

室内アレルゲンの測定法

Measurement of Indoor Allergens

NPO法人東京アレルギー・呼吸器疾患研究所 環境アレルゲン研究班 班長
環境アレルゲンinfo and care株式会社 代表取締役

白井 秀治

Hideharu Shirai (Lerder of environmental allergens dept./ CEO)

Tokyo Allergy & Respiratory Disease Research Institute / Environmental Allergy Info and Care

麻布大学獣医学部獣医学科微生物学第一研究室 教授 **阪口 雅弘**

Masahiro Sakaguchi (Professor)

Department of Veterinary Microbiology School of Veterinary Medicine, Azabu University



キーワード

ダニ、室内アレルゲン、酵素免疫測定法

01 | はじめに

室内におけるダニや真菌および室外におけるスギ花粉に代表される環境アレルゲンの暴露は、アレルギー疾患の増加に重要な関係があると考えられる。また室内でイヌやネコなどのペットを飼育する家庭では、室内塵中や空中浮遊粒子のペットアレルゲン量が、非飼育家庭に比べ多いことが報告され、ペットアレルギーの発症にそれらが関わると考えられる。アレルギー疾患における対策の基本は、原因アレルゲンの除去と回避である。そのため、アレルゲンの汚染状況を把握することは、原因への対応を進める上で有益な情報となる。家庭内におけるアレルゲン汚染の測定は、主に室内塵を対象に行われているが、個人暴露量の評価として空中浮遊アレルゲン量の測定法が開発されてきた。本稿では、室内環境におけるアレルゲンとその測定方法について概説する。

の花粉は、屋内への流入や人による持ち込みがあり、しばしば屋内におけるアレルゲンとしても重要であると考えられる。

2-1 ダニ

アレルギーの原因として重要なダニは、チリダニ科のヤケヒョウヒダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*)とコナヒョウヒダニ(*D. farinae*)の2種である。これらのダニは、寝具、敷物、布製の室内インテリア用品に多く生息する。そしてそれから回収される室内塵からは、ダニの糞や死骸が検出される。このダニの糞や死骸に含まれるタンパク成分の内、排泄物由来(Cystein protease)の分子量25,000のDer p 1/Der f 1 (グループ1アレルゲンとしてDer 1)と、虫体由来(Niemann-Pick Type C2 protein)分子量14,000のDer p 2/Der f 2 (グループ2アレルゲンとしてDer 2)が、ダニにおける主要なアレルゲンである。現在、ダニのアレルゲンについては、20を超えるアレルゲンが同定されている。

2-2 ペット

ペットとしてネコやイヌを飼育している場合、ペット由来のアレルゲンが室内塵、または空中から検出される。それらのアレルゲン量は、ダニアレルゲンの量よりも多いことがある²⁾。ペットに関わるアレルゲンとして、ネコの主要アレルゲンであるFel d 1は分子量19,000の糖タンパクである³⁾。イヌの主要アレルゲンであるCan f 1は分子量19,200のタンパクである⁴⁾。

2-3 花粉

日本ではスギやヒノキなどの樹木、ブタクサやオオアワガエリなどの草による花粉症が地域によって違いがあるが報告され、その他職業性の花粉症も報告されている。花粉の飛散時期から飛散終了後しばらくは、室内塵から花粉由来のアレルゲンが検出される例がある。日本ではスギ花粉症が最も重要な花粉症であり、そのスギ花粉のアレルゲンとしては、分子量45,000-50,000の塩基性糖タンパクのCry j 1⁵⁾、45,000(非

02 | アレルゲン

アレルゲンとは、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患における原因となる抗原をいう。広義ではダニや花粉という物質を指すこともあるが、アレルゲン量の測定を行う際には、タンパク抗原そのものを指すこともある。

室内から回収される室内塵、いわゆるハウスダストからは、ダニをはじめネコ、イヌなどの動物や、花粉、ゴキブリ、真菌、そして食物などに由来するアレルゲンが存在する(表1)。これらの

表1 室内塵から検出される主要な環境アレルゲン

| | | |
|------|-----------------|----|
| ダニ | ペット(ネコ、イヌ、げっ歯類) | |
| ゴキブリ | 真菌 | 花粉 |
| 食品 | 化学物質 | |

中でもダニは、多くの家庭から検出される重要なアレルゲンである¹⁾。またスギなどの風媒花

還元下では37,000)の塩基性タンパクのCry j 2⁶⁾が報告され、Cry j 3も同定された。

2-4 食物

食物アレルギーとは、多くは経口的に摂取し、症状発症や増悪をきたす場合をいう。そして経気道又は経皮的な経路によって、食物またはその成分を摂取、あるいは接触することにより、アレルギーの症状が起こることもある。近年、室内塵に種々の食物アレルギーが含まれることや⁷⁾、食物が環境抗原として果たす役割⁸⁾が指摘されている。室内環境中の食物アレルギーが、感作やアレルギーの発症、そして症状悪化に関わることを考えると、食物アレルギーも環境アレルギーとみなすことが出来ると思われる。

03 | 室内アレルギーの発生要因と浮遊粒子

室内アレルギーにおいてダニアレルギーは寝具に特に多く存在し、それを含む寝具の上げ下ろしや、寝返りなどの行為によって空中に浮遊する^{9, 10)}。また、ペットを室内で飼育している場合、ペットがアレルギーの発生原因となることが考えられる。またペットが人の布団で人と共に寝る場合、寝具からペットアレルギーが検出される²⁾。このようにペットアレルギーで汚染された寝具では、布団の上げ下ろしや寝返りなどの発塵行為によって、ペットアレルギーが浮遊することが考えられる。

食物アレルギーについて、小麦粉などの粉体を例にすれば、調理時の発塵が汚染の原因となる。さらに小麦粉が調理時の着衣に付着すれば、着衣で行動する範囲において再浮遊することが考えられる。ヨーロッパでは、パン職人が小麦粉に暴露されることによる喘息を「パン屋喘息」として古くから報告され¹¹⁾、日本においても小麦粉吸入によるアレルギー患者の報告¹²⁾がある。また、家業が米屋であったコメ喘息患者では、精米時の米粉が浮遊粒子として気管支喘息の症状増悪に関与したと考えられたケースが報告されている¹³⁾。

04 | 浮遊アレルギー粒子と落下減衰

4-1 ダニとペットアレルギー

布団たたきによってダニアレルギーを浮遊させ、アンダーセンサンプラーを用いて浮遊粒子中のアレルギーの粒子径が調査された。ダニアレルギー(Der 1, Der 2)は、粒径7 μ m以上の粒子に約50%前後分布し、さらに5.5 μ m以上の粒径粒子に80%が含まれる。そして、発生した空中浮遊ダニアレルギー濃度は、発塵行為による浮遊以後、約10~15分で約50%に減衰し、30分後の残存率は10%程度になる(図1)。この減衰率は、Der 1とDer 2で大きく変わらないことから、Der 1とDer 2の空気中での動態はほぼ同じであると考えられた¹⁴⁾。一方、ネコアレルギー(Fel d 1)は、粒径が5 μ m以下の粒子が多く、ダニアレルギーに比べ粒子径が小さい傾向にある¹⁵⁾。そのためネコアレルギー粒子は、ダニアレルギー粒子に比べ、長時間空中に浮遊していると考えられている。

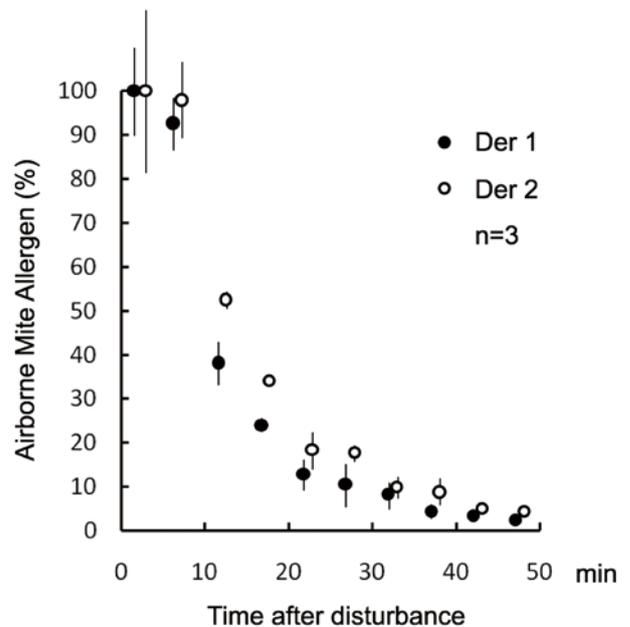


図1 ダニアレルギーの経時的減少曲線

4-2 スギ花粉

スギ花粉は屋外で発生するものであるが、人による室内への持ち込み、窓開け換気時における室内への流入があり、室内塵から検出されることがある。花粉飛散時期における室内外の花粉数の測定では、窓開けにより室内でも屋外の1/3ほどのスギ花粉が確認され、その飛散花粉数の変動は、屋外の変動パターンと非常によく似ていることが報告されている¹⁶⁾。

スギ花粉を顕微鏡するとスギ花粉粒子の多くは、直径約30 μ mの球形粒子として観察される。しかし、気流を制御した室内において花粉を散布して粒径別の落下減衰を観察すると、スギ花粉の粒径より小さな粒子、特に2 μ m前後の粒子が観察される。これらの粒子は、花粉粒子(30 μ mの球形粒子)に比べ落下速度が遅く、無換気下では1時間経過後も初期濃度の50%程の粒子の浮遊が認められる。

また屋外におけるスギ花粉の粒径分布の調査では、25 μ m以上の大粒径と5 μ m付近にピークのある二峰性を示し、室内では大粒子が少なく5 μ m以下の小粒子にピークが現れるとの報告もある¹⁷⁾。スギ花粉に関して粒子観察を行う際には、スギ花粉の形態を持たない粒子についても観察対象にすることが必要と思われる。

05 | アレルギーの評価方法

5-1 評価方法

環境汚染や浮遊粒子、室内塵などのアレルギーについて評価を行う場合、同定や計数を目的とした形態学的方法と、アレルギー(タンパク)による汚染量を測定する免疫学的方法に大別できる(表2)。

表2 環境アレルギー汚染の評価方法

| | |
|--------|--|
| 形態学的方法 | ダニ虫体数, pollen count |
| 免疫学的方法 | ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent assay)による単一アレルギー(主要アレルギー)の定量 |

形態学的方法は、鏡検によってダニや花粉の同定や計数、真菌では培養し同定、コロニー数の計数を目的に行われる。一方、免疫学的方法は、アレルゲンと特異的に結合する抗体の反応を利用した検出法で、濃度が既知の精製アレルゲンを用いて検量線を作成することで、試料中のアレルゲン濃度を定量することが可能である。特定のアレルゲンを認識する抗体は、そのアレルゲンにしか結合しない。そのため、無数にある種類のタンパクの中で、その抗体が結合するアレルゲンだけ認識することが可能になる(図2)。

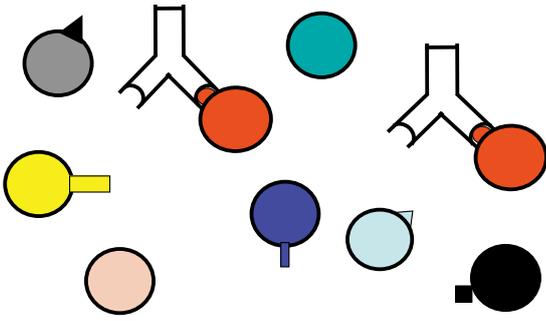


図2 アレルゲンとそのアレルゲンに対する抗体の反応
特定のアレルゲンに対する抗体は、そのアレルゲンだけと結合する。

5-2 ダニとダニアレルゲンの評価

ダニについて形態学的方法では、ヤケヒョウヒダニ(以下:Dp)やコナヒョウヒダニ(以下:Df)、その他のダニのように、ダニの種類ごとの計数や、卵、幼虫、若虫、成虫といったステージごとの計数、あるいは生ダニ、死骸、脱皮殻という状態での計数が行え、それぞれを個体数で表す。

一方、免疫学的方法では、DpとDfそれぞれの主要アレルゲンであるDer p 1、Der f 1、あるいはDer p 2、Der f 2を測定し、主要アレルゲン量として表す(表3)。

表3 定量法が報告されている主要な環境アレルゲン

| ダニ | Der p 1/Der f 1, Der p 2/Der f 2 |
|------|---|
| ネコ | Fel d 1 |
| イヌ | Can f 1 |
| ゴキブリ | Bla g 1, Bla g 2, Per a 1 |
| 真菌 | Asp f 1, Alt a 1 |
| 花粉 | Cry j 1, Cry j 2, Amb a 1, Phl p 5, Bet v 1 |

Der p 1とDer f 1はアミノ酸配列に高い相同性があり、臨床的にも高い交差反応性を持つ。しかし、DpとDfは生育における至適湿度が若干異なるため、室内環境中のDer p 1とDer f 1の汚染量は、必ずしも1:1の関係にはないと考えられ、どちらか一方のみの汚染しか認められない場合もある(図3)。そのため、環境汚染の測定では、Der p 1とDer f 1それぞれを測定し、その和をDer 1として環境汚染を評価する。人における臨床的な指標¹⁾としては、室内塵1g中のDer 1が2μg以上でダニアレルゲン感作の危険性があり、10μgを超えると喘息発作を誘発する危険性があるとされている(表4)。このダニアレルゲン量は、ダニ数と有意な相関が認められる(図4)¹⁸⁾。

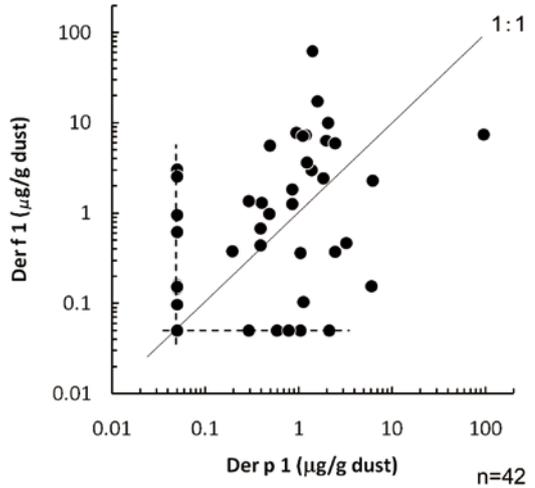


図3 室内塵中のDer p 1とDer f 1の分布

表4 喘息の危険因子としてのダニアレルゲン量

| 室内塵1グラムあたりのDer 1量 | 危険因子 |
|-------------------|-----------|
| 2μg | 感作の閾値 |
| 10μg | 喘息発作誘発の閾値 |

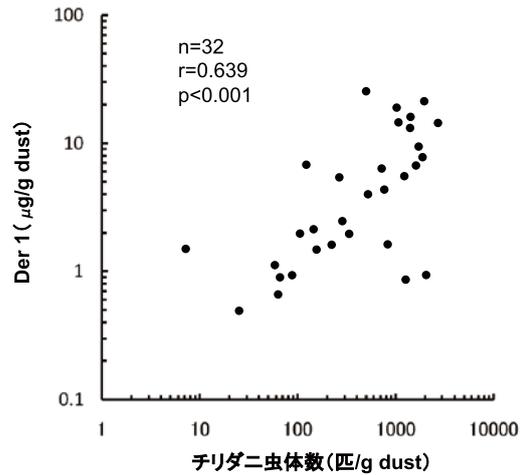


図4 チリダニ虫体数とダニアレルゲン量

5-3 花粉と花粉アレルゲンの評価

花粉について、形態学的方法では、鏡検により同定し個数を計数するのに対し、免疫学的方法では、スギ(*Cryptomeria japonica*)の花粉ではアレルゲンとしてCry j 1、あるいはCry j 2、ブタクサ(*Ambrosia artemisiifolia*)の花粉ではAmb a 1、オオアワガエリ(*Phleum pratense*)の花粉ではPhl p 5、シラカバ(*Betula platyphylla*, *Betula verrucosa*)の花粉ではBet v 1と、測定を行ったアレルゲン名を表す(表3)。

06 | アレルゲンの測定方法

免疫学的方法のうち、アレルゲンに対する特異抗体を用いてアレルゲンを測定する方法を、酵素免疫測定法(Enzyme-Linked immunosorbent assay: ELISA)という。ELISAは、測

定対象とするアレルゲンと特異的に結合する抗体の反応、すなわち抗原抗体反応を利用して測定を行う。具体的なステップとしては、アレルゲンと結合する抗体を酵素で標識し、アレルゲンと結合後に基質を反応させることにより、基質を発色させる。合わせて、既知の濃度の標準アレルゲンによる発色(吸光度)をもとに検量線を作製することで、試料中のアレルゲン濃度を定量する(図5)。

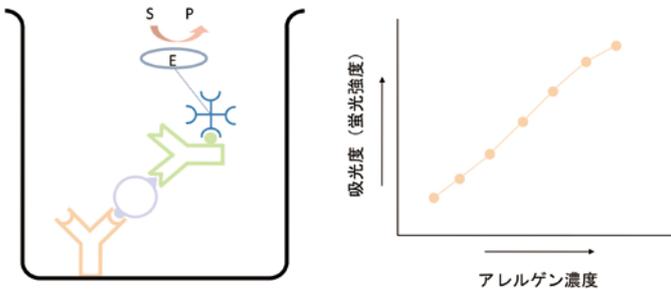


図5 ELISAによるアレルゲンの定量

近年、ダニ及び花粉をはじめ、临床上重視される主要なアレルゲンが精製され、そのアレルゲンに対する特異的抗体が作製された。そして、それらを用いた測定系の構築によってアレルゲンを免疫学的に定量することが可能となった(表5)。現在のこの方法は、微量タンパクの定量法として広く用いられ、国際的な標準法として定着している¹⁾。

表5 アレルゲン量の測定単位と表記単位の例

| 測定単位 | 表記単位 |
|----------------------------|------------------------|
| 室内塵(ホコリ): 1 gあたり | $\mu\text{g/g dust}$ |
| 面積: 1 m ² あたり | ng/m^2 |
| 室内空気: 1 m ³ あたり | pg/m^3 |
| その他: 1gあたり (寝具の詰め物など) | ng/g material |

測定単位あたりのアレルゲン量として表す。

記載の表記単位は一般例であり、回収される条件およびアレルゲン量によって適切な単位を用いる。

6-1 sandwich ELISA法

ELISA法の中で抗原に対して2つの抗体を用いる方法をsandwich ELISA法と呼び、サンプルにおける抗原濃度の定量に用いられる(図6)。2つの抗体によってサンドイッチのように抗原を両側から挟みこむことから、この名前が付けられた。

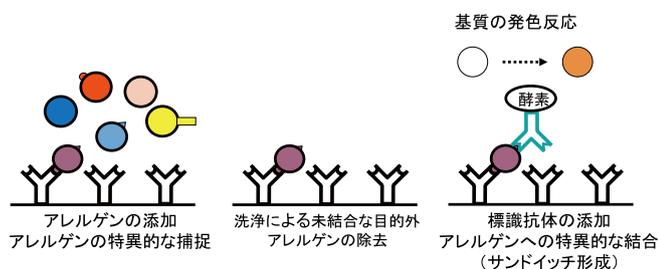


図6 sandwich ELISA法の原理

異なるエピトープを認識する2種類の抗体を用いたsandwich ELISAの原理

このsandwich ELISA法によるアレルゲンの定量は、検出の特異性が高く、多くのタンパクが混在する試料、対象が原形を留めない不定形なものや微細なものであっても、検出して汚染量を評価することが可能である。また、測定の再現性も高く、サンプルの処理から測定までを簡易なプロセスで行え、多量のサンプルを分析するような大規模な調査に対応できる。

そして実際にアレルギーの原因となるタンパク、すなわちアレルゲンを対象にし、アレルゲンの絶対量を測定する。そのため臨床症状に関わるアレルゲン汚染の評価として、アレルギー患者における環境調整の指標に用いることが可能である。一般的なsandwich ELISA法は、呈色反応によって試料中のアレルゲン濃度を定量的に評価する。また、空中浮遊アレルゲン濃度の測定や、皮膚表面や鼻腔内への吸入アレルゲン濃度の測定など、極微量のアレルゲンの測定を行う際には、より高感度な方法として蛍光酵素免疫吸着法(図7)¹⁹⁾や放射性同位元素(Radio isotope: RI)を用いたラジオイムノアッセイ²⁰⁾を用いることもある。これらの測定法は、測定対象に必要な感度や設備などを考慮し選択される。

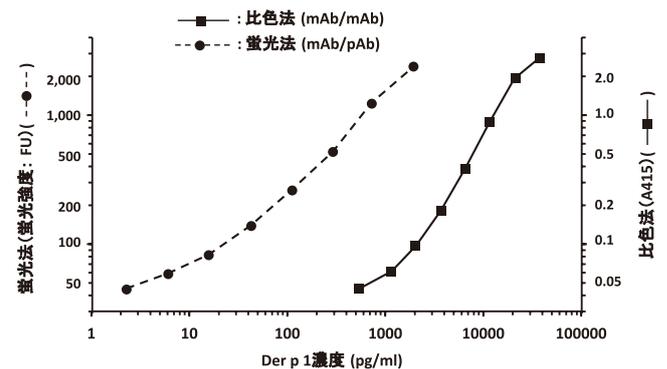


図7 2種類のELISAにおけるDer p 1の標準曲線

6-2 競合ELISA法

アレルゲンをマイクロプレートに固相化したものに、対象物質(測定試料や標準アレルゲン)とそのアレルゲンに感作された患者の血清を添加し競合反応をさせる。その後固相化抗原に対して結合しなかった患者血清中の免疫グロブリンE抗体(Immunoglobulin E: IgE)を洗浄除去する。次に酵素標識抗IgE抗体を加えて、アレルゲンと酵素基質を添加して、酵素による蛍光反応をさせ、蛍光強度を測定する(図8)。対象物質の標準アレルゲンと比較することにより、測定検体中の対象物質濃度を測定することができる。

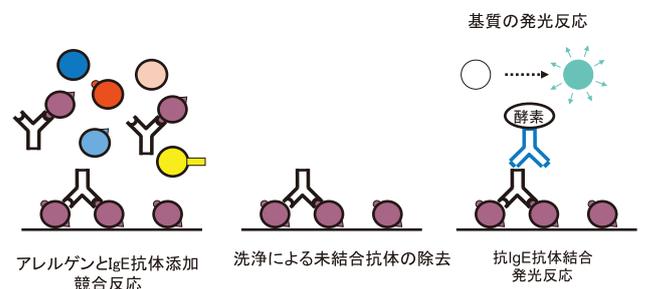


図8 競合ELISA法の原理

患者血清中のアレルゲン特異IgE抗体を用いた競合ELISA法の原理

この方法の大きな利点はアレルゲンの定量を患者血清中のIgE抗体を用いて行える点である。すなわち、よりin vivoに近いアレルゲン性の評価が出来る点が優れている。特にアレルゲンを様々な化学物等で不活化したような実験の場合、その不活化の程度を評価する方法としては最も適した方法であると考えられている。しかし、IgE抗体を測定するため、蛍光やRIを用いた高感度の測定システムが必要になる。また、そのアレルゲンに

感作された患者血清も必要になる。そのため、患者血清を用いた競合ELISA法は専門の技術や知識を持った研究者が行っている。

6-3 イムノクロマト法

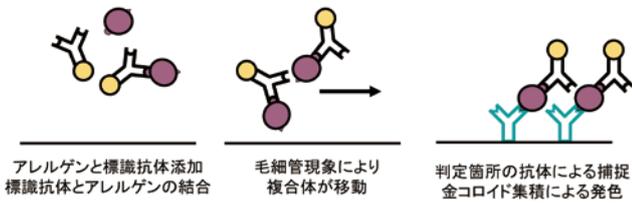


図9 イムノクロマトの原理
金コロイド標識抗体を使用した例

図9は金コロイド標識抗体を用いたイムノクロマト法の原理を表わす。毛細管現象により、サンプル中のアレルギーがメンブレン・フィルター上を移動する時に、金コロイドで標識されたアレルギー特異抗体と結合する。さらにメンブレン・フィルター上の判定箇所に固定されたアレルギー特異抗体に捕捉される。金コロイド標識された抗体・アレルギー・捕捉抗体の三者により、抗原抗体反応の複合体が形成され、集積した金コロイド等を目視で確認できる。

イムノクロマト法の特徴は、発色を目視で確認できるという点にある(図10)。

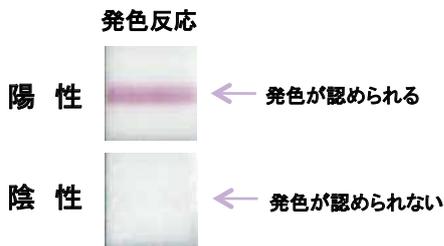


図10 イムノクロマトの判定例
金コロイド標識抗体とアレルギー、そして固相抗体の複合体形成による金コロイドの集積によって、判定箇所に金コロイドによる赤紫色のラインが出現する。

測定には専用設備は必要なく、測定を行う家庭内等の現場において、アレルギー汚染の有無を判定することができる。この方法は定性的な評価に用いられる事が多いが、イムノクロマトのストリップを開発する場合、設計条件によっては、半定量的な評価を行うよう設定することが可能である。現在ダニアレルギーについては、市販の製品が入手可能であるが、花粉については市販された製品がない。

6-4 その他

複数種類のアレルギーを同時に測定するシステムとして、各種アレルギーに対する特異抗体であらかじめ標識されたビーズを用いるマルチプレックスアレイの測定法が開発されている(Indoor Biotechnologies社, USA)。専用の読み取り装置が必要のため、測定を行える施設がまだ限られている。

07 | 試料の回収・捕集とアレルギー抽出

アレルギーの測定を行う場合、対象室内塵や空気中等から試料を回収または捕集する。

7-1 室内塵中アレルギー

室内塵の回収は、床や寝具などの対象物であれば、掃除機を用いて塵を回収する。回収した塵は、ふるいを用いて細塵を分離し、これをアレルギー抽出に用いる。アレルギーの抽出は、リン酸緩衝液(PBS)などに、必要に応じて界面活性剤及び牛血清アルブミン(Bovine serum albumin: BSA)などの蛋白を添加した緩衝液を用いる。細塵の重量を測定し、この抽出液を添加し、室温または4℃下で、静置あるいは振とうして抽出を行う。その後、抽出液をマイクロチューブ等に移し、遠心処理を行い、得られた上清をアレルギー測定に用いる(図11)¹⁰⁾。

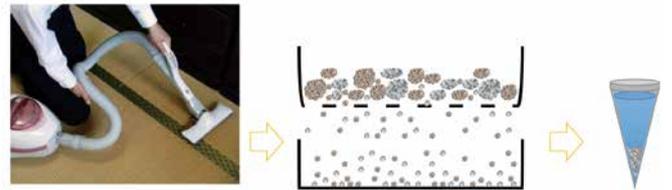


図11 室内塵の回収とアレルギー抽出
掃除機を用いて回収した室内塵は、篩にかけ大きなゴミを取り除く。得られた細塵(fine dust)の重量を測定し、アレルギーの抽出を行う。

7-2 空中浮遊粒子中のアレルギー

空中浮遊アレルギーの捕集は、エアースンプラーを用いてグラスフィルター等に浮遊アレルギーを捕集し、室内塵同様にアレルギーの抽出を行う(図12)¹⁰⁾。

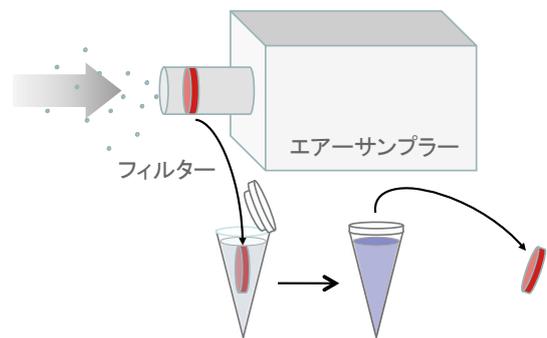


図12 空中アレルギー粒子の捕集とアレルギーの抽出
エアースンプラーのフィルター上に空中アレルギーが収集され、そのフィルター上のアレルギーを溶液中に抽出する。

試料の捕集にあっては、浮遊アレルギーの沈降による経時的な濃度減少を考慮する。個人の行動様式による暴露量の評価を行う場合は、携帯が可能な小型のエアースンプラーが選択される。また捕集時点における浮遊アレルギー濃度の測定を行う場合、ハイボリウムサンプラーを用いた捕集も行える。室内において短時間に多量の試料を捕集する場合、吸引による気流変化や残存粒子(浮遊粒子)濃度に及ぼす影響を考慮することは、アレルギー以外の試料捕集と同様に留意すべき点である。

7-3 その他

空中に浮遊した落下塵を予め設置したシャーレに回収するシャーレ法、対象表面の付着アレルゲンを粘着シートに付着させ回収するテープ法、そしてフィルターや布団綿などから直接抽出する方法など、対象や条件によって様々なアレルゲン回収方法が選択される。

08 | sandwich ELISAによるアレルゲンの測定

マイクロプレートの各ウェルに捕捉抗体を固相化し、BSA等を用いてポストコーティングを行う。次いでサンプルを各ウェルに投入して、抗体と反応させ、検出抗体、酵素、基質を順に反応させ、発色後の吸光度を測定する。既知の濃度の標準アレルゲンを用いて標準曲線を作製し、サンプルのアレルゲン濃度を求める。得られた溶液中のアレルゲン濃度は、単位サンプル量あたりのアレルゲン量として換算し表される(表5)。

近年、ELISAに必要な抗体や試薬がセットになったELISAキットが開発され、国内外の製品が、コマーシャルベースで入手可能である。国内製品の多くは、捕捉抗体が予めマイクロプレート上に固相化されている。そのため、測定時の作業工程が外国製品に比べ少なく、測定に要する時間が短縮された。

09 | 終わりに

ダニやスギなどの花粉は、鏡検によって形態学的に計数ができる。しかし、ダニであれば糞や破砕され原型を留めない死骸、スギ花粉であれば花粉外層を覆うユービッシュ体や不定形な粒子となったものなどは、形態学的に識別することが困難であり、定量することが難しいと考えられる。しかし、このような形態学的識別が困難なものでも、免疫学的方法を用いることで、アレルゲンとして測定を行うことが可能である。

環境中のアレルゲンの測定は、臨床的に重要と考えられる暴露に関わる汚染を定量的、且つ経時的な変化として評価することが出来る。そして得られた情報は、暴露予防等の対策に生かすことが可能となり、患者にとって有益な情報となると考えられる。

謝辞

本研究の一部は日本私立学校振興・共済事業団の私学助成および麻布大学研究推進・支援本部補助金の助成を受けたものである。

参考文献

- 1) TA. Platts-Mills, D. Vervlote, WR. Thomas, RC Aalberse, MD. Chapman, *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, S2-24 (1997).
- 2) M. Sakaguchi, S. Inouye, T. Irie, H. Miyazawa, M. Watanabe, H. Yasueda, T. Shida, H. Nitta, MD. Chapman, C. Schou, RC Aalberse, *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 797-802 (1993).
- 3) AK. Kristensen, C. Schou, P. Roepstorff, *Biol. Chem.* **378**, 899-908 (1997).
- 4) A. Konieczny, JP. Morgenstern, CB. Bizinkauskas, CH. Lilley, AW. Brauer, JF. Bond, RC. Aalberse, BP. Wallner, MT. Kasaian, *Immunology.* **92**, 577-586 (1997).
- 5) H. Yasueda, Y. Yui, T. Shimizu, T. Shida, *J. Allergy Clin. Immunol.* **71**, 77-86 (1983).
- 6) M. Sakaguchi, S. Inoye, M. Tania, S. Ando, M. Usui, T. Matuhasi, *Allergy.* **45**, 309-312 (1990).
- 7) 増田 進, 宇理須厚雄, 松山温子, 各務美智子, 徳田玲子, 藪田憲治, *アレルギー* **53**, s968 (2004).
- 8) AT. Fox, P. Sasieni, G. du Toit, H. Syed, G. Lack, *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 417-423 (2009).
- 9) M. Sakaguchi, S. Inouye, H. Yasueda, T. Irie, S. Yoshizaaw, T. Shida, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **90**, 190-193 (1989).
- 10) M. Sakaguchi, S. Inouye, H. Yasueda, T. Shida, *Allergy* **47**, 55-57 (1992).
- 11) T. Pfeil, U. Schwabl, WT. Ulmer, W. König, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **91**, 224-231 (1990).
- 12) M. Amano, H. Ogawa, K. Kojima, T. Kamidaira, S. Suetsugu, M. Yoshihama, T. Satoh, T. Samejima, I. Matsumoto, *Biochem. J.* **330**, 1229-1234 (1998).
- 13) M. Nambu, N. Shintaku, S Ohta, *Pediatrics.* **117**, 2331-2332 (2006).
- 14) 吉沢 晋, 菅原文子, 安枝 浩, 信太隆夫, 入江建久, 阪口雅弘, 井上 栄, *アレルギー* **40**, 435-438 (1991).
- 15) CM. Luczynska, Y. Li, MD. Chapman, TA Platts-Mills, *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**, 361-367 (1990).
- 16) 佐橋紀男, 高橋裕一, 村山貢司, *スギ花粉症のすべて* (メディカルジャーナル社, 東京, 1995).
- 17) 菅原文子, 宮沢博, 岡部かおり, *日本建築学会計画系論文集* **515**, 75-81 (1999).
- 18) 安枝浩, *気管支喘息に関わる家庭内吸入性アレルゲン*, 小屋二六・永倉俊和編 (メディカルレビュー社, 東京, 1999). pp35-43.
- 19) M. Sakaguchi, S. Inouye, T. Irie, H. Miyazawa, M. Watanabe, H. Yasueda, T. Shida, H. Nitta, MD. Chapman, C. Schou, RC. Aalberse, *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 797-802 (1993).
- 20) H. Yasueda, H. Mita, Y. Yui, T. Shida, *Int. Allergy Appl. Immunol.* **90**, 182-189 (1989).