

光触媒によるダニアレルゲン低減化

西川奈緒美*, 山崎栄次**, 増山和晃*, 橋本忠範***

Deactivation of the Mite Allergen by Photocatalyst

Naomi NISHIKAWA, Eiji YAMAZAKI, Kazuaki MASUYAMA
and Tadanori HASHIMOTO

Degradation of the mite allergen (Derf 1) by photocatalytic treatment with titanium dioxide (TiO₂) was investigated. The deactivation of Derf 1 was estimated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). With increasing the amounts of photocatalyst, the rate for the deactivation of mite allergen (Derf 1) increased gradually. When the photocatalytic reaction was performed with 1 mg of TiO₂ for 1 h, the deactivation of Derf 1 was achieved more than 96.9%. The photocatalytic treatment with TiO₂ was very effective for the deactivation of mite allergen. To elucidate the mechanism of the deactivation of Derf 1 by photocatalytic treatment, amino acid analysis was also performed.

Key words : Mite Allergen, Photocatalyst, ELISA, Amino Acid Analysis

1. はじめに

近年、ダニの排泄物、その死がい、及びスギ花粉による室内汚染が原因で引き起こされる小児気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギーが問題となっている。これらアレルギーの発症患者は増加傾向にあり、解決すべき重要な課題の一つとなっている。この対策には、薬の投与を主とする内科的治療法¹⁾とアレルギーが体内に入らないようにする抗原回避による予防法がある。この予防法の一つとして、空気清浄機やマスクを用いる方法があり内科的治療法よりも患者への負担が少ないことから普及しつつある。しかし、フィルターに活性炭のような吸着剤を付着させるこの方法は、吸着されたアレルギーが再飛散する可能性がある。そのため、アレルギー源を吸着させるだけでなく、アレルギーを変性や分解させるなどして不活性化することが必要である。例

えば、タンニン酸²⁾を用いてアレルギーを不活性化する方法が試みられたが、水中で使用すると容易に洗い流されるため効果を持続させることが困難であった。また、コロナ放電³⁾やイオンクラスター⁴⁾でアレルギーを無害化する方法があるが、高価な装置が必要であるなどの課題が残されている。

本研究では、環境浄化に広く用いられている二酸化チタンを触媒として、水中や空気中の有機汚染物質などの光による分解技術を、アレルギーのひとつであるダニアレルゲン(Derf 1)の低減化に応用する試みを行った。さらに、光分解処理をした Derf 1 のアミノ酸分析により、アレルギーの低減化機構の解明を試みた。

2. 実験方法

2. 1 アレルゲンと光触媒材料

アレルギーとして生化学工業製のダニアレルゲン (*Dermatophagoides farinae* I: Derf 1)を使用した。Derf 1 の分子量は 25kDa である。

光触媒材料として市販の TiO₂ 粉末 (P-25,

* 材料技術グループ

** 生物食品グループ

*** 三重大学

Degussa 社製)を使用した。P-25 はアナタース(80%)とルチル(20%)からなっている。平均粒径は 30nm, 表面積は 50m²/g である。

2. 2 光分解反応溶液の調製

はじめに界面活性剤 Tween20 を 0.06%含むリン酸緩衝溶液(PBS-T)を調製した。次に、抗原 Derf 1(2.5 μg/25 μL)を濃度が 31ng/ml になるように PBS-T で希釈した。この抗原溶液 1.05ml に光触媒を入れ、出力が 1mW/cm² の UV ランプを所定時間 (0,10,20,30,60,90 分および 24 時間) 照射しながら、振とうを行った。また、ブランクとして UV による抗原の減少を測定するため、光触媒なしでも処理を行った (BLANK1)。さらに、光触媒への Derf 1 の吸着を把握するため、暗条件下でも同様の処理を行った (BLANK2)。

2. 3 残留抗原量の測定

上記の照射後、溶液を遠心分離機で、光触媒粉体と抗原溶液を分離し、抗原溶液を酵素免疫定量法 (Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) 用試料とした。

ELISA 法には Delf 1 抗原に対する抗体を吸着させた 96 ウェルプレート (LCD アレルギー研究所製) を用いた。はじめに、プレートを洗浄液で 3 回洗浄し、抗体を吸着させた 96 ウェルに検量線を作成するための標準溶液と上記の操作を行った後の ELISA 用試料を 50 μl ずつ添加した。そして、その後ピオチン結合抗体を 50 μl ずつ添加し、振とうし恒温層にて 37°C で 2 時間インキュベートした。次に、洗浄液でそのウェルを 3 回洗浄し、あらかじめ調製しておいたストレプトアビジン結合ガラクトシダーゼ溶液を 100 μl 添加し、恒温槽にて 37°C で 1 時間インキュベートを行った。インキュベート終了後、6 回洗浄し、ウェルに発色試薬である基質溶液を 100 μl 添加し、十分に発色するまで恒温槽にて保持した。発色後、基質溶液の上に反応停止液を 100 μl 添加し、反応を停止させた。そして、プレートリーダーを用いて、415nm での吸光度を測定した。

2. 4 アミノ酸分析

アミノ酸分析用試料は、2. 2 と同様に出力が 1mW/cm² の UV ランプを所定時間 (0,10,20,30,60, 90 分および 24 時間) 照射して調製した。

アミノ酸分析を行うための前処理として、処理後の抗原溶液を 1%wt/V のフェノールを含む 6 N の HCl に溶解し、N₂ 存在下 110°C で 21 時間加熱する

ことで加水分解した。そして、エタノール:蒸留水:トリエチルアミン:フェニルイソシアネート=7:1:1:1 の割合で混合した反応液を加え、誘導体化処理を行った。アミノ酸残基を Waters 社の Pico Tag system アミノ酸分析装置を用いて測定した。

3. 結果と考察

3. 1 ELISA 法による光触媒性能評価 — 光照射時間の影響 —

光触媒量を 5mg とし、光照射時間を 0,10,20,30, 60,90 分と変化させ、ダニアレルゲン低減化効果を調べた。光照射後、残留する抗原の活性を ELISA 法によって測定し、光触媒効果を評価した。その結果を図 1 に示す。触媒存在下で UV を照射すると、図 1 に示すように 10 分で急速に抗原が減少している。これはアレルゲンが光分解により変性したため、ELISA 法における抗体との結合能力をなくしたことによる。すなわち、抗原の低減化率は 90%である。さらに、30 分後には、ほぼ抗原が除去され、その後変化はなかった。それに対し、触媒なしで UV 照射をした場合 (BLANK1)、および触媒を加えて暗条件 (BLANK2) で放置した場合抗原はほとんど除去されなかった。

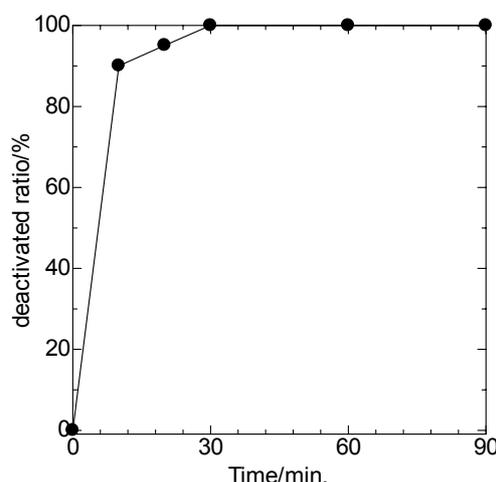


図1 光照射時間を変化させたときのダニアレルゲン低減化率

3. 2 ELISA 法による光触媒性能評価 — 触媒量の効果 —

次に、ダニアレルゲン低減化処理に用いる光触媒量を 0mg (BLANK1), 1mg, 2.5mg, 5mg, 10mg, 50mg と変化させ、触媒量の違いによるダニアレル

ゲン低減化効果を調べた。光触媒量の違いによる UV 照射時間に対する低減化率を図 2 に示す。触媒量 1mg, 2.5mg において 10 分の UV 照射では低減化率はそれぞれ 35%と 70%程度にとどまっていた。照射時間を長くすると、徐々に分解は進み、30 分では低減化率 100%に近づいている。ダニアレルゲンの低減化には吸着と光分解の二つの要素があると考えられる。触媒量が 10mg では触媒量への吸着が無視できないため、アレルゲン量が減少し、UV 照射 10 分で低減化率は 90%程度を示した。その後、徐々に分解が進み、90 分では低減化率がほぼ 100%を達成した。このように濃度 31ng/ml のダニアレルゲンを低減化するためには、10 分の UV 照射では、5mg 程度の触媒が必要である。一方、10mg, 50mg の触媒量では粉末への吸着による抗原減少も考えられるため、添加量の最適化が必要である。90 分照射では触媒添加量にかかわらず、ほぼ 100%低減化された。以上のことから、ダニアレルゲンの低減化に光触媒が非常に有効であることがわかった。ここには載せていないが、参考試料として用いた活性炭シートでは、分解率が低く、活性炭シートへのダニアレルゲンの吸着はほぼないことが確認できた。

3. 3 ダニアレルゲンの低減化機構

光触媒によるダニアレルゲンの低減化機構の基礎的データを得るために、分解後のアミノ酸量をアミノ酸分析法を用いて測定した。ダニアレルゲンはたんぱく質なのでアミノ酸で構成されている。よって、ダニアレルゲン(Der f1)抗原の低減化処理後のア

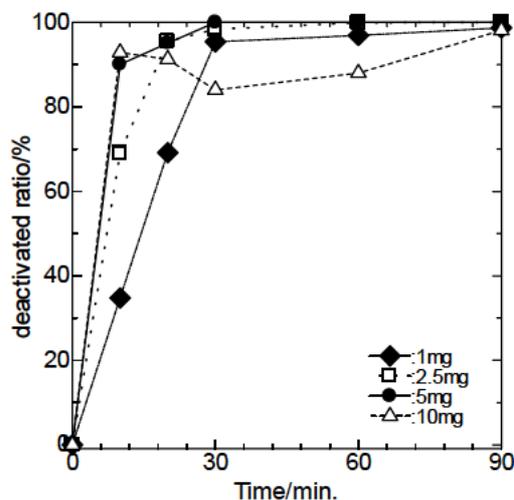


図2 種々のTiO₂触媒量におけるダニアレルゲン低減化率

ミノ酸残基残存率を調べることによって、抗原の分解反応の進行度を確認することができる。アミノ酸分析を行う前に、加水分解と誘導体化処理を行うため、これらの処理による影響がないことを確認するため、光触媒を入れずに UV 照射のみの試料 (BLANK1) と光触媒暗条件とした試料 (BLANK 2) についても同様の処理を行い、アミノ酸分析を行った。その結果、UV 照射のみおよび光触媒暗条件で行った試料についてはほぼ変化はなかった。低減化処理後の試料をアミノ酸分析した結果を図 3 に示す。これらの結果からアミノ酸濃度の減少傾向は 3 つのグループに分類できる。

- (a) アスパラギン酸 (ASP), グリシン (GLY), アラニン (ALA)
- (b) ヒスチジン (HIS), イソロイシン (ILE), メチオニン (MET), フェニルアラニン (PHE), チロシン (TYR), バリン (VAL)
- (c) ロイシン (LEU), リジン (LYS), プロリン (PRO), セリン (SER), トリプトファン (THR)

(a)グループはアミノ酸濃度が最初増えて、その後増加から減少に変わる。そして、24 時間後にはほぼ分解が終了している。(b)グループははじめから速い速度で分解が進み、アミノ酸濃度が減少している。(c)グループはゆっくりと分解が進むが、24 時間照射後にはアミノ酸濃度はほぼ 0 を示している。

アミノ酸は分子内にカルボキシル基 (-COOH 基) とアミノ基 (-NH₂) が存在する物質である。グリシンはアミノ酸の中で最も簡単な構造であり、ダニアレルゲンを構成しているほかのアミノ酸の分解過程において生成されると考えられる(式 1)。アスパラギン酸(式 2)もダニアレルゲンの光触媒による UV 照射処理を行っている間に、グリシンとカルボキシル基(-CH₂COOH)から合成されると思われる⁵⁾。これはアミノ酸の合成に TiO₂ が用いられているという事実からも推測される。Muszkat⁶⁾らは水中のたんぱく質の分解について報告しており、光触媒によるたんぱく質の分解においてグリシンとアスパラギン酸の分解速度が遅いとしている。それ故、今回の研究で得られた結果と同様、たんぱく質の分解においてはほかのアミノ酸の分解によりこれらのアミノ酸が蓄積し、結果として増加したように見える。

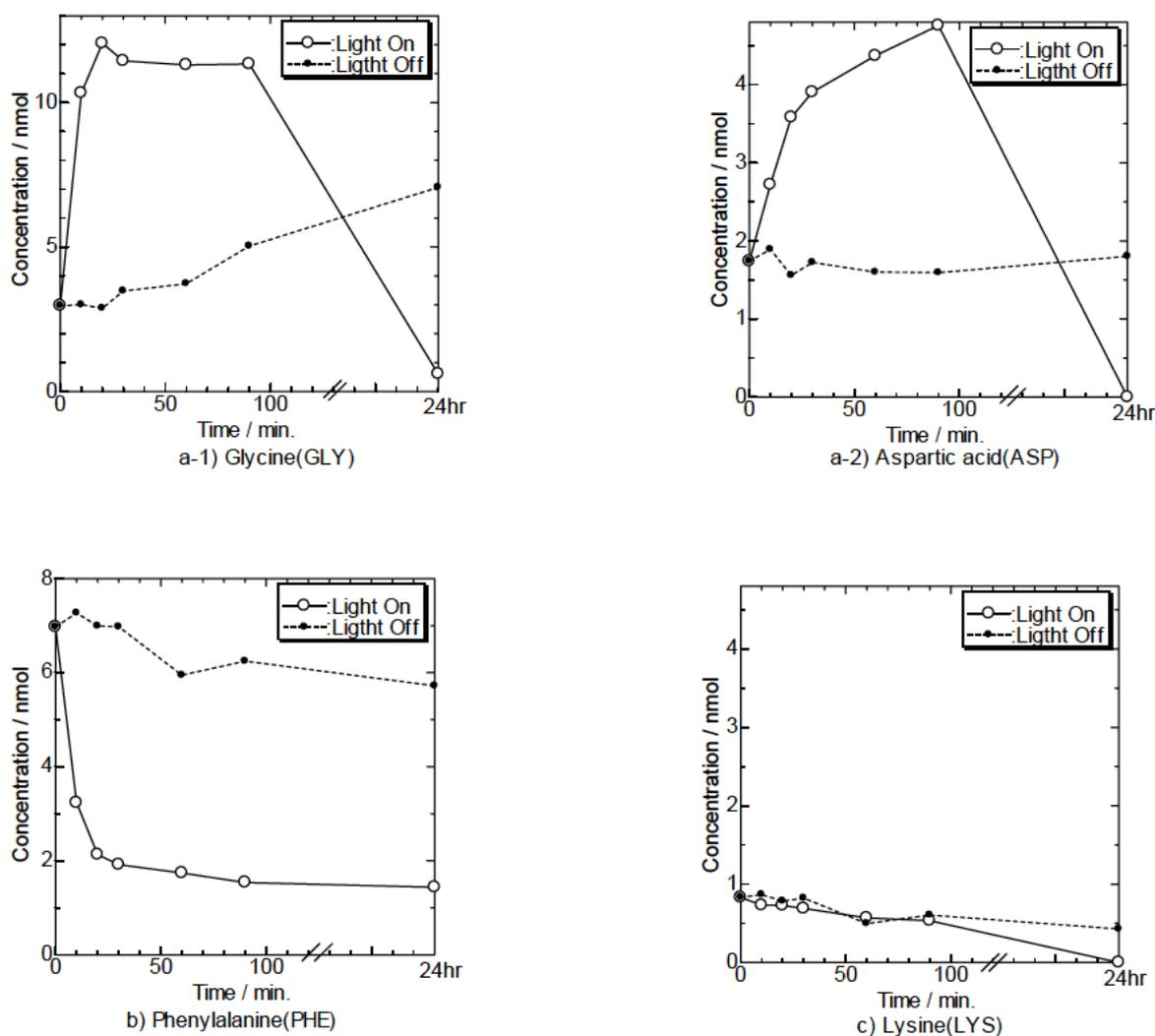
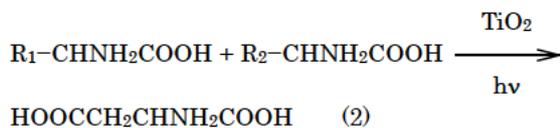
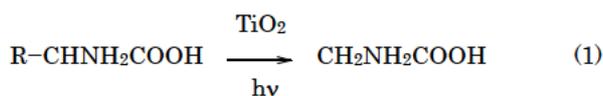
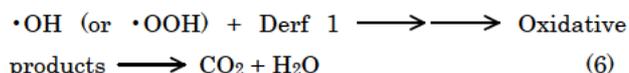
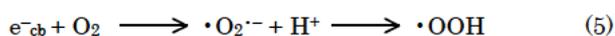
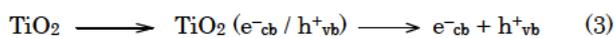


図3 アミノ酸分析結果



•OOH) は Derf 1 と反応し、最終的に CO₂, H₂O に分解する.



一般に TiO₂ 光触媒による有機物の分解は次のようである. TiO₂ のバンドギャップは 3.2eV なので普通 380nm 以下の光を吸収し、電子とホールを生成する (式 3). そして生成したホール(h⁺)は H⁺ や •OH ラジカルを生成し、(式 4)電子 (e⁻_{cb}) はスーパーオキシドアニオン•O₂⁻を生成する. さらに•OOH (式 5)も生じる. さらに、活性酸素 (•OH,

以上のことから、ダニアレルゲンの低減化に光触媒を用いると、上記のような反応が徐々に進み、ダニアレルゲンを分解することから、非常に有効であることがわかった.

4. まとめ

ダニアレルゲンの低減化に光触媒作用が非常に有

効であることがわかった。また、アレルゲンの分解メカニズムをアミノ酸分析によって検討した。その結果、光照射の初期段階にアレルゲンを構成しているアミノ酸の光分解が進むと同時に、グリシンおよびアスパラギン酸が生成することがわかった。そして光触媒に光を照射することにより生じるヒドロキシルラジカルのような活性種により、アミノ酸が攻撃を受けさらに分解が進み、最終的には CO₂ および H₂O に分解できることが予測される。

参考文献

- 1) 中川武正：“抗アレルギー薬の行くべき道”，アレルギー，Vol.53-7，pp653-654（2004）
- 2) “ダニ抗原変性処理方法”，特開 2004-331553
- 3) Neil Goodman et al.：“The effect of corona discharge on dust mite and cat allergens”. J. Electrostatics, Vol.60, p69-91 (2004)

- 4) Kazuo Nishikawa et al.：“Indoor airborne allergen Deactivation Technology by mean of Cluster ions generated by discharge plasma”. Sharp Technical report. Vol.89 (2004)
- 5) Wendell W. Dunn et al.：“Heterogeneous Photosynthetic Production of Amino Acids at Pt/TiO₂ Suspensions by Near Ultraviolet Light”. J. Am. Chem. Soc., Vol.103, p6893-6897 (1981)
- 6) Muszkat L. et al.：“Titanium dioxide photocatalyzed oxidation of proteins in biocontaminated waters.”. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. Vol.60, p32-36. (2001)

(本研究は法人県民税の超過課税を財源としていません)