

200729001B

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

**リアルタイムモニター飛散数と現状の
治療によるQOLの関連性の評価研究と
花粉症根治療法の開発**

平成17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 大久保 公裕

平成20年(2008)年3月

目 次

I. 総合研究報告

リアルタイムモニター飛散数と現状の治療によるQOLの関連性の評価研究と花粉症根治療法の開発 大久保公裕	1
自動花粉測定器の問題点とその改善に向けての検討, 舌下免疫療法の有効性の検討, ならびにスギ花粉症発症へのインフルエンザウイルス感染の影響についての検討 岡本美孝	8
Side-by-side comparison of automatic pollen counters for use in pollen information systems Jean-Jacques Delaunay, et al	12
小児の花粉症 、 岡本美孝	18
スギ花粉症に対する経年的な舌下免疫療法と丸山ワクチン免疫療法の臨床研究 大久保公裕	23
Omalizumab is more effective than suplatast tosilate in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis T. Nagakura, et al	25
Preliminary Study on Japanese Cedar Pollinosis in an Artificial Exposure Chamber (OHIO Chamber) Kazuhiro Hashiguchi, et al	37
システニルロイコトリエン受容体拮抗薬モンテルカストナトリウムの通年性アレルギー性鼻炎に対する12週間長期投与試験 大久保公裕, 他	43
スギ・ヒノキ花粉飛散の実際と花粉症の臨床 大久保公裕	53
特異的免疫療法による抗原特異的メモリーT細胞の変化について 松岡伴和, 他	59
免疫療法の作用機序 中井義紀	62
スギ花粉症に対する舌下免疫療法 後藤 穰, 他	66
気管支喘息におけるアレルギー免疫療法 永田 真	71
実地医家の皮内注射による免疫療法への評価 大西正樹	74
抗IgE抗体療法 -基礎から臨床まで 大久保公裕	79
アレルギー性鼻炎とQOL 大久保公裕	83
スギ花粉症に対する新たな抗原特異的免疫療法 (減感作療法) 大久保公裕	89

2005年スギ花粉症に対するラマトロバンと抗ヒスタミン薬の併用効果 今井 透, 他	95
リアルタイムモニター飛散数と現状の治療によるQOLの関連性の評価研究と 花粉症根治療法の開発 後藤 穰	107
アレルギー性鼻炎 後藤 穰	110
スギ花粉症に対する舌下免疫療法 後藤 穰, 他	115
花粉症の総合的診療 (1) - 私は花粉症です! - 後藤 穰	120
花粉症の総合的診療 (2) - 花粉症はスギだけ? - 後藤 穰	125
抗原特異的免疫療法のEBM 後藤 穰	129
経口薬物療法 後藤 穰	135
ベシル酸ベポタスチンOD錠によるスギ花粉症の症状抑制効果 橋口一弘, 他	140
スギ花粉症における初期治療開始時期の検討 後藤 穰	150
免疫療法の治療効果と臨床評価方法の研究 湯田厚司	155
ONE airway, one diseaseの概念とスギ花粉症治療 湯田厚司, 他	158
スギ花粉症に対する免疫療法のヒノキ科花粉症への効果 湯田厚司, 他	164
小児アレルギー性鼻炎の疫学と特殊性 湯田厚司	169
当科におけるスギ花粉症に対する舌下免疫療法 - 小児例を中心に - 湯田厚司	175
討 論 原田 保, 他	180
スギ花粉症に対する免疫療法のヒノキ科花粉症への治療効果 鈴木あゆ美, 他	182
スギ花粉症に対する抗原特異的免疫療法の花粉飛散総数による医療経済効果 - 医療費による直接経費からの検討 - 湯田厚司, 他	188

リアルタイムモニターを用いた花粉観測の解析と鼻噴霧用ステロイド薬を用いた初期療法の有用性とスギ特異的メモリーT細胞の季節変動に関する研究 増山敬祐	194
Nasal Immunologic Reactivity, Rhinitis, and Polyps Takeru Ishikawa, et al	197
アレルギー性鼻副鼻腔炎 増山敬祐	207
花粉症の治療ガイドラインと評価 増山敬祐	215
花粉症に対する鼻局所ステロイド薬の進歩とエビデンス 増山敬祐	222
抗原特異的免疫療法について 増山敬祐	229
自然免疫系を介したスギ花粉症治療の基礎的研究と網羅的解析 藤枝重治	236
The efficacy of short-term administration of 3antihistamines vs placebo under natural exposure to Japanese cedar pollen Sawako Hyo, et al	242
Roles of protein tyrosine kinase Syk in nasal polyps T. Yamada, et al	250
Double-stranded RNA induces production of RANTES and IL-8 by human nasal fibroblasts Noboru Takahashi, et al	255
Collaborative Action of NF- κ B and p38 MAPK Is Involved in CpG DNA-Induced IFN- α and Chemokine Production in Human Plasmacytoid Dendritic Cells ¹ Youko Osawa, et al	263
鼻茸の成因と生物学的特性 藤枝重治	275
Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis Yuki Hamajima, et al	282
Ⅷ. 外科的治療～粘膜下甲介骨切除術と後鼻神経選択的切断術～ 山田武千代, 他	290
CD40依存性非依存性IL-4誘導IgクラススイッチのヒトIgFc γ -IgFc ϵ キメラ蛋白による抑制効果 山田武千代, 他	296
I. 鼻アレルギー 1)鼻アレルギーにおけるリモデリング 山田武千代, 他	301
鼻由来線維芽細胞によるB細胞の制御 山田武千代, 他	308
Ⅱ. 耳鼻咽喉科 1)鼻粘膜由来線維芽細胞におけるRANTES・Eotaxin 制御 山田武千代, 他	311

I. 免疫細胞, 炎症細胞を標的としたIgE依存性疾患治療への展望	
2) IgE抗体産生とB細胞のシグナル	
山田武千代, 他	319
スギ特異的免疫療法の奏効機序の解明とマウススギ花粉症モデルの作製と解析	
岡野光博	328
スギ特異的免疫療法の作用機序の解析	
岡野光博	332
好酸球の抑制と花粉症	
松本理恵, 他	339
アレルギー性鼻炎の発症機序と遺伝	
岡野光博	345
Histamine H4 receptor agonists have more activities than H4 agonism in antigen-specific human T-cell responses	
Yuji Sugata, et al	352
Glycoform Analysis of Japanese Cypress Pollen Allergen, Cha o 1 : A Comparison of the Glycoforms of Cedar and Cypress Pollen Allergens	
Yoshinobu Kimura, et al	362
CRTH2 Plays an Essential Role in the Pathophysiology of Cry j 1-Induced Pollinosis in Mice ¹	
Rie Nomiya, et al	369
アレルギー性鼻炎の新しい治療薬開発の現状	
-免疫療法薬を中心に-	
岡野光博	379
リアルタイムモニター飛散数と現状の治療によるQOLの関連性の評価研究と花粉症根治療法の開発	
久保伸夫	387
II. 調査概要	393
III. 業績	393

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

研究報告書

リアルタイムモニター飛散数と現状の治療による QOL の関連性の評価研究と花粉症根治療法の開発

主任研究者	大久保公裕	日本医科大学耳鼻咽喉科助教授
分担研究者	岡野光博 岡本美孝 久保伸夫 後藤 穰 藤枝重治 増山敬祐 湯田厚司	岡山大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科准教授 千葉大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学教授 関西医科大学男山病院耳鼻咽喉科助教授 日本医科大学耳鼻咽喉科講師 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授 山梨大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授 三重大学耳鼻咽喉科講師
研究協力者	米倉修二 吉江うらら D Jean-Jacques 松崎全成 松岡伴和 遠藤周一郎 安枝 浩 横田匡彦 山田武千代 高橋 昇 大沢陽子 玉利真由美 坂下雅文 野口恵美子 牧野友香 竹中 洋 伊藤加奈子	千葉大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学助手 千葉大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学医員 東京大学大学院工学系研究科機械工学専攻助教授 山梨大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科准教授 山梨大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科講師 山梨大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科講 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター ウェザー・サービス株式会社 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科講師 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科助手 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科医員 理化学研究所遺伝子多型研究センター 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科大学院生 筑波大学人間総合科学研究科人類遺伝学講師 筑波大学人間総合科学研究科人類遺伝学大学院生 大阪医科大学耳鼻咽喉科教授 大阪医科大学耳鼻咽喉科大学院生

研究要旨

社会問題となっているスギ花粉症において現在注目されている花粉飛散の調査方法であるリアルタイムモニターと治療法との関連性の研究を行った。リアルタイムモニターはまだ現状ではSPMなどの問題もあり、治療法に応じたQOL改善との直接的な関連性は無かった。しかし、QOLや症状の推移を把握するにはリアルタイムモニターの値は有用であった。

スギ花粉症の新しい治療法しかも根治療法の開発はその疾患の低年齢化や罹病人口の増加から急務であり、我々は舌下免疫療法の検討を多施設により行った。RCTでは2年目の効果は明らかにならなかった。2年目の投与抗原量が1年目より減少したためと考えられた。しかし舌下免疫療法の分担研究者個別での調査によれば経年的効果は良好であり、舌下免疫療法や丸山ワクチン併用アジュバント免疫療法など、今後さらに新規治療法について検討する必要がある。

A. 研究目的

花粉症において患者の症状の出現やQOLの低下がリアルタイムモニターの飛散花粉量で分るようになれば、患者の行動範囲をどの様に制限すればよいか分

る。その結果花粉症の医療に係るべき費用や時間の減少が可能となり患者自身のセルフケアについて大きな情報となる。将来的にはこの花粉情報が気象情報などと組み合わせられ、どの地域でどの程度の花粉

が時間ごとに飛散するか気象予報と同じ様に予想できるようにとなると考えられる。その時にリアルタイムモニターの情報と連動した花粉症の症状変化や QOL についての情報は国民にとって重要だと考えられる。各種の治療法の QOL の研究ではそれぞれの治療法により QOL が改善されることが分ったが、完全に QOL を花粉の非飛散期の状態にすることはできなかった。既存の治療では免疫療法以外はすべて対症療法であり、QOL の更なる向上には副作用のない根治的な治療法の開発が必須である。昨年までの口腔を利用した抗原特異的な免疫療法の効果は証明されたが、完全に症状を抑制する事はできなかった。抗原量の問題かあるいは別のアジュバントとの併用が効果的なのかを検討する必要がある。また別のシグナル伝達などの方法論を駆使した治癒を目標とした治療法の開発が急務であり、この根治的な治療法を確立させれば医療の削減はもちろん、花粉抗原に対する抗体陽性者の未発症者の発症を予防する可能性やもし発症してもその時期を遅らせることができると考え研究を始めた。

B. 研究方法

- ①2003 年から 2007 年までの QOL の変化 (大久保、後藤) : 2003 年から 2005 年まで同一日に同一場所 (東京都新宿) で QOL 調査を行った。毎年 200 症例の QOL を集積し、その年度の比較を行った。2006 年から 2007 年まで JQRLQ No2 (鼻眼以外の症状) の調査を同様に行った。
- ②リアルタイムモニターと患者 QOL の関連性 (大久保) : 2005 年、2006 年に日本医科大学付属病院 (文京区千駄木) 屋上でのリアルタイムモニターでのデータを解析し、毎日のデータと当日を含む 1 週間前からあるいは 2 週間前からの累積花粉数を算出し、その当日の患者 QOL との検討を行った。また 2007 年は JQRLQ No2 (鼻眼以外の症状) とリアルタイムモニターの数との関連性の研究を行った。
- ③リアルタイムモニターの検証 (岡本) : NTT 社製 (NTT)、大和製作所製 (KH3000)、興和社製 (KP1000)、神栄社製 (Shinei)、NTT による神栄社製改良型 (NTT-神栄: 平成 17 年のみ) を千葉大学屋上に設置し 2005 年、2006 年、2007 年それぞれ比較し、検討を行った。降雪や黄砂の影響を測定全粒子数と花粉測定数の両値から検討し、補正式を確立する。
- ④現在の治療の検証 (増山) : 2006 年に薬物治療として第 2 世代抗ヒスタミン薬と鼻噴霧用ステロイド薬を用い、それらによる初期療法の鼻症状と眼症状の症状発現遅延効果ならびに症状改善効果を比較検

討した。

- ⑤スギ花粉症における免疫療法の効果の検証 (湯田、岡野) : 免疫療法の治療効果の判定とヒスタミン遊離率試験での評価を検討した。また効果良好の免疫療法群と免疫療法非施行患者からスギ花粉飛散期の 2005 年 3-4 月に末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。PBMC を Cry j 1 にて刺激し培養し、制御性 T 細胞および共抑制分子の研究を行なった。また免疫療法施行および非施行のスギ花粉症患者の PBMC の Cry j 1 あるいは Cha o 1 特異的 T 細胞を樹立し、抗原反応性を検討した。
- ⑥花粉症への手術療法 (久保) : 2005 年、2006 年スギ花粉症に対してアルゴンプラズマ凝固療法 (APC) の長期間の有効率の変化を検討した。また 2007 年からは中等症以上の小児スギ花粉症患者に炭酸ガスレーザーによる下鼻甲介表面蒸散術の効果を評価検討した。
- ⑦スギ花粉症に対する舌下免疫療法 (多施設二重盲検比較試験) 7 ヶ月間の研究 (大久保、岡本、岡野、後藤、藤枝、増山、盛川) : 2005 年の花粉飛散季節中に、症状日記、QOL 質問表を用いて舌下免疫療法の治療効果を 2 重盲検比較試験によって検討した。52 症例がランダム化された。抗原エキスを舌下に約 2 分間保持し、舌下吐き出し法で行った。2004 年の 11 月より新規に治療を開始した。鼻症状、眼症状は日記により、QOL 評価は JRQLQ No. 1 を用いた。
- ⑧舌下免疫療法の経年的オープン試験 (藤枝) : 2007 年まで 3 年間実薬を継続した群 : 18 名、2 年間実薬を継続した群 : 30 名、1 年実薬を行った群 : 18 名、偽薬群 18 名が、平成 19 年春のスギ花粉飛散期を迎えた。治療効果は、症状スコアと薬物スコアによって判定した。
- ⑨小児スギ花粉症に対する舌下免疫療法のオープン試験の研究 (湯田) : 小児スギ花粉症 10 例に舌下免疫療法を行った。2006 年 12 月より成人と同じ抗原量と治療スケジュールで施行した。
- ⑩スギ花粉症に対するグミ剤による舌下免疫療法の研究 (盛川) : 2005 年スギ抗原エキスを一定量含有したグミ剤またはプラセボ剤を口腔内で自然溶解後に嚥下する方法で 1 日 1 回投与した。合計 42 例を二重盲検法により実薬群 22 名、プラセボ群 20 例に割り付けた。鼻症状、薬物スコア、花粉飛散開始から症状発現までの日数、中等症以上の鼻症状を有した日数を算出した。
- ⑪2 年間連続の舌下免疫療法の多施設研究 (大久保、岡野、岡本、後藤、藤枝、増山、盛川、湯田) 日本医科大学耳鼻咽喉科と研究班の分担研究者の施設において 109 名の試験参加を受け付けた。試験は

ランダム化プラセボ対照比較試験で2006年(109名)と2007年(93名)の効果について検討した。検討した項目はアレルギー日記による症状スコアとJRQLQ No1によるQOLスコアである。

⑫DNAワクチンの基礎的研究(藤枝):口蓋扁桃単核球を用いIL-4と抗CD40刺激下でAタイプCpG DNAとBタイプCpG DNAを添加し、IgE産生、CD4⁺CD25⁺細胞の誘導、IFN- α 、IFN- γ の産生をELISAにて検討した。

⑬丸山ワクチン免疫療法の基礎研究(大久保):2006年BALB/cマウスの皮下にスギ花粉抗原を5回投与し、その後腹腔内投与で感作し、投与の間にアンサ20を皮下投与した。腹腔誘発後に腹腔に増加する好酸球数を検討した。また2007年からは倫理委員会の承認を受けて、臨床試験を開始した。ヒトでの検討では2007年からランダム化プラセボ対照比較試験でプラセボ群と丸山ワクチン単独群、丸山ワクチンと抗原の混合群の3群で12症例を行った。方法は急速法であり、抗ヒスタミン薬を前もって服用し1週間に混合薬を投与した。

⑭スギ花粉症モデルマウスの作成とCRTH2の研究(岡野):2006年にBALB/cマウス(雌7週齢)にスギ花粉アレルゲンCry j1を連続点鼻で感作した。最終点鼻誘発時のくしゃみ・鼻かき回数からCry j1に対する過敏性の変化を検討した。

⑮B cell stimulator(BLyS)によるアレルギー性鼻炎治療の研究(藤枝):2005年に鼻粘膜線維芽細胞株でのTLR, BLySの発現をreal-time PCRで測定し、またBLySの蛋白産生をウエスタンブロット法にて測定し刺激後の発現の変化を検討した。

⑯スギ抗原特異的メモリーT(IL-4, IL-5, IL-10)細胞の季節変動に関する研究(増山):2006年にスギ花粉症にて薬物療法を受けた患者群と健常者群の2006年の花粉飛散前、花粉飛散ピーク時期、花粉飛散終了後に採血を行った。分離した単核球層を6穴プレートにて分離した細胞を3時間培養し、メモリーT細胞を樹立した。IL-4, IL-5, IL-10 ELISPOT ASSAY KITを用いてスポットを染色し、検討を行った。

(倫理面への配慮)

小児に対するスギ花粉症調査、インフルエンザウイルス感染の罹患についてのアンケート調査は、保護者の文書同意を得て行った。成人に関してのスギ花粉症調査は文書同意を得て行った。舌下免疫療法の試験は十分に試験の内容を説明し、インフォームドコンセントをとり、成人では本人より小児では本人と保護者より文書同意を得て行った。現在まで問題は生じていない。

C. 結果

①2003年は平年よりやや大目の飛散花粉量、2004年は少量の飛散花粉量、2005年は大量飛散花粉数であった。2004年より2003年、2005年の患者QOLは悪化した。2003年と2005年の間には差が認められなかった。「日常生活」で2005年が悪い傾向にあった。他の項目では2003年と2005年がともに悪い傾向が認められた。2006年、2007年の鼻眼の以外の症状では花粉症症状のやや重い以上の群ではより女性に皮膚の痒みの症状が多く認められた。また気道の症状はのどの症状と関連した。これら症状は鼻閉に関連することが分かった。

②リアルタイムモニターの数値はその時の症状に影響を与えるが、1週間、2週間といったQOLへの関連性は相関係数が低かった。鼻眼以外の症状は花粉飛散前の1月下旬と飛散終了後5月以降にも悪化している。治療法との関連性についても初期治療ではQOLは軽くなるが、その症状軽減の利得はリアルタイムモニターの数値と関連しなかった。

③2005年の検討からリアルタイムモニター-KH3000は降雪、黄砂により影響を受け、神栄センサーは、雪は花粉と誤認しなかったが、黄砂には影響を受けていた。2006年にはSPMの影響を改善するための補正式として、花粉粒子数=2.1 × (花粉識別判別式による花粉と識別された粒子数) - 0.073 × (神栄センサーの測定粒子数)で補正したところ相関係数は0.54から0.91に上昇した。さらに2007年には誤認率を算出し、花粉見逃し率から新たな補正マトリックスを作成した。2005年、2006年の同様なダーラム法による飛散測定との関連も新マトリックスを用いることで改善がみられた。

④格飛散開始日における症状発現率は両群とも20%程度であり、初期療法において差がなかった。併用療法の開始は、両群とも飛散ピーク時に集中していた。本格飛散開始後飛散ピーク時までの鼻症状は抗ヒスタミン薬で症状の増悪があったが、局所ステロイド薬では症状の増悪が抑制されていた。

⑤免疫療法群は初期治療群よりもスギ花粉飛散期の症状緩和があり、中等度以上のスギ花粉飛散年で医療経済上も安価な治療であった。スギ花粉症の即時型症状と好塩基球含有ヒスタミン量は正に相関し、ヒスタミン遊離率は免疫療法効果判定に応用可能なことが示唆された。また免疫療法群では非施行群よりCry j1刺激によりCD4陽性CD25強陽性細胞比率の有意な増加を認めた。B7-H1発現変化に関しては免疫療法施行群で発現が亢進する傾向を認め、BTLA発現も増加した。免疫療法群ではIL-5産生が有意に低下した。またChao1特異的IL-5産生量についても免疫療法では有意な低値を示した。免疫療法群で

も非施行群でも Cry j1 特異的 IL-5 産生量と Cha o1 特異的 IL-5 産生量は有意に正の相関を示した。

⑥2005年のスギ花粉症へのAPCの有効率は74%で満足度も74%だった。花粉飛散量が平年並みの年の有効率は60%だが、花粉の少ない年の有効率は92%だった。炭酸ガスレーザー手術では2005年と2007年ではいくつかの指標で鼻噴霧用ステロイド薬の初期治療との間に有意差はなかった。小児への炭酸ガスレーザー手術では2007年度の症状スコアはレーザー群と薬物療法群に有意差はなかった。手術の症状抑制の越年効果はみられなかったが、抗原誘発による粘膜腫脹への越年効果は認められた。

⑦花粉飛散期後半でプラセボ群と比較し有意に各症状と重症度で軽く推移した。またJRQLQ No1によるQOL調査では健康関連QOLは有意に低値で、プラセボの約半分であった。各領域の検討では精神生活で有意に軽度に推移した。

⑧2007年では4群の症状スコアには有意な差が認められなかった。花粉飛散ピーク時において薬物スコアが0である割合を検討すると1年目22%、2年目43%、3年目50%であり、偽薬群では0%であり、使用薬物の減量効果があった。

⑨小児スギ花粉症の舌下免疫療法では、全例で安全に在宅投与ができた。初年度の2007年は成人よりも自覚症状が良好であった。症状スコアでは花粉飛散期で最大、鼻閉の1.3点までで良好であった。花粉飛散期の症状の悪化が平均で1点未満であり、花粉最大飛散期で無症状が2例、軽症例が4例であった。保護者のアンケートでも良好であった。

⑩2006年の結果では、3シーズン治療を継続した実薬継続投与群は、鼻症状スコアおよび症状薬物スコアがプラセボ群よりも有意に低く、症状の改善と薬剤使用の低下が認められた。3シーズン治療を継続した8例はヒスタミン遊離率およびリンパ球増殖能が治療前より有意に抑制されていた。副作用は、口腔内の搔痒感などで、重篤な副作用は認められなかった。

⑪2006年の症状スコアは実薬とプラセボで鼻閉に差が認められた。QOL平均スコアでも3月に実薬0.6プラセボ1.2であった。2年目の2007年は平年並みとなりの年の症状スコアは実薬でプラセボより鼻閉で有意に良い時期があったが、QOLスコアでは実薬1.0プラセボ1.0であり、2年目の効果は確認されなかった。

⑫扁桃細胞ではAタイプCpG-DNA、BタイプCpG-DNAともに有意なIgE産生の低下を誘導し、IFN \cdot 、IFN \cdot の産生の亢進を認めた。それらの作用は形質細胞

様樹状細胞によるものであった。しかしいずれのCpG-DNAもCD4 $^+$ CD25 $^+$ 細胞の増加はフローサイトメトリーにて確認できなかった。

⑬BALB/cマウスの腹腔内スギ花粉抗原投与により溶媒投与の対照群と比較し、好酸球数は増加した。この増加をアンサ20は抑制できなかった。ランダム化プラセボ対照比較試験の結果は2008年の花粉症季節時の症状スコア、QOLスコアで評価する予定である。現在投与時期に関してはアレルゲンによる副反応は生じていない。

⑭高用量のCry j1点鼻投与では有意にくしゃみおよび鼻かき回数が増加した。Cry j1点鼻投与にて血清中のCry j1特異的IgEおよびIgG1抗体価はともに上昇し、リンパ節細胞培養でIL-4およびIL-5の産生は高用量Cry j1を点鼻投与した群で増加し、鼻粘膜内好酸球浸潤が認められた。CRTH2ノックアウトマウスでは有意な症状の抑制、Cry j1特異的IgE/IgG1抗体産生の抑制、鼻粘膜浸潤好酸球数の低下、顎下部リンパ節細胞によるIL-4およびIL-5産生の有意な抑制がみられた。

⑮線維芽細胞ではTLR3、TLR4、TLR9の発現が多く、Poly ICとLPS刺激によりBlySが発現した。BlyS発現誘導は、Poly ICの作用が最も強く濃度依存性に誘導し下甲介粘膜由来線維芽細胞で特に強かった。抗CD40抗体が低濃度ではBlySはIgEクラススイッチを有意に増強したが、高濃度の存在下ではBlySの影響はなかった。BlyS中和抗体(抗BlyS抗体)がIgE産生を減少させた。

⑯健常者群ではIL-4、IL-5産生スギ抗原特異的メモリーT細胞は低値で花粉飛散による変動は認めなかった。スギ抗原特異的IL-10産生メモリーT細胞はシーズン終了後は前に比較し有意に高値を示した。患者群においてはIL-4、IL-5産生スギ抗原特異的メモリーT細胞は花粉飛散前の値に比較して徐々に増加する傾向がみられた。Th2サイトカイン産生メモリーT細胞は患者群で健常者群に比較して有意に高値であった。

D. 考察

厚生労働省の研究班としては花粉のリアルタイムモニターはKH-3000を使用している。しかし、千葉大学のデータにもあるように黄砂や雪の影響を受けることが分かり、2006年のマトリックス(補正式)よりさらに精度の高い新マトリックスが2007年に誕生し研究班としても新マトリックスに基づき、今後正しい補正をし、花粉情報を発信しなければならない。2005年からの検討でリアルタイムモニターの値

はその日の症状には呼応するが、QOLには直接結びつかない場合もあるが、長期的に見るとQOL、症状とも相関する傾向がある。またこの値は花粉症における鼻や眼以外の症状にも関連する事が明らかとなった。この鼻眼以外症状では「口が渇く」が男女とも最も多く、性別では男性に「イビキをかく」、女性には「皮膚がかゆい」が多かった。今後、リアルタイムの飛散花粉数の広報は患者への症状、QOLに関する情報も必須で、啓蒙が必要である。リアルタイムモニターの情報かどのように使用されなければならないか今後の課題である。

従来の皮下注射による免疫療法の効果は国際的に認められているが、日本では副作用の問題から頻用されていない。そのため、より副作用の少ない舌下免疫療法を単年度のRCT、2年間のRCTと臨床検討を続けてきた。まだ2年目の臨床試験のデータは決して良くなかったが、1年目より投与総抗原量が減少した事が問題と考えられ、今後の舌下免疫療法の展望となると考えられた。これは福井大学の季節前のみ1週間に1回という同じプロトコルでの経年的な実施が良かった事からも分かる原因であった。また小児に対する舌下免疫療法が成人と同じプロトコルで安全にしかも高い効果で施行できた事は、これから増加するであろう小児花粉症患者には朗報となる。現在まで舌下免疫療法における治癒の可能性は明らかになっていないが、より長期での検討や抗原量などの問題から治癒の可能性も探って行かねばならない。また丸山ワクチンアジュバント免疫療法を実際に臨床試験として施行し始めた事は新しい免疫療法の開発の基礎の臨床試験となる事が期待され、その臨床効果の解析を待ちたい。

免疫療法をターゲットにした治療効果の検証として、ヒスタミン遊離試験、末梢血からの主要アレルゲン特異的サイトカイン産生、抗原特異的メモリーT細胞のサイトカイン産生能など評価された。どれも今後の治療の評価法の基礎となる実験が進み、今後さらに簡便な方法を開発する事が必要であると考えられた。新規の治療法としてもBLyS中和抗体で鼻粘膜のアレルギー反応抑制の可能性が示唆され、実際の医療現場で使用可能かどうか今後の課題である。

リアルタイムモニターとQOL、そして新しい治療法の開発という広いテーマでの研究班であるが、舌下免疫療法を中心として成果を残した。患者に提供される花粉飛散とQOLの関連性の啓蒙活動や、新たな治療法である舌下免疫療法を実際に患者に使用できる

よう今後のストラテジーが必要である。

E. 厚生労働省の研究班としては花粉のリアルタイムモニターは精度の問題から新マトリックスに基づき、今後正しい補正をし、花粉情報を発信しなければならない。リアルタイムモニターの値はその日の症状には呼応するが、QOL（治療前、治療後）には直接結びつかない場合もあるが、長期的に見るとQOL、症状とも相関する傾向がある。またこの値は花粉症における鼻や眼以外の症状にも関連する事が明らかとなった。この鼻眼以外症状では「口が渇く」が男女とも最も多く、性別では男性に「イビキをかく」、女性には「皮膚がかゆい」が多かった。

副作用の少ない根治を目指した舌下免疫療法では1年目の効果は二つのRCT試験で検証された。根治を目指した経年的なRCTから2年目の臨床試験のデータは決して良くなかったが、1年目より投与総抗原量が減少した事が問題と考えられた。また小児に対する舌下免疫療法が成人と同じプロトコルで安全にしかも高い効果で施行できた。丸山ワクチンアジュバント免疫療法を実際に臨床試験として施行し始めた事は新しい免疫療法の開発の基礎の臨床試験となる事が期待され、その臨床効果の解析を待ちたい。研究全体を通して治癒可能な免疫療法の可能性を追求できた。この免疫療法の治療効果の検証もヒスタミン遊離試験、末梢血からの主要アレルゲン特異的サイトカイン産生、抗原特異的メモリーT細胞のサイトカイン産生能などを検証し、今後の評価スタンダードとなるように検討を続ける。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 国内

口頭発表 61件

原著論文による発表 24件

それ以外（レビュー等）の発表 26件

そのうち主なもの

論文発表

大久保公裕、岡本美孝、増山敬祐：季節性鼻アレルギー

ギー患者に対する塩酸フェキソフェナジンとプロピオン酸フルチカゾンとの併用療法の検討—QOL 質問票による評価—アレルギー・免疫 12: 96-107, 2005.
大久保公裕、永倉俊和、臼井秀夫、八木尚子、横森淳二、植地泰之、永田傳：小児花粉症患者におけるプロピオン酸フルチカゾン（小児用フルナーゼ点鼻液 25）の有効性、安全性、及び鼻炎 QOL の検討アレルギー・免疫 12: 148-161, 2005.

大久保公裕：アレルギー性鼻炎の QOL について—抗ロイコトリエン剤の有効性—。日気食会報 56. 2(4月)：194-196, 2005.

学会発表

Okubo K, Okamoto Y, Masuyama K, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Gotoh M: Randomized placebo controlled trial of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. Symposium 7.

Immunotherapy, update and future. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会（東京）2006. 5

後藤穰、大久保公裕：花粉症に対する舌下免疫療法・液剤（耳鼻咽喉科領域における免疫寛容・減感作療法の最前線）第 55 回アレルギー学会総会 シンポジウム

後藤穰、大久保公裕：スギ花粉症に対する舌下免疫療法 第 25 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会シンポジウム

後藤穰、大久保公裕：スギ花粉症に対する舌下免疫療法の二重盲検比較試験 第 56 回日本アレルギー学会秋期学術大会シンポジウム

2) 海外

口頭発表 10 件

原著論文による発表 22 件

それ以外（レビュー等）の発表 7 件

そのうち主なもの

論文発表

Delaunay, J., Sasajima, H., Yokota, M., Okamoto, Y. Side-by-side comparison of automatic pollen counters for use in pollen information systems. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 98, 553-558, 2007.

Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, Tsubaki S, Fujita M, Suematsu K, Gotoh M, Okubo K: Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in an artificial exposure chamber (OHIO chamber). *Allergology International* 56(2): 125-130, 2007.

Takahashi N, Yamada T, Narita N, Fujieda S: Double-stranded RNA induces production of RANTES and IL-8 by human nasal fibroblast. *Clin Immunol* 118:51-8, 2006.

Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T, Horiguchi S, Urasaki Y, Matsuki T, Fujieda S: Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 177(7): 4841-4852, 2006

Okubo K, Gotoh M: Inhibition of the antigen provoked nasal reaction by second-generation antihistamines in patients with Japanese cedar pollinosis. *Allergology International* 55: 261-269, 2006.

Okubo K, Ogino S, Nagakura T, Ishikawa T: Omalizumab is effective and safe in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Allergology International* 55: 379-386, 2006.

Okubo K, Gotoh M, Shimada K, Ristu M, Okuda M, Crawford B: Fexofenadine improves the quality of life and work productivity in Japanese patients with seasonal allergic rhinitis during the peak cedar pollinosis season. *Int Arch Allergy Immunol* 136: 148-154, 2005.

Gotoh M, Okubo K: Sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Allergology International* 54: 167-171, 2005.

Okuda M, Ohkubo K, Goto M, Okamoto Y, Konno A, Baba K, Ogino S, Enomoto M, Imai T, So N, Ishikawa Y, Takenaka Y, Manndai T, Crawford B: Comparative study of two Japanese rhinoconjunctivitis quality-of-life questionnaires. *Acta Oto-Laryngologica* 125: 10. 736-744, 2005

Gotoh M, Okubo K, Okuda M: Inhibitory effects of facemasks and eyeglasses on invasion of pollen particles in the nose and eye: clinical study. *Rhinology* 43, 8: 266-270, 2005.

Ishikawa T, Okamoto Y, Masuyama K: Nasal immunologic reactivity, rhinitis, and polyps. In: *Mucosal Immunology*, edited by Mestecky J, et al., Elsevier Academic Press, MA, 2005, pp1497-1508

学会発表

Okubo K, Gotoh M, Okuda M: Epinastine hydrochloride protects the nasal reactivity by provocation tests with Japanese cedar pollen allergen better than placebo and fexofenadine hydrochloride. 19th World Allergy Congress, Munch, Germany, 2005. 6

Osawa Y, Iho S, Takatsuka H, Matsuki T, Fujieda S, Yamamoto S: NF-kappaB/p38 MAPK-dependent and -independent pathways are involved in CpG

DNA-induced IFN-alpha, CXCL10, and CCL3 production in human pDC. ICS2005 2005. 10.

Tang H, Fujita T, Habe K, Okubo K, Hashiguchi K, Ishikawa T, Okuda M: Development of an artificial exposure chamber system using Japanese cedar pollen. XXV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Vienna, Austria. 2006.6

Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, Tsubaki, Fujita M, Koshino T, Suematsu K, Ohkubo K: Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in an artificial exposure chamber (OHIO chamber). XXV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Vienna, Austria. 2006.6

Mishina T, Yuta A, Suzuki A, et al. Clinical effects of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. -Results of the first trial year-. 11th Asian Research Symposium in Rhinology, Seoul, Korea 2006. 12.

Yuta A, Hattori R, Sakakura Y, et al. The effects of anti-allergic drugs on histamine release from basophils. 11th Asian Research Symposium in Rhinology, Seoul, Korea, 2006. 12

Okubo K: The future is with sublingual immunotherapy. XX World Allergy Congress, Bangkok, Thai, 2007.12

知的財産権の出願・取得状況

1 特許取得

1. 抗原暴露室システム 国際出願番号
PCT/JP2005/017865 2005年9月28日
2. 抗原暴露室の抗原供給装置 国際出願番号
PCT/JP2005/017866 2005年9月28日
3. 抗原暴露室およびその洗浄・乾燥方法 国際出願番号 PCT/JP2005/017867 2005年9月28日
4. スギ花粉症の診断方法 特願
2006-288853 2006年10月24日

2 実用新案登録

なし

自動花粉測定器の問題点とその改善に向けての検討、舌下免疫療法の有効性の検討、 ならびにスギ花粉症発症へのインフルエンザウイルス感染の影響についての検討

分担研究者 岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 教授

研究協力者 吉江 うらら 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員

米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員

横田 匡彦 ウェザー・サービス株式会社

古保 静男 NTT 環境エネルギー研究所

Delaunay Jean-Jacques 東京大学大学院工学系研究科 機械工学専攻 助教授

研究要旨

リアルタイムで正確、詳細な花粉飛散情報を得るために自動花粉測定器の役割が期待されるが、現在の自動測定器にはいずれも花粉と空中浮遊粒子 (SPM) との識別能力に大きな問題がみられた。自動花粉測定器の精度の向上のため、測定器に花粉のみの暴露、SPM のみの暴露検討を行って花粉粒子識別率、土粒子誤認率を算定し、これから新たな花粉識別補正式 (新マトリックス) を作成した。本式を用いて検討を行ったところ、花粉非飛散期のノイズの減少、飛散期のダーラム法との高い相関がみられ、黄砂の影響についても影響が軽減され、精度の改善がみられた。地域毎に機器の SPM 誤認率の検討を行ない補正式を作ることで、自動花粉測定器の精度の向上を得ることが期待される。一方、2年間舌下免疫療法を実施している患者の有効性を臨床スコアから評価したが、有意差は明らかではなかった。また、スギ花粉症を初めて発症した患者の背景因子としてインフルエンザウイルス感染についても検討を行ったが、罹患の影響は明らかではなかった。大規模な前方視研究が望まれる。

A 研究目的

正確、詳細な花粉飛散情報の提供は、花粉症患者の花粉暴露の回避、ひいてはセルフケアの向上に意義は高い。また、詳細な花粉飛散予防の構築にも不可欠である。これまで飛散花粉の測定はダーラム法やバーカード法により自然落下や吹き付けにより、スライドグラスやテープ上に付着した花粉を染色後、検鏡によるカウントにより行われてきたが、手間がかかり、またリアルタイムでの測定は出来なかった。そこで最近、一定量の大気を吸引しながらその中に含まれる花粉を、大きさ、形状、偏光度、あるいは花粉の放つ自然蛍光などを利用して他の空中浮遊物質と鑑別して測定する自動花粉測定器が開発されている。これらの自然花粉測定器はリアルタイムで花粉を測定することが可能で、詳細な飛散情報の提供に有効な手段となることが期待されている。しかし、

これらの測定器の性能について十分な検討は行われていない。今回、これらの評価を行うことで、今後の改良と有効利用につなげることを目的として検討を行った。

B 研究方法

- 1) 現在開発されている自動花粉測定器, NTT 社製 (NTT), 大和製作所製 (KH3000), 興和社製 (KP1000), 神栄社製 (Shinei), NTT による神栄社製改良型 (NTT-神栄: 平成17年のみ) を同一場所 (千葉大学医学部屋上) に設置し平成16年, 17年にスギ、ヒノキ花粉飛散時期に測定を行い、風向, 風速, 雨の影響, およびダーラム法、バーカード法との比較に関する検討を行った。
- 2) 平成18年は、千葉大学医学部屋上に神栄センサーならびに KH3000 を設置して、ダーラム法による飛散カウントとの比較、さらに降雪の影響、黄砂の影響について検討を行った。また、花粉非飛散時の神栄センサーが SPM を花粉粒子と識別してしまう誤認率を計算し、さらに花粉曝露室

内に置いたときの花粉粒子識別率から、花粉識別判別式により花粉と識別された粒子数を計算し、新たな補正式を算出し、本式を用いた花粉飛散の検討を行った。舌下免疫療法の二重盲検試験(大久保班)は平成16年から行った患者のうち実薬投与群についてさらに維持量での投与を平成17年1年間継続して行い、本年の症状について検討を行った。

- 3) 平成18年に千葉県南房総市(旧丸山町)で、丸山小学校5年生全員、丸山中学校1,2年生全員を対象に、抗体検査、アンケート調査から本年スギ花粉症を発症した生徒のこの1年間のインフルエンザウイルス罹患について調査を行った。
- 4) 平成19年1月の千葉市及び成田市での花粉非飛散期の測定データから空中浮遊粒子を花粉と識別してしまう誤認率を算出し、花粉見逃し率から新たな補正マトリックスを作成した。また、2005年、2006年についても両市での同機種による全粒子数、花粉測定数から同様の検討を行った。

(倫理面への配慮)

学童に対するスギ花粉症調査、インフルエンザウイルス感染の罹患についてのアンケート調査は、保護者の文書同意を得て行った。舌下免疫療法については、千葉大学大学院医学研究院倫理委員会の検討を得て、参加希望者に十分な説明を行い、文書による同意を得て行った。

C 研究結果

- 1) KP1000を除き、他の機種の性能は比較的類似しているが、空中浮遊粒子との識別能には問題が残されている。
- 2) KP1000は感度が低く、少なくとも使用した測定器の使用は困難であった。
- 3) 現状では価格や維持費も考慮した機種の選定が必要であり、また可能であれば異なった

機種を併設することで測定値の補正を検討していくことが望ましい。

- 4) センサーの改善を目的に、花粉粒子識別率、土粒子の誤認率から新たな補正式を作り、本式を用いて花粉飛散の検討を行ったところ、ダーラム法との相関が著しく向上し、かつ黄砂の影響も軽減した。
- 5) 舌下免疫療法2シーズン目の鼻症状スコアを検討すると、全体として低値であった。対照として参考値であるが、本年飛散数期に別の舌下免疫療法でのプラセボ群と比較して低値を呈していたが、有意差は明らかではなかった。
- 6) 平成18年度スギ花粉症を初めて発症した患者の背景因子としてインフルエンザウイルス感染についても検討を行ったが、罹患の影響は明らかではなかった。

D 考察

- 1) これまで開発された花粉自動測定器の性能は比較的類似しているが、いずれも空中浮遊粒子の識別の点で改良の余地が残されている。今後、各測定器の精度向上が大きな課題であるが、現状では価格や維持費も考慮して設置を検討し、可能であれば異なった機種を併設して補う形で補正を検討すべきである。
- 2) この改善の一つとして地域毎の機種によるSPM誤認率を計算して補正式を作ることで可能性が期待される。
- 3) スギ花粉症発症へのインフルエンザウイルスの影響についても明らかではなかったが、今後さらに検討対象数を増やして検討する必要がある。

E 結論

現在の自動花粉測定器は、いずれの機種も空中浮遊微粒子と花粉との識別能に大きな問題がある。すぐには性能を大幅に向上した機種の開発は容易ではなく、現行のもの改善のはかることがまず必要であり、今回検討したような新たな補正式の検討が有用であろう。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

- ・岡本美孝、自動花粉測定器を用いたリアルタイム花粉測

定をその問題点、アレルギー科、2007

- Delaunay,J., Sasajima,H., Yokota,M., Okamoto,Y. Side-by-side comparison of automatic pollen counters for use in pollen information systems. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 98,553-558 (2007)

2. 学会発表

- 米倉修二, 岡本美孝, 横田匡彦, 高橋雪江, 渋井隆嗣. 黄砂、降雪の花粉自動測定器への影響. 日本鼻科学会, 2006年9月, 四日市
- 吉江うらら, 米倉修二, 堀口茂俊, 岡本美孝, 横田匡彦, 高橋雪江, 渋井隆嗣, J.J.Delaunay. 粉自動測定器の問題点とその改善に向けての検討, 日本アレルギー学会, 2007年11月, 横浜

H 知的所有権の出願・取得状況

なし

花粉自動測定器の特徴					
	大和 (KH3000)	NTT	呉和 (KP1000)	神栄	NTT-神栄
花粉粒子識別手産	-粒径の識別 -形状(長-短径)の識別	-粒径の識別	-粒径の識別 -重光による識別	-粒径の識別 -偏光による識別	-粒径の識別 -偏光による識別
砂塵除去手産	-砂塵を容器により10μ以下の粒子除去	-2段階の分別手段で10μ以下、50μ以上の粒子を分別	-バーチャルインバクターを使用して塵粒子を除去	-100μ以上の大粒子フィルターの使用	-100μ以上の大粒子フィルターの使用
吸気吸入量	4.1ℓ/分	30ℓ/分	4ℓ/分	0.9ℓ/分	2.2ℓ/分

問題点: ・ノイズが大きい - 微粒子をカウントしている
 ・特に花粉飛散が少ない時にダーラム法との相関が低い
 (相関係数0.3~0.5)

センサー補正值パラメータ

	90%値 全花粉数 ＜ラボデータ＞	誤カウント数 90%値 ＜1月センサー データ＞	花粉見 逃し率	花粉誤 認識率	相関 ＜2/1～4/30＞	平均 90%値 全粒子数 ＜2/1～4/30＞	ダーク 平均値 ＜2/1～4/30＞
2006							
成田 Shinyei	0.507	0.0342	2.1	0.073	0.91	0.047	13
2007				↓ノイズ減少			
成田 Shinyei	0.507	0.0303	2.1	0.064	0.80	0.091	30
千葉 Shinyei	0.507	0.0308	2.1	0.065	0.77	0.045	24



$$\text{花粉数} = \text{para1} \times 90\% \text{値} - \text{para2} \times \text{全粒子数}$$

新マトリックスの効果

場所	観測年	センサー	現マトリックス	新マトリックス
千葉	2007年	NTT-Shinyei	0.49	0.69
千葉	2007年	Shinyei	0.50	0.77
成田	2007年	Shinyei	0.76	0.80
千葉	2006年	NTT-Shinyei	0.43	0.79
千葉	2006年	Shinyei	0.54	0.84
成田	2006年	Shinyei	0.54	0.91
千葉	2005年	NTT-Shinyei	0.70	0.71
千葉	2005年	Shinyei	0.74	0.73

Side-by-side comparison of automatic pollen counters for use in pollen information systems

Jean-Jacques Delaunay, PhD*; Hajime Sasajima, BS†; Yoshitaka Okamoto, MD‡; and Masahiko Yokota, BS§

Background: Recent effort to build an unmanned pollen monitoring network in Japan has led to new developments in automatic pollen counters. In-the-field performance tests of these automatic counters have not been reported.

Objective: To characterize recently developed automatic pollen counters, with a view of using their data in pollen information systems.

Methods: We performed side-by-side comparisons between 2 recently developed automatic pollen counters and 2 reference samplers at 2 sites during the 2005 pollen season.

Results: Both automatic counters were found to have similar overall performance in terms of their correlations with the reference samplers. The linear correlation coefficient between the hourly values of the counters and one of the reference samplers was larger than 0.8 at both sites for both counters. Although these results are encouraging, our analysis also points to weaknesses of the investigated automatic counters in the areas of pollen discrimination, minimum measurable concentration, and calibration. Both counters were found to be affected by large concentrations of particulate matter, although the conditions and extent to which the particulate matter disrupted the measurements differ for the 2 sensors. The effect of particulate matter is particularly noticeable at the start and end of the pollen season, that is, when pollen concentration is low relative to particulate matter concentration. Further, it was found that one of the automatic counters could not differentiate snow particles from pollen grains.

Conclusions: The tested automatic pollen counters had good overall performances, but weaknesses in the areas of pollen discrimination, minimum measurable concentration, and calibration still have to be addressed for these counters to find widespread use in the allergy community.

Ann Allergy Asthma Immunol. 2007;98:553–558.

INTRODUCTION

Monitoring of airborne pollen has recently attracted much attention because of its potential contribution to both allergen avoidance measures by providing individuals with allergy with pollen alerts¹ and the evaluation of cross-pollination between genetically modified crops and their wild relatives.^{2,3} Automatic pollen monitoring has only been introduced recently in Japan in an attempt to provide the general public with alerts for Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) pollen. The cedar and cypress tree species are major sources of airborne pollen, carrying potent allergens that have been reported to be the main cause of pollinosis in Japan.⁴ Today, it is estimated that more than 1 in 10 Japanese citizens has pollinosis. Further, the cedar and cypress pollen share a common antigen (70% of Japanese patients with cedar pollen allergy also developed cypress pollinosis) and have their season shifted in time but overlapping so that the pollen season of the combined cedar and cypress pollen is unusually long. The cedar pollen season

starts in February and ends in the beginning of April, whereas the cypress pollen season starts in March and can last until the beginning of May, thus making a pollen season of approximately 12 weeks, twice as long as the typical 6-week ragweed pollen season. Thus, cedar and cypress allergy patients are exposed to pollen for a long time, making the development of a pollen alert system desirable. Current pollen alerts are generated by information systems that use the data collected by a network of automatic pollen counters as one of their model inputs to compute pollen forecasts.^{5–7} Besides the application in allergy prevention, the spread of transgenes through pollen of genetically modified crops needs to be monitored to evaluate the impact of genetically modified crops, which could lead to disruption of natural habitats.^{2,3} The environment evaluation of genetically modified crops requires detailed data on pollen dispersal that can only be collected with an automatic network of pollen counters.

Automatic pollen counters that are widely used in Japan include the KH3000 (Yamato, Yokosuka, Japan),⁸ Kowa (Hamamatsu, Japan),⁹ and NTT (Tokyo, Japan)¹⁰ counters. Recently, a new pollen counter developed by Shinyei Corporation (Kobe, Japan) was introduced on the market and has triggered much interest because of its new pollen discrimination principle and its low cost. The design of the new automatic counter is based on the design of the standard particle counter in which a defined volume of air is circulated through a fine pipe that is intersected by a laser beam. When

* Department of Mechanical Engineering, The University of Tokyo, School of Engineering, Tokyo, Japan.

† Akita Prefectural Institute of Public Health, Akita, Japan.

‡ Department of Otolaryngology, Chiba University, Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan.

§ Weather Service Inc, Tokyo, Japan.

Received in revised form December 27, 2006.

Accepted for publication December 29, 2006.

a particle passes through the laser beam, a scattered signal is detected, the intensity of which is related to particle size and optical index. The measured intensity of the scattered light can be related to particle size. In addition to the scattered intensity, the Shinyei counter includes a measure of the change in the polarization state of scattered light, which is known to be related to the particle shape and its internal structure. Pollen grains generate intensity and polarization signals that are different from those of nonpollen particles, so that pollen can be recognized from these 2 measures. The application of this pollen recognition principle may lead to some errors, because it was recognized that under certain circumstances (types of particulate matter) some overlapping between the scattered intensity and polarization values of pollen and particulate matter takes place. The KH3000 counter uses the spherical shape of pollen grains to discriminate them from other particles (the nearly perfect spherical shape of pollen is not found in particulate matter that lacks a biological origin such as sand and soot). To discriminate spherical particles from others, 2 laser beams and their respective detectors are used to measure the intensity of the scattered light from the same particle but measured at 2 different incident angles. If the particle is spherical and homogeneous, the 2 intensities will be the same. The existing automatic counters together with their main characteristics are listed in Table 1. Extensive comparisons against reference samplers, such as the gravimetric Durham sampler and the volumetric Burkard sampler (Burkard Manufacturing Co, Rickmansworth, England), remain scarce, resulting in poor characterization of actual counter performance in the field and, therefore, in ambiguity as to how the data should be used in a pollen information system. The new counter introduced by Shinyei and the lack of data on actual performance of the available counters prompted us to conduct our own side-by-side comparison.

MATERIALS AND METHODS

During the cedar and hinoki pollen season of 2005, we conducted extensive side-by-side comparisons between the KH3000 and Shinyei automatic pollen counters and the Durham and Burkard reference pollen samplers. Our measurement campaign was performed at 2 different sites, namely, on the roof of a 4-story building in the Chiba University Campus (140.133° east and 35.602° north) and on a 5-story building of the Akita Health Institute (140.898° east and 39.717° north). The measured items together with the measurement periods are given in Table 2. Although the

Burkard samplers used at both sites were of a different type, they were of a similar design except for the vacuum source, which uses a fan in the old version (7-day spore trap) and a mechanical pump in the new version (SporeWatch trap). The pollen counts on the Melinex tape used in the Burkard samplers and on glass slides used in the Durham samplers were performed under a microscope at a magnification of $\times 400$ by trained staff. Both cedar and hinoki pollen grains were counted, because the automatic counters do not distinguish these pollen species, which are similar in size and shape. Durham daily counts were only available at the Chiba site and were determined by observing an area of 1 cm² (in this case, cedar and hinoki were counted separately). For the Burkard counts, the observed areas of the Chiba data and the Akita data were 0.5 \times 5 mm² and 2 \times 14 mm², respectively. The KH3000 counters were operated with a sand gravimetric trap, which is thought to filter out yellow sand particles originating from deserts in China and Mongolia and sporadically blowing across Japan. The actual performance of the sand trap with regard to discrimination between pollen and sand has not been reported to our knowledge. The recently developed Shinyei pollen counter¹¹ exists in 2 versions: the original version, referred to as Shinyei, which has to be placed in a weather instrument shelter, and a modified version, referred to as NTT-Shinyei, which has a higher flow rate and is protected by an all-weather casing. The measurement results obtained with the original version of the NTT counter¹⁰ are not shown because the NTT counter was updated to the NTT-Shinyei counter. The KP1000 Kowa counter⁹ was found to be difficult to operate during a long period (we have had experience during 2 cedar pollen seasons) because of high running cost and repeated failures, so we decided not to include data from this counter in our study.

RESULTS

Figure 1 shows the variation in time of the daily deposition count and the average daily concentration for the Chiba site. The deposition count was determined by using a Durham sampler and counting separately cedar and hinoki pollen grains. The average daily concentration was obtained by averaging hourly concentrations measured by the automatic pollen counters. These counters cannot distinguish cedar from hinoki pollen grains and thus should be compared with observations of the total count of cedar and hinoki pollen grains. As shown in Figure 1, the hinoki pollen contribution to deposition counts was significant from the middle of March and predominant at the end of March. For the Akita

Table 1. Main Characteristics of the Most Widely Used Automatic Counters and the Burkard Reference Sampler

Counter	Measurement principle	Pollen discrimination	Flow rate, L/min
Burkard	Impactor and microscopy	Microscope observation	10
KH3000	Scattering from 2 beams	Spherical shape	4.1
Kowa	Scattering and fluorescence	Size and fluorescence	4.0
Shinyei	Scattering and polarization	Size and shape	0.9 (original), 2.2 (NTT-Shinyei)
NTT	Scattering	Size	30

Table 2. List of Instruments and Their Period of Operation at Both Measurement Sites

Site (period of operation)	Durham	Burkard	KH3000	Shinyei
Chiba (1/24/05–4/24/05)	C	3/25–3/30 (SporeWatch, 1-hour sampling)	C (with sand filter)	C (NTT-Shinyei)
Akita (3/28/05–4/25/05)	NA	C (7-day sampler, 2-hour sampling)	C (with sand filter)	C (Shinyei original)

Abbreviations: C, complete dataset; NA, dataset not available.

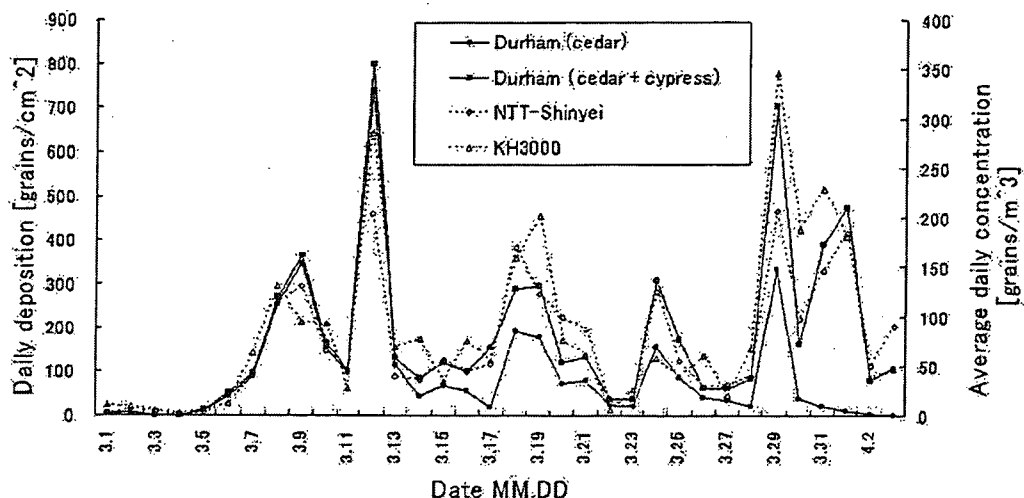


Figure 1. Comparison between daily deposition and daily average concentration of pollen at the Chiba site for the complete pollen season. The daily deposition counts for the cedar and hinoki total and for the cedar only are shown to illustrate the contribution of hinoki to the total count of pollen. Average daily concentrations were computed from hourly concentration values measured by automatic counters.

site, hinoki pollen contribution is known to be negligible during the entire pollen season because of the quasi-absence of the hinoki species in this area. From Figure 1 it is clear that the variations in daily deposition counts determined by the Durham reference sampler are well reproduced by the variations in the daily average concentrations of the automatic counters. Note that the relation between deposition and concentration depends on local factors, such as irregular topography and micrometeorological conditions, and is therefore varying over space and time. In our comparison, we assume the average over a day of these factors to be constant. The linear correlation coefficients between the Durham counts and the concentrations of both automatic counters were higher than 0.9, strongly suggesting that the automatic counters correctly approximate daily pollen variations.

Figure 2 shows the pollen concentration time series as measured with the automatic counters and the reference sampler at both sites. Timing of the pollen bursts are well reproduced by the 2 automatic counters. This is further evidenced by the high values of the linear correlation coefficients between the counters and the reference sampler. For the Chiba data, both a Shinyei and a NTT-Shinyei counter were used and the correlations were computed on hourly concentrations. For the Akita data, a Shinyei module was used and the correlations were computed on 2-hour average concentrations. At the Chiba site, the linear correlation coefficients

were 0.89, 0.92, and 0.90 for the KH3000, Shinyei, and NTT-Shinyei counters, respectively. At the Akita site, the linear correlation coefficients were 0.83 and 0.81 for the KH3000 and Shinyei counters, respectively. It also appears from Figure 2 that the intensity of the burst is not always well determined by the automatic counters. All counters underestimated pollen concentrations, pointing to calibration problems in the automatic counters. Small variations in pollen concentrations (<100 grains/m³) as measured by automatic counters did not compare well with those determined with the reference sampler. In the Akita time series of Figure 2b, we found a high correlation between a sleet episode recorded by the Japan Meteorology Agency on March 29 to 30 and high counts of the KH3000. During this sleet episode, no pollen was observed in the Burkard reference concentration series. This strongly suggests that the KH3000 counted snow particles as pollen grains. This phenomenon was not observed with the Shinyei counter.

In Figure 3 and Figure 4, we examine in more detailed measurement errors in pollen concentration determined by the automatic counters for the Akita series. The concentrations measured by the automatic counters were first corrected for bias introduced by calibration errors using a linear calibration curve between the reference and the automatic counters, and then the residuals were computed and used to derive the absolute errors between the automatic counters and

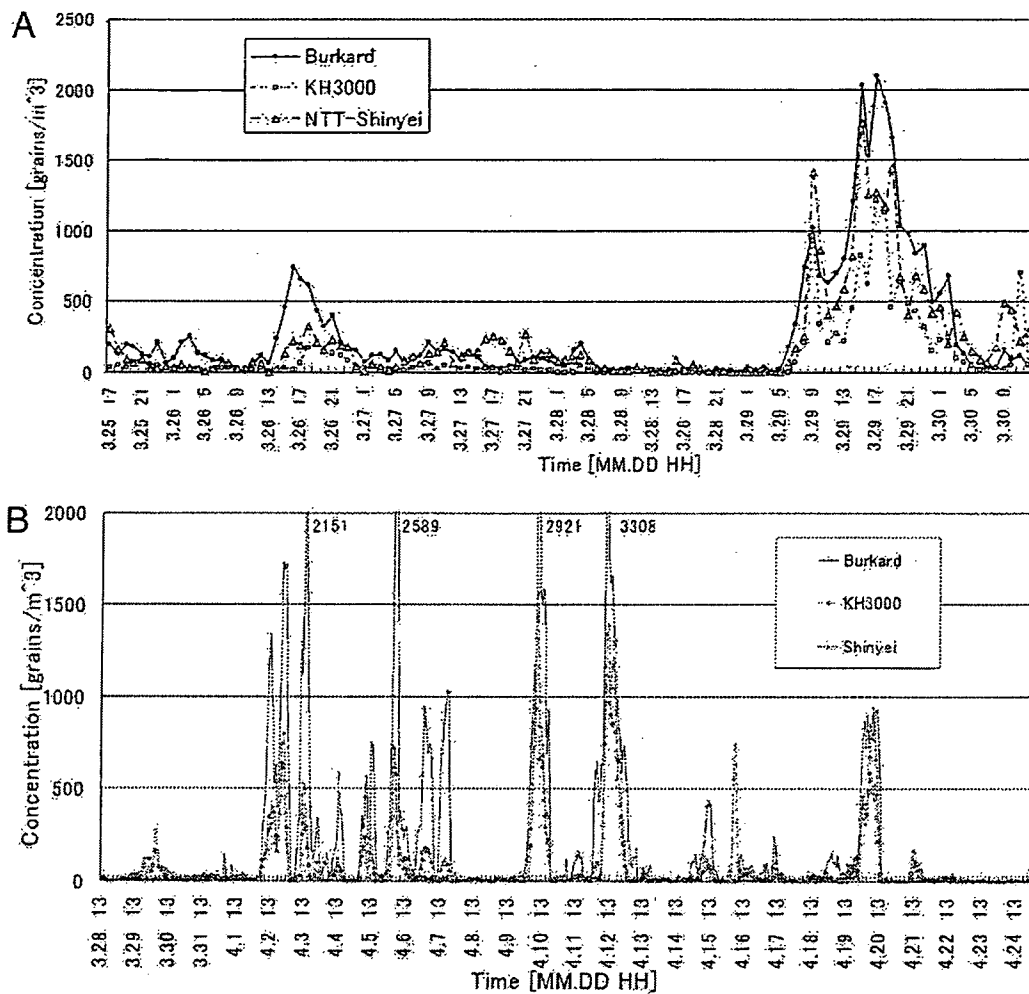


Figure 2. Comparison between pollen concentrations measured with a Burkard, KH3000, and Shinyei counter at the Chiba site (A) and the Akita site (B). In section B, the maximum value of the concentration axis was set to 2,000 grains/m³ to make visible the variations for all counters (actual values for the Burkard counts that fall outside the plotted range are indicated on the right side of each peak). The 1-hour average and 2-hour average of pollen concentration are plotted for the Chiba site and the Akita site, respectively.

the reference sampler. Figure 3a-b shows detailed time variations in the corrected concentrations together with the reference concentration for a low-concentration region and a high-concentration region of the Akita series, evidencing poor (good) correlation between the automatic counters and the reference sampler for the low (high) concentration region. Figure 4 shows the absolute errors in concentration measurement between the automatic counters and the reference sampler as a function of the averaged concentration. The curves indicated as "observed" refer to errors estimated from differences between the reference sampler and the automatic counters, whereas the curves indicated as "statistical" refer to errors estimated from the theory of statistical fluctuations. When counting airborne pollen grains, unavoidable statistical fluctuations in the observations result from the random nature

of the observed process. These fluctuations are not related to any instrument error; that is, an estimate of the statistical fluctuations gives the lower limit to the measurement error for an ideal instrument. An estimate of the fluctuation error can be obtained from the SD of the observation distribution, which is known to follow a Poisson distribution in a counting experiment. The SD of a Poisson distribution is the square root of the mean of the counted events, which was used to compute the statistical errors of Figure 4. The difference in the statistical errors between the 2 automatic counters is explained by a difference in the sampled volumes (see the flow rate column of Table 1), that is, a difference in the number of counted pollen grains for the same concentration. For both automatic counters, the observed errors are found to be much larger than the statistical errors, pointing to the