

## (花粉学実験講座)

## 9 花粉アレルギー実験法

## はじめに

花粉症は花粉をアレルゲンとする I 型アレルギーである。すなわち、特定の花粉に感作された個体はその花粉に特異的な IgE 抗体を産生し、アレルゲンの再度の侵入により抗原抗体反応が引き起こされてアレルギー症状が発現する。発症機序をはじめ、花粉症に関する総合的な内容については文献<sup>1)</sup>を参考にしたい。

花粉症に関連する実験手技の原理は、花粉から抽出したアレルゲンと花粉症患者血清中の IgE 抗体との抗原抗体反応を利用するものが多い。ここでは抽出、アレルゲン活性測定法を中心に述べる。

## 花粉アレルゲンの抽出

すべての実験は、花粉からアレルゲンを抽出することに始まる。抽出液として、phosphate buffered saline (PBS, pH7.0~7.6), 0.05~0.125M 炭酸水素アンモニウム, dextrose-phenol 液 (DP液), Coca 液など一般に弱アルカリ性溶液が用いられる。花粉症の臨床に必要なアレルゲンエキスの多くは DP 液によって抽出されたものである。また、この方法で得たものを実験材料として使用することもできる。

## &lt;オオバヤシャブシ花粉粗エキス(OYCE)の抽出&gt;

## (方法)

- (1) DP 液の作製: グルコース45g, 炭酸水素ナトリウム 2g, フェノール 5g に蒸留水を加え、全量 1,000ml とする。
- (2) 花粉 (40g) をプラスチックチューブに移し、約20倍量の DP 液を加えて、4℃で一晩水平振盪する。
- (3) 10,000rpm で20分間冷却遠心分離する。
- (4) 上清をセルロース透析膜に移し、流水、蒸留水の順にフェノール臭がなくなるまで透析する。
- (5) 10,000rpm で20分間冷却遠心分離する。
- (6) 凍結乾燥により OYCE (611mg) を得る。

## アレルゲン活性測定法

研究室における *in vitro* のアレルゲン活性測定法として、radioallergosorbent test (RAST) の inhibition, ヒスタミン遊離試験, イムノブロッティング, 免疫電気泳動などがある。これらは文献<sup>(2-4)</sup>に詳しく書かれているが、ここでは著者らが日常行っているものを紹介する。

## 1. IgE-ELISA inhibition

## 1-1. IgE-ELISA

## (原理)

アレルゲンを結合させたディスクに患者血清を反応させると、そのアレルゲンに特異的な血清中の IgE 抗体がディスクのアレルゲンと結合する。これに酵素で標識した抗 IgE 抗体を反応させると、この酵素結合抗 IgE 抗体はディスクに結合した IgE 抗体の量に比例して結合する。すなわち、ディスク + アレルゲン + IgE 抗体 + 抗 IgE 抗体の結合物ができる。ここで、その酵素に特異的な基質を反応させ、生じた発色の程度を分光光度計で測定する。IgE 抗体量が多いと色が濃くなる。

特異的 IgE 抗体を測定する *in vitro* の検査として、IgE-RAST あるいは IgE-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) が用いられる。前者は放射性物質を使用することから後者の使用が一般的であるので、以下アレルゲンディスクの作製法から IgE-ELISA の方法までを記す。

## &lt;オオバヤシャブシ花粉アレルゲンディスクの調製&gt;

## (原理)

ロ紙 (セルロース) の水酸基を CNBr でイミドカルボネートとし (活性化), タンパクのアミノ基と結合させる (N-置換イミドカルボネート)。

## (操作)

- (1) 東洋ロ紙 No. 6 をパンチで穿孔し、直径 5 mm の円形ディスクを作製する。

- (2) ディスク 3 g (1,000枚) を室温で60mlの蒸留水に30分間浸す.
- (3) 蒸留水を吸引除去, あらたに 200mlの蒸留水を加える.
- (4) CNBr 粉末 10gを加え, ただちに 8 M NaOH を滴下して pH を10.5から11.5に保つ.
- (5) 30分後ガラスフィルター上へ移す.
- (6) 氷冷蒸留水 2,000mlで吸引洗浄する.
- (7) 氷冷0.1M NaHCO<sub>3</sub> 2,000mlで吸引洗浄する.
- (8) 氷冷蒸留水 2,000mlで吸引洗浄する(活性化ディスク).
- (9) OYCE 100mgをborate buffered saline (0.02 M boric acid, 0.15M NaCl, pH8.0) 10mlに溶解する.
- (10) 4 °C, 10,000rpmで10分間遠心分離する.
- (11) 上清をプラスチック容器にとり, 活性化ディスク200枚を入れて4 °Cで2日間水平振盪する.
- (12) 液を吸引除去し, 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 50mlで洗浄する.
- (13) 0.05M エタノールアミンを含む0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH8.0) 20ml中で3時間水平振盪する.
- (14) 液を吸引除去後0.1M NaHCO<sub>3</sub> 50mlで洗浄する.
- (15) 0.1M酢酸バッファー (pH4.0) 50mlで3回洗浄する.
- (16) インキュベーション バッファー (0.01M phosphate buffered saline, pH7.3 に 0.02%

NaN<sub>3</sub>, 2% BSA, 0.05% Tween 20を溶解) 50ml で2回洗浄する.

(17) インキュベーション バッファー中4 °Cで保存する.

＜IgE-ELISA 法＞

(用意するもの)

IgE 抗体測定用試薬<sup>\*1</sup> (酵素標識抗 IgE 抗体<sup>\*2</sup>, 基質), ポリスチレンチューブ, 分光光度計, アレルゲンディスク, 患者血清.

<sup>\*1</sup> 試薬やチューブの準備が面倒な場合には, IgE 抗体測定用キットが市販されている (表1)

<sup>\*2</sup> パーオキシダーゼ標識 (KPL, TAGO, ICN), ホスファターゼ標識 (KPL) が市販されているので自家調製できる.

以下, Phadezym RAST キット (ファルマシア) を使った IgE-ELISA について記す.

(操作)

- (1) ポリスチレンチューブに被検血清50  $\mu$ l を入れ, アレルゲンディスク 1 枚を浸す.
- (2) 室温で3時間放置する.
- (3) 被検血清を吸引除去後, 洗浄液 (0.05% Tween 20含有0.15M NaCl) 2.5mlを加えて充分洗浄する. この洗浄操作を3回繰り返す.
- (4) 酵素標識抗 IgE 溶液50  $\mu$ l を加えて室温で16~18時間静置する.
- (5) 洗浄液 2.5mlで吸引洗浄を3回繰り返す.

表 1 IgE 抗体測定法の種類と原理

| 製 品 名                 | 国内取扱会社       | 測 定 原 理  |
|-----------------------|--------------|----------|
| Pharmacia RAST        | Pharmacia    | RIA／EIA  |
| Pharmacia CAP system  | Pharmacia    | RIA／FEIA |
| MAST                  | 日立化成 (カインス)  | EIA      |
| FAST-Plus             | 住友 3 M       | FEIA     |
| AlaSTAT               | 日本DPC (三光純薬) | EIA      |
| QUIDEL Allergy Screen | 富士レビオ        | EIA      |
| SIST                  | シオノギ         | RIA      |
| EAST                  | シオノギ         | EIA      |
| VAST／IP specific IgE  | バクスター        | RIA／EIA  |
| MATRIX                | ダイナボット       | EIA      |
| MAGIC LITE SQ (S-IgE) | チバ・コーニング     | EIA      |

RIA : radioimmunoassay  
EIA : enzyme immunoassay  
FEIA : fluorescent enzyme immunoassay

- (6) 基質溶解液 200  $\mu\text{l}$  を加え、ただちに37°Cでインキュベートする。
- (7) 2時間後反応停止液 1 mlを加え、吸光度 ( $A_{420}$ ) を測定する。

#### ＜オオバヤシャブシ IgE-ELISA の血清希釈試験＞

##### (目的)

ディスクの検定と血清中 IgE 抗体のアレルゲン特異性の検討をかねて希釈試験を行なう。

##### (方法)

PBS で血清の希釈系列を作製し、それぞれの血清についてELISA を行なう。3倍希釈系列を用いられることが多いが、2, 4, 5, 10倍などでもよい。

この場合に用いる血清は、診断を目的とするものの他に、陽性対照としてその花粉症ではないことが明らかで、かつ他のアレルギーに罹患している者から得たもの、陰性対照として非アレルギーのものも必要である。

希釈度と吸光度との関係を片対数グラフにプロットした場合、診断を目的とする血清では直線性を示し、陽性ならびに陰性対照の血清ではほぼ0に近いくらい低い吸光度を示すようなら、診断を目的とする血清中の抗体がアレルゲンに特異的であり、作製したディスクも有用であることを示している。

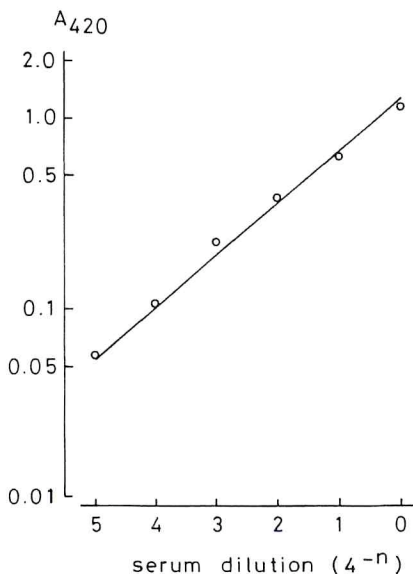


図1. IgE-ELISA 血清希釈試験

オオバヤシャブシ花粉症のプール血清で希釈試験を行なった結果を図1に示した。

#### 1-2. IgE-ELISA inhibition test

##### (目的)

アレルゲンと患者血清を前もって反応させた後 IgE-ELISA を行なうことにより、血清中 IgE 抗体のアレルゲン特異性を検討するとともに、アレルゲン活性を半定量的に測定する。

##### (方法)

- (1) PBS でディスクに結合させたアレルゲンの希釈系列をつくる。対照として他のアレルゲンの希釈系列もつくる。
- (2) 前記希釈試験で吸光度が0.9前後になるよう PBS で被検血清を希釈する。
- (3) 希釈したアレルゲン各50  $\mu\text{l}$  および対照としてアレルゲンの代わりにPBS 50  $\mu\text{l}$  と、被検血清 50  $\mu\text{l}$  とをプラスチックチューブ内で混和し、室温で1時間放置する。
- (4) このチューブにアレルゲンディスクを1枚ずつ入れ、室温で3時間放置する。
- (5) IgE-ELISA を行なう (1-1. IgE-ELISA 法の項参照)。
- (6) 次式により inhibition のパーセントを求める。

$$\left[ 1 - \frac{(\text{アレルゲン+血清}) \text{ の吸光度}}{(\text{PBS+血清}) \text{ の吸光度}} \right] \times 100$$

アレルゲンの濃度が高いと inhibition が強くかかり、濃度が低くなるにしたがって inhibition の程度が低下し、他のアレルゲンで inhibition がかからないようなら、その抗体はアレルゲンに特異的であるといえる。

オオバヤシャブシ花粉症のプール血清で IgE-ELISA inhibition test を行なった結果を図2に示す。

IgE-ELISA inhibition test は、抗体のアレルゲン特異性をみるためだけでなく、スギとヒノキなど異種間の共通抗原性を検討するためにも用いられる。

## 2. イムノブロッティング

##### (原理)

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), SDS-PAGE, または IEF-PAGE (iso-electric focusing) により泳動分離したタンパクを膜支持体に転写し (ウエスタンブロッティング), 膜面でタンパク (抗原) と抗体を反応させることによって抗体が結合するタンパクを検討するものであ

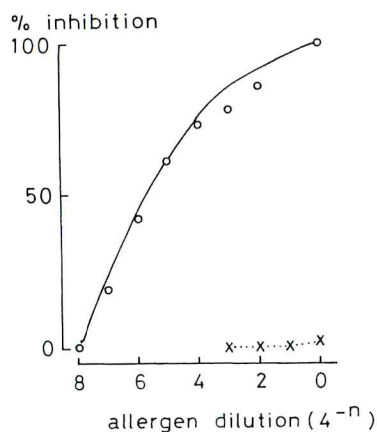


図2. IgE-ELISA inhibition test

$4^{-0}$  の OYCE 重量は  $150 \mu\text{g}$

○—○ : OYCE,

×……× : スギ花粉エキス

る。花粉症研究においては標識抗 IgE 抗体を用いることによりアレルゲンの検索が個々のタンパクレベルで可能となる。

#### <オオバヤシャブシ花粉のアレルゲン分析例>

##### (目的)

OYCE を SDS-PAGE により分子量の差で分離し、ウエスタンブロッティングして、IgE 抗体が結合するタンパクを酵素免疫学的方法で検出する。

##### (用意するもの)

ブロッティング溶液<sup>\*1</sup>、転写膜<sup>\*2</sup>、PBS、PBS-T<sup>\*3</sup>、3% BSA-PBS<sup>\*4</sup>、1% BSA-PBS-T<sup>\*5</sup>、患者血清、陰性対照血清、HRP 標識抗 IgE 抗体<sup>\*6</sup>、ECL キット<sup>\*7</sup>、X線フィルム<sup>\*8</sup>

<sup>\*1</sup> 0.125M Tris, 0.96M グリシン, 20% (V/V) メタノール

<sup>\*2</sup> PVDF 膜 (ポリビニリデンジフルオリド)、イモビロン P (ミリポア)

<sup>\*3</sup> 1% Tween 20 含有 PBS

<sup>\*4</sup> 3% BSA 含有 PBS

<sup>\*5</sup> 1% BSA 含有 PBS-T

<sup>\*6</sup> KPL 社

<sup>\*7</sup> アマーシャム社

<sup>\*8</sup> コダック社 XRP-5

##### (操作)

#### 2-1. SDS-PAGE

Laemmli の方法に準じて濃縮ゲルを作成し、15% 泳動ゲル、ミニスラブ法 (日本エイドー) で行ない、色素 (BPB) の泳動距離を 5 cm とした。試料は SDS 濃度 2% とし、加熱処理せずに調製した。

#### 2-2. ウエスタンブロッティング

- (1) サイズを切り揃えた PVDF 膜 1 枚とロ紙 (Whatman 3MM) 5 枚をブロッティング溶液に 30 分以上浸しておく。ただし、PVDF 膜はこの操作の前に 20 秒間メタノールに浸す。
- (2) 電気泳動後直ちにゲルを取り出し、ブロッティング溶液ですばやく濯いだ後、前もって用意しておいた (1) のロ紙 1 枚の上の PVDF 膜にゲルを重ねる。このとき膜とゲルの間に気泡があれば指で押さえて追い出す。次にゲルのレーンに相当する膜面に鉛筆で目印をつける。ゲルや膜はすべての操作の間ピンセットかビニール手袋で扱う。
- (3) セミドライ転写装置の電極面 (陽極は下) をブロッティング溶液で湿らせておき、(1) のロ紙 2 枚をおく。気泡が入らぬようにしてその上に (2) の PVDF 膜ごとゲルを重ねる。ゲルの上にさらに (1) のロ紙 2 枚を置き、その上に陰極を重ねる。
- (4) ロ紙サイズ  $10 \times 9$  cm の場合、140mA 定電流で 90 分間通電して転写する。

#### 2-3. 酵素免疫学的検出

- (1) タンパクの吸着されていない膜面を 3% BSA-PBS に  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩または  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間浸して非特異的吸着を防ぐ。
- (2) 予め膜面につけた目印に沿って PVDF をカットする。
- (3) 洗浄: PBS-T で素早く 2 回洗浄した後、軽く振盪しながら 5 分間の洗浄を 2 回繰り返す。
- (4) 第一抗体: カットした PVDF を 1% BSA-PBS-T で 4 倍に希釈した患者血清、または陰性対照血清に浸し、1 時間軽く振盪する。ブランクには血清の代わりに 1% BSA-PBS-T を用いる。
- (5) 洗浄: 素早く 2 回の洗浄後、振盪しながらの洗浄 15 分を 1 回、5 分を 2 回繰り返す。
- (6) 第二抗体: PVDF を 1% BSA-PBS-T で 1000 倍に希釈した酵素結合抗 IgE 抗体溶液に浸し、1 時間振盪する。
- (7) 洗浄: 素早い洗浄を 2 回、振盪しながらの洗浄 15 分を 1 回、5 分を 4 回繰り返す。

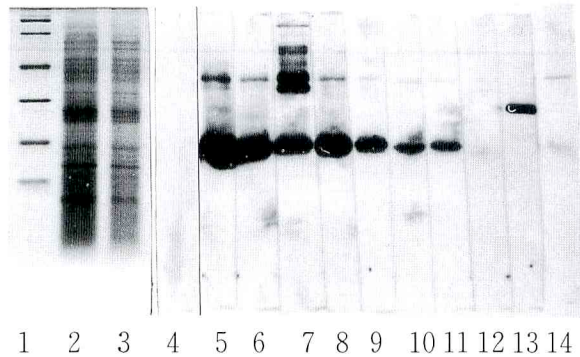


図3. 個別血清による OYCE のイムノブロッティング

lane 1: 分子量マーカー (マーカーの分子量は上から順に97, 66, 42, 30, 20 14kD)

lane 2~3: SDS-PAGE (OYCE 重量は lane 2 が10  $\mu$ g, lane 3 が5  $\mu$ g, 銀染色)

lane 4: 陰性対照血清のイムノブロッティング (OYCE 5  $\mu$ g)

lane 5~14 オオバヤシャブシ花粉症患者個別血清によるイムノブロッティング (OYCE 5  $\mu$ g)  
オオバヤシャブシ花粉主アレルゲンの分子量は18kDと推定される。

- (8) 検出: 以上の操作が終ると, ECL により IgE 抗体が結合したタンパクバンドをレントゲンフィルム上に検出する (図3)。

### 3. Crossed enzyme-immunoelectrophoresis (CEIE)

#### 3-1. Crossed immunoelectrophoresis (CIE)

(原理)

2次元電気泳動法の1つであり, まず試料を荷電の違いで構成タンパクに分離し, 次にそれと垂直方向に抗血清を含む担体中で更に分離する手技である。この特徴は, 抗原中の分離された構成成分は抗血清と対向しながら泳動されることにより, それぞれに特異的な抗体との間で特異的抗原抗体複合物を形成させながら分離する (immuno-sieving) ことを応用したものである。

＜オオバヤシャブシ花粉の抗原分析例＞

(用意するもの)

アガロース電気泳動槽; 定電圧装置; ガラス板 (84mm×94mm); 泳動緩衝液<sup>\*1</sup>; 1% (W/V) アガロースゲル<sup>\*2</sup>; 花粉アレルゲン<sup>\*3</sup>; 抗血清<sup>\*4</sup>; 脱

色液<sup>\*5</sup>

<sup>\*1</sup> 0.073M Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.024M Barbitol, 0.05M NaN<sub>3</sub> (pH 8.6)

<sup>\*2</sup> アガロース (Agarose GP-36/ナカライテスク) を泳動緩衝液と加熱溶解, 冷蔵保存. アガロースはゲル化温度の低いものがよい。

<sup>\*3</sup> OYCE

<sup>\*4</sup> OYCE の生理食塩水溶液 (20mg/ml) と incomplete Freund's adjuvant (DIFCO) の等量混合 emulsion 1ml をウサギの皮下数ヵ所に週1回計5回注射, 最終注射から2週間後採血して抗血清を調製

<sup>\*5</sup> エタノール: 酢酸: 水 = 9 : 2 : 9

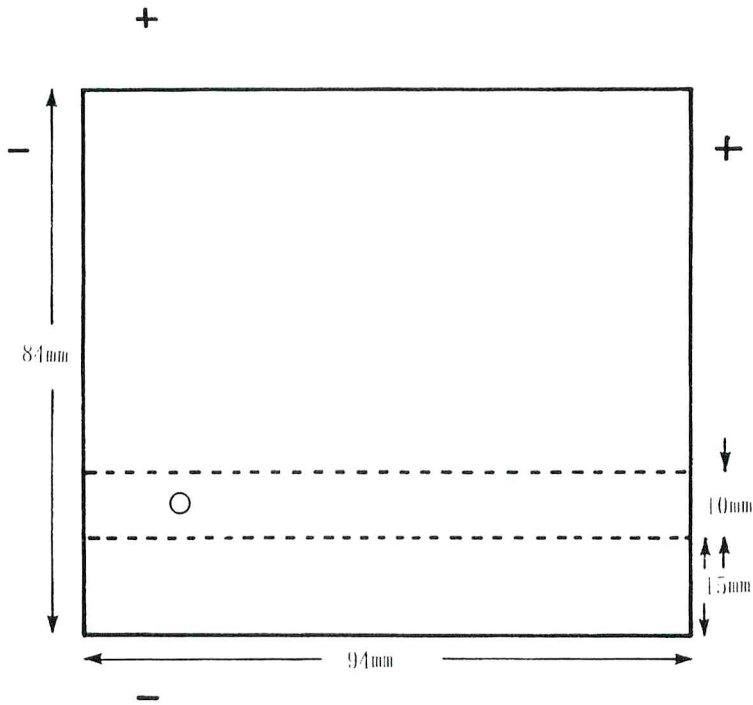
(操作)

#### 1. 1次元泳動用アガロースゲルの作成

1%アガロースゲル7.6mlと泳動緩衝液0.8mlをよく混合加熱して, 水平に保ったガラス板上に注いで泳動ゲルを作成する. ウェル (φ 4 mm) を作る。 (図4)

#### 2. 1次元電気泳動

OYCE を泳動緩衝液に溶解 (0.4mg/ml), 遠心分離した上清12  $\mu$ l をウェルに入れ, ガラス板長辺



に沿ってウエルの反対側を陽極にして、 $6\text{ V/cm}$ で2時間泳動する(図4)。

### 3. 2次元泳動用アガロースゲルの作成

1次元泳動終了ゲルからウエルを含む10mmの幅を残して、泳動方向の上下のゲルをカッターで切取り除く(図4)。次に、1%アガロースゲルを加熱溶解して9mlを試験管にとり $50^{\circ}\text{C}$ 位に冷やして抗血清1mlを加えてよく混合したものを、ガラス板に残したゲルも含め全面に注いで2次元の泳動用ゲルを作成する。

### 4. 2次元電気泳動

ガラス板の短辺に沿ってウエルを境に面積の広い側を陽極にして $6\text{ V/cm}$ で2.5時間泳動する。泳動終了後、密閉した湿潤箱に入れ、室温、16時間静置する。沈降線が確認できたら写真撮影して記録することも可能である。

### 5. 残った抗体の除去とゲルの洗浄

泳動したゲル上に生理食塩水で濡らした口紙2枚、乾いたペーパータオル、同じ大きさのガラス板、更にその上に約1kgの重しを置いて、10分間放置する(プレス)。ゲルのついたガラス板を生理食塩水に浸して30分間静置してから再度プレスする。

### 6. 沈降線の染色

蒸留水中に10分間静置してから風乾する。完全に乾いてから0.25% (W/V) クーマシーブリリアントブルー(脱色液に溶解)に浸して15~30分間染色後、脱色液で洗浄、風乾する(図5)。

(結果)

オオバヤシャブシ花粉の抗原が少なくとも15成分確認できる。

### 3-2. Crossed enzyme-

immuno-electrophoresis (CEIE)

(原理)

H.Lφwenstein ら<sup>10)</sup>のCrossed radio-immuno-electrophoresis (CRIE)、即ち、CIEのプレート上で特異的IgE抗体(患者血清)、次に<sup>125</sup>I-labelled anti-IgEを作用させてX線フィルム上にアレルゲンを検出した方法を改変したものである。つまり、enzyme-labelled anti-IgEを用い、酵素反応で検出する点に特徴があり、検出感度も高い。

＜オオバヤシャブシ花粉アレルゲン分析例＞

(用意するもの)

CIEで使用した器具、試薬類；Incubation

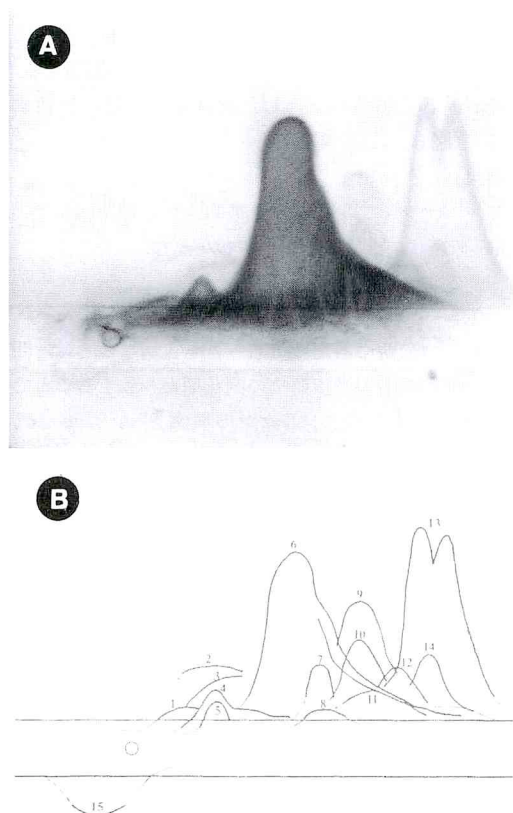


図5. オオバヤシャブシ抗原のCIE

① CIE ② CIEの読取図

buffer A (IB-A)<sup>\*1</sup>; Incubation buffer B (IB-B)<sup>\*2</sup>; 試料<sup>\*3</sup>; 患者血清<sup>\*4</sup>; Galactosidase labelled anti-IgE<sup>\*5</sup>; 基質<sup>\*6</sup>

<sup>\*1</sup> 0.05M phosphate buffer, pH7.5 (含, 3% (W/V) BSA, 0.9% (W/V) NaCl, 0.1% (W/V) NaN<sub>3</sub>, 0.1% (W/V) EDTA, 2% (W/V) Tween 20)

<sup>\*2</sup> 0.02M phosphate buffer, pH6.0 (含, 0.1M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>)

<sup>\*3</sup> OYCE を sephadex G-75 での gel filtration, つぎに electrofocusing して RAST inhibition により活性を確認した画分

<sup>\*4</sup> ハンノキ RAST クラス2以上, オオバヤシャブシ スクラッチテスト陽性の血清

<sup>\*5</sup> ファデザイム RAST キット (ファルマシア)

<sup>\*6</sup> 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) を40mg/ml濃度に Dimethylformamide (DMF) で溶解, 凍結保存 (操作)

#### 1. CIE

試料が異なることを除けば, 前述の CIE の項操作1.~4. と全く同じである.

#### 2. 抗血清の除去と洗浄

生理食塩水での洗浄とプレス (CIE の操作5.) を繰り返して抗血清を取り除く. さらに, IB-A に10分間浸した後, プレスする.

#### 3. 患者血清 IgE 抗体との反応と洗浄

抗血清を除去しプレスしたガラス板をセット (図

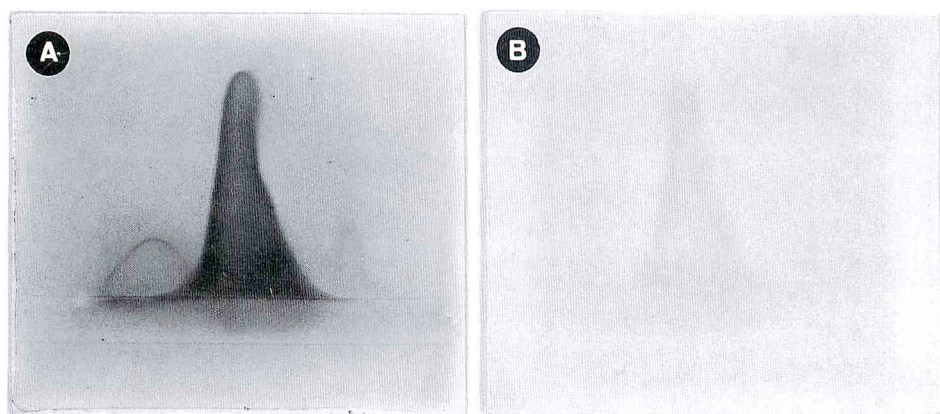


図6. オオバヤシャブシ抗原のpI 5~6画分のCIEとCEIE

① CIE ② CEIE

4) する。IB-A 4.5ml と患者血清 0.5ml を混合したものを、プレスしたゲル上に生理食塩水に浸したロ紙片をスぺーサーとして置いたガラス板との間に流し込む。湿潤箱中に室温、16時間静置する。生理食塩水に浸して計4回洗浄し、次に IB-A に10分間浸した後、プレスする。

#### 4. 酵素標識抗 IgE 抗体との反応と洗浄

IB-A 3.2ml と Galactosidase labelled anti-IgE 0.5ml を混合したものを、プレスしたゲルとスぺーサーを置いたガラス板との間に流し込んで、湿潤箱中に室温、16時間静置する。生理食塩水に浸して洗浄とプレスを3回繰り返す。次に、IB-B に10分間浸した後、プレスする。

#### 5. 酵素と基質との反応

IB-B 4ml と基質溶液 0.1ml を混合したものをプレスしたゲルとスぺーサーを置いたガラス板との間に流し込んで、湿潤箱中に 37℃、1～2日間静置する。特異的 IgE 抗体の結合した沈降線が青色に発色する。(図6-B)。

#### (結果)

オオバヤシャブシ花粉の主アレルゲンは 18kD、pI5～6 のタンパク質であることがわかった。

### 未報告の花粉症診断の実際

花粉症の診断にあたってもっとも大切なことは、問診上、発症時期が当該植物の開花期と一致することである。それをもとにアレルゲンの検索を *in vivo* または *in vitro* で行なうことになる。

表2 市販花粉アレルゲンディスク

| 樹 木        | イ ネ 科      | そ の 他    |
|------------|------------|----------|
| カエデ        | ハルガヤ       | ブタクサ     |
| ハンノキ       | ギョウギシバ     | ブタクサモドキ  |
| シラカンバ      | カモガヤ       | オオブタクサ   |
| ハシバミ       | ヒロハウシノケグサ  | ニセブタクサ   |
| ブナ         | ホソムギ       | ニガヨモギ    |
| ビャクシン      | オオアワガエリ    | ヨモギ      |
| コナラ        | アシ         | フランスギク   |
| ニレ         | ナガハグサ      | タンポポ     |
| オリーブ       | コヌカグサ      | ヘラオオバコ   |
| クルミ        | セイバンモロコシ   | シロザ      |
| カエデバスズカケノキ | コスズメノチャヒキ  | オカヒジキ    |
| ヤナギ        | ライムギ       | アキノキリンソウ |
| ハコヤナギ      | シラゲガヤ      | オナモミ     |
| トネリコ       | オートムギ      | アオゲイトウ   |
| マツ         | コムギ        | ハマアカザ    |
| スギ         | オオスズメノテッポウ | イソホウキ    |
| ヒノキ        | スズメノヒエ     | ヒメスイバ    |
| ユーカリ       | オオムギ       | ヒカゲミズ    |
| アカシア       | トウモロコシ     | イラクサ     |
| ライラック      |            | バラ       |
| ペカン        |            | チューリップ   |
| シナノキ       |            | ナタネ      |
| クワ         |            | カミツレ     |
| クログルミ      |            |          |
| カシ         |            |          |
| クリ         |            |          |

*in vivo* の検査として、皮内反応、スクラッチテスト、プリックテストなどの皮膚試験と誘発試験ならびにこれらの閾値テストがあるが、その実施には資格が必要であることから専門書に譲る。

特異的 IgE を測定する *in vitro* の検査には、これまで述べてきた IgE-RAST あるいは IgE-ELISA がある。

表 2 は市販されている花粉アレルギーの一覧である。これら以外花粉症が疑われる場合には、花粉採集、採血、血清分離、アレルギーエキスの抽出、アレルギーディスクの作製を経て IgE-ELISA を行なう。ディスクの検定と血清中 IgE 抗体のアレルギー特異性の証明をかねて IgE-ELISA による希釈試験を行ない、さらに、ELISA inhibition test の施行が望ましい。

これらの方法により、著者らがこれまでに報告した花粉症の例を文献<sup>(5-7)</sup>に記した。

## おわりに

免疫アレルギー学的実験は、対象を抗原におくのかあるいは抗体にするのかをはじめ、広範囲にわたる。実験材料を花粉に限定しても例外ではない。

本実験講座において、それらすべてを網羅するのは相当困難であることから、我々が日常ルーチンに行なっているものを中心に述べた。SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングは、免疫アレルギーとは関係なく行なわれている手技であることからポイントを指摘するに留め、免疫に関する実験方法と得られた結果についてできるだけ詳細に表現するよう努めた。

## 文 献

1. 特集 花粉症をめぐって. *JOHNS* 2, 135-337 (1988).
2. Handbook of Experimental Immunology, edit. D.M.Weir. Blackwell (1978).
3. Løwenstein, H. : Quantitative immuno-electro-phoretic method as a tool for the analysis and isolation of allergen. *Prog. Allergy* 25, 1-62 (1978).
4. Aukrust, L., J.Apold, S.Elsayed and K. Aas : Crossed immunoelectrophoretic and crossed radioimmunoelectrophoretic studies employing a model allergen from codfish. *Int. Arch. Allergy appl.Immun.* 57, 253-262 (1978).
5. 芦田恒雄, 松永 喬, 井手 武, 田端司郎 : コウヤマキ花粉症. *アレルギー* 35, 245-249 (1986).
6. 中原 聰, 芦田恒雄, 衛藤幸男, 吉川恒男, 井手 武, 田端司郎 : オオバヤシャブシ花粉症の 1 例とその疫学調査. *アレルギー* 39, 104-109 (1990).
7. 芦田恒雄, 井手 武, 田端司郎, 衛藤幸男, 吉川恒男, 鳥山欽哉, 日向康吉, 渡辺正夫, 岸谷幸枝 : アブラナ属花粉症. *花粉誌* 38, 31-36 (1992).

## 著者紹介

### ◇ 芦田恒雄

昭和15年2月, 大阪生まれ. 奈良県立医科大学大学院医学研究科博士課程修了. 奈良県立医科大学耳鼻咽喉科 助手. 附属奈良病院院長を経て, 昭和49年耳鼻咽喉科医院開業(東大阪市). 同時に奈良医大非常勤講師, 医学博士.

### ◇ 井手 武

昭和19年3月, 福岡県生まれ. 鹿児島大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了. 奈良県立医科大学 助手(化学教室).

### ◇ 衛藤幸男

昭和34年5月, 奈良県生まれ. 川崎医科大学医学部卒業. 奈良県立医科大学耳鼻咽喉科入局. 済生会奈良病院勤務.

