

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3713030号

(P3713030)

(45) 発行日 平成17年11月2日(2005.11.2)

(24) 登録日 平成17年8月26日(2005.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53

// CO 7 K 16/16

F I

GO 1 N 33/53

D

GO 1 N 33/53

Q

CO 7 K 16/16

Z N A

請求項の数 1 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2003-287764 (P2003-287764)

(22) 出願日 平成15年8月6日(2003.8.6)

(65) 公開番号 特開2005-55348 (P2005-55348A)

(43) 公開日 平成17年3月3日(2005.3.3)

審査請求日 平成15年10月17日(2003.10.17)

(73) 特許権者 591108178

秋田県

秋田県秋田市山王4丁目1番1号

(74) 代理人 100062007

弁理士 川口 義雄

(74) 代理人 100113332

弁理士 一入 章夫

(74) 代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低アレルギースギ選抜に関する高精度Cryj 1免疫測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Cryj 1を含み得るスギ花粉から調製したスギ花粉抽出液を80℃で1分～3分間加熱処理し、スギ花粉タンパク質Cryj 1のアミノ酸配列DNPIDSCWRGを認識する第一の抗体、及びスギ花粉タンパク質Cryj 1のアミノ酸配列FTGHDDAYSDDKSMKVTを認識する第二の抗体を用いてサンドイッチイムノアッセイに供することを含み、前記第一の抗体がAnti-Cryj I mAb 026であり、前記第二の抗体がAnti(MAP)CryJ 1である、スギ花粉タンパク質Cryj 1の高精度検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アレルギーの少ないスギの選抜に有用な新たなスギ花粉アレルギーのイムノアッセイ法に関する。

【背景技術】

【0002】

スギ花粉症は、スギ花粉を原因とするアレルギーで、近年、患者数の増加とともに大きな社会問題になっている。この花粉症患者が増加した理由には、車社会の発達によって増加したディーゼル排出粒子にアジュバント作用があることや、都市化に伴って生活環境が衛生になったため、人間の免疫防御システムが変化し、アレルギーになりやすくなったな

どが考えられている。

【 0 0 0 3 】

また、直接的な原因としてスギ飛散花粉の増加が考えられる。国内では、1950年代から70年代にかけて、木材生産を向上させるためにスギの造林が急増した。現在、これらのスギが開花樹齢に達してスギの飛散花粉が増加し始めている。

【 0 0 0 4 】

林業サイドからのスギ花粉症対策として、花粉の少ないスギの選抜に関する研究が始まっている。秋田県を含む東北地方では11系統が選抜され、中でも、生長、病虫害抵抗性などを考慮して多数の候補木から選抜した精英樹から生産される種子が、広く植林に供給されてようとしている。

10

【 0 0 0 5 】

これまでは、スギ種子生産の採種園には種子生産性と遺伝的多様性を高めるために花粉生産性が高い系統を積極的に用いてきた。しかし、スギ花粉症との関係で花粉量とアレルゲン量を総合して考えれば、花粉が多くてもアレルゲンが少ない、あるいは花粉が少なくかつアレルゲンが少ない精英樹が選抜されれば、花粉症対策として有効と考えられる。

【 0 0 0 6 】

スギ花粉症の原因物質であるアレルゲンは、花粉の表面と内部に存在する2種類のタンパク質Cryj1(非特許文献1)とCryj2(非特許文献2)である。このスギ花粉症アレルゲンに関する研究により、Cryj1含量とCryj2含量には1%水準で有意な相関が認められることが報告されている(非特許文献3)。このことは、Cryj1を測定対象とすることによっ

20

【 0 0 0 7 】

Cryj1の定量は、免疫測定法の一種であるサンドイッチELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)によって行われることが一般的である。しかしながら、これまでの方法では、Cryj1を完全に定量することが出来なかった(非特許文献4、5、)。そのため、あるスギのアレルゲン性について不正確な評価を与えることがあった。

【 0 0 0 8 】

また、Cryj1のポリクローナル抗体で固相化したマイクロプレートに花粉抽出液を加え、反応部域が異なる2種類のマウスのモノクローナル抗体で検出する方法が報告されている(非特許文献4)。

30

【非特許文献1】Yasueda, H., Yui, Y., Schimizu, T. and Shida, T. J. Allergy Clin. Immunol. 71: 77-86 (1983)

【非特許文献2】Sakaguchi, M., Inoue, S., Taniai, M., Ando, S., Usui, M. and Matsuhashi, T., Allergy 45: 309-312 (1990)

【非特許文献3】佐々木義則, 谷口美文, 正山征洋、大分県研究時報 22: 8~12 (1996)

【非特許文献4】後藤陽子, 近藤禎二, 井手 武, 山本恵三, 稲岡 心, 安枝 浩、第113回 日林学術講: 330 (2002)

【非特許文献5】高橋裕一, 安部悦子, 三浦直美, 荒木龍平, 安枝 浩, 阪口雅弘、花粉誌 48: 103~107 (2002)

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

しかし、これらの方法では、依然としてCryj1の正確な量を測定するまでには至っておらず、また各系統に対して2とおりの測定が必要となり、抗体の調製に技術や時間を要する点等の問題があった。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、スギ花粉症対策として花粉の少ないスギを選抜するという試みに有効な、アレルゲンの少ない杉を的確かつ簡便に選別する方法の開発を目的として研究を重ねた結果、Cryj1の特定の部位に結合し得る抗体を組み合わせることで、かかる課題

50

を解決し得ることを見出した。

【0011】

すなわち、本発明は、スギ花粉タンパク質Cryj1のアミノ酸配列DNPIDSCWRGを認識する第一の抗体、及びスギ花粉タンパク質Cryj1のアミノ酸配列FTGHDDAYSDDKSMKV Tを認識する第二の抗体を用いることを特徴とする、スギ花粉タンパク質Cryj1のサンドイッチイムノアッセイ方法に関する。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、スギ花粉中のCryj1の全量を正確に定量することが出来、アレルギーの少ない杉を的確かつ簡便に選別することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明で使用する第一の抗体は、Cryj1のアミノ酸配列DNPIDSCWRGで表される抗原決定基を認識し結合する抗体である。具体的には、Kawashimara (Int. Arch. Allergy Immunol., 98巻、110~117頁、1992年)により報告され、「Anti-Cryj1 mAb 026」としてアサビール薬品株式会社から市販されている抗スギ花粉タンパク質Cryj1モノクローナル抗体である。

【0014】

また、本発明で使用する第二の抗体は、スギ花粉タンパク質Cryj1のアミノ酸配列FTGHDDAYSDDKSMKV Tで表される抗原決定基を認識し結合する抗体である。特に、当該アミノ酸配列からなる合成ペプチドを抗原として誘導され、「Anti(MAP)Cryj1」として株式会社エル・エス・エルから市販されている抗スギ花粉タンパク質Cryj1モノクローナル抗体である。

20

【0015】

本発明では、Cryj1を含む花粉抽出液は、予めこれを加熱処理、好ましくは80℃以上で加熱処理することが好ましい。50℃以下の加熱処理では、Cryj1と本発明で使用する第二の抗体との反応性は低くなる傾向にある(図1)。また、加熱処理の時間は、短くても長くても本発明で使用する抗体とCryj1との反応性を低下させる恐れがある。具体的には、加熱処理の時間としては1~3分が、短時間(例えば30秒間程度)あるいは長時間(5分以上)の何れに対しても、反応性の点で有利である(図2)。

30

【0016】

また、本発明のイムノアッセイ方法、特に第一及び第二の抗体にそれぞれ上記の好ましい2種の抗体を使用したイムノアッセイ方法は、精製Cryj1を対照とした場合、150 ng/mLのCryj1まで、比色定量において直線性を示す(図3)。この直線性は、スギの代表的な3系統、すなわち雄勝1号、雄勝9号、及び平鹿1号から得られるいずれの場合においても、花粉抽出液量4~5 µL/wellの範囲において確認することができる。この結果は、ごく少量のスギ花粉からでもCryj1を有効に検出し測定できることを意味する。

【0017】

以下、非限定的な実施例により、本発明をさらに詳述する。

40

【実施例】

【0018】

スギ精英樹より採取し4℃で冷蔵保存した花粉20mgに1 mLの0.125M NaHCO₃を加え、41時間で抽出し、15,000rpm、10分の遠心分離を行ったのち、得られた上清100 µLをエッペンドルフチューブに分注し、80℃で2分間の加熱処理をウォーターバスで行って、スギ花粉アレルギーを調製した。

【0019】

第一の抗体としての一次抗体(マウスモノクローナル抗体anti-Cryj1 mAb 026、Hayashibara製)を、TBS(20mM Tris-HCl (pH7.5)、500mM NaCl)で100倍希釈した100 µLを、4

50

で1晩、マイクロプレートに吸着させた。ブロッキングは5%BSA(アルブミンフリー, Sigma製)を含む200 μ LのTBSで一昼夜行った。TBSで3回洗浄後、抽出液の上清を0.125M NaHCO₃で希釈し、マイクロプレートに100 μ Lを分注し、4で1晩おいた。TBSで3回洗浄後、第二の抗体としての二次抗体(ウサギモノスペシフィックポリクローナル抗体Anti (MAP) Cryj1、LSL)を37で1時間、あるいは4で一晩、反応させた。

【0020】

TTBS(0.05% Tween 20を含むTBS)で3回、さらにTBSで3回洗浄後、0.2%BSAを含むTBSで1,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギヤギIgG抗体(Cappel)を、37で1時間反応させた。TTBSで3回、さらにTBSで3回洗浄後、BluePhosキット(KPL)で発色および発色反応を停止し、655nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Model 550, Biorad)で測定した(図4)。

【0021】

この方法により、スギ精英樹より採取した花粉は、1gあたり93~630 μ gのCryj1を含むことが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0022】

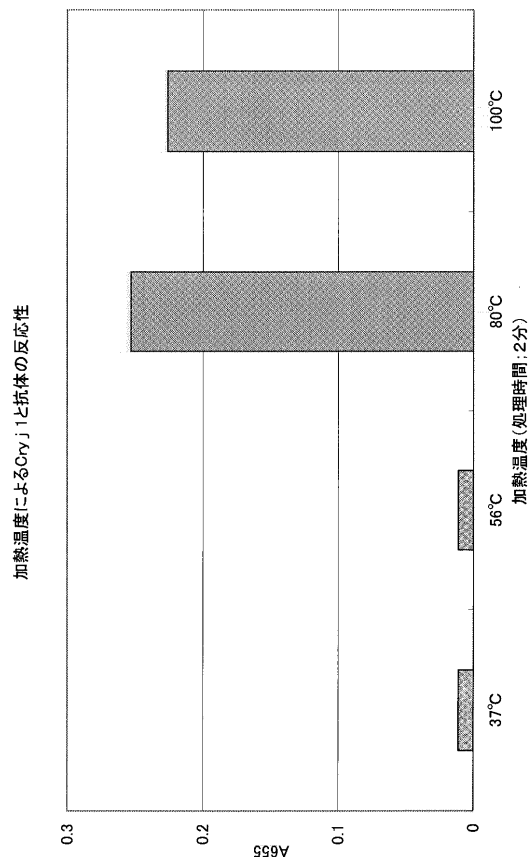
【図1】図1は、スギ花粉抽出の加熱処理の処理温度と本発明の方法における検出感度との関係を示す。

【図2】図2は、スギ花粉抽出の加熱処理の処理時間と本発明の方法における検出感度との関係を示す。

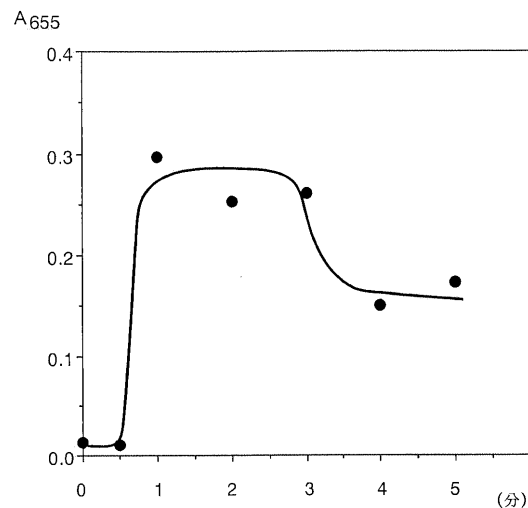
【図3】図3は、精製Cryj1を用いた場合の本発明の検出感度を示す。

【図4】図4は、本発明によるCryj1の定量結果を示す。

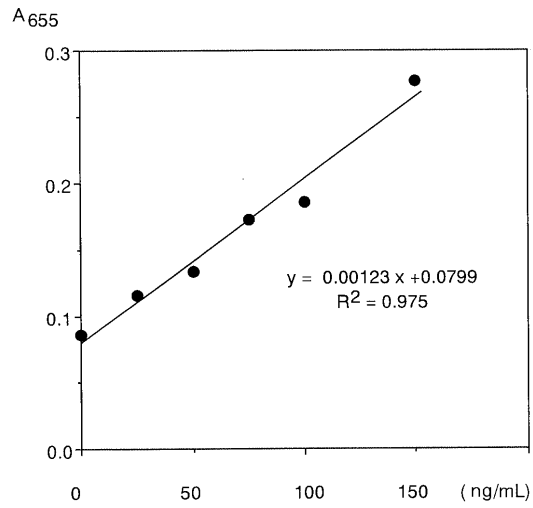
【図1】



【図2】



【図 3】



【図 4】

精英樹系統名	μg Cry I/g 花粉
平鹿 1	9.3
雄勝 1	24.5
平鹿 3	25.3
平鹿 2	25.8
北秋田 4	31.7
鹿角 3	43.7
鹿角 2	44.7
北秋田 13	50.5
雄勝 2	57.5
雄勝 14	59.8
雄勝 9	63.0

フロントページの続き

(72)発明者 佐々木 揚

秋田県河辺郡河辺町戸島字井戸尻台47-2 秋田県森林技術センター内

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特開平04-335896(JP,A)

Tomoko Kawashima, Int Arch Allergy Immunol., 1992年, vol.98, p.110-117

Anti(MAP)Cry j-1, カタログNo. LB-5201, 株式会社エル・エス・エル, 1999年

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 33/53

专利名称(译)	用于低过敏性雪松选择的高精度Cryj1免疫分析		
公开(公告)号	JP3713030B2	公开(公告)日	2005-11-02
申请号	JP2003287764	申请日	2003-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	秋田县		
申请(专利权)人(译)	秋田县		
当前申请(专利权)人(译)	秋田县		
[标]发明人	佐々木 揚		
发明人	佐々木 揚		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/16		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.Q C07K16/16.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA54		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
审查员(译)	宫泽浩		
其他公开文献	JP2005055348A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为Cryj1提供一种简单而准确的免疫分析方法，Cryj1是一种雪松花粉过敏原蛋白。溶液：雪松花粉蛋白Cryj1的夹心，其特征在于使用识别雪松花粉蛋白Cryj1的氨基酸序列DNPIDSCWRG的第一抗体和识别雪松花粉蛋白Cryj1的氨基酸序列FTGHDDAYSDDKSMKVT的第二抗体。免疫分析方法。【选择图表】无

【 図 2 】

