

〔速報〕

蛍光抗体染色法とフローサイトメトリーを組合せた 空中スギ花粉量の迅速測定法

¹⁾山形県衛生研究所, ²⁾日本分光(株), ³⁾東京ダイレック(株), ⁴⁾興和総合科学研究所, ⁵⁾国立公衆衛生院

高橋裕一¹⁾ 吉村俊一²⁾ 真砂 央²⁾
井上浩三³⁾ 白井 忠³⁾ 名古屋隆生⁴⁾
阪口雅弘⁵⁾ 井上 栄⁵⁾ 片桐 進¹⁾

蒸留水中に大気試料を捕集するように改造した花粉捕集器を用いて空中スギ花粉を捕集し, その花粉をスギ花粉の主要アレルゲン (*Cry j I*) に特異的な蛍光標識モノクローナル抗体 (KW-S10) で染色し, フローサイトメータで分析した. この抗体で処理したスギ花粉の蛍光強度は, 未処理のスギ花粉やこの抗体で処理したヒノキ花粉より明らかに大きかった. この方法を用いれば, 試料捕集後20分以内にスギ花粉のみを選択的にかつ迅速に測定することができる.

Key words: airborne allergen — *Cry j I* — flow cytometry — pollen — Virtual Impactor

はじめに

スギ花粉症患者の急増に伴い, 全国各地でスギ花粉情報の提供がなされるようになった. 正確なスギ花粉情報 (予報) を行うためには迅速かつ精度の高い空中スギ花粉数の測定が不可欠である.

今回, 大気浮遊粒子捕集装置 (バーチャル・インパクト) で捕集される空中花粉試料中のスギ花粉量を, 選択的, 且つ迅速に測定するための, 蛍光抗体染色法とフローサイトメトリーを組合せた分析方法を開発したので報告する.

材料と方法

1. 空中花粉の採集

花粉を濾紙上に捕集する方式の市販大気浮遊粒子捕集器 (バーチャル・インパクト-VS-20, 東京ダイレック社) を, 次の免疫反応による蛍光抗体染色の都合で, 10ml の蒸留水に捕集する方式に改造¹⁾して空中花粉の採集に用いた. 吸引速度6m³/hr で一定時間吸引した

後, 得られる花粉懸濁液を0.3ml に遠心濃縮した. 本装置の, 直径7μm 以上の粒子に対する浮遊粒子捕集効率 は約90%である.

2. スギ花粉の蛍光抗体染色

前田ら²⁾の方法に従って, スギ花粉タンパク質 (*Cry j I*) に対して特異的で, ヒノキ花粉タンパクには反応しない, モノクローナル抗体 (KW-S10)³⁾を, fluorescein isothiocyanate (FITC) と反応させて蛍光標識抗体 (FITC-KW-S10) を作成し, これを0.5M トリス-HCl 緩衝液 (pH 6.0) に溶解した. 使用時に所定の濃度にしてスギ花粉に特異的な蛍光抗体染色試薬として用いた. すなわち, 試料花粉の懸濁液0.3ml にこの染色試薬0.02ml を加え, 室温で10分間震盪後, 遠心沈殿を蒸留水に再懸濁して0.3ml の懸濁液とした.

3. 蛍光フローサイトメトリー

FITC-KW-S10による蛍光染色処理を行った花粉試料について, 蛍光検出フローサイトメータ (CytoACE-150, JASCO) を用いて, スギ花粉量の測定を行った. 励起光源は空冷アルゴンイオンレーザ (488nm, 10 mw, 25×80μm 楕円ビーム) で, 測定蛍光波長は FL-1が530nm, FL-2が600nm である. 8×10² FITC 分子/粒子以上が粒子の検出感度である. フローセルは200μm 角無蛍光合成石英製で, サンプルは100~180μl 量を, 流速は1~300μl/min の間で調整可能である. スギ花粉は沈降速度が早いので, サンプル量100μl, 流速300μl/

Received: July 14, 1992

Accepted: September 25, 1992

Abbreviation: FITC fluorescein isothiocyanate

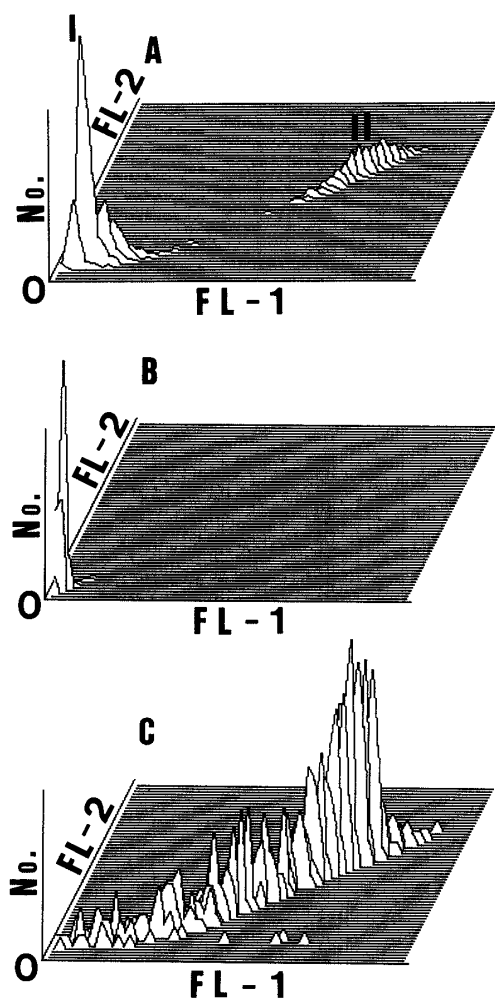


Fig. 1. Intensity of fluorescence of Japanese cedar pollen (A), Hinoki-cypress pollen (B) and airborne samples (C) obtained from flow cytometer.

Abbreviations are as follows: FL-1; Intensity of fluorescence at 530nm. FL-2; Intensity of fluorescence at 600nm. No.; Numbers of particles counted at each of the intensity. Numbers I and II in Fig. 1A are non-treated Japanese cedar pollen (I) and Japanese cedar pollen treated with 10 μ g/ml FITC-anti-*Cry j I* Mab for 10min. Hinoki-cypress pollen and airborne samples collected from 13:00 to 17:00 April 4 were treated with the same condition as Japanese cedar pollen.

min の条件で分析した。

結 果

Fig. 1 に標準スギ花粉、標準ヒノキ花粉および大気試料を FITC-KW-S10 で処理しフローサイトメトリーを行った結果を示す。図で FL-1 は 530nm の蛍光強度を、FL-2 は 600nm の蛍光強度を示している。それぞれ

最大値は 256 である。縦軸は各粒子の数を示している。標準スギ花粉を抗体処理する (Fig. 1A ピーク II) と、未処理のスギ花粉 (Fig. 1A ピーク I) に比べ明らかに蛍光強度が増加した。ヒノキ花粉を抗体処理しても蛍光強度の増加はみられなかった (Fig. 1B)。スギ花粉飛散期の大気試料を抗体で処理すると強度の小さい粒子から大きな粒子まで幅の広い蛍光強度の分布が得られた。花粉飛散ピーク時の一例を Fig. 1C に示した。

試料の一部をとって光学顕微鏡を用いて形態学的に計数した値とフローサイトメトリーで得られた値を比較したところ良い一致がみられた ($r=0.978$, $p<0.01$, Table 1)。またこれらの値を、同一時間帯に Burkard sampler で捕集した試料を抗 *Cry j I* モノクローナル抗体 (KW-S10) を用いイムノブロット法で分析し得られた値と比較すると、形態学的に計数した値との間には $r=0.870$ ($p<0.01$)、フローサイトメトリーで得られた値との間には $r=0.918$ ($p<0.01$) の値が得られ、ともに良い一致がみられた (Table 1)。

考 察

ヒノキ花粉と交差反応を示さずスギ花粉だけに特異的な蛍光標識モノクローナル抗体 (FITC-KW-S10)³⁾ を用いてスギ花粉を処理した後、フローサイトメトリーをおこなったところ、空中スギ花粉量を特異的に検出できることがわかった。この方法は、我々が先に開発した酵素抗体を用いたイムノブロット法との相関も良かった (精度については明らかではない)。迅速性においてはすぐれていると考えられる。また捕集効率も Burkard sampler のような膜上に試料を付着捕集する方式に比べると良いようである (Table 1)。

大気試料では蛍光強度の小さい粒子から大きな粒子まで幅広い分布を示した。標準花粉ではみられない小さな蛍光強度を示す粒子が大気試料に存在した理由は現在のところ明らかではない。1つの可能性として、我々は、先に空中スギ花粉飛散期の大気中にスギ花粉形態をしていない無定型の *Cry j I* 粒子が存在することを報告したが⁴⁾、このような無定型 *Cry j I* 粒子の関与も考えられる。スギ花粉は溶液中では容易に外壁が破裂するため、破裂しにくい条件を検討したところ、蒸留水あるいは 0.01M トリス緩衝液 pH 6.0 を用いるとその 99% は破裂しないことがわかった。佐分利ら⁵⁾ も蒸留水が最もスギ花粉を破裂させにくいことを報告

Table 1 Comparison of the numbers of pollen grains counted by microscope or by flow cytometer and Virtual Impactor, and by immunoblotting technique and Burkard sampler

No.	Sampling period	Virtual Impactor		Burkard sampler Immunoblotting grains/m ³
		Flow Cytometer grains/m ³	Microscope grains/m ³	
1	8hr (3/27 9:00-17:00)	47	10	13
2	22 (3/27 17:00-3/28 13:00)	28	30	24
3	4 (3/28 13:00-17:00)	77	133	47
4	18 (3/31 15:00-4/1 9:00)	62	220	63
5	4 (4/3 9:00-13:00)	113	63	88
6	4 (4/3 13:00-17:00)	96	67	140
7	4 (4/4 9:00-13:00)	15	17	19
8	4 (4/4 13:00-17:00)	522	1,363	257
9	16 (4/4 17:00-4/5 9:00)	17	8	32
10	8 (4/5 9:00-17:00)	50	58	67
11	16 (4/6 17:00-4/7 9:00)	33	41	63
12	8 (4/8 9:00-17:00)	42	46	23

している。また、*Cry j I* 抗原は蒸留水中に溶出しなことがわかっている⁶⁾。

Table 1 のフローサイトメトリー法の花粉数は単位立方メートル当たりで表示してあるが、実測値はその6倍の値である（バーチャル・インパクトの1時間当たりの大気吸引量が6m³なので）。このことから考えると、今回はスギ花粉の飛散ピーク時には4時間ごとに試料を採集したが、1時間ごとに採集し1時間ごとの値を測定することも可能と考えられる。

フローサイトメータは日本分光(株)林幹高氏のご好意により借用した。心から感謝いたします。

文 献

- 1) Hinds, W.C.: Aerosol Technology. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp.110-122, 1982.
- 2) Maeda, H., Ishida, N., Kawauchi, H. and Tuzimura, K.: Reaction of fluorescein-isothiocyanate with proteins and amino acids. *J. Biochem.* 65, 777-783, 1969.
- 3) 渡辺政尚, 田村政宏, 名古屋隆生, 高橋裕一, 片桐進: スギ花粉抗原 (*Cry j I*) に対するモノクローナル抗体を用いたイムノブロット法によるスギ花粉アレルゲン粒子数の測定. *アレルギー* 46, 637-644, 1992.
- 4) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., Inouye, S., Miyazawa, H., Imaoka, K. and Katarigi, S.: Existence of exine-free airborne allergen particles of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy* 46, 588-593, 1991.
- 5) 佐分利保雄, 矢島篤子, 佐藤洋子, 大浜悦子, 斎藤胤曠: 鼻汁によるスギ花粉の破裂. *日本公衛誌* 39, 341-346, 1992.
- 6) 安枝 浩: 抗原分析, “図説スギ花粉症”(信太隆夫監修, 清水章治編集), 金原出版株式会社, 東京, pp.87-109, 1983.

BRIEF COUNTING METHOD OF AIRBORNE *CRYPTOMERIA JAPONICA* POLLEN BY A COMBINATION OF FLUORESCENCE ANTIBODY STAINING AND FLOW CYTOMETRY

Yuichi Takahashi¹⁾, Shunichi Yoshimura²⁾, Hisashi Masago²⁾, Kozo Inouye³⁾, Tadashi Shirai³⁾, Takao Nagoya⁴⁾, Masahiro Sakaguchi⁵⁾, Sakae Inouye⁵⁾ and Susumu Katagiri⁵⁾

¹⁾The Yamagata Prefectural Institute of Public Health, ²⁾JASCO Co. Ltd., ³⁾Tokyo Dylec Co. Ltd.,

⁴⁾Kowa Research Institute Kowa, Co. Ltd., ⁵⁾Department of Microbiology, The Institute of Public Health

Airborne pollens collected in a pollen collector (Virtual Impactor) was treated with a fluorescein isothiocyanate-labeled monoclonal antibody (KW-S10) which was strictly specific to Japanese cedar pollen antigen (*Cry j I*). Flow cytometric analysis revealed that the intensity of fluorescence of the pollen samples treated with the antibody was greater than that of non-treated reference pollen or the antibody treated Hinoki-cypress pollen. By use of this method, it may be possible to display the airborne pollen concentration within 20 min after sampling.