

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Immunoblotting を用いた 喘息小児におけるヒノキ科ネズ花粉アレルギーの検討

岡山大学医学部小児科

堀内照美

喘息小児49例の血清を用いて、ヒノキ科ネズ花粉抽出液の抗原分析を **enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**, **immunoblotting** 法により行った。SDS-PAGE では **Coomassie brilliant blue R (CBB)** により染色されるバンドが3本認められた。ELISA により対象とした喘息小児49例中27例(55.1%)にネズ陽性がみられた。ELISA によるネズ陽性例では、**immunoblotting** により分子量約70 K dalton のバンドが認められた。このバンドは **lectin** 染色では **concanavalin A** により染色された。SDS-PAGE により得られたこの70K dalton のバンドを切り出し **electroelution** 法により精製したネズ抗原を得た。ネズの主要抗原は成分中最も多い糖蛋白質で、分子量約70K dalton と考えられた。sugi basic protein (SBP), 抗 SBP 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法ではネズ花粉抗原では反応は認められず、ネズ花粉抗原は SBP とは明らかな抗原交叉性がなく、新しい抗原と考えられた。

Key words: bronchial asthma — ELISA — immunoblotting — Japanese juniper (*Juniperus rigida*) — pollen allergy

緒言

花粉アレルギーは、地方により飛散花粉の種類、量、および時期が異なるため、症状発現時期も異なっている。アメリカでの花粉アレルギーの有病率は全人口の5~10%で、原因となる花粉は75%がブタクサ花粉、40%がイネ花粉、9%が樹木花粉とされている。日本では小泉の日光地方の調査では昭和52年の有病率は全人口の約5%、昭和56年の小学生を対象とした調査ではスギ花粉の皮内反応陽性率は27%、有病率は9.4%と

されている¹⁾。石崎らの日光今市地方の調査では有病率は9.6%とされている²⁾。近年小児アレルギー疾患においても花粉アレルギーの増加が報告され³⁾、花粉症が注目されている。我々は昭和63年から岡山県南において空中飛散スギ花粉の測定を行ってきたが、飛散花粉中にスギ以外のスギ科花粉及び岡山県南に特徴的な植生分布を示すヒノキ科のネズ花粉が含まれると考えられた⁴⁾。喘息小児を対象としてスクラッチテストを行い、ネズ (Japanese juniper, *Juniperus rigida*) ではスギに次ぐ高い陽性率が認められたことは既に報告した⁵⁾。そこで今回、喘息小児を対象に **enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**, **immunoblotting** 法を用いてネズ花粉の抗原分析を行いネズの花粉アレルギーを検討し、さらに sugi basic protein (SBP), マウス抗 SBP 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を行い、ネズ花粉抗原と SBP との抗原交叉性を検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

1990年5月から7月に岡山県南に位置する玉野市民病院小児科喘息外来を受診した喘息小児49例、男児34

Received: March 23, 1992

Accepted: June 16, 1992

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; CBB Coomassie brilliant blue R; Cry j *Cryptomeria japonica*; DAB 3,3'-diaminobenzidine; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; Ig immunoglobulin; PBS phosphate buffered saline; P-K Prausnitz-Küstner (reaction); RAST radioallergosorbent test; RIST radioimmunosorbent test; SBP sugi basic protein; SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TBS Tris buffered saline; TCA Trichloroacetic acid; TPBS Tween 20-phosphate buffered saline; TTBS Tween 20-Tris buffered saline

Table 1 Subjects

49 asthmatic children
34 male, 15 female
Age
6yrs 1mo~18yrs 1mo (mean 11yrs 5mo±2yrs 11mo)
Severity of asthma
mild 26 cases (53.1%), moderate 20 cases (40.8%), severe 3 cases (6.1%)
Accompanied with allergic rhinitis
73.5%
Accompanied with allergic conjunctivitis
26.5%
RIST
13~6990IU/ml (mean 1180±1379IU/ml)
RAST
positive rate of Japanese cedar 26.8%
positive rate of D.P 89.8%

例, 女児15例, 年齢6歳1カ月~18歳1カ月, 平均11歳5カ月±2歳11カ月児を対象とした。血清は使用まで-70℃で凍結保存した。なお, 小児アレルギー学会の基準⁹⁾に従った喘息の重症度は, 軽症26例(53.1%), 中等症20例(40.8%), 重症3例(6.1%)であった。花粉症症状については通年性を除き2月からアレルギー性鼻炎が認められるものが73.5%, 同様にアレルギー性結膜炎が認められるものが26.5%で, これらのうちアレルギー性鼻炎単独またはアレルギー性鼻炎とアレルギー性結膜炎の合併のみられるものを花粉症症状の認められる例として検討した。radio-immunosorbent test (RIST)は13~6990IU/ml, 平均1180±1379IU/mlで, radioallergo-sorbent test (RAST)ではスギ陽性率が26.8%, ヤケヒョウヒダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*)陽性率が89.8%であった (Table 1)。

2. 花粉抽出抗原

1990年3月の花粉飛散直前に岡山県南の森林, 公園の樹木から花粉を採集した。花粉5gに対しトルエン1ml, グリセリン50ml, phosphate buffered saline (PBS, pH 8) 100ml, 滅菌蒸留水を加え全量250mlとし, 4℃で3日間抽出を行った。濾過した後, 4℃で24/32インチの透析チューブにて100mlまで風乾濃縮を行った。0.45μm フィルター (Terumo) で除菌濾過した⁴⁾。調整したネズ抗原液中の蛋白質濃度は6.4mg/dlであった。

3. ELISA

マイクロプレート(96穴平底, Nunnc Immunoplate)

Microplate coating with antigen
↓ 4℃ overnight
Washing 3X with TTBS
Blocking with 0.1% BSA-PBS
↓ Room temperature 2hr
Washing 3X with TTBS
Serum (1:20)
↓ Room temperature 3hr, shaking
Washing 4X with TTBS
Anti-IgE-peroxidase (1:400)
↓ Room temperature 1hr, shaking
Washing 4X with TTBS
OPD
↓ Room temperature 1hr
Stopper (1N H₂SO₄)
ELISA reader (OD 492nm, Bio-Rad)

Fig. 1. Procedure for ELISA.

の各穴に coating buffer (0.05M 炭酸緩衝液, pH 9.6) で10倍希釈した抗原液を加え4℃で一夜静置した。0.1% Tween 20-Tris buffered saline (TTBS, pH 7.5) で3回洗浄した後, 0.1% bovine serum albumin-phosphate buffered saline (BSA-PBS) を加え2時間静置した。TTBSで3回洗浄後, 0.1% BSA-TTBSで20倍に希釈した血清を加え3時間振盪しながら反応させた。TTBSで4回洗浄後, TTBSで400倍希釈したbiotin 化 peroxidase 結合ヤギ抗ヒト IgE (Vector) を加え1時間振盪した。TTBSで6回洗浄後, biotin-avidin 液 (Vecta-stain ABC Kit, Vector) と30分反応させた。TTBSで4回洗浄後, Ortho phenylene diamine (OPD) により発色させ, ELISA reader (Bio-Rad) により492nmによる吸光度を測定した。ELISAの判定はアレルギー症状の現病歴, 既往歴, 3親等以内の家族歴のない10例を正常対照とし, 正常対照の吸光度の平均値+2SD以上を陽性とした (Fig. 1)。

4. SDS-PAGE

ネズ抗原液を2-mercaptoethanolを含むdigestive bufferに混ぜ, 1分間boiling処理した後, 10% gelを用いてLaemmliの方法⁷⁾に従って電気泳動を行った。分子量測定のため, 低分子域スタンダード (Bio-Rad, Amersham) を用いた。

5. ニトロセルロース膜への電氣的転写

Towbinらの方法⁷⁾を用いて200mA, 15分通電により, ゲルからニトロセルロース膜へ電氣的に転写した。

SDS-PAGE with 10% gel
↓
Transfer with 200mA constant current 15min
↓
Blocking with 3% BSA-TTBS
↓
Washing with TTBS
Serum (1:5)
↓ Room temperature 3hr, shaking
Anti-IgE-peroxidase (1:200)
↓ Room temperature 30min, shaking
Washing 3X with TTBS
DAB

Fig. 2. Procedure for immunoblotting.

6. immunoblotting

非特異的反応を防ぐため、転写後ニトロセルロース膜を3%BSA-0.1%TTBSで、室温で2時間反応させることによって blocking 処理した。TTBSで洗浄後TTBSで5倍あるいは10倍に希釈した患者血清と室温で攪拌しながら一夜反応させた。次に、TTBSで5000倍に希釈した biotin 化 peroxidase 結合ヤギ抗ヒト IgE と室温で30分反応させた後、TTBSで5000倍に希釈した biotin-avidin 液と室温で30分反応させた。基質液(8mg 3,3'-diaminobenzidín, 30 μ l 3% H_2O_2 , 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2)を加えて発色させた (Fig. 2)。

7. Coomassie brilliant blue R (CBB) 染色

ゲル染色は0.25%Coomassie brilliant blue R (CBB, Sigma) により蛋白質を染色した。

8. electroelution 法

CBBにより染色されたバンドを切断し8/32インチの透析チューブに入れ20mAで1時間泳動した。泳動後、20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で1時間透析した。透析チューブ内の溶液に20%trichloroacetic acid (TCA) 溶液を加え20分放置後、冷却しながら遠沈した。採取した沈渣に200 μ lのアセトンを加えて遠沈し、沈渣を収集した。

9. lectin 染色

転写後のニトロセルロース膜を3%BSA-0.1%TTBSにより blocking 処理した。TTBSで洗浄後7種類の biotin 化 lectin (concanavalin A, dolichos-agglutinin, peanut agglutinin, ricinus communis agglutinin I, soybean agglutinin, ulex enropaens agglutinin I, wheat germ agglutinin, vector) と1時間反応させた。biotin-avidin 液と30分反応させた後、基質液と反応させた。

Microplate coating with anti-SBP (1:500)
↓ Room temperature 2hr
Washing 3X with TTBS
1% BSA-PBS
↓ Room temperature 2hr
Washing 3X with TTBS
Antigen (SBP or extract from Japanese juniper)
↓ Room temperature 2hr
Washing 3X with TTBS
Anti-SBP-alkaline phosphatase (1:1000)
↓ Room temperature 2hr
Washing 3X with TTBS
alkaline buffer (0.05M $NaHCO_3$, pH9.8)
↓ Room temperature 30min
Stopper (0.1N NaOH)
ELISA reader (OD 405nm, Bio-Rad)

Fig. 3. Procedure of sandwich ELISA.

10. サンドイッチ ELISA

興和株式会社より提供されたマウス抗 SBP (Cry j I) 抗体, SBP 標準溶液, alkaline phosphatase 結合マウス抗 SBP 抗体を用いた。マイクロプレートの各穴に coating buffer (0.05M 炭酸緩衝液, pH 9.6) により500倍希釈した抗 SBP (Cry j I) 抗体を加え2時間静置した。TTBSで3回洗浄後、1% BSA-PBSを加え2時間静置した。TTBSで3回洗浄後、TTBSで希釈した SBP 標準溶液(4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625ng/ml)を加え2時間静置した。TTBSで3回洗浄後、TTBSで1000倍希釈した alkaline phosphatase 結合マウス抗 SBP 抗体を加え2時間静置した。TTBSで3回洗浄後、alkaline buffer (0.05M $NaHCO_3$, pH 9.8)を加え30分静置した。0.1N NaOHにより反応を停止させ ELISA reader (Bio-Rad) により405nmにおける吸光度を測定した (Fig. 3)。

結 果

1. 対象とした49例中27例(55.1%)で、ネズ ELISA 陽性が認められた。花粉症症状のみられた36例中24例(66.7%)で陽性が認められた。花粉症症状のみられなかった例では13例中3例(23.1%)で陽性が認められた (Table 2)。

2. ネズ花粉を SDS-PAGE により泳動しゲルの CBB 染色を行うことにより3本のバンドが認められた (Fig. 4)。

Table 2 Relationship between pollinosis and ELISA of Japanese juniper

		Pollinosis		
		(+)	(-)	Total
ELISA	(+)	24	3	27
	(-)	12	10	22
	Total	36	13	49

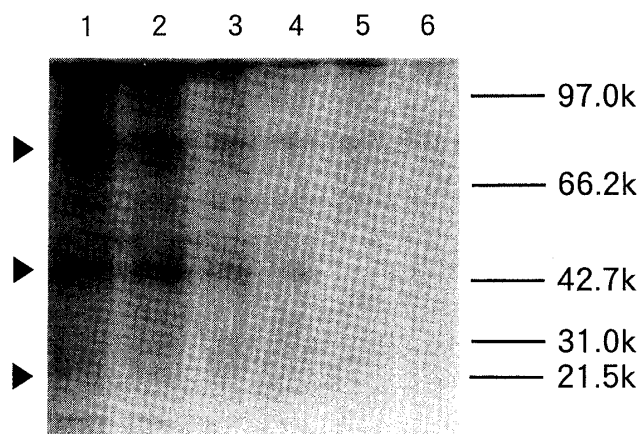


Fig. 4. SDS-PAGE stained CBB.

Pollen extract was loaded as follows; Lane 1 : 5.12 μ g, Lane 2 : 2.56 μ g, Lane 3 : 1.28 μ g, Lane 4 : 0.64 μ g, Lane 5 : 0.32 μ g, Lane 6 : 0.16 μ g

3. ELISA 陽性であった症例の血清を一次抗体とした immunoblotting により、分子量約70K dalton のバンドが検出された (Fig. 5). このバンドは lectin 染色で concanavalin A により染色された。

4. SBP, 抗 SBP 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法によりネズ抗原では反応は認められなかった。

5. electroelution 法により精製したネズ抗原を得た。得られた精製ネズ抗原は immunoblotting により分子量約70K dalton のバンドが検出され、精製されたネズ抗原であることを確認した。

考 察

著者らは昭和63年から岡山県南において空中飛散スギ花粉の測定を行ってきた。飛散花粉中にスギ以外のスギ科花粉及び岡山県南に特徴的な植生分布を示すヒノキ科のネズ花粉が含まれると考えられた⁴⁾。スギ科

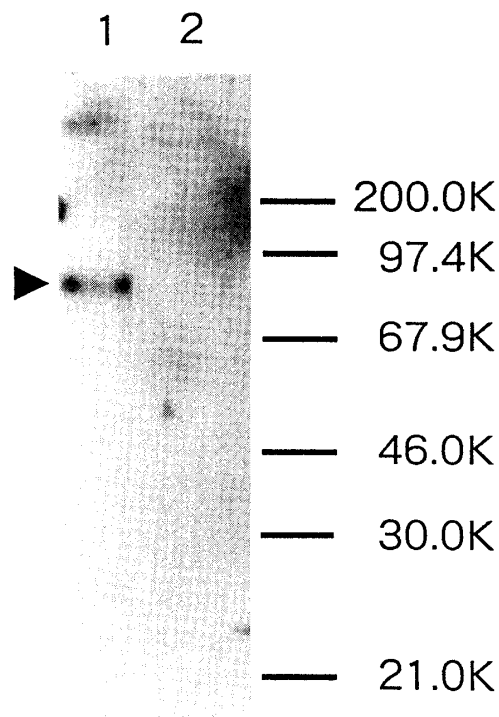


Fig. 5. Immunoblotting.

Lane 1 : pollen extract was stained with the serum of ELISA positive case. Lane 2 : pollen extract was stained with the serum of ELISA negative case.

のスギ、セコイヤ、メタセコイヤ、ヒノキ科のネズ花粉についてのスクラッチテストによる検討では、喘息小児160例を対象としたネズ陽性率は18.8%とスギ陽性率の25.0%に次ぐ高値がみられ、吸入抗原として重要な位置を占めるものと考えられ⁵⁾、今回ネズ花粉の抗原分析を行った。

今回の検討では、対象とした喘息小児の55.1%に ELISA によりネズ陽性がみられた。SDS-PAGE により3本のバンドがみられ、ELISA によるネズ陽性例の血清を一次抗体とした immunoblotting により特異的なバンドが検出された。ネズの主要アレルゲンは成分中最も多い糖蛋白質で、分子量約70K dalton と考えられた。

1983年安枝ら⁹⁾はスギ花粉の主要抗原を硫酸アンモニウム沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、SDS-PAGE により抽出し、分子量約40K dalton の糖蛋白質 (sugi basic protein, SBP) で分子量41~46K dalton の subfraction を持つと述べている。また谷合ら¹⁰⁾は精製した SBP は非還元状態で SDS-PAGE により5つの subfraction を持つ45~50K dalton のバンドと37K dalton のバンドの2本が認められると述べている。

また、阪口ら¹¹⁾は非還元状態で SDS-PAGE を行い、SBP は分子量45~50K dalton であり、スギ花粉の2番目に主要な抗原として分子量37K dalton の Cry j II を抽出し、ELISA inhibition により Cry j I と Cry j II は抗原性が異なると報告している。

1977年花粉学研究の立場から上野¹²⁾がネズ花粉症の可能性について述べ、1990年高橋ら¹³⁾が immunoblotting 法を用いて空中花粉粒子数を測定する際にスギ花粉、ヒノキ科のヒノキやコノテガシワ花粉では濃いスポットがみられたが、ヒノキ科のアスナロやネズ花粉ではスギに比べやや薄いスポットがみられたと報告している。ネズ花粉の抗原性についての検討は1991年に井手¹⁴⁾¹⁵⁾が抗 Cry j I 抗体(ウサギ)、抗 hinoki major allergen(HMA)抗体(ウサギ)、スギ花粉症患者血清、HRP-標識抗ウサギ IgG(ヤギ)、HRP-標識抗ヒト IgE(ヤギ)を用いた enhanced chemiluminescence 法を用いた immunodetection により行っている。この報告で井手は Cry j I, HMA が類似構造を有し、スギ科、ヒノキ科花粉にわたり広く共通抗原性をもつ蛋白が存在し、また、患者血清中の IgE 抗体と親和性をもった蛋白成分が存在すると述べている。今回の検討との差異は抗原抽出法の問題、また今回用いたマウス抗 Cry j I monoclonal 抗体と井手の用いたウサギ抗 Cry j I polyclonal 抗体の認識する部位の違いなどが考えられる。少なくとも SBP の主要な抗原部位とネズの主要な抗原部位とは抗原交叉性がないと考えられた。

ネズ以外のヒノキ科植物による花粉症は、1945年に Ordman¹⁶⁾により報告され、日本では1971年宮本ら¹⁷⁾が Prausnitz-Küstner (P-K) 反応中和試験によりスギ花粉とヒノキ科花粉の間に共通抗原性が存在することを最初に報告している。清水ら¹⁸⁾、井手ら¹⁹⁾²⁰⁾も P-K 反応中和試験、RAST inhibition 試験、抗ウサギ血清を用いたゲル内沈降反応を用いて検討し、スギ花粉、ヒノキ科花粉間に共通抗原性を証明し、major allergen はスギ花粉にありヒノキ科花粉は minor な点でスギ花粉と同一の抗原成分を一部共有していると述べている。また、谷合ら¹⁰⁾は SBP のアミノ酸配列の N 末端の5残基は Gross ら²¹⁾の報告した mountain cedar 花粉の抗原蛋白のアミノ酸配列の N 末端の5残基と同一であり、このためヒノキ花粉抗原は SBP と抗原交叉性がある可能性があるとして述べている。

著者らは既に報告したスクラッチテストの結果、ネズ花粉抗原と SBP とは抗原性が異なると考え、今回の検討を行った。今回著者の SBP、抗 SBP 抗体を用い

たサンドイッチ ELISA 法では、SBP 標準液を段階希釈したものとは非還元また還元状態のネズ花粉抗原液、またスクラッチテストで用いたスギ花粉抗原液とを比較した。スギ花粉抗原液では SBP 4.0ng/ml の値以上の反応が得られたが、ネズ抗原液では非還元、還元状態いずれにおいても感度以下の反応であった。また immunoblotting 法によりネズ花粉抗原は分子量約70 K dalton と考えられ、SBP (Cry j I) の分子量約40K dalton とは分子量が異なり、ネズ花粉抗原は SBP とは抗原交叉性がなく新しい抗原と考えられた。

岡山県南ではスギ花粉の飛散は2月中旬から3月末、ヒノキ花粉の飛散は3月末から4月末で、飛散ピークは4月初旬、ネズ花粉の飛散は4月初旬から4月末にかけて認められる⁴⁾。岡山県南でスギ花粉飛散終了後にみられる花粉アレルギー症状ではネズ花粉の関与にも注意する必要があると考えられた。

結 語

喘息小児を対象としてヒノキ科ネズ花粉のアレルギーを検討した。ネズ花粉抗原は SBP とは明らかな抗原交叉性はみられなかった。岡山県南にみられる花粉アレルギーでは、スギ花粉以外にもネズ花粉に注意する必要があると考えられた。

本論文の要旨は第41回日本アレルギー学会総会(於、京都)、第95回日本小児科学会学術集会(於、松山)において発表した。

稿を終えるに当たり御校閲を賜りました岡山大学医学部小児科学教室清野佳紀教授、ならびに小田 慈講師、直接御指導頂きました玉野市民病院小児科濃野 信医長、ならびに岡山大学医学部小児科学教室田中弘之先生、さらに貴重な御助言を頂きました国立予防衛生研究所石井 明部長に深謝致します。また、ネズ花粉抗原液を頂きました玉野市民病院薬剤部岡 鐵雄部長、マウス抗 SBP (Cry j I) 抗原、SBP 標準溶液、alkaline phosphatase 結合マウス抗 SBP 抗体を提供して頂きました興和株式会社名古屋隆夫先生に深謝致します。

文 献

- 1) 小泉一弘：重要花粉の各科領域における問題点—内科から。アレルギー 30, 449, 1981.
- 2) Ishizaki, T., Koizumi, K., Ikeda, Y. and Kushibiki, E. : Study of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann. Allergy* 58, 265-270, 1987.
- 3) 高木 学：小児期におけるスギ花粉感作の研究。アレルギー 37, 1065-1071, 1988.
- 4) 三好教夫, 岡 鐵雄, 堀部 徹：ネズによる花粉症について。日本花粉学会誌 36, 137-142, 1990.
- 5) Horiuti, T.M., Nouno, S. and Seino, Y. : Skin tests of pollen grains of Taxodiaceae and Cupressaceae in children with bronchial asthma. *Acta Paediatr Jpn* (To be published).
- 6) 小児アレルギー研究会, 小児気管支喘息重症度・治療判定基準再検討委員会：小児気管支喘息の発作の程度・重症度予後判定基準。日小ア誌 2, 69-72, 1988.
- 7) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- 8) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4350-4354, 1979.
- 9) Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T., Shida, T. : Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria Japonica*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 77-86, 1983.
- 10) Taniai, M., Ando, S., Usui, M., Kurimoto, M., Sakaguchi, M., Inouye, S. and Matsuhashi, T. : N-Terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS Letters* 239, 329-332, 1988.
- 11) 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.
- 12) 上野実朗：第26回日本アレルギー学会総会記録を読んで。ネズ花粉症の予想。日本花粉学会誌 20, 41-44, 1977.
- 13) 高橋裕一, 井上 栄, 阪口雅弘, 片桐 進：イムノブロット法による空中スギ, イネ科植物花粉アレルギー粒子数の測定。アレルギー 39, 1612-1620, 1990.
- 14) 井手 武：スギ, ヒノキ花粉の抗原分析とスギ科, ヒノキ科花粉の共通抗原性。日本耳鼻科学会誌 29, 311-312, 1991.
- 15) 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.
- 16) Ordman, D. : Cypress pollinosis in South Africa—A study of seasonal hay-fever and allergic conjunctivitis occurring in the winter-spring period. *S. A. Med. J.* 19, 142-146, 1945.
- 17) 宮本昭正, 降矢和夫, 水野勝之：花粉間の共通抗原に関する研究。アレルギー 20, 39-46, 1971.
- 18) 清水章治, 信太隆夫：スギ花粉症におけるヒノキ科花粉の意義。アレルギー 26, 318-319, 1977.
- 19) 井手 武, 芦田恒雄, 田端司郎, 鳥居健三：ヒノキ花粉の抗原性に関する研究—スギ花粉との共通抗原性について—。アレルギー 30, 784, 1981.
- 20) 井手 武, 芦田恒雄, 田端司郎, 鳥居健三：ヒノキ花粉の抗原性に関する研究 I—ヒノキ花粉抗原の分析。アレルギー 32, 596, 1983.
- 21) Gross, G.N., Zimburean, J.M. and Capra, J.D. : Isolation and partial characterization of the allergen in mountain cedar pollen. *Scand. J. Immunol.* 8, 437-441, 1978.

EVALUATION OF ALLERGENICITY OF THE EXTRACT OF JAPANESE JUNIPER POLLEN
REACTING TO SERA FROM ASTHMATIC CHILDREN

—By the Methods of Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Immunoblotting—

Terumi Midoro-Horiuti

Department of Pediatrics, Okayama University Medical School

We investigated the allergenicity of pollen extract of Japanese juniper (*Juniperus rigida*, Cupressaceae family) to sera of 49 asthmatic children by the methods of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. Three bands stained with Coomassie Brilliant Blue R were detected on SDS-PAGE. Sera from 27 (55.1%) out of the 49 children showed positive reaction to the pollen extract in ELISA. The same sera from the 27 children were used as the first antibody in immunoblotting, which confirmed the presence of a band of protein with 70 K dalton molecular weight (M.W) common to the all sera. This band was bound with concanavalin A in lectins. We successfully purified the antigenic substance of Japanese juniper pollen from this band by the electroelution method.

The major allergen of Japanese juniper pollen is glycoprotein with 70 K M.W. On sandwich-ELISA, there was no reaction of Sugi Basic Protein (SBP) and anti-SBP to Japanese juniper is an allergen that has no cross-reactivity with SBP.
