THE EXAMINATIONS OF JAPANESE CEDAR POLLINOSIS BY THE
RADIO-ALLERGOSORBENT TEST
PART I. BASIC STUDIES OF RAST IN JAPANESE CEDAR POLLINOSIS
SATORU TAKAYAMA

*The Department of Ear, Nose and Throat, The Kudanzaka Hospital
(Director: Satoru Takayama)*

YOZO SAITO, MAKOTO HASEGAWA AND KENSUKE WATANABE

*The Department of Oto-Rhino-Laryngology, Tokyo Medical and Dental
University, School of Medicine (Director: Prof. Isamu Watanabe)*

Although the concentration of the Japanese cedar specific IgE antibody in blood can be measured with RAST, the Phadebas RAST Kit contains no Japanese cedar allergen disc. Japanese cedar allergen disc (1:20) was newly prepared. It was evaluated whether this Japanese cedar allergen disc was practical or not in the RAST of Japanese Cedar Pollinosis. Serum samples were collected from 86 patients with Japanese Cedar Pollinosis and 10 normal adults.

RAST was performed with Phadebas reagents and (1:20) Japanese cedar allergen disc according to Phadebas experimental instructions.

Results were as follow:

1) Phadebas mountain cedar allergen discs did not react with the Japanese cedar specific IgE in the sera of Japanese Cedar Pollinosis.

2) Japanese cedar allergen was well coupled to paper discs and Japanese cedar allergen discs (1:20) absorbed so well the Japanese cedar specific IgE antibody that RAST with this Japanese cedar allergen disc can be carried out without the modification of Phadebas experimental directions.

3) The results of RAST with this Japanese cedar allergen disc should be expressed following new criteria other than Phadebas RAST criteria. According to the RAST results of normal persons, negative RAST, doubtful RAST and positive RAST were newly classified instead of Phadebas RAST class.

4) The RAST results of 86 patients suffering from Japanese Cedar Pollinosis were 4 cases of negative RAST, 13 cases of doubtful RAST and 69 cases of positive RAST.

A78—0738.32862

Radioallergosorbent Test (RAST) によるスギ花粉症の検討

I. スギ花粉症における RAST の基礎的検討

九段坂病院耳鼻咽喉科 (主任: 高山哲)

高山 哲

東京医科歯科大学耳鼻咽喉科学教室 (主任: 渡辺勲教授)

斎藤 洋三・長谷川 誠・渡辺 建介

緒 言

1967年 Wide¹⁾ らにより開発されたアレルゲン特異

的 IgE 抗体の測定法である Radioallergosorbent Test (RAST) は、喘息、枯草熱などのアトピー性アレルギー

疾患の診断に極めて有用な方法であると報告されている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。最近 Pharmacia が RAST を kit 化し, Pharmacia-塩野義より, 日本のスギ花粉症 (Japanese Cedar Pollinosis) を中心に RAST Kit (S-8534) の検討を依頼された。この検討の主眼点は, 日本のスギ花粉症に対して, mountain cedar の花粉抗原を結合した allergen disc が使用できるかどうかということであつた。結果は, mountain cedar allergen disc は日本のスギ花粉症の RAST には不適と考えられた。そこで新に japanese cedar allergen disc を作製し実験を行い, 作製した japanese cedar allergen disc の disc としての適格性, このデスクを使用した場合の RAST の判定基準などについての検討したので報告する。

研究対象および研究方法

対象は, 東京医科歯科大学耳鼻咽喉科および九段坂病院耳鼻咽喉科を受診した, 主として東京および東京近辺在住のスギ花粉症患者86例 (男: 42例, 女: 44例, 10~48才) と正常成人10名である。スギ花粉症の診断基準は⁵⁾, 1)スギ開花期に一致して臨床症状が出現する。2)鼻粘膜, 眼結膜にアレルギー所見がみられる。3)スギアレルギーによる皮膚反応が陽性である。4)鼻粘膜誘発反応が陽性である。の条件を満たすものである。鼻汁好酸球は Eosino stain (トリイ) で染色検鏡, 皮膚反応はスクラッチ法⁶⁾で行い皮内反応で確認した。ただしスギの場合はスクラッチテスト陽性, 皮内反応陰性でも皮膚反応陽性と判定した。鼻粘膜誘発反応はデスク法 (250ug) で行いグループ研究の判定基準にしたがった⁷⁾。

RAST の原理は, アレルゲンを結合させた固型物と患者血清を試験管内で反応させると, 血清中のアレルゲン特異的 IgE 抗体はアレルゲンと結合し, 固型物上でアレルゲン—アレルゲン特異的 IgE 抗体複合物が生成される。未結合のアレルゲン非特異的 IgE を洗浄により除去したのち ¹²⁵I 抗 IgE 血清を加えると, 固型物上でアレルゲン—アレルゲン特異的 IgE 抗体の複合物が形成される。この複合物の放射活性を測定する。測定された放射活性は血清中のアレルゲン特異的 IgE 抗体の量に比例する。Pharmacia の RAST Kit ではアレルゲンを結合させる固型物が濾紙で, 1)アレルゲンデスク (paper disc), 2)アイソトープ試薬 (¹²⁵I 抗 IgE 血清), 3)Reference 試薬 (reference disc, reference seum) の3標品より成っており, 実験にあたっては被験血清と同時に4つの濃度の異なる reference 血清を測定し, reference 血清のカウント (radiouptake) に基づいて結果を5段階

に分ける RAST 表示法をとっている。すなわち RAST class 0~4 の5段階で, class 0 は negative, class 1 は border line, class 2 は臨床的に陽性, class 3 は強陽性という表示法である。本実験では RAST 試薬はすべて Pharmacia の規格品を使用した。japanese cedar allergen disc は鳥居薬品製を使用した。japanese cedar allergen disc (鳥居) は, paper disc (東洋濾紙 No. 6) で, その大きさは Pharmacia の disc と同じである。paper disc の activation, 抗原の coupling, 洗浄などは Wide¹⁾ の原法に従うもので, 抗原液は (1:20) のスギ抽出液である。RAST の実験操作は pharmacia の指示書 (S-8534) に従った。すなわち被験血清 (50μl) とデスクの incubation time は室温で3時間, 洗浄後のデスクと ¹²⁵I 抗 IgE 血清 (50ul) の incubation time は室温で over night, 洗浄回数は3回である。放射能の測定は, well type scintillation counter (日本無線医理学研究所製 JDL 207) を用い, base line 16, channel width 60, diff. 100%, gain 1/4, voltage 810V で1分間測定した。本実験の測定誤差は15.7%であつた。

成 績

1. mountain cedar allergen disc について

mountain cedar allergen disc (以後 MCAD と略) を用いて, 次の4群20症例40血清について RAST を行つた。結果は全例 RAST: 0であつた。1群5症例5血清は任意に選んだもので, 採血時期, 血中 IgE 値は下記のごとくである。

症例1 (1973年3月採血, 99u/ml), 症例2 (1973年3月50u/ml), 症例3 (1973年3月1820u/ml), 症例4 (1973年6月635u/ml), 症例5 (1973年6月3930u/ml)。2群5症例25血清は, 1群がすべて RAST: 0であつたので季節的な影響をうけているのではないかと考えて, 3月より7月までの血清を検討してみたものである。これらはいずれも1973年のもので, 各月の IgE 値は下記のごとくである。症例1 (214, 372, 730, 153, 250u/ml), 症例2 (250, 142, 210, 207, 241u/ml), 症例3 (246, 162, 640, 363, 433u/ml), 症例4 (210, 385, 410, 1030, 512u/ml), 症例5 (46, 63.5, 164, 91, 90u/ml)。3群5例5血清は, 1973年秋よりスギ抗原による減感作をうけスギ特異的 IgE 抗体が上昇していると予想されるもので, 1973年12月の血清である。これらの血中 IgE 値は未測定である。4群5例5血清は (IgE 値未測定)。1群から3群の血清が1973年のもので, 時間の経過による IgE 抗体の崩壊を考慮して1974年3月にスギ花粉症と

診断された症例の血清であつた。以上のごとく MCAD については 1 群が RAST : 0 であつたので、以後は意図して症例を選択してみたがいずれも RAST : 0 で、MCAD は日本のスギ花粉症の allergen disc として不適当と考えられた。ただしここで検討された症例に対し mountain cedar extracts (1000倍) による皮膚反応は施行していない

2. (1 : 20) japanese cedar allergen disc についての検討

新に作製した japanese cedar allergen disc (以後 JCAD と略記) が RAST に使用できるかどうか、次のごとく検討した。①正常人血清 (5 名) と JCAD, ②スギ花粉症患者血清 T.M (血中 IgE 2680u/ml 1973年 7 月採血) と CNBr で活性化せるもアレルゲン未結合の control disc, ③血清 T.M と JCAD の 3 つの組合で RAST を行つた。結果は表 1 のごとくで、①および②はいずれも RAST : 0, ③の場合のみ RAST : 2 であつた。このことは、JCAD には相当量のスギ抗原が結合し、このデスクを使用しての RAST の結果は allergen specific と考え

表 1 Japanese Cedar Allergen Disc の検討 (1)

	(1 : 20) JCAD + Normal (5)	Control Disc + Serum T. M	(1 : 20) JCAD + Serum T. M
1	275 cpm	209	986
2	126.5	194	995
3	401	210	995
4	207	237	1035
5	207	168	745
Mean	243.3	203.6	951.2
RAST Class	0	0	2

JCAD : japanese cedar allergen disc

表 2 Japanese Cedar Allergen Disc の検討 (2)

Case	Total IgE	First Time (RAST)	Second Time (RAST)
1. T.D (3, 1973)	205 u/ml	1274 (2)	249 (0)
2. N.K (7, 1973)	495	763 (1)	216 (0)
3. K.K (6, 1973)	1280	880 (1)	285 (0)
4. H.K (4, 1973)	710	2402 (3)	488 (0)
5. F.K (3, 1973)	870	1175 (2)	487 (0)

ることができる。

つぎに任意にスギ花粉症 5 例 5 血清を選んで、JCAD と incubation し、3 時間後 disc のみを採り出し (第一回目 disc), 残つた血清に再び disc を入れ、3 時間後 disc を採り出し (第二回目 disc), 第 1 回および第 2 回目 disc と ^{125}I 抗 IgE 血清を incubation し両者のカウントを比較した。結果は表 2 のごとくで、第 2 回目の disc の結果はいずれも RAST : 0 で、(1 : 20) JCAD と被験血清の 3 時間 incubation で、血清中のスギ特異的 IgE 抗体は、disc のアレルゲンと結合し吸収されたものと考えることができ、この allergen disc は RAST の disc として使用に耐えるものと考えられた。

3. RAST Criteria の設定

この項の検討に供した血清は、10名の正常成人血清と History(+), Nasal Smear(+), Skin test(+), Provocation(+) の 86例のスギ花粉症患者血清で、1973年 3 月に採血したもの 45 検体、1974年 3 月に採血したもの 41 検体である。皮膚反応および誘発反応は、1973年、1974年 3 月に行つたものである。RAST の表示法については、Pharmacia の Criteria では濃度の異なる 4 つの参考血清の結果に基づいて 5 段階に分けているということはすでに記した。本実験に使用した JCAD は、Pharmacia の規格品ではないので、このデスクを使用しての RAST の結果を Pharmacia の RAST Criteria にそのままあてはめることは不適当である。被験血清と incubation 後の disc のカウントは、その血清のアレルゲン特異的 IgE 抗体の量に比例するので、結果を各サンプルのカウント数で表示してもよいのであるが、常に同一の kit (^{125}I 抗 IgE 血清) を使用できるわけではないので、各サンプルのカウントの総カウントに対する比 (被験血清カウント総カウント, % で表示) で表現することにする。比で表現した場合の 86 例のスギ花粉症患者の RAST の結果は、最低 8%, 最高 272%, 平均 $86 \pm 64.2\%$ で、その分布は図 1 のとうりである。比による RAST の表示法をとる場合、background counts の 1.5 倍以上は、物理化学的には RAST positive と考えられであるが、臨床的には正常人コントロールの 2 倍以上のカウントを RAST Positive と見做している¹⁾ 本実験における background counts は $2.54 \pm 0.22\%$ 、正常人コントロールでは $7.7 \pm 2.2\%$ であつた。そこで本実験では下記のように RAST Criteria を設定した。

negative RAST : 0 ~ 12.1%

doubtful RAST : 12.1 ~ 24.2%

図 1

表 3 RAST Results

	RAST					
		negati- ve	doubt- ful	positi- ve		
History (+)	86	4 % (4.6)	13 (15.1)	69 (80.2)		
Nasal Smear (+)	RAST (Pharmacia)					
Skin Test (+)		0	1	2	3	4
Provocation (+)	86	12 % (13.9)	13 (15.1)	31 (36)	25 (29)	5 (5.8)

positive RAST : 24.2% 以上.

ここで12.1%とは正常人平均値+2標準偏差, 24.2%とは2×(正常人平均値+2標準偏差)である. この基準に基づいて86例のスギ花粉症患者の RAST Class を表示すると表3のごとくである. 参考までに Pharmacia の criteria に従った分類も示した.

考 按

Mountain Cedar (*Juniperus sabinoide*s) を含むビヤクシン属は, ヒノキ科 (*Cupressaceae*) に属し日本のスギとは異なる. 日本のスギは, 日本独自の樹木でアメリカには存在しないのであるが, 花粉の抗原性という点から

は, Mountain Cedar と Japanese Cedar には共通抗原はないとする報告⁸⁾もあるが, mountain cedar 抽出液(1000倍, Hollister-stier)で日本のスギ花粉症患者に皮内反応を行つてみると陽性を示す場合があり, 日本のスギ花粉抽出液および mountain cedar 抽出液で皮内反応閾値を調べてみると, 両者の皮内反応閾値が相関 ($r = 0.98$) すること. および P-K 反応による中和試験で Mountain Cedar に陽性の人の血清はスギアレルゲンを完全に中和することなどから, 日本のスギと Mountain Cedar に共通抗原の存在を肯定する報告⁹⁾もあるので, MCAD で日本スギ花粉症20症例40血清の RAST を行つてみたが, いずれも RAST : 0 であつた. この結果より, MCAD は日本スギ花粉症の RAST には不適という結論を下したのであるが, ここで検討した20症例の mountain cedar 抽出液に対する皮膚反応の結果は不明である.

もしスギ花粉症の人で mountain cedar 抽出液による皮膚反応が陽性でありながら (in vivo), MCAD による RAST が陰性ということになれば (in vitro), in vivo で働く抗原と in vitro で働く抗原が相異なるのではないかと, スギと Mountain Cedar では in vivo で働く抗原には共通部分があるが, in vitro で働く抗原が異なるのではないかなどの問題を提起するが今後の研究を待ちたい

つぎに allergen disc の抗原濃度の問題であるが, RAST

の成否は被験血清の特異的 IgE 抗体の濃度に依存すると同時に、固型物に結合させるアレルゲンの濃度に左右される。Pharmacia の allergen disc のアレルゲン濃度は明示されていないが、固型物 (Sephadex, Cellulose, 濾紙など) に結合させるアレルゲン濃度の条件は、最高濃度のアレルゲンを使用することである。Wide¹⁾らは (固型物 Sephadex G 28), 1/10 W/V あるいは 10000 PND の抗原濃度を使用している。Johansson¹⁰⁾らは (固型物 Cellulose), 入手できる最高濃度を使用し、その 1 例として horse dander の場合には 1mg/ml を使用している。Stenius²⁾らは (固型物 Sephadex), ダニ抗原で 100mg の乾燥凍結粉末を 1 ml の phosphate buffer saline に溶解したものを使用している。

Özkaragöz¹¹⁾らは (固型物 Sephadex), 1:40 の濃度のものを使用している。宮本¹²⁾らは (固型物濾紙), ダニでは凍結乾燥末 10mg を 10ml の borate buffer saline に溶解, 室内塵では凍結乾燥末 10mg を 10ml の borate buffer saline に溶解したものを使用, ブタ草では (1:20) 抽出液 (トリイ), 10000 PNU (Hollister-Stier) を使用している。このようにみえてくると, (1:20) スギ抽出液は, アレルゲン濃度として低濃度に属すると思われる。(1:20) スギディスクは, 鳥居薬品より製造提供されたもので, スギ花粉よりアレルゲンを精製する場合, (1:20) 以上の高濃度のアレルゲンの精製は少しく困難を伴うこと, また, 著者らの研究条件から自らアレルゲン抽出液をつくることは無理であるので, (1:20) の濃度で使用できる最高濃度ということになる。

(1:20) スギアレルゲンディスクの検討の結果, すなわち正常人血清とスギディスクでは RAST:0 であるのに比し, スギ花粉症患者血清 T.M とスギディスクでは RAST:2 で allergen specific と考えられること, また control disc と血清 T.M との組合せでは RAST:0 であるのに比し, スギディスクと RAST:2 ないし 3 の血清と 1 回 incubation したのちには, 血清中のスギ特異的 IgE 抗体は吸収されて RAST:0 になるので, このスギディスクには相当量のスギアレルゲンが結合していると考えられること, などから, (1:20) スギアレルゲンディスクは RAST の使用に充分耐えられるものと考えられた。

(1:20) スギディスクは Pharmacia の規格品ではないので, このディスクを使つての RAST の結果は, Pharmacia の RAST Criteria とは別の Criteria で表現されるべきである。Pharmacia の RAST Class で表現するためには, スギディスクを使つての結果が, Pharmacia の

standard serum の標準曲線に一致あるいは平行し, かつ Class 分けの基準に合致することが必要である。このような検討は行っていないので, 本実験における RAST の結果は Pharmacia の Criteria とは別の基準で表現した。

RAST の結果の表現法には, 1) Johansson¹⁰⁾らの用いている IgE 抗体価の高い血清を標準にし, 標準血清の IgE 抗体価を 1000% とし被験血清の IgE 抗体価を % で表現する方法, 2) 被験血清の radioactivity uptake が正常コントロールのそれより 2~5 倍多い場合を RAST positive とする方法が採用されている。そこで本実験では 2) にしたがって, negative RAST, doubtful RAST, positive RAST の 3 段階を設け, 比で表現した。この基準に従うとスギ花粉症患者 86 例中 69 例 (80.2%) が positive RAST で, 血中にスギ特異的 IgE 抗体が存在し, かつ増加していると思ふことができる。

ここですでに報告されている成績から, 皮膚反応, 誘発反応などの in vivo test と RAST の相関の程度をみてみたい。86 例のスギ花粉症患者が History(+), Nasal Smear(+), Skin test(+), Provocation(+) の条件を満たしているので, 特に Provocation (bronchial or rhinoconjunctival Provocation を含む) と RAST との一致率をみてみると, Wide¹⁾らは 96% (ただし negative provocation, negative RAST の場合も一致率として算出されている。positive provocation, positive RAST の一致率は試算してみると 96.5% となる。アレルゲンとしては animal dandruff, pollen, fungus, house dust など 14 種全体の統計である)。Berg¹³⁾らは, provocation の方法として bronchial (75.3%) と rhinoconjunctival (73.4%) に差はなく, positive provocation, positive RAST および negative provocation, negative RAST もともに一致と合算し, animal dandruff では 75.3%, pollen では 73.4%, house dust では 72.1% と報告している。本実験のスギ花粉症における provocation test と RAST との一致率 80.2% は, 上記の一致率とほぼ合致し妥当な成績と考えられよう。

結 論

1. mountain cedar allergen disc は日本のスギ花粉症の RAST には不適である。

2. (1:20) japanese cedar allergen disc はスギ特異的 IgE 抗体をよく吸収し, このディスクを使用して実験条件をかえることなく RAST を施行できる。

3. (1:20) japanese cedar allergen disc を使用して

の RAST の結果は, Pharmacia の Criteria ではなく別の基準で表現されなければならない。そこで negative RAST, doubtful RAST, positive RAST の基準を設定した。

4. 86例のスギ花粉症患者の RAST の結果は, negative RAST 4例, doubtful RAST 13例, positive RAST 69例であった。

文 献

- 1) Wide, L., Bennich, H. and Johansson, S.G.O.: Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 11; 1105-1107, 1967.
- 2) Stenius, B. and Wide, L.: Reaginic antibody(IgE), skin, and provocation test to dermatophagoides culinae and house dust in respiratory allergy. *Lancet* 11; 455-458, 1969.
- 3) Berg, T., Bennich, H. and Johansson, S.G.O.: In vitro diagnosis of atopic allergy. I. A comparison between povocation tests and radioallergosorbent test. *Int. Arch. Allergy* 40; 770-778, 1971.
- 4) Aas, K. and Johansson, S.G.O.: The radioallergosorbent test in the in vitro diagnosis of multiple reaginic allergy. A comparison of diagnostic appsoaches. *J. Allergy Clin. Immunol.* 48; 134-142, 1971.
- 5) 堀口申作, 斎藤洋三: スギ花粉症 Japanese Cedar Pollinosis に関する臨床的観察. *日耳鼻*, 68; 1224-1233, 1965.
- 6) 松村竜雄・他: スクラッチ反応一術式の検討および陽性判定基準について. *アレルギー*, 21; 50-63, 1972.
- 7) 奥田稔・他: 鼻アレルギー診断用誘発デスクの臨床的検討. *耳鼻咽喉科*, 46; 225-230, 1971.
- 8) Yoo, T., Spitz, E. and Mcgerity, J.L.: Allergy to Cupressaceae pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 53; 71, 1974.
- 9) 宮本昭正, 降矢和夫, 水野勝之: 花粉間の共通抗原に関する研究. *アレルギー*, 20; 39-46, 1971.
- 10) Johansson, S.G.O., Bennich, H. and Berg, T.: In vitro diagnosis of atopic allergy, III. Quantitative estimation of circulating IgE antibodies by the radioallergosorbent test. *Int. Asch. Allergy* 41; 443-451, 1971.
- 11) Özkaragöz, K., Smith, H.J., Gökçen, M. and Saracilar, Y.: The radioallergosorbent test (RAST) in the diagnosis of atopic allergy. *Acta Allergologica* 29; 96-100, 1974.
- 12) 宮本昭正, 真野健次, 伊藤幸治, 富谷百合子, 堀内淑彦: Paper disc を用いての Radioallergosorbent test (RAST) に関する研究. *アレルギー*, 22; 584-593, 1973.

稿を終わるにあたり RAST kitを 御提供下さった Pharmacia 塩野義製薬, スギデスクを御提供下さった鳥居薬品および放射能測定に種々御助言下さった東京医科大学アイソトープ室文部技官藤井張生氏に心から感謝します。

(原稿受付 昭和49.12.6日)