

住環境アレルゲン *Der f1* 連続計測のための

光ファイバ式蛍光免疫計測システム

Fiber-optic Fluoroimmunoassay System for On-site Detection of *Der f1* in Residential Environment

○ 三木大輔 宮島久美子 荒川貴博 三林浩二 (東医歯大)

Daisuke MIKI, Kumiko MIYAJIMA, Takahiro ARAKAWA, Kohji MITSUBAYASHI,
Tokyo Medical and Dental University

Abstract: A fiber-optic fluoroimmunoassay system for *Dermatophagoides farinae* allergen (*Der f1*) was developed and applied to a flow analysis system. This system measures *Der f1* as fluorescence of sandwich-type immune complexes formed by capture antibodies, *Der f1*, and fluorescently labeled detection antibodies. The immune complexes were adsorbed on the optical fiber probe surface. An evanescent light, generated by total internal reflection of laser propagating in the probe, excites fluorophores binding immune complexes. The fluorescence was detected by the photo diode as current values. The calibration range determined by fluorescence of immune complexes was from 0.98 to 250 ng/ml and the assay time was within 16 minutes. As another quantification method of *Der f1*, the fluorescence increasing rate during the binding reaction between antigen and fluorescent-labeled antibody was calculated. The calibration range was equal to mentioned above, and the assay time was shortened to 6 minutes. The flow immunoassay system thus allows on-site detection of allergens in residential atmosphere with high precision.

Key Words: Optical Fiber, Allergen, Antigen-Antibody Reaction, Fluoroimmunoassay, *Dermatophagoides Farinae*

1. はじめに

近年、気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の有病率は年々増加傾向にあり、世界的な社会問題となっている^(1,2)。疾患を引き起こすアレルゲンの中でも特に重要なものとしてダニアレルゲンが挙げられる。アレルギーを引き起こすダニのほとんどは、屋内塵中の総ダニ数の50~90%を占めるチリダニ科に属するコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) とヤケヒョウヒダニ (*D. pteronyssinus*) である。これらのダニは寝具や畳、絨毯などに多く存在し、その死骸や排泄物などに含まれるタンパク質が強い抗原性を示す。

こうしたアレルギーの発症予防や症状改善の対策としては、原因物質であるアレルゲンの除去・回避が重要であり、汚染レベルを明らかにし、環境整備に役立てるためにもアレルゲンを簡便かつ迅速に高感度計測する技術やシステムが必要とされている。現在行われている環境中アレルゲンの測定法には免疫計測が広く用いられているが⁽³⁻⁵⁾、特別な施設や煩雑な操作を必要とすることや、結果を得るまでに時間を要するといった課題が残されており、家庭環境での計測に向けたシステムの簡便化や高速化が期待される。

本研究では、主要な環境アレルゲンであるコナヒョウヒダニ由来の *Der f1* を対象とし、アレルゲン動態評価のための計測システムの開発およびシステムの高感度化、高感度化を行った。

2. 実験方法

2-1 光ファイバ式蛍光免疫計測の原理

Fig. 1 に光ファイバ式蛍光免疫計測の原理を示す。まず、捕捉抗体を側面に固定化した光ファイバ型プローブ (長さ: 4 cm, 材質: ポリスチレン) に抗原を結合させ、さらに蛍光標識抗体を結合させることでサンドイッチ型の免疫複合体を形成した。本プローブに、レーザーダイオードから照射した励起光 (650 nm) を導入することで、プローブ側面近傍にエバネッセント光が発生する。この光によりプローブ側面の

免疫複合体の蛍光色素が励起され、放出される波長 670 nm の蛍光を再度プローブにて集光した。光学フィルタにて励起光の戻り成分を遮断しつつ、プローブ側面の抗原に基づく蛍光をフォトダイオードにて検出することで、抗原の定量を行った。

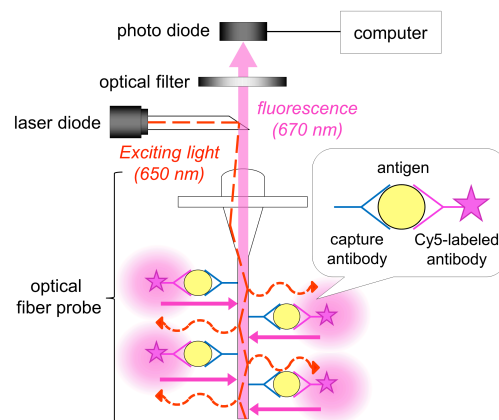


Fig. 1 Fiber-optic fluoroimmunoassay system

2-2 *Der f1* 測定における蛍光免疫計測

Der f1 の測定は、装置に捕捉抗体付きプローブ、抗原溶液 (100 μ l)、及び標識抗体溶液 (100 μ l) をセットし行った。また、従来法との比較のため非競合 ELISA 法にて *Der f1* の測定を行った。ELISA 法では、二次抗体にビオチン標識抗体 (2 μ g/ml)、酵素溶液にストレプトアビジンペルオキシダーゼ (0.25 μ g/ml)、発色基質液に 3% 過酸化水素を加えた 2 mM ABTS 加 70 mM リン酸-クエン酸緩衝液を各 100 μ l/well ずつ用いて、405 nm での吸光度を分光光度計 (SH-1000Lab, コロナ電気 (株)) にて測定した。

本システムの *Der f1* に対する選択性を確認するため、*Der f1* (50 ng/ml)、*Der f2* (コナヒョウヒダニ由来, 50 ng/ml) (精製ダニ抗原 r*Der f2* AB-N-1, Lot F7-03, 生化学バイオビジネ

ス(株)), *Cry j1* (スギ花粉由来, 50 ng/ml) (Japanese Cedar Pollen Allergen *Cry j1*, Purified, Lot C1-080636, HAYASHIBARA BIOCHEMICAL LABS. INC.), *Der f1* および *Der f2* を混合させたもの(各 50 ng/ml), *Der f1* および *Cry j1* を混合させたもの(各 50 ng/ml) の5種類の抗原溶液を用いて, 蛍光免疫計測を行った。

さらに光ファイバの周囲にフローセルを設け, 光ファイバを固定した状態でのサンプル溶液及び反応試薬の導入と洗浄蛍光計測のステップを可能にすることで, 光ファイバプローブの移動操作を省き, 本計測手法の半連続化, 高速化を図った。

3. 結果及び考察

3-1 *Der f1* 測定における蛍光免疫計測の特性

光ファイバ式蛍光免疫計測による各ステップの蛍光強度変化を Fig. 2 に示す. ステップ[2]における非特異的反応は十分小さく, 二次抗原抗体反応後のステップでは *Der f1* 濃度に応じた蛍光出力が得られた. 本システムでのステップ[3]と[4]との蛍光出力値の差分から *Der f1* の定量特性を求めたところ, 開発した光ファイバ式蛍光免疫計測において, *Der f1* を 0.98~250 ng/ml の範囲で定量可能であった. 測定に要する時間は, ELISA 法の約 150 分に対し, 蛍光免疫計測では 1 検体あたり約 16 分と約 1/10 で, 迅速な測定が可能であった.

また, *Der f1* 以外の各種抗原成分に対する本システムの出力値の比較から, *Der f1* 含有抗原溶液のみから蛍光出力の増加が確認され, 本システムの *Der f1* に対する高い選択性が確認された。

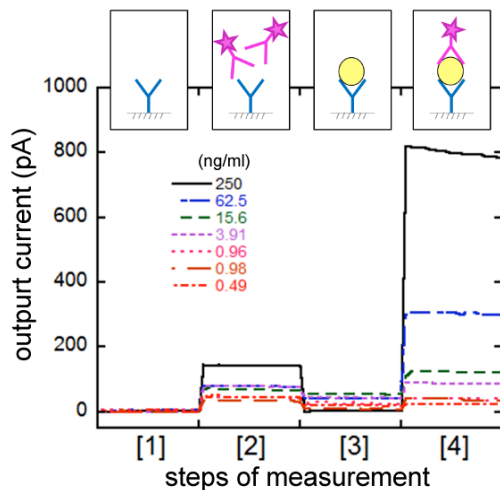


Fig. 2 Immunoassay process and fluorescence changes of the *Der f1* detection

3-2 フロー計測における *Der f1* の検出

フローを導入した蛍光免疫計測によるシステムを用いて, 二次抗原抗体反応前後の値の差分から得た, *Der f1* の定量特性と, ELISA 法による測定結果との関係を Fig. 3 に示す. フローを導入した光ファイバ式蛍光免疫計測において, *Der f1* を 0.98~250 ng/ml の範囲で定量可能であった. 本計測法は, ELISA 法と比較し, 同程度の直線性を持ち, ELISA 法と同程度の定量能力を持つことが確認された. 測定に要する時間は

1 検体あたり約 6 分であり, バッチ計測に比べて半分以下に短縮された。

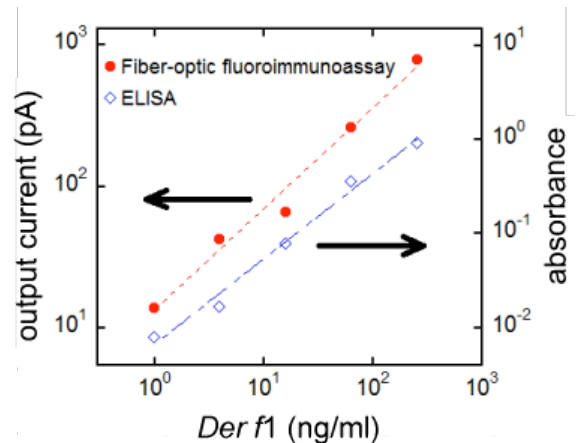


Fig. 3 Calibration curves for *Der f1* measured by proposed immunoassay system and ELISA

4. まとめ

光ファイバプローブを用いた, 住環境中 *Der f1* 測定のための蛍光免疫計測法を開発した. 本計測法により, *Der f1* を 0.98~250 ng/ml の範囲で定量が可能であった. ELISA 法と比較したところ, 同等の定量特性且つ, 測定時間は ELISA 法の約 1/10 (約 16 分/1 検体) と大幅な短縮が可能であった. また, *Der f1* 以外の各種抗原成分に対する出力値の比較から, 本システムの *Der f1* に対する高い選択性が確認された。

さらに, 本システムに送液が可能なフローセルを導入することで, 光ファイバを固定した状態でのサンプル溶液及び反応試薬の導入と洗浄蛍光計測のステップを可能にした. *Der f1* を 0.98~250 ng/ml の範囲で定量が可能であり, ELISA 法と比較したところ, 同等の定量特性且つ, 測定時間は 6 分であり, バッチ計測に比べて半分以下に短縮された。

参考文献

- (1) B. Richard, the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee Worldwide Variation in Prevalence of Symptoms of Asthma, Allergic Rhinoconjunctivitis, and Atopic Eczema: ISAAC, *Lancet*, 351, 9111, 1225-1232, 1998.
- (2) A. Togias, Rhinitis and Asthma: Evidence for Respiratory System Integration, *J. Aller. Clin. Immunol.*, 111, 6, 1171-1183, 2003.
- (3) J. A. Asturias, M. C. Arilla, M. Aguirre, N. Gomez-Bayon, A. Martinez, R. Palacios, F. Sanchez-Gascon, J. Martinez, Quantification of Profilins by a Monoclonal Antibody-based Sandwich ELISA, *J. Immunol. methods*, 229, 61-71, 1999.
- (4) I. Neuner-Plattner, T. Grabher, I. R. Hall, G. Stoffler, F. Griffin, K. Haselwandter, A Comparison of Immunological Assays for the Identification of Tuber spp. and Other Edible Ectomycorrhizal Fungi, *Myco. Research*, 103, 4, 403-412, 1999.
- (5) M. D. Chapman, P. W. Heymann, T. A. E. Platts-Mills, Epitope Mapping of Two Major Inhalant Allergens, *Der p1* and *Der f1*, from Mites of the Genus *Dermatophagoides*, *J. Immunol.*, 139, 5, 1479-1484, 1987.