

ELISA法による室内アレルゲンの 分析方法の検討

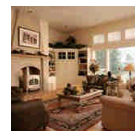
住化分析センター 渡辺千春

2008/11/7



背景

- 屋内燃焼機器の不完全燃焼による一酸化炭素中毒・酸欠
- 1960年代 湿気・カビ・ダニの問題
- 1970年代 オイルショック 住宅の高気密化
- 1980～90年代 化学物質によるシックハウス症候群問題
- 1997～2002年 厚生労働省 室内濃度に関する指針値 策定
- 2000年代 化学物質過敏症問題
- 2003年 建築基準法改正(放散量規制)
- 湿気による微生物汚染(カビ・ダニ)とアレルギー疾患が急増
- 学校環境衛生の基準
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



住宅の高気密・高断熱化
建材の高機能化・高性能化
により 様々な問題が発生

アレルギーを引き起こす
室内微生物汚染の対策が必要



環境アレルゲン

- **ハウスダスト**
粒系の小さなハウスダストは呼吸により肺の奥まで入り込み、そこで沈着してしまう 健康影響
- **ダニ**
ダニの抜け殻やダニのフンが室内空気中に舞い、これを吸い込むことで喘息などのアレルギー性疾患を引き起こす
- **ペット**
犬や猫の毛、皮膚、皮膚からの分泌物がアレルゲンとなる
- **スギ**
スギ花粉症
- **カビ**
空中に舞ったカビやカビの胞子を吸い込むと、気管支喘息やアレルギー性鼻炎、過敏性肺炎などの原因となる
アトピー性皮膚炎の原因の一つ



2008/11/7

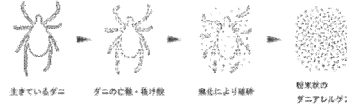


アレルギーを起こすダニ

- 住宅の中に生息するダニの90%はチリダニ科

- ヤケヒョウヒダニフンアレルギー (Der p 1)
- コナヒョウヒダニフンアレルギー (Der f 1)
- 虫体アレルギー (Der2)

- ダニのフンや脱皮殻、
ダニの亡骸などが
アレルギーとなる



- 住宅でのダニによるアレルギーは、
フンアレルギーを把握し、除去することが重要
- 環境管理の目安: アレルギー $2 \mu\text{g} / \text{g dust}$ 以上で
感作*が成立、 $10 \mu\text{g}$ 以上で喘息発作誘発の閾値

*感作 = 免疫を作る(抗原が次に入ってきたときにすばやく抗体を作れるようにしておく)こと。アレルギー反応準備状態ができること。

2008/11/7

4
シックハウス大博覧会より
SCAS

ダニによる室内環境汚染の評価方法

ダニ虫体を形態学的に識別・同定して計数する方法
ダニ類、クモ類に共通する窒素性の最終代謝物である
グアニンを測定する方法

主要アレルギーを免疫化学的に定量する方法

- モノクローナル抗体を用いる酵素免疫測定法(ELISA法)
によるアレルギーの定量法
 - 実用性、特異性ともに他の方法より優れている
 - 汚染の評価に特に有用
- ダニ簡易検査キット
 - 色見本による4段階定量評価
 - 測定精度、感度が不十分

2008/11/7

5
SCAS

ELISA法について

- 迅速で低廉な簡易測定法として、
環境分析に用いられている。
 - ダイオキシン類
 - PCB
 - 環境ホルモンとして疑われる化学物質
(ビスフェノールA, アルキルフェノール類など)
 - 農薬類
- 本分析では既存のELISA用試薬キットを利用
 - ダニ、カビ、ペット(ネコ、イヌ)、スギ花粉等

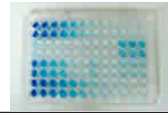
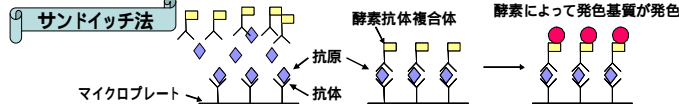
2008/11/7

6
SCAS

ELISA法によるアレルゲンの定量法

• ELISA法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : 酵素免疫測定法)

- プレートに固相化した抗体に、ハウスダストから分離した抗原 (ダニ等のアレルゲン) が反応
- さらに酵素を付けた抗体を反応させて発色処理し、発色強度を測定



96ウェルマイクロプレート



マイクロプレートリーダー

2008/11/7

7

SCAS

アレルゲン分析試験フロー

1. サンプリング(ハウスダストの捕集)
2. 前処理-試料の抽出
3. 抗原抗体反応
4. 測定
5. 定量
6. 報告

ダスト量当たりのアレルゲン量 ($\mu\text{g/g dust}$)

$2\mu\text{g/g dust}$ 以上で感作、 $10\mu\text{g}$ 以上で喘息発作の危険因子

面積当たりのアレルゲン量 ($\mu\text{g/m}^2$)

2008/11/7

8

SCAS

1. サンプリング(ハウスダストの捕集)

掃除機を利用した堆積ダストの捕集

- 掃除機のノズルにフィルターをセット
対象領域を吸引
フィルターからダストを回収
- 掃除機のバックからダストを回収



ポンプによるフィルター捕集

- ポンプにフィルターを接続し、室内空気を吸引してフィルターに捕集



2008/11/7

9

SCAS

1.ハウスタスタの捕集

・採取状況



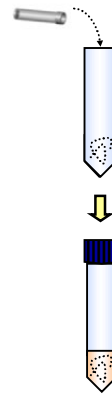
2008/11/7

10



2.前処理-試料の抽出

1. 採取した試料ダストを計量
2. 2～3mLの 緩衝溶液を添加
3. 20分程度ボルテックスミキサーで攪拌
4. 試料抽出液とする



2008/11/7

11



3.抗原抗体反応

・ Der p1 (ヤケヒョウヒダニの糞アレルギー)のプロトコール

抗体固相化プレートの作製

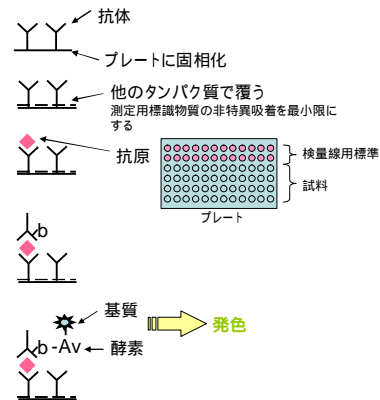
洗浄とブロッキング

標準の添加、サンプルの添加

アレルギー検出用標識抗体の反応

酵素による標識
洗浄と発色反応

定量



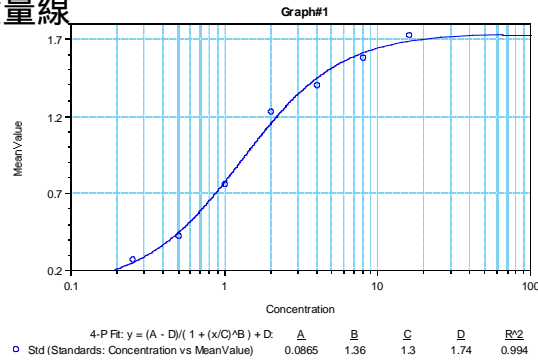
2008/11/7

12



4.定量

検量線



2008/11/7 Curve Fit Option - Fixed Weight Value

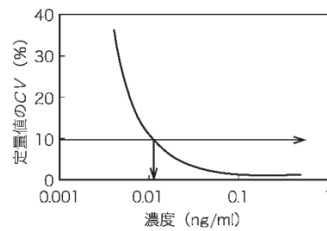
13

SCAS

4.定量(続き)

定量下限値

- 定量値のCVが10%を示す分析対象成分の濃度を定量下限値とする。
- ダスト100mg で定量下限値 0.04 $\mu\text{g/g}$ dustをみます。(感作レベル: 2 $\mu\text{g/g}$ dust 以上)



JISK0462 非競合免疫測定方法 (サンドイッチ法) 通則 より

検出下限値

- 定量値のCVが30%を示す目的値の量または濃度

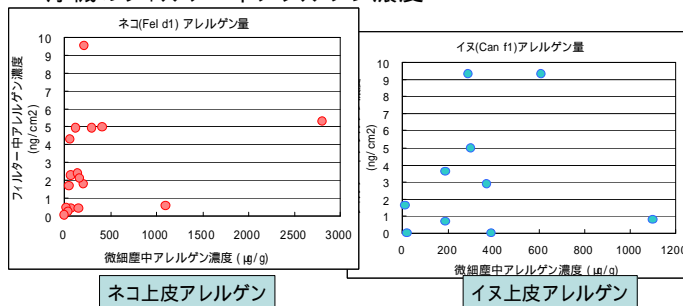
2008/11/7

14

SCAS

分析実例(1)室内のアレルゲン濃度

- 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のフィルター中アレルゲン濃度



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。

2008/11/7

15

SCAS

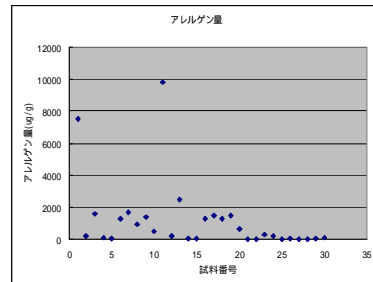
分析実例(2)室内のアレルゲン濃度

- 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

- 掃除機フィルターからアレルゲンを抽出し、分析。

室内家庭によってアレルゲン濃度に非常に差がある

再測定の増加・効率悪化



2008/11/7

16

SCAS

ELISA法によるアレルゲン分析の問題点

- 定量範囲が狭い
 - アレルゲン量に室間差の大きい室内試料では、希釈や、再測定が必要となる場合が多い
- 工程が複雑で測定時間を要する
- 検体数がまとまらなければ作業効率が低下
 - 使用試薬の濃度を調整し、測定条件の最適化
 - 検量線範囲の拡大を検討

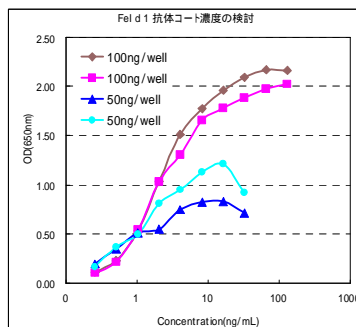
2008/11/7

17

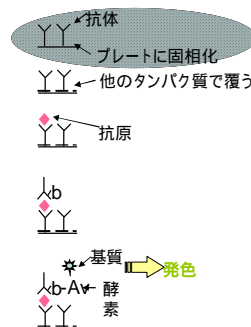
SCAS

ダイナミックレンジの検討

- 使用試薬の濃度を調整し、定量範囲の拡大を図る



ネコ上皮アレルゲン



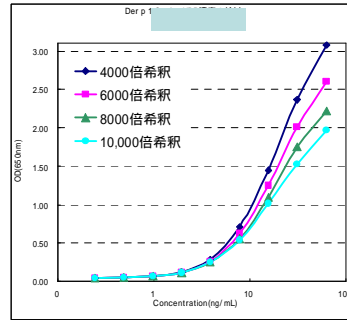
2008/11/7

18

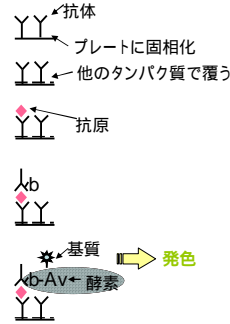
SCAS

ダイナミックレンジの検討

- 使用試薬の濃度を調整し、定量範囲の拡大を図る



ダニフンアレルゲン



抗体コート濃度、二次抗体濃度の検討により、ダイナミックレンジを広げること成功 再測定数の減少

200

19

SCAS

まとめ

- 既存のELISA用試薬キットを組み合わせて環境アレルゲンの分析に対応
- 室内の環境により、室内アレルゲン濃度の差が大きい
- 再測定による効率悪化が課題
- 分析条件を検討し、定量範囲の拡大に成功
- 分析の効率化や高感度化など、分析の目的に応じた開発が今後の課題

2008/11/7

20

SCAS