

## スギ精英樹花粉におけるアレルゲン Cry j1 含量の変動

清藤城宏 神保智一\* 野村光男\* 松野 智\* 山本静雄\*

Variation in the Allergen Cry j1 content in the Pollen  
of Sugi (*Cryptomeria japonica*) Plus Trees

Kunihiro SEIDO, Tomokazu JINPO, Mituo NOMURA,  
Satoru MATSHUNO and Shizuo YAMAMOTO

**Summary :** The purpose of this study was to examine differences in Cry j1, which is one of the main allergens of Sugi (*Cryptomeria japonica*) pollinosis, in 46 clones of Sugi plus trees. The content of the plus trees varied from 2.55 to 27.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , with an average of 10.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . There was no relationship between the number of male flowers or the male flowering period and the Cry j1 content. The content of three plus clones collected at different times tended to be large initially and to decrease with time. These results suggest the possibility of individual selection for a lower amount of Cry j1. Therefore, it is thought that both the number of male flowers and the allergen content play a role in pollen allergy.

**要旨 :** スギ花粉アレルギーの主要アレルゲンは Cry j1 と Cry j2 とされている。ここでは Cry j1 の定量分析を 46 スギ精英樹クローンを対象におこなった。この結果、精英樹クローン間の Cry j1 には差が見られた。各クローンの雄花量、雄花飛散期間と Cry j1 との相関は認められなかった。また時期別に採取した 3 クローンの分析測定結果では、花粉飛散始めに多量の Cry j1 の含有がみられ漸次減少傾向にあった。アレルゲン含量に変異がみられることは選抜育種による個体選抜の可能性を示唆するものであり、花粉量の少ない品種の選抜のみでなく、アレルゲン含量を加味し選抜育成すべきと考える。

### I はじめに

我が国における花粉アレルギーの研究は、1930 年代から見られたものの、本格的には戦後アメリカからの情報が多くなるにつれ、特に花粉アレルギーの原因が明らかにされている外来草が繁殖するようになってから急速に進みはじめている (岩波, 1980)。我が国の花粉アレルギーはブタクサ、スギ、カモガヤ、カナムグラ、イネ、コナラ等 53 種が報告され、草本、木本の割合はほぼ半分である (宇佐神, 1994)。中でも日本固有種の花粉症第 1 号はスギ花粉症 (堀口, 斎藤, 1964) であり、スギの花粉症が明らかにされて以来患者数が増加の一途をたどっている。北海道・沖縄を除く地域において患者数の多い慢性疾患の一つで、20~30 代の人たちのスギ花粉特異 IgE 抗体の陽性率は 30%前後に達し (井上ほか,

1986, 1988)、発病率も 10%程度と推定されている (中村, 1990)。このスギ花粉症の予防対策の一環として空中に飛散しているスギ花粉量を情報として提供する、いわゆるスギ花粉情報の提供が全国で行われている。一方、空中に飛散しているスギ花粉測定法の改善努力も試みられている (Takahashi, et al., 1993)。

スギ花粉中の主要なアレルゲンである Cry j1 は 1983 年に Yasueda ら (1983) によって、Cry j2 は 1990 年に Sakaguchi ら (1990) によってそれぞれ分離されているが、スギ花粉中のアレルゲン含有量についての詳細は明らかにされていない。

スギ花粉中に含有されている Cry j1 と Cry j2 の量の割合は Cry j1 が約 3/4 と多く含有していることから (佐々木ほか, 1996)、本研究では Cry j1 の量を測定することとし、Cry j1 の測定方法、スギ精英樹の系統別の量の違い、ならびに飛散時期の異なるスギ花粉中の Cry j1 量を検討したので、その結果を報告する。

\* 麻布大学 Azabu University

## II 材料および方法

### 花粉の採集

スギ花粉は1997年2月下旬から3月下旬にかけて、山梨県スギ採種園の構成精英樹クローンの内46系統のスギからそれぞれ採取した。またの3精英樹のスギから時系的に樹冠の上部・下部に分けてスギ花粉を採取した。なお、園齡は29年生である。スギ花粉の採集は、市販の家庭用掃除機で各調査個体から吸引採集し、これらのスギ花粉は使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ 下に保存した。

### スギ花粉からの Cry j1 の分離

スギ花粉からの Cry j1 の分離は Yasueda らの方法 (1983) に準じて行った。スギ花粉 100 g に対して 1,000 ml のジエチルエーテルを加えて脱脂後、0.125 M 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 8.0) 1,000 ml を加えて  $4^{\circ}\text{C}$  下で 48 時間可溶性成分の抽出を行い、高速遠心 ( $10,060 \times g$ 、20 分) によって上清を得た。この上清を Osborne の硫酸アンモニウム固体添加法 (松岡, 1971) で 80% 飽和とし、得られた塩析沈殿の可溶性成分を 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) に再溶解した。このスギ花粉の可溶性成分を Fast Protein Liquid Chromatography System (FPLC ; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用い、Hi Load Q Sepharose column (Pharmacia Biotech) による陰イオン交換クロマトグラフィーで 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) によって溶出をされた未吸着分画を得た。次に、この分画を陽イオン交換体である Hi Load SP Sepharose column (Pharmacia Biotech) に 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で吸着させたのち、0.01 M 食塩加里ン酸 (pH 7.2, phosphate buffered saline ; PBS) によって吸着分画を解離させて採取した。さらに、これを Superdex G75 column (Pharmacia Biotech) を用いてゲル濾過を行い第二峰に Cry j1 を得た。この Cry j1 をウサギへの免疫原および ELISA 用の標準タンパクとしてそれぞれ用いた。

### 抗 Cry j1 血清の調製

精製した Cry j1 を PBS で  $0.5 \text{ mg/ml}$  とし、これに等量のフロイドの完全アジュバンド (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を混じたエマルジョンを調製した。その 1 ml をウサギの指踏の皮内あるいは皮下に 1 週間隔で 9 回免疫を行い Cry j1 に対する抗血清を調製した。最終免疫の 5 日後に全採血を行い、得られた抗血清には 0.1% の割にアジ化ナトリウムを加え、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。このウサギ抗 Cry j1 血清から Protein G

column (Pharmacia Biotech) を用いて分離した IgG 抗体を ELISA および Western blot に用いた。

### タンパクの定量法

IgG 抗体の濃度は Bio-Rad Protein Assay kit I (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を、Cry j1 の濃度は Coomassie Brilliant Blue G-250 を用いた Bradford の方法 (1976) によってそれぞれ測定を実施した。ウサギ抗 Cry j1 抗体の特異性は Towbin らの方法 (1979) に準じた Western Blot によって確認した。Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) には 12% ゲルの分離ゲルを用い、 $1.2 \text{ mA/cm}^2$  で 3 時間通電を行った。電気泳動終了後、ニトロセルロース膜 (Pharmacia Biotech) への転写には Multiphor II Nova Blot Electrophoresis Transfer Unit (Pharmacia Biotech) を用い、 $0.8 \text{ mA/cm}^2$  で 1 時間通電した。1 次抗体には 3% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS で  $2.3 \mu\text{g/ml}$  に調製したウサギ抗 Cry j1 IgG 抗体を、2 次抗体には  $1 \mu\text{g/ml}$  に調製したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Organon teknika Co., West Chester, PA, USA) をそれぞれ用いた。基質には PBS で 0.05% に調製した 3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (和光化学株式会社、大阪) を、分子量マーカーには LMW electrophoresis calibration kit (Pharmacia Biotech) を用いた。

### スギ花粉からの可溶性成分の抽出

Cry j1 量の測定に用いるすべてのスギ花粉は、 $37^{\circ}\text{C}$  の孵卵器中に 24 時間静置して花粉中の水分含有量を一定にしたのちこれらを 1 g ずつ秤量した。これらの花粉各 1 g に各々 20 ml の 0.125 M 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 8.0) を加えて  $4^{\circ}\text{C}$  下で 24 時間攪拌後、遠心 ( $900 \times g$ 、20 分) して採取したそれぞれの上清を Cry j1 の定量に用いた。1 g の花粉を 20 ml の上記緩衝液に加えたときは、1 g 約 16 ml の可溶性抽出液が得られた。Cry j1 量は 1 検体当たり 1 g ずつ秤量して調製した 3 サンプルについて定量を実施した。ELISA は Yamamoto らの方法 (1992) に準じてサンドイッチ法で実施した。固相には 0.05 M 炭酸重炭酸緩衝液 (pH 9.6) で  $0.77 \mu\text{g/ml}$  に調製したウサギ抗 Cry j1 IgG 抗体を  $100 \mu\text{l/well}$  加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間吸着させた。Nakane and Kawaori の方法 (1974) によって調製したペルオキシダーゼ (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA) 標識ウサギ抗 Cry j1 IgG 抗体は PBS で  $1.3 \mu\text{g/ml}$  に調製し、 $100 \mu\text{l/well}$  用いた。基質には 2,2-amino-di (3-ethyl-benzthiazoline sulphonic acid; ABTS) (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) を

用い、波長 415nm で O.D. 値を測定した。PBS で倍数希釈した既知濃度の精製 Cry j1 抗原から ELISA の検量線を作成し、これを用いてスギ花粉抽出液中の Cry j1 量を算出した。スギ花粉の Cry j1 量はスギ花粉 1 g を 20ml の 0.125M 重炭酸アンモニウム溶液 (pH8.0) で抽出し得られた可溶性成分中の濃度として表した。

### III 結 果

#### スギ花粉からの Cry j1 の分離と同定

FPLC を用いた Hi Load Q Sepharose column による陰イオン交換クロマトグラフィーでスギ花粉から Cry j1 を溶出し、陰イオン交換クロマトグラフィーによって得られた未吸着分画を陽イオン交換体である Hi Load SP Sepharose column を用いて溶出した。これで得られた吸着分画を Superdex G75 column を用いてゲル濾過することにより Cry j1 を得た。図-1 に示す。

スギ花粉から抽出した可溶性成分、Cry j1 精製過程の

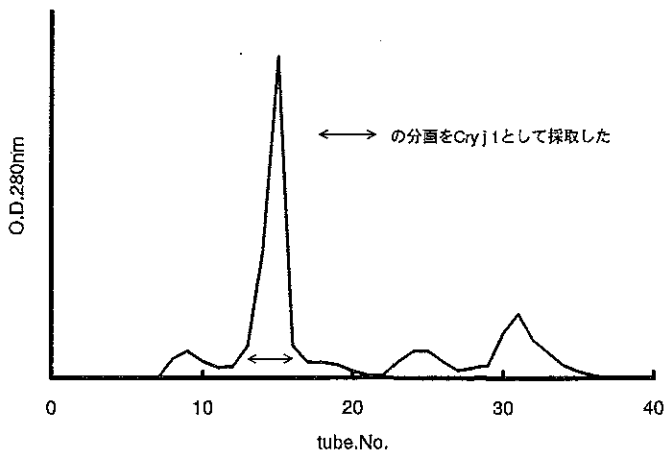


図-1 FPLC によるスギ花粉抽出成分のゲルろ過

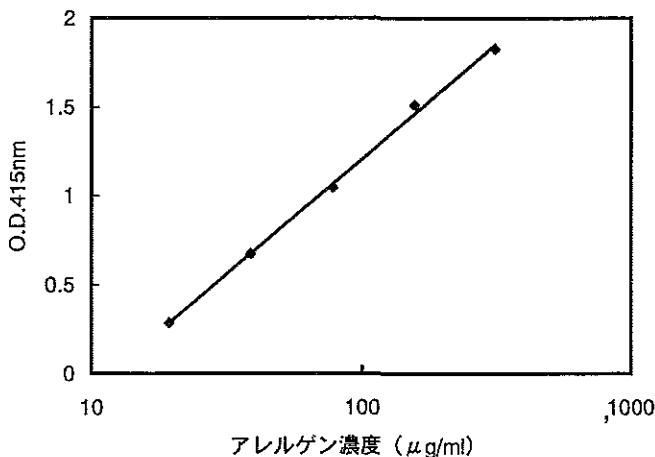


図-2 Cry j1 測定用 ELISA の検量線

成分および精製した Cry j1 の SDS-PAGE で FPLC による Cry j1 の精製過程の成分は、複数のバンドを形成したが、精製した Cry j1 は分子量 40~45kDa 付近に二本のバンドを形成した。ウサギ抗 Cry j1 IgG 抗体は、スギ花粉から抽出した可溶性成分ならびに免疫に用いた Cry j1 との間でいずれも分子量 40~45kDa の部位に 2本のバンドを形成した。スギ花粉に含まれる Cry j1 量の測定に用いる ELISA の検量線を既知濃度の Cry j1 抗原を用いて作成した結果、図-2 に示したとおり良好な検量線が得られた。

#### スギ精英樹花粉中の Cry j1 量

採種園で採取した系統の異なる 46 精英樹のスギの花 粉抽出液中の Cry j1 量を 3 回測定した。その各精英樹の平均値の結果は表-1 のとおりである。27.38~2.54 μg/ml (平均 10.9 ± 7.33 μg/ml) で、分散分析の結果、精英樹間に 1% で有意な差が認められた。各精英樹の Cry j1 量と雄花開花期間、雄花量との関係を図-3、

表-1 精英樹クローン花粉中の Cry j1 量

クローン名	Cry j1 (μg/ml)	クローン名	Cry j1 (μg/ml)
千頭 3号	27.38	鯉沢 14号	7.13
甲府 1号	26.87	中の条 2号	6.81
中津川 1号	24.78	丹沢 1号	6.68
大月 2号	23.45	中の条 9号	6.47
与瀬 1号	23.41	奈良井 5号	6.44
松筑 1号	22.61	南巨摩 1号	6.04
鯉沢 8号	21.05	勢多 2号	5.67
鯉沢 2号	20.45	鯉沢 3号	5.64
飯山 1号	20.16	鯉沢 1号	5.40
大月 3号	18.06	大月 5号	5.29
鯉沢 9号	17.71	鯉沢 7号	5.28
西多摩 23号	15.87	久野 1号	4.99
西多摩 19号	15.75	高崎 2号	4.92
上高井 2号	15.53	鯉沢 13号	4.70
飯田 2号	14.39	鯉沢 10号	4.68
鯉沢 12号	14.18	鯉沢 5号	4.33
長水 6号	14.16	西多摩 17号	4.30
津久井 1号	11.60	上伊那 4号	3.96
飯田 1号	8.74	鯉沢 11号	3.96
群馬 4号	8.62	塩山 1号	3.45
鯉沢 4号	8.54	埴科 1号	3.29
鯉沢 6号	8.14	多野 1号	3.28
月夜野 3号	7.66	勢多 3号	2.55

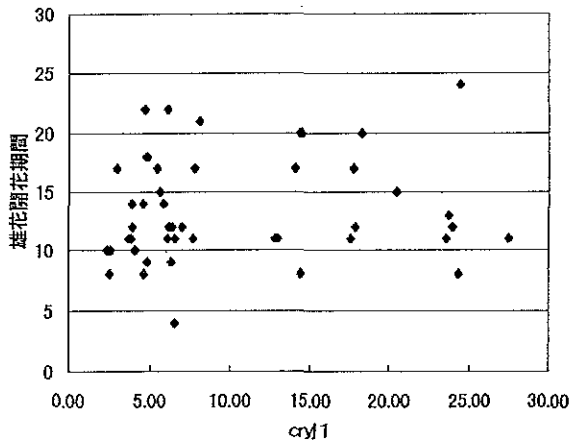


図-3 雄花開花期間と Cry j1

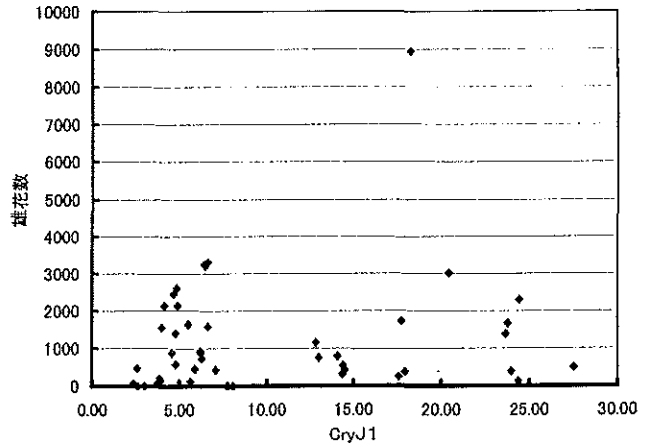
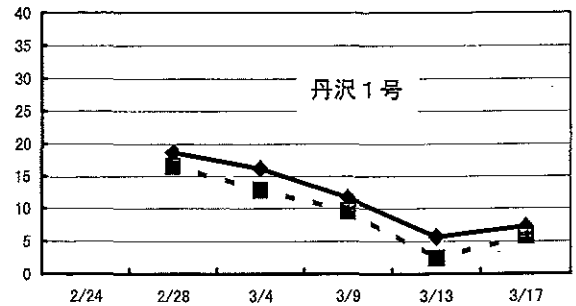
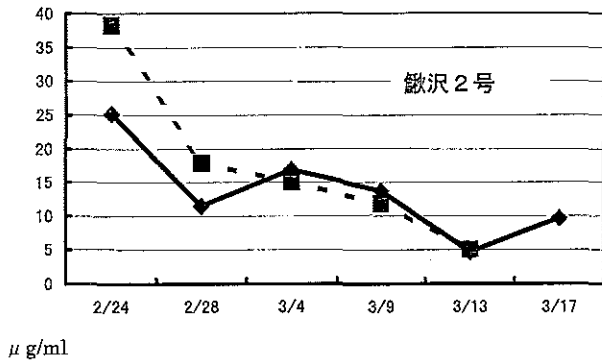
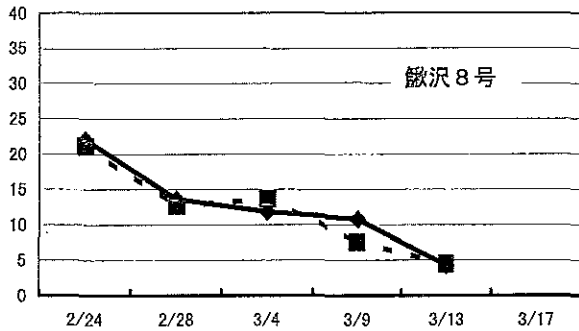


図-4 雄花量と Cry j1



μ g/ml



◆ 樹冠上部  
■ 樹冠下部

図-5 採種位置と時期別に採種した花粉の Cry j1 の変化

図-4 に示す。いずれにおいても有意な相関関係は認められなかった。時期別に採集したスギ花粉の Cry j1 量の変化を図-5 に示す。樹冠内の上下のスギ花粉中の Cry j1 含有量の差は餓沢 2号の採集初期時に差が認められたものの、他は差が認められずほぼ一定していることがわかる。しかし採集開始の2月下旬に採取した花粉は Cry j1 含有量が最も多く含有されており、その後時間的な経過とともに漸次減少した。

#### IV 考 察

花粉症の原因となる植物は主要なものだけで二十種類存在するといわれている (山村, 1982)。その中でもわが国の国民的疾患となっているスギ花粉症を惹起するスギは、日本の固有種ともいえる樹種で *Cryptomeria japonica* の一属一種だけである。しかし、その系統は多数あり、スギ花粉の飛散量は系統および地域により異

なる (橋詰, 1990、山崎, 1979, 1994)。また、精英樹では花粉量が少ないことから、花粉量の少ない精英樹の利用が提案されている (近藤, 1997)。本県においても精英樹の中から花粉を生産しない精英樹・少ない精英樹 (清藤, 1996) の選抜を行なっている。毎年、初春にはスギ花粉症の予防対策として花粉の飛散情報が提供されている (Takahashi, et al, 1993)。しかし、現在提供されているスギ花粉情報は空中花粉量の測定、気象データおよびスギ林の分布状況をもとにしたシミュレーションであり、飛散している花粉中のアレルゲン量は加味されていない (高橋, 1996)。ELISA によってスギ花粉に含有される Cry j1 量を測定した結果、精英樹系統によってその含有量に差があることが確認された。加えて、同一精英樹個体内においてもスギ花粉の飛散時期により Cry j1 の含有量に著しい差があることが確認された。Cry j1 と花粉に係わる形質との相関が見出せれば簡易にアレルゲンを評価出来る。今回は雄花量、雄花開花期間との関係をみたが、相関は認められなかった。今後は Cry j1 を多量に含むスギ花粉生産のスギ花粉飛散時期ならびに前年度の天候、樹齢の関係など各種の要因を加味したアレルゲン生産の現象を的確に把握し、スギ花粉とアレルゲン量の関係をさらに詳細に解明する必要がある。

アレルゲンの分析は必ずしも容易ではない現在、さらに簡便なスギ花粉アレルゲンの測定方法を開発することが必要である。

花粉情報の提供については、飛散しているスギ花粉中のアレルゲン量も考慮した情報の提供が検討されなければならない。

スギ花粉症対策として育種的には単に花粉量の少ない系統を選抜するのではなく、可能な限り花粉中のアレルゲン生産量を加味して評価し選抜すべきであろう。

## 引用文献

- Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K. and Bjorek, L.: Protein G: A Powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.*, 135: 2589-2592, 1985.
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- 井上 栄, 阪口雅弘, 堀幹 朗, 渡辺恒明: IgE 抗体測定によるスギ花粉症の疫学的研究. *医学のあゆみ*, 136: 959-960, 1986.
- 井上 栄, 阪口雅弘, 森田盛大, 庄司俊雄, 金田誠一, 木村栄二, 山本保男, 井上博雄, 小野哲郎, 道家直, 平川浩資: 一般住民のスギ花粉特異 IgE 抗体保有率の地域差. *医学のあゆみ*, 145: 121-122, 1988.
- 岩波洋造: 花粉学. 1-212, 1980.
- 橋詰隼人: 日本列島の空中花粉の生産に関する研究. (I) 各地のスギ林の着花状況. 品種による着花性の差異及び着花に影響する因子について. 鳥取大学 農学部演習林研究報告, 19: 67-122, 1990.
- 堀口申作, 斎藤洋三: 栃木県日光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
- 近藤禎二: 花粉の少ない精英樹. *林木の育種* NO.183: 7-9, 1997
- 岡岡雄治: 免疫性グロブリンの精製. *免疫学・アレルギー学実験*, 進藤宙二監修. 文光堂, 東京, p.149, 1971.
- Nakane, P. K. and Kawaori, A.: Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem.*, 22: 1084-1091, 1974.
- 長野 準: 空中花粉測定および花粉情報の標準化委員会活動報告. *アレルギー*, 23: 44-45, 1994.
- 中村 晋: 大学生並びに大学職員におけるスギ花粉症の頻度調査成績. *アレルギー*, 36: 476-482, 1990.
- Sakaguchi, M., Inoue, S., Taniai, M., Ando, S., Usui, M. and Matsushashi, T.: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy*, 45: 309-312, 1990.
- 清藤城宏: 遺伝資源の保存と増殖. 平成 7 山梨森総研事業報告, 18-19, 1996
- 佐々木義則, 谷口美文, 正山征洋: スギ倍数体花粉のアレルゲン分析. *大分林試研時報*, 22, 8~12, 1996.
- Takahashi, Y., Nagoya, T., Watanabe, M., Inoue, S., Sakaguchi, M. and Matsushashi, T.: A new method of counting airborne Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens by immunoblotting. *Allergy*, 48: 94-98, 1993.
- 高橋裕一: 花粉アレルギーについて. (II) スギ花粉の測り方や気象との関連および花粉情報について.

- モダンメディア, 42 : 56-63, 1996. 1974.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A., 76 : 4350-4354, 1979.
- 宇佐神篤 : 花粉学事典. 日本花粉学会篇 P52, 1994.
- Yamamoto, S., Tagata, K., Nagahata, H., Ishikawa, Y., Morimatsu, M. and Naiki M. : Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. Vet. Immunol. Immunopathol., 30 : 329-339, 1992.
- 山崎 太 : 花粉症起因花粉の研究. (12) スギ花粉症流行状況予測法の一部改定について. アレルギー, 28 : 732-737, 1979.
- 山崎 太 : スギ花粉症その原因と対策. 医薬ジャーナル社, p.10, 1991.
- 山村 雄一 : 免疫学 (4). 中山書店, p.197, 1982.
- Yasueda, H., Yui, Y., Shimazu, 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.