

〔原 著〕

空中スギ花粉抗原の定量的測定

—重力法, イムノブロット法の比較と気象因子の影響—

富山医科薬科大学医学部小児科学教室, *富山赤十字病院小児科

高野雅子 村上巧啓* 松野正知

尾上洋一 高柳 幹 萱原昌子

足立陽子 足立雄一 岡田敏夫

富山医科薬科大学公衆衛生学教室

劔田幸子 寺西秀豊

1991年3月から7月まで, Burkard 型捕集器にて花粉抗原を採取し, polyclonal 抗 *Cry j I* 抗体を用いて *Cry j I* スポットを発色させ, デンシトメーターおよび画像解析装置を用いて定量化しその変動をみた。これを従来主として使用されている Durham 型花粉捕集器による重力法の結果と比較検討, また気象因子との関連性についても検討を加えた。Durham 型花粉捕集器によるスギ+ヒノキ科花粉は3月の中旬からピークを認め4月中旬以後徐々に減少していた。これに対してデンシトメーターおよび画像解析装置によるスポットは飛散終了後も高値を維持しており, 変動に大きな相違があった。この原因としては交差抗原性を有する他の樹木花粉や破碎されて形態学的に同定不能となった花粉粒子が考えられた。飛散開始から4月中旬までのほぼ同様の変動パターンを示している期間では, スギ花粉飛散の季節的影響を考慮し, 近似する二次回帰曲線による期待値との差を標準化し, 比較したところ $r=0.699$, $p<0.0001$ と有意な相関を認め両者は同様の環境因子により変動していると考えられた。気象因子の影響は, Durham 花粉捕集器による花粉数では降雨量と負の, 平均風速と正の相関を認め, 画像解析装置によるスポットでは降雨量と負の相関を認めた。

Key words: airborne pollen — Burkard — *Cry j I* — immunoblotting

はじめに

これまで空中スギ花粉量の測定法としては, Durham 型花粉検索器による重力法が主として用いられてきたが, その問題点として, 熟練を要すること, 気象因子の影響を受けやすいことなどがあげられる。また形態学的に同定不能であっても主要感作抗原と考えられている *Cry j I* を含む破碎された花粉抗原粒子が存在する場合, これを測定できない可能性もある。immunoblot 法による花粉抗原の定量化は熟練を必要とせず, 将来の自動測定の可能性を有しており, また破碎された花粉抗原粒子も抗体の選択によっては可能である。今後, この方法が有用だと思われるが, 従来の Durham 型花粉捕集器による重力法との関連を見る必要があると考えられる。しかしそれを比較検討した報

告はない。

よって今回我々は, Burkard 型花粉捕集器にて採取した空中 *Cry j I* 抗原粒子を, Schumacher らの fluorescence immunoblotting 法¹⁾を改良した高橋らの方法²⁾に準じて, ニトロセルロース膜に転写させ, 一次抗体としてポリクローナル抗 *Cry j I* ウサギ抗体を用い発色させ, 画像解析装置とデンシトメーターで定量化した。その経時的変動, および同時に Durham 型花粉捕集器で採取したスギ, ヒノキ科飛散花粉数との関連性や気象因子による影響について検討した。

材料と方法

1) 花粉飛散数の測定

1991年2月より7月まで, 富山医科薬科大学屋上に Durham 型標準花粉検索器を設置し重力法により花粉飛散数を調査した。スライドグラスにワセリンを塗布

Received: January 18, 1993

Accepted: April 8, 1993

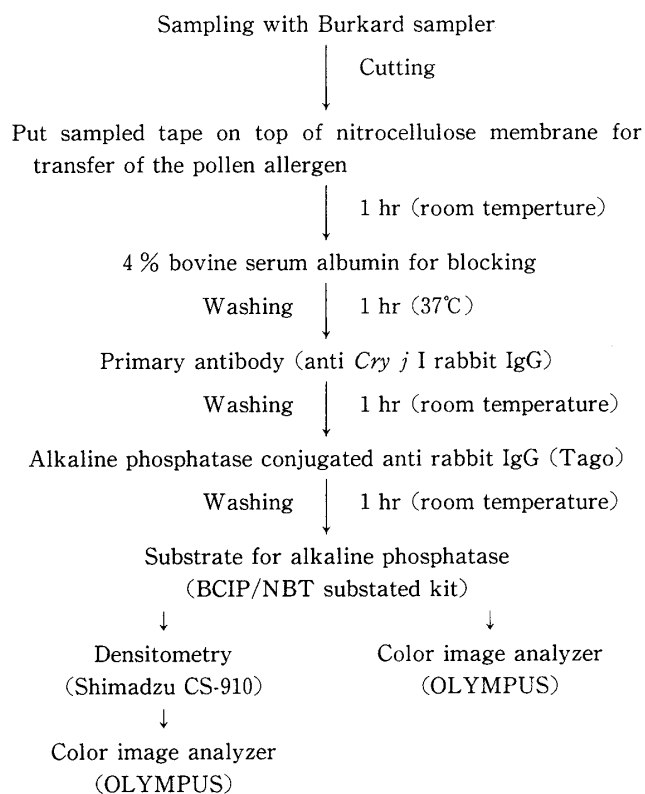


Fig. 1. Procedure for immunoblotting.

し朝9時より24時間落花粉を採取し、染色固定はGVグリセリンゼリー（ゼラチン10g, グリセリン60ml, 蒸留水35ml, 0.2%アルコールメチル紫1ml, 液状フェノール0.5ml）を用いて1×1cmのカバーガラス中の花粉数を顕微鏡下で数えた。

2) immunoblotting による定量的測定

Burkard型花粉捕集器で採取した花粉抗原を、Schumacherらのfluorescence immunoblotting法¹⁾を改良した高橋らの方法²⁾に準じ染色し、画像解析装置とデンストメーターで定量化した（Fig. 1）。1991年2月より7月まで、富山医科薬科大学屋上にBurkard型捕集器を設置し、専用ドラムにMedical Adhesive Silicon Type A（Dou CORNING CORP., U.S.A.）を薄く塗り1週間で1回転するタイマーを用いて、10 l/hrで吸引し試料捕集を行った。捕集後のテープを1日毎に切断しblotting buffer（20% methanol含有の25mM/l Tris, 192mM/l glycine, pH 8.3）でニトロセルロース膜に1時間室温で転写した。転写後、ニトロセルロース膜を4%ウシ血清アルブミン（BSA）含有のTris Buffered Saline（20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.5, TBS）で、37°Cで1時間blockingし、0.2% Tween 20を含むTBS（TBS Tween）で洗浄後、

抗Cry j-IウサギIgG（TBSで1000倍に希釈し蛋白量は2ng/ml）を一次抗体として室温で1時間反応した。TBS Tweenで10分ずつ3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識F(ab')₂抗ウサギIgG（Lot No. 0701, Tago, U.S.A.）をTBSで1000倍希釈した二次抗体で室温で1時間反応させた。再び、TBS Tweenで10分ずつ3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ染色用のBCIP/NBT substrate system（Kirkegaard & Perry Laboratories, U.S.A.）で染色し青紫色のスポットを得た。なお抗Cry j-IウサギIgGは、国立相模原病院の安枝 浩博士より御供与戴き、スギおよびヒノキ科花粉と反応することが確かめられている。

得られたスポットを1日毎にオリンパス社製の画像解析装置CIA102で処理し、1日毎のスポットの面積を測定し、これを画像解析装置によるCry j-Iスポットとした。また、デンストメーター（Shimadzu cs-910）を用いて490nmの吸光度で得られた曲線と基線に囲まれた部分の面積を画像解析装置CIA102で求めデンストメーターによるCry j-Iスポットとした。

3) 気象因子についての検討

気象条件についての検討は、1991年3月1日から7月31日まで富山地方気象台より入手した気象観測月表をもとに測定日の前日と当日の2日間各々の降水量、平均風速、平均気温の3因子について行った。

4) 統計学的検討

画像解析装置およびデンストメーター両者によるCry j-Iスポットとスギ、ヒノキ科花粉飛散数のそれぞれの相関は、1991年3月1日から4月30日の測定値において求め、その有意差検定は、Student's t-testを用いて行った。3つの気象因子がCry j-Iスポット、あるいはDurham型花粉捕集器によるスギ、ヒノキ科花粉数により強く影響を与えるかという点についての検討は、花粉の飛散の季節的な影響を除外するため、Cry j-Iスポットおよび花粉飛散数の二次回帰曲線による期待値との差を標準化し、重回帰分析の変数減増法を用いて検討した。平均気温は季節的変動の影響を除外するため測定日前後1週間の平均値および標準偏差を算出し個々の値を規準化して用いた。

結 果

1) 飛散花粉数およびCry j-Iスポットの変動

画像解析装置およびデンストメーターによるスポッ

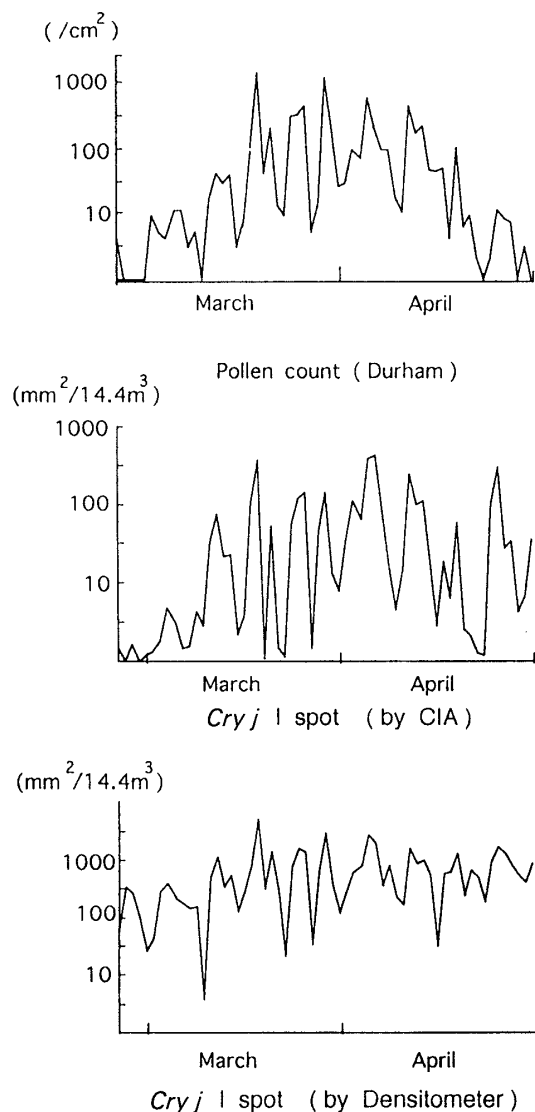


Fig. 2. Fluctuation of pollen count and *Cry j* I spot from March to April, 1991.

トと、スギ+ヒノキ科飛散花粉数の3月から4月の変動をFig. 2に示す。スギ+ヒノキ科飛散花粉数は、3月の中旬よりピークを認め4月の中旬より徐々に減少していたが画像解析装置およびデンストメーターによる*Cry j* Iスポットは、3月中旬に増加した後、日によつての格差はあるものの4月下旬でも高値を維持していた。免疫ブロット法で得られた同じスポットを定量化する2つの方法間での差は花粉飛散開始時の3月初旬で大きくなっていた。デンストメーターと画像解析装置による*Cry j* Iスポットの間には $r=0.721$ と有意の正の相関を認め、また両者ともスギ+ヒノキ科飛散花粉数とそれぞれ $r=0.624$, $r=0.555$ と有意の正の相関を認めた。

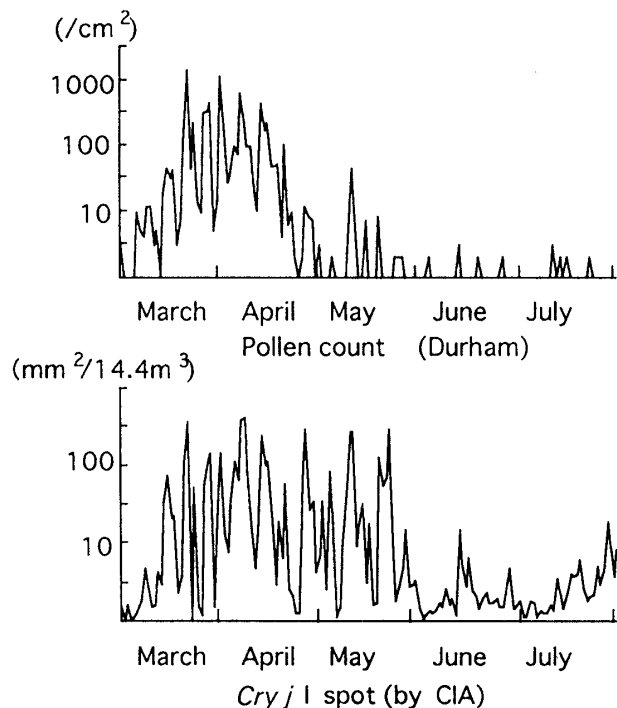


Fig. 3. Fluctuation of pollen count and *Cry j* I spot from March to April, 1991.

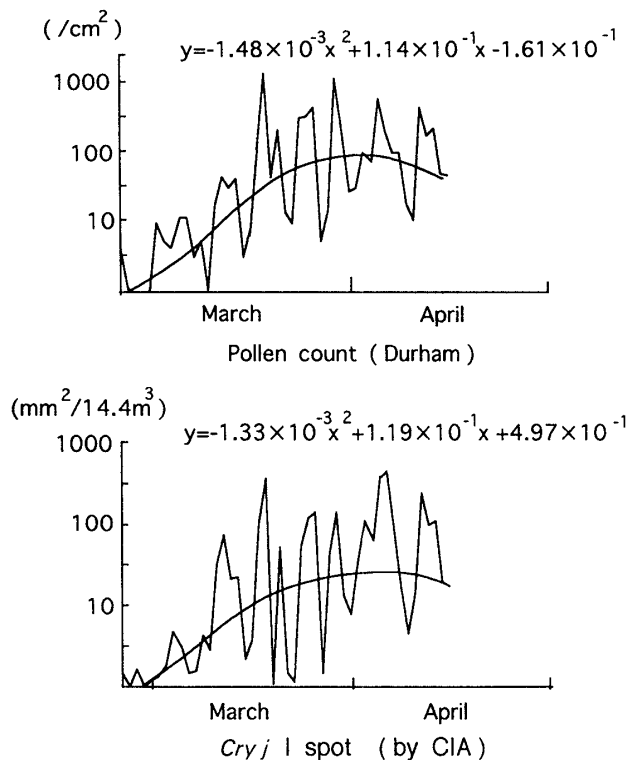


Fig. 4. The regression curve of pollen counts and *Cry j* I spot.

次に画像解析装置による*Cry j* Iスポットとスギ+ヒノキ科飛散花粉数の7月までの変動を追ったものを

Fig. 3に示す。画像解析装置による *Cry j* I スポットはスギ+ヒノキ科飛散花粉数の減少している4月中旬から5月にかけても高値を示していた。

2) *Cry j* I スポットと飛散花粉数および気象因子との関連性

気象条件との関連性は、花粉飛散の季節的影響を考慮し、3月のはじめから4月の中旬までの期間で Fig. 4のように二次回帰曲線を求め、この差を標準化したものを用いてその変動を検討した。画像解析装置による *Cry j* I スポットと Durham 型花粉捕集器による花粉数の変動は有意な相関 ($r=0.699$, $p<0.0001$) を認め、両者の変動に対して共通する因子が影響していると考えられた。また気象因子との重回帰分析法での検討では、Table 2に示すように、*Cry j* I スポットは降

雨量と負の相関を(標準偏回帰係数 -0.544 , 偏相関係数 -0.548)認め、Durham 型花粉捕集器による花粉数は降雨量と負の相関(標準偏回帰係数 -0.375 , 偏相関係数 -0.389)を、平均風速とは正の相関(標準偏回帰係数 0.282 , 偏相関係数 0.304)を認めた。

考 案

近年、スギ花粉症患者の増加に伴い³⁾⁴⁾、スギ飛散花粉数の測定が各地で行われており、その採取方法としては Durham 型花粉捕集器による重力法が主に用いられているが欠点として気象条件の影響を受け易いと言われている⁵⁾⁶⁾。これに対してヨーロッパなどでは Burkard 型花粉捕集器による標準化が進んでいる。

今回、我々は Burkard 型花粉捕集器により空中花粉抗原を採取し、これをスギの主要抗原である *Cry j* I に対する polyclonal 抗体を用いて高橋らの方法²⁾に準じてスポットとして発色させデンストメーターおよび画像解析装置の2つの方法を用いて定量化した。この結果と同地点で Durham 型花粉捕集器による花粉飛散数の変動とを比較した。

本法では、発色したスポットを画像解析装置で自動的に読み取らせるため、顕微鏡で染色した花粉を計測する従来の方法に比べて、熟練を必要としないという利点も有している²⁾。

結果は、Burkard 型捕集器により採取した、画像解析装置及びデンストメーターによるスポットは両者とも Durham 型花粉捕集器による花粉数と有意な相関を示したが、両者とも飛散時期を過ぎても高値を維持する傾向がみられた。この傾向はデンストメーターによるスポットでより高く認められた。高橋らは花粉症患者の原因物質量の把握という面から青紫色に発色したスポットをデンストメーターで比色定量する方法が画像解析装置で定量するより優れているのではないかと推察している²⁾。今回の検討では飛散時期の前でもデンストメーターでの値が高かった。この原因として、スポットに対する感度の差が考えられたがピーク時の値の比較では差がないため非特異的なものも読み込んでいる可能性、デンストメーターで得られたカーブを画像解析にかけたことによる手技的な誤差の可能性が考えられた。

7月までの調査で、画像解析装置によるスポットが Durham 型捕集器による花粉飛散数のピークを過ぎ殆

Table 1 Correlation between three methods among pollen count, airborne *Cry j* I (by CIA) and airborne *Cry j* I (by Densitometer)

	Airborne <i>Cry j</i> I (CIA)	Airborne <i>Cry j</i> I (Densitometer)
Pollen count (Durham)	$r=0.624$ $p<0.001$	$r=0.555$ $p<0.001$
$r=0.721$ $p<0.001$		

Table 2 Weather factor effect on pollen count and CIA spot by multiple regression analysis (step-wise regression)

Pollen count (Durham)		
	Standerized partial regression coefficient	Partial correlation coefficient
Average temperture	0.380	0.345
Average wind	0.282	0.304*
Rain fall	-0.375	-0.389*

Fin 2.0, Fout 2.0

<i>Cry j</i> I spot (by CIA)		
	Standerized partial regression coefficient	Partial correlation coefficient
Average temperture	0.105	0.110
Average wind	0.149	0.172
Rain fall	-0.544	-0.548**

Fin 2.0, F out 2.0

* $p<0.05$ ** $p<0.01$

ど計測されなくなっても高値を維持していた原因としては、ヒノキなど共通抗原性を持つ他の樹木の花粉によるものか⁷⁾、あるいはまた、高橋らが報告しているように、破碎されて形態学的にスギと同定されないが抗原性を持つ粒子が空中に存在している可能性⁸⁾が考えられた。我々は同時期、同地点でエアースAMPLINGを行い、ヒノキと交差しない monoclonal の抗 *Cry j I* 抗体を用いた ELISA 法（感度 $>2\text{pg}/\text{m}^3$ ）にて空中 *Cry j I* 抗原を測定したが、この結果では Durham 型捕集器による花粉数の変動と殆ど同じで飛散期を過ぎると急激に抗原量が減少し感度以下となった。このことより、破碎された抗原粒子は存在していたとしても抗原量としては少ないものと考えられた。症状を引き起こし得る *Cry j I* 抗原量については、現在解明されておらず、また個人差も大きいものと思われる。スギ花粉症患者のうちスギ花粉の飛散時期を過ぎても症状が遷延する症例が少なくないと言われており⁷⁾、その原因を考察する上で興味ある結果と思われた。

富山県の花粉症研究会のアンケート調査¹⁰⁾によるスギ花粉症患者の1991年の発症日と、Durham 型花粉捕集器によるスギ花粉数および *Cry j I* スポットとの関連性についてみると以下のようになっていた。対象は富山県内のスギ花粉症患者2883人（26施設に依頼）で男女比は1:1.48であった。1991年にアレルギー症状の出現した最初の日（発症日）のピークは3月19日であり花粉飛散数の最多飛散日（ $1339/\text{cm}^2$ ）と一致していた。それ以前に発症する患者の発症日は3月13, 15日に小さなピークを持っていた。この日の、Durham 型花粉捕集器ではそれぞれ40, $39/\text{cm}^2$ であり、*Cry j I* スポットではデンスitomーターで437, 174、画像解析装置で1811, 711と他の日に比べ高値を示していた。以上より、*Cry j I* スポットはスギ花粉症患者の症状との関連が強いと考えられた。

ヒノキの植林は最近スギを上回るといわれスギの1/3程度とされているが今後開花齢に達するものが増加するとみられている⁹⁾。ヒノキ等の交差抗原性を有する樹木の花粉の臨床的意義も問われている⁷⁾¹¹⁾。今後どの方法が症状の推移を見る上で、最も適当かを検討する必要があると思われた。

気象因子との検討は、単純に *Cry j I* スポットの値や花粉数と気象因子を分析しただけでは花粉飛散の季節的影響が大きいと不十分であると考えられる。よって今回は、その回帰する二次式の期待値との差を標準化し、変動に影響を及ぼす因子を検討した。画像

解析装置による *Cry j I* スポットおよび Durham 型花粉捕集器による飛散花粉数の両者は有意な相関を示し、同じような環境因子によりその変動が影響を受けていると考えられた。両者とも当日の降雨量とは負の相関を認め、後者のみが当日の平均風速と正の相関を認めた。平均気温とは両者とも相関を認めなかった。今回の検討でも、降雨量については負の相関を示す、または晴天の日ほど飛散数が多いという報告^{12)~17)}と同様の結果であった。また Durham 型花粉捕集器が気象条件、特に風速の影響を受けやすいという報告¹²⁾¹⁶⁾と同じ結果であった。花粉予報を行うためにも、気象条件の影響は重要なものと考えられ今後も検討を重ねる必要があると思われた。

稿を終えるにあたり統計学的処理に関してご指導をうけたまわりました、富山医科薬科大学保健医学教室成瀬優知先生に深謝致します。

文 献

- 1) Schumacher, M.J., Griffith, R.D., O'Rourke, N. K.: Recognition of pollen and other particulate aeroantigens by immunoblot microscopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 608-616, 1988.
- 2) 高橋裕一, 井上 栄, 阪口雅弘, 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ギー粒子数の測定. *アレルギー* 39, 1612-1620, 1990.
- 3) 斉藤洋三: スギ花粉症患者の動態と患者増加の原因. *アレルギーの臨床* 11, 168-170, 1991.
- 4) 岸川禮子: 福岡市における花粉症と空中花粉. *アレルギー* 39, 684-695, 1990.
- 5) 岸川禮子, 長野 準, 勝田満江, 宗 信男: 福岡市におけるスギ・ヒノキ科花粉飛散の年次変動と気象条件—スギ・ヒノキ科花粉飛散予報—. *アレルギー* 37, 355-363, 1988.
- 6) 阪口雅弘, 井上 栄, 吉沢 晋, 池田耕一: 蛍光サンドイッチ enzyme-linked immunosorbent assay による空气中スギ—花粉花粉量の測定. *アレルギー* 36, 886-889, 1987.
- 7) 井手 武, 芦田恒夫: 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.
- 8) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., Inoue, S., Miyazawa, H., Imaoka, K. and Katagiri, S.: Existence of exine-free airborne allergen particles

- of Japanese cedar (*Cryptomeria Japonica*) pollen. *Allergy* 46, 588-593, 1991.
- 9) 長尾精文：林業面から見たスギ・ヒノキの現状、アレルギーの臨床 11, 171-173, 1991.
 - 10) 中川 肇, 他：富山県におけるスギ花粉症の疫学調査研究 第1報 アンケートの基礎データを中心に、耳喉頭頸 64, 689-693, 1992.
 - 11) Panzani, R., Yasueda, H., Shimizu, T. and Sida, T.: Cross-reactivity between the pollens of *Cupressus senpervirens* (common cypress) and of *Cryptomeria Japonica* (Japanese cedar). *Ann. Allergy* 57, 26-30, 1986.
 - 12) 村山貢司：スギ花粉飛散の予測と予報、アレルギーの臨床 10, 95-98, 1990.
 - 13) 稲村直樹：スギ花粉飛散に与える気象の影響、日耳鼻 91, 907-914, 1988.
 - 14) 岸川禮子, 長野 準：花粉飛散の予報と対策、臨床と研究 66, 1157-1162, 1989.
 - 15) 柴原義弘, 高坂知節：スギ花粉予報の方法と検討、*Johns* 4, 191-195, 1988.
 - 16) 井上敦子：スギ花粉飛散量と気象条件及び鼻アレルギー患者数との関係、耳鼻臨床補 28, 84, 1988.
 - 17) 山崎 太：花粉症起因花粉の研究(第11報)一昭和60年春のスギ花粉症流行状況と降水との関係一、医学と薬学 16, 1645-1650, 1986.

AIRBORNE JAPANESE RED CEDAR ALLERGENS STUDIED BY THE IMMUNOBLOTTING TECHNIQUE —Comparison with Pollen Counts Obtained by Durhamsampling and Effect of Weather—

Masako Takano, Gyoukei Murakami, Masatomo Matsuno, Yoichi Onoue, Miki Takayanagi,
Masako Kayahara, Yoko Adachi, Yuichi Adachi and Toshio Okada
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Toyama Medical & Pharmaceutical University

We collected airborne particles with Burkard's sampling tape in Toyama from March to July. According to the immunoblotting technique (Takahashi et al, 1990), the airborne pollen allergens were reacted with anti-*Cry j* I polyclonal antibody and were stained as blue spots. The areas of these spots were measured with a color image analyzer (CIA) and a densitometer. There were significant correlations between the airborne *Cry j* I allergen spots (CIA and densitometer) and the pollen counts obtained with a Durham sampler ($r=0.624, 0.555, p<0.001$). The airborne *Cry j* I allergens however, tended to maintain a higher level than the pollen counts (Durham) in May. We theorized that this discrepancy is caused by cross reactivity with other pollen or crushed cedar pollen particles have allergenicity.

There was a negative correlation between the *Cry j* I spots and rainfall. The pollen counts had a negative correlation with rainfall, and a positive correlation with average windspeed. These results suggest that this method is useful in evaluating fluctuations in airborne *Cry j* I allergen.