

(原著論文)

スギ花粉アレルゲン (Cry j 1, Cry j 2) の共通抗原性

中村 澄夫^{1*)}・曾屋 貴男²⁾・川上 理愛²⁾・大越 匠²⁾・中村 紀雄²⁾¹⁾ 神奈川歯科大学生物学教室 〒238-8580 横須賀市稲岡町 82²⁾ 横浜市立大学大学院総合科学研究科 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2

(2009年10月14日 受付, 2009年12月22日 受理)

Cross-allergenicity of the allergens Cry j 1 and Cry j 2
from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollenSumio NAKAMURA¹⁾, Takao SOYA²⁾, Rie KAWAKAMI²⁾, Takumi OHKOSHI²⁾
and Norio NAKAMURA²⁾¹⁾ Biological Laboratory, Kanagawa Dental College, 82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan²⁾ Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University,
22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0027, Japan

Patients with pollinosis caused by Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen often have additional allergy to the pollen of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). This phenomenon is due to cross-allergenicity between Cry j 1, the allergen from *C. japonica* pollen, and Cha o 1, the allergen of *C. obtusa* pollen. In this study we have surveyed pollen of various species for signs of cross-allergenicity with the allergens Cry j 1 and Cry j 2 from *C. japonica*. Mature pollen grains from a range of woody dicotyledonous species were examined by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using the anti-monoclonal antibody (anti-mAb) 013 against the allergen Cry j 1, and anti-mAb T27 against the allergen Cry j 2. Anti-mAb 013 reacted with *Morus bombycis* pollen twice as strongly as with *C. obtusa* pollen; it also reacted weakly with pollen from *Sambucus sieboldiana*, *Betula platyphylla*, *Mallotus japonicus* and *Myrica rubra*. However, Anti-mAb T27 only reacted with *B. platyphylla* pollen.

Moreover, immunocytochemical localization of Cry j 1- and Cry j 2-like proteins was examined in the pollen of these species, and showed cross-reactivity in ELISA. Anti-mAb 013 showed marked reactivity with the orbicules, exine, cytosol, and starch granules in the pollen of *C. obtusa* and *B. platyphylla* but only weak reactivity with the pollen of the other species. Anti-mAb T27 only reacted with the pollen of *B. platyphylla* and *C. obtusa*. These results suggest that as well as *C. obtusa* pollen, *B. platyphylla* pollen may have cross-allergenicity with *C. japonica* pollen.

Key Words: *Betula platyphylla*, *Chamaecyparis obtusa*, cross-allergenicity, *Cryptomeria japonica*, Japanese cedar pollinosis

緒 言

ある種の花粉症患者が他種の花粉によりアレルギー症状を呈することが知られている。これは、患者血清に含まれるある種の花粉の抗原を認識する抗体が、他種の花粉など、他の抗原を同様に認識することが原

※ E-mail: nakasumi@kdcnet.ac.jp

因であると考えられている。この現象は共通抗原性と呼ばれており、類似性の高いアミノ酸配列を持つ蛋白質が、異なる種の花粉や食物に共通して存在していることを示唆している。ヨーロッパ、北海道などでみられるシラカバ（カバノキ科）花粉症では、Bet v 1, Bet v 2 等のアレルゲンが同定されているが⁽¹⁾、これら

のアレルゲンはブナ目の花粉やリンゴ、モモ、キウイ果実等と共通抗原性を示すことが報告されている^(2,3)。一方、日本で最も罹患率が高く、国民の関心の高いスギ花粉症に関しては、その主なアレルゲンとして Cry j 1 と Cry j 2 が報告されている^(4,5)。しかし、スギ花粉症に関しては、Cry j 1 とヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 との共通抗原性が指摘されているものの⁽⁶⁾、その他の花粉や食品との共通抗原性については明らかにされていない。Cry j 1 は広く植物に存在するペクチンターリアーゼであり⁽⁷⁾、花粉粒外壁とオービクルに存在することが明らかにされている⁽⁸⁾。また、Cry j 2 はポリガラクトロナーゼであり、Cry j 1 同様、ペクチンの分解に関与することが知られており⁽⁹⁾、デンプン粒に局在することが明らかにされている⁽¹⁰⁾。ペクチンは花粉の一般的成分であり、その分解酵素も花粉に存在すると考えられる。そしてその中には Cry j 1 や Cry j 2 と共通抗原性を示すものがあることが考えられる。

この研究ではスギ花粉アレルゲン Cry j 1 と Cry j 2 に注目し、これらに対するモノクローナル抗体と種々の花粉の反応を ELISA（酵素免疫定量法）と免疫電子顕微鏡法により調べ、スギ花粉アレルゲンとスギ以外の花粉との共通抗原性の可能性を検討した。

材料と方法

1. 材 料

Table 1 に示した 29 種類の植物から、花粉または未開の葯を採取した。葯は室温または 30℃ で開葯させ、花粉の大きさに応じた篩（網目 0.1~0.35mm）を通して花粉のみを集めた。花粉はシリカゲルと共に容器に入れ使用まで -20℃ で冷凍保存した。

2. 蛋白質の抽出と定量

試料からの蛋白質の抽出は以下のように行った。花粉 0.1g に pH 7.4 の 10mM HEPES 緩衝液を加えて、5 分間震盪し、遠心分離（4000rpm, 4℃, 5 分間）して得た上清を花粉浸出液とした。さらに、沈澱に再度緩衝液を加えてポッター型ホモジナイザー管で磨砕した後、遠心分離（10000rpm, 4℃, 10 分間）して得た上清を花粉抽出液とした。

浸出液と抽出液の蛋白質量の測定は、Bio-Rad 社の Protein Assay Kit のプロトコールに従って行った。

3. ELISA 法

マイクロタイタープレート（Nunc 製）に生理食塩水含有リン酸緩衝液（PBS）で 10μg/ml となるよう希釈した抗 Cry j 1 モノクローナル抗体（013）または抗

Table 1. Cross-reactivity of different pollen against allergens from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen by ELISA.

The relative activities of pollen exudates and extracts from different species of pollen against those from *C. japonica* were examined. mAb: monoclonal antibody. The values are means and standard errors for three experiments.

Pollen	Antibody against Japanese cedar pollen		
	Cry j 1 mAb	Cry j 2 mAb	
	Activity (%Control)		
	Exudate	Extract	Extract
<i>Cryptomeria japonica</i>	100 ± 0	100 ± 8	100 ± 20
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	20 ± 7	22 ± 4	5 ± 1
<i>Ginkgo biloba</i>	10 ± 1	0	0
<i>Podocarpus macrophyllus</i>	1 ± 1		
<i>Cedrus deodara</i>	0		
<i>Pinus thunbergii</i>	2 ± 1		
<i>Pinus densiflora</i>	3 ± 0	4 ± 5	9 ± 7
<i>Morus bombycis</i>	42 ± 1	6 ± 4	1 ± 1
<i>Hydrangea macrophylla</i>	4 ± 2		
<i>Sambucus sieboldiana</i>	10 ± 2	2 ± 4	2 ± 3
<i>Quercus glauca</i>	3 ± 0	0	0
<i>Quercus acutissima</i>	7 ± 0	5 ± 6	0
<i>Quercus serrata</i>	5 ± 5		
<i>Betula platyphylla</i>	1 ± 0	13 ± 6	19 ± 7
<i>Castanopsis cuspidata</i>	2 ± 0	0	0
<i>Mallotus japonicus</i>	12 ± 1	7 ± 4	1 ± 1
<i>Myrica rubra</i>	9 ± 1	1 ± 0	1 ± 1
<i>Prunus</i> × <i>yedoensis</i>	4 ± 0	5 ± 1	0
<i>Camellia japonica</i>	1 ± 1	0	0
<i>Brassica napus</i>	1 ± 0		
<i>Rumex japonicus</i>	5 ± 1		
<i>Rumex acetosa</i>	0		
<i>Erigeron philadelphicus</i>	3 ± 0		
<i>Ambrosia trifida</i>	2 ± 0	0	0
<i>Plantago lanceolata</i>	1 ± 1		
<i>Lolium multiflorum</i>	2 ± 1	0	0
<i>Lolium perenne</i>	2 ± 2		
<i>Dactylis glomerata</i>	0		
<i>Trachycarpus fortunei</i>	1 ± 0	0	0

Cry j 2 モノクローナル抗体（T27）を 100μl ずつ加え、室温で 2.5 時間静置した。抗体液を除去し、ブロッキングするため 1.5% 牛血清アルブミン（BSA）-PBS 溶液を 250μl ずつ加えて 4℃ で一晩静置した。ブロッキング溶液を除去し、PBS で 250μg/ml に希釈したコントロールおよび試料液をそれぞれ 100μl ずつ加え、室温で 1.5 時間静置した。試料液を除去し、洗浄液（0.5% Tween20-PBS）で 3 回洗った後、0.1% BSA-

PBS で 1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ結合抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 (053) またはペルオキシダーゼ結合抗 Cry j 2 ポリクローナル抗体を 100 μ l ずつ加えて室温で 2 時間静置した。洗浄後、pH 5.0 の基質溶液 (0.1M Na₂HPO₄-クエン酸緩衝液 10ml, o-フェニレンジアミン 5mg, 30% H₂O₂ 10 μ l) を 100 μ l ずつ加えた。反応 5 分後に 2N H₂SO₄ を 100 μ l ずつ加えて反応を止め、マイクロプレートリーダーで吸光度 (492nm) を測定した。

4. 免疫電子顕微鏡観察

未吸水の成熟花粉は 3% グルタルアルデヒド-0.05M カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) に、また 0.3M ショ糖液で 5 分吸水させた花粉は 4% パラホルムアルデヒド-0.5% グルタルアルデヒド-0.05M カコジル酸緩衝液に浸し、マイクロウェーブ処理をした後、4℃で一晩振盪して前固定を行った。固定液を取り除き、カコジル酸緩衝液で 3 回洗った後、0.1% オスミウム酸-0.05% カコジル酸緩衝液を加え、室温で 2 時間静置して後固定した。その後エタノール上昇系列で脱水を行い、Spurr 法⁽¹¹⁾ に従いエポキシ樹脂に試料を包埋した。

超薄切片の免疫染色は室温で以下のように行った。pH 7.6 の TBS 液 (50mM トリス緩衝液, 150mM NaCl,) で 30 倍に希釈した正常ヤギ血清に切片を 10 分間浸した。次に切片を TBS で 50 倍に希釈した抗 Cry j 1 抗体 (013) または抗 Cry j 2 抗体 (T27) 液に浸し、2 時間反応させた。反応後、切片を洗浄し、TBS で 20 倍に希釈した金コロイド標識ヤギ抗マウス IgG 抗体液 (British Biocell International 社) と 1 時間反応させた。反応後、切片を洗浄液で洗い、次に蒸留水で洗った。乾燥後、切片を酢酸ウラン水溶液に 10 分間浸した後、蒸留水で洗浄した。その後、硝酸鉛水溶液に 5 分間浸した後、蒸留水で洗浄し、乾燥させた。

観察は JEM200CX または JEM1200EX 透過型電子顕微鏡 (日本電子) を用いて、加速電圧 80kV で行った。

5. 試 薬

抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 (013), 抗 Cry j 2 モノクローナル抗体 (T27), ペルオキシダーゼ結合 Cry j 1 モノクローナル抗体 (053), ペルオキシダーゼ結合 Cry j 2 ポリクローナル抗体は林原生物化学研究所製を用いた。

結 果

スギ (*Cryptomeria japonica*) 花粉アレルゲンである Cry j 1 と Cry j 2 と共通抗原性示す蛋白質がスギ以外

の花粉に存在するかどうかを多くの花粉を用いて検討した。またこれら蛋白質は、花粉が吸水すると直ちに液中に浸出し易いものと浸出しにくいものが存在すると考え、花粉浸出液と花粉を破碎した抽出液とに分画して ELISA 反応を調べた (Table 1)。

抗 Cry j 1 モノクローナル抗体の反応はどの花粉においても大変低かったが、ヤマグワ (*Morus bombycis*) 浸出液は共通抗原性が知られているヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) よりも高い値を示した。イチヨウ (*Ginkgo biloba*), ニワトコ (*Sambucus sieboldiana*), アカメガシワ (*Mallotus japonicus*), ヤマモモ (*Myrica rubra*) 浸出液はスギの反応の 10% 程度の値を示した。また、これらは抽出液よりも浸出液が高い反応を示したが、シラカバ (*Betula platyphylla*) は浸出液に反応がみられず、抽出液が高い反応を示した。

抗 Cry j 2 抗体の反応については抽出液についてのみ調べた。ほとんどの花粉において反応がみられなかったが、シラカバだけが 20% 程度の反応を示した。

ELISA 反応においてスギの反応値の 10% 以上の値を示した花粉について、抗 Cry j 1 と抗 Cry j 2 モノクローナル抗体を用いて免疫電子顕微鏡観察を行った (Fig. 1-3)。Cry j 1 抗体の反応においては、ヒノキとシラカバに強い反応がみられた (Fig. 1)。ヒノキではオービクル、外壁、デンプン粒に多くの金コロイド粒子のラベルがみられ、シラカバでも外壁とデンプン粒にラベルがみられた (Fig. 1)。イチヨウ、ニワトコ、ヤマグワ、アカメガシワ、ヤマモモは花粉壁や細胞質に僅かなラベルがみられたが、ELISA 反応がみられなかったシュロ (*Trachycarpus fortunei*) とラベルの程度は同様であった (Fig. 2)。

Cry j 2 抗体の反応はヒノキとシラカバについて調べた (Fig. 3)。ヒノキの ELISA 反応は非常に低かったが、オービクルと外壁 (セキシンとネキシン) にラベルがみられた。シラカバでは、外壁とデンプン粒にラベルがみられた。

考 察

スギ花粉症患者の血清は、スギ花粉の主要アレルゲンである Cry j 1 と Cry j 2 の両方またはどちらか一方に反応することが報告されている⁽¹²⁾。Cry j 1 と Cry j 2 はアミノ酸配列が異なる蛋白質であるから、スギ花粉症患者の血清中には Cry j 1 と Cry j 2 をそれぞれ認識する抗体が存在すると考えられる。そこで、モノクローナル Cry j 1 抗体を用いて Cry j 1 との共通抗原性を調べた。今回用いたモノクローナル抗体 013 は、スギ花粉症患者血清が Cry j 1 を認識するエピトープ

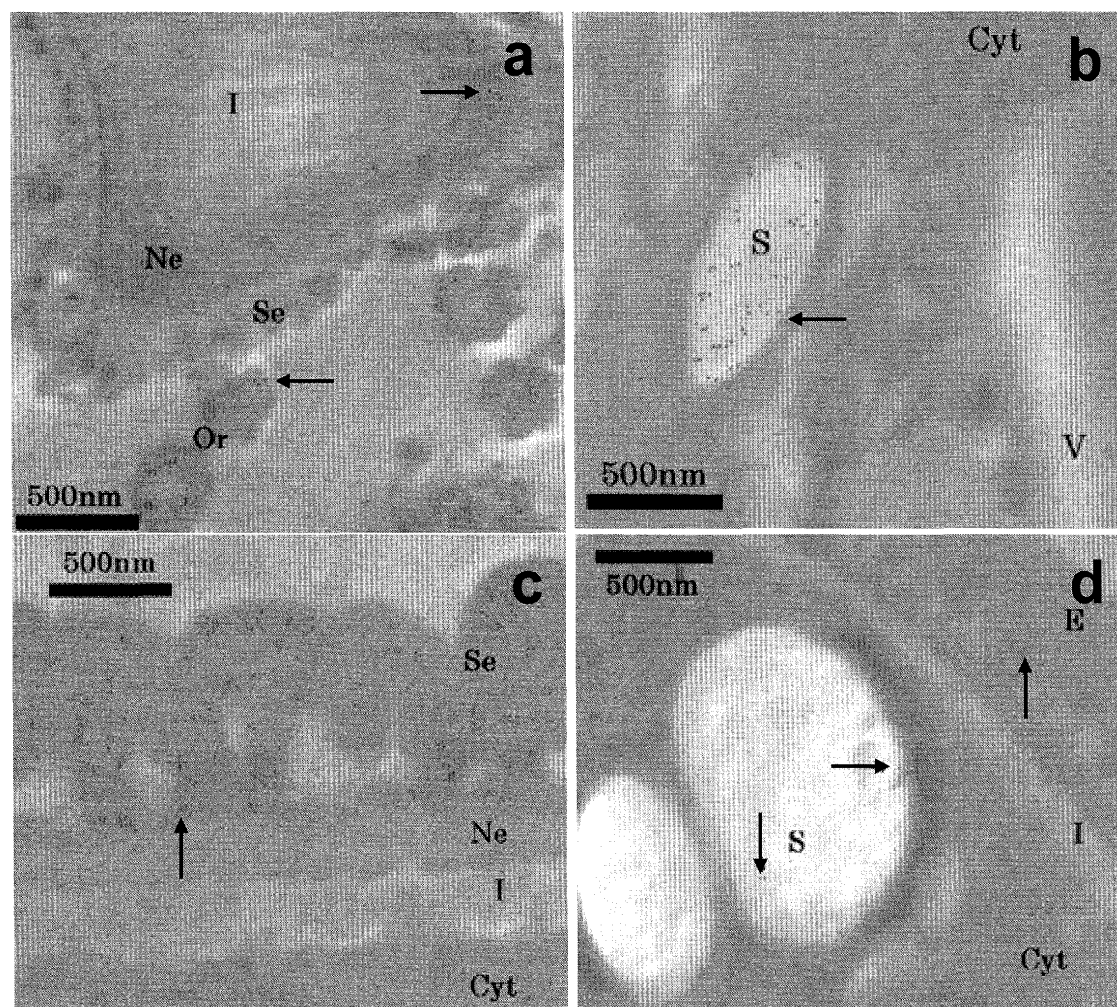


Fig. 1. Immunolocalization of Cry j 1-like proteins in *Chamaecyparis obtusa* and *Betula platyphylla* pollen grains.

The reactivities of Cry j 1 antibody with the cytosol (cyt), starch granule (s) and cell wall (exine: E and intine: I) of *Chamaecyparis obtusa* (a, b) and *Betula platyphylla* (c, d) pollen grains were examined. Ne: nexine, Se: sexine, O: orbicle, V: vacuole.

のうち1つのエピトープを認識することが報告されている⁽¹³⁾。したがって、調べた花粉において、これら抗体に対する強い反応がみられれば、ヒノキ花粉の場合と同様に、スギ花粉症患者がそれら花粉によりアレルギー症状が引き起こされる可能性があると考えられる。

今回調べた裸子植物の花粉はスギと同じく風媒花粉であり、スギ花粉の飛散時期とほぼ同時期に大量に飛散させることが知られ、ヒノキ、イチョウ、ヒマラヤスギ、クロマツ、アカマツ花粉についてはそれぞれ花粉アレルギーを引き起こす報告がある^(14, 15)。Table 1に示したように、ヒノキ以外は抗体との反応も非常に弱かった。したがって、ヒノキ以外の今回調べた花粉により、スギ花粉症患者がCry j 1との共通抗原性によるアレルギー症状を引き起こす可能性は非常に低いと考えられる。

被子植物の花粉については、職業性花粉症のことを考えて風媒花粉に限ることなく、既に花粉アレルギーの報告のある花粉⁽¹⁴⁾を主に、多量に得られる花粉を採取した。その結果は花粉症の報告がある植物のほとんどが、浸出液と抽出液の結果ともに高い値は示さなかった。一方、花粉症の報告がないヤマグワはヒノキの反応よりも高い値を示した。ニワトコ、アカメガシワ、ヤマモモにも弱い反応がみられ、他の花粉ではほとんど反応がみられなかった。またシラカバは、浸出液ではなく、抽出液にモノクローナル抗体との反応がみられ、Cry j 2モノクローナル抗体との反応も抽出液にみられた。そこでさらにヒノキとこれらELISA反応のみられた花粉について、Cry j 1またはCry j 2様蛋白質が花粉内に存在するかどうか、また細胞内にどのように分布しているのかを免疫電子顕微鏡法により調べた。

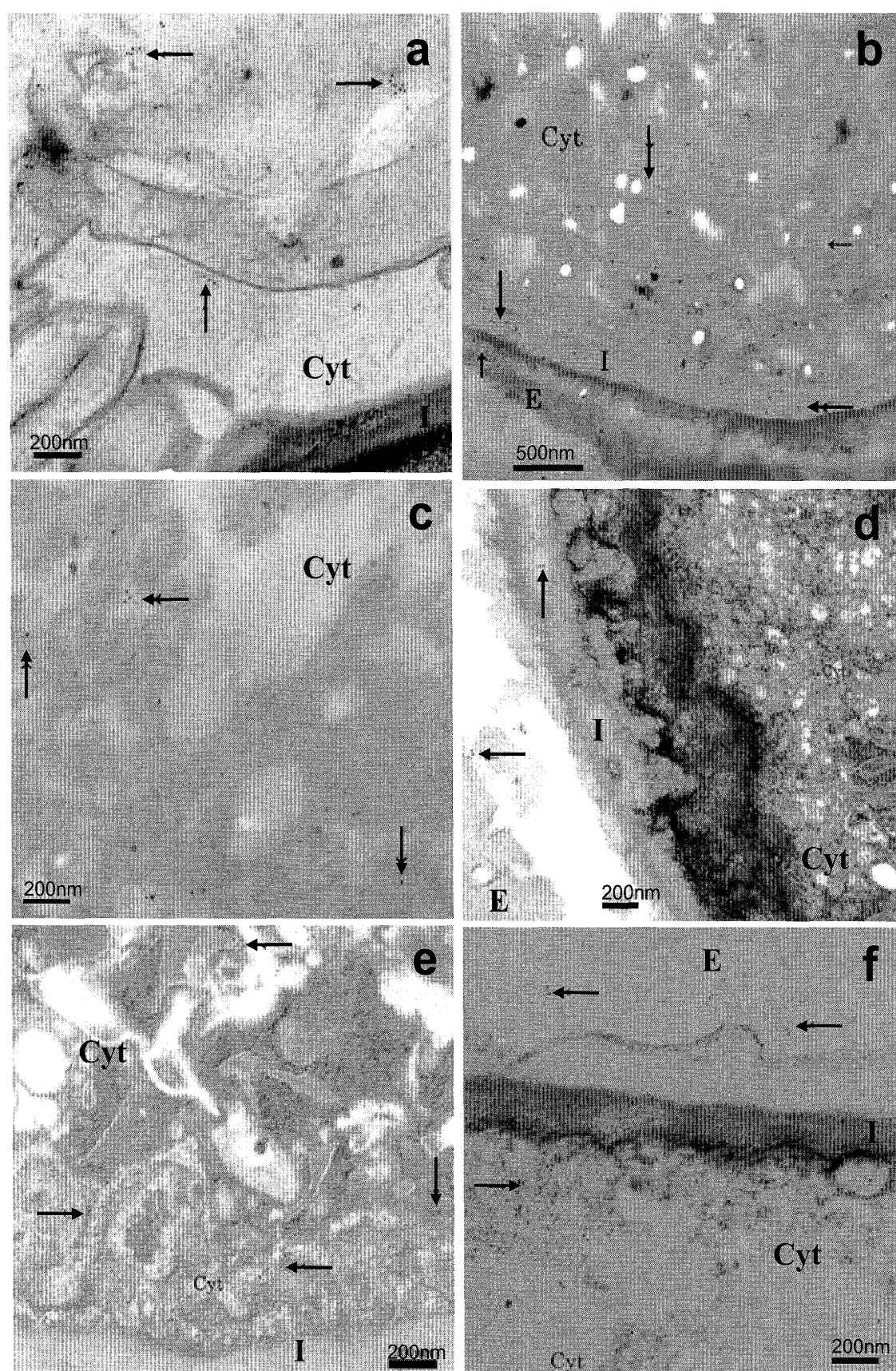


Fig. 2. Immunolocalization of Cry j 1-like proteins in different pollen grains.

The reactivities of Cry j 1 antibody with the pollen grains of *Ginkgo biloba* (a), *Sambucus sieboldiana* (b), *Morus bombycis* (c), *Mallotus japonicus* (d), *Myrica rubra* (e) and *Trachycarpus fortunei* (f) were examined.

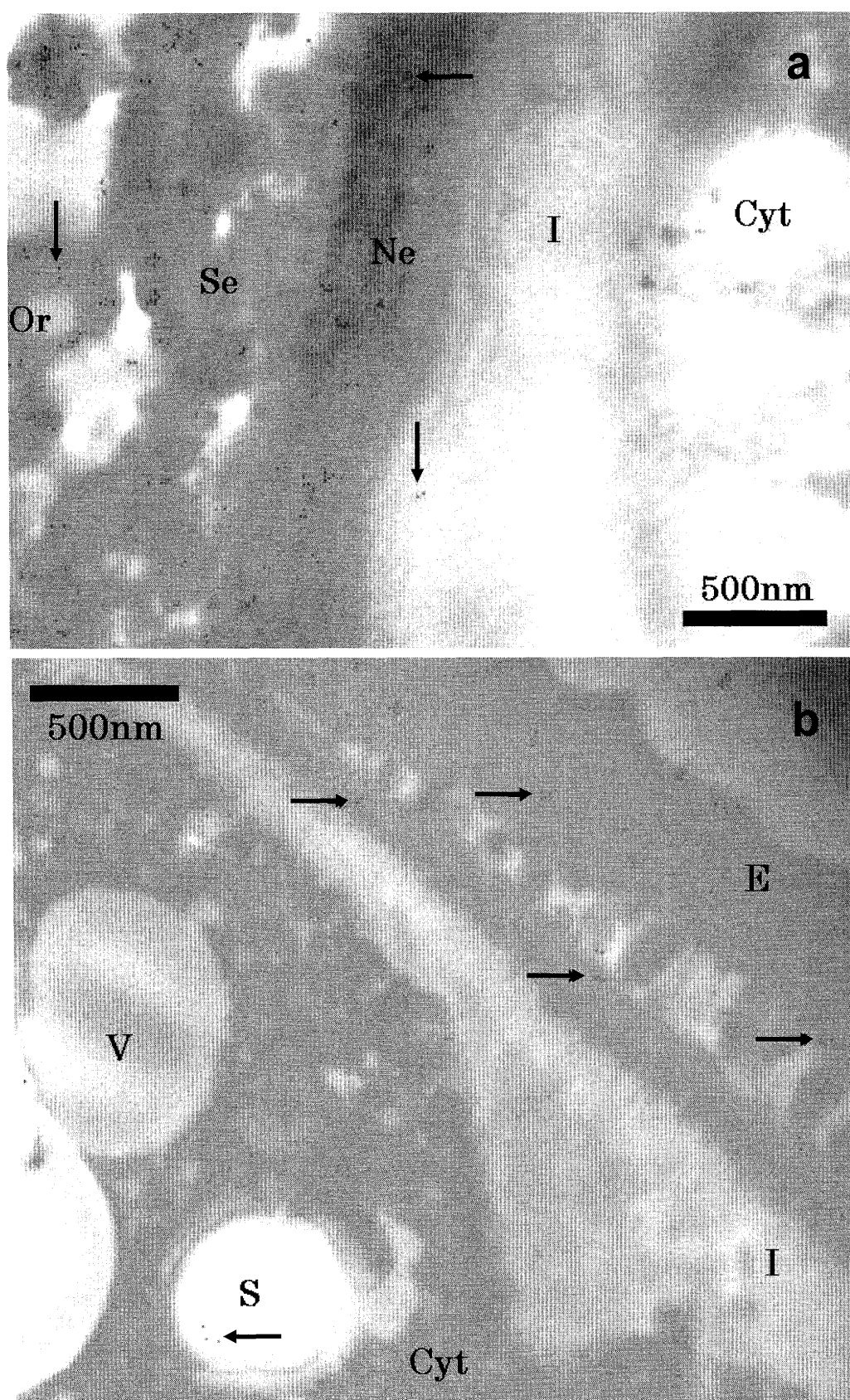


Fig. 3. Immunolocalization of Cry j 2-like proteins in *Chamaecyparis obtusa* and *Betula platyphylla* pollen grains.

The reactivities of Cry j 2 antibody with the pollen grains of *C. obtusa* (a) and *B. platyphylla* (b), which were hydrated for 5min, were studied.

スギでは, Cry j 1 は成熟花粉の外壁, オービクル, ゴルジ体, 粗面小胞体付近に分布し, 内壁やデンプン粒内部には存在しないことが⁽⁸⁾, また Cry j 2 は成熟花粉のデンプン粒にのみ分布することが示めされている⁽¹⁰⁾. 今回吸水させたヒノキ花粉を固定して観察したところ, Cry j 1 様蛋白質がオービクル, 外壁, そしてデンプン粒にも存在し, Cry j 2 様蛋白質はオービクルと外壁に分布していた. これらの結果から, スギ花粉のデンプン粒にも Cry j 1 が検出されるかも知れないこと, ヒノキ花粉では花粉が吸水すれば両蛋白質は直ちに放出され易いことが考えられる. ELISA で最も強い反応がみられたヤマグワでは, Cry j 1 様蛋白質が細胞質に僅かに検出されたにすぎない. これは花粉を吸水させて固定して観察したため, その過程で蛋白質が細胞外へ浸出したためとも考えられる. 今後, 花粉試料の固定法の工夫を行い, ヤマグワに Cry j 1 様蛋白質が存在するかどうかを検討する必要がある.

吸水シラカバ花粉を用いた電顕観察では, Cry j 1 様, Cry j 2 様蛋白質はともに外壁とデンプン粒に分布していた. 外壁に存在することから, 両蛋白質は吸水後直ちに放出されると推測されるが, それは浸出液にそれらが検出されないとの ELISA の結果とは一致しない. Cry j 1 様蛋白質は容易には溶液中へ浸出しにくい外壁成分なのかも知れない. ただ, シラカバは, ELISA において反応の強さが同程度であった花粉の電顕像と比べてみると, 明らかにより多い量の Cry j 1 様, Cry j 2 様蛋白質を含有しており, それらは抽出液に検出できるので水溶性であると考えられ, 細胞外へ放出される可能性が考えられる. シラカバ花粉がアレルギー症状を引き起こす可能性について検討してみる必要がある.

謝 辞

シラカバ花粉を提供してくださった北海道立衛生研究所の小林智博士に深謝いたします.

引用文献

- (1) Belin, L.: Immunological analysis of Birch pollen antigens, with special reference to the allergenic components. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **42**, 42-300 (1972).
- (2) Gall, H., K.J. Kalveram, G. Forck and W. Sterry: Kiwi fruit allergy: A new birch pollen-associated food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**, 70-76 (1994).
- (3) Niederberger, V., G. Pauli, H. Grönlund, R. Fröchl, H. Rumpold, D. Kraft, R. Valenta and S. Spitzauer: Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: A quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 579-591 (1998).
- (4) Yasueda, H., Y. Yui, T. Shimizu and T. Shida: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **45**, 77-86 (1983).
- (5) Sakaguchi, M., S. Inouye, M. Taniai, S. Ando, M. Usui and T. Matuhasi: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* **45**, 309-312 (1990).
- (6) 井出 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).
- (7) Taniguchi, Y., A. Ono, M. Sawatani, M. Nanba, K. Kohno, M. Usui, M. Kurimoto and T. Matuhasi: Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* **50**, 90-93 (1997).
- (8) Miki-hirosige, H., S. Nakamura, H. Yasueda, T. Shida and Y. Takahashi: Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. *Sex. Plant Reprod.* **7**, 95-100 (1994).
- (9) Ohtsuki, T., Y. Taniguchi, K. Kohno, S. Fukuda, M. Usui and M. Kurimoto: Cry j 2, a major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. *Allergy* **50**, 483-488 (1995).
- (10) 中村澄夫・佐藤文孝・中村紀雄: スギ花粉アレルゲン Cry j 1 と Cry j 2 の発芽花粉における局在性. 花粉誌 **50**, 15-22 (2004).
- (11) Spurr, A.R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**, 31-43 (1969).
- (12) 安枝 浩: スギ花粉症とスギ・ヒノキ科花粉アレルゲン. 花粉誌 **46**, 29-38 (2000).
- (13) Kawashima, T., M. Taniai, Y. Taniguchi, M. Usui, S. Ando, M. Kurimoto and T. Matuhasi: Antigenic analyses of sugi basic protein by monoclonal antibodies: I. Distribution and characterization of B-cell-tropic epitopes of Cry j 1 molecules. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **98**, 110-117 (1992).
- (14) 日本花粉学会編: 花粉学事典. 朝倉書店 pp. 53 (1994).
- (15) Rawat, A., S. Singh, A.B. Singh, and P. Ravindran:

Clinical and immunologic evaluation of *Cedrus* 620-626 (2000).
deodara pollen: a new allergen from India. *Allergy* 55,
