

短 報

蛍光ELISA法による花粉抗原（Cry j 1およびDac g）の高感度測定

安部 悦子, 高橋 裕一, 青山 正明¹⁾A highly-sensitive method for the measurement of pollen allergens (Cry j 1 and Dac g)
by fluoro enzyme-linked immuno sorbent assay

by Etsuko ABE, Yuichi TAKAHASHI, Masaaki AOYAMA

花粉抗原は大気中にごく微量しか存在しないので、超高感度の測定が要求される。これまではELISA法の酵素基質にラジカル基質を用い、酵素反応の産物をESR装置で測定してきた（ESRラジカルイムノアッセイ法）。今年度は、より汎用性の高い蛍光ELISA法の検討を行った。蛍光ELISA法では、Cry j 1は1pg/m³、Dac gは0.5AUまで測定が可能であった。2007年春のスギ花粉飛散シーズン初期における大気試料中のCry j 1をESR法と蛍光ELISA法で測定し、両方法による値を比較したところ良い相関が得られた（ $r=0.925$, $n=16$, $p<0.01$ ）。日々の花粉アレルゲンの情報提供には蛍光ELISA法が適していると考えられる。

Key Words : Cry j 1, 蛍光ELISA法, ESRラジカルイムノアッセイ法

I はじめに

スギ花粉飛散開始日の1～2週間前から花粉症患者のなかに軽い症状を示す人がいる。その時期の空中スギ花粉抗原（Cry j 1）の濃度は数pg/m³であることがESRラジカルイムノアッセイ（ESR）法というきわめて高感度な方法で明らかとなった¹⁾。そこでこのESR法を用い飛散開始日前のごく微量の空中アレルゲンを測定し地域住民に情報提供すれば予防に役立てることができると考えられる。ESR法はきわめて感度が高く研究には適した方法^{2), 3)}であるが、使用する装置が広く普及していないという問題があり日常の情報提供業務に使用するのに適した方法とはいえない。そこで、より汎用的な方法として蛍光ELISA（ELISA; Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay）法を検討した。さらに、イネ科花粉症の原因となる植物は数多く存在するがその中でカモガヤ花粉が当地域では最も重要な花粉抗原と考えられるので、今シーズンは空中Cry j 1抗原の他に空中イネ科カモガヤ花粉抗原（Dac g）も測定し、結果を当研究所のホームページで公開した^{4), 5)}。そこでカモガヤ花粉抗原についても同様の比較、検討を行った。

II 対象と方法

1 大気試料の採取および抽出液の作成

大気試料は2007年2月から6月に採取した。採取場所は山形市郊外で、サイクロンサンプラー C90M（バーカード社製）を用い24時間間隔で採取した。このサンプラーは1時間に1m³の大気を吸引するので24時間では24m³吸引することになる。試料の交換は午前6時に行った。採取後の試料に0.1%BSA添加0.125M重炭酸ナトリウム溶液100 μ lを加え室温で2時間抽出後、3000rpm、10分間遠心し上清の一部を測定に使用した。

2 固相プレートの作成法

1) 抗Cry j 1抗体の固相化

抗Cry j 1モノクローナル抗体（林原製, 013）を5mM NaHCO₃（0.25M NaCl含有 pH8.5）で10 μ g/mlの濃度に調整した。この抗体液をELISAプレート（NUNC社）の各ウエルに100 μ lずつ分注し、室温で1時間吸着させた。0.1Mリン酸バッファー（以下PBSと略）で3回洗浄した後各ウエルに200 μ lのスタビルガード（SurModics, Inc., Minneapolis, MN, USA）を加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングした。処理後蒸留水で洗浄し、乾燥後に乾燥剤入り容器に入れ使用時まで4 $^{\circ}$ Cに保存した（固相化抗体プレート）。

1) 山形県産業技術振興機構

2) Dac g 抗原の固相化³⁾

PBSで2000倍に希釈したカモガヤ花粉エキス（鳥居薬品株式会社，スクラッチエキス B3SFV2）をELISAプレート（NUNC社）に100 μ lずつ分注し，4 $^{\circ}$ Cで6時間吸着させた．PBSで3回洗浄後に各ウェルに200 μ lのスタビルガードを分注，4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングした．処理後蒸留水で洗浄し，乾燥後に乾燥剤入り容器に入れ使用時まで4 $^{\circ}$ Cに保存した（固相化抗原プレート）．

3 蛍光ELISA法による測定

1) Cry j 1抗原

固相化抗体プレートにスギ飛散開始日前後に採取した試料の抽出液を各々30 μ lずつ分注した．スタンダード溶液は100 μ lずつ分注した．緩衝液と抽出液でpHと容積を調整した後に，3%BSA-PBSで1000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシターゼ（HRP）標識抗Cry j 1モノクローナル抗体（林原，053）50 μ lを加え混和後，4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた．洗浄液で5回，蒸留水で1回洗浄後，蛍光試薬の3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid溶液を加え2時間37 $^{\circ}$ Cで反応させ，グリシン-NaOH緩衝液（pH 10.3）で反応を停止し，蛍光マイクロプレートリーダー（コロナ電気，MTP-100F）で蛍光強度を測定した（励起：320nm，蛍光：405nm）（表1）．スタンダードには日本アレルギー学会から提供されたCry j 1標準液を10，5，1，0.5，0.25 ng/mLの濃度に要時調整して用いた．

2) Dac g 抗原

固相化抗原プレートに標準液もしくは大気試料抽出液を添加し，さらに3%BSA-PBSで1000倍に希釈したHRP標識抗Dac g抗体50 μ lを加え4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた．洗浄液で5回，蒸留水で1回洗浄し，3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid溶液を加え2時間37 $^{\circ}$ Cで反応させた．グリシン-NaOH緩衝液で反応を停止し，蛍光マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した．スタンダードにはカモガヤ花粉エキス（鳥居薬品株式会社）を用いた．原液の抗原濃度を100000AUと定義し，10，20，40，100，400AU/ml抗原濃度の溶液を要時調整して用いた．抗Dac g抗体は，抗Dac gウサギ血清をProteinAカラムでIgG画分にした後に抗カモガヤ抗原カラムを通し精製した．この精製抗体を，HRP標識キット-SH（同仁堂モレ

キュラーテクノロジー社）を用い酵素標識し使用した³⁾．

4 ESRラジカルイムノアッセイ法

Cry j 1抗原およびDac g 抗原のESRによる測定法は別報^{1)~3)}に従った．

III 結 果

1 蛍光ELISA法による大気試料中Cry j 1抗原の測定

Cry j 1標準液で得られた標準曲線を図1に示した．今回採用した条件では，蛍光ELISA法によるCry j 1の検出範囲は0.25~10ng/mLであった．試料は24 m³吸引し100 μ lの抽出液で抽出したので，検出範囲を大気の一容量当り（1 m³）に換算すれば1~40 pg/m³となる．さらに，蛍光マイクロプレートリーダーのかわりにELISA法で測定した後の液をプレートからセルに分取して蛍光分光光度計で測定することで，数倍高感度で測定することが可能であった．

2 大気試料中Cry j 1の蛍光ELISA法およびESR法による比較

飛散開始日以前から飛散前期の期間（2007年2月14日~3月2日，飛散開始日：2月17日~2月19日）について，蛍光ELISA法とESR法で得られた値を比較した．両者の相関係数は0.925（P<0.01）で，良好な正の相関が得られた（図2）．

3 大気試料中Dac g 抗原の測定

図3に得られた標準曲線を示した．今回の測定条件では100 μ lで抽出し，その30 μ lを使用するのでDac gの濃度範囲は0.5~12AUであった．またこの検量線を用いて2007年5月~6月の大気試料中のDac g濃度を求めた所ESR法での測定結果⁵⁾と良い相関を示した（図4）．

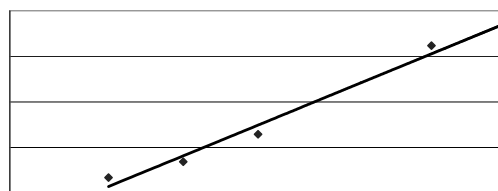


図1 蛍光ELISA法によるCry j 1標準曲線

表1 蛍光ELISA法における使用試薬等

固 相	酵素標識抗体	基 質	停 止 液	測定波長
Cryj1抗体：mAb 013	Peroxidase conjugated Anti-Cry j 1 mAb 053	3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	Glycine-NaOH Buffer pH10.3	励起：320nm 蛍光：405nm
Dacg抗原：カモガヤ花粉エキス	Peroxidase conjugated Anti-Dac g pAb Rabbit			

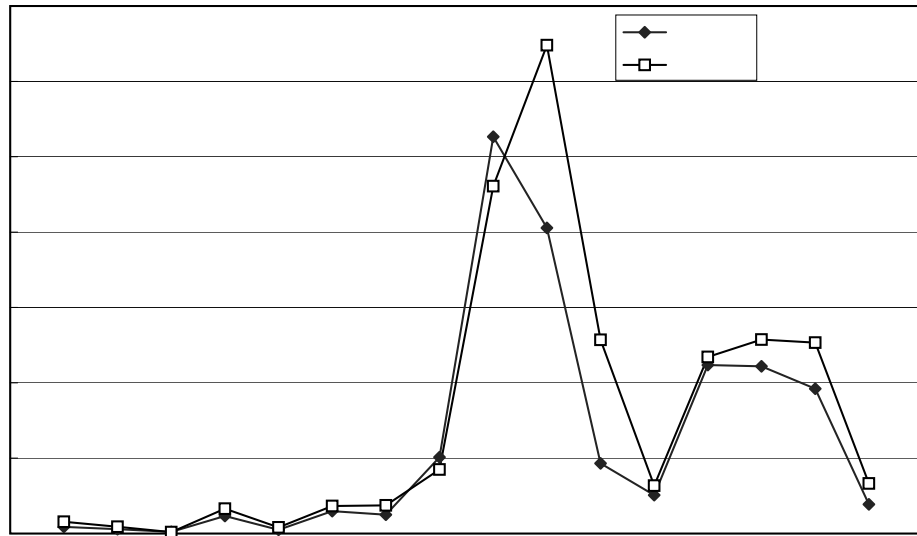


図2 ESR法と蛍光法によるCry j 1の比較 (2007年)

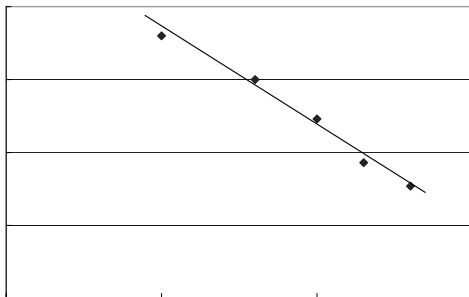


図3 イネ科カモガヤ花粉抗原Dac g 標準曲線

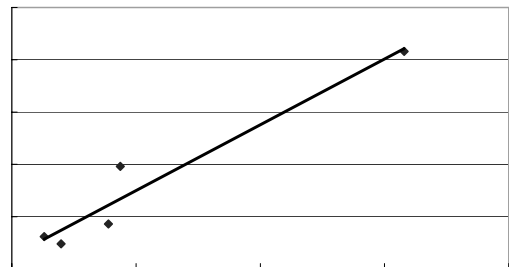


図4 Dac g蛍光法とESR法との比較 (単位: AU)

IV 考 察

1 蛍光ELISA法によるCry j 1の検出感度

蛍光ELISA法ではCry j 1濃度が1 pg/m³未満の試料は検出が困難であった。これは、今回使用した蛍光試薬の自己蛍光が高くブランクが一定の値を持つためと考えられ、測定には1 pg/m³以上の濃度が必要であった。この方法で測定を行った場合、当日抽出を行い、夕方に試料と抗体を分注し、翌朝に基質を加えれば午前中には測定結果が得られる。実際の操作に要する作業時間は合わせて20分間程度なので蛍光リーダーさえあれば、どこの施設でも容易にアレルゲンの測定が可能である。今回の測定には、ESR法と同一のモノクローナル抗体を使用した。榎本らは第二抗体に抗Cry j 1 ポリクローナル抗体を用いて感度を高めている⁹⁾。今後は、ポリクローナル抗

体を用いた検討も必要であろう。

2 Dac gの検出感度

2007年イネ科花粉飛散シーズン中のDac gはESR法で測定した所、1.6~24.2AUであった。蛍光ELISA法によるDac gの検出限界は今回の条件では0.5AUであったが、抗体が1種類しかなかったので競合法を用いており、もう1種類の抗体があればサンドイッチ法を行うことができるため、より高感度化が期待される。

3 蛍光試薬の検討

高感度化にはサンドイッチELISA法の検討の他に、よりブランク値を下げるのが可能な蛍光試薬が存在するので、蛍光基質の検討も有効と考える。

4 蛍光リーダーの検討

蛍光マイクロプレートリーダーは、試料の使用量がき

わめて少なく操作性に優れ、多検体の処理に向いているが、花粉アレルギー情報は、毎日の値を短時間に感度良く測定できることが望ましい。蛍光分光光度計で感度を上げることも選択肢の一つになる。

このように、蛍光ELISA法による花粉アレルギーの測定は、ESR法の感度には及ばないが、広く普及している装置で行える点で優れている。これからの花粉情報の重要な一部として今後も検討を継続する計画である。

文 献

- 1) Y Takahashi, M Aoyama, M Yoshitake, E Abe, N Ohta and M Sakaguchi: Relationship between Airborne Cry j 1 and the Onset Time of the Symptoms of Japanese Cedar Pollinosis Patients, *Allergology International*, 56(3), 277-283, 2007.
- 2) 青山正明, 高橋裕一: ESRラジカルイムノアッセイ法による Cry j 1 の超高感度測定法の開発, アレルギー 53(10), 1088-1090, 2004.
- 3) Y Takahashi, M Aoyama, E Abe, T Aita, S Kawashima, N Ohta, M Sakaguchi: Development of electron spin resonance radical immunoassay for measurement of airborne orchard grass (*Dactylis glomerata*) pollen antigens *Aerobiologia* (Italy) 印刷中
- 4) 山形県衛生研究所ホームページ 4～6月, 2007. (<http://www.eiken.yamagata.yamagata.jp/topics/kafun/kafun.html>)
- 5) 會田健, 高橋裕一, 安部悦子, 青山正明: 空中スギ及びイネ科花粉アレルギー (Cry j 1, Dac g) 濃度のインターネットによる情報提供と今後の課題 (その2): 本誌, 9-11.
- 6) 榎本 雅夫, 大西 成雄, 他: 高感度 Cry j 1 測定法について, 日本花粉学会会誌 46(1), 9-16, 2000.