

「第19回日本臨床環境医学会学術集会奨励賞受賞論文」

オゾンを活用したダニアレルゲン失活化に関する研究

村上 能庸 筏 義人

奈良県立医科大学住居医学講座

A study on the inactivation of house dust mite allergen by ozone

Yoshinobu Murakami Yoshito Ikada

Department of Indoor Environmental Medicine, Nara Medical University

要約

ダニを原因とするアレルギー患者は多く、また放置すると日常生活下で著しく増殖するため、その適切なアレルギー除去法の確立が望まれている。本研究では、室温下での有機物の分解効果が極めて高く活性寿命が非常に短い活性酸素の特徴に注目するとともに、安全性と材料劣化の問題にも留意し、温和な閉鎖系条件下でのオゾンによるアレルギーの失活化を試みた。その結果、オゾンは、アレルギーの原因・増悪物質であるアレルギーとプロテアーゼの双方を失活させ、そのメカニズムは活性酸素による分子の分解であると結論した。このオゾンによる失活効果は、水分子存在下での強力なヒドロキシラジカルの生成によりさらに増加し、より短時間で発現した。また、成層圏のオゾン層と同程度のオゾン濃度である4.2ppmでも長時間曝露により失活可能であった。

(臨床環境19: 89~94, 2010)

《キーワード》オゾン、失活、ダニ、アレルギー、プロテアーゼ

Abstract

The major allergen source in indoor environments appears to be the house dust mite. A drastic increase in the number of house dust mites may occur inconspicuously in the indoor environment. As the house dust mite has allergic and proteolytic qualities, the development of effective mite elimination methods have been long demanded. For the elimination of mite allergen, this study attempts to inactivate the allergic and proteolytic qualities by active oxygen treatment in a closed system under mild conditions. Our results suggest that the ozone treatment inactivates both protease and allergen by oxidative decomposition of their responsible biomolecules. This inactivation was strongly increased

受付:平成22年11月20日 採用:平成23年1月14日

別刷請求宛先:筏 義人

〒631-8521 橿原市四条町840 奈良県立医科大学住居医学講座

Received: November 20, 2010 Accepted: January 14, 2011

Reprint Requests to Yoshito Ikada, Department of Indoor Environmental Medicine, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan

by the presence of water molecules, probably because of generation of the hydroxyl radical which is much more reactive than ozone itself. The ozone concentration to inactivate both protease and allergen is lower than that of the ozone layer around the earth when treated for a long time.

(Jpn J Clin Ecol 19 : 89~94, 2010)

《Key words》 ozone, inactivation, house dust mite, allergen, protease

I. はじめに

今日、アレルギー疾患は日本人の4割が罹患するほどに増加しており¹⁾、現代の国民病ともいわれている。この傾向は若年層に顕著であるため、その対策が望まれている。

住居内に存在するアレルゲンには、ハウスダスト(ダニ、カビ、ペットの毛など)、花粉、化学物質(ホルムアルデヒドなど)、大気汚染物質(PM、NO_xなど)、黄砂などがある。化学物質や大気汚染物質に対しては、すでに安全基準が定められており、産業界もそれに従って排出防止に取り組んでいる。花粉や黄砂などの無生物粒子は増殖することはないが、ダニやカビは適切な対応を怠ると住居内で増加の一途をたどる可能性がある。

ダニにとっての餌の最大の供給源はヒトであり²⁾、住居はその生存や繁殖に必要な温度や湿度の供給源でもあるため、放置するとダニは日常生活の場で爆発的に増加する。事実、本邦の寝具中におけるダニアレルゲン量の幾何平均値は、喘息発症の危険値とされる10 μ g/g dustを上回っており、世界でも有数のダニ汚染国である^{3,4)}。また、室内の換気の不備や結露によってもカビは増殖するため⁵⁾、ダニやカビなどを含むハウスダスト対策は、居住者自身が日々の生活の中で継続的に対応しなければならない問題である。アレルゲン回避はアレルギー対策の有効な手段のひとつであるため^{6,7)}、室内環境においてこれらの増殖を抑え、さらに積極的に除去することが重要である。また、ダニやカビが分泌するプロテアーゼがアレルギー疾患の発症や増悪に関与することから^{8,9)}、プロテアーゼに対する注意も必要である。

本研究では、室温下での有機物の分解効果が極めて高く、かつ活性寿命が非常に短いために直

に不活性種となる活性酸素の特徴に注目し¹⁰⁾、オゾンによるアレルゲンとプロテアーゼの失活を試みた。オゾンには安全基準が設定されているが、さらに強い酸化力が繊維などの劣化を招くことから、閉鎖系にてより弱い条件下での失活の可能性について検討したので報告する。

II. 研究方法

1. 試料の作製

ダニ由来物質として、ダニ虫体抽出物(Dfb、ビオスタ、神戸)、ダニ糞抽出物(Dff、ビオスタ)、ダニアレルゲン(Der f1、生化学工業、東京)、およびDer f3(trypsin-like protease)の代替物としてブタ膵臓由来トリプシン(SIGMA-Aldrich, St Louis, MO)を用いた。これらのアレルゲンを25 mM トリス塩酸緩衝液(pH 6.8)に溶解した後、1.5 cm 角に切断した布片に滴下し、湿潤状態で試験に供した。乾燥状態で失活させる場合は、室温にて試験布片を乾燥後、試験に供した。各アレルゲンの試験用布片の材質とアレルゲン担持量は、Dfbではポリオレフィン系不織布片に10 μ g、DffおよびDer f1ではポリオレフィン系不織布片に50 μ g、トリプシンでは木綿布片に10 μ gとした。

オゾン曝露によるDfbのアレルゲン性の変化を評価するためには、ダニアレルゲンに鋭敏に反応する患者血清が必要である。筆者(Y.M)はダニアレルゲンに強く反応する重度のアレルギー患者であるため、筆者の血清をアレルギー患者血清として実験に使用した。血清の作製は、ベノジェクトII真空採血管(テルモ、東京)にて採血し、転倒混和後1,500gにて30分間遠心分離して血清を得た。得られた血清は分注し、使用前まで-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。

2. オゾン曝露

50 l 容量のプラスチック製コンテナ内にオゾン発生装置（野村電子工業（大阪府大東市）製オゾン発生装置、もしくはプラズマイオン発生装置）を設置し、試験片をオゾン発生装置の前10cmの位置に置いてオゾン曝露した。オゾン濃度は、所定時間ごとにガス吸入口を介してオゾン検知管（光明理化学工業、川崎）にて測定した。低濃度オゾン曝露試験では、変圧器を用いてオゾン発生量を調整した。

3. オゾン曝露試料の評価

試験片からのアレルゲンの抽出は、オゾン曝露した試験片を1.5ml チューブに入れ、25mM トリス塩酸緩衝液（pH6.8）1 ml を添加後、4℃にて1,400rpm 下で30分間振とうして行った。各抽出液を、プロテアーゼ活性測定、ダニ主要抗原 Der f1 定量、アレルギー患者血清中の IgE 抗体との反応性試験、および電気泳動に供した。

プロテアーゼ活性測定は、抽出試料50 μ l に200 μ M 濃度の合成蛍光基質（#3135-v、ペプチド研究所、大阪府箕面市）50 μ l を加え、37℃にて30分間反応させた後、試料中のプロテアーゼ作用による切断で合成基質から遊離した AMC 量を励起波長365nm、蛍光波長465nm にて定量した¹¹⁾。

ダニアレルゲン Der f1 は、ダニ抗原 Der f1 測定キット（ニチニチ製薬、三重県伊賀市）を用い、ELISA 法にて吸収波長415nm で定量した¹²⁾。

アレルギー患者血清中の IgE 抗体との反応性試験は次の順序で行った。予め4℃にて16時間反応させることにより標準物質および試料抽出液をコートした ELISA プレート（住友ベークライト、東京）に、アレルギー患者血清の10倍希釈液を添加し、プレート上に固定したアレルゲンに結合した IgE 量を抗ヒト IgE 抗体（ME-114, abcam, Cambridge, UK）、HRP 標識抗体（AP192P, Millipore, Billerica, MA）およびペルオキシダーゼ発色試薬（ML-1120 O、住友ベークライト、東京）を用い、発色量を吸収波長492nm にて定量した。

いずれの試験も、測定にはベックマン・コールター社製マルチモードプレートリーダー DTX

800を使用し、オゾン未曝露試験片の抽出液の値を100としてオゾン曝露の影響を評価した。

オゾン曝露によるダニ抗原分子への影響は、オゾン曝露した Der f1 分子を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）後、ゲル中のタンパク質分子を銀線染色法（2D-銀線染色試薬、コスモバイオ、東京）にて可視化して評価した。

III. 結果

1. オゾン曝露における水分子の影響

トリプシン（Der f3 代替物）10 μ g へのオゾン曝露の影響をプロテアーゼ活性測定にて評価した結果を図1に示す。実験系内のオゾン濃度は時間に依存して増加し、試料の状態（乾燥・湿潤）にかかわらず、オゾン曝露時間とともにプロテアーゼ活性は低下した。しかし、完全失活に要するオゾン曝露時間は、乾燥状態では30分間、湿潤状態ではわずかに5分間であった。

2. オゾンによる Der f1 分子の分解

湿潤条件下での Der f1 分子へのオゾン曝露の影響を電気泳動にて調べた結果を図2に示す。

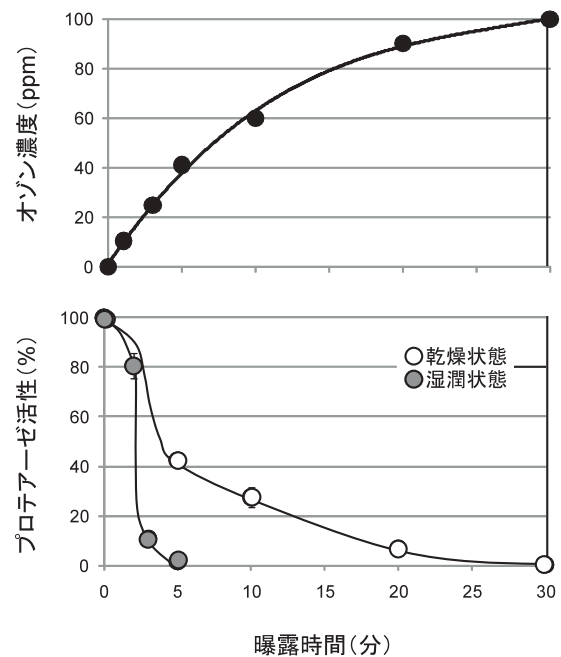


図1 オゾン曝露におけるオゾン濃度とプロテアーゼ失活に対する水分子の影響 (n=3)

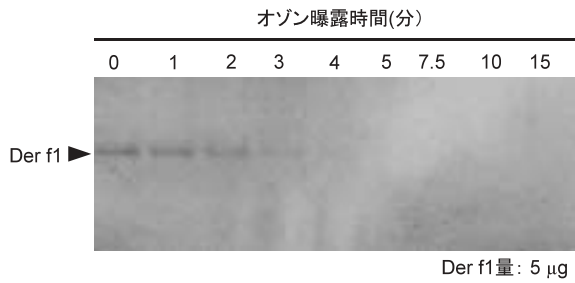


図2 水分子の存在下でオゾン曝露した Der f1分子の電気泳動バンド

Der f1を示すバンドは曝露時間とともに薄くなり、曝露時間5分以上では消失した。これより、オゾン曝露により Der f1分子は分解を受けたと考えられる。

3. 低濃度オゾン曝露

乾燥状態のトリブシン10 μ gへの低濃度オゾン曝露の影響をプロテアーゼ活性測定にて評価した結果を図3に示す。実験系内のオゾン濃度は時間とともに増加し、開始から6時間後に最高値4.2ppmに達し、それ以降ではこの値を維持した。

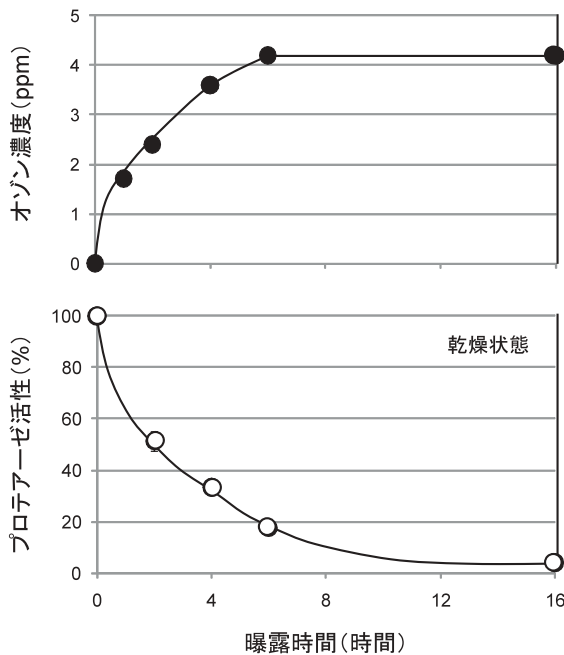


図3 低濃度オゾン曝露のプロテアーゼ活性に及ぼす影響 (n=3)

オゾン濃度が4.2ppm以下の条件でも、プロテアーゼ活性は曝露時間とともに低下し、曝露時間16時間で、トリブシンのプロテアーゼ活性は未曝露試料の4%にまで低下した。

4. ダニ抽出物へのオゾン曝露

ハウスダストはアレルゲン以外にも多くの物質を含んでいるため、夾雑物共存下でのオゾンの有効性も評価する必要がある。そこで、アレルゲン以外の夾雑物を多く含むダニ抽出物 (Dff および Dfb) へのオゾン曝露の影響を調べた。乾燥ダニ糞抽出物 Dff 50 μ gへのオゾン曝露の影響を図4に示す。実験系内のオゾン濃度は時間とともに増加し、それとともにプロテアーゼ活性および Der f1抗原性は低下し、曝露時間1時間でプロテアーゼ活性は14%、Der f1の抗原性は26%にまで低下した。

図5は乾燥ダニ虫体抽出物 Dfb 10 μ gへのオゾン曝露の影響を調べた結果である。図から明らかなように、実験系内のオゾン濃度は曝露開始から約1時間でほぼ一定の値を示した。曝露時間とともにアレルギー患者血清中のIgE抗体に対す

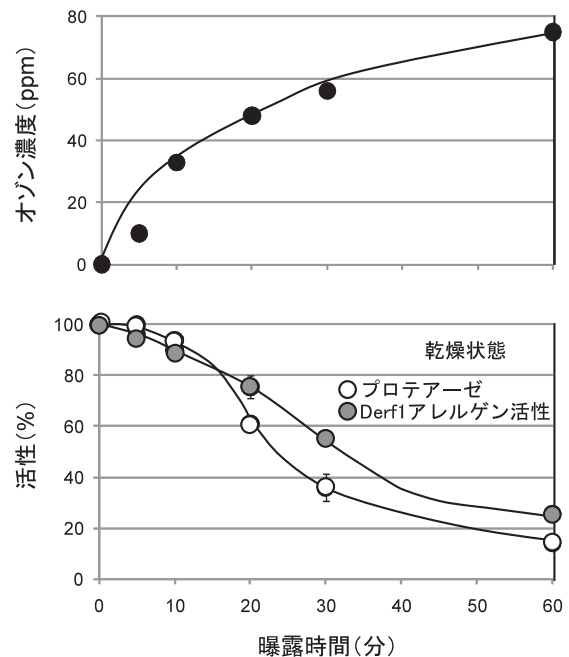


図4 ダニ糞抽出物 (Dff) へのオゾン曝露の影響 (n=3)

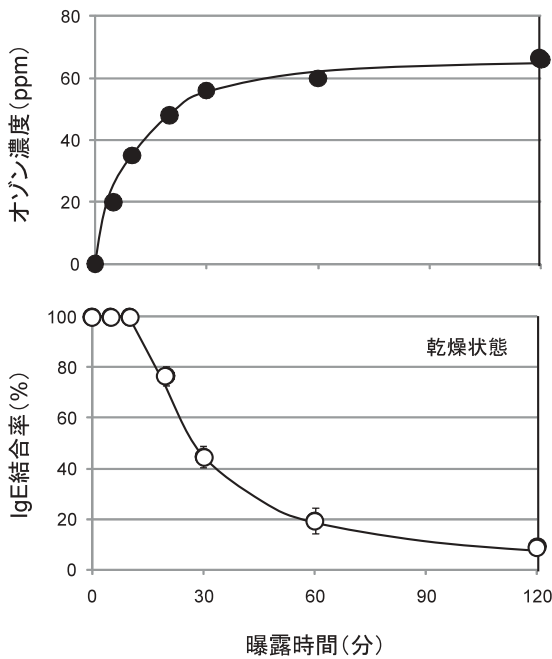


図5 ダニ虫体抽出物(Dfb)へのオゾン曝露の影響(n=3)

る反応性も低下し、曝露2時間で未曝露試料の抗原性の9%にまで低下した。

IV. 考察

本研究では、アレルギーの発症と悪化に関与するダニアレルゲンおよびプロテアーゼの失活についてオゾンを用いて調べた。オゾンは、強い酸化力による有機物の分解が期待される半面、ヒトへの有害性や有機材料劣化の問題も考慮する必要がある。本研究では、高濃度オゾン曝露に代替する要素として、閉鎖系での使用を前提に水分子の影響と時間の影響を検討した。

図1に示すように、オゾン曝露時間とともにトリプシン(Der f3代替物)は失活した。完全失活までに要する曝露時間は乾燥下では30分間であるが、湿潤下では5分間であった。これらの結果より、オゾンはトリプシンを失活させ、その失活効果は水分子の存在により顕著に増大することが明らかとなった。これは、オゾンが水分子と反応した結果、オゾンよりも強力なヒドロキシラジカルが生成したためと考えられる¹³⁾。図2に示した

電気泳動の結果からも、オゾン曝露によってダニアレルゲン分子が分解したと考えられる。これらの結果は、オゾン曝露による失活のメカニズムが分子レベルでの分解であることを示している。

図3より明らかなように、オゾン濃度が最高4.2ppmでの曝露でも、乾燥トリプシンのプロテアーゼ活性は曝露時間とともに低下し、曝露時間2時間で半減した。これより成層圏内のオゾン層のオゾン濃度(4~5ppm)と同程度でも¹⁰⁾、時間をかけることで失活可能なことが明らかとなった。

図4および5に示すように、アレルゲン以外の夾雑物が多く含まれるダニ抽出物(DffおよびDfb)でも、試料中のプロテアーゼ活性、ダニ主要抗原Der f1の抗原性、アレルギー患者血清中のIgE抗体との反応性などのいずれもが、オゾン曝露時間とともに低下し、曝露1時間以内に半減した。夾雑物を多く含む試料でもオゾンによる失活効果が認められたことから、アレルゲン以外に多くの物質を含むハウスダストにおいても同様の効果が期待される。

以上の結果より、オゾンを活用したアレルゲンの失活が有望であると考えられるが、一方で、国民生活センターの報告書に示されているように、オゾンの安全性に対する不安感があるのも事実である¹⁴⁾。現在、民生用として密閉型のオゾン洗濯機が販売されており、さらに室内へのオゾン漏洩を防ぐ安全対策も施されている。われわれも、オゾンの利用には安全対策が必要不可欠と考えており、このような密閉型のオゾン装置によるアレルゲン失活装置の実現を期待している。今後、オゾンを活用したアレルゲンなどの失活化技術の研究を進め、アレルギーに苦しむ多くの人達に役立ちたいと考えている。

謝辞

本研究は、奈良県立医科大学住居医学研究奨励金による成果である。

文献

- 1) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会：

- 鼻アレルギーガイドライン 2009年版、ライフサイエンス、2008, pp8-12
- 2) Takeda S, Inada T: Change in mite population and mite allergen during breeding of *Dermatophagoides farinae* with house-dust and human dander/skin scales. *Med Entomol Zool* 58: 19-28, 2007
 - 3) 福富友馬、安枝浩、他：室内環境中のダニ・昆虫とアレルギー疾患. *室内環境* 12 : 87-96, 2009
 - 4) 榎本雅夫、永井智：小児アレルギー性鼻炎の抗原除去・回避とその実際. *MB ENT82* : 19-25, 2007
 - 5) 濱田信夫：冬のサッシの結露とカビ汚染. *防菌防黴*35 : 23-29, 2007
 - 6) W. J. Morgan, *et al*: for the Inner-City Asthma Study Group: Results of a home-based environmental intervention among urban children with asthma. *N Engl J Med* 351: 1068-1080, 2004
 - 7) 安枝浩：室内環境アレルゲンとアレルギー疾患の発症. *感染炎症免疫*35 : 12-21, 2005
 - 8) Kauffman HF: Interaction of environmental allergens with airway epithelium as a key component of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*3: 101-108, 2003
 - 9) Reed CE, Kita H: The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 114: 997-1008, 2004.
 - 10) 日本医療・環境オゾン研究会：環境分野におけるオゾン利用の実際、日本医療・環境オゾン研究会、2007, pp12-23
 - 11) Takai T, Kato T, *et al*: Recombinant Der p 1 and Der f1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 944-952, 2005
 - 12) 榎本雅夫、永井智、他：抗原除去・回避のEBM. *アレルギーの臨床*27 : 45-50, 2007
 - 13) 特定非営利活動法人日本オゾン協会オゾンハンドブック編集委員会：オゾンハンドブック、サンヨー書房、2004, pp67-117
 - 14) 独立行政法人国民生活センター『家庭用オゾン発生装置の安全性』（平成21年8月27日発表）