

スギ花粉アレルゲン *Cry j II* の免疫学的, 物理化学的性質

1) (株) 林原生物化学研究所

2) 国立相模原病院

3) 沖中記念成人病研究所

澤谷真奈美¹⁾ 安枝 浩²⁾ 秋山一男²⁾信太隆夫²⁾ 谷口美文¹⁾ 臼井美津子¹⁾安藤駿作¹⁾ 栗本雅司¹⁾ 松橋 直³⁾

スギ花粉アレルゲン *Cry j II* の皮内反応におけるアレルゲン性, および物理化学的性質について, 主要アレルゲンである *Cry j I* のそれと比較検討した. *Cry j I* は24/25例に *Cry j II* は19/25例で皮内反応陽性を示した. 採取年度, 採取地の異なる花粉より調製した粗抽出液に含まれる *Cry j I* の量は, 花粉100 g 当たり35mg 前後のほぼ一定の値を示したが, *Cry j II* の量は2.9~14mg と大きく変動していた. *Cry j II* は *Cry j I* と同様, 酸, アルカリまたは SDS 処理により特異的ヒト IgE 抗体との結合性はほとんど失われるが, 抗 *Cry j II* mAb (N26, T27) との結合性はかなり保持されていた. すなわち, ヒト IgE 抗体の結合部位は conformational な構造をとっていると推定され, N26, T27は sequential なアミノ酸を認識していると推定された.

Key words: allergen — *Cry j I* — *Cry j II* — sugi pollen

はじめに

スギ花粉症は, 春先ほぼ全国的に観察されるアレルギー疾患であるが, その患者数は, 1970年以降急速に増加の一途をたどり, 大きな社会問題となっている. スギ花粉の主要アレルゲンは, 1983年安枝ら¹⁾によって単離精製され, Sugi Basic Protein (SBP) と命名され, その後 WHO の命名法に従い *Cry j I* と呼ばれている. さらにその後, 谷合ら²⁾, 阪口ら³⁾によって *Cry j I* の分離精製の過程で, 条件を僅か変えることにより, 分子量45~50kDa の *Cry j I* とは抗原性の異なる37kDa の *Cry j II* が分離され, N 末端アミノ酸配列も, それぞれ20残基, 10残基が決定されて, 両者は異なる蛋白であろうと推定された. さらに, 河島ら⁴⁾⁵⁾により, *Cry j I*, *Cry j II* に対するモノクローナル抗体

(mAb)も作成され, 両者に共通する抗原決定基はこの時点では見出されなかった.

ほとんどのスギ花粉症の患者血清は *Cry j I*, *Cry j II* の両者に反応するが, *Cry j I* のみあるいは *Cry j II* のみと反応する血清も見出されている³⁾. しかし, これまで, *Cry j II* のアレルゲン性は, 患者血清を用いる ELISA でのみ検討されており, *Cry j II* が, 果してヒト生体内でどの程度アレルギー症状に関与しているかは検討されていない. 今回, 25例のアレルギー患者での皮内反応および RAST で *Cry j I*, *Cry j II* のアレルゲン性を比較検討した. さらに, *Cry j II* の物理化学的性質も検討し, *Cry j I* のそれと比較した. *Cry j II* も, *Cry j I* と同程度にスギ花粉症に関与していることが明らかにされた.

Received: October 9, 1992

Accepted: March 2, 1993

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; HRPO horseradish peroxidase; Ig immunoglobulin; mAb monoclonal antibody; PBS phosphate buffered saline; RAST radioallergosorbent test; SBP Sugi Basic Protein; SDS sodium dodecyl sulfate

材料および方法

1. スギ花粉

1977年から1991年にかけて, 神奈川, 福島, 千葉, 秋田および奈良県で採取したスギ花粉を, 使用時まで-20℃に保存した.

2. スギ花粉アレルゲンの抽出および精製

Cry j II の分離精製は, 安枝ら¹⁾の方法に若干の変更

Table 1 Anti-*Cry j* I and -*Cry j* II monoclonal antibodies used in this study

Specific for	Group	mAbs	Epitope recognized by mAb
<i>Cry j</i> I	1	013	Conformational
	2	029, 065	Conformational
	3	026	Sequential
	4	027	Sequential
<i>Cry j</i> II		N26, T27	Undetermined

を加えて行い、*Cry j* I の精製法¹⁾と比較した。さらに、抗 *Cry j* I mAb 065, 抗 *Cry j* II mAbN26を CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia 社) に固定化し、それぞれをアフィニティークロマトグラフィーで精製した。蛋白量は BSA を標準としてローリー法で測定した。

3. 抗体

mAb 抗 *Cry j* I, *Cry j* II は河島ら⁴⁾⁵⁾の報告に用いたものと同一ロットのものを使用した (Table 1)。グループ 1, グループ 2 に属する mAbs は conformational なエピトープを認識していると推定され、グループ 3, 4 に属する mAbs は sequential なアミノ酸配列を認識していることが確かめられている。ウサギポリクローナル抗 *Cry j* I, *Cry j* II 抗体は当研究所で調製し、Protein-A Sepharose (Pharmacia 社) により IgG 画分にして用いた⁶⁾。

4. 皮内反応

国立相模原病院内科, 耳鼻科を受診したアレルギー患者25例(男性10例, 女性15例)を対象とし、*Cry j* I, *Cry j* II 100ng/ml を20 μ l 用いて石崎⁷⁾の方法に従っておこなった。対照として、Hollister-Stier 社製スギ花粉粗抗原1000倍希釈液を用いた。

5. RAST

Cry j I, *Cry j* II あるいはスギ花粉エキスをペーパーディスクに結合させ、固相を調製した。RAST の測定には Pharmacia RAST-RIA キットを用いた。なお、リファレンス D 血清 (0.35PRU/ml) を正常ウマ血清で 4 : 7 (v : v) に希釈したものをリファレンス E 血清 (0.20PRU/ml) として、試料中の抗体価は 0.35 PRU/ml 以上を陽性とみなした。正常ヒト血清による非特異的なバックグラウンドカウントはリファレンスディスク, アレルゲンディスクのいずれを用いた場合でもリファレンス E 血清による結合カウントの 1/2 以下であった。

6. *Cry j* I, *Cry j* II の測定

マイクロプレート (Nunc 社) に生理食塩水で 5 μ g/ml に希釈したウサギポリクローナル抗 *Cry j* I あるいは抗 *Cry j* II 抗体を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C に 3 時間おいて吸着させ、1% ウシ血清アルブミン (BSA) でブロッキングをおこない固相を調製した。*Cry j* I の検出には、0.1% BSA-PBS で希釈した標準溶液 (0.3~20ng/ml) あるいはサンプル 100 μ l を抗 *Cry j* I 固相に加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。0.1% BSA-PBS で 3 回洗浄後 1 μ g/ml に希釈したビオチン標識ウサギポリクローナル抗 *Cry j* I を 100 μ l 加えた。*Cry j* II の検出には抗 *Cry j* II 固相とビオチン標識ウサギポリクローナル抗 *Cry j* II を用いて同様に行った。固相に結合した抗原・抗体複合物は horseradish peroxidase (HRPO) 標識ストレプトアビジン (Zymed 社) と基質 *o*-phenylenediamine (和光純薬社) で検出し、492nm での吸光度を測定して算出した。

7. *Cry j* I, *Cry j* II の熱, 酸, アルカリ, sodium dodecyl sulfate (SDS) 処理

熱処理: 100 μ g/ml の *Cry j* I, *Cry j* II を 100 $^{\circ}$ C, 10分, 37 $^{\circ}$ C または 56 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。

酸, アルカリ処理: 100 μ g/ml の *Cry j* I, *Cry j* II を pH 2 または 4 のクエン酸緩衝液, pH 7 のリン酸緩衝液, pH 9 のトリス緩衝液, pH 12 のグリシン緩衝液に一晩透析し、その後 PBS (pH 7.2) に一晩透析した。

SDS 処理: 200 μ g/ml の *Cry j* I, *Cry j* II に等量の 2%, 0.6%, 0.2%, 0.02% の SDS 溶液を加え、一晩室温にて反応させた。

抗体との結合能の測定: 上記のようにそれぞれ処理した *Cry j* I あるいは *Cry j* II を PBS で 5 μ g/ml に希釈し、50 μ l/well ずつマイクロプレートに分注して固相を調製した (抗原固相)。Table 1 に示す mAb (1~5 μ g/ml) を 50 μ l/well ずつ抗原固相に加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させ、結合した mAb を 1000 倍希釈した HRPO 標識抗マウス Igs で検出した。ヒト IgE 抗体との結合能の測定は、*Cry j* I, *Cry j* II に陽性を示す患者血清を PBS で 4 倍に希釈して 50 μ l/well ずつ各固相に加え、37 $^{\circ}$ C, 2 時間反応させた。抗原固相に結合したヒト IgE 抗体をビオチン標識抗ヒト ϵ 鎖 (Kirkegaard & Perry 社, 1 μ g/ml) および HRPO 標識ストレプトアビジンで検出した。各抗体との結合能は、結合百分率 = (処理サンプルでの吸光度 $\div$ 未処理サンプルでの吸光度) $\times$ 100 であらわした。

結 果

I. Cry j II の抽出, 精製の条件

スギ花粉より Cry j II を効率よく抽出する条件を検討した。Table 2 に示すように, 抽出バッファーの pH が 6.5 以下では Cry j I と同様にほとんど抽出されず, 弱アルカリ性で抽出された。バッファーには, トリス, 炭酸水素ナトリウム, 炭酸水素アンモニウムのいずれを用いても弱アルカリ性であれば同程度の収率であった。Cry j II の抽出には, Cry j I の抽出に用いている 0.125M 炭酸水素ナトリウムでよいことが確かめられた。

0.125M 炭酸水素ナトリウムによる Cry j I, Cry j II の抽出量を経時的に測定した成績を Fig. 1 に示す。60 分で抽出はほぼ終了している。

Cry j I の精製には, 花粉抽出液を 80% 硫酸アンモニウムで塩析後, DEAE-cellulose および CM-cellulose によるイオン交換クロマトグラフィーを用いたが¹⁾, Cry j II の精製に際しては, Table 3 に示すように, Cry j II は DEAE-cellulose には一部吸着され, 1M NaCl で溶出しても十分に回収されなかった。すなわち, Cry j II に関しては, イオン交換 cellulose では十分なクロマトグラフィーが行えないことが判明した。そこで DEAE-Sephadex を用いたところ, 全く吸着されず, さらに CM-Sephadex に吸着され, 0.3M NaCl を含む 0.1M PB で溶出された。Cry j I は DEAE-Sephadex, DEAE-cellulose のいずれにも吸着されなかった。すなわち, DEAE-cellulose, CM-cellulose を用いると, Cry j I が単離され, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex を用いると Cry j I と共に Cry j II も

Table 2 Effects of buffer-composition and its pH on the extraction of sugi pollen allergens

Allergens pH	Amounts of allergens ($\mu\text{g/ml}$) extracted by									
	20mM • Tris-HCl + 0.15M NaCl		0.125M NaHCO ₃	0.125M NH ₄ HCO ₃	10mM phosphate-buffered saline					
	9.0	8.5	8.2	7.9	8.0	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5
Cry j I	21.3	21.9	23.9	23.0	18.8	20.4	15.9	1.48	1.09	1.15
Cry j II	4.34	4.01	4.20	4.82	3.88	1.98	1.35	0.07	0.04	0.09

One gram pollen was extracted with 20 ml of the buffer indicated at 4°C for 2 hours.

Cry j I and Cry j II contents in each extract were determined by ELISA.

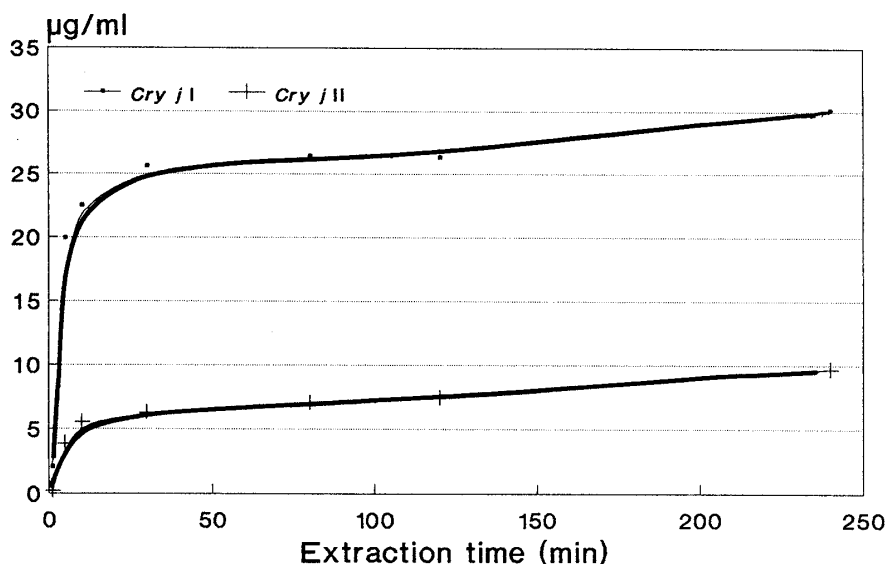


Fig. 1. Kinetics of extraction of Cry j I and Cry j II from Japanese cedar pollen.

Japanese cedar pollen was suspended in 0.125M NaHCO₃ and stirred. After incubation at 4°C for the indicated periods, a part of the suspension was harvested. The Cry j I and Cry j II contents in each sample were determined by ELISA.

Table 3 Comparison of recovery of *Cry j* I and *Cry j* II between DEAE-Sephadex and DEAE-cellulose chromatography

Fractions	Recovery*			
	DEAE-Sephadex		DEAE-cellulose	
	<i>Cry j</i> I	<i>Cry j</i> II	<i>Cry j</i> I	<i>Cry j</i> II
Leak	100	94.6	98.0	27.4
Eluate	<0.1	<0.1	14.2	21.0

*: Percent of recovered amounts against loaded amounts.

Crude extract of sugi pollen was precipitated by 80% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The precipitate dissolved in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.8, was loaded on a DEAE-Sephadex or a DEAE-cellulose column. The leak fractions and the fractions eluted by 1 M NaCl were collected, then the amounts of *Cry j* I and *Cry j* II in each fraction were determined by ELISA.

同じ画分に含まれてくることがわかった。したがってこの画分より *Cry j* I, *Cry j* II の分離には, 抗 *Cry j* I, 抗 *Cry j* II mAb によるアフィニティクロマトグラフィーかあるいは谷合ら²⁾, 阪口ら³⁾のように Mono S カラムによる HPLC が必要である。 *Cry j* I, *Cry j* II の精製法を Fig. 2 に示す。

II. *Cry j* II のアレルゲン性

内科, 耳鼻科でのアレルギー患者25例についておこなったスギ花粉粗抽出液, *Cry j* I および *Cry j* II に対する皮内反応の成績を Table 4 に示す。 *Cry j* I に対しては24例, *Cry j* II には19例が陽性反応を示した。すなわち25例中19例は *Cry j* I, *Cry j* II の両者に陽性を示し, 5 例が *Cry j* I にのみ陽性, *Cry j* II には陰性であった。逆に *Cry j* II にのみ陽性で *Cry j* I に陰性を示した例は1例も見られなかった。

同じ患者の血清をもちいた RAST の成績を Table

Table 4 Allergenicity of *Cry j* II compared with that of *Cry j* I

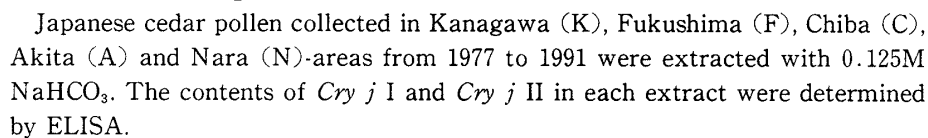
Case No.	Sex	Diagnosis	Skin test*				RAST (PRU/ml)		
			Sugi	<i>Cry j</i> I	<i>Cry j</i> II	M.D.	Sugi	<i>Cry j</i> I	<i>Cry j</i> II
1	F	A, U #	++	++	++	10 ⁻⁵	5.1	8.2	0.21
2	F	R	++	++	++	10 ⁻⁵	12.3	>17.5	>17.5
3	F	A, R	++	++	++	10 ⁻⁶	11.2	>17.5	4.6
4	F	A, R	++	—	—	10 ⁻³	0.29	<0.2	<0.2
5	M	R	+	++	—	10 ⁻³	0.21	0.64	<0.2
6	F	A, R	+	+	—	10 ⁻³	<0.2	<0.2	<0.2
7	M	A	++	++	—	10 ⁻⁴	0.44	0.28	<0.2
8	M	A, R	++	++	—	10 ⁻⁶	2.7	1.6	<0.2
9	M	A, R, C	++	++	++	10 ⁻⁵	6.5	8.7	8.7
10	M	A	++	++	++	10 ⁻⁵	>17.5	>17.5	>17.5
11	M	R, C	++	++	—	10 ⁻⁵	1.3	1.4	<0.2
12	M	R, C	++	++	++	10 ⁻⁴	1.1	0.75	1.7
13	F	A, R, C	++	++	++	10 ⁻⁴	7.3	10.4	12.7
14	F	A, R	++	++	++	10 ⁻³	0.65	0.52	0.91
15	M	A, R	++	++	++	10 ⁻⁶	3.8	3.4	3.3
16	F	A, R, C	++	++	++	10 ⁻⁶	15.0	>17.5	>17.5
17	F	A, AD	++	++	+	10 ⁻⁶	10.2	11.1	0.32
18	M	A	+	+	+	10 ⁻³	0.23	<0.2	0.51
19	F	A, R, AD, C	++	+	+	NT	2.1	1.6	2.9
20	F	A	++	+	+	10 ⁻⁶	17.4	13.7	9.6
21	F	R	++	++	++	10 ⁻⁶	>17.5	>17.5	3.0
22	F	A	++	+	+	10 ⁻⁴	1.8	0.51	2.4
23	F	A, C	++	++	++	10 ⁻⁵	11.4	10.7	7.9
24	M	A	+	+	+	NT	4.1	4.8	3.3
25	F	U	++	++	++	10 ⁻⁴	>17.5	>17.5	>17.5

*20 μ l of crude extract of sugi pollen (Hollister-Stier, 10⁻³), purified *Cry j* I or *Cry j* II (100 ng/ml) were injected intradermally.

A : Asthma, R : Rhinitis, U : Urticaria, C : Conjunctivitis, AD : Atopic dermatitis,

\$ M.D. : Minimum dose of sugi extract showing positive reaction.

Fig. 2. Purification procedure of *Cry j* I and *Cry j* II.



1977年から1991年にかけて、神奈川、福島、千葉、秋田および奈良県で採取したスギ花粉より粗抽出液を

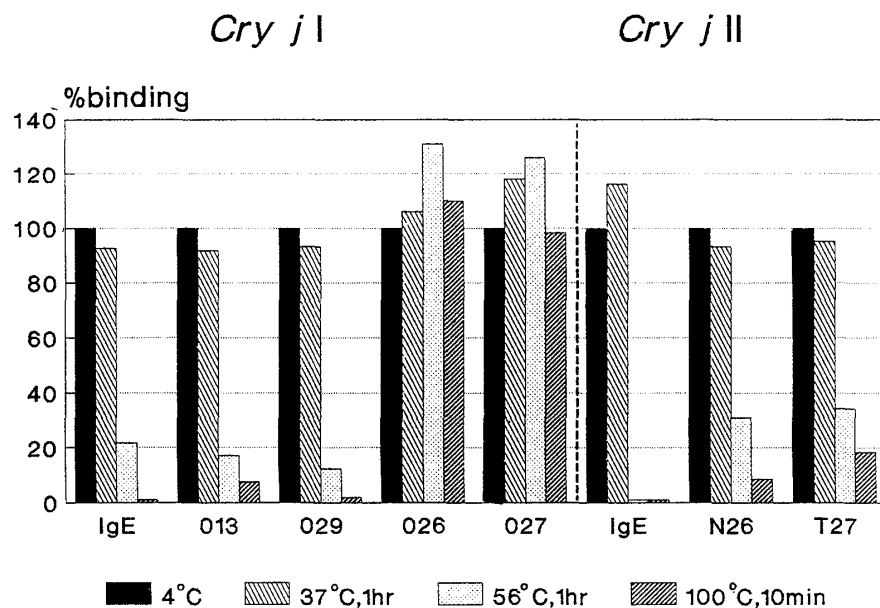


Fig. 4. Effect of heat-treatment of *Cry j* I or *Cry j* II on binding activities to monoclonal antibodies and human IgE antibodies.

Cry j I or *Cry j* II, 100 µg/ml, was incubated at 37°C, 56°C for 1 hour or 100°C for 10min. After cooling in an ice bath, the treated allergens and untreated allergens were diluted with PBS to 5 µg/ml, then microplate wells were coated with the allergens. Binding to mAbs and human IgE antibodies was tested.

調製し, *Cry j* I, *Cry j* II の含有量を ELISA で測定した. Fig. 3 に成績を示す. *Cry j* I は, 採取地, 採取年度にかかわらず, 花粉100g あたり35mg 前後とほぼ一定の値であったが, *Cry j* II は2.9mg から14mg と, 大きく変動した. 平均して, *Cry j* II は *Cry j* I の約20%であるが, 多いものでは約50%近くも含まれており, 無視できない量である.

IV. *Cry j* I, *Cry j* II の物理化学的性質: 熱, 酸, アルカリ, SDS 処理の *Cry j* I, *Cry j* II の抗原性への影響

抗 *Cry j* I mAbs は *Cry j* I への結合部位の違いにより, 4つのグループに分類されている⁴⁾ (Table 1). しかし, *Cry j* II に対する mAbs に関してはまだ検討されていない. そこで, *Cry j* II 分子上のエпитープ解析の準備として, 物理的, 化学的処理に対する *Cry j* II 上の抗原決定基安定性を *Cry j* I のそれと比較検討した.

a) 熱処理: 熱処理した *Cry j* I, *Cry j* II と各グループ mAbs およびスギ花粉症患者血清 IgE 抗体との結合を ELISA で検討した成績を Fig. 4 に示す. *Cry j* I の37°C, 1hr 処理は013, 029, 026, 027およびヒト IgE 抗体との結合にはほとんど変化が見られな

かった. しかし, 56°C 1時間処理するとヒト IgE, 013, 029との結合はそれぞれ22%, 17%, 12%にまで低下したが, 026, 027との結合性はむしろ上昇した. 100°C 10分の処理では *Cry j* I の013, 029, ヒト IgE への結合性はほとんど失われるが, 026, 027との結合性はまったく失われていない. すなわち013, 029およびヒト IgE 抗体の結合する部位は, 温度に依存して破壊されるが, 026, 027の認識するエпитープは破壊されることがない. また37°C, 1時間の処置をした *Cry j* II とヒト IgE, N26, T27との結合は, ほとんど変化しないが, 56°C 1時間の処理では0%, 31%, 34%, 100°C 10分の処理では0%, 9%, 18%と温度に応じて結合性を低下させた.

b) 酸, アルカリ処理: 酸, アルカリ処理した *Cry j* I, *Cry j* II と抗体との結合性を Fig. 5 に示す. pH 2~9での *Cry j* I 処理では013, 029, 026, 027およびヒト IgE との結合性にはほとんど変化は認められないが, pH 12での処理はこれらの抗体への結合性は全く失われ026, 027に対しても60%に低下した. 一方, *Cry j* II では pH 2~12での処理は N26, T27への結合性は失われることなく保持されているが, ヒト IgE 抗体との結合は pH 2処理で60%, pH 9で40%, pH 12

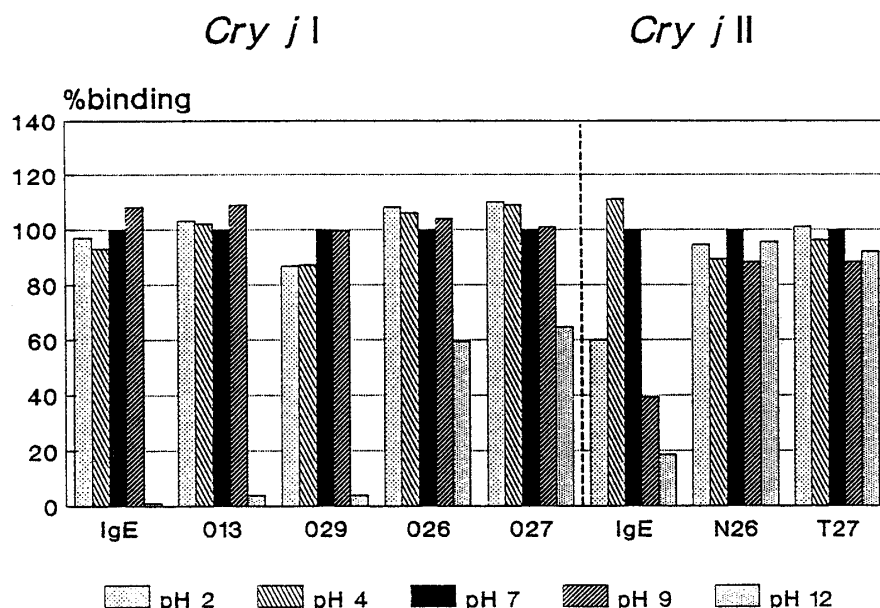


Fig. 5. Effect of acid- or alkali-treatment of *Cry j I* or *Cry j II* on binding activities against mAbs and human IgE antibodies.

Cry j I or *Cry j II*, 100 μ g/ml, was dialyzed overnight against buffers of various pH as indicated. After dialyzed against PBS (pH 7.2) overnight, binding activities of the treated allergens to mAbs and human IgE were examined.

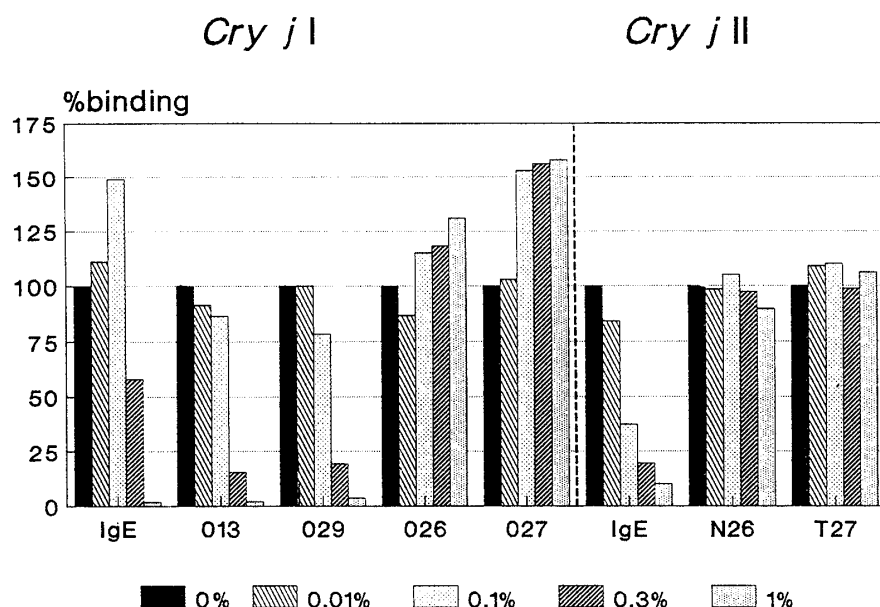


Fig. 6. Effect of SDS-treatment of *Cry j I* or *Cry j II* on binding to mAbs and human IgE antibodies.

Cry j I or *Cry j II*, 200 μ g/ml, was mixed with an equal volume of SDS solution of indicated concentration. After overnight incubation, each mixture was diluted to 5 μ g/ml with PBS, then microplate wells were coated with the allergens. Binding to mAbs and human IgE antibodies was tested.

で20%に低下した。

c) SDS 処理：SDS 処理 *Cry j I*, *Cry j II* の各種抗体との結合を Fig. 6 に示す。SDS 濃度に依存して結

合性の低下が認められたのは013, 029およびヒト IgE 抗体との結合であって、026, 027, N26, T27との結合は低下せず、026, 027への結合性は SDS 濃度に依存し

て上昇している。

以上の成績は、013, 029 (グループ 1, 2) および特異的ヒト IgE 抗体の大部分の結合する部位は、conformational な構造であろうこと、026, 027 (グループ 3, 4) の結合部位の構造は sequential なアミノ酸配列であろうことを示唆しており、河島らの報告⁴⁾⁵⁾と矛盾しない。また、*Cry j II* 上の抗原決定基は熱には弱い、pH, SDS 処理には耐性である。

考 察

今回のアレルギー患者での皮内反応の成績により、*Cry j II* が *Cry j I* とならんでスギ花粉の重要なアレルゲンのひとつであることが *in vivo* で確かめられた。含量的には *Cry j I* のほうがよりメジャーであり、*Cry j II* 含量は *Cry j I* 含量の 1/2 から 1/5 程度である。*Cry j I* 陽性率が *Cry j II* 陽性率を上回ったのはそのためと思われる。しかし、*Cry j II* の含量は無視できない量であり、また、*Cry j I* 同様、弱アルカリで極めて短時間のうちに花粉から溶出されてくる。鼻炎患者の鼻粘膜が弱アルカリになっている⁹⁾ことを考慮すると、*Cry j II* も花粉吸入直後の症状に深く関与していると思われる。アレルゲン含量が多くても、鼻粘膜の pH で容易に抽出されない場合は症状が出にくいことがブタクサの精製アレルゲンで報告されている⁹⁾⁻¹¹⁾。

なお、スギ花粉粗抽出液に対し皮内反応陽性を示すにもかかわらず、*Cry j I*, *Cry j II* 両者に陰性を示した例が 1 例 (症例 4) 観察された。スギ花粉には *Cry j I*, *Cry j II* 以外のマイナーなアレルゲンの存在することも示唆される。多くの市販アレルゲン物質の標準化の必要性が指摘され¹¹⁾、検討されているが、スギ花粉アレルゲンの標準品として、少なくとも *Cry j I*, *Cry j II* が一定量以上含まれる必要があると思われる。

スギ花粉抽出液中の *Cry j I* 含量は採集年度、採集地に関係なくほぼ一定であるのに対し、*Cry j II* 含量は変動が大きく、最大一桁の差がみられた。理由は不明である。多くのアレルゲンが、ある酵素活性をもつなど、その生理作用が徐々に解明されているが¹²⁾⁻¹⁴⁾ *Cry j I*, *Cry j II* についても花粉における生理的役割が明らかにされれば、*Cry j II* 含量の変動の要因がわかるかもしれない。なお、*Cry j I* にはペクテートリアーゼ活性があるが、*Cry j II* にはその活性がないこ

とが証明されている (谷口、未発表データ)。

種々の物理化学的処理を施して高次構造を変化させた *Cry j I*, *Cry j II* と、ヒト IgE 抗体および種々の mAbs との結合性を検討したが、*Cry j I* に関しては、河島ら⁴⁾⁵⁾の報告と一致した成績が得られ、グループ 1, 2 の mAbs およびヒト IgE 抗体は conformational なエピトープに結合すると推定された。グループ 3, 4 の mAbs に対する結合性はいずれの処置でもほぼ保持されており、026 は *Cry j I* の N 末端を含むペプチド断片と結合し、027 は、ペプチド NAGVLTCSLSK と反応するとの報告⁵⁾と矛盾しない。また、026, 027 との結合性が 56°C, 1hr 処理で上昇したことは、これらの mAbs の認識するエピトープは cryptooantigen であろうと推定した河島ら⁴⁾⁵⁾の報告を支持するものである。*Cry j II* に関しては、得られている mAb 数が少なく、しかも N26 と T27 の認識エピトープは一部重複している (未発表データ) 詳しい解析はまだなされていないが、今回の成績では、この二つの mAb の結合する部位は、56°C 1 時間の加熱で変性するが、酸、アルカリ処理には安定であるのでこれら 2 種の mAbs は sequential なエピトープを認識していると推定されるが、安定した結合には conformational な因子も必要であるとおもわれる。*Cry j II* のヒト IgE 抗体結合部位は conformational な構造をとっていると推定されるが、この結合は N26, T27 で有意に阻止される⁴⁾¹⁵⁾ことから、これらの mAbs の認識するエピトープを含む立体構造がヒト IgE 抗体の結合部位を構成していると推測される。安枝ら¹⁾は *Cry j I* の熱、酸アルカリに対する安定性を RAST-inhibition 法により調べ、これらの処理によりアレルゲン性が低下したことを報告している。また、谷合ら¹⁵⁾は、河島ら⁵⁾の報告した 027 の結合する *Cry j I* 由来ペプチド NAGVLTCSLSKR にさらに N 末側に 13 残基アミノ酸がつき、しかも I 型糖鎖のついたペプチドが、ヒト IgE 抗体と反応し、同じペプチドでも糖鎖を欠如すると反応しないことを見出した。*Cry j I*, *Cry j II* のエピトープの構造の解明は、理論的にも実際面からも重要な課題であり、スギ花粉症の感作の機序、発症機序の解明へ役立ち、治療法開発へとつながるであろう。

これまで、スギ花粉症の研究は *Cry j I* のみを対象に進められてきたが、今回の皮内反応において、*Cry j II* に陽性の例が患者の 75% にも及んだことは、多くの患者が *Cry j I* のみならず *Cry j II* にも感作されてい

ることを示している。今回、反応閾値の決定まで実施することはできなかったが、今後是非、行っていきたいと考えている。これら精製アレルゲンを用いたヒスタミン遊離試験、誘発試験なども今後の課題であろう。スギは日本にのみ分布する植物なので、スギ花粉症は日本に限定される疾患であるが、他のスギ科植物、ヒノキ科植物花粉との交差反応性も指摘されており¹⁵⁾¹⁶⁾、Cry j I、Cry j II の免疫化学的、物理化学的性質を調べることは、スギ花粉症のみならずこれと交差反応性を示す他の花粉に対するアレルギー疾患の研究にも役立つものである。今後 Cry j II の解析も進められるべきであり、有効な治療法開発への手がかりとなることと期待される。

本論文の一部は、第4回日本アレルギー学会春季臨床集会(1992年、横浜)において発表した。

文 献

- 1) 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.
- 2) Taniai, M., Ando, S., Usui, M., Kurimoto, M., Sakaguchi, M., et al.: N-terminal amino acid sequence of major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS Letters* 239, 329-332, 1988.
- 3) 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.
- 4) Kawashima, T., Taniai, M., Taniguchi, Y., Usui, M., Ando, S., et al.: Antigenic analyses of Sugi Basic Protein by monoclonal antibodies. I. Distribution and characterization of B cell epitopes of Cry j I molecules. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 98, 110-117, 1992.
- 5) Kawashima, T., Taniai, M., Usui, M., Ando, S., Kurimoto, M. and Matuhashi, T.: Antigenic analyses of Sugi Basic Protein by monoclonal antibodies. II. Detection of immunoreactive fragments in enzyme-cleaved Cry j I. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 98, 118-126, 1992.
- 6) Taniguchi, Y., Ikegami, H., Usui, M., Ando, S., Kurimoto, M., et al.: Biological and immunological properties of Sugi Basic Protein-pullulan conjugate. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89, 136-142, 1989.
- 7) 石崎 達: 気管支喘息患者における室内塵抗原液の皮内反応閾値の研究. *アレルギー*, 13, 183, 1964.
- 8) 佐分利保雄, 矢澤篤子, 佐藤洋子, 大浜悦子, 斉藤胤曠: 鼻汁によるスギ花粉の破裂. *日本公衛誌* 39, 341-346, 1992.
- 9) Marsh, D.G., Belin, L., Bruce, C.A., Lichtenstein, L.M. and Hussain, R.: Rapidly released allergens from short ragweed pollen. 1. Kinetics of release of known allergens in relation to biologic activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 206-216, 1981.
- 10) 安枝 浩: 抗原分析, “図説スギ花粉症”(信太隆夫, 清水章治編), 金原出版, 東京, pp.87-107, 1983.
- 11) 伊藤幸治: アレルゲンの標準化. *アレルギー* 41, 467-474, 1992.
- 12) Ino, Y., Ando, T., Haida, M., Nakamura, K. and Iwaki, M. et al: Characterization of protease in the crude mite extract. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89, 321-326, 1989.
- 13) Ando, T., Ino, Y., Haida, M., Honma, R. and Maeda, H. et al: Isolation of cysteine protease in the crude mite extract, *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 96, 199-205, 1991.
- 14) Chua, K.Y., Stewart, G.A., Thomas, W.R., Simpson, R.J., Dilworth, R.J. and Plozza, T.M. et al: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der p 1*. Homology with cysteine protease. *J. Exp. Med.* 167, 175-182, 1988.
- 15) Taniai, M., Kayano, T., Takakura, R., Yamamoto, S., Usui, M., et al.: Epitopes on Cry j I and Cry j II for the human IgE antibodies cross-reactive between *Cupressus sempervirens* and *Cryptomeria japonica* pollen. *Mol. Immunol.* 30, 183-189, 1993.
- 16) Panzani, R., Yasueda, H., Shimizu, T. and Shida, T.: Cross-reactivity between the pollens of *Cupressus sempervirens* (Common cypress) and of *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar). *Ann. Allergy* 57, 26-30, 1986.

IMMUNOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF *Cry j* II, THE SECOND MAJOR ALLERGEN OF JAPANESE CEDAR POLLEN (*CRYPTOMERIA JAPONICA*)

Manami Sawatani¹⁾, Hiroshi Yasueda²⁾, Kazuo Akiyama²⁾, Takao Shida²⁾, Yoshifumi Taniguchi¹⁾, Mitsuko Usui¹⁾, Shunsaku Ando¹⁾, Masashi Kurimoto¹⁾ and Tyoku Matuhashi³⁾

¹⁾*Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.*

²⁾*Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Sagamihara Hospital*

³⁾*Okinaka Memorial Institute for Medical Research*

Cry j II, the second major allergen of Japanese cedar (sugi, *Cryptomeria japonica*) pollen was examined for the allergenicity by intradermal test and RAST. Nineteen of the 25 allergic patients examined, showed positive reaction to the *Cry j* II. Contents of *Cry j* II in the extracts of the pollen collected in various regions from 1977 to 1991 showed yearly variation ranging from 2.9 to 14 mg/100 g pollen, whereas the amount of *Cry j* I in the extract was comparatively stable at about 35 mg/100 g pollen. Physicochemical treatments of *Cry j* I and *Cry j* II suggested that specific human IgE antibodies and some mAbs bind to conformational epitopes which are denatured and destroyed by certain treatments.
