Antibody Responses against Japanese Cedar Pollen Allergen (*Cry j* I) in Different Strains of Rats

Koichi IMAOKA, Masahiro SAKAGUCHI, and Sakae INOUYE

*Department of Microbiology, The Institute of Public Health,
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan*

(Received 3 June 1992/Accepted 25 August 1992)

We established an IgE-capture ELISA for rat IgE antibody, and examined rat strain differences in the antibody responses against the major allergen of Japanese cedar pollen (*Cry j* I). First, IgE-capture ELISA and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) method were compared. IgE-capture ELISA was found to be, in sensitivity, about 10 times higher than, and, in specificity, equal to, PCA. Second, seven strains of rat were immunized three times at days 0, 14 and 28 by intraperitoneal injections of 1 or 10 μ g *Cry j* I mixed with 4 mg aluminium hydroxide gel. Anti-*Cry j* I IgE was detected by IgE-capture ELISA. Anti-*Cry j* I IgG and IgM responses were found not significantly different among different strains, but IgE responses in Brown-Norway (BN) rat were about 10 times higher than in other strains of rats. These results suggest that BN rat may be a useful animal model for studying physiological and pathological changes in the nose after pollen challenge to that organ. —KEY WORDS: antibody response, BN rat, *Cry j* I, IgE-capture ELISA, Japanese cedar pollen

スギ花粉アレルゲン免疫ラットにおける IgE 抗体応答

今岡 浩一・阪口 雅弘・井上 栄

国立公衆衛生院衛生微生物学部

近年、花粉、食物（牛乳、卵、大豆など）やハウスダスト（ダニなど）に対する各種アレルギー疾患が急増し、社会的にも大きな問題となっている。これらアレルギー疾患の中でも、スギ花粉症は1964年に初めて報告[4]されて以来、その患者数は急激に増加している[5]。

今回、我々は、マウスよりも鼻の生理機能について検討しやすいラットで、その実験動物モデル系を確立することを目的として、まず、スギ花粉アレルゲン (*Cry j* I) を水酸化アルミニウムゲルとともに腹腔内に免疫し、IgE 抗体高応答性を示すラットの系統の検索を行った。

また、現在、ラット血清中のアレルゲン特異的 IgE 抗体の測定は受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 法

[13] で行われているが、これは、ラットを用いる生物学的測定法であり、①再現性が悪い、②多数検体を一度に処理できない、③熟練を要する術式である、というような問題がある。そこで、マウス IgE 抗体測定のために当研究部で開発した IgE-capture ELISA [11] を、ラットの特異的 IgE 抗体測定に応用した。

材料および方法

1) 使用動物：6週齢・雄の7系統のラットを、日本エスエルシーおよび日本チャールス・リバーより入手し実験に用いた。その内訳は、クローズドコロニーのSlc:SD, Slc:Wistar, HOS:Donryuと、

近交系の F 344/NS 1 c, F 344/DuCrj, BN/Crj, SHR/NCrj である。

2) スギ主要アレルゲン (*Cry j I*) : スギ花粉主要アレルゲン (*Cry j I*) は、谷合らの報告 [16] に従い作成した。

3) 免疫スケジュール : *Cry j I* を 1 もしくは 10 μg と水酸化アルミニウムゲル (アラム・アジュバント ; Pierce 社) 4 mg (全量 0.4 ml) をラットの腹腔内に 2 週間隔で 3 回免疫した。初回免疫の 10 日後と 2・3 回目の 5 日後に採血を行い血清を分離し、測定まで -40°C に保存した。各群 4 匹ずつ使用した。

4) PCA 法によるスギ特異的 IgE の測定 : 従来より特異的 IgE 抗体の検出に用いられている PCA 法 [13] を実施した。血清を、2 倍階段希釈したものそれぞれ 50 μl ずつ、10 週齢雄の Slc : SD ラットの背部皮内に接種した。48 時間後に、0.5% エバンスブルーを含む *Cry j I* 溶液 (0.5 mg/ml) 1 ml をラットに静注し、30 分後に背部のエバンスブルーのスポットを皮膚の裏側から計測した。

5) IgE-capture ELISA によるスギ花粉特異的 IgE 抗体の測定 : スギ花粉特異的 IgE の測定をマウスにおいて報告された IgE-capture ELISA [11] の変法で実施した。マイクロプレート (Immulon 2, Dynatech 社) に 0.01% bovine serum albumin (BSA) を含む carbonate-bicarbonate 緩衝液 (pH 9.5) で希釈したモノクローナル抗ラット IgE (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Zymed 社) を 100 μl 加え、 37°C で 3 時間反応させた後、1% BSA を含む PBS (BSA-PBS) で 1 時間ブロッキングした。0.05% Tween-20 を含む PBS (PBST) で洗浄後、BSA-PBST で希釈した血清を 4°C で一晩反応させた。PBST で洗浄後、Nerurkar らの方法 [8] に従い作成したビオチン標識 *Cry j I* を室温 1 時間反応させ、洗浄後、さらに β -D-ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン (Zymed 社) 100 μl を室温で 1 時間反応させた。次に、酵素反応の基質として、0.2 mM 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド溶液 100 μl を加え、 37°C で 2 時間反応後、0.1 M Glycine-NaOH (pH 10.2) で反応を停止させた。反応産物 4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度は、自動蛍光測定器フルオロスキャン (Flow 社) で測定した。各検体の抗体価は、免疫前の抗体陰性血清の示した蛍光強度の 2 倍の値を示す希釈度を求め、幾何平均値で表した。

Fig. 1. Effect of heat on anti-*Cry j I* IgE antibody activity in IgE-capture ELISA. An antibody positive serum from BN/Crj rat was heated at 56°C for 4 hr, and then titrated for antibody activity. ○ : with heating ● : without heating FU : fluorescence unit

6) IgE-capture ELISA の特異性の検討 : IgE 抗体は、 56°C で加熱処理することにより活性を失うことが知られている [7]。そこで、血清を 56°C で 4 時間処理した後、特異的 IgE 抗体活性の変化を調べた。

7) スギ花粉特異的 IgG・IgM 抗体の測定 : 間接法 ELISA で測定した。マイクロプレートに 0.05 M carbonate-bicarbonate 緩衝液で希釈した *Cry j I* (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 100 μl 加え、 4°C で一晩固相化させた。次に、BSA-PBS で室温 1 時間ブロッキングした。PBST で洗浄後、BSA-PBST で希釈した血清を室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、ビオチン標識抗ラット IgG または IgM (Zymed 社) を加え室温で 1 時間反応させ、その後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Sigma 社) を室温で 1 時間反応させた。酵素反応の基質として、 H_2O_2 + オルソフェニレンジアミンを加えて発色させ、4 N H_2SO_4 で反応停止後、 $A_{492\text{nm}}$ で吸光度を測定した。各血清検体の抗体価は、OD 値 0.1 を示す希釈度を抗体価とし、幾何平均値で表した。

Fig. 2. Anti-*Cry j I* antibody response after immunization to 7 strains of rats with 1 or 10 μ g *Cry j I*. Rats other than BN/Crj were given 1 μ g of *Cry j I*. ●: Anti-*Cry j I* IgE △: Anti-*Cry j I* IgG ▲: Anti-*Cry j I* IgM Arrows indicate intraperitoneal injections of *Cry j I* + aluminium hydroxide gel. Data are shown as geometric mean ($n = 4$).

成 績

1) PCA 法による抗 *Cry j I* IgE 抗体の測定: 3 回免疫後の血清をプールしたものについて, PCA 法による抗 *Cry j I* IgE 抗体を測定した。BN/Crj では 1 : 1,280 までエバンスブルーによるスポットが確認されたが, F 344/DuCrj では 1 : 160 までしか確認されなかった。同じ血清についての IgE-capture ELISA での抗体価は, それぞれ 1 : 14,000, 1 : 500 であり, PCA 法の方が IgE-capture ELISA より, 約 1/10, 感度が劣っていた。

2) 抗 *Cry j I* IgE 抗体測定におよぼす加熱処理の影響: Fig. 1 に, 抗 *Cry j I* IgE 抗体測定におよぼす 56°C, 4 時間の加熱処理の影響を, BN/Crj の 1 μ g 投与群の 3 回免疫後の血清について示した。加熱処理することで, 抗 *Cry j I* IgE 抗体価の顕著な減少が認められた。

3) 抗 *Cry j I* IgE 抗体応答

Fig. 2 に 1 μ g 投与群における抗 *Cry j I* IgE 抗体応答の推移を示した。どの系統においても特異的

IgG 抗体の産生誘導が認められ, 2・3 回と免疫するにつれてその抗体価は増加し, 3 回免疫後には約 1 : 100,000 以上を示した。特異的 IgM 抗体価は, 2 回免疫後に約 1 : 1,000 ~ 1 : 2,000 前後を示し, 3 回目は IgG ほどは増加が見られなかった。特異的 IgE 抗体の産生は, 2 回目の免疫のあとから認められ, 特に, BN/Crj で約 1 : 10,000 以上と強く認められた。特異的 IgE 抗体価は F 344 および HOS:Donryu で約 1 : 1,000, 他は約 1 : 100 と BN/Crj の 1/10 ~ 1/100 となっていた。

一方, 10 μ g 投与群においては, 特異的 IgG・IgM 抗体は 1 μ g 投与群とほぼ同様の結果となった。IgE 抗体に関しては, BN/Crj で最も強く, 初回免疫後から産生が認められ, 2 回目の免疫のあとに約 1 : 100,000 の特異的 IgE 抗体の産生誘導が認められたが, 免疫回数が 3 回となると, 逆に約 1 : 10,000 と産生は抑制される結果となった (Fig. 2)。このような, 3 回免疫後の抑制は, HOS:Donryu, F 344, SHR/NCrj でも認められた (図は示さず)。

考 察

抗 *Cry j* I IgE 抗体の測定法について検討してみた結果、IgE-capture ELISA で測定した結果と PCA 法で測定した結果では、IgE-capture ELISA の方が測定感度が約 10 倍程優れているという結果が得られた。これは、capture antibody をプレートにコーティングする際の BSA の濃度を 0.001% から 0.01% に、また、酵素および基質の濃度を 2 倍に変更することにより、マウスにおける IgE-capture ELISA [11] よりも測定感度が増したためと考えられる。

また、PCA 法での測定結果と感度以外は差がないことや、56°C で 4 時間処理し IgE を失活させた [7] 検体では反応しないことから、IgE-capture ELISA による特異的 IgE 抗体測定の特異性が証明された。データは示さなかったが、BN/Crj の血清を Sephacryl S-300 カラムでゲルろ過して、各フラクションの抗 *Cry j* I IgE 活性を IgE-capture ELISA で調べてみると、その活性が IgE のフラクションのみに認められることから、IgE-capture ELISA で特異的 IgE の測定が可能ながことが明らかとなった。

現在、ヒト IgE 抗体の *in vitro* 測定法としては、間接法 ELISA が使われるようになってきている。しかし、アラム・アジュバントを用いて免疫した動物では、IgE 抗体のほかに大量の IgG 抗体も産生されるため、間接法 ELISA では、この IgG が IgE と競合し、微量の IgE は測定できない。そこで、免疫動物における IgE 抗体測定法は、PCA 法が主となっている。しかし、PCA 法は、動物を用いた生物学的測定法であるため、再現性や処理できる検体数などに問題がある。一方、IgE-capture ELISA は PCA 法とは異なり、マイクロプレートで一度に多数の検体を測定することが可能であり、かつ、ラットを用いないため測定時期や実験手技によるバラツキも少ないので、非常に優れた抗原特異的 IgE 測定法であると思われる。

各系統のラットにおける *Cry j* I に対する IgE 抗体応答を検討した結果、BN/Crj が他系の 10~100 倍と最も高応答性を示した。BN ラットは、HgCl₂ 投与により自己免疫病態を示すことが報告されている [3,12]。また、この際、IgE の非特異的な産生増強が起こる事も知られている [10]。さらに、このよう

な BN ラットにおいて特筆すべき特徴は、総 IgE 量が、他系のラット (SHR, Fisher, Wistar, SD) に比べて有意に多いという事である [6]。また、IgE 抗体応答に関しては、免疫前の総 IgE 量が多いラットの方が、免疫により誘導される特異的 IgE 量も多くなり、特に BN ラットでその傾向が強く認められたという報告もある [1,9]。今回、BN ラットが最も *Cry j* I に対する IgE 抗体応答が良かったが、この結果は上述の報告 [1,9] と一致するものと考えられる。

本実験において、免疫する抗原量として、1 および 10 μ g を検討し、10 μ g では初回および 2 回目の免疫に対する IgE 応答が 1 μ g よりも良かったが、3 回免疫後には逆に抑制されるという結果が得られた。これは、IgE 抗体を産生させる際に免疫抗原量が多くなると、抑制性 T 細胞が誘導されやすいという報告 [13,15] に従うものと思われる。

今回の実験に用いた BN ラットは、近交系であり、個体間での応答性の違いを考慮に入れる必要性は少ないと考えられる。また、BN ラットを卵白アルブミンで免疫し、気道抵抗性を測定したという報告 [2] や、鼻アレルギーのモデルを作出したという報告 [14] もある。この事からも、スギ花粉症の動物モデルに BN ラットを用いる事は、花粉を鼻腔内に投与した後の、鼻の生理機能および鼻腔や気道の抵抗性を検討する事を可能にするので、良いモデルとなると考えられる。さらに、BN ラットは、スギ花粉症のみならず、ダニアレルギーを始めとする各種アレルギー疾患研究の動物モデルに適した系統であると思われる。

要 約

近年、各種アレルギー疾患が急増しているが、これらアレルギー疾患研究のための実験動物モデルの開発が必要とされている。今回、我々は、スギ花粉症研究のためのラットモデルを作出することを目的として、スギ花粉に対するラットの IgE 抗体応答を評価する方法の開発と、高応答性を示すラットの系統の検索を行った。スギ花粉特異的 IgE 抗体測定法として、IgE-capture ELISA を試みた。従来より用いられている受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 法と比較したところ、感度が約 10 倍高く、特異的 IgE の検出に適していることが明らかとなった。7 系統

のラットにスギ花粉アレルゲン (*Cry j* I) を免疫した結果, IgE 抗体に関しては, BN ラットで最も強く産生されていた。ラットはマウスよりも大きく, 花粉点鼻投与後の鼻腔の生理機能を調べることも可能であることから, BN ラットが, 今後, モデル動物として用いるのに適していると考えられた。

文 献

- [1] Abadie, A. and Prouvost-Danon, A. (1980). Specific and total IgE responses to antigenic stimuli in Brown-Norway, Lewis and Sprague-Dawley rats. *Immunology*, **39**, 561-569.
- [2] Elwood, W., Lötvall, J. O., Barnes, P. J., and Chung, K. F. (1991). Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized Brown-Norway rats. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **88**, 951-960.
- [3] Hirsch, F., Coudrec, J., Sapin, C., Fournie, G., and Druet, P. (1982). Polyclonal effect of HgCl_2 in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.*, **12**, 620-625.
- [4] 堀口申作・斎藤洋三 (1964). 栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese Cedar Pollinosis の発見. アレルギー, **13**, 16-18.
- [5] 井上 栄・阪口雅弘・母里啓子・宮村紀久子・氏家淳雄・重原 進・野口有三 (1986). スギ花粉症の血清疫学調査—IgE 抗体保有者の近年における増加—. 医学のあゆみ, **138**, 285-286.
- [6] Karlson, T., Ellerson, J. R., Dahlbom, I., and Ben-nich, H. (1979). Analysis of the serum IgE levels in nonimmunized rats of various strains by a radioimmunoassay. *Scand. J. Immunol.*, **9**, 217-228.
- [7] MaCamish, J. (1967). A heat-labile skin sensitizing activity of mouse serum. *Nature*, **214**, 1228-1229.
- [8] Nerurkar, L. S., Namba, M., Brashears, G., Jacob, A. J., Lee, Y. J., and Sever, J. L. (1984). Rapid detection of herpes simplex virus in clinical specimens by use of a capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **20**, 109-114.
- [9] Pauwels, R., Bazin, H., Platteau, B., and Van Der Straeten, M. (1979). Relation between total serum IgE levels and IgE antibody production in rats. *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.*, **58**, 351-357.
- [10] Prouvost-Danon, A., Abadie, A., Sapin, C., Bazin, H., and Druet, P. (1981). Induction of IgE synthesis and potentiation of anti-ovalbumin IgE antibody response by HgCl_2 in the rat. *J. Immunol.*, **126**, 699-702.
- [11] Sakaguchi, M., Inouye, S., Miyazawa, H., and Tamura, S. (1989). Measurement of antigen-specific mouse IgE by a fluorometric reverse (IgE-capture) ELISA. *J. Immunol. Methods*, **116**, 181-187.
- [12] Sapin, C., Druet, E., and Druet, P. (1977). Induction of anti-glomerular basement membrane antibodies in the Brown-Norway rat by mercuric chloride. *Clin. Exp. Immunol.*, **28**, 173-179.
- [13] Tada, T. and Okumura, K. (1971). Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. *J. Immunol.*, **106**, 1002-1011.
- [14] Takahashi, N., Aramaki, Y., and Tsuchiya, S. (1990). Allergic rhinitis model with Brown Norway rat and evaluation of antiallergic drugs. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 414-420.
- [15] Tamura, S. and Ishizaka, K. (1978). Reaginic antibody formation in the mouse. X. Possible role of suppressor T cells in transient IgE antibody response. *J. Immunol.*, **120**, 837-843.
- [16] Taniai, M., Ando, S., Usui, M., Kurimoto, M., Sakaguchi, M., Inouye, S., and Matuhasi, T. (1988). N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (*Cry j*-I). *FEBS lett.*, **239**, 329-332.