

代替アレルゲンによる不活化評価法

Inactivation Evaluation Method with Substitute Allergens

井原 望* ・ 宮田 隆弘** ・ 浅野 幸康*** ・ 山内 俊幸***
Nozomi Ihara Takahiro Miyata Yukiyasu Asano Toshiyuki Yamauchi

抗原を定量化できる ELISA 法によるアレルゲン不活化効果の評価において、供試抗原の濃度や活性を一定化できる精製抗原液を採用し、さらに抗原の保持担体を供試抗原とは別のたんぱく質であらかじめブロッキングする方法の考案により、この抗原液を実際のアレルゲンの代替とする方法を開発した。

本法を帯電微粒子水のアレルゲン不活化効果の評価実験に適用し、その効果が高いことを定量的に確認している。

For evaluating the allergen inactivation effect using ELISA, which is capable of quantifying allergens, refined allergen liquid has been adopted to stabilize the concentration and revitalization constant. A method of substituting real allergens with this allergen liquid has also been developed by designing a method for blocking the absorption object in advance with a protein different from the test allergen.

The application of this method to the allergen inactivation test has quantitatively shown that electrostatic atomized water is highly effective for inactivating allergens.

1. ま え が き

近年、住宅の高気密化や共稼ぎ家庭の増加に伴い、窓をあける機会の減少により居室内の換気が不足している。このため、室内環境で増殖するダニ、大気中に飛散する花粉などのアレルゲンと接触する機会が増えている。このことがアトピー性皮膚炎や気管支ぜん息などのアレルギー患者を増加させている原因の一つと考えられている¹⁾。

一方、家庭におけるもっとも一般的なアレルゲンの対策法として定期的な掃除や換気が挙げられるが、これらは手間を要するだけでなく、舞い上がったアレルゲンを人が吸引してしまうおそれがある。このため、市販薬剤の散布や空気清浄機の利用など、簡単な方法が注目されつつある。当社でも、水に高電圧を印加して発生させた帯電微粒子水を室内空間に放出する静電霧化装置の技術を有しており、この装置を空気清浄機に搭載し、アレルゲン対策法として提案している²⁾。

従来、アレルゲン対策の効果の評価するには、実体顕微鏡による観察でダニや花粉の数をカウントする方法が用いられてきた。しかしこの方法では煩雑な作業を伴うだけでなく、評価結果の客観性や定量性に問題があった³⁾。こ

のため近年では、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay：以下、ELISA法と記す）を用い、アレルゲンに含有する抗原量を定量化する方法が主流になりつつある。これにより測定作業が簡素化され、評価結果の定量性や客観性も向上した。

しかし実際のダニや花粉は、入手が容易でないことと含有抗原量や活性などに変動⁴⁾があることから、ELISA法による評価結果に影響する可能性がある。この問題の解決には、入手が容易で供試する抗原の濃度や活性を一定化させることが可能なアレルゲン由来の精製抗原液を使用する方法が考えられる。

そこで筆者らは、実際のアレルゲンの代替として精製抗原液に着目した不活化評価法の開発を試み、帯電微粒子水によるアレルゲン不活化効果が高いことを定量的に確認したので以下に報告する。

2. 従来法の問題

一般にアレルゲン対策法の効果の評価するためには、ELISA法を用いて実際のダニや花粉に含まれる抗原量の変化を測定する。しかし、ダニや花粉は市販品が少なく、また市販時期が限定される場合もあるため入手が困難で

* パナソニック電工解析センター（株） Panasonic Electric Works Analysis Center Co., Ltd.

** 先行技術開発研究所 Advanced Technologies Development Laboratory

*** 電器事業本部 電器R & Dセンター Research & Development Center, Home Appliances Manufacturing Business Unit

あり、さらに高価である場合が多い。たとえ入手できたとしても、採取時期や場所、保管状態などの違いによっては含有抗原の量や活性などに変動があるため、評価結果に影響する可能性がある。

この問題の解決には、アレルゲンから精製された抗原液を使用する方法が考えられる。この方法は抗原の入手が容易かつ安価であるだけでなく、供試する抗原の濃度や活性を一定化させることが可能である。

また、精製抗原液を用いてアレルゲン対策の効果を評価するためには、試験環境において抗原液を一定時間保持させる担体を使用する。当社がアレルゲン対策法として提案している帯電微粒子水のように、室内空間に放出される不活化剤との接触確率を高める担体としては、ガーゼなどの繊維状のものが適当であると考えられる。しかし、ELISA法による試験の場合、試験容器や保持担体などへのたんぱく質の吸着を考慮する必要がある。これは、供試たんぱく質が試験容器や保持担体などに吸着されると、目的とする試験区の測定値が見かけ上減少し、測定結果に影響する可能性があるためである。したがって、その対策を講じる必要がある。

3. 精製抗原による測定法

3.1 対象アレルゲンとELISA測定法

実験には、もっとも代表的なアレルゲンとして知られている杉花粉 (Crj1) およびコナヒョウヒダニ (Derf1) 由来の精製抗原液 (いずれもアサヒビール株式会社製) を用いる。なぜなら花粉症の原因植物として杉、稲、ぶななどが知られているが、そのなかでも杉が原因となる花粉症の割合がもっとも高いためである。また、ダニは地球上に数万種存在するといわれているが、そのなかでもコナヒョウヒダニはアレルギー症の主原因であることが明らかになっているためである⁵⁾。

ELISA法では、杉花粉由来の抗原 (Crj1) およびコナヒョウヒダニ由来の抗原 (Derf1) の定量分析用として市販されているELISAキット (ニチニチ製薬株式会社製) を使用する。

3.2 ELISA法の操作手順

ELISAキットに付属の操作手順書に従い、以下の手順で抗原量の測定を行う。

- (1) 96 ウェルプレート洗浄する。
- (2) 各ウェルに 50 μ L の抗原液サンプルを添加後、50 μ L の二次抗体を添加する。
- (3) 37 $^{\circ}$ C で 2 時間放置する。
- (4) 96 ウェルプレート洗浄する。
- (5) 各ウェルに 100 μ L のストレプトアビジン結合ガラクトシダーゼを添加する。
- (6) 37 $^{\circ}$ C で 1 時間放置する。

- (7) 96 ウェルプレートを洗浄する。
- (8) 各ウェルに発色基質 100 μ L 添加する。
- (9) 37 $^{\circ}$ C で一定時間放置後、各ウェルに 100 μ L の反応停止液を加え攪拌する。
- (10) 各ウェルの波長 415 nm における吸光度を測定する。
- (11) 検量線を用いて、吸光度値を抗原値に換算する。

3.3 保持担体のブロッキング

3.3.1 ブロッキング方法

抗原の保持担体への吸着を防止するため、供試抗原とは別のたんぱく質で、あらかじめ保持担体をブロッキングする方法を適用し、その効果を以下の手順で検証する。

まず、保持担体をブロッキングするため、滅菌ガーゼを 0.2 % 牛血清アルブミン含有燐酸緩衝液中に浸漬して一晩冷蔵した後、風乾する。次に、精製抗原を 0.06 % Tween20 含有燐酸緩衝液で希釈して試験濃度に調整する。最後に濃度調整済み抗原液 1 ml をガーゼに滴下し、それぞれ 2 時間、4 時間、24 時間放置する。所定時間後、ガーゼから抗原を回収し、3.2 節で述べた操作手順により ELISA 法で抗原量を測定する。なお、ブロッキングをしていない滅菌ガーゼに対しても同様の手順で抗原量の測定を行う。

3.3.2 ブロッキング効果

花粉抗原の抗原残存率の変化を図 1 に示す。ブロッキングなしでは、残存抗原は 2 時間経過後には初期値に比べて半減し、24 時間経過後にはほとんど認められない。一方、ブロッキングありでは、抗原残存率の低下が比較的緩やかであり、24 時間経過後においても初期値の約半分の抗原が認められる。これらの結果から、抗原担体をあらかじめブロッキングすることで、不活化効果の定量分析試験に必要な抗原量の確保が可能であることがわかる。さらに、ダニ抗原においても同様の方法でブロッキング効果があることを確認している。

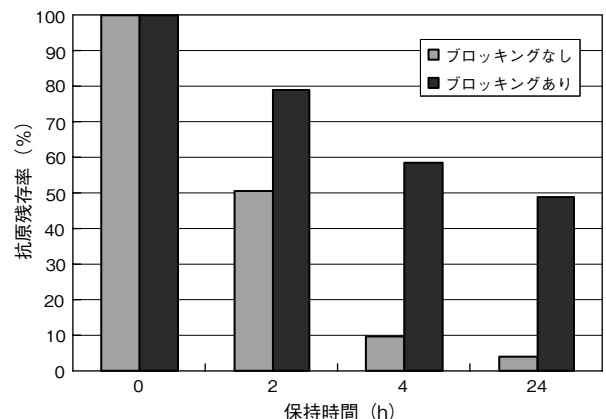


図 1 花粉抗原のブロッキングによる抗原残存率の変化

4. 帯電微粒子水のアレルゲン不活化効果

4.1 試験方法

帯電微粒子水のアレルゲン不活化効果を定量的に確認するため、従来用いられてきた実際のアレルゲンの代替として抗原液を採用し、不活化評価試験を以下の手順で行う。

帯電微粒子水は、ペルチェ素子を利用して空気中の水分を電極に結露させ、さらに放電電極に約 -5 kV 程度の電圧を印加することにより静電霧化現象を引き起こして発生させる⁶⁾。図2および図3に帯電微粒子水による抗原不活化評価試験中の写真を示す。



図2 帯電微粒子水による抗原不活化試験 (45 Lチャンバ)

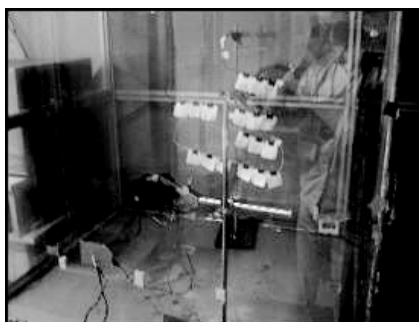


図3 帯電微粒子水による抗原不活化試験 (1 m³チャンバ)

試験は、45 L および 1 m³ のチャンバを用意して評価する。まず、3.3.1 項で述べた手順で精製抗原液を試験濃度に調整する。この抗原液 1 ml をガーゼに接種した後、静電霧化装置を各試験チャンバ内で稼働させて不活化処理を行う。帯電微粒子水による暴露を所定時間行った後、ガーゼから抗原を回収し、ELISA 法で抗原量を測定する。なお、帯電微粒子水による暴露なしでの試験も対照として行う。

4.2 結果

45 L チャンバにおける花粉抗原の不活化評価試験結果を図4に示す。暴露1時間後において、顕著な不活化効果があることを定量的に確認できる。

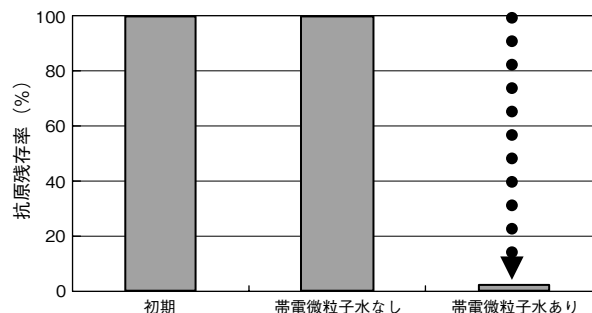


図4 45 Lチャンバ暴露1時間後の抗原残存率

1 m³ チャンバにおける花粉抗原の結果を図5に示す。暴露24時間後において、顕著な不活化効果が確認できる。以上の傾向は、ダニ抗原においてもほぼ同様であることを確認している。

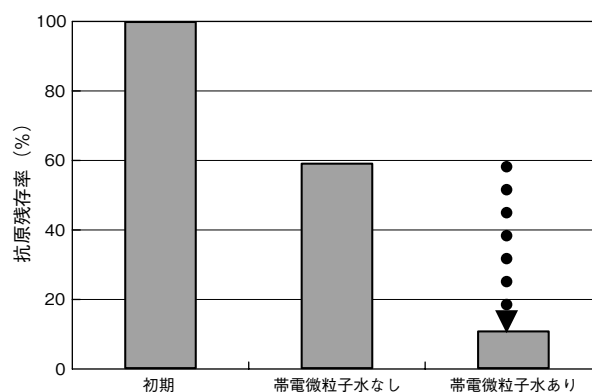


図5 1 m³チャンバ暴露24時間後の抗原残存率

両チャンバにおいて顕著な不活化効果が認められることから、より大きな空間においても同様の効果が期待できる。以上の結果から、従来から提案されてきた帯電微粒子水による顕著なアレルゲン不活化効果が定量的に確認できる。

5. あとがき

抗原を定量化できるELISA法によるアレルゲン不活化効果の評価において、供試抗原の濃度や活性を一定化できる精製抗原液を採用し、さらに抗原の保持担体を供試抗原とは別のたんぱく質であらかじめ吸着対象物をブロックして接種する方法の考案により、この抗原液を実際のアレルゲンの代替とする方法を開発した。

本法を帯電微粒子水のアレルゲン不活化効果の評価実験に適用し、その効果が高いことを定量的に確認した。

今後は、アレルゲンたんぱく質のアミノ酸組成や高次構造変化などの解析を行うことで、帯電微粒子水によるアレルゲン不活化効果のメカニズム解明に取り組んでいきたい。

*参考文献

- 1) 荒 勝俊：住環境ビジネスの動向と将来展望，バイオサイエンスとインダストリー，Vol. 61, No. 12, p. 821-824 (2003)
- 2) 須田 洋，中田 隆行，小豆沢 茂和，田中 友規，山口 友宏，山内 俊幸：静電霧化技術応用空気清浄機の付着臭除去とアレルギー不活化効果，松下電工技報，Vol. 53, No. 3, p. 16-19 (2005)
- 3) 小峰 裕己：ダニ・カビ完全対策，井上書院，p. 161-166 (2007)
- 4) 安枝 浩：スギ花粉アレルギー，医学のあゆみ，Vol. 200, No. 5, p. 358-362 (2002)
- 5) 安枝 浩：環境アレルギー，総合臨牀，Vol. 56, No. 5, p. 1840-1844 (2007)
- 6) 小林 健太郎，秋定 昭輔，平井 康一，渡邊 純一，宮田 隆弘：熱伝冷却を応用した静電霧化装置「バルチェ式 nanoe システム」，松下電工技報，Vol. 55, No. 1, p. 95-100 (2007)

◆執筆者紹介



井原 望

パナソニック電工解析センター(株)



宮田 隆弘

先行技術開発研究所



浅野 幸康

電器 R & D センター



山内 俊幸

電器 R & D センター
工学博士