

氏名	龔 秀民		
博士の専攻分野の名称	博士（工学）		
学位記号番号	博理工甲第 1049 号		
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 23 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	スギ花粉アレルゲン Cry j 1、Cry j 2 の室外および室内の飛散挙動に関する研究		
論文審査委員	委員長	准教授	王 青躍
	委員	教授	川合 真紀
	委員	連携教授	三輪 誠
	委員	教授	門野 博史

論文の内容の要旨

スギ花粉アレルゲンを含む大気浮遊粒子状物質による花粉症や花粉喘息の発症、花粉アレルゲンと大気汚染物質とが症状に与える影響を評価していく上で、実大気中におけるスギ花粉粒およびアレルゲン含有粒子の飛散挙動を調査し、それぞれの動態を解析することは大変重要である。一方、室外から持ち込まれる花粉アレルゲンの飛散挙動を把握するために、室内花粉アレルゲンの飛散挙動への影響因子などを調査することが必要になる。室外での飛散状況に加えて、室内に侵入した花粉の動態に関する研究や検討が必要と考えられる。室内外の花粉間の相関関係、室内外の花粉アレルゲン粒径分布調査のことに注目している。

本研究は、スギ花粉飛散期において、大気サンプリングを都市部道路端と一般環境にて実施し、スギ花粉およびスギ花粉アレルゲン Cry j 1、Cry j 2 含有粒子を捕集し、大気中の Cry j 1、Cry j 2 濃度を快速測定法としての表面プラズモン共鳴法にて粒径別に測定することで、Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の粒径分布や生成原因を明らかにすることを目的とした。また、飛散花粉数、アレルゲン濃度と黄砂、気象要因（降水、風速及び風向）の関連性を検討することを目的とした。

道路端の交通影響によるスギ花粉アレルゲンの微小化などについて評価を行うため、総合研究棟 10 階を一般環境とし、道路端（国道 463 号）におけるスギ花粉およびスギ花粉アレルゲンを捕集した。花粉数は総合研究棟 10 階（一般環境）の方が多かったが、Cry j 1 濃度は道路端の方が高かった。この原因は道路端に特有の現象、例えば自動車走行が影響している可能性が考えられた。つまり、自動車走行によって花粉表面からユービッシュ小体が剥離し、アレルゲン含有粒子が微小粒径へ移行する可能性が考えられた。

スギ花粉飛散期において黄砂飛来前後のスギ花粉およびスギ花粉アレルゲンの飛散挙動を把握するため、大気サンプリングを行った。黄砂飛来ピークと花粉飛散ピークとの重なりが観測されたことが分かった。黄砂飛来前後に $PM_{2.5}$ の Cry j 1 平均濃度は黄砂飛来後に減少した。しかし、花粉数および $PM_{1.1}$ 中の Cry j 1 の平均濃度は増加した。黄砂飛来前後の $PM_{1.1}$ 中の Cry j 1 の平均濃度の差は無視することができない。Cry j 1 含有微小粒子が、黄砂や汚染化学種と共に下気道へ侵入して、何らかの相乗効果を及ぼし、人体への悪影響を増幅させている可能性が示唆された。そのため、今後、スギ花粉アレルゲンと汚染化学種や黄砂による修飾などと関連づける研究が重要である。自動車走行の影響で花粉アレルゲン含有粒子の微小化の可能性

が考えられた。大気中に浮遊している花粉アレルゲンの微小粒径分布を確認でき、下気道へ侵入する花粉アレルゲン含有粒子の存在の可能性があると考えられた。フィルター上に捕集されたアレルゲンを直接観察することで、大気中でのアレルゲン含有粒子の発生について確証が得られると考え、免疫抗体法を用いたアレルゲンの可視化実験を行った。すべての粒径範囲に緑色発光を示す輝点が数箇所観察された。これらの輝点は、免疫蛍光抗体法によりアレルゲンを特異的に認識していることから、 $0.06\mu\text{m} \sim 11\mu\text{m}$ の粒径範囲にスギ花粉アレルゲン Cry j 1 が存在することが確認できた。スギ花粉内部のデンプン粒を含む色素体内に局在する Cry j 2 は、花粉壁が破壊されると溶出量が顕著に増加し、また pH の増加とともに溶出量が増加することが報告されている。都市部において降水によって Cry j 1 含有粒子のみならず、Cry j 2 も微小粒子化と修飾を受け、降水後の晴れた日に再飛散し、都市部でのスギ花粉症有病率の増加およびスギ花粉症由来の喘息に寄与するものと推測された。大気中に浮遊する花粉および花粉アレルゲンが多くなると、室内に存在する花粉も多くなる。室内に存在する花粉・花粉アレルゲンの調査が必要である。花粉飛散期に室外および10階研究室空気中において、スギ花粉および花粉アレルゲンを同時に捕集し、室内花粉数を測定した。室内花粉アレルゲンについては、測定をおこなったが検出できなかった。そこで、捕集したフィルターを用いて Cry j 1 の形態観察を試みた。その結果、 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒径範囲に緑色の蛍光発光を示す輝点が数箇所観察された。これらの輝点は、免疫蛍光抗体法によりアレルゲンを特異的に認識していることから、室内で捕集したフィルターにスギ花粉アレルゲン Cry j 1 が微小粒径に存在することを確認できた。

以上の結果から、スギ花粉飛散期において、Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の粒径分布や生成原因を明らかにした。また道路端・一般環境および黄砂飛来時のアレルゲン含有微小粒子の存在形態を観察し、下気道へ侵入可能なスギ花粉アレルゲン含有粒子の飛散挙動を明らかにした。

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、当該論文の発表会を平成28年7月25日に公開で開催し、約35分の発表の後、本論文に関する詳細な質疑を行い、論文内容を審査した。当学位論文では、埼玉県都市部のスギ花粉飛散期において、スギ花粉およびスギ花粉アレルゲン Cry j 1、Cry j 2 含有粒子を捕集し、大気中の Cry j 1、Cry j 2 濃度を粒径別に測定することで、Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の粒径分布について、免疫蛍光抗体法、表面プラズモン共鳴法（SPR 法）などを利用し、室内外のアレルゲン含有微小粒子の存在形態を観察し、下気道へ侵入可能なスギ花粉アレルゲン含有粒子の飛散挙動を明らかにした。以下に、論文内容を示すとともに、学位論文審査の結果を要約する。

第一章（序論）では、スギ花粉アレルゲン含有粒子の微小粒子への移行の原因について調査結果をまとめ、花粉表面からの Cry j 1 含有ユービッシュ小体の剥離、花粉粒子が湿度や降雨によって水分を吸収、膨潤して破裂することで花粉内部の Cry j 2 の大気中への放出などが考えられている。その結果、近年都市部でスギ花粉を原因とする花粉喘息の発症が観察されるようになった。大気中におけるスギ花粉本体および花粉アレルゲン含有粒子の飛散挙動（粒径別アレルゲン濃度や放出原因など）を調査し、それぞれの動態を解析することは大変重要である。

第二章では、道路近傍および一般大気中のスギ花粉およびそのアレルゲン Cry j 1 含有粒子の挙動の比較道路端の交通影響によるスギ花粉アレルゲンの微小化などについて評価を行うため、総合研究棟 10 階を一般環境とし、道路端（国道 463 号）におけるスギ花粉およびスギ花粉アレルゲンを捕集した。調査の結果、花粉数は総合研究棟 10 階（一般環境）の方が多かったが、Cry j 1 濃度は道路端の方が高かった。この原因は道路端に特有の現象、例えば自動車走行が影響している可能性が考えられた。つまり、自動車走行によって花粉表面からユービッシュ小体が剥離し、アレルゲン含有粒子が微小粒径へ移行する可能性が考えられた。

第三章では、黄砂飛来前後におけるスギ花粉およびそのアレルゲン Cry j 1 含有粒子の挙動調査スギ花粉飛散期において黄砂飛来前後のスギ花粉およびスギ花粉アレルゲンの飛散挙動を把握するため、大気サンプリングを行った。黄砂飛来ピークと花粉飛散ピークとの重なりが観測されたことが分かった。黄砂飛来前後に $PM_{>7.0}$ の Cry j 1 平均濃度は黄砂飛来後に減少した。しかし、花粉数および $PM_{1.1}$ 中の Cry j 1 の平均濃度は増加した。黄砂飛来前後の $PM_{1.1}$ 中の Cry j 1 の平均濃度の差は無視することができない。Cry j 1 含有微小粒子が、黄砂や汚染化学種と共に下気道へ侵入して、何らかの相乗効果を及ぼし、人体への悪影響を増幅させている可能性が示唆された。東アジアでの黄砂飛来の時期が早まるに伴い、黄砂飛来ピークとスギ花粉飛散ピークが同期間に出現する現象が観測されている。特に、黄砂飛来時にはスギ花粉アレルゲンを含有する微小粒子も多く計測され、花粉症、喘息などのアレルギー疾患の悪化が懸念されている。そのため、今後、スギ花粉アレルゲンと汚染化学種や黄砂による修飾などに関連づける研究が重要である。

第四章では、大気中スギ花粉アレルゲン Cry j 1 含有粒子の粒径分布について調査し、自動車走行の影響で花粉アレルゲン含有粒子の微小化の可能性が考えられた。調査の結果、大気中に浮遊している花粉アレルゲンの微小粒径分布を確認でき、下気道へ侵入する花粉アレルゲン含有粒子の存在の可能性があると考えられた。フィルター上に捕集されたアレルゲンを直接観察することで、大気中でのアレルゲン含有粒子の発生について確証が得られると考え、免疫抗体法を用いたアレルゲンの可視化実験を行った。すべての粒径範囲に緑色発光を示す輝点が数箇所観察された。これらの輝点は、免疫蛍光抗体法によりアレルゲンを特異的に認識していることから、 $0.06\mu\text{m} \sim 11\mu\text{m}$ の粒径範囲にスギ花粉アレルゲン Cry j 1 が存在することが確認できた。

第五章では、大気中に浮遊している花粉アレルゲン Cry j 2 含有粒子の飛散挙動について調査し、Cry j 2 は花粉内部のデンプン粒に局在しているため外に放出されにくいことが分かった。そのため、降雨後、時間が経ってから、花粉内部の Cry j 2 が多く放出される可能性が考えられる。スギ花粉内部のデンプン粒を含む色素体内に局在する Cry j 2 は、花粉壁が破壊されると溶出量が顕著に増加し、また pH の増加とともに溶出量が増加することが報告されている。都市部において降水によって Cry j 1 含有粒子のみならず、Cry j 2 も微小粒子化と修飾を受け、降水後の晴れた日に再飛散し、都市部でのスギ花粉症有病率の増加およびスギ花粉症由来の喘息に寄与するものと推測された。

第六章では、室内花粉および花粉アレルゲン Cry j 1 含有粒子の飛散量を調査し、大気中に浮遊する花粉および花粉アレルゲンが多くなると、室内に存在する花粉も多くなることを解明した。室内に存在する花粉や花粉アレルゲンの調査が必要である。花粉飛散期に室外および 10 階研究室内空気中において、スギ花粉および花粉アレルゲンを同時に捕集し、室内花粉数を測定した。窓は一日中ほとんど開いていたため、窓近傍の花粉が極めて多かった。入口の花粉数も多いと予想したが、実は低かった。床、机と棚の高さ別にみれば、床での値が大きい傾向があった。この結果から、落下法によって花粉は床に落ちると考えられた。室内花粉アレルゲンについては、測定をおこなったが検出できなかった。そこで、捕集したフィルターを用いて Cry j 1 の形態観察を試みた。その結果、 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒径範囲に緑色の蛍光発光を示す輝点が数箇所観察された。これらの輝点は、免疫蛍光抗体法によりアレルゲンを特異的に認識していることから、室内で捕集したフィルターにスギ花粉アレルゲン Cry j 1 が微小粒径に存在することを確認できた。また、2 日間捕集したフィルターからも Cry j 1 が存在することを確認できた。室内大気試料中の $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒径範囲の形態観察結果から、室内に Cry j 1 含有粒子が微小粒子状物質の状態で存在することがわかった。

第七章(総括)として、本研究で室内外の花粉尘および花粉アレルゲンの飛散挙動を調査した結果をまとめた。室外については、黄砂飛来前後および道路端のスギ花粉および花粉アレルゲンの飛散挙動を考察した。総合研究棟 10 階を一般環境とし、道路端(国道 463 号)における、スギ花粉およびスギ花粉アレルゲンの飛散挙動を調査した。大気中のスギ花粉数および花粉アレルゲン濃度は黄砂飛来の影響によって高くなったことがわかった。大気中のスギ花粉アレルゲン濃度は降水の影響によって高くなったと推測できた。道路端では自動車走行などによってスギ花粉アレルゲン濃度が高いと考えられた。免疫蛍光抗体法により、 $0.06\mu\text{m}$ ~ $11\mu\text{m}$ の微小粒径範囲にスギ花粉アレルゲン Cry j 1 が存在することが確認できた。Cry j 2 は花粉内部のデンプン粒に局在しており、外へ放出されにくい。しかし、降雨の影響で Cry j 2 が放出される可能性があり、時間が経つと多くの Cry j 2 が放出されると考えられた。さらに、室内花粉アレルゲンは定量できなかったが、免疫蛍光抗体法により室内で捕集したフィルターにスギ花粉アレルゲン Cry j 1 が微小粒径に存在することが確認できた。

本学位論文では、スギ花粉飛散期において、Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の粒径分布や生成原因を明らかにした。アレルゲン含有微小粒子の存在形態を観察し、下気道へ侵入可能なスギ花粉アレルゲン含有粒子の飛散挙動(道路端・一般環境および黄砂飛来時)を明らかにした。本論文に関わる内容は 3 編の学術誌(Aerobiologia (International Journal of Aerobiology)、Asian Journal of Atmospheric Environment、エアロゾル研究)にすでに公表されており、さらに 1 編の論文を取りまとめて学術誌への投稿が進められている。