

樹木精油によるスギ花粉アレルギー性への抑制効果について

Inhibition effect of trees essential oils on Japanese cedar pollen allergenicity

王 青躍*、金子 俊彦**、大平 辰朗***

Qingyue WANG, Toshihiko KANEKO and Tasturo OHIRA

In our study, we try to develop new method for utilizing the essential oils extracted from cedar, cypress and todomatsu tree residues for control of human allergenicity of Japanese cedar pollinosis. Therefore, we evaluated dissociation constant (K_D) of cedar pollen allergenic Cry j 1 by using the Biacore J system based on the surface plasmon resonance (SPR) principle before and after exposure to the different trees essential oils. We found that the K_D value (2.20×10^{-10} M) of Cry j 1 when it has been exposed to polluted air of NO_2 and O_3 is lower than those of Cry j 1 ($1.35 \sim 2.45 \times 10^{-9}$ M) exposed to both of pollutant air (NO_2 and O_3) and the essential oils. It is suggested that the trees essential oils are valuable for allergenicity inhibition of cedar pollen allergenic Cry j 1.

Keywords: Japanese cedar pollinosis, Essential oils, Surface plasmon resonance, allergenic Cry j 1

1. 研究背景

我々の生活環境には多種類の環境汚染物質が存在しており、それらが原因で引き起こされる疾病が問題になっている。また、全国平均の有病率が約 26%もあるスギ花粉症の原因となるスギ花粉中のアレルギー物質 Cry j 1 も、都市部大気中で二酸化窒素などの大気汚染物質と反応し、ニトロ化 Cry j 1 となることが報告されている 1)。一方、日本の森林では、スギ、ヒノキ、トドマツなどの針葉樹の割合が高く、それらの樹木にはアロマ素材として注目されている精油が数%含有しており、特に、精油の有効利用について、進められてい

る。これまでに、香りの基となる精油は少量でも抗菌性、防虫性、リラックス作用、悪臭・有害物質除去などの効果が報告されている。これらの物質の機能を最大限発揮させるための実用的な空間への噴霧法も開発されている。こうした精油成分とテルペン類はスギ葉からも抽出することが可能である。また最近、二酸化窒素などの環境汚染物質に対して強力な除去活性を示す精油成分とテルペン類が樹木の葉や材から見出されている 2)。そのような背景から、我々はスギ、ヒノキ、トドマツなどから抽出した精油成分の活用と研究展開として、スギ花粉主要なアレルギーである Cry j 1 のアレルギー性の抑制効果、並びに Cry j 1 のニトロ化を防ぐ可能性について着目した。そこで、本研究では、まず、スギ花粉アレルギー Cry j 1 へのスギ、ヒノキ、トドマツ樹木より抽出した精油の暴露による Cry j 1 のアレルギー性の抑制効果について調査した。

2. 実験および解析方法

2.1 スギ花粉タンパク質抽出物の作成

スギ花粉 1.0 g と Cry j 1 抽出液 40 mL を 50 mL 遠沈

*埼玉大学 工学部 環境共生学科

*Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama, Saitama, 338-8570, Japan

**日本かおり研究所 (エステー化学株式会社)

** Japan Aroma Laboratory Co., Ltd, 4-6, 2-chome, Shimo-ochiai, Shinjuku-ku, Tokyo, 161-0033, Japan

***森林総合研究所 バイオマス化学研究領域

***Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan

管に入れて 4 °C で一晩静置した。6,000 rpm, 10 min の遠心分離後、上清を分取し、遠心式フィルターユニット（アミコンウルトラ-4; Millipore Co., Ltd.）（分画 10,000 Da）のフィルター濾過ユニットに入れた。14,800 rpm, 15 min で遠心分離後、溶媒を除去した上清をマイクロチューブに移し、スギ花粉から溶出したタンパク質を濃縮および回収した。すべての上清を回収し終わったら、再度新しいアミコンウルトラ-4 に上清を入れ、溶媒交換および濃縮操作を以下の方法で行った。上清の入ったアミコンウルトラ-4 を 14,800 rpm, 15 min で遠心分離した後、緩衝液（HBS-EP; GE Healthcare Co., Ltd.）を 3 mL 加え、さらに同条件で遠心分離した。この操作を 2 回繰り返したのち、溶媒交換した濃縮スギ花粉抽出タンパク質をフィルターユニットから吸い取り、マイクロチューブに入れ、全量が 2.0 mL になるように HBS-EP を加えた。この試料を、スギ花粉タンパク質抽出物とし、使用するまで -40 °C で保管した。

2.2 スギ花粉タンパク質抽出物と樹木精油との接触によるアレルギー活性変化の調査

スギ花粉アレルギーの樹木精油との接触による活性変化について調査を行った。スギ花粉タンパク質抽出物 2.5 μL、各樹木精油（スギ、ヒノキ、トドマツ）または HBS-EP 1 μL、HBS-EP を 100 μL マイクロチューブに入れた。試料は、混合後すぐに溶媒交換を行ったものと 4 °C, overnight で接触させたものを用意し、接触時間による活性変化を調査した。溶媒交換は、HBS-EP を 400 μL 入れてサンプルを希釈し、これらをアミコンウルトラ-0.5 で HBS-EP 緩衝液へ溶媒交換を行った。これらのサンプル中の Cry j 1 濃度を Biacore J により測定し、各模擬降水と接触した際の Cry j 1 活性の変化を調査した。

2.3 樹木精油揮発ガスのスギ花粉への暴露

樹木精油 50 μL を、3 L のアナリティックバリアバッグ（近江小戸エアーサービス（株））に入れた。このアナリティックバリアバッグへ 3 L のゼロガスを加えたのち、50 °C の乾燥器内へ 10 分以上入れ、樹木精油を揮発させた。スギ花粉への樹木精油揮発ガスの暴露に

は、デジケータ型固定層反応器を用いた（Fig. 1）。この反応器内に、47 mmφ の石英繊維フィルター上にスギ花粉 1.0 g を撒いたものを入れ、3 L の樹木精油揮発ガスを通気した。樹木精油揮発ガスを通気後、反応容器のガス導入部をコックで密閉し、スギ花粉と樹木精油揮発ガスを 24 時間接触させた。

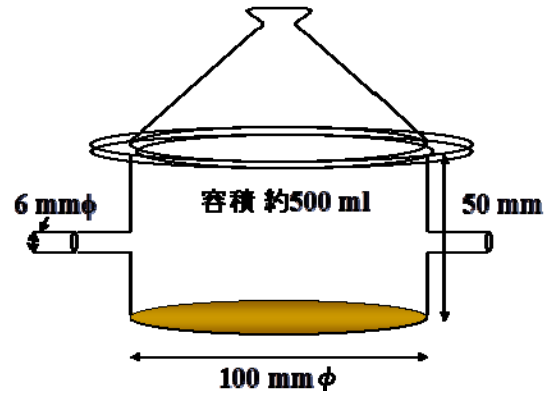


Fig. 1. Reactor for essential oils.

樹木精油揮発ガスと接触させたスギ花粉は、フィルターおよび Cry j 1 抽出液 3 mL とともに遠沈管に入れて 4 °C で一晩静置した。6,000 rpm, 10 min の遠心分離後、上清を 2 mL のマイクロチューブへ分取し、14,800 rpm, 10 min で遠心分離を行った。その後、上清 500 μL を遠心式フィルターユニット（アミコンウルトラ-0.5; Millipore Co., Ltd.）のフィルター濾過ユニットに入れた。14,800 rpm, 15 min で遠心分離後、緩衝液（HBS-EP; GE Healthcare Co., Ltd.）を加え、再度 14,800 rpm, 15 min で遠心分離した。これを 2 回行い、溶媒交換を行った。次に、フィルター濾過ユニットをマイクロチューブに逆に取り付け、4,000 rpm, 2 min で溶液をフィルター濾過ユニットからマイクロチューブへ移した。溶液が、元の溶液量になるよう HBS-EP を加え、これをスギ花粉アレルギーサンプルとした。

2.4 各樹木精油吸着スギ花粉への大気汚染物質の暴露

樹木精油を暴露したスギ花粉へ O₃: 250 ppb, NO₂: 250 ppb に調製した流量 2 L/min のガスを約 6 h 暴露し、Cry j 1 の大気汚染物質への暴露による変性影響を調査した。樹木精油吸着スギ花粉は NO₂・O₃ 混合ガスへ暴露したのちにマイクロチューブに移し、Cry j 1 抽出液 2 mL を加えて 4 °C で一晩静置した。その後、14,800 rpm, 10

min で遠心分離を行い、上清 500 μ L を遠心式フィルターユニット (アミコンウルトラ-0.5; Millipore Co., Ltd.) のフィルター濾過ユニットに入れた。14,800 rpm, 15 min で遠心分離後、HBS-EP を加え、再度 14,800 rpm, 15 min で遠心分離した。これを 2 回行い、溶媒交換を行った。次に、フィルター濾過ユニットをマイクロチューブに逆に取り付け、4,000 rpm, 2 min で溶液をフィルター濾過ユニットからマイクロチューブへ移した。溶液が、元の溶液量になるよう HBS-EP を加え、これをサンプルとした。

2.5 各種精油吸着のスギ花粉への大気汚染物質の暴露

各種樹木精油を暴露したスギ花粉へ O_3 : 250 ppb, NO_2 : 250 ppb に調製した流量 2 L/min のガスを約 6 h 暴露し、Cry j 1 の大気汚染物質への暴露による変性影響を調査した。樹木精油吸着スギ花粉は $NO_2 \cdot O_3$ 混合ガスへ暴露したのちにマイクロチューブに移し、Cry j 1 抽出液 2 mL を加えて 4 $^{\circ}C$ で一晩静置した。その後、14,800 rpm, 10 min で遠心分離を行い、上清 500 μ L を遠心式フィルターユニット (アミコンウルトラ-0.5; Millipore Co., Ltd.) のフィルター濾過ユニットに入れた。14,800 rpm, 15 min で遠心分離後、HBS-EP を加え、再度 14,800 rpm, 15 min で遠心分離した。これを 2 回行い、溶媒交換を行った。次に、フィルター濾過ユニットをマイクロチューブに逆に取り付け、4,000 rpm, 2 min で溶液をフィルター濾過ユニットからマイクロチューブへ移した。溶液が、元の溶液量になるよう HBS-EP を加え、これをサンプルとした。

2.6 スギ花粉アレルゲン Cry j 1 の濃度定量および抗体へのアフィニティの算出

本研究で用いた抗原抗体反応における Cry j 1 濃度および抗体へのアフィニティ変化を調査するため、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を利用した装置である Biacore J を用いた。SPR 法とはセンサーチップの金膜表面上での生体物質相互作用などの特異的反応を観察するのに用いられる分析装置で、様々な分野で利用されており、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 濃度の測定にも用いられている装置である。リガンドには Cry j 1 Mab

(生化学バイオビジネス社製) を使用し、標準物質には精製スギ花粉抗原 Cry j 1 (生化学バイオビジネス社製) を用いて検量線を作成した。センサーチップ表面の再生には 10 mM グリシン-HCl (pH 2.0) を使用した。Cry j 1 と Cry j 1 Mab が結合していく様子を測定し、それらのセンサグラムから Cry j 1 の Cry j 1 Mab へのアフィニティを調査した。

3. 結果と考察

3.1 スギ花粉への各樹木精油暴露によるスギ花粉アレルゲンのアフィニティ変化

Fig. 2 に、各樹木精油と接触した Cry j 1 の濃度変化を示した。Cry j 1 濃度は、各樹木精油と一晩接触させたが変化は見られなかった。したがって、樹木精油によるスギ花粉アレルゲンの失活は生じないと考えられる。次に、各樹木精油と接触した Cry j 1 の Cry j 1 Mab とのアフィニティ変化を調査した。それぞれの樹木精油で若干の変化は見られたが、大きなアフィニティ変化は

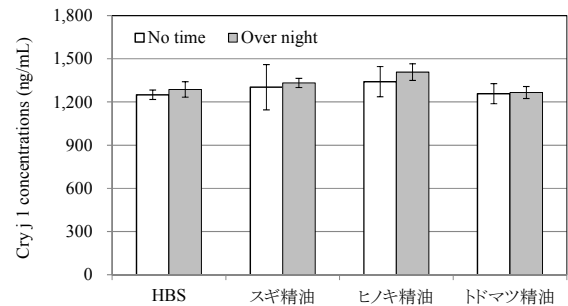


Fig. 2. Allergenic Cry j 1 of Japanese cedar pollen before and after exposure to the different trees essential oils.

見られなかった。

Biacore J にて試 Fig. 3 のようなセンサグラムとしてデータが表示される。初めはベースラインの値を示しており、試料をフローセルへと流していくと、Cry j 1 と Cry j 1 Mab が徐々に結合していき、応答値も Cry j 1-Cry j 1 Mab の結合量に応じて上昇する (Associate)。試料を流し終えて、バッファだけを流し続けると、今度は Cry j 1-Cry j 1 Mab が解離していき、徐々に応答値も減少していく (Dissociate)。1つのサンプルを任意の

5段階に希釈して、それぞれを測定し、それらのセンサグラムからCry j 1のCry j 1 Mabへのアフィニティを測定できた。

本結果は、Cry j 1を加えたHBS-EP溶液中へ樹木精油

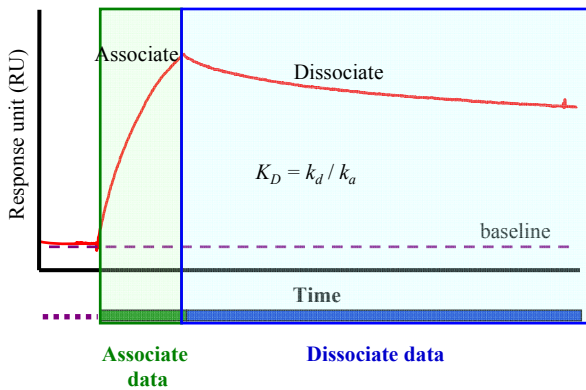


Fig. 3. Evaluated dissociation constant (K_D) of cedar pollen allergenic Cry j 1 by using the Biacore J system.

を添加した実験であったため、樹木精油がHBS-EP溶媒と分離し、Cry j 1とほとんど接触していない可能性があった。そのため、次に樹木精油を揮発させたガスをスギ花粉へ暴露させた実験系を用いて再度Cry j 1のアフィニティを調査した。各樹木精油と接触したCry j 1のCry j 1 Mabとのアフィニティ変化を調査したところ、それぞれの樹木精油で若干の変化は見られたが、大きなアフィニティ変化は見られなかった。したがって、樹木精油にはスギ花粉アレルゲンを変性させることはないものと考えられた。

3.2 樹木精油付着スギ花粉への大気汚染物質暴露によるスギ花粉アレルゲンのアフィニティ変化

Cry j 1を加えたHBS-EP溶液中へ樹木精油を添加した実験であったため、樹木精油がHBS-EP溶媒と分離し、Cry j 1とほとんど接触していない可能性もあった。そのため、次に樹木精油を揮発させたガスをスギ花粉へ暴露させた実験系を用いて再度Cry j 1のアフィニティを調査した。その結果、各樹木精油と接触したCry j 1のCry j 1 Mabとのアフィニティ変化を確認することができた。それぞれの樹木精油で処理した花粉Cry j 1の K_D 値($1.01\sim 1.74\times 10^{-9}M$)であり、若干の変化は見られたが、大きなアフィニティ変化は見られなかった

め、Cry j 1への樹木精油の暴露によるCry j 1の変性はないものと考えられた。

さらに、各種樹木精油を暴露した後、 $NO_2\cdot O_3$ 混合ガスを暴露したスギ花粉Cry j 1のCry j 1 Mabへのアフィニティ変化(k_a , k_d , K_D 値)をTable 1に示す。樹木精油未処理のスギ花粉Cry j 1の K_D 値($2.20\times 10^{-10}M$)がやや低く、 $NO_2\cdot O_3$ 混合ガスを暴露したスギ花粉中Cry j 1のCry j 1 Mabへのアフィニティが少し変化され、分子間相互作用がやや強くなったことと推測できた。一方、精油と接触したスギ花粉アレルゲンへの $NO_2\cdot O_3$ 混合ガスを暴露したところ、それらの K_D 値($1.35\sim 2.45\times 10^{-9}M$)が少し大きくなったため、樹木精油にはスギ花粉アレルゲンを変性させることはないものの、アレルギー性をやや抑制することができた。

Table 1. Dissociation constant (K_D) between Cry j 1 antigens and anti-Cry j 1 monoclonal antibody when exposed to polluted air of NO_2 and O_3 .

Exposure to trees essential oil	k_a ($10^9/Ms$)	k_d (1/s)	K_D ($10^{-9}M$)
Without exposure	3.37	0.73	0.22
Cedar essential oil	1.86	2.52	1.35
Cypess essential oil	2.45	4.30	1.76
Todomatsu essential oil	1.37	3.37	2.45

4. まとめ

本研究では、樹木精油によるスギ花粉アレルゲンCry j 1のニトロ化抑制の効果を調査する前段階として、関東都市部におけるニトロ化Cry j 1の存在確認ならびにCry j 1への精油暴露によるCry j 1への影響についての基礎調査を行った。

これまでに、我々は関東都市部においてニトロ化Cry j 1の存在を確認しており、高い濃度の大气汚染物質に暴露されたためにCry j 1のニトロ化が促進すると考えられる。

本研究では、その抑制対策として、樹木精油を活用して、それらによるスギ花粉アレルゲンCry j 1のニトロ化抑制の効果を調査した。まず、樹木精油によるCry j 1の影響についてCry j 1 Mabへのアフィニティ変化

から調査したところ、Cry j 1 は樹木精油を暴露された前後、特に変化はなかったため、Cry j 1 への樹木精油の暴露によるCry j 1 の変性等の影響はないものと考えられた。また、樹木精油で処理したところ、スギ花粉Cry j 1 のアフィニティがやや大きくなる傾向が示唆されたことから、スギ花粉のアレルギー性をやや抑えられたことが確認できた。

参考文献

- 1) Wang, Q., Morita, J., Gong, X., Nakamura, S., Suzuki, M., Lu, S., Sekiguchi, K., Nakajima, T., Nakajima, D., Miwa, M., Characterization of the physical form of allergenic Cry j 1 in the urban atmosphere and determination of Cry j 1 denaturation by air pollutants, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **6**(1), pp.33-40, 2012.
- 2) 大平辰朗, 松井直之, 金子俊彦, 田中雄一, 香り成分による二酸化窒素の捕集・除去機構 1-生成する粒子状物質の特性について-, 第 25 回におい・かおり環境学会, P13, 2012.
- 3) 埼玉県 (2011 年 2 月 3 日 閲 覧), <http://www.pref.saitama.lg.jp/site/dousei1001/dousei901.html>
- 4) Takahashi, Y., Nagoya, T., Ohta, N.: Identification of Airborne Pollen and Airborne Particles with Pollen Allergen (Cry j 1, Dac g) by Aeroallergen Immunoblotting Technique, *Japanese Journal of Allergology*, **51**, pp.609-614, 2002
- 5) Takahashi, Y., Ohashi, T., Nagoya, T., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Nitta, H.: Possibility of Real-time Measurement of an Airborne Cryptomeria Japonica Pollen Allergen Based on the Principle of Surface Plasmon Resonance, *Aerobiologia*, **17**, pp.313-318, 2001
- 6) 王青躍, 栗原幸大, 桐生浩希, 坂本和彦, 三輪誠, 内山巖雄 : スギ花粉飛散期における飛散花粉数およびアレルギー含有微小粒子状物質の高濃度出現の時系列的挙動差異、エアロゾル研究、**23** (2), pp.120-126, 2008
- 7) Maeda, Y., Japanese Cedar Pollen and Respiratory Symptom, *Allergology & Immunology*, **6**, pp.236-242, 1999
- 8) Hatch, T. F.: Distribution and Deposition of Inhaled Particles, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **25** (3), 237-240, 1961
- 9) Gruijthuijsen, Y. K., Grieshuber, I., Stöcklinger, A., Tischler, U., Fehrenbach, T., Weller, M. G., Vogel, L., Vieths, S., Pöschl, U., Duschl, A.: Nitration Enhances the Allergenic Potential of Proteins, *International Archives of Allergy and Immunology*, **41**, 265-275, 2006
- 10) Sadwuri, M., Koike, E., Kobayashi, T.: Ryukei no Kotonaru Ryusizyobussitu Bakuro ga Kougennteiji ni Kakawaru Saibouhyoumen Bunsu no Hatsugen ni Oyobosu Eikyo, *Japanese Journal of Allergology*, **52** (8), p.833, 2003
- 11) Ohno, N., Ide, T., Sakaguchi, M., Inouye, S., Saito, S.: Common Antigenicity between Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollen and Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) Pollen, II. Determination of the Cross-reacting T-cell Epitope of Cry j 1 and Cha o 1 in Mice, *Immunology*, **99** (4), pp.630-634, 2000
- 12) Sone, T., Dairiki, K., Morikubo, K., Shimizu, K., Tsunoo, H., Mori, T., Kino, K.: Identification of Human T Cell Epitopes in Japanese Cypress Pollen Allergen, Cha o 1, Elucidates the Intrinsic Mechanism of Cross-allergenicity between Cha o 1 and Cry j 1, the Major Allergen of Japanese Cedar Pollen, at the T Cell Level, *Clinical & Experimental Allergy*, **35** (5), pp.664-671, 2005