

大気汚染物質によるスギ花粉アレルゲン変性の検討

王 青躍、○ 栗原 幸大、龔 秀民、仲村 慎一、胡 舜堯、鈴木 美穂 (埼玉大・院理工)
中島 大介 (国環研・環境リスク研究センター)

【はじめに】 スギ花粉症有病率が増加しているが、山間部よりも都市部においてスギ花粉症患者の有病率が高く¹⁾、その原因の1つとして大気汚染物質の影響が考えられているが、これに関する研究は動物試験が殆どである。動物試験によるアジュバント効果^{2,3)}の検証は行われているが、実大気中に存在する大気汚染物質と Cry j 1 との反応に関する研究は報告されていない。そのため、大気汚染物質により Cry j 1 が変性し、アレルギー症状を悪化させる可能性が推測される。今後の花粉症対策、さらにはアレルギー疾患対策を講じる上でも大気汚染物質とアレルゲンとの反応によるアレルゲン変性を評価することは重要である。本研究では、2008年のスギ花粉飛散期に大気捕集を実施し、捕集フィルターからスギ花粉アレルゲンを抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) にてタンパク質を分離検出することで、大気汚染物質によるスギ花粉アレルゲンの変性に関する評価方法について検討した。

【実験方法】 スギ花粉アレルゲンの捕集 2008年のスギ花粉飛散期、埼玉県都市部の国道463号道路端にて大気捕集を実施した。アンダーセンハイボリウムエアサンプラー (AHV) にて大気中のスギ花粉およびスギ花粉アレルゲンを粒径別捕集し、捕集流量は566 L/min、捕集時間は47 h、捕集粒径は $> 7.0 \mu\text{m}$ および $< 1.1 \mu\text{m}$ とした。

スギ花粉タンパク質の抽出

2008年に大気捕集したフィルター (大気試料) を $8 \text{ mm}\phi$ の大きさにくり抜き、水溶性タンパク質抽出試薬 (0.125 M NH_4HCO_3 , 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 10 mM HEPES 緩衝液, 0.005 wt % Tween 20 を含む水溶液) を加え、24 時間 (4°C) 静置させた。その後、振盪および遠心分離 (6,000 rpm, 10 分, 25°C) を行い、上清を限外濾過 (6,000 rpm, 10 分, 25°C, Amicon[®] Ultra-4, Millipore Corp.) して SDS-PAGE サンプルとした。同様の抽出操作により、スギ花粉 (山梨県森林総合研究所から提供) からタンパク質を抽出した。

SDS-PAGE による精製スギ花粉アレルゲンの分離検出

サンプル (大気試料あるいはスギ花粉から得た水溶性タンパク質抽出液) 10 μL を SDS-PAGE (ATTO Corp., AE-6530MCP) にて分子量毎にタンパク質を分離した (250 V, 4 mA, 120 min)。SDS-PAGE 終了後、二次元目ゲルを銀染色 (ATTO Corp., AE-1360) して、スギ花粉タンパク質を検出した。

【結果および考察】 2008年の大気試料から抽出したタンパク質抽出液を SDS-PAGE にて分離検出した結果を Fig. 1 に示す。主要スギ花粉アレルゲンは Cry j 1 と Cry j 2 の2種類が知られており、それぞれの分子量は約 40,000 と約 37,000 である⁴⁾。しかし、大気試料から得たタンパク質抽出液からアレルゲンを検出することができなかった (Fig. 1, Line 1~4)。3月10日の大気試料における大気中 Cry j 1 濃度は 0.09 ng/m^3 ($> 7.0 \mu\text{m}$) および 0.23 ng/m^3 ($< 1.1 \mu\text{m}$) であったが、SDS-PAGE では検出できないアレルゲン濃度であったので、濃縮法を導入する必要がある。

また、スギ花粉から得たサンプルからはタンパク質が分離検出できた (Fig. 1, Line 5)。Cry j 1 および Cry j 2 の分子量に類似したタンパク質が検出できた。環境中においてスギ花粉の飛散に伴ってアレルゲンが変性される可能性も考えられるため、濃縮法やウェスタンブロッティングを用いたスギ花粉アレルゲンの検出および変性評価に取り組む予定である。

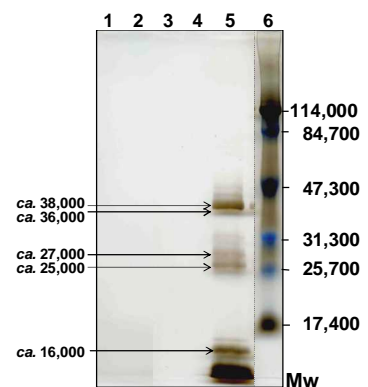


Fig. 1. Profile of SDS-PAGE using the silver staining. Line 1: $> 7.0 \mu\text{m}$ (filter sample on Mar. 10, 2008), Line 2: $< 1.1 \mu\text{m}$ (filter sample on Mar. 10, 2008), Line 3: $> 7.0 \mu\text{m}$ (filter sample on Mar. 12, 2008), Line 4: $< 1.1 \mu\text{m}$ (filter sample on Mar. 12, 2008), Line 5: Japanese cedar pollen extract, Line 6: molecular weight marker.

【参考文献】

- 1) 文部科学省, 2002, 生活・社会基盤研究 スギ花粉症克服に向けた総合研究 (科学技術振興調整費 第II期成果報告書), 125-133.
- 2) M. Muranaka *et al.*, 1986, Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **77**, 616-623.
- 3) S. Takafuji *et al.*, 1987, Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **79**, 639-645.
- 4) 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*, **42**, 1235-1242.