

## リグノフェノール誘導体によるダニアレルゲン低減化(第2報)

フェノール性水酸基数の違いによるアレルゲン低減化効果について

増山和晃<sup>\*</sup>, 西川奈緒美<sup>\*</sup>, 舟木淳夫<sup>\*</sup>, 井岡浩之<sup>\*\*</sup>, 三原理江<sup>\*\*\*</sup>

### Allergen Deactivation by Lignophenol Derivatives (Part )

Kazuaki MASUYAMA, Naomi NISHIKAWA, Atsuo FUNAKI ,  
Hiroyuki IOKA, and Rie MIHARA

The mite allergen deactivation by ligno-*p*-cresol (LC), lignopyrocatechol (LPC) and lignopyrogallol (LPG) were investigated. All these lignophenol derivatives deactivated mite allergen effectively. The deactivation order of Derf1 and Derf2 was LPG>LPC>LC. The deactivating effect of LPG was similar to tannic acid. Poly-4-vinyl phenol well deactivated Derf1 allergen like LPG, LPC and tannic acid, but didn't deactivate for Derf2. A clear difference was not seen in the deactivation capacity between solvents that dissolved the samples of LPG and LPC. Since tannic acid is water soluble, once tannic acid soaked fabrics were washed, tannic acid couldn't keep to the fabrics, the deactivation effect was almost lost. On the other hand, it was revealed that LPG well adsorbed BSA (bovine serum albumin) like a tannic acid, when LPG solution and BSA solution were mixed. When the adsorption and the precipitation between BSA and LPG was observed, it was thought that deactivation mechanism of mite allergen was caused by denaturing protein.

Key words: mite allergen, ligno-phenol derivatives, tannic acid, poly-4-vinyl phenol.

#### 1. はじめに

厚生労働省の調査では日本人の3人に1人が何らかのアレルギー症状に悩んでいるとされる。以前は子供の頃のアレルギーは成長するにつれて沈静化していくと言われていたが、最近では花粉症の発症、加齢後の難治化、重症化の報告も多い。最も重篤なアレルギー疾患である喘息では年間6000人もの死亡報告があり、アトピー性皮膚炎ではその症状が社会生活に支障をきたすことも多くなっている。こうしたアレルギーを起こす原因物質はアレルゲンと呼ばれ、

\* 材料技術研究課

\*\* 旧 株式会社マルトー

現 荒川化学工業株式会社

\*\*\* 旧 株式会社マルトー

スダストが主な原因といわれている。近年、住宅の省エネ化の観点から高气密性の住宅が増え快適性が向上してきているが、この快適性はハウスダスト中のダニにとっても適した環境になっている。ダニが増殖することにより虫体のみならず死骸、抜け殻、糞が増え、ダニアレルゲンを増やす原因となっている。このダニアレルゲンは喘息、鼻炎等のアレルギー疾患を誘発する主な原因とされており、早急な対策が求められている。

ダニを減らす方法として、これまで掃除機で吸いとりたり水洗いしたり、ダニアレルゲンがタンパク質から成っていることから60以上の熱を加えることにより変性させたり、或いは布団の中で繁殖しないよう高密度の織物を使用する等の対策が講じられ

てきた。しかし、WHOの発表によると、アレルギーによる喘息発作誘発の閾値は $10\mu\text{g/g}$  fine dustであり、また、ダニアレルゲンは虫体のみならずその死骸や糞までもアレルゲンであるという特徴を有している。そのため、完全除去が不可能であることから抜本的な技術対策が求められている。このような現状から近年、アレルゲンの構成物質であるタンパク質の変性、吸着という観点で研究が進められ、ダニアレルゲン低減化物質として、タンニン酸（以下TAと表記）<sup>1) 2) 4)</sup>やポリ-4-ビニルフェノール（以下p4vpと表記）等のポリフェノール<sup>3)</sup>が有効であるという報告がある。

しかし、Tovey<sup>4)</sup>らの報告によるとTAは、一ヶ月以上経過すると、安定したアレルゲン低減化効果を得ることが困難であることが示されている。一方、p4vpについては一部商品化されており、現在はさらに効果が期待できる商品の開発がなされている。

第一報<sup>5)</sup>では、ポリフェノール由来のアレルゲン低減化物質として植物中のリグニンから得られる誘導体であるリグノクレゾール（以下LCと表記）、を用いてコナヒョウヒダニ虫体由来のアレルゲンであるDerf2に対する低減化の検討を行い、p4vpと同等のアレルゲン低減化効果が得られることを確認した。

Labieniec<sup>6)</sup>らはタンニン酸とその誘導体であるエラグ酸および没食子酸に対する牛胸腺DNAおよびBSA間の相互作用について分光法を利用して検討を行い、両者の疎水性相互作用とポリフェノール中に近接しているフェノール性水酸基が、相互作用の強さに依存すると報告している。そこで、今回はさらに、アレルゲン低減化効率を上げることを目的として、リグノクレゾールよりも単位重量あたりのフェノール性水酸基の多いリグノピロカテコール（以下LPCと表記）およびリグノピロガロール（以下LPGと表記）を用いてアレルゲン低減化試験を行った。

そしてこれらを様々な溶媒に溶解し、Derf2に対し、アレルゲン低減化率の溶媒による違いを測定した。また、実用化を想定した実験として、一度Derf2アレルゲンと反応させた低減化処理済みの基材に対し、基材洗浄後も、アレルゲン低減化効果が維持されるか否かについて検討を行った。

Whitley<sup>7)</sup>らは、動物実験で効果の確認された食道癌に対するエラグ酸の効果について検証するため、人の腸の上皮癌細胞とエラグ酸の相互作用を生体外で検証したところ、両者間で不可逆な反応が起き、

沈殿が発生したと、報告しています。そこで、今回はアレルゲン低減化物質としてLPGおよびタンニン酸を、反応させるタンパク質としてBSAまたはDerf1を用い、両者を混合することにより、同様の沈殿が発生するか否かについて確認した。

## 2. 実験方法

### 2.1 リグノフェノール誘導体の製造

リグノフェノール誘導体の製造は、船岡<sup>8)</sup>らにより開発された手法に従い製造した。このフローチャートを図1に示す。

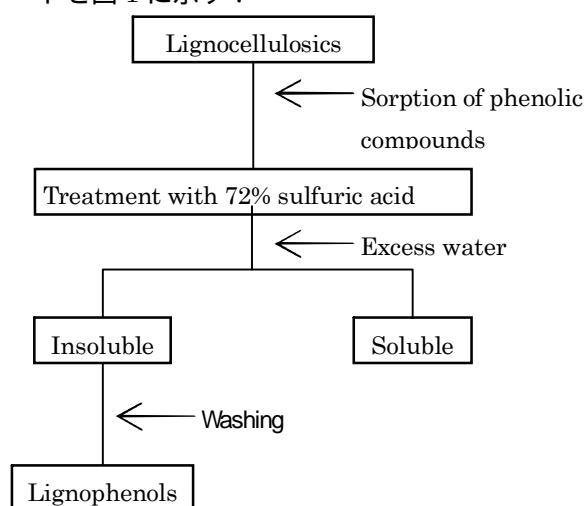


図1 リグノフェノール誘導体調製のフロー

### 2.2 試薬

比較用低減化試薬として用いたTA、p4vp(分子量8000と20000)は市販の特級試薬を用いた。また、これらの低減化試薬を添着する基材には、呉羽テック社製の不織布である「8056」を用いた。また、Derf1およびDerf2は、生化学工業の精製ダニ抗原を用いた。

### 2.3 ダニアレルゲン測定方法

#### 2.3.1 Derf2 および Derf1 溶液の調製

Derf2またはDerf1を $50\mu\text{g}$ 取り、 $500\mu\text{l}$ の蒸留水を加えてよく溶解し、その溶液をマイクロチューブに $25\mu\text{l}$ ずつ分取することにより $0.01\%(\text{w/v})$ に調製し、 $-80$ で凍結保存した。実験に使用する際にはその都度リン酸バッファー(PBS, pH 7.4)で希釈し、使用した。

#### 2.3.2 Derf2 の測定

まず、p4vp, TA, LC, LPC, LPGを各 $2\%(\text{w/v})$

の濃度に希釈した溶液を 20ml 用意し、20cm×15cm にカットした不織布を 30 分間浸した。そして 30 で 24 時間乾燥させた。この不織布に対し、凍結保存した Derf1 溶液を PBS にて  $8.3 \times 10^{-5}\%$ (w/v) に希釈した溶液 0.75ml を均一に滴下塗布した。30 で 2 時間乾燥した後、Der2 簡易測定キットであるアサヒダニスキャン(アサヒフードアンドヘルスケア製)を用いてダニアレルゲン量を測定した。ダニスキャンの測定方法は試薬の取扱説明書に従った。この取扱説明書によると結果の判定は 1 から 4 の数字で表され、その中央値は以下の表のとおりである。

判定値	濃度の中央値(μg/g dust)
1	0.1
2	0.8
3	2.7
4	8.0

判定 3 で感作濃度、判定 4 で発症濃度に相当するとの記載があるため、本実験では低減化物を利用していない場合の判定が 4 になるようにアレルゲンの初期濃度を調製した。また、測定データの取得に際しては、人による目視による判断となるため、公正を期すために特に記載がない限り、測定人数を 7 名とし、その平均値を結果として用いた。

### 2.3.3 Derf1 の測定

Derf1 の低減化率測定は、ELISA キット(LCD アレルギー研究所社製 Derf1 測定用)を用いた。直径 1cm、容量 5ml の円筒形ガラスバイアル中に、2cm×2cm に切った基材と  $3.1 \times 10^{-6}$ (w/v) に調製したダニ抗原液 1ml を入れ、60 分振とう後、その上澄み液を Derf1 測定液として、ELISA キット内の 96 穴ウェルプレートに入れ、その 415nm における吸光度を求めることにより、低減化率を求めた。

### 2.3.4 水洗浄後における効果の持続性試験

現在われわれが検討している、アレルゲン低減化物質は、例えば繊維に添着した状態で室内に設置することにより、室内ダニアレルゲンを低減化することを目的としている。実際に実用化製品として家庭で使用することを想定した場合、定期的に洗濯を行

うことが考えられる。その際に、付着した汚れは取り除かれる一方、アレルゲン低減化物質は繊維から脱落することなく低減化効果が持続することが望ましいと考えられる。そこで、2.3.2 項にて一度ダニアレルゲン低減化試験を行った不織布の内、効果の高かったサンプルを選び、それぞれを 1L のイオン交換水にて 3 分間揉み洗いを行ったのち、40 にて一晩乾燥した。次に、乾燥後の不織布に対して再び 2.3.2 項に従い、Derf2 溶液を滴下塗布し反応後のダニアレルゲン量の判定を行った。

### 2.3.5 アレルゲン低減化物質とタンパク質の相互作用測定

アレルゲン低減化物質とタンパク質の相互作用についての知見を得るため、アレルゲン低減化物質として LPG およびタンニン酸を用い、タンパク質として Derf1 ダニアレルゲンおよび BSA(ウシ血清アルブミン)を用い、溶液中で両者を反応させた。アシスト製シリコナイズドチューブ(1.5ml)に 80% メタノール水に溶解した 3%(w/v)の LPG またはタンニン酸 300 μl と、PBS に溶解した 1%(w/v)の BSA または Derf1 ダニアレルゲンを入れた後、遠心分離機にて 10,000rpm で 1 分間遠心分離を行いその後の様子を観察した。

## 3. 実験結果と考察

### 3.1 リグノフェノールのダニアレルゲン(Derf1,2)に対する低減化効果

図 2 と図 3 に、Derf2 および Derf1 に対する低減化試験結果を示す。縦軸は、ダニスキャンによる判定値を示している。なお、図 2 および図 3 中の以下の文字は次の試薬の略である

p4vp8k・・・ポリ-4-ビニルフェノール分子量 8000  
p4vp20k・・・ポリ-4-ビニルフェノール分子量 20000  
Ac・・・アセトン、Me・・・メタノール  
Et・・・エタノール

Derf2 において、リグノフェノール誘導体のアレルゲン低減化効果は、LPG>LPC>LC の順であった。これは、図 4 のように、フェノール性水酸基の数が多くほどアレルゲン低減化活性に関与しているためと思われる。LC は、p4vp と同等の低減化率でダニスキャンによる値はいずれも 2.5 から 4.0 の間であった。TA と LPG はいずれの条件においても 2.0 以下の数値であり、高いアレルゲン低減化効果が得られた。

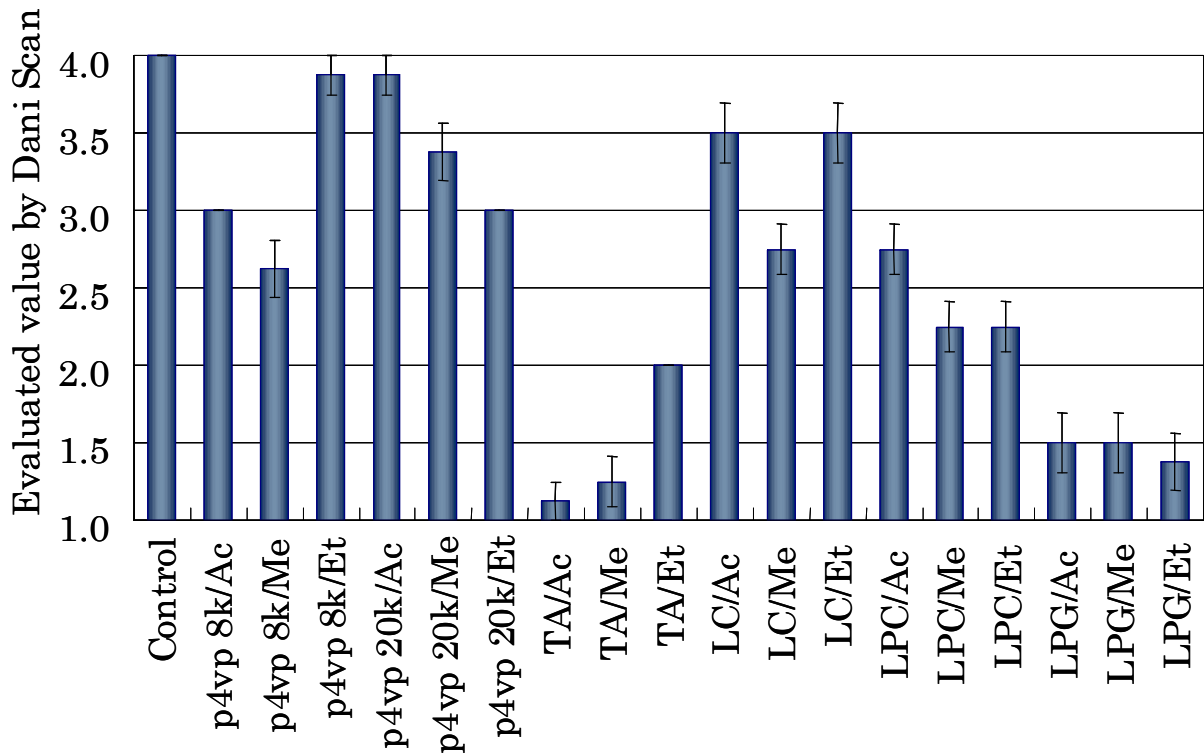


図2 Derf2 に対するアレルゲン低減化試験結果

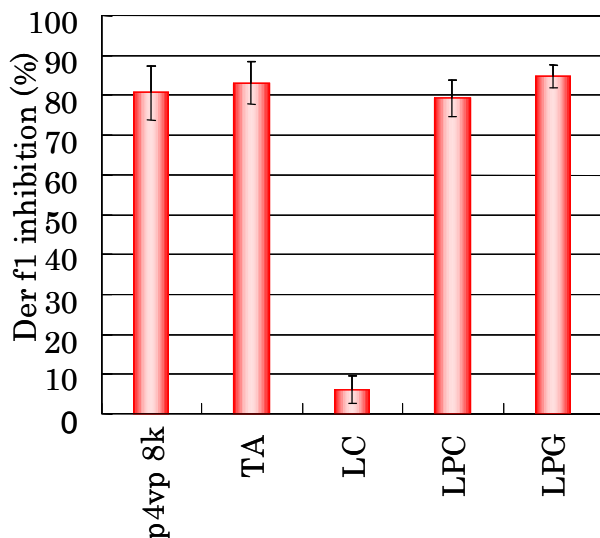
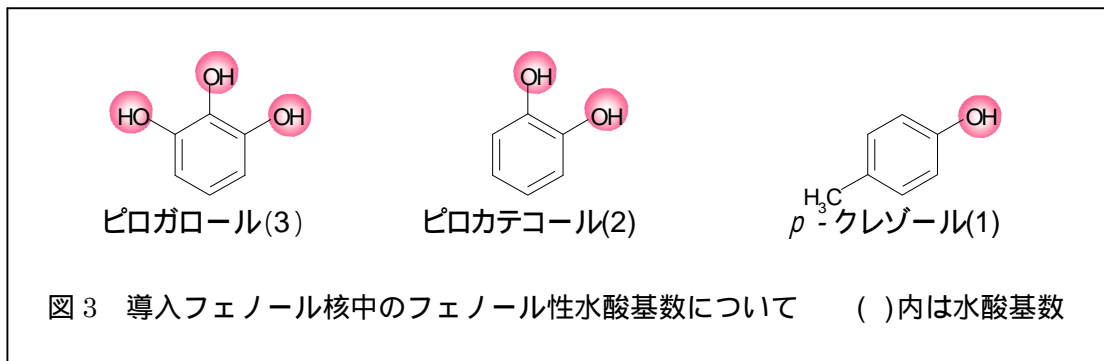


図4 Derf1 に対するアレルゲン低減化試験結果

各サンプルについて最も低減化効果が高かった溶媒は,TA については Ac であり, p4vp の分子量 8000 のものと LC については Me であり, p4vp の分子量 20000 のものと LPC, LPG については Et となったため, 溶媒の違いによるアレルゲン低減化効果の差は低減化物により様々で, 明らかな傾向は見られなかった。

次に, ELISA 測定法による Derf1 の測定結果を図3 に示す. この図では, 縦軸をアレルゲン低減化率とし, (%) で表示したため, 数値の高いほど低減化効率がよいことを表している. 図2 の Derf2 のケースでは, TA と LPG の結果が良かったが, この Derf1 のケースでは Derf2 では余り良い結果の得られな

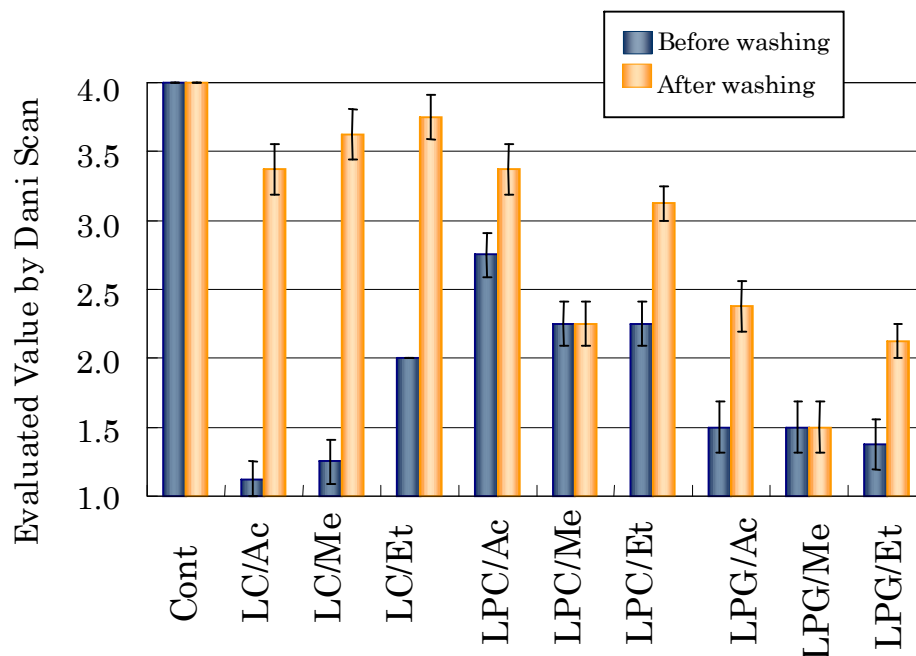


図5 水洗浄によるアレルギー低減化効果の繰り返し試験(Derf2)

った p4vp が TA, LPC, LPG と並びいずれも 80% 程度の低減化効果を示した。一方, LC については 10%以下という低い低減化効率であった。p4vp における Derf2 の低減化効率が Derf1 の測定時と異なった結果については良くわからないが, Derf1 と Derf2 の分子量がそれぞれ 25kDa と 14kDa で異なることが何らかの影響を与えていると思われる。

### 3.2 水洗浄後における効果の持続性

図2の Derf2 低減化率測定において低減化効率の高かった TA, LPC および LPG について, イオン交換水で洗浄後, 再び Derf2 溶液を滴下塗布し, 低減化試験を行った結果を図5に示す。TA に関しては, 洗浄前の測定結果はいずれも 2.0 以下と良好な低減化効果を示していたものの, 洗浄後にはいずれも 3.0 から 4.0 の間となり, アレルギー低減化効果は著しく低下した。これはアレルギーを洗い流した時に一緒に TA が流出してしまったためであると考えられる。一方, リグノピロカテコールとリグノピロガロールに関しては, 洗浄後も効果が持続する傾向が見られ, 特に Me にて溶解した場合には, 低減化効果が維持される結果が得られた。

### 3.3 アレルギー低減化物質とタンパク質の相互作用測定

遠心分離機にかける前後の様子を図6に示す。上の写真は, 混合前の LPG と TA の様子であり, それ

ぞれ茶色と淡黄色の溶液であった。また, 混合した後遠心分離を行った下の写真では, LPG + BSA, LPG + Derf1, TA + BSA では沈殿の生成が見られたが, TA + Derf1 では沈殿が見られなかった。また, 沈殿の生成量は Derf1 よりも BSA において多くなる傾向であった。これにより LPG は, TA と同様なタンパク質収斂作用を示すこと示唆された。

## 4. まとめ

第一報では, LC による Derf2 低減化試験を行い, TA や p4vp と同等の低減化効果があることを報告した。本報では, この結果を踏まえ, さらに低減化効果の高い物質を製造するため, LC の代わりにフェノール性水酸基数の多い LPC よび LPG を製造し, Derf1 および Derf2 に対する低減化効果を測定した。その結果は以下の通りであった。

- ・リグノフェノール誘導体のアレルギー低減化効果は Derf1, Derf2 とともに LPG > LPC > LC の順であった。この中でも特に LPG は TA に匹敵する高い性能を示した。
- ・p4vp については Derf1 に対して大きな低減化効果が得られたが, Derf2 に対しては TA や LPC・LPG ほど大きな低減化効果が見られなかった。
- ・低減化物質を溶解した溶媒間における低減化効率に明確な差は見られず, 理由として, Derf1 と

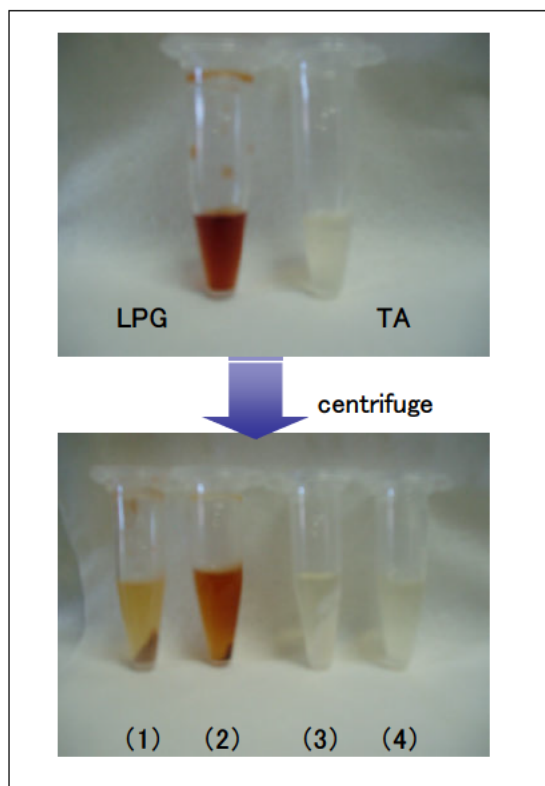


図6 LPGまたはタンニン酸とBSAまたはDerf1 ダニアレルゲンの混合物の遠心分離  
 (1) ・ ・ LPG+BSA (2) LPG+Derf1  
 (3) ・ ・ TA+BSA  
 (4) ・ ・ TA+Derf1

Derf2 間の分子量の違いが影響が考えられた。

- ・ タンニン酸は、水洗時に吸着したアレルゲンと一緒に溶出すると考えられ、水洗後は著しく効果が低下した。一方、リグノフェノール誘導体は、溶出がほとんど起きないため、繰り返しの使用でも効果が持続することを確認した。

- ・ LPG と TA のダニアレルゲン低減物質に対する Derf1 および BSA に対する吸着について観察したところ、LPG と BSA, LPG と Derf1, TA と BSA において沈殿が見られた。これは、両者が吸着したことにより不溶性の沈殿が生じたと考えられ、これがダニアレルゲン低減化のメカニズムであることが示唆された。

#### 参考文献

- 1) J. A. Woodfolk, et al. : "Chemical treatment of carpets to reduce allergen: A detailed study of the effects of tannic acid on indoor allergens", J. Allergy Clin Immunol. 94, p.19-26 (1994)
- 2) T. Hashimoto, et al. : "Accumulation of Group I Dermatophagoides farinae and Stability of the Mite Allergen in the Cultured Medium of Allergenicity.", Bull. of JESC 28 (2001)
- 3) T. Suzuki, et al. : "Control of Mite-Allergen by Anti-Allergen Agent Grafted Cloths", Extended Abstracts of The 33rd Textile Research Symposium, 99 (2004)
- 4) E. Tovey, et al. : "Changes in mite allergen Derp1 in house dust following spraying with a tannic acid / acaricide solution.", Clin Exp Allergy, 22 67-74 (1992)
- 5) M. Labieniec, et al. : "Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method", J. Photochem. Photobiol. B 82 72-78 (2006)
- 6) M. Funaoka, et al. : "Characteristics of Lignin Structural conversion in a Phase-Separative Reaction System Composed of Cresol and Sulfuric Acid", Holzforchung 50, p.245-252 (1996)

(本研究は法人県民税の超過課税を財源としていません)