

## Human anti-Bacteria Toxins Antibody Assay Kits

Catalog # 6113, #6114, #6117, #6118, #6123, #6124

本品は研究用試薬です。研究目的以外の用途には使用できません。

### はじめに

自己免疫疾患と消化管内のバクテリアとの関係が近年注目され、関連する研究が進んでいます。特に、腸内細菌フローラのバランス異常、すなわちdysbiosisは、関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis; RA)の病態に影響するという多くの報告がされています(1-5)。また最近では、RAと、*Porphyromonas gingivalis* (6-8)や*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (9)などの原因菌により発症する歯周病との関係が注目されています。健常人では腸内細菌は宿主の健康状態に影響しませんが、それらの菌種のバランス異常が起こることにより宿主の免疫能が異常をきたし、病気の引き金になると考えられます。これらの原因としては、老化による免疫能の低下(10-13)、便秘(14)や下痢(15)などの消化管障害、心身のストレス(16, 17)などいろいろなケースがあります。したがって、自己免疫疾患の病因を研究する上では、これらの環境上のリスクファクターを考慮することが肝要です。腸内細菌のバランス異常は腸管の病因物質のレベルを上げ、腸管粘膜透過性の亢進により、これらの血中への移行性を上げる可能性があります。結果として、血中に移行した病因物質が宿主の免疫能を破綻させ、自己免疫疾患などの慢性疾患を引き起こすことが考えられます(18,19)。

ヒトにおいて環境因子に対する免疫応答反応を測定することは、上記の研究を推進するもととなります。コンドレックスでは、環境因子としてヒトが生涯を通じてさらされている、各種バクテリア毒素に対するヒト血清中の抗体量を測定できるELISAキットを提供しています。詳細情報は、support@chondrex.comに英語でお問合せいただくか、ssupport@iwai-chem.co.jpまで日本語でお問合せください。

これらのELISAキットには、ChonBlock™(カタログ番号#9068, #90681)と名付けたアッセイバッファーが搭載されています。ChonBlock™は間接ELISAにおける非特異的反応を極力排除し、特にELISAプレートに試料中の免疫グロブリンが疎水結合することによる偽陽性反応をブロックします(20-22)。

### カタログ番号とプレートカラーコード

Antigens	IgG	IgA
<i>E. coli</i> (O111:B4) Lipopolysaccharide (LPS)	Red - 6113	Red - 6114
<i>P. gingivalis</i> LPS	Pink - 6117	Pink - 6118
Peptidoglycan Polysaccharide (PG-PS)	Blue- 6123	Blue- 6124

## キット構成

Item	Quantity	Amount	Storage
Standard Antibody IgG or IgA	1 vial	32 units, lyophilized	-20°C
IgG or IgA Secondary Antibody (peroxidase-conjugated goat polyclonal antibodies) (61133 or 61143)	2 vials	50 µl/vial	-20°C
Solution A - Blocking Buffer (61026)	1 bottle	10 ml	-20°C
Solution B - Sample/Standard Dilution Buffer (61027)	1 bottle	50 ml	-20°C
Solution C - Secondary Antibody Dilution Buffer (61025)	1 bottle	20 ml	-20°C
TMB Solution (90023)	2 vials	0.2 ml/vial	-20°C
Chromogen Dilution Buffer (90022)	1 bottle	20 ml	-20°C
Stop Solution - 2N Sulfuric Acid (9016)	1 bottle	10 ml	-20°C
Wash Buffer, 20X (9005)	1 bottle	50 ml	-20°C
Antigen coated 8-Well Strips	12 each	8-well strips	-20°C

抗原コートしていないプレート(カタログ番号#9026)はキットに含まれていません。ssupport@iwai-chem.co.jpまでお問合せください。

## 使用前の注意

Note 1: 標準品及び検体は2重測定を推奨します。

Note 2: すべてのバッファは使用前に室温に戻してください。

Note 3: 一部使用した試薬は次回の測定まで-20°Cで保管してください。

Note 4: Wash Buffer, 20Xは冷蔵保存で結晶の沈殿物が発生することがあります。その場合は加温して結晶を完全に溶解してください。

Note 5: 表示よりも多くの容量のバッファを含んでおりますので、必要量をピペットで量りとってください。

Note 6: プレートの外周のウェルの乾燥を防ぐために、各工程でプレートシールもしくはサララップでプレートを覆ってください。

## プレートマッピング

それぞれの試料の希釈したものをどこに入れるかをプレート上で印します。例えば、試料の希釈が1,000倍以上であれば、抗体未コートのウェルをネガティブコントロールとして測定する必要はありませんが(図1a)、1,000倍希釈以下であれば、個々の試料のOD値のバックグラウンド値(BG)を測定するために、抗原コートしていないウェルを用意しておく必要があります(図1b)。

図 1a - 抗原コートプレートの標準的レイアウト

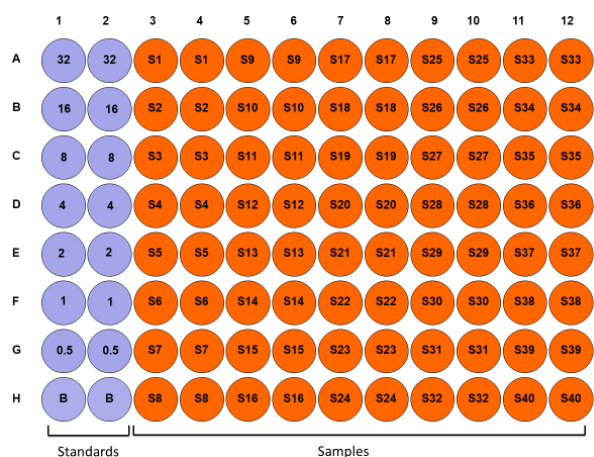
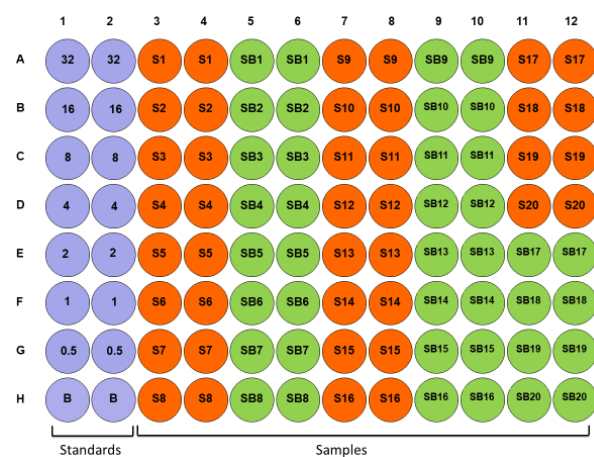
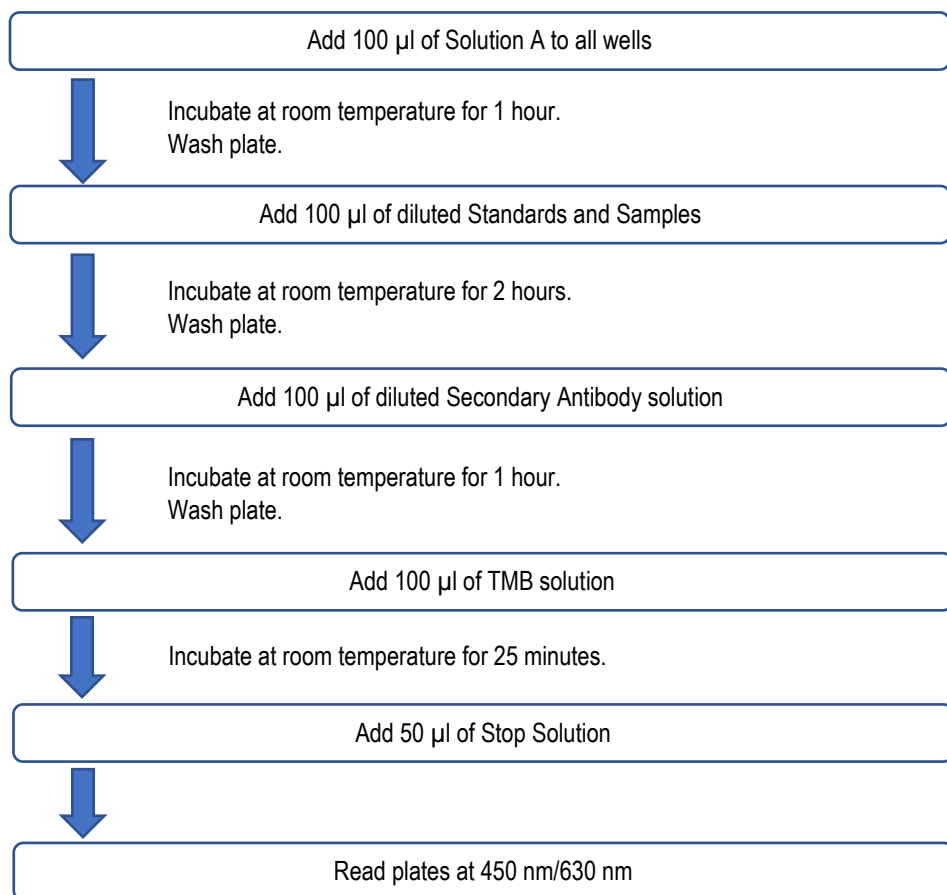


図 1b - 抗原未コートプレートについても測定するときのレイアウト



## 測定概要



## 測定方法

1. ブロッキングバッファ-の添加：100 µl のブロッキングバッファ- (Solution A) を各ウェルに入れ、室温で1時間インキュベートしてください。

**Note:** もしも試料の希釈倍率が1,000倍希釈以下であれば、抗原コートしていないウェルについても測定する必要があります。ブロッキングバッファ-(Solution A) 100 µlを、洗浄していない抗原未コートウェルにも加えて同様に室温で1時間インキュベートします。抗原コートウェル(S1)と未コートウェル(SB1)の配置については、図1bを参考にしてください。

2. 標準希釈液の調製：1バイアルの標準品 (32 units/vial) を1 mlのSample/Standard dilution buffer (Solution B)に溶解し、32 units/ml の保存標準溶液とします。250 µlの本標準溶液と250 µlのSolution Bを混ぜ16 units/ml 標準溶液とし、この操作を繰り返すことにより8, 4, 2, 1, 0.5 units/ml の7種類の濃度の標準希釈系列を調製します。残った32 units/ml の保存標準溶液は、-20°Cで保存し、次回の測定に使用できます。

3. サンプルの調製：10  $\mu$ l の血清サンプルを990  $\mu$ lのSolution B (1:100)に加え、以後これをサンプルのストック溶液とします。サンプルは、抗体のレベルに合うようにSolution B でさらに希釈して使用します。例えば、50  $\mu$ lのサンプルストック溶液を450  $\mu$ l のSolution B で希釈して、1:1,000 希釈とします。もしも抗体価が低く抗体をあまり希釈できない場合 (1:1,000以下) には、抗原をコートしていないウェルでの測定も必要です。詳細情報は、support@chondrex.comに英語でお問合せいただくか、ssupport@iwai-chem.co.jpまで日本語でお問合せください。

**Note 1:** コンドレックスは、たくさんの血清を測定する場合、いくつかの血清サンプルをあらかじめ種々の希釈濃度(1:1,000, 1:4,000, 1:16,000など)で測定し、至適希釈倍率を求めておくことを推奨します。

**Note 2:** 下記の表は、136人の日本人の種々の患者サンプルを測定したときの抗体価の平均とばらつきを参考までに示したものです。

	IgG (x1000 units/ml)		IgA (x1000 units/ml)	
	Average	STDEV	Average	STDEV
<b>E. coli-LPS</b>	2.6	3.4	2.1	2.8
<b>P. gingivalis-LPS</b>	48.1	71.5	2.0	2.1
<b>PG-PS</b>	160.0	154.0	16.6	18.8

Note: 136人の患者サンプルを、これらのバクテリア毒素抗体測定用ELISAで測定しました。

4. 洗浄液の調製：50 ml の Wash Buffer, 20Xを950 ml の蒸留水と混合し、1 X洗浄液を調製します。プレートは洗浄瓶もしくはプレート洗浄機を用いて、1 X洗浄液で少なくとも3回洗浄してください。洗浄ごとにプレートを逆にし、ペーパータオルの上に置き、プレートをタッピングして、ウェル内の残存液を完全に除去してください。プレートは乾燥させないでください。
5. 標準希釈液およびサンプルの添加：100  $\mu$ l標準希釈液、Solution B (ブランク) およびサンプルをそれぞれ2ウェル分ずつ上記レイアウト (図1aまたは1b) に従って添加し、室温で2時間インキュベートしてください。
- Note:** もしもサンプルの希釈倍率が1,000倍希釈以下であれば、抗原コートウェル(S1)だけでなく、図1bのように、対応する抗原コートしていないウェル(SB1)にも100  $\mu$ lの希釈サンプルを加えます。
6. 洗浄： プレートを洗浄瓶もしくはプレート洗浄機を用いて、1 X洗浄液で少なくとも3回洗浄してください。洗浄ごとにプレートを逆にし、ペーパータオルの上に置き、プレートをタッピングして、ウェル内の残存液を完全に除去してください。プレートは乾燥させないでください。
7. 二次抗体の添加：1バイアルの二次抗体を、10 mlの二次抗体希釈液(Solution C)に溶解し、100  $\mu$ lずつ各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートしてください。
8. 洗浄： プレートを洗浄瓶もしくはプレート洗浄機を用いて、1 X洗浄液で少なくとも3回洗浄してください。洗浄ごとにプレートを逆にし、ペーパータオルの上に置き、プレートをタッピングして、ウェル内の残存液を完全に除去してください。プレートは乾燥させないでください。
9. TMB溶液の添加：凍結乾燥したTMB 1 チューブを、10 mlのChromogen Dilution Bufferで溶解してください。調製は使用直前に新しいチューブを用いて行ってください。TMB溶液100  $\mu$ lをすべてのウェルにすばやく添加し、室温で25 分間インキュベートしてください。
10. 反応停止：50  $\mu$ lの2N 酢酸 (Stop Solution)をすべてのウェルに添加し、反応を停止してください。
11. プレート測定：反応停止後5分以内に450 nmでOD値を測定してください。サンプルのOD値が標準液の最高濃度のOD値よりも高い場合は、サンプルを更に希釈して再測定してください。630 nmはリファレンスとして使用できます。

## 抗体価測定値の計算方法

1. 標準液、サンプルおよびブランクの2重測定のOD値を平均してください。
2. ステップ1で求めた平均のOD値をブランクのOD値平均で差し引いてください。

Note: 抗原未コートウェルを用いた場合には、このOD値を非特異的反応によるバックグラウンド値として、対応する抗原コートウェルの値から引きます。

3. 標準液のOD値をunits/mlでプロットしてください。log/log プロットを用いると直線検量線が作成できます。図2 に標準曲線 0.5– 32 units/ml の範囲での典型的なOD値のプロット例を示しました。
4. 回帰分析でサンプル中の抗体価を units.ml として計算してください。サンプルの希釈倍率を掛けて、サンプル中の抗体価units/ml を求めます。

図2-ヒト抗バクテリア毒素抗体ELISAキットの典型的な標準曲線例

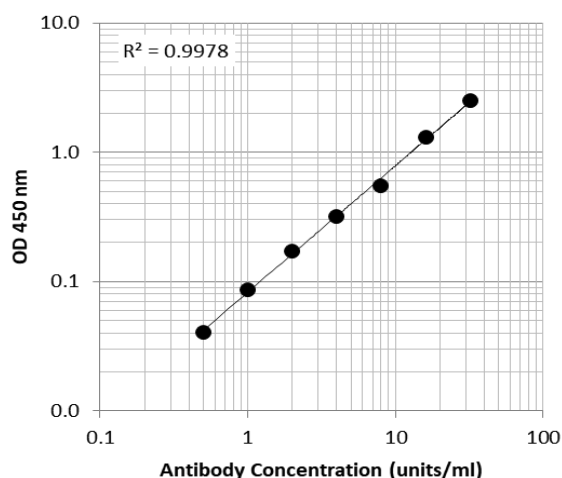


表 1- 抗 *E. coli* (O111:B4) LPS 抗体測定用 ELISA キットの再現性試験成績

Test At	IgG (6113)			IgA (6114)		
	1 unit/ml	4 units/ml	16 units/ml	1 unit/ml	4 units/ml	16 units/ml
Inter-Assay CV (%)	3.7	6.3	6.5	9.8	9.3	4.2
Intra-Assay CV (%)	3.2	6.2	7.2	8.8	5.0	3.3
Spiking Test*	97%	109%	95%	103%	97%	94%

表2- 抗 *P. gingivalis* LPS抗体測定用ELISAキットの再現性試験成績

Test At	IgG (6117)			IgA (6118)		
	1 unit/ml	4 units/ml	16 units/ml	1 unit/ml	4 units/ml	16 units/ml
Inter-Assay CV (%)	9.0	5.8	7.7	9.9	4.5	6.3
Intra-Assay CV (%)	2.5	8.8	2.8	8.9	1.1	1.9
Spiking Test*	94%	96%	95%	105%	108%	105%

表3- 抗PG-PS抗体測定用ELISAキットの再現性試験成績

Test At	IgG (6123)			IgA (6124)		
	1 unit/ml	4 units/ml	16 units/ml	1 unit/ml	4 units/ml	16 units/ml
Inter-Assay CV (%)	6.1	1.7	8.9	7.5	9.7	4.3
Intra-Assay CV (%)	6.8	1.2	8.9	7.3	3.5	6.5
Spiking Test*	108%	101%	95%	94%	96%	96%

\*それぞれの 抗体の既知量を標準希釈液に添加後、Sample/Standard/Detection Antibody Dilution Buffer (Solution B) で希釈し測定しました。



## REFERENCES

1. Kjeldsen-Kragh J. Rheumatoid arthritis treated with vegetarian diets. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(3 Suppl):594S-600S.
2. Peltonen R, Nenonen M, Helve T, Hänninen O, Toivanen P, Eerola E. Faecal microbial flora and disease activity in rheumatoid arthritis during a vegan diet. *Br J Rheumatol.* 1997;36(1):64-8.
3. Vaahtovuori J, Munukka E, Korkeamäki M, R. L, Toivanen P. Faecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008;35(8):1500-5.
4. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N UC, Bielski C, Rostron T, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife.* 2013;2013 Nov 5;2:e01202. .
5. Kang Y, Cai Y, Zhang X, Kong X, Su J. Altered gut microbiota in RA: implications for treatment. *Z Rheumatol.* 2016.
6. de Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol.* 2008;35(1):70-6.
7. Liao F, Li Z, Wang Y, Shi B, Gong Z, Cheng X. *Porphyromonas gingivalis* may play an important role in the pathogenesis of periodontitis-associated rheumatoid arthritis. *Med Hypotheses.* 2009;72(6):732-5.
8. Yin-Yi. Chou, Kuo-Lung. Lai, Der-Yuan. Chen, Ching-Heng. Lin, Chen H-H. Rheumatoid Arthritis Risk Associated with Periodontitis Exposure: A Nationwide, Population-Based Cohort Study. *PLoS One.* 2015;10(10 ):e0139693.
9. Yoshida A, Nakano Y, Yamashita Y, Oho T, Ito H, Kondo M, et al. Immunodominant region of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 40-kilodalton heat shock protein in patients with rheumatoid arthritis. *J Dent Res.* 2001;80(1):346-50.
10. Schmucker D, Thoreux K, Owen R. Aging impairs intestinal immunity. *Mech Ageing Dev.* 2000;122(13):1397-411.
11. Tiihonen K, Ouwehand A, Rautonen N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev.* 2010;9(2):107-16.
12. Larbi. A, Rymkiewicz. R, Anusha Vasudev. A, Low. I, Nurhidaya Binte Shadan. NB, Mustafah. S, et al. The Immune System in the Elderly: A Fair Fight Against Diseases? *Ageing Health.* 2013;9(1):35-47.
13. Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, et. al The origins of age-related proinflammatory state. *Blood.* 2005;105(6):2294-9.
14. Khalif I, Quigley E, Konovitch E, Maximova I. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Dig Liver Dis.* 2005; 37(11): 838-49.
15. Katayama K, Matsuno T, Waritani T, Terato K, Shionoya H. Supplemental Treatment of Rheumatoid Arthritis with Natural Milk Antibodies against Entero-Microbes and Their Toxins: Results of an Open-Labeled Pilot Study. *Nutrition J.* 2011;10(2).
16. Anderlik P, Szeri I, Bános Z, Barna Z. Bacterial translocation after cold stress in young and old mice. *Acta Microbiol Hung.* 1990;37(2):289-94.
17. Selkirk G, McLellan T, Wright H, Rhind S. Mild endotoxemia, NF-kappaB translocation, and cytokine increase during exertional heat stress in trained and untrained individuals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(2):R611-23.
18. Terato K, Do CT, Shionoya H. Slipping through the Cracks: Linking Low Immune Function and Intestinal Bacterial Imbalance to the Etiology of Rheumatoid Arthritis. *Autoimmune diseases.* 2015;2015:636207.
19. Terato K, Waritani T, Fukai R, Shionoya H, Itoh H, Katayama K. Contribution of bacterial pathogens to evoking serological disease markers and aggravating disease activity in rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2018.
20. Terato K, Do C, Cutler D, Waritani T, Shionoya H. Preventing Intense False Positive and Negative Reactions Attributed to the Principle of ELISA to Re-investigate Antibody Studies in Autoimmune Diseases. *J Immunological Methods.* 2014;407:15-25.
21. Terato K, Do C, Chang J, Waritani T. Preventing further misuse of the ELISA technique and misinterpretation of serological antibody assay data. *Vaccine.* 2016;34(39):4643-4.
22. Waritani T, Chang J, McKinney B, Terato K. An ELISA Protocol to Improve the Accuracy and Reliability of Serological Antibody Assays. *MethodX.* 2017;4:153-65.