

〔原 著〕

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
イムノブロット法によるスギ花粉アレルゲン粒子数の測定

興和(株)興和総合科学研究所

渡辺雅尚 田村正宏 名古屋隆生

山形県衛生研究所

高橋裕一 片桐 進

スギ花粉より主要アレルゲンである Cry j I 蛋白を精製し、これをマウスに免疫して抗 Cry j I モノクローナル抗体を作製した。得られた抗体は、KW-S10を代表としたスギ花粉にのみ特異的に反応する抗体と KW-S91を代表としたスギ花粉と共通抗原性を有する多くの裸子植物花粉と反応する抗体に分けられた。これらの抗体の酵素標識体を用いて、空中に飛散しているスギ花粉及び共通抗原性を有する花粉アレルゲン粒子数を膜上のスポットとして検出するイムノブロット法を確立した。すなわち、ワセリン塗布スライドガラス上に飛散花粉を捕集し、PVDF 膜に花粉蛋白を転写後、酵素標識抗体を反応させ、基質溶液により発色したスポットをカウントするものである。標識抗体として KW-S10を用いるとスギ花粉のみ、KW-S91を用いるとスギと共通抗原性を有する全ての花粉を検出することができる。このイムノブロット法により、スギ花粉数だけでなく空中に飛散するスギ花粉のアレルゲン量を測定することが可能となった。

Key words: *Cryptomeria japonica* — Cry j I — immunoblotting — monoclonal antibody — pollen

はじめに

スギ花粉症は、空中に飛散するスギ花粉により引き起こされるアレルギー性疾患であり、年々患者数が増加傾向にある。スギ花粉の飛散予測情報は、患者にとって有用な情報であり、その情報を基にしてマスクの着用や外出を控えるといった予防のための自衛手段を取ることができる。また、治療面でもより効果的な薬の投与に利用できる。現在スギ花粉の飛散数の測定は、ワセリン塗布スライドガラス上で捕集した花粉をゲンチアナ・バイオレット染色法¹⁾などで染色し、顕微鏡下

でスギ花粉を形態識別しながら計数している。この方法では、花粉の形態的類似性から識別が困難で、労力を要するため標本の処理数に限界があった。また、花粉症発症の面からみると、単なるスギ花粉数よりはむしろ、アレルギーを引き起こすスギ花粉抗原を持つ粒子（スギ花粉アレルゲン粒子）の量を測定した方が有用であろう。そこで、空中に飛散する花粉アレルゲン粒子数の新しい測定法として、我々は、先に花粉アレルゲン粒子を膜上のスポットとして検出するイムノブロット法を報告した²⁾。今回、新たにスギ花粉の主要アレルゲンである Cry j I 蛋白³⁾に対するモノクローナル抗体を作製し、酵素標識モノクローナル抗体を用いたスギ花粉アレルゲン粒子数を測定するイムノブロット法を確立したので報告する。

材料と方法

1. 花粉

スギ花粉は、つくば市内の植林地より採取した開花

Received: January 16, 1992

Accepted: March 10, 1992

Abbreviations: Alp alkaline phosphatase; BCIP 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; HAT hypoxanthine-aminopterin-thymidine; NBT nitroblue tetrazolium; PBS phosphate buffered saline; PBS-T phosphate buffered saline containing 0.05% Tween-20; PVDF polyvinylidene difluoride

期の枝を25℃、湿度60%の部屋で開花させ採取したものを用いた。メタセコイア、セコイア、ネズの各花粉は岡鐵雄氏（玉野市民病院）より分与されたものを用いた。ヒノキ、サワラ、コノテガシワ、ヒノキアスナロ、イヌガヤ、ガマ、カササゲの花粉は開花期に直接採取したものを用いた。その他の花粉は International Biological INC. の乾燥花粉（輸入元、フナコシ薬品）を用いた。

2. スギ花粉アレルゲン (*Cry j I*) の精製

Cry j I の精製は Yasueda らの方法⁴⁾に従って行い、電気泳動によって純度を確認した *Cry j I* を免疫抗原に用いた。

3. 抗 *Cry j I* モノクローナル抗体の作製

精製 *Cry j I* 0.2mg を Freund のアジュバントとエマルジョン化し、8週齢の雄性 BALB/c 系マウスの皮下に2週間間隔で3回免疫を行った。なおアジュバントは初回免疫には完全アジュバントを、それ以後の免疫には不完全アジュバントを用いた。さらに2週間後、*Cry j I* 0.2mg を尾静脈より投与した。最終投与の3日後にマウスより脾細胞を調製し、ミエローマ細胞 (P3-Ag8- γ) と電気細胞融合装置（島津製作所, SSH-1）を用いて融合させた。融合後、96ウェルプレートに分注し、HAT 含有培地でハイブリドーマを選択した。抗 *Cry j I* モノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングは以下の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で行った。

コーティング緩衝液 (0.05M 炭酸ナトリウム緩衝液, pH 9.6) で調製した *Cry j I* 溶液 (3 μ g/ml) を96ウェル ELISA プレート (Nunc) の各ウェルに100 μ l ずつ加え、25℃で2時間静置し、*Cry j I* をウェルにコーティングした。0.05% の Tween-20 を含む phosphate buffered saline (PBS-T) で洗浄後、25% のブロッケーヌ（大日本製薬）を200 μ l/ウェルずつ加え、4℃で一晩静置してブロッキング処理を行った。プレートを PBS-T で洗浄後、ハイブリドーマの培養上清液 (100 μ l/ウェル) を加え、25℃で2時間反応させた。PBS-T で洗浄後、PBS-T で3000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ (Alp) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Tago) を100 μ l/ウェルずつ加え、25℃で2時間反応させた。PBS-T で洗浄後、50mM NaHCO₃-10mM MgCl₂ (pH 9.8) で調製した基質溶液 (1mg/ml, Sigma 104, Sigma) を、100 μ l/ウェルずつ加えて反応させた。5N の NaOH を50 μ l/ウェルずつ加えて反応を止めた後、415nm の吸光度を測定した。

ELISA により、*Cry j I* と反応したハイブリドーマは限界希釈法で単クローン化を行った。

4. 抗体の Alp 標識

BALB/c マウスにプリスタン (Aldrich) を腹腔内投与し、1週間後にハイブリドーマを腹腔内に接種した。接種後約2週間で腹水を採取した。腹水からのモノクローナル抗体の精製は Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) を使ったアフィニティークロマトグラフィー法で行った。

抗体の Alp 標識は以下のように行った。抗体0.85mg と Alp (Boehringer) 3.0mg を混合し、PBS で1ml とした後、25% グルタルアルデヒド8 μ l を加え、室温で2時間反応した。その後、PBS に一晩透析し MgCl₂, ZnCl₂ (終濃度各 1mM) 及び NaN₃ (終濃度 0.02%) を添加して4℃で保存した。

5. ELISA による各種花粉との反応性の検討

得られた抗 *Cry j I* モノクローナル抗体の各種花粉との反応性を調べるために、以下の ELISA を行った。96ウェルプレートの各ウェルにコーティング緩衝液で調製した各種花粉の懸濁液5mg/ml 溶液を100 μ l ずつ加えて4℃で一晩静置し、花粉蛋白をプレートにコーティングした。以下、3. と同様の操作で ELISA を行った。なお、一次抗体の抗 *Cry j I* モノクローナル抗体の濃度は0.5 μ g/ml で行った。また、抗 *Cry j I* マウス血清はモノクローナル抗体作製時の免疫マウスより採血して得たものを用いた。

6. イムノブロット法 (Fig. 1)

空中に飛散する花粉の捕集は白色ワセリンを薄く塗ったスライドガラスを屋外に置くか、あるいはバーカード型花粉捕集器 (Burkard) を用いて12m³/日の割合で大気を吸引してワセリン塗布テープ上に花粉を捕集して²⁾イムノブロット法に用いた。また、実験室内では花粉を直接 PVDF 膜 (1.5×1.5cm, アトー) 上に散布した。なお PVDF 膜はあらかじめメタノールに20秒間浸した後、転写用緩衝液 (20% メタノールを含む 0.05 M Tris, 0.04M glycine 液, pH 7.6) に浸したものを使用した。花粉が捕集されたスライドガラス (テープまたは PVDF 膜) に同じ大きさの PVDF 膜を膜間に気泡の入らないように重ね、その上に同じ大きさのろ紙を3枚重ねた。室温で1時間静置して花粉蛋白を膜に転写した。転写後、PVDF 膜を PBS-T で2回 (各5分) 洗浄した後、PBS-T で500倍に希釈した Alp 標識抗 *Cry j I* モノクローナル抗体と室温で30分間反応した。PBS-T で3回 (各5分) 膜を洗浄した後、0.1M

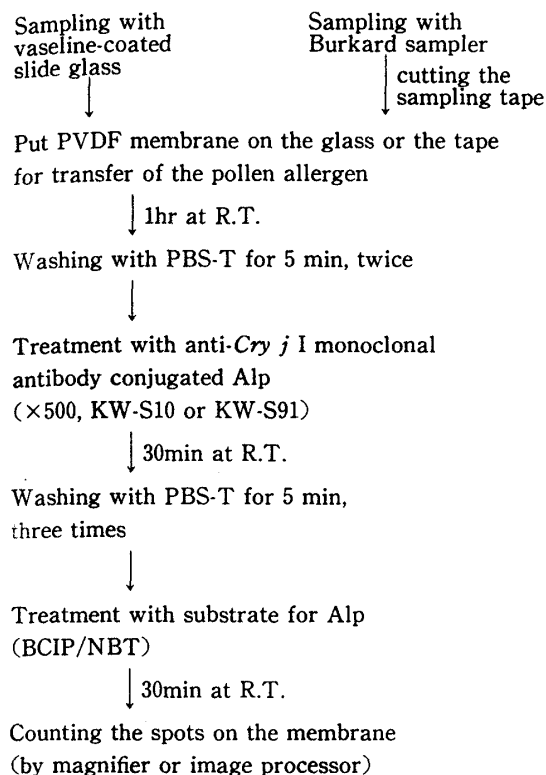


Fig. 1. Procedure for immunoblotting.

R.T. ; room temperature

PBS-T ; PBS containing

0.05% Tween-20

Alp ; alkaline phosphatase

トリス緩衝液 (0.1M NaCl, 5mM MgCl₂を含む, pH 9.5) で調製した NBT (0.33mg/ml)-BCIP (0.165mg/ml) 基質溶液で室温で30分間発色させた。水洗後、風乾し、実体顕微鏡下で膜上のスポット数を計数した。

7. 花粉実数値とスポット数の相関

PVDF 膜に現れたスポット数と実際に膜上に存在したスギ花粉数との関係は以下のようにして検討した。転写用緩衝液で浸した PVDF 膜 (3×3mm の枠を書いたもの) にスギ花粉を散布し、直ちに顕微鏡下で枠内に存在するスギ花粉を計数した後、PVDF 膜及びろ紙を重ねて花粉蛋白を転写し、イムノブロット法を行い枠内に現れたスポット数を計数し、両者を比較した。

実験結果

1. 抗 *Cry j* I モノクローナル抗体と各種花粉の反応性

精製 *Cry j* I を免疫したマウス脾細胞とミエローマ細胞の融合により、ELISA で *Cry j* I と反応する137株のハイブリドーマが得られた。さらにその中から、*Cry j* I との反応性の強い10種類のモノクローナル抗体 (IgG) を産生するハイブリドーマのクローンを選び出し、これらの抗体がスギ花粉に特異的に反応する抗体であるか調べるため、種々の花粉との反応性を ELISA により検討した。

その結果、Table 1 に示したように KW-S10, KW-S14, KW-S32, KW-S81 の4種の抗体はスギ花粉にのみ反応し、他の花粉とは全く反応しなかった。これらの抗体は抗 *Cry j* I 血清が反応した花粉に対しても反応が認められないことから、スギ花粉に対し極めて特異性の高い抗体といえる。また、KW-S118 と KW-S131 はスギ花粉以外に僅かに反応性を示す花粉があるもののスギ花粉に比較的特異性の高い抗体と考えられる。一方、KW-S84, KW-S91, KW-92, KW-S95 の4種の抗体は種々の花粉と広範囲に反応した。特に KW-S91 はアメリカブナとカモガヤを除き、抗 *Cry j* I 血清との反応性の認められる花粉全てに反応した。以上のようにより *Cry j* I に対するモノクローナル抗体はスギ花粉に特異的に反応するものとスギ以外の花粉にも広く反応するものに分けられた。そこで、それぞれの抗体の中でスギ花粉に対して最も反応性の強かった KW-S10 と KW-S91 を選び、以下のイムノブロット法に用いることにした。なお、KW-S10 と KW-S91 のサブクラスは IgG₁ であった。

2. イムノブロット法によるスギ花粉の検出

イムノブロット法は、花粉蛋白を PVDF 膜に転写し、膜上で酵素標識抗体と反応させ花粉アレルゲンを検出するものである。

2種の抗 *Cry j* I モノクローナル抗体 KW-S10 と KW-S91 について Alp 標識抗体を作製し、スギ花粉とヒノキ花粉について Fig. 1 に示したプロトコールでイムノブロット法を行った。その結果、Fig. 2 に示したように、KW-S10 抗体はスギ花粉でスポットがみられたが、ヒノキ花粉ではスポットが全くみられなかった。一方、KW-S91 抗体ではスギとヒノキの両方の花粉でスポットが認められた。次に、このように膜上に現れたスポットが実際の花粉を反映したものであるか否かを調べるため、PVDF 膜上に散布した花粉数とスポット数の比較を行ったところ、Fig. 3 に示したように両者の間に良い相関が認められ、膜上に現れたスポットは実際の花粉を反映したものと考えられた。

Table 1 Cross reactivities of anti-Cry j I monoclonal antibodies to various pollens by ELISA

Family	Species	Japanese	Monoclonal antibodies										Polyclonal anti-Cry j I
			KW-S10	KW-S14	KW-S32	KW-S81	KW-S118	KW-S131	KW-S84	KW-S91	KW-S92	KW-S95	
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria japonica</i>	Sugi	++	++	++	+	+	++	++	++	+	++	++
	<i>Taxodium distichum</i>	Rakuushou	-	-	-	-	+	±	+	++	+	+	+
	<i>Sequoia</i> spp.	Sekoia-zoku	-	-	-	-	-	±	+	++	+	+	+
	<i>Sequoia sempervirens</i>	Sekoia	-	-	-	-	-	-	±	+	±	±	+
	<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	Metasekoia	-	-	-	-	-	±	+	++	+	+	+
Cupressaceae	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Hinoki	-	-	-	-	-	±	+	++	++	+	+
	<i>Thujopsis dolabrata</i>	Hinokiasunaro	-	-	-	-	-	±	+	++	+	+	+
	<i>Cupressus arizonica</i>		-	-	-	-	-	-	+	+	+	±	+
	<i>Cupressus macrocarpa</i>		-	-	-	-	-	-	±	+	+	±	+
	<i>Juniperus</i> spp.	Byakusin-zoku	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Juniperus virginiana</i>	Enpitubyakusin	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Juniperus occidentalis</i>		-	-	-	-	-	-	+	+	+	±	+
	<i>Juniperus sabinoides</i>		-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+
	<i>Juniperus rigida</i>	Nezu	-	-	-	-	-	-	±	+	±	±	+
Pinaceae	<i>Picea pungens</i>	Touhi	-	-	-	-	-	±	+	++	-	+	±
Salicaceae	<i>Populus</i> spp.	Popura-zoku	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±
Juglandaceae	<i>Juglans regia</i>	Onigurumi	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±
Betulaceae	<i>Corylus americana</i>	Hasibami	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
	<i>Betula</i> spp.	Kabanoki-zoku	-	-	-	-	-	-	+	+	-	±	±
	<i>Alnus</i> spp.	Hannoki-zoku	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	±
Fagaceae	<i>Fagus grandifolia</i>	Amerikabuna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
	<i>Quercus</i> spp.	Konara-zoku	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±
Compositae	<i>Artemisia vulgaris</i>	Yomogi	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Butakusa	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±
Gramineae	<i>Dactylis glomerata</i>	Kamogaya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±

++: strong ($A_{415} > 1.0$), +: weak ($1.0 \geq A_{415} \geq 0.1$), ±: very weak ($A_{415} < 0.1$), -: negative.

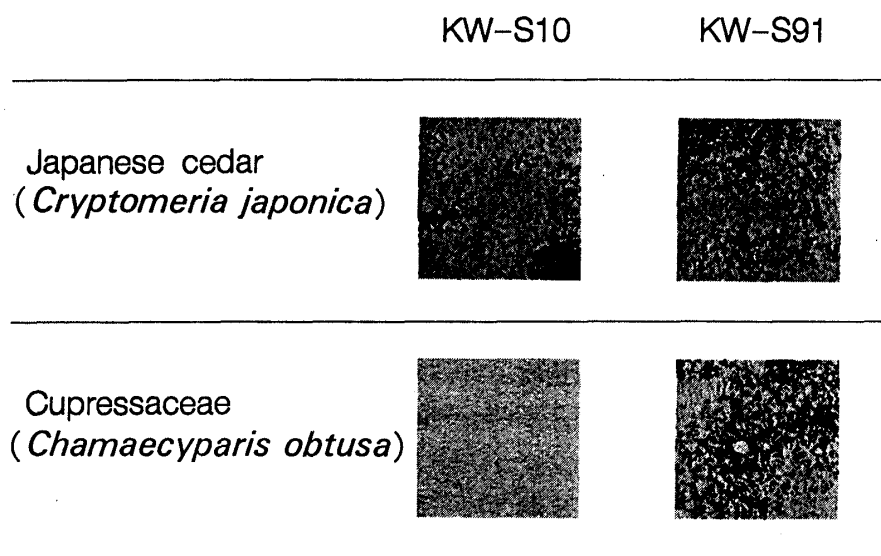


Fig. 2. Reactivity of two monoclonal antibodies (KW-S10 and KW-S91) to pollens of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and Cupressaceae (*Chamaecyparis obtusa*) by immunoblotting.

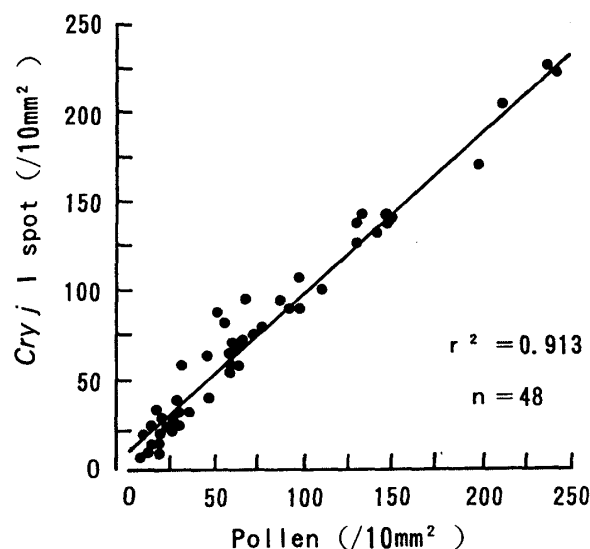


Fig. 3. Correlation between Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen count and *Cry j I* spot count.

さらに、KW-S10とKW-S91抗体を用いたイムノプロット法の特異性を検討するために、25種類の花粉によるイムノプロット法を行った。

その結果、Table 2に示したように、KW-S10抗体を用いたイムノプロット法はスギ花粉のみにスポットがみられ、他の花粉ではスポットが全く現れなかった。一方、KW-S91抗体を用いた場合では、抗 *Cry j I* 血清と同様の反応性を示し、スギが属する裸子植物の花粉に広く反応した。しかし、被子植物花粉に対しては、ヤナギ科のポプラやヤナギ、カバノキ科のカバノキに対して弱い反応がみられるものの、他の被子植物花粉にはほとんど反応しなかった。なお、キク科のヨモギなど一部の被子植物花粉で、KW-S91抗体や抗 *Cry j I* 血清と弱い反応がみられたが、これらの花粉は正常血清においても弱い反応がみられることから非特異的な反応と考えられた。

以上の結果より、イムノプロット法において、KW-S10抗体を用いるとスギ花粉のみを特異的に検出することができ、また、KW-S91抗体を用いるとスギ花粉と共通抗原性のある花粉を検出できることがわかった。

3. イムノプロット法による空中飛散花粉の測定

バーカード型花粉捕集器を用いて、空中に飛散する花粉を経時的にテープ上に捕集し、イムノプロット法を行った1例をFig. 4に示した。24時間分に相当するテープをAlp標識KW-S91抗体を用いてイムノプロット法を行ったもので、14:00頃より多くのスポッ

トが観察された。

さらに、1991年3～4月に空中飛散するスギ及びヒノキ花粉について、花粉数の計数 (Fig. 5A, B) と同時にイムノプロット法 (Fig. 5C) を行った。KW-S91抗体を用いてイムノプロット法を行ったところ、先の抗 *Cry j I* 血清を用いたイムノプロット法²⁾で報告したように大きさの異なるスポットが観察された。大部分のスポットは直径60～90 μ mのスポットであり、それよりも小さい直径10～15 μ m程度のスポットも認められた。さらに、極めて小さなスポット (直径2～4 μ m) も顕微鏡で観察されたが、計数の際には、この顕微鏡で観察される微小なスポットを除いて計数した (Fig. 5C)。その結果、3月においては、スポット数の変動はスギ花粉数の実数値の変動とよく一致した。4月9日頃より、スギ花粉の他にヒノキ花粉も飛散し始めたので (Fig. 5B)、この時期より、KW-S91抗体と平行して、KW-S10抗体を用いたイムノプロット法も開始し、両者の比較を行った。その結果、KW-S91抗体によるスポット数は、KW-S10抗体によるスポット数を常に上回っていた (Fig. 5C)。この結果は、KW-S10抗体がスギ花粉のみを検出しているのに対し、KW-S91抗体ではスギ花粉と一緒にヒノキ花粉とも反応し、スポットとして検出しているためと考えられた。

考 察

先に、我々は、空中に飛散するスギ科及びイネ科植物の花粉アレルゲン粒子数を測定する新たな方法としてイムノプロット法を報告した²⁾。この時は花粉アレルゲンに対するウサギ抗血清を用い、二次抗体としてAlp標識抗ウサギIgGを用いた間接法によるイムノプロット法であった。しかし、ウサギ抗血清は、そのロット間で抗体価や特異性に差が生じるなどの問題があった。全国各地の研究者により実施されたデータを相互比較する場合や空中飛散花粉の年次変動を長年に渡り比較する場合など、一定の品質の抗体を安定に供給する必要がある。このような点を考えると、抗血清に比べモノクローナル抗体は同一の抗体を供給できることからイムノプロット法に適していると考えられる。そこで今回、我々はスギ花粉アレルゲン (*Cry j I*) に対して特異性の高いモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いたイムノプロット法を報告した。さらに、得られた抗体に直接酵素を標識することで二次抗

Table 2 Cross reactivities of anti-Cry j I monoclonal antibodies to various pollens by immunoblotting technique

Family	Species	Japanese	Monoclonal antibodies		Polyclonal anti-Cry j I	Non-immunized mouse serum
			KW-S10	KW-S91		
1. Gymnospermae						
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria japonica</i>	Sugi	++	++	++	—
	<i>Taxodium distichum</i>	Rakuushou	—	++	+	—
	<i>Sequoia</i> spp.	Sekoia-zoku	—	++	+	—
	<i>Sequoia sempervirens</i>	Sekoia	—	++	+	—
	<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	Metasekoia	—	++	+	—
	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Hinoki	—	++	+	—
Cupressaceae	<i>Chamaecyparis pisifera</i>	Sawara	—	++	+	—
	<i>Biota orientalis</i>	Konotegashiwa	—	++	+	—
	<i>Thujopsis dolabrata</i>	Hinokiasunaro	—	++	+	—
	<i>Cupressus arizonica</i>		—	+	+	—
	<i>Cupressus macrocarpa</i>		—	+	+	—
	<i>Juniperus</i> spp.	Byakusin-zoku	—	++	+	—
	<i>Juniperus virginiana</i>	Enpitubyakusin	—	++	++	—
	<i>Juniperus occidentalis</i>		—	+	+	—
	<i>Juniperus sabinoides</i>		—	+	+	—
	<i>Juniperus rigida</i>	Nezu	—	+	+	—
Pinaceae	<i>Picea pungens</i>	Touhi	—	+	+	—
Cephalotaxaceae	<i>Cephalotaxus drupacea</i>	Inugaya	—	+	+	—
Taxaceae	<i>Taxus cuspidata</i>	Ichii	—	±	±	—
2. Angiospermae						
Salicaceae	<i>Populus</i> spp.	Popura-zoku	—	+	+	—
	<i>Salix</i> spp.	Yanagi-zoku	—	±	±	—
Betulaceae	<i>Corylus americana</i>	Hasibami	—	—	—	—
	<i>Betula</i> spp.	Kabanoki-zoku	—	±	—	—
	<i>Alnus</i> spp.	Hannoki-zoku	—	—	—	—
Fagaceae	<i>Fagus grandifolia</i>	Amerikabuna	—	—	—	—
	<i>Quercus</i> spp.	Konara-zoku	—	—	±	±
Moraceae	<i>Humulus japonicus</i>	Kanamugura	—	—	—	—
Juglandaceae	<i>Juglans regia</i>	Onigurumi	—	—	—	—
Rosaceae	<i>Prunus sargentii</i>	Ooyamazakura	—	—	+	+
Compositae	<i>Artemisia vulgaris</i>	Yomogi	—	±	+	+
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Butakusa	—	—	+	+
Gramineae	<i>Dactylis glomerata</i>	Kamogaya	—	—	—	±
Typhaceae	<i>Typha orientalis</i>	Gama	—	—	—	—
Cyperaceae	<i>Carox dispalata</i>	Kasasuge	—	—	—	—

体を省略し、イムノブロット法に要する時間を短縮して簡便化することができた。

Cry j I に対する抗血清でみるかぎり、スギ花粉は、多くの裸子植物の花粉と共通抗原性があり、被子植物花粉とは、わずかな例外(ヤナギ科のボブラやヤナギ、カバノキ科のカバノキ)を除き、ほとんど共通抗原性はみられなかった。イムノブロット法で使用する抗体として、スギ花粉に対して特異性の異なる2種類の抗体(KW-S10とKW-S91)を選んだ。両方の抗体を使い

分けることにより、スギ花粉のみを測定するか、または、スギ花粉と共通抗原性のある花粉を一緒に測定するかを選択が可能となった。本来、花粉症に対する空中飛散花粉の情報の提供という点から考えると、単にスギ花粉数だけではなく、KW-S91抗体を用いるイムノブロット法のように、花粉症を引き起こす共通抗原性を有する全ての花粉をスギ花粉アレルゲン粒子として一括して計測することも有意義と考えられる。

イムノブロット法は、膜上に転写した花粉抗原を酵

素標識抗体と反応させ、スポットとして検出するものであるが、先の抗 *Cry j* I 血清を用いたイムノブロット法²⁾の場合と同様に、現れてくるスポットには種々

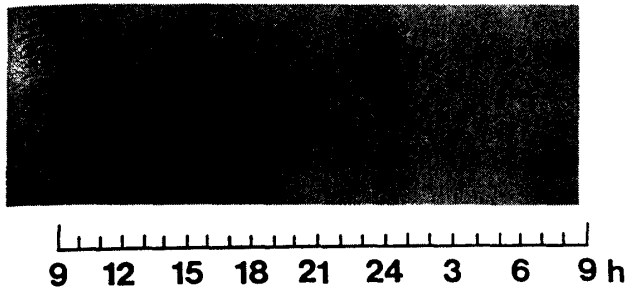


Fig. 4. Immunoblotting of sampling tape of Burkard sampler using KW-S91 monoclonal antibody.

Cry j I spots were obtained on April 5, 1991.

の大きさのものが存在する。一番多く認められるのは、直径が60~90 μ mのスポットである。しかし、直径が2~4 μ mの非常に小さいスポットも観察される。現在、我々は、この小さいスポットの由来となるスギ花粉アレルゲン微粒子が何であるのか解析しているが、*Cry j* I がスギ花粉の外壁やユービッシュ小体に局在し⁵⁾、また、葯の最内層のタペータム組織にも局在していることから⁶⁾、このアレルゲン微粒子はスギ花粉の外壁表面に付着しているユービッシュ小体が花粉から遊離したものではないかと考えている。

イムノブロット法は、膜上のスポットをカウントして測定するが、その際に画像解析装置などを使って、膜上に現れたスポットを定量化することができる²⁾ので、花粉測定の自動化も可能である。さらに、花粉の捕集の際には、通常使用されているワセリン塗布スラ

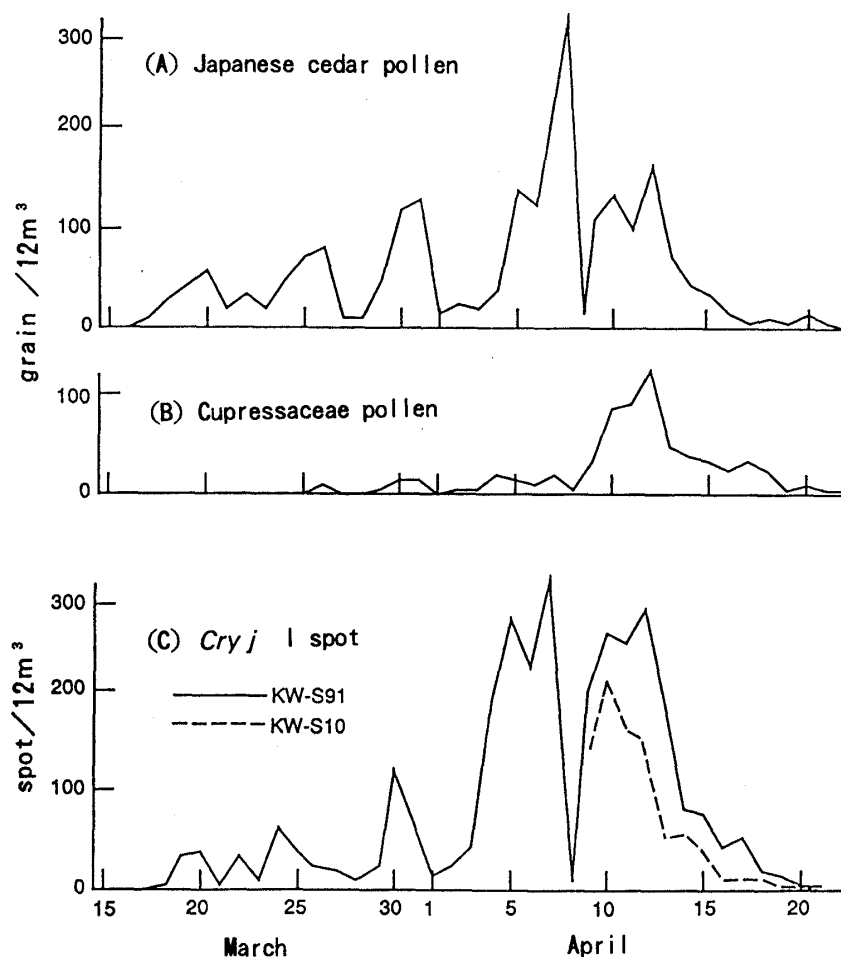


Fig. 5. Daily fluctuations in numbers of Japanese cedar pollen count (A), Cupressaceae pollen count (B) and *Cry j* I spot (C).

Cry j I spots were obtained by KW-S91 monoclonal antibody (—) and partly by KW-S10 monoclonal antibody (---) in March 10 to April 21, 1991.

イドグラスによる重力法（落下法）に比べ、一定量の体積の大気を連続的に吸引してその中に存在する花粉を捕集するバーカード型花粉捕集器の方が、大気中の正確な花粉量を調べるのに適しており、さらに、経時的に花粉を捕集することが可能である。しかし、スギ花粉のように大量に飛散する花粉の場合、バーカード型花粉捕集器では時として、捕集される花粉量が多すぎて、これまでの形態観察によるカウント法では測定することができない場合があった。しかし、イムノブロット法と画像解析装置などを組み合わせることによって、バーカード型花粉捕集器による花粉捕集にも対応できる測定システムとなった。この測定系により、空中飛散花粉の経時的測定も行うことができ、より精度の高い花粉情報の提供が可能となるものと期待される。

文 献

- 1) 菅谷愛子：東京都区における空中飛散花粉分析，
- 特にイチョウ花粉の飛散状態について。アレルギー 22, 321-325, 1973.
- 2) 高橋裕一, 井上 栄, 坂口雅弘, 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ゲン粒子数の測定。アレルギー 39, 1612-1620, 1990.
- 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) 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, 77-87, 1983.
- 5) 中村澄夫, 安枝 浩, 信太隆夫, 三木寿子：スギ花粉におけるアレルゲンの局在一免疫細胞化学的検討。日本花粉学会第 32 回大会講演要旨, pp.22, 榎原市, 1991.
- 6) 高橋裕一, 溝口二郎, 片桐 進, 坂口雅弘, 井上 栄, 他：スギ花芽中のスギ主要とアレルゲン量の季節変動とその組織内分布。アレルギー 37, 838-838, 1988.

A NEW COUNTING METHOD OF AIRBORNE JAPANESE CEDAR (*CRYPTOMERIA JAPONICA*)
POLLEN ALLERGENS BY IMMUNOBLOTTING USING
ANTI-Cry j I MONOCLONAL ANTIBODY

Masanao Watanabe, Masahiro Tamura and Takao Nagoya
Kowa Research Institute, Kowa Co., Ltd.

Yuichi Takahashi and Susumu Katagiri
The Yamagata Prefectural Institute of Public Health

We produced monoclonal antibodies against the major allergen of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen, Cry j I. KW-S10 antibody reacted only with Japanese cedar pollen and KW-S91 antibody reacted to most angiospermae pollens as well as Japanese cedar pollen. Using these antibodies, we devised a new counting method of Japanese cedar pollen allergen particles by an immunoblotting technique. Airborne pollen allergens were collected on vaseline coated glass slides or Burkard's sampling tape and were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were treated with anti-Cry j I monoclonal antibody conjugated with alkaline phosphatase. Pollen allergens were detected as spots on the membranes after staining with phosphatase substrate (BCIP/NBT). This method using KW-S10 antibody measured only the amounts of allergen from Japanese cedar pollen, while with KW-S91 antibody, the method measured the amounts of pollens which have antigenicity in common with Japanese cedar pollen.