

スギ花粉アレルゲン含有粒子の放出機構と その計測手法に関する研究

Release mechanisms of airborne particles containing Japanese cedar pollen allergens and the measuring methods

循環制御研究室 06ME210 桐生 浩希(Hiroki KIRYU)
指導教員 王 青躍 准教授

Abstract

The prevalence of Japanese cedar pollinosis has been increased. Japanese cedar pollen (JCP), which contains two allergens Cry j 1 and Cry j 2, belongs to coarse particles (particle diameter $>2 \mu\text{m}$). Some researchers showed that respirable-sized particles containing pollen allergen (particle diameter $<2 \mu\text{m}$) may be resuspended after light rainfall in the atmosphere. These particles may cause pollen asthma, however, release mechanisms of them are still uncertain. Therefore, it is important to examine release behaviour of Cry j 1 and Cry j 2 from JCP. The aim of this study is to found respirable-sized particles containing Cry j 1 and Cry j 2 (Cry j 1, Cry j 2 particles) in the atmosphere, to examine elution phenomenon of Cry j 1 from JCP and JCP burst followed by Cry j 2 release. Cry j 1 and Cry j 2 particles were collected size-selectively and were visualized by immunofluorescence technique. Consequently, Cry j 1 and Cry j 2 particles can be confirmed to resuspend in the atmosphere. The original solutions (OS) and the eluted solutions (ES) were prepared from mixture of JCP and artificial rain solution (ARS). The percentage of Cry j 1 concentration of ES to that of OS has already been exceeded 50 % within 1 hour after mixing. In contrast, pollen exposed to humidified air wasn't burst. However, it is suggested that pollen burst with rainfall is due to osmotic pressure by rainfall. As a result, it was supposed that Cry j 1 and Cry j 2 particles might be generated from JCP which contacts rainfall. We propose to convert from pollen information to allergen information and to recommend avoidance of pollen asthma.

Keywords: Japanese cedar pollen, allergen, pollen asthma, rainfall, release mechanism, allergen information

1. はじめに

国民病といわれるスギ花粉症の有病率は全国平均で 16 % (都市部では 20 %) に達している¹⁾。今後も飛散花粉数の増加や大気汚染物質の複合曝露により、患者数の増加が懸念されることから、花粉症克服のための研究が、免疫学や林学等多方面で行われている。

粒径 $30 \mu\text{m}$ のスギ花粉には、花粉表面のユービッシュ小体や花粉外膜に主に存在する Cry j 1 と内部のデンプン粒に局在する Cry j 2 がある。そして、花粉は粗大粒子 (粒径 $> 2.0 \mu\text{m}$) であるので、気道上部に沈着し、アレルゲンが吸入されることで花粉症が発症する。

しかし、近年、微小粒径範囲のスギ花粉アレルゲンを含有する粒子 (以下、アレルゲン含有粒子) の存在が指摘され、これらの粒子が、花粉喘息の発症に寄与することが懸念されている²⁾。実際に、飛散スギ花粉数とアレルゲン含有粒子濃度との相関が低いことが指

摘されており³⁾、諸外国では、大気中のカバノキ科花粉の粒径別捕集およびアレルゲンの分析により、降雨発生後に花粉本来の粗大粒子から微小粒子 (粒径 $< 2.0 \mu\text{m}$) へのアレルゲンの存在粒径範囲の移行が確認されている⁴⁾。

しかしながら、現時点でアレルゲン移行現象は報告されているものの、花粉アレルゲン含有粒子の放出機構は全く解明されていない。

そのため、まず本研究では、微小粒径範囲の Cry j 1、Cry j 2 を含有する粒子 (以下、Cry j 1、Cry j 2 含有粒子) の存在を検証するための可視化技術を新たに開発した。この技術を用いて、Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の大気中での存在形態を把握し、また、その放出機構を解明することで、花粉喘息症状の実態解明や花粉情報の精度向上、花粉症回避のために有益な情報を得ることができると考えられる。

Fig. 1 は、Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の放出過程のイメージ図である。ユービッシュ小体

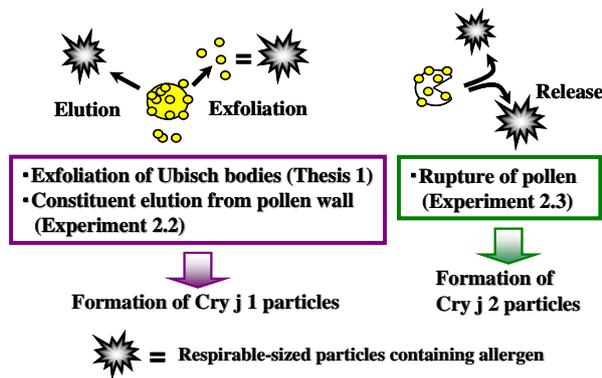


Fig. 1. Concept of release mechanisms of respirable-sized particles containing allergen.

の剥離は既報^{論文 1)}に記述されており、アレルゲン含有粒子は、高湿度下にて放出される可能性があることから⁵⁾、さらに本研究では、大気中での Cry j 1 および Cry j 2 含有粒子の存在可能性を検討することと、花粉からの Cry j 1 の溶出に与える降雨の影響および Cry j 2 含有粒子の放出に寄与する花粉破裂に対する湿度の影響を調査することを目的とした。

2. 実験方法

2.1. 大気中 Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の観察

2005 年 3 月に埼玉大学地域共同研究センター屋上に、石英繊維フィルターを装着したアンダーセンハイボリウムエアサンプラー(以下、AHV)を設置し、566 L/min の吸引流量で大気中のアレルゲン含有粒子を粒径別に(1 段 : > 7.0、2 段 : 3.3~7.0、3 段 : 2.0~3.3、4 段 : 1.1~2.0、5 段 : < 1.1 μm)捕集し、Cry j 1 濃度を測定した。その結果、捕集した Cry j 1 量の 80% 以上が < 1.1 μm のフィルター中に分布することが明らかとなった(Fig. 2)⁶⁾。しかし、AHV は高吸引流量の捕集器であるため、> 7.0 μm のフィルターに捕集された花粉が壊れ、2 段目以降へ移行し、Cry j 1、Cry j 2 含有粒子が観測されたことが懸念される。その

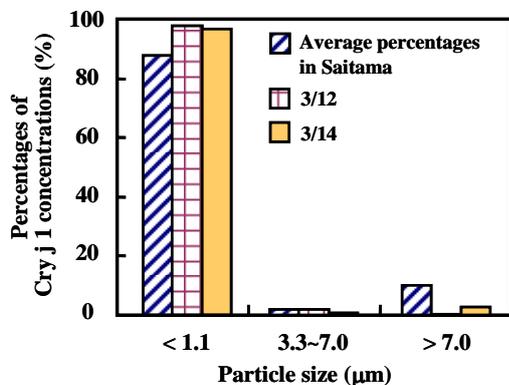


Fig. 2. Percentages of Cry j 1 concentrations at Saitama. Data shows average percentages, March 12th and 14th.

ため、大気中における Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の存在を確認するために、抗 Cry j 1 または抗 Cry j 2 モノクローナル抗体および FITC 抗マウスモノクローナル抗体を用いた生体試料可視化法の一つである免疫蛍光抗体法⁷⁾を応用し、新たに開発した Cry j 1、Cry j 2 存在部位の発光、可視化法により、< 1.1 μm のフィルター中で、かつ花粉の存在しない場所での Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の可視化を試みた。なお免疫蛍光抗体法とは、抗原(=アレルゲン)と抗体との特異的な結合を利用し、抗原と蛍光色素との複合体を生成させ、励起光照射と蛍光検出を行う蛍光顕微鏡により、抗原存在部位を可視化させて観察する手法である。

2.2. 花粉からの Cry j 1 溶出試験

Cry j 1 は、スギ花粉粒子の周縁部に多く存在することが確認されている⁸⁾。したがって、Cry j 1 含有粒子は、降雨と接触した花粉壁面から溶出した Cry j 1 が、乾燥、再飛散するなどして発生すると推測される。そこで、花粉からの Cry j 1 の溶出現象について調査した。

スギ花粉約 20 mg(山梨県森林総合研究所にて採取、日本自動車研究所より提供)と、埼玉県騎西町の降水データ⁹⁾を元に調製した模擬降雨([Na⁺]=10、[NH₄⁺]=20、[H⁺]=20、[Cl⁻]=10、[NO₃]=20、[SO₄²⁻]=10 μM)100 mL とを混合して、花粉原液を調製した。花粉原液の調製直後から 1 時間おきに 6 時間後まで同溶液を採取し、その一部を 0.20 μm 孔径の PTFE フィルターによりろ過(花粉を除去)した溶出液サンプル、残りを原液サンプルとし、両溶液を分析まで -40 °C で保存した。溶液中の Cry j 1 濃度は、抗 Cry j 1 モノクローナル抗体および HRP 標識抗 Cry j 1 モノクローナル抗体を用いて抗原と抗体との特異的結合を利用した sandwich ELISA 法にて定量した。

2.3. 花粉破裂に伴う Cry j 2 含有粒子の放出可能性の調査

Cry j 2 は花粉内部に存在するため、花粉の破裂により Cry j 2 が放出され、Cry j 2 含有粒子が生成する可能性がある。そこで、花粉破裂に与える湿度影響を調査するため、相対湿度 80±4.0%、流速 1.0 L/min に調整したゼロガスをスギ花粉に曝露し、花粉の形態観察を試みた。Fig. 3 に、スギ花粉にゼロガスを曝露するための実験装置図を示した。走査型電子顕微鏡(SEM)観察用カーボンテープに花粉を担持した試料を曝露室内に設置し、ゼロガスを 8 時間曝露した。曝露後の花粉を SEM にて観察し、花粉の破裂の有無を確認した。

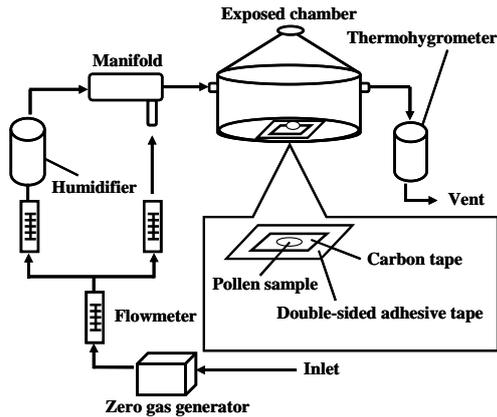


Fig. 3. Chamber system exposed humidified air to pollen.

3. 結果と考察

3.1. 大気中 Cry j 1、Cry j 2 含有粒子の存在確認

まず、AHV は高い吸引流量でアレルギー含有粒子を捕集しているため、 $> 7.0 \mu\text{m}$ のフィルターに捕集された花粉が物理的に壊れる可能性がある。そこで、 $> 7.0 \mu\text{m}$ のフィルターに捕集された花粉に加わる力と花粉が壊れる力を比較し、花粉の破裂可能性を検討した。

$> 7.0 \mu\text{m}$ のフィルター上の花粉に加わる力は、(1)、(2)式により計算した。

$$V(m/s) = \frac{Q(m^3/s)}{s \times N(m^2)} \quad \text{----- (1)}$$

$$F = ma$$

$$F \times t = m \times V$$

$$F = \frac{m \times V}{t} \quad \text{----- (2)}$$

ただし、 V は AHV 内の空気流れの速度、 Q は AHV の体積流量($9.43 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{min}$)、 s は AHV のノズル面積、 N はノズルの総数、 F は花粉に加わる力、 t は捕集時間(23 時間)、 m は花粉質量(花粉の密度¹⁰⁾ 1.38 g/cm^3 、粒径 $30 \mu\text{m}$ から算出)である。以上より、 $> 7.0 \mu\text{m}$ のフィルター上の花粉に加わる力は、 $F=1.04 \times 10^{-17} \text{ N}$ だった。また、花粉の圧縮強度¹⁰⁾が、 2.0 kgf/mm^2 であるので、花粉が壊れる力を、 19.1 N と仮定すれば、花粉に加わる力は花粉が壊れる力に比べて非常に小さく、花粉が捕集中に破裂する可能性は低いと推察できる。

次に、免疫蛍光抗体法により処理した $< 1.1 \mu\text{m}$ のフィルターを観察した。 $< 1.1 \mu\text{m}$ フィルター上で花粉の存在しない場所において、蛍光の輝点が観察された。輝点は Cry j 1 と Cry j 2 が抗体と反応し、生成した複合体の存在を示すので、輝点の存在場所には Cry j 1 や Cry j 2 が存在すると考えられる。

したがって、飛散花粉から Cry j 1、Cry j 2

が $< 1.1 \mu\text{m}$ の粒子として放出され、大気中に浮遊している可能性が高いことが推測された。

3.2. 時間別の Cry j 1 溶出量の測定結果

Fig. 4 に、経過時間別の溶出液、原液サンプル中の Cry j 1 濃度および Cry j 1 溶出率を示した。なお、Cry j 1 溶出率は、(3)式で表される Cry j 1 溶出割合の指標である。

$$\text{Cry j 1 溶出割合 (\%)} = \frac{\text{溶出液中 Cry j 1 濃度}}{\text{原液中 Cry j 1 濃度}} \times 100 \quad \text{----- (3)}$$

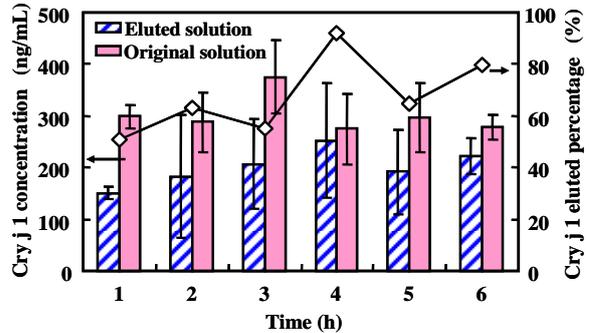


Fig. 4. Time variation of Cry j 1 elution behaviour.

原液中の Cry j 1 濃度は、時間によらずほぼ一定(約 300 ng/mL)であったが、溶出液中の Cry j 1 濃度は、1~4 時間の間、増加する傾向が確認された。また、Cry j 1 溶出率は花粉原液調製直後で 35 %、調製後 1 h で 50 % を超え、その後も 50 % 以上の値を維持した。

したがって、降雨と接触した直後から Cry j 1 が溶出され始めることが示唆され、溶出した Cry j 1 が、大気中を飛散する Cry j 1 含有粒子の発生要因であると考えられた。そのため、花粉からのアレルギーの溶出現象が、降雨発生後の微小粒径範囲におけるアレルギー濃度の増加に寄与する可能性が示された。

3.3. 花粉の破裂、Cry j 2 放出可能性の検討

Fig. 5 に湿度調整したゼロガスを曝露した花粉の SEM 画像を示した。相対湿度 98 % で 10 分間空気を曝露したニレ科花粉では、花粉の膨潤や発芽孔の伸長が生じ、その後花粉の

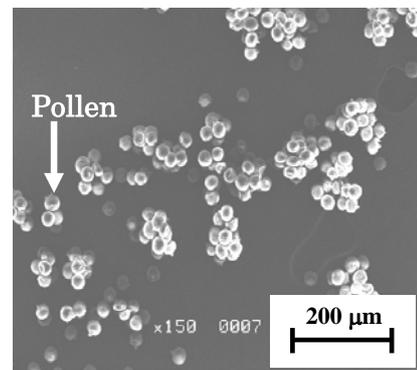


Fig. 5. Scanning electron micrograph of pollen exposed to humidified air.

破裂、内部組織の放出が観測されている⁵⁾。しかし、本実験結果では、発芽孔からの花粉管の伸長や花粉の破裂は観察されなかった。

スギ花粉が採取後長時間冷凍保存されていることで、生理活性の失活や乾燥による含水量の低下が生じ、破裂に至らなかったことも考えられるが、花粉開葯直後の花粉を低温、乾燥状態に保つことで、その生理状態を保持できるため¹¹⁾、生理活性成分の失活影響は考えにくい。また、花粉破裂の報告と本実験は、温度や湿度、曝露時間が同程度であったことから、花粉への水分供給量はほぼ同量であると考えられる^{5,12)}。そのため、花粉種により破裂傾向が異なることが推測された。また、降雨中のスギ花粉は、浸透圧により膨張破裂することが報告されているため¹³⁾、Cry j 2含有粒子の発生経路もCry j 1と同様に、降雨により花粉が破裂し、Cry j 2の放出に至る過程が主に影響を及ぼしていると考えられた。

4. まとめ

本研究では、Cry j 1、Cry j 2の可視化法を開発し、大気中でのCry j 1、Cry j 2含有粒子の存在可能性を検討した。また、未解明のアレルゲン含有粒子の放出機構について、花粉からのCry j 1の溶出現象に与える降雨の影響およびCry j 2含有粒子の放出に関係する花粉の破裂への湿度影響を調査した。

大気中のCry j 1、Cry j 2含有粒子を捕集した< 1.1 μmのフィルターのうち、花粉の存在しない場所において、Cry j 1とCry j 2の存在部位を発光、可視化させたところ、Cry j 1とCry j 2の存在を示す蛍光の輝点が観察された。

したがって、花粉から放出されたCry j 1、Cry j 2含有粒子が大気中に浮遊していることが示唆された。

模擬降雨と接触させた花粉からのCry j 1の溶出現象を調査した。その結果、模擬降雨と接触した直後からCry j 1が溶出し始め、1時間以内に花粉に含まれるCry j 1の約半量が溶出する傾向が確認された。

花粉の破裂に与える湿度の影響を調査し、Cry j 2の放出可能性を検討した。花粉を相対湿度 80 %のゼロガスに 8 時間曝露したが、破裂は確認されなかった。その一方で、溶液中に置かれた花粉は破裂することが確認されていることから、花粉の破裂に伴うCry j 2含有粒子の放出は、湿度影響よりも液相場に置かれた状態で起こる花粉の膨張破裂によるところが大きいと考えられた。

以上より、大気飛散スギ花粉が降雨と接触することで、花粉壁面から溶出したCry j 1や花粉の膨張破裂により放出されたCry j 2が、乾燥、再飛散することで、微小粒径範囲に分布するCry j 1およびCry j 2含有粒子の発生に寄与する可能性が示された。すなわち、アレルゲン含有粒子の発生と降雨が密接に関係するという新たな知見を得た。

以上の結果から、降雨発生後に、アレルゲン含有粒子が大気中に高濃度に発生するおそれがあり、スギ花粉情報の精度向上、具体的には、従来の飛散花粉数による花粉予報から、アレルゲン予報への情報提供方法の転換やアレルゲンの回避による花粉症および花粉喘息の予防を提言する必要性が示された。

【参考文献】

- 1)中村 昭彦, 吉田 博一, 平林 秀樹, 谷垣内 由之, 馬場 廣太郎, 中江 公裕, スギ花粉症有症率の全国分布, *免疫・アレルギー*, **17** (2), 134-135 (1999).
- 2)前田 裕二, スギと呼吸器症状, *アレルギー・免疫*, **6** (2), 30-37 (1999).
- 3)高橋 裕一, スギ花粉アレルゲンの飛散動態と花粉アレルゲンの情報化の可能性, *環境技術*, **32**, 196-200 (2003).
- 4)P.E.Taylor, R.C.Flagan, A.G.Miguel, R.Valenta and M.M.Glovsky, Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens, *Clinical and Experimental Allergy*, **34**, 1591-1596 (2004).
- 5)A.G.Miguel, P.E.Taylor, J.House, M.M. Glovsky and R.C.Flagan, Meteorological Influences on Respirable Fragment Release from Chinese Elm Pollen, *Aerosol Science and Technology*, **40**, 690-696 (2006).
- 6)桐生 浩希, 「埼玉大学学士論文」, (2006).
- 7)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 http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/protocols/mennsenn_matsuzaki.html
- 8)中村 澄夫, スギ花粉アレルゲンの局在とその起源, *顕微鏡*, **42** (1), 50-54 (2007).
- 9)関東地方環境対策推進本部大気環境部会 酸性雨調査会議, 「平成 16 年度 酸性雨調査報告書」, p.2, 26, 27 (2006).
- 10)(財)日本自動車研究所, 「粒子とスギ花粉症-実験動物を用いた粒子とスギ花粉の混合暴露実験-」, p.33 (2000).
- 11)日本花粉学会, 「花粉学事典」, 朝倉書店, p.76-77 (1994).
- 12)P.E.Taylor, R.C.Flagan, R.Valenta, and M.M. Glovsky, Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **109**, 51-56 (2002).
- 13)佐分利 保雄, 矢澤 篤子, 桜井 克巳, 林 正孝, 佐藤 洋子, 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 (1992).

【講演】

- 1)桐生 浩希, 王 青躍, 坂本 和彦, 都市部/山間部における微小化スギ花粉の生成に関する研究, 日本花粉学会第 47 回大会 講演要旨集, 和歌山, 49-50 (2006.10).
- 2)桐生 浩希, 王 青躍, 栗原 幸大, 坂本 和彦, 三輪 誠, 内山 巖雄, スギ花粉由来のアレルゲンCry j 1 と水溶性有機炭素の溶出挙動に関する研究, 日本花粉学会第 48 回大会 講演要旨集, 岡山, 54 (2007.9).

【論文】

- 1)栗原 幸大, 王 青躍, 桐生 浩希, 坂本 和彦, 三輪 誠, 内山 巖雄, 埼玉県都市部、道路端および山間部におけるスギ花粉アレルゲン含有粒子状物質の飛散挙動に関する研究, *大気環境学会誌*, **42** (6), 362-368 (2007).