

スギおよびヒノキ科花粉数の算定における花粉染色封入法の影響

1) 中山耳鼻咽喉科, 2) 日本大学医学部第一外科

中山壽孝¹⁾ 中山壽之¹⁾²⁾

空中花粉調査における染色封入方法は施設ごとに異なっており測定される花粉数に差異が生じている。スギおよびヒノキ科花粉数の測定において染色封入方法が与える影響について検討した。Durham型捕集器2台を同一場所に設置し、台上にワセリンを塗布したスライドガラスを置き、24時間空中に曝露した。Calberla染色法(C法)とgentiana-violet-glycerin jelly法(G法)を用いて花粉数を測定した。C法が花粉シーズン中の観察開始から終了までの期間が長く花粉の検出に優れていた。C法とG法による花粉数には、有意に相関が認められた($p < 0.001$)。C法によるスギおよびヒノキ科花粉数はG法によるそれぞれの花粉数の33.7%, 120.3%増しであった。花粉調査には全国統一してCalberla染色を使用することが望ましい。また、花粉数を公表する場合には捕集法と染色封入方法を併記することを推奨する。

Key words : *Cryptomeria japonica* — Cupressaceae — Japanese cedar pollinosis — pollen counts — staining method

はじめに

近年における花粉症患者の増加は著しく国民の18~26%に達すると推定される¹⁾²⁾。現在、全国多数の地点で空中花粉調査が実施され飛散花粉数の多寡や予報が各種マスコミ、インターネットなどで報道されている³⁾。このような花粉情報は、花粉症の予防や治療において必要不可欠なものとなっている⁴⁾。しかし、空中花粉調査における捕集、染色、同定の手順は施設ごとに異なっている。我が国では花粉の捕集器にはDurham型、ISロータリー型、Burkard型の3種類が使用されており、捕集器の違いが花粉数算定に影響を与えることはよく知られている⁵⁾。一方、花粉染色法にはCalberla液⁶⁾を用いる施設と、gentiana-violet-glycerin jellyを用いて染色封入⁷⁾している施設がある。我々は1981年以降、Durham型およびISロータリー型捕集器とgentiana-violet-glycerin jellyによる染色封入を用いて花粉観測を行ってきた⁸⁾。しかし、各施設において算定される花粉数に相当のばらつきを認め、飛散開始も異なることが指摘されており⁹⁾、

我々は染色封入方法(以下染色法)がこの差異に影響を与えているのではないかと予測した。また、染色法が、算定花粉数に差異を生ずるか否かについて検討した報告は見当たらない。

今回スギおよびヒノキ科花粉数の測定において染色法が与える影響について検討した。

対象と方法

1. 対象

1998(平成10)年1月1日から同年4月30日の間に、中山耳鼻咽喉科(徳島県阿南市富岡町)の4階屋上(高さ約10 m)において捕集されたスギ(*Cryptomeria japonica*、およびヒノキ科(Cupressaceae)花粉を対象とした。

2. 方法

花粉捕集は竹田の方法⁵⁾に従い、当院屋上の同一場所に2台のDurham標準花粉捕集器(西精機株式会社、千葉)を約50 cmの間隔を空けて設置した。各捕集器の台上に毎日午前9時にワセリンを塗布したスライドガラスを置き、24時間空中に曝露した。台上のスライドガラスは1週間ごとに各台上を交代した。染色法以外の背景因子は全く同一の手順である。花粉染色は以下の2方法を各々施行した。

Received : April 16, 2001

Accepted : June 27, 2001

Abbreviations : C法 Calberla染色法; G法 gentiana-violet-glycerin jelly法

1) Calberla 染色法 (以下 C 法)⁵⁾⁶⁾: 花粉が捕集されたスライドグラスに Calberla 液 {グリセリン (和光純薬工業, 大阪) 5 ml, 95% アルコール (武藤化学, 東京) 10 ml, フクシン原液 (約 10% 塩基性フクシンエタノール溶液: 武藤化学, 東京) 2 滴, 蒸留水 15 ml} を数滴滴下し, 1.8×1.8 cm のカバーグラスをかけて室温放置する。

2) gentiana-violet-glycerin jelly 法 (以下 G 法): 菅谷の方法⁷⁾に準じ gentiana-violet-glycerin jelly を使用して染色及び封入を行った。ゼラチン 10 g (和光純薬工業, 大阪) をフラスコにとり, 蒸留水 35 ml を加え, グリセリン 60 ml (和光純薬工業, 大阪) を加え, 加温して溶解, 混和する。やや冷えてから固まる前に gentiana-violet (和光純薬工業, 大阪) 1 ml とフェノール (和光純薬工業, 大阪) 0.5 ml を加え, 混和し, そのままシャーレに厚さ 2 mm となるように注入しゼリー状とした後に冷蔵庫に保存する。花粉を捕集したスラ

イドグラスに, この gentiana-violet-glycerin jelly を小さく切った 1 ブロック (約 4×4×2 mm) を乗せ, 1.8×1.8 cm のカバーグラスをかける。ガスバーナーを用い火力を弱めにし, 炎より距離をおいて沸騰しないようスライドグラスを徐々に加熱する。ゼラチンがカバーグラス一杯に広がるまで加温することで, スライドグラスに付着した花粉の封入と染色が同時に行われる。

それぞれの染色が終了した後に, 100 倍率で鏡検観察し花粉数を測定, 2 箇所 の 平均値を用いた。内部構造を観察する場合は適宜, 200 倍あるいは 400 倍を使用した。C 法ではカバーグラス内の花粉を全て算定した。G 法では Fig. 1 の如くカバーグラスから僅かにゼリーがはみ出すため, カバーグラス内の花粉と, はみ出したゼリー部分の花粉の両者を合計し花粉数として算定した。花粉飛散状況は佐橋の定義に従って¹⁰⁾¹¹⁾, 初観測日 (1 月 1 日より初めて小数点以下 1 桁の数が認められた最初の日), 飛散開始日 (1 月 1 日から初めて連続 2 日以上 1 個 $\geq$ 1 cm² 記録した最初の日), 最高飛散日 (観測期間中最多飛散日), 飛散終了日 (3 日間連続して 0 個が続いた最初の日の前日), 最高飛散数 (最高飛散日の飛散数) を用いて示した。

統計学的検討は, 両染色法に関して Pearson の相関係数を求めるとともに回帰分析を行った。

結 果

1. スギ花粉数

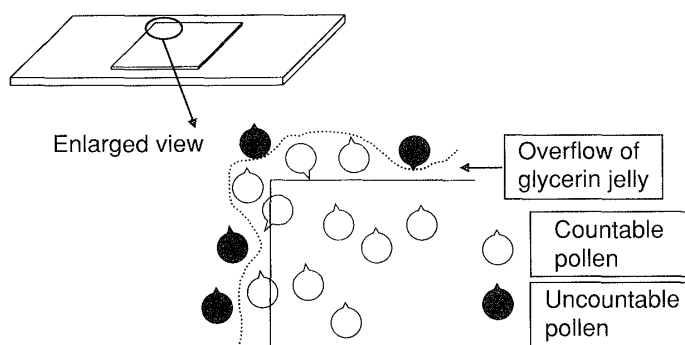


Fig. 1. Measurement of the pollen count.

Table 1 Comparing C method to G method in the measurement of the *Cryptomeria japonica* pollen

	C method	G method
Day 1	6 January	8 February
Day 2	15 February	15 February
Day 3	28 February	28 February
Day 4	5 April	31 March
Pollen counts during the whole day (/cm ²)	986.6	706.3
The highest dispersion number (/cm ² /day)	312.0	243.7

C method : Calberla method

G method : gentiana-violet-glycerin jelly method

Day 1 : day when the pollen was observed for the first time

Day 2 : day when the pollen started to disperse

Day 3 : day when dispersion of the pollen was highest

Day 4 : day when the pollen dispersion ended

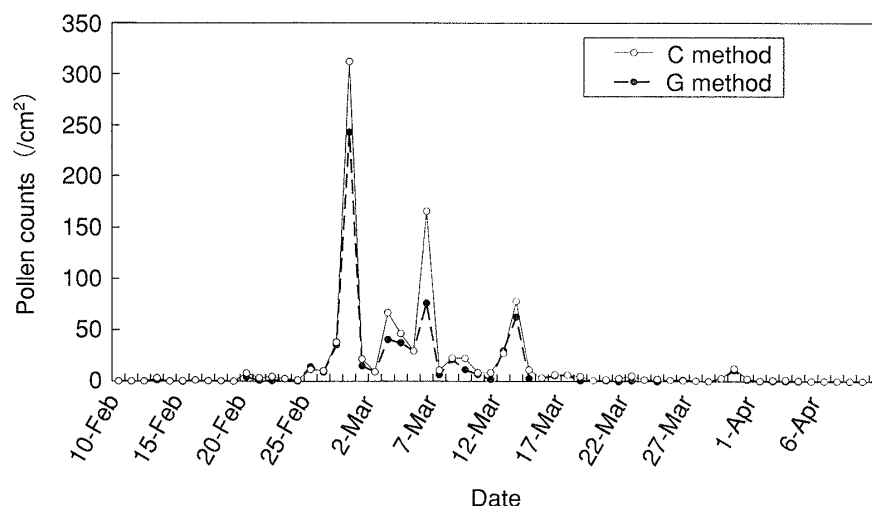


Fig. 2. *Cryptomeria japonica* pollen counts between February and April of 1998.

スギ花粉は特有の突起を有しており¹²⁾、容易に判別できた。しかし、G法では、飛散数が多い時にはカバーガラスからはみ出しが著明であり、数え落とし無いように丹念に算定した。

染色法別のスギ花粉数を示す (Table 1)。初観測日はG法 (2月8日) よりC法 (1月6日) が約1カ月も早かった。初観測日から飛散開始日までの期間中に、カバーガラス内に少なくとも1個以上の花粉が観測された日数はG法 (2回) に比べてC法 (9回) が多かった。しかし、飛散開始日は2月15日で同一であり、観測期間中に最も花粉数の多かった最高飛散日も2月28日で同じであった。飛散終了日はG法 (3月31日) よりC法 (4月5日) が遅かった。観測期間中の総花粉数、1日当たりの平均個数、最高飛散数は、いずれもC法が高値であった。

観測期間中の両染色法におけるスギ花粉数の変動を示す (Fig. 2)。常にC法を用いた時の花粉数は高値を示したが、日ごとのピークは一致していた。

両染色法間のスギ花粉数の散布を Fig. 3 に示す。Pearson の相関係数は 0.980 で統計学的に有意な相関を認めた ($p < 0.001$)。C法による花粉数 (Y) とG法による花粉数 (X) の回帰直線は $Y = 1.337 X + 0.435$ で、C法による花粉数はG法の 33.7% 増しであった。

2. ヒノキ科花粉数

平均花粉数ではヒノキ科花粉はスギ花粉に比較して捕集数が少なく、外形的特徴に乏しいため内部構造¹²⁾を確認して算定した。G法においては、カバーガラスからはみ出すと内部構造が不明瞭になりスギのように突起も無いため判定ができなかった。花粉内部構造の観

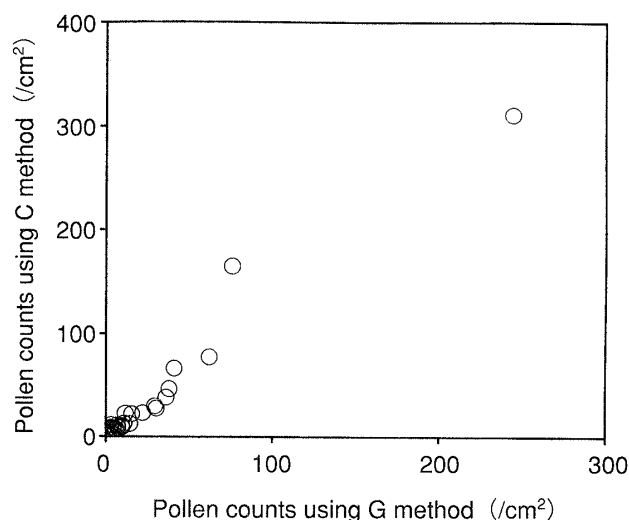


Fig. 3. The relationship of *Cryptomeria japonica* pollen counts between C method and G method.

察にはG法およびC法には差異は無かった。G法は固定し後刻再観察するのに優れていた。

ヒノキ科花粉数と染色法による差を示す (Table 2)。初観測日はスギ花粉と同様にC法 (3月21日) がG法 (3月24日) より早かったが、その差はわずか3日間であった。しかし、飛散開始日はG法 (3月25日) が3日間、早かった。最高飛散日 (3月30日) と飛散終了日 (4月11日) は同一であった。

観察期間中の染色法別ヒノキ科花粉数の変化を示す (Fig. 4)。C法が高値を示す傾向にあるが、その差はスギ花粉ほど大きくはなかった。日ごとのピークは両染色法とも一致していた。

Table 2 Comparing C method to G method in the measurement of the Cupressaceae pollen

	C method	G method
Day 1	21 March	24 March
Day 2	28 March	25 March
Day 3	30 March	30 March
Day 4	11 April	11 April
Pollen counts during the whole day (/cm ²)	100.3	46.0
The highest dispersion number (/cm ² /day)	34.7	12.7

C method : Calberla method

G method : gentiana-violet-glycerin jelly method

Day 1 : day when the pollen was observed for the first time

Day 2 : day when the pollen started to disperse

Day 3 : day when dispersion of the pollen was highest

Day 4 : day when the pollen dispersion ended

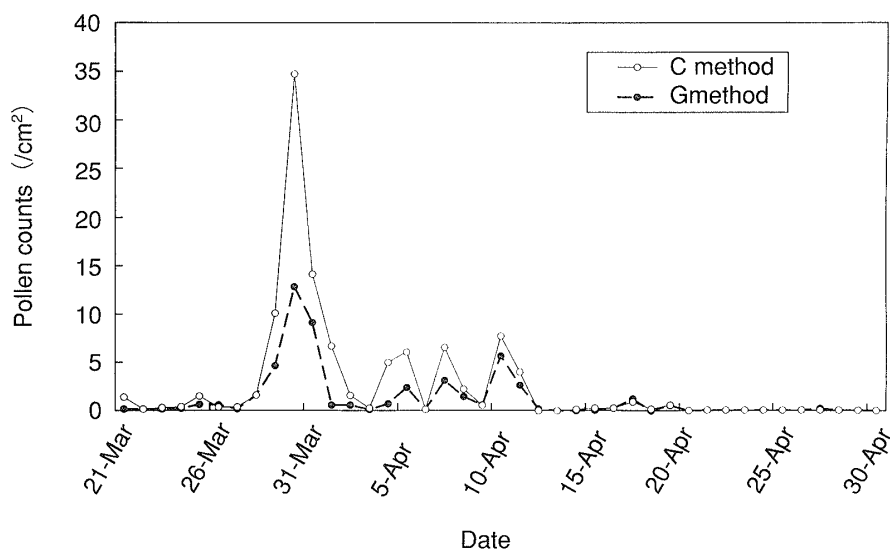


Fig. 4. Cupressaceae pollen counts between March and April of 1998.

両染色法の花粉数散布を示す (Fig. 5). Pearson の係数 0.944 で統計学的に有意な相関を認めた ($p < 0.001$). 回帰直線は $Y = 2.203 X + 0.1$ で, C 法による花粉数は G 法の 120.3% 増しであった.

考 察

IT (information technology) 革命時代の今日においては, 花粉情報も全国津々浦々まで報道されるようになった. テレビ, ラジオ, 新聞はもとよりインターネットを通じて即時に誰もが全国のスギ花粉数を手に入れることが可能となっている¹³⁾. 京都ではいち早く花

粉情報センターが企画され花粉症の予防, 治療に役立っている¹⁴⁾. 現在では, 各地において花粉調査に基づいて飛散開始日, 最高飛散日が判定されるようになった. 花粉飛散開始日と患者の治療開始時期は一致しており¹⁵⁾, 花粉数が花粉症発症に関与すると判明したことから¹⁶⁾, 花粉の飛散状況を把握することは花粉症に対する医療戦略にとって重要事項であると考えられる¹⁷⁾.

このような状況において, スギ花粉数については, 厚生省花粉症研究班¹⁸⁾や近畿地方花粉症研究会¹⁹⁾が, 2000 年は西日本より東日本において花粉数が多いと報告している. その原因としてスギ植林面積の違い, 気候の変化などが挙げられるが, 奥田らは花粉捕集方

法により花粉数に差があることを指摘して花粉測定の方法論、信頼性に疑問を唱えている²⁰⁾。花粉捕集法については Durham 型, IS ロータリー型, Burkard 型の各機種により花粉数に違いがあることが報告されている^{21)–24)}。一方, 花粉染色法による違いについてはほとんど検討がなされていない。

植物の花粉は, 外壁に様々な模様と内部に特有の構造物を有しており, 色素を用いて染色することで種類の鑑別が可能となる²⁵⁾。また, 封入剤を用いることで, さらに外形や模様が長期間の保存に耐える花粉標本の作成が可能となる。1956 年, 幾瀬は gentiana-violet や fuchsine など染めた後に glycerin jelly を封剤として用いる方法を報告した²⁵⁾。1973 年, 菅谷は glycerin jelly に gentiana-violet を加えた GV-glycerin jelly を開発しスギ, ヒノキ科の飛散調査に使用した⁷⁾。以後, GV-glycerin jelly は藤崎²⁶⁾, 佐橋²⁷⁾を初めとして広く花粉調査に用いられており, 本研究では G 法とし

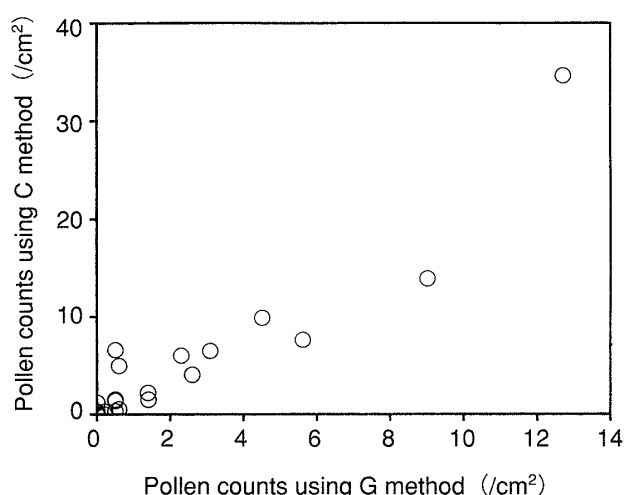


Fig. 5. The relationship of the Cupressaceae pollen counts between C method and G method.

て検討した。一方, 1962 年, 北原により fuchsine を含んだ Calberla 液が開発され⁶⁾, 花粉の染色剤として広く普及し, 堀口²⁸⁾, 信太²⁹⁾, 高橋³⁰⁾らにより使用例が報告されており, 我々は C 法として検討した。

両方法にはそれぞれ長所短所があり, 主な特徴を Table 3 に示した。G 法は花粉が紫色に染色されるとともに封入が同時に行われる。標本作成操作は複雑で約 15 分を要した。また, グリセリンゼリーが加温により溶解するためカバーガラスの外に花粉が飛び出すことがある。しかし, 長期保存に耐える標本が完成するため, 後刻観察することが可能である。我々が, 1981 年に G 法により作成した標本は, 現在でも観察, 算定に耐えうる状態である。また, 花粉が膨潤形となるため²⁵⁾, 形態の観察が行いやすい。一方, C 法では花粉は赤く染色されるが封入は行われない。作成時間は約 2 分と短く簡便である。カバーガラス内に均一に花粉が分布し算定するには好都合であるが, 保存が効かないため直ちに観察する必要がある。

今回の我々の検討では, スギ花粉数算定においては C 法が観察開始から終了までの期間が長く, 検出率が高いことが判明した。スギ花粉は特有の突起を有するために判別しやすいことも一因と考えられた。一方, ヒノキ科花粉の算定には外形, 模様, 内部構造を正確に把握することが必要であった。

染色法の違いにより, 花粉数に差異が生じる原因について詳細は不明であるが, 一因として操作方法による因子や花粉の変形による因子が関係すると思われる。G 法では封入剤のグリセリンが溶融し花粉がカバーガラスからはみ出しを認め, 加温操作により塗布したワセリンの液状化を伴った花粉破裂も考慮された。我々の観察では破裂した花粉は突起が変形したり内部構造を観察できず, 植物ごとの花粉数判定は困難であった。さらにカバーガラスからはみ出した花粉で

Table 3 Differences between C method and G method

	C method	G method
Time	About 2 minutes	About 15 minutes
Technique	Convenient	Complicated
Dyeability	Homogeneity	Uniformity
Color tone	Red	Purple
Observation of pollen	Sometimes difficulty	Easy
Preservation	Impossible	Possible

C method : Calberla method

G method : gentiana-violet-glycerin jelly method

はスギは突起があり判定は容易であるが、ヒノキ科は特徴がなく内部構造が不鮮明となりスギかヒノキまたはその他の花粉との鑑別が困難であった。

同一施設において、花粉シーズンを通しての変動をみるためには、飛散開始日や最高飛散日は、ほぼ一致しており、臨床上は両染色法とも有効な測定方法であると考えられた。しかし、花粉情報は全国津々浦々の施設の協力により成されており、全国の各施設で標準化した方法が採用されるべきであると考えられるものの¹⁰⁾、未だ統一がなされていない。欧米における花粉捕集は Burkard 型が主流となり Durham 型は過去の遺物となっている²⁴⁾。また染色法は Calberla 染色が標準法として採用されている³¹⁾。特に米国では Pan-American Aerobiology Association が Standardized Protocols を設定しており Calberla 染色や Glycerin Jelly による封入法をインターネット (<http://www.geocities.com/ResearchTriangle/Campus/9792/StandardizedProtocols.html>) を通じて公表している。花粉数算定には迅速、簡便が必要条件であり、今回の検討から我々は、スギおよびヒノキ科花粉飛散調査には C 法を用いることを推奨する。厚生省花粉症研究班では各地のスライドを一カ所に集め全て C 法を用いた染色を開始している¹⁸⁾。ただし現在各施設で実施し、算定された成績は、その施設内では同じテクニック、同一条件ゆえに誤差が少なく貴重なデータである。したがって同一地点における年度毎の比較に有意義であるため、従来の染色方法を改めることは幾許かの損失も伴うと思われる。本研究により G 法と C 法に有意な相関関係があることが示された。これは、両者の換算式としても有効であり、G 法の結果から簡易的に C 法による推定花粉数が求められることが判明した。各施設での花粉数カウント方法の統一が困難な場合は、このような換算式を施設ごとに設定するのも一案であり標準的手順の設定とともに関連学会などで対応されることを切望する。

竹中は花粉情報は継続して観測されることが患者のニーズに合うものであり、学問的新事実に乏しく評価されるものではないと述べている³²⁾。しかし、方法論すら統一していない現状で継続観察することは甚大な経費と労力の無駄であり、飛散花粉の現状を把握するに最も適切な測定方法を確立することが学問的にも有用であると考えられた。かかる意味において、本研究は過去のデータ調整を含め現段階では必要にして評価に値するものと思われる今回報告した。

結 語

染色法の違いにより花粉数の算定結果が異なっていた。スギおよびヒノキ科花粉飛散調査には全国統一して Calberla 染色を使用することが望ましい。今後、花粉数を公表する場合には捕集法や染色方法を併記することを推奨する。

本論文の要旨は第 11 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (1999 年 5 月, 大阪) において報告した。

本論文に対し、ご協力頂いた東邦大学薬学部佐橋紀男教授、ご校閲頂いた熊本大学医学部石川 峰名誉教授、日本大学医学部福澤正洋教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 斎藤洋三：スギ花粉症—過去・現在・将来—。花粉誌 **45**, 55-62, 1999.
- 2) 西端慎一, 井上 栄, 雑賀寿和, 佐橋紀男, 鈴木修二, 他：東京都におけるスギ花粉症有病率東京都花粉症対策検討委員会の平成 8 年度実態調査から。アレルギー **48**, 597-604, 1999.
- 3) 竹中 洋：花粉情報の出し方・見方：アレルギーの臨床 **19**, 264-267, 1999.
- 4) 今井 透：花粉症関連の情報の入手と利用法。Prog. Med. **18**, 2785-2788, 1998.
- 5) 竹田英子：空中花粉調査とその現況。JOHNS **4**, 159-163, 1988.
- 6) 北原静夫：アレルギー疾患の臨床—米国のアレルギー診療室から—。日本医事新報 **2008**, 7-13, 1962.
- 7) 菅谷愛子：東京都港区における空中飛散花粉分析特にイチョウ花粉の飛散状態について。アレルギー **22**, 321-328, 1973.
- 8) 中山壽孝：多発せるスギ花粉症について。日耳鼻会報 **82**, 203-204, 1979.
- 9) 佐橋紀男：2000 年のスギ花粉前線。花粉誌 **46**, 45-53, 2000.
- 10) 佐橋紀男, 岸川禮子, 西間三馨, 長野 準：日本における空中花粉測定および花粉情報の標準化に関する研究報告。花粉誌 **39**, 129-134, 1993.
- 11) 佐橋紀男：1995 年のスギ花粉前線。花粉誌 **41**, 59-67, 1995.
- 12) 佐橋紀男：主要原因花粉生産植物とその花粉。JOHNS **4**, 147-157, 1988.
- 13) 今井 透, 小沢 仁：花粉症・鼻アレルギー診療におけるインターネットの活用法。アレルギーの

- 臨床 **20**, 210-227, 2000.
- 14) 竹中 洋, 高木伸夫, 片桐 聡, 水越文和, 村上泰, 他: 京都府における花粉情報について—花粉情報センターのあらまし—. 耳鼻臨床 補 **76**, 1-5, 1995.
 - 15) 藤倉輝道, 佐橋紀男, 秋元利春, 佐地富砂子, 青木秀治, 他: スギ花粉症患者の外来初診日の動向. 耳鼻展望 **42**, 292-297, 1999.
 - 16) 出島健司, 竹中 洋, 斎藤憲治, 河田 了, 高木伸夫, 他: スギ花粉症の発症と花粉飛散についての検討. アレルギー **41**, 1405-1411, 1992.
 - 17) 榎本雅夫, 嶽 良博: 花粉症の自己管理. *Prog. Med.* **18**, 2796-2799, 1998.
 - 18) 厚生省花粉症研究班日本列島空中花粉調査データ集 (西間三馨・奥田 稔・信太隆夫・岸川禮子監修). (前)厚生省花粉研究班作成. 協和企画, 東京, 2000.
 - 19) 近畿花粉情報センター: 近畿地方の花粉飛散数報告書. 近畿花粉症研究会, 大阪, 2000.
 - 20) 奥田 稔, 三浦逸子, 広島加乃: スギ花粉症常識への疑問. 日本医事新報 **3944**, 37-44, 1999.
 - 21) 佐橋紀男: 空中花粉調査の話題. 花粉誌 **30**, 75-77, 1984.
 - 22) 丸山昌広, 岡田弘之, 高柳和幸: 愛知県新城市における 1995 年のスギ・ヒノキ花粉数ダラム型とロータリー型の 2 方法による相関. アレルギーの臨床 **15**, 636-639, 1995.
 - 23) 裕田猛真, 雪谷茂子, 岩松裕子, 芝 埜彰, 高橋將範, 他: ダラム型と IS 式ロータリー型花粉捕集器の比較 和歌山市における平成 9 年春の検討. 花粉誌 **44**, 77-83, 1998.
 - 24) 児塔栄子, 岸川禮子, 西間三馨, 石川 峰: ダラム型と IS 式ロータリー型空中花粉捕集器による調査結果の比較検討 国立療養所南福岡病院における最近 12 年間の調査結果から. 花粉誌 **44**, 107-118, 1998.
 - 25) 幾瀬マサ: 日本植物の花粉. 廣川書店, 東京, pp. 1-2, 1956.
 - 26) 藤崎洋子: 新潟市における過去 15 年間の空中花粉調査結果と花粉症患者の実態. 花粉誌 **34**, 19-30, 1988.
 - 27) 佐橋紀男: 花粉学から見たスギ花粉の飛散変動. 科学 **61**, 101-104, 1991.
 - 28) 堀口申作, 齊藤洋三: 空中飛散花粉の検索とその臨床的意義. 日耳鼻会報 **68**, 974-981, 1965.
 - 29) 信太隆夫: 相模原市における過去 20 年間の空中飛散花粉検索と花粉症患者の推移. 花粉誌 **32**, 41-49, 1986.
 - 30) 高橋裕一, 菅野颯一, 松浦敬次郎, 東海林喜助, 片桐 進: 山形市における過去 5 年間 (1983 年～1987 年) のスギ花粉・マツ属花粉およびコナラ属花粉の空中飛散状況と気象との関係—雄花芽形成量に影響を及ぼす因子の解析. 花粉誌 **34**, 1-9, 1988.
 - 31) Weber, R.W.: Pollen identification. *Ann. Allergy Asthma Imm.* **80**, 141-147, 1998.
 - 32) 竹中 洋: 空中飛散スギ花粉数の測定とその応用. アレルギー **49**, 558-561, 2000.

INFLUENCE OF STAINING AND MOUNTING METHODS ON *CRYPTOMERIA JAPONICA* AND CUPRESSACEAE POLLEN COUNTS

Toshitaka Nakayama¹⁾ and Hisashi Nakayama¹⁾²⁾

¹⁾Nakayama Ear Nose and Throat Clinic, ²⁾First Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

The staining and mounting method for measuring air-borne pollen differs at each institute resulting in discrepancies. We examined influence of staining and mounting methods on pollen counts of *Cryptomeria japonica* and Cupressaceae.

Two Durham type pollen collection instruments, stored at the same place and holding slides coated with white vaseline, were exposed to the air for 24 hours. Pollen was counted using Calberla staining (C method) or gentiana-violet-glycerin jelly staining (G method). Results showed: 1) C method showed more variety than G method for measuring the pollen counts from the beginning to the end of the pollen season; 2) a significant coincidence was observed between counts measured by C and G methods ($p < 0.001$); and 3) the counts of *Cryptomeria japonica* and Cupressaceae measured by C method resulted in higher levels by 33.7% and 120.3%, respectively, than those counted by G method. We recommend that Calberla staining is preferable for regular nationwide pollen counts and that pollen count reports should include the collection and staining methods.