

スギ花粉アレルギー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

2016年9月

埼玉大学大学院理工学研究科(博士後期課程)

理工学専攻(主指導教員 王 青躍)

龔 秀 民

目次

第 1 章 序論	- 1 -
1.1. はじめに	- 2 -
1.1.1. 花粉症	- 2 -
1.1.2. スギ花粉とスギ花粉アレルゲン	- 3 -
1.1.3. 花粉症発症メカニズム	- 4 -
1.1.4. スギ花粉症の有病率増加の要因	- 6 -
1.1.5. 花粉情報現状	- 7 -
1.2. 本研究の目的と意義	- 8 -
1.3. 本論文の構成	- 9 -
1.4. 本論文の概要	- 10 -
第 1 章の参考文献	- 12 -
第 2 章 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	- 15 -
2.1. はじめに	- 16 -
2.2. 道路近傍および一般大気中のスギ花粉およびアレルゲンの挙動の比較	- 17 -
2.2.1. 観測条件	- 17 -
2.2.2. 測定方法	- 19 -
2.3. 実験結果	- 21 -
2.3.1. 飛散花粉数の調査	- 21 -
2.3.2. 道路端と一般環境のスギ花粉アレルゲン Cry j 1 濃度の比較	- 22 -
2.4. まとめ	- 24 -
第 2 章の参考文献	- 25 -
第 3 章 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	- 27 -
3.1. はじめに	- 28 -
3.2. 実験方法	- 28 -
3.2.1. 観測条件	- 28 -

3.2.2. 黄砂飛来状況	- 29 -
3.2.3. 大気中花粉数の計測と気象条件の取得	- 29 -
3.2.4. 測定方法	- 29 -
3.3. 実験結果	- 32 -
3.3.1. 黄砂飛来時スギ花粉数への影響	- 32 -
3.3.2. 黄砂飛来時スギ花粉アレルゲンへの影響	- 34 -
3.4. まとめ	- 37 -
第3章の参考文献	- 38 -
第4章 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	- 40 -
4.1. はじめに	- 41 -
4.2. 実験方法	- 42 -
4.2.1. 観測条件	- 42 -
4.2.2. スギ花粉アレルゲンの抽出および測定	- 43 -
4.3. 実験結果	- 47 -
4.3.1. 微小粒径範囲の Cry j 1 濃度	- 47 -
4.4. まとめ	- 51 -
第4章の参考文献	- 52 -
第5章 大気中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	- 53 -
5.1. はじめに	- 54 -
5.2. 実験方法	- 54 -
5.2.1. 観測条件	- 54 -
5.2.2. スギ花粉アレルゲン Cry j 2 の抽出	- 54 -
5.2.3. スギ花粉アレルゲン Cry j 2 の測定	- 55 -
5.3. 結果と考察	- 56 -
5.3.1. スギ花粉アレルゲン Cry j 2 の粒径分布と飛散挙動	- 56 -
5.4. まとめ	- 58 -
第5章の参考文献	- 59 -
第6章 室内花粉および花粉アレルゲンの飛散量調査	- 60 -
6.1. はじめに	- 61 -

6.2 実験方法	- 61 -
6.2.1. 観測条件.....	- 61 -
6.2.2. 室内花粉数の測定	- 62 -
6.2.3. 免疫蛍光抗体法による室内 Cry j 1 含有粒子の可視化.....	- 62 -
6.3. 実験結果	- 62 -
6.4. まとめ	- 64 -
第 6 章の参考文献.....	- 64 -
第 7 章 総括	- 65 -
7.1. 本研究のまとめ.....	- 66 -
7.2. 今後の展望	- 67 -
活動実績.....	- 69 -
謝辞	- 75 -

第 1 章

序論

1.1. はじめに

1.1.1. 花粉症

花粉症とは、花粉を吸入することで、くしゃみ、鼻水、鼻づまり、目のかゆみ、喘息などを生じるアレルギー疾患のことである。花粉症は世界各地で報告されており、例えばヨーロッパのイネ科、アメリカのブタクサ、日本のスギ花粉症は世界三大花粉症と言われ、疫学研究による発症原因の調査や、大気科学研究から、花粉予報の精度向上を目指した研究が行われている。

花粉症のアレルギー疾患問題は、世界各地で起きている国際的な問題であり、現代病として今後さらに大きな社会問題に発展するものと思われる。ヨーロッパ、日本、アメリカなどの先進国で、アレルギー性気管支炎やアレルギー性鼻炎などの深刻なアレルギー疾患を引き起こしている。地球温暖化の影響もあり、ヨーロッパなどでは花粉の飛散が通年化し、さらには暖冬ということで花粉の飛散時期が早まっている。イタリアやスペインなどもスギ、ヒノキ花粉量が多く、セルビアなどの中東地域も含め、欧州全体が花粉の影響を受け始めている。

現在、日本では単に花粉症といった場合、スギ花粉症を指していることが多い。スギ花粉症は、1964年に発症者の存在が初めて確認され（堀口ら, 1964）、現在スギは、日本において主要な花粉症の原因植物として認知されている。1980年代に入ると有病率は急激に増加した。現在も有病率は増加傾向にあり、人口の約26.5%がスギ花粉症を発症し、都市部では約40%近くもの有病率を有する疾患である（Murayama *et al.*, 2010）。

本来、スギ花粉症は日本固有のものと考えられてきたが、中国において、日本のスギ(*Cryptomeria japonica*)と同一種のスギ(柳杉; *Cryptomeria fortunei*)の存在が確認され、スギに陽性反応を示す事例が報告されており（三好ら, 1998）、イタリアでのスギ（谷川ら, 1993）の存在やヨーロッパ各地においてもスギ花粉が飛散していることから、また近年では花粉症発症の低年齢化（Maejima *et al.*, 2001）やアジュバント効果（Watanabe *et al.*, 2002）も確認されており、スギ花粉症は世界全体に年齢を問わず拡大しており、花粉症発症の抑制、治療法の開発が必要な緊急の問題といえる。症状を軽減するための方策が医学、気象学、生態学、育種学など、様々な分野において相互に関連して研究され、問題が少しでも解決する方向に向かうことを大切に望まれている（川島茂人, 2003）。

1.1.2. スギ花粉とスギ花粉アレルゲン

スギ花粉は、約 30 μm の直径をもつ球形粒子であり、エアロゾルとしては粗大粒子(粒子径 $>2.5 \mu\text{m}$)に分類される。その構造は、パピラと呼ばれる鉤状突起をもつ花粉粒子本体に、直径 0.1~1.0 μm のユービッシュ小体と呼ばれる粒状物体が付着したものとなっている (Fig. 1-1)。

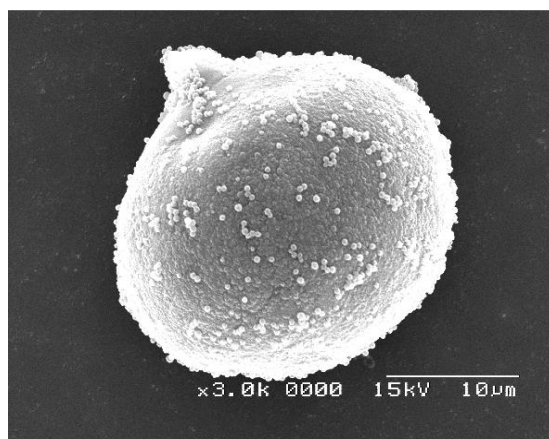


Fig. 1-1. Scanning electron micrograph of Japanese cedar pollen.

日本のスギは本州、四国、九州に分布しており、北海道や沖縄にはあまり分布していない。関東地方は (Fig. 1-2)、関東平野を囲むようにスギが分布しており、特に東京、埼玉、神奈川の西部に非常に多く分布していることが分かる (信太ら, 1991)。



Fig. 1-2. Distribution of Japanese cedar in Kanto area.

スギ花粉の飛散量は前年の7月の平均気温と7、8月の全天日射量とに良い相関が見られ、雄花の生育数は前年の夏の気象状況で変化する。これは、スギ花粉が夏に生産されることに起因している（平ら, 1997）。花粉中のアレルゲン含有量は生育場所も影響しており、日陰の多い森林内に生育する樹木の花粉中アレルゲン含有量は、日向に生育する樹木の花粉中アレルゲン含有量と比べ増加することも報告されている（Helender *et al.*, 1997）。花粉の飛散には様々な気象要因が関係しており、気温とは正の相関、湿度と降雨とは負の相関がそれぞれ得られている（Bartkova-Scevkova, 2003）。

スギ花粉症は、スギ花粉そのものによって引き起こされるのではなく、花粉中に含まれる主要な2種類のタンパク質 Cry j 1 と Cry j 2 によって引き起こされる典型的なアレルギー疾患である。Cry j 1 と Cry j 2 は（Fig. 1-3）、いずれも塩基性のタンパク質であり、分子量も共に 40 kDa 前後であるが、Cry j 1（分子量約 44 kDa, 41 kDa）は花粉表面のユービッシュ小体（粒径約 0.7 μm ）や花粉外膜に主に存在し（Miki-Hiroshige *et al.*, 1994）、Cry j 2（分子量約 37 kDa）は花粉内部のデンプン粒を含む色素体内に局在している（中村ら, 2004）、その含有量は Cry j 1 の 1/2～1/10 程度である（斎藤真己ら, 2003）。

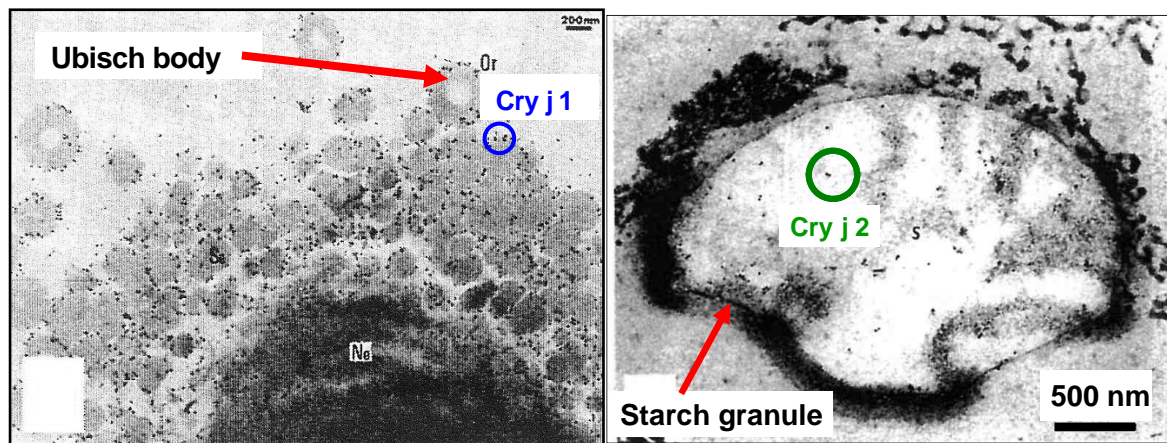


Fig. 1-3. Cry j 1 is localized in Ubisch body and pollen exine and Cry j 2 is localized in starch granule and pollen intine (These photo was taken by a transmission electron microscope)（佐橋, 2006） .

1.1.3. 花粉症発症メカニズム

花粉粒は 20～100 μm の粗大粒子に分類されており、気道上部の鼻腔に沈着

されると考えられてきた。しかし、近年、花粉症患者のうち、咳や喘息の発症例が多く見られていることから、大気中でアレルゲン含有粒子状物質が微小粒径へ移行し、鼻腔より深部の気管支や肺胞などの下気道への侵入が生じていることで、そのアレルゲン粒子による咳、喘息などの一連の症状が生じたと考えられている。(前島ら, 1995; Elder *et al.*, 2009)。

花粉症の発症メカニズムの概略図を **Fig. 1-4** に示した。まず、スギ花粉が上気道に沈着すると、沈着面に存在する分泌物、汗、皮脂などの水分により、Cry j 1 および Cry j 2 が溶出し、それが血管などの結合組織内に浸透し、結合組織中のマクロファージ (抗原提示細胞) により異物として認識され、マクロファージはその情報をヘルパーT細胞 (Th₁ および Th₂) に伝達する。その後、Th₂細胞が活性化することにより、IL-4 や IL-5 サイトカインを分泌し、B細胞を活性化させる (Th₁細胞はB細胞の活性を抑制する働きがある)。活性化した

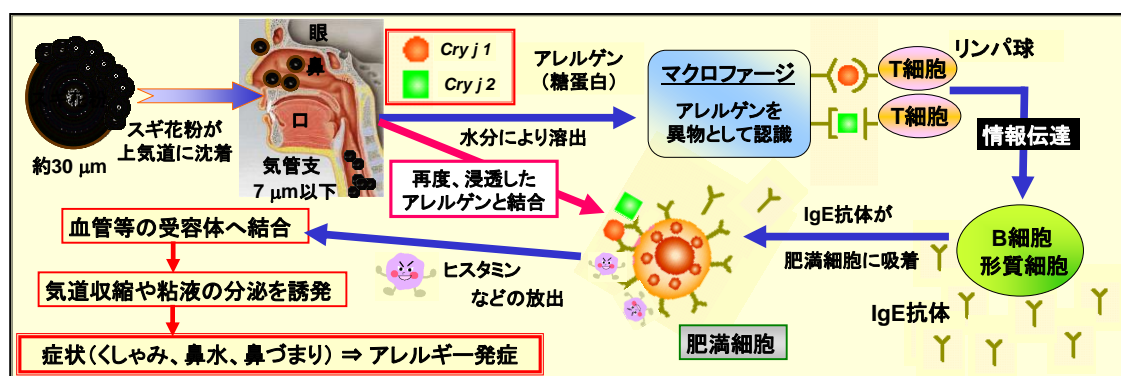


Fig. 1-4. Mechanism of pollinosis.

B細胞は増殖分化し、抗体産生細胞となり IgE 抗体を産出する。その後、IgE抗体は肥満細胞 (マスト細胞) に吸着し、再度結合組織中に浸透した Cry j 1 や Cry j 2 と結合することにより、肥満細胞からヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質 (ケミカルメディエーター) が放出され、これらの化学伝達物質が気道収縮や粘液の分泌を誘発し、アレルギー症状 (くしゃみ、鼻水、鼻づまりなど) を発症させる (ディーゼル車排出ガスと花粉症の関連に関する調査委員会報告書, 2003)。

1.1.4. スギ花粉症の有病率増加の要因

有病率の増加の要因として、①戦後の植林政策によるスギ花粉飛散量の増加(北村ら, 2005)、②衛生仮説 (Saito, 2006)、③大気汚染物質の影響 (Ishizaki ら, 1987; Ross ら, 2002)等が指摘されている。

① 戦後の植林政策によるスギ花粉飛散量の増加

日本は戦後、建築材料としての木材を大量に生産することを目的とし、成長の早いスギを大量に植林した。30年を経過して花粉を飛ばす樹齢に達したスギが1970年代後半に大量花粉飛散をもたらし、急激なスギ花粉症有病率の増加へと繋がった。

② 衛生仮説

新生児期のナイーブ T 細胞は生育期の環境において、抗原と接触し、徐々に Th1 細胞や Th2 細胞に分化していく。この過程において、細菌、ウイルス由来の分子が存在した場合、樹状細胞は強く刺激され Th1 細胞へと分化する。しかし、無菌的環境の場合 Th2 細胞へと分化する。生育期を過ぎるとナイーブ T 細胞の比率は下がるので、Th1 細胞と Th2 細胞のバランスが大きく変化することがなくなる。すなわち、乳幼児期までの感染、非衛生的環境が、その後のアレルギー疾患の発症を低下させるということである。

③ 大気汚染物質の影響

花粉飛散源から都市部に花粉粒が移流してくる際に、さまざまな汚染化学種との接触が起こる。そのため、ここでは大気汚染物質との接触による花粉粒・アレルゲンの影響について調査する。スギ花粉は輸送距離の長さから、大気中に大気汚染物質との相互影響により、花粉症症状へ悪影響が懸念されている。実際にスギ花粉への大気浮遊粒子状物質の付着 (Okuyama *et al.*, 2007)、自動車排ガス由来の炭素凝集体へのアレルゲンの吸着 (Namork *et al.*, 2006) などの複合体粒子の生成、大気汚染物質との接触によるスギ花粉の損傷や破ならびにアレルゲンの酸性化 (Rogerieux *et al.*, 2007) やニトロ化 (Franze *et al.*, 2003) などの変性が報告されている。アレルゲンは他の粒子との同時吸引により、アレルギー症状を悪化させるアジュバント効果(免疫効果の増強)を引き起こす (Maejima *et al.*, 2001)。

さらに、近年、地球温暖化に伴って東アジア大陸から長距離輸送によって飛

来する黄砂の飛来期がスギ花粉飛散期と重なることもあり、黄砂とスギ花粉の複合影響も問題となっている（Ichinose *et al.*, 2009）。黄砂は日本に飛来するまでに発生地域とは大きく異なる大気汚染の大都市上空を通過することになる。従って、中国東部域での大気汚染による黄砂粒子は酸性ガス、水蒸気、エアロゾル粒子と混合し、物理的変質・性状（粒子の形状や粒径・吸湿性・光学特性）変化と化学的変質・性状（粒子・ガス状物質の合体や化学反応特性）変化を起こす。黄砂飛来時スギ花粉症状が悪化することが報告された。黄砂はスギ花粉アレルゲンに由来する喘息の発症や花粉症症状悪化を誘発させると懸念されている。

1.1.5. 花粉情報現状

日本の花粉情報の多くはスギ花粉情報である。スギ花粉症が 80 年代から増加し始め国民病とか、文明病などと呼ばれるようになった。こんな状況のなかで東京都、京都市、仙台市などが 1986 年からスギ花粉情報の住民サービスを始めた。今では、スギ花粉シーズンには全国で 200 ヶ所を越える施設が情報を提供している（環境省）。情報としては花粉シーズン前の時期には今シーズンはスギ花粉がどれくらい飛ぶのか（総飛散数の情報）あるいはいつ頃から飛び始めるのか（飛散開始日の情報）があり、花粉シーズンに入ると日々の花粉の飛散状況や明日の予報を中心とした内容になった。明日の予報は多くの地域では“少ない”、“やや多い”、“多い”、“非常に多い”の 4 段階表示が一般的となった（村山ら, 2006）。2000 年代に入ると、自動花粉計数器における時間ごとのスギ花粉数の変化をリアルタイムに入手できるようになりつつある。このようなモニターからの情報と気象予報があれば、今、スギ花粉がどれくらい飛んでいて、これから数時間先にはどうなっていくのかが一目でわかる（檜垣ら, 2006）。しかし、スギ花粉症は、スギ花粉そのものによって引き起こされるのではなく、花粉中に含まれる主要な 2 種類のタンパク質 Cry j 1 と Cry j 2 によって引き起こされる。現在、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 と Cry j 2 についての情報は行っていない状態です。

1.2. 本研究の目的と意義

スギ花粉飛散開始 2~3 週間前にも、敏感な患者は花粉症の症状を引き起こすことが確認され、この原因もアレルゲン含有粒子と考えられている(中村ら, 2004)。アレルゲン含有粒子の実態は必ずしも明らかにされていないが、スギ花粉本体(約 30 μm)の表面に付着しているユービッシュ小体(Cry j 1 が局在)が剥離、花粉テンプレット粒(Cry j 2 が局在)から破裂して大気中に飛散していると考えられている(佐橋, 2006; 前島, 1995)。したがって、スギ花粉主要アレルゲンである Cry j 1、Cry j 2 を含有する大気中の微小粒子状物質の粒径分布や生成原因、存在形態などを把握することは重要である。一方、現在、日本はスギ花粉の情報提供として“飛散花粉数”を計数した結果を用いている。アレルゲン含有微小粒子は、様々な大気浮遊粒子状物質に沈着すると考えられる(Namork *et al.*, 2006; 高橋ら, 2002)、これらの複合粒子が花粉症へのアジュバント効果を引き起こすと指摘されている(Maejima *et al.*, 2001)。生成したスギ花粉アレルゲン含有微小粒子は、下気道に侵入することでスギ花粉アレルゲンに由来する喘息の発症や花粉症症状悪化を誘発すると懸念されている(安場, 2002; 前田, 1998)。大気中の花粉数とアレルゲン濃度に相関性が見られないため、花粉症の原因物質であるアレルゲン濃度で評価するべきとの指摘からである。日本においても、大気中のスギ花粉数とアレルゲン濃度は比例せず、花粉数予測だけではなく、アレルゲン濃度予測情報を花粉症患者へ提供していく必要がある。

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。室内外の花間の相関関係、室内外の花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（Surface Plasmon Resonance、以下 SPR 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。本研究成果は、スギ花粉アレルゲン濃度の飛散予測情報提供への一助となることが期待される。

1.3. 本論文の構成

本論文は以下の 7 つの章より構成される。

第 1 章「序論」は本研究の背景、研究目的と意義を述べ、全体構成を示した。

第 2 章「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」では、都市部大気中におけるスギ花粉とそのアレルゲンの挙動について調査を行った。幹線道路沿道および一般都市大気の二地点で観測を行い、その挙動の違いについて言及した。

第 3 章「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」では、黄砂飛来前後のスギ花粉数およびスギ花粉アレルゲン Cry j 1 含有粒子濃度の変化について調査を行い、黄砂飛来前後のスギ花粉の挙動を明らかにした。

第 4 章「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」では、微小粒径範囲のスギ花粉アレルゲンについての調査を行い、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 含有粒子の微小粒径分布について明らかにした。

第 5 章「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」では、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ため、抽出法を改良して、Cry j 2 含有粒子に関する調査を行った。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。粒径分布や降雨などの影響によって Cry j 2 含有粒子の飛散挙動を明らかにした。

第 6 章「室内花粉および花粉アレルゲン Cry j 1 含有粒子の飛散量調査」では、埼玉大学総合研究棟 10 階循環研究室Ⅲにおけるサンプリングした。室内

サンプラーで捕集したフィルターからの Cry j 1 含有粒子の形態観察を試みた。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 含有粒子を存在することを確認できた。

第 7 章「総括」では、本研究により得られた知見や意義についてまとめ、将来的に望まれる研究について言及した。

1.4. 本論文の概要

埼玉県さいたま市の都市部室内外に浮遊するスギ花粉およびそのアレルゲン含有粒子の大気中における挙動を調査するため、スギ花粉飛散期に室内外の浮遊粒子をサンプリングした。道路端および一般環境大気中のスギ花粉およびスギ花粉アレルゲン (Cry j 1、Cry j 2) 含有粒子の粒径分布、微小粒径範囲の粒径分布、自動車の影響および気象の影響について調査した。さらに黄砂飛来時、スギ花粉数とスギ花粉アレルゲン含有微小粒子の濃度変化について調査した。室内の場合は、スギ花粉およびスギ花粉アレルゲン含有粒子の存在を確認した。以下に本論文の概要を示す。

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は、花粉表面からの Cry j 1 含有ユーピッシュ小体の剥離、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。

本論文第二章では、道路端および一般環境大気中におけるスギ花粉およびそのアレルゲン含有粒子の挙動をさいたま市都市部でのサンプリングを通じて調査した。道路端および一般都市環境中のスギ花粉およびそのアレルゲン含有粒子の挙動を観察した。結果からは、道路端では、一般都市環境にくらべてスギ花粉数が少なく、Cry j 1 濃度が高い傾向にあった。都市部道路端で行ったサンプリング結果からは、スギ花粉数は降水前の晴れ日にくらべて降水後の晴れ日で減少し、一方 PM_{1.1} 中の Cry j 1 濃度は増加した。したがって、降水が起き

る前にもスギ花粉アレルゲンの微小粒子化は生じているが、降水によってその影響は顕著に高まることが分かった。

そこで、第三章では、黄砂飛来時に降雨によってスギ花粉およびスギ花粉アレルゲン含有粒子の挙動について調査を行った。黄砂飛来後の降水では、弱塩基性かつ高イオン濃度の降水となることから、スギ花粉からのアレルゲン溶出濃度が増加し、スギ花粉アレルゲン含有微小粒子の生成に寄与するものと推察される。

第四章では、スギ花粉アレルゲン含有粒子の微小粒径範囲の粒径分布について評価を行った。大気中に浮遊している花粉アレルゲン含有粒子の微小粒径分布を確認できた。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。

第五章では降雨の影響で花粉内部のデンプン粒に局在している Cry j 2 含有粒子が放出する可能性があるため、本章では、Cry j 2 濃度を測定した。降水と接触後のスギ花粉アレルゲン含有粒子の粒径分布は、Cry j 2 含有粒子は粗大粒子域に多く分布し、微小粒子への移行も見られた。したがって、降水がスギ花粉アレルゲン含有微小粒子の形成ならびにスギ花粉アレルゲン含有粒子の修飾に寄与し、都市部におけるスギ花粉症状およびスギ花粉由来喘息の悪化に寄与することが分かった。

第六章では、室内のスギ花粉およびスギ花粉アレルゲンの有無を確認した。

以上の要約のように、本論文では、都市部道路端および一般環境大気中におけるスギ花粉およびそのアレルゲンの飛散挙動、黄砂飛来時に捕捉されたスギ花粉の挙動、気象要因によってスギ花粉数およびスギ花粉アレルゲン含有粒子の濃度の変化、微小粒子化を調査することを試みた。そして、室内のスギ花粉およびスギ花粉アレルゲン含有粒子の存在を確認した。結果として、道路端の方はスギ花粉アレルゲン濃度が一般環境より高かったことがわかった。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。降雨の影響で花粉内部のデンプン粒に局在している Cry j 2 含有粒子が放出する可能性があることがわかった。黄砂飛来時にスギ花粉数とスギ花粉アレルゲン濃度の変化を見られた。微小粒径範囲にスギ花粉アレルゲン含有粒子が存在す

ることが確認できた。一方、室内の方はスギ花粉アレルギー含有粒子が存在することが確認できた。

第 1 章の参考文献

- Bartkova-Scevkova, J., (2003), the Influence of Temperature, Relative Humidity and Rainfall on the Occurrence of Pollen Allergens (Betula, Poaceae, Ambrosia artemisiifolia) in the Atmosphere of Bratislava (Slovakia), *International Journal of Biometeorology*, **48**, 1-5.
- Franze, T., Weller, M.G., Niessner, R. and Poschl, U., (2005), Protein Nitration by Polluted Air, *Environmental Science and Technology*, **39**(6), 1673-1678.
- Ichinose, T., Hiyoshi, K., Yoshida, S., Takano, H., Inoue, K., Nishikawa, M., Mori, I., Kawazato, H., Yasuda, A. and Shibamoto, T., (2009), Asian Sand Dust Aggravates Allergic Rhinitis in Guinea Pigs Induced by Japanese Cedar Pollen, *Inhalation Toxicology*, **21**(12), 985-993.
- Ishizaki, T., Koizumi, K., Ikemori, R., Ishiyama, Y., Kushibiki, E. 1987. Studies of Prevalence of Japanese Cedar Pollinosis among the Residents in a Densely Cultivated Area, *Annals of Allergy*, **58**, 265-270.
- Miki-Hirosige. H, Nakamura, S., Yasueda, H., Shida, T. and Takahashi, Y., (1994), Immunocytochemical Localization of the Allergenic Proteins in the Pollen of *Cryptomeria japonica*, *Sex Plant Reprod*, **7**, 95-100.
- Maejima, K., Tamura, K., Nakajima, T., 2001. Effects of the inhalation of diesel exhaust, Kanto loam dust or diesel exhaust without particles to Japanese cedar pollen. *Inhalation Toxicology* **13**, 1047-1063.
- Murayama, K., Baba, K. and Okubo, K., (2010), Regional Differences in the Prevalence of Japanese Cedar-Pollen Allergy, *The Japanese Society of Allergology*, **59**(1), 47-54. (in Japanese)
- Namork, E., Johansen, B.V. and Løvik, M., (2006), Detection of Allergens Adsorbed to Ambient Air Particles Collected in Four European Cities, *Toxicology Letters*, **165**, 71-78.
- Okuyama, Y., Matsumoto, K., Okochi, H. and Igawa, M., (2007), Adsorption of Air

- Pollutants on the Grain Surface of Japanese Cedar Pollen, *Atmospheric Environment*, **41**, 253-260.
- Rogerieux, F., Godfrin, D., Sènèchal, H., Motta, A.C., Marlière, M., Peltre, G. and Lacroix, G., (2007), Modifications of *Phleum pratense* Grass Pollen Allergens following Artificial Exposure to Gaseous Air Pollutants (O₃, NO₂, SO₂), *International Archives of Allergy and Immunology*, **143**, 127-134.
- Ross, M. A., Persky, V. W., Scheff, P. A., Chung, J., Curtis, L., Ramakrishnan, V., Wadden, R. A., Hryhorczuk, D. O. 2002. Effect of Ozone and Aeroallergens on the Respiratory Health of Asthmatics, *Archives of Environmental Health*, **57 (6)**, 568-578.
- Saito, H.: Hygiene Hypothesis, 2006. *Kokyu*, **25 (4)**, 373-377 (in Japanese).
- Watanabe, N., Ohsawa, M., 2002. Elevated serum immunoglobulin E to *Cryptomeria japonica* pollen in rats exposed to diesel exhaust during fetal and neonatal periods. *BMC Pregnancy and Childbirth* **25**, 1-9.
- 高橋裕一, 名古屋隆生, 太田伸男, (2002), エアロアレルゲン免疫プ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*, **51(8)**, 609-614.
- ディーゼル車排出ガスと花粉症の関連に関する調査委員会報告書, (2003), ディーゼル車排出ガスと花粉症の関連に関する調査委員会 報告書, 東京都環境局・保健局, 40p.
- 前田裕二, (1998), スギ花粉症と喘息, *アレルギー*, **47(2・3)**, 194.
- 斎藤真己, 寺西秀豊, 平英彰, (2003), 全国 25 道県におけるスギ花粉アレルゲン—Cry j 1—量の変異と遺伝率の推定, *日林誌*, **85**, 312-317
- 川島茂人, 2003, スギ花粉拡散過程のモデル化, *環境技術*, **32**, 170-176
- 三好 彰, 佐橋 紀男, 1998, 中国のスギ花粉症 -スギ花粉症は日本独特か-, *耳喉頭頸*, **70 (2)**, 139-145.
- 信太隆夫, 奥田稔, (1991), 図説スギ花粉症, 金原出版 (株) , 245p, ISBN4-307-10072-7.
- 平英彰, 寺西秀豊, 剣田幸子, (1997), 平均気温、全天日射量及び着花指数を用いたスギ空中花粉総飛散数の予測方法に関する比較検討 -富山県における

- 事例-, アレルギー, **46(6)**, 489-495.
- 堀口申作, 齋藤洋三, (1964), 栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese Cedar Pollinosis の発見, アレルギー, **13**, 16-18.
- 谷川 博一, 藤田 洋祐, 山越 隆行, 片桐 仁一, 小関 洋男, 今野 昭義, 1993, イタリア産 *Cryptomeria japonica* と本邦産 *Cryptomeria japonica* 抗原の共通性について, アレルギー, **42 (9)**, 1358.
- 齋藤真己, 寺西秀豊, 平英彰, 2003, 全国 25 道県におけるスギ花粉アレルギー—Cry j 1—量の変異と遺伝率の推定, *日林誌*, **85**, 312-317.
- 佐橋紀男, 2006, 特集: スギ スギ花粉の正体, *プラント*, **104**, 11-18.
- 村山貢司, 鈴木基雄, 登内道彦, 2006, シンポジウム「空中飛散花粉の観測と情報伝達」(4) 日本における将来の予報システム, *第 47 回日本花粉学会年会講演要旨集*, **23**.
- 檜垣義光, 伊関孝一, 難波弘行, 2006, 愛媛県 2006 年花粉飛散調査からみた花粉自動計測器 (KH-3000-01) の有用性について, *第 47 回日本花粉学会年会講演要旨集*, **59**.
- 中村澄夫, 佐藤文孝, 中村紀雄, 2004, スギ花粉アレルギー Cry j 1 と Cry j 2 の発芽花粉における局在性, *日本花粉学会誌*, **50**, 15-22.
- 前島一仁, 1995. 大気汚染とスギ花粉症. *自動車研究*, **17**, 45-51.
- 北村拓朗, 塩盛輝夫, 藤村武之, 鈴木秀明. 2005. アレルギー その 1—花粉による鼻アレルギー, *エアロゾル研究*, **20(1)**, 54-57.

第 2 章

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

2.1. はじめに

2008年、スギ花粉症の有病率は日本平均で26.5%、関東地方平均で33.5%となり、高い有病率を示した(Murayama *et al.*, 2010)。有病率増加要因として、戦後植林のほか、衛生仮説、大気汚染物質の影響等が指摘されている。栃木県日光地域におけるスギ花粉症有病率の調査によると、いろは坂の交通量の増加と有病率の増加との間に相関があること、スギ花粉飛散数がほぼ同じ2地点を比較した場合、交通量の多い地点において有病率が高い傾向となること(Ishizaki *et al.*, 1987)が報告されている。実際にラットによる免疫学的な研究が行われ、スギ花粉と大気汚染物質の同時暴露によるアレルギー反応の増強作用(アジュバント作用)(Maejima *et al.*, 2001)が確認されている。花粉粒は20~100 μm の粗大粒子に分類されており、気道上部の鼻腔に沈着されることが考えられてきた。しかし、近年、花粉症患者のうち、咳や喘息の発症例が多く見られていることから、大気中でアレルギー含有粒子状物質が微小粒径へ移行し、鼻腔より深部の気管支や肺胞などの下気道への侵入が生じていることで、そのアレルギー粒子による咳、喘息などの一連の症状が生じたと考えられている。

スギ花粉アレルギーにはCry j 1とCry j 2が存在し、Cry j 1はスギ花粉の最表層を構成する花粉外壁およびユービッシュ体に、Cry j 2は花粉内部のデンプン粒に局在している(中村ら, 2004)。都市部でのスギ花粉症有病率の高さから、大気汚染物質や自動車交通が有病率の増加に寄与していると考えられている(Behrendt *et al.*, 1997; Rogeriux *et al.*, 2007)。また、ぜんそく患者のスギ花粉アレルギーによる症状悪化やスギ花粉飛散期中の病状悪化等が報告されている(Maeda *et al.*, 2008; Taylor and Jonsson, 2004)。喘息症状の悪化は、微小粒子化したスギ花粉アレルギー含有粒子を吸い込み、呼吸器系の下気道までアレルギー含有粒子が侵入することで生じると考えられている(王ら, 2008)。

スギ花粉アレルギー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、花粉アレルギー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ギー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。本研究は、2008年から2009年までの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国道463号と県道57号にて実施し、スギ花粉およびスギ花粉アレルギーCry j 1

含有粒子を捕集し、大気中の Cry j 1 濃度を粒径別に測定することで、剥離したユービッシュ小体などの Cry j 1 含有粒子の粒径分布や生成原因を明らかにした。2008 年および 2009 年の大気試料からは、Cry j 1 含有粒子を測定した結果、Cry j 1 含有粒子が粒径 1.1 μm 以下に高濃度存在することが分かった。特に、交通量を比べて、交通量が高かった国道 463 号において粒径 1.1 μm 以下に高濃度の Cry j 1 含有粒子が検出されたため、自動車走行などによって、花粉表面から Cry j 1 が局在するユービッシュ小体が剥離し、Cry j 1 含有粒子が生成する可能性も示唆された。従って、PM_{1.1} の微小粒子は肺胞までに到達することが考えられるため、下気道へ侵入可能な高濃度 Cry j 1 含有微小粒子の存在が再確認された。

こうしたスギ花粉アレルギー含有微小粒子の形成が、大気中におけるスギ花粉数と Cry j 1 濃度の相関を悪くしているものと思われる。このスギ花粉アレルギーの微小粒子化は、自動車走行によってアスファルトに沈着したスギ花粉が再飛散し、粒子同士の衝突やアスファルトの摩擦によって生じると考えられている。しかし、大気中のスギ花粉数と Cry j 1 濃度を調査した報告はあるものの、自動車走行の多い地点と影響が無い地点で比較した報告はない。そこで本章では、関東都市部におけるスギ花粉およびそのアレルギー含有粒子の挙動を、降水前後の晴れ日ならびに道路端と一般環境に着目して調査した。

2.2. 道路近傍および一般大気中のスギ花粉およびアレルギーの挙動の比較

2.2.1. 観測条件

観測条件を以下に示す。

サンプリング期間：3/12 ~ 3/23

サンプリング時間：8:00 ~ 19:30 および 20:00 ~ 7:30

サンプリング地点：埼玉大学付近国道 463 号道路端

埼玉大学総合研究棟 10 階 (Fig. 2-1)

観測期間中の気象情報は、浦和市役所にて常時観測されているデータを気象庁のホームページからダウンロードして利用した (気象庁 HP)。

大気中の飛散スギ花粉およびスギ花粉アレルギー Cry j 1 含有粒子を粒径別に捕集するため、アンダーセンハイボリウムサンプラー（柴田科学社製、AH-600、以下 AHV）を用いた。AHV は、慣性衝突を利用して大気浮遊粒子状物質（SPM）を分級捕集する装置である。分級粒径範囲は人体の各呼吸器沈着部位に相当し、以下の 5 段階に粒子を分級捕集する（口・鼻腔： $\geq 7.0 \mu\text{m}$ 、咽頭・気管： $3.3\text{-}7.0 \mu\text{m}$ 、気管支： $2.0\text{-}3.3 \mu\text{m}$ 、気管支枝： $1.1\text{-}2.0 \mu\text{m}$ 、肺胞： $\leq 1.1 \mu\text{m}$ ）。AHV の装置本体および分級範囲を Fig. 2-

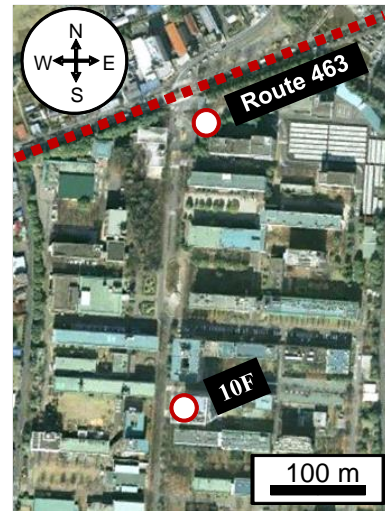


Fig. 2-1. Sampling site

2 に示した。以前の研究より、2-4 段目の Cry j 1 濃度が非常に低濃度であったため、本研究では 2-4 段目のフィルターの Cry j 1 濃度の測定はせず、1 段目（ $\geq 7.0 \mu\text{m}$ ）および 5 段目（ $\leq 1.1 \mu\text{m}$ （PM_{1.1}））のみ行った。AHV のサンプリング時間は、47 時間である。大気中のスギ花粉数の計測には Durham 型花粉捕集器（西精機株式会社製、DK-1SA）を用い、大気中のスギ花粉を捕集した。捕集時間は午前 10 時から翌午前 9 時までの 24 時間である。Durham 型花粉捕集器は捕集部にワセリンを塗布したスライドガラス（松浪硝子工業製、76 mm × 26 mm）をのせ、花粉が重力沈降して付着することで捕集する捕集器であり、上部の円板は雨よけ、下部の円板はほこりやゴミよけになっている。Durham 型花粉捕集器は 24 時間捕集したものを AHV の捕集時間に合わせて合計値として算出した。

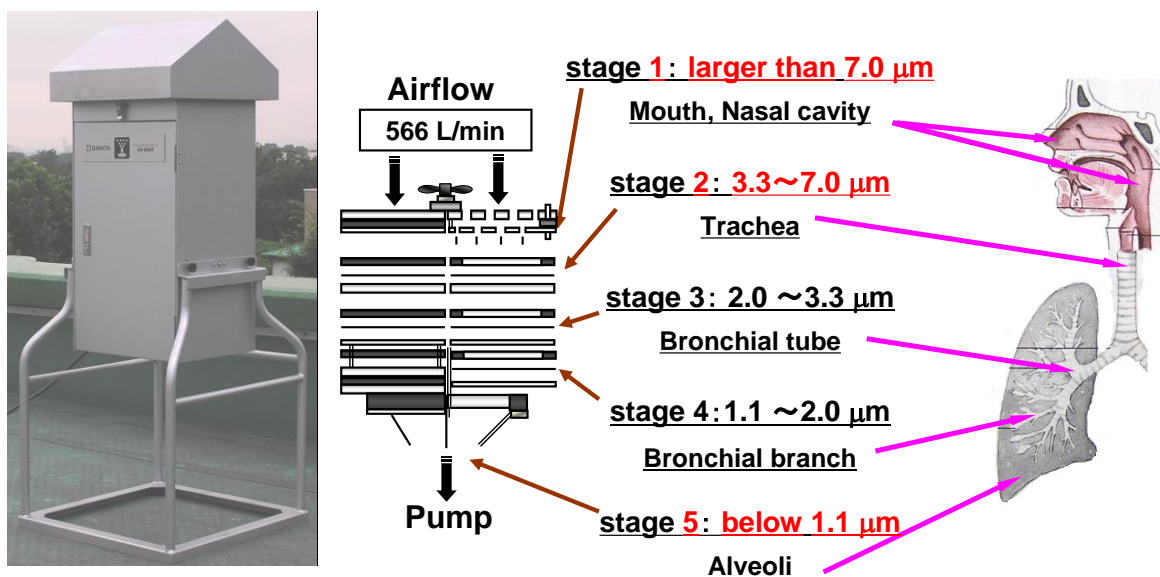


Fig. 2-2. AHV sampler (left) and sampling position of particulate matters which correspond to human airways (right).

2.2.2. 測定方法

スギ花粉数は、捕集した花粉のスライドガラスに花粉染色液を滴下し、18 mm×18 mm の面積のカバーガラスを被せて静置させた後（20 min）、光学顕微鏡にて染色された花粉を計数し、飛散花粉数（個/cm²/24 h）を算出した。

AHV 捕集した石英繊維フィルターの 1 段目（> 7.0 μm）と 5 段目（< 1.1 μm）それぞれ直径 8 mm に 30 枚ずつくり抜き、それぞれ遠沈管に入れた。遠沈管に Cry j 1 抽出液を 2 mL ずつ加え、4℃で 24 時間静置した。遠沈管を振盪し（192 rpm、1 時間）、遠心分離にかけ（6000 rpm、10 分間）、上澄み溶液を測定用サンプルとした。Cry j 1 濃度は抗 Cry j 1 モノクローナル抗体（013）およびペルオキシダーゼ抗 Cry j 1 抗体（053）を用いた酵素免疫測定法（Enzyme linked immunosorbent Assay, ELISA 法）（Fig. 2-3）にて測定し（発色基質：o-フェニレンジアミン、測定吸収波長：492 nm）、最終的には得られた吸光度から以下の式（1）により、大気中の Cry j 1 濃度（ng/m³）に換算した。

$$C \left(\text{ng} / \text{m}^3 \right) = (C_s - C_b) \times \frac{F}{F_a} \times V_e \div V \quad (1)$$

C_s : 測定濃度（ng/mL）、 C_b : ブランク溶液濃度（ng/mL）、 F : フィルター総面積（mm²）

F_a : 分析したフィルターの面積 (mm^2)、 V_e : 抽出量 (mL)、 V : 全吸引流量 (m^3)

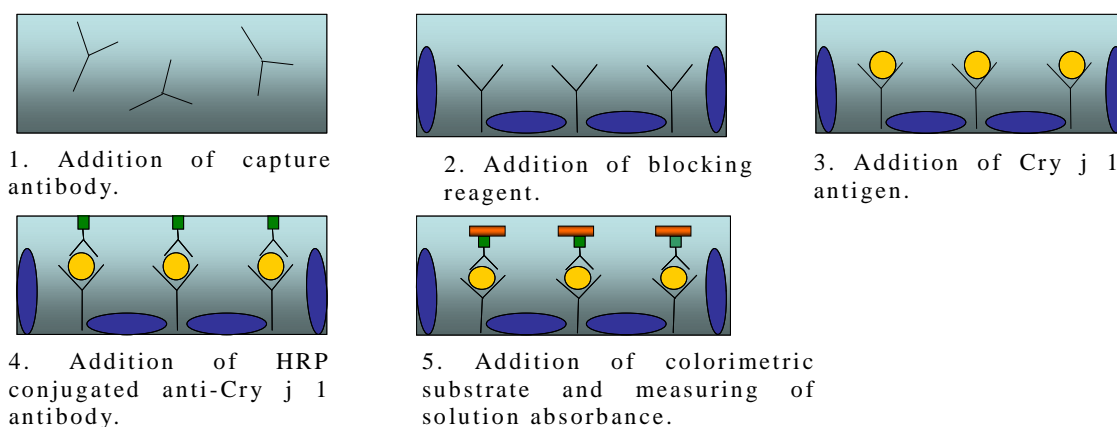


Fig. 2-3. Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA).

実験手順

① 96穴 ELISA マイクロプレートに補足抗体を各穴に 100 μL 注入し、プレートに蓋をしてパラフィルムで密封した。

② 37.0 $^{\circ}\text{C}$ に温度制御したインキュベーター内で 2 時間静置後、アスピレーター、キムワイプを用いて水分を完全に吸引・除去した（キムワイプを掌に置き、マイクロプレートを軽く叩くようにして、水分をウェルから除去した）。その後、BSA 含有 PBS を各穴に 250 μL 注入した（以下、単に“静置”と書いてある箇所では 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間インキュベーター内で静置を行った。その際、プレートに蓋をしてパラフィルムで密封した）。

③ インキュベーター内で静置させ、アスピレーターにて水分を完全に吸引・除去し、アレルゲン標準溶液（スタンダード）を各穴に 100 μl 注入した。

④ アレルゲン標準液を注入したプレートを静置後、Tween20 含有 PBS を 250 μl 注入・吸引し、ウェルの洗浄を行った（注入、吸引を 3 回繰り返した）。

⑤ 水分を完全に除去した各ウェルに 250 μL ずつ PBS を注入・吸引し、Tween 20 を完全に取り除いた（注入、吸引を 2 回繰り返した）。

⑥ 検出抗体を各穴に 100 μL 注入し、抗体－抗原－抗体の複合体を形成させた。検出抗体を注入したプレートを静置させた後、再び操作④、⑤を行い、ウェル内を洗浄した。

⑧ *o*-フェニレンジアミン、過酸化水素水、くえん酸・リン酸緩衝液を用い

て調製した発色基質溶液を各穴に 100 μL 注入し、30 分程度室温にて静置させた。プレートに発色基質溶液を注入する 直前 に、過酸化水素水を加えること（発色が安定する）。

⑨ 反応停止剤として 1 M 硫酸 100 μL を各穴に注入し、プレートリーダー（測定波長 492 nm、対照波長 630 nm）にて吸光度を測定した。

2.3. 実験結果

2.3.1. 飛散花粉数の調査

本研究は 2009 年から 2012 年まで花粉飛散期（3 月 1 日～3 月 31 日）における埼玉大学附近国道 463 号の飛散花粉数および気象データ（平均気温および平均降雨量）を **Fig. 2-4** に示した。2012 年花粉飛散期（3 月 12 日～3 月 20 日）における埼玉大学附近国道 463 号と埼玉大学総合研究棟 10 階の飛散花粉数お

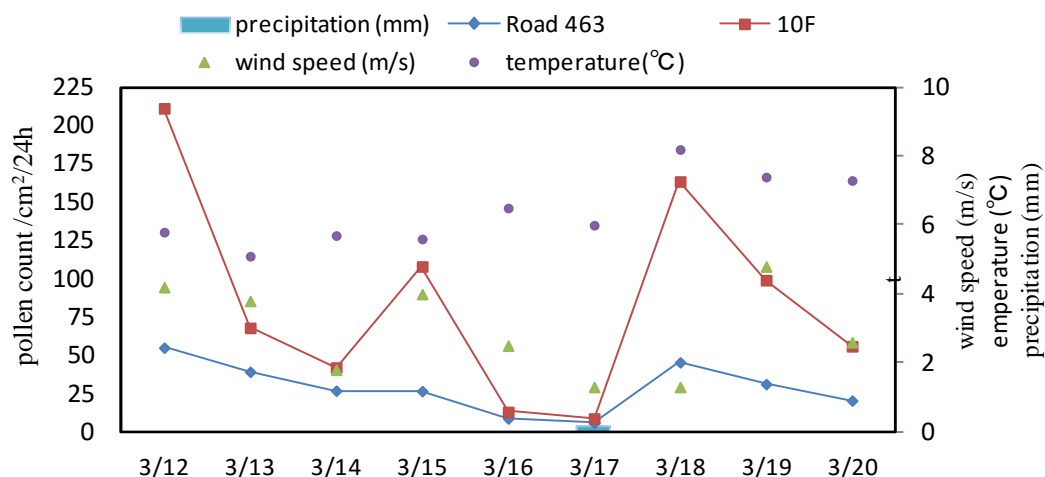


Fig. 2-4 Airborne pollen counts for route 463 and 10th floor of building of Research and Project and Meteorological data in 2012.

よび気象データ（平均風速、平均気温および平均降雨量）を **Fig. 2-4** に示した。図を見ると、総研棟 10 階の方が道路端に比べ花粉数が多かった。道路端と総研棟 10 階で良い相関が見られた ($R^2=0.8206$) (**Fig. 2-5**)。この結果は自動花粉モニター KH-3000-01 で観測した結果と一致した。3 月 12 日の花粉がピークになった。さいたま市の気象データによって、3 月の風速を見ると 12 日の風速が高かった。空気塊が移流してきたため、飛散花粉数ピークが出現したと

考えられる。また、3月17日は雨（3 mm/day）であり、飛散花粉数が少なかったが、3月18日に大量飛散花粉が観測された。降雨後の晴天日に多量の花粉が飛散することが確認された。

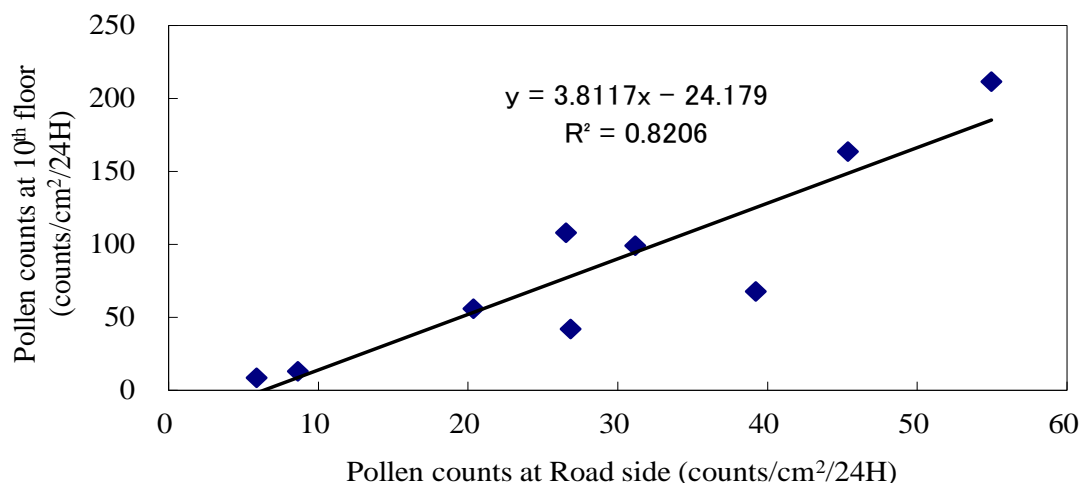


Fig. 2-5. Correlation of pollen counts between route 463 and 10th floor of building of Research and Project.

2.3.2. 道路端と一般環境のスギ花粉アレルゲン Cry j 1 濃度の比較

2008年～2009年の調査では、国道463号のCry j 1濃度は高かった。交通量によると、平日と休日ともに国道463号は県道57号より車が多かった。飛散花粉数が多い場合、大気中の全Cry j 1濃度も高いと考えられるが、飛散花粉数が少ない場合も高濃度のCry j 1含有粒子が測定された。これは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。

2012年のスギ花粉サンプリングは、総合研究棟10階を一般環境とし、および道路端（国道463号）2地点で行った。2地点の飛散花粉数および粒径別Cry j 1濃度をFig. 2-6、Fig. 2-7に示した。Fig. 2-6、Fig. 2-7により、 $< 1.1 \mu\text{m}$ に高濃度のCry j 1含有粒子が検出された。これは以前のCry j 1含有粒子の粒径分布の傾向と一致している。そして、飛散花粉数と大気中のCry j 1濃度とに

相関関係も認められなかった。3月12日～13日と3月18日～19日の総合研究棟10階の飛散花粉数はほぼ同じ高かったが、Cry j 1濃度は3月18日～19日の方が高かった。気象データによると、12日（平均風速4.2 m/s、最大風速

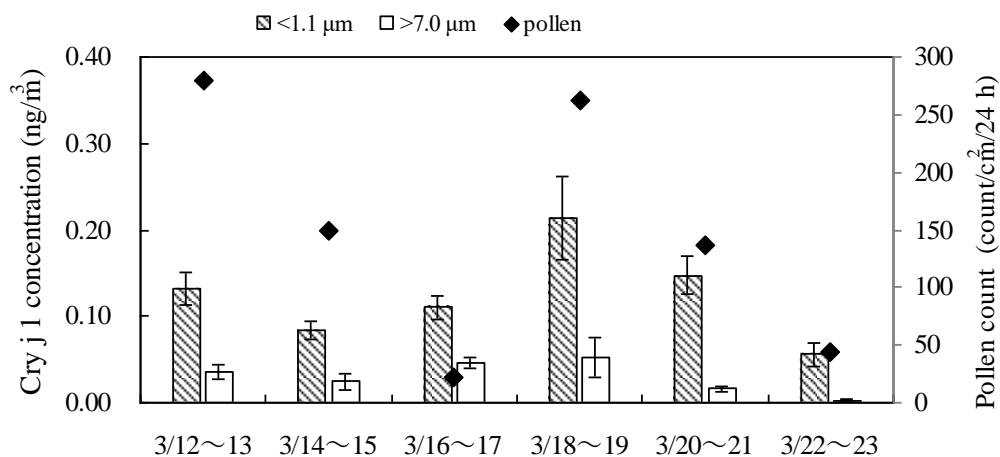


Fig. 2-6 Pollen counts and Cry j 1 concentration of 10th floor of building of Research and Project by AHV (2012/3/12~23).

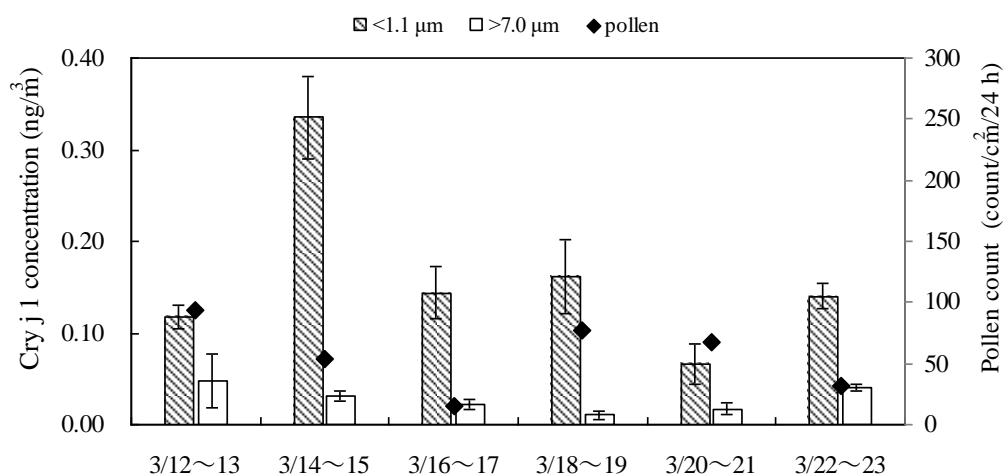


Fig. 2-7 Pollen counts and Cry j 1 concentration of Route 463 by AHV (2012/3/12~23).

9.5 m/s) の風速が高かった。空気塊が移流してきたため、飛散花粉数ピークが出現したと考えられる。また、3月17日は雨(3 mm/day)であり、飛散花粉数が少なかったが、3月18日に大量飛散花粉が観測された。降雨後の晴れ日に多量の花粉が飛散することが確認された。そして、降雨後の晴れ日に微小粒径

範囲における Cry j 1 濃度も高かったことが示唆された。

2012 年の調査において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。この結果より、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を考えられた。

関東都市部の上空を飛散するスギ花粉は、山間部から移流してきた直後の花粉が多く、大気汚染物質や自動車走行の影響は少ない。一方、都市部のアスファルト等に沈着したスギ花粉は、他の SPM の付着(Okuyama *et al.*, 2007)やアレルギー含有粒子の微小粒子化などが生じ、顕著に形態を変化させていると考えられる。

道路端では、移流してきたスギ花粉に加えて自動車走行による巻き上げにより、地面に堆積した花粉が再飛散する。そのため、道路端のほうがスギ花粉数は多いものと考えられる。一方、移流してきたスギ花粉は、道路端へ沈着する以外にも樹木等へ沈着し減少することが考えられる。しかし、道路端のほうが一般都市環境にくらべて Cry j 1 濃度は高いため、その影響は小さく、道路端のほうが飛散している花粉数も多いものと考えられる。花粉症症状や喘息の悪化はアレルギー含有微小粒子やアレルギーが吸着した SPM を吸引することで悪化する(Maeda *et al.*, 2008, Maejima *et al.*, 2001)。そのため、形態変化したスギ花粉や Cry j 1 含有粒子の濃度を調査していく必要がある。同様に、著しく形態変化したスギ花粉は、目視による花粉数計測手法においても、計測されていない可能性がある。ダーラム型花粉捕集器やバーカード型花粉捕集器はその手法を用いており、ともに日本ならびに欧米の標準的な計測手法である。そのため、今後は花粉数よりも正確な大気中 Cry j 1 濃度の情報を花粉症患者へ提供していくことが必要である。

2.4. まとめ

本章では、大気中におけるスギ花粉数およびそのアレルギー濃度の挙動を調査した。道路端の交通影響によるスギ花粉アレルギー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ギーを捕集した。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、アスファルトとの摩擦やスギ花粉同士の衝突により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。

降水前後の挙動変化に着目した報告では、スギ花粉数は降水前の晴れ日にくらべて降水後の晴れ日で減少したのに対し、PM_{1.1}中のCry j 1濃度は増加した。したがって、降水がCry j 1含有微小粒子の生成に寄与しているものと推測される。

第2章の参考文献

- Behrendt, H., Becker, W.M., Fritzsche, C., Sliwa-Tomczok, W., Tomczok, J., Friedrichs, K.H. and Ring, J., (1997), Air Pollution and Allergy: Experimental Studies on Modulation of Allergen Release from Pollen by Air Pollutants, *International Archives of Allergy and Immunology*, **113**, 69-74.
- Maeda, Y., Akiyama, K. and Shida, T., (2008), A Clinical Study of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollen-Induced Asthma, *Allergology International*, **57**, 413-417.
- Maejima, K., Tamura, K., Nakajima, T., Taniguchi, Y., Saito, S. and Takenaka, H., (2001), Effects of the Inhalation of Diesel Exhaust, Kanto Loam Dust or Diesel Exhaust without Particles on Immune Responses in Mice Exposed to Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollen, *Inhalation Toxicology*, **13**, 1047-1063.
- Murayama, K., Baba, K., Okubo, K.: Regional differences in the prevalence of Japanese cedar pollen allergy, *Japanese Journal of Allergology*, **59**, (1), pp.47-54, 2010 (in Japanese).
- Ishizaki, T., Koizumi, K., Ikemori, R., Ishiyama, Y., Kushibiki, E.: Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area, *Annals of Allergy*, **58**, pp.265-270, 1987.
- Okuyama, Y., Matsumoto, K., Okochi, H. and Igawa, M., (2007), Adsorption of Air Pollutants on the Grain Surface of Japanese Cedar Pollen, *Atmospheric*

Environment, **41**, 253-260.

Rogerieux, F., Godfrin, D., Sènèchal, H., Motta, A. C., Marlière, M., Peltre, G. and Lacroix, G., (2007), Modifications of *Phleum pratense* Grass Pollen Allergens following Artificial Exposure to Gaseous Air Pollutants (O₃, NO₂, SO₂), *International Archives of Allergy and Immunology*, **143**, 127-134.

Schappi, G.F., Taylor, P.E., Staff, I.A., Suphioglu, C. and Knox, R.B., (1997), Source of Bet v 1 Loaded Inhalable Particles from Birch Revealed, *Sexual Plant Reproduction*, **10**, 315-323.

Schappi, G.F., Taylor, P.E., Staff, I.A., Rolland, J.M. and Suphioglu, C., (1999), Immunologic Significance of Respirable Atmospheric Starch Granules Containing Major Birch Allergen Bet v 1, *Allergy*, **54**(5), 478-483.

Takahashi, Y., Ohashi, T., Nagoya, T., Sakaguchi, M. and Yasueda, H., (2001), Possibility of Real-Time Measurement of an Airborne *Cryptomeria japonica* Pollen Allergen Based on the Principle of Surface Plasmon Resonance, *Aerobiologia*, **17**, 313-318.

Taylor, P.E. and Jonsson, H., (2004), Thunderstorm Asthma, *Current Allergy and Asthma Reports*, **4**, 409-413.

環境省 HP, <http://kafun.taiki.go.jp/>.

気象庁 HP, <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>.

中村澄夫, 佐藤文孝, 中村紀雄, (2004), スギ花粉アレルゲン Cry j 1 Cry j 2 の発芽花粉における局在性, 日本花粉学会会誌, **50**(1), 15-22.

王青躍, 栗原幸大, 桐生浩希, 坂本和彦, 三輪誠, 内山巖雄, (2008), スギ花粉飛散期における飛散花粉数およびアレルゲン含有微小粒子状物質の高濃度出現の時系列的挙動差異, エアロゾル研究, **23**(2), 120-126.

第 3 章

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

3.1. はじめに

近年、東アジア大陸から長距離輸送によって飛来する黄砂の影響も問題となっている。地球温暖化に伴い、黄砂飛来期はスギ花粉飛散期と重なることもある。さらに、黄砂とスギ花粉同時投与による動物試験結果から、黄砂はスギ花粉症へのアジュバント効果を引き起こすことも指摘されている (Ichinose *et al.*, 2009)。花粉アレルギー含有微小粒子が微細な黄砂や汚染化学種と共に、肺に入りやすく、微量でも吸い込むと花粉症やぜんそくなどが悪化する可能性が報告されているため、花粉症罹患への黄砂と花粉アレルギーの複合影響を評価する必要がある。今後、スギ花粉アレルギーと黄砂による修飾などに関連づける研究が重要である。

黄砂飛来時には降水中イオン濃度は上昇し、特に Ca^{2+} 濃度と pH が大きく増加することが知られている (川村ら, 2006)。さらに、飛散スギ花粉上への大気浮遊粒子状物質 (SPM) の付着なども観察されており (Okuyama *et al.*, 2007)、スギ花粉-SPM (黄砂含む) 複合体への雨滴接触によって SPM からイオン成分が溶出し、スギ花粉表面において高イオン濃度の溶液とスギ花粉との接触が生じる可能性がある。そこで本章では、黄砂飛来時スギ花粉数とスギ花粉アレルギーの挙動について明らかにし、特に黄砂飛来時に降雨があつて降水の影響を調査した。降水などの溶液中においては、イオン濃度が増加するとスギ花粉からの Cry j 1 溶出濃度は増加すると報告されている (Sagehashi *et al.*, 2005)。これは、初期降水に大気汚染物質がより多く取り込まれることでイオン濃度が高くなるためと考えられ、特に弱い雨の初期降水や降水直前の大気汚染物質が高濃度の時に、降水中のイオン濃度は極めて高くなると予想される。黄砂飛来時に花粉症症状の増悪を訴える症例が多いため、黄砂飛来時にスギ花粉アレルギーの飛散挙動を調査する必要がある。

3.2. 実験方法

3.2.1. 観測条件

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ギーの飛散挙動を把握するため、2009年～2010年にかけて黄砂飛来前後に大気サンプリングを行った。

捕集地点：国道 463 号（埼玉大学正門付近）。

捕集装置：アンダーセンハイボリウムサンプラー（AHV）、KH-3000-01自動花粉モニターおよびDurham型花粉捕集器

スギ花粉アレルゲン定量分析：表面プラズモン共鳴法（SPR 法）

3.2.2. 黄砂飛来状況

環境省のデータから、スギ花粉飛散期である 2 ~ 4 月における関東への黄砂の飛来は、2001 ~ 2010 年の年平均で約 3 回観測されている（環境省、<http://www.env.go.jp/air/dss/past/index.html>）。本サンプリング期間の黄砂の飛来情報は環境省のホームページを参照し、黄砂飛来日は本サンプリング地点に最も近い観測地点である茨城県つくば市で黄砂の飛来が観測された日とした。

3.2.3. 大気中花粉数の計測と気象条件の取得

大気中の花粉数には、リアルタイム花粉モニターKH-3000-01 を用いた。また、サンプリング期間中の気象情報（風向・風速、降水量、気温）は、浦和市役所にて常時観測されているデータを気象庁のホームページからダウンロードして利用した（気象庁、<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>）。

3.2.4. 測定方法

本研究室で行っているスギ花粉アレルゲン濃度の測定には、従来 ELISA 法が用いられてきたが、この方法は長い分析時間を要するため（約 8~9 h）、新たに表面プラズモン共鳴法（Surface Plasmon Resonance、以下 SPR 法）を用いたアレルゲン分析手法を利用した。この方法を用いた場合、1 サンプルを 15 分ほどで分析可能であり、抗原抗体反応におけるアフィニティー等の反応性についても簡便に測定可能である。SPR 法とはセンサーチップの金膜表面上での生体物質相互作用などの特異的反応を観察するのに用いられる分析装置で、様々な分野で利用されている装置であり（永田ら, 1998）、スギ花粉アレルゲン濃度の測定にも用いられている（Sagehashi *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2001）。本研究では SPR 法を利用した分析装置として Biacore J (GE Healthcare Co., Ltd.) を用いた。金膜に固定化する物質（リガンド）を抗 Cry j 1 モノクローナル抗

体 (Cry j 1 Mab) (生化学バイオビジネス社製)、分析する物質 (アナライト) を各試料中のスギ花粉アレルゲンとし、アレルゲンの定量をする際に用いた。

SPR 法は、装置内のセンサーチップを構成する金薄膜とガラスの界面でレーザーが全反射するように照射すると、反射光の一部に反射光強度が低下した部分が観察される。抗 Cry j 1 (Cry j 2) 抗体をセンサーチップの金薄膜表面に固定化させておいて、サンプルをセンサーチップに流したときにサンプル中の Cry j 1 (Cry j 2) と結合反応すれば、チップ表面上の質量が増加し (溶媒の屈折率が変化し)、実験系の概略を Fig. 3-1 に示す。

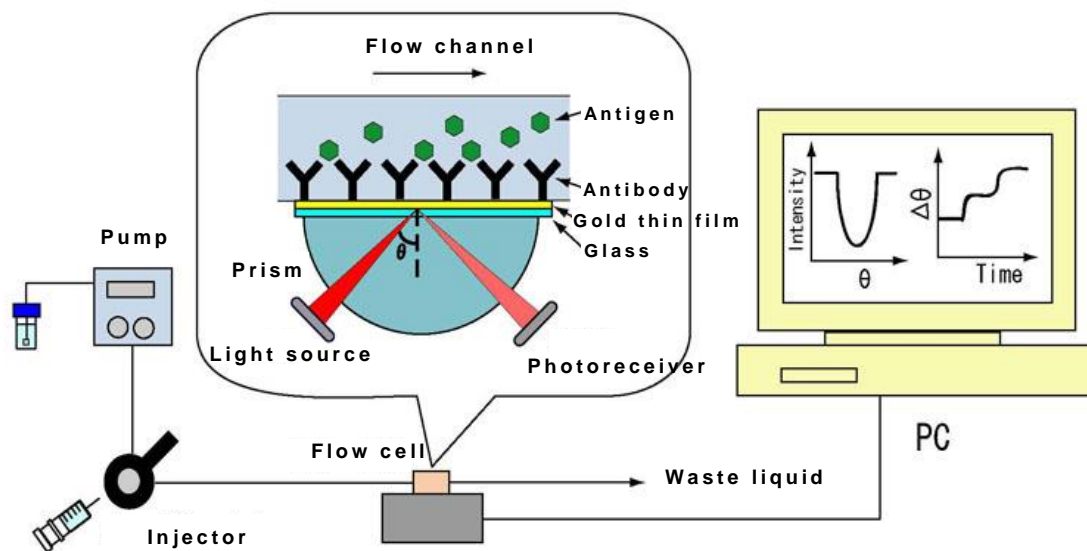


Fig. 3-1. Principle of Surface Plasmon Resonance (SPR).

SPR 法によるアレルゲン濃度の分析手順

(1) 装置の立ち上げ

Biacore J、パソコン、パソコン用モニターの電源を立ち上げる。装置の前右側のポンプ周辺から出ている 2 本のインレットチューブを、ランニング緩衝液を入れたボトルに差し込み、ポンプの締め金を留める。また、本体左側のコネ

クターブロックの下に廃液ビンを置く。Biacore J control Software をクリックしてソフトウェアを起動し、設定温度が 25 °C になっているのを確認する。

センサーチップの挿入

装置左横のチップ挿入部から、センサーチップを挿入する。インジケータの Sensor chip の緑ランプ点滅を確認し、Menu bar→Dock を選択し、ボックス内の Dock をクリックする。

リガンドの固定化

※この操作は、シングルチャンネルで必ず行うこと。フローセル 2 にも固定化を行う場合は、インジェクションポートのチューブの配列を変える必要があるため、PC 画面に出てくる配列に変えること。

Run→start をクリック、シングルチャンネル、流量 30 µl/min を選択する。

・ EDC と NHS を 100 µL ずつ採取し、マイクロチューブ内で、混合する。添加時間を 6 min に設定し、マイクロピペットでインジェクションポートに 190 µL セットする。

・ 次に、添加時間を 6 min に設定し、10 µg/ml に調製したリガンド（抗体）190 µL をマイクロピペットでインジェクションポートにセットする。

・ 最後に、添加時間を 6 min に設定し、エタノールアミン 190 µL をマイクロピペットでインジェクションポートにセットする。

(2) 分析の開始

サンプルの添加

・ Run→start をクリック後、デュアルチャンネルを選択し、Reference subtraction をチェック、流量 30 µL/min に設定する。

・ 保存先を選んで save を押すとセンサーグラムが開始される。Command→Inject をクリックし、添加時間を 2 min に設定する。

※ピークが小さいようなら添加時間を増やす。その際、必要サンプル量も 30 µL/min で増えるので注意。

・ サンプル必要量をマイクロピペッターで吸い、チップをインジェクションポートにセットし、start をクリックする。

・結合解離定数を測定する場合は、2 min 間のインジェクション後、15 分ほどそのままの状態を維持し、解離速度を測定するためのデータを取得する。

チップ表面再生溶液の添加

・Command→Regenerate をクリックする。添加時間を 2 min にし、GLYCINE 2.0 (スギ&ヒノキ花粉アレルゲンの場合) をマイクロピペッターで吸い、チップをインジェクションポートにセットし、Start をクリックする。

(3) 終了操作

フローセル内の洗浄操作

・ランニング緩衝液を超純水に置き換え、Tools→Change Buffer をクリックする。

・超純水に置換終了後、超純水を抜き取り、Tools→Empty Flow System をクリックする。

センサーチップの抜き取り

・Command→Undock をクリックし、ボックス中の Undock をクリックする。Undock が完了すると、インジケータの緑ライトが点灯から点滅に変わるので、確認する。

ポンプの締め金の解除

・ポンプの締め金のおさえを外し、解除する。

電源のオフ

・本体、PC、モニターの電源をオフにする。

3.3. 実験結果

3.3.1. 黄砂飛来時スギ花粉数への影響

2009 年～2010 年にかけて KH-3000-01 で測定した花粉数について黄砂飛来情報と合せて **Fig. 3-2** に示している。近年、黄砂早期飛来が日本全国的に観測され、その同時期にスギ花粉飛散ピークも度々出現している。都市部において、越境汚染で修飾された黄砂が、スギ花粉と接触することで、スギ花粉も修飾され、アレルギーを増悪させる可能性も考えられる。黄砂が広範囲で観測された

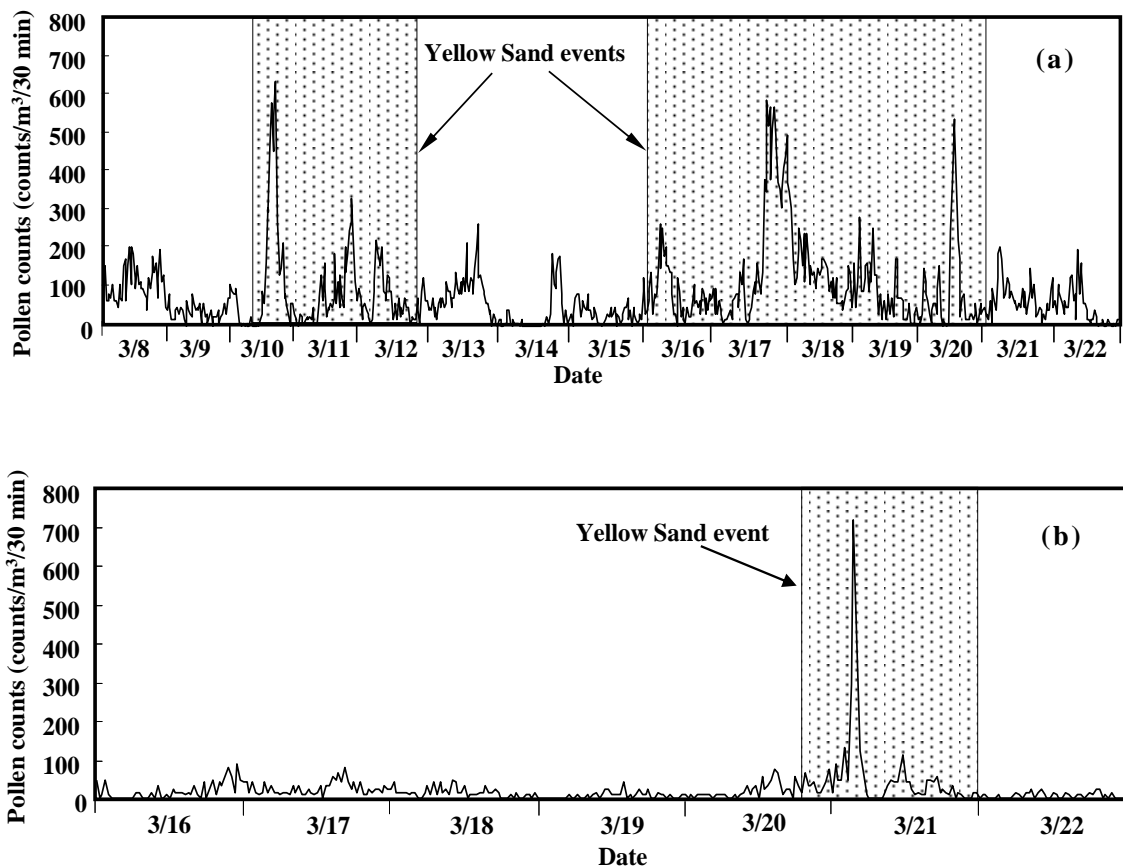


Fig. 3-2. Pollen counts by automatic pollen monitor KH-3000-01 and the flying information of the Yellow Sand events during Mar. 8~22nd, 2009 (a) and Mar. 16~22nd, 2010 (b).

2009年3月11日～12日と3月16日～20日には飛散花粉数がピークになっており、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。2010年3月21日には飛散花粉数がピークになっており、黄砂飛来ピークと花粉飛散ピークとの重なりが再び観測された。

気象庁黄砂情報によると、2010年3月21日には黄砂が観測された (**Fig. 3-3**)。埼玉大学解析地点としては緯度 35.8649、経度 139.6061 を設定した。流跡線解析の結果を **Fig. 3-4** に示した。後方流跡線とは、任意の地点と任意の時間において空気塊が時間と共にどのような経路を通過して到達したのかを風速などの気象データから追跡する手法のことである。**Fig. 3-4** によると、24時間をかかって黄砂は中国から飛んできたことがわかった。

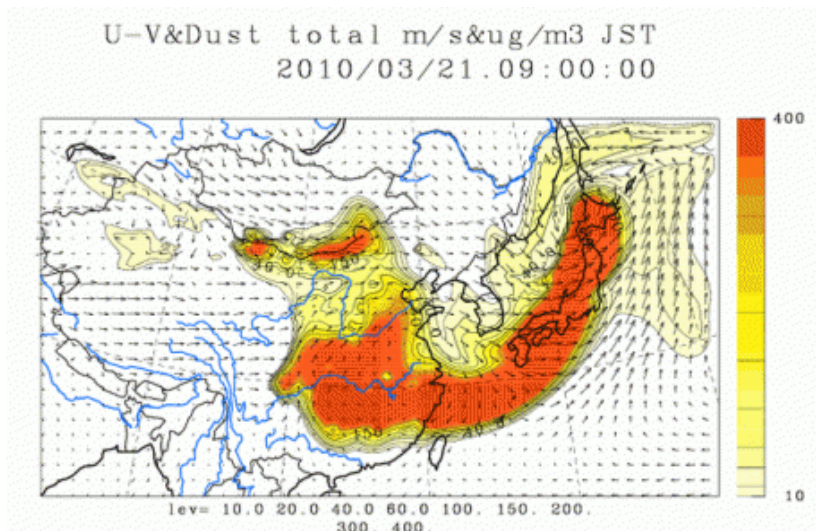


Fig. 3-3. The data of Yellow sand (2010/03/21).

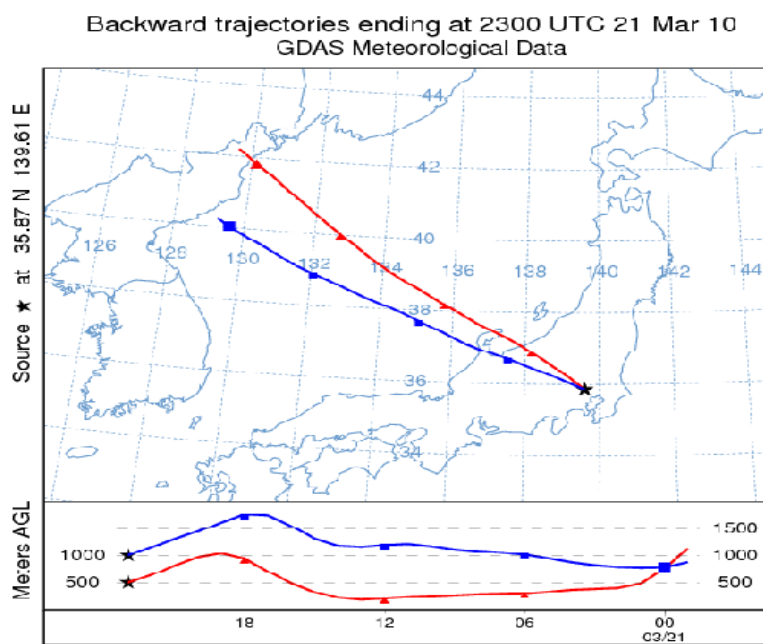


Fig. 3-4. The Backward trajectory (2010/03/21).

3.3.2. 黄砂飛来時スギ花粉アレルギーへの影響

黄砂飛来前後の気象データについて Fig. 3-5 に示した。黄砂飛来時における飛散花粉数と Cry j 1 含有粒子の粒径別濃度を Fig. 3-6 に示した。1.1 μm 以下の微小粒径範囲において、他の粒径範囲よりも高濃度の Cry j 1 が測定された。1.1 μm 以下の微小粒子は肺胞までに到達することができるため、下気道へ侵

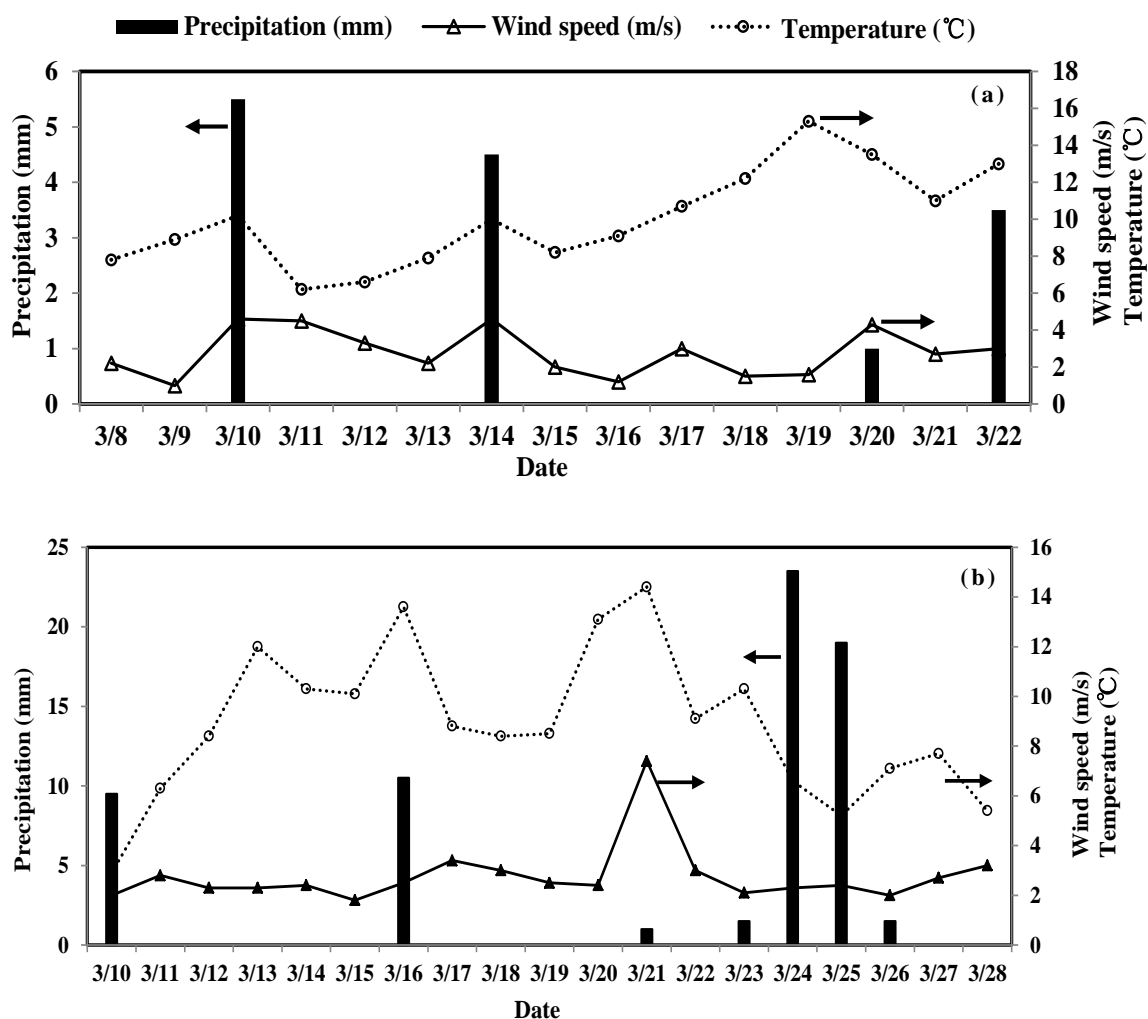


Fig. 3-5. Daily variation of wind speed, wind direction, temperature and precipitation during the pollen scattering spring seasons in 2009 (a) and 2010 (b).

入可能な Cry j 1 含有微小粒子の存在が示唆された。気象のデータ (Fig. 3-5) によって、

2009年3月10日(5.5mm)、20日(1mm)および2010年3月21日(1mm)は雨がかった。黄砂飛来時、雨水中のpHおよびイオン濃度は増加する。高イオン濃度によってスギ花粉アレルゲンの溶出率が増加することが報告された(Wangら, 2012)。黄砂飛来時降雨後の晴日に高濃度のCry j 1含有粒子を測定された。

サンプリング期間中の黄砂の飛来は3月20日に観測されたため、翌日の3

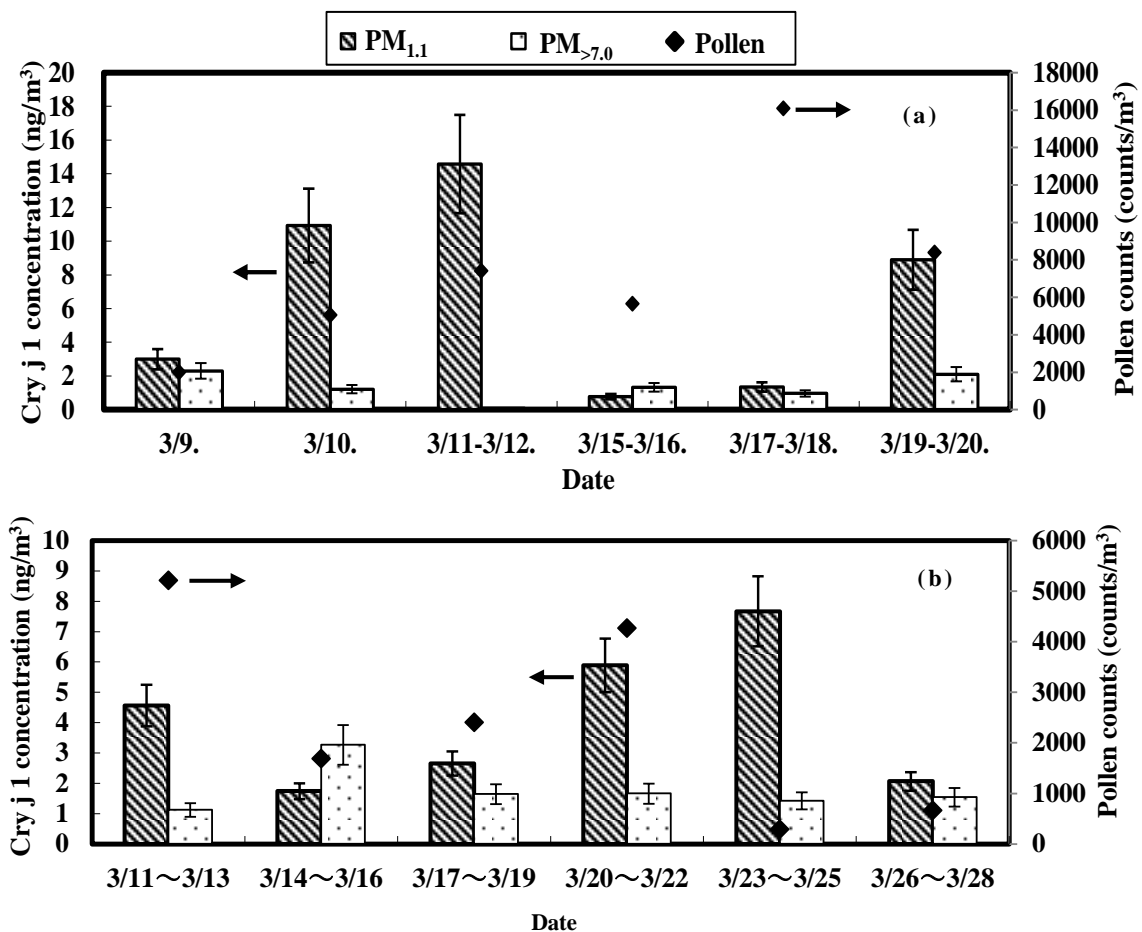


Fig. 3-6 The concentration of allergen particles Cry j 1 and pollen counts on Mar. 9 ~ 20, 2009 (a) and Mar. 14 ~ 28, 2010 (b).

月 21 日の降水に黄砂が含まれたと考えられる。黄砂の原因となっている東アジア大陸内陸の砂漠地帯の土壌は、アルカリ土壌である。そのため、黄砂を捕捉した降水は pH 7.0 以上になることがあった（川村ら，2006）。そのため、スギ花粉の破裂割合が増加したものと思われる。したがって、細胞壁に局在する Cry j 1 も、細胞壁が破裂することでその欠片が Cry j 1 含有粒子となり、降水後の晴れ日に再飛散し、SPM となることが考えられた。

Table. 1 は、黄砂飛来前後にスギ花粉平均飛散数およびスギ花粉アレルゲン Cry j 1 含有粒子の平均濃度を示す。表によると、PM_{≧7.0} の Cry j 1 含有粒子の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 含有粒子の平均濃度は増加した。2009 年および 2010 年の黄砂飛来前後の PM_{1.1} 中の Cry j 1 含有粒子の平均濃度の差はそれぞれ 1.06 ng/m³/24h および 0.72

ng/m³/24h でした。(高橋ら, 2001)は、スギ・ツバキ花粉の大気中のアレルギー濃度は約 1-3 pg/m³ に達する時、花粉症の症状が現われると報告した。黄砂飛来前後の Cry j 1 含有粒子の平均濃度の差を無視することができない。

Table 1. The average pollen counts and average concentrations of Cry j 1 before and after Yellow Sand events.

Pollen counts and concentrations of allergen		2009		2010	
		Before YS	After YS	Before YS	After YS
Pollen (counts/m ³ /24h)		2000	4700	680	4200
Cry j 1 (ng/m ³ /24h)	PM _{1.1}	3.00	4.06	1.24	1.96
	PM _{>7.0}	2.30	0.63	0.60	0.55

Cry j 1 含有粒子が、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。東アジアでの特有な黄砂飛来する現象が早まるに伴い、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ギーの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、スギ花粉アレルギー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。

3.4. まとめ

本章では、関東都市部における黄砂飛来時にスギ花粉および花粉アレルギーの飛散挙動について調査を行った。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ギー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。黄砂飛来後の降水では、弱塩基性かつ高イオン濃度の降水となることから、スギ花粉からのアレルゲン溶出濃度およびスギ花粉脱皮割合が増加し、スギ花粉アレルゲン含有微小粒子の生成に寄与するものと推察される。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。

現時点で黄砂飛来時にスギ花粉および花粉アレルゲンへの影響についての研究は少ないため、黄砂の特徴の紹介から間接的にスギ花粉アレルゲンへの影響を理解しようと考えられた。

本章における調査結果は黄砂飛来時のスギ花粉の挙動およびアレルゲン含有微小粒子の形成可能性を示した有意義な研究であると言える。

第 3 章の参考文献

- Ichinose, T., Hiyoshi, K., Yoshida, S., Takano, H., Inoue, K., Nishikawa, M., Mori, I., Kawazato, H., Yasuda, A. and Shibamoto, T., (2009), Asian Sand Dust Aggravates Allergic Rhinitis in Guinea Pigs Induced by Japanese Cedar Pollen, *Inhalation Toxicology*, **21**(12), 985-993.
- Maejima, K., Tamura, K., Nakajima, T., Taniguchi, Y., Saito, S. and Takenaka, H., (2001), Effects of the Inhalation of Diesel Exhaust, Kanto Loam Dust, or Diesel Exhaust without Particles on Immune Responses in Mice Exposed to Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollen, *Inhalation Toxicology*, **13**, 1047-1063.
- Okuyama, Y., Matsumoto, K., Okochi, H. and Igawa, M., (2007), Adsorption of Air Pollutants on the Grain Surface of Japanese Cedar Pollen, *Atmospheric Environment*, **41**, 253-260.
- Sagehashi, M., Fukuda, T., Fujii, T., Sakai, Y. and Sakoda, A., (2005), Elution and Adsorptive Concentration of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollen Allergen in Environmental Water, *Water Science and Technology*, **52**(9), 37-43.
- Takahashi, Y., Ohashi, T., Nagoya, T., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Nitta, H. (2001) Possibility of real-time measurement of an airborne *Cryptomeria japonica* pollen

allergen based on the principle of surface plasmon resonance. *Aerobiologia* 17, 313-318.

Wang, Q., Nakamura, S., Gong, X., Lu, S., Nakajima, D., Wu, D., Suzuki, M., Sakamoto, K. and Miwa, M., (2010), Evaluation of Elution Behavior and Morphological Change of *Cryptomeria japonica* Pollen Grain and Release of Its Daughter Allergenic Particles by Air Polluted Rainfall, *Air Pollution XVIII, Ecology and the Environment*, **136**, 185-197.

Wang, Q., Nakamura, S., Lu, S., Nakajima, D., Suzuki, M., Sakamoto, K., Miwa, M., 2012, Release behavior of small sized daughter allergens from *Cryptomeria japonica* pollen grains during urban rainfall event, *Aerobiologia*, **28**, 71-81.

川村知裕, 原宏, (2006), 日本の降水化学に対する黄砂の影響, 大気環境学会誌, **41**(6), 335-346.

環境省, <http://www.env.go.jp/air/dss/past/index.html>.

気象庁ホームページ, <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>.

仲田 拓人, 中込一之, 高久洋太郎, 西原冬実, 山口剛史, 柚知行, 萩原弘一, 金澤實, 加瀬康弘, 永田眞, (2010), 鼻炎症状と喘息症状の連関についてのアンケート調査, *アレルギー*, **59**(6), 688-698

中村澄夫, 佐藤文孝, 中村紀雄, (2004), スギ花粉アレルゲン Cry j 1 と Cry j 2 の発芽花粉における局在性, *日本花粉学会会誌*, **50**(1), 15-22.

第 4 章

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

4.1. はじめに

花粉粒は20～100 μm の粗大粒子に分類されており、気道上部の鼻腔に沈着されると考えられてきた。しかし、近年、花粉症患者のうち、咳や喘息の発症例が多く見られていることから、大気中でアレルゲン含有粒子状物質が微小粒径へ移行し、鼻腔より深部の気管支や肺胞などの下気道への侵入が生じていることで、そのアレルゲン粒子による咳、喘息などの一連の症状が生じたと考えられている。スギ花粉の場合、アレルゲン粒子は大気中で1.1 μm 以下の粒径範囲に高い割合で存在し、都市部では山間部よりも多くのアレルゲン粒子が1.1 μm 以下に存在することが観測されている。アレルゲン粒子の微小粒径への移行要因としては、花粉粒の表面に付着しているオービクル（1.0 μm 以下）の剥離、花粉粒が高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アレルゲン粒子の大気中への放出、そして大気汚染物質などが原因と考えられている。本研究は大気中に浮遊する花粉および微小アレルゲン粒子の実態について調査している。

大気中の花粉およびアレルゲン含有粒子を捕集するにはサンプラーを使用する必要がある。これまでに挙げられた研究では、粒径別のアレルゲン濃度を測定する際に、様々なサンプラー（吸引流量）を用いてきた。本研究室では、アンダーセンハイボリウムサンプラー（AHV）を用いて捕集した。しかし、この装置は吸引流量が大きいいため、サンプラーの1段目に捕集された花粉またはアレルゲン含有粒子が再飛散され、下段に流入している可能性が指摘されている。上記の問題を検討するために、スギ花粉飛散期において、流量の小さいロープレッシャーインパクト（LPI）を用いて捕集した花粉およびアレルゲン含有粒子を利用した。スギ花粉アレルゲンの微小粒径分布を調査した。2009年国道463号と総合研究棟10階にLPIで捕集したフィルターを用いてスギ花粉アレルゲンを測定し、花粉および花粉アレルゲンの飛散挙動を考察した。

4.2 実験方法

4.2.1. 観測条件

スギ花粉アレルゲンの微小粒径範囲の粒径分布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。

捕集装置：ロープレッシャーインパクト

ー (LPI)

この装置は、低圧条件下で、インパクションする事により従来下限とされていた捕集径 $0.43 \mu\text{m}$ (空気動学的粒径 50%、カットオフ値) より小さい粒子の分級捕集を可能としたインパクトである。 $0.06 \mu\text{m}$ 以下から $11 \mu\text{m}$ 以上まで 13 段階 (Fig. 4-1) に分級捕集した (2009年～2012年)。

LPI による分級原理は、ジェットノズルから捕集板に向かって含塵ガスを噴出させたときの粒子の慣性力を利用して気流から粒子を分離し、捕集板上に衝突させるものである。口径の異なるジェットノズルと捕集板を多段で組み合わせることによって、全 13 段から成る $0.06 \mu\text{m} \sim 11 \mu\text{m}$ (≤ 0.06 , $0.06 \sim 0.12$, $0.12 \sim 0.20$, $0.20 \sim 0.30$, $0.30 \sim 0.49$, $0.49 \sim 0.69$, $0.69 \sim 1.2$, $1.2 \sim 2.1$, $2.1 \sim 3.5$, $3.5 \sim 5.1$, $5.1 \sim 7.8$, $7.8 \sim 11$ and $\geq 11 \mu\text{m}$) の粒径範囲の粒子を分級捕集することができる (Fig. 4-2)。

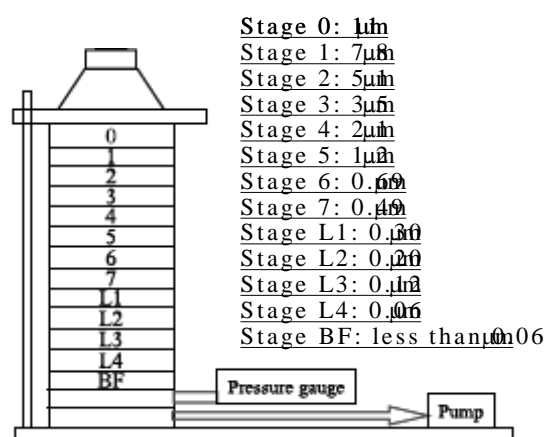


Fig. 4-1. Low pressure impactor (LPI) .

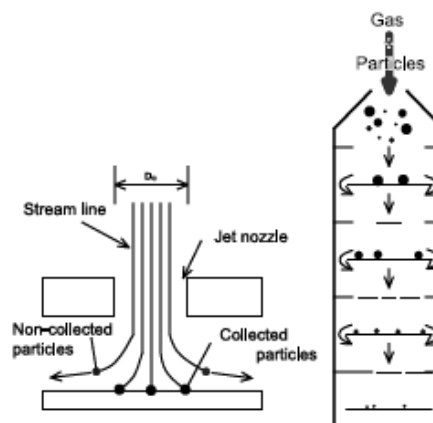


Fig. 4-2. Principle of LPI

4.2.2. スギ花粉アレルゲンの抽出および測定

LPIフィルターはカッターを用いて1/4にカットし、150 mM NaCl, 0.125 M NH₄CO₃, 3 mM EDTA, 0.005% Tween20含有10 mMヘPes緩衝液を2 mlの入った試験管内に入れ、4°Cで24時間静置後、さらに室温で1時間振とう器で振とうさせた後、溶液を10分間遠心分離（6000 rpm）し、その上清を分析用サンプルとした。

SPR法の装置としてBiacore J（GEヘルスケアバイオサイエンス製）を使用した。スギ花粉アレルゲンCry j 1の濃度を測定するため、センサーチップ表面に抗Cry j 1モノクローナル抗体[clone 013]（生化学バイオビジネス製）を固相化させ、標準試料として精製スギ花粉抗原Cry j 1（生化学バイオビジネス製）を使用した。バッファーにはHBS-EPバッファー（GEヘルスケアバイオサイエンス製）を用いた。Biacore Jフローセル入り口部分に、標準試料あるいは、Cry j 1測定用試料を70 μL分取し、フローセル内に流してCry j 1濃度の測定を行った。最終的に大気中Cry j 1濃度（ng/m³）に換算した。

4.2.3. 免疫蛍光抗体法による大気試料中のCry j 1含有粒子の可視化

本研究室では、Cry j 1含有粒子の存在形態を可視化させるため、抗スギ花粉抗原Cry j 1抗体とFITC（Fluorescein isothiocyanate）標識抗マウスIgG抗体との特異的な結合を利用した免疫蛍光抗体法という観察手法を確立した（原理：Fig. 4-3）。この方法を用いて、大気試料中のCry j 1含有粒子を蛍光標識し、励起光照射と蛍光検出を行う落射型蛍光顕微鏡により、その存在形態を確認した。

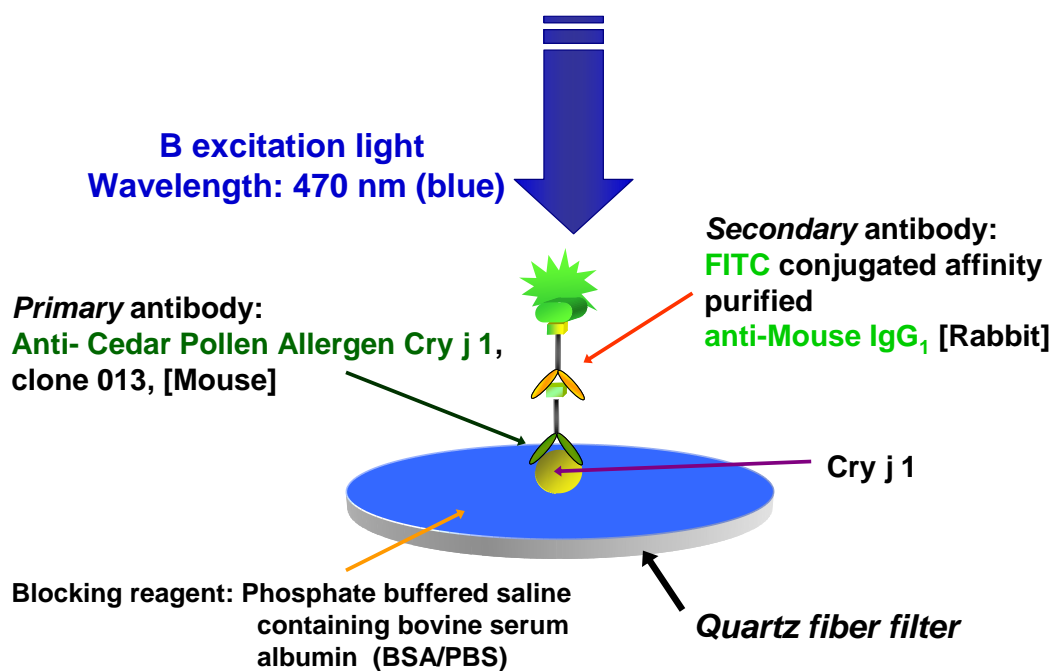


Fig. 4-3. Principle of immunofluorescence antibody method.

【試薬】

□ 精製スギ花粉抗原Cry j 1（生化学バイオビジネス製）

精製花粉抗原Cry j 1をPBSに100 µg/mLの濃度に溶解し、バイアルに500 µL分注したもの。

□ FITC標識抗マウスIgG抗体（Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.製；FITC抗体）

□ リン酸緩衝生理食塩水（和光純薬工業製）

□ ウシ血清アルブミン HG-不含（和光純薬工業製）

□ ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（和光純薬工業製）

□ VectaShield Mounting Medium（Vector laboratories, Inc.製；退色防止剤）
（遮光下、4℃で保存する）

◎免疫蛍光抗体法で用いた溶液の調製

【溶液調製法】

(1) 抗スギ花粉抗原Cry j 1抗体

<用途> Cry j 1抗原と特異的に結合し、抗原-抗体の複合体を形成させるために、大気試料中のCry j 1と結合させる抗体。

→ 抗スギ花粉抗原Cry j 1抗体をマイクロピペットで200 μ L量りとり、10 mLメスフラスコに注ぎ、PBSにてメスアップする。

(2) 1 wt. % BSA含有PBS

<用途> 抗スギ花粉抗原Cry j 1抗体がFITC抗体以外のタンパク質と非特異的な反応を起こすことを防止するために添加するタンパク質溶液。

→ 薬さじでBSAを2.65 g秤量し、ビーカーに加える。ここにPBSを加え、BSAを完全に溶解させた後、250 mLメスフラスコに溶液を移し、PBSにてメスアップする。

(3) FITC抗体

<用途> 蛍光色素を標識した抗体である。抗原と結合し、抗原-抗体複合体を形成することで、抗原（Cry j 1）存在部位に蛍光色素を結合させ、可視化を可能にする。

→ FITC抗体2 mg（黄色粉末）を超純水1.5 mLとともに10 mLバイアルに入れ、検出抗体原液を作製する。検出抗体原液を500 μ L量りとり、100 mLメスフラスコに加える。超純水でメスアップし、バイアル瓶に小分けして冷凍保存する（バイアル瓶に溶液を入れ過ぎると、冷凍下で膨張しガラスが割れるので注意する）。

(4) 0.05 wt. % Tween 20 PBS

<用途> 抗原、抗体、BSA含有PBSなどのタンパク質溶液を吸引除去した後に添加し、マイクロプレートなどに残留した溶液を洗浄し、次に行う抗体反応の阻害を防止する。

→ マイクロピペットを用いてTween20を50 μ L量りとり、ビーカーに加える。PBSを加え、攪拌して完全に溶解させた後、100 mLメスフラスコに加える。メスフラスコにPBSを加え、100 mLにメスアップする。

◎免疫蛍光抗体法の実験手順

<フィルターの設定>

↓ スギ花粉を捕集した大気試料を5 mmφにくり抜き、マイクロプレートの底部に置く。

<1次抗体の添加>

↓ 抗スギ花粉抗原Cry j 1抗体溶液をウェルに100 μL注入する。

↓ 37 °Cで2 h静置させ、水分を除去する。

↓ Tween 20含有PBS100 μLをウェルに注入し洗浄する。×1回

↓ PBS 100 μLをウェルに注入し洗浄する。×1回

<ブロッキング>

↓ 1 %BSA含有PBSをウェルに100 μL注入する。

↓ 37 °Cで2 h静置させ、水分を除去する。

<2次抗体の添加>

↓ FITC標識抗マウスIgG抗体をウェルに100 μL注入する。

↓ 遮光、室温で2 h静置させ、水分を除去する。

↓ Tween 20含有PBS 100 μLをウェルに注入し洗浄する。×1回

↓ PBS 100 μLをウェルに注入し洗浄する。×1回

<プレパラートの作製>

↓ ウェルからフィルターを取り出し、観察する面を上にしてスライドガラスに載せる。

↓ フィルターに封入剤を1滴垂らし、カバーガラスをかぶせる。

↓ 遮光下、プレパラートを4 °Cにて保存する（すぐに観察しない時にはアルミホイルで遮光し、冷蔵保存する）。

<試料の観察>

↓ 蛍光顕微鏡（B励起線）で試料を観察する。

[注意]上記、免疫蛍光抗体法の手順の中で、「添加溶液の除去」と「Tween 20含有PBSによるウェル洗浄」の操作がある。このとき、ウェル内の溶液をアスピレーターにて除去するのだが、ウェル底部に置いた大気試料はアスピレーターで溶液除去する前に、ピンセットを使ってキムワイプの上に出しておくこと（フィルター捕集面を上にする）。

4.3. 実験結果

4.3.1. 微小粒径範囲の Cry j 1 濃度

Fig. 4-4に2009年 (a) 3月4日から3月10日、(b) 3月11日から3月17日と (c) 3月18日から3月24日に埼玉国道463号で捕集した花粉アレルギーの粒径別の Cry j 1

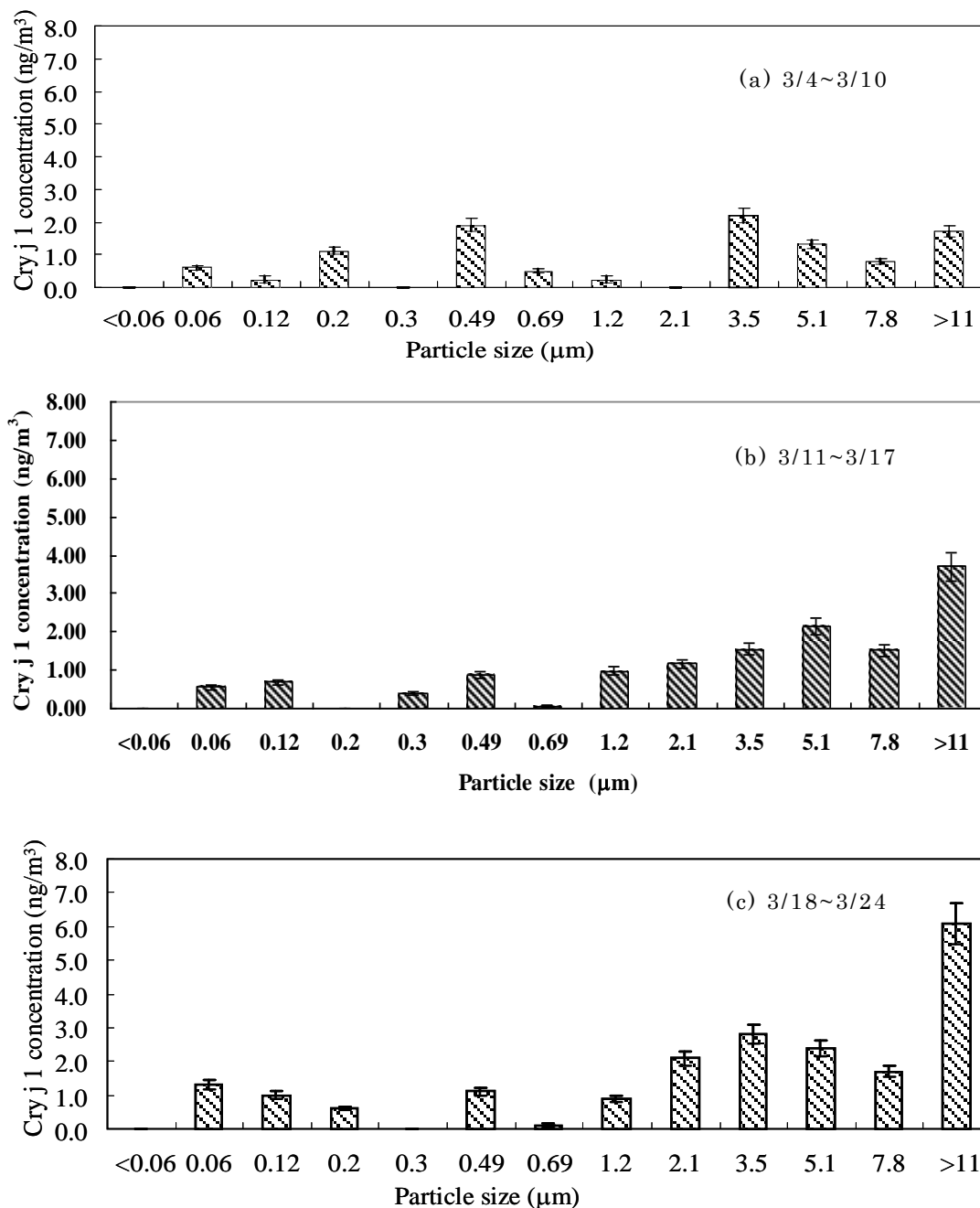
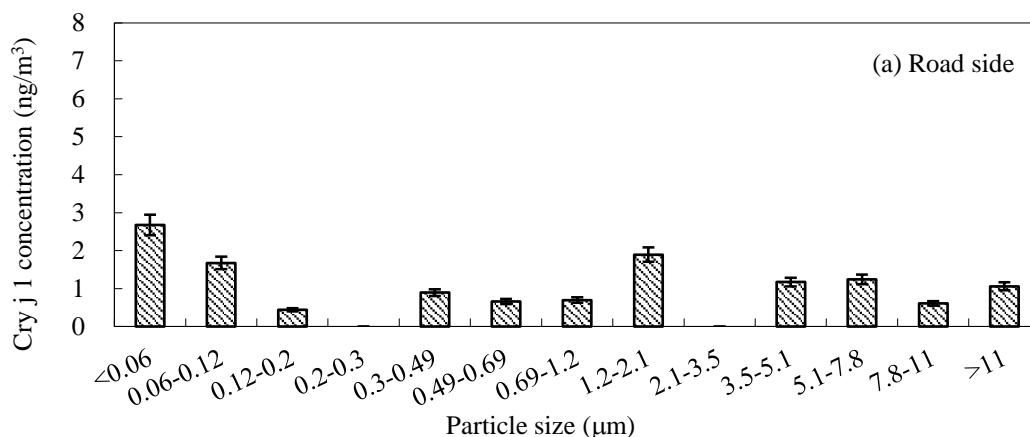


Fig. 4-4. Size distribution of Cry j 1 in different airborne LPI samples (a) 3/4~3/10 (b) 3/11~3/17 (c) 3/18~3/24 during 2009 investigation.

濃度を示した。3月4日から3月10日の飛散花粉数は384個/cm²/7dayであり、3月11日から3月17日の飛散花粉数は670個/cm²/7dayであったが、3月18日から3月24日の飛散花粉数は980個/cm²/7dayであった。スギ花粉アレルゲンの総濃度は3月18日から3月24日のほうが高かった。0.06 μm以下の粒径範囲にはCry j 1が検出されなかったことは2005年の測定結果と一致した。3つのサンプルは3.5 μm以上の粒径範囲に高濃度のCry j 1が検出された。3月4日から3月10日のサンプルは2.1 μm粒径範囲のアレルゲンは検出できなかったが、花粉飛散数が多かった3月11日から3月24日のサンプルがこの粒径範囲で高濃度のCry j 1が検出された。そして、0.06 μm~1.2 μm粒径範囲のアレルゲンも検出された。大気中に浮遊している花粉アレルゲンの粒径分布を確認できた。下気道へ侵入するスギ花粉アレルゲン含有粒子の存在可能性があると考えられた。今後、これらの粒径範囲にCry j 1が存在することを注目することが必要になると考えられる。

Fig.4-5.は国道463と総合研究棟10F両地点において、2012年3月11日から3月17日に一週間捕集した花粉アレルゲンの粒径別のCry j 1濃度を示した。二箇所は3.5 μm以上の粒径範囲に高濃度のCry j 1が検出された。そして、道路端の方は0.06 μm~0.12 μm粒径範囲のアレルゲンも検出された。自動車走行の影響で花粉アレルゲン微小化の可能性を考えられた。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た。下気道へ侵入する花粉アレルゲン含有粒子の存在可能性があると考えられた。



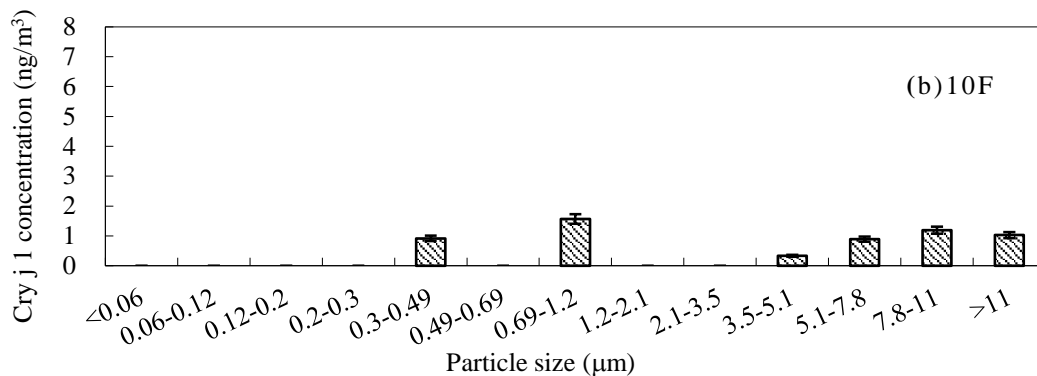


Fig.4-5. Size distribution of Cry j 1 in different airborne LPI samples (a) roadside, (b) 10F (2012/3/11~3/17).

アレルギー活性を保ったアレルゲン微小粒子が降水によりスギ花粉から放出し、その後の晴れ日に自動車走行等による巻き上げによってそのスギ花粉片が大気中浮遊微小粒子となることが考えられた。従って、下気道へ侵入する花粉アレルゲン微小粒子の存在可能性があると考えられた。特に、生成したアレルゲン粒子の中には数百 nm の粒子も存在するため、放出されたスギ花粉アレルゲン微小粒子が降水後の晴れ日に微小粒径範囲中の Cryj 1 濃度の増加ならびに花粉症由来喘息の発症に寄与するものと考えられた。

アレルゲン微小粒子の形成過程の調査が必要になると考える。P.E.Taylor らはカバノキ花粉アレルゲン粒子を含む吸引可能なエアロゾルの放出と関連しているかどうかを調査した。彼らは標準排出チャンバー内に静置したカバノキの、ほとんどの花粉は花に付いたままだった。カバノキ尾状花序は草本類の花粉に比べ、花粉が飛散されにくい構造になっている。これは、カバノキの花が尾状花序の花粉内部がくぼんだ状態であるが、草本類の花では花序が花から 1cm ほどはなれたところに突出した細いフィラメント上に存在していることが原因だろう。静かな環境下で開花すると、ほとんどの花粉はカバノキ尾状花序の中に残存していた。さらに、花序が花粉を保持できるのは数日間であるため、花粉は風により飛散しなければ樹木から花が落ちてしまう。細胞質の断片粒子が湿気および乾燥サイクル後に花粉から放出されていた。粒子はまた、湿気のある気候の後に採取した花からも放出された。さらにその粒径を走査型電子顕微鏡で観察したところ、 $0.4\sim 4\mu\text{m}$ の粒径範囲であった。花粉から放出された

断片を、DMA (TSI Inc.) を用いて測定したところ、粒径 30nm 程の大きさのものもあった。

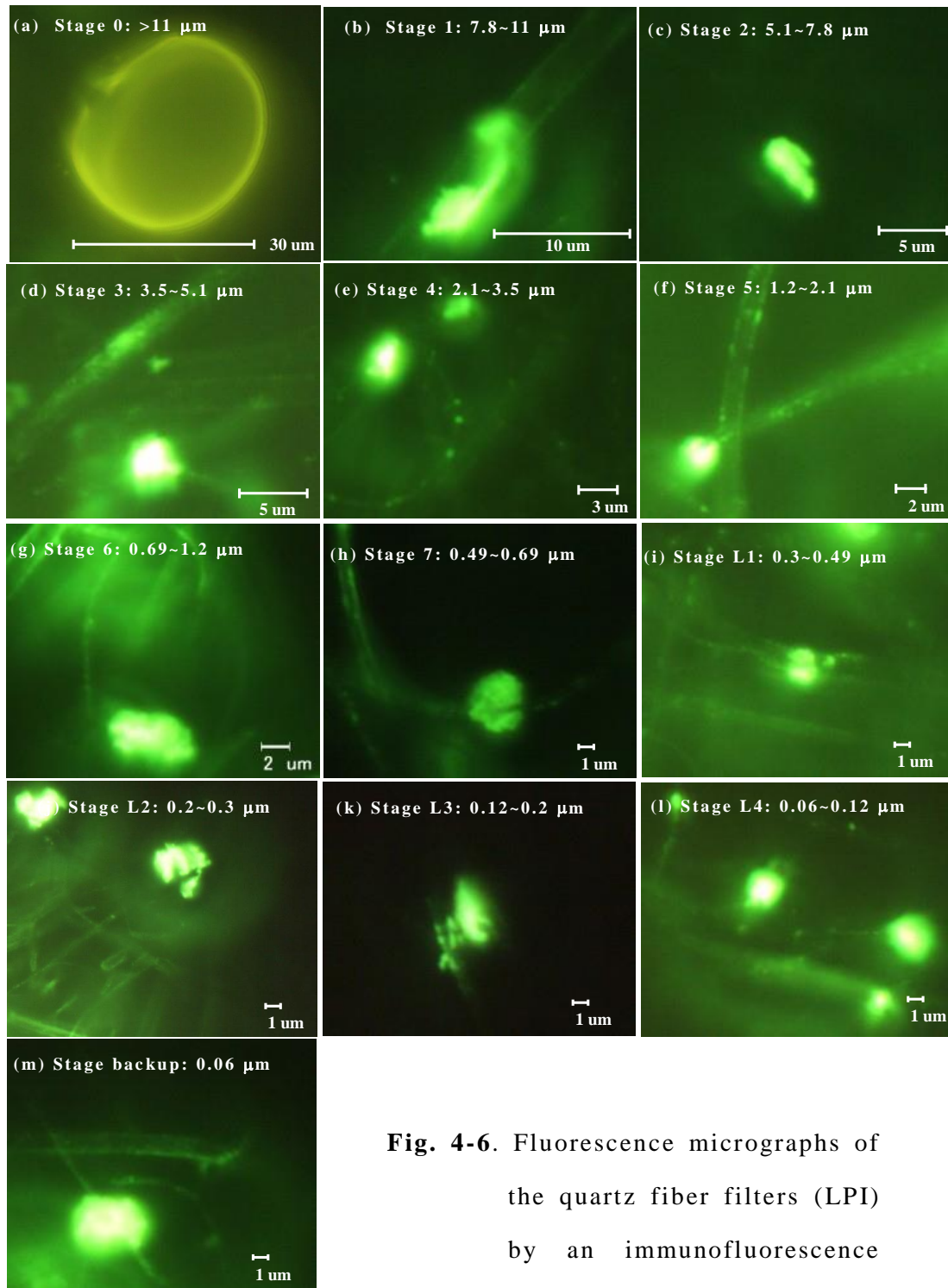


Fig. 4-6. Fluorescence micrographs of the quartz fiber filters (LPI) by an immunofluorescence

4.3.2. 微小粒径範囲の粒径別 Cry j 1 含有粒子の形態観察

LPI で捕集したフィルターからの Cry j 1 含有粒子の形態観察を試みる。石英繊維フィルター各粒径範囲の花粉アレルゲン Cry j 1 含有粒子を免疫蛍光抗体法により可視化する。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られるので、免疫抗体を用いたアレルゲンの可視化実験を行った。Fig. 4-6 に LPI 捕集したフィルター の Cry j 1 含有粒子を観察された画像を示した。Fig. 4-6 より、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、特に、 $0.06\mu\text{m}$ (60nm) 以下の粒径にもスギ花粉 Cry j 1 の微小なアレルゲン含有粒子の存在を確認することができた。

4.4. まとめ

本研究は、 $0.06\mu\text{m}$ ~ $1.2\mu\text{m}$ 粒径範囲のアレルゲンも検出された。大気中に浮遊している花粉アレルゲンの粒径分布を確認できた。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た。破裂したスギ花粉からは、アレルゲン粒子の放出や細胞壁に局在するアレルゲンの微小粒子化が引き起こされることが考えられた。また花粉粒への大気汚染物質暴露による、花粉粒の損傷、アレルゲン粒子が PM2.5 や PM1.0 のような微小粒径に移行することも考えられた。下気道へ侵入するスギ花粉アレルゲン含有粒子の存在可能性があると考えられた上で、今後、これらの微小粒径範囲に Cry j 1 が存在することを注目する必要があると考えられる。

第 4 章の参考文献

- Motta, A.C., Marliere, M., Peltre, G., Sterenberg, P.A. and Lacroix G., (2006), Traffic- Related Air Pollutants Induce the Release of Allergen- Containing Cytoplasmic Granules from Grass Pollen, *International Archives of Allergy and Immunology*, **139**(4), 294-298.
- P.E.Taylor, R.C. Flagan, A.G. Miguel, R. Valenta and M.M Glovsky, *Clin Exp Allergy*, 34, pp.1591-1596, 2004
- Wang Q., Nakamura S., **Gong S.**, Suzuki M., Nakajima D., Takai Y., S. Lu, Sekiguchi K. and M. Miwa, Release behaviour of *Cryptomeria japonica* pollen allergenic Cry j 1 and Cry j 2 in rainwater containing air pollutants, *International Journal of Sustainable Development and Planning*, Vol. 9-1, 42-53, 2014.
- Wang, Q., Morita, J., **Gong, X.**, Nakamura, S., Suzuki, M., Lu, S., Sekiguchi, K., Nakajima, T., Nakajima, D., Miwa, M., Characterization of the physical form of allergenic Cry j 1 in the urban atmosphere and determination of Cry j 1 denaturation by air pollutants, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **6**(1), 33-40, 2012.
- 筑波大学大学院 先端学際領域研究センター 深水研究室免疫蛍光抗体法実験
プロトコール (2009 年 2 月 23 日 閲 覧) ;
http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/protocols/mennsenn_matsuzaki.html
- 松崎利行, 高橋幸子, 多鹿友喜, 青木武生, 萩原治夫, 高田邦昭, 2004, 蛍光抗体法のコツとヒント, *組織細胞化学*, 243-253.
- 王青躍, 栗原幸大, 桐生浩希, 坂本和彦, 三輪誠, 内山巖雄, 2008, スギ花粉飛散期における飛散花粉数およびアレルギー含有微小粒子状物質の高濃度出現の時系列的挙動差異, *エアロゾル研究*, **23**(2),120-126.
- 仲村 慎一, 王 青躍, **龔 秀民**, 森田 淳, 鈴木 美穂, 中島 拓也, 中島 大介, 関口 和彦, 呂 森林, 三輪 誠, 黄砂飛来後の降水時におけるスギ花粉破裂現象とそれに伴うアレルギーの溶出機構, *エアロゾル研究*, **27**(2), 182-188, 2012.

第 5 章

大気中浮遊している花粉アレルギー Cry j 2

含有粒子の飛散挙動について

5.1. はじめに

スギ花粉症は、スギ花粉そのものによって引き起こされるのではなく、花粉中に含まれる主要な2種類のタンパク質 Cry j 1 と Cry j 2 によって引き起こされる典型的なアレルギー疾患である。Cry j 1 と Cry j 2 は、いずれも塩基性のタンパク質であり、分子量も共に 40 kDa 前後であるが、Cry j 1 は花粉表面のユービッシュ小体（粒径約 0.7 μm ）や花粉外膜に主に存在し（Miki-Hiroshige *et al.*, 1994）、Cry j 2 は花粉内部のデンプン粒を含む色素体内に局在している（中村ら, 2004）、その含有量は Cry j 1 の 1/2~1/10 程度である（斎藤真己ら, 2003）。

Cry j 2 はスギ花粉内部のデンプン粒に存在するので、Cry j 2 含有粒子は、花粉の破裂により内部デンプン粒が放出されることで生成する可能性がある。花粉の破裂が、高湿度条件（A.G.Miguel, 2006）に曝すことや、降雨中において生じるとする報告があることから（佐分利ら, 1992）、スギ花粉の破裂に与える湿度および降雨中成分の影響を調査した。

5.2. 実験方法

5.2.1. 観測条件

観測条件を以下に示す。

サンプリング期間：2012/3/10 ~2012/ 3/23

サンプリング時間：8:00 ~ 19:30 および 20:00 ~ 7:30

サンプリング地点：埼玉大学付近国道 463 号道路端

観測期間中の気象情報は、浦和市役所にて常時観測されているデータを気象庁のホームページからダウンロードして利用した（気象庁 HP）。

大気中の飛散スギ花粉およびスギ花粉アレルゲン Cry j 2 含有粒子を粒径別に捕集するため、アンダーセンハイボリウムサンプラー（柴田科学社製、AH-600、以下 AHV）とロープレッシャーインパクト（LPI）を用いた。

5.2.2. スギ花粉アレルゲン Cry j 2 の抽出

AHV 捕集した石英繊維フィルターの1段目（ $\geq 7.0 \mu\text{m}$ ）から5段目（ $\leq 1.1 \mu\text{m}$ ）まで、それぞれ直径 8 mm に 30 枚ずつ作り抜き、それぞれ遠沈管に入れ

た。遠沈管に Cry j 2 抽出液を 2 mL ずつ加え、4°C で 24 時間静置した。遠沈管を振盪し（192 rpm、1 時間）、6,000 rpm、10 min の遠心分離後、上清を分取し、遠心式フィルターユニット（アミコンウルトラ-4; Millipore Co., Ltd.）（分画 10,000 Da）のフィルター濾過ユニットに入れた。14,800 rpm、15 min で遠心分離後、溶媒を除去した上清をマイクロチューブに移し、スギ花粉から溶出したタンパク質を濃縮および回収した。すべての上清を回収し終えたら、再度新しいアミコンウルトラ-4 に上清を入れ、溶媒交換および濃縮操作を以下の方法で行った。上清の入ったアミコンウルトラ-4 を 14,800 rpm、15 min で遠心分離した後、緩衝液（HBS-EP; GE Healthcare Co., Ltd.）を 3 mL 加え、さらに同条件で遠心分離した。

この操作を 2 回繰り返したのち、溶媒交換した濃縮スギ花粉抽出タンパク質をフィルターユニットから吸い取り、マイクロチューブに入れ、全量が 2.0 mL になるように HBS-EP を加えた。この試料を、スギ花粉タンパク質抽出物とし、使用するまで -40 °C で保管した。

5.2.3. スギ花粉アレルゲン Cry j 2 の測定

本研究室で行っているスギ花粉アレルゲン濃度 Cry j 2 の測定には、従来 ELISA 法が用いられてきたが、この方法は長い分析時間が必要であり（約 8~9 h）、一方、ELISA 法で検出できなかったこともあったため、新たに表面プラズモン共鳴法（Surface Plasmon Resonance、以下 SPR 法）を用いたアレルゲン分析手法を利用した。抗 Cry j 2 モノクローナル抗体（Cry j 2 Mab）（生化学バイオビジネス社製）、分析する物質（アナライト）を各試料中のスギ花粉アレルゲンとし、アレルゲンの定量をする際に用いた。SPR 法は、装置内のセンサーチップを構成する金薄膜とガラスの界面でレーザーが全反射するように照射すると、反射光の一部に反射光強度が低下した部分が観察される。抗 Cry j 2 抗体をセンサーチップの金薄膜表面に固定化させておいて、サンプルをセンサーチップに流したときにサンプル中の Cry j 2 と結合反応すれば、チップ表面上の質量が増加し、Cry j 2 を定量した（手順を第三章に参考）。

5.3. 結果と考察

5.3.1. スギ花粉アレルゲン Cry j 2 の粒径分布と飛散挙動

気象データによる (Fig. 5-1) と、3月9日 (25.5 mm/day) と3月10日 (13 mm/day) は雨であり、飛散花粉数が少なかったが、3月12日～13日に大量飛散花粉が観測された。2012年、道路端 (国道463号) の飛散花粉数および粒径別 Cry j 2 濃度を Fig. 5-2 に示した。降雨後の晴れ日に多量の花粉が飛散することが確認された。そして、降雨後の晴れ日に Cry j 2 濃度も高かったことが示唆された。3月17日は雨 (3 mm/day) であり、3月18日～19日に大量飛散花粉も観測されたが、降雨後の晴れ日に Cry j 2 濃度が低かった。降雨量の影響があると考えられる。結果によって微量的な Cry j 2 を検出されたが、降雨後の晴天の後に Cry j 2 濃度は高かったことがわかった。花粉中の Cry j 2 量は Cry j 1 量の 1/2～1/10 である (斎藤真己ら, 2003)。Fig.5-3 は国道463と総合

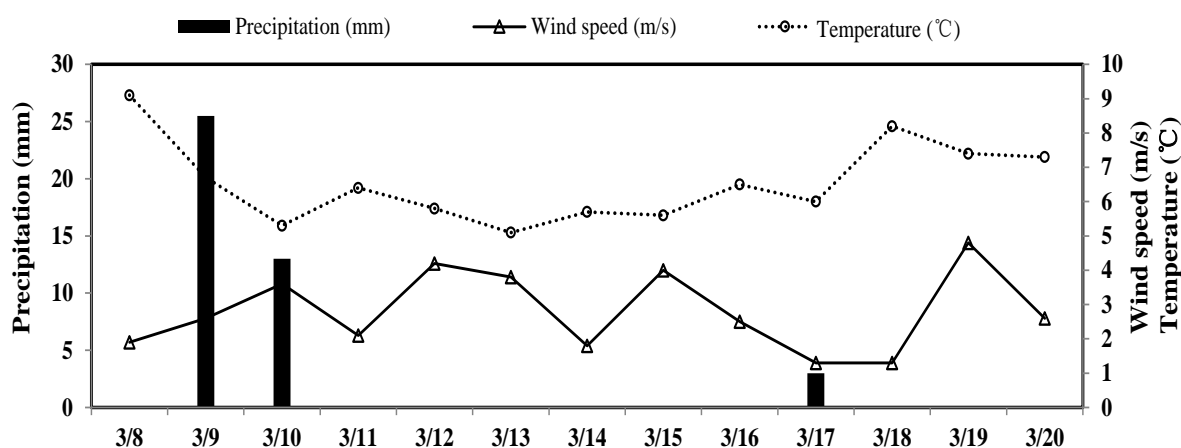


Fig. 5-1. Daily variation of wind speed, wind direction, temperature and precipitation during the pollen scattering spring seasons in 2012.

研究棟 10F 両地点において、一週間捕集した花粉アレルゲンの粒径別の Cry j 2 濃度を示した。道路端の方は $0.06 \mu\text{m} \sim 0.2 \mu\text{m}$ 粒径範囲のアレルゲンも検出された。自動車走行の影響で花粉アレルゲン微小化の可能性を考えられた。

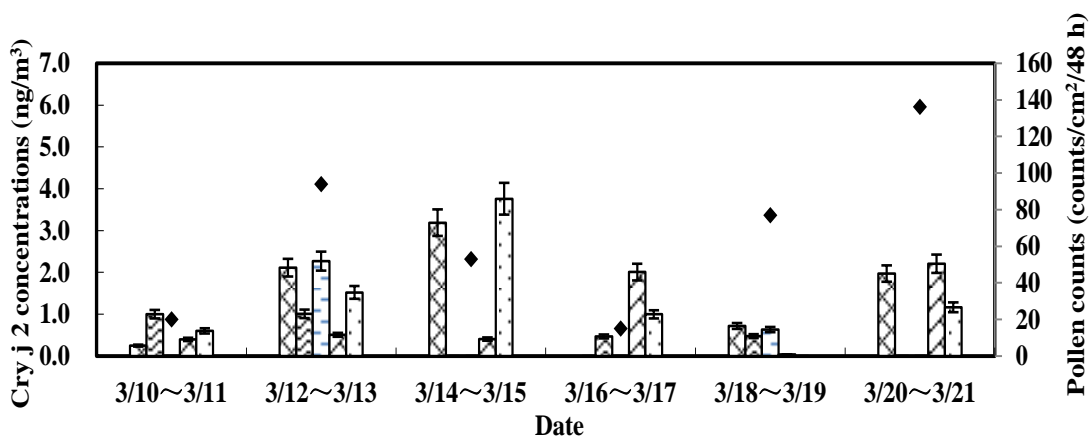


Fig. 5-2 Pollen counts and Cry j 2 concentration of Route 463 by AHV.

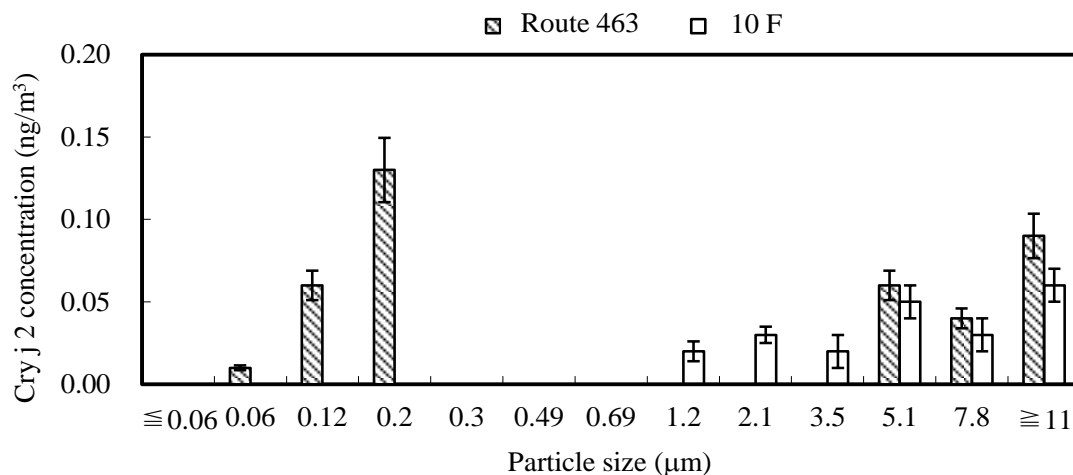


Fig. 5-3. Size distribution of allergen particles Cry j 2 at roadside of Route 463 and 10th floor of Research and Project Building by a LPI air sampler during Mar. 11th~17th, 2012.

Cry j 2 が花粉内部のデンプン粒に局在しており、Cry j 2 が抽出されにくい
 ためだが、降雨の影響で花粉内部のデンプン粒に局在している Cry j 2 含有粒
 子が放出する可能性があると考えられる。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
 (Nohara *et al.*, 1997)、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 (Nohara *et al.*, 1996)。降雨と接触した花粉は、破裂や花粉管の伸長
 によってアレルゲン粒子を放出する。George らは小雨が降った後のカバノキ

の葉上に落下したカバノキ花粉の内、最大 80%が花粉管を伸長させたと報告している。花粉管の長さは花粉粒のほぼ 10 倍の 300 μ m ほどにも成長し、やがて花粉管は破裂し内部のデンプン粒が放出した。花粉粒 1 個に対して、およそ 400 粒のデンプン粒が放出した。これらの放出したデンプン粒は、晴れの日により再び再飛散し、微小粒径に移行したアレルゲン粒子が大気中を浮遊することとなる。しかし大雨の場合、花粉は葉の表面から洗い流されてしまい、葉上の花粉存在量は減少した。

Cry j 2はCry j 1より抽出されにくく、各抽出液中のCry j 2含有量も大きく変動するという報告もある（安枝，2000；澤谷，1993）。また、50%グリセリン食塩水を用いた抽出法（セラミックボール存在下で4℃、24時間振盪抽出）により、Cry j 2抽出量が大幅に増加する報告もある（澤谷，1993）。以上より、Cry j 2の定量に関しては、抽出時間をCry j 1よりも長くするなど、Cry j 2の抽出法を含めて検討する必要があると考えられる。

5.4. まとめ

本章では、濃縮の抽出法でCry j 2を抽出して、表面プラズモン共鳴法を用いて、Cry j 2含有粒子を測定した。結果によって微量的なCry j 2を検出されたが、降雨後の晴天の後にCry j 2濃度は晴天より高かったことがわかった。さらに、降雨量の影響があると考えられる。

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。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た可能性がある。したがって、都市部において降水によってCry j 1含有粒子の微小粒子化およびCry j 1ならびにCry j 2の修飾アレルゲンが、降水後の晴れ日に再飛散し、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察された。

第 5 章の参考文献

- A.G.Miguel, P.E.Taylor, J.House, M.M.Glovsky and R.C.Flagan, 2006
Meteorological Influences on Respirable Fragment Release from Chinese Elm
Pollen, *Aerosol Science and Technology*, **40**, 690-696.
- George. F., Schäppi. PhilipE., Taylor. Ian. A., StaffCenk Suphioglu. R., Bruce Knox,
Source of Bet v 1 loaded inhalable particles from birch revealed, *Sex Plant
Reprod*, 10, pp.315-32, 1997.
- Miki-Hirosige. H, Nakamura, S., Yasueda, H., Shida, T. and Takahashi, Y., (1994),
Immunocytochemical Localization of the Allergenic Proteins in the Pollen of
Cryptomeria japonica, *Sex Plant Reprod*, **7**, 95-100.
- Nohara, O., Imai, T., Endo, T., Saneyoshi, K., Ohmori, T., Saito, S., Taniguchi, Y.,
Fujimaki, H. and Moriyama, H.: Relationship between the Morphological Change
of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollen Grains and the Release of Major
Allergens from the Pollen, *The Japanese Society of Allergology*, **46**(12), 1235-
1242 (1997) (in Japanese)
- Nohara, O.: The Effect of Nasal Fluid on the Release of Major Allergens from
Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollens, *Jibi Inkoka Tembo*, **39**(5), 483-
495 (1996) (in Japanese)
- 斎藤真己, 寺西秀豊, 平英彰, (2003), 全国 25 道県におけるスギ花粉アレルギー
ン—Cry j 1—量の変異と遺伝率の推定, *日林誌*, **85**, 312-317
- 中村澄夫, 佐藤文孝, 中村紀雄, 2004, スギ花粉アレルギー Cry j 1 と Cry j 2 の
発芽花粉における局在性, *日本花粉学会誌*, **50**, 15-22.
- 佐分利 保雄, 矢澤 篤子, 桜井 克巳, 林 正孝, 佐藤 洋子, 1992, 降雨による
空中スギ花粉の除去, *日本公衆衛生雑誌*, **39** (10), 809-815.
- 野原 修ら, 1997, スギ花粉粒子の形態的变化と主要抗原の溶出との関係, *アレ
ルギー*, **46** (12) , 1235-1242
- 安枝浩 (2000) アレルゲンの標準化と新しい標準化スギ花粉アレルギーエキス,
アレルギー科, **9** (2) , 124-130
- 澤谷真奈美 他 (1993) スギ花粉アレルギー Cry j 2 の免疫学的、物理化学的性
質, *アレルギー*, **42** (6) , 738-747

第 6 章

室内花粉および花粉アレルギーの飛散量調査

6.1. はじめに

スギ花粉は典型的な室外環境アレルゲンである。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。ヒトは一日の大半を室内で過ごす。室内環境は、我々の健康に直接重大な影響を及ぼす。花粉飛散期かつ越境汚染などの大気汚染の激しい時期において、並びに室外での飛散状況に加えて、室内に侵入した花粉の動態を把握した上で、アレルゲン粒子の対策を行使する必要がある。その対策の基本は室外で花粉を吸い込まないようにすることである。それに加えて、家の中での花粉曝露を防ぐために、室内に花粉を持ち込まない、侵入させないという対策も重要である。室内に存在する花粉・花粉アレルゲンの調査は必要だと考える。大気中に浮遊している花粉・花粉アレルゲンの飛散挙動と室外から持ち込まれる花粉・花粉アレルゲンが室内の分布や侵入率の測定が必要である。

現在、様々の研究は室内環境中のいろいろな状況によって、変わった。また、バイオエアロゾルとしての花粉は大気汚染の中での濃度を研究し、大気環境基準の中で測定された。最も室内の浮遊している花粉の研究は家にあったが、現在には調査された仕事場と学校であった。ほとんどの研究者は、いくつかの不一致があるか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。

研究者たちは、大気中および室内の飛散花粉アレルゲンをサンプリングする。正確な研究方法として継続するより技術がある。様々な研究方法は室内の飛散花粉および花粉アレルゲンを測定するために使用された。

ほこりは、室内花粉アレルゲンの存在場所だと言われる。ほこりをサンプリングするおよび分析することにより、ほこり中の花粉濃度を測定し、1グラムのほこり当たり花粉濃度がよく報告された。

本研究は、スギ花粉飛散期に埼玉大学総合研究棟 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た。

6.2. 実験方法

6.2.1. 観測条件

室内のサンプリングについては、総合研究棟 10 階循環研究室Ⅲにおけるサンプリングした。

捕集装置：スライドガラスおよび MINIPUMP サンプラー

① 室内にはスライドガラスを入口 (E)、床 (F)、机 (D)、棚 (S) および窓 (W)

5箇所（Fig. 6-1）で置いて花粉を捕集した（一週間）。

② MINIPUMP サンプラー

この装置は、積算流量測定機能を内蔵した小型軽量、携帯型のエアサンプリング用ポンプである。吸引流量 2.5 L/min で一週間（167.5 時間）室内にサンプリングを行った。

6.2.2. 室内花粉数の測定

捕集した花粉のスライドガラスに花粉染色液を滴下し、18 mm×18 mm の面積のカバーガラスを被せて静置させた後（20 min）、光学顕微鏡にて染色された花粉を計数し、飛散花粉数（個/cm²/24 h）を算出した。

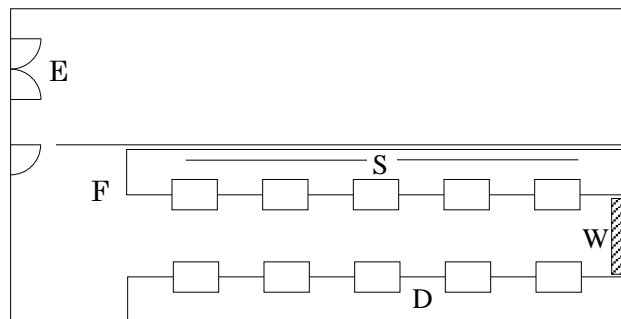


Fig. 6-1 Planform about sampling of indoor.

6.2.3. 免疫蛍光抗体法による室内 Cry j 1 含有粒子の可視化

室内 MINIPUMP サンプラーで捕集したフィルターからの Cry j 1 の形態観察を試みた。石英繊維フィルター上のスギ花粉アレルゲン Cry j 1 を免疫蛍光抗体法により可視化した。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られるので、抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 013 および FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いて、蛍光顕微鏡(B 励起)で試料を観察した（第 5.2.3 に参考）。

6.3. 実験結果

室内花粉数を測定した（Table 1）。窓は一日中ほとんど開いたから、窓の花粉が一番多かった。入口の花粉数も多いと考えたが、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。落下法によって花粉は床に落ちると考えられた。

Table 1. Pollen counts of indoor (count/cm²/1week) in 2012.

situation period	entrance above floor:105cm	floor 24cm	desk 60cm	shelf 135cm	window 85cm
3/16-3/23	0	8	7	1	219
3/24-3/30	8	26	18	0	380
3/31-4/06	3	24	15	3	196

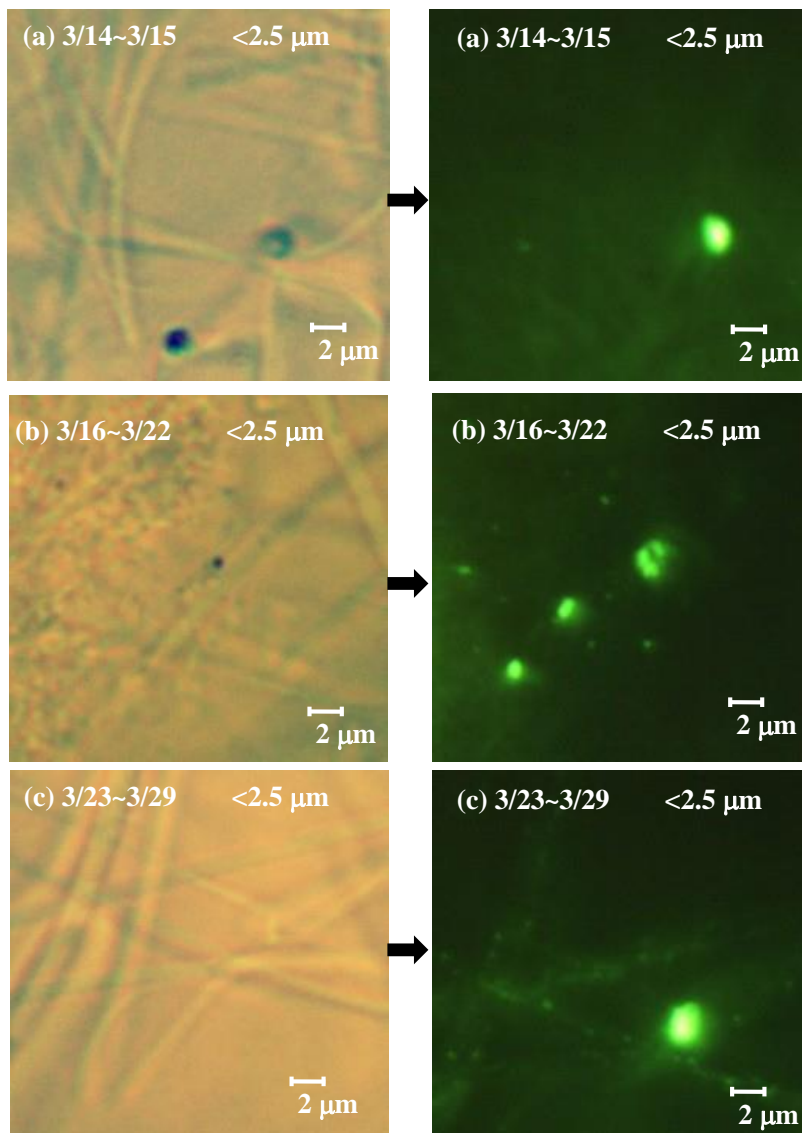


Fig. 6-2. Fluorescence micrographs of the quartz fiber filters by an immunofluorescence antibody method ((a) ~ (c): Fluorescence of Cry j 1 particles below 2.5 μm in the air samples that collected in indoor (left micrographs were taken before B excitation light was irradiated).

より、2.5 μm 以下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、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 を存在することを確認できた。特に、2 日間捕集したフィルターからも Cry j 1 を存在するこ

室内花粉アレルゲンについては、ELISA 法を用いて、測定したが、検出できなかった。これから、室内 MINIPUMP サンプラーで捕集したフィルターからの Cry j 1 の形態観察を試みる。花粉アレルゲン Cry j 1 を免疫蛍光抗体法により可視化する。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られるので、免疫抗体を用いたアレルゲンの可視化実験を行った。

Fig. 6-2 は室内で捕集したフィルターに対して B 励起線を照射した前後の観察結果を示した。Fig. 6-2 に

とを確認できた (Fig. 6-2 (a))。粒径 2.5 μm 以下の室内大気試料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が存在することがわかった。

6.4. まとめ

室内花粉アレルゲンについては、ELISA 法を用いて、検出できなかった。室内 MINIPUMP サンプラーで捕集したフィルターからの Cry j 1 の形態観察を試みた。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た。室内大気試料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が存在することがわかった。

室内花粉および花粉アレルゲンの研究については、非常に複雑な研究だと考えられた。室内花粉アレルゲンの飛散挙動を把握するために、時間・空間の変化、換気、室内のヒトの活動、気象原因などの影響を考えることが重要である。今後の室内外花粉サンプリング、実験方法について参考になると考えられた。

第 6 章の参考文献

- Terada T, et al, 2009, Allergic Potency of Japanese Cedar Pollen Cry j 1 is reduced by a Low Concentration of Hypochlorous Acid Generated by Electolysis, *Allergology International*, **58**, 255-260
- Timo Hugg et al, 2007, Indoor and outdoor pollen concentrations in private and public spaces during the Betula pollen season, *Aerobiologia* **23**, 119-129.
- Tormo-Molino R, 2009, Seasonal and spatial variations of indoor pollen in a hospital, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **6**, 3169-3178.
- Wang Q., Nakamura S., Gong S., Suzuki M., Nakajima D., Takai Y., S. Lu, Sekiguchi K. and M. Miwa, Release behaviour of *Cryptomeria japonica* pollen allergenic Cry j 1 and Cry j 2 in rainwater containing air pollutants, *International Journal of Sustainable Development and Planning*, Vol. 9-1, 42-53, 2014.
- Wang, Q., Morita, J., Gong, X., Nakamura, S., Suzuki, M., Lu, S., Sekiguchi, K., Nakajima, T., Nakajima, D., Miwa, M., Characterization of the physical form of allergenic Cry j 1 in the urban atmosphere and determination of Cry j 1 denaturation by air pollutants, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **6**(1), 33-40, 2012.

第 7 章

総括

7.1. 本研究のまとめ

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は、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。スギ花粉アレルゲンが微小粒子である粒径 $1.1\ \mu\text{m}$ 以下の微小粒子は、人間の呼吸器系の下気道まで侵入し、スギ花粉症由来の喘息を発症することが報告されている。そこで本研究では、都市部に浮遊するスギ花粉アレルゲン含有粒子の大気中における挙動を解明することを目的とした。

本研究には、室内外の花粉および花粉アレルゲンの飛散挙動を調査した。室外の方は、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、Durham 型花粉捕集器、LPI および AHV などのエアサンプラーを用いて、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、 $0.06\ \mu\text{m}\sim 11\ \mu\text{m}$ 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。この原因としては、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や降水が考えられた。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。

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。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。

7.2. 今後の展望

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。

今までは大気中に飛散している花粉の“数”を情報として提供してきた。飛散花粉数のピークと大気中の Cry j 1 濃度のピーク出現に時間的差異が観測されたため、飛散花粉数よりも Cry j 1 濃度を情報として利用することが正確であり、花粉予測などにもアレルゲン濃度を考慮して研究していく必要性が示唆された。本研究の結果から、花粉の“数”に基づく情報提供よりも、大気中アレルゲン濃度に基づく情報提供が正確であると指摘した。これと同様の考えに基づき、欧州では、各国が協力し花粉アレルゲン濃度の測定に着手している。これはフランス、イギリス、ポルトガル、ポーランド、フィンランド、スペイン、スイスの機関が共同参加した免疫法によるアレルゲン観測ネットワークであり、英語表記 **Monitoring Network of Allergens by Immuno-Sampling** の頭文字などから MONALISA 計画と呼ばれている。欧州では花粉の飛散量の増加などに伴い、気象には国境が無いように、花粉や孢子の空中飛散についても国境を越えて注目して行こうという気運が高まっているようである。

また日本では、スギ花粉症有病率をもっとも高いが、ヒノキや秋のブタクサ花粉症などの有病率も高く、スギ花粉以外の調査も重要である。人体に吸入可能なサイズの花粉アレルゲン粒子の大気中への放出源は、スギ花粉やカバノキだと言えるが、それは草本類と同様のメカニズムで放出されている。ほとんどのアレルギー性の高い風媒の植物は、乾燥した風に次いで降雨や霧、露に曝された際に、花粉からアレルゲン粒子を放出する可能性が示唆されている。スギ花粉の場合は、初期降水中に多くが捕捉され、破裂しているものも多く観測された。破裂したスギ花粉からは、アレルゲン粒子の放出や細胞壁に局在するアレルゲンの微小粒子化が引き起こされることが考えられる。また今後、花粉粒

への大気汚染物質暴露による、花粉粒の損傷、アレルギー粒子が PM2.5 や PM1.0 のような微小粒径に移行することを明らかにされる。また大気汚染物質が花粉成長過程におけるアレルギー性の増加に影響する可能性が考えられ、アレルギー粒子への大気汚染物質への吸着や大気汚染物質暴露に伴う修飾によって、アレルギー粒子が修飾されて、そのアレルギー性増悪の可能性が示唆される。

本研究で得られた研究成果が少しでも、今後の花粉学や将来予測などの研究に貢献できれば幸いである。

活動実績

(1) 学術雑誌等（紀要・論文集等も含む）に発表した論文、著書

（査読有り）

1. Wang Q, **Gong X.**, Suzuki M, Lu S, Sekiguchi K, Nakajima D and Miwa M. Size-segregated allergenic particles released from airborne *Cryptomeria japonica* pollen grains during the Yellow Sand events within the pollen scattering seasons, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, Vol.7-4, pp.191-198, 2013.
2. 王青躍、**龚秀民**、董詩洋、関口和彦、鈴木美穂、中島大介、三輪 誠、花粉飛散時における環境汚染物質の影響とアレルギー物質の放出挙動、エアロゾル研究、Vol. 29 (S1), 197-206 (2014).
3. **Xiumin Gong.**, Qingyue Wang., Miho Suzuki., Senlin Lu., Kazuhiko Sekiguchi., Daisuke Nakajima and Makoto Miwa, Size distribution of allergenic Cry j 2 released from airborne *Cryptomeria japonica* pollen grains during the pollen scattering seasons, *Aerobiologia*, July 2016, DOI 10.1007/s10453-016-9450-6.
4. **Xiumin Gong.**, Qingyue Wang., Miho Suzuki., Daisuke Nakajima., Senlin Lu., Weiqian Wang., Zhou Shumin and Makoto Miwa, Airborne behavior of *Cryptomeria japonica* pollen allergenic fine particles in the northern urban of metropolitan Tokyo during four severe seasons, *Aerobiologia*, 2016, under review.
5. **Xiumin Gong.**, Qingyue Wang., Miho Suzuki., Senlin Lu., Daisuke Nakajima and Makoto Miwa, Outdoor and indoor behavior of airborne *Cryptomeria japonica* pollen and allergenic Cry j 1 during the pollination season, *Allergology International*, in preparation.
6. Wang, Q., **Gong X.**, Nakamura, S., Kurihara, K., Suzuki, M., Sakamoto, K., Miwa, M., Lu, S., Air pollutant deposition effect and morphological change of *Cryptomeria japonica* pollen during its transport in urban and mountainous areas of Japan, *Environmental Health Risk V, Biomedicine and Health*, **14**, 77-89, 2009.
7. Nakamura S., Wang Q., **Gong S.**, Takai Y., Lu S., Nakajima D., Suzuki M., Sekiguchi K. and Miwa M., Release rate of daughter allergenic species from *Cryptomeria japonica* pollen grains trapped in air polluted wet deposition, *Air Pollution XX Ecology and The Environment*, **157**, 387-398, 2012.
8. Wang Q., Nakamura S., **Gong S.**, Suzuki M., Nakajima D., Takai Y., S. Lu, Sekiguchi K. and M. Miwa, Release behaviour of *Cryptomeria japonica* pollen allergenic Cry j 1 and Cry j 2 in rainwater containing air pollutants, *International Journal of Sustainable Development and Planning*, Vol. 9-1, 42-53, 2014.
9. 仲村 慎一、王 青躍、**龚秀民**、森田 淳、鈴木 美穂、中島 拓也、中島 大介、関口 和彦、呂 森林、三輪 誠、黄砂飛来後の降水時におけるスギ花粉破裂現象とそれに伴うアレルギーの溶出機構、エアロゾル研究、**27**(2), 182-188, 2012.

10. 森田淳, 王青躍, ゴン秀民, 仲村慎一, 鈴木美穂, 中島拓也, 関口和彦, 中島大介, 三輪誠.: 大気汚染物質によるスギ花粉アレルゲン Cry j 1 の化学的修飾と 3-ニトロチロシンの HeLa 細胞に対するアポトーシス誘導能に関する基礎研究, エアロゾル研究, **27**(1), 71-77 (2012).
11. Wang, Q., Morita, J., Gong, X., Nakamura, S., Suzuki, M., Lu, S., Sekiguchi, K., Nakajima, T., Nakajima, D., Miwa, M., Characterization of the physical form of allergenic Cry j 1 in the urban atmosphere and determination of Cry j 1 denaturation by air pollutants, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **6**(1), 33-40, 2012.
12. Wang, Q., Nakamura, S., Gong, X., Lu, S., Nakajima, D., Wu, D., Suzuki, M., Sakamoto, K., Miwa, M., Evaluation of elution behavior and morphological change of *Cryptomeria japonica* pollen grain and release of its daughter allergenic particles by air polluted rainfall, *Air pollution XVIII, Ecology and the Environment*, 136, 185-197, 2010.
13. Wang, Q., Nakamura, S., Gong, X., Kurihara, K., Suzuki, M., Sakamoto, K., Nakajima, D., Contribution estimation of airborne fine particles containing Japanese cedar pollen allergens to ambient organic carbonaceous aerosols during a severe pollination episode. *Environmental Health Risk V, Biomedicine and Health*, 14, 65-76, 2009.
14. Wang, Q., Wu, D., Nakamura, S., Gong, X., Morita, J., Suzuki, M., Sakamoto, K., Miwa, M., Nakajima, D., Morphological observation and allergenic measurement of airborne pollens in Japanese urban areas and evaluation on their cross-antigenicity, *World academy of science, engineering and technology*, 70, 723-728, 2010.
15. Wang, Q., Morita, J., Nakamura, S., Wu, D., Gong, X., Suzuki, M., Miwa, M., Nakajima, D., Field investigation on modification of Japanese cedar pollen allergen in urban air-polluted area, *World academy of science, engineering and technology*, 70, 717-722, 2010.

(2) 国際会議における発表

(口頭発表 査読有り)

1. Wang, Q., Gong, X., Nakamura, S., Takai, Y., Suzuki, M., Sekiguchi, K., Lu, S., Nakajima, D. and Miwa, M., Atmospheric behaviour of *Cryptomeria japonica* pollen and its respirable allergenic particles in the urban area of Japan, *International symposium on aerosols in East Asia and their impacts on plants and human health*, 2012, 142-143, Tokyo, Japan, Nov 2012.
2. Wang, Q., Gong, X., Kurihara, K., Nakamura, S., Suzuki, M., Sakamoto, K., Nakajima, D., 2009, Airborne behavior and source apportionment of Japanese cedar pollen and its respirable allergen particles in urban residential atmosphere

of Japan, *9th International Conference & Exhibition Healthy Buildings 2009 (CD-ROM; CD-ROM; Paper 661)*, Syracuse, NY USA.

3. Wang, Q., Nakamura, S., **Gong, X.**, Takai, Y., Suzuki, M., Sekiguchi, K., Lu, S., Nakajima, D. and Miwa, M., Allergenic species release behaviour of *Cryptomeria japonica* pollen in rainwater samples simulated for urban polluted atmosphere, *International symposium on aerosols in East Asia and their impacts on plants and human health*, 2012, 70-71, Tokyo, Japan, Dec 2012.
4. Nakamura S., Wang Q., **Gong S.**, Takai Y., Lu S., Nakajima D., Suzuki M., Sekiguchi K. and Miwa M., Release rate of daughter allergenic species from *Cryptomeria japonica* pollen grains trapped in air polluted wet deposition, *Air Pollution 2012*, **157**, 387-398, A Coruña, Spain, May 2012.
5. Wang, Q., Nakamura, S., **Gong, X.**, Lu, S., Nakajima, D., Wu, D., Suzuki, M., Sakamoto, K., Miwa, M., Evaluation of elution behavior and morphological change of *Cryptomeria japonica* pollen grain and release of its daughter allergenic particles by air polluted rainfall, *Air pollution 2010*, **136**, 185-197, Kos, Greece, June 2010.
6. Wang, Q., Wu, D., Nakamura, S., **Gong, X.**, Morita, J., Suzuki, M., Sakamoto, K., Miwa, M., Nakajima, D., Morphological observation and allergenic measurement of airborne pollens in Japanese urban areas and evaluation on their cross-antigenicity, *International conference on applied chemistry (ICAC)*, **70**, 723-728, Amsterdam, The Netherlands September 28-30, 2010.
7. Wang, Q., Nakamura, S., **Gong, X.**, Kurihara, K., Suzuki, M., Sakamoto, K., Nakajima, D., Contribution of airborne fine particles containing *Cryptomeria japonica* pollen allergens to airborne organic carbonaceous aerosols during a severe pollination episode, *Environmental Health Risk 2009*, **14**, pp.65-76, New Forest, UK, September 2009.
8. Wang, Q., Nakamura, S., **Gong, X.**, Kurihara, K., Wu, D., Sakamoto, K., Miwa, M., Influence factors on release and transition of Japanese cedar pollen allergen to fine particle sizes in urban residential atmosphere of Japan, *9th International Conference & Exhibition Healthy Buildings 2009 (CD-ROM; Paper 704)*, Syracuse, NY USA, September 2009.

(3) 国内学会講演

1. 王青躍, キョウ秀民, 仲村慎一, 呉迪, 森田淳, 坂本和彦, 鈴木美穂, 中島大介, 2010, 表面プラズモン法による都市部大気中のスギ花粉アレルゲン成分の粒径分布測定, 第27回エアロゾル科学・技術研究討論会(8月3~5日), 名古屋, 55-56.
2. 王青躍, キョウ秀民, 仲村慎一, 呉迪, 坂本和彦, 鈴木美穂, 三輪誠 2009, 表面プラズモン共鳴法による都市大気中に浮遊するスギ花粉アレルゲン成分の測定, 第50回日本花粉学会年会(10月16~18日), 京都, 57.
3. 王青躍, 龔秀民, 仲村慎一, 呉迪, 胡舜堯, 坂本和彦, 三輪誠, 中島大介, 2009, 黄砂飛来時のスギ花粉アレルゲンの挙動, 第26回エアロゾル科学・技術研究討論会(8月19~21), 岡山, 87-88.
4. 王青躍, 龔秀民, 栗原幸大, 胡舜堯, 仲村慎一, 三輪誠, 2008, 2007年と2008年のスギ花粉観測からのさいたま市都市部花粉飛散源の推定, 第49回日本花粉学会年会(9月12~14日), 東京, 72.
5. 王青躍, 龔秀民, 栗原幸大, 胡舜堯, 仲村慎一, 坂本和彦, 三輪誠, 2008, 2008年のスギ花粉飛散期におけるスギ花粉アレルゲン Cry j 1 含有粒子の飛散挙動, 第49回大気環境学会年会(9月17~19日), 金沢, 458.
6. 王青躍, 董詩洋, 森田淳, 鈴木美穂, 仲村慎一, ゴン秀民, 関口和彦, 中島大介, 2012, ニトロ化スギ花粉アレルゲンにおけるアポトーシス誘導能の検討, 第29回エアロゾル科学・技術研究討論会(8月28~30日), 福岡, 71-72.
7. 王青躍, 高井優子, 中島拓也, 仲村慎一, ゴン秀民, 鈴木美穂, 関口和彦, 中島大介, 2012, スギ花粉主要アレルゲンと共通抗原性をもつ花粉アレルゲンの飛散量調査, 第29回エアロゾル科学・技術研究討論会(8月28~30日), 福岡, 67-68.
8. 仲村慎一, 王青躍, ゴン秀民, 森田淳, 中島拓也, 関口和彦, 鈴木美穂, 中島大介, 2011, 2011年度のさいたま市に飛来したスギ花粉の飛散挙動, 第28回エアロゾル科学・技術研究討論会(8月27~29日), 大阪, 57-58.

9. 森田淳, 王青躍, 龔秀民, 仲村慎一, 鈴木美穂, 中島拓也, 関口和彦, 中島大介, 三輪誠, 2011, 都市部汚染大気によるスギ花粉アレルゲンタンパク質のニトロ化と 3-ニトロクロシンのアポトーシス誘導能の評価, 第 52 回大気環境学会年会 (9 月 14~16 日), 337.
10. 仲村慎一, 王青躍, ゴン秀民, 呉迪, 森田淳, 坂本和彦, 鈴木美穂, 中島大介, 2010, スギ花粉及びそのアレルゲンの降雨中における挙動, 第 27 回エアロゾル科学・技術研究討論会 (8 月 3~5 日), 名古屋, 53-54.
11. 王青躍, 森田淳, 龔秀民, 仲村慎一, 呉迪, 孫楊, 三輪誠, 中島大介, 鈴木美穂, 2010, 分子間相互作用からみたスギ花粉アレルゲン物質の変性可能性, 第 51 回大気環境学会年会 (9 月 8~10 日), 大阪, 346.
12. 王青躍, 森田淳, 仲村慎一, 龔秀民, 呉迪, 孫楊, 三輪誠, 鈴木美穂, 中島大介, 分子間相互作用から見たスギ花粉アレルゲン物質の変性可能性, BIA Symposium 2010 アフィニティーのその先へ~ Biophysical Interaction Analysis~, (7 月 16 日), 東京, 国内学会(ポスター発表) p.1 (2010).
13. 王青躍, 仲村慎一, キョウ秀民, 呉迪, 坂本和彦, 鈴木美穂, 中島大介, 2009, 降水中塩成分変化によるスギ花粉アレルゲンの溶出と放出, 第 26 回エアロゾル科学・技術研究討論会(8 月 19~21), 岡山, 85-86.
14. 王青躍, 仲村慎一, キョウ秀民, 坂本和彦, 鈴木美穂, 中島大介, 三輪誠, 2009, 降水による花粉の破裂現象とアレルゲンの溶出挙動, 第 50 回日本花粉学会年会(10 月 16~18 日), 京都, 56.
15. Wang Q., Wu D., Nakamura S., Gong X., Sakamoto K., Suzuki M., 2009, Observation and measurement of airborne Japanese cedar and cypress pollen in urban area of Saitama during 2009 pollination season, 第 50 回日本花粉学会年会(10 月 16~18 日), 京都, 51.
16. 王青躍, 胡舜堯, 栗原幸大, 龔秀民, 仲村慎一, 関口和彦, 中島大介, 2008, 2008 年のスギ花粉飛散期における都市部道路端での SPM 中のイオン及び炭素成分の特性, 第 49 回大気環境学会年会(9 月 17~19 日), 金沢, 459.
17. 王青躍, 仲村慎一, 栗原幸大, 龔秀民, 胡舜堯, 2008, スギ花粉アレルゲン含有粒子の微小粒径移行への降雨による影響, 第 49 回日本花粉学会年会,

東京, 73.

18. 王青躍, 栗原幸大, 龔秀民, 仲村慎一, 胡舜堯, 鈴木美穂, 中島大介, 2008, 大気汚染物質によるスギ花粉アレルゲン変性の検討, 第 49 回日本花粉学会年会(9 月 12~14 日), 東京, 75.
19. 王青躍, 胡舜堯, 栗原幸大, 仲村慎一, 龔秀民, 坂本和彦, 2008, 2008 年スギ花粉飛散期における都市部道路端での SPM 成分とアレルゲン含有粒子の関連性, 第 49 回日本花粉学会年会(9 月 12~14 日), 東京, 74.

(4) その他・報告書等

1. 王青躍, 鈴木美穂, 中島大介, 三輪誠, 仲村慎一, キョウ秀民, 2010, 都市部での飛散スギ花粉と黄砂の修飾影響の評価(新学術領域研究:4003, 議題番号:A04-P14), 東アジアにおけるエアロゾルの植物・人間系へのインパクト 平成 22 年度第 1 回全体会議講演要旨集.
2. 王青躍, 仲村慎一, キョウ秀民, 篠田壽和, 2008, 都市部の高所花粉計測法の開発及び降水によるアレルゲンの溶出挙動, 埼玉大学地域オープンイノベーションセンター紀要, 1, p. 120-123.
3. 栗原幸大, アパルタパル, 仲村慎一, キョウ秀民, 環境負荷低減・資源高効率利用技術の開発プロジェクト報告, 文部科学省平成 20 年度研究拠点形成費用等補助金(若手研究者養成費)大学院教育改革プログラム(大学院 GP)平成 20 年度採択 地域環境保全エキスパート養成プログラム-現場支援型プロジェクトによる高度な環境技術者教育-平成 20 年度活動成果報告書, 埼玉大学大学院理工学研究科 博士前期課程 環境システム工学系専攻 循環制御システムコース, 65-74.
4. 栗原幸大, アパルタパル, 仲村慎一, キョウ秀民, タリプトオフティ, 国際環境協力への実践プロジェクト報告, 文部科学省平成 20 年度研究拠点形成費用等補助金(若手研究者養成費)大学院教育改革プログラム(大学院 GP)平成 20 年度採択 地域環境保全エキスパート養成プログラム-現場支援型プロジェクトによる高度な環境技術者教育-平成 20 年度活動成果報告書, 埼玉大学大学院理工学研究科 博士前期課程 環境システム工学系専攻 循環制御システムコース, 75-83.

謝辞

本研究の一部は、文部科学省科研費・新学術領域研究(研究領域提案型)(研究課題番号:20120015 FY 2008-FY2013、研究代表者:王青躍)および科研費・挑戦的萌芽研究(研究課題番号:21651002 と 23651005、研究代表者:王青躍)により実施されたものであり、ここに謝意を表します。

本論文をまとめるにあたり、指導教員の王青躍 准教授をはじめ、同研究室の関口 和彦 准教授、同コースの川合 真紀 教授、環境科学国際センター 三輪 誠客員准教授のご指導並びにご校閲いただきました。元同研究室(現コース事務員)の高倉 洋子 様には研究活動を円滑に進めるため、数多くの手助けをして頂きました。

また、私の研究について多くの意見を述べてくださった、研究室の後輩には大変お世話になりました。さらに、学生生活を共に過ごし常に明るい環境で支えてくださった同研究室のみなさん、お世話になった研究室修了生のみなさん、様々なご助言をいただきましてありがとうございました。

そして特に、大学院博士後期課程までの長い学生生活を支えてくれた両親、義理両親、主人、息子に心から感謝いたします。

これまで多くの方々よりご支援、ご協力いただいたことを忘れず、さらに精進して参りたいと思います。何より、博士課程での6年間半は、皆様のおかげで大変濃厚な6年間半を過ごすことができ、生涯忘れられない思い出となるでしょう。

最後になりましたが、循環制御研究室のさらなる発展及び社会への貢献を心よりお祈りしております。

龔秀民(2016年6月吉日)