

蛍光酵素抗体法を用いたシラカバ及びハンノキ花粉に対する 血漿 IgE 抗体の測定

Measurement of Plasma IgE Antibodies against Birch and Alder Pollen Allergens
by Fluorescence Enzyme-immunosorbent Assays

小島 弘幸 武内 伸治 小林 智
高橋 哲夫 神 和夫

Hiroyuki KOJIMA, Shinji TAKEUCHI, Satoshi KOBAYASHI,
Tetsuo TAKAHASHI and Kazuo JIN

We have established the fluorescence enzyme-immunosorbent assay (F-ELISA) for detecting plasma antibody immunoglobulin E (IgE) against birch pollen. The plasma samples were collected from volunteers containing individuals with symptoms of pollinosis, and measured by the F-ELISA and CAP system, which is widely used in clinical test companies. The results obtained by the F-ELISA exactly corresponded with those obtained by CAP system ($r^2=0.987$, $n=13$), indicating that our F-ELISA method might be very useful for detecting the anti-birch pollen IgE titers. Furthermore, we have also established the F-ELISA for detecting antibody IgE against alder pollen, which has been reported to have common antigens included in birch pollen. And then we measured the IgE antibodies against birch and alder pollen in plasma from 18 volunteers using two F-ELISAs, respectively. As a result, the levels of both antibody titers in individuals with symptoms of pollinosis were found to be higher than those in healthy individuals. In addition, the levels of anti-birch pollen IgE titer were correlated with the levels of anti-alder pollen IgE titer ($r^2=0.773$, $n=18$). This finding supports the concept that antigens in birch and alder pollens share allergenic epitopes, and suggests that the patients with birch pollinosis need to take care during not only scattering period of birch pollen, but also that of alder pollen. Because these F-ELISAs are simple in procedure and not expensive compared with CAP system, it is suggested that they might be available for surveillance of anti-pollen IgE antibody at a large scale.

Key words : alder pollen (ハンノキ花粉) ; birch pollinosis (シラカバ花粉症) ; enzyme-immunosorbent assay (酵素抗体法) ; immunoglobulin E (免疫グロブリン E)

緒 言

近年、「国民病」といわれるスギなどの花粉症が社会問題となっている。国民の約5割がスギ花粉に対する抗体を保有しており、国民の約15%がスギ花粉症を発症していると推定されている¹⁾。一方、スギがほとんど植栽されていない北海道においては、主に北欧諸国で多いシラカンバ *Betula platyphylla* var. *japonica* (カバノキ科、一般にシラカバと称される) による花粉症が問題となっている²⁾。しかしながら、道民のシラカバ花粉に対する抗体保有率については知見が極めて少なく³⁾、道内にはシラカバ花粉以外にも、ハンノキ、イチイ、ハルニレなどの花粉が飛散し、これらの花粉による花粉症患者も潜在的に存在すると考えられる。シラカバ花粉などの特異的 IgE 抗体の測定には、民間の臨床検査機関においてファルマシア社で開発された

CAP FEIA system (以下 CAP 法) が一般的に使用されている。一検体当たりの費用は数千円と高額であり、大規模な抗体保有調査を行うには、簡便で安価な測定法が必要である。

本研究では、酵素抗体法 (ELISA) によりヒト血中の抗シラカバ花粉 IgE 抗体を測定するため、シラカバ花粉抽出物及び蛍光色素発色反応を用いた蛍光 ELISA 法の確立を行い、その有用性を検討した。また、シラカバ花粉よりも飛散開始時期が早く⁴⁾、シラカバ花粉と共通抗原を有する^{5,6)} ことが報告されているハンノキ花粉についても同様に IgE 抗体測定のための蛍光 ELISA 法を確立した。さらに、これらの測定法を用いて、当所職員 18 名におけるシラカバ及びハンノキ花粉 IgE 抗体保有の小規模調査を行い、二つの花粉抗原の共通性に関する若干の知見を得たので合わせて報告する。

方 法

1. 試 料

当所職員の30~50歳代の男女($n=18$)を対象に、当所の倫理規定に従ったインフォームドコンセントを得て、血液試料を入手した。内訳は、3月~5月の春先に花粉症の症状(鼻水、鼻づまり、くしゃみ、眼の充血など)を訴えている9名(シラカバ花粉症患者4名を含む)及び花粉症の症状を訴えていない健康者9名であり、シラカバ花粉飛散終了後の6月中旬に採血した。血液試料はペノジェットII真空採血管(テルモ社製)に7mL程度採取し、直ちに遠心分離(2,000 rpm)により血漿約2.5 mLを採取した。試料は測定するまで -80°C で凍結保存した。さらに、抗体価の経時的推移を測定するため、シラカバ花粉症患者2名について、年間4~6回採血し、血漿を採取した。

2. 花粉の採取と抗原の調製

シラカバ花粉及びハンノキ花粉を札幌市厚別区及び北区よりそれぞれ採取した。脇田らの方法⁷⁾に従い、それぞれ花粉(約20 mg)にCoca液(Table 1) 0.5 mLを加え、30秒間激しく攪拌後、室温で16時間振とうしてそれぞれ花粉抗原を抽出した。 4°C で5分間遠心分離(12,000 rpm)後、その上清を花粉抗原抽出液とし、使用するまで -80°C で凍結保存した。

3. 蛍光酵素抗体法

花粉抗原特異的IgE抗体の測定は、我々が既に報告している抗ゼラチンIgE抗体の測定方法⁸⁾を改変して行った。使用した緩衝液等の組成をTable 1に示した。花粉抗原抽出液をトリス緩衝生理食塩液(TBS, pH 7.4)で140倍に希釈した。この希釈抗原液を96-wellマイクロプレート(Nunc社製MaxisorpTM)に $100\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、 4°C で一晩、固相化した。0.05% Tween 20含有TBS緩衝液(TTBS, pH 7.4)で洗浄後、1%ウシ血清アルブミン(BSA, Sigma社製)を含むブロッキング液を $250\mu\text{L}/\text{well}$ 添加して、室温で2時間反応させた。TTBS緩衝液で洗浄後、0.1%BSA含有TTBS緩衝液(TTBS-B,

pH 7.4)で100倍に希釈した血漿を $100\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、2時間室温で反応させた。TTBS緩衝液で洗浄した後、TTBS-B緩衝液で1,000倍に希釈した β -ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体(American Quarex社製)を室温で2時間反応させた。TTBS緩衝液で洗浄した後、酵素基質液を $100\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、 37°C で1時間反応させた。反応停止液を $100\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、酵素反応を停止させた。各wellにおける β -ガラクトシダーゼ活性を蛍光マイクロプレートリーダー(Wallac社製, 1420 ARVO SX)により励起波長360 nm・蛍光波長450 nmで蛍光強度を測定した。さらに、得られた測定値から、抽出物(抗原)を固相化しないwellに上記と同様の操作を行った後の測定値(ブランク値)を差し引き、抗原特異的な蛍光強度を算出することで、血漿中の花粉抗原に対するIgE抗体価とした。

4. CAP法によるシラカバ花粉抗体の測定

花粉症の症状を訴えている7名と花粉症の症状を訴えていない健康者6名から得られた計13試料の血漿を用いた。CAP法を用いたシラカバ花粉抗原の特異的IgE抗体の測定は、(株)エスアールエル北海道(札幌市中央区)に依頼して行った。

結 果

1. シラカバ花粉IgE抗体測定のための蛍光ELISA法の確立

シラカバ花粉症患者の血漿を用いて抗体測定の検討を行った。花粉抽出物を固相化したwellと固相化しないwellに、10~10,000倍に希釈した血漿をそれぞれ反応させた後、 β -ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体(二次抗体)を反応させた。その結果、希釈倍数に依存した抗原特異的な蛍光強度が確認された(Fig. 1)。10倍あるいは30倍希釈の場合で、抗原を固相化していないwellでの非特異的な蛍光強度も認められたことから、最適な血漿の希釈倍数は100倍に設定した。なお、測定結果の最適化のため、花粉抽出液は140倍希釈に、また、二次抗体は1,000

Table 1 Constituents of Buffer Solutions and Reagents Used for Fluorescence ELISA

| | |
|---------------------------|---|
| Coca buffer | Blocking solution |
| 85 mM NaCl | 1% BSA/TTBS buffer |
| 32.7 mM NaHCO_3 | |
| 42.5 mM Phenol | Enzyme substrate solution |
| | 0.2 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactoside |
| TBS buffer | 10 mM Na-Phosphate buffer (pH7.0) |
| 25 mM Tris (pH 7.4) | 1 mM MgCl_2 |
| 137 mM NaCl | 100 mM NaCl |
| 2.67 mM KCl | 0.1% BSA |
| TTBS buffer | Reaction stopping buffer |
| 0.05% Tween 20/TBS buffer | 100 mM Glycine-NaOH (pH 10.3) |
| TTBS-B buffer | |
| 0.1% BSA/TTBS buffer | |

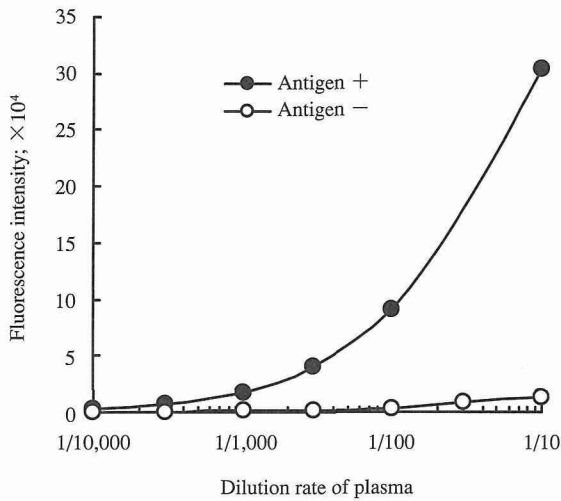


Fig. 1 Effects of Plasma Dilution Rate on Measurement of Anti-birch Pollen IgE by Fluorescence ELISA

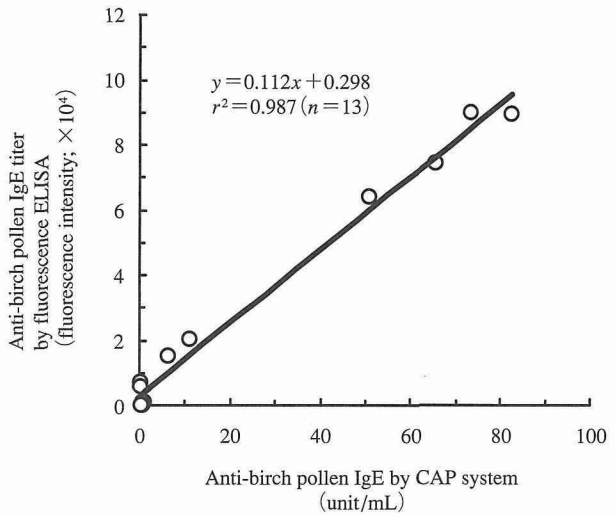


Fig. 2 Correlation between Fluorescence ELISA and CAP System on Measurement of Anti-birch Pollen IgE

倍希釈に設定した。

2. 蛍光 ELISA 法と CAP 法によるシラカバ花粉抗体価の比較

計 13 名の血漿試料について、蛍光 ELISA 法による測定値と CAP 法による測定値との比較を行った。その結果、両測定値の間には極めて高い正の相関 ($r^2=0.987$) が認められた (Fig. 2)。

3. シラカバ花粉症患者における花粉抗体価の経時的推移

シラカバ花粉症患者 2 名の血液を経時的に採取し、蛍光 ELISA 法によりシラカバ花粉 IgE 抗体価の季節変動を調べた。Fig. 3 に示すように、高い抗体価を保有する患者 A の場合、花粉飛散時期に上昇する傾向を示すが 7 月から減少し、11 月から 3 月までほぼ一定の高い抗体価で推移した。また、患者 B の場合には、年間を通して抗体価の推移に著しい変動は認められなかった。

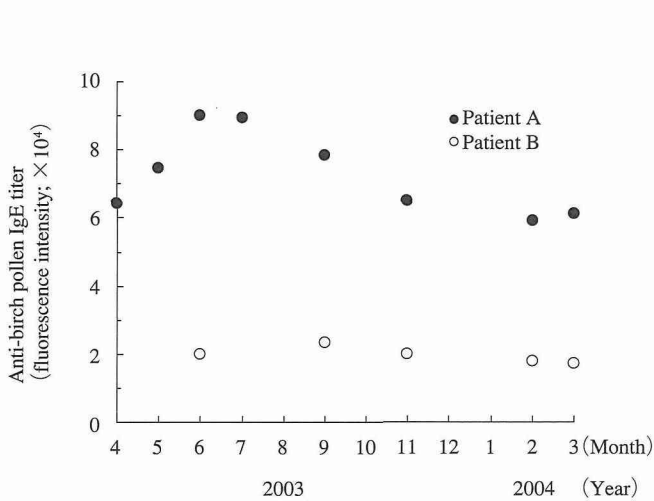


Fig. 3 Change in a Year of Anti-birch Pollen IgE in Plasma of Two Patients with Birch Pollinosis

4. 蛍光 ELISA 法を用いたシラカバ及びハンノキ花粉に対する抗体保有調査

シラカバ花粉の Coca 液抽出物を抗原として用いた蛍光 ELISA 法によりシラカバ花粉 IgE 抗体を測定できることが明らかとなったため、ハンノキ花粉についてもシラカバ花粉と同様に Coca 液で抽出して蛍光 ELISA 法を確立した。これら二つの蛍光 ELISA 法を用いて、花粉症の症状を訴えている 9 名 (A~I) と花粉症の症状を訴えていない 9 名 (J~R) の計 18 名について、シラカバ及びハンノキ花粉抗原に対する IgE 抗体価を調べた。Fig. 4 に示すように、症状を訴えている集団では訴えていない集団に比べ、シラカバ花粉やハンノキ花粉に対して高い抗体価が認められた。花粉症を訴える人の中で I 氏がシラカバ及びハンノキ花粉に対する抗体価が最も高かった。しかしながら、

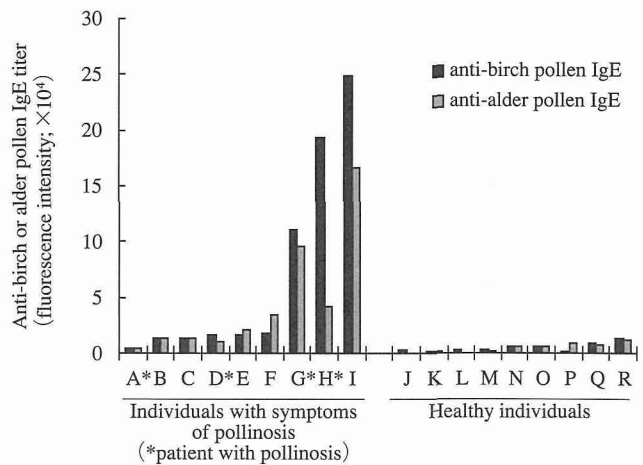


Fig. 4 Plasma IgE Antibody against Birch and Alder Pollen in 18 Volunteers Using Fluorescence ELISA

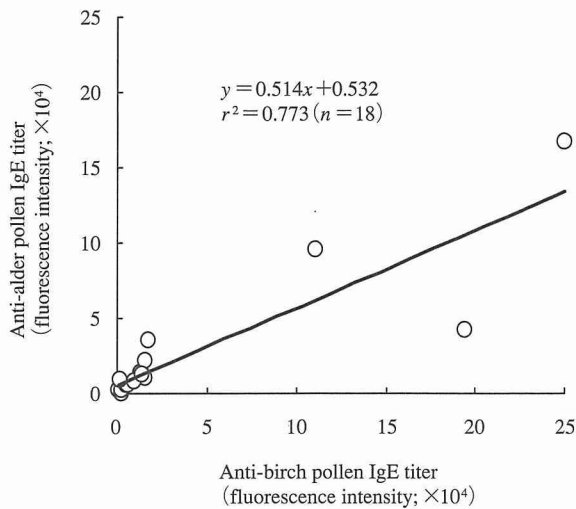


Fig. 5 Correlation between Birch and Alder Pollen Antibody IgE in Plasma of 18 Volunteers

A氏のように花粉症を訴えているにもかかわらず、シラカバ及びハンノキ花粉に対する抗体価が低い場合も認められた。一方、花粉症を訴えていない人の中でも、R氏のように訴えている人と同程度にシラカバ及びハンノキ花粉に対する抗体価が認められる事例も存在した。

5. シラカバとハンノキ花粉抗原に対する IgE 抗体価の相関性

シラカバとハンノキ花粉との共通抗原性を確認するため、今回試験した 18 名のそれぞれの抗体価について比較した。その結果、Fig. 5 に示すように、両花粉に対する抗体価には正の相関 ($r^2=0.773$) が認められた。

考 察

ヒト血漿中の抗原特異的 IgE 抗体を測定する場合、臨床検査会社で導入されている CAP 法が知られている。この方法の原理は、ELISA 法と同様に抗原抗体反応を利用しているが、微量の特異 IgE を検出するため抗原の固相化に工夫が施されている。今回我々は、数名のシラカバ花粉症患者及び健常者の血漿を用いて、CAP 法に代わる簡便で安価な蛍光 ELISA 法の確立を試みた。脇田ら⁷⁾はシラカバ花粉を Coca 液で抽出することで、抗原である Bet V1 タンパク (17 kDa) とプロフィリンタンパク (14 kDa) が効率良く抽出されることを、ウエスタンブロット法により確認している。このことから、我々はシラカバ花粉の Coca 液抽出液を抗体測定の抗原として利用した。従って、我々が検出した蛍光強度は、Bet V1 タンパクやプロフィリンタンパクに対する抗体価を含むと推察される。さらに、シラカバ花粉症患者と健常者、計 13 名について本法と CAP 法との測定値を比較したところ、極めて高い一致が認められた (Fig. 2)。このことは、今回我々が確立した蛍光 ELISA 法がシラカバ花粉 IgE 抗体の測定に有用であることを示唆している。

抗体保有率を調査する場合、採血する時期は重要な要因と考えられるが、シラカバ花粉症患者における抗体価の季節変動については明らかにされていない。そこで、シラカバ花粉症患者 2 名について抗体価の季節変動を蛍光 ELISA 法により調べたところ、花粉が飛散していない時期でも年間を通じ高い抗体価を維持していることが明らかとなった (Fig. 3)。このことから、抗シラカバ花粉 IgE 抗体を測定する場合、花粉飛散時期に行うことが望まれるが、花粉が飛散していない時期でも十分測定が可能と考える。一方、シラカバ花粉症患者の中には、リンゴやサクランボなどの果物を摂取すると口腔及び咽頭のかゆみなどを訴える口腔アレルギー症を併発する事例が報告されている⁹⁻¹¹⁾。このようなことから、シラカバ花粉症患者は年間を通じて花粉以外の抗原にも曝露されている可能性が考えられる。

シラカバの属するカバノキ属とハンノキの属するハンノキ属の共通抗原については、高い相関性があることが報告されている^{5,6)}。このことから、シラカバ花粉抗体を有する人はハンノキ花粉に対しても反応性を有していると考えられるが、健常者を含めたシラカバ及びハンノキ花粉に対する抗体保有に関しての実態調査はなされていない。そこで、シラカバ花粉と同様にハンノキ花粉についても IgE 抗体を検出する蛍光 ELISA 法を確立し、花粉症を訴える 9 名 (花粉症患者 4 名を含む) と訴えない健常者 9 名についてシラカバ及びハンノキ花粉に対する抗体価を測定した。その結果、予想されたように、花粉症を訴える群では、健常者群に比べて、シラカバ及びハンノキ花粉抗体が高い傾向が認められた (Fig. 4)。しかしながら、抗体価の高い人ほど花粉症の症状が重篤であるとの見解は得られず、アレルギー疾患の指標となる抗体価の高低について、花粉症の症状を必ずしも反映していないと考えられた。また、R 氏のように抗体を保有しているが発症には至らない人、いわゆる花粉症の予備軍も存在すると考えられる。スギ花粉症の場合、症状を呈していない人でもスギ花粉抗体を保有していることが明らかにされており、シラカバ花粉についても同様のことが考えられる。

間口ら⁶⁾は、CAP 法を用いて花粉症患者の血中ハンノキ花粉 IgE 抗体価とシラカバ花粉 IgE 抗体価を調べ、高い相関 ($r=0.849$) を有することを報告しており、両花粉において共通抗原の存在を指摘している。本研究においても、18 名の比較であるが、シラカバとハンノキに対する抗体価は先の報告⁶⁾と同程度に高い相関 ($r^2=0.773$) を示した (Fig. 5)。このことは、シラカバやハンノキ花粉から作製した抽出液には共通抗原が存在することを示唆するとともに、我々が確立したハンノキ花粉に対応した蛍光 ELISA 法がシラカバ花粉の蛍光 ELISA 法と同様に有用であることを示している。札幌市内では、ハンノキ花粉は 3 月中旬～4 月中旬、シラカバ花粉は 4 月下旬～5 月下旬まで飛散していることが報告されている⁴⁾。花粉症を訴える人においては、シラカバ花粉飛散時期 (4 月～5 月)

のみならず、ハンノキ花粉が飛散する3月から警戒する必要があると考えられる。

本研究において我々は、シラカバ及びハンノキ花粉から抽出した抗原を用いて抗花粉IgE抗体を蛍光ELISA法により測定できることを明らかにした。道内には、ハルニレやイチイなど他の花粉も飛散することから、今後はこれらの花粉に対応した蛍光ELISA法の確立も可能と考える。さらに、本法は簡便かつ安価であることから、北海道においてシラカバやハンノキをはじめとする花粉抗原に対する抗体保有率の大規模な実態調査を行う上で有用であると考えられる。

結 語

ヒト血漿中におけるシラカバ花粉に対するIgE抗体を測定するための蛍光ELISA法を確立した。蛍光ELISA法による測定値と民間の検査機関で一般に用いられているCAP法による測定値との比較を行ったところ、両測定値の間には極めて高い正の相関($r^2=0.987$, $n=13$)を認めたことから、本法はシラカバ花粉抗体を測定する方法として有用であると推察された。ハンノキ花粉抗原を用いた蛍光ELISA法も同様に確立し、花粉症を訴えている集団と訴えていない集団について、両花粉抗体を測定したところ、症状を訴えている集団では訴えていない集団に比べ、シラカバ花粉やハンノキ花粉に対して高い抗体価が認められた。さらに、シラカバ花粉に対する抗体価とハンノキ花粉に対する抗体価が正の相関($r^2=0.773$, $n=18$)を示したことから共通抗原の存在も推察された。本研究において開発された抗体測定法は、今後、北海道における花粉症

の実態調査を行う上で有用であると考えられる。

本研究は平成15年度より開始された一般試験研究「北海道における花粉症の予防に関する研究」の一環として行われたことを付記する。

終りに臨み、本調査研究に御協力頂いた北海道立林業試験場・脇田陽一研究職員ならびに当所微生物部細菌科・合田 悟専門員をはじめ当所職員の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) 三好 彰：花粉症を治す，PHP 研究所，東京，2003
- 2) 朝倉光司：アレルギーの臨床，13(3)，18(1993)
- 3) 野村由加利，福士 勝，小田浩道，藤田晃三：北海道公衆衛生学雑誌(要旨集)，12(1)，86(1998)
- 4) 武内伸治，小林 智，神 和夫，小川 広，都築俊文：道衛研所報，49，148(1999)
- 5) Eriksson NE, Wihl J-A, Arrendal H, Strandhede SO：Allergy，42，205(1987)
- 6) 間口四郎，高木撰夫，吉田美果，福田 諭，犬山征夫：日本耳鼻咽喉科学会誌，96，1(1993)
- 7) 北海道立林業試験場編：平成13年度重点領域特別研究報告書 シラカンバ花粉症対策に向けた優良個体選抜と花粉飛散予測技術の開発，美唄，平成14年3月，p.27
- 8) Saito A, Kumagai T, Kojima H, Terai I, Yamanaka T, Wataya Y, Umetsu M, Umetsu A, Yano S：Scand. J. Immunol.，61，376(2005)
- 9) Dreborg S, Foucard T：Allergy，38，167(1983)
- 10) Ebner C, Birkner T, Valenta R, Rumpold H, Breitenbach M, Scheiner O, Kraft D：J. Allergy Clin. Immunol.，88，588(1991)
- 11) 山本哲夫，朝倉光司，白崎英明，氷見徹夫，小笠原秀樹，成田慎一郎，形浦昭克：アレルギー，53，435(2004)