

イムノブロット法による空中スギ, イネ科 植物花粉アレルゲン粒子数の測定

1) 山形県衛生研究所, 2) 国立公衆衛生院衛生微生物学部

高橋裕一¹⁾ 井上 栄²⁾ 阪口雅弘²⁾ 片桐 進¹⁾

我々は, Schumacher らにより開発された fluorescence immunoblotting 法を, 二次抗体に酵素標識抗体を用いることで肉眼または10×ルーペで花粉アレルゲンを判別できる方法に改良した。すなわち, Burkard 捕集器の透明なテープ上に捕集した大気中の花粉アレルゲンをニトロセルロース膜に転写し, アレルゲンを抗 *Cry j I* ウサギ血清または抗 *Lol p I* ウサギ血清と反応させ, 次いでアルカリホスファターゼ標識 F(ab')₂ 抗ウサギ IgG で処理した。最後に, BCIP/NBT 基質を加えることで青紫色のスポットを得た。この方法は, 従来用いられている形態観察による計数法のような熟練を必要としない。また, 共通抗原性を有する花粉全体を計数し得るため, ある花粉症患者の感作花粉アレルゲンの空中量を把握するにはすぐれた方法と考えられる。ただし, スギ花粉のように大量に飛散する花粉では, 試料捕集面積の0.16cm²あたりに400個以上の花粉がみられた場合には, 花粉数が多く重なってしまい, スポット数として求めることができなかった。この場合には, 染色領域を1花粉の染色領域で除して算出する方式を試みた。しかし, 花粉症患者の原因物質量の把握という意味ではスポット数として計数するよりは, むしろデンストメータを用い比色定量しアレルゲン濃度として表示する方式のほうが良いと思われる。

Key words: airborne allergen — immunoblotting — pollen

はじめに

大気中を飛散している花粉を計数するには試料捕集後のスライドをカルベラ液などの染色液で染色した後鏡検し計数する方法が一般に行われてきた。しかし, この方法は花粉アレルギー症の原因物質量を把握する方法としては必ずしも適切な方法ではない。なぜならば, イネ科植物花粉のように, 花粉形態が類似していても, アレルゲンの種類や含量に違いがみられる¹⁾⁻³⁾ 場合には, 花粉症の原因花粉としてはそれぞれ区別すべきであるし, 逆に, スギ花粉の主要アレルゲンの一つである *Cry j I* はヒノキ花粉のアレルゲンと交差する¹⁾⁴⁾⁵⁾ というように, 花粉形態が違っていても共通抗原性を有するアレルゲンを含むことがある。このような場合には, 花粉症の原因花粉としては一括して計測すべ

きであろう。私たちは, 先に, サクランボ, リンゴなど果樹花粉症の命名に際しては, 共通抗原性を有する群別(例えば, サクラ属花粉症とかナン亜科花粉症など)に花粉症を命名すべきことを提唱した⁶⁾。花粉症患者に有益な情報としての空中飛散花粉量は, このような共通抗原性を有する群別に計数し, 大気中の原因花粉アレルゲン量をアレルゲンの種類ごとに命名する(例えば *Cry j I* 交差性アレルゲン量など)ことが妥当と考える。そのためには原因となる花粉の主要アレルゲンを含む飛散粒子数を計数することが望ましい。最近, Schumacher, M.J. らは空中花粉アレルゲンをニトロセルロース膜に移し, 抗ギョウギシバ花粉血清で処理後, 二次抗体として FITC 標識ウサギ IgG と反応させ蛍光顕微鏡下でアレルゲンスポットを計数する方法を開発した (Fluorescence immunoblotting 法)⁷⁾。しかし, この方法は蛍光スポットを計数するので暗室内で蛍光顕微鏡を用いて計数しなければならないためさほど省力化にはならない⁸⁾。そこで, 我々はこの方法を酵素法に改良して, 肉眼でアレルゲンスポットを観察できるようにした。さらに, 数多くのアレルゲンスポットがみられる計数領域では, 肉眼あるいは10×ルーペで正確に計数することが容易でないことから, アレルゲン量の自動計数法を検討した。

Received: July 10, 1990

Accepted: August 28, 1990

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; BCIP/NBT 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium; *Cry j I* *Cryptomeria japonica I*; FITC fluorescein isothiocyanate; *Lol p I* *Lolium perenne I*; TBS Tris-buffered saline, 0.05M Tris, 200mM NaCl, pH 7.6

材料と方法

1. 抗血清

抗 *Cry j* I ウサギ血清は国立公衆衛生院で作製した。抗 *Lol p* I ウサギ血清は国立相模原病院で作製した抗血清を用いた。抗カモガヤ花粉ウサギ血清はトリイ薬品社製（東京）のカモガヤ花粉スクラッチエキスをウサギを免疫して得た⁶⁾。

2. 花粉およびその抽出液の作製法

スギ花粉は開花期の枝を暖かい部屋で水栽培しながら採集した。ヒノキ科、イチイ科、イチョウ、カラマツ、アカマツ、ハンノキ、クリ、コナラ、ギンギシ、ヘラオオバコ、ガマおよび一部のイネ科植物の花粉は開花期に直接植物体から採集した。カモガヤ、ナガハダサ、コイチゴツナギ、ホソムギ、ウシノケグサ、セイバンモロコシ、ギョウギシバ、コヌカグサ、グラマグラス、ブタクサ、ヨモギ、クソニンジン等の各花粉は International Biological INC. の乾燥花粉（輸入元、フナコシ薬品、東京）を用いた。

3. イムノブロット法 (Fig. 1)

Burkard 花粉捕集器用の専用のドラムに、白色ワセリンを薄く塗った透明な専用テープをセットし、1週間で1回転するタイマーを用いて、0.5m³/hr で大気試料を捕集した⁹⁾。捕集後のテープは付属のテンプレートを用い、1日ごとに切断した。あらかじめ blotting buffer (20%メタノールを含む0.05M Tris, 0.04M glycine 液, pH 7.6) に浸した濾紙 (5枚) をトランスファーユニット上にのせ、その上に同液に浸した 20×55cm のニトロセルロース膜を重ねた。次に、切断済みの捕集テープを捕集面がニトロセルロース膜と接するように端をそろえて、気泡が入らないように慎重に重ね、さらに同液に浸した濾紙を5枚重ねて1時間室温で転写した。終了後、膜を取り出し4%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む0.05M Tris 緩衝生理食塩水, pH 7.6 (TBS), で37℃で1時間 blocking 処理した。0.25% Tween20を含む TBS (TBS Tween) で洗浄後、抗花粉アレゲン血清 (TBS で1000倍に希釈した抗 *Cry j* I ウサギ血清あるいは TBS で1400倍に希釈した抗 *Lol p* I ウサギ血清) を一次抗体として室温で1時間反応した。約80ml の TBS Tween で30分ずつ2回洗浄した後、TBS で1600倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識 F (ab')₂ 抗ウサギ IgG (Cat. No. 4620, Lot: 0401, Tago 社, U.S.A.) を二次抗体として室温で1時間反応させ、再び約80ml の TBS Tween

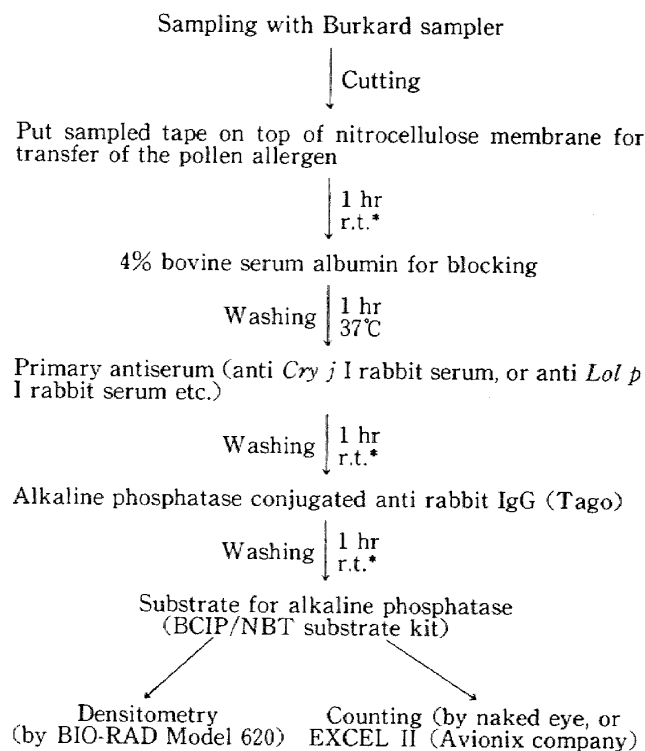


Fig. 1 Procedure for immunoblotting.

*r.t.=room temperature

で30分ずつ2回洗浄後アルカリホスファターゼ染色用キットの BCIP/NBT 基質キット (フナコシ薬品) で染色し、得られた青紫色のスポットを肉眼あるいは10×ルーペで計数した。自動計数には日本アビオニクス株式会社 (東京) の画像処理装置 (EXCEL II) を用いた。まず測定領域のスポットを積分入力し、二値化処理後、二値計測を行い、目的外のスポットを除去した後に統計処理を行った。スポット数は、指定粒子除去操作により平均的な1スポット当たりの領域を求め、この値で領域内のスポット面積値を割り求めた。また、日内変動を求めるには BIO-RAD 社の反射型デンストメータ Model 620を用いた。

結 果

1. スポットのみられる花粉の種類

各植物から採集した成熟花粉をできるだけ重ならないように200~300個ほど Burkard 捕集器用の専用テープ面に撒いて、イムノブロット法を行った。抗 *Cry j* I ウサギ血清を用いると、スギ花粉の他にヒノキ科のヒノキやコノテガシワの花粉でもスギ花粉同様に濃いスポットがみられた。同じヒノキ科のアスナロやネズ

Table 1 The kind of pollen which can form a bluish purple spot in cases where anti *Cry j* I rabbit serum was used as primary antibody

Family	Genus	Species	Japanese	spot*
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria</i>	<i>japonica</i>	Sugi	++
Cupressaceae	<i>Chamaecyparis</i>	<i>obtusa</i>	Hinoki	++
	<i>Biota</i>	<i>orientalis</i>	Konotegashiwa	++
	<i>Thujopsis</i>	<i>dolabrata</i>	Asunaro	+
	<i>Juniperus</i>	<i>rigida</i>	Nezu	+
	<i>Taxus</i>	<i>spp.</i>	Ichii	—
Taxaceae	<i>Torreya</i>	<i>nucifera</i>	Kaya	—
	<i>Ginkgo</i>	<i>biloba</i>	Ichou	—
Ginkgoaceae	<i>Larix</i>	<i>leptolepis</i>	Karamatsu	—
Pinaceae	<i>Alnus</i>	<i>japonica</i>	Hannoki	—
Betulaceae				

*++ The pollen can form a rich bluish purple spot.

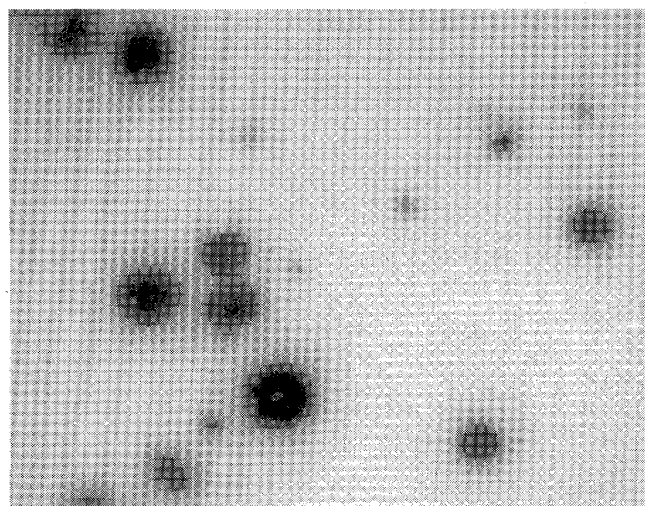
+ The pollen can form a light bluish purple spot.

— The pollen can not form a bluish purple spot.

花粉ではスギに比べやや薄いスポットがみられたが、スギ花粉と同じ時期に飛散するイチイ科のイチイ、イチョウ科のイチョウ、カバノキ科のハンノキなどではほとんどスポットがみられなかった (Table 1)。イネ科花粉では、結果はかなり複雑であった (Table 2)。抗 *Lol p* I 血清を用いると、Poöideae 亜科に属する多くの植物 (例えばカモガヤ、ホソムギ、ナガハグサなど) 花粉で、濃いスポットが得られた。しかし亜科が異なる花粉でも薄いスポットが認められ、2～3の種では比較的濃いスポットを作るものがあつた。なかには科が異なっても薄いスポットがみられる場合があつた。抗カモガヤ花粉ウサギ血清を用いると、トウモロコシ、チマキザサなど亜科が異なるイネ科花粉でも濃いあるいは比較的濃いスポットがみられ、抗 *Lol p* I 血清を用いた時と多少異なる結果が得られた。

2. 空中花粉とスポットとの関係

スポットには80～120 μ mの大きさのもの、30～60 μ mのもの、5～15 μ m、さらに小さいものなど種々の大きさのものが存在することがわかつた (Fig. 2)。このうち80～120 μ mの大きさ (100 μ m スポット) と5～15 μ m (10 μ m スポット) の大きさのものが多かつたので、1990年春に抗 *Cry j* I 血清を用いて得られた100 μ m スポットの数とスギ、ヒノキ科の合計花粉の数との関係を見ると、スポットの数が少なくスポット同士が重ならない日では、100 μ m スポットの数は、スギ・ヒノキ科花粉の数より30%ほど少なかった (Table 3)。Burkard 捕集器で7日巻きタイマーを用いた場合、1時間当りの試料捕集面積は0.32cm²であるが、Fig. 3では捕集テープを二等分してあるので、捕集面積は0.16

Fig. 2. Light-microscopic image of 100 μ m-size and 10 μ m-size spots in cases where anti *Cry j* I rabbit serum was used as primary antibody.

cm² (大気吸引量0.25m³) となる。この0.16cm²当りに400個以上の花粉がみられるようになるとスポットの多くは重なってしまい、スポット数は花粉数に比して小さな値になった。10 μ m スポットは100 μ m スポットの30～40%と少なかった。これはスギ花粉の形態をしていない微粒子状の花粉アレルゲンによるものと思われる (別に報告予定)。スポットの一部に重なりのみられた3月18、19日を除いてそれぞれの相関関係を調べたところ、花粉数と100 μ m スポットの数とは強い正の相関がみられた ($r=0.937$, $n=15$, $p<0.01$)。10 μ m スポットと100 μ m スポットは有意の相関がみられた ($r=0.556$, $n=15$, $p<0.05$)。

抗 *Lol p* I 血清を用いて得られたスポットは

Table 2 The kind of pollen which can form a bluish purple spot in cases where anti *Lol p* I rabbit serum (1) or anti *Dactylis glomerata* pollen rabbit serum (2) was used as primary antibody.

Family	Subfamily	Tribe	Genus	Species	Japanese	spot*		
						(1)	(2)	
Gramineae	Poöideae	Poeae	<i>Dactylis</i>	<i>glomerata</i>	Kamo-gaya	++	++	
			<i>Poa</i>	<i>pratensis</i>	Nagaha-gusa	++	++	
		Agrostideae		<i>compressa</i>	Ko-ichigotsunagi	++	++	
			<i>Lolium</i>	<i>perenne</i>	Hoso-mugi	++	++	
			<i>Festuca</i>	<i>elatior</i>	Hiroha-no-ushinoke-gusa	++	++	
			<i>Phleum</i>	<i>pratense</i>	Oh-awagaeri	++	++	
			<i>Alopecurus</i>	<i>aequalis</i>	Suzumeno-teppou	++	n.t.	
			<i>Agrostis</i>	<i>alba</i>	Konuka-gusa	++	++	
			<i>Calamagrostis</i>	<i>epigeios</i>	Yama-awa	+	+	
		Bromeae	<i>Bromus</i>	<i>cathariticum</i>	Inu-mugi	++	++	
		Phalarideae	<i>Anthoxanthum</i>	<i>odoratum</i>	Haru-gaya	++	n.t.	
			<i>Phalaris</i>	<i>arundinacea</i>	Kusa-yoshi	++	n.t.	
	Chloridoideae	Triticeae	<i>Agropyron</i>	<i>tsukushiense</i>	Kamoji-gusa	+	++	
		Eragrostae	<i>Eragrostis</i>	<i>ferruginea</i>	Kazekusa	+	+	
			<i>Setaria</i>	<i>viridis</i>	Enokoro-gusa	±	+	
		Chlorideae	<i>Cynodon</i>	<i>dactylon</i>	Gyogi-shiba	±	±	
			Zoisieae	<i>Zoisia</i>	<i>japonica</i>	Shiba	—	±
			<i>Bouteloua</i>	<i>spp.</i>	Grama grass (English)	+	+	
		Panicoideae	Arundinelleae	<i>Arundinella</i>	<i>hirta</i>	Toda-shiba	±	±
			Andropogoneae	<i>Imperata</i>	<i>cylindrica</i>	Chigaya	—	—
				<i>Miscanthus</i>	<i>sinensis</i>	Susuki	+	+
			<i>Paspalum</i>	<i>thunbergii</i>	Suzumeno-hie	—	±	
	Oryzoideae	Paniceae	<i>Echinochloa</i>	<i>crus-galli</i>	Inu-bie	±	+	
			<i>Digitaria</i>	<i>timorensis</i>	Mehishiba	±	+	
			<i>Sorghum</i>	<i>halepense</i>	Seiban-morokoshi	+	+	
		Maydeae	<i>Zea</i>	<i>mays</i>	To-morokoshi	+	++	
		Oryzeae	<i>Oryza</i>	<i>sativa</i>	Ine	+	+	
			Banbusoideae	<i>Sasa</i>	<i>palmata</i>	Chimaki-zasa	±	+
		<i>Typha</i>		<i>latifolia</i>	Gama	—	—	
		<i>Rumex</i>		<i>japonicus</i>	Gishigishi	—	—	
Typhaceae		Banbusoideae		<i>Quercus</i>	<i>serrata</i>	Konara	±	±
Polygonaceae				<i>Castanea</i>	<i>creanata</i>	Kuri	—	—
Fagaceae	<i>Plantago</i>			<i>laceolata</i>	Hera-ohbako	—	±	
Plantaginaceae	<i>Amborsia</i>			<i>elatior</i>	Butakusa	—	±	
	<i>Artemisia</i>			<i>vulgaris</i>	Yomogi	—	—	
				<i>annua</i>	Kusoninjin	±	—	
Pinaceae				<i>Pinus</i>	<i>densiflora</i>	Akamatsu	—	—
Taxodiaceae				<i>Cryptomeria</i>	<i>japonica</i>	Sugi	—	—

*++ The pollen can form a rich bluish purple spot.

+ The pollen can form a comparative rich bluish purple spot.

± The pollen can form a light bluish purple spot.

— The pollen can not form a bluish purple spot.

n.t.=not test.

Grass classification was conformed to Koyama¹⁰⁾.

80~120 μ mの大きさに加え30~60 μ mのものも多くみられた。イネ科花粉は花粉形態がいずれも類似しているものの、大きいものでは直径が40 μ m以上のものもあるが、小さいものでは20~25 μ m程度のものなど

サイズはさまざまであった。サイズの大きな花粉(*Festuca elatior*)に由来するスポットはそれなりに大きく濃いものが多いが、中には50 μ m前後のものもみられた。一方、20~25 μ mサイズの花粉(*Poa trivialis*)

Table 3 Relationship between the *Cryptomeria japonica* (Cj) and *Cupressaceae* (Cup) pollen count and the two types of spot counts obtained by naked eyes or the automated counter.

Date		Pollen count	Cry i I spot count		
			100μm spot		10μm spot
			naked eyes	EXCEL II	
		(grain/6m³)	(spot/6m³)	(Spot*/6m³)	(spot/6m³)
March	11	1732	1,659	1524	634
	12	948	469	592	265
	13	170	88	138	48
	14	209	234	215	69
	15	234	211	174	159
	16	600	524	576	216
	17	725	607	648	417
	18	4012	1335	1178	751
	19	4392	2108	2224	268
	20	1789	1527	1560	88
	21	947	637	706	33
	22	1698	1411	1639	405
	23	1986	1633	1666	515
	24	1863	1007	1134	200
	25	882	751	647	217
	26	1128	1154	1194	275
	27	1972	1412	2633	338
	28	2339		3410	
	29	3921		4188	
	30	10034		9264	
	31	1442		1690	
April	1	3937		5289	
	2	6005		6784	
	3	8063		10285	
	4	5045		6485	

1) Pollen count is the sum of the pollens of Japanese red cedar and Japanese cypress family.

2) Cry j I spot by naked eyes during the period of March 28 to April 4 could not be obtained due to overlapping of the bluish purple coloured area.

* Spot count of the trapping area was calculated as the ratio of bluish purple coloured area to one pollen area.

では、スポットはちょうど30~60 μ mの大きさであった。そこで抗 *Lol p* I 血清では30 μ m から120 μ m 以上のスポットを一括して計数した。その結果、日ごとの100 μ m スポットはイネ科花粉数より多少多い値(約1.3倍, 0.7~3.3)を示した。*Lol p* I スポットも *Cry j* I スポットと同様5~15 μ mの大きさのスポットが存在した。*Lol p* I では10 μ m スポットは100 μ m スポットの1.2倍ほどみられ、数時間に100~200個かたまってみられた日があった(Table 4の5月24日, 6月5日など)。*Lol p* I ではこれらのスポットの他に30~100

μ m程度の薄いスポットが濃い100 μ m スポットの半数弱みられた。これら3種のスポットのうちイネ科花粉と強い相関がみられたのは100 μ m スポットのみであった($r=0.915$, $n=27$, $p<0.01$)。

3. スポット数の自動計数の試み

捕集後のテープを1日ごとに切断し、さらに時間軸に平行に二等分し、一方はCarberla染色後、顕微鏡下で形態をみて計数した。他方は、画像処理装置のEXCEL IIを用いて計数した。EXCEL IIでは1日分(48 $\times$ 16mmの領域)のスポットを7~10分ほどで読み

Table 4 Relationship between the grass pollen count and the two types of spot count

Date		Pollen count (grain/6m ³)	Lop I I spot count		
			100μm spot		10μm spot
			Rich**	Light**	
			(spot/6m ³)	(spot/6m ³)	(spot/6m ³)
May	24	17	29	4	288*
	25	15	18	8	19
	26	24	28	32	33
	27	18	23	10	44
	28	19	16	25	42
	29	19	14	11	14
	30	3	10	11	9
June	31	19	35	14	39
	1	19	27	4	35
	2	7	14	4	12
	3	19	24	5	19
	4	60	64	7	24
	5	22	27	4	161*
	6	25	18	9	27
	7	37	34	44	29
	8	24	28	25	36
	9	9	10	11	27
	10	12	16	5	14
	11	13	18	14	26
	12	18	19	6	11
	13	21	22	4	7
	14	5	7	11	13
	15	14	7	9	23
	16	1	3	6	10
	17	2	2	2	8
	18	8	10	12	16
	19	7	9	4	9

*Lump spot was observed.

**Rich-rich bluish purple spots.

Light-light bluish purple spots.

取ることが可能であった。アレルゲンを有する花粉数が著しく多く（捕集面の0.16cm²当りに400個以上）になるとスポットの多くが重なってしまい正確に計数することができなくなったので、全捕集面積に占める青紫色の領域を求め、これを1個のスポットの全面積に対する割合で割ることでスポット数を求めることを検討した。その結果、ほぼ花粉数と相関するスポット数が得られた ($r=0.957$, $n=9$, $p<0.01$)。

また多数飛散した日の日内変動を求めるにはデンストメータを用いることが可能であった。デンストメータはニトロセルロース膜が透明でないので透過光による測定は不可能であり反射光で行った。典型的な

チャートを Fig. 4 に示した。

考 察

Schumacher らにより開発された Fluorescence immunoblotting 法⁷⁾は FITC の蛍光スポットを計数するため蛍光顕微鏡を用いて、少なくとも100×で鏡検する必要があったが、今回開発した二次抗体に酵素標識抗体を用いる方法では、肉眼でアレルゲンスポットを観察できた。この方法により、大気中に存在する花粉アレルゲンの量を共通抗原群別に定量することが可能

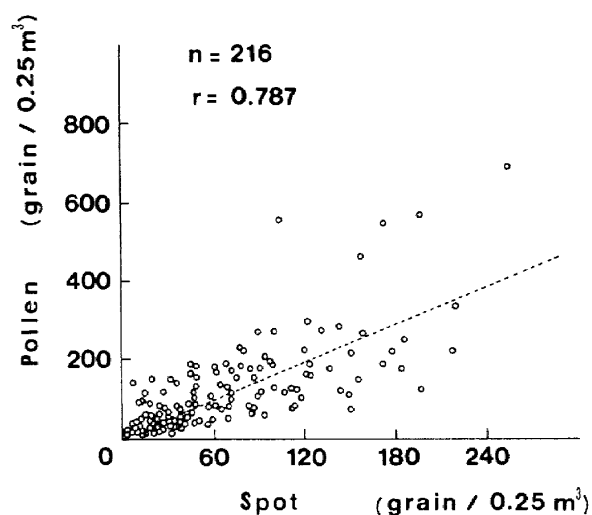


Fig. 3. Relationship between hourly pollen count and *Cry j I* spot count.

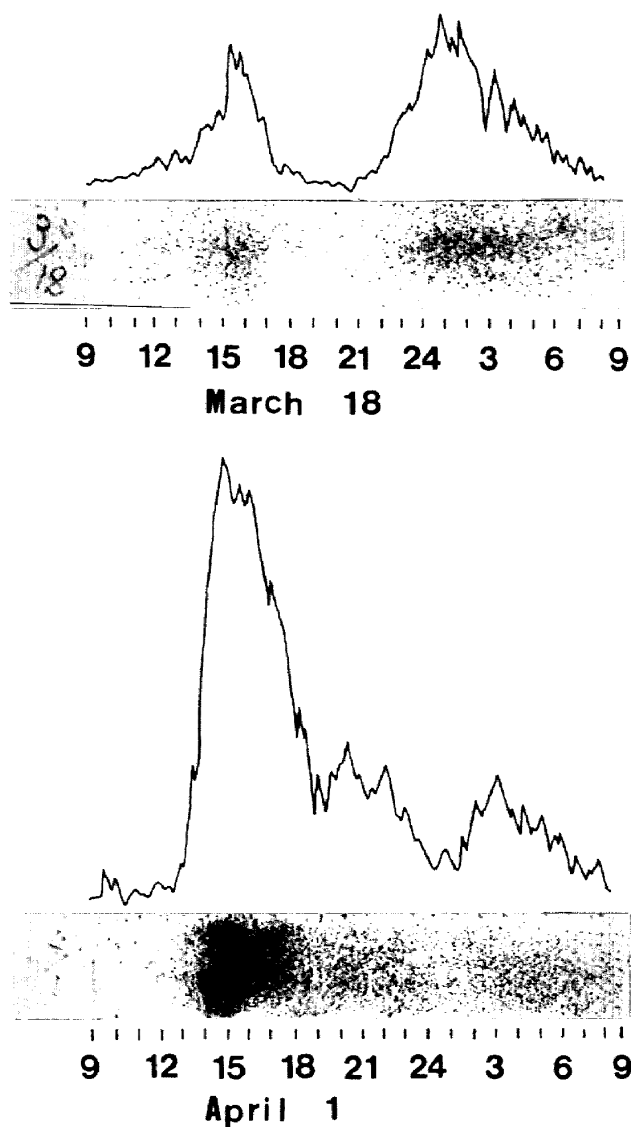


Fig. 4. Typical densitogram of *Cry j I* spots.

である。加えて原因花粉粒子数の他に微粒子状の花粉尘アレルゲンの量をも把握することができる。しかし、短時間内に著しく多くの花粉が飛散した場合にはスポットが重なってしまうためスポット数として求めることが不可能であった。このような場合には全捕集面積に占める青紫色の領域を求めることで、およそその定量は可能と思われるが、実測値と完全に一致せず、今後検討しなければならない問題が残された。また、このように大量に飛散し、7日巻きタイマーを用いた場合にスポットが重なり合う時間帯の調査においては24時間で1回転するタイマーを併用することで対処し得る。この方法は免疫化学的な処理に5時間ほど要するが、その処理にはほとんど手間がかからないため、スギ花粉速報など急を要するものは別として、Burkard捕集器での花粉アレルゲン量の把握には有用な方法である。さらに、青紫色のスポットを数えることで計数可能なため、形態観察に不可欠な熟練を要することもない。特に、5月～6月にかけて数多くの種類の花粉尘が飛散している時期にイネ科花粉アレルゲンの数を求める場合には有用であった。

抗 *Lol p I* 血清では、イネ科花粉数と100 μ m スポット数とは正の相関がみられたので、100 μ m スポットの多くは、形態上イネ科植物花粉と認識できる花粉に由来していると思われる。しかし、花粉数に比べスポット数の多い日が大部分であったので、100 μ m スポットの一部は花粉形態をしていない粒子または交差反応性を有する他科の花粉尘に由来すると思われる。一方、100 μ m *Cry j I* スポット数とスギ・ヒノキ科花粉数を比べると、スギ・ヒノキ科花粉の方が多かった。これはヒノキ科花粉の一部が濃いスポットをつくらないことと関係していると思われるが (Table 1)、スギ花粉は破れないとアレルゲンが溶出してこないため¹¹⁾スギ花粉に由来する一部の薄いスポットを計数しなかった可能性もある。抗 *Lol p I* 血清では、イネ科植物花粉以外にも薄いスポットをつくる花粉があるようである。実際、5月初旬から中旬にかけて数多くの種類の花粉尘がみられる時期にはイネ科花粉数に比べ著しく多くの薄いスポットがみられることがあった。Table 2より薄いスポットはイネ科植物花粉以外の花粉に由来したものと考えられる。以上のことから、空中花粉尘アレルゲン粒子の算定には濃く染まったスポットを用いれば良いと思われるが、花粉症患者の原因物質量の把握という意味では、検討の余地が残されているものの、デンストメータを用い青紫色を比色定量する方法のほうが

すぐれていると思われる。この場合には、アレルゲンの濃度を求めることになるので、濃度既知のアレルゲン標準品を準備する必要がある。今回は、スギ花粉では、試料捕集面積0.16cm²あたりに400個以上の花粉がみられるようになるとスポットは重なってしまうものが多くなり正確に計数できなくなったので、染色領域を1花粉の染色領域で割って花粉アレルゲン粒子数を求めたが、この場合も前記の理由からデンストメータで比色定量したほうが良いと思われる。スポットのみられる花粉の種類を抗 *Lol p I* 血清と抗カモガヤ花粉血清の2種類のイネ科花粉アレルゲンに対する抗血清を用い検討したところ、使用する抗血清の性状により多少結果が異なってくるのがわかった (Table 2)。花粉には何種類かの主要アレルゲンがあり、どのアレルゲンを検出するかは調査目的や調査地域によっても異なることが予想されるが、当然のことではあるが、できるだけ特異性の高い抗体を用いることが望ましい。しかし、現在は主な花粉症原因花粉の主要アレルゲンに対する抗血清が市販されておらず、全国各地で空中花粉の飛散数の調査を各自の自作抗血清で行ったとすると、相互のデータの比較の際に問題が生じるであろう。そのためにも管理された市販抗血清が1日でもはやく入手できるようになることが望まれる。

今回検討した方法は、花粉アレルゲンに限らず、ダニアレルゲンや真菌アレルゲンなどの検出にも応用できる。

抗 *Lol p I* ウサギ血清を分与いただいた国立相模原病院 安枝 浩博士および EXCEL II の試用に協力いただいた日本アビオニクス株式会社、新屋明彦氏に深謝する。

文 献

- 1) Weber, R.W. and Nelson, H.S.: Pollen allergens and their interrelationship. *Clin. Rel. Allergy* 3, 291-318, 1985.

- 2) Leavengood, D.G., Renard, R.L., Martin, B.G. and Nelson, H.S.: Cross allergenicity among grasses determined by tissue threshold change. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76, 789-794, 1985.
- 3) Martin, B.G., Mansfield, L.E. and Nelson, H.S.: Cross-allergenicity among the grasses. *Ann. Allergy* 54, 99-104, 1985.
- 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, 77-87, 1983.
- 5) Panzani, R., Yasueda, H., Shimizu, T. and Shida, T.: Cross-reactivity between the pollens of *Cupressus senpervirens* (common cypress) and of *Cryptomeria Japonica* (Japanese cedar). *Ann. Allergy* 57, 26-30, 1986.
- 6) 高橋裕一, 片桐 進, 敵 文雄: 果樹花粉抗原相互の交差反応性に関する研究. *アレルギー* 36, 377-385, 1987.
- 7) Schumacher, M.J., Griffith, R.D. and O'Rourke, N.K.: Recognition of pollen and other particulate aeroantigens by immunoblot microscopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 608-616, 1988.
- 8) 高橋裕一, 阪口雅弘, 井上 栄, 片桐 進: 大気浮遊スギ主要アレルゲン (SBP) 保有粒子数の蛍光イムノプロット法による計数およびスギ, ヒノキ科花粉数との関係. *アレルギー* 38, 884-884, 1989.
- 9) Ogden, E.C., Raynor, G.S., Hayes, J.V., Lewis, D.M. and Haines, J.H.: Sampling techniques. In "Manual for Sampling Airborne Pollen". Hafner Press, New York, pp.74-95, 1974.
- 10) Koyama, T.: Classification of the subfamilies of the grass family. In "Grasses of Japan and its Neighboring Regions. An Identification Manual", Kodansha Ltd. Tokyo, pp.1-13, 1987.
- 11) Takahashi, Y., Mizoguchi, J., Katagiri, S., Sakaguchi, M., Inouye, S., et al.: Development and distribution of major pollen allergen (Cry J I) in male flower buds of Japanese cedar (*Cryptomeria Japonica*). *Jpn. J. Allergol.* 38, 1354-1358, 1989.

A NEW COUNTING METHOD OF AIRBORNE JAPANESE RED CEDAR AND GRASS POLLEN ALLERGENS BY IMMUNOBLOTTING TECHNIQUE

Yuichi Takahashi and Susumu Katagiri

The Yamagata Prefectural Institute of Public Health

Sakae Inouye and Masahiro Sakaguchi

Department of Microbiology, The Institute of Public Health

We devised a new counting method of pollen allergen particles which improved the fluorescence immunoblotting technique by Schumacher et al (1988). And by which airborne pollen allergens became visible under 10× magnifier or naked eyes. Airborne pollen allergens collected on the Burkard's sampling tape were transferred onto nitrocellulose membrane and were reacted with anti *Cry j* I rabbit serum or anti *Lol p* I rabbit serum, and then treated with alkaline phosphatase conjugated F(ab')₂ anti rabbit IgG. Finally, bluish purple spots were obtained by staining with BCIP/NBT phosphatase substrate system. This technique do not require any skilfull morphological observation, and is more suitable to measure the amounts of airborne pollen allergen for given pollinosis patients because total pollen allergen particles with common antigenicity are measured. In Japanese red cedar pollen counts, we could not count the spots more than 400 grains per 0.16 cm² of the sample trapping area due to many overlapping spots. In this case, we try to calculate the value from the ratio of buish purple coloured area to one pollen area. However, more suitable method for estimate the content of pollinosis caused airborne allergens may be colorimetric quantitation using densitometry and displaying the value as allergen content.
