEDICO 20, 17-26 (1989).
- (2) 齊藤洋三: スギ花粉症, 過去・現在・将来. 感染・炎症・免疫 25, 54-60 (1995).
- (3) 榎本雅夫, 横山道明, 新井宏紀, 他: 和歌山県におけるスギ花粉症の疫学. 耳展 34, 219-226 (1991).
- (4) 榎本雅夫, 畚田猛真, 嶽 良博, 他: 和歌山県におけるスギ花粉症の疫学 - 1995 の調査と 1985 年, 1990 年の比較 -. 日耳鼻 102, 1311-1317 (1999).
- (5) 常俊義三: わが国のスギ花粉症の疫学. 日胸 56, 1-7 (1997).
- (6) 岸川禮子: スギ花粉症と地理疫学調査. 総合臨床 44, 2140-2148 (1995).
- (7) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会: 鼻

- アレルギー診療ガイドラインー通年性鼻炎と花粉症ー. (99年度版, 改訂第3版). ライフサイエンス・メディカ (東京), pp25-26 (1999).
- (8) 榎本雅夫:「スギ花粉症」の予防のための患者指導ースギ花粉情報の活用と花粉症グッズ. 治療 79, 606-610 (1997).
- (9) 榎本雅夫:アレルギー対策とその効果ーダニとスギを中心にー. カレントセラピー 17, 459-462 (1999).
- (10) 榎本雅夫:スギ花粉回避のためのセルフケアとその評価. アレルギー科 7, 218-224 (1999).
- (11) 榎本雅夫, 嶽 良博, 大西成雄, 他:高感度 *Cry j 1* 測定法の評価と応用. 和医医誌 17, 35-40 (1999).
- (12) Yasueda H, Yui Y, Shimizu T, et al: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeia japonica*) pollen. *J Allergy Clinical Immunol* 71, 77-86 (1983).
- (13) Sakaguchi M, Inoue S, Taniai M, et al: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45, 309-312 (1990).
- (14) 安枝 浩:花粉アレルギーースギ花粉を中心に. 第31回日本花粉学会シンポジウム抄録集 12-15, (1991).
- (15) 澤崎 健, 板谷英貴, 森元和雄, 山本光夫:スギ 51 品種の抗原性の比較. 日立化成テクニカルレポート No.28, 41-44 (1997).
-