

(短報)

## 42年生スギにおける花粉中のCry j 1量の年較差 およびCry j 1定量法の検討

高橋 裕一<sup>1)</sup>・安部 悦子<sup>1)</sup>・三浦 直美<sup>2)</sup>・  
荒木 龍平<sup>2)</sup>・安枝 浩<sup>3)</sup>・阪口 雅弘<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 山形県衛生研究所 〒990-0031 山形市十日町1-6-6

<sup>2)</sup> 山形県森林研究研修センター 〒991-0041 寒河江市大字寒河江丙2707

<sup>3)</sup> 国立相模原病院 〒228-0815 相模原市桜台18-1

<sup>4)</sup> 国立感染症研究所 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

(2002年7月10日 受付, 2002年10月3日 受理)

Annual Fluctuation and Comparison of Quantitative Method of Cry j 1 Levels among Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollens from 42-Year-Old Trees.

Yuichi TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Etsuko ABE<sup>1)</sup>, Naomi MIURA<sup>2)</sup>, Ryuhei ARAKI<sup>2)</sup>, Hiroshi YASUEDA<sup>3)</sup> and Masahiro SAKAGUCHI<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> *Yamagata Prefectural Institute of Public Health, Tohkamachi 1-6-6, Yamagata-City, Yamagata 990-0031, Japan*

<sup>2)</sup> *Yamagata Prefectural Forest Research and Instruction Center, Sagae-hei 2707, Sagae-City, Yamagata 991-0041, Japan*

<sup>3)</sup> *National Sagamihara Hospital, 18-1, Sakuradai, Sagamihara-City, Kanagawa 228-0815, Japan*

<sup>4)</sup> *Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan*

Annual fluctuations and individual differences in Cry j 1 levels in Japanese cedar pollens from 42-year-old trees were investigated. Cry j 1 levels were measured by two quantitative methods that used either a monoclonal antibody (Mab) or a polyclonal antibody (Pab) as the first antibody. For most years, only slight differences were observed between Cry j 1 levels extracted from the same tree. However, great differences were observed between individual trees. Thus, some trees always produced pollens with high Cry j 1 levels, while others consistently produced pollens with low Cry j 1 levels. Cry j 1 levels from one sample (No.19) were lower than the detection limit ( $<10\mu\text{g/g}$ ) when Mab was used as the first antibody, but they were 100 to  $200\mu\text{g/g}$  when Pab was used as the first antibody. Cry j 1 is sometimes lacking in the reactivity with Mab, therefore, Pab is advisable to quantify Cry j 1 levels.

**Key Words :** annual fluctuation, *Cryptomeria japonica*, Cry j 1, ELISA, pollen

## はじめに

我々は空中スギ花粉数とスギ花粉の主要アレルゲンの Cry j 1 量との関係を調べ、両者は必ずしも一致しないことを知った<sup>(1, 2)</sup>。その理由として、1) スギ花粉中に含まれる Cry j 1 量が一定でない、2) スギ花粉から Cry j 1 が遊離し空中に浮遊している、などが考えられる。1) については、最近、スギ精英樹から得られた花粉中の Cry j 1 量を測定した報告<sup>(3-5)</sup>があり、いずれもスギの木ごとに花粉中の Cry j 1 量には大きな違いがあるという結果を得ている。2) については、花粉以外の粒子に存在する Cry j 1 を確認した<sup>(6)</sup>が、定量的な検討は今後の課題として残されている。そこで、1) が注目されるが、上述の報告では Cry j 1 量の年較差をみていないため、同一樹ではその量は毎年一定しているのか、それとも樹齢により変動していくものなのかなどは明らかでない。

ここではスギの樹齢を42年生と一定にし、それから得られた花粉を用いることにした。そして、スギの木ごとの Cry j 1 量の違い及びその年較差を調べた。また、報告<sup>(3-5)</sup>ごとに Cry j 1 量に違いがみられるため、1次抗体にモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いる2種類の方法について Cry j 1 測定手法を検討した。

## 対象と方法

### 1. スギ花粉

2000年から2002年の3年間のうち、3月から4月上旬にスギ花粉を採取した。対象としたのは、寒河江市にある山形県森林研究研修センター構内に植林された42年生のスギである。これらのスギは昭和35年に挿し木で良好な木を選抜しセンター周辺に植林されたものである。2000年の春に花粉を採取できた16本について、次年度以降も花粉を採取することにした。しかし、次年度以降も花粉を採取することができたのは、2001年では3本、2002年では5本にすぎなかった。これらのスギ花粉は使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。

### 2. 花粉抽出液の作成

スギ花粉を10~20mg正確に秤量し0.125M重炭酸アンモニウム液を加え4mg/mlの濃度に調整した。室温で8時間振騰抽出を行った後に、 $4^{\circ}\text{C}$ でさらに64時間静置して抽出した。一度攪拌した後に3000rpm、30分の遠心で上清を分離し測定に用いた。

### 3. Cry j 1 の定量

以下に示す2通りのサンドイッチELISA法で定量し、相互に値を比較した。また2通りの測定法の感度も比較した。

①固相化抗体：マウス抗Cry j 1モノクローナル抗

体(JIB07)<sup>(7)</sup>—1次抗体：ビオチン標識マウス抗Cry j 1モノクローナル抗体(biotin-JIB01)<sup>(7)</sup>—2次抗体：アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン

②固相化抗体：マウス抗Cry j 1モノクローナル抗体(JIB07)<sup>(7)</sup>—1次抗体：ウサギ抗Cry j 1ポリクローナル抗体<sup>(8)</sup>—2次抗体：アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体

いずれも $10\mu\text{g/ml}$ 濃度の抗Cry j 1モノクローナル抗体(JIB07)の $100\mu\text{l}$ をELISA(NUNC)プレートに室温で1時間吸着し、4%BSAでブロッキング処理を行った。 $0.05\text{M}$ リン酸緩衝食塩水pH7.6(PBSと略)で3回洗浄した後に、適当に希釈したCry j 1標準液あるいは花粉抽出液の $100\mu\text{l}$ を $25^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。PBSで洗浄した後に①あるいは②に示す1次抗体の $100\mu\text{l}$ を室温で1時間反応させた。①では $5\mu\text{g/ml}$ 濃度のビオチン標識抗Cry j 1モノクローナル抗体(biotin-JIB01)の $100\mu\text{l}$ を反応させ、続いて $100\mu\text{l}$ のアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを、②では $100\mu\text{l}$ のウサギ抗Cry j 1ポリクローナル抗体(IgG)を反応させ、続いてアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を反応させた。反応後にアルカリホスファターゼの基質のp-nitrophenyl-phosphate液で発色させ、415nmの吸光度を測定した。標準抗原として日本アレルギー学会から提供されたCry j 1標準液を使用した。

## 結 果

それぞれのスギの木からの花粉を用いて同時に抽出した16検体の抽出液中のCry j 1量の年較差を図1に示した。図1aは、前述①のモノクローナル抗体を用いた測定で得られた結果である。図1bは、前述②のポリクローナル抗体を用いた測定で得られた結果である。いずれの方法でも、同一樹から得られたCry j 1量には多少の変動がみられるものの、大きく異なることはなく、Cry j 1量の多い花粉を作るスギとCry j 1量の少ない花粉を作るスギがあることがわかった。

使用した抗体による測定結果の違いを検討したところ、①と②では相関が $r=0.9608$ ( $p<0.01$ ,  $n=24$ )であった。花粉ごとに検討するとCry j 1量に違いがみられる試料とほぼ一定している試料とがあった。1年目に採取した試料のNo.19, 24, 28, 34や、3年目の試料のNo.2, 19などでは違いがみられた。注目に値するのはNo.19で①のモノクローナル抗体では1年目も3年目もCry j 1量は検出下限以下( $<10\mu\text{g/g}$ )であったのに対し、②のポリクローナル抗体の系では $100\sim 200\mu\text{g/g}$ の値が得られた。1年目の試料( $n=16$ )では1gのスギ花粉中のCry j 1量は、

## モノクローナル抗体

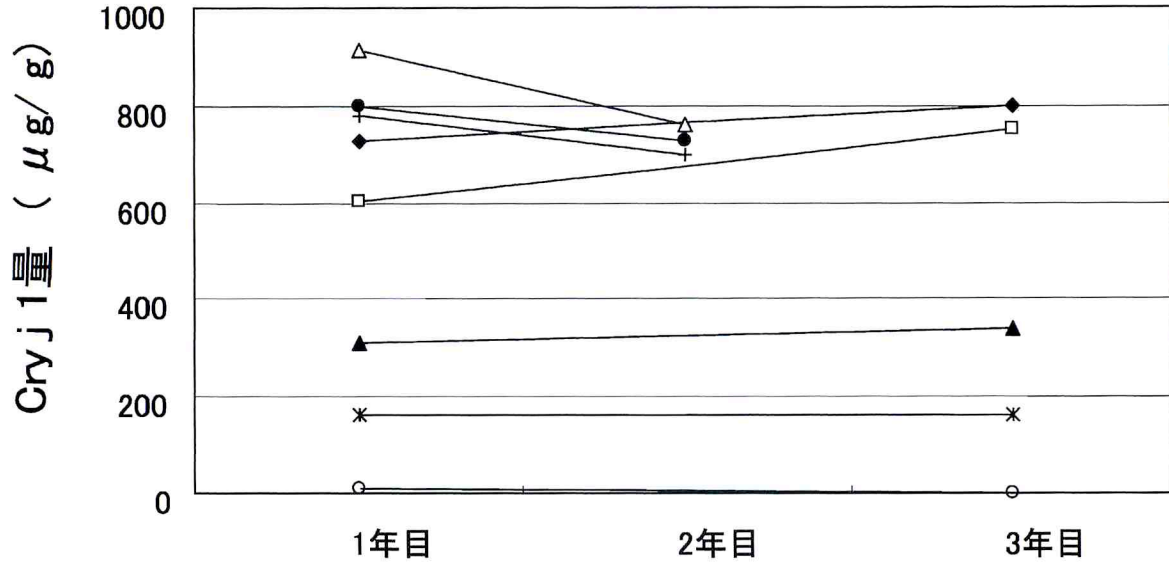


図 1 a. 同一樹から得られたスギ花粉中の Cry j 1 量の年較差  
(1次抗体としてモノクローナル抗体を使用)

## ポリクローナル抗体

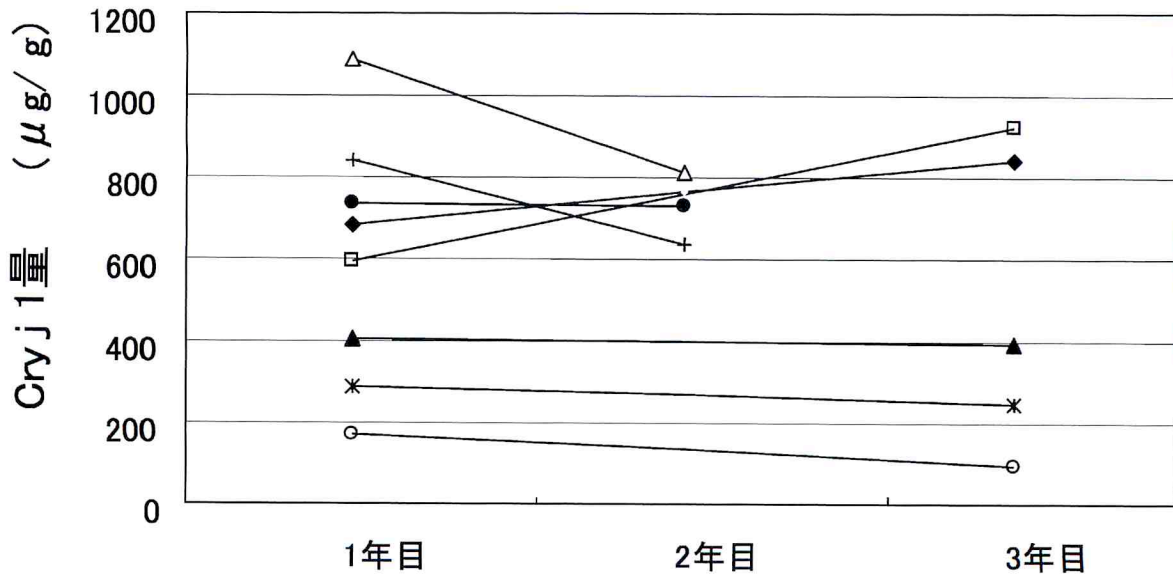


図 1 b. 同一樹から得られたスギ花粉中の Cry j 1 量の年較差  
(1次抗体としてポリクローナル抗体を使用)

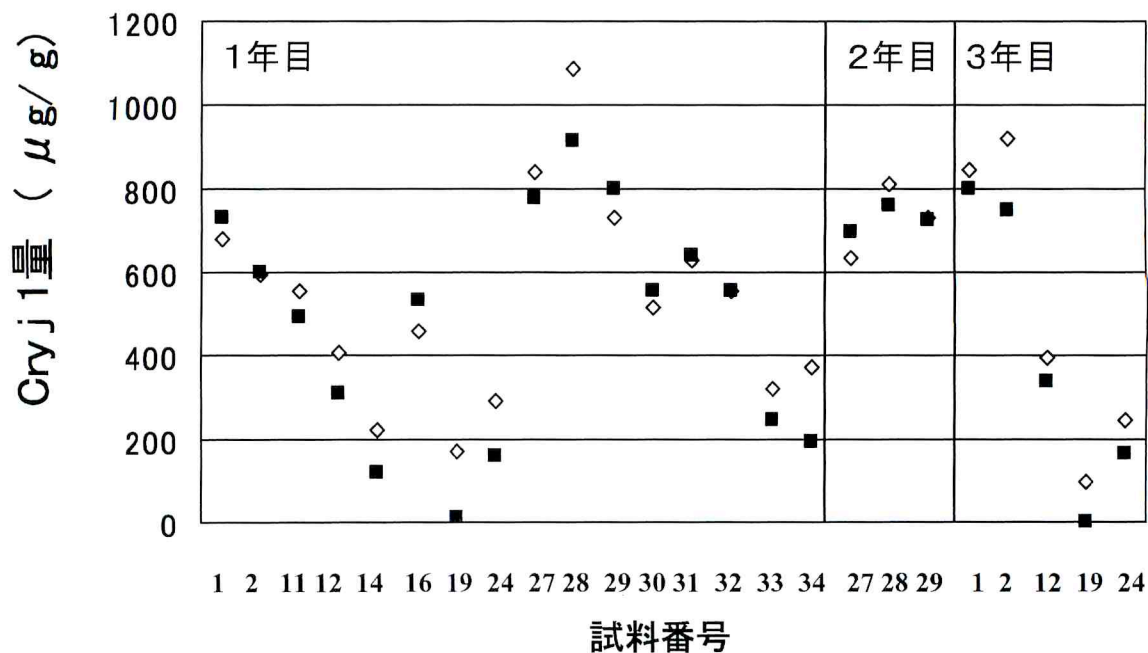


図2. 使用した抗体の違いによる Cry j 1 量測定値の差異

◇: 1次抗体としてポリクローナル抗体を使用

■: 1次抗体としてモノクローナル抗体を使用

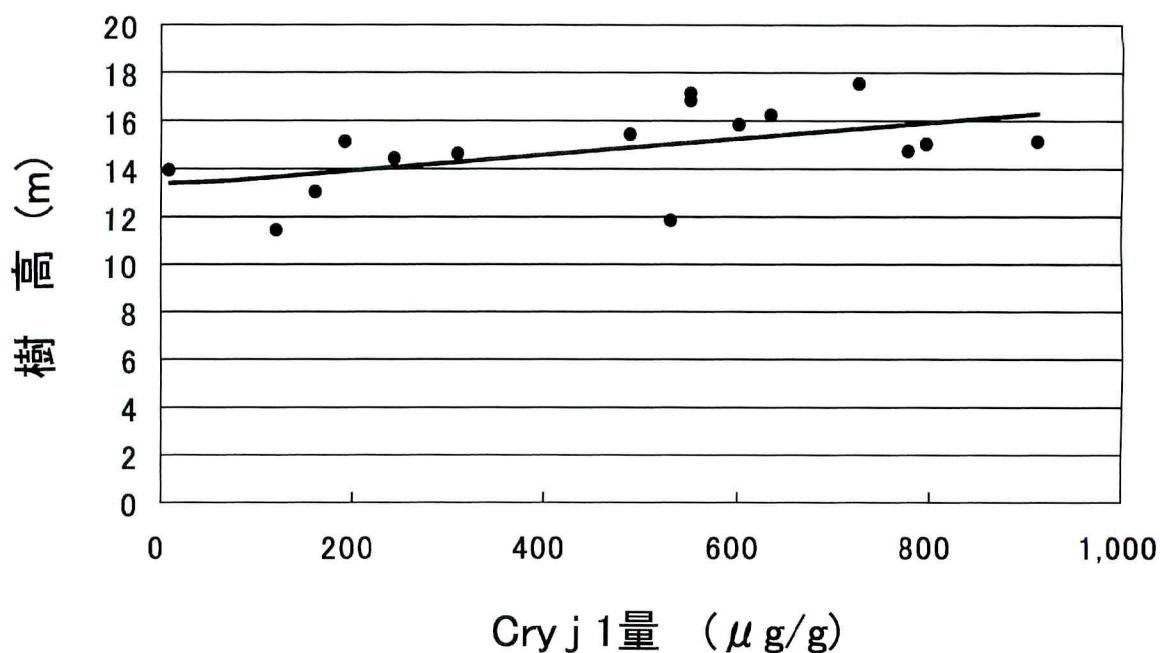


図3 スギ樹高と花粉中の Cry j 1 量の関係

<math>10\mu\text{g/g}</math> ~ <math>1000\mu\text{g/g}</math> で, 平均はモノクローナル抗体では <math>516.7 \pm 259.0\mu\text{g/g}</math>, ポリクローナル抗体では <math>558.3 \pm 226.6\mu\text{g/g}</math> であった (図2). 雄花の着き具合とそのスギが作る花粉中の Cry j 1 量との間に, 相

関は認められなかった. 42年生のスギの樹高 (m) と花粉中の Cry j 1 量との間には, 弱い正の相関が認められた ( $r=0.5099$ ,  $p<03.05$ ,  $n=16$ , 図3).

## 考 察

スギの木ごとに花粉中の Cry j 1 量の年較差をみると、若干の変動はみられるものの Cry j 1 量の多い花粉を作るスギと Cry j 1 量の少ない花粉を作るスギが存在すると考えられる。それでは、どのようなスギが Cry j 1 量の多い花粉をつくるのであろうか。この点に関しては、今回は同一樹齢（42年生）のスギでは樹高が高いスギ、つまり成長の良いスギで Cry j 1 量が多くなる傾向が伺えた。スギには豊作年にたくさんの雄花を着ける木と豊作年でもあまり雄花を着けない木とがある。雄花量は花粉中の Cry j 1 量に関係しないものであろうかという疑問から、雄花量と花粉中の Cry j 1 量との関係を見たが、両者にはっきりとした傾向はみられなかった。恐らく、個々のスギごとに Cry j 1 量は一定しており、それは雄花の着け方には関係がないのであろう。

最近、Cry j 1 にはいくつかのアイソフォームが存在する<sup>(9)</sup>ことが明らかとなった。今回の Cry j 1 定量で注目に値するのは、試料 No.19 である。この試料はモノクローナル抗体の系で Cry j 1 を検出できなかったのにポリクローナル抗体の系では検出されている。試料 No.19 の Cry j 1 は一般型の Cry j 1 とは異なり、特定のモノクローナル抗体とは反応できないアイソフォームであると考えられる。このように、モノクローナル抗体の系では Cry j 1 が存在していても認識できない場合があるのでポリクローナル抗体の系の方が見逃しは少ない。したがって、空中に微量に存在する Cry j 1 の全量を把握する場合などは見逃しの少ないポリクローナル抗体を用いた測定が無難と考える。

## 謝 辞

Cry j 1 標準液をご提供いただいた日本アレルギー学会に深謝します。

## 和 文 要 旨

42年生のスギから得られた花粉中の Cry j 1 量について年較差と個体差を調べた。Cry j 1 量の測定には1次抗体としてモノクローナル抗体 (Mab) を用いる方法とポリクローナル抗体 (Pab) を用いる方法の2定量法を用いた。同一樹から得られた花粉中の Cry j 1 量はわずかしき変化しなかったが、個々のスギの木間でみると大きく異なっていた。このことより、Cry j 1 をたくさん作るスギとあまり作らないスギがあることがわかった。No.19 では1次抗体として

Mab を使用した場合は Cry j 1 量は検出下限以下 ( $<10 \mu\text{g/g}$ ) であったが、Pab では  $100 \sim 200 \mu\text{g/g}$  の値であった。Mab は Cry j 1 が存在していても認識できない場合があるので Cry j 1 量の測定は Pab が望ましい。

## 引 用 文 献

- (1) Y. Takahashi, T. Ohashi, T. Nagoya, M. Sakaguchi, H. Yasueda and H. Nitta : Possibility of real-time measurement of an airborne *Cryptomeria japonica* pollen allergen based on the principle of surface plasmon resonance. *Aerobiologia* **17**, 313-318 (2001).
- (2) 高橋裕一, 大橋 武: 表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した空中花粉アレルゲンのリアルタイム測定. *アレルギー* **51**, 24-29 (2002).
- (3) 清藤城宏, 神保智一, 野村光男, 松野 智, 山本静雄: スギ精英樹花粉におけるアレルゲン Cry j 1 含量の変動. 山梨県森林総合研究所研究報告 No.20, 1-5 (1999).
- (4) 近藤禎二: アレルゲンの遺伝的変異と選抜基準の検討, スギ花粉症克服に向けた総合研究 (第一期 平成9年度~11年度) 成果報告書, 466-471ページ, 科学技術庁研究開発部 (1999).
- (5) 後藤陽子, 近藤禎二, 安枝 浩: 関東地方周辺のスギ精英樹花粉における Cry j 1 含量の変異, *日本花粉学会会誌* **45**, 149-152 (1999).
- (6) 高橋裕一, 名古屋隆生, 太田伸男: エアロアレルゲンイムノプロット法による花粉アレルゲン (Cry j 1, Dac g) を有する花粉種および大気浮遊粒子の同定, *アレルギー* **51**, 609-614, (2002).
- (7) 安枝 浩, 秋山一男, 前田裕二, 早川哲夫, 金子富志人, 他: Enzyme-linked immunosorbent assay によるスギ花粉, ヒョウヒダニアレルゲンの定量とアレルゲンエキス標準化への応用, *アレルギー* **40**, 1218-1225 (1991).
- (8) 阪口雅弘, 井上 栄, 吉沢 晋, 池田耕一: 蛍光サンドイッチ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による空中スギ花粉量の測定, *アレルギー* **36**, 886-889 (1987).
- (9) 安枝 浩, 斎藤明美, 石井豊太, 秋山一男, 後藤陽子, 近藤禎二: スギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 のアイソフォーム, *アレルギー* **51**, 978-978 (2002).

# 地球の過去から現在を考える。 自然環境の変遷を時間を追って解明します。

## 年代・地層対比の手段に

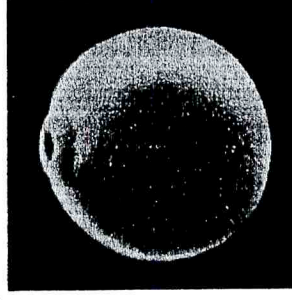
石灰質ナノ化石分析, 珪藻化石分析, 有孔虫化石分析, 放射虫化石分析, 花粉化石分析,  
火山灰分析(重鉍物組成・屈折率測定), <sup>14</sup>C年代測定.

## 岩石・土壌・資材の分析に

岩石・土壌・コンクリート薄片作製, 顕微鏡観察, X線回折試験, 海浜・河川の重鉍物分析, 資材評価,  
pH・EC・有機炭素・CEC測定, 蛍光X線試験, 示差熱分析, 赤外線分光分析, 粒度分析, 電子顕微鏡観察.

## 考古学調査に

計画立案, 遺跡の層序地形解析・古環境解析, 遺構解析, 遺物分析.



パリーノ・サーヴェイ株式会社

本社 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町 1-10-5 日産江戸橋ビル 2F  
TEL 03-3241-4566 (代表) FAX 03-3241-4597

研究所 〒375-0011 群馬県藤岡市岡之郷戸崎 559-3

TEL 0274-42-8129 FAX 0274-42-7955

大阪支店 〒564-0044 大阪府吹田市南金田 2-3-26 77-1-スト21 503

TEL 06-6193-9885 FAX 06-6193-9886