

## イムノブロットで *Cry j* II に一致して 明瞭なバンドが証明されたスギ花粉 RAST 陰性症例

芦田恒雄<sup>1)</sup>・井手 武・田端司郎<sup>2)</sup>・衛藤幸男・吉川恒男・松永 喬<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 芦田耳鼻咽喉科医院 〒577 東大阪市小阪 3-4-51

<sup>2)</sup> 奈良県立医科大学化学教室 〒634 橿原市四条町 840

<sup>3)</sup> 奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室 〒634 橿原市四条町 840

(1994年11月1日 受理)

Detection of Distinct IgE-binding Band Corresponding to *Cry j* II by  
Immunoblot with the Serum from a Patient Who Is Negative in  
RAST to *Cryptomeria japonica* Pollen

Tsuneo ASHIDA<sup>1)</sup>, Takeshi IDE, Shiro TABATA<sup>2)</sup>, Yukio ETOH,  
Tsuneo YOSHIKAWA and Takashi MATSUNAGA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> ASHIDA ENT Clinic, Kosaka 3-4-51,  
Higashiosaka 577, Japan

<sup>2)</sup> Department of Chemistry, Nara Medical University, Shijocho 840,  
Kashihara 634, Japan

<sup>3)</sup> Department of Otolaryngology, Nara Medical University, Shijocho 840,  
Kashihara 634, Japan

In an immunoblot, distinct IgE-binding band corresponding to *Cry j* II was detected with the serum from a patient who complained of nasal allergic symptoms only when *Cryptomeria japonica* pollen were dispersed in the air, but was negative in skin test and radioallergosorbent test (RAST) to allergen extract from the pollen.

This fact suggested that commercially obtained allergen extract contained insufficient content of *Cry j* II to detect IgE for this antigen.

It's also reported that some cases were sensitized only to *Cry j* II, although the frequency is small.

Thus, our results indicated that allergen extract for diagnosis and immunotherapy of *C. japonica* pollinosis should contain *Cry j* II as well as *Cry j* I.

**Key words:** Immunoblot, *Cry j* II.

## はじめに

スギ・ヒノキ科の開花期に限って、くしゃみ、水性鼻汁、鼻閉、流涙、眼や皮膚のかゆみなどの症状（以下、花粉症々状という）があるにもかかわらず、スギやヒノキアレルゲンエキスによる皮膚試験や IgE 抗体検査が陰性という症例がある。このような症例から得た血清を用いてイムノブロットを行なったところ、明瞭な IgE 結合バンドが証明された 1 例を経験したので報告する。

## 症 例

症 例：36 歳，事務職，男性

初 診：1986 年 3 月 27 日

主 訴：くしゃみ発作

現病歴：1 年前から，3 月から 4 月にかけて，くしゃみ発作，水性鼻汁，鼻閉，眼のかゆみが発現するようになった。

既往歴：特記すべきことはない。

家族のアレルギー歴：長女が通年性鼻アレルギー，気管支喘息とアトピー性皮膚炎

初診時所見：下鼻甲介の中等度腫脹と水性鼻汁の貯留が認められた。

免疫アレルギー学的検査成績：鼻汁好酸球（+），皮内反応は市販のハウスダスト，スギ花粉，カモガヤ花粉に陰性であったが，翌朝スギ花粉のみ陽性所見を示した。RAST はスギ花粉に陽性（クラス 2，0.8 PRU/ml），カモガヤ花粉に陰性であった。-85°C に保存しておいたこの血清を 7 年後再検したところ，クラス 1，0.5 PRU/ml であった。

経 過：その後毎年スギ・ヒノキ科の開花期に一致して花粉症々状が発現した。1993 年度の症状はそれまでと異なり，スギ開花期よりヒノキ科開花期の方が強かったので，enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) である AlaSTAT（日本 DPC コーポレーション）によりスギ花粉およびヒノキ花粉に対する特異 IgE 抗体を測定したところ，いずれも陰性（クラス 0）であった。念のため RAST である SIST（シオノギ）も施行したが，スギ花粉に陰性であった。

## 方 法

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)：泳動ゲル，濃縮ゲ

ルの濃度がそれぞれ 10%，3% のミニスラブ法によった。試料の SDS 濃度は 2% で，負荷したスギ花粉粗エキスのタンパク質量を 0.75  $\mu\text{g}/\text{lane}$  とした。

Western blotting：セミドライ装置により，140mA 定電流で Polyvinylidene difluoride 膜 (PVDF, 商品名イモビロン P, Millipore) に転写した。

Immunostaining：転写後の PVDF 膜へのタンパク質の非特異的吸着を 3% bovine serum albumin (BSA) 含有 phosphate buffered saline (PBS) でブロックし，1% Tween 20 含有 PBS で洗浄後，第一抗体として 4 倍希釈した被検血清を 1 時間反応させた。洗浄後第二抗体として 1,000 倍希釈した horse radish peroxidase 標識抗ヒト IgE 抗体 (KPL) を 1 時間反応させ，IgE 抗体結合バンドを ECL Western blotting detection system (Amersham) によりレントゲンフィルム上に検出した。

以上の操作は既述の方法<sup>(1)</sup>に準じた。

使用した血清は，本症例以外に，レファランスとして RAST のクラスが 4 のスギ花粉単独感作症例，RAST がスギ花粉に 0，カモガヤ花粉に 3 のイネ科花粉症の陽性対照，非アレルギーの陰性対照から得たもので，1% Tween 20 と 1% BSA を含む PBS を blank とした。

レファランス血清がほぼ一定の染色性を示した時点で，レントゲンフィルムの現像を止めた。

## 結 果

イムノブロットの結果を Fig. 1 に示した。レーン番号 1 は分子量マーカー，2，3 は，それぞれタンパク質量 0.75  $\mu\text{g}$ ，0.25  $\mu\text{g}$  を負荷したときの SDS-PAGE で，少なくとも 14 本のバンドが認められた。レーン番号 4 以降がイムノブロットである。レーン番号 4 はレファランス血清で，分子量 45 kDa の *Cry j I* に濃い，37 kDa の *Cry j II* に淡いバンドがみられた。レーン番号 5 が本症例で，IgE-ELISA がクラス 0 にもかかわらず，レファランス血清に勝るとも劣らないバンドが *Cry j II* に検出された。レーン番号 6 以下は陽性対照，陰性対照，ブランクの順で，いずれも IgE 結合バンドは認められなかった。

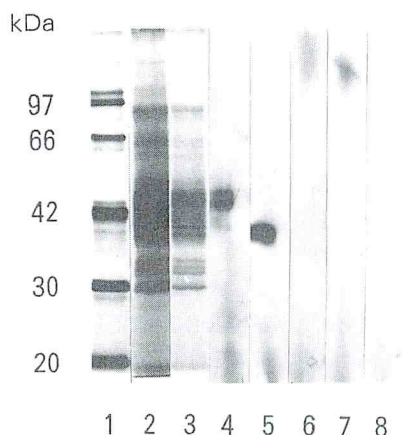


Fig. 1. Staining of SDS gels of *C. japonica* pollen extract and corresponding PVDF blots. Lane 1 : molecular weight markers. Lanes 2 and 3 : the banding patterns of *C. japonica* pollen extracts after SDS-PAGE and staining of the gel with silver. 0.75  $\mu$ g and 0.25  $\mu$ g of protein as BSA were loaded, respectively. Lanes 4-8 : *C. japonica* pollen immunoblots. Lane 4 : Serum from patient positive RAST to *C. japonica* pollen. Distinct and weak IgE-binding bands corresponding to *Cry j* I and *Cry j* II were recognized. Lane 5 : Distinct IgE-binding band corresponding to *Cry j* II was detected in spite of negative skin test and RAST to *C. japonica* pollen. Lane 6 : Serum from atopic non-*C. japonica* pollen sensitive subject. Lane 7 : Serum from nonatopic subject. Lane 8 : Serum-free buffer.

## 考 察

スギ花粉症は、症状の発現がその開花期に限られるというアレルギー病歴の他に、皮膚試験あるいはRASTがスギ花粉に陽性という検査結果によって診断されている。ところが、スギ・ヒノキ科の開花期にのみ花粉症々状があり、鼻汁好酸球検査も陽性でありながら、皮膚試験またはRASTが陰性という症例を経験することがある。著者らの実地臨床において、このような症例は、スギ花粉単独感作と診断された1,130名に対し61名にみられた。この現象を解明することを目的としてイムノブロットを行なった。皮膚試

験やRASTに用いられるアレルゲン粗エキスにはいろいろなタンパク質が存在することから、量的に多いアレルゲン成分に感作されている症例では検査が陽性反応を示すものの、量的に少ないタンパク質に感作されている症例では陰性となる可能性がある。一方、イムノブロットでは分子量で分けられた抗原とIgE抗体との結合をみることから、後者のような症例でもIgE結合バンドを検出できるという特徴がある。

本症例は、初診時の検査でスギ花粉に対する皮内反応が陰性であったものの、アレルギー病歴とRASTが陽性であったことからスギ花粉単独感作と診断された。しかし、1993年に得た血清ではRAST、IgE-ELISAがともにスギ花粉に陰性であった。それにもかかわらず、1993年度の血清を用いたイムノブロットでは*Cry j* IIに一致して明瞭なIgE抗体結合バンドが証明された。-85°Cに保存しておいた初診時の血清でイムノブロットを行なったところ、*Cry j* IIにのみバンドが認められたが、intensityは1993年度のものよりかなり弱かった。

スギ・ヒノキ科の開花期にのみ花粉症々状があり、皮膚試験あるいはRASTがスギ花粉に陽性であったことからスギ花粉単独感作と診断されたものの、別のスギ開花期でのRASTが陰性の39名、スギ・ヒノキ科の開花期にのみ花粉症々状があるにもかかわらず、皮膚試験またはRASTがスギ花粉に陰性の16名、計55名から得た血清を用いてイムノブロットを行なったが、本症例のような例は認められなかった<sup>(2)</sup>。この55例の中には、本症例と同様、初診時の皮内反応が陰性であったものの、翌日陽性所見を呈した1症例が含まれている。

これらの結果から、1) RASTあるいはIgE-ELISAに使用されているアレルゲンは製品ロットによって差がある、2) 検査用試薬中*Cry j* II含量がきわめて少ないか、ほとんど存在していなかったのではないかと考えられる。

皮内反応が遅発型を示したことから、*Cry j* IIが遅発反応に関与している可能性も考慮されるが、これについてはさらに症例を集積して検討する必要がある。

*Cry j* Iは、安枝らにより精製されたもので、SDS-PAGEによる分子量は41および46kDa、pIは8.9および9.2の塩基性糖タンパク質である<sup>(3)</sup>。一方、*Cry j* IIは、阪口らによりMono S columnによって*Cry j* I画分から分離されたもので、SDS-PAGEでの分子量は37kDa、pIは9.5以上であり、N末端アミノ酸配列も決定され、両者は異なるタンパ

ク質であることが判明している<sup>(4)</sup>。

澤谷らは、スギ花粉中に存在する *Cry j* I の量は、採取地、採取年度にかかわらず、花粉 100 g あたり 35mg 前後とほぼ一定であったが、*Cry j* II 含量は *Cry j* I 含量の  $\frac{1}{2}$  から  $\frac{1}{5}$  と差があったと述べている<sup>(5)</sup>。本症例にみられた現象は、*Cry j* II 含量の少ない花粉からアレルゲンエキスが抽出された可能性も否定できない。

阪口らは fluorometric ELISA において、14 名のスギ花粉症患者血清中 2 血清が *Cry j* II のみと反応した<sup>(4)</sup> ことを、澤谷らは、スギ花粉症 25 例中皮内反応で *Cry j* II にのみ陽性の症例はみられなかったにもかかわらず、RAST では *Cry j* II のみに陽性が 1 例あった<sup>(5)</sup> ことを、井上は、スギ花粉症患者 145 名の血清中、5 血清が *Cry j* II だけに反応した<sup>(6)</sup> ことを報告している。

比較的頻度は少ないものの、このように *Cry j* II のみに感作されている症例も存在することから、スギ花粉症の診断や免疫療法に用いられるアレルゲンエキスには、*Cry j* I だけでなく、*Cry j* II も一定量以上含まれていなければならないといえる。

## 要 約

スギ開花期にのみ花粉症々状があるにもかかわらず、スギ花粉アレルゲンエキスによる皮膚試験や RAST が陰性の血清を用いてイムノブロットを行なったところ、*Cry j* II に一致して明瞭な IgE 抗体結合バンドが証明された 1 例について報告した。

比較的頻度は少ないものの、*Cry j* II のみに感作されている症例も存在することから、スギ花粉症の診断や免疫療法に用いられるアレルゲンエキスには、*Cry*

*j* I だけでなく、*Cry j* II も一定量以上含まれていなければならない。

## 文 献

- (1) 芦田恒雄, 井手 武, 衛藤幸男: 花粉学実験講座 9 花粉アレルギー実験法. 花粉誌 39, 71-79 (1993).
- (2) 芦田恒雄, 井手 武, 田端司郎, 衛藤幸男, 吉川恒男: スギ花粉 IgE-RAST 陰性血清のイムノブロット. 日本花粉学会第 34 回大会講演要旨 61 (1993).
- (3) Yasueda, H., Y. Yui, T. Shimizu and T. Shida: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol* 71, 77-86 (1983).
- (4) Sakaguchi, M., S. Inoue, M. Taniai, S. Ando, M. Usui and T. Matuhasi: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45, 309-312 (1990).
- (5) 澤谷真奈美, 安枝 浩, 秋山一男, 信太隆夫, 谷口美文, 臼井美津子, 安藤駿作, 栗本雅司, 松橋 直: スギ花粉アレルゲン *Cry j* II の免疫学的, 物理化学的性質. アレルギー 42, 738-747 (1993).
- (6) 井上 栄: スギ花粉症患者における主要スギ花粉アレルゲン特異的 IgE 抗体の測定. 平成 4 年度厚生省アレルギー総合研究事業研究報告書 166-168 (1992).