

「スギ花粉症」抗原性物質の不活性化に関する研究

高島 征助

岡山大学地域共同研究センター

Study of Deactivating Methods against Cedar Pollenosis Antigen in Vitro

Seisuke TAKASHIMA

Co-operative Research Center, Okayama University

I. 緒 言

毎年、我が国では2月下旬から4月上旬にかけて、植物の開花期に合致するように夥しい「花粉症」の患者が発生している。これらのうち、とくにスギ花粉を抗原性物質とする「スギ花粉症」患者が最も多く、我が国の人口の数%にも達するといわれている。

最近では、自動車の排気ガス中の芳香族炭化水素化合物もアジュバンドとして作用するとの報告もあり¹⁾、その発症機序も明らかにされつつあるが、現時点ではまだ根治療法は確立されておらず、薬物投与、減感作療法など対症療法に頼らざるを得ない²⁾。

花粉のヒト体内への侵入を防止する最も簡単で、しかも効果的な方法は織り目の細かいマスクを着用することであるが、元々、花粉症による鼻炎を併発しているケースが多く苦痛を伴いやすい。

著者もこれまで、「スギ花粉症」抗原性物質を効率的に吸着除去する繊維について検討してきた³⁾。それらのうち、スルホン酸基を有するモノマーを共重合したポリエステルなどが有効であることを見出したが、スルホン酸基の濃度を増大させるにしたがって、繊維形成能や工程安定性が低下するという欠点もあることが明らかになった。そこで、より広範囲の生活環境中のスギ花粉を適当な方法で処理することによって、抗原性物質を不活性化することが出来れば、患者にとって何らかの救いになることを期待して本研究に着手した。

本研究では、スギ花粉への紫外線 (UV) 直接照射後の抽出液、スギ花粉の抽出液をUV処理、加熱処理および吸着剤による処理を行った後、「スギ花粉症」既往の被験者の血清に添加し、血清中の抗体価の変化から抗原性物質の不活性化効果を判定した。さらに、抗原性物質の

構造・物性についても若干の考察を行ったので、これらの事柄について報告する。

II. 実験方法

- i. スギ花粉：農林水産省 森林研究所から供与
 - ii. UVランプ：ニッポ電機(株)製
SGL-500Y4U型 (λ max.:254nm)
SGL-3000SW型 (λ max.:185, 254nm)
 - iii. 使用した血清：「スギ花粉症」既往の被験者の血清
 - iv. 血清中の抗体価 (IgE Antibody, Ab) の測定：ELISA(RAST)法
 - v. 使用した吸着剤：ゼオライト (孔径；0.4, 1.0 nm), ゼオライト (フライポンタイト, 孔径；500 nm), シリカ/アルミナ (DavisonCo., Al/Si 原子比=4.40), α -, γ -アルミナ (和光純薬), 陽イオン交換樹脂 (Rohm & Haas Co., SO₃H型), 陰イオン交換樹脂 (三菱化成, N(CH₃)₃・Cl型), 活性炭 (クラレ, PHEMAコート)
 - vi. 「スギ花粉症」抗原性物質 (Antigen, Ag) の不活性化の評価方法
 - a. スギ花粉への直接UV照射法
 - ① 所定量のスギ花粉の精秤してアルミ箔上に静置し、大気中にて、その上方から所定時間UV照射した。なお、照射強度はランプ～試料間の距離を変更して行った。
 - ② 照射処理した花粉を1mlの生理食塩液に1昼夜浸漬した後、0.45 μ mのフィルターで濾過した。
 - ③ 血清, 1mlに②の濾液, 0.3mlを添加して血清の抗体価を測定した。
 - b. スギ花粉抽出液へのUV照射法
 - ① 約1gの花粉を精秤して、20mlの蒸溜水に1昼夜浸漬した後、0.45 μ mのフィルターで濾過し、濾液を試料溶液とした。
 - ② 試料溶液を石英製セル (光路長. 10mm) に充填して所定時間UV照射を行った。
 - c. 吸着剤による処理
 - ① 0.03gの吸着剤を1.0mlの蒸溜水に浸漬し、オートクレービングして脱気した。
 - ② b-①の試料溶液, 1.5mlを添加して30分間、室温にて放置した後、0.45 μ mのフィルターで濾過し、濾液を回収した。
 - d. 加熱処理
 - ① 約2mlのb-①の試料溶液をそれぞれ40, 60, 80, 100, 120℃にて20分間、大気中にて加熱処理した。
- b～dで処理した試料溶液, 1.0mlを血清, 1.0mlと混合して、血清の抗体価を測定した。

III. 実験結果および考察

a. スギ花粉へのUVの直接照射

著者は、先にスルホン酸基を導入したポリエステル繊維が「スギ花粉症」抗原性物質を効率的に吸着除去することをスクラッチテスト用キットを用いて確認している³⁾。しかし、実際には、その除去効率はポリエステル繊維当たりのスルホン酸基の濃度と大気中に浮遊している「スギ花粉」量の組み合わせに依存する。一方、ポリエステル繊維に導入されるスルホン酸基の濃度は高々、4～5 mol%程度であり、それ以上導入することは繊維の製造工程で無理である。したがって、大気中に高濃度の「スギ花粉」が浮遊していれば、この繊維による抗原除去率は低下することになる。

そこで、著者は「スギ花粉症」抗原性物質をただ単に吸着除去するのではなく、より大掛かりな不活性化方法の一つとしてUV照射法に着目した。

UV照射による細菌類の殺滅機序は、菌体内のDNAの損傷——とくにチミンダイマーの生成——によるといわれているが⁴⁾、スギ花粉においても、UVは花粉の細胞膜を透過して、細胞内の物質を変性して、抗原性物質を不活性化することを予想した。それらの測定結果を表1（低照度領域）、2（高照度領域）に示す。

Table 1. Deactivation of cedar pollenosis antigen by UV irradiation (Lower irradi. energy range)

UV (mW/cm ²)	Cedar pollen (ng)	IgE(IU/ml) in serum
0	0	6.88
0	0.18	4.45
	0.40	4.49
	1.10	1.37
1.30	0.18	5.03
	0.52	3.35
	0.96	2.09
4.70	0.14	7.03
	0.74	3.71
	0.91	2.36

UV LAMP: SGL-500T4U, For 3 mins.

Table 2. Deactivation of cedar pollenosis antigen by UV irradiation (Higher irradi. energy range)

UV (mW/cm ²)	Irrad. time (min)	Cedar pollen (ng)	IgE(IU/ml) in serum
0	0	0	5.84
0	0	0.40	3.44
		0.72	3.74
		1.22	3.59
6.10	1	1.14	3.85
	3	1.21	3.97
	3	0.44	3.59
	3	0.56	3.16
	5	1.06	3.63
8.50	1	0.96	7.06
	3	1.12	6.11
	3	0.30	5.01
	3	0.69	3.94
	5	1.06	4.38

UV Lamp: SGL-300WS

表1, 2の測定結果から明らかなように, スギ花粉が少量の場合にはその抗原性はほぼ完全に消失するが, 多量になるとその効果が低下する。これは花粉が多量になると, 花粉粒子が重なり合い陰の部分が生じ易くなり, UV照射が不十分になることに起因するのであろう。しかし, 実際に大気中に浮遊しているスギ花粉の分散度は極めて大きく, 花粉粒子が重なり合う可能性は低い。したがってUV照射によるスギ花粉中の抗原性物質の不活性化方法は有効な手段になり得るものと考えられる。また, このようなUV照射によって「スギ花粉症」抗原性物質が不活性化されることは, セイタカアワダチ草, あるいは干草などの「花粉症」抗原性物質も不活性化される可能性を示唆するものである。

UV照射によるスギ花粉の形態学的変化についても走査型電子顕微鏡によって観察した。

著者は先に指標菌として黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) を用いてUV照射による殺滅機序を検討した際に, UV照射によってSAの粒子径が約10%縮小することを確認している⁵⁾。そこでスギ花粉においても同様の所見が得られる否か, さらに新しい知見が得られることも期待して観察した。しかし, UV照射で処理前の像と大差なかった。一方, 水抽出後の試料では花粉の顕著な収縮, 顆粒の脱落などの所見が認められた (図1~6)。

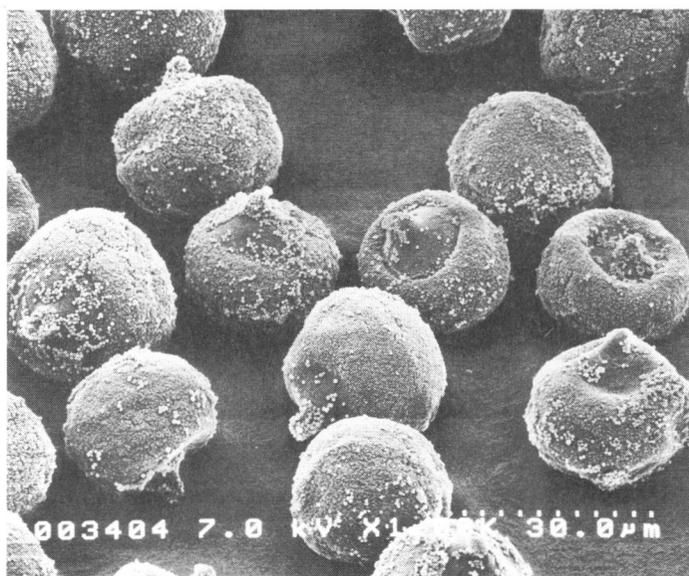


Fig.1 SEM of cedar pollen before treatment
(X 1,000)

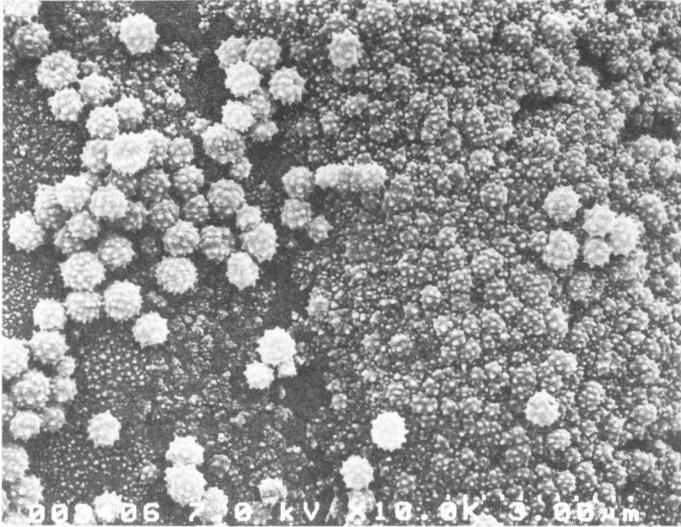


Fig.2 SEM of cedar pollen before treatment
(X 10,000)

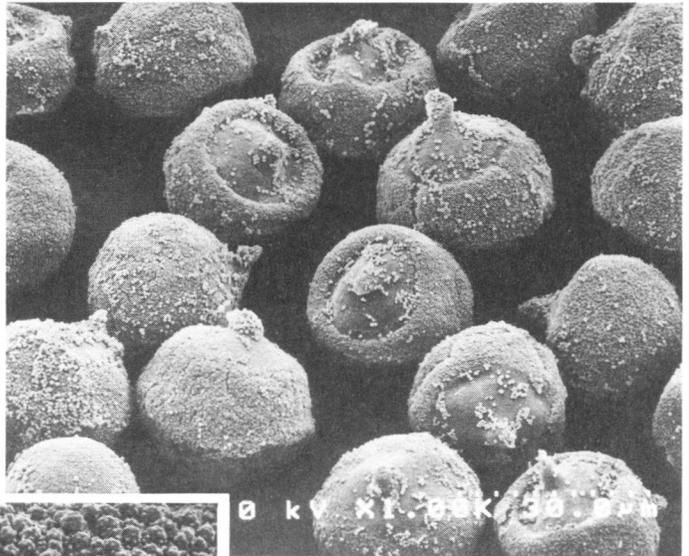


Fig.3 SEM of cedar pollen after UV irradiation.
(X 1,000)

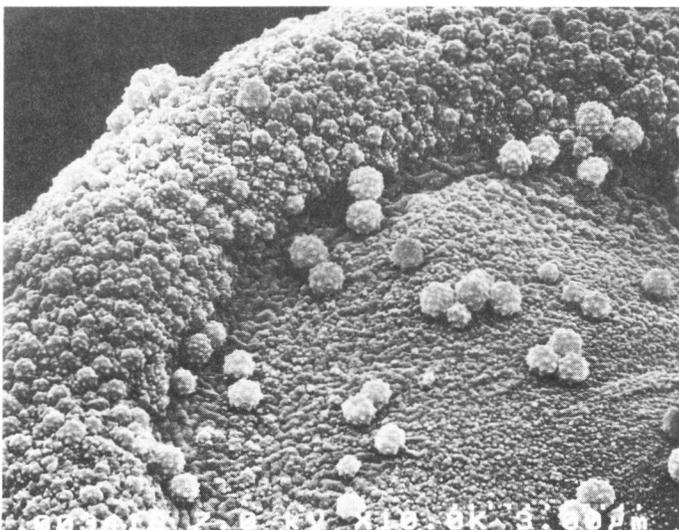


Fig.4 SEM of cedar pollen after UV irradiation.
(X 10,000)

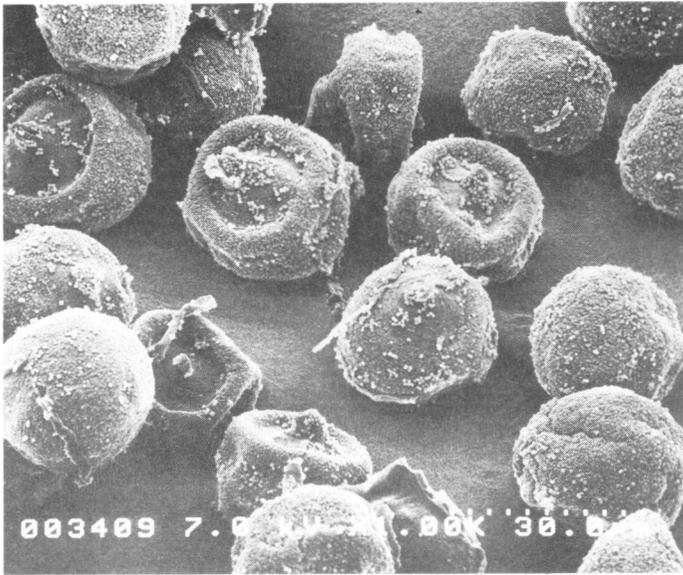


Fig.5 SEM of cedar pollen after extraction (X 1,000)

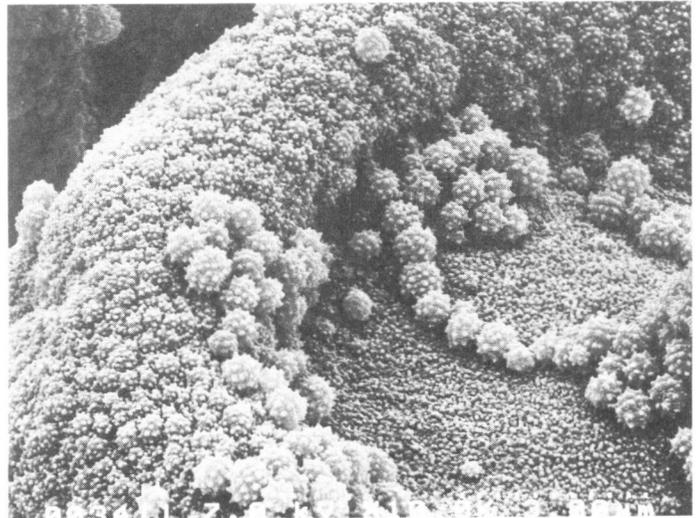


Fig.6 SEM of cedar pollen after extraction (X 10,000)

b. 花粉の抽出液へのUV照射

UV照射処理法の欠点は対象物の凹凸によって陰の部分があると、充分の効果が得られないことである。そこでUV照射による「スギ花粉症」抗原性物質の不活性化効果をより定量的に把握するために花粉の抽出液を用いて検討した。それによると照射時間を延長するにしたがって抗原性物質が不活性化されることが確認された(図7)。

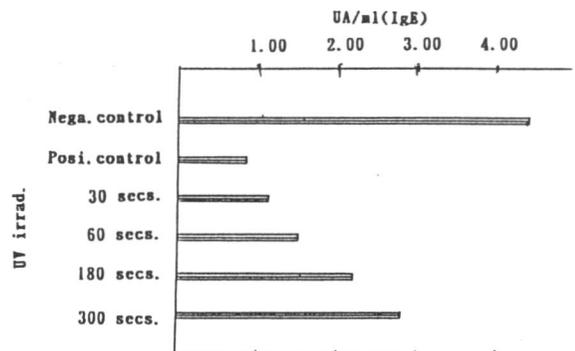


Fig.7. Deactivating against the cedar pollenosis antigen in the extracted solution by UV irradiation.

また、UV照射による抽出液中の成分の変化を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) によって観察した。

UV照射によって、抽出液中の小・分子量領域の成分が変性することがHPL Chromatogramから判明した (図8, 9)。さらにGP Chromatogramから分子量が約12,000の成分もUV照射によって破壊・変性されることが判明した (図10, 表3)。なお、これらの成分の抗原性については後述する。

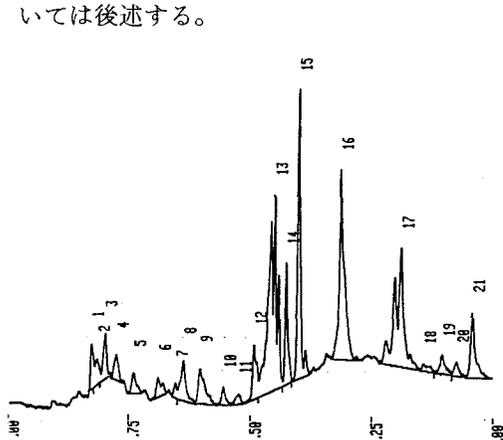


Fig. 8. HPL Chromatogram of the cedar pollen extracted solution before UV irradiation.

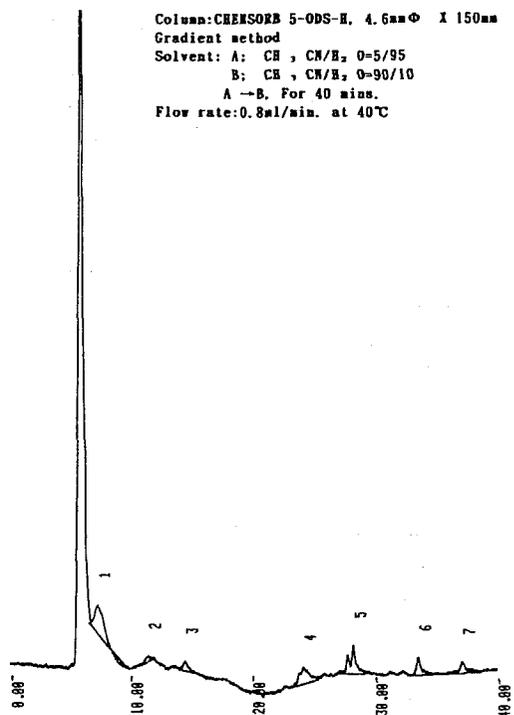


Fig. 9. HPL Chromatogram of the cedar pollen extracted solution after UV irradiation for 3 minutes.

Table 3. UV irradiating effect on the extracted solutions from cedar pollen (Comparison of peak area on GPC)

UV irradiation time (min)	Relative intensity of peak area on GPC at 22 mins.
0	1.000
1	874
3	831
5	741
10	666

Extd. soln. conc. : 0.016g/7 ml, 5 ml used
 In quartz cell (10mm of path)
 UV irradiation : 9.50±0.50 mV/cm²

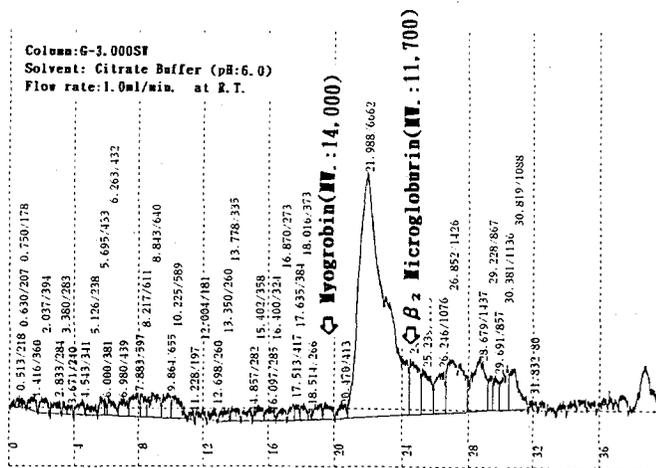


Fig. 10. GP Chromatogram of the cedar pollen extracted solution

c. 吸着剤による処理

「スギ花粉症」抗原性物質の構造・物性を検討する一手段として、抽出液を物性の異なる種々の吸着剤で処理した。その結果、陽イオン交換樹脂が高活性であり、次いで特定の細孔径のゼオライトであった。しかし、活性炭は全く活性を示さなかった(図11)。ここで使用した陽イオン交換樹脂はnon porousであるが、著者のこれまでの研究から、血清中のB型肝炎抗原(HBsAg)、ヒト免疫不全症候群ウイルス(HIV)のような大分子量物質を効率的に吸着除去することを認めている^{6,7)}。また、谷は血清中の低密度リポ蛋白質(L

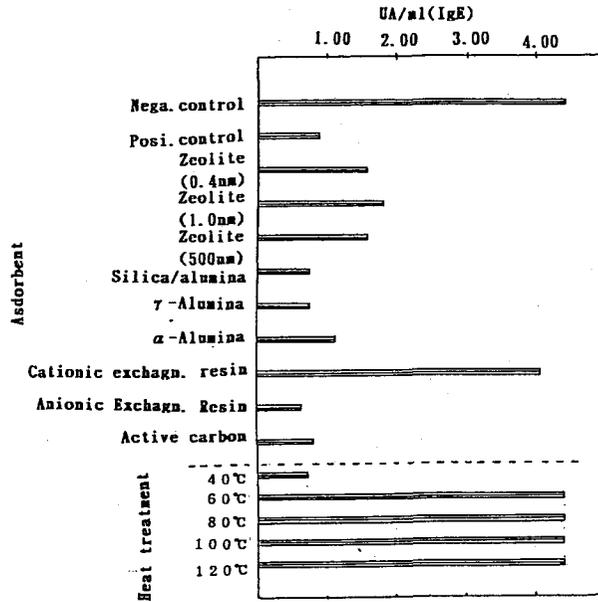


Fig. 11. Deactivating against the cedar pollenosis antigen in the extracted solution by various adsorbents and the heat treatment

DL)の選択的吸着剤としてデキストラン硫酸固定化セルロースを開発し、LDL吸着機序はデキストラン硫酸の SO_4^{\ominus} とLDLのリジン、およびアルギニン残基の \oplus 電荷の静電的結合によると説明している⁸⁾。したがって、「スギ花粉症」抗原性物質もLDLと同様に \oplus 電荷を有し、しかも活性炭が全く吸着活性を示さなかったことからかなりの高分子物質であると推測される。

d. 抽出液の加熱処理

「スギ花粉症」抗原性物質の構造・物性を推定するためのもう一つの手段として抽出液を加熱処理した。その結果、60°Cで完全に不活性化することが判明した(図11)。このことから抗原性物質はペプチド様物質である可能性が高いと推察される。

e. 「スギ花粉症」抗原性物質の構造・物性

上述した如く、抗原性物質はかなりの高分子量を有し、しかもペプチド様物質であろうと推定される。

そこで、まず、抗原性物質を含有するスギ花粉の水溶性成分の化学構造を明らかにするために赤外吸収スペクトルを測定した。

スギ花粉、1.0204 gを100mlの蒸溜水中に懸濁し、室温にて3時間振とうした後、0.45 μmのフィルターで濾過した。濾液を凍結乾燥し、さらに40°Cにて真空乾燥して赤外スペクトルを測定した(図12)。また、その試料の一部で元素分析も行った。

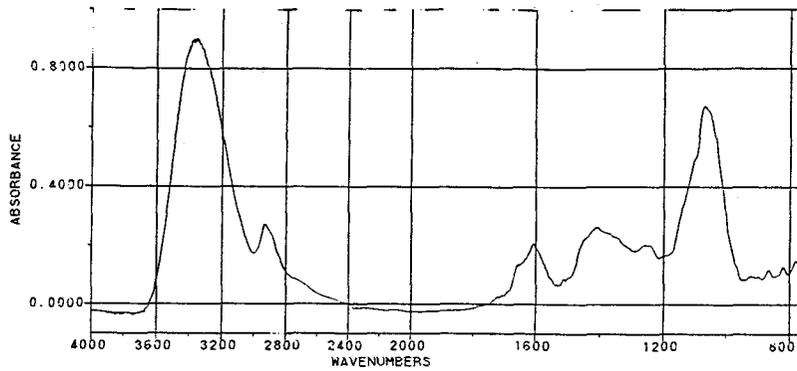


Fig. 12. IR spectrum of the cedar pollen extract

得られたスペクトルはセルロースのそれと類似しており、1,700~1,600, 1,500~1,400, 1,400~1,200 cm^{-1} のピークは、それぞれ $c=0$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2-$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 結合に帰属されるものと推定した。一方、元素分析値は、

C : 38.85%, H : 6.78%, N : 0.70%

であった。

これらの情報を基にして、抽出物の化学構造は、大部分はセルロースであり、その中にセルロースの骨格に $-\text{NHCO}-$ 基を側鎖とする物質が微量存在するものと推定した。

また、抗原性物質の物性についてさらに詳細に検討するために、酸型の水溶性高分子物質との反応性を検討した。すなわち、抽出液にスルホン酸変性ポリビニルアルコール（酸型，Na型），およびカルボン酸変性ポリビニルアルコール（酸型，Na型）の水溶液を添加し，それらの混合溶液を血清に添加して血清の抗体価の変化を測定した（表4）。

Table 4. Deactivating effect of PVA derivatives against cedar pollenosis antigen in homogeneous solution

Sample	IgE(IU/ml)	ref.
Nega. control	4.69	Dil. serum
Posi. control	2.49	serum/extd
Sulfonated PVA	4.77	H type
Sulfonated PVA	3.14	Na type
Carboxylated PVA	2.85	H type
Carboxylated PVA	2.96	Na type

PVA derivatives conc. : 0.076g/ml
 Nega. control: serum/H₂O=1/1
 Posi. control: serum/extd. soln. =1/1
 PVA derivative: PVA deriv. soln./extd. soln.
 =1/1(mixed soln.)

serum/mixed soln. =1/1

Sulfonated PVA

Comonomer: $\text{CH}_2 = \text{CH} \cdot \text{CONH} \cdot \text{C}(\text{CH}_2)_2 \text{CH}_2 \text{SO}_3 \text{R}$

R: H or Na

Polymerization degree: 96

Molecular weight: 4,200

A: 5 mol. %

Carboxylated PVA

Comonomer: $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_2 \text{COOR}) \cdot \text{COOR}$

R: H or Na

Polymerization degree: 200

Molecular weight: ca. 9,000

A: 10 mol. %

元来、ポリビニルアルコール（PVA）は界面活性剤としての働きを有しており、さらに、分子鎖の末端にスルホン酸基、あるいはカルボキシル基が結合していることから、抗原性物質

と親和性に富むと推定した。その結果、表4に示される如く、スルホン酸（酸型）変性PVAは高活性であり、次いでスルホン酸Na変性変性PVAであった。しかし、カルボン酸変性PVAでは酸型、Na型ともに低活性であった。このことは、PVAに共重合したカルボン酸はイタコン酸であり、分子内の2個のカルボキシル基の内の1個はラクトン環を形成する可能性が高く、その立体構造のために抗原性物質との親和性がスルホン酸変性PVAよりも乏しいことに起因すると考えられる。したがって、スルホン酸変性PVAが高活性であるのは、スルホン酸基が抗原性物質と静電的に結合して、血清中の抗体との結合能を失わせるのであろう。この現象は先の陽イオン交換樹脂が高活性であったこととも合致する。

次に抗原性物質の分子量について考察する。上述した如く、抽出液のGP Chromatogram (図10)では明瞭なピークは分子量が約12,000付近に存在するのみである。このピークの物質が果たして抗原性を有するか否かを確認するために、抽出液を2種類の分子分画用フィルターで処理し、それぞれの分画試料の抗原性を測定した。

すなわち、図13に示す如く、4 mlの抽出液を、Milli pore Co.,製、モルカットL-TTK-UFP2 TTK24 (分子量30,000)で濾過し、濾液をさらにモルカットL-TGD UFP2 TGC24 (分子量10,000)で濾過した。2個のフィルター上の残分をそれぞれ4 mlの蒸留水で洗浄して回収した。このようにして得られた、分子量10,000以下、10,000~30,000、30,000以上の3種類の分画試料をそれぞれ1.0mlずつ血清に添加して抗体価を測定した (表5)。

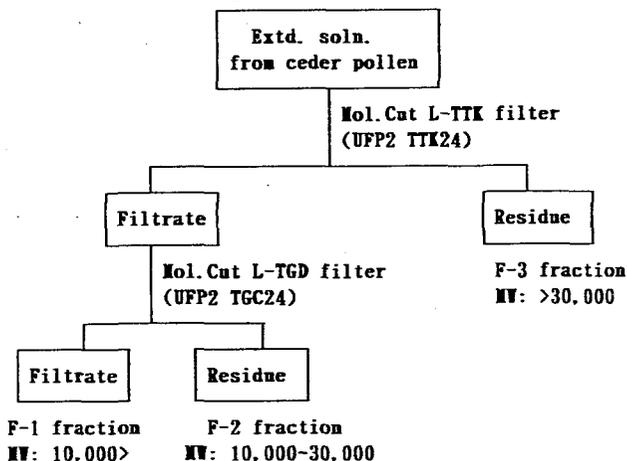


Fig. 13. Fractionation of the cedar pollen extracted solution

それによると、前2者の試料の抗原性は極めて低いことが判明した。したがって、先のGP Chromatogram上のピークの物質は抗原性物質である可能性は低く、抗原性物質はほとんどピークが見当たらない分子量、30,000以上の領域に極微量存在すると考えられる。

したがって、現段階で抗原性物質の化学構造を推定することは極めて困難である。

Table 5. The cedar pollenosis antigen activities of three fractionated components from the pollen extracted solution

Sample	IgE(IU/ml)	Ref.
Nega. control	8.39	
Posi. control	4.61	
F-1	8.17	MW:10,000 >
F-2	7.58	10,000-30,000
F-3	3.83	>30,000

IV. 結 語

1. スギ花粉に直接, UV照射することによって, 「スギ花粉症」抗原性物質を不活性化することが出来た。
2. スギ花粉の抽出液をUV照射, 60℃以上の加熱処理, およびスルホン酸型陽イオン交換樹脂による吸着処理によっても抗原性物質は不活性化出来る。
3. 抗原性物質はスルホン酸変性PVA水溶液によっても不活性化されることから, ⊕電荷を有していると考えられる。
4. 抗原性物質の分子量が30,000以上であると推定される。

謝 辞

本研究を進めるに当たり, 顕微鏡写真撮影, 赤外吸収スペクトル, クロマトグラフィーなど多くのご協力をいただきました(株)クラレの各位に改めて感謝いたします。

引 用 文 献

1. 加納堯子, 鈴木孝人, 上林真子, 大国寿士: アレルギー, 42: 348 (1993)
2. 久松健一: モダンメディシン, No. 2, 44, 1992
3. 高島征助, 赤木孝夫, 中路修平: 医器学, 62: Suppl., 110 (1992)
4. Kelner, A.: J. Bacteriol., 58: 511 (1967)
5. 高島征助, 内沼幸子, 江崎久美子, 山根 健, 村山良介: 第1回日本オゾン研究会年次研究講演会講演集, 177 (1992)
6. 高島征助, 黒川圭一, 高木俊昭, 大高憲二, 山根 健, 村山良介: 医器学, 56: 499 (1986)
7. 山根 健, 村山良介, 高島征助, 中路修平, 桜田 洋: 人工臓器, 18: 1372 (1989)
8. 谷 叙孝: 医器学, 58: 266 (1988)

Study of Deactivating Methods against Ceder Pollenosis Antigen in Vitro

Seisuke TAKASHIMA

Co-operative Research Center, Okayama University

Abstract

Study of deactivating methods against ceder pollenosis antigen in vitro: Every spring season, there are numerous pollenosis patients, especially ceder pollenosis, in our country. However, the radical therapeutics against the pollenosis has not been established yet.

Some deactivating methods, ultraviolet (UV) irradiation, wet heat treatment and adsorption method to the extracted solution of ceder pollen were examined. Deactivating effect against the pollenosis antigen was determined by measuring the changes of the specific antibody values (IgE antibody) in patient blood serum as the marker in vitro. It was cleared that the UV irradiation, the heat treatment over 60°C and the adsorbent containing the acid site were effective on the deactivation against the antigen.