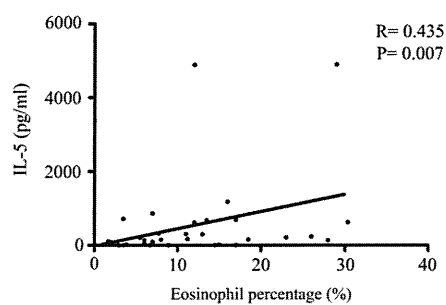


**FIG E3.** The milk protein component causing the most prominent tritiated thymidine uptake varied among the patients. PBMCs from children with gastrointestinal food allergies were stimulated separately with 100  $\mu$ g/mL of each of 5 LPS-depleted milk protein preparations in the absence of serum. Lymphoproliferation was measured based on tritiated thymidine uptake. The stimulation index (*S.I.*) was calculated as milk protein-specific tritiated thymidine uptake (cpm)/vehicle-induced tritiated thymidine uptake (cpm). For



**FIG E4.** IL-5 concentration in the culture supernatant of cow's milk protein-stimulated PBMCs correlated significantly with the peripheral blood eosinophil percentage. PBMCs from children with gastrointestinal food allergies were stimulated separately with 100  $\mu$ g/mL of each of 5 LPS-depleted cow's milk protein preparations in the presence of 5% autologous plasma for 6 days. Antigen-specific IL-5 production correlated significantly with the peripheral blood eosinophil percentage at disease onset ( $r = 0.435$ ,  $P = .007$ ).

each patient, the SI is shown for the PBMCs' response to each of the 5 milk protein preparations. Each row represents a single patient, and each column represents one of the 5 milk proteins. ALA,  $\alpha$ -Lactalbumin; BLG,  $\beta$ -lactoglobulin; blue, SI < 2; yellow, 2.0 < SI < 4.0; red, SI > 4.

**TABLE E1.** Concentrations of LPS in commercially available milk protein preparations before and after treatment with a prepacked endotoxin affinity column

| Cow's milk protein preparation                           | Before treatment<br>(pg/mg) | After treatment<br>(pg/mg) |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| $\alpha$ -Lactalbumin (Sigma L-6010)                     | 184,200                     | 14                         |
| $\beta$ -Lactoglobulin (Sigma L-3908)                    | 206,700                     | 1,880                      |
| $\alpha$ -Casein (Sigma C-6780)                          | 540                         | 23                         |
| $\beta$ -Casein (Sigma C-6905)                           | 500                         | 34                         |
| $\kappa$ -Casein (Sigma C-0406)                          | 400                         | 41                         |
| LPS-depleted $\beta$ -lactoglobulin<br>(Bean Stalk Snow) | 29                          | —                          |

The indicated milk protein preparations were treated with a prepacked endotoxin affinity column (Detoxi-Gel; Pierce Chemical, Rockford, Ill) in accordance with the manufacturer's instructions. LPS concentrations were measured by using the limulus amoebocyte lysate assay.

## II. アレルゲン特異 IgE 抗体の新しい測定方法

### 3. Diamond-Like Carbon を用いた 新規高感度アレルゲンマイクロアレイの 多項目抗原特異的 IgE 測定

Kido Hiroshi

木戸 博\*

Kubota Kenji

窪田 賢司\*\*

Tada Hitomi

多田 仁美\*

Suzuki Kouichi

鈴木 宏一\*\*

Kamemura Norio

亀村 典生\*

\*徳島大学疾患解毒学研究中心・応用解毒・疾患代謝研究部門 \*\*教授  
\*\*応用解毒医学研究所株式会社

#### はじめに

Diamond-Like Carbon 基板に高密度に抗原を固定化する蛋白チップの基盤技術を確認することで、従来にはない高感度化、微量検体、同時多項目測定を達成した。これにより、これまで測定が困難であった臍帯血中の抗原特異的 immunoglobulin E (IgE) の定量が可能になっただけでなく、IgE 以外に抗原特異的 IgG4, IgA の高感度定量も可能となり、アレルギーの病態を様々な抗体価から総合的に判定する技術が確立された。さらに血液中のアレルゲン濃度も同様の技術で高感度測定が可能になり、これら新技術がアレルギーの医療を変えようとしている。

#### キーワード

蛋白チップ/アレルゲンスクリーニング/多項目アレルゲン特異抗体検出法/DLC/臍帯血

#### はじめに

多くの国民が何らかのアレルギー疾患に罹患している中で、より精度が高く負担の少ないアレルギー検査法、予防と治療を支える検査法の開発が望まれている。現行の抗原特異的 immunoglobulin E (IgE) 測定を取りまく幾つかの問題点を以下

に挙げてみる。

現行の抗原特異的 IgE 測定は、検出感度が低いだけでなく定量測定範囲が狭く、特に限界値以上の値を示す検体を希釈して測定すると、定量性からはずれてしまうことをしばしば経験する。また抗原特異的 IgE レベルと患者のアレルギーの症状とが必ずしも相関しない例があるが、アレルギー

IgE (immunoglobulin E)

DLC (Diamond-Like Carbon)

3. Diamond-Like Carbon を用いた新規高感度アレルゲンマイクロアレイの多項目抗原特異的 IgE 測定

の病態は抗原特異的 IgE 以外に、血液中の抗原量、病態に関与すると推定される IgG4, IgA, 各種サイトカイン量から総合的に判断しなくてはならない。これらのパラメーターが測定可能なレベルにまで技術は到達しつつある。

本稿で解説する抗原特異的 IgE 測定系では、アレルゲンエピトープペプチドやアレルゲンエピトープを含むリコンビナント蛋白等の Molecular Allergen を搭載した測定系が市場に出て測定精度を向上させている半面<sup>1)~4)</sup>、問題点も明らかになってきている。これまで報告されているほとんどの蛋白チップは、ほぼ単一にまで精製されたリコンビナント蛋白やペプチドを搭載した条件下で IgE の定量的測定が可能であるが、例えば食品として摂取する卵白や牛乳のような複数の抗原複

合体を抗原として搭載した場合は、検出感度が低下して測定できなくなることが通例で、この問題を解消する技術開発が望まれている。即ち食品として摂取する状態の抗原でも解析可能な高感度測定系が強く望まれている。また搭載する抗原は、抗原抽出方法が未だ不完全なために全ての抗原を抽出しているとは言い難く、古くて新しい研究課題が抗原抽出法である。以上の問題に加えて、微量の検体で測定可能な方法、例えば乳幼児の耳朶や踵からの採血ですむ方法、究極的にはノンニードル化が望まれている。

上記の各種問題を解決する新たな検査法として、Diamond-Like Carbon (DLC) を用いた新規高感度アレルゲンマイクロアレイ検査法<sup>5)</sup>が注目される。DLC 高感度アレルゲンマイクロアレイ開

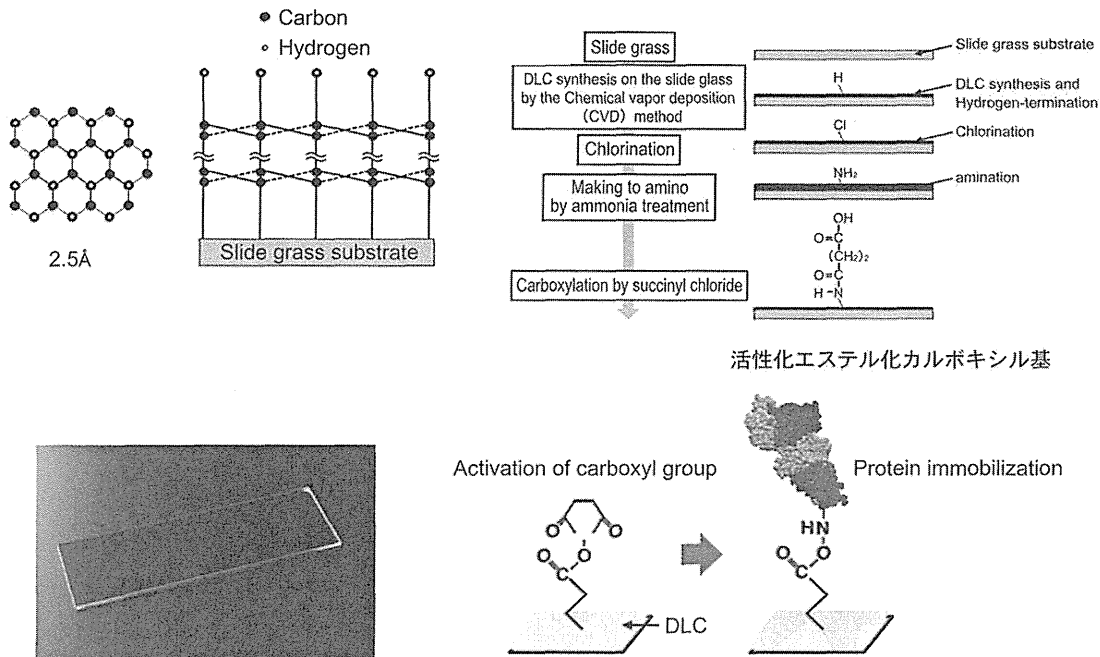


図1 カルボキシル化 DLC チップの高密度抗原集積性の原理

DLC コーティングスライドガラスを H, Cl, NH<sub>2</sub> 処理した後にジカルボン酸の succinyl chloride と反応させて炭素鎖4個のスペーサーアームを加えた後に carbodiimide hydrochloride と hydroxysuccinamide で処理してチップを活性化する。最後に抗原を加えて固定化する。(文献5より)

発の現状を紹介したい。

## I. DLC 基板を用いた抗原特異的 IgE 多項目測定アレルギーチップの概要

ダイヤモンドの 2.5Å の炭素骨格にカルボキシル基を配置したカルボキシル化 DLC<sup>6)</sup> を用いることで、これまで報告のあった蛋白チップの中では最も高密度に抗原蛋白質を共有結合で固定化することに成功した<sup>5)</sup>。これにより、① 高感度測定、② 幅広い定量範囲、③ 微量検体による多項目の同時測定、④ 測定の迅速化、等の実現が可能となった。図1に DLC チップのカルボキシル化の修飾手順とその模式図を示す。高密度集積によって、比較的分子量の大きな抗原同士の立体構造障害を引き起こすリスクがあることから、DLC と抗

原とを繋いでいるリンカーの長さを種々に変更してみたが、抗原・抗体反応に与える影響はほとんどなかったことから、現状では炭素鎖4個を標準のリンカーの長さとしている。抗原に結合した IgE 抗体の検出は、化学発光酵素免疫測定法を用いて定量している。検出系は目的に応じて今後様々に工夫できるが、その反応手順を図2に示す。DLC チップは抗原の高密度集積性の反面、非特異的吸着性が高くブロッキングと洗浄工程が高感度検出で重要な工程となる。また同一チップ内に種々の既知濃度の IgE を内部標準として搭載して、データ解析の再現性を高めている。このシステムでは1-2マイクロリッターの極微量の血液や体液で、多項目の抗原に対する抗体価が同時に測定可能で、患者の負担を大幅に低下させる。

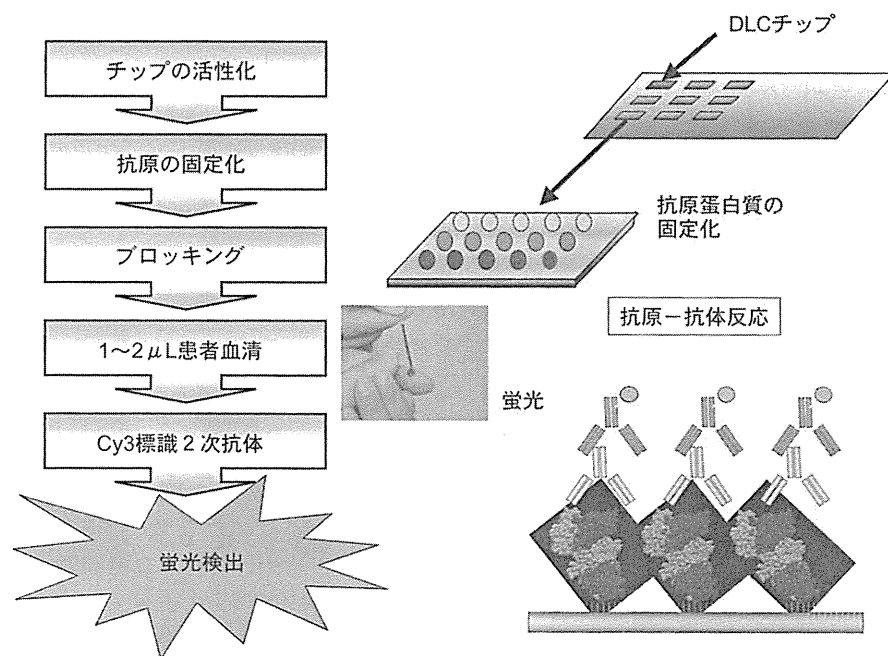


図2 カルボキシル化 DLC チップへの抗原固定化と特異抗体の測定方法

アレルギーの DLC チップへの固定化の手順と、その後の反応を示しているが、反応は従来の Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay 法に準ずる。1~2 μL の微量の検体でも測定が可能である。  
(筆者作成)

3. Diamond-Like Carbon を用いた新規高感度アレルギーマイクロアレイの多項目抗原特異的 IgE 測定

II. アレルゲン特異 IgE 抗体の新しい測定方法

測定感度は、抗原の種類によって異なるが、国際標準となっている UniCAP<sup>®</sup> (6)~(9) の測定感度をさらに4~8倍上げた高感度化が達成された<sup>5)</sup>。この技術は、従来抗原特異的 IgE の測定が困難であった臍帯血の IgE 測定を可能にし、多項目アレルギーに対する IgE 抗体のパターン認識による相互比較や、IgE 以外の抗原特異的 IgG1, IgG2, IgG4, IgA, IgM の定量とパターン認識、唾液、鼻汁の sIgA 抗体価測定(図3)等を可能にした<sup>5), 10)</sup>。さらに血液中に含まれる微量抗原を抗体搭載 DLC チップで高感度測定ができるなど、アレルギー

ギーの病態を形成する各種パラメーターを詳細に解析することができるようになった。

II. IgE 測定と新規関連検査法による近未来的展望

アレルギーが国民病として位置付けられ患者数も年々増加している今日、アレルギーの原因物質の同定に留まることなく、アレルギーの治療指針になるような検査や、アレルギーの予防になるような検査法が期待されている。図4は、これまで長年議論されていた臍帯血の IgE が、母体血に由

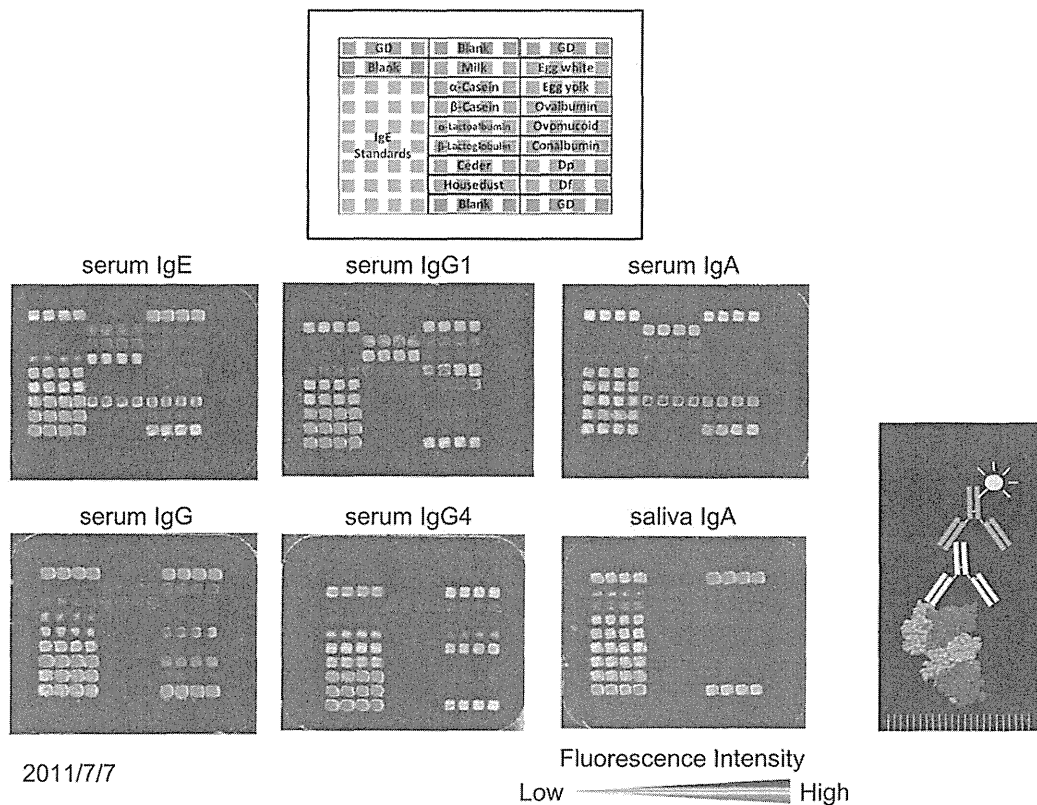


図3 カルボキシル化 DLC チップを用いた同一患者血液の IgE, IgG, IgG1, IgG4, IgA と唾液 sIgA の測定結果

上段に搭載した抗原のレイアウトを示す, GD : guideline dot, Dp : *Dermatophagoides pteronyssinus*, Df : *Dermatophagoides farinae*.

最下段に蛍光強度をレインボウ表示.

(文献5より)

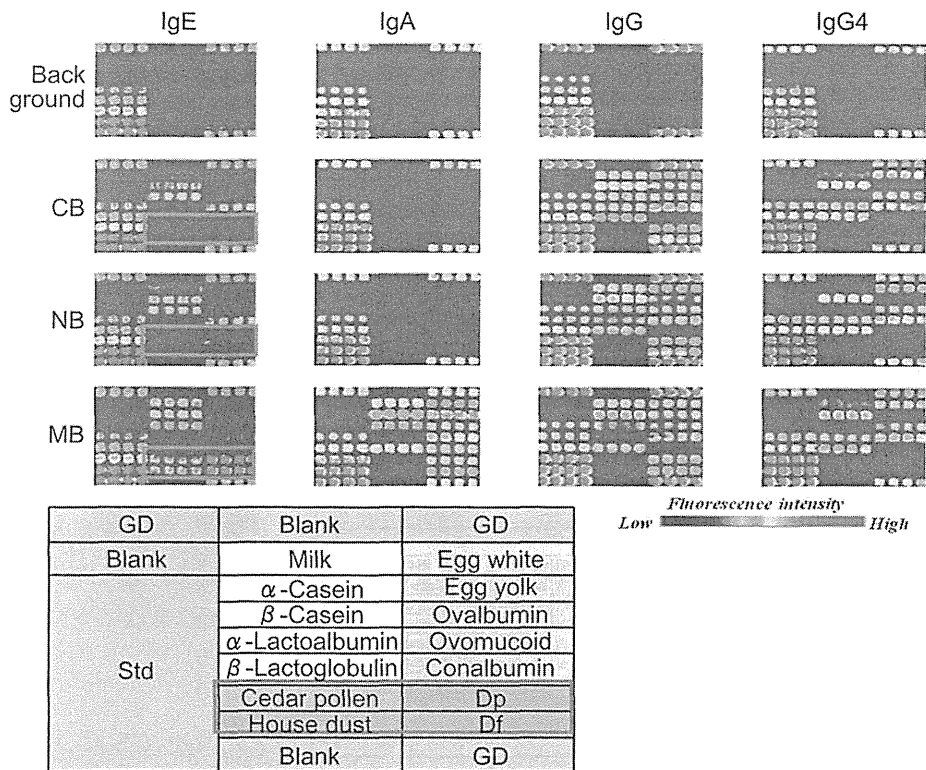


図4 臍帯血(CB)、新生児血(NB)、母体血(MB)のペアー血清のアレルゲン認識パターンの違い

下段に搭載した抗原のレイアウトを示す。GD : guideline dot, Dp : *Dematophagoides pteronyssinus*, Df : *Dematophagoides farinae*.

下段右に蛍光強度をレインボウ表示。特にMBとCB、NBの間で大きく異なる花粉、ダニ等の吸入抗原を枠で囲んだ。(文献 10 より)

来するものか、胎児由来かの議論に決着を付けた DLC チップのデータである<sup>10)</sup>。調べた 92 例の母体血と臍帯血でアレルゲン特異的 IgE の認識パターンが異なっていたこと、母体血の混入を示す IgA 値が低いことから、胎児は母体内で抗原感作にさらされ、胎児が IgE 抗体を産生していることが臍帯血で証明された例である。この研究では表 1 に示すように、従来法で臍帯血の抗原特異的 IgE の測定を試みているが検出できなかったが、DLC チップでは全ての項目で検出されている。一

般に高感度測定の場合、交叉免疫性も増加することが報告されているが、大過剰の抗原を検体に加えた抗体吸収試験で DLC チップ上で交叉免疫反応が起きていないことを証明している<sup>10)</sup>。

新規の高感度・多項目同時測定が今後アレルギーの予防や治療への補助的診断に役立つことを期待して、様々な試みが開始されている。1 例として、乳児のアトピーや食物アレルギーの発症と妊婦や授乳中の母親の食事との間では相関性が乏しいとのこれまでの報告であったが<sup>3)</sup>、臍帯血の抗



## 3. Diamond-Like Carbon を用いた新規高感度アレルゲンマイクロアレイの多項目抗原特異的 IgE 測定

表 1 臍帯血と母体血の抗原特異的 IgE 測定における DLC チップと UniCAP 間の検出感度の違い

| Allergen    | 臍帯血 (希釈率 1 : 1)     |                   | 母体血 (希釈率 1 : 1)     |                   |
|-------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
|             | DLC チップ<br>(Bue/mL) | UniCAP<br>(Ua/mL) | DLC チップ<br>(Bue/mL) | UniCAP<br>(Ua/mL) |
| <b>食物抗原</b> |                     |                   |                     |                   |
| 卵白          | 30.35               | ND*               | 77.41               | 0.545             |
|             | 11.02               | ND                | 23.65               | ND                |
| オボムコイド      | 180.0               | ND                | 134.8               | 0.960             |
|             | 84.89               | ND                | 64.66               | ND                |
| 牛乳          | 13.30               | ND                | 23.15               | ND                |
|             | 221.4               | ND                | 182.7               | 1.095             |
|             | 30.90               | ND                | 61.71               | 0.540             |
|             | 18.05               | ND                | 23.15               | ND                |
| <b>吸入抗原</b> |                     |                   |                     |                   |
| スギ花粉        | 55.55               | ND                | 90.98               | 0.960             |
|             | 21.78               | ND                | 32.20               | ND                |
| Df          | 54.01               | ND                | 80.76               | 1.275             |
|             | 47.38               | ND                | 25.53               | ND                |
| Dp          | 63.04               | ND                | 215.6               | 2.950             |
|             | 26.48               | ND                | 60.70               | ND                |

カルボキシル化 DLC チップ (DLC チップ) の測定単位を IgE binding unit (Bue) /mL で, UniCAP の測定単位を (Ua) /mL で示す。ND : 検出感度以下で UniCAP では < 0.35 Ua/mL を, DLC チップでは < 10 Bue/mL を示す。Dp : *Dematophagoides pteronyssinus*, Df : *Dermatophagoides farinae*。

(文献 10 より)

原特異的 IgE, IgG, IgA の正確な測定が可能になった現在, DLC チップによる高感度多項目測定でこの問題を再度検証する試みが始まっている。また減感作療法時に変動する抗原特異的 IgE, IgG4, IgA 抗体と血液中の抗原量をモニターすることで, 減感作療法の病態解明と治療指針に役立つ試みが計画されている。

## おわりに

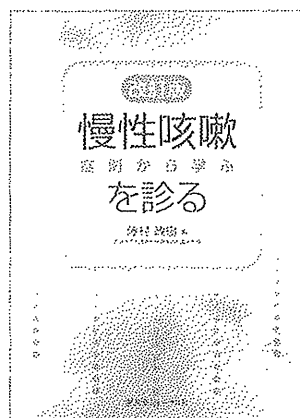
アレルギーに対する国民的関心の高まりを背景に, アレルギーの臨床医学, アレルギー検査法が目覚ましく進歩している。それと共に, 新規検査法はこれまで検出できなかった新たなアレルギーの病態を目の前に提示してくれることから, これ

までの結論を再度詳細に見直す試みが始まっている。技術革新が現場の診療と研究に大きな影響を及ぼすことはこれまで幾度か経験してきたが, アレルギー診断の領域にも新たな技術革新が到来しつつあることを予感する。

## 文献

- 1) Jahu-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R et al : Allergen microarray : comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 33 (10) : 1443-1449. 2003.
- 2) Deinhofer K, Sevcik H, Balic N et al : Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 32 (3) : 249-254. 2004.

- 3) Petersen AB, Gudmann P, Milvang-Gronager P et al : Performance evaluation of a specific IgE assay developed for the ADVIA centaur immunoassay system. Clin Biochem 37 (10) : 882-892. 2004.
- 4) Herzum I, Blumer N, Kersten W et al : Diagnostic and analytical performance of a screening panel for allergy. Clin Chem Lab Med 43 (9) : 963-966. 2005.
- 5) Suzuki K, Huyoshi M, Tada H et al : Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins. Anal Chim Acta 706 : 321-327. 2011.
- 6) Wide L, Bennich H, Johansson SGO : Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. Lancet 2 (7526) : 1105-1107. 1967.
- 7) Ewan PW, Coote D : Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. Allergy 45 (1) : 22-29. 1990.
- 8) Leimgruber A, Mosimann B, Claeyss M et al : Clinical evaluation of a new in-vitro assay for specific IgE. the immuno CAP system. Clin Exp Allergy 21 (1) : 127-131. 1991.
- 9) Yman-L : Standardization of in vitro methods. Allergy 56 (67) : 70-74. 2001.
- 10) Kamemura N, Tada H, Shimojo N et al : Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray. J Allergy Clin Immunol 130 : 113-121. 2012.



## 慢性咳嗽を診る 改訂版 一症例から学ぶ

金沢大学附属病院呼吸器内科臨床教授 藤村 政樹 編

B5判 272頁 定価 5,145円 (本体 4,900円 + 税5%) 送料実費  
ISBN978-4-7532-2438-8 C3047

◎慢性咳嗽の定義・メカニズムなどの基本事項をはじめ、咳喘息やアトピー咳嗽など各原因疾患の病態・診断・治療について、具体的な症例を挙げて解説。

### おもな内容

#### 上巻 総論

1. 慢性咳嗽の定義と基礎病態
2. 診断に役立つ検査

#### 下巻 症例

1. 好酸球性気道炎症疾患群
2. 好中球性気道炎症疾患群
3. 耳鼻咽喉科領域の慢性咳嗽
3. その他の慢性咳嗽

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 ( 振替番号 )  
〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 (069)6-1-33353  
<http://www.yaku.com> 書籍・雑誌バックナンバー検索、ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

