

ESR ラジカルイムノアッセイ法による空中カモガヤ花粉抗原(Dac g)の 高感度測定法の開発

○高橋裕一¹, 青山正明²(¹山形県衛生研究所, ²山形県産業技術振興機構)

(目的) 我々はイネ科花粉症患者の発症原因となるアレルゲンの空中濃度を高感度に、かつ迅速に測定できる方法を検討している。先に共同演者の青山が開発した ESR ラジカルイムノアッセイ法を用いればスギ花粉の Cry j 1 を超高感度に測定できることがわかった。今回はカモガヤ花粉抗原について検討し高感度に測定できることがわかったので報告する。

(方法および結果) 96 穴の Nunc プレートに PB (0.02M, pH7.0) で 2000 倍に希釈したトリイ製カモガヤ花粉スクラッチエキス(Dac g エキス)の 100 μ l を注入し 4°C で 6 時間反応させ、スタビルガードで一晩ブロッキングし Dac g 感作プレートを作製した。抗 Dac g ウサギ血清はカモガヤ抽出液を用いてウサギに免疫して作製した。抗 Dac g ウサギ血清は硫酸沈殿、プロテイン A カラム及び、Dac g セファロースカラムを通して精製した。Dac g セファロースは Dac g 抽出液と BrCN 活性化 - セファロース 4B を用いて自作した。2%BSA 含有 PB で Dac g エキスの希釈系列を測定時に調整し標準液とした。原液を 100 倍に希釈したものを 100a.u./ml と定義した。Dac g 測定は競合反応を用いた。標識抗体には HRP 標識抗 Dac g 抗体あるいは HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。測定は以下の手順で行った。Dac g 感作プレートに標準液または大気試料抽出液を分注し、2,000 倍に希釈した HRP 標識抗 Dac g 抗体を注入し 30 分反応させた。エルジア F 用洗浄液にて洗浄後、*p*-AP(4mM)、HTIO(0.34mM)と過酸化水素(0.01%)を含む基質緩衝液 150 μ l を加え 37°C で 30 分反応させた。100mMNa₃で酵素反応を停止させ、酵素反応の結果生成した安定ニトロキシドラジカル量を ESR(FR30,JEOL)にて測定した。HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体では、非標識抗 Dac g 抗体と Dac g 抗原を競合的に反応させた後、一回目の洗浄を行った。次いで HRP 標識抗ウサギ IgG 抗 150 μ l を加え室温で 40 分反応させた。二回目の洗浄終了後に、ラジカル化基質液を加え酵素反応後、100mMNa₃で反応を停止させた。この条件で 2005 年 5 月 25 日~6 月 17 日まで採取した大気試料について Dac g 濃度とイネ科花粉数を測定したところ比較的良好な相関が得られた。Dac g の感度はイネ科花粉 1 個を検出できる程度であった。反応時間を延長すればさらに高感度な測定が可能になると考えられた。