

報 文

花粉飛散マーカの探索を目的とした加熱脱着-GC/MS による花粉由来揮発性有機化合物の同定

佐伯健太郎¹, 山崎 大¹, 溝口 竣介¹, 梶原 英貴¹, 大平 慎一¹, 戸田 敬^{*1}

花粉症は多くの日本人を悩ます健康被害であり、花粉飛散の予測や計測は社会的に重要な技術となっている。従来の花粉飛散状況の把握は、多大な労力を費やす顕微鏡観察のほか、レーザー散乱の計数など物理的な手法に基づいていた。これに対し、花粉固有の化学物質が存在すれば、飛散花粉の同定とその定量について化学的なモニタリングが可能ではないかと考え、花粉に含まれる化学物質の調査に着手した。まず、スギ、ヒノキ、アカマツの市販標準花粉に加え雑木林で採取したクリの花粉について、加熱脱着-ガスクロマトグラフィー/質量分析を行った。その結果、すべての花粉に共通の化合物の存在が示されたが、それに加え、個々の花粉に固有の物質が見られることが確認された。針葉樹に共通した化学物質としては、 α -pinene, β -pinene などのモノテルペン類のほか、nonanal や nonanoic acid, ならびにセスキテルペンの β -eudesmol が観測された。これに加え、特徴的な化合物として、スギでは kaur-15-ene, sclareol, 4-isopropyl-7,11-dimethyl-3,7,11-cyclotetradecatrienone (IDC), ヒノキでは hibaene, アカマツでは borneol 及び (13R)-8,13-epoxy-labd-14-ene が特異的にみられた。広葉樹のクリの花粉からは, benzyl alcohol, phenylethyl alcohol (PEA), tetracosane が特徴的な物質として挙げられた。林から採取した各針葉樹花粉の化学物質も市販品と同様であり、これらの物質が花粉マーカの候補になり得ることが確認された。次に、花粉飛散の季節に、大気に浮遊する花粉をフィルターに採取し、捕集物をフィルターごと加熱脱着に供して分析したところ、スギ花粉由来と思われる IDC やクリ花粉に含まれる PEA が検出された。また、IDC や PEA の大気中における濃度の推移を調べると、それぞれスギやクリの花粉の飛散状況に応じて増減していることが確認された。今後、さらに網羅的かつ詳細なデータの蓄積や花粉の捕集脱着自動分析装置の開発によって、飛散花粉の種類や量について化学的な観測が可能になると期待される。

1 緒 言

アレルギーは多くの人々を悩ませているが、中でも花粉症は日本で患者数の多い健康被害である¹⁾。戦後の国の施策により、山地にスギの植樹が進み、1963年に初めてスギ花粉症患者が発見された²⁾。その後、患者数は年々増加し、現在のスギ花粉症は国民の1/3にのぼると言われている³⁾。また、クリも西日本の広葉樹林帯に多く生育し、春から初夏にかけて多くの花粉を放散し、クリによる花粉症の症例も報告されている⁴⁾。

このような状況を鑑み、以前から花粉飛散量の計測が行われている。標準法として Durham 法⁵⁾が知られている。ワセリンを塗布したプレバートを24時間屋外に設置し、その間に付着した粒子について花粉かどうかを判断しながら顕微鏡で計測し、1 cm²当たりの沈着個数で示される。英国の Burkard 社が開発した花粉収集器も用いられてい

る。この捕集器は Hirst の考案⁶⁾に基づいており、大気導入したチャンパー内の回転式ドラムに粘着テープを貼りつけておき、テープに付着した花粉を顕微鏡でカウントする。近年、顕微鏡観察に代わり、より簡便な自動分析装置が普及してきた。環境省の提供する花粉観測システム（はなこさん：<http://kafun.taiki.go.jp/>）では、花粉によるレーザー散乱のカウント数から花粉濃度（個 m⁻³）が求められている。自動化され簡便であるが、大きさの近い粒子も花粉として計測してしまう欠点がある^{7)~9)}。そこで、新たな分析法もいくつか検討されてきた。例えば二電極間を粒子が通過する際に生じる電流変化に基づく Coulter カウンティング¹⁰⁾や、フーリエ変換赤外線吸収¹¹⁾、ラマン分光^{12)~14)}を利用した花粉の同定も提唱されている。また、スギ花粉抽出物中のアレルギーである Cry j1 の濃度を表面プラズモン共鳴によって測定する試みもすすめられている^{15)~17)}。このほか、紫外線照射の散乱光から推定される粒子径と、青/赤色の蛍光強度比による花粉の種類判別も試みられている¹⁸⁾¹⁹⁾。Cry j1 を除き、いずれも物理的に検出するものであるが、今回は化学的に花粉の飛散状況を把

* E-mail: todakei@kumamoto-u.ac.jp

¹ 熊本大学大学院先端科学研究部（理学系）：860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪 2-39-1

Table 1 Analytical conditions of TD-GC/MS for pollen compounds

Device	Procedure	Condition
TD	1 st desorption	150 °C × 3 min, He 50 mL min ⁻¹ , splitless
	Trap	Tenax TA at 5 °C, purging trap box with N ₂ at 50 mL min ⁻¹
	2 nd desorption	Ramping 40 °C s ⁻¹ up to 250 °C 250 °C × 5 min Outlet split flow 10 mL min ⁻¹
	Temperature	Valve 225 °C Transfer line to GC 280 °C
	Carrier	He 1.0 mL min ⁻¹
GC	Column	Inert cap 5MS/Sil (0.25 mm i.d. × 30 m)
	Oven	60 °C (1 min) → 30 °C min ⁻¹ → 200 °C → 10 °C min ⁻¹ → 280 °C (5 min)
	Transfer line	280 °C
MS	Ion source	250 °C
	Inonization	Electron impact 70 eV
	Mass range	<i>m/z</i> 60-300 in TIC mode or SIM mode as in Table 2

握できないかと考え、本研究に着手した。すなわち、花粉に特有の物質を花粉マーカーとし、花粉が飛散する大気を通気したフィルターから花粉マーカー物質が検出できれば、この物質から花粉の飛散状況の把握が可能になるのではないか、ということである。花粉には、その種に応じて様々な揮発性有機化合物が含まれ、月桂樹²⁰⁾、柑橘類²¹⁾²²⁾、春菊²³⁾、ひまわり²⁴⁾など種々の植物の花粉に含まれる特有の揮発性物質の存在が報告されている。本研究では、まずスギ (Japanese cedar, *Cryptomeria japonica*: *C. japonica*)、ヒノキ (Japanese cypress, *Chamaecyparis obtusa*: *C. obtusa*)、アカマツ (Japanese red pine, *Pinus densiflora*: *P. densiflora*)、クリ (Japanese chestnut, *Castanea crenata*: *C. crenata*) について花粉中に含まれる化学物質を加熱脱着-ガスクロマトグラフィー/質量分析 (TD-GC/MS) にて分析を行い、花粉マーカーとなりうる化合物の探索を行った。続いて、大気サンプリングを行ったフィルター捕集物から、候補物質の検出を試み、花粉起因物質の飛散マーカーとしての有用性について検証した。特に、熊本で飛散の多い²⁵⁾²⁶⁾スギとクリの花粉起源物質の追跡を試みた。

2 実 験

2.1 花粉試料及び試葉

花粉マーカーを探索するため、熊本県阿蘇地方で採取したスギ花粉や熊本市内の立田山で採取したクリ花粉のほか、東京環境アレルギー研究所から供されているスギ、ヒノキ、アカマツの花粉を用いた。花粉試料は密閉して冷蔵庫に保管し、デシケーター内で室温に戻して測定に供した。花粉に含まれる化合物候補の標準物質として、東京化成工業製の α -pinene, β -pinene, myrcene, carene, limo-

nene, β -caryophyllene, 2-phenylethyl alcohol (PEA), nonanal, decanal, dodecanoic acid, tetradecanoic acid を用いた。これらの物質 10 mg ずつ、比重で校正した体積分をマイクロピペットで量り採り、ヘキサンで希釈して 10 mL とし、1000 μ g mL⁻¹ 混合貯蔵溶液を調製した。また、内標準物質 (ISD) として、cyclopentadecane 100 mg をヘキサンに溶解して 50 mL とし、2000 μ g mL⁻¹ 内標準貯蔵溶液を調製した。この物質は、スギ・ヒノキから放出するセスキテルペン類、ジテルペン類の測定にしばしば内標準物質として用いられている²⁷⁾²⁸⁾。これら標準混合溶液及び内標準物質溶液を適宜採り、ヘキサンにて希釈して 0.05 ~ 1 μ g mL⁻¹ (内標準物質 2 μ g mL⁻¹) の標準溶液を調製した。

2.2 花粉中有機化合物の TD-GC/MS 分析

花粉中の化学物質については、加熱脱着-ガスクロマトグラフィー/質量分析 (thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: TD-GC/MS) によって分析を行った。花粉試料 10 mg を石英ウールで挟んで TD 専用のガラスチューブに設置した。これを加熱脱着装置 (Turbo Matrix 650ATD, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) にて揮発性物質を脱着し、得られた化合物を GC-MS (Trace 1300-ISQ, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) にて分析を行った。TD では、脱着物を二次捕集管 (Tenax TA, 20 mg) にて捕集フォーカスし、二次脱着して GC へ導入した。測定条件の詳細を Table 1 に示す。脱着温度について 120 ~ 210 °C までの範囲でクロマトグラムピーク高さに優位な差は見られなかったため、花粉自身や化合物の熱分解を避けるため比較的低温の 150 °C で行うことにした。なお、花粉化合物の探索には total ion chromatogram

Table 2 Scan times and mass numbers for the pollen compounds

Compounds	Scan time/min	<i>m/z</i>
α -Pinene, β -pinene, myrcene	3.50–4.60	93
2-phenylethyl alcohol (PEA)	4.50–5.00	91
Nonanal	4.60–5.00	73
Borneol	5.00–5.40	95
Nonanoic acid	5.40–6.10	73
β -Caryophyllene	6.10–7.00	133
Cyclopentadecane (ISD)	7.00–7.85	97
β -Eudesmol	7.85–9.00	149
Hibaene	9.00–10.20	81, 134, 243
Kaur-15-ene, (13R)-8,13-epoxy-labd-14-ene	10.20–10.70	81, 94
Kaur-16-ene	10.70–11.20	69, 229, 257
Sclareol	11.20–11.70	69, 81, 275
4-Isopropyl-7, 11-dimethyl-3,7,11-cyclotetradecatrienone (IDC)	11.70–	81, 123, 259

(TIC), 候補物質決定後の大気観測には selected ion monitoring (SIM) を用いた. 各候補化合物についての SIM 条件については Table 2 に示す.

2.3 大気試料の採取と分析

大気中に浮遊する花粉の採取は, 2013~2017 年の春, 熊本大学黒髪南キャンパス理学部内の 9 階建てビル屋上, もしくは同じ黒髪町内にある森林総合研究所九州支所の実験林内にある環境計測室にて行った. また, 一時期, 大学構内のスギ木横に隣接する公用車庫の屋上にて朝 9 時より 16 時にかけての採取を繰り返した. 通常, 試料採取は ϕ 47 mm のフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター (T60A20, 柴田科学) に 10 L min^{-1} (または ϕ 80 mm のフィルターに 30 L min^{-1}) の流量で大気を吸引し, 2~7 日間ごとにフィルターを交換した. 採取後のフィルターは滅菌シャーレに入れ, チャック付きビニル袋に入れて冷蔵庫で保存した.

フィルター採取した花粉に含まれる物質の測定は, 以前当研究室で実施した $\text{PM}_{2.5}$ 中の多環芳香族炭化水素の直接分析²⁹⁾と同じように, フィルターの 1/4 を短冊状に裁断して TD 用のガラスチューブに挿入し, 2.2 項で述べた手法・条件にて TD-GC/MS 分析を行った. 定量の際は $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ 内標準溶液 $10 \mu\text{L}$ を TD 用ガラスチューブに設置した試料フィルターに滴下し, SIM モードで GC/MS 分析を行った. 標準物質によるクロマトグラムは, 標準溶液 (2.1 項参照) $10 \mu\text{L}$ を TD 用ガラスチューブに設置したブランクフィルター片に滴下し (添加量は $0.5 \sim 10 \text{ ng}$ に相当, ただしクリ花粉の PEA 分析の際は $5 \sim 100 \text{ ng}$ とした), TD-GC/MS 分析によって得た. 本検量線より, n 分割したフィルター片上の各物質の質量 w (ng) を得, 大気濃度 C (ng m^{-3}) を式(1) よりもとめた.

$$C (\text{ng m}^{-3}) = \frac{n \times w (\text{ng})}{FR (\text{m}^3 \text{min}^{-1}) \times t (\text{min})} \quad (1)$$

ここで, FR は大気サンプリング流量, t はサンプリング時間である.

参考までに, 環境省花粉観測システムから熊本市医師会ヘルスケアセンターにおける花粉飛散量のデータを取得した (<http://kafun.taiki.go.jp/>). 本測定値はレーザー散乱法による計測に基づいている. また, 当測定局は大学構内の花粉採取現場から南西 3.5 km に位置している. さらに, 日射強度 (insolation) を熊本大学の屋上に設置した全天球型日射計 (MS-601, 英弘精機) のサーモパイル出力を同建物の 7 階にて記録した.

3 結果と考察

3.1 スギ, ヒノキ, アカマツ, クリの花粉とその成分

今回対象とした花粉は, 針葉樹のスギ, ヒノキ, アカマツ, ならびに広葉樹のクリ, の 4 種類である. まず, 各花粉の外観を Fig. 1 に示す. スギ花粉は直径約 $30 \mu\text{m}$ の球状の粒子であり, パピラという突起物を持ち, また高倍率では花粉表面がユービッシュ小体と呼ばれるサブミクロン径の粒子に覆われている³⁰⁾のがわかる. 一方ヒノキ花粉は約 $400 \mu\text{m}$ の房の中に入っており, 房表面に見える無数の粒子が花粉である (Fig. 1b 中段). ヒノキ花粉を拡大すると窪んだ形をしており, 直径は約 $30 \mu\text{m}$ 程でスギ花粉と同等であった. アカマツ花粉は比較的大きく $50 \mu\text{m}$ 程度の大きさで, 2 つの袋状の気嚢を配し風に乗りやすい構造を持っている²⁶⁾. クリ花粉は先の 3 つとは大きく異なり, 直径 $8 \mu\text{m}$, 長さ $13 \mu\text{m}$ 程度の縦長の形状をしており, 長さ方向にひだが見られた. 以上のように, 花粉の形状は植物によって大きく異なり, それぞれ特徴のあることが示された.

続いて, これらの花粉から脱着する有機化合物について調べてみた. TIC モードで測定した TD-GC/MS のクロマトグラムを代表的な物質名と合わせて Fig. 2 に示す. 上から, スギ, ヒノキ, アカマツ, クリとなっている. いずれの花

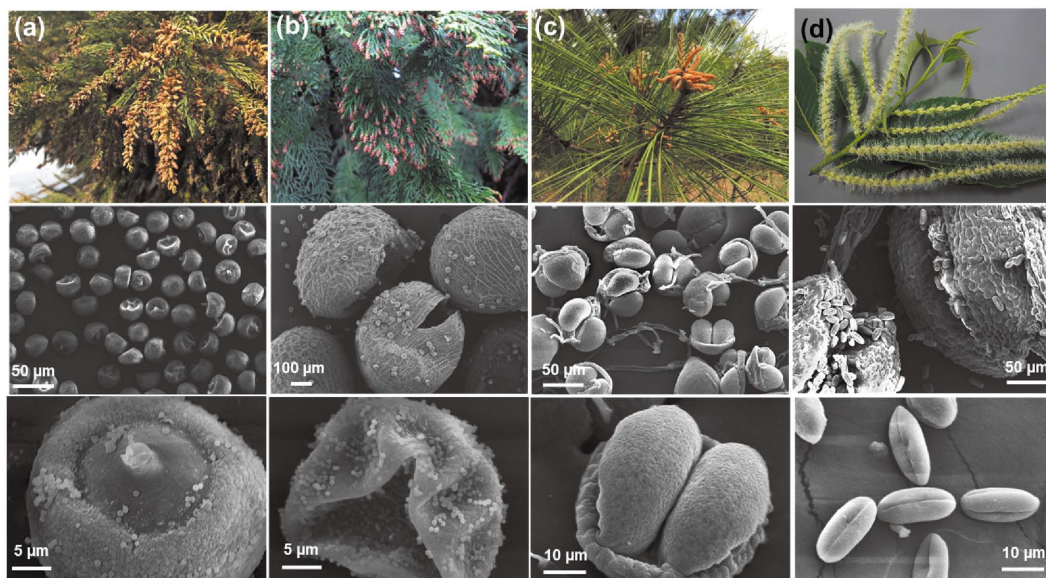


Fig. 1 Four kinds of pollens investigated

Photos of tree branches having flowers (upper) and SEM images of their pollens (middle and lower) for (a) cedar (*C. japonica*), (b) cypress (*C. obtusa*), (c) red pine (*P. densiflora*) and (d) chestnut (*C. crenata*).

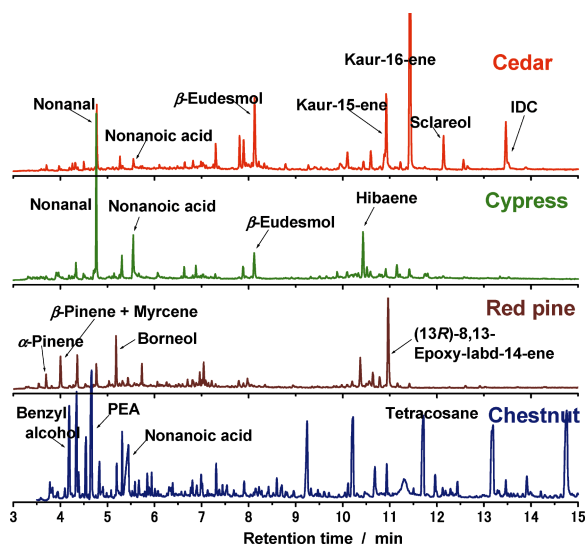


Fig. 2 Detected compounds from the pollens

TIC chromatograms obtained for volatile compounds from 10 mg of cedar, cypress, red pine, and chestnut pollens.

た化合物もあるが、植物によって特徴的な物質も多くみられる。 α -pinene, β -pinene, myrceneなどのモノテルペン類はすべての針葉樹の花粉から共通して検出された。これについては3・2項にて詳しく述べる。このほか nonanal や nonanoic acid が、スギ、ヒノキから多く検出された。スギ、ヒノキの花粉はセスキテルペノイドである β -eudesmol も共通して顕著なピークを与えた。また、それぞれの花粉固有とみられる物質もいくつかあることが判明した。例え

ば、スギでは kaur-15-ene, sclareol, 4-isopropyl-7,11-dimethyl-3,7,11-cyclotetradecatrienone (IDC), ヒノキでは hibaene, アカマツでは borneol 及び (13R)-8,13-epoxy-labd-14-ene, クリでは benzyl alcohol, phenylethyl alcohol, tetracosane が特徴的な物質として挙げられた。このように、各花粉に含まれる化合物のキャラクタリゼーションを行った結果、針葉樹に共通に含まれる化合物やそれぞれ固有に含まれる化合物を確認することができた。このことから、大気浮遊花粉の捕集とその化合物の分析による花粉飛散状況の把握の可能性が示された。そこで以降の個別の調査に進むことにした。

3・2 花粉のモノテルペン類

先に示した通り、針葉樹すべての花粉からモノテルペン類が検出された。テルペン類が針葉樹の葉に含まれていることはよく知られているが³¹⁾、今回、花粉にも多く含まれていることが判明した。そこで、花粉に含まれるモノテルペン類 $C_{10}H_{16}$ 、セスキテルペン類 $C_{15}H_{24}$ 、ジテルペン類 $C_{20}H_{32}$ について調査し、これら化合物の花粉マーカーとしての有用性を検討した。Fig. 3 に、モノテルペン類、セスキテルペン類、ジテルペン類を対象に測定したクロマトグラムを示す(このとき異なるカラム (DB-XLB) が装着されていたため保持時間が他のクロマトグラムと一致していない)。広葉樹であるクリについても同様の分析を行った。これらのクロマトグラムは、モノテルペン類が共通して持つフラグメントイオン ($m/z=93$)、及びセスキ、ジテルペン類それぞれの分子イオン ($m/z=204, 272$) より得た。得

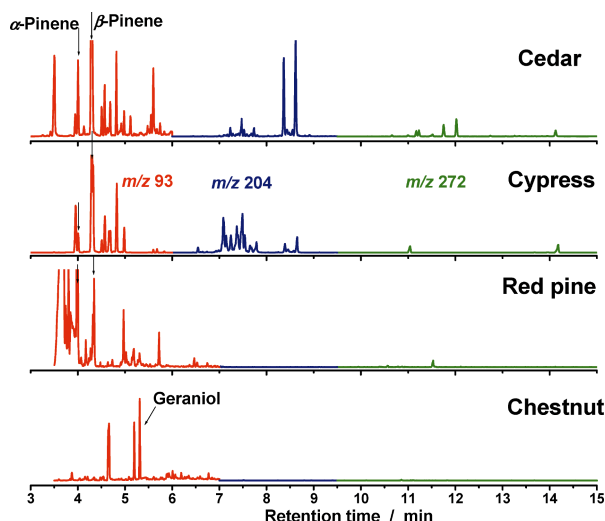


Fig. 3 Terpenes detected from the sampled pollens
Chromatograms obtained for pollen compounds by monitoring at m/z 93, 204 and 272 for mono-, sesqui- and di-terpenes, respectively. All pollens were sampled in Kumamoto prefecture. Note that these chromatograms were obtained using a DB-XLB column, which was different from one used for other chromatograms.

られた結果を見ると, スギ, ヒノキ, アカマツの花粉は $m/z=93$ のピークが顕著に見られ, 次いで $m/z=204$ が多く, $m/z=272$ のピークも特徴的に検出された。クリ花粉からは, テルペン類と同定されるピークは検出されず, テルペノイドの一種である geraniol とみられるピークが得られた。スギとヒノキについてみると, スギでは α -pinene が, ヒノキでは β -pinene が顕著にみられた。このことから, これらのモノテルペン類が春先の大気粒子にどの程度含まれているかについて検討した。

まず, 2013 年春, フィルター捕集物に含まれる α -及び β -pinene を調査した。花粉が飛散していれば, フィルターに捕集され, フィルターの加熱脱着により, 花粉中の比較的揮発性の高いピネン類が検出されるはずである。実際に得られた α -、 β -pinene 濃度の推移を Fig. 4 に示す。棒グラフの空白部分は採取できなかった期間である。また, 環境省花粉観測システムより得た花粉計測値 (於 3.5 km 離れた観測点) も合わせて示すが, 2013 年のスギ花粉の飛散時期は 2 月下旬から 3 月上旬, ヒノキ花粉の飛散時期が 3 月中旬から 4 月上旬であった。大気中の各 pinene 濃度は, 標準溶液を滴下 (添加量 0.5 ~ 10 ng) したフィルターを加熱脱着して得た結果よりキャリブレーションしてフィルター中の物質質量をもとめ, 次いで捕集大気の全体積で除して決定した。30 L min⁻¹ で 48 時間サンプリングした場合, 検量線試料の最小値, 最大値は大気濃度で 0.023, 0.46 ng m⁻³ に相当する。このようにした得た Fig. 4 からわかるが, フィルター捕集物からピネン類が検出された。 α -pinene

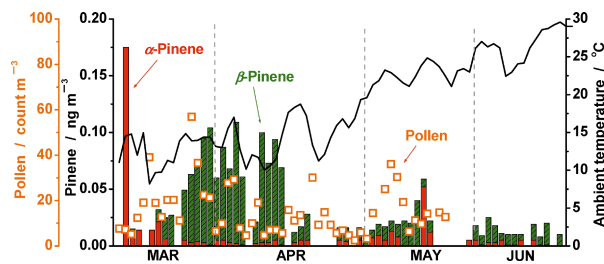


Fig. 4 Pinenes in filter samples in the spring season
Variations of α - and β -pinenes found from filters sampled at Kumamoto University from March to June, 2013. Pollen count at the downtown and daily average of ambient temperature are also shown together.

は 3 月上旬多く見られ, 最大値は 0.17 ng m⁻³ であった。また 3 月中旬以降は, 逆に β -pinene が顕著となり, 3 月末から 4 月上旬にかけて 0.06 ~ 0.11 ng m⁻³ で推移した。その後, 4 月下旬から 6 月下旬まで約 0.01 ~ 0.04 ng m⁻³ の低濃度で推移した。このように α -pinene が 3 月上旬, β -pinene が 4 月上旬に極大を示しており, それぞれスギとヒノキの花粉飛散を反映したと考えられる。この結果から α -、 β -pinene の大気粒子濃度から花粉の種類と量に関する飛散状況の把握の可能性が示唆された。

しかし, α -、 β -pinene は揮発性が高く, フィルター捕集の際に揮散してしまい, 捕集時の気温や流量, 捕集時間などの条件によって結果が左右される。また, 花粉だけでなく, 植物起源の他の小片や粒子にもピネン類が含まれていると考えられ, 花粉時期ではない暖かい 5 月や 6 月にも観測されている。そのため, 揮散性がより低く, かつ花粉特有の物質の方がマーカーとして好ましいと考え, 以降の検討を行った。

3.3 浮遊スギ花粉に含まれる化合物の検出

より理想に近い花粉マーカー探索のため, モノテルペン以外の物質について検討を行った。まず熊本市近郊でよくみられるスギについて, 花粉マーカー物質の探索を行った。3.1 項で述べた通り, スギ花粉に特異的な物質として β -eudesmol, kaur-15-ene, sclareol, IDC があげられる。これは市販の花粉について調べたものだが, 実際に熊本県阿蘇地方で採取したスギの花房枝から花粉を取り出し, かつ SIM モードでこれらの成分について測定すると Fig. 5 のように市販スギ花粉に含まれていた成分すべてが検出された。また, ヒノキに特異的な hibaene, アカマツにみられる borneol や (13R)-8,13-epoxy-labd-14-ene, クリの benzylalcohol, phenylethyl alcohol などは, スギ花粉から一切観測されなかった。このことから, このような物質が各花粉の同定に有用なことが再認識された。そこで, これらの

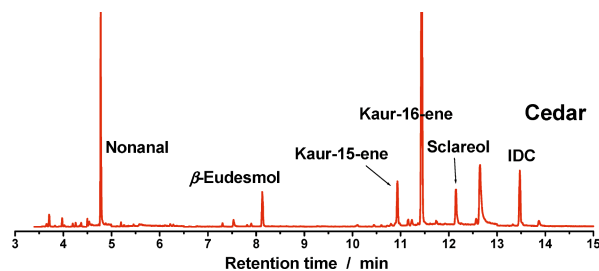


Fig. 5 SIM chromatogram for sampled cedar pollen
Chromatogram was obtained for selected compounds from cedar pollen sampled in Kumamoto.

化合物について、実際に大気採取したフィルターから検出できるかどうかを試験評価した。その結果、IDCが確実に検出できることがわかった (Fig. 6a)。また、スギ花粉の分析によって観測された β -eudesmol, kaur-15-ene, sclareol のピークは見られず、また kaur-16-ene と思われるピーク (t_R 10.80 min) も見られたが、得られた質量スペクトルが確かでなかったため、IDCのみを対象とした。IDCは他の候補物質より分子量が大きく、かつ極性基を持つため、大気採取中の損失も小さいと考えられる。この結果を受け、スギ木近くで日中大気採取したフィルターについて IDC 量の推移を調べた。その結果を Fig. 6 に示す。ただし、IDC については標準物質の入手が不可能であり、次のように IDC_{quasi} として疑似的に濃度を求めた。スギに含まれず、かつ IDC と構造の似た β -caryophyllene (CPL) の検量線を用い、IDC ピーク強度を β -caryophyllene に換算した濃度 CPL (ng m^{-3}) を算出し、これを IDC と β -caryophyllene の分子量 (M_{IDC} , M_{CPL}) で補正して IDC_{quasi} を求めた。

$$\text{IDC}_{\text{quasi}} (\text{ng m}^{-3}) = \text{CPL} (\text{ng m}^{-3}) \times \frac{M_{\text{IDC}}}{M_{\text{CPL}}} \quad (2)$$

なお、IDC_{quasi} 濃度での検出限界 ($S/N=3$) は 0.27 ng であった。ちなみに、10 L min⁻¹ にて 7 時間大気試料を採取しその 1/4 を分析に供した場合の大気濃度に換算すると、0.25 ng m⁻³ に相当する。また、IDC の代わりに使用した β -caryophyllene 標準物質の検量線範囲 0.5 ~ 10 ng で相関係数 $R^2=0.9988$ の直線性が得られている。ちなみにこの範囲は、先の採取条件での大気濃度で 0.48 ~ 9.5 ng m⁻³ に相当し、また、フィルターに 10 ng の疑似物質を標準添加した測定値の再現性は、相対標準偏差で 3.4 % ($n=6$) であった。

さて、Fig. 6 の結果についてみると、スギ木の真横で採取していたこともあり、数 ng m⁻³ と比較的高濃度の IDC が得られた。3 月 27 日から 4 月 2 日にかけて、気温が上昇していき、それにつれスギの雄花が開いていき、観測された IDC 量も増大した。しかし、花粉が飛散してしまった

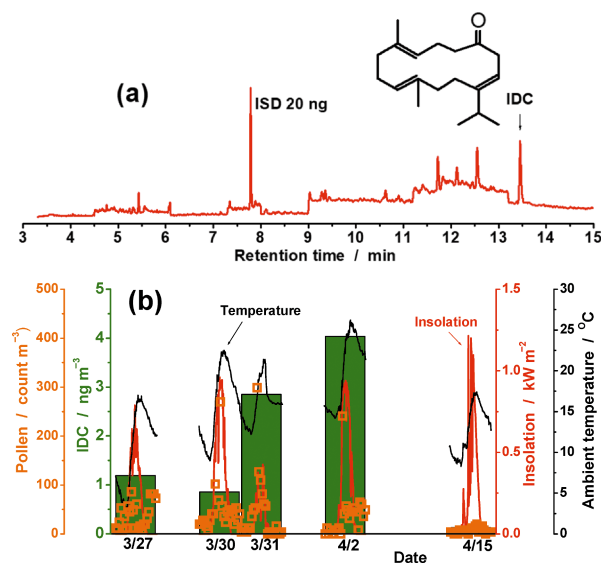


Fig. 6 Detected IDC from air sampling filters

(a) SIM chromatogram obtained from a filter sampled on April 2, 2015. (b) Variation of IDC collected near Japanese cedar trees in daytime from March 27, 30, 31, April 2 and 15. Pollen data observed in the downtown Kumamoto, ambient temperature and solar radiation (insolation) are shown together.

後の 4 月 15 日には、IDC はほとんど検出されなかった。この IDC の推移は、3.5 km 離れた街中心部で観測した花粉飛散量も 3 月 31 日、4 月 2 日に 200 個 m⁻³ 以上飛散した時間帯があり、飛散量と IDC 量の関連が示された。

続いて 2015 年春季に、学内 9 階建ての屋上及び立田山の雑木林内にて、長期間にわたる IDC の観測を行った。結果を Fig. 7 に示す。都市郊外に位置するキャンパスでも IDC が観測され、通常でも 0.02 ng m⁻³ 前後で推移していたが、2 月後半に高い濃度が得られた。ちょうどこの頃が 2015 年ではスギ花粉の飛散時期であった。特に 2 月 23 日 ~ 26 日に採取したフィルターからは、この採取期間平均の IDC 濃度として 0.12 ng m⁻³ の値が得られた。採取直前の 22 日に降水があり、その後スギ雄花が大きく開いたためと考えられる。3.5 km 離れた地点でのスギ花粉量も IDC 極大時に最大値 55 個 m⁻³ が得られている。ちょうど、この前後盛んに花粉が飛散したと考えられる。花粉の飛散は 2 月だけでなく 3 月・4 月にも継続して観測されているが、スギの雄花は 3 月以降全く花粉を保持しておらず、この時期のスギ花粉の浮遊は考えにくい。花粉飛散データではこのような状況を把握することはできないが、IDC データからはスギ花粉の飛散に応じた推移を得ることができた。対照的に、多くの常緑広葉樹に囲まれた立田山観測小屋では、高濃度の IDC は観測されなかった。林間の閉ざされた中での採取のため、遠方からのスギ花粉の影響を受けにくかったと考えられる。

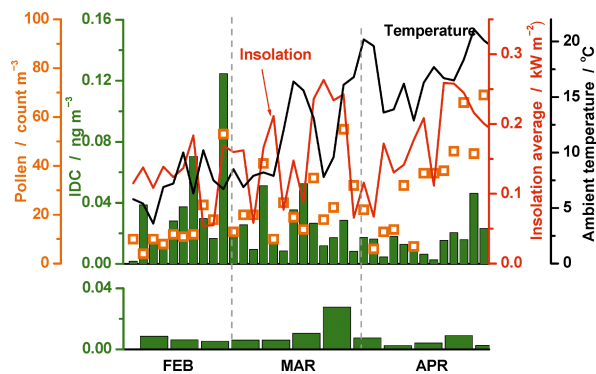


Fig. 7 Variations in the IDC concentration

Variations of the IDC concentrations at (a) Kumamoto University and (b) Mt. Tatsuta, in the spring season, 2015. In addition to the IDC concentration, pollen count at the downtown, insolation average and ambient temperature average for the sampling period are shown together.

3・4 クリ花粉由来成分の検出

クリ花粉については、雑木林に立地する森林総合研究所の計測小屋で大気サンプリングを行った。クリの花は5月初頭から開花し、ほぼ5月いっぱい咲き続けた。この前後を含めて PEA の測定を行ったところ、Fig. 8 のようにクリの開花状況に連動して5月初頭に急激な濃度上昇が観測された。この期間、 $40 \sim 50 \text{ ng m}^{-3}$ のほぼ一定の値で推移した。最大は5月17日～19日の 65 ng m^{-3} であった。6月になっても PEA がみられたが、クリ花粉の残渣に起因したと考えている。6月でも枯れたクリの花が枝に残っていたり、花が地面に落下していたりして、開花後も森林内に留まっている。そのような特性に基づいていると考えられる。なお、PEA の TD-GC/MS による検出限界は 0.06 ng 、森林大気2日間の採取では 0.0083 ng m^{-3} に相当する。また、使用した検量線の濃度 ($5 \sim 100 \text{ ng}$) は $0.069 \sim 1.38 \text{ ng m}^{-3}$ に相当する。 100 ng での相対標準偏差は 14% ($n=6$) であった。

この5月に採取したフィルターを観察してみると、Fig. 9 の通り、黄色のクリ花粉が多くトラップされていることも確認された。花粉はフィルター表面ばかりでなく繊維の内部にまで入り込み、顕微鏡の被写界深度の問題で計数は困難であったが、フィルターに捕集されたクリ花粉量に応じて PEA が観測された。

4 結 言

今回の調査研究により、スギ、ヒノキ、アカマツ、クリの各花粉に含まれる揮発性有機化合物について調査し、そのキャラクタリゼーションを行うことができた。その結果、各花粉に共通の物質のほか、それぞれの花粉に固有の化学物質の存在が明らかになった。スギ花粉はジテルペン

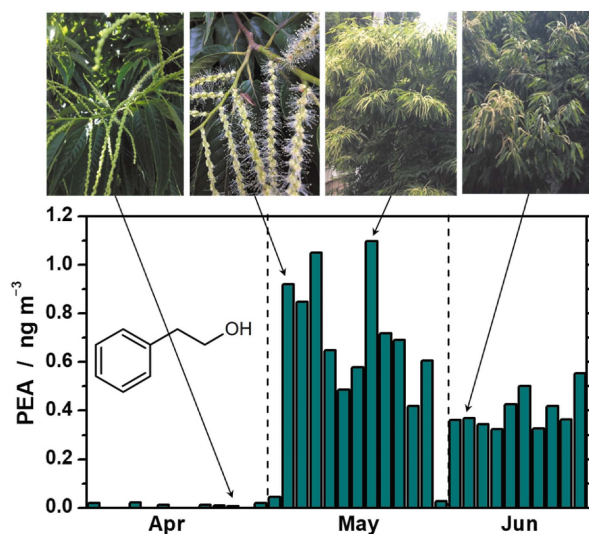


Fig. 8 Detected PEA from air sampling filters

PEA concentrations were analyzed from particles collected at Mt. Tatsuta station, in the spring season of 2017.

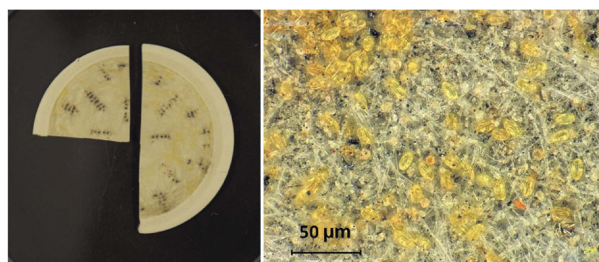


Fig. 9 Filter after use in the chestnut bloom season

Photos of a filter used for sampling in the chestnut bloom season (left) and its closeup (right). Sampling was performed at Mt. Tatsuta station in May 17-19, 2017.

類の kaur-15-ene, kaur-16-ene や 11-dimethyl-3,7,11-cyclotetradecatrienone (IDC), ヒノキ花粉は hibaene, アカマツ花粉は, (13R)-8, 13-epoxy-labd-14-ene, クリ花粉は benzyl alcohol や 2-phenylethyl alcohol (PEA) を多く含むことが分かった。このことから、各花粉に固有の物質を大気捕集試料から検出できれば、花粉の飛散の把握や花粉の種類の判別ができると期待される。

以上の結果をふまえ、大気粒子を捕集したフィルターから花粉由来物質の検出を試み、スギ花粉飛散時期に採取した大気試料から、IDC が検出され、その飛散状況に応じて IDC 濃度が変動した。また、クリ花粉の飛散時期に PEA が多く観測された。 α -pinene や β -pinene などのモノテルペン類も花粉に含まれることがわかったが、モノテルペン類は揮散性が高く、フィルター捕集には適切でない化合物である。したがって、IDC や PEA のような化学物質が花粉マー

カーとして適当と考えられる。このような化合物を花粉マーカーとすれば、花粉の検出ばかりか、花粉の種類の同定も可能である。今回、個々の花粉特有の物質を決定し、花粉を捕集したフィルターからの検出に成功したが、花粉1個当たりのこれら花粉マーカー含有量の分散や安定性などの知見を蓄積すれば、花粉マーカー物質濃度から花粉の個数へ変換することも可能になると期待される。また、今回明らかになった化学物質を網羅的かつ短いサイクルで長期の観測を行い、かつ花粉の飛散量もしくはカウント数との相関を詳細に調べることにより、本法の有用性を実証できると考えている。さらに、フィルター捕集と加熱脱着を自動化し、ポータブルGCと組み合わせれば1時間ごとの花粉由来物質のモニタリングが可能になると期待される。本研究では、このような実応用の基礎データを蓄積することができた。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金「基盤研究(B)」(MEMS加工デバイスにより大気中化学物質の気相/粒子間の相間移動を追跡する)の支援によりなされたことを付記し、ここに謝意を表します。また、森林内での花粉サンプリングは森林総合研究所九州支所の環境計測室を借用させていただき、ここに感謝申し上げます。

文 献

- 1) 宇佐神篤, 奥田 稔: 耳鼻咽喉科臨床, **80**, 1190 (1987).
- 2) 堀口伸作, 斎藤洋三: アレルギー, **13**, 16 (1964).
- 3) 東京都福祉保健局: 花粉症患者実態調査報告書, (2007), <http://www.tokyo-eiken.go.jp/files/kj_kankyo/kafun_servey/juutenn/houkokusyoi.pdf>.
- 4) 菅谷愛子, 保田和美, 津田 整, 清水はるみ: アレルギー, **32**, 333 (1983).
- 5) O. C. Durham: *J. Allergy*, **79**, 79 (1946).
- 6) J. M. Hirst: *Ann. Appl. Biol.*, **39**, 257 (1952).
- 7) 奥田茂利, 榎本雅夫, 芝埜 彰, 池田浩己, 夜陣真司, 嶽良 博, 原田 保: 日本耳鼻咽喉科学会会報, **108**, 801 (2005).
- 8) 高橋裕一, 川島茂人, 藤田敏男, 伊藤千代子, 富樫ルミ, 武田久子: アレルギー, **50**, 1136 (2001).
- 9) 瀬野悟史, 榎本雅夫, 嶽良 博, 池田浩己, 畠田猛真, 齊藤優子, 芝埜 彰, 船越宏子, 鈴木幹男, 矢沢代四郎: 耳鼻臨床, **96**, 83 (2003).
- 10) Z. Zhang, J. Zhe, S. Chandra, J. Hu: *Atmos. Environ.*, **39**, 5446 (2005).
- 11) C. S. Pappas, P. A. Tarantilis, P. C. Harizanis, M. G. Polissiou: *Appl. Spectrosc.*, **57**, 23 (2003).
- 12) M. L. Laucks, G. Roll, G. Schweigers, E. J. Davis: *J. Aerosol Sci.*, **31**, 307 (2000).
- 13) N. P. Ivleva, R. Niessner, U. Panne: *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 261 (2005).
- 14) F. Schulte, J. Lingott, U. Panne, J. Kneipp: *Anal. Chem.*, **80**, 9551 (2008).
- 15) Y. Takahashi, T. Ohashi, T. Nagoya, M. Sakaguchi, H. Yasueda, H. Nitta: *Aerobiologia*, **17**, 313 (2001).
- 16) Q. Wang, S. Nakamura, S. Lu, D. Nakajima, M. Suzuki, K. Sekiguchi, M. Miwa: *Asian J. Atmos. Environ.*, **7**, 65 (2013).
- 17) Q. Wang, J. Morita, X. Gong, S. Nakamura, M. Suzuki, S. Lu, K. Sekiguchi, T. Nakajima, D. Nakajima, M. Miwa: *Asian J. Atmos. Environ.*, **6**, 33 (2012).
- 18) 鈴木基雄, 登内道彦, 村山貢司, 光本浩太郎: エアロゾル研究, **20**, 281 (2005).
- 19) K. Mitsumoto, K. Yabusaki, K. Kobayashi, H. Aoyagi: *Aerobiologia*, **26**, 99 (2010).
- 20) G. Flamini, P. L. Cioni, I. Morelli: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4647 (2002).
- 21) G. Flamini, P. L. Cioni, I. Morelli: *J. Chromatogr. A*, **998**, 229 (2003).
- 22) G. Flamini, M. Tebano, P. L. Cioni: *Anal. Chim. Acta*, **589**, 120 (2007).
- 23) G. Flamini, P. L. Cioni, I. Morelli: *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2267 (2003).
- 24) A. Bertoli, M. Fambrinib, S. Doveria, M. Leonardia, C. Pugliesi, L. Pistellia: *Chem. Biodivers.*, **8**, 1766 (2011).
- 25) 岸川禮子, 長野 準, 宋 信夫, 石川 哮: 耳鼻と臨床, **37**, 580 (1991).
- 26) 元木 靖: 東北地理, **26**, 96 (1974).
- 27) S. N. Matsunaga, T. Mochizuki, T. Ohno, Y. Endo, D. Kusumoto, A. Tani: *Atmos. Pollut. Res.*, **2**, 16 (2011).
- 28) S. N. Matsunaga, S. Chatani, S. Nakatsuka, D. Kusumoto, K. Kubota, Y. Utsumi, T. Enoki, A. Tani, T. Hiura: *Chemosphere*, **87**, 886 (2012).
- 29) 山崎 大, 梶原英貴, 切井仁崇, 大平慎一, 戸田敬: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **64**, 571 (2015).
- 30) 日本花粉学会: “花粉学事典”, 新装版, 日本花粉学会編, p. 196, 312, 337 (1994), (化学同人).
- 31) 戸田 敬, 廣田和敏, 徳永 航, 須田大作, 具志堅洋介, 大平慎一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **60**, 489 (2011).

Identification of Volatile Organic Compounds from Pollens for Pollen Scattering Markers Using Thermal Desorption-GC/MS

Kentaro SAEKI¹, Dai YAMASAKI¹, Shunsuke MIZOGUCHI¹,
Hidetaka KAJIWARA¹, Shin-Ichi OHIRA¹ and Kei TODA^{*1}

* E-mail : todakei@kumamoto-u.ac.jp

¹ Department of Chemistry, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8555

(Received February 5, 2018; Accepted February 12, 2018)

Pollen allergy is serious health problem especially in Japan. Therefore, the forecasting and monitoring of pollen scattering have been a important techniques for decades. Conventionally, the pollen scattering is monitored by physical counting such as labor-required microscope observations or counting laser scattering. In this work, we started on investigation of chemical compounds contained in pollens because the identification of pollens and determination of pollen concentrations can be carried out chemically by monitoring atmospheric pollen compounds. First, organic compounds thermally desorbed from pollens were analyzed by GC/MS for commercially obtained conifer tree pollens, such as Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*: *C. japonica*), Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*: *C. obtusa*), and Japanese red pine (*Pinus densiflora*: *P. densiflora*), and broadleaf tree pollen namely Japanese chestnut (*Castanea crenata*: *C. crenata*) sampled in a trivial woods forest. Monoterpenes, nonanal, nonanoic acid, and sesquiterpene β -eudesmol were observed from all conifer tree pollens. In addition to these common compounds, kaur-15-ene, sclareol and 4-isopropyl-7,11-dimethyl-3,7,11-cyclotetradecatrienone (IDC) were observed only from Japanese cedar pollen. Also, hibaene from Japanese cypress, borneol and (13R)-8,13-epoxy-labd-14-ene from Japanese red pine were found as their specifical compounds. Benzyl alcohol, phenylethyl alcohol (PEA) and tetracosane were observed as characteristic compounds of Japanese chestnut. The same compounds were observed from the corresponding conifer tree pollens sampled in a neighboring forest, and it was shown that these compounds can be candidates for pollen markers. Next, pollens suspended in the atmosphere were collected by filter sampling. The particles were analyzed, as they were on a filter, by thermal desorption-GC/MS, and IDC and PEA were detected from the filters. The concentrations of IDC and PEA varied according to changes in the cedar and chestnut pollen scatterings, respectively. It is expected that chemical observation will be available in the future for the identification and quantitative determinations of pollen scatterings by further detailed examinations and automated instrumentation.

Keywords: pollen scattering; atmospheric sampling; thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry; Japanese cedar; Japanese chestnut.