

2010年3月31日

株式会社ピュアソン 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 2-2-4 スワンビル  
電話 03-5840-8983 Fax03-5840-8984



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アレルギーと反応させ、反応後の溶液中アレルギー濃度を測定し、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	弱酸性 次亜塩素酸除菌水 ・ 29SA-L001 ・ 29SA-L007 ・ 29SA-L008
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 (スギ花粉粗抽出物, ITEA) (溶解濃度 Cry j 1: 100ng/ml)
反応温度、時間	室温、1分、および5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

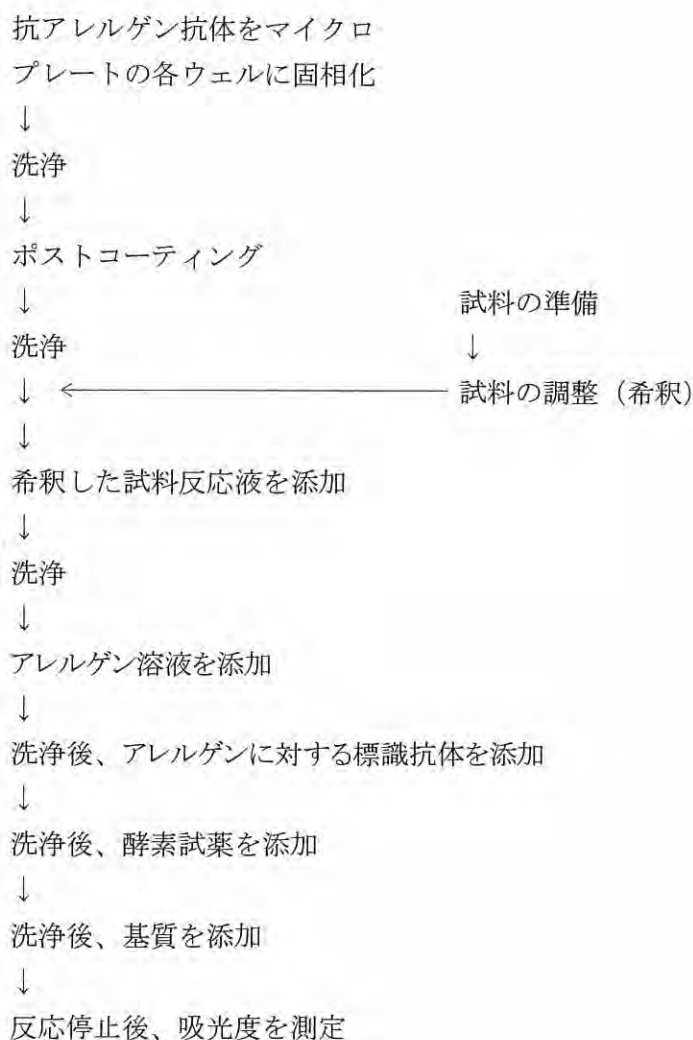
↓

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。

1次抗体への影響確認実験

- ⑥ 各試料液が、測定系（1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

1) スギ花粉アレルゲン (Cry j 1)

表 1 1次抗体への影響確認試験 (OD 値: 450-620nm)

試料 \ 希釈	×2	×20
29SA-L001	-0.875	0.015
29SA-L007	-0.221	0.001
29SA-L008	0.035	0.250

- ・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
- ・影響が小さい場合は値が「0」に近く、抗体へのダメージが強い試料では「試料-対照」の値が負となり、希釈倍率が低い測定において絶対値が大きく現れる傾向があります。

表 2 スギ花粉アレルゲン (Cry j 1)の測定

試料 \ 反応時間	1分			5分		
	濃度 (ng/ml)	平均 (ng/ml)	低減率	濃度 (ng/ml)	平均 (ng/ml)	低減率
対照(精製水)	107.07	107.07		104.07	104.07	
29SA-L001	<0.1	<0.1	>99.9%	<0.1	<0.1	>99.9%
	<0.1			<0.1		
29SA-L007	<0.1	<0.1	>99.9%	<0.1	<0.1	>99.9%
	<0.1			<0.1		
29SA-L008	<0.1	<0.1	>99.9%	<0.1	<0.1	>99.9%
	<0.1			<0.1		

検出感度 : 0.1ng/ml

6. まとめ

1) 試料「弱酸性 次亜塩素酸除菌水/ 29SA-L001, 29SA-L007, 29SA-L008」それぞれに、アレルゲン溶液(スギ花粉粗抽出液)を添加し反応させ、反応後の溶液中アレルゲン濃度(スギ花粉アレルゲン:Cry j 1)を測定しました。

2) 1次抗体の影響試験では、試料「29SA-L001, 29SA-L007」の2倍希釈において、ダメージが認められ、「29SA-L001」では測定の判定に若干の考察を行う必要があると考えられました(表 1)。

3) アレルゲンとの反応実験では、この度の実験系において、試料「29SA-L001, 29SA-L007, 29SA-L008」の全てで、スギ花粉アレルゲンへの強い低減作用を認め、反応 1 分、5 分ともにアレルゲン

濃度は検出感度以下に低下しました(表 2)。

4) 試料「弱酸性 次亜塩素酸除菌水/ 29SA-L001, 29SA-L007, 29SA-L008」は、スギ花粉アレルギーへの低減作用があると考えられます。

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 2-2-4 スワンビル  
電話 03-5840-8983 Fax 03-5840-8984

実験実施：白井 秀治

