

(3) ELISA 法による室内アレルゲンの分析方法の検討

株式会社 住化分析センター

渡辺 千春

1. はじめに

近年、アトピー性皮膚炎、気管支喘息といったアレルギー疾患が急増している。アレルギー疾患の発症には環境要因が関与しているといわれ、最も重要な因子は環境中のアレルゲンへの暴露である。最近では生活様式、住宅構造の変化により、室内環境中のアレルゲン（特にダニ、ペット、カビなど）に関心が高まってきている。

ハウスダスト中のダニアレルゲン(Der1)が細塵 1g あたり 2 μ g を超えるとダニアレルゲンに感作され、10 μ g を超えると喘息発作を誘発するリスクが高まる、というダニ汚染基準が提唱されている。またわが国の学校環境衛生の基準では、ダニ数は 100 匹/m² 以下、又はこれと同等のアレルゲン量以下であること、と定められている。微生物汚染を評価する方法は種々あるが、アレルゲンを特異的に検出できる酵素免疫測定法(ELISA 法)が有効である。

ダニ・ペット等由来のアレルゲン分析において、96 穴プレートを用いた ELISA 法による分析を実施しているが、定量範囲が狭く、アレルゲン量にばらつきの大きい室内試料では、希釈や、再測定が必要となり非効率な場合が多い。そこで、分析試料の希釈・再測定の回数を削減し、分析の効率化を図ることを目的として、使用試薬の濃度等検討を行った結果を紹介する。

2. 実験方法

2.1 前処理

アレルゲン分析試験フローチャートを Fig.1 に示す。試料は、測定対象箇所で捕集用フィルターを接続した掃除機を用いてハウスダストを吸引採取し、大きな粒子や繊維を除いてファインダストを得た。採取した試料ダストを計量し、適量を滅菌済み 15mL チューブにとり、緩衝溶液を加えた後、ボルテックスミキサーで攪拌したものを試料抽出液とした。

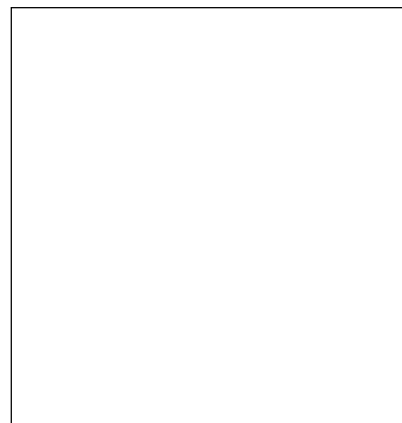


Fig.1 アレルゲン分析試験フローチャート

2.2 検出方法

試料抽出液中のアレルゲン量を酵素免疫測定法(ELISA 法)により測定する。ELISA 測定のフローチャートを Fig.2 に示す。96 穴型マイクロタイタープレートに、抗アレルゲン一次抗体を分注して 4 $^{\circ}$ C で一晩静置し、プレートに抗体を固定化した。プレート内の試薬を捨て、緩衝溶液でプレートを洗浄し、余分なコート試薬を除去した。洗浄後、プレートにブロッキング試薬を添加し、プレートのプラスチックに余分なタンパク質が吸着しないようにブロッキングを行った。

次にプレートに検量線作成用標準溶液と試料抽出液を添加して一次抗体と反応させた後、アレルゲン検出用標識二次抗体を添加し、プレートに固定化された免疫複合体を形成させた。さらに酵素溶液と反応させた後、発色基質を添加して発色させ、プレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

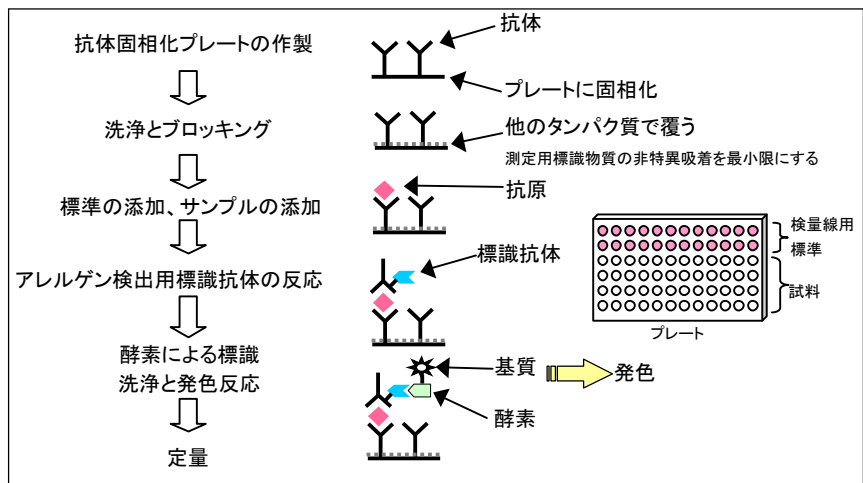


Fig.2 ELISA 測定のプロージャート

標準溶液の濃度と吸光度をプロットして作成した検量線を Fig.3 に示す。試料の吸光度から、試料溶液中のアレルゲン濃度を算出し、ハウスダスト当たりのアレルゲン量($\mu\text{g/g dust}$)または面積当たりのアレルゲン量($\mu\text{g}/\text{m}^2$)に換算した。

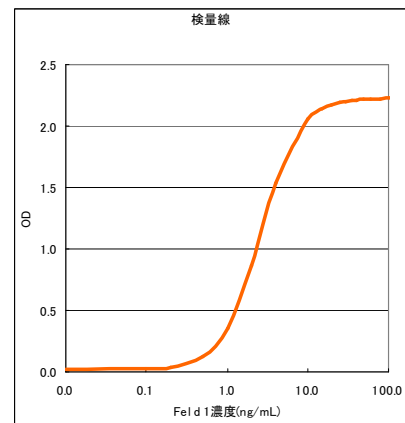


Fig.3 ELISA 測定 検量線

3. 分析事例

ネコ上皮アレルゲンとイヌ上皮アレルゲンについて、室内中微細塵中のアレルゲン量と室内で稼動させた空気清浄機フィルター中のアレルゲン濃度を分析した。分析結果を Fig.4 に示す。空気清浄機は室内空気を取り込み、空气中微細塵をフィルターに捕捉して清浄空気を室内に供給するが、室内中微細塵中のアレルゲン量が多いと空気清浄機フィルターに捕捉されたアレルゲン量も多くなる傾向が見られた。

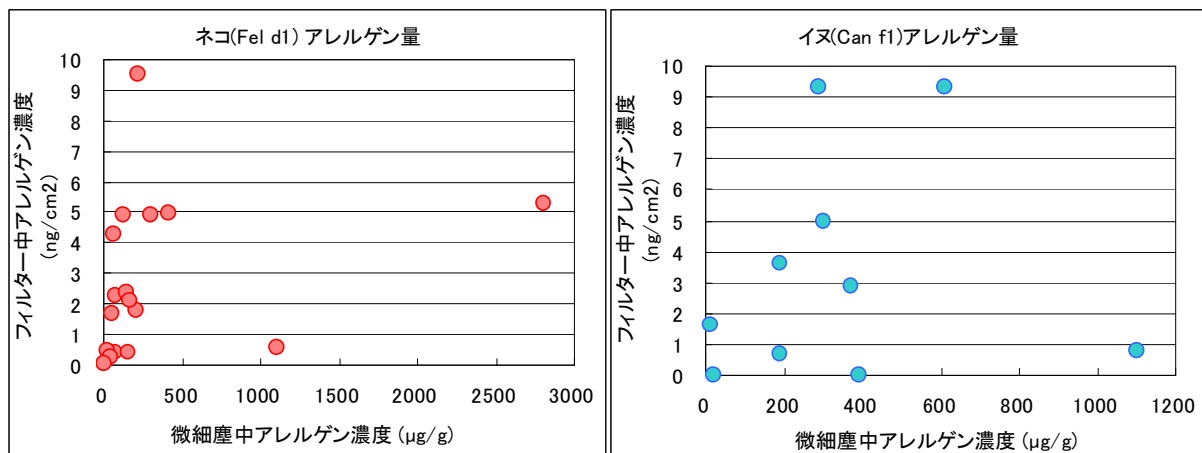


Fig.4 室内中微細塵中のアレルゲン量と空気清浄機フィルター中のアレルゲン濃度

次に、一般住宅のハウスダスト中のネコ上皮アレルゲン量の分析結果を Fig.5 に示す。掃除機フィルターからアレルゲンを抽出し、分析した。測定箇所によりアレルゲン量に非常に差がある結果となった。ELISA 測定には 96 穴プレートを用いる為、多検体測定の場合は複数のプレートを使用する。また、試料中のアレルゲン濃度が定量範囲を超える場合は試料溶液を適宜希釈して測定しなければならない。この測定例は、採取箇所によりアレルゲン量の差が大きく、測定箇所数も多かったため、使用プレートの枚数と再測定の回数が多くなり非効率であった。

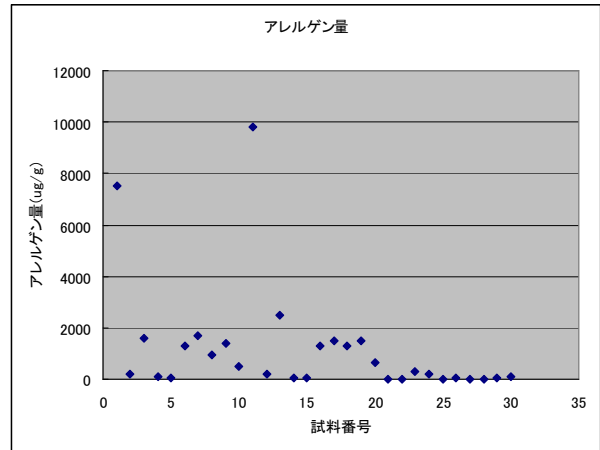


Fig.5 一般住宅のハウスダスト中ネコ上皮アレルゲン量

4. 問題点と検討

分析例で紹介したとおり、ハウスダスト中のアレルゲン量は測定箇所により濃度の範囲が非常に大きいため、一回の測定では定量範囲内に収めることが困難であり、再測定の増加・効率悪化といった問題がある。そこで使用試薬の濃度を調整し測定条件の最適化を行うことで検量線範囲の拡大を検討した。検討結果を Fig.6 に示す。抗体コート濃度、二次抗体濃度の検討により、OD1 付近での直線性が良くなり検量線の使用範囲を広げることができた。これにより分析試料の希釈・再測定回数を削減し分析の効率化を図ることができた。

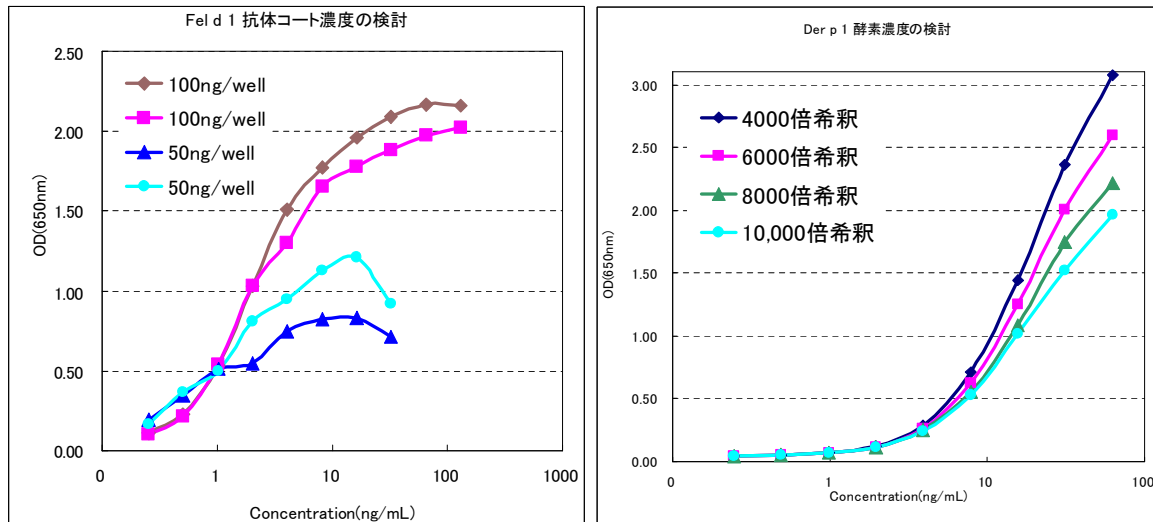


Fig.6 検量線範囲の拡大の検討結果

5. まとめ

室内環境中アレルゲンは測定箇所により検出量に差が大きく、定量範囲の狭い ELISA 法では再試験が必要となる場合が多かったが、試薬濃度の最適化により定量範囲を拡大することが可能となった。分析の効率化や高感度化等、分析の目的に応じた開発が今後の課題である。