

エアロアレルゲン・イムノブロット法による 空中クラドスポリウム抗原の測定と季節変動

¹⁾山形県衛生研究所

²⁾国立病院機構相模原病院臨床研究センター

鈴木 道子¹⁾ 高橋 裕一¹⁾ 安枝 浩²⁾ 齋藤 明美²⁾

【目的】空中クラドスポリウム属抗原 (*Clad*) をニトロセルロース膜に転写し、免疫化学的に処理することで *Clad* 胞子の胞子数を計数する方法を開発する。開発した方法を使って空中 *Clad* 胞子の季節変動を調べる。

【方法】バーカード型捕集器からの試料をニトロセルロース膜に転写し、ブロッキング後に *Clad* 抗血清で処理、続いてアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG で処理し、膜上の酵素に BCIP/NBT 基質を反応させ紫色のスポットを得た。

【結果】*Clad* の胞子は中央が濃く周囲が薄い紫色のスポットとして目視できた。*Clad* の胞子は春と秋にピークがみられた。1日のうちでは午後から夜にかけ多く飛散する傾向がみられた。気象四要素と空中 *Clad* 胞子との関係を調べたところ、いずれの要素とも強い相関はみられなかった。

【結語】空中 *Clad* 抗原を免疫化学的に処理し、ニトロセルロース膜上で紫色のスポットとして目視できるようになった。*Clad* の胞子は春と秋に、1日では、午後から夜にかけ多くみられた。

Key words: airborne mould — immunoblotting — mould antigen — seasonal fluctuation

はじめに

空中真菌はさまざまなヒトのアレルギーと結びついており、真菌による呼吸器アレルギーの頻度はアトピー患者で20～30%、一般人で約6%といわれている¹⁾。主な疾患は喘息、鼻炎、過敏性肺炎、気管支肺真菌症などである。アレルギーの原因となる真菌には、屋外ではアルテルナリア属 (*Alt*)、クラドスポリウム属 (*Clad*)、アスペルギルス属 (*Asp*)、フザリウム属、ペニシリウム属 (*Pen*) な

どがあげられるが、なかでも *Alt* と *Clad* が重要とされている。これらの真菌は世界中に広く分布するが、*Alt* は特に高温多湿な環境に多く、米国では南部に多いという。*Clad* は冷温な気候を好みスカンジナビアなどに多いことが知られている¹⁾。本邦においては空中真菌の調査は可部²⁾や三島³⁾が行っているもののあまり多くない。胞子のサイズは *Alt* の胞子を除けば一般に小さく、形態に特徴がないため顕微鏡での同定は容易でない。スウェーデンなどの北欧では *Alt* や *Clad* の胞子を顕

Received: March 7, 2008, Accepted: August 18, 2008

利益相反 (conflict of interest) に関する開示：著者全員は本論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

Abbreviations: *Alt* “*Alternaria* spp”, *Asp* “*Aspergillus* spp”, BCIP/NBT “5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium”, *Clad* “*Cladosporium* spp”, EPS “extracellular polysaccharide”, PBS “phosphate buffered saline”, *Pen* “*Penicillium* spp”, PVDF “polyvinylidene difluoride”

高橋裕一：山形県衛生研究所 [〒990-0031 山形市十日町 1-6-6]

E-mail: takahashiyui@eiken.yamagata.yamagata.jp

微鏡で計数して空中真菌の飛散数に関する情報を地域住民に提供している⁴⁾。しかし、形態識別による方法は熟練を要するばかりでなく測定には長い時間を要するなどの問題がある。そのため多くの調査がなされていないものと考えられる。そこでわれわれは形態識別に代わる方法として免疫化学的な方法を考えた。真菌の免疫化学的な測定法としては安枝らはELISA法を用いた検出系を開発している^{5)~7)}。彼らはアレルゲンとして代表的な *Alt*, *Clad*, *Asp*, カンジダ, *Pen* の培養濾液から蛋白質が少ない多糖体含有量の多い分画 (extracellular polysaccharide: EPS) を集め、ウサギに免疫し、得られた抗血清を用い、比色法による Sandwich ELISA, 蛍光法による ELISA を開発した。われわれは ESR ラジカルイムノアッセイ法を検討しており、ELISA 法より 100 倍近い低濃度の試料の測定に成功している^{8)~10)}が、この方法に必要な抗体を入手できなかったので、まずは先にスギ花粉、イネ科花粉やダニで行った免疫化学的な手法^{11)~13)}で空中真菌の胞子を計数することを考えた。ここではこの方法で空中 *Clad* 胞子の数を測定し、その季節変動及び日内変動を調べた結果を述べる。

方 法

屋外に飛散する空中真菌の胞子は山形県衛生研究所の屋上 (地上 19m) に英国製バーカード型捕集器 (Seven day volumetric spore trap)¹⁴⁾を設置し、一週間捕集用のドラムを用いて捕集した。大気試料は専用の捕集テープ (メリネックステープ) に捕集される。試料の吸引口は 2mm×14mm の大きさがある。捕集面での胞子の収集には偏りがみられる場合があるので、原則として全視野をカウントした。ただし、一年の内でどの時期に多く飛散するかを調べる場合には傾向がわかれば良いと考え、100 倍 (10×10) で鏡検しながら一視野 (約 Φ 2mm)×48mm の領域を数えた。捕集テープは午前 9 時に交換し、使用時まで 4℃ に保存した。使用時に試料を 1 日ごと (48mm 間隔) に切断しニトロセルロース膜へ転写した。転写の手技は前報^{11)~13)}に準じた。転写液には 20% メタノールを含む 0.1M リン酸グリシン緩衝液 (pH 7.0) を用いた。転写

後のニトロセルロース膜は 0.125M NaCl を含む 0.1M 燐酸バッファー (pH 7.0; 以後 PBS と略) で 500 倍に希釈した抗 *Clad* 抗血清で室温 2 時間処理した。PBS で洗浄した後に、PBS で 500 倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG (Tago Inc, USA) で室温 2 時間処理した。アルカリホスファターゼの基質には BCIP/NBT (Kirkegaard & Perry Lab, Inc, USA) を用いた。

抗 *Clad* 抗血清は *C. sphaerospermum* TSY0853 株を合成液体培地で培養したときの培養濾液から得られた多糖体分画 (EPS) をウサギに免疫して調製した⁵⁾。

得られたスポットが *Clad* の胞子に由来することは既報¹⁵⁾¹⁶⁾に準じて確認した。つまり、専用の粘着性の膜に空中真菌の胞子 (*Alt*) または培養して得た胞子試料 (*Clad*, *Asp*, *Pen*) を散布しニトロセルロース膜と密着させた状態で抗体処理し、胞子とスポットを同時に観察した。抗血清による処理は 4℃ でオーバーナイトし、得られたスポットは 100 倍の光学顕微鏡で観察した。

結 果

使用した抗 *Clad* 抗血清が主な空中真菌である *Clad*, *Alt*, *Asp*, *Pen* の胞子に由来する抗原と反応し紫色のスポットを作るかを調べた。*Clad* では、胞子周辺のニトロセルロース膜が紫に染まった。*Alt*, *Asp*, *Pen* では胞子の周辺のニトロセルロース膜は紫に染まらなかった (Fig. 1)。以上のことから、今回の抗体処理では *Clad* の胞子はスポットを作るが *Alt*, *Asp*, *Pen* の各胞子はスポットを作らないことがわかった。

空中から採取した試料を抗体処理した結果の一例を Fig. 2 に示した。Fig. 2 には *Clad* の胞子に由来するとみなしたスポットを丸で囲んで示した。

Clad の胞子が一年のうちでどの季節に多くみられるかを調べるため各月の第 3 週に得られた試料を日ごとに計数した (Fig. 3)。2006 年ではスポットは春 (5 月)、秋 (9 月) と冬 (1 月) に多くみられた。多く飛散した 5 月、9 月、1 月について、一日のうちで多く飛散する時間帯を調べたところ午後から夜にかけ多くみられることがわかった (Fig. 4a~Fig. 4c)。

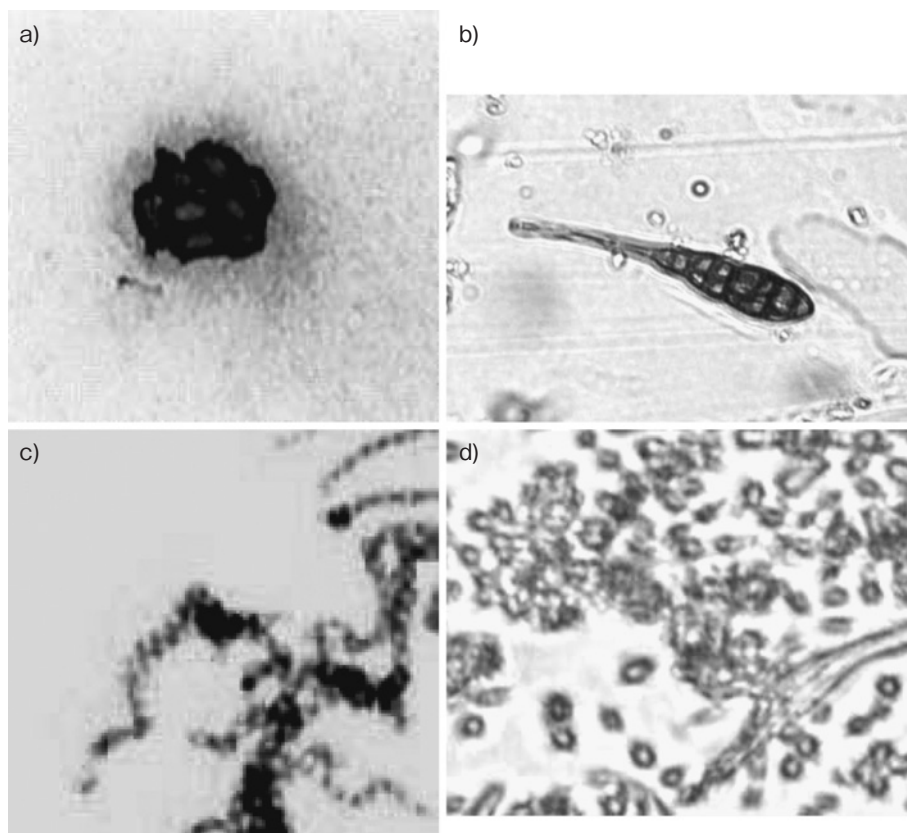


Fig. 1. Simultaneous immunochemical and morphological detection of individual spore and its spot.

a) *Cladosporium* spp, b) *Alternaria* spp, c) *Aspergillus* spp, d) *Penicillium* spp

次に、どのような日に多くの孢子が飛散するかを調べた。2006年4月から2007年3月までの各月の第3週、79日分のデータを用いてスポットの数と気象四要素との関係を調べたが、いずれも強い相関はみられなかった (Table 1)。

考 察

喘息やアレルギーの原因抗原として真菌抗原の重要性が指摘されているもののいまだに不明な点が多い。三島³⁾によれば成人気管支喘息患者の *Clad* による皮膚反応陽性者は3.7%，小児気管支喘息では15.2%という。成人喘息患者では吸入コルチコステロイド使用群の一部がある種の *Clad* への感作と関連していたという¹⁷⁾報告や *C. her-*

barum の TCTP (translationally controlled tumor protein) という蛋白はIgE結合性で病気の重症度と関連するとした報告¹⁸⁾もみられる。一方、室内では *Clad*, *Pen*, *Asp* が多くみられるが、これらの室内真菌と喘息スコアの間には相関はみられず、子供の喘息や鼻炎への室内真菌の関与については明らかでないといった報告¹⁹⁾もみられる。このように喘息や鼻炎と真菌との関係はまだ解明されていない。その理由としては、*Alt* を除けば空中真菌の孢子は顕微鏡による同定が容易でないことがあげられる。そこで、われわれは免疫化学的な手法を用い *Clad* の孢子数を容易に測定できないか検討した。その結果、空中真菌孢子を特異的に染色しニトロセルロース膜上でスポットとして検

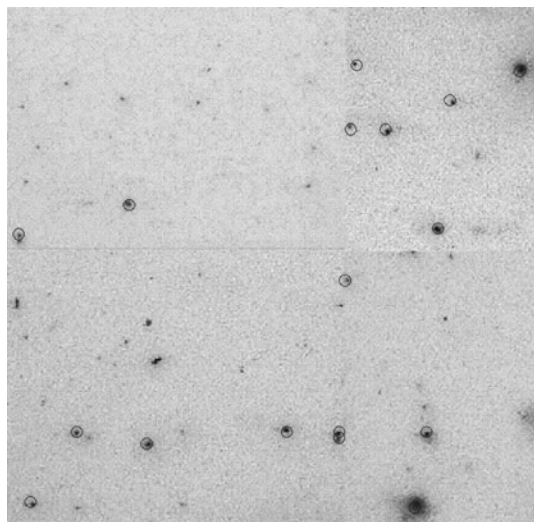


Fig. 2. Airborne *Cladosporium* spp spots obtained from aeroallergen immunoblotting method. Circled spots are counted as spots from *Cladosporium* spp spores.

出することに成功した。問題はこれらのスポットが *Clad* の胞子によるものかということである。ここで使用した抗 *Clad* 抗血清は真菌が増殖する際に産生、放出される多糖体 (EPS) に対する抗体である。これらの多糖体は主な空中真菌の *Alt*, *Asp*, *Pen*, カンジダの 5 属の間では交差反応しないことが示されている⁶⁾。ゲル内沈降反応で共通抗原性を調べた結果では *Pen* やムコールとの交差性が存在するという報告もある²⁾。われわれは *Alt*, *Asp*, *Pen* については今回の AI 法ではスポットをつくらないことを確認した。しかしこの抗血清はオーレオバシジウムやトリコデルマと弱い交差反応性を示すと報告⁶⁾されている。そのため、これらの真菌が存在する試料では計数されてしまう恐れがある。オーレオバシジウムやトリコデルマについては真菌試料を入手できず、われわれの方法でスポットを作るかどうかは確認できていないが、今後確認する必要がある。また安枝らは *Clad* 属内の交差性も検討しており、5 種の *Clad* 属内では相互に交差反応性があると報告している⁹⁾。今回は *Clad* 属全般の検出を目的としており交差性はあ

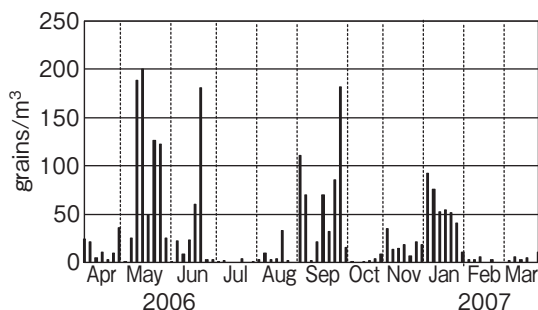


Fig. 3. Daily fluctuation of airborne *Cladosporium* spp spots measured by aeroallergen immunoblotting.

The horizontal axis — the dates of the third week at each month.

The vertical axis — the numbers of spots.

る方が望ましく、われわれの方法は空中の *Clad* 属の胞子を容易に測定できる方法として有用と考える。

季節変動については、調査の大部分が関東地方でなされており、東北地方での報告はみられない。可部²⁾が行った調査によれば、夏と秋 (9 月から 11 月)、あるいはその両者 (2 峰性) にピークがみられたという。また、三島は³⁾夏の終わりから秋に増加し 10 月に最高値を示したと報告している。井出ら²⁰⁾は晩春から初夏にかけてと秋期にピークがみられることを、また高鳥²¹⁾²²⁾は春から梅雨期 (5 月から 6 月) と秋 (9 月から 10 月) の 2 峰性のピークを報告している。われわれも春 (5 月～6 月) と秋 (9 月) にピークを認めており、春と秋の 2 峰性のピークという点では高鳥の結果と一致した。一方、われわれは 2007 年 1 月にもピークを認めたが、この年はまれにみる暖冬で、山形では 1 月の平均気温は平年より 3.5℃ も高かった。さらに、積雪は従来の二分の一から三分の一と少なかった。このように 2007 年の冬は異常な暖冬であったため、冬のピークが毎年みられるか明らかでない。

Clad の胞子数の日内変動をみると、概してピークは一つで午後から夜にかけ多く飛散する傾向が認められた。一方、石岡が島根県松江地方で行った調査²³⁾では午前 9 時頃と、午後 6 時頃の 2 峰性を示すと報告している。今回の調査は山形市の中

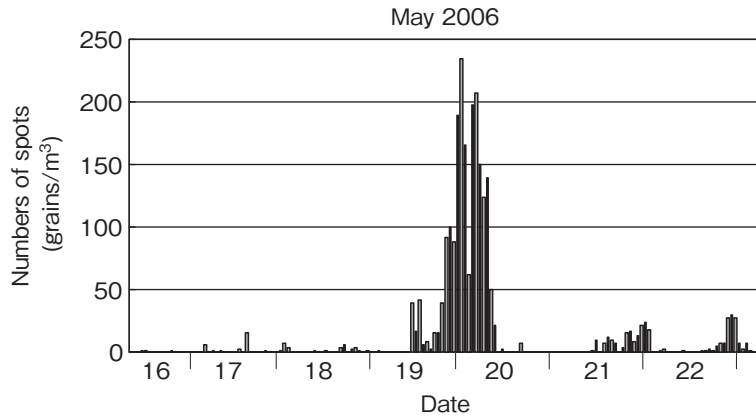


Fig. 4a. Hourly fluctuation of airborne *Cladosporium* spp spots measured by aeroallergen immunoblotting in May 2006.

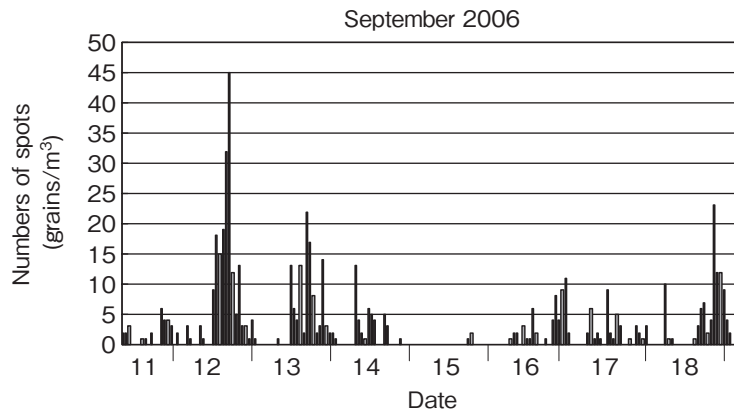


Fig. 4b. Hourly fluctuation of airborne *Cladosporium* spp spots measured by aeroallergen immunoblotting in September 2006.

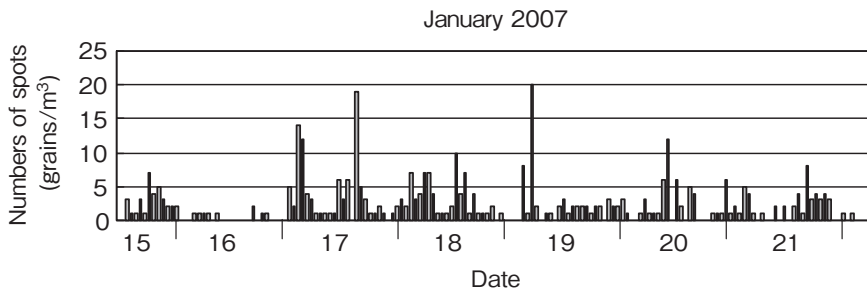


Fig. 4c. Hourly fluctuation of airborne *Cladosporium* spp spots measured by aeroallergen immunoblotting in January 2007.

Table 1 Relationship between the numbers of *Clad-sporium* spores and the meteorological factors

Meteorological factor	Coefficients of correlation
Precipitation	- 0.118
Maximum temperature	0.121
Mean temperature	0.044
Minimum temperature	0.132
Moisture	0.028
Wind velocity	0.116
Sunshine duration	- 0.041

心部一カ所での調査であり、場所による違いがどの程度あるか明らかでない。日内変動の地域差は今後に残された課題である。

小白川至誠堂病院臨床検査科、中川卓夫氏には真菌を提供いただいた。また山形県衛生研究所、大谷勝実副所長には真菌スポットの撮影に協力いただいた。ここに深謝する。

文 献

- 1) Vijay HM, Thaker AJ. Mold allergens. In: Lackey IRF, Buknts SC, editors. Allergens and allergen immunotherapy. New York: Marcel Dekker; 1999. p. 133-54.
- 2) 可部順三郎. 抗原の除去・回避策 2 真菌. アレルギーの臨床 1989; 112: 785-6.
- 3) 三島 健. 住環境に起因するアレルギー, II 真菌アレルギー. 化学と生物 1988; 26: 134-8.
- 4) Hjelmroos M. Svampsporsasongen 1991. In: Asthma & Allergi Service Fison Pharmaceuticals. Stockholm: Fisons Sweden AB; 1991. p. 76-86. (in Swedish).
- 5) 安枝 浩, 齋藤明美, 秋山一男, 高鳥浩介. VII 真菌の免疫化学的検出法の開発. 公害健康被害補償予防協会委託業務「生活環境中の粒子状物質等による個人暴露測定手法の開発に関する研究報告書」2000 年度. p. 169-78.
- 6) 安枝 浩, 秋山一男, 高鳥浩介. VII 真菌の免疫化学的検出法の開発. 公害健康被害補償予防協会委託業務「生活環境中の粒子状物質等による個人暴露測定手法の開発に関する

研究報告書」2001 年度. p. 207-17.

- 7) 安枝 浩, 齋藤明美, 秋山一男, 高鳥浩介. VII 真菌の免疫化学的検出法の開発. 公害健康被害補償予防協会委託業務「生活環境中の粒子状物質等による個人暴露測定手法の開発に関する研究報告書」2002 年度. p. 519-28.
- 8) Takahashi Y, Aoyama M, Yoshitake M, Abe E, Ohta N, Sakaguchi M. Relationship between airborne Cry j 1 and the onset time of the symptoms of Japanese cedar pollinosis patients. *Allergol Int* 2007; 56: 277-83.
- 9) Takahashi Y, Aoyama M, Abe E, Aita T, Kawashima S, Ohta N, et al. Development of electron spin resonance radical immunoassay for measurement of airborne orchard grass (*Dactylis glomerata*) pollen antigens. *Aerobiologia* 2008; 24: 53-9.
- 10) 青山正明, 高橋裕一. ラジカルイムノアッセイ法による Cryj1 の超高感度測定法の開発. アレルギー 2004; 53: 1088-90.
- 11) Takahashi Y, Nagoya T, Watanabe M, Inouye S, Sakaguchi M, Katagiri S. A new method of counting airborne Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens by immunoblotting. *Allergy* 1993; 48: 94-8.
- 12) 高橋裕一, 井上 栄, 阪口雅弘, 片桐 進. イムノプ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. アレルギー 1990; 12: 1612-20.
- 13) Sakaguchi M, Inouye S, Takahashi Y, Katagiri S, Yasueda H. Immunoblotting of mite aeroallergens collected with an indoor Burkard air sampler. *Aerobiologia* 1995; 11: 265-8.
- 14) Hirst JM. An automatic volumetric spore

- trap. *Ann Appl Biol* 1952; 39: 257-65.
- 15) 高橋裕一, 名古屋隆生, 太田伸男. エアロアレルギーイムノブロット法による花粉アレルゲン (Cry j 1, Dac g) を有する花粉種および大気浮遊粒子の同定. アレルギー 2002; 51: 609-14.
- 16) Green BJ, Yli-Panula E, Tovey ER. Halogen immunoassay, a new method for the detection of sensitization to fungal allergen; comparisons with conventional techniques. *Allergol Int* 2006; 55: 131-9.
- 17) Lucia C, Alessandro M, Christer J, Angelo C, Deborah J, Isabelle P, et al. Asthma control in Europe: a real-world evaluation based on an international population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1360-7.
- 18) Raphaela R, Simon-Nobbels B, Langdon J, Claudia H, Verna W, Verna P, et al. *Cladosporium herbarum* translationally controlled tumor protein (TCTP) is an IgE-binding antigen and is associated with disease severity. *Mol Immunol* 2008; 45: 406-18.
- 19) Ayfer I, Bingol RG, Ufuk AD, Korkmaz GH, Yeliz A, Rukiye G, et al. Effect of indoor mold concentrations on daily symptom severity of children with asthma and/or rhinitis mono-sensitized to molds. *J Asthma* 2007; 44: 543-6.
- 20) 井出宏嗣, 高橋昭三. 真菌アレルギー. 臨床医薬情報 1986; 26: 697-700.
- 21) 高島美奈子. 最近 10 年間の相模原地区における空中飛散真菌. アレルギー 1994; 43: 1-8.
- 22) 高島浩介, 相原真紀. 病原性真菌の今日的意味 (10) 4. 真菌とアレルギー. 化学療法の領域 2002; 20: 351-5.
- 23) 石岡 栄. 松江地方の空中真菌相とその菌種に関する研究. 真菌誌 1991; 32: 297-311.

MEASUREMENT OF AIRBORNE *CLADOSPORIUM* SPP ANTIGENS BY AEROALLERGEN IMMUNOBLOTTING AND THE SEASONAL FLUCTUATION

Michiko Suzuki¹⁾, Yuichi Takahashi¹⁾, Hiroshi Yasueda²⁾ and Akemi Saito²⁾

¹⁾Yamagata Prefectural Institute of Public Health

²⁾Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology,
National Hospital Organization, Sagami-hara National Hospital

Background: Airborne *Cladosporium* spp (Clad) antigens were measured by aeroallergen immunoblotting, and analyzed the seasonal fluctuation of the antigens.

Methods: Airborne Clad antigens (Clad) were transferred onto nitrocellulose membrane and treated with anti-Clad rabbit antiserum, then alkaline phosphatase-conjugated rabbit IgG. Finally, the spots from Clad antigens were visualized with BCIP/NBT substrate.

Results: Clear purple spots from Clad antigens were seen on the airborne samples. Two peaks of spring and autumn were observed on the study of daily examination of the spots. Many spots from Clad antigens were mainly observed from afternoon to midnight at daily basis. No correlation between the number of the spots and the four weather elements was seen.

Conclusion: Spots from airborne Clad antigens can be obtained easily by use of an immunochemical technique. The great numbers of spores were seen in spring and autumn out of one year and from afternoon to midnight out of one day.