

Magic Lite SQ Specific IgE Kit による特異 IgE 抗体の測定

富山医科薬科大学小児科

尾上洋一	村上巧啓	高野雅子	萱原昌子
足立陽子	松野正知	足立雄一	岡田敏夫

新しい特異的 IgE 抗体測定法である Magic Lite SQ の有用性を調べるためアレルギー性疾患患児血清で特異的 IgE 抗体を測定し Phadebas RAST, プリックテストと比較検討した. Magic Lite SQ と Phadebas RAST の相関係数はダニ D.p. 0.87, D.f. 0.89, ハウスダスト 1 0.87, ハウスダスト 2 0.55, カモガヤ0.76, ネコ上皮0.93, アルテルナリア0.78, 卵白0.88, 卵黄0.75, 牛乳0.81, 大豆0.75, エビ0.64であった. また, 両者の陰性陽性一致率はハウスダスト 2 で低値を示した他は比較的高かった. プリックテストとの比較において Magic Lite SQ はハウスダスト 2 とカモガヤ以外では良好な感度, 特異性を示した. D.f. 陽性患者血清を用いた希釈試験ではほぼ直線的な減少が認められ定量性に優れていた. D.f. 陽性プール血清にダニ抗原を添加するとダニ特異的 IgE 抗体量はほぼ直線的に抑制が認められ抑制率は最高96%に達した. 以上より, 簡単な操作で短時間に微量の検体の測定が行える本法は有用な特異的 IgE 抗体測定法であると考えられた.

Key words: Chemiluminescence Immunoassay — Magic Lite SQ Specific IgE — Phadebas RAST — specific IgE antibodies

はじめに

特異的 IgE 抗体の測定は気管支喘息, アトピー性皮膚炎, アレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患の診断においてアレルゲンの同定に不可欠である. 従来より Wide ら¹⁾が開発した radioallergosorbent test (RAST) がアレルギー性疾患患者の血中 IgE 抗体の検出法として一般に用いられてきたが, 最近より簡便で感度の高い CAP system²⁾, fluorescence allergosorbent test (FAST)³⁾, AlaSTAT⁴⁾などの新しい IgE 抗体測定法が開発されてきている. 今回我々は, Ciba-corning 社 ALK Laboratory で近年開発された新しい IgE 抗体測定法である協和メデックス Magic Lite SQ Specific IgE Kit (Magic Lite SQ) を使用する機会を得た. これまで, 従来用いられてきた Phadebas RAST と Magic Lite SQ の相関を検討した報告は非常に少ない. そこで, アレルギー性疾患患者血清の特異 IgE 抗体測定を行い, Phadebas RAST 法, プリックテストとの比較検討, およびプール血清を用いた血

清希釈による影響, 抑制試験を行い, その有用性を検討したので報告する.

方 法

1. 対象および検討アレルゲン

対象は富山医科薬科大学小児科アレルギー外来に通院した気管支喘息, アトピー性皮膚炎およびアレルギー性鼻炎患児で, 患者血清分離後, 13項目すなわちダニ (D.p. および D.f.) 50名, ハウスダスト 1, 2 およびハウスダストミックス50名, カモガヤ52名, ネコ上皮54名, アルテルナリア14名, 牛乳54名, 卵白54名, 卵黄53名, エビ38名, 大豆30名について Magic Lite SQ および RAST にて同時に測定した. また, ダニ (D.p. および D.f.) 31名, ハウスダスト 1, 2 およびハウスダストミックス33名, カモガヤ35名, ネコ上皮25名, 卵白31名, 牛乳24名, エビ23名について, プリックテストと Magic Lite SQ および RAST の結果を比較した.

2. Magic Lite SQ

1) 測定原理

Fig. 1 に Magic Lite SQ による特異的 IgE 抗体測定の原理を示す. 洗浄・分離などの操作を簡単に行う

Received: December 14, 1992

Accepted: March 9, 1993

Abbreviations: D.f. *Dermatophagoides farinae*;
D.p. *Dermatophagoides pteronyssinus*; RAST
radioallergosorbent test

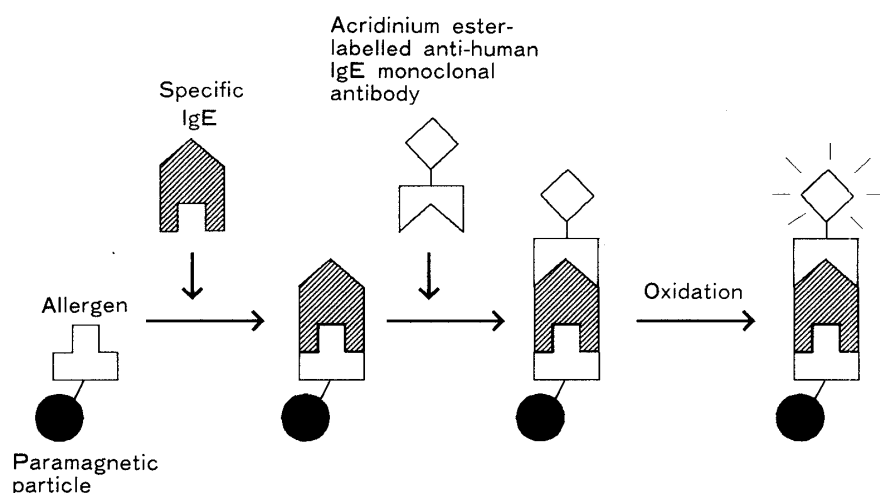


Fig. 1. Principle of the Magic Lite SQ Specific IgE assay.

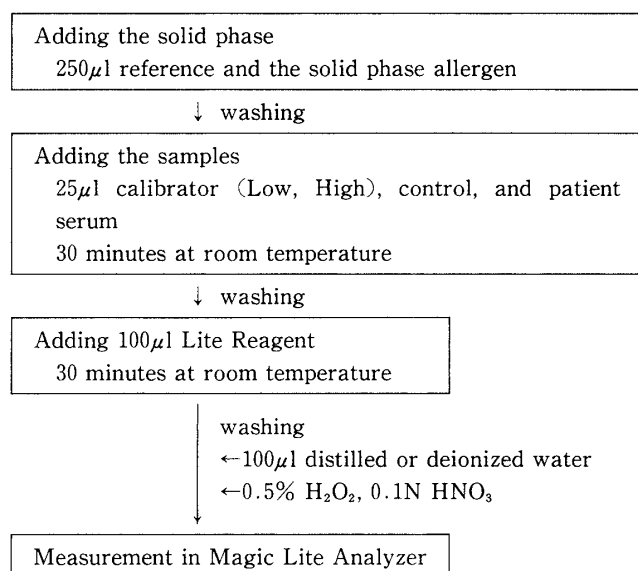


Fig. 2. Magic Lite specific IgE Assay Procedure.

ため Paramagnetic particle にアレルゲンが結合している。ここに被検血清を加えて反応させた後抗ヒト IgE モノクローナル抗体を加え特異的 IgE 抗体をサンドウィッチする。この抗ヒト IgE モノクローナル抗体は Acridinium ester でラベルされているが、Acridinium ester は酸化過程で励起され 10-methylacridanone になり基底状態に戻るときに 430 nm の光子を放出する。本法はこれを Luminometer により測定する Chemiluminescence Immunoassay である。

2) 操作手順

Fig. 2 に操作手順を示す。まず、試験管内に 250μl の paramagnetic particle に接着した較正用アレルゲン

(オオアワガエリアレルゲン) および測定すべきアレルゲンに対応した固相を添加し、洗浄する。ここに 25μl の低濃度と高濃度の較正剤 (抗オオアワガエリ IgE 抗体を含む)、管理血清および検体を加え、室温にて 30 分間インキュベーション後再び洗浄する。次に 100μl の acridinium ester 標識抗ヒト IgE モノクローナル抗体 (Lite Reagent) を加えさらに室温で 30 分間インキュベートし 2 回洗浄する。ここに 100μl の蒸留水を添加し Magic Lite Analyzer 内にて自動的に酸化剤 (0.5% H₂O₂, 0.1N HNO₃) および酸化補助剤 (<0.25 N NaOH, 界面活性剤) を加え 2 秒間蛍光量を測定する。なお、洗浄には Magic Separation Unit を用い、ラックを磁石に 3 分間セットし、分離後液相を捨てることで容易に行える。

3) 結果の判定

結果は standardized units per milliliter (SU/ml) で表され、測定範囲は 1.43~800SU/ml である。1.43 SU/ml 未満をクラス 0, 1.43~4SU/ml をクラス 1, 4~20SU/ml をクラス 2, 20~100SU/ml をクラス 3, 100~300SU/ml をクラス 4, 300SU/ml 以上をクラス 5 とした。

3. RAST

Phadebas RAST キット (Pharmacia 社) を用いて通常の方法で測定した。結果は 0.35PRU/ml 未満を RAST スコア 0, 0.35~0.7PRU/ml をスコア 1, 0.7~3.5PRU/ml をスコア 2, 3.5~17.5PRU/ml をスコア 3, 17.5PRU/ml 以上をスコア 4 とした。

4. プリックテスト

皮膚テストは鳥居薬品株式会社製のプリックテストエキスをを用いてプリックテストを行い、15 分後に判定

し膨疹4mm 以上で対照液より2mm 以上大きいものを陽性とした。

5. 血清希釈の影響

D.f. RAST スコア 3 以上を示す18名の気管支喘息児より血清を等量ずつ集めた D.f. 陽性プール血清を128倍まで RAST buffer にて倍数希釈し Magic Lite SQ で D.f. 特異的 IgE 抗体量を測定し血清希釈の影響を調べた。

6. 抑制試験

D.f. 陽性プール血清25 μ l に鳥居薬品株式会社製のダニ抗原液 (Lowry 法にて蛋白量を0.1, 0.3, 1, 3, ……300, 1000 μ g/ml に調整)を25 μ l 加えて室温で2時

間静置後, Magic Lite SQ で D.f. 特異的 IgE 抗体量を測定した。

抑制率は下記の式にて算出した。

$$\frac{[\text{RAST buffer 添加プール血清による Magic Lite SQ (SU/ml)} - \text{ダニ抗原添加プール血清による Magic Lite SQ (SU/ml)}]}{[\text{RAST buffer 添加プール血清による Magic Lite SQ (SU/ml)}]} \times 100$$

7. 統計処理

Magic Lite SQ と RAST との相関係数は, 前者のクラス5を4として, クラス0～4により求めた。またクラス1以上とクラス2以上を陽性とした場合の陰性陽性一致率は, 全検体数に対する両測定法とも陰性ま

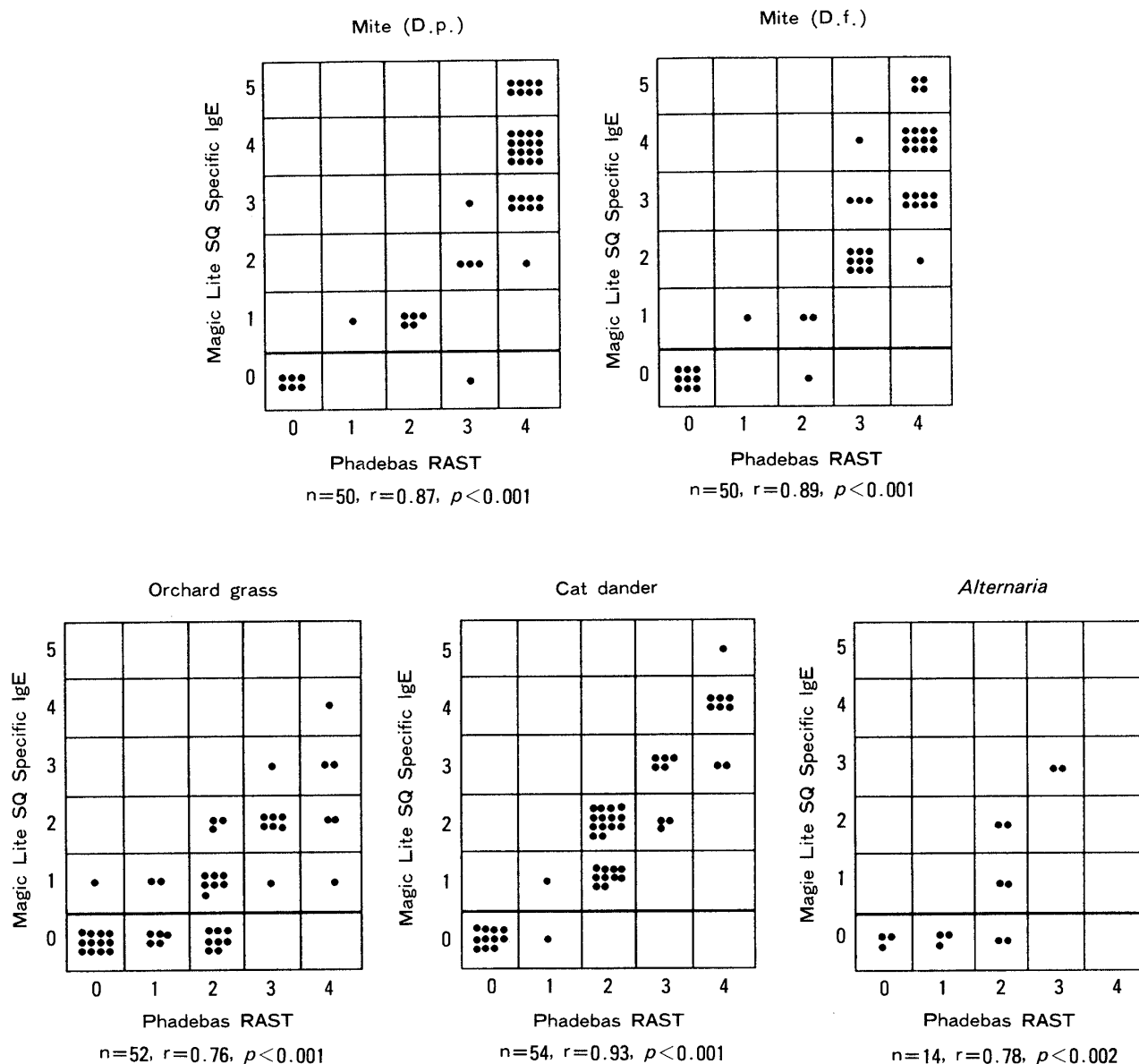


Fig. 3. Relations between classes of Magic Lite SQ Specific IgE and those of Phadebas RAST.

たは陽性を示した検体数の百分率で表した。また、ブリックテストに対する感度、特異性および陰性陽性一致率は Magic Lite SQ, RAST のクラス 2 以上を陽性として求めた。

結 果

1) Magic Lite SQ と Phadebas RAST の相関および一致率

Fig. 3 はダニ(D.p. および D.f.), カモガヤ, ネコ上

皮, アルテルナリア, Fig. 4 は卵白, 卵黄, 牛乳, 大豆およびエビについてそれぞれ Magic Lite SQ と Phadebas RAST の両者のクラスで比較したものである。また, Magic Lite SQ のハウスダスト (1 および 2), ハウスダストミックスと Phadebas RAST のハウスダスト 1 およびハウスダスト 2 のクラスで比較したものを Fig. 5 に示す。相関係数は D.p. 0.87, D.f. 0.89, ハウスダスト 1 0.87, ハウスダスト 2 0.55, カモガヤ 0.76, ネコ上皮 0.93, アルテルナリア 0.78, 卵白 0.88, 卵黄 0.75, 牛乳 0.81, 大豆 0.75, エビ 0.64 であり, Magic Lite SQ のハウスダストミックスと

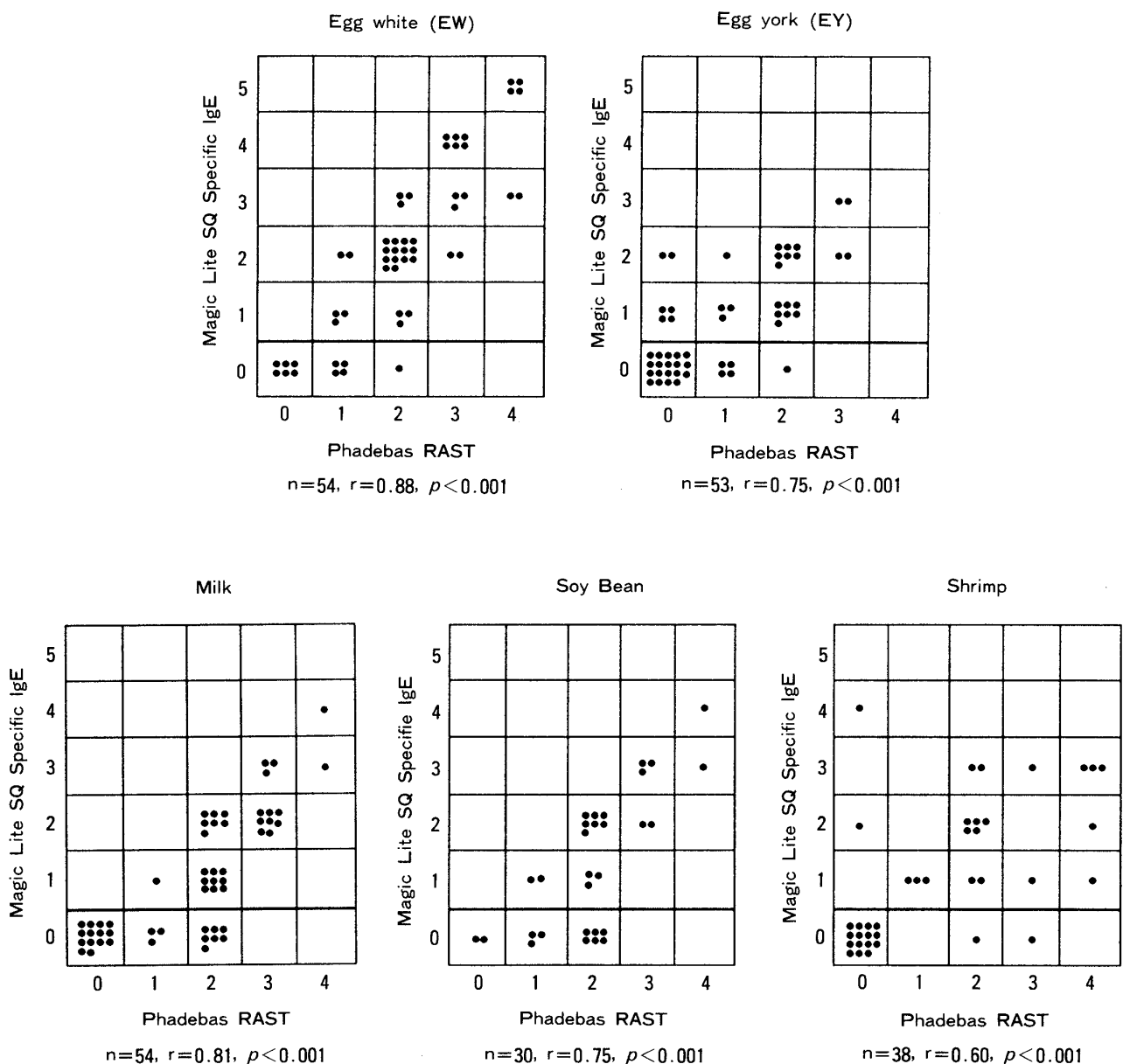


Fig. 4. Relations between classes of Magic Lite SQ Specific IgE and those of Phadebas RAST.

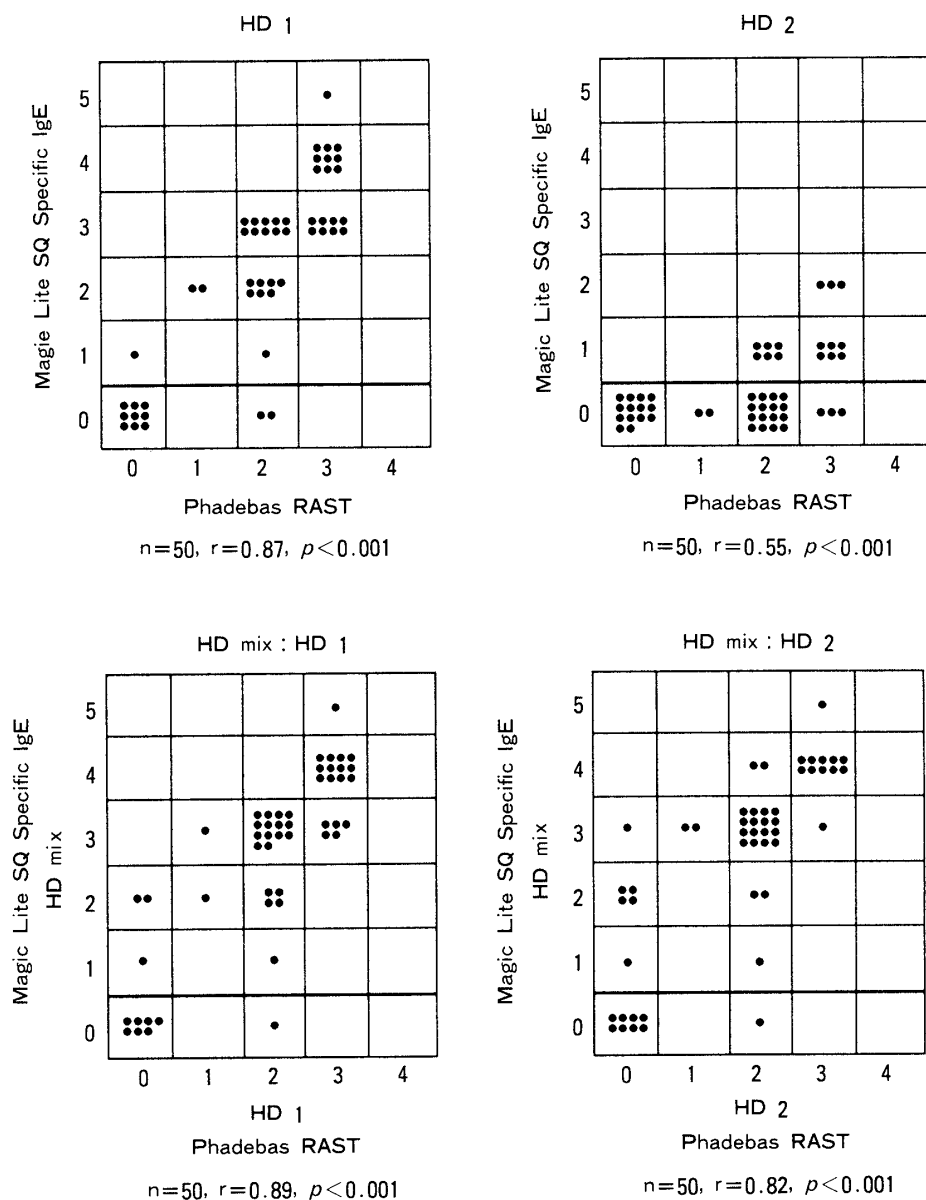


Fig. 5. Relations between classes of Magic Lite SQ Specific IgE and those of Phadebas RAST.

Phadebas RAST のハウスダスト 1, ハウスダスト 2 とそれぞれ比較したものでは相関係数はそれぞれ 0.89, 0.82であった。ハウスダスト 2 では Magic Lite SQ によるクラスが低値をしめし, ハウスダスト 1, ハウスダストミックスでは高値を呈した。エビではクラス間にばらつきが多く相関係数が低い, 他のアレルゲンでは良好な相関がみられた。

Table 1 に Magic Lite SQ と Phadebas RAST のクラスの比較のまとめを示す。クラス 1 およびクラス 2 以上を陽性とした陰性陽性一致率はハウスダスト 2 ではそれぞれ 58%, 38%と低値を示した。また, Phadebas RAST に比べて Magic Lite SQ によるク

ラスがやや低値を示したカモガヤ, 牛乳, 大豆ではクラス 2 以上を陽性とした時の陰性陽性一致率が 70%前後を示した。

2) プリックテストと Magic Lite SQ および RAST の比較

それぞれのアレルゲンに関して皮膚テストに対する Magic Lite SQ および RAST の感度, 特異性, 陰性陽性一致率を Table 2 に示す。D.p. と D.f. については鳥居社製のダニのプリックテストの結果と, ハウスダスト 1, ハウスダスト 2, ハウスダストミックスについては鳥居社製のハウスダストのプリックテストの結果と比較した。個々のアレルゲンにおける Magic Lite

Table 1 Relations between classes of Magic Lite SQ Specific IgE and those of Phadebas RAST

Allergen	No. of cases	Coefficient of correlation	Concordance Cut off :	
			Class 1	Class 2
Mite(D.p.)	50	0.87	98.0%	88.0%
Mite(D.f.)	50	0.89	98.0%	94.0%
HD 1	50	0.87	94.0%	90.0%
HD 2	50	0.55	58.0%	38.0%
Orchard grass	52	0.76	73.1%	67.3%
Cat dander	54	0.93	98.1%	81.5%
<i>Alternaria</i>	14	0.78	64.3%	71.4%
Egg white	54	0.88	90.7%	88.9%
Egg york	53	0.75	79.2%	79.2%
Milk	54	0.81	81.5%	70.4%
Soy bean	30	0.75	70.0%	70.0%
Shrimp	38	0.60	89.5%	78.9%

Table 2 Comparison date between skin prick test and in vitro test

Allergen	No. of cases	Magic Lite SQ			RAST		
		Sens.	Spec.	CR	Sens.	Spec.	CR
Mite(D.p.)	31	84.6%	80.0%	83.9%	96.2%	60.0%	90.3%
Mite(D.f.)	31	84.6	80.0	83.9	92.3	80.0	90.3
HD 1	33	82.1	100	84.8	89.3	100	90.9
HD 2	33	3.6	100	18.2	78.6	100	81.8
HD mix	33	89.3	80.0	87.9			
Orchard grass	35	33.3	100	48.6	74.1	100	80.0
Cat dander	25	66.7	71.4	68.0	77.8	57.1	72.0
Egg white	31	83.3	61.5	74.2	83.3	53.8	71.0
Milk	24	58.3	91.7	75.0	83.3	41.7	62.5
Shrimp	23	66.7	87.5	73.9	60.0	87.5	69.6

In vitro test	Skin prick test		Sens : Sensitivity = $D \times 100 / B + D$
	—	+	
	—	A	Spec : Specificity = $A \times 100 / A + C$
	+	C	
			CR : Concordance rate = $(A + D) \times 100 / A + B + C + D$

SQ の感度はダニ、ハウスダスト 1、ハウスダストミックス、卵白で80%以上と良好であったが、カモガヤで33.3%、ハウスダスト 2 で3.6%と低値を示した。RAST の感度も同様の傾向がみられ、ダニ、ハウスダスト 1、卵白、牛乳で80%以上と良好であった。Magic Lite SQ の特異性は卵白で70%以上でやや低いが、その他はおおむね良好であった。RAST の特異性はダニ(D.p.)、ネコ上皮、卵白、牛乳で60%以下であり、Magic Lite SQ よりやや悪かった。プリックテストと Magic Lite SQ との一致率はハウスダスト 2 とカモガヤで

50%以下で良くなかったが、それ以外のアレルギーにおいては RAST との一致率とほぼ同様でおおむね良好であった。

3) 血清希釈による影響

D.f. 陽性患者プール血清の倍々希釈を行い、Magic Lite SQ を用い、D.f. の特異的 IgE 抗体量を測定すると Fig. 6 のように、ほぼ直線的な減少が認められた。しかし、希釈倍率が高くなると期待値に比してわずかに高値を示した。

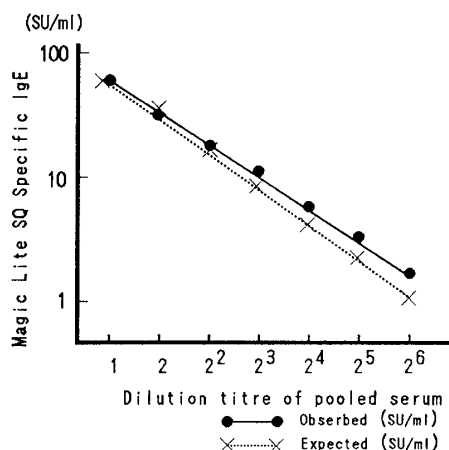


Fig. 6. Effect of serum dilution on D.f. specific IgE antibody level measured by Magic Lite SQ Specific IgE Kit.

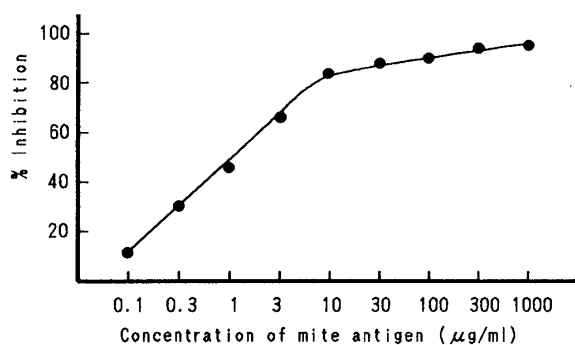


Fig. 7. Inhibition test of D.f. specific IgE antibody level by mite antigen using Magic Lite SQ Specific IgE Kit.

4) 抑制試験

D.f. 陽性プール血清にダニ抗原を添加し、吸収した後、Magic Lite SQ Kit を用いて D.f. 特異的 IgE 抗体量を測定すると Fig. 7 のように、ほぼ直線的に抑制が認められ、抑制率は最高96%に達した。

考 案

アレルギー特異的 IgE 抗体の測定には RAST 法が広く臨床検査として使われている。しかし、従来より用いられた RAST 法は、アイソトープを用いる免疫学的測定法であるため、廃棄や¹²⁵I の半減期が短いことから頻回にロットを交換する必要があるなどの問題があり、また測定時間が約1日と長いのが欠点である。

今回検討した Magic Lite SQ では RAST と比べ以下のような特徴がある⁵⁾⁶⁾。

1) ALK SQ 標準抗原を固相である微細な常磁性体粒子 (paramagnetic particles) に結合させているため洗浄・分離などの操作が簡単に行える。また、固相抗原の表面積が広く、paper disc と比べ4~16倍の結合能力があるため感度が良く、抗原までの接触距離が短いため全反応時間が60分と非常に短い。

2) 測定は Acridinium ester をトレーサーとし特異的抗ヒト IgE モノクローナル抗体を用いた Chemiluminescence Immunoassay にて行われるため、アイソトープ使用の諸問題がない。

3) 検体量が25μl と微量で行えるため特に小児の特異 IgE 抗体の測定に有利である。

4) 他の免疫グロブリンとの交叉反応は100万分の1である。

また、Magic Lite SQ は、臍帯血による非特異的反応はみられず、Myeloma IgE による非特異的 IgE 抗体の影響も10,000IU/ml までみられず特異性に優れており、希釈試験による再現性も様々なアレルゲンで91~109%であったとされる⁶⁾。アレルゲン別には検討されていないが、48種のアレルゲン908検体での Magic Lite SQ と Phadebas RAST 法との比較では非常に良い相関関係を示し、1クラス以内のクラス一致率は95.5%であると報告されている⁶⁾。また、オオアワガエリ、ネコ上皮、シラカンバに対するブリックテスト、Magic Lite SQ、および Phadebas RAST の陰性陽性一致率をそれぞれ比較したところ83~97%と高いものであったという⁷⁾。CAP system との比較した報告⁸⁾でも Magic Lite SQ は優れた特異性および感度を示し CAP system と各々のアレルゲンで高い相関を認めた。

日本においては従来広く使用されていた RAST と Magic Lite SQ を使用しての相関の検討はこれまでみられない。今回の検討では以前の報告と比較して陰性陽性一致率は若干低かったが、大部分のアレルゲンで Magic Lite SQ と RAST とは良好な相関が認められ両試験の陰性陽性一致率もハウスダスト2以外では比較的高かった。また、一部の症例で行ったブリックテストとの比較においては Magic Lite SQ は特異性が高く、ハウスダスト2とカモガヤ以外のアレルゲンでは感度、陰性陽性一致率がおおむね良好であった。Magic Lite SQ と RAST との相関が低かったのはハウスダスト2とエビであった。ハウスダスト2では Magic Lite SQ に使用している ALK 社製抗原、RAST で使用している Hollister-Stier 社製抗原およ

びプリックテストで使用している鳥居社製抗原中に存在する各種のダニ抗原量や、その他のアレルゲンの組成に違いがあるのかもしれない。また、エビの Magic Lite SQ と RAST との相関が低かったのは、それぞれの試験で使用されている抗原によりエビの主要アレルゲンの量あるいはエピトープが異なっていることが理由の1つとして考えられる。カモガヤ、牛乳、大豆において Magic Lite SQ はやや低値をとり、クラス2以上を陽性と判定すると Phadebas RAST に比較して陽性率が若干低くなると思われた。今後さらに検体数を増やして皮膚試験や臨床症状との関連性を検討しなければならない。

希釈試験ではおおむね定量性に優れており、抑制試験においても良好な結果がえられ、簡単な操作で短時間に微量の検体の測定が行えるため Magic Lite SQ は有用な特異的 IgE 抗体測定検査と考えられた。

結 語

Magic Lite SQ Specific IgE Kit は Phadebas RAST と良好な相関、高い陽性陰性一致率を認め、感度、特異性も良好であった。操作が簡便で短時間で行えるという利点を持ち、定量性にも優れており有用な特異 IgE 抗体検査法であると考えられた。

文 献

- 1) Wide, L., Bennich, H. and Johansson, S.G.O.:
Diagnosis of allergy by an in vitro test for

- allergen antibodies. *Lancet* 2, 1105-1107, 1967.
- 2) Ewan, P.W. and Coote, D.: Evaluation of capsulated hydrophilic carrier polymer (the immuno CAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* 45, 22-29, 1990.
- 3) Tsay, Y.-G. and Halpern, G.M.: IgE fluoroallergosorbent (IgE FAST™) test: Concept and clinical applications. *Immunol. Allergy Practice* 6, 169-174, 1984.
- 4) El Shami, A.S. and Alaba, O.: Liquid-phase in vitro allergen-specific IgE assay with in situ immobilization in advances in the biosciences. In "Allergy and Molecular Biology", Pergamon Press, Oxford, pp.191-201, 1989.
- 5) Dudley, R.F.: Chemiluminescence immunoassay: An alternative to RIA. In "A Collection of Worldwide Clinical Evaluations", Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA. 2.1-2.3, 1991.
- 6) Johansen, N.: The Magic Lite SQ specific IgE system: The technology and its performance. In "A Collection of Worldwide Clinical Evaluations", Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA. 2.9-2.15, 1991.
- 7) Heining, J.H., Engel, T., Johansen, N. and Jacobsen, L.: Comparison of Magic Lite SQ Specific IgE, Phadebas RAST, and skin prick test in patients suspected of allergic rhinitis and/or asthma. In "A Collection of Worldwide Clinical Evaluations", Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA. 3.3-3.6, 1991.
- 8) Kleine-Tebbe, J., Eickholt, M., Gatjen, M., Brunnee, T., O'Connor, A. and Kunkel, G.: Comparison between MAGIC LITE- and CAP-system; two automated specific IgE antibody assays. *Clin. Exp. Allergy* 22, 475-484, 1992.

EVALUATION OF THE MAGIC LITE SQ SPECIFIC IgE KIT

Yoichi Onoue, Gyokei Murakami, Masako Takano, Masako Kayahara, Yohko Adachi,
Masatomo Matsuno, Yuichi Adachi and Toshio Okada
Department of Pediatrics, Toyama Medical and Pharmaceutical University

The new IgE specific antibody assay kit (Magic Lite SQ) was evaluated by comparing its results with those obtained by the Phadebas RAST and the skin prick tests. Sera from allergic children were used in the tests. The correlation coefficients between the Magic Lite SQ and the Phadebas RAST were as follows: 0.87 for D.p., 0.89 for D.f., 0.87 for HD1, 0.55 for HD2, 0.76 for orchard grass, 0.93 for cat dander, 0.78 for *Alternaria*, 0.88 for egg white, 0.75 for egg yolk, 0.81 for milk, 0.75 for soy bean, and 0.60 for shrimp. The concordance rate of the two methods was high, except on the case of HD2. The sensitivity and specificity of Magic Lite SQ to the skin prick test was high, except on the case of HD2 and orchard grass. Dilution tests using samples from D.f. positive patients showed a good linearity and excellent quantitiveness. When mite allergen was added to D.f. positive pool serum, mite specific IgE antibody yielded an excellent inhibition curve of up to a maximum of 96%. Since the Magic Lite SQ requires only a small sample of serum and can complete the test in a short time, it is a useful and specific IgE antibody assay kit.