

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による

Cry j I, *Cry j* II 定量法の開発

(株) 林原生物化学研究所

澤谷真奈美 小野昭子 河野恵三 河島トモ子
谷口美文 池上伯郎 臼井美津子 栗本雅司

スギ花粉の主要アレルゲン *Cry j* I, *Cry j* II をそれぞれ特異的に定量する ELISA 系を開発した。*Cry j* I あるいは *Cry j* II に対するウサギポリクローナル抗体 (poly Ab) あるいはマウスモノクローナル抗体 (mAb) を吸着させたマイクロプレートに、アレルゲン、ビオチン化抗体、horseradish peroxidase (HRPO) 標識ストレプトアビシンを順次反応後、固相に結合した酵素活性を比色法で定量した。これらの ELISA 系 (*Cry j* I ELISA, *Cry j* II ELISA) の測定範囲は、それぞれ 0.3~20ng/ml, 0.6~20ng/ml であり、測定内及び測定間変動係数は 1.5~10.3%, 0.9~12.9% でいずれも良好な再現性を有していた。また、mAb を用いたものでは、*Cry j* I, *Cry j* II 間において交差反応が無いのみならず、ヒノキなど代表的なスギ近縁植物花粉アレルゲンとの交差反応も極めて低かった。今後、この両 ELISA 系はスギ花粉症の診断、治療に欠かすことのできないスギ花粉主要アレルゲンの解析や、スギアレルゲンエキスの標準化など多方面で活用できるであろう。

Key words: *Cry j* I — *Cry j* II — ELISA

はじめに

スギ花粉症は春季、北海道、沖縄を除く日本全土において見られるアレルギー疾患である。1964年堀口・斎藤ら¹⁾により発見されて以来、その患者数は増加の一途をたどり、今やわが国で最も重要なアレルギー疾患のひとつに数えられている。

スギ花粉の主要アレルゲンは1983年に安枝ら²⁾により分子量約40kDaの蛋白として単離、精製され、スギ塩基性蛋白, Sugi Basic Protein (SBP) と命名された。その後 WHO の命名法により *Cry j* I と呼ばれている³⁾。さらに、阪口、谷合ら⁴⁾⁵⁾により、分子量37kDaの *Cry j* II が分離された。*Cry j* I と *Cry j* II はどちらもスギ花粉の主要アレルゲンでありながら、抗原性もアレルゲン性も異なる⁵⁾⁶⁾。スギ花粉中には *Cry j* II

より *Cry j* I の含量が数倍多く存在していることが報告されている⁶⁾。しかし、ほとんどのスギ花粉症患者は *Cry j* I のみならず *Cry j* II に対しても皮内反応陽性を示し、かつ血清中には両アレルゲンに対する IgE 抗体が存在する⁶⁾。なかには *Cry j* II のみに反応する患者血清も見い出され⁵⁾、スギ花粉症を惹起するアレルゲンとしては *Cry j* II も見逃せない。

したがってスギ花粉アレルゲンの解析および標準化、さらにスギ花粉症発症のメカニズムの解明には、*Cry j* I, *Cry j* II 両者ともに研究の対象にする必要がある。それにはまず花粉中に同時に存在するこれらをそれぞれ特異的に定量することが重要である。そこで *Cry j* I, *Cry j* II に対するウサギポリクローナル抗体ならびにマウスモノクローナル抗体を用い、この2種類の主要アレルゲンをそれぞれ特異的に、かつ簡便に定量する ELISA 系を開発したので報告する。

Received: September 23, 1993

Accepted: January 12, 1994

Abbreviations: BSA bovine serum albumin;
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay;
HRPO horseradish peroxidase; Ig immunoglobulin;
mAb monoclonal antibody; PBS phosphate buffered saline;
poly Ab polyclonal antibody; SBP Sugi Basic Protein

材料および方法

1. *Cry j* I, *Cry j* II の調製

1989年秋田産スギ花粉を0.125M NaHCO₃で抽出し、安枝ら²⁾の方法に準じて精製した。*Cry j* I は

CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia 社製) に抗 *Cry j* I mAb 065⁷⁾ を固定化したカラムを, *Cry j* II は抗 *Cry j* II mAb N26⁷⁾ を固定化したカラムを用いて精製した. 溶出 buffer には 0.1M glycine-HCl, pH 3.0 を使用した. *Cry j* I, *Cry j* II の蛋白量は Lowry 法にて, bovine serum albumin (BSA) を標準として測定した.

2. 花粉アレルゲンの調製

本報告に使用した花粉の植物名を Table 1 に示す. ヒノキ, ネズミサシ, セコイア, メタセコイア花粉は岡山県玉野市民病院薬剤部の岡鐵雄先生より分与されたものを用いた. ラクウショウ, アリゾナサイプレス, エンピツビャクシン, マウンテンセダー, オニヒバ, モントレーサイプレス花粉は International Biologicals, Inc., Oklahoma, U.S.A. から購入した. 各花粉アレルゲンは, これらの花粉に重量の20倍量の 0.125M NaHCO₃ を加えて 4℃, 3時間攪拌し抽出した. これらの遠心上清を phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 に透析し, MILLEX-GV 0.22μm (Millipore 社製) で濾過した. 粗抽出液中の蛋白含量は Bensadoun らの modified Lowry 法⁸⁾ により測定した.

3. モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は既報⁷⁾ に従って調製した. 抗 *Cry j* I mAb は 013, 046, 029, 065, 053 (全て IgG1) を, 抗 *Cry j* II mAb は N26 (IgG1), T27 (IgG3) を用い, 腹水から Protein A Sepharose (Pharmacia 社製) を用いて精製した.

4. ポリクローナル抗体の調製

Freund's Complete Adjuvant (Difco 社製) を用い, *Cry j* I あるいは *Cry j* II (100μg) を 2 週おきに 2 ~ 4 回, ウサギの皮下に免疫した. 最終免疫後 7 日目に血清を採取し, Protein A Sepharose により, IgG 画分を得た.

5. 抗体のビオチン標識

1mg の IgG 画分 (1ml) を 0.5M NaCl を含む 0.1M ホウ酸 buffer, pH 8.5 に 4℃ で一晩透析後, 37.5mM NHS Biotin (BIORAD 社製) を 20μl 添加し, 氷冷下一時間反応させた. 10mg/ml のグリシンを 100μl 添加後, 5 分間放置し PBS に一晩透析した.

6. サンドイッチ ELISA 法

固相抗体, ビオチン化抗体の組み合わせ及びそれぞれの抗体濃度を Table 2 に示す. PBS で希釈した固相抗体を, ELISA 用ポリスチレンマイクロプレート

Table 1 The list of plants botanically related to *Cryptomeria japonica*

Family	Genus	Species	English name	Japanese name
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria</i>	<i>japonica</i>	Japanese cedar	Sugi
	<i>Sequoia</i>	<i>sempervirens</i>	Sequoia	Sekoia
	<i>Metasequoia</i>	<i>glyptostrobis</i>	Metasequoia	Metasekoia
	<i>Taxodium</i>	<i>distichum</i>	Bald cypress	Rakuusho
Cupressaceae	<i>Libocedrus</i>	<i>decurrens</i>	Incense cedar	Onihiba
	<i>Chamaecyparis</i>	<i>obtusa</i>	False cypress	Hinoki
	<i>Juniperus</i>	<i>rigida</i>	Needle juniper	Nezumisashi
	<i>Juniperus</i>	<i>virginiana</i>	Red cedar	Enpitsu-byakushin
	<i>Juniperus</i>	<i>sabinoides</i>	Mountain cedar	
	<i>Cupressus</i>	<i>macrocarpa</i>	Moneterey cypress	
	<i>Cupressus</i>	<i>arizonica</i>	Arizona cypress	

Table 2 Combination of antibodies and amounts of the antibodies using in *Cry j* I ELISA and *Cry j* II ELISA

	Solid phase-Ab		Biotin-Ab	
		μg/ml		μg/ml
<i>Cry j</i> I ELISA	anti- <i>Cry j</i> I poly Ab	4	anti- <i>Cry j</i> I poly Ab	4
	anti- <i>Cry j</i> I poly Ab	4	mAb 053	1
<i>Cry j</i> II ELISA	anti- <i>Cry j</i> II poly Ab	25	anti- <i>Cry j</i> II poly Ab	5
	mAb T27	10	anti- <i>Cry j</i> II poly Ab	5

(Maxisorp, Nunc 社製)に100 μ l 加え37 $^{\circ}$ Cで3時間吸着させた. 1%BSA を含むPBS (BSA/PBS) を250 μ l 加え, 4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングした. 0.1% BSA/PBS で希釈した被検物質および, *Cry j* Iあるいは*Cry j* II 標準溶液を100 μ l 加え, 37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた. 次に250 μ l の0.1% BSA/PBS で3回洗浄後, Table 2 に示す濃度に希釈したビオチン化抗体を100 μ l 加え, 2時間反応させた. 0.1% BSA/PBS で3回洗浄した後, 8000倍希釈したHRPO 標識ストレプトアビジン (Zymed 社製) を100 μ l 加え2時間インキュベートした. 0.1% BSA/PBS で3回洗浄し, 0.03% H₂O₂, 0.5 mg/ml *o*-phenylenediamine (和光純薬社製) を含む0.1M クエン酸-リン酸緩衝液, pH 5.0を100 μ l 加えて, 室温で約3分間酵素反応を行った. 2N H₂SO₄, 100 μ l を加えて反応を停止後, 分光光度計 (Molecular devices 社製)で490nm の吸光度を測定した. 標準溶液

で作成した標準曲線より被検物質の濃度を求めた.

結 果

1. *Cry j* I, *Cry j* II を定量する ELISA 系の作成

抗 *Cry j* I mAb 5 種, 抗 *Cry j* II mAb 2 種並びに抗 *Cry j* I poly Ab, 抗 *Cry j* II poly Ab を用いて, サンドイッチ ELISA を検討した. その結果, *Cry j* I 測定用として固相に poly Ab, 二次抗体に biotin-poly Ab を用いた系 (poly-poly) と, 固相に poly Ab, 二次抗体に biotin-mAb 053 を用いた系 (poly-053) を使用することとした. *Cry j* II 測定用としては固相, 二次抗体に poly Ab を用いた系 (poly-poly) と, 固相に mAb T27, 二次抗体に biotin-poly Ab を用いた系

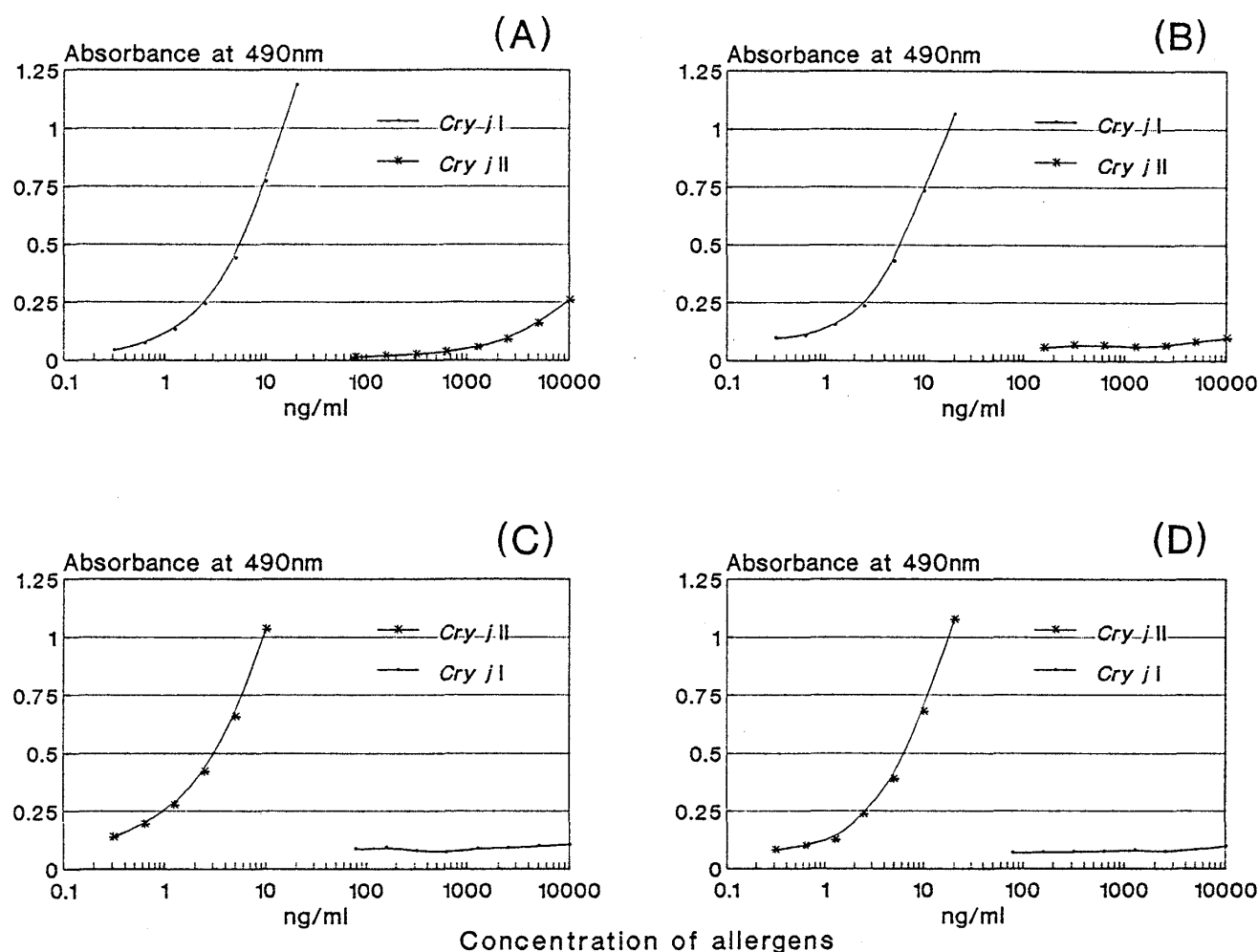


Fig. 1. Standard curve for *Cry j* I ELISA and *Cry j* II ELISA.

(A): *Cry j* I ELISA, poly-poly

(B): *Cry j* I ELISA, poly-053

(C): *Cry j* II ELISA, poly-poly

(D): *Cry j* II ELISA, T27-poly

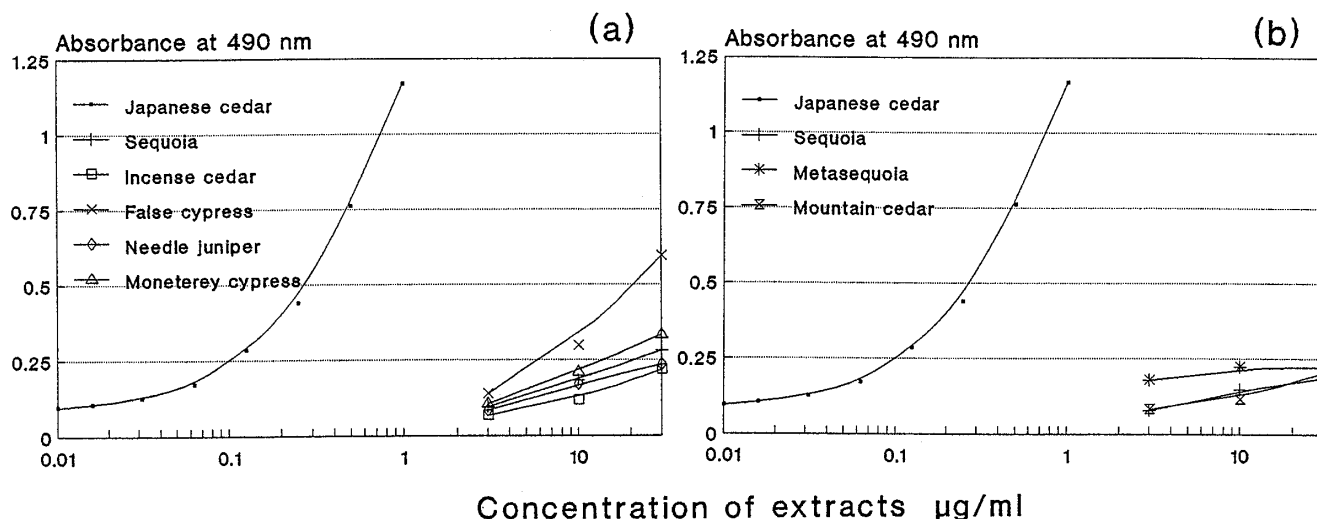


Fig. 2. Reactivities of pollen extracts from *Taxodiaceae* and *Cupressaceae* families in *Cry j* II ELISA. Serially diluted pollen extracts prepared from the indicated plants were assayed by *Cry j* II ELISA. (a): poly-poly (b): T27-poly.

(T27-poly)を選択し、それぞれ2系列の測定系を用いて以下の実験を行った。Fig. 1に *Cry j* I 測定系 (*Cry j* I ELISA), *Cry j* II 測定系 (*Cry j* II ELISA) の標準曲線を示す。*Cry j* I ELISA の測定範囲は0.3~20 ng/ml, *Cry j* II ELISA の測定範囲は0.6~20ng/mlであった。

2. *Cry j* I ELISA, *Cry j* II ELISA のスギ近縁植物花粉との反応性

スギ花粉アレルゲンはヒノキその他の多くの近縁植物花粉アレルゲンと共通抗原性があることが知られている⁹⁾。そこでこれらの ELISA 系について、スギ近縁植物花粉抽出液に対する交差反応性を調べた。*Cry j* I ELISA では、poly-poly の系では調べた10種類の花粉全てと交差反応性がみられたが、poly-053の系では全く交差反応がみられなかった(データ略)。*Cry j* II ELISA の方はいずれの系も近縁植物花粉との交差反応が少なからず認められた(Fig. 2)。T27-poly の系のほうがより交差反応が低く、また、ヒノキに対する交差が低いので実際上有用であると考えられた。

3. *Cry j* I ELISA, *Cry j* II ELISA の特異性の検討

Cry j I ELISA で *Cry j* II を、*Cry j* II ELISA で *Cry j* I を測定した。Fig. 1に示すように、poly-053の系では、10000ng/ml の *Cry j* II に対しても交差反応は全く認められなかった。poly-poly の系では、10000ng/ml の *Cry j* II 濃度(検出上限の500倍濃度)を測定した時、約3.6ng/ml の *Cry j* I を測定した時と同程度の反応が認められた。また *Cry j* II ELISA では、いず

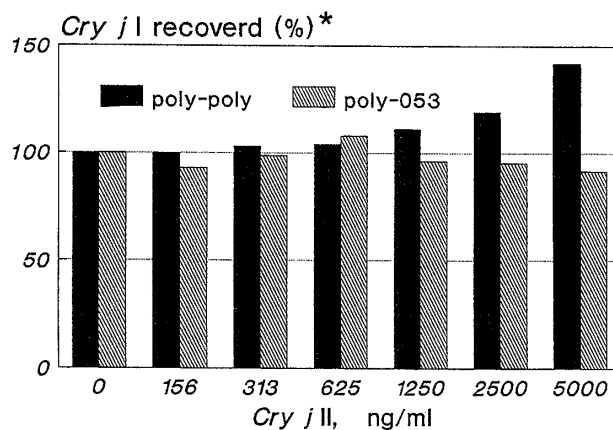


Fig. 3. Effect of the presence of *Cry j* II on the measurement of *Cry j* I by *Cry j* I ELISA.

A constant concentration (10ng/ml) of *Cry j* I was mixed with an equal volume of various concentrations of *Cry j* II, then the amount of *Cry j* I in mixture was quantified by *Cry j* I ELISA.

* Results were presented as the relative percentage of the amount of *Cry j* I measured to that of *Cry j* I in the absence of *Cry j* II.

れの系も10000ng/ml の *Cry j* I に対しても全く反応しなかった。

次に一定濃度の *Cry j* I に、*Cry j* II を濃度を変えて添加し *Cry j* I が正確に測定できるかどうかを検討した。Fig. 3に示すように poly-053の系では5000ng/ml の *Cry j* II が存在しても *Cry j* I の測定値が影響を受けることはない。しかし、Fig. 1の結果から推測さ

Table 3 Quantification of *Cry j* I and *Cry j* II in Japanese cedar pollen extracts, partially purified allergen and commercial pollen extracts

Sample	<i>Cry j</i> I (ng/ml)	<i>Cry j</i> II (ng/ml)
Pollen extracts (1 : 32) ¹⁾		
Lot a	7600	1000
Lot b	8540	1140
Lot c	8080	1660
Partially purified allergen		
Lot 01	2.27×10^6	0.446×10^6
Lot 02	2.07×10^6	0.274×10^6
Lot 03	2.06×10^6	0.334×10^6
Lot 04	2.65×10^6	0.391×10^6
Lot 05	2.45×10^6	0.567×10^6
Commercial pollen extracts		
Corporation A		
Scratch test solution (1 : 20) ²⁾	22000	2760
Corporation B		
Scratch test solution (1 : 20) ²⁾	100	2170
Intradermal skin test solution (1 : 1000) ³⁾	0.538	<0.63
Immunotherapeutic solution (1 : 100) ²⁾	161	111
(1 : 1000) ²⁾	2.01	17.5

¹⁾ : Pollen extracts with 0.125M NaHCO₃ solution (w/v).

²⁾ : Pollen extracts with 50% glycerol-NaCl solution (w/v).

³⁾ : Pollen was extracted with 50% glycerol-NaCl solution, then the extract was dialyzed against saline (w/v).

れるように, poly-poly 系では5ng/ml の *Cry j* I に対し2500ng/ml 以上の *Cry j* II (*Cry j* I の500倍量以上) が存在する場合 *Cry j* I が高めに測られる。従って *Cry j* II が *Cry j* I の500倍以上含まれるような標品, 例えば *Cry j* II 標品中の *Cry j* I の混入を測定するような場合には poly-053系を用いたほうが適当である。*Cry j* II ELISA についても同様に一定濃度の *Cry j* II に *Cry j* I を濃度を変えて添加し *Cry j* II を測定した。いずれの系においても *Cry j* II は特異的に測定されており, 極めて良好な成績であった (データ略)。

4. *Cry j* I ELISA, *Cry j* II ELISA の再現性

同一標品の同一測定時における測定内変動および同一標品における日差変動を調べた。1, 3, 8, 18ng/ml のサンプルを調製し, 6重測定を行ったときの同一測定時の測定内における変動係数は, *Cry j* I ELISA, *Cry j* II ELISA それぞれ1.5~7.8%, 3.1~10.3%であった。同一サンプルを3重測定で日を変えて3回測定したときの測定間における変動係数は, 0.9~12.9%, 3.3~10.7%で, 両 ELISA とともに測定領域の全域にわたって良好な再現性を示した。

5. *Cry j* I ELISA, *Cry j* II ELISA によるスギ花粉抽出液, 精製スギアレルゲンおよび市販スギ花粉アレ

ルゲン中の *Cry j* I, *Cry j* II の定量

Cry j I ELISA (poly-053), *Cry j* II ELISA (T27-poly)を用いて, スギ花粉より0.125M NaHCO₃ で抽出して調製した粗抽出液中の, *Cry j* I, *Cry j* II 濃度を測定した。さらに粗抽出液を80%飽和硫酸で塩析後, DEAE Sephadex, CM Sephadex により部分精製した標品についても測定を行った。Table 3に結果を示す。粗抽出液, 部分精製標品いずれも *Cry j* I は *Cry j* II の6倍以上の濃度で検出された。次に現在市販されているスギ花粉アレルゲンエキス中の *Cry j* I, *Cry j* II 濃度を測定した。製品中に添加物としてグリセリンを含むものは, ELISA におけるグリセリンの影響を避けるため製品原液を希釈するかあるいは, 最終濃度が0.1%になるよう BSA を添加し1000倍量の PBS に4℃一晩透析した。A 社製アレルゲンは *Cry j* I, *Cry j* II 濃度とも我々が NaHCO₃ を用いて抽出した値と近いものであった。しかし, B 社の製品を同一希釈度で比較した場合, いずれも *Cry j* I 含量が著しく低かった。一方 *Cry j* II は診断用皮内エキスを除いて同程度含まれていた。

考 察

スギ花粉主要アレルゲンである *Cry j* I, *Cry j* II をそれぞれ特異的に測定する *Cry j* I ELISA 並びに *Cry j* II ELISA を開発した。両 ELISA を用いることにより、2 種類の主要アレルゲン量を正確かつ簡便に測定し、それらの組成比について情報を得ることができる。

Cry j II のアレルゲンとしての重要性は、皮内反応の成績⁶⁾より明らかである。すなわち、スギ花粉粗抽出液に陽性を示す25例の患者のうち19例が *Cry j* I, *Cry j* II 両者に陽性を示した。また、RAST⁶⁾、あるいは ELISA⁵⁾で調べると、*Cry j* I 陽性かつ *Cry j* II 陰性の症例も、*Cry j* I 陰性かつ *Cry j* II 陽性の症例も認められる。これは両アレルゲンが異なった抗原性を持つ蛋白であることを示している。これまでスギ花粉主要アレルゲンについては主に1成分、*Cry j* I についてのみ研究が進められてきたが、*Cry j* I ELISA, *Cry j* II ELISA の開発により、今後、もうひとつの成分である *Cry j* II も含めたより詳しい解析が進められると思われる。

Cry j I ELISA, *Cry j* II ELISA の測定感度はそれぞれ0.3ng/ml, 0.6ng/ml であり、*Cry j* II ELISA についても、安枝¹⁰⁾、渡辺ら¹¹⁾の報告する *Cry j* I ELISA と同程度の感度(0.2ng/ml, 0.16ng/ml)が確保された。また、固相にモノクローナル抗体を用いたものでは *Cry j* I, *Cry j* II 間で全く交差反応が認められず、その特異性が高いことが確認された。*Cry j* I ELISA において、poly-poly の系で *Cry j* II との交差が認められたのは、*Cry j* I, II 間の共通抗原性の存在というよりも、むしろ、ポリクローナル抗体の免疫原として用いた *Cry j* I のなかに微量の *Cry j* II が混入していたためと考えられる。実際、ポリクローナル抗体のロットにより、交差反応の大小に差がみられた。

また、スギ花粉アレルゲンと共通抗原性がある、もしくはその可能性がある多くのスギ近縁植物(セコイア、メタセコイア、ラクウショウ、オニヒバ、ヒノキ、ネズミサシ、エンピツビャクシン、マウンテンセダー、モントレーサイプレス、アリゾナサイプレス)花粉に対する反応性を調べた結果、*Cry j* I ELISA(poly-053) はこれら花粉抽出液と全く反応しなかった。*Cry j* II ELISA (T27-poly) は非常に低いものの、若干の交差反応が認められる。しかし、ヒノキに対する交差は極めて低いので、ヒノキ花粉との識別等には有用である

と思われる。

さらに、今回確立した ELISA を用いて市販のスギ花粉アレルゲンエキス中の *Cry j* I, *Cry j* II 濃度を測定した。A 社製アレルゲンは *Cry j* I, *Cry j* II 濃度とも我々が NaHCO₃ を用いて抽出した値と近いものであったが、B 社の製品はいずれも *Cry j* I 濃度が著しく低い。少なくとも我々が採取年度・産地の異なる花粉を用いて検討したかぎり、*Cry j* I の方が *Cry j* II の2~10倍多いという成績を得ている⁶⁾。診断・治療等に使用する場合、A 社製アレルゲンの方が実用的であると考えられた。

今回開発した *Cry j* I ELISA, *Cry j* II ELISA は、スギ花粉主要アレルゲンの2種類の成分それぞれに関する解析など基礎研究関係の多くの方面に利用できる。また絶対量の評価を行えるようになったことは、スギ花粉症のアレルゲンの標準化¹⁰⁾¹²⁾をはじめとして、臨床関係においても非常に有用であると考えられる。

ヒノキ、ネズミサシ、セコイア、メタセコイア花粉を提供していただいた玉野市民病院薬剤部の岡鐵雄先生に深謝致します。

本論文の要旨の一部は第3回日本アレルギー学会春季臨床集会(1991年、福岡)において発表した。

文 献

- 1) 堀口申作, 斎藤洋三: 栃木県日光市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, 1964.
- 2) Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T. and Shida, T.: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 77-86, 1983.
- 3) Marsh, D.G., Goodfriend, L., King, T.P., Lowenstein, H. and Platts-Mills, T.A.E.: Allergen nomenclature. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 639-645, 1987.
- 4) Sakaguchi, M., Inouye, S., Taniai, M., Ando, S., Usui, M. and Matuhashi, T.: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45, 309-312, 1990.
- 5) Taniai, M., Ando, S., Usui, M., Kurimoto, M., Sakaguchi, M., et al.: N-terminal amino acid

- sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (*Cry j* I). *FEBS Letters* 239, 329-332, 1988.
- 6) 澤谷真奈美, 安枝 浩, 秋山一男, 信太隆夫, 谷口美文, 他: 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.
 - 7) Kawashima, T., Taniai, M., Taniguchi, Y., Usui, M., Ando, S., et al.: Antigenic analyses on Sugi Basic Protein by monoclonal antibodies. I. Distribution and characterization of B cell-tropic epitopes of *Cry j* I molecules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98, 110-117, 1992.
 - 8) Bensadoun, A. and Weinstein, D.: Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry* 70, 241-250, 1976.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 渡辺雅尚, 田村正宏, 名古屋隆生, 高橋裕一, 片桐進, 岡 鐵雄: スギ花粉抗原 (*Cry j* I) に対するモノクローナル抗体を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による *Cry j* I の測定. *アレルギー* 41, 1535-1539, 1992.
 - 12) 伊藤幸治: アレルゲンの標準化. *アレルギー* 41, 467-474, 1992.

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE QUANTIFICATION OF *Cry j* I and *Cry j* II

Manami Sawatani, Akiko Ono, Keizo Kohno, Tomoko Kawashima, Yoshifumi Taniguchi,
Hakuwo Ikegami, Mitsuko Usui and Masashi Kurimoto
Hayashibara Biochemical Labs., Inc.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were developed to specifically quantify the two major allergens from Japanese cedar pollen, *Cry j* I and *Cry j* II. Polystyrene microplates coated with antibodies specific for *Cry j* I or *Cry j* II were incubated with an allergen and then with biotinylated anti-*Cry j* I or *Cry j* II antibody. The bound allergen-biotin Ab complexes were detected with HRPO-conjugated streptavidin and an enzyme substrate. The working ranges of *Cry j* I ELISA and *Cry j* II ELISA were 0.3-20 ng/ml and 0.6-20 ng/ml, respectively. Intra- and inter-assay coefficients of variation for reproducibility were 1.5-10.3% and 0.9-12.9%. These ELISA systems showed no cross-reactivity between *Cry j* I and *Cry j* II and showed little cross-reactivity with pollen allergens of plants botanically related to the Japanese cedar. Using the *Cry j* I ELISA and the *Cry j* II ELISA, it was possible to quantify *Cry j* I and *Cry j* II easily and accurately. These ELISA systems will be useful in various fields, especially for the analysis and standardization of the allergens necessary for diagnosis and treatment of Japanese cedar pollinosis.