

## Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) を用いたスギ花粉の Major allergen の推定方法

井手 武\*・田端 司郎\*・芦田 恒雄\*\*

Estimation for Major Allergen of Sugi Pollen by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Takeshi IDE\*, Shiro TABATA\* and Tsuneo ASHIDA\*\*

\*Department of chemistry, Nara Medical University, Shijo-cho, Kashihara 634, Japan

\*\*Ashida ENT Clinic, Kosaka 3-4-51, Higashiosaka 577, Japan

Two allergenic fractions (A and B) were separated from extract of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) pollen by column chromatography using p-cellulose and ELISA inhibition test. With the use of two allergenic fractions, we developed a method for estimating the amount of different allergens in the extract. Different titration curves for inhibition of IgE antibodies binding to a disc carrying crude allergens by the partially purified fraction A and B revealed that the extract of Sugi pollen contained at least two allergenic components, and the major allergen was contained in fraction B.

### 緒 言

Radioallergosorbent test (RAST) は Wide ら<sup>(1)</sup>によって開発されて以来、起因抗原の検索に広く用いられるようになった。さらに近年、radioisotope に代わり酵素を結合させる enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) が考案され、より広く利用されるようになって来た。<sup>(2-6)</sup>これら RAST や ELISA に基づいた方法で抗原活性を定量的に測定することも試みられている<sup>(5, 7)</sup>

しかしながら、一般に起因物質中に抗原は必ずしも 1 成分だけが含まれているとは限らず、スギ花粉<sup>(8)</sup>をはじめ種々の物質<sup>(9)</sup>について数種の抗原成分の存在が報告されている。このような抗原成分を分離精製する際、2 成分以上に分画された系において、それぞれが抗原としてどの程度寄与しているか、またいずれが主要な成分であるかが問題になる。

この報告では、スギ花粉から抽出した粗抗原を結合させた paper disc を用いた ELISA 阻害試験で、スギ粗抗原を分画して得た 2 成分が阻害する割合から、いずれが主要な成分であるかを推定する方法を述べる。

### 材料および方法

1. 血清：発症時期がスギ開花期と一致し、鼻汁中好酸球陽性、皮内反応、RAST などによりスギ花粉症と診断されたボランティアの血清を用いた。
2. paper disc：スギ花粉を 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で抽出した抗原成分(粗抗原)<sup>(10)</sup>を宮本らの方法に従い、10mg/ml の濃度で paper disc に結合させた<sup>(11)</sup>
3. ELISA 阻害試験：0.15M NaCl を含む 10 mM リン酸 buffer (pH 7.3) (PBS) で 1/4 に希釈した被検血清 50  $\mu$ l と、同 buffer で適当な濃度に希釈した

\* 〒634 橿原市四条町 840 奈良県立医科大学化学教室

\*\* 〒577 東大阪市小阪 3-4-51 芦田耳鼻咽喉科医院

スギ花粉抗原50 $\mu$ lをプラスチックチューブの中で混合して室温で1時間放置した。このチューブにスギ花粉粗抗原を結合した paper disc 1枚を入れ、室温で3時間反応させた後、Phadezym RAST<sup>®</sup> キット(Pharmacia Diagnostics 社)を用いた ELISAを常法通りおこなった<sup>(10)</sup>。この時の吸光度 ( $A_{420}$ )を  $A(Ag)$  とし、スギ花粉抗原を含まないPBS 50 $\mu$ lを加えた血清で得られた吸光度 ( $A_{420}$ )を  $A(0)$  とした。

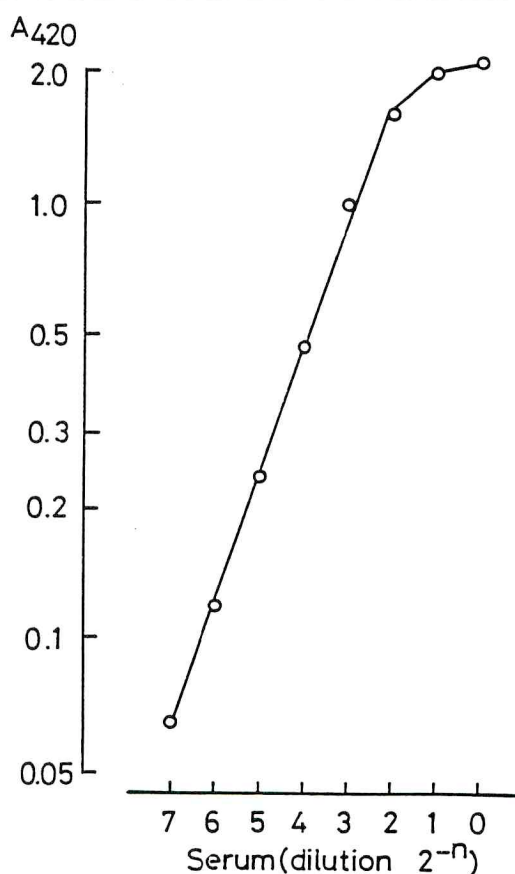
4. スギ花粉粗抗原の分画: スギ花粉抽出液を10% ethylenglycol 含有0.1M acetate buffer(pH5.4)に透析後、同 buffer で調整した p-cellulose column (イオン交換容量5.7meq/dry g)でクロマトグラフィーをおこなった<sup>(10)</sup>。この結果 p-celluloseに非吸着の画分 (fraction A)と、吸着して NaCl濃度0.3M付近で溶出される画分 (fraction B)を得、両者はそれぞれ同一 p-cellulose column で再クロマトグラフィーをおこなった。

### 結果と考察

スギ花粉粗抗原を結合した disc を用い、患者血清を順次希釈して ELISA をおこなうと、Fig. 1に見られるように血清の希釈にともなって吸光度が減少する。これは吸光度と血清中に含まれる特異的 IgE 抗体との関係を示すものである。ELISA 阻害試験において、ELISA の反応系に disc に結合した抗原と同一の遊離の抗原を加えると、血清中の特異的 IgE 抗体を吸収し paper disc に結合している抗原への特異的 IgE 抗体の結合が妨げられる。反応系に遊離の抗原を加えないときの paper disc に結合した特異的 IgE 抗体量に依存する吸光度 ( $A(0)$ )と遊離の抗原を加えたときの paper disc に結合した特異的 IgE 抗体量に依存する吸光度 ( $A(Ag)$ )との間には、

$$\frac{A(Ag)}{A(0)} = \frac{1}{1 + k[Ag]} \quad \cdots (1)$$

の関係式が得られ、加えた抗原濃度 ( $[Ag]$ ) のみに依存する式となる (ただし、 $k$ は  $A(Ag)/A(0) = 0.5$ 、

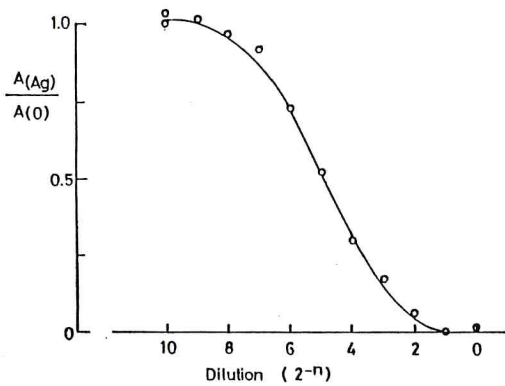


**Fig. 1** Relation between concentration of serum and absorbance ( $A_{420}$ ) obtained by ELISA. Serum was serially diluted with PBS and used for ELISA.

つまり50%阻害するのに必要な抗原濃度の逆数)<sup>(5)</sup>。

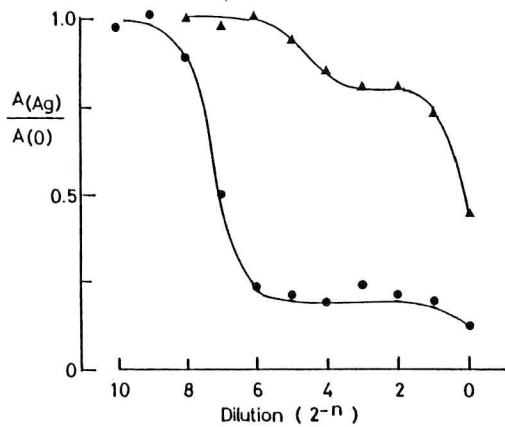
スギ花粉粗抗原を順次希釈した ELISA 阻害試験から、 $[Ag]$  と  $A(Ag)/A(0)$  との関係は、Fig. 2に示す曲線となり、これは(1)式とよく一致する。粗抗原を1~1.5 mg/mlの濃度で加えると特異的 IgE 抗体の paper disc への結合は完全に妨げられ、その濃度が0.02 mg/mlまでの間では濃度に対して阻害の程度は減少していった。

粗抗原を分画して得た2成分 (fraction A, B) をそれぞれ単独で加えると、Fig. 3に示すように fraction Aは高濃度でも阻害の程度は低く、 $A(Ag)/A(0)$  が0.8のあたりにplateauが見られた。fraction Bは、かなり低濃度(0.5  $\mu$ g/ml)でも有効であるものの30倍の濃度 (15  $\mu$ g/ml) でも阻害の程度は変わらず、



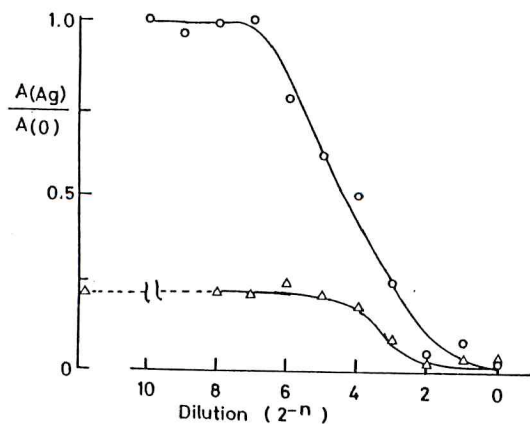
**Fig. 2** ELISA inhibition curve for crude extract of Sugi pollen.

Three mg/ml of allergen solution (crude extract) was serially diluted with PBS. The diluted solution was preincubated with test serum and followed to incubate with a sheet of paper disc covalently bound allergen (s) (crude extract). IgE antibody bound to the paper disc was assayed by a photometer at  $A_{420}$ . Plots were  $A(Ag)/A(0)$  versus serially diluted allergen ( $[Ag]$ ).



**Fig. 3** ELISA inhibition curve for fraction A or B.

Initial concentration of fraction A ( $\Delta$ ) was 2mg/ml and fraction B ( $\bullet$ ) was 30  $\mu$ g/ml. Plots were obtained by the same method described in Fig. 2.



**Fig. 4** ELISA inhibition curve for mixed allergen (fraction A and B).

$\circ$  : Equal volume of fraction A (2 mg/ml) and fraction B (30  $\mu$ g/ml) were mixed, and then serially diluted with PBS.

$\Delta$  : Solution consists of fraction A (2 mg/ml) serially diluted with PBS and constant concentration of fraction B (1  $\mu$ g/ml).

Plots were obtained by the same method described in Fig. 2.

$A(Ag)/A(0)$ の値が0.2付近でとどまった。この結果から次の事が推定される。粗抗原中にはp-celluloseに吸着しない成分(fraction A)と吸着する成分(fraction B)との2種類の抗原成分があり、血清中には、それぞれに対応する特異的IgE抗体が存在する。discには両抗原が結合しており、遊離の抗原として、そのいずれか一方のみを使用してELISA阻害試験を行うと、その抗原に対する特異的IgE抗体のdiscへの結合は遊離の抗原濃度に依存して阻害されるが、他方の抗原に対する特異的IgE抗体はdiscに結合する。つまり、fraction Aを遊離の抗原として、血清中の抗fraction A IgE抗体を吸収するに十分量を加えることにより得られた $A(Ag)/A(0)$ (Fig.3でplateauとして示されている)の値からdiscに結合し得るIgE抗体の約20%を妨げている。したがってfraction Aは抗原全体の約20%位寄与していると考えられる。同様にfraction Bは、濃度が0.5~15  $\mu\text{g/ml}$ において $A(Ag)/A(0)$ が約0.2であり、抗原全体に対して約80%の寄与が考えられる。次に両fractionを混合すると、もとの粗抗原と同様な

阻害曲線を描くかどうかを調べたのがFig.4である。A,B両fractionを混合して、順次希釈するとFig.2で得られた曲線と同様の結果を得、やはりpaper discへの特異的IgE抗体の結合を完全に妨げる事が出来た。またFig.3において $A(Ag)/A(0)$ の値がplateauとなったfraction Bの一定濃度(1  $\mu\text{g/ml}$ )を含むfraction Aの希釈系列でELISA阻害試験を行うと、fraction Aの濃度が濃くなるにしたがって阻害の割合は相加的に強くなった。

これらのことはスギ花粉粗抗原中には抗原性を示す成分が少なくとも2種あり、fraction Bの方が主要な画分であることを示すものである。<sup>(12)</sup>

## 要 約

スギ花粉抗原をp-cellulose column chromatographyで2つの抗原活性画分(fraction A,B)に分画した。この両者のいずれが主要な抗原であるかを推定する方法としてELISA阻害試験を用い、その阻害曲線からfraction Bが主要な抗原として寄与していると推定した。

## 引 用 文 献

- (1) Wide, L., Bennich, H. & Johansson, S.G.O.: Lancet **2**, 1105-1107 (1967)
- (2) 宮井 潔: 感染炎症免疫 **10**, 40-52 (1980)
- (3) 向島 達: 最新医学 **36**, 887-893 (1981)
- (4) 四宮 敬介: アレルギー **31**, 81-85 (1982)
- (5) 井手 武、芦田 恒雄、大久 長範、梅村 康義、田端 司郎、鳥居 健三: 最新医学 **37**, 2261-2267 (1982)
- (6) 星 恵子: アレルギー **30**, 1052-1059 (1981)
- (7) Yman, L., Ponterius, G. & Brandt, R.: in Develop. Biol. Standard. Vol. 29, pp. 151-165, Karger, Basel, (1975)
- (8) Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T. & Shida, T.: J. Allergy Clin. Immunol. **71**, 77-86 (1983)
- (9) King, T. P.: Adv. Immunol. **23**, 77-105 (1976)
- (10) 芦田 恒雄: 奈良医学雑誌 **35**, 719-727 (1984)
- (11) 宮本 昭正、真野 健次、伊藤 幸治、寒谷 百合子、堀内 淑彦: アレルギー **22**, 584-593 (1973)
- (12) 井手 武、田端 司郎、芦田 恒雄: アレルギー **33**, 681-681 (1984) (受理日 1987年2月2日)