

2013 年 2 月 27 日

株式会社ラジカルラボ 御中

実 験 報 告 書



ITEA 株式会社 東京環境アレルギー研究所
〒113-0034 東京都文京区湯島 3-1-4 ブリランテ湯島
電話 03-5817-1017 Fax03-5817-1018



1. 実験名	アレルギーに対する試料の反応実験
2. 実験の目的	試料にアレルギー溶液を添加し、試料とアレルギーと反応させ、反応後の溶液中のアレルギー濃度を測定し、試料のアレルギーに対する低減効果を検討する。
3. 対象と方法	
試料	キエルキン（次亜塩素酸水） 50 ppm
対照	精製水
実験サンプル数	n=1
対象アレルギー	スギ花粉アレルギー(Cry j 1)
アレルギー溶液	スギ花粉粗抽出液（#10103 スギ花粉粗抽出液, ITEA） （溶解濃度 Cry j 1: 100ng/ml）
反応温度、時間	室温、1 分
測定サンプル	試料と反応させたアレルギー溶液
アレルギー測定法	酵素免疫測定法（サンドイッチ ELISA 法） （酵素免疫測定法／96 穴マイクロプレートの各ウェルに 1 次抗体を固相しアレルギーを捕捉させた。次に予め標識化した 2 次抗体を反応させ、酵素、基質を順に反応させた。発色した各ウェルの吸光度を測定し、標準曲線から検体の抗原量を求めた。）
評価方法	試料または対照を反応させたアレルギー溶液のアレルギー濃度を測定し、下記の式にて低減率を求めた。 $\text{低減率(\%)} = (B - A) / B \times 100$ A : 試料反応後のアレルギー溶液中のアレルギー濃度 B : 対照反応後のアレルギー溶液中のアレルギー濃度

4. プロトコール

試料、対照とアレルゲン溶液の反応

- ① 試料、及び対照にアレルゲン溶液をそれぞれ所定濃度になるように添加した。ボルテックスで軽く攪拌後、室温で所定時間振とうし、反応させた。

アレルゲン濃度の測定

- ② 試料と反応させた溶液のアレルゲン濃度をサンドイッチ ELISA 法で測定した。
- ③ サンドイッチ ELISA 法は、下記の手順で行った。

アレルゲンに対する抗体をマイクロプレートの各ウェルに
固相化

↓

ポストコーティング

↓

洗浄後、サンプル、及び標準アレルゲンを添加

↓

洗浄後、標識化抗アレルゲン抗体を添加

↓

洗浄後、酵素試薬を添加

↓

洗浄後、基質を添加

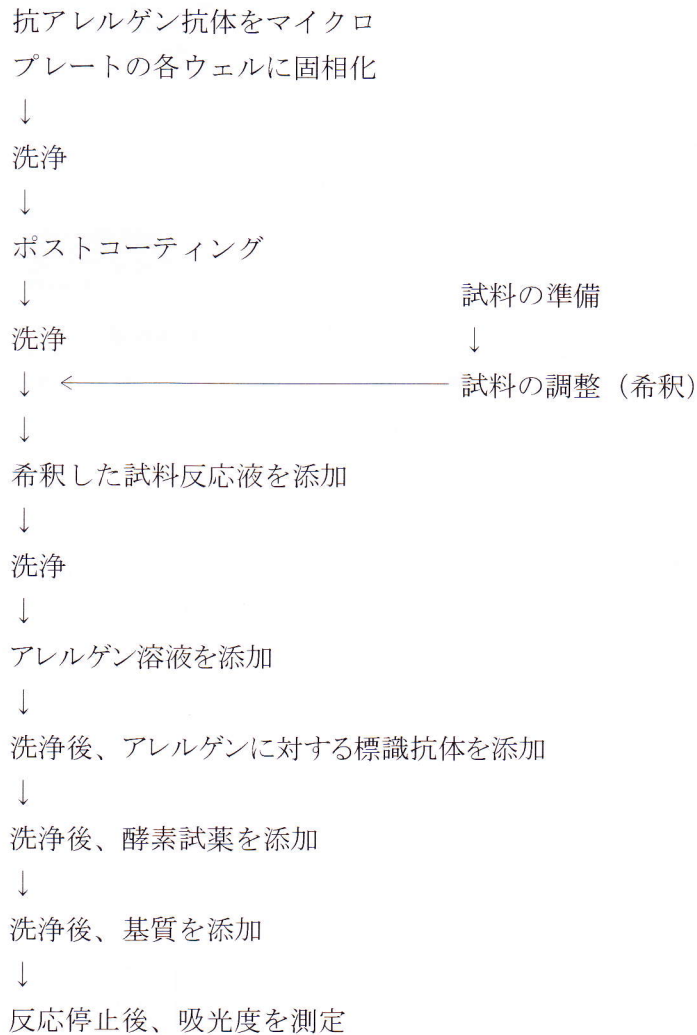
↓

反応停止後、測定

- ④ 標準アレルゲンを用いて作製したウェルの吸光度から検量線を作成し、各試料のアレルゲン濃度を求めた。
- ⑤ 得られた値から、アレルゲン溶液中のアレルゲン濃度減少率を求めた。

一次抗体への影響確認実験

- ⑥ 各試料液が、測定系（一次抗体）へ与える影響について下記実験を行い、測定時の希釈条件と、反応後の解析の参考にした。
- ⑦ 反応サンプルの作製は、反応液がアレルゲンを含まないこと以外は本実験と同様に行った。
- ⑧ 実験は下記の手順で行った。



- ⑨ 各試料の希釈の違いによる影響をウェルの吸光度を測定し検討した。

5. 結果

表 1 一次抗体への影響確認試験

希釈倍率	サンプル名	OD値 (450-620nm)	対照との差 (OD値) ^{*1}	対照との差 (%) ^{*2}
×2	キエルキン 50ppm	0.129	-0.063	-31.33
	精製水 (ブランク)	0.184	-0.008	-3.76
	対照 (リン酸緩衝液)	0.192	-	-
×20	キエルキン 50ppm	0.188	-0.017	-8.52
	精製水 (ブランク)	0.192	-0.013	-6.52
	対照 (リン酸緩衝液)	0.205	-	-
×200	キエルキン 50ppm	0.200	0.000	0.00
	精製水 (ブランク)	0.192	-0.008	-3.76
	対照 (リン酸緩衝液)	0.200	-	-

*1 「対照との差 (OD 値)」 = (サンプルの OD 値) - (対照の OD 値)

*2 「対照との差 (%)」 = {対照との差 (OD 値)} / (対照の OD 値) x 100

- ・ 希釈倍率は、反応溶液を測定ウェルに添加する際の希釈倍率。
- ・ 試料の一次抗体への影響が小さい場合は「対照との差 (OD 値)」が「0」に近く、影響の大きい試料では「対照との差 (OD 値)」の値が負となり、かつ希釈倍率が低いほど絶対値が大きい傾向があります。

表 2 スギ花粉アレルゲン (Cry j 1) の測定

サンプル名	アレルゲン濃度 (ng/ml)	ブランクに対する 低減率 (%)
キエルキン 50ppm	<1.0	>99.0
精製水 (ブランク)	101.14	-
初期溶液	103.55	

検出限界 1ng/ml より、算出される低減率の上限は 99.0%

6. まとめ

1) 試料「キエルキン（次亜塩素酸水） 50 ppm」にアレルゲン溶液（スギ花粉アレルゲン Cry j 1）を添加し反応させ、反応後の溶液中のスギ花粉アレルゲン Cry j 1 の濃度を測定しました。

2) 予備検討として、試料「キエルキン（次亜塩素酸水） 50 ppm」が一次抗体へ与える影響の有無を確認しました（表 1）。試料「キエルキン（次亜塩素酸水） 50 ppm」の 2 倍希釈において、一次抗体へのダメージが認められたため、本試験における測定は希釈倍率 20 倍および 200 倍にておこなうこととしました。

3) 試料「キエルキン（次亜塩素酸水） 50 ppm」とアレルゲンとの反応実験において、1 分間反応後のアレルゲン溶液中のスギ花粉アレルゲン Cry j 1 濃度は検出限界以下に低下しました。このとき、ブランクに対する低減率は>99.0%でした（表 2）。

4) 試料「キエルキン（次亜塩素酸水） 50 ppm」は、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 への強い低減作用をもつと考えられます。

以上

ITEA 株式会社
東京環境アレルギー研究所
東京都文京区湯島 3-1-4 ブリランテ湯島
電話 03-5817-1017 Fax 03-5817-1018

実験実施：藤井 祐加

