

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：26401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16237

研究課題名(和文) 卵白アレルギーに対する迅速な超高感度酵素免疫測定法の開発

研究課題名(英文) Development of rapid and ultra-sensitive enzyme immunoassay for egg white allergen

研究代表者

沼田 聡 (Numata, Satoshi)

高知県立大学・健康栄養学部・助教

研究者番号：10565857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵白アレルギーの1つであるオボアルブミンに対する酵素免疫測定法の高感度化では、市販されているELISAキットと比べて650倍高感度(蛍光法)に検出することが可能となった。酵素免疫測定法の高速化では、固相に磁気ビーズを用いること、および蛍光法より短時間で酵素を検出できる化学発光法を用いることで一部の測定操作で大幅な時間の短縮化が可能となった。しかし、抗原と標識抗体からなる免疫複合体を形成させる時間と化学発光法による測定感度の低下(ELISAキットと比べて20倍は高感度)がみられたことから、さらなる改良が必要となった。

研究成果の概要(英文)：Food allergy patients occurs allergy reaction even when an infinitesimal amount of allergen is ingested. From this, it is very dangerous if food allergens accidentally mix during cooking. In order to ascertain early whether food allergens are not mixed in the cuisine, it is necessary to increase the high sensitivity and speed of the enzyme immunoassay. We focused on ovalbumin as a food allergen. Ovalbumin is one of the major allergens of food allergies and is present in the egg white. In this study, we achieved high sensitivity of enzyme immunoassay for ovalbumin. However, the high speed of the enzyme immunoassay was not able to shorten the formation time of immune complexes between ovalbumin and labeled antibodies.

研究分野：酵素免疫測定法

キーワード：高感度酵素免疫測定法 食物アレルギー オボアルブミン

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギー患者は非常に微量な食物アレルギーの摂取でもアレルギー症状を誘発し、最悪の場合死亡する恐れがある。そのため、食物アレルギーとの接触を回避させることが大原則となっている。しかし、食物アレルギーが付着した調理器具・機器の使用や食物アレルギーが含まれている半調理食品・加工食品の使用等により食物アレルギーが料理中に混入することがあることから、食物アレルギーが混入していないかを事前に検査する必要がある。現在食物アレルギーの検査法の1つに酵素免疫測定法が用いられている。しかし、酵素免疫測定法には食物アレルギーを検出する上で検出感度および測定時間に課題がある。

2. 研究の目的

本研究では、食物アレルギーの中でも最も割合が高い鶏卵に着目し、その中でも主要なアレルギーとされているオボアルブミン (OVA) に対する高感度かつ迅速な酵素免疫測定法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 超高感度酵素免疫測定法 (ICT-EIA 法-I)

超高感度酵素免疫測定法の操作方法は、2,4-ジニトロフェニル (DNP) 化・ビオチン化捕捉用抗体と抗原および酵素 (β -D-ガラクトシダーゼ) 標識抗体の3者を同時に4°Cで16~18時間反応させ、免疫複合体を形成させた。この反応液に抗 DNP 抗体不溶化固相ポリスチレンビーズ (第1固相) を加え、30分間反応させて免疫複合体を捕捉させた。第1固相を洗浄して酵素標識抗体の大部分を除去した後、過剰の DNP-Lys 溶液で30分間反応させて免疫複合体のみを第1固相から溶出させ、溶出液にストレプトアビジン不溶化固相ポリスチレンビーズ (第2固相) を加え30分間反応させて転移させた。第2固相の洗浄後に、ビーズ上に転移させた β -D-ガラクトシダーゼ活性を 0.2mM 4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside (蛍光基質; 4MUG) を用いて30°Cで20時間インキュベーションし、酵素反応停止液を加え反応を停止後、蛍光分光光度計 (JASCO FP-6300、日本分光) を用いて測定した。なお、励起波長 360nm、蛍光波長 450nm を用い、蛍光強度は 10^{-8} M 4MU を 100 として換算した。この方法により、第1固相に非特異的に吸着した酵素標識抗体を残すため、バックグラウンドを一層完全に除去することができるようになり、高感度化が達成される。

(2) 迅速な超高感度酵素免疫測定法 (ICT-EIA 法-II)

迅速な超高感度酵素免疫測定法の操作方法は、DNP 化・ビオチン化捕捉用抗体と抗原および酵素 (β -D-ガラクトシダーゼ) 標識抗体の3者を同時に反応させ、捕捉用抗体・抗原・酵素表標識抗体からなる免疫複合体を形成さ

せた。この反応液に抗 DNP 抗体不溶化固相磁気ビーズ (第1固相) を加え、免疫複合体を捕捉させた。第1固相を洗浄して酵素標識抗体の大部分を除去した後、過剰の DNP-Lys 溶液で免疫複合体のみを第1固相から溶出させ、ストレプトアビジン不溶化固相磁気ビーズ (第2固相) を加え転移させた。第2固相の洗浄後に、ビーズ上に転移させた β -D-ガラクトシダーゼ活性を 4MUG または Galacto-Star (発光基質) を用いてインキュベーションし、マイクロプレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific) を用いて蛍光強度または発光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) ICT-EIA 法-I の開発

OVA に対する ICT-EIA 法-I を開発するにあたり、捕捉用標識抗体および酵素標識抗体の調製を行った。抗 OVA 抗体をペプシン消化後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて F(ab')₂ 分画を得た。F(ab')₂ を還元し、半量を DNP 化・ビオチン化 BSA と反応させて捕捉用標識抗体を調製した。残りの半量は、 β -D-ガラクトシダーゼと反応させて酵素標識抗体を調製した。

ICT-EIA 法-I の再現性においては、濃度の異なる標準 OVA 溶液を用いて、同時再現性および日差再現性を検討した。その結果、同時再現性は 5.1~7.3% (n = 10)、日差再現性は 4.1~8.4% (n = 5) と良好な結果であった。

ICT-EIA 法-I の特異性として、OVA と他のアレルギーとして鶏卵の他の主要アレルギーの1つであるオボムコイドおよび大豆アレルギーの1つである大豆トリプシンインヒビターを用いて交差反応を検討した。その結果、大豆トリプシンインヒビターでは全く反応は見られなかったが、オボムコイドにおいては、濃度依存的に若干の反応が見られた。この反応については、精製したオボムコイド溶液内に微量の OVA が残存していたことが影響したと考えられる。

ICT-EIA 法-I の測定感度においては、0.45 pg/ml であり、測定範囲は 0.45~450 pg/ml であった。OVA に対する市販の ELISA キットの測定感度は 780 pg/ml であり、ICT-EIA 法-I と比較して約 1,700 倍高感度であった。しかし、ELISA キットに付属しているアレルギー抽出液にて処理を行った標準 OVA 溶液を用いて、測定した結果、測定感度は 13.5 pg/ml となり、市販 ELISA キットの測定感度と比較して、約 60 倍となった (図1)。

(2) ICT-EIA 法-II の開発

OVA および標識抗体による免疫複合体の形成時間について検討を行った。条件は 42°C でインキュベーションした。標準 OVA 溶液の濃度を一定にし、標識体濃度のみを増加させて免疫複合体の形成率をみた。その結果、標識体濃度を増加させていくことで免疫複合体形成に要する時間は短縮され、形成率が 90% 以上となるのが、「標準 OVA 濃度 1 : 標識体濃度

10」の比率で240分、「標準OVA濃度1：標識体濃度100」の比率で180分であった(図2)。

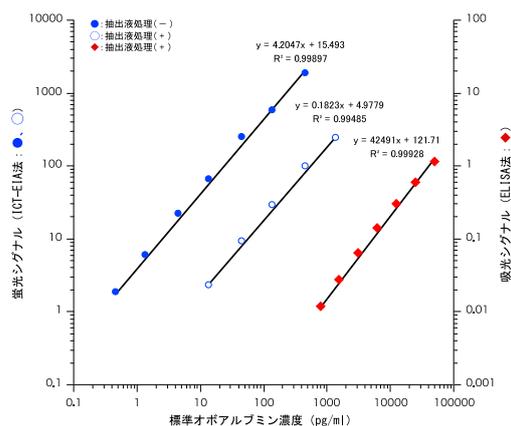


図1 ICT-EIA法-IとELISAキットによるOVAの測定感度の比較

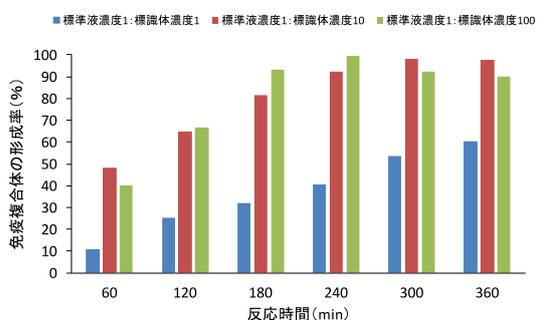


図2 標識体濃度の違いによる免疫複合体形成時間の比較

第1固相である抗DNP抗体不溶化固相磁気ビーズによる免疫複合体の捕捉時間の検討を行った。条件はウェルプレート恒温振とう培養器(M・BR-022UP、タイテック)により400 rpm/min、42°Cでインキュベーションした。その結果、5分で蛍光強度のピークを迎え、以降横ばいとなったことから、第1固相での捕捉時間は5分とした(図3)。

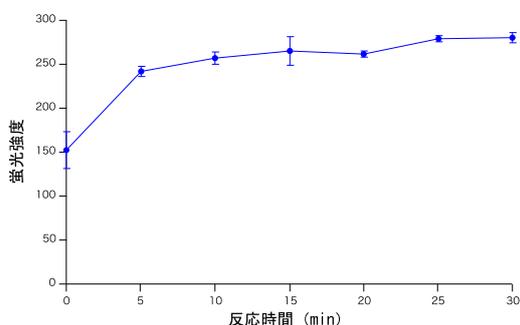


図3 抗DNP抗体不溶化固相磁気ビーズによる免疫複合体の捕捉時間

また、第2固相であるストレプトアビジン不溶化固相磁気ビーズによる免疫複合体の捕捉時間においても検討を行った。条件はウェルプレート恒温振とう培養器により500 rpm/min、42°Cでインキュベーションした。その結果、5分で蛍光強度のピークを迎え、10分

以降に蛍光強度の減少が見られたことから、第2固相での捕捉時間は5分とした(図4)。

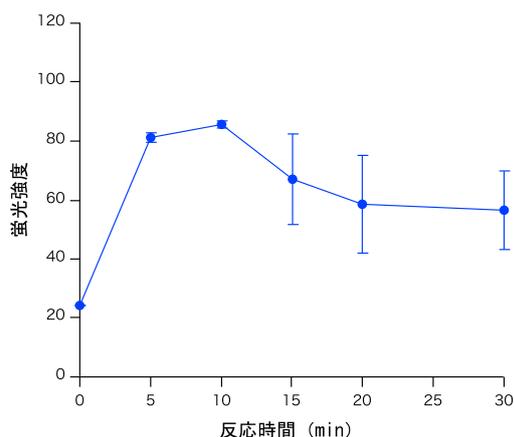


図4 ストレプトアビジン不溶化固相磁気ビーズによる免疫複合体の捕捉時間

磁気ビーズから免疫複合体を溶出させるためにDNP-Lys溶液との反応時間の検討を行った。条件はウェルプレート恒温振とう培養器により1000 rpm/min、42°Cでインキュベーションした。第1固相上に存在している免疫複合体のβ-D-ガラクトシダーゼ活性による蛍光強度をコントロールとした。また、DNP-Lys溶液の添加により第1固相から溶出された免疫複合体を含むDNP-Lys溶液を除去後、第1固相を洗浄し、残存するβ-D-ガラクトシダーゼ活性(免疫複合体)を測定し、溶出率を求めた。その結果、DNP-Lys溶液を添加後、攪拌のみで98%の免疫複合体が溶出されることがわかったことから、免疫複合体の溶出は攪拌のみとした(図5)。

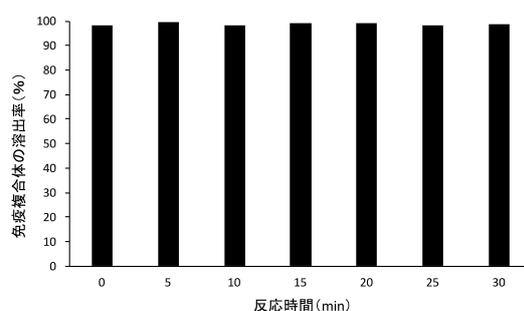


図5 DNP-Lysによる免疫複合体の溶出率

ICT-EIA法-IIによる測定感度において、蛍光基質および発光基質を用いて検討を行った。発光基質であるGalacto-Starは60分前後で最大発光に達するため、蛍光基質より短時間でβ-D-ガラクトシダーゼを検出することができる。蛍光基質を用いたICT-EIA法-IIの測定感度は1.2 pg/mlであり、市販ELISAキットと比較して、650倍となった。そして、発光基質を用いたICT-EIA法-IIの測定感度は40 pg/mlであり、市販ELISAキットと比較して、約20倍となった(図6)。

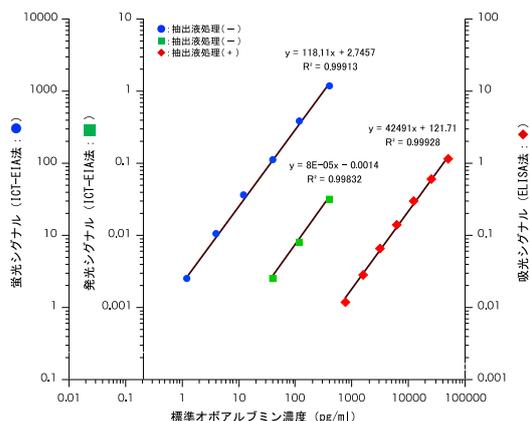


図 6 ICT-EIA 法-II と ELISA キットによる OVA の測定感度の比較

ICT-EIA 法-II の開発により、ICT-EIA 法-I の固相への免疫複合体の捕捉および溶出の操作時間が大幅に短縮することが可能となった。しかし、免疫複合体の形成時間および発光基質による測定感度の低下についてさらなる改良が必要になる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 沼田 聡、島田 郁子、橋田誠一：オボアルブミンに対する高感度酵素免疫測定法の開発。第 71 回日本栄養食糧学会大会，沖縄，2017. 5. 19-21
- ② 沼田 聡、島田 郁子、橋田誠一：卵白アレルゲンであるオボアルブミンに対する迅速な高感度酵素免疫測定法開発への取り組み。第 5 回日本栄養改善学会四国支部学術総会，高知，2018. 6. 30

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田 聡 (NUMATA Satoshi)

高知県立大学健康栄養学部健康栄養学科
 助教

研究者番号：10565857