

高速液体クロマトグラフィーの花粉抗原分析への応用; ゲル濾過カラムを用いたヒノキ花粉の抗原分析

井手 武*・田端司郎*・芦田恒雄**

Allergen Analysis of *Hinoki* Pollen with HPLC Using a Gel Filtration Column

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

* Department of Chemistry, Nara Medical University, 840 Shijo, Kashihara,
Nara 634, Japan

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

A major allergen of *Hinoki* (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) pollen was purified by HPLC using a gel filtration column (TSK G-3000SW). This method was rapid and convenient for detection and separation of the allergen.

Key words: allergen, *Hinoki* pollen, HPLC

緒 言

ある植物の花粉症が疑われる場合、そのアレルギーエキスをRAST用diskが市販されてなければ、その植物の花粉から抗原を抽出し、皮膚試験、鼻粘膜誘発試験やRAST用ディスクを調製して、それらの結果から花粉症を診断する必要がある⁽¹⁾。さらに、抗原成分の分析を行うには抽出条件の検討、生化学的方法による分離精製の過程における損失、変性や失活なども考慮しなければならない。しかも、これらのすべての過程でボランティアに*in vivo* testを施行することはできないので、抗原活性のスクリーニングには保存患者血清による直接、間接のRASTによっている^(1, 2, 3, 4, 5)。しかし操作の煩雑さや経費面での問題があった。今回、ゲル濾過カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が、Phadezyme RAST (E-RAST) での阻害試験との併用により抗原のスクリーニングにも有用であると思われたので報告する。

材料および方法

1. ヒノキ花粉

1980年3月下旬の飛散期に採集したものを使用時まで-70℃に保存した。

2. ヒノキ花粉粗抽出物 (DP-HCE)

デキストロース-フェノール液⁽⁶⁾ (4.5% グルコース、0.2% 重炭酸ナトリウム、0.5% フェノール) へ1/20 (W/V) の花粉を浸潤して、4℃、24時間振盪抽出した。これを遠心分離して上澄をフェノール臭がなくなるまで流水中で透析、さらに蒸留水に対して透析後、凍結乾燥物としてデシケーター中に保存した。

3. 血 清

ヒノキ開花期にも症状があるスギ花粉症患者で、鼻汁好酸球陽性、皮内反応、鼻粘膜誘発試験、ラジオ・アレルギーソルベント・テスト (RAST) でヒノキ花粉に陽性であった患者血清5検体をプールし、使用時まで-70℃に保存した。

4. E-RAST 阻害試験

ペーパーディスクの活性化およびアレルギー結合

* 〒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

ディスク(DP-HCE disc)の調製は、DP-HCEを用いて前報の方法^(3,4)で行った。また、阻害試験は被検液50 μ lと1/4希釈患者血清50 μ lとを37℃、1時間保温して、前報の方法⁽³⁾で行った。

5. クロマトグラフィー

DEAE-celluloseはDE52(Whatman)を使用した。

ゲル濾過カラムを用いたHPLCは、装置本体にはポンプ；モデル6000A、検出器；モデル441、イン

ジェクター；モデルU6K(いずれもWaters)、カラムにはTSK G-3000SW(7.5 mm ID \times 60 cm、TOYO SODA)を使用した。

結果ならびに考察

DP-HCEはスギ花粉の場合と同じく、ペクチン様酸性多糖含量が多く、アレルギーの分析を困難にしている。Fig. 1は、DP-HCE(500 mg)のDEAE-セルロースクロマトグラフィー(pH 5.6)の結果である。

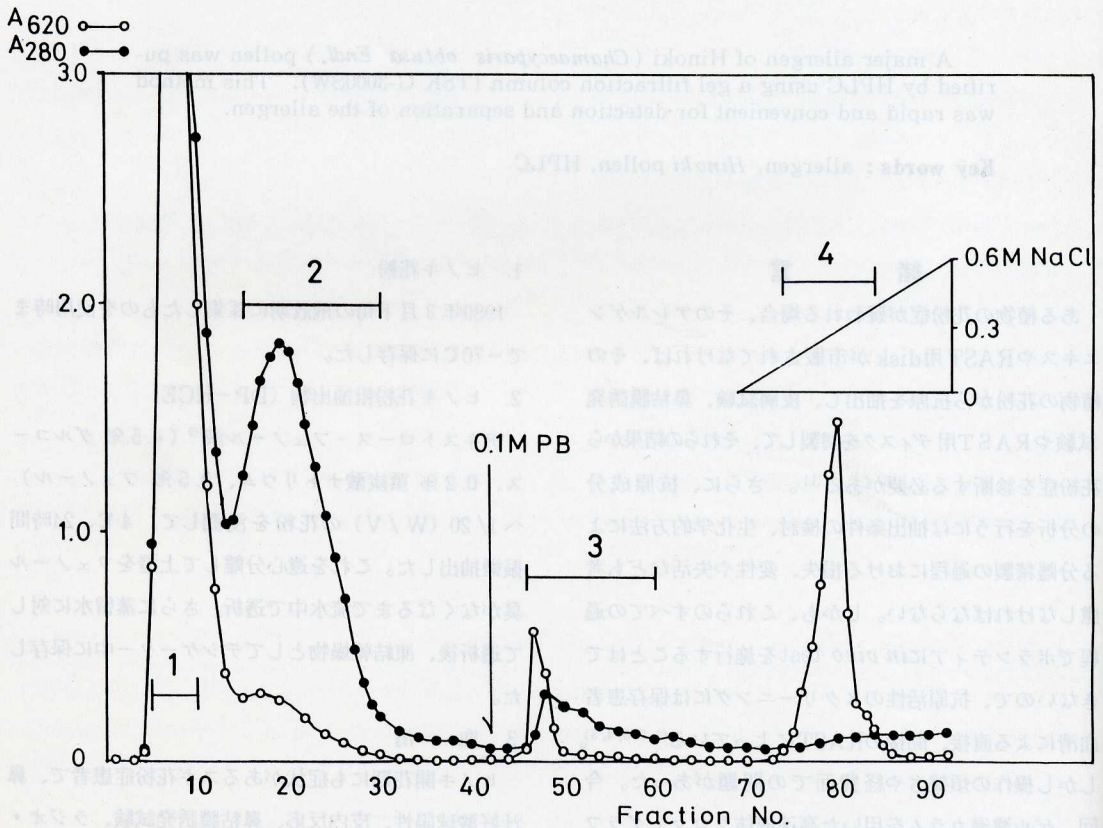


Fig. 1. Chromatography of DP-HCE on a DEAE-cellulose column.

DP-HCE (500 mg) in 50ml of 0.01M sodium phosphate buffer, pH 5.6, was applied on a column (ϕ 2.6 \times 19cm) equilibrated with the same buffer. The column was washed with 800ml of the same buffer, and then the materials were eluted with 500ml of 0.1M sodium phosphate buffer, pH5.6 and finally with a linear gradient of 0~0.6M NaCl (total volume 400ml). Twenty ml-fractions were collected. The fractions indicated, 1~4, were separately pooled and lyophilized after dialysis against distilled water.

●=Absorbance at 280nm, ○=absorbance at 620nm for the anthrone sulfuric acid carbohydrate test⁽⁷⁾.

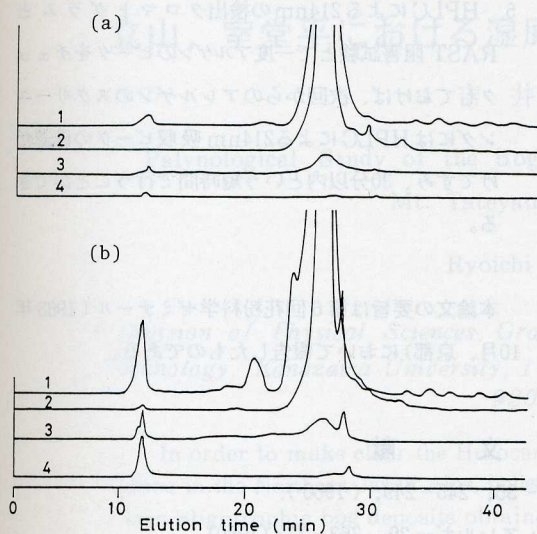


Fig. 2. Chromatography of the fractions obtained in Fig. 1 on a TSK G-3000SW column.

Each fraction (2mg) was dissolved in 1ml of PBS. Twenty-five μ l was applied and each effluent was monitored at 280nm (a) and 214nm (b). HPLC was performed as below: mobile phase, PBS; flow rate, 0.9ml/min; pressure, 500-600psi; monitoring AUFS, 0.05 (at 280nm) and 0.1 (at 214nm).

非吸着で糖、蛋白含量がいずれも多い画分(1, 82mg)、蛋白含量が多い画分(2, 31mg)、0.1 Mリン酸緩衝液で溶出される画分(3, 83mg)、0.1~0.3 M NaClで溶出される画分(4, 163mg)を得た。この4画分をPBS(0.15 M NaClを含む0.01 Mリン酸緩衝液、pH 7.0)にて400 μ g/mlとし、DP-HCE discを用いて単位重量当たりのE-RAST阻害試験を行った結果、画分1、2、3、4の阻害率はそれぞれ78、6、12、7%であった。この結果は画分1に強いアレルゲン活性の存在を示している。

次に画分1と他の画分のアレルゲン活性の違いを検索する目的で、TSK G-3000SW(シリカ系のゲル濾過用カラム)を用いてHPLCを行った(Fig. 2)。

280 nmで検出したクロマトグラムでは、E-RAST阻害試験の結果を直接反映していると思われるピークは見当たらなかった(Fig. 2, a)。214nmでは検出感

Table 1. E-RAST inhibition for fractions from GFC.

elution time	A ₂₁₄	% inhibition
10 12	0.032	26
20 22	0.022	74
22 24	0.042	14
24 26	0.380	0
26 28	0.400	0
28 30	0.031	0
30 32	0.027	7
32 34	0.028	0
34 36	0.035	3
36 38	0.021	0
38 40	0.022	0

度を1/2としたが21分付近に溶出される特に目立つピークが画分1にのみ強く見られた(Fig. 2, b)。

次に画分1(2 mg/ml)、200 μ lを同条件でHPLCを行い、Fig. 2, bのピークを主に経時的に分取し、E-RAST阻害試験を試みた。つまりV₀付近(10分から2分間)と20分から2分間隔で40分までの画分(11検体)について、そのA₂₁₄値と阻害率を求めた(Table 1)。21分のピークに高い阻害が見られ、ついで11分、23分の順で24分から30分のピークにはA₂₁₄が大きいのに全く阻害はかからなかった。別に行った画分1の希釈列によるE-RAST阻害曲線からすると、21分のピーク(A₂₁₄ 0.022)の阻害率は画分1の20 μ g/mlに相当した。また、今回HPLCで21分付近に溶出された画分は、我々が以前報告した⁽⁸⁾ものと同じく分子量4~4.5万、電気泳動的に単一なものであった。

なお、E. Landmarkら⁽⁹⁾が糸状菌の一種である*Cladosporium herbaum*の抗原分析に同じカラムを使用し、A₂₁₄で検出した報告がある。

結 語

1. ヒノキ花粉のDP抽出液から、DEAE-セルロー

- スカラムクロマトグラフィー、およびTSK G-3000 SWカラムを用いたHPCLを用いて、ヒノキ花粉の主アレルゲンを単一に得ることができた。
2. ヒノキ花粉中の主アレルゲンは280nmよりも214nmの方が約10倍感度よく検出された。
 3. PBSを溶出溶媒としているのでRAST 阻害試験にそのまま使用できる。
 4. 214nm 付近に吸収の大きいカルボン酸系の緩衝液は使用できない。

5. HPLCによる214nmの検出クロマトグラムとRAST 阻害試験とで一度アレルゲンのピークをチェックしておけば、次回からのアレルゲンのスクリーニングにはHPLCによる214nm 吸収ピークの確認だけで済み、30分以内という短時間で行うことができる。

本論文の要旨は第6回花粉科学ゼミナール(1983年10月、京都)において報告したものである。

引 用 文 献

- (1) 芦田恒雄、松永 喬、井手 武、田端司郎：アレルギー **35**, 245-249, (1986)。
- (2) 安枝 浩、油井泰雄、清水章治、遠藤久子、信太隆夫：アレルギー **29**, 763-772 (1980)。
- (3) 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)。
- (4) 井手 武、田端司郎、芦田恒雄：日本花粉学会誌 **33**, 15-18 (1987)
- (5) Yman, L., G. Ponterius and R. Brandt : In "Develop. boil. Standard." Vol. 29, pp 151-165, S. Karger, Basel (1975).
- (6) Unger, L. L. : J. Allergy **4**, 92-97 (1933).
- (7) Koehler, L. H. : Anal. Chem., **24**, 1576-1579 (1952).
- (8) 井手 武、芦田恒雄、田端司郎、鳥居健三：アレルギー **32**, 596 (1983).
- (9) Landmark, E. and L. Aukust, : Int. Archs Allergy appl. Immun. **78**, 71-76 (1985).

(受理日 1988年4月1日)