

〔速報〕

蛍光サンドイッチ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による空气中スギ花粉量の測定

国立公衆衛生院衛生微生物学部

阪口雅弘 井上 栄

国立公衆衛生院建築衛生学部

吉沢 晋 池田耕一

空气中スギ花粉をハイボリュームエアーサンプラーを用いて、グラスファイバーフィルター上に採取した。次にスギ主要アレルゲン (SBP) をフィルターから抽出し、凍結乾燥により濃縮後、蛍光サンドイッチ ELISA 法で定量し、空气中 1m^3 のスギ花粉数を求めた。1987年3月後半の2週間を昼と夜に分けて測定を行ったところ、空气中花粉数は $1.7\text{--}120\text{個}/\text{m}^3$ の間を変動した。この方法はスライド落下法に比べ測定感度がよく、天候の影響を受けずに測定することができた。この方法を用いることにより、一定量空气中のスギ花粉数を知ることができ、異なる場所での正確なスギ花粉数の比較も行うことができる。

Key words: airborne pollen — *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) — fluorometric sandwich ELISA — high-volume air sampler — sugi basic protein

緒言

従来、空气中のスギ花粉量の測定には、主にスライド落下法が用いられてきたが、気象条件に影響されやすく、また、空気単位体積中の花粉数を認べる事ができなかった¹⁾。

Agarwal ら²⁾は、エアーサンプラーを用いて花粉をフィルターに強制採取し、アレルゲンを抽出後、RAST (radioallergosorbent test) inhibition 法を用いて、アレルゲンを定量することにより、一定量の空气中の花粉数を算出した。

しかし、RAST inhibition 法は、アレルゲンエキスの力価測定法としてよく用いられてきたが、測定条件により値が大きく変動し³⁾、測定感度も高いとは言えない。

今回、我々は、スギ花粉の主要アレルゲンである sugi basic protein (SBP)⁴⁾をより直接的に高感度で測

定する蛍光サンドイッチ酵素免疫吸着法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) を開発し、これを用いてフィルターから抽出した SBP を定量することによって、 1m^3 のスギ花粉数を算出することができた。さらに、この方法と従来の Durham 型スライド落下法と比較した。

材料と方法

SBP の精製と SBP 抗血清：SBP の精製は、安枝らの方法⁴⁾に従った。SBP 抗血清は、精製 SBP $100\mu\text{g}$ を Freund 完全アジュバンドとともにウサギに4回免疫して作成した。

スギ花粉採集とアレルゲンの抽出：東京都港区の国立公衆衛生院屋上 (6階建て) にて1987年3月23日-4月3日 (土、日曜日は除く) までの期間中にハイボリュームエアーサンプラー (毎分約 1.2m^3 吸引; MODEL-120F, 紀本電子工業) を用いて、スギ花粉をグラスファイバーフィルター (20X25cm, TX40H120 WW, Pallflex 社) 上に採集した。次にそのフィルターを細かく切り、0.01% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む 0.125M NH_4HCO_3 の抽出液に 4°C 一夜静置後、さらに室温1時間振とう器で振とうした。この抽出液を

Received: June 12, 1987

Accepted: August 8, 1987

Abbreviations: BSA bovine serum albumin;**ELISA** enzyme-linked immunosorbent assay;**FU** fluorescence unit; **PBS** phosphate bufferedsaline; **RAST** radioallergosorbent test; **SBP**

sugi basic protein

凍結乾燥後、緩衝液 (I) {10%ウシ胎児血清, 0.05% Tween20を含む0.01M リン酸緩衝食塩水 (PBS)} 4ml で溶解した。この溶液を低速遠心した上清を試料とした。また、比較のため Durham 型スライド落下法を実施した。

SBP の定量：試料中の SBP は、蛍光サンドイッチ ELISA 法により測定した。マイクロプレート (Immulon II, Dynatech 社) の各穴に0.05M 炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈した10 μ g/ml の抗 SBP ウサギ IgG を100 μ l ずつ加え (以下加える液量はすべて100 μ l), 37 $^{\circ}$ C, 恒温槽中に2時間静置し、抗体を固相に吸着させた。次に1%BSA を含む PBS で postcoating を行った後、0.05%Tween 20を含む PBS を洗浄し、試料原液を4穴に加え、室温で一晩静置した。ふたたび洗浄後、ビオチンを標識した⁵⁾抗 SBP ウサギ IgG を緩衝液 (I) で1:200に希釈したものを加え、プレートをマイクロミキサーで室温1時間振とうさせた。

次に同緩衝液で β -ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン (Zymed 社) を1:400に希釈して同様に振とうさせた。洗浄後、基質希釈液(0.01M Na-リン酸, pH7.0, 0.1M NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1%NaN₃, 0.1% BSA) で作った0.1mM4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド液を加えた。37 $^{\circ}$ C, 2時間反応後、0.1M グリシン-NaOH (pH10.3) を加え、反応を停止させた。次に反応生成物4-メチルウンベリフェロンの蛍光を、自動蛍光光度測定機 (Fluoroskan, Flow 社) で蛍光単位 (FU) として測定した。

結 果

SBP の定量と花粉数の算出：蛍光サンドイッチ ELISA 法によって0.4-100ng/ml 精製 SBP の FU を求め、標準曲線を作成した (Fig. 1)。これを基にして試料中の SBP 濃度を求めた。なお、blank well の background noise の FU 値の2倍に相当する SBP 濃度を検出最小濃度 (0.4ng/ml) とした。また、この精製 SBP の標準曲線と実際の試料の希釈曲線を比較したところ、両曲線は平行になった (データは示さず)。

次に、スギ花粉が飛散しない季節に粉塵をフィルターに7時間捕集したあと、0.5ml のエーテルに懸濁した0.5mg のスギ花粉 (3万個のスギ花粉数に相当) をさらにフィルターに採集した。なお、単位重量あたりの花粉数の測定は、既知量のスギ花粉をアセトンに

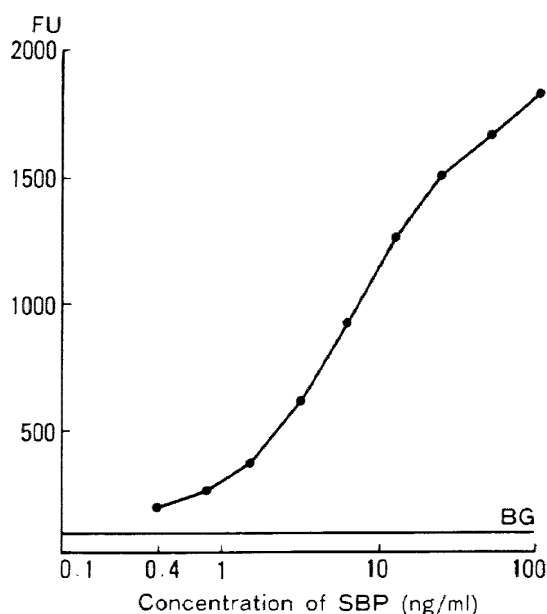


Fig. 1. Standard curve for the quantitation of SBP. FU: fluorescence unit, BG: background noise.

よく混ぜた後、血球計算盤でおこなった。このフィルターからアレルゲンを抽出後、SBP 量を測定したところ、抽出液4ml 中の濃度は15ng/ml となり、花粉1個あたりの抽出 SBP 濃度は0.5pg/ml となった。したがって、1m³あたりのスギ花粉数は、試料中の SBP 濃度 (pg/ml) をこの花粉1個の SBP 濃度 (0.5pg/ml) と吸引した総空気量 (m³) とで割った商として求めることができる。なお、空气中花粉の検出可能限界濃度は次のようになる。7時間捕集の場合には、総吸引空気量は、504 (=1.2 $\times$ 60 $\times$ 7) m³であり、一方、蛍光 ELISA の SBP 検出最小濃度が400pg/ml であるので、1.6 (=400/0.5/504) 個/m³となる。17時間捕集では0.65 (400/0.5/1224) 個/m³となる。

空气中のスギ花粉数：3月23日-4月3日 (土、日曜日を除く) までの期間の1日を昼 (午前10時-午後5時:7時間) と夜 (午後5時-午前10時:17時間) に分け、エアースAMPLER を用いた方法と Durham 型スライド落下法とで比較を行った (Fig. 2)。なお、落下法では1時間あたりの花粉数を算出した。

エアースAMPLER 法では、3月25日の昼に120個/m³と最高になった。このピークに関しては落下法の測定結果と一致したが、3月30日以降のピークは一致しなかった。3月27日昼をはじめ4回の測定において落下法では花粉数0 (延べ時間においても0) であったが、エアースAMPLER 法は2.6-11.6個/m³と測定可能であった。また、落下法において測定開始時または測定途中で雨のため測定が4回できなかったが (Fig. 2, X

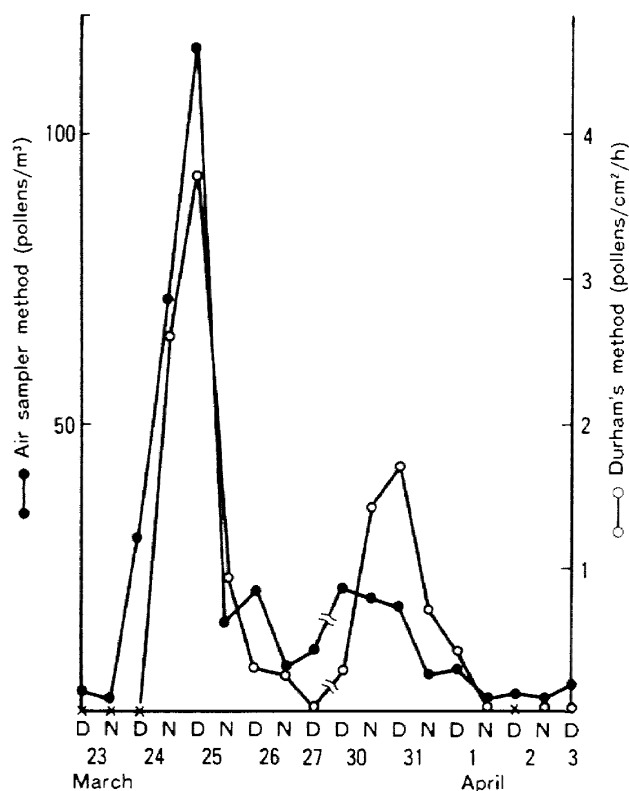


Fig. 2. Comparison of the air sampler method and Durham's slide technique. D and N: pollen collection during daytime (10:00-17:00) and nighttime (17:00-10:00), respectively. X: not measurable according to the weather condition.

印), エアースンプラー法では, 1.7-29.8個/m³と測定できた。

考 察

従来より空气中のスギ花粉の測定には, 主として落下法が用いられてきたが, 以下の欠点があった。(1) 花粉数とその花粉の由来する総空気量との関係がわからない。(2) スライド面にあたる空気量は, 風速や風向によっては影響を受けるため, 空气中の花粉数と同じでも異なる数値を測定してしまう。今回, エアースンプラー法と落下法との結果を比較して, 花粉数のピークのずれがあったのはこのような影響を受けたものと思われる。(3) 測定開始時, または途中で雨が降るとスライドが濡れて測定が困難になる。

エアースンプラーによる花粉採集はこれらの欠点を補っている。すなわち, (1) 強制的にポンプで大量の空気を吸引しているため, 風速・風向の影響を受けに

くい。(2) 吸引空気の総体積を知ることができる。(3) ポンプとフィルターが全天候性のシェルター内にあるため, 雨の影響を受けにくい。今回も雨のため, 落下法では4回測定不能となったが(測定開始から終了まで雨が降り続いたのは1回だけ), エアースンプラー法はすべて測定できた。また, 1987年は空气中スギ花粉が少なく, 落下法において測定値が0の 때가4回あったが, いずれの場合もエアースンプラー法では測定することができ, 感度においても優れているように思われる。

衝撃式エアースンプラー法(カスケードインパクター)と今回のエアースンプラー法を比較すると, 前者は形態学的に花粉粒子数を測定し, 後者は免疫化学的方法でアレルゲン量を測定する。ブタクサ花粉は, 花粉粒子以外に1μm以下の微粒子がアレルゲンになっていることが知られており⁶⁾, このような微粒子状のアレルゲンの測定は, 今回の研究で用いたような免疫化学的方法でのみ定量が可能となる。

Agarwal ら²⁾は, RAST inhibition 法で抽出液のアレルゲンの定量を行っていたが, 今研究に用いた蛍光サンドイッチ ELISA 法は, RAST inhibition 法よりも測定感度がよく, また, 患者血清を使用しないで, 直接アレルゲン量を定量できるこの方法は, 測定系としても安定していると考えられる。

この方法は落下法に比べ, 花粉検出感度がよく, また, 雨, 風などの気象条件に左右されずに花粉数の測定が可能になった。さらに, 単位体積あたりの花粉数として表せるため, 異なる地点での花粉量の正確な比較も可能になった。

稿を終えるにあたり, エアースンプラーによる花粉採集に御協力いただいた国立公衆衛生院地域環境衛生学部の方々, 研究にご協力下さった国立公衆衛生院衛生微生物学部佐藤俊江嬢に感謝します。なお, 本研究は厚生科学研究費によって行われた。

文 献

- 1) Solomon, W.R.: Aerobiology of pollinosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74, 449-461, 1984.
- 2) Agarwal, M.K., Yunginger, J.W., Swanson, B.A. and Reed, C.E.: An immunochemical method to measure atmospheric allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68, 194-200, 1981.

- 3) 安枝 浩：抗原分析“図説スギ花粉症”（清水章治編），金原出版，東京，pp.87-110, 1983.
- 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, 77-86, 1983.
- 5) Nerurkar, L.S., Namba, M., Brashears, G., Jacob, A.J., Lee, Y.J. and Sever, J.L.: Rapid detection of herpes simplex virus in clinical specimens by use of a capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 20, 109-114, 1984.
- 6) Agarwal, M.K., Swanson, M.C., Reed, C.E. and Yunginger, J.W.: Airborne ragweed allergens: Association with various particle sizes and short ragweed plant parts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74, 687-693, 1984.

MEASUREMENT OF AIRBORNE *CRYPTOMERIA JAPONICA* POLLENS BY FLUOROMETRIC SANDWICH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Masahiro Sakaguchi and Sakae Inouye

Department of Microbiology, Institute of Public Health

Susumu Yosizawa and Kouich Ikeda

Department of Architectural Hygiene Engineering and Housing, Institute of Public Health

Airborn sugi (Japanese cedar) pollens were collected on fiber glass filters by use of a high-volume air sampler. The major sugi allergen (sugi basic protein; SBP) was extracted from the filters, concentrated by lyophilization, and then measured by a fluorometric sandwich ELISA, which is sensitive enough to detect 0.4 ng/ml of SBP. Pollen number per cubic meter of air were calculated from the SBP concentration and the total air volume. We compared the results obtained by this method with those obtained by a conventional method, Durham's slide technique. We found that this new method is more sensitive and accurate in assessing the airborne pollen concentration. It is also unaffected by weather conditions. This method would be useful for the comparison of pollen numbers in the air at different places.
