

(原著論文)

## ヤブツバキ花粉症とそのアレルゲン分析

吉田 直<sup>1)</sup>・井手 武<sup>2)</sup>・芦田 恒雄<sup>3)</sup>・  
加藤 博司<sup>4)</sup>・田中 恒平<sup>1)</sup>・中村 紀雄<sup>1)</sup><sup>1)</sup>横浜市立大学大学院総合理学研究所 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2<sup>2)</sup>奈良県立医科大学化学教室 〒634-8521 橿原市四条町 840<sup>3)</sup>芦田耳鼻咽喉科医院 〒577-0801 東大阪市小阪 3-4-51<sup>4)</sup>(株)ヤترون 〒100-0031 東京都千代田区東神田 2-1-11

(2002年9月2日 受付, 2002年10月4日 受理)

*Camellia* Pollinosis and Characterization of the AllergensSunao YOSHIDA<sup>1)</sup>, Takeshi IDE<sup>2)</sup>, Tsuneo ASHIDA<sup>3)</sup>,  
Hiroshi KATOH<sup>4)</sup>, Kouhei TANAKA<sup>1)</sup> and Norio NAKAMURA<sup>1)</sup><sup>1)</sup> Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University,  
22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-0027 Japan<sup>2)</sup> Department of Chemistry, Nara Medical University,  
840 Shijo-cho, Kashihara, 634-8521 Japan<sup>3)</sup> ASHIDA ENT Clinic,  
3-4-51 Kosaka, Higashiosaka, 577-0801 Japan<sup>4)</sup> IATRON LABORATORIES, INC.,  
2-1-11 Higashikanda, Chiyoda-ku, Tokyo, 100-0031 Japan

A case of occupational allergy caused by camellia (*Camellia japonica*) pollen was reported. The diagnosis of immediate-type allergy was based on history, intradermal test, and IgE-ELISA with use of the pollen extract. Three allergens were then identified and characterized using a serum from a subject sensitized to the pollen. The allergens were determined to have molecular masses of 63kDa, 58kDa and 55kDa and pI values of 5.0, 5.8, and 6.0 by two-dimensional IEF-SDS-PAGE analysis, respectively. These allergens occurred only in the pollen grains and the pistil, and not in the stamens, petals, and leaves of *C. japonica*. They were also present in the pollen grains of *C. sinensis* and *C. sasanqua* but not in those of *Cryptomeria japonica* and *Pinus densiflora*. The allergens were also detected in the growing pollen tube, but not in the tube that had stopped growing after being incubated for more than 14 h *in vitro*. These results suggest that the camellia pollen allergens may play a role in pollen tube growth.

**Key Words :** Allergen, *Camellia japonica*, Camellia pollinosis, Occupational allergy.

## 緒 言

ヤブツバキ花粉は鳥媒花とされ、飛散しにくく、通常では花粉症の原因にはならないと考えられるが、ツバキ愛好家はその栽培で花粉を扱っていて花粉症になっ

た例が報告<sup>(1)</sup>されている。一般的には花粉症の原因にはならない花粉も職業的に扱うと、つまりその花粉に長期間接しているとその花粉により花粉症になることがあり、職業性花粉症として知られている<sup>(2, 3)</sup>。ヤブツバキ花粉症もこれに相当すると思われる。しか

しヤブツバキ花粉症に関してはこの症例報告<sup>(1)</sup>が1報あるだけであり、その後の報告はみられない。

今回、長年にわたりヤブツバキ花粉を実験材料として扱い、目のかゆみ・くしゃみ・鼻水などの症状を示した研究者について報告する。

また、花粉アレルゲンは花粉の形成（発生）過程あるいは発芽・花粉管伸長の過程で何らかの生理的機能をもっていると推測されており、近年種々の花粉<sup>(4-11)</sup>において、それらのさまざまな機能が示唆されている。そしてヤブツバキ花粉アレルゲンが花粉の発生・成長過程で果たしている機能にも興味もたれる。

そこで、ヤブツバキ花粉症と思われる研究者の血清を利用して、そのアレルゲンを同定し、その性質を調べることで、ヤブツバキ花粉症について新たな知見を得たので報告する。

## 材料と方法

### 1. 対象

58才の男性（大学教員、以下Nと記載）は、約30年前から実験材料としてヤブツバキ花粉を扱っているが、約15年前から花粉採取時期である2月から4月にかけて多量の花粉を扱うと、くしゃみ発作・水性鼻漏・鼻閉・眼のかゆみといった花粉症症状が発現するようになった。また、数年前からは喘鳴や呼吸困難も生じるようになった。これらの症状は、花粉採取時期だけでなく、1年を通して花粉に接するときのみ発症した。なお、皮内テストでは、実験材料としてヤブツバキ花粉を扱っているものの花粉症症状がない者3名ならびにヤブツバキ花粉を扱ったことのない者6名、計9名をコントロールとした。

また、25才の男性（大学院生、以下Iと記載）は、3年間ヤブツバキ花粉を扱い、2年目に急に鼻水、目のかゆみとともにひどく腫れる症状が現われ、花粉を扱わない限りこれらの症状は現れなかった。

Iについては、血清のIgE量を調べ、アレルゲン分析を行った。

### 2. 材料

ヤブツバキ (*Camellia japonica*) とサザンカ (*Camellia sasanqua*) 花粉は開花1-3日前の花から葯を集め、30°Cの乾燥器内で開葯させ、篩(0.35mm mesh)に通し、花粉だけを集めた。チャ (*Camellia sinensis*)、スギ (*Cryptomeria japonica*)、アカマツ (*Pinus densiflora*) 花粉も室内で開葯させ、篩(0.1mm mesh)で花粉だけを集め、使用まで-80°Cで保存した。

### 3. 花粉抽出液

花粉はアセトンに懸濁させ、ろ紙でろ過した後、さらに減圧下でアセトンを完全に除いてから使用した<sup>(12)</sup>。このアセトン処理花粉0.4gに0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を2ml加え、ポッター型ホモゲナイザー管を用いて花粉を破碎した。この液を遠心分離(10000×g, 10分間, 4°C)し、上清を集めて、花粉抽出液(蛋白質濃度は、ヤブツバキ32.5, サザンカ36.8, チャ39.3, スギ13.5, アカマツ23.6mg/ml)とした。また、花粉粒0.6gを蒸留水5mlに1時間懸濁させた後、ろ過して集めた液を遠心分離し、その上清を花粉浸出液とした。

### 4. 組織抽出液の調製

ヤブツバキの葉、花弁、花糸、雌ずいをそれぞれ乳鉢に入れ、液体窒素中で乳棒により破碎した。粉状になった組織片をポッター型ホモゲナイザー管に移し、0.07% 2-メルカプトエタノール(2-ME)を含む10%トリクロロ酢酸-90%アセトン(TCA-A)液を加えてさらに磨砕した。遠心分離して得た沈澱をアセトンで洗い、風乾した<sup>(13)</sup>。これにドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)溶解緩衝液(62.5mM Tris-HCl pH6.8, 2.5%ドデシル硫酸ナトリウム, 5%グリセリン混液)を加えてペッスルを用いてさらに破碎した。これら破碎液を90°Cで2分間熱処理し、冷却後遠心分離し、得られた上清を組織抽出液(蛋白質濃度:葉1.3, 花弁4.5, 花糸3.3, 雌ずい2.6mg/ml)とした。

### 5. 皮膚試験

#### 1) 皮内反応

皮内テストに使用したヤブツバキ花粉アレルゲンは、花粉抽出液をセファデックス-G 25カラムにかけて分画し、蛋白質画分を集め、それを凍結乾燥して調製した。この粉末標品1mgを生理食塩水に溶かし(蛋白質濃度836μg/ml)、10倍希釈系列を作成して皮内テストに用いた。

#### 2) スクラッチテスト

スクラッチテストには、鳥居薬品社製のスギ・カモガヤ (*Dactylis glomerata*)・ヨモギ (*Artemisia princeps*)・ダニ (*Dermatophagoides farinae*) のアレルゲン液を使用した。またヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) とオオバヤシャブシ (*Alnus sieboldiana*) のアレルゲン液は井手ら<sup>(14)</sup>の方法に準じて作成した。

### 6. 酵素免疫測定法(ELISA)によるヤブツバキ花粉特異的IgE抗体の測定

被検血清中の抗原特異的IgE抗体価の測定は、スギ・ヒノキ・オオバヤシャブシ・ヨモギ・カモガヤについ



てアラスタット-マイクロプレート (AlaSTAT-MP) 法<sup>(15)</sup>にて行った。

ヤブツバキ花粉特異的 IgE 抗体価の測定は、ヤブツバキ花粉アレルゲン液 (10 $\mu$ g/ml) を 50 $\mu$ l ずつマイクロプレート (コーニング社製 1 $\times$ 8well, Flat Bottom High Binding, type I) の well に分注し、4-8 $^{\circ}$ C で 18 時間静置した後 AlaSTAT-MP 試薬に添付された洗浄液を用いて洗い、同液を各 well に 300 $\mu$ l 分注し、4-8 $^{\circ}$ C で 18 時間ブロッキングした。このヤブツバキ花粉アレルゲン固相化プレートを使い、AlaSTAT-MP 変法にてヤブツバキ花粉特異的 IgE 抗体価を測定した。第一反応は、リガンド (ビオチン) を結合させたプレートの well にリガンド結合抗 total-IgE 抗体試薬とリガンド結合剤 (アビジン溶液) を 50 $\mu$ g ずつ分注し、1 時間振盪で well 壁に結合させ、レファレンス用の固相プレートとした。第二反応は、被検血清 50 $\mu$ l をヤブツバキ花粉アレルゲン固相化プレートに、レファレンスとして total-IgE 標準血清 50 $\mu$ l を第一反応で固定化した抗 total-IgE 抗体にそれぞれ加え反応させた。第三反応は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgE マウスモノクローナル抗体試薬を 200 $\mu$ l 分注し、IgE 抗体と反応させた。その結果、アレルゲン-IgE-酵素標識化抗 IgE 抗体の複合体が well の壁に結合した。発色反応は、基質 (テトラメチルベンチジン-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 試薬) を分注し、基質を酵素により発色させ、5 分間 10 秒ごとに吸光度 (650nm) を測定した。検体の 5 分間の測定した吸光度の傾き (mOD/min) から IgE 量を求めた。

#### 7. IgE-ELISA 希釈テスト

被検血清をリン酸緩衝液-生理食塩水液 (PBS) で 4<sup>0</sup>-4<sup>-4</sup> に希釈して抗体液として用いた。ヤブツバキ花粉抽出液をアレルゲン液とし、マイクロプレート (ヌンク社) の各 well に 50 $\mu$ l 加え、4 $^{\circ}$ C で一晩静置保温した。アレルゲン液を捨てた後、1% 牛血清アルブミン (BSA) -PBS を各 well に 200 $\mu$ l 加え、30 $^{\circ}$ C で 2 時間ブロッキング処理をした。BSA-PBS を除いて、0.05% Tween-20 を含む PBS (PBS-T) で洗った後、抗体液を加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。抗体液を捨て、PBS-T で洗って未反応抗体を除いた後、二次抗体として PBS-T で 400 倍に希釈したヤギ由来ヒト IgE-ビオチン液 (ベクター社) を加えて 1 時間反応させた。抗体液を捨て、PBS-T で洗い、三次反応として PBS-T で 1400 倍に希釈したセイヨウワサビ由来ペルオキシダーゼ-アビジン液 (ベクター社) 50 $\mu$ l を加え、30 分反応させた。PBS-T で洗浄した後、1.5mg/ml アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)-0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-リン酸/クエン酸緩衝液 (pH5.0) を 100 $\mu$ l 加え発色させ、プレートリーダー

(MTP-32, コロナ電気) で 415nm の波長の吸光度を測定した。

#### 8. IgE-ELISA 阻害テスト

芦田ら<sup>(2)</sup>の方法に準じて行った。ELISA プレートの well への抗原の吸着と BSA によるブロッキング操作は上述の ELISA テストの場合と同様に行い、ブロッキングを行っている間に以下の操作を行った。N 血清と 0-500 $\mu$ g/ml までの様々な濃度のヤブツバキ花粉抽出液を等量ずつ混ぜ、30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。この反応により未反応の IgE 量に違いが生じる。このように反応させた液を試験抗体液として 50 $\mu$ l ずつ、すでにアレルゲンを吸着させてある well に入れ、再び 30 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。以後の操作は上述 ELISA の通りに行い、well に吸着しているアレルゲンと結合した IgE 抗体の量を 415nm の波長を用いた吸光度として測定した。

#### 9. 一次元電気泳動によるアレルゲンの分離

花粉抽出液に 3 倍量の TCA-A 液を混合し、遠心分離し、得られた沈澱を 1% HCl を含む冷アセトンで洗い、さらに冷アセトンで 2 回洗い、得た沈澱を風乾して粉末標品を得た。この標品を SDS-PAGE 溶解液に溶かし、遠心分離して上清を泳動用試料とした。泳動はスラブ泳動装置を用いて、ゲル濃度は 10% でおこなった。泳動蛋白質濃度は 1 レーン当り 40 $\mu$ g とした。

#### 10. 二次元電気泳動による蛋白質の分離

泳動に際しては、O'Farrel の方法<sup>(16)</sup>に従って蛋白質試料を調製した。アセトンを用いて沈澱させた蛋白質粉末標品を試料溶解液 (8 M 尿素, 2% IGEPAL CA630, 2% バイオライト 3/10, 5% 2-ME, 5% PV-40) に溶かした。遠心分離して不溶成分を除き、上清を泳動に用いた。一次元目の等電点電気泳動 (IEF-PAGE) では、チューブゲル 1 本当たり 150 $\mu$ g の蛋白質を注入した。酸性側での IEF-PAGE ではチューブゲル泳動装置を使用して、陽極から陰極へ定電圧で泳動した。担体にはバイオライト 3/10 (終濃度 1.6%) とバイオライト 4/6 (終濃度 0.4%) を使用し、電極液には 10mM リン酸と 20mM NaOH を使用した。また塩基性の IEF-PAGE にはバイオライト 3/10 (終濃度 0.8%) とバイオライト 7/9 (終濃度 1.2%) を用いて、陽極から陰極へ泳動した。二次元目の泳動はスラブ泳動装置を用いて、ゲル濃度は 10% とし電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。

#### 11. ウェスタンブロット法によるアレルゲンの同定

ブロッキング装置を用いて、泳動を行ったゲルからニトロセルロース膜 (NC 膜) へ蛋白質を転写した。

NC膜を洗ったのち、2% BSA-0.1% Tween20-PBS, pH8 混液で一晩、4°C でブロッキング処理した。N または I の血清を4倍希釈した液にNC膜を被せて室温で3時間反応させ後、洗浄し、3000倍希釈ペルオキシダーゼ-抗ヒトIgE液にNC膜を被せて1時間反応させた。洗浄した後、膜をDAB反応液(0.2% ジアミノベンチジン-0.0045% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-50mM Tris-HCl)に浸し、発色させた。または、膜をECL ウェスタンブロットング検出システム(アマシャム-ファルマシア社)に基づいて化学発光検出した。

### 12. 過ヨウ素酸-Schiff 反応 (PAS) による糖蛋白質の検出

二次元電気泳動を行ったゲルからポリビニリデンジフルオリド膜 (PVDF) へ蛋白質を転写し、Devine ら<sup>(17)</sup>の方法に従って糖蛋白質の発色を調べた。

### 13. 蛋白質の定量と染色

蛋白質の定量はBradford法<sup>(18)</sup>により行った。電気泳動後の蛋白質の検出には、クマシーブリリアントブルー R-250 (CBB) 染色を、NC膜での蛋白質の検

出にはボンソーS染色を用いた。

## 結 果

### 1. 皮膚試験

Nがヤブツバキ花粉症であるかどうかを確かめるために皮内閾値テストを行なった (Table 1)。Nはヤブツバキ花粉アレルギー液に対して強い皮膚反応を示

**Table. 1 Threshold of allergic reaction for *Camellia japonica* pollen protein**

Dilution of protein solution	Cutaneous reaction (mm)	
	Wheal	Erythema
1 : 10 <sup>3</sup>	20 × 16	32 × 29
1 : 10 <sup>5</sup>	15 × 11	18 × 16
1 : 10 <sup>7</sup>	15 × 15	19 × 16
1 : 10 <sup>8</sup>	12 × 9	13 × 11
1 : 10 <sup>9</sup>	7 × 5	0 × 0
1 : 10 <sup>10</sup>	2 × 2	0 × 0

The original protein solution contained 1mg of proteins prepared from camellia pollen extract.

**Table. 2 Scratch test for house dust mite and different pollen**

Allergen	Cutaneous reaction (mm)	
	Wheal	Erythema
<i>Dermatophagoides farinae</i> mite	5 × 5	0 × 0
<i>Cryptomeria japonica</i> pollen	11 × 8*	28 × 23
<i>Chamaecyparis obtusa</i> pollen	5 × 6	14 × 14
<i>Alnus sieboldiana</i> pollen	7 × 7	21 × 20
<i>Dactylis glomerata</i> pollen	6 × 5	9 × 6
<i>Artemisia princeps</i> pollen	5 × 5	17 × 15
Control	2 × 2	0 × 0

\*with pseudopodium reaction.

**Table. 3 Levels of IgE antibodies against pollen allergens in human sera**

Serum sample	(month)	pollen					
		<i>Camellia japonica</i>	<i>Cryptomeria japonica</i>	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	<i>Alnus sieboldiana</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Artemisia princeps</i>
		IU/ml					
N	(180)	6.46	5.61	0.57	1.32	2.72	0.84
M	(17)	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
T	(8)	0.05	0.74	<0.1	0.16	13	<0.1
Y	(5)	0	1	0.92	<0.1	<0.1	<0.1
I	(36)	9.73	<0.1	<0.1	0.13	0.14	<0.1
S	(0)	0.05	3.03	0.81	0.23	6.76	<0.1
U	(0)	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Control	(0)	0.01	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

IgE contents were determined by AlaSTAT-Microplate method. Figures in parentheses indicate the periods that workers had been using camellia pollen as an experimental material. IU : International unit.



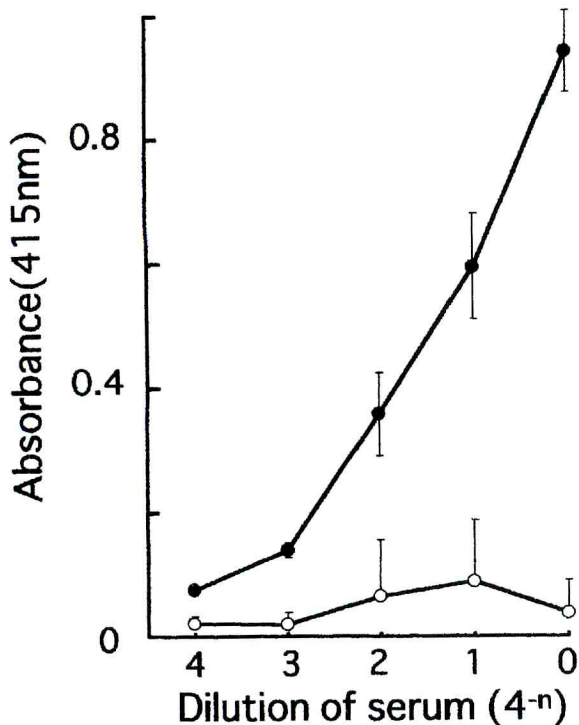


Fig. 1 ELISA titration.

The binding of specific IgE antibodies to camellia (*Camellia japonica*) pollen allergens was determined by serial dilution using serum from a subject sensitized to camellia pollen (●) and from a non-allergic subject (○).

し、 $10^{-8}$  希釈でも陽性であった。また N に対して診断用アレルゲン液を用いてスクラッチテストを行なったところ (Table 2), 各種花粉に陽性であり、スギに対しては偽足反応がみられるなどスギとオオバヤシャブシ花粉に対して強い陽性を示した。

## 2. IgE-ELISA

各人の各種の花粉に対する血清中の IgE 量を調べた (Table 3)。ツバキ花粉を扱っている N と I だけがヤブツバキ花粉に対して高い値を示した。N は調べたすべての花粉に対する IgE をもっており、I はオオバヤシャブシとカモガヤ花粉に対する IgE をもっていた。また、被験者の各花粉に対する IgE 量はさまざまであったが、オオバヤシャブシとカモガヤ花粉に対する IgE を持っていた者にヤブツバキ花粉に対する IgE が検出された。ヤブツバキ花粉蛋白質と血清中に含まれるヤブツバキ花粉アレルゲンに特異的な IgE の反応を ELISA で調べたところ (Fig. 1), N の血清濃度、つまり IgE 量に比例した反応がみられたが、症状を示さない者の血清とヤブツバキ花粉蛋白質

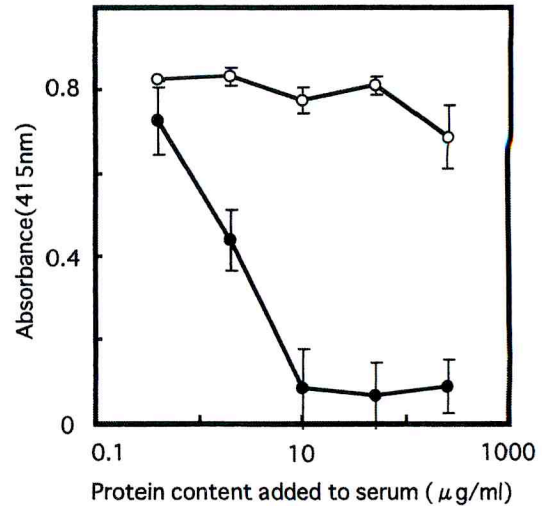


Fig. 2 ELISA inhibition curve.

Serum from the subject sensitized to camellia pollen was incubated with different concentrations of camellia pollen extract (●) or bovine serum albumin (○, control) prior to titration of the IgE antibody reactive with the pollen allergens.

の反応には変化がみられなかった。そして IgE-ELISA 阻害テストの結果 (Fig. 2) では、血清に加えた花粉蛋白質量に比例して IgE 量が減少することが示された。

## 3. アレルゲンの同定

これらの結果から N 血清中にヤブツバキ花粉アレルゲンに対する抗体が存在すると考え、N の血清を用いてアレルゲンの同定を行なった。成熟ヤブツバキ花粉粒の抽出液を SDS-PAGE にかけて、N 血清を用いてウエスタンブロットを行なったところ、少なくとも 3 本の特異的な蛋白質バンドが検出され、これらバンドのパターンは花粉抽出液調製において TCA-C 液を用いた場合も、用いない場合も同じ結果であった (Fig. 3)。これらの蛋白質を二次元電気泳動、ウエスタンブロット法で分析したところ、分子量と等電点は、それぞれ 63kDa 蛋白質は pI 5.0, 58kDa 蛋白質は pI 5.8, 55kDa 蛋白質は pI 6.0 であり、58kDa 蛋白質については pI 5.8 の前後に等電点のやや異なる 2 つのスポットが検出された (Fig. 4)。I の血清を用いた場合には、63kDa と 55kDa に相当する蛋白質と反応がみられた (Fig. 5)。いずれの蛋白質にも PAS 反応はみられず、2-ME 処理により電気泳動移動度は変化しなかった。また、ヤブツバキ花粉抽出液には N 血清と反応する塩基性蛋白質は検出されなかった。

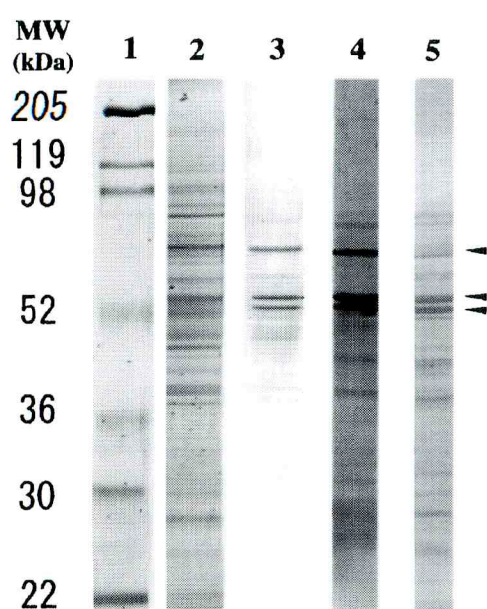


Fig. 3 Detection of camellia pollen allergens by SDS-PAGE and Western blotting.

The pollen grain proteins extracted with a buffer (lane 2 and 4) or TCA-acetone solution (lane 3), and the pollen exudate (lane 5) were separated by SDS-PAGE. Proteins were stained with CBB (lane 1, molecular weight markers and lane 2) or immunoblotted using DAB staining (lane 3-5).

#### 4. その他のアレルゲンの性質

これらアレルゲンが、雌ずい（子房は除く）、花卉、そして葉の組織に存在するかどうかを調べたところ (Fig. 6), 雌ずいにも 58kDa と 55kDa のアレルゲンが検出された。また、他種の花粉と血清抗体の反応を調べたところ、ヤブツバキと同じ属であるサザンカとチャ花粉にもこれらアレルゲンが検出されたが、科の異なるアカマツとスギ花粉には検出されなかった (Fig. 7)。

さらにシヨ糖培地で成長したヤブツバキ花粉についてこれらアレルゲンの消長を SDS-PAGE で調べたところ、管伸長が停止する頃にアレルゲン蛋白質の分解がみられた (Fig. 8)。ただ、採取後まもない新鮮な花粉を培養すると 12 時間でも管伸長がみられ、その際には管伸長 3 時間の場合と同じようなアレルゲンの泳動パターンがみられた。

## 考 察

### 1. 花粉症の診断

ヤブツバキ花粉は花粉粘着物質のため飛散しにくく、花粉症の原因とはなりにくい。しかし N はヤブツバキ花粉を扱うと花粉症の症状がみられ、この花粉が原因と考えられる。しかしこれまで研究室において多くの者がヤブツバキ花粉を扱ってきたにもかかわらず、花粉症の症状を示したものは N 以外には I が 1 名い

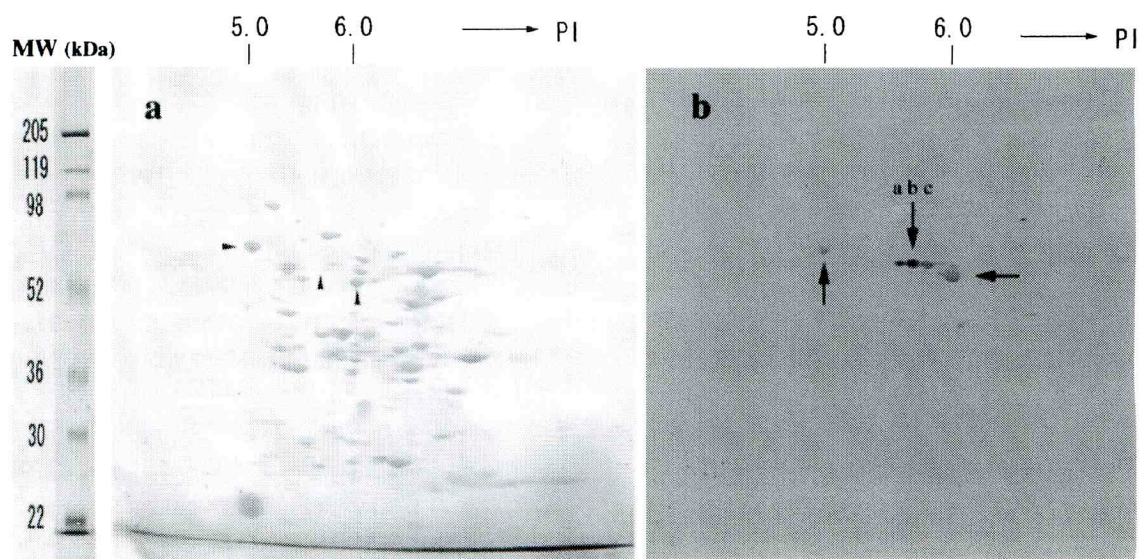


Fig. 4 Separation of camellia pollen allergens by 2D-IEF-SDS-PAGE. The allergenic proteins were first separated by IEF-PAGE and then by SDS-PAGE (a, stained with CBB). The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and detected using serum from the subject (N) sensitized to camellia pollen, and by the ECL method (b).



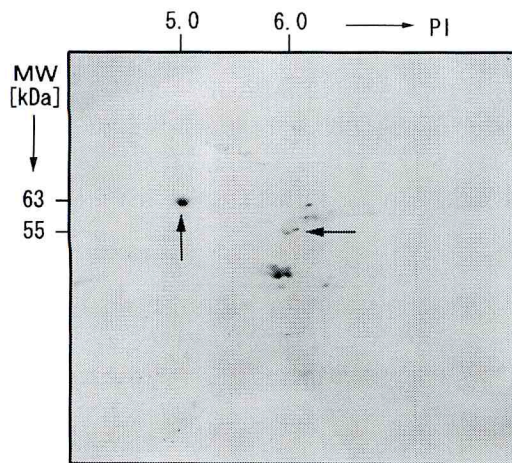


Fig. 5 Detection of camellia pollen allergens by 2D IEF-SDS-PAGE. The allergenic proteins were detected by 2D-PAGE using serum against camellia pollen from another allergic subject (I).

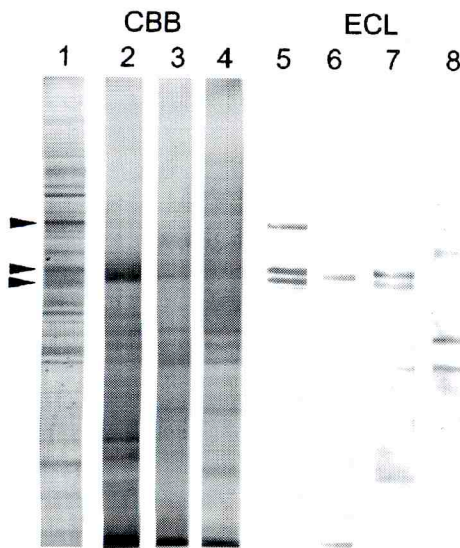


Fig. 6 Tissue-specificity in the occurrence of camellia allergenic proteins.

The extracts prepared from pollen grains (lane 1 and 5), leaves (lane 2 and 6), pistils (lane 3 and 7), petals (lane 4 and 8) of *Camellia japonica* were subjected to SDS-PAGE and their separated proteins were stained with CBB or immunoblotted. The allergenic proteins were detected by the ECL method. Arrowheads indicate protein bands corresponded to the pollen allergens.

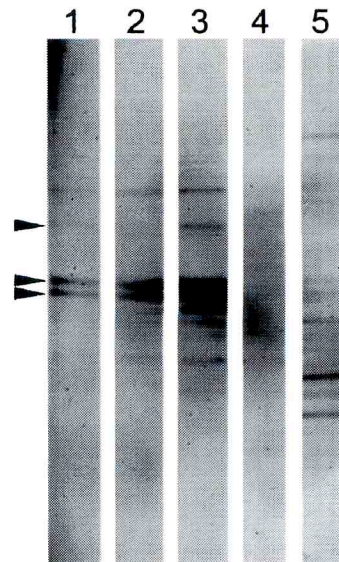


Fig. 7 Reactions of the serum against camellia pollen allergens with different pollen extracts. *Camellia japonica* (lane 1), *C. sasanqua* (lane 2), *C. sinensis* (lane 3), *Cryptomeria japonica* (lane 4), and *Pinus densiflora* (lane 5) pollen proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using the serum against camellia pollen allergens. The allergenic proteins (arrowheads) were detected by the ECL method.

るだけであり、花粉を多量に扱う2-4月はスギ花粉の飛散時期でもあり、症状はヤブツバキ花粉だけが原因ではないことも考えられる。

そこでNと他9人について花粉蛋白質 $10^{-3}$ 希釈液による皮内反応を調べたところ、データは示していないが、Nの他に2人が陽性、1人が疑陽性であり、他は紅斑のみられない陰性であった。Nはさらに希釈した液に対して鋭敏な皮膚反応を示し (Table 1)、ツバキ花粉に特異的なIgE抗体が検出されたが (Table 3)、N以外の陽性、疑陽性の者にはツバキ花粉に特異的なIgE抗体は検出されなかった。

またNは、各種花粉に対しても皮膚反応を示したが (Table 2)、スギ飛散時期以外においてもヤブツバキ花粉を扱うとアレルギー症状みられること、IgE-ELISA希釈テストと阻害テストによりヤブツバキ花粉蛋白質と血清に定量的関係がみられること (Fig. 1 and 2)、ヤブツバキ花粉には血清と反応する少なくとも3種類の蛋白質が検出されることなどから (Fig. 3)、Nはヤブツバキ花粉症であると判定した。

Iについては皮膚反応を調べていないが、ヤブツバキ花粉に対するIgE量が大きく (Table 3)、スギ花粉



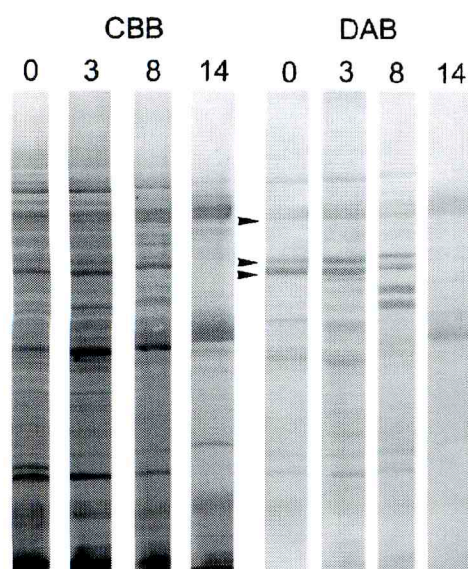


Fig. 8 Occurrence and decay of allergenic proteins during pollen tube growth.

*Camellia japonica* pollen grains were incubated on 0.3 M sucrose- 1.3% agar medium at 25°C for 0, 3, 8, and 14h. The pollen proteins were then extracted with water, separated by SDS-PAGE and immunoblotted. The allergenic proteins (arrowheads) were detected by DAB staining. The numbers in the figure indicate the period of incubation.

などには反応しないので、Iもヤブツバキ花粉症であると思われる。Iがこのように早く症状を示すようになったのはおそらくアセトン処理花粉<sup>(15)</sup>を多量に扱っていたことが原因と考えられる。アセトン処理花粉は大変飛散し易く、Nの場合もこれにより強く感作され、ヤブツバキ花粉に過敏に反応するようになったことも考えられる。

## 2. アレルゲンの同定

ヤブツバキ花粉抽出液をSDS-PAGEにかけ、N血清を用いてウェスタンブロットを行なったところ、少なくとも3本の特異的な蛋白質バンドが検出され(Fig. 3)、これらのバンドは花粉症の症状を示していない者の血清によっては検出されなかった。またTCA-C液を用いて抽出した花粉蛋白質も血清と反応し、アレルゲンの活性がみられたので(Fig. 3)、主にこの蛋白質標品を電気泳動分析に用いた。

二次元泳動により検出された3種類のアレルゲンのうち、主アレルゲンが何であるかは明らかではないが、63kDaアレルゲンはNでは時に検出されないことがあり、Iでは最も強く検出された。58kDaアレルゲンは

Iでは検出されないことがあり、55kDaアレルゲンはNとIでかならず検出された。63kDaアレルゲンの分子量は一次元SDS-PAGEにより検出されたバンドの分子量とは相応しておらず、現在その理由について検討を行っている。またこれらアレルゲンはPAS反応を示さず、糖は含まないと考えられる。

## 3. アレルゲンの性質

スギ花粉症の主アレルゲンCry j 1はペクチナーゼ活性をもち<sup>(4)</sup>、花粉粒の外壁とオービクル顆粒に局在することが知られ<sup>(5)</sup>、Cry j 2はポリガラクトクロナーゼ<sup>(6)</sup>であることが推測されている。オリーブのOle e 9は $\beta$ -1, 3-グルカナーゼであり<sup>(7)</sup>、またホソムギのLol p 1とトウモロコシのZea m 1はエクспанシン様機能をもち、雌ずいの細胞壁をゆるませることが<sup>(8)</sup>考えられている。またオオアワガエリのPhl p 5b<sup>(9)</sup>とカバノキのBet v 1<sup>(10)</sup>はRNase機能をもち、花粉の抗菌性に関わっていると推測され、アブラナのBra r 1はCa<sup>2+</sup>結合蛋白質で、花粉と雌ずいの相互作用に関係していることが推測されている<sup>(11)</sup>。このように花粉症のアレルゲンは花粉の発芽・管伸長、抗菌性、不和合性などに関わっていると考えられ、ヤブツバキ花粉における機能にも興味もたれる。

ヤブツバキ花粉アレルゲンは花粉粒と雌ずいに存在し(Fig. 6)、花卉や花糸(図には示していない)には検出されなかった。葉において検出されたバンドは、蛋白質量が多く(Fig. 6)、抗体と非特異的な吸着がおきたためと思われる。またこれらアレルゲンは伸長している花粉管に存在することが、二次元泳動分析(データは示されていない)によっても確かめられている。これらの結果はアレルゲンが花粉管伸長に関与していることを示しているのかも知れない。

サザンカとチャ花粉にもヤブツバキ花粉と同じアレルゲン活性がみられた。これらアレルゲンはツバキ属花粉に特有であるのかも知れない。またオオバヤシャブシやカモガヤ花粉に対するIgE抗体をもつ者にはヤブツバキ花粉に対するIgEが検出された(Table 3)。これはヤブツバキ花粉と共通抗原性をもつ他種の花粉があることを示唆していると考えられ、現在多くの花粉について共通抗原性の検討を行っている。

## 要 約

飛散しにくいヤブツバキ花粉を職業的に扱うことにより、花粉症(ヤブツバキ花粉症)になる例が報告された。そしてこの花粉に感作された者の血清を利用して、二次元電気泳動分析により3種類のアレルゲンが同定され、それらの性質が調べられた。アレルゲンはそ



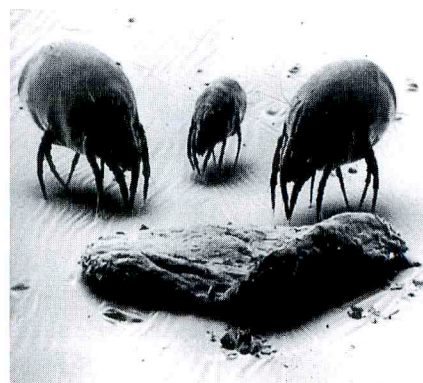
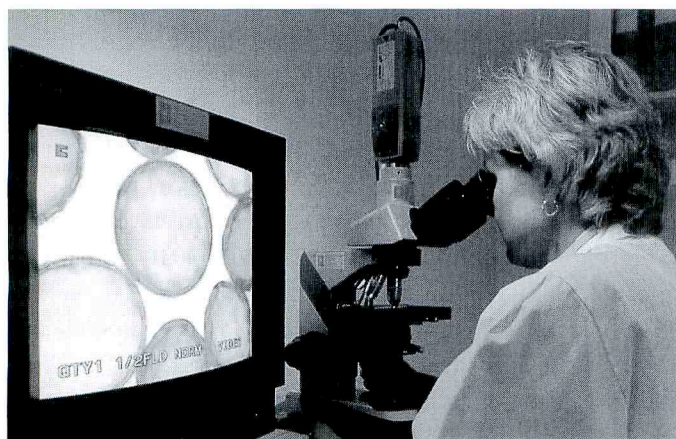
それぞれ分子量が 63, 58, 55kDa で、等電点が 5.0, 5.8, 6.0 であった。アレルゲンは花粉の他に雌ずいに検出され、花糸、花弁、葉には検出されなかった。また、これらはチャ、サザンカ花粉にも検出され、スギ、アカマツ花粉には検出されなかった。ツバキ花粉アレルゲンは花粉管伸長において何らかの役割を果たしているのかも知れない。

## 引用文献

- (1) 秋山一男・安枝 浩・三田晴久・前田裕二・早川哲夫・田所憲治・長谷川真紀・信太郎夫：ツバキ花粉症の 1 症例。アレルギーの臨床 9, 660-661 (1989).
- (2) 芦田恒雄・井手 武・田端司郎・衛藤幸男・吉川恒男・鳥山欽哉・日向康吉・渡辺正夫・岸谷幸枝：アブラナ属花粉症。花粉誌 38, 31-36 (1992).
- (3) 斎藤洋三・井手 武：花粉症の科学。化学同人 105pp (1994).
- (4) Taniguchi, Y., A. Ono, M. Sawatani, K. Kohno, M. Usui, M. Kurimoto and T. Matuhashi : Cry j 1, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* 50, 90-93 (1995).
- (5) Miki-Hirosige, H., S. Nakamura, H. Yasueda, T. Shida and Y. Takahashi : Immunocytochemical localization of the allergenic proteinin the pollen of *Cryptomeria japonica*. *Sex Plant Reprod.* 7, 95-100 (1994).
- (6) Komiyama, N., T. Sone, K. Shimizu, K. Morikubo, and K. Kino : cDNA cloning and expression of Cry j II, the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 1021-1028 (1994).
- (7) Huecas, S., M. Villalba and R. Rodriguez : Ole e 9, a major olive pollen allergen is 1,3- $\beta$ -glucanase ; Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 27959-27966 (2001).
- (8) Cosgrove D. J., P. Bedinger and D. M. Durachko : Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 6559-6564 (1997).
- (9) Bufe, A., G. Schramm, M. B. Keown, M. Schlaak and W. -M. Becker : Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase. *FEBS letters* 363, 6-12 (1995).
- (10) Bufe, A., M. D. Spangfort, H. Kahlert, M. Schlaak, and W. -M. Becker : The major birch pollen allergen, Bet v 1, show ribonuclease activity. *Planta* 199, 413-415 (1996).
- (11) Okada, T., Z. Zhang, S. D. Russell and K. Toriyama : Localization of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein, Bra r 1, in anthers and pollen tubes. *Plant Cell Physiol.* 40, 1243-1252 (1999).
- (12) Iwanami, Y. and N. Nakamura : Storage in an organic solvent as a means for preserving viability of pollen grains. *Stain technol.* 47, 137-139 (1972).
- (13) Damerval, C., D. de Vinne, M. Zivy, and H. Thiellement : Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52-54 (1986).
- (14) 井手 武・芦田恒雄：スギ科・ヒノキ科樹木花粉の共通抗原性。アレルギーの臨床 11, 174-178 (1991).
- (15) 小野哲也・川村雅英・西江晴男：アレルギー診断薬「アラスタットマイクロプレート」の基礎的検討。医学と薬学 41, 1019-1028 (1999).
- (16) O'Farrell, P. H. : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021 (1975).
- (17) Devine, P. L., and J. A. Warren : Glycoprotein detection on immobile PVDF transfer membrane using the periodic acid/Schiff reagent. *Biotechniques* 8, 492-495 (1990).
- (18) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).



# アレルギーキャップには眼に見えない信頼があります



**allergon**   
A Pharmacia Company

自然界から得られるアレルギー原料を使い、安定した品質のアレルギーエキスをつくることは容易なことではありません。ファルマシア社の子会社、アラゴン社はスウェーデンの西部、エンゲルホルム市に本社を置き、30年以上に及ぶ経験から培ったノウハウを駆使してダニや真菌類の培養や植物の栽培など、各種原料の調整を厳重な管理で行っています。アラゴン社のアレルギー原料はファルマシア社の特異IgE抗体検査に寄せられる信頼の礎です。

**ファルマシア株式会社 診断薬事業部**

本社：〒163-1448 東京都新宿区西新宿3-20-2 東京オペラシティタワー  
☎03-5365-8338

**PHARMACIA** *Diagnos*tics