

Determination of inactivators of mite and Japanese cedar pollen allergens using the dot-blot method

吉田愛美^{1,2}、水上圭二郎^{1,3}、蔵田圭吾²、那須川忠弥¹、内山淳平¹、阪口雅弘¹

¹麻布大学獣医学部微生物学第一研究室、²ITEA 株式会社、³理化学研究所

背景: これまでアレルゲンに対する不活化剤の評価にはサンドイッチ ELISA が使われてきた。しかし、サンプルに含まれる不活化剤は試験に影響を与えることがある。そのため、不活化剤の影響により ELISA で測定されるアレルゲンの量が実際よりも少なくなり、その結果不活化剤の効果が過大に評価される可能性がある。本研究では、不活化剤が試験に影響を与える影響を減らして評価する手法として、ドットブロット法を用いた。

実験手法: 最初に、各濃度のダニアレルゲン(Der f 1)を 2 枚の PVDF 膜に固定化し、その後、それぞれの変性剤(5 ppm 次亜塩素酸ナトリウム、6M グアニジン、0.1%SDS)と反応させた。反応後に膜を洗浄し、膜のうち 1 枚はアレルゲンを検出するために免疫染色に、もう 1 枚はタンパク質を検出するために金染色に供した。アレルゲンの検出には抗 Der f 1 IgG モノクローナル抗体を用いた。また、タンパク質の検出には金染色を用いた。スギアレルゲン(Cry j 1)に対しても同様の試験を行った。

結果: まず免疫染色を用いて、抗 Der f 1 IgG 抗体がアレルゲンに反応するかどうかを確認した。抗 Der f 1 IgG 抗体は PBS 処理したもの(不活化剤無添加として)は 4ng、グアニジン処理では 20ng、SDS と次亜塩素酸ナトリウム処理では 100ng のアレルゲンを検出することができた。次に、膜に固定化された Der f 1 が不活化剤によって除去されたかどうかを確認するために、タンパク質の染色を行った。その結果、すべての膜で最低でも 4ng のタンパク質を検出することができ、Der f 1 は膜から除去されていないことが分かった。Cry j 1 でも同様の試験を行った結果、Der f 1 とおおむね同じ結果が得られた。

まとめ: 本研究では、免疫染色とタンパク質染色を組み合わせたドットブロット法を用いることで、不活化剤のアレルゲンに対する効果の評価を行うことができた。