

花粉の新規モニタリング技術の開発 —花粉の自家蛍光特性を活用した花粉種自動識別計数装置の開発と利用—

New Monitoring Technology of the Pollen—Development of a Real-Time Pollen Sorting Counter Using Species Specific Pollen Autofluorescence

青 柳 秀 紀 *

HIDEKI AOYAGI*

筑波大学生命環境系 〒 305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

* TEL: 029-853-7212 FAX: 029-853-4605

* E-mail: aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード：花粉，自家蛍光，スギ，ヒノキ

Key words: pollen, auto-fluorescence, *Cryptomeria japonica*, *Chamaecyparis obtusa*

(原稿受付 2016 年 2 月 8 日／原稿受理 2016 年 2 月 15 日)

1. はじめに

花粉で起こるアレルギーが花粉症 (pollinosis) であるが、欧米では枯草熱 (hay fever) と名づけられていた。その症状が花粉で起こることを立証したのはイギリスの Blackley¹⁾ である。その後、アメリカではブタクサ花粉症が問題となった²⁾。日本でも、花粉症がはじめて報告されたのは 1961 年のブタクサ花粉症³⁾ であり、1964 年にはスギ花粉症が報告された⁴⁾。その後、日本における花粉症患者数は年々大きく増加し、現在は、国民病として社会問題になっている。しかしながら現状では、花粉症の根本的な治療法は無く、抗アレルギー剤を服用することで、諸症状を和らげるのが一般的である。そのため、現状で最も有効な対策は、花粉との接触を避けることであり、その基礎情報として、花粉の飛散数を選択的、客観的に感度良くリアルタイムに計測することが重要であり、正しい花粉情報が社会的ニーズとして求められている (実際、花粉の飛散量と花粉症との間に相関性があることも示されている)。

従来、広く用いられてきた花粉計測方法として、主に重力落下法、体積法、光散乱法がある。重力落下法としてはダーラム (Durham) 法がある⁵⁾。ダーラム法は安価で簡便な方法であり、日本では標準花粉測定方法にも指定されているため、最も一般的に使用されている (図 1)。この方法は、ワセリンを塗布したスライドガラスをダーラム型花粉捕集器に設置し、1 日間放置した後に、スライドガラス上に付着した花粉をカルベラ液やゲンチアナバイオレット・グリセリンゼリー液で染色し、光学顕微鏡を用いて花粉種を識別し、1 cm² あたりの積算花粉数を計測する方法である。しかしながら、ダーラム法は風力や風向きの影響を受けるため、大気中の花粉の飛

散量を正確に捉えられていないという点やリアルタイムに計測を行う事が困難であるという問題がある (また、ダーラム法を実際におこなってみると、花粉種の判別を精度良く行うためには熟練を要することが実感できる)。一定の空気を吸引して測定する体積法としては、バーカード (Burkard) 型花粉捕集器⁶⁾ が有名で、主に欧米で用いられている (花粉捕集器に内蔵されたポンプにより一定量の大気を吸引し、回転するテープに大気浮遊粒子を付着して捕集し、染色により花粉種を識別し、花粉数を顕微鏡で計数する。テープの位置から時間当たりの花粉濃度を求めることもできる)。しかしながら、この方

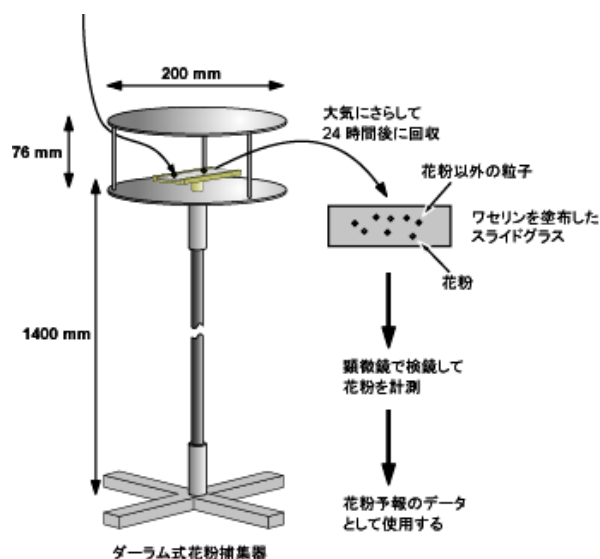


図 1. ダーラム (Durham) 法の概念図

法は高額な設備とその維持や花粉の観察に専従者が必要のため、日本ではほとんど使用されていない⁷⁾。また、花粉の数をリアルタイムに測定することはできないという欠点をもっている。光散乱法は、吸入粒子の粒子径を散乱光のパルス幅から算出し、20～40 μm の粒子をスギやヒノキ花粉として識別する⁸⁾。この方法は、リアルタイムに花粉の数を測定することができるが、同じ粒径の粉塵も花粉としてカウントしてしまうという欠点がある。

以上のように、上述した従来の花粉計測方法には客観性、迅速性、感度、選択性の点で一長一短があり、これまで正しく、有効な花粉情報が得られてきたとは言い難い。そのため花粉の飛散数を選択的、客観的に感度良く、リアルタイムに計測し、適切な花粉情報を得ることが切望されている。

この現状を踏まえ著者の研究グループは、UV 光を花粉に照射した際に、花粉種特有の自家蛍光特性を発生することを見出し、その解析すると共に、従来法の問題点を排除した新規な花粉種自動識別計数装置の開発研究をおこなってきた。本稿ではその概要を紹介する。

2. 花粉の自家蛍光特性を活用した花粉種の識別

実験室では、抗体抗原反応や電子顕微鏡観察により、花粉の種類を識別することができる。しかしながらこれらの方法では、屋外で花粉種を識別し、リアルタイムに計測することは不可能である。そこで著者らは、はじめに、アレルギー花粉のモデルとしてスギとヒノキを用い、花粉の種類の識別に有効な諸特性を探索した。その結果、花粉に適切な波長の UV 光を照射するとスギ (*Cryptomeria japonica*) とヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) ではそれぞれ特有の自家蛍光 (花粉表面の成分 [芳香族アミノ酸、ビタミン類、イソプレノイド、キノン類など] や花粉の表面構造に由来) が生じることを見出した^{9,10)}。しかしながら、気象条件や生育条件などが異なる (産地が異なる) スギ花粉やヒノキ花粉は自家蛍光強度が異なった⁹⁾。この問題点を解決するために、蛍光顕微鏡を用い UV 光励起下で花粉の自家蛍光画像を取得し、画像を光の 3 原色成分 (赤蛍光, 緑蛍光, 青蛍光) に分け、[青蛍光/赤蛍光], [赤蛍光/青蛍光], [赤蛍光/緑蛍光], [緑蛍光/赤蛍光], [緑蛍光/青蛍光], [青蛍光/緑蛍光] の 6 種類の蛍光色比について数値化し、平均値と標準偏差を求め、種々検討を試みた。その結果、6 種類の蛍光色比の中で特に、[青蛍光/赤蛍光] 比がスギとヒノキの花粉で大きく異なることが明らかとなった (スギはヒノキに比べて [青蛍光/赤蛍光] 比が高い値を示した^{9,10)})。また、花粉の自家蛍光の [青蛍光/赤蛍光] 比と粒径 (サイズ) を組み合わせることで、産地が異なる、スギやヒノキ花粉を明瞭に識別できることが明らかとなった⁹⁾。大気環境の重要な因子の一つである、湿度の変化がスギおよびヒノキ花粉の自家蛍光特性や花粉の粒径 (サイズ) に及ぼす影響を調べた結果、産地が異なる花粉では、湿度の変化が自家蛍光強度に及ぼす影響に差が認められた。しかしながら、[青蛍光/赤蛍光] 比で表現する事により、湿度の影響を無視できる事が明らかとなった⁹⁾。

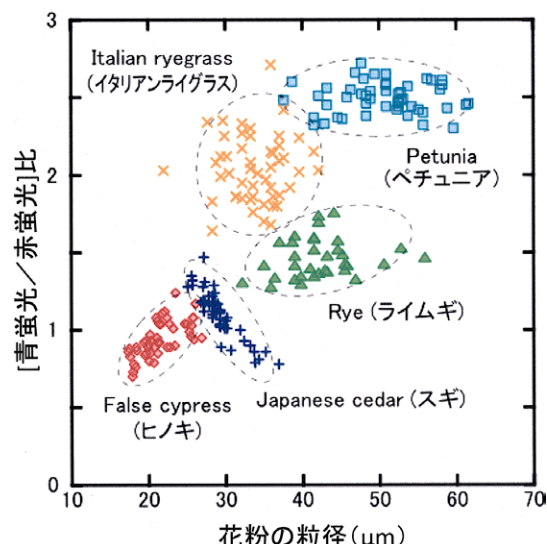


図2. 春の各種花粉の自家蛍光特性 ([青蛍光/赤蛍光] 比) と花粉のサイズの関係の例

自家蛍光特性と粒径に基づく花粉の識別は非破壊で簡便なため、色々な活用が期待されるが、現状では、様々な花粉の自家蛍光特性と粒径に関するデータは少なく、十分な知見がない。そこで、様々な花粉を対象に自家蛍光特性と粒径の比較解析を試みた結果、花粉の自家蛍光特性 ([青蛍光/赤蛍光] 比) と花粉のサイズを組み合わせる事で、季節の異なる様々な花粉種を識別できることが示された (図2, 3)。

本法は上述の長所がある反面、蛍光顕微鏡を使用する必要がある。一般的に、蛍光顕微鏡は高価で、屋外に持ち出し、簡便に使用することは困難である。平成27年度日本生物工学会大会シンポジウム「安全な水・大気・土壌環境づくりのためのバイオセンシングと実用化に向けての取り組み」において、黒田は蛍光法を屋外の現場で使用するために、スマートフォンに接続可能な小型蛍光顕微鏡を開発し、スマートフォンの通信機能を併せて用いるシステムを提案した¹¹⁾。この方法は自家蛍光特性を活用した花粉の識別にも有効なツールとなることが期待できる。

3. 花粉自動識別計数装置の開発^{12,13)}

UV 光を照射した際に生じる花粉の自家蛍光の [青蛍光/赤蛍光] 比を活用することで、花粉種の識別が可能になったが、蛍光顕微鏡を用いた花粉の計数では、従来の方法と同様な手間がかかり、自動化やリアルタイム計測は不可能である。そこで、この現象を基に、大気中の花粉を回収し、花粉独自の蛍光特性の違いに基づき花粉の種類を識別し、リアルタイムで計数する花粉種自動識別計数装置を考案、開発した (図4, 5)。

本装置は、ポンプを用いて大気を吸引し、吸引口直後に装備されたバーチャルインパクター (花粉と他の粒子をサイズ差で分級する機能を有する。花粉より小さく、軽い粒子はバイパスされ、花粉とそれより大きい粒子だけが測定部へ導入される) により、花粉サイズ相当の粒子が選択的に、測定部に1個ずつ、導入される。そし

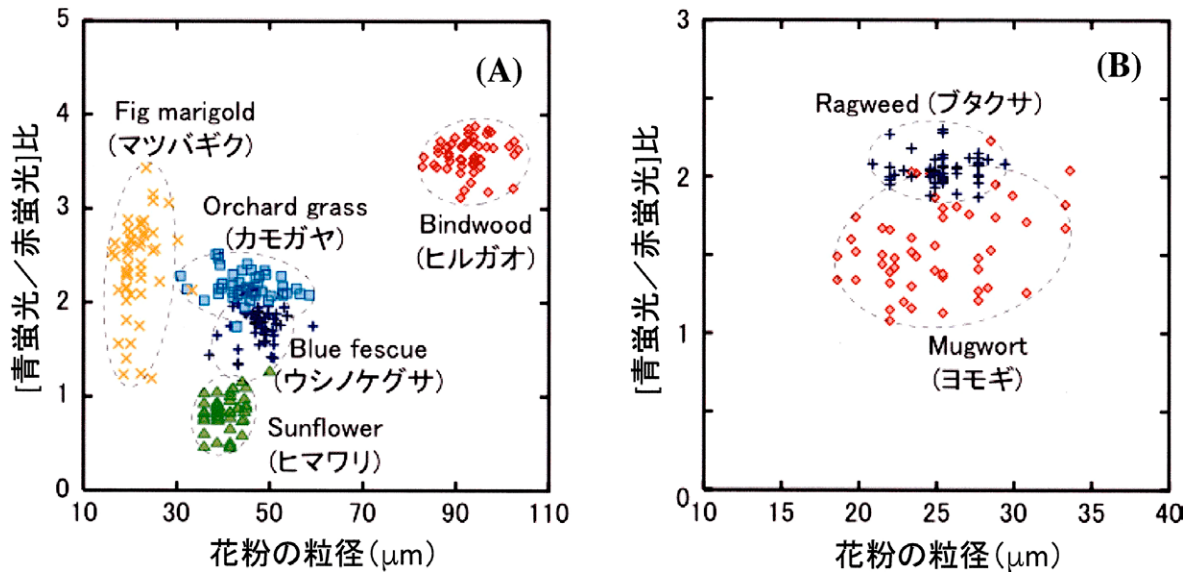


図3. 夏 (A) と秋 (B) の各種花粉の自家蛍光特性 ([青蛍光/赤蛍光] 比) と花粉のサイズの関係の例

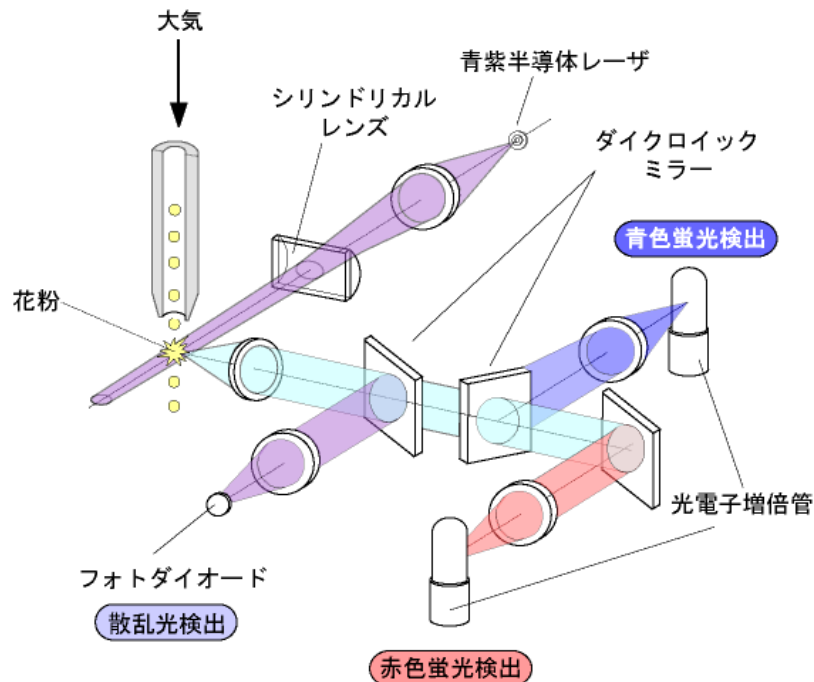


図4. 花粉種自動識別計数装置の機構概念図

て、測定部において青紫色半導体レーザーにより UV 光が 1 個、1 個の粒子に照射される。UV 光を照射された花粉は、UV 光を散乱すると同時に励起され、自家蛍光を発する。受光光学系では、青色蛍光、赤色蛍光と散乱光を同時に検出し、[青蛍光/赤蛍光] 比と花粉の粒径 (散乱光より推算) をソフトで算出し、入力してある識別関数 (北海道以外の日本各地で、共通の設定値で使用可能) に基づき、花粉種を識別して自動計数する仕組みになっている。本装置はいわゆる気相系のフローサイトメーターである。また、屋外の計測において大きな問題となる測定部の汚れを防止するために、本装置は試料空気 (花粉を含む大気) をシープエアー (ポンプの吸引

口、排気口にフィルターを設置し、エアロゾルを含まない清浄な空気を供給) で包み、測定部の中心付近にエアロゾルを含んだ試料空気の流れるシステムを装備している。シープエアーシステムにより測定部の気流の安定化と汚れ付着防止が実現でき、本装置の実用性が高まった。

実際に、本装置を用いて、野外で大気中の花粉の自動識別計数実験を実施した結果、スギやヒノキの花粉を他の微粒子と識別すると共に、個別にリアルタイムで計数することができた。得られたデータは、ダーラム法の計測結果と相関が得られた^{12,13)}。本装置により、花粉の飛散数を選択的、客観的に感度良く、リアルタイムに計



図 5. 花粉種自動識別計数装置（筑波大学農林技術センター屋上で撮影）

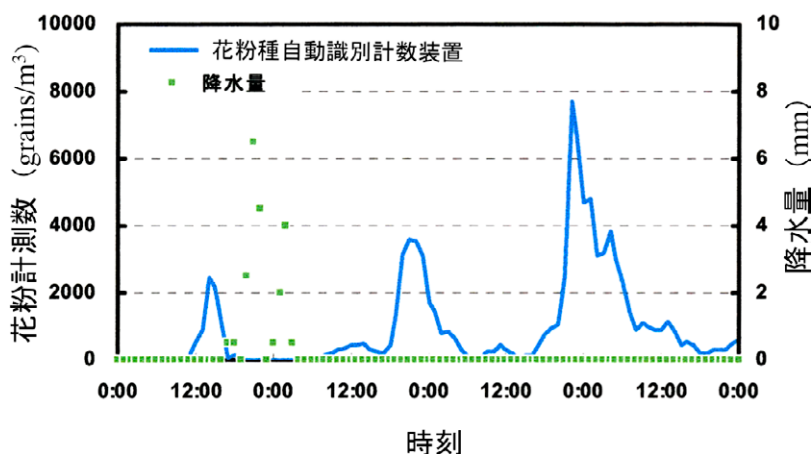


図 6. 花粉種自動識別計数装置を用いた花粉飛散量の時間経過の測定結果

測し、適切な花粉情報を得ることが可能となった。得られたデータは、パケット通信を利用して数分ごとに送信され、各地の花粉状況をほぼリアルタイムで収集できる。

また、本装置を用いることで、1日の間の花粉濃度の詳細な変動経過を定量的に把握することも可能であった（図 6）。この実験期間中に降雨が生じたが、降雨の状況下でも本装置は問題なく稼働すると共に、降雨時での花粉数のカウントはゼロとなった（図 6）。屋外では降雨時には花粉が飛散しないことが多くの研究者により報告されており、実情と一致する結果が得られた。

本装置は東京都の花粉情報提供サービス等に採用され、現在、有効な、スギ、ヒノキ、草本花粉の情報提供がなされている。

4. おわりに

花粉の自家蛍光特性に関するデータは少なく、現在、著者の研究グループは引き続き様々な花粉の自家蛍光データの収集および利用について検討中である（ミツバチが収集する花粉種の推定にも使用できる可能性が

示されている）。また、花粉の自家蛍光特性を花粉とフラーレンや酸化チタンなどのナノ微粒子の付着特性の解析にも利用できることを示した^{8,9)}。種々検討した結果、花粉とナノ微粒子の種類によって付着率が大きく異なることが明らかとなり、ナノ微粒子を産業的に使用する際には、花粉などの環境生物に対する影響評価を適切に行い、影響の少ないナノ微粒子を選択して使用する必要性を示唆した^{14,15)}。

現状では、花粉の種類を識別してリアルタイムで自動計測できる装置は国内外を通じて本装置があるのみである。本装置により精度が高い有効な花粉情報（花粉の種類、数および飛散分布のリアルタイム情報、花粉の飛散予測、携帯電話を介したリアルタイム花粉警報）の提供がはじめて可能になる。本装置で得られる情報は国内のみならず海外の花粉症患者のアメニティー向上への貢献が期待される（北米ではブタクサやカバノキの花粉、英国はイネ科の花粉に由来する花粉症が深刻な問題になっている）。さらに、本装置で得られるデータは、植物生態の把握（長年にわたる花粉情報の蓄積は、地球温暖化等の環境変動の把握に活用できる）や林業の将来設計、組換え植物のリアルタイムの花粉飛散挙動の把握な

ど、その利用性は広い。

これまで、花粉の観測の多くはボランティアにより行われきたが、ボランティアの高齢化の問題や自治体による予算や人員の削減など、従来の花粉計測法は大きな転機を迎えつつある。そのため、今後、花粉種を自動的に識別しリアルタイムで計数できるシステムの重要性は益々大きくなると思われる。しかしながら、社会実装の過程で、ダーラム法などの従来法で観測された過去のデーターを無駄にしないことが求められる（公定法の視点から、本装置と従来のダーラム法で得られたデーターとの高い相関性が望まれる）。さらに、空中に飛散する花粉量のみならずアレルゲン量を簡便に測定できる方法の開発も要求されており、今後、花粉の自家蛍光特性とアレルゲン量との相関に関する研究も重要性が高いと考えられる。

謝 辞

本稿の内容は、興和（株）の薮崎克己博士および光本浩太郎博士との共同研究で行われたものです。厚く御礼申し上げます。また、本研究の一部は、（公財）新技術開発財団の植物研究助成、文科省 都市エリア産学官連携促進事業（発展型）筑波研究学園都市エリア、および（独）日本学術振興会科学研究費補助金 萌芽研究の一環として実施されたものであり、ここに深謝いたします。

文 献

- 1) Blackley, C.H. 1881. On the treatment and prevention of hay fever. *The Lancet*. 118: 371.
- 2) Alford, R.I. 1948. Allergy in Japan. *Journal of Allergy*. 19:

- 240–243.
- 3) 荒木英斉. 1961. 花粉症の研究 II 花粉による感作について. *アレルギー*. 10: 354–370.
- 4) 堀口申作, 齊藤洋三. 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.
- 5) Durham, O.C. 1946. The volumetric incidence of atmospheric allergens IV. A proposed standard method of gravity sampling, counting, and volumetric interpolation of results. *J. Allergy*. 39: 79–86.
- 6) Hirst, J. 1952. An automatic volumetric spore trap. *Annals of Appl. Biol.* 39: 79–86.
- 7) 竹中 洋. 2000. 空中飛散スギ花粉数の測定とその応用. *アレルギー*. 49: 558–561.
- 8) 安枝 浩, 齋藤明美, 轡田和子, 井出 武, 深谷修司, 柴田政裕. 2006. 光散乱方式によるスギ・ヒノキ花粉自動計数機の開発と検証. *アレルギー*. 55: 475.
- 9) 榎戸仁美, 光本浩太郎, 薮崎克己, 青柳秀紀. 2008. 産地が異なるスギおよびヒノキ花粉の自家蛍光特性と粒径の比較解析. *日本花粉学会誌*. 54: 69–77.
- 10) Mitsumoto, K., K. Yabusaki, and H. Aoyagi. 2009. Classification of pollen species using autofluorescence image analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 107: 90–94.
- 11) Mitsumoto, K., K. Yabusaki, K. Kobayashi, and H. Aoyagi. 2010. Development of a novel real-time pollen-sorting counter using species-specific pollen autofluorescence. *Aerobiologia*. 26: 99–111.
- 12) 青柳秀紀, 薮崎克己, 光本浩太郎. 2013. 花粉の自家蛍光特性を利用した実用的な花粉種自動識別計測装置の開発. *バイオサイエンスとインダストリー*. 71: 407–411.
- 13) 黒田章夫. 2015. アスベストバイオペロープの開発とスマートバイオセンシングへの展開. 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集. p. 357.
- 14) 青柳秀紀, 榎戸仁美, 薮崎克己. 2008. フラワーレンナノ微粒子と花粉の付着特性の解析. *日本花粉学会誌*. 54: 103–106.
- 15) 青柳秀紀. 2011. 花粉と酸化チタンナノ微粒子の付着特性の解析. *日本花粉学会誌*. 57: 51–55.