

オオバヤシャブシ花粉のアレルゲン分析

奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

衛 籐 幸 男

ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF
ALDER (*Alnus sieboldiana*) POLLEN ALLERGENS

YUKIO ETOH

Department of Otorhinolaryngology, Nara Medical University

Received January 23, 1996

Abstract: Alder (*Alnus sieboldiana*) pollen contained at least 14 antigenic components, demonstrable by SDS-PAGE. One of these antigens was responsible for a major allergenic activity of alder pollen extracts. The major allergen of alder pollen was separated from other allergenic components as well as non-allergenic antigens by ion-exchange chromatography and disk preparative electrophoresis.

Forty-two sera from patients with alder pollen allergy were investigated for the presence of IgE antibodies against alder pollen allergens by means of immunoblotting. In immunoblots, 38 patients (90%) exhibited IgE antibodies against the major allergen of alder pollen with a molecular mass of 17 kDa.

The pI value of the major allergen determined by preparative isoelectric focusing was 5.7.

The major allergen was stable to heat, acidic and alkaline treatments.

The N-terminal amino acid sequence of the major allergen was Gly-Val-Phe-Asn-Tyr-Glu-His-Glu-Thr-Pro-. The N-terminal amino acid sequences of the major allergens of *A. sieboldiana* pollen, *A. glutinosa* (Aln g 1) and *Betula verrucosa* (Bet v 1) exhibited a high degree of homology.

Index Terms

alder, *A. sieboldiana* pollen, major allergen

はじめに

本邦において、春期花粉症の原因となる代表的な植物はスギであるが、地域によってはスギ以上に問題となる植物がある。六甲山系では砂防を目的として多数のオオバヤシャブシ(*Alnus sieboldiana* Matsumura)が植林され、宅地開発にともなってその花粉症が社会問題となっている。筆者は、表六甲山麓に位置する神戸市灘区で実施されたオオバヤシャブシ花粉症の疫学調査に参加し、同地区での推定有病率が23.0%で、スギ花粉症の13.1%より高く、花粉飛散数もスギの4.3倍におよぶことを

報告した¹⁾。

一方、花粉症の診断と治療にはアレルゲンエキスの必要であり、その標準化のためには主アレルゲンの同定を欠かすことができない。

以上の観点から、筆者は本邦でまだ報告がみられないオオバヤシャブシ花粉のアレルゲン分析をおこなったので報告する。

材料ならびに方法

オオバヤシャブシ花粉からアレルゲン粗エキスを抽出し、免疫電気泳動とイムノプロットにより、まずそのア

レルゲン活性を検討した。次に、粗エキスをイオン交換クロマトグラフィー、熱処理、ディスクプレパラティブ電気泳動の順におこない、精製アレルゲンを得た。さらに、その物理化学的性質をみるため、等電点電気泳動、熱・pH 処理および N 末端アミノ酸シーケンスを調べた (Fig. 1)。以下その詳細を記す。

I. 花粉の採集とアレルゲンエキスの抽出

1. 花粉の採集と保存；疫学調査を実施した表六甲山麓で、開花直前の雄花が豊富なオオバヤシャブシの小枝を切り取り、既述の方法²⁾で花粉を採集し、使用まで -30℃ で保存した。

2. アレルゲン粗エキスの抽出；オオバヤシャブシ花粉 40 g をプラスチックチューブに移し、約 20 倍量の dextrose-phenol solution (4.5 % glucose, 0.2 % NaHCO₃, 0.5 % phenol) をくわえて、4℃ で一晩水平振盪した。10,000 rpm で 20 分間冷却遠心分離後の上清をセルロース透析膜に移し、流水、蒸留水の順に phenol 臭がなくなるまで透析、さらに 10,000 rpm で 20 分間冷却遠心分離して沈澱物を除き、凍結乾燥によりオオバヤシャブシ花粉アレルゲン粗エキス (以下粗エキスという) 611 mg を得、デシケーター中 4℃ に保存した。なお、bovine serum albumin (BSA) を標準とした bicin-

choninic acid 法によって測定した粗エキスのタンパク質含量は 84.1 % であった³⁾。

II. アレルゲンの精製

1. イオン交換クロマトグラフィー；粗エキス 50 mg を 50 mM phosphate buffer (PB), pH 7.5 30 ml に溶解し、4℃, 10,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清を、同緩衝液で調整した DEAE-TOYOPEARL 650S (TOSOH) カラム (φ 2.0 cm × 16.8 cm) に負荷し、260 ml の同緩衝液を流して非吸着画分を得た。さらに、最終濃度 1 M NaCl 含有同緩衝液となる直線的濃度勾配法による溶出 (全量 410 ml) をおこない吸着画分を得た。6 ml づつ画分を採取し、280 nm の吸光度を測定した。

2. 加熱処理；DEAE-TOYOPEARL 650S によるイオン交換クロマトグラフィーでの非吸着画分を 80℃ で 10 分間加熱処理をおこなった。

3. ディスクプレパラティブ電気泳動；加熱処理後遠心分離した上清を透析チューブに移し、高吸水性樹脂 (アクアリック CA；日本触媒) で周囲を覆い濃縮した。その濃縮液を 0.0925 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) に対して透析した。この 2,800 μl に 70 % glycerol 400 μl, 10 % SDS 800 μl と 0.1 % bromophenol blue (BPB) 30 μl をくわえたものを試料とし、ディスクプレパラティブ電気泳動装置 (NA-1800 型；日本エイド) を用いて分離精製した。すなわち、泳動ゲル、濃縮ゲルの acrylamide 濃度をそれぞれ 15 %, 3 % とし、0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1 % (W/V) SDS (pH 8.3) の泳動緩衝液を用いて、100 V 定電圧で 24 時間泳動しながら、15 滴づつ画分を採取した。

III. アレルゲン活性の評価

1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 阻止試験；IgE-ELISA の方法として自家調製のペーパーディスク法と、市販の AlaSTAT キット (日本 DPC コーポレーション) を用いた。

a. ペーパーディスク法

CNBr 活性化ディスクの調製；東洋口紙 No. 6 をパンチで穿孔し、直径 5 mm の円形ディスクを作製した。

ディスク 3 g (1,000 枚) を室温で 60 ml の蒸留水に浸し、30 分後蒸留水を吸引除去、あらたに 200 ml の蒸留水にくわえた後 CNBr 粉末 10 g をくわえ、ただちに 8 M NaOH を滴下して pH を 10.5 から 11.5 に保った。30 分後ガラスフィルター上へ移し、氷冷蒸留水 2,000 ml, 氷冷 0.1 M NaHCO₃ 2,000 ml, 氷冷蒸留水 2,000 ml の順で吸引洗浄した (活性化ディスク)。

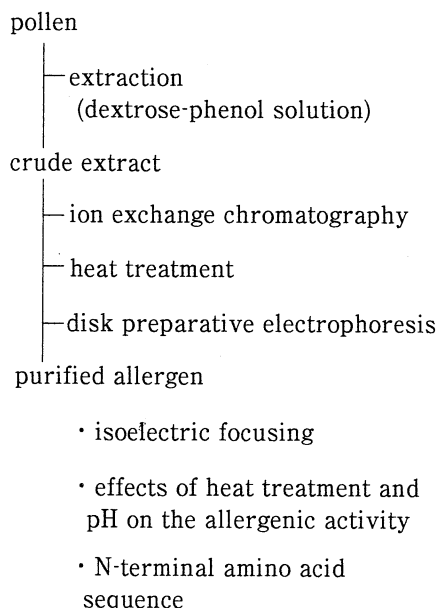


Fig. 1. Flow-diagram of isolation and partial characterization of *A. sieboldiana* pollen allergens.

アレルギーディスクの調整；粗エキス 100 mg を borate buffered saline (0.02 M boric acid, 0.15 M NaCl, pH 8.0) 10 ml に溶解し、4°C、10,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清をプラスチック容器にとり、活性化ディスク 200 枚を入れて 4°C で 2 日間水平振盪した。液を吸引除去し、0.1 M NaHCO₃ 50 ml で洗浄、0.05 M 2-aminoethanol を含む 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.0) 20 ml 中で 3 時間水平振盪した。液を吸引除去後、0.1 M NaHCO₃ 50 ml, 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) 50 ml で 3 回、incubation buffer (0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.3 に 0.02 % NaN₃, 2 % BSA, 0.05 % Tween 20 を溶解) 50 ml で 2 回洗浄し、incubation buffer 中 4°C で保存した。

血清中 IgE 抗体の測定；ポリスチレンチューブに被検血清 50 μ l を入れ、アレルギーディスク 1 枚を浸し、室温で 3 時間放置した。被検血清を吸引除去後、洗浄液 (0.05 % Tween 20 含有 0.15 M NaCl) 2.5 ml をくわえて充分洗浄した。この操作を 3 回繰り返した後、酵素標識抗 IgE 溶液 50 μ l (Phadezym RAST; Pharmacia) をくわえて室温で 16~18 時間静置した。洗浄液 2.5 ml で吸引洗浄を 3 回繰り返した後、基質溶液 200 μ l (Phadezym RAST) をくわえ、ただちに 37°C で incubate した。2 時間後反応停止液 1 ml をくわえ、吸光度 (A₄₂₀) を測定した。

b. AlASTAT キット；原理は、被検血清中の抗原特異 IgE 抗体とリガンド結合特異抗原を反応させた後、この反応複合体をリガンド結合剤により、リカンドを固定化させたチューブに結合させ、さらに、酵素標識抗 IgE 抗体を反応させ、反応液を除去し洗浄後、基質をくわえて酵素反応をおこなわせ、発色した反応液の吸光度を測定することにより血清中の抗原特異 IgE 抗体を測定するものである。また、実際の測定法は以下のごとくおこなった。

リガンド固定化チューブにオオバヤシヤブシ抗原試薬 100 μ l と被検血清 50 μ l をくわえ、室温で 1 時間振盪しながら incubate し、その後リガンド結合剤 50 μ l をくわえて室温で 1 時間振盪しながら incubate した。チューブから反応液を捨て、0.1 % Tween 20 含有 PBS (洗浄液) で洗浄、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗 IgE 抗体試薬 200 μ l をくわえて、室温で 1 時間振盪しながら incubate した。チューブから反応液を捨て洗浄後、o-phenylene diamine 試薬と過酸化水素試薬を混合した基質液 500 μ l をくわえ室温で 15 分 incubate した。1 N 硫酸 500 μ l をくわえて反応を停止させ、492 nm の吸光度を測定した。

これらの測定系の特異性を検討するため、オオバヤシヤブシ花粉症患者のプール血清を用いた希釈試験をおこなった。

IgE-ELISA 阻止試験には、等量のアレルゲンと被検血清を混和し、30°C で 1 時間 incubate したものを試料として IgE-ELISA を施行した。このときの吸光度を (A)、アレルゲンの代わりに同量の PBS をくわえた血清で得た吸光度を (A₀) としたときの、 $(1-A/A_0) \times 100$ を阻止率 (% inhibition) とした。

IgE-ELISA ならびに IgE-ELISA 阻止試験はすべて二重測定した。

粗エキスおよびアレルゲン活性画分の 3 倍または 4 倍の希釈系列を作製し、プール血清との IgE-ELISA 阻止試験をおこない阻止曲線とした。

2. イムノプロット⁴⁾；sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離した抗原を膜支持体に転写し、免疫染色した。

a. SDS-PAGE；Laemmli の方法⁵⁾ に準じて 15 % の泳動ゲル、3 % の濃縮ゲルを作製し、ミニスラブ法 (日本エイドー) で電気泳動をおこなった。試料の SDS 濃度を 2 % とし、BPB の泳動距離を常に 5 cm とした。目的によって試料の還元処理をおこなった。また、SDS-PAGE ゲルのタンパク質の染色は銀染色法 (第一化学薬品) によった。分子量マーカーには第一化学薬品のものを用いた。

b. ウェスタンブロット；SDS-PAGE 後のゲルを転写用緩衝液 (0.125 M Tris, 0.96 M glycine, 20 % (V/V) methanol) で洗浄し、水平に置かれたセミドライ型転写装置 (日本エイドー) で Polyvinylidene difluoride (PVDF；商品名イモビロン P, Millipore) 膜に 1 mA/cm² の定電流で 90 分間通電して転写した。

転写後、3 % BSA を含む PBS に 1 時間以上浸すことによってタンパク質の非特異的な吸着を防いだ PVDF 膜を洗浄液 (1 % Tween 20 含有 PBS) で洗浄後、第一抗体として PBS で 4 倍に希釈した被検血清と室温で 1 時間振盪した。洗浄液で洗浄後、第二抗体として 1 % human serum albumin (HSA) を含む PBS で 15,000 倍に希釈した HRP 標識抗ヒト IgE 抗体 (KPL) と室温で 1 時間振盪した。洗浄液で洗浄後、Western blotting detection system (Amersham) により被検血清中の IgE 抗体と結合するバンドをレントゲンフィルム上に検出した。

IV. 血清

1. 患者血清；オオバヤシヤブシ開花期に花粉症症状があり、オオバヤシヤブシ花粉アレルギーエキスによる皮膚試験¹⁾あるいは IgE-ELISA が陽性の 42 名から得た血

清を用いた。また、このうち IgE 抗体価の高い 30 名の血清を混和し、プール血清とした。

2. 抗オオバヤシャブシ花粉ウサギ血清；生理食塩水で 20 mg/ml の濃度に調整したオオバヤシャブシ花粉粗エキスと complete Freund's adjuvant (DIFCO) を等量混和した emulsion 1 ml をウサギの皮下数カ所に分け週 1 回、計 5 回注射した。最終注射から 2 週間後採血し、抗血清を調製した。

これらの血清はすべて使用まで -80°C に保存した。

V. 免疫電気泳動

1. Fused rocket electrophoresis (FRIE)；粗エキスをゲル濾過により分子量的に分画し、その画分中の抗原活性のあるタンパク質を検出する目的でウサギ血清を用いた FRIE をおこなった。

a. ゲル濾過；粗エキス 70 mg を 0.075 M NaCl, 10 mM PB(pH 7.5) 1.5 ml に溶解し、 4°C 、10,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清を、同緩衝液で調整した Sephadex G-75(Pharmacia)カラム(ϕ 2.2 cm \times 76 cm, bed volume 290 ml, void volume 90 ml)でゲル濾過をおこなった。すなわち、試料を負荷後 30 ml/hr の流速で同緩衝液を 24 時間流し(全量 720 ml)、5 ml ずつ画分を採取し、280 nm の吸光度を測定した。

b. FRIE；アガロースを 12.6 ml の泳動緩衝液(0.073 M Tris, 0.024 M barbital, 0.05 M NaN_3 , pH 8.6)に混和後、水平に保った 84 mm \times 94 mm のガラス板上に注いで厚さ約 1.5 mm の 0.9% ゲルを作製し、直径 2 mm の 29 ウェルを作製した(Fig. 2)。ウェルを含む 22 mm の幅を残し、その上部のゲル(84 mm \times 72 mm)を取り除き、10% 濃度の抗オオバヤシャブシ花粉ウサギ血清 0.73 ml を含む 0.9% アガロースをガラス板の切り取った領域に注ぎ、厚さ 1.2 mm の泳動ゲルを作製した。

ゲル濾過の画分 5 μl を順にウェルに入れ、ガラス板長辺に沿ってウェルの反対側を陽極として 6 V/cm で 2 時間泳動した。泳動終了後、ガラス板を密閉した湿潤箱に入れ、室温で 16 時間静置して抗原抗体反応を完成させた。

このゲルの上に、生理食塩水で湿らせた濾紙 2 枚、乾いたペーパータオル、同じサイズのガラス板を乗せ、その上に約 1 kg の重しをおいて 10 分間プレスし、次に生理食塩水に 30 分間浸してから再度プレスし、蒸留水中に 10 分間浸してから風乾した。完全に乾燥した後、0.25% (W/V)Coomassie brilliant blue (CBB)に浸して 15 分間染色し、脱色液(エタノール：酢酸：水=9：2：9)で洗浄脱色し、風乾した。

2. Fused rocket enzyme-immunoelectrophoresis (FREIE)；これは Fused rocket radioimmunoelectrophoresis(FRRIE)⁶⁾を改変したもので、FRIE のプレート上で特異的 IgE 抗体、酵素標識抗 IgE 抗体の順に反応させてアレルゲンを検出する方法である。

FRIE で抗原抗体反応を完成させたアガロースゲルから余分の抗血清を PBS に浸して除去したのち、緩衝液 A(W/V で 3% BSA, 0.9% NaCl, 0.1% NaN_3 , 0.1% EDTA, 2% Tween 20 を含む 0.05 M PB, pH 7.5)に 10 分間浸し、プレスした。

プレスしたゲルの両端にスぺーサーとして PBS に浸した濾紙片を置き、その上にガラス板を乗せた。緩衝液 A 4.5 ml と患者血清 0.5 ml を混和し、プレスしたゲルとガラス板の間に流し込んだ。これを湿潤箱中、室温で 16 時間静置し、沈降線の上のアレルゲンと患者血清中の IgE 抗体を反応させた後、PBS に浸して計 4 回洗浄し、緩衝液 A に 10 分間浸した後プレスした。

次に、緩衝液 A 3.2 ml と galactosidase で標識された抗ヒト IgE 抗体 0.5 ml (Phadezym RAST；Pharmacia)を混和し、再びプレスしたゲルとスぺーサ

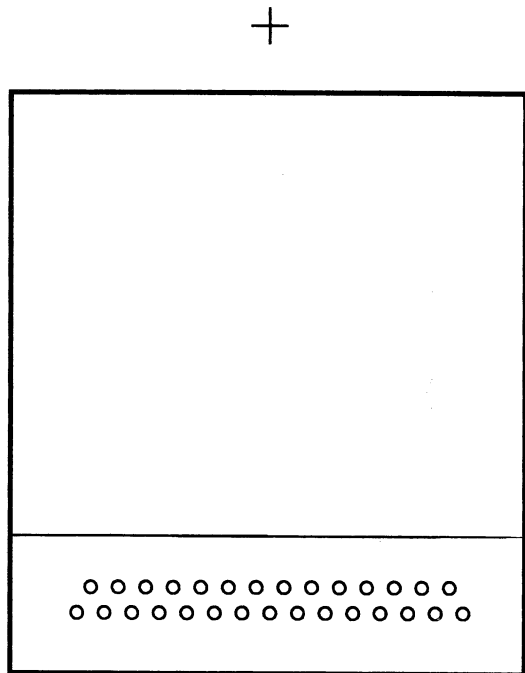


Fig. 2. Schematic representation of FRIE.

ーを置いたガラス板の間に流し込み、湿潤箱中、室温で16時間静置した。これをPBSに浸して洗浄とプレスを3回繰り返した後、緩衝液B(0.1 M NaCl, 0.02 % (W/V) NaN_3 を含む0.02 M PB, pH 6.0)に10分間浸した後プレスした。

緩衝液B 4 mlと基質溶液(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactosideをdimethyl-formamide中40 mg/mlの濃度に溶解)0.1 mlを混和し、プレスしたゲルとスぺーサー上のガラス板の間に流し込んだ。これを湿潤箱中、室温で3日間静置した。

VI. オオバヤシヤブシ花粉アレルゲンの物理化学的性質

1. 分子量；SDS-PAGEによった。
2. 等電点；等電点電気泳動装置には容量110 mlのLKB社製カラムを用い、陽極液は0.1 M H_3PO_4 を使用し、陰極液には2% 2-aminoethanolを用い、漙流温度を4°Cに一定とした。試料液は、イオン交換クロマトグラフィでアレルゲン活性が認められた画分を蒸留水に対

して透析した7.6 mlを用い、carrier ampholite pH 4-6を3 mlとpH 3-10を0.5 mlを混和後、50%~0%のglycerol濃度勾配を作製した(全容量100 ml)。カラム充填終了後、850 Vで46時間泳動した。泳動後、2 mlずつ分取した⁷⁾。

採取した各画分について、それぞれのpH値および280 nmの吸光度を測定後、ELISA阻止試験をおこなった。

3. 温度の影響；ディスクプレパラティブ電気泳動での活性画分をPBSでタンパク質濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように稀釈した。60, 80, 100°Cで10分間加熱処理後、さらに、PBSで22.5倍と202.5倍に稀釈してELISA阻止試験をおこなった。

4. pHの影響；ディスクプレパラティブ電気泳動での活性画分を蒸留水でタンパク質濃度20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように稀釈した後、同量の40 mM Glycine-HCl buffer (pH 2.5), 40 mM Sodium acetate-acetic acid buffer (pH 4.0), 40 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.4, pH 11.0), 40 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), 40 mM

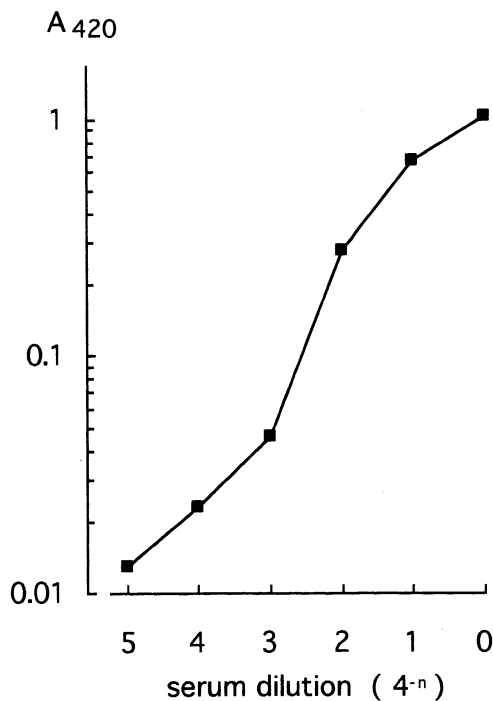


Fig. 3. IgE-ELISA titration curve. The procedure was described in "Materials and Methods". A serum pool was used.

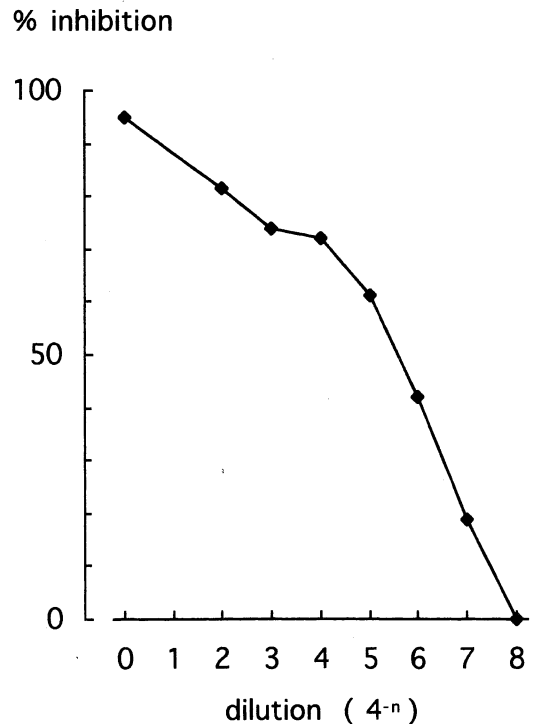


Fig. 4. IgE-ELISA inhibition curve. The procedure was described in "Materials and Methods". The crude extract (3 mg/ml) was serially diluted.

Sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer (pH 9.5)をくわえた。37°Cで17時間放置後、さらにPBSで22.5倍と202.5倍に希釈してELISA阻止試験をおこなった。

5. N末端アミノ酸配列

a. 試料の調製；ディスクプレパラティブ電気泳動の試料をCosmosil 5 C₄-AR-300カラム(4.6 mm I.D. × 150 mm + 4.6 mm I.D. × 250 mm；ナカライテスク)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー(逆相HPLC：Waters LC module I)に負荷した。カラムは0.1% Tri-fluoroacetic acid (TFA)で平衡化し、流速0.5 ml/minで、0.1% TFAを含むacetonitrile濃度を0%から70%まで60分間で直線的に増加させることによって溶出させた。

逆相HPLCで得た画分を凍結乾燥し、これを試料としてSDS-PAGEをおこなった。blotting buffer A (0.3 M Tris-base, 20% methanol, 0.02% SDS), blotting buffer B (25 mM Tris-base, 20% methanol, 0.02% SDS), blotting buffer C (25 mM Tris-base, 20% methanol, 0.02% SDS, 40 mM 6-amino-n-capronic

acid)を使用し、陽極面からblotting buffer Aで湿らせた濾紙, blotting buffer Bで湿らせた濾紙, PVDF膜, ゲル, blotting buffer Cで湿らせた濾紙, 陰極の順に重ね、ゲルの大きさに対して1 mA/cm², 2時間の条件でPVDF膜に転写した。転写後、バンドの部分を切り取って試料とした。

b. 分析；分析にはアミノ酸シーケンサー(ABI 476 A：Applied Biosystems)を用いた。操作は付属の説明書にしたがった。得られた結果をApplied Biosystems 610 A Data Analysis System Ver. 1.2により解析してN末端アミノ酸配列を決定した。

結 果

I. オオバヤシャブシ花粉特異IgE抗体の証明

1. プール血清の4倍希釈系列を作成し、IgE-ELISAを施行した結果をFig. 3に示した。血清の希釈に伴って吸光度が低下していた。

2. オオバヤシャブシ花粉粗エキスの4倍希釈系列を作成し、プール血清を用いてELISA阻止試験を施行した結果をFig. 4に示した。エキスの希釈に伴って阻止率

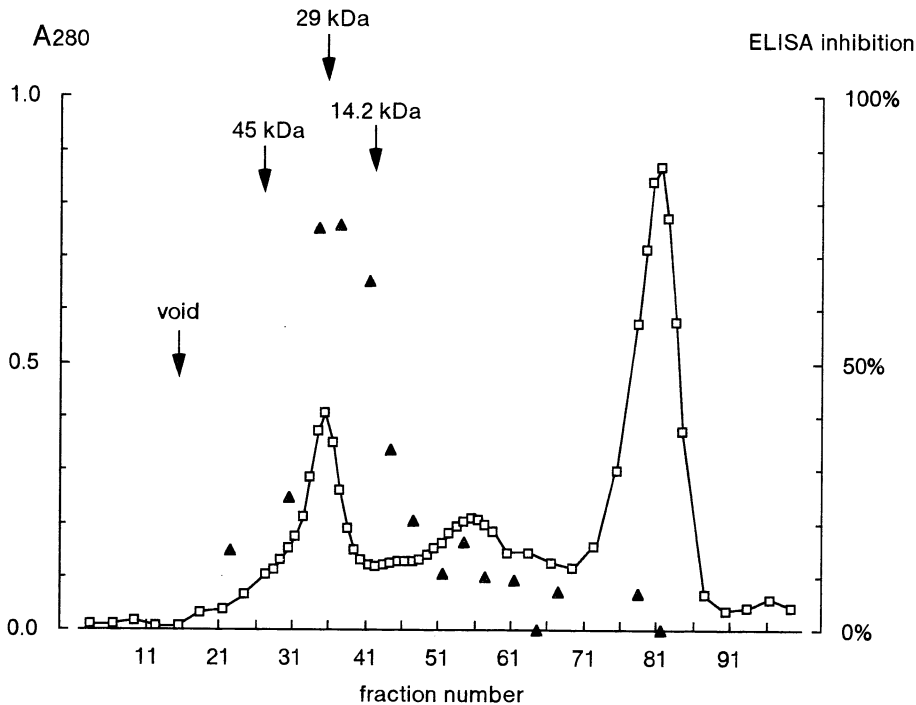


Fig. 5. Elution pattern of the crude extract from pollen of *A. sieboldiana* on a Sephadex G-75 column. The allergenic activities of the fractions were indicated by % inhibition, as described in "Materials and Methods". □ : A₂₈₀, ▲ : % inhibition.

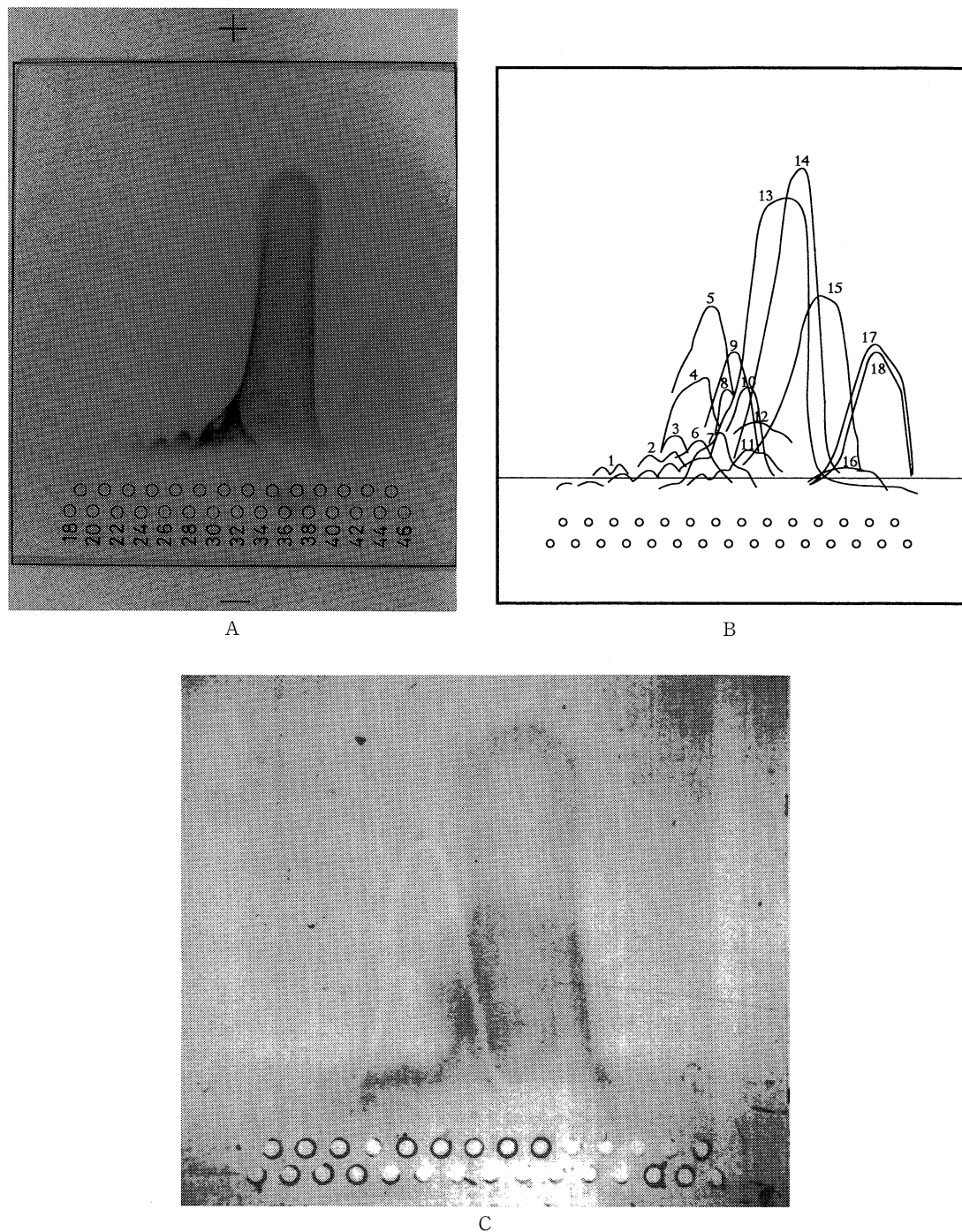


Fig. 6. FRIE and FREIE profiles of eluted fractions of the crude extract on the Sephadex G-75 column. Five microliters of samples from fraction 18 to 46 were applied. A : Protein staining with CBB, B : Schematic representation of the immunoprecipitates, C : The FREIE result.

は低下していた。

これらの結果から、プール血清中に存在する抗体はオオバヤシャブシ花粉アレルゲンに特異的であるとともに、この測定系がアレルゲン活性の評価に有用であることが明らかになった。また、市販のIgE-ELISA キットであるAlaSTATでも同様の結果を得たので、以下これを使用した。

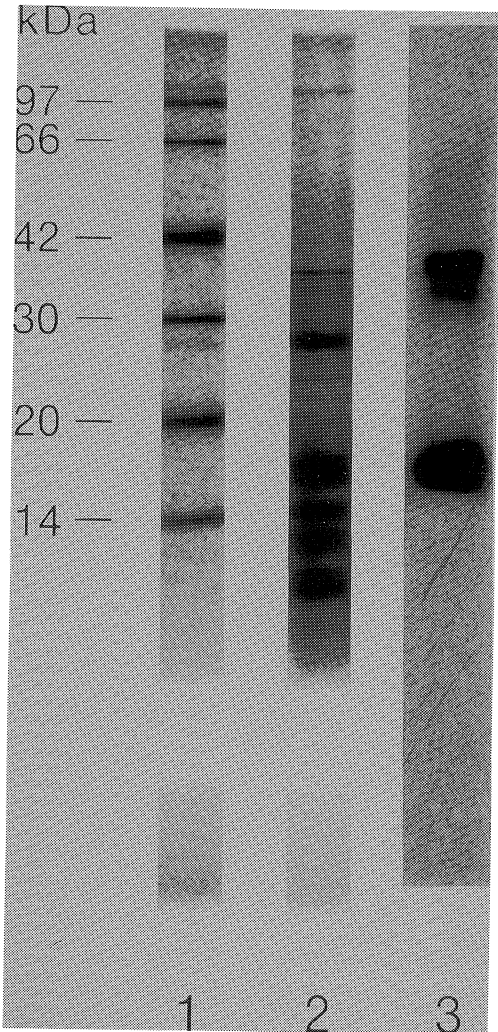


Fig. 7. SDS-PAGE of the crude extract from pollen of *A. sieboldiana*. lane 1: MW marker, lane 2: Protein staining of the sample by the silver staining method, lane 3: Western blotting. The procedure was described in "Materials and Methods".

II. アレルゲン活性

ゲル濾過後の各画分(Fig. 5)のFRIEでは、分子量約7,000~100,000の間に18本の沈降線が認められた(Fig. 6A, 6B)。また、FREIEではこのうちNo. 13のみにプール血清中のIgE抗体と反応する発色を認めた(Fig. 6C)。

SDS-PAGEでは14本のタンパク質バンドが認められ、特に17 kDaのバンドが濃く太く染色された。また、プール血清を用いたイムノプロットでは、17 kDaに濃い、36 kDaと34 kDaに淡いIgE抗体結合バンドが認められた(Fig. 7)。

42名の個別血清を用いたイムノプロットの結果、IgE抗体が結合したバンドのヒストグラムをFig. 8に示した。17 kDaが42名中38名(90%)でもっとも多く、これが主アレルゲンと考えられたので、以下このタンパク質の精製を試みた。

III. 主アレルゲンの精製

1. イオン交換クロマトグラフィー；280 nmの吸光度で、非吸着画分、吸着画分にそれぞれ一つのピークが認められたが、アレルゲン活性は非吸着画分に顕著に存在した(Fig. 9)。

2. 加熱処理；非吸着画分を加熱して生じた不溶性物質を遠心分離して除くことによる活性の低下はほとんどなかった。また、処理前後の試料のSDS-PAGEでは、同処理により28 kDaのバンドがほぼ消失し、夾雑物を除去

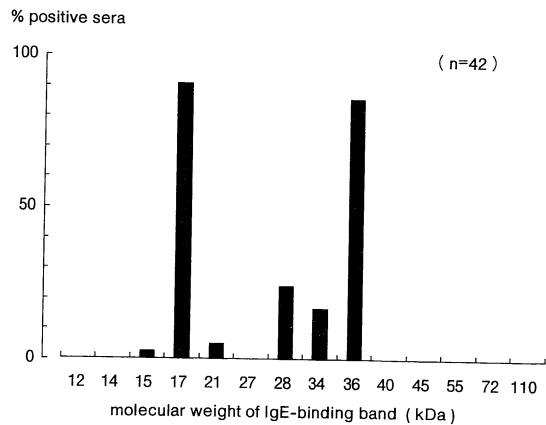


Fig. 8. Frequency distribution of patients' sera containing specific IgE antibodies to each of the SDS-PAGE-separated allergenic components of *A. sieboldiana* pollen extract.

できた。

3. ディスクプレパラティブ電気泳動；2. の上清を電気泳動して得た各画分について SDS-PAGE と ELISA 阻止試験をおこなった結果、17 kDa のタンパク質を含む fraction 16~23 に活性が認められた (Fig. 10 A, 10 B).

精製過程の各試料を SDS-PAGE した結果を Fig. 11 にまとめた。Fig. 11 lane 8 はアレルギー活性を強く認めた fraction 19 についてイムプロットをおこなったものである。これらの方法により、粗エキスはかなり精製された。

粗エキスと精製試料を ELISA 阻止試験により比較すると、50% 阻止活性で約 10 倍精製されていた (Fig. 12).

IV. オオバヤシャブシ花粉アレルゲンの物理化学的性質

1. 分子量；主アレルゲンの分子量は、SDS-PAGE で 17 kDa であった (Fig. 11).

2. 等電点；主アレルゲンの等電点は pI 5.7 であった。

3. 温度の影響；精製試料は 60°C および 80°C では失活しなかったが、100°C ではわずかに活性が低下した (Fig. 13).

4. 酸・アルカリの影響；精製試料は、Fig. 14 に示すように、pH 2.5, 4.0, 7.4, 8.5, 9.5 および 11.0 では失活しなかった。

5. N 末端からのアミノ酸シーケンス；主アレルゲンの N 末端からのアミノ酸シーケンスを Table. 1 に示した。

考 察

I. オオバヤシャブシ花粉症について

オオバヤシャブシ (Fig. 15) は植物分類学上、被子植物亜門、双子植物綱、ブナ目、カバノキ科、ハンノキ属に分類される。その植生分布は山形県以南であり、阪神地方、特に六甲山麓には砂防を目的として多数植林されている。ここでの開花期は 3 月中旬から約 1 カ月間である。

その花粉 (Fig. 16) は、幾瀬の分類⁹⁾によれば、赤道上

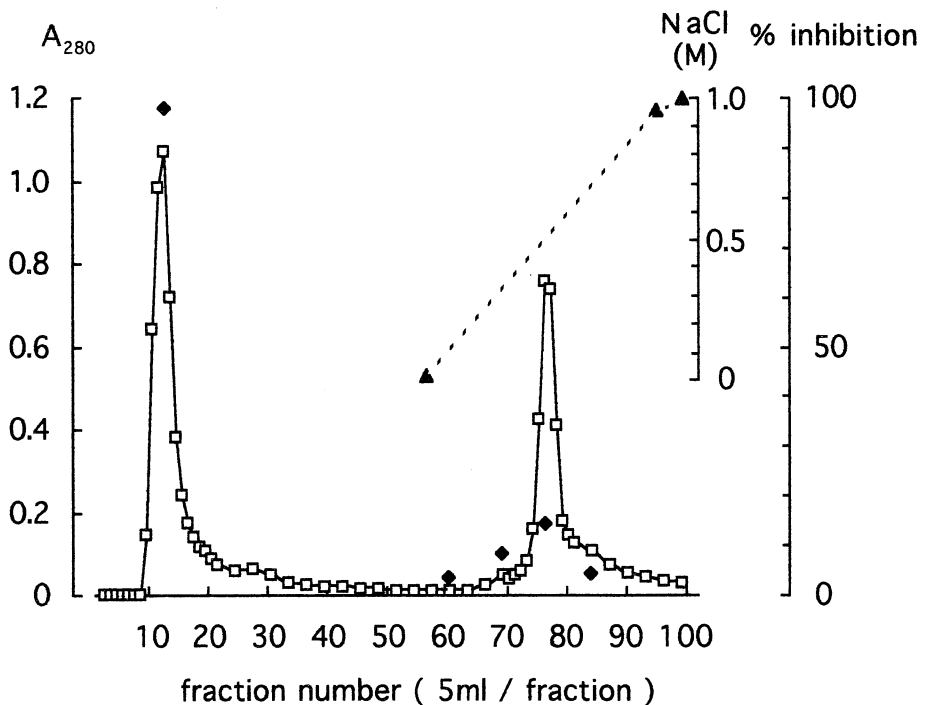


Fig. 9. Ion exchange chromatogram of the crude extract on a DEAE-TOYOPEARL 650S column. The allergenic activities of the fractions were indicated by % inhibition. □ : A₂₈₀, ▲ : NaCl (M), ◆ : % inhibition.

多数短溝型であり、管口は4ないし6個、大きさは21~23×28~31 μmである。

オオバヤシャブシ花粉症には二つの特徴がある。

一つは、花粉発生源から離れるにしたがって花粉症発症率が減少することである。吉村は、花粉発生源である六甲山麓から花粉が飛散する方向の平野部に存住する235名を対象として、オオバヤシャブシ群生地住宅地を中心に半径2 km ほどの同心円で5地区に分けて各対象のハンノキ属花粉 RAST 陽性率を検討した。その結

果、陽性率は75.0 %、43.1 %、28.6 %、25.0 %、7.4 %と、花粉発生源から離れるにしたがって花粉症発症率が減少することを報告した⁹⁾。このことより、オオバヤシャブシ花粉の空中飛散域は、スギ花粉より狭いと思われる。

スギ花粉とオオバヤシャブシ花粉の飛散距離の相異に関する詳細な報告はないが、研究室でこれらの花粉採集を試みる場合に、これらの相異を表現していると考えられる現象を経験する。すなわち、雄花が開花した状態で、スギ花粉が袋の中で広がり呈するのに対し、オオ

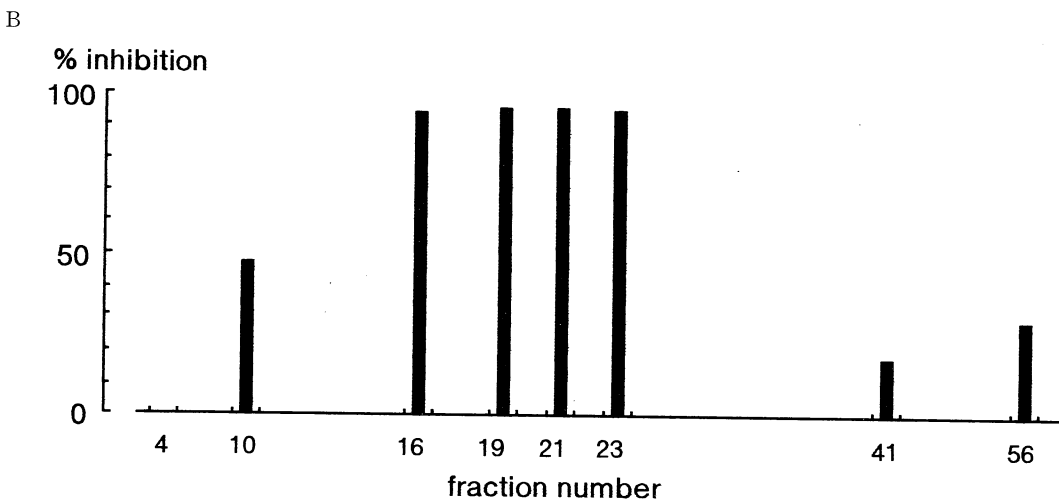
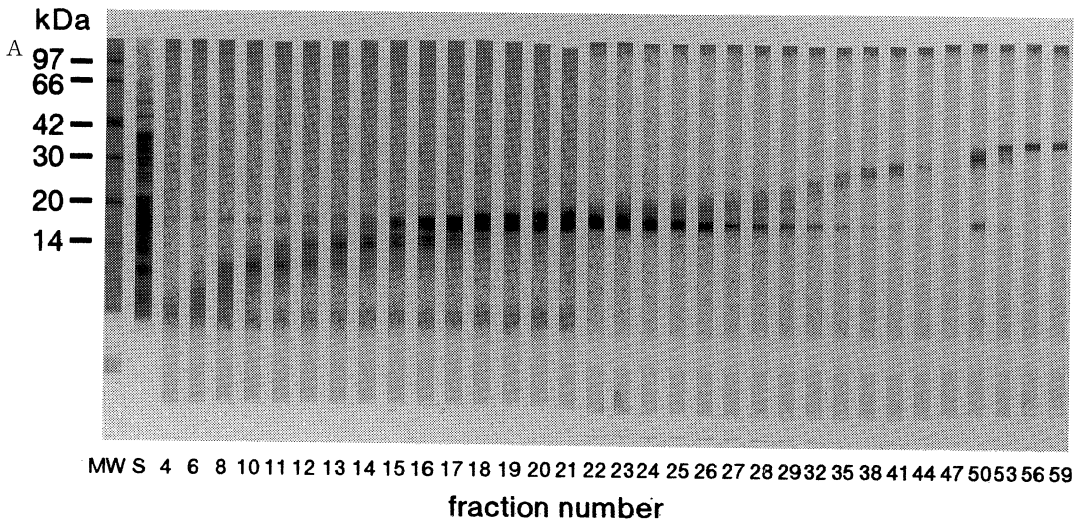


Fig. 10. A, SDS-PAGE of fractions from disk preparative electrophoresis. MW : MW marker, S : an applied sample to disk preparative electrophoresis, 4-59 indicate fraction numbers from disk preparative electrophoresis. B, The allergenic activity of the fractions. The procedure was described in "Materials and Methods".

バヤンシャブシ花粉は直下に落ちて集合することが多い、自然界でも同様のことが生じている可能性がある。

他の一つは野菜や果実と交差反応性を有することである。ハンノキ属花粉と交差抗原性が認められているカバノキ花粉に過敏な患者は、リンゴやニンジンにも過敏症を示す^{10,11)}ことや、オオバヤンシャブシ花粉症でも24.7%に食餌過敏症の合併が認められている⁹⁾。原因となる食物はリンゴ、モモ、ビワ、ナシ、イチゴ、サクランボのバラ科が多数を占め、この他にもメロン、スイカ、キュウリ、キウイ、ミカン、ゴボウ、ヤマイモ、マンゴ、アボカドなどがある。

Table 1. Comparison of the N-terminal amino acid sequences of the major allergen of *A. sieboldiana* pollen, *A. glutinosa* (Aln g 1) and *Betula verrucosa* (Bet v 1).

major allergen of <i>A. sieboldiana</i>	G-V-F-N-Y-E-H-E-T-P-
Aln g 1	G-V-F-N-Y-E-A-E-T-P-
Bet v 1	G-V-F-N-Y-E-T-E-T-T-

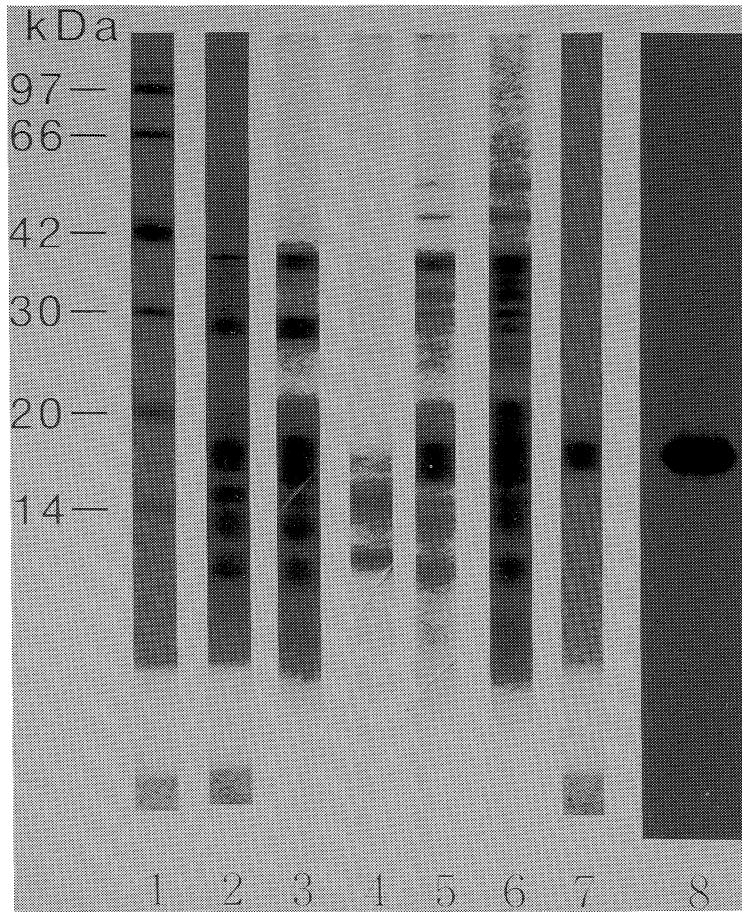


Fig. 11. SDS-PAGE of *A. sieboldiana* pollen extract and its immunoblot. lane 1-7 were stained for protein. lane 1 : MW marker, lane 2 : crude extract of *A. sieboldiana*. lane 3 : fraction 13 from ion exchange chromatography of DEAE-TOYOPEARL 650S, lane 4 : fraction 76 from ion exchange chromatography of DEAE-TOYOPEARL 650S, lane 5 : post-heated sample, lane 6 : concentrated sample, lane 7 : fraction 19 from disk preparative electrophoresis. lane 8 : immunoblot of fraction 19 from disk preparative electrophoresis after SDS-PAGE.

わが国に存在するハンノキ属植物には、オオバヤシャブシ(*Alnus sieboldiana* Matsumura)の他に、ヤシャブシ(*A. firma* Sieb. et Zucc.), ヒメヤシャブシ(*A. pendula* Matsumura), ハンノキ(*A. japonica* Steud.), ヤマハンノキ(*A. hirsuta* Turcz.), カワラハンノキ(*A. serrulatoidea* Callier)などがある。

これらのハンノキ属にはアレルゲン活性があり、また、それらのうちいくつかの間には共通アレルゲン活性が存

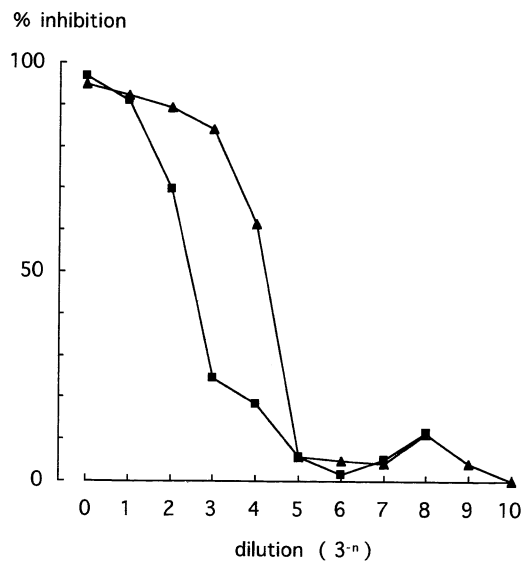


Fig. 12. IgE-ELISA inhibition curve. ■ : crude extract of *A. sieboldiana*. ▲ : fraction 19 from disk preparative electrophoresis.

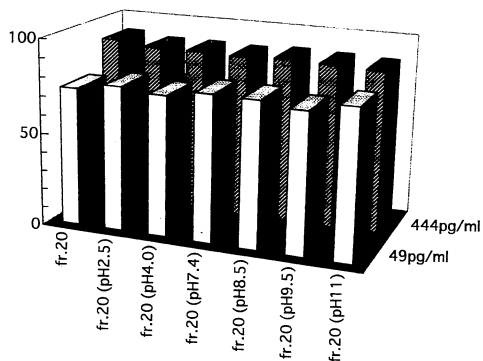


Fig. 14. Effect of pH on the allergenic activity of the purified allergenic component. The procedure was described in "Materials and Methods".



Fig. 15. Male flower of *A. sieboldiana*.

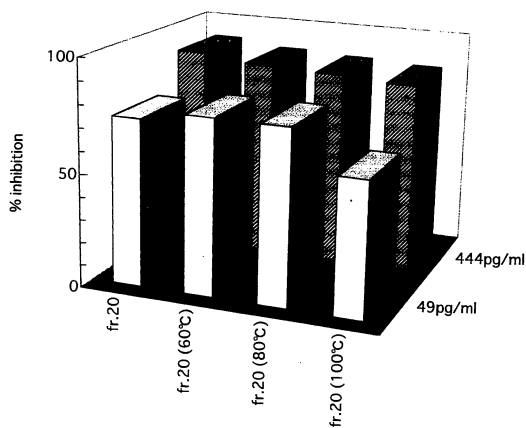


Fig. 13. Effect of heating on the allergenic activity of the purified allergenic component. The procedure was described in "Materials and Methods".

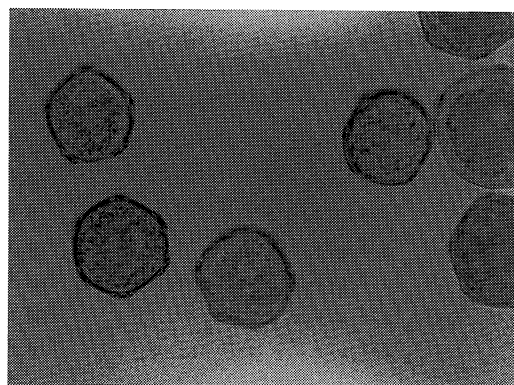


Fig. 16. Pollen of *A. sieboldiana*. Original magnification (40×10).

在することが証明されている¹²⁾が、アレルゲン分析はいずれの植物についてもこれまでおこなわれていない。

一方、北欧ではカバノキ科花粉症の頻度が高く、アレルゲン分析の研究も盛んにおこなわれている。このうちハンノキ属では、*A. incana*¹³⁾および *A. glutinosa*^{14,15,16)}についておこなわれ、アレルゲンの国際命名法^{17,18)}でも *Aln i*¹³⁾、*Aln g*¹⁶⁾として認められているが、これらはいずれも日本には存在しない。

したがって、特に阪神地方にその花粉症患者が多いオオバヤシャブシ花粉のアレルゲン分析をおこなうことは、臨床アレルギー学にも寄与するところが多々あると考えられた。

II. アレルゲンについて

粗エキス中のアレルゲンをスクリーニングする方法として、CRIE⁹⁾やFRRIE^{8,10)}が用いられてきた。著者もFRRIEを改変して酵素標識した抗IgEを用いたFREIEをおこない、IgE抗体が結合した沈降線を証明し得た。

しかし、スクリーニングの方法として、イムノプロットはそれら以上に簡便な方法である。すなわち、イムノプロットによれば、SDS-PAGEで分子量によって分離された抗原をPVDF膜に転写後、免疫染色することでIgE抗体と結合するタンパク質が容易に証明される。抗血清を用いる場合は抗IgGで標識した酵素を用いればよい。イムノプロットに要する時間は、CEIEとFEIEに比べれば1/5程度である。

以上の理由から、各精製段階でのタンパク質をSDS-PAGEで、得られた画分のアレルゲン活性をイムノプロットとIgE-ELISA阻止試験で評価した。

オオバヤシャブシ花粉から抽出した粗エキスを使ってSDS-PAGEをおこない、タンパク質染色すると14本のバンドが認められた。これをイムノプロットした結果、このうちの6本にIgE抗体の結合が認められた。最も頻度が高かったのは17 kDaで、以下36 kDa, 28 kDa, 34 kDaと続き、21 kDaと15 kDaは最もすくなかった。17 kDaのバンドはintensityも最も強く、これが主アレルゲンであると推定された。

粗エキスおよび精製画分に2-mercaptoethanolをくわえ、加熱後SDS-PAGEをおこなうと、タンパク染色してもバンドに変化がみられなかった(data not shown)ことから、各タンパク質成分はいずれも単量体であると考えられた。

III. 粗エキスの精製について

アレルゲン粗エキスの精製を目的として、まずDEAE-TOYOPEARL 650Sによるイオン交換クロマトグラフィーをおこなった。アレルゲン活性はこの緩衝液の濃度では非吸着画分に存在し、粗エキス中に含まれる色素の大部分はカラムに吸着した。非吸着画分のSDS-PAGEをおこなうと、バンドはやや鮮明になったものの、その数は粗エキスの場合と変わらなかった。

花粉に存在するアレルゲンの分離精製に用いられる基本的手技は塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過の3種類である。Vianderら¹⁴⁾は *A. glutinosa* 花粉アレルゲンの分離精製に、またFlorvaagら¹³⁾は *A. incana* 花粉アレルゲンの分離精製にゲル濾過と等電点電気泳動を利用し、イオン交換クロマトグラフィーを用いていない。Ipsenら²⁰⁾は *A. glutinosa* 花粉アレルゲンの分離精製にゲル濾過の他にCM-Sepharose, DEAE-Sepharoseを用いてイオン交換クロマトグラフィーをおこなったとしているが、その結果は記載されていない。このように、ハンノキ属花粉のアレルゲン活性成分を分離精製するのにイオン交換クロマトグラフィーはあまり有効ではなく、粗エキスに存在する色素を除去するのに有効な手段であったといえる。

次に、この試料を80°C、10分間の加熱処理をおこなうと白濁を認めた。加熱前の試料と比較して、この遠心後の上清は、28 kDaのバンドは消失したが、ELISA阻止試験によりアレルゲン活性の低下がわずかなことと、SDS-PAGEにより主アレルゲンと推定される17 kDaのバンドがほとんど変化せず、さらにこのバンドのアレルゲン活性もイムノプロットで認められた。これらにより、加熱処理がこの花粉の分離精製に有効であると考えられた。

この上清を濃縮後ディスクプレパラティブ電気泳動することにより、17 kDaの主アレルゲンを得た。このタンパク質はイムノプロットでもIgE抗体の結合が認められた。

主アレルゲンの分子量が予め推定されている場合には、ディスクプレパラティブ電気泳動はアレルゲン分析にきわめて有効な方法であり、ハンノキ属花粉のアレルゲン分析にこれを用いたのは著者が最初である。

IV. アレルゲンの物理化学的性質について

A. incana と *A. glutinosa* の主アレルゲンの分子量は、22,500¹³⁾と19,000¹⁵⁾、等電点は4.78¹³⁾と5.6¹⁵⁾あるいは5.2¹⁴⁾と報告されている。オオバヤシャブシ花粉主アレルゲンの分子量と等電点がそれぞれ17,000、5.7であったことは、これら2種のハンノキ属植物の花粉と類似して

いるようである。免疫学的にも共通するエピトープが存在するものと推定される。

カバノキ科の *Betula verrucosa* と *A. glutinosa* との間には交差抗原性が証明されている²⁰⁾。前者の主アレルゲンの一つに分子量が 15,000 のタンパク質があり、これは profilin と相同性が高いと報告されている²¹⁾が、オオバヤシャブシ花粉粗エキスをイムノプロットした結果によると、この分子量のタンパク質に IgE 抗体が結合した症例は 42 名中 1 名にすぎなかった。

オオバヤシャブシ花粉の N 末端より 10 個のアミノ酸シーケンスは、*A. glutinosa* 花粉¹⁶⁾とは 7 番目以外は同じであり、*B. verrucosa* 花粉¹⁶⁾とは 7 番目と 10 番目以外は同じであり (Table. 1), N 末端アミノ酸シーケンスの相同性が高いことが示唆された。

V. 花粉中のアレルゲン活性物質の局在部位について

花粉症は即時型反応である。すなわち、花粉が生体内に侵入すると数分以内にアレルゲン活性物質が溶出し、抗原抗体反応が生じる。それでは、アレルゲン活性物質は花粉内のどの部分に局在するのであろうか。

スギ花粉とヒノキ花粉の主アレルゲンは、コロイド金による免疫電顕法での検討の結果 Ubish body, sexine, nexine に存在することが証明されている²²⁾。すなわち、これら主アレルゲンは細胞質には存在しないと報告されている。*A. incana* 花粉においては、同じ方法を用いた Grote らによるとアレルゲンは exine にもっとも多く存在し、細胞質や管口にも少し認められたと述べている²³⁾。このように、植物の種類によって、花粉中のアレルゲン局在部位に相異がみられることは興味深い。

以上、筆者はオオバヤシャブシ花粉の主アレルゲンが 17 kDa, pI 5.7 のタンパク質で、熱や酸、アルカリに対して安定な物質であることを示した。今後、遺伝子工学手技を用いて全アミノ酸シーケンスを決定するとともに、そのエピトープも決定したいと考えている。

ま と め

筆者は、阪神地方にその花粉症発症例が多いオオバヤシャブシ花粉のアレルゲン分析をおこない、次の結果を得た。

1) 粗エキスをイオン交換クロマトグラフィー、加熱、ディスクプレバラティブ電気泳動によって精製した結果、主アレルゲンの分子量は 17 kDa で、等電点は 5.7 であった。

2) この主アレルゲンに対し、オオバヤシャブシ花粉症患者 42 名中 38 名 (90%) に IgE 抗体の結合が認められ

た。

3) この主アレルゲンは熱、酸、アルカリに対して安定であった。

4) この主アレルゲンの N 末端から 10 個のアミノ酸シーケンスは、日本に存在しないハンノキ属である *Alnus glutinosa* のそれと 7 番目以外一致していた。

本論文の要旨は、第 227 回日耳鼻大阪地方連合会 (1988. 12. 3, 大阪市)、第 232 回日耳鼻大阪地方連合会 (1990. 3. 17, 大阪市)、第 233 回日耳鼻大阪地方連合会 (1990. 6. 23, 大阪市)、第 234 回日耳鼻大阪地方連合会 (1990. 9. 1, 大阪市)、第 40 回アレルギー学会総会 (1990. 11. 15, 長崎市)、第 248 回日耳鼻大阪地方連合会 (1994. 3. 5, 大阪市)、日本花粉学会第 36 回大会 (1995. 10. 28, 東京都) で講演したものである。

御指導、御校閲いただいた奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室松永 喬教授に謝意を表します。同じく御指導いただいた奈良県立医科大学第 2 内科学教室成田亘啓教授、同皮膚科学教室白井利彦教授に感謝いたします。本研究は奈良県立医科大学化学教室との協同研究の一部であり、御指導いただいた同教室田端司郎教授に感謝いたします。実験にあたり直接御指導いただいた化学教室井手 武助手、山本恵三助手、耳鼻咽喉科学教室芦田恒雄非常勤講師に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 中原 聰, 芦田恒雄, 衛藤幸男, 吉川恒男, 井手武, 田端司郎: オオバヤシャブシ花粉症の 1 例とその疫学調査. アレルギー 39: 104-109, 1990.
- 2) 井手 武, 松村有嘉子, 岡崎 旦, 芦田恒雄, 衛藤幸男, 吉川恒男: 風媒花樹木の成熟花粉採集法. 花粉誌. 35: 39-42, 1989.
- 3) 吉川恒男, 衛藤幸男, 松永 喬, 芦田恒雄, 井手武, 田端司郎: Bicinchoninic Acid による花粉抗原中のタンパク質微量定量法. 花粉誌. 35: 35-38, 1989.
- 4) 芦田恒雄, 井手 武, 衛藤幸男: 花粉アレルギー実験法. 花粉誌. 39: 71-79, 1993.
- 5) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227: 680-685, 1970.
- 6) Lφwenstein, H.: Quantitative immunoelectrophoretic method as a tool for the analysis and isolation of allergen. Prog. Allergy 25: 1-62,

- 1978.
- 7) **Tabata, S., Ide, T., Umemura, Y. and Torii, K.** : Purification and characterization of α -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **797** : 231-238, 1984.
 - 8) 幾瀬マサ : 日本植物の花粉. 広川書店, 東京, p61-61, 1956.
 - 9) 吉村史郎 : 六甲山麓のオオバヤシャブシ花粉症. 耳鼻臨床 **86** : 1715-1721, 1993.
 - 10) **Lahti, A. and Hannuksela, M.** : Hypersensitivity to apple and carrot can be reliably detected with fresh material. *Allergy* **33** : 143-146, 1978.
 - 11) **Calkhoven, P. G., Aalbers, M., Koshte, V. L., Pos, O., Oei, H. D. and Aalberse, R. C.** : Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross-reactive structures. *Allergy* **42** : 382-390, 1987.
 - 12) 小笠原 寛, 吉村史郎, 中原 聡, 藤谷哲造, 榎本 雅夫 : オオバヤシャブシ特異 IgE 抗体測定と共通抗原性. 花粉誌. **38** : 134-139, 1992.
 - 13) **Florvaag, E., Elsayed, S. and Apold, J.** : Comparative studies on tree pollen allergens II. Isolation of alder (*Alnus incana*) pollen allergens : Purification and some characteristics of the major allergen pI 4.78. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **67** : 49-56, 1982.
 - 14) **Viander, M., Fräki, J., Djupsund, M. and Laine, S.** : Antigens and allergens in birch pollen extract. *Allergy* **34** : 289-302, 1979.
 - 15) **Ipsen, H., Bøwadt, H., Janniche, H., Nüchel Petersen, B., Munch, E. P., Wihl, J.-Å and Løwenstein, H.** : Immunochemical characterization of reference alder (*Alnus glutinosa*) and hazel (*Corylus avellana*) pollen extracts and the partial immunochemical identity between the major allergens of alder, birch and hazel pollens. *Allergy* **40** : 510-518, 1985.
 - 16) **Breiteneder, H., Ferreira, F., Reikerstorfer, A., Duchene, M., Valenta, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Ebner, C., Breitenbach, M., Kraft, D. and Scheiner, O.** : Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli* of *Aln g I*, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.* **90** : 909-917, 1992.
 - 17) **Marsh, D. G., Goodfriend, L., King, T. P., Løwenstein, H. and Platts-Mills, T. A. E.** : Allergen nomenclature. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **64** : 767-770, 1986.
 - 18) **King, T. P., Hoffman, D., Løwenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A. E. and Thomas, W.** : Allergen nomenclature. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **105** : 224-233, 1994.
 - 19) **Harboe, N. M. G. and Svendsen, P. J.** : Fused rocket immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* **17**(Suppl. 10) : 107-111, 1983.
 - 20) **Ipsen, H. and Hansen, O.C.** : The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) *Aln g I*, birch (*Betula verrucosa*) *Bet v I*, hornbeam (*Carpinus betulus*) *Car b I* and oak (*Quercus alba*) *Que a I* pollens. *Mol. Immunol.* **28** : 1279-1288, 1991.
 - 21) **Valenta, R., Duchêne, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D. and Scheiner, O.** : Identification of profilin as a novel pollen allergen ; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* **253** : 557-560, 1991.
 - 22) **Takahashi, Y., Ide, T., Ashida, T., Tabata, S. and Araki, T.** : Major allergens of Hinoki- and Sugi-pollen exist on their grain wall. *Jpn. J. Palynol.* **38** : 51-57, 1992.
 - 23) **Grote, M., Vik, H. and Elsayed, S.** : Immunoelectro-microscopic identification and localization of the antigenic proteins of tree pollen grains. *Allergy* **43** : 603-613, 1988.