

# 弱酸性次亜塩素酸水溶液のスギ花粉アレルゲン Cryj1 に対する不活化効果

The Inactivation Effect of Weak Acid Hypochlorous Solution against Cryj1, Cedar Pollen Allergen

小野 朋子・山下 光治

Tomoko Ono, Koji Yamashita

株式会社エイチ・エス・ピー 研究開発部

Research and Technology Development Division, HSP company

## 1. はじめに

実験動物施設の従事者にとって実験動物アレルギーは労働安全衛生上深刻な問題となっている。2009年に実施された日本実験動物学会のアンケートによると、回答機関のうち半数近い実験動物施設で動物アレルギーが起きており、生死にかかわるアナフィラキシーが6件、重度の喘息様症状も48件報告されている<sup>1)</sup>。動物アレルギーの原因動物はマウス・ラット・ウサギなどであり、動物本体や床敷、空中粉塵に含まれる体毛やふけ、唾液、皮脂腺、糞尿などの蛋白抗原が、作業者の口・鼻から侵入し感作が成立する。症状は目のかゆみ・充血、クシャミ、喉のかゆみや咳、皮膚のかゆみなどがあり、稀に全身症状としてアナフィラキシーショックが出る場合がある<sup>2-4)</sup>。これら動物アレルギーを防ぐためには、マスク・ゴーグル等でアレルゲンへの曝露量を減らすとともに、室内の清掃や空気清浄化によって、アレルゲン量そのものを低減させる必要がある。

本研究では、現在実験動物施設で衛生管理および消臭対策として使用されている弱酸性次亜塩素酸水溶液(スーパー次亜水)の動物アレルゲンへの効果を検討する第一段階として、同じアレルゲン物質であるスギ花粉アレルゲン(Cryj1)に対する不活化効果について基礎的に検討を行った<sup>5)</sup>。

## 2. 弱酸性次亜塩素酸水溶液とは

弱酸性次亜塩素酸水溶液は、アルカリ性である次

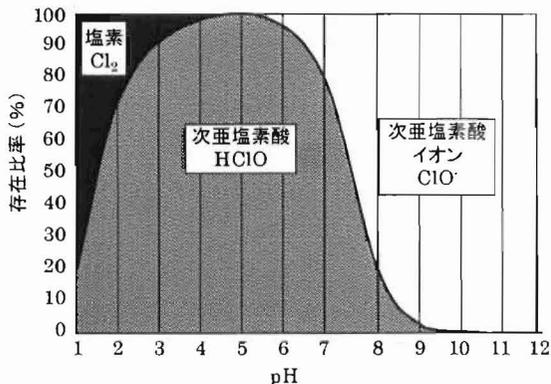


図1 水溶液中での有効塩素の存在形態

亜塩素酸ナトリウムに塩酸を希釈混合し、pHを5.5~6.5の弱酸性域に調製したものである。図1に示すように、次亜塩素酸ナトリウムのpHを弱酸性に調製することにより、有効塩素の成分は解離型の次亜塩素酸イオン(ClO<sup>-</sup>)から非解離型の次亜塩素酸(HClO)の割合が増大する。次亜塩素酸ナトリウムの殺菌効果は水中の総有効塩素濃度ではなく非解離型の次亜塩素酸(HClO)の濃度に依存する。これは、解離型のClO<sup>-</sup>は微生物の細胞膜にある脂質二重層を通過できず細胞の外側からのみ酸化作用を及ぼすのに対し、非解離型のHClOは、適度の分子サイズと電気的中性の性質から、容易に微生物の細胞壁および形質膜を通過するため、細胞の内側と外側両面から酸化作用を及ぼし、殺菌効果および殺菌速度が向上されるためである<sup>6-7)</sup>。

弱酸性次亜塩素酸水溶液は医療福祉分野および食品分野で多く使用されてきているが、実験動物施設でも除菌および消臭の目的で作業従事者の手洗い、器具の洗浄、環境清掃、空間への噴霧等に使用されている<sup>8-9)</sup>。

## 3. 花粉アレルゲン Cryj1 に対する弱酸性次亜塩素酸水溶液の不活化効果

### 3.1 試験方法

#### 3.1.1 弱酸性次亜塩素酸水溶液の調製

弱酸性次亜塩素酸水溶液は12%次亜塩素酸ナトリウムを希釈して有効塩素濃度50ppmの次亜塩素酸ナトリウム水溶液を調製し、8.5%の塩酸でこれをpH6.0に調整した。対照として滅菌蒸留水を用いた。pHはEH Controller PH-51((株)IWAKI)、有効塩素濃度はハンディ水質計アクアブ AQ-102(柴田科学(株))を用いて測定した。

#### 3.1.2 スギ花粉アレルゲンの調製

本研究ではアレルゲンとしてスギ花粉アレルゲンに着目した。ニホンスギ(*Cryptomeria japonica*)は日本人の約30%が罹患している花粉症の主要原因植物であり、例年2~4月に雄花(図2-A)から放出される花粉(図2-B)によって花粉症が流行する。スギ花粉アレルゲンは現在数種類同定されているが<sup>10)</sup>、その中で最も主要なアレルゲンは花粉壁外層およびその表面に付着するオービクル(微粒子)に存在する

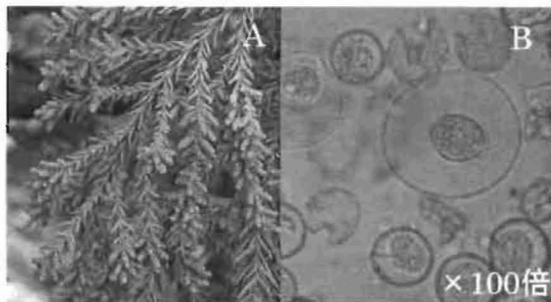


図2 ニホンスギの雄花(A)と花粉(B)

Cryj1 である<sup>11-12)</sup>。本試験ではこの Cryj1 を対象として不活化試験を行った。Cryj1 原液として、スギ花粉粗抽出液(10ng/ml ITEA(株)東京環境アレルギー研究所)およびニホンスギ雄花(岡山県内)から採取したスギ花粉を滅菌蒸留水に浮遊させたものを用い、各々粗抽出液およびスギ花粉とした。

### 3.1.3 水中浮遊アレルゲンの不活化

基礎試験として、水中に浮遊させたアレルゲンに対する弱酸性次亜塩素酸水溶液の不活化効果の検討を行った。試験にあたっては 10ml の弱酸性次亜塩素酸水溶液および蒸留水に粗抽出液およびスギ花粉を一定時間接触させた。一定時間後、その一部を経時的に採取し、速やかに 0.1%チオ硫酸ナトリウムを添加して有効塩素を失活させたものを試料液とした。スギ花粉については有効塩素失活後の試料液に NaHCO<sub>3</sub> を 0.125M となるように添加して 1 時間静置し Cryj1 を抽出した。Cryj1 濃度は、弱酸性次亜塩素酸水溶液接触前および接触後の試料液について、スギ花粉抗原 Cryj1 測定キット(ニチニチ製薬(株))を用いて ELISA 法にて反応後、マイクロプレートリーダー Multi-spectrophotometer Vient (Dainippon Sumitomo Pharm)にて 450nm の吸光度を測定して決定した。

### 3.1.4 付着アレルゲンの不活化

実際の生活環境中での花粉アレルゲンの不活化を想定し、2種の部材に付着させた付着アレルゲンに対する弱酸性次亜塩素酸水溶液の不活化効果の検討を行った。担体は、机・床等の硬質無孔質表面を想定しプラスチックシャーレ(φ86mm (株)アテクト)およびカーテン・衣類・紙など繊維質表面を想定し濾紙(5×5cm No.2 アドバンテック東洋(株))を用いた。Cryj1 原液 0.1ml を担体に塗布し、室内にて 1 時間乾燥させた。この担体に対し、弱酸性次亜塩素酸水溶液で①浸漬処理 ②スプレー処理 ③噴霧処理を行った(図3)。

#### ①浸漬処理

10ml の弱酸性次亜塩素酸水溶液に 10 分間静置浸漬させた。

#### ②スプレー処理

弱酸性次亜塩素酸水溶液を 3 回担体にスプレーし

浸漬	スプレー	噴霧
10mlの被験液に 10分間静置浸漬	0.5ml×3回噴射 後10分静置	噴霧口から15cm の地点で噴霧粒子 に30秒間接触

図3 付着アレルゲンに対する不活化試験

(1回 0.5ml), 10 分間静置させた。

#### ③噴霧処理

超音波式噴霧器(ステリ愛(株)エイチ・エス・ピー)噴霧量 320ml/h の噴霧口 15cm の地点にて 30 秒間噴霧粒子に接触させた後、10 分間静置させた。

各種処理前および処理後の付着担体を 10ml の 0.125M NaHCO<sub>3</sub> に回収して 1 時間抽出を行い、処理前後の Cryj1 濃度を測定した。なお、対照は蒸留水とした。

## 4. 結果および考察

### 4.1 水中浮遊アレルゲンの不活化

図4に弱酸性次亜塩素酸水溶液に接触させた場合の水中浮遊アレルゲン(Cryj1)の経時変化を示す。初期の Cryj1 濃度は粗抽出液で 0.46ng/ml、スギ花粉で 56.0ng/ml であった。粗抽出液の場合、弱酸性次亜塩素酸水溶液接触 60 秒で Cryj1 濃度は 0.04ng/ml に低下し、高いアレルゲン不活化効果が認められた。スギ花粉の場合も Cryj1 濃度は接触 60 秒後で 16.2ng/ml、600 秒後で 3.5ng/ml と経時的に減少し、粗抽出液と同様に不活化効果が認められた。

### 4.2 付着アレルゲンの不活化

図5に粗抽出液およびスギ花粉をプラスチックシャーレに付着させた場合の弱酸性次亜塩素酸水溶液の付着アレルゲンの不活化効果を示す。プラスチックシャーレの場合、担体 1 枚あたりの処理前の Cryj1 量は粗抽出液で 3.6ng、スギ花粉で 63.9ng であった。粗抽出液の場合、浸漬、スプレー、噴霧ともに処理

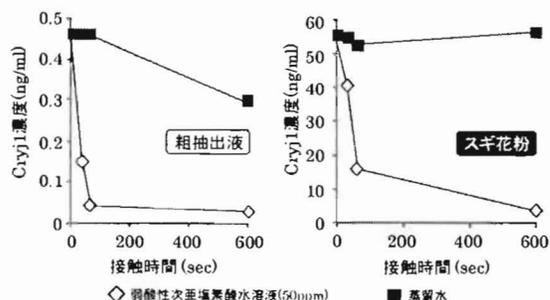


図4 弱酸性次亜塩素酸水溶液に粗抽出液およびスギ花粉を接触させた場合の Cryj1 不活化効果

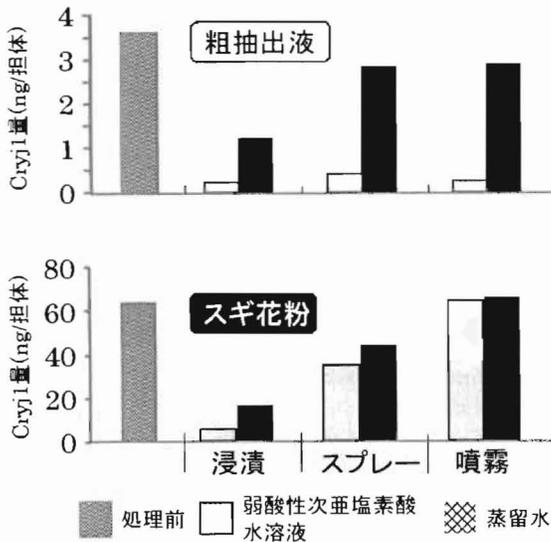


図5 プラスチックシャーレに付着した粗抽出液およびスギ花粉に対する弱酸性次亜塩素酸水溶液のCryj1不活化効果

後のCryj1量は担体1枚あたり0.2、0.4、0.3ngとなり、蒸留水同処理した場合と比較して高い不活化効果が認められた。一方、スギ花粉の場合は処理によって不活化効果が異なった。最も不活化効果が高かったのは浸漬処理で担体1枚あたりのCryj1量は5.5ng、次いでスプレーの34.9ngであり、噴霧では63.7ngとほとんど不活化効果が認められなかった。

図6に粗抽出液およびスギ花粉を濾紙に付着させた場合の弱酸性次亜塩素酸水溶液の付着アレルゲンの不活化効果を示す。濾紙の場合、担体1枚あたりの処理前のCryj1量は粗抽出液で1.3ng、スギ花粉で100.2ngであった。粗抽出液の場合、最も高い不活化効果を示したのは浸漬処理で、次いで噴霧、スプレーの順であり、処理後のCryj1量は担体1枚あたり各々0.08、0.4、0.8ngであった。一方、スギ花粉の場合は、浸漬、スプレー、噴霧の順で不活化効果が高く、処理後のCryj1量は担体1枚あたり各々12.0、34.1、85.2ngであった。

#### 4.3 考察

以上の結果より、弱酸性次亜塩素酸水溶液はスギ花粉アレルゲンCryj1に対して不活化効果を有することが分かった。本試験では、スギ花粉よりも粗抽出液に対して高い不活化効果が認められた。これは、Cryj1の濃度がスギ花粉の方が高いこと、粗抽出液はCryj1が溶液中に溶解しているのに対し、スギ花粉は花粉外壁や微粒子内に内在しているため、弱酸性次亜塩素酸水溶液が接触・不活化するまでに時間を要したことが考えられる。

また、付着アレルゲンに対しても、いずれの条件においても蒸留水と比較して次亜塩素酸水溶液で処

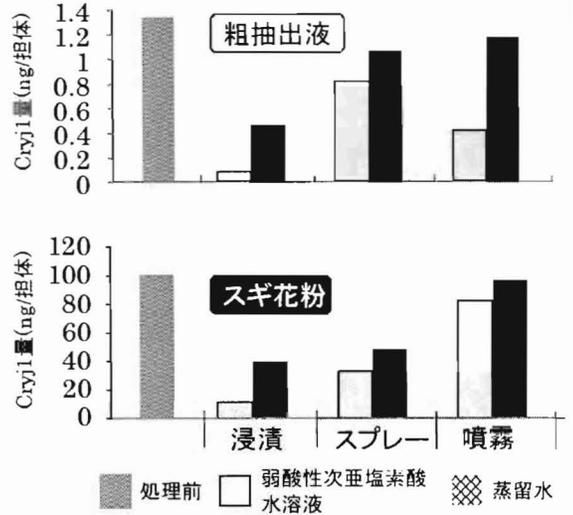


図6 ろ紙に付着した粗抽出液およびスギ花粉に対する弱酸性次亜塩素酸水溶液のCryj1不活化効果

理したほうがCryj1量は低減していることからCryj1に対して不活化効果が認められた。最も効果があったのは浸漬処理であった。これは、接触効率が良いことと、浸漬液中にCryj1が流出し担体への付着量が減少したためと考えられる。また、粗抽出液をプラスチック表面に付着させた場合は、各処理方法とも噴霧安定した不活化効果が得られた。また、スプレーおよび噴霧は浸漬処理よりも効果が低かったが、実際に担体に接触した水量を計測すると、浸漬、スプレー、噴霧の順に10ml、1.5ml、0.13mlであり、スプレーおよび噴霧は弱酸性次亜塩素酸水溶液の接触量が少なかったことが影響していると考えられる。

今回検討した3種の使用法は、現在、現場で除菌や消臭目的でよく実施されている手法である。花粉アレルゲンの不活化に対しても、有効塩素濃度や接触時間等の最適な適用条件を探索し、有効な使用方法を提案したい。また、花粉の多くは空中に浮遊した状態から、眼、鼻、喉の粘膜に付着することによってアレルギーを発症することから、浮遊状態の花粉アレルゲンに対する不活化効果についても検討を進めたい。

#### 5. おわりに

本研究では、アレルゲンとしてスギ花粉に着目し、弱酸性次亜塩素酸水溶液の不活化効果について検討を行い、高い不活化効果を得ることができた。スギ花粉アレルゲンCryj1および動物アレルゲンはいずれもタンパク質や多糖類であるため、弱酸性次亜塩素酸水溶液は動物アレルゲンにも不活化効果を有することが期待される。今後、各種の動物アレルゲンに対する弱酸性次亜塩素酸水溶液の不活化効果につ

いても基礎的に検討し、実験動物施設内での有効な動物アレルギー対策方法の開発を目指したい。

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました岡山県工業技術センター研究開発部福崎智司先生および化学・新素材グループの皆様、島根大学生物資源科学部生態環境科学科、佐藤利夫先生に深謝致します。

## 7. 参考文献

- 1)米川博通、動物アレルギーの現状(アンケート調査の結果)、実験動物技術、45(2)、103-108、2010
- 2)熊井恵美、動物アレルギーおよびアナフィラキシー発症時の対策、実験動物技術、45(2)、109-112、2010
- 3)坂口雅弘、動物アレルギー、実験動物技術、45(2)、99-102、2010
- 4)Venables, K. M. et al., Laboratory animal allergy in a pharmaceutical company, Br. J. Indust. Med.,45 660-666, 1988.
- 5)小野朋子、山下光治、佐藤利夫、弱酸性次亜塩素酸水溶液のスギ花粉アレルギー Cryj1 に対する不活化効果、日本防菌防黴学会第 39 回年次大会要旨集、2011
- 6)福崎智司、次亜塩素酸を基盤とする洗浄・殺菌の理論と実際、New Food Industry、47(6)、9-22、2005
- 7)福崎智司、次亜塩素酸ナトリウムの特性と洗浄・殺菌への効果的な利用、食品工業、49 (16)、36-43、2006
- 8)山下光治、三宅真名 他、弱酸性次亜塩素酸水を用いた動物実験施設での衛生管理の可能性 -ホルマリン燻蒸に替わる新たな消毒資材としての活用、岡山実験動物研究会報、20、28-32、2003

- 9) Ching, F.L. et al, Application of Hypochlorous Acid in Management of Mouse Facility, 第 54 回日本実験動物学会総会講演要旨集. 2007
- 10)Fujimura, T. et al, Two-dimensional IgE-binding spectrum of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens, Int Arch Allergy Immunol, 133(2), 125-135, 2004
- 11)中村澄夫、佐藤文隆 他、スギ花粉アレルギー Cryj1 と Cryl2 の発芽花粉における局在性、日本花粉学会誌、50(1)、15-22、2004
- 12)Maria S.C et al, Immunocytochemical localization of Cry j 1, the major allergen of *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae) in *Cupressus arizonica* and *Cupressus sempervirens* (Cupressaceae) pollen grains, Sexual plant reproduction, 16(1), 9-15, 2003

## 要約

弱酸性次亜塩素酸水溶液(スーパー次亜水)の動物アレルギー不活化への前段階として、スギ花粉アレルギー Cryj1 に対する不活化効果を検討した。スギ花粉の粗抽出液およびスギ花粉本体に対し、有効塩素濃度 50ppm の弱酸性次亜塩素酸水溶液は高い不活化効果を有していた。また、濾紙やプラスチック表面に付着したアレルギーに対しても、浸漬、スプレー、噴霧の各種処理を行うことにより、アレルギーの不活化が可能であった。今後、空气中に浮遊するアレルギーに対する不活化効果を検討するとともに、各種動物アレルギーに対する不活化効果についても検討したい。