

Miyazawa
Hiroshi

デジタル署名
者 : Miyazawa
Hiroshi
日付 : 2023.01.24
12:50:36 +09'00'

RD22JUL011

発行日 : 2023 年 1 月 23 日
報告書 No.RD22JUL011

エコムーバー株式会社 御中

試 験 報 告 書

※無断転載禁止※



ITEA 株式会社 東京環境分析センター研究所

〒113-0001 東京都文京区白山 1-33-18 白山 NTビル

電話 03-526-5511 fax 03-3566-2522

JIAMOVER

社印のないもの、コピーされたものは正式な報告書としてみとめられません。販促物等に当社名を記載する場合は、併せて当該試験 No.を記載してください。
試験結果は、当所に提出された試料についての値であり、製造ロット全体や製品について表すものではありません。
© ITEA Inc. 2023

JIAMOVER

1. 目的

スギ花粉アレルギーの不活化試験では、花粉から抽出したアレルギーと試験薬剤を直接反応させ、その後花粉アレルギー特異的抗体を用いた ELISA 法によりアレルギー量を測定し、アレルギーの不活化率を求めるのが一般的である。本試験では、より自然環境に近い条件における花粉アレルギーの不活化を評価することを目的とする。

生きたスギ花粉は吸水すると、細胞壁が薄くなっているパピラと呼ばれる突起部分から花粉が破れ、原形質が外に飛び出す脱皮と呼ばれる現象を起こし、同時にアレルギーを放出することが知られている(図 1.)。一方、死んだ花粉は脱皮条件下に置かれても脱皮することはない、アレルギーの放出も起こらない。

本試験では、花粉と試験薬剤を反応させ、顕微鏡で花粉の形状を観察するとともに、その上清中のアレルギー濃度を測定することで、試験薬剤が花粉そのものと反応した際の効果を評価する。また、試験薬剤と反応後、脱皮しなかった花粉を脱皮条件下に置換し、花粉の観察をすることで、試験薬剤によって花粉が死んだかどうかを観察する。これらの結果から総合的に試験薬剤が花粉に与える効果を評価する。

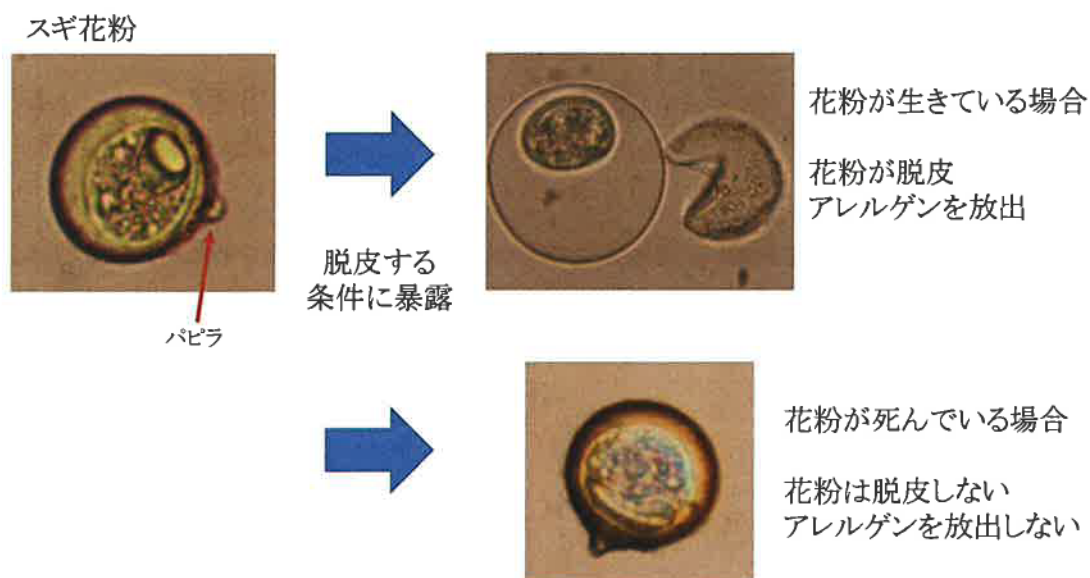


図 1. スギ花粉と脱皮

2. 試験方法

2.1 スギ花粉

試験前まで-30℃で保存し、試験時に室温に戻してから秤量し使用した。

2.2 試験薬剤

1. 次亜塩素酸水溶液

次亜塩素酸水溶液（商品名：ジアムーバー酸化水、200 ppm (pH 6.0)、100 ppm (pH 6.0)、50 ppm (pH6.0)は、エコムーバー社により生成されたものを用いた。

2. 蒸留水 (DW; pH 6.5) エコムーバー社提供品

花粉を脱皮させず、反応後脱皮条件下に置換すると花粉が脱皮する対照として使用。

3. リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline (PBS); pH 7.4)

花粉を効率的に脱皮させ、かつ溶出したアレルゲンに影響を与えない対照として使用。

2.3 花粉脱皮試験

1. スギ花粉が 10 mg/mL になるように溶液を加え、懸濁した。
2. この懸濁液 50 μ L と溶液 450 μ L を混合し、花粉 1 mg/mL 懸濁液を調整した。
3. 室温（以下、RT）で、所定時間（結果の 3.1 と 3.2 に記載）反応させた。
4. 1 mM チオ硫酸-クエン酸-リン酸 buffer, pH 5.0 を添加して反応を止めた
5. 反応後の花粉を顕微鏡で観察し、脱皮している花粉の割合を求めた。
6. 8000 rpm、5 分、RT で遠心して上清を回収した。
7. 沈殿した花粉に蒸留水を加えて花粉を懸濁し、8000 rpm、5 分、RT で遠心して上清を捨てた。
8. 花粉を 500 μ L の PBS で懸濁し、室温で 1 時間静置した。
9. 花粉を顕微鏡で観察し、脱皮している花粉の割合を求めた。
10. 残った花粉は 8000 rpm、5 分、RT で遠心して上清を回収した。

下式より、試験薬剤処理後の花粉脱皮率を算出した。

$$\text{花粉脱皮率 (\%)} = X/Y \times 100$$

X：脱皮花粉*1 数（個）

Y：花粉総数（個）

*1 花粉の細胞壁が開裂し、原形質が内部から飛び出している花粉

2.4 スギ花粉アレルゲン Cry j 1 特異的抗体を用いた ELISA 法による Cry j 1 量の測定

上記 2.3.6 および 2.3.10 の上清中の Cry j 1 量を ITEA スギ花粉アレルゲン (Cry j 1) ELISA キット（製品 No.10204、ITEA 製）*2 を用いたサンドイッチ ELISA 法で測定した。

*2 キット付属の固相化プレートではなく、ELISA 測定前日に必要分を固相化したプレートを用いた。

2.5 花粉の破碎処理および Cry j 1 量測定

試料は、次亜塩素酸水溶液 200 ppm 反応後の上記 2.3.10 の沈殿花粉を使用し、対照として、クエン酸リン酸 buffer にて懸濁した花粉を使用した。

1. 花粉をクエン酸リン酸 buffer 1 mL で 2 回洗浄した後、上清を捨て、残った花粉をバイオマッシャーII (ニッピ、日本) で 1 分破碎した。
2. 400 μ L クエン酸リン酸 buffer を加えて 8000 rpm、5 分、RT で遠心し、上清をサンドイッチ ELISA 法で測定した。
3. 破碎後の花粉を顕微鏡で観察し、下式より破碎率を算出した。

$$\text{花粉破碎率 (\%)} = X/Y \times 100$$

X : 破碎した花粉数 (個)

Y : 花粉総数 (個)

3. 結果

3.1 次亜塩素酸水溶液の濃度変化による花粉脱皮に与える影響

次亜塩素酸水溶液の濃度変化による花粉脱皮に与える影響を検証するため、試験に使用する次亜塩素酸水溶液の濃度は、50 ppm、100 ppm、200 ppm とした。また、花粉との反応時間は、15 分と 30 分の 2 条件とし、上記、試験 2.3、2.4 を実施し、200 ppm に関しては 2.5 も実施した。

花粉の脱皮率と結果を表 1、図 2 に示した。

次亜塩素酸水溶液と花粉を 15 分反応後の花粉脱皮率は、50 ppm では 0.5%、100 ppm では 1.3%、200 ppm では 0.6%であった。また 30 分反応後では、50 ppm では 0%、100 ppm では 0.5%、200 ppm では 0.9%が脱皮した。

次亜塩素酸水溶液反応後の花粉を洗浄後、PBS と反応させた結果、50 ppm では 74.6%、100 ppm では 38.1%、200 ppm では 2.6%が脱皮した。また 30 分反応した後の顕微鏡観察では、50 ppm では 56.0%、100 ppm では 19.1%、200 ppm では 3.5%の花粉が脱皮していることが観察された。他方、蒸留水では 15 分、30 分後はそれぞれ 1.8%、1.1%であったが、PBS 置換後は 90%以上脱皮した。

表 1. 次亜塩素酸水溶液反応後の花粉脱皮率

		反応時間			
		15 min		30 min	
		反応後	PBS置換後	反応後	PBS置換後
PBS		90.5%	96.8%	99.4%	91.8%
蒸留水		1.8%	93.5%	1.1%	92.5%
次亜塩素酸	50 ppm	0.5%	74.6%	0.0%	56.0%
	100 ppm	1.3%	38.1%	0.5%	19.1%
	200 ppm	0.6%	2.6%	0.9%	3.5%

JIAMOVER

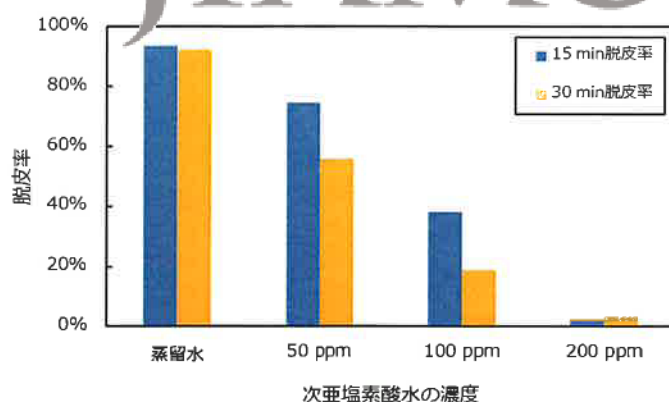


図 2. 次亜塩素酸水溶液反応後(PBS 置換後)の花粉脱皮率

上清中のスギ花粉アレルゲン (Cry j 1) 量を表 2、図 3 に示した。

次亜塩素酸水溶液反応後の花粉を洗浄後、PBS と反応させた結果、上清中に含まれる Cry j 1 量は、15 分反応後の 50 ppm では 224.3 ng/mL、100 ppm では 102.6 ng/mL、200 ppm では 12.3 ng/mL であった。30 分反応後の 50 ppm では 218.7 ng/mL、100 ppm では 69.9 ng/mL、200 ppm では 9.7 ng/mL であった。他方、蒸留水では 15 分、30 分後はそれぞれ 428.9 ng/mL、428.6 ng/mL、PBS は反応後 468.2 ng/mL、540.8 ng/mL であった。

表 2 次亜塩素酸水溶液反応後のスギ花粉アレルゲン(Cry j 1)量 (ng/mL)

		反応時間			
		15 min		30 min	
		反応後	PBS置換後	反応後	PBS置換後
PBS		468.2	26.2	540.8	15.6
蒸留水		18.8	428.9	21.7	428.6
次亜塩素酸	50 ppm	3.3	224.3	4.2	218.7
	100 ppm	<1.0	102.6	<1.0	69.9
	200 ppm	<1.0	12.3	<1.0	9.7

※ 検出限界 1.0 ng/mL

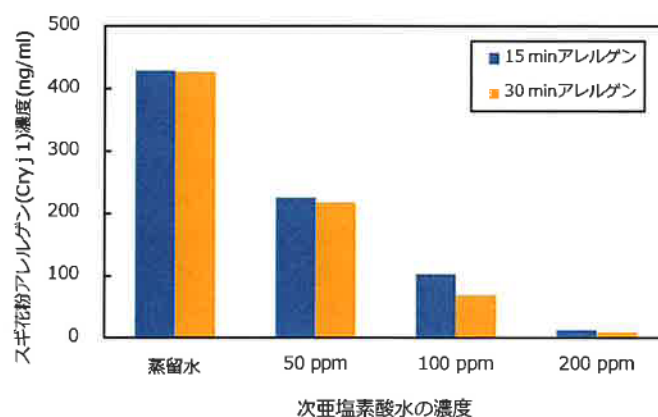


図 3. 次亜塩素酸水溶液反応後(PBS 置換後)のスギ花粉アレルゲン(Cry j 1)量 (ng/mL)

次亜塩素酸水溶液 200 ppm 反応後の花粉を破碎処理した後の破碎率と、スギ花粉アレルゲン(Cry j 1)量を表 3、と図 4 に示した。

対照としたクエン酸リン酸 buffer は、懸濁後すぐに破碎処理を行ったものであるが、破碎率は 70.8%、Cry j 1 量は 215.4 ng/mL であった。これに対し次亜塩素酸水溶液 200 ppm と 15 分反応後の破碎率は 52.8%、Cry j 1 量は 6.6 ng/mL、30 分反応後では 52.9%と 2.9 ng/mL であった。破碎率から推定される Cry j 1 量 (163.1 ng/mL)の 4.0% (6.6 ng/mL; 15 分反応)または 1.8% (2.9 ng/mL; 30 分反応)しか検出されなかった。

表 3 次亜塩素酸水溶液 (200 ppm) 反応後花粉の破碎処理後の
破碎率とスギ花粉アレルゲン(Cry j 1)量

	濃度	反応時間	破碎率	Cry j 1 量 (ng/mL)
クエン酸リン酸buffer			70.8%	215.4
次亜塩素酸	200 ppm	15 min	52.8%	6.6
		30 min	52.9%	2.9

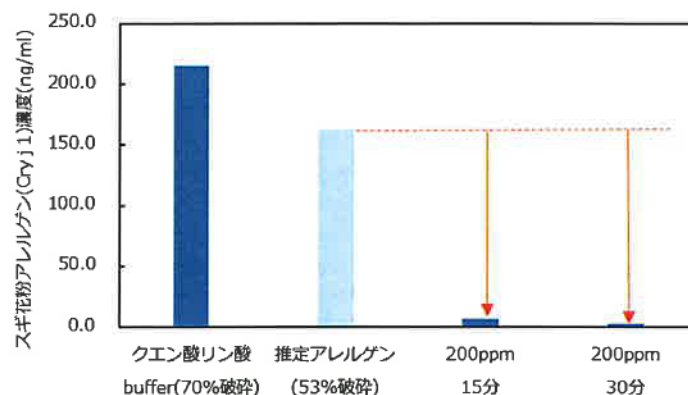


図 4. 次亜塩素酸水溶液 (200 ppm) 反応後の非脱皮花粉からの
スギ花粉アレルゲン (Cry j 1) の溶出量

3.2 次亜塩素酸水溶液と花粉との反応時間変化による花粉脱皮に与える影響検討

反応時間の変化による花粉脱皮に与える影響を検証するため、この試験では 200 ppm の次亜塩素酸水溶液を使用し、反応時間を 30 秒、60 秒、180 秒、10 分、20 分、30 分の 6 条件とし、上記、試験 2.3、2.4 を実施した。

花粉の脱皮率と結果を表 4 と図 5 に示した。

200 ppm 次亜塩素酸水溶液と花粉を 30 秒反応後の顕微鏡観察では 1.1%、60 秒後では 0.5%、180 秒後では 0.7%、10 分後では 0.0%、20 分後では 0.0%、30 分後では 0.5%の脱皮率であった。次亜塩素酸水溶液反応後の花粉を洗浄後、PBS と反応後では、30 秒後が 83.7%、60 秒後が 50.0%、180 秒後が 31.0%、10 分後が 22.7%、20 分後が 23.2%、30 分後は 14.8%が脱皮した。

表 4. 次亜塩素酸水溶液 (200 ppm) 反応後の花粉脱皮率

	PBS		蒸留水		次亜塩素酸	
	反応後	PBS置換後	反応後	PBS置換後	反応後	PBS置換後
0 sec	—	—	—	—	1.1%	87.3%
30 sec	—	—	1.0%	85.7%	1.1%	83.7%
60 sec	—	—	0.0%	91.4%	0.5%	50.0%
180 sec	—	—	1.8%	90.2%	0.7%	31.0%
10 min	—	—	0.0%	90.2%	0.0%	22.7%
20 min	—	—	1.6%	87.1%	0.0%	23.2%
30 min	91.5%	92.4%	1.8%	89.5%	0.5%	14.8%

※—Not Test

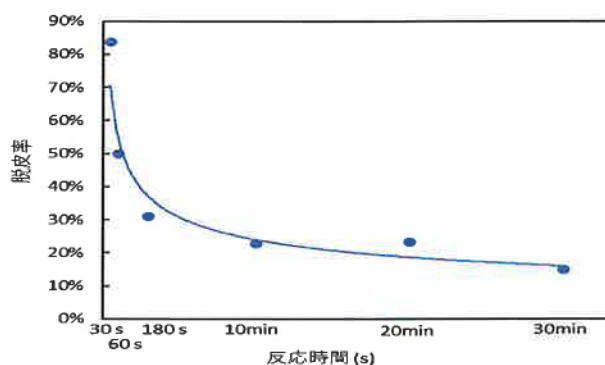


図 5. 次亜塩素酸水溶液(200 ppm)反応後(PBS 置換後)の花粉脱皮率

上清中の Cry j 1 量を表 5、図 6 に示した。

200 ppm 次亜塩素酸水溶液と花粉を 30 秒反応後の上清中に含まれる Cry j 1 量は、4.4 ng/mL、60 秒反応後では 2.3 ng/mL、180 秒反応後では 1.1 ng/mL、10 分反応後では 1.8ng/mL、20 分反応後では 1.5 ng/mL、30 分反応後では 0.5 ng/mL 未満であった。

次亜塩素酸水溶液反応後の花粉を洗浄後、PBS と反応させた後の上清中に含まれる Cry j 1 量は、30 秒反応後が 250.9 ng/mL、60 秒反応後では 218.8 ng/mL、180 秒反応後では 193.8 ng/mL、10 分反応後では 89.9 ng/mL、20 分反応後では 73.0 ng/mL、30 分反応後では 68.1 ng/mL であった。

表 5 次亜塩素酸水溶液 (200 ppm) 反応後のスギ花粉アレルゲン(Cry j 1)量 (ng/mL)

	PBS		蒸留水		次亜塩素酸	
	反応後	PBS置換後	反応後	PBS置換後	反応後	PBS置換後
0 sec	—	—	—	—	33.5	389.6
30 sec	—	—	21.1	334.5	4.4	250.9
60 sec	—	—	19.0	290.3	2.3	218.8
180 sec	—	—	19.0	215.1	1.1	193.8
10 min	—	—	26.6	320.5	1.8	89.9
20 min	—	—	31.1	384.2	1.5	73.0
30 min	445.3	11.8	27.8	365.2	<1.0	68.1

※ 検出限界 1.0 ng/mL ※—Not Test

JIAMOVER

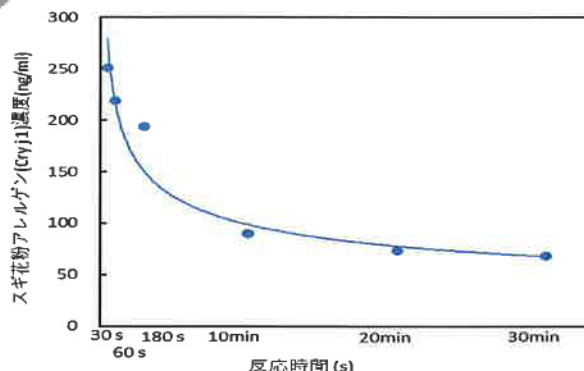


図 6. 次亜塩素酸水溶液 (200 ppm) 反応後のスギ花粉アレルゲン(Cry j 1)量 (ng/mL)

4. まとめ

1) 次亜塩素酸水溶液の濃度変化によるスギ花粉脱皮に与える影響

次亜塩素酸水溶液の濃度が 50 ppm、100 ppm、200 ppm と上がるほど、脱皮条件下 (PBS 置換後) の花粉脱皮率が下がり、かつ反応時間が長いほど脱皮率は低下した (図 2)。また上清中の Cry j 1 量は、次亜塩素酸濃度が高いほど低く (図 3)、花粉脱皮の抑制によりアレルゲン放出が抑えられたと思われる。

2) 反応時間による花粉脱皮に与える影響

脱皮条件下 (PBS 置換後) の花粉脱皮率は、200 ppm 次亜塩素酸水溶液との反応時間が 30 秒、60 秒、180 秒までは時間とともに大きく減少し、10 分以上ではほぼ一定であった (図 5)。このことは上清中の Cry j 1 量においても同様であった (図 6)。このことより、反応時間が長いほど花粉の脱皮は抑制され、結果、花粉からのアレルゲン放出が抑制されることが示唆された。

3) 次亜塩素酸水溶液と反応後の非脱皮花粉からのスギ花粉アレルゲンの溶出量

200 ppm 次亜塩素酸水溶液と反応後の花粉を破碎し、Cry j 1 の溶出量を調べたところ、破碎率から推定される Cry j 1 量の 4.0% (15 分反応) または 1.8% (30 分反応) しか検出されなかった。この結果から、次亜塩素酸が細胞壁内部にあるスギ花粉アレルゲン (Cry j 1) に対しても作用しアレルゲンを低減化する、あるいは溶出されにくい状態になっていることが示唆された。

本試験では、スギ花粉 1mg を 1000 倍量の次亜塩素酸水溶液により懸濁し、試験を行ったものである。実環境と比較するとかなり高濃度であるが、上記のことから、次亜塩素酸水溶液はスギ花粉の脱皮を妨げ、花粉からのアレルゲン放出を抑制する効果が認められた。またスギ花粉内のアレルゲンにも作用する可能性も示唆された。

5. 略語説明

PBS: リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline)

PBS-T: PBS に 0.05% Tween-20 を加えたもの

1% BSA-PBST: ウシ血清アルブミン (BSA, Bovine serum albumin) を 1%含む PBS-T

付記 本試験は、共同研究契約(2022 年 8 月 1 日付)に基づき実施されております。
本試験結果を異なる実験系ないし実験条件による試験結果と比較することはできません。

試験開始日：2022 年 8 月 17 日

試験終了日：2022 年 12 月 20 日

ITEA 株式会社
東京環境アレルギー研究所
東京都文京区白山 1-33-18 白山NTビル
電話 03-3526-2031 Fax 03-3526-2032

試験責任者：所長 阪口雅弘

試験担当者：宮澤博・山野裕美・吉田愛美

JIAMOVER