

Radioallergosorbent Test (RAST) による *Dermatophagoides farinae* 特異的 IgG 抗体の測定

—Double Antibody Antigen-Binding Assay および Protein A Solid-Phase Radioimmunoassay との比較—

東京大学医学部物療内科

坂本芳雄 中川武正 伊藤幸治 宮本昭正

Key words: *Dermatophagoides farinae* — double antibody antigen-binding assay — IgG-RAST — protein A solid-phase radioimmunoassay

(受付: 5月28日, 1983)

はじめに

アトピー性気管支喘息, アレルギー性鼻炎, アトピー性皮膚炎という一連のアレルギー疾患において, 家塵ダニとしての *Dermatophagoides* 属のダニが主要な位置を占めることはよく知られており¹⁾⁻³⁾, 日本ではその中で特に *Dermatophagoides farinae* (以下 *D. farinae*) の役割が宮本⁴⁾⁵⁾により強調されている。*D. farinae* エキスを用いた減感作療法が近年各施設で行われるようになり, 減感作療法の有効性を判断する上で *D. farinae* 特異的 IgG 抗体の測定はひとつの指標を与えてくれることが考えられる。今回我々は, *D. farinae* に過敏な気管支喘息患者血清中の *D. farinae* 特異的 IgG 抗体を radioallergosorbent test (IgG-RAST) で測定することを試みるとともに, ほかの IgG 抗体測定法である double antibody antigen-binding assay や protein A を用いた solid-phase radioimmunoassay との比較検討を行った。

方 法

対象: *D. farinae* に対して皮膚テストで陽性を示す

気管支喘息患者65症例を対象とした。内訳は, *D. farinae* エキスで減感作療法を行っているもの25例, ハウスダストで減感作療法を行っているもの16例, 減感作療法を行っていないもの24例であった。対照として非アトピー性健康人10人を選んだ。

抗原, 抗血清: *D. farinae* 抗原は鳥居薬品より供与された凍乾末を使用した。ヨード標識抗原は, 透析した *D. farinae* 溶液を Klinman and Taylor⁶⁾の方法で ¹²⁵I で標識したものをを使用した。¹²⁵I 標識ウサギ抗ヒト IgG・Fc (Pharmacia 社) は, シオノギ製薬より供与された。

double antibody antigen-binding assay: 伊藤らの方法⁷⁾に従い borate buffered saline (BBS), pH 8.0 で 10 倍希釈した被検血清 50 μ l に ¹²⁵I 標識 *D. farinae* 溶液 50 μ l (約 30×10^4 cpm) を加え 37°C で 1 時間インキュベートした後, 最適比の 2 倍量のウサギ抗ヒト IgG 血清 (Behringwerke 社) 500 μ l を加え 37°C で 1 時間, ひきつづき 4°C で一晩インキュベートした。1400g 15 分遠心で沈殿物を BBS で 3 回洗浄後, ガンマカウンター (アロカ社) で沈殿物中の放射活性を測定した。

protein A solid-phase radioimmunoassay: borate buffered saline (BBS), pH 8.0 で 100 μ g/ml に調整した protein A (Pharmacia 社) を 1 ml ずつ 10 $\times$ 70 mm ポリスチレンチップ (シオノギ) に加え, 3 時間静置後, 吸引し phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 で 3 回洗浄した。1% ウシ血清アルブミン (以下 BSA) 加 PBS を加え室温で 3 時間静置し残存付着部位を塞いだ後, 1% BSA および 0.1% Tween-20 加 PBS (incubation buffer) で 10 倍希釈した被検血清 1 ml を加

Abbreviations: BBS: borate buffered saline; BSA: bovine serum albumin; DEAE: diethylaminoethyl; *D. farinae*: *Dermatophagoides farinae*; PBS: phosphate buffered saline; RAST: radioallergosorbent test; THB: Tris-hydrochloride buffer

え室温で3時間反応させる。吸引し incubation buffer で3回洗浄後 ^{125}I 標識 *D. farinae* 溶液 1 ml (約 10×10^4 cpm)を加え4℃で一晩インキュベートする。吸引洗浄後チューブに残存する放射活性をガンマカウンターで測定した。同時に BSA のみ付着させたチューブについても測定を行い、protein A 付着チューブの放射活性値より BSA 付着チューブの放射活性値を引いた値を protein A に結合した *D. farinae* 特異的 IgG 抗体の放射活性値とした。background の放射活性値は約2400cpm, BSA 付着チューブの放射活性値は約2300-2500cpmであり、この放射活性値は ^{125}I 標識 *D. farinae* の非特異的なチューブへの吸着によるものと考えられた。

IgG-RAST: 0.15M Tris-HCl buffer (THB), pH 7.6で $10\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製した *D. farinae* 溶液をポリスチレンチューブに1mlずつ加え、4℃で一晩静置し、吸引およびTHBで3回洗浄後、1%BSA加THB 2mlを加え室温で3時間静置した。吸引後1%BSAおよび0.1%Tween-20加THB (incubation buffer)で100倍希釈した被検血清1mlを加えて室温で3時間インキュベートした。吸引後 incubation buffer で3回洗浄し、 ^{125}I 標識抗 IgG 1ml (約25000cpm)を加え室温で一晩静置した。吸引洗浄後チューブに残存する放射活性をガンマカウンターで測定した。同時に BSA のみを付着させたチューブについても同様の操作を行い、*D. farinae* 付着チューブの放射活性値から BSA 付着チューブの放射活性値を引いた値を *D. farinae* に特異的な放射活性とした。各測定は、duplicateあるいは triplicateで行い、測定値のパラッキは約4%であった。また BSA 付着チューブの放射活性は約100-200cpmであり natural background との差はわずかであった。

チューブに加える *D. farinae* 溶液の濃度は以下のごとく決定した。 ^{125}I 標識 *D. farinae* を種々の濃度でチューブに加え、4℃で一晩静置後、吸引洗浄しチューブに残存する放射活性を測定した。Fig. 1に示すように、およそ $10\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ならば付着量はほぼプラトーとなるので、standard assay では $10\mu\text{g/ml}$ の濃度を用いた。

被検血清のインキュベーション時間は以下のごとく決定した。ゲル内沈降反応で *D. farinae* と強い沈降線を形成する患者 H.I. の血清を用いインキュベーション時間を変えた場合の放射活性の変化を検討した。Fig. 2に示すごとく約3時間後より反応はほぼプラ

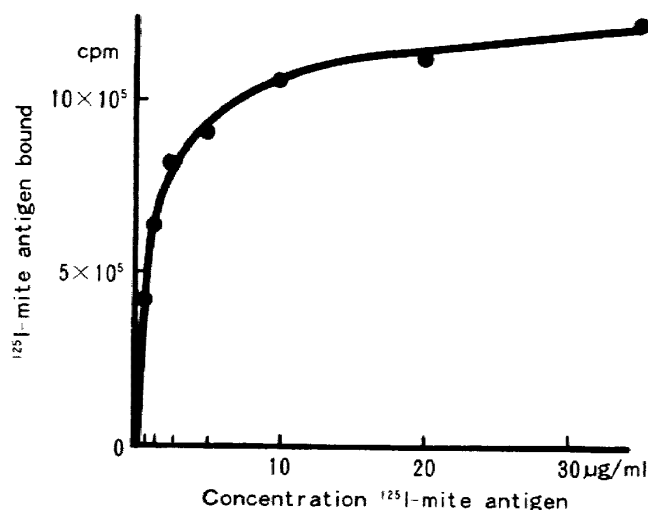


Fig. 1. Attachment of ^{125}I -*D. farinae* to the polystyrene tubes.

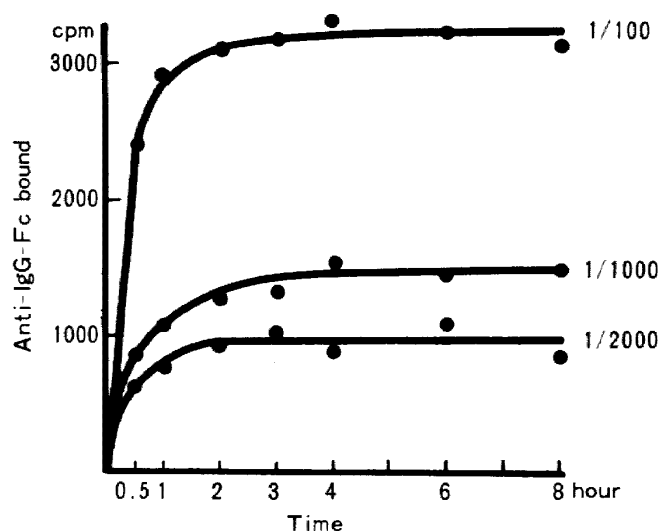


Fig. 2. Time course of binding of anti-IgG in each serum dilution.

トーとなるので、standard assay ではインキュベーション時間を3時間とした。

IgG-RAST 測定値の標準化: 測定された放射活性を IgG 量として表現する目的で、まず前出の H.I. 血清中の *D. farinae* 特異的 IgG 抗体量を設定し、次に H.I. 血清を用いて標準曲線を作製し、各被検血清中 *D. farinae* 特異的 IgG 抗体量をグラフより算出した。具体的に以下の操作を行った。1) ヒトガンマグロブリン(緑十字)を DEAE セルローズカラムに通して集めた IgG を ^{125}I で標識し、 $1 \times 100\text{cm}$ Sephadex G-25 fine カラムに通し放射活性の第1ピークを集めた。同量の IgG を同等のカラムに通し第1ピークに相等するフラクションの IgG 含量を吸光度計で測定し、IgG 単位量当

りの放射活性を算定した。2) ^{125}I 標識ヒト IgG を Tris-HCl buffer で調製した各濃度で、チューブに加え、5 時間室温で静置後、吸引洗浄し、incubation buffer を加えた後室温で一晩静置した。再び吸引洗浄後チューブに残存する放射活性を測定し、チューブに付着した IgG 量を算出した (Fig. 3)。3) 未標識ヒト IgG を 2) と同濃度でチューブに加え、5 時間インキュベート後吸引洗浄し ^{125}I 標識抗ヒト IgG を加え一晩静置し、吸引洗浄後残存放射活性を測定した (Fig. 4-a)。同時に、H.I. 血清を IgG-RAST の予備実験で最も低値の放射活性を示した正常人血清で順次希釈して IgG-RAST を行い、各希釈に対する残存放射活性を測定した (Fig. 4-b)。なお血清のインキュベーション時間は十分に反応させるため 5 時間とした。2) 3) の測定は triplicate で行った。各希釈に対応する放射活性を Fig. 4-a より IgG 量に換算し、更に希釈倍数を掛けて $\mu\text{g}/\text{ml}$ で表した。得られた数値のうちで最大値である $152\mu\text{g}/\text{ml}$ を H.I. 血清中に含まれる *D. farinae* 特

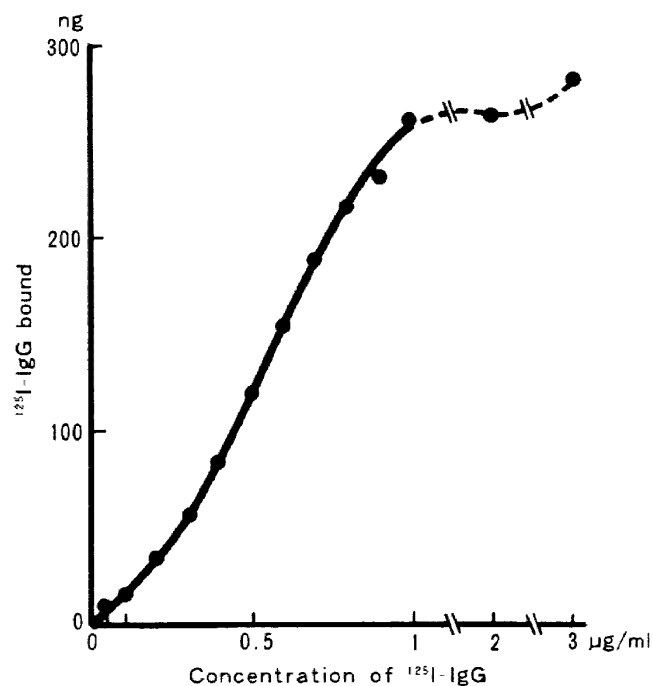
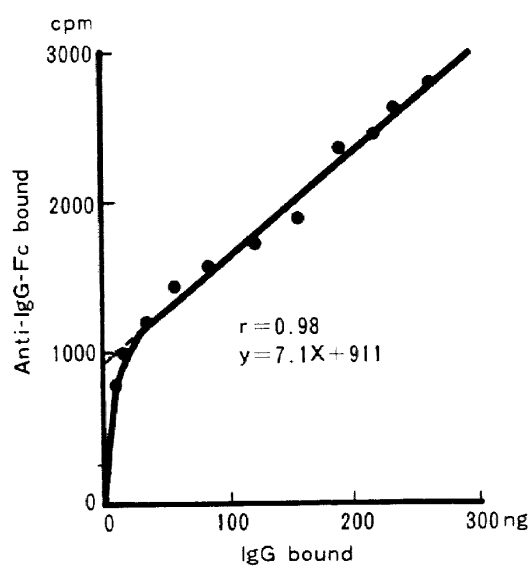
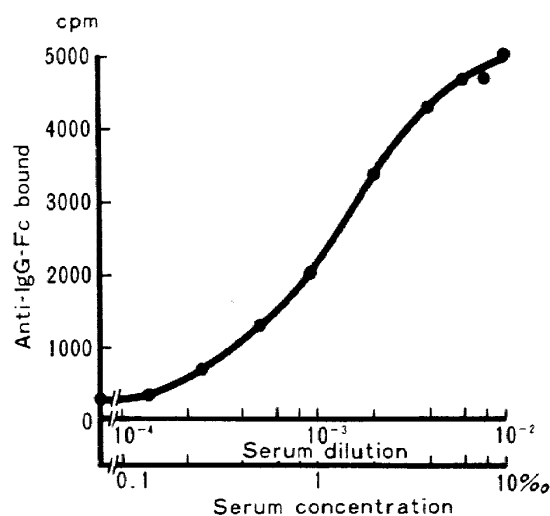


Fig. 3. Amount of ^{125}I -IgG attached to the tubes in each concentration of ^{125}I -IgG.



4 (a)



4 (b)

Fig. 4. Determination of the amount of *D. farinae*-specific IgG antibodies in the reference serum (H.I.).

(a) The correlation between the amount of bound IgG and the corresponding radioactive counts of anti-IgG.

(b) The correlation between the concentration of reference serum and the corresponding radioactive counts of anti-IgG.

The radioactive counts of anti-IgG bound in each concentration of reference serum was converted to the amount of IgG with the line shown in (a). The calculated amount of IgG was then multiplied with each dilution coefficient. As IgG did not bind to the tubes over about 280ng as shown in Fig. 3, the determination of the amount of IgG was carried out in the dilutions where the bound IgG were below 280ng.

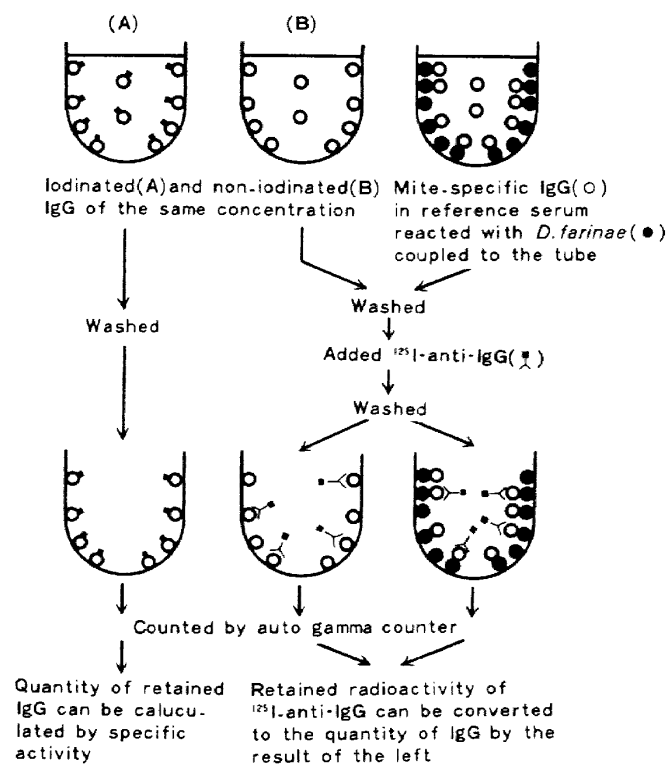


Fig. 5. The procedure to determine the amount of *D. farinae*-specific IgG antibodies in the reference serum.

異的 IgG 量と設定した。上記の操作の概略を Fig. 5 に示す。

結 果

IgG-RAST と double antibody antigen-binding assay との比較：両法で19例の血清について *D. farinae* 特異的 IgG 抗体に対する放射活性を測定し、両法間の相関について検討した。Fig. 6 に示すように両法間には $r=0.90$, $p<0.001$ と良い相関が認められた。

IgG-RAST と protein A solid-phase radioimmunoassay との比較：14例の血清について両法で測定した結果を Fig. 7 に示す。両法間には $r=0.88$, $p<0.001$ と良い相関が認められた。

IgG-RAST：減感作施行群および未施行群についての測定結果を Fig. 8 に示す。健常コントロール群の平均値は $4.3 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ (mean $\pm$ 1SD) であり、正常域上限を $6.8 \mu\text{g/ml}$ に設定した。*D. farinae* エキスで減感作を行っている25例についての測定値は、3.2から $179.7 \mu\text{g/ml}$ で、平均 $26.1 (\pm 39.8) \mu\text{g/ml}$ であった。3例を除いた残りの症例では IgG 抗体値が正常域上

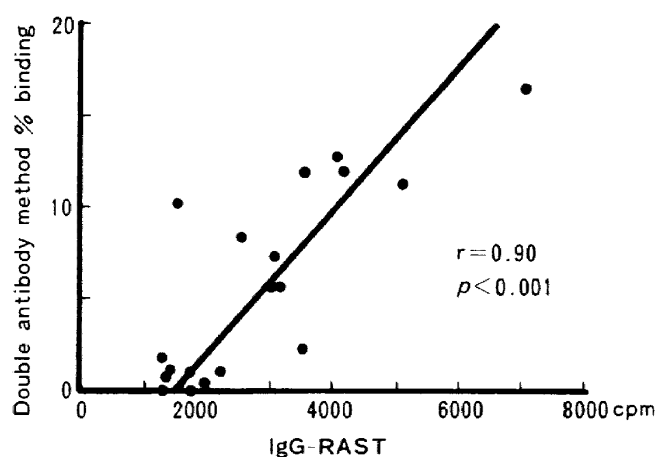


Fig. 6. The correlation between the double antibody antigen-binding assay and the IgG-RAST.

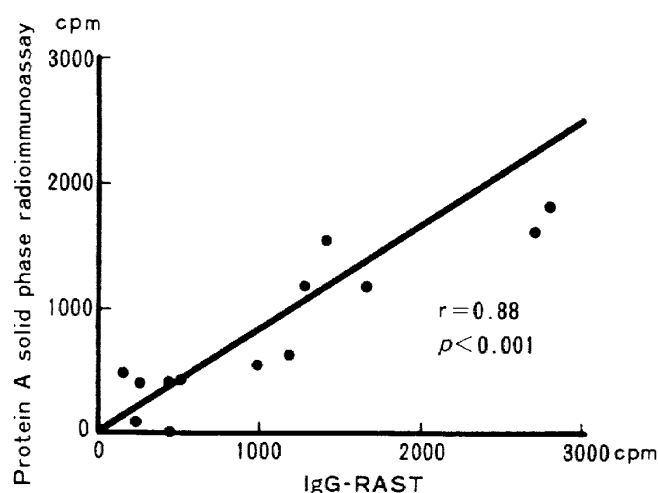


Fig. 7. The correlation between the protein A solid-phase radioimmunoassay and the IgG-RAST.

限を越えていた。ハウスダストで減感作を行っている16例についての測定値は6.5から $110.0 \mu\text{g/ml}$ で、平均 $23.9 (\pm 29.3) \mu\text{g/ml}$ であった。1例を除いた全例で IgG 抗体値は正常域上限を越えていた。一方減感作療法を行っていない24例では、約半数で IgG 抗体値が正常域上限を越えており、平均は $21.6 (\pm 35.6) \mu\text{g/ml}$ であった。これら各群間での unpaired t-test による有意差検定では、健常人群とハウスダスト減感作群との間のみ有意差が認められた ($p<0.05$) が、未減感作群またはダニ減感作群との間には有意差はなかった。またハウスダスト減感作群、ダニ減感作群および未減感作群の3者間には、それぞれ有意差はなかった。

1年以上減感作療法を行っている8例 (*D. farinae* 4例、ハウスダスト4例) について減感作療法前後での IgG 抗体値の変動をみた結果を Fig. 9 に示す。減感

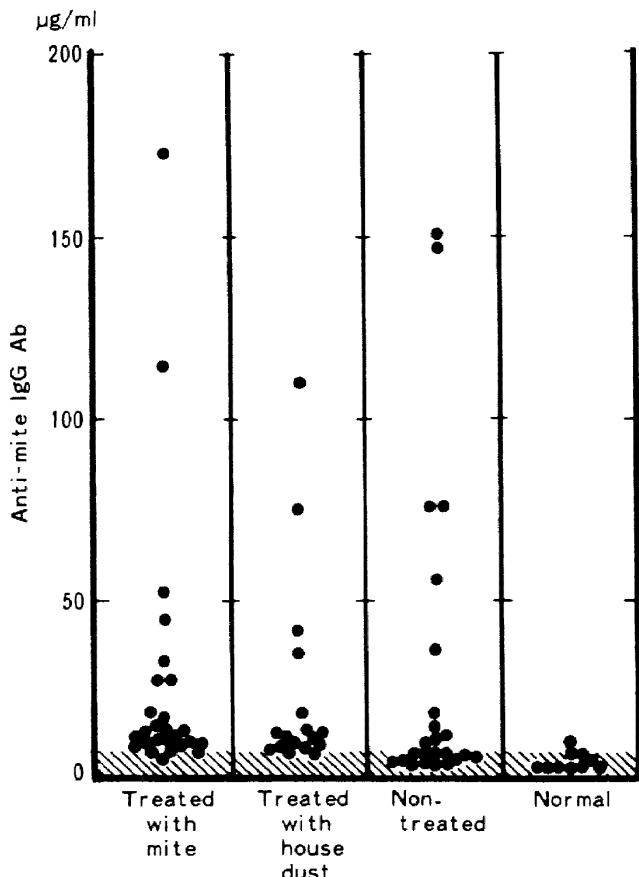


Fig. 8. The results of measurement of *D. farinae*-specific IgG antibodies.

The area of the oblique lines represents the normal range.

作前では8例中5例で抗体値が正常域内にあった。減感作後では8例中5例(*D. farinae* 3例, ハウスダスト2例)でIgG抗体は増加し, その増加率は減感作施行前のおよそ2ないし3倍であった。

考 察

Dermatophagoides 属のダニはハウスダストに含まれる主要抗原であり¹¹⁻¹³⁾, アレルギー疾患の病因として重要な位置を占め, 日本では特に, *Dermatophagoides farinae* のはたす役割が宮本ら⁴⁾⁵⁾の研究により確認されてきた。

D. farinae 特異的IgE抗体の測定は, paper discを用いたIgE-RASTにより広く行われてきている。一方 *Dermatophagoides* 特異的IgG抗体の測定に関しては今日まで double antibody antigen-binding assay⁷⁾⁻⁹⁾ や Delespesse ら¹⁰⁾ による ¹²⁵I-protein A を用いた

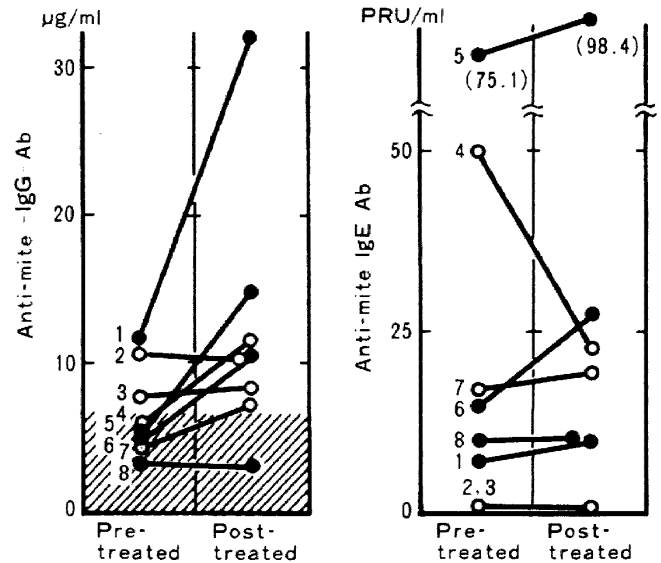


Fig. 9. The comparison of the amounts of *D. farinae*-specific IgG and IgE antibodies before and after immunotherapy. An open circle indicates the patient treated with house dust, and a closed circle indicates the patient treated with *D. farinae*. The area of the oblique lines represents the normal range. IgE antibodies specific to *D. farinae* were measured by a conventional method employing the Phadebas RAST kits (Pharmacia Diagnostics).

protein A solid-phase radioimmunoassay の報告があるが, IgG-RAST による測定の報告は未だない。double antibody antigen-binding assay には, 一度のアッセイで処理できる検体数に限りがある, 非特異的に結合する放射活性が多いという難点がある。protein A はIgGのFc部分に特異的に結合するとされているが, IgG 3サブクラスとは結合しない, わずかではあるがIgA, IgM¹¹⁾⁻¹³⁾と反応するという欠点をもつ。IgG-RAST はアレルギーの分野では真菌類のアスペルギルス¹⁴⁾¹⁵⁾やハチ毒¹⁶⁾について行われてきた。今回の我々の検索の結果 *D. farinae* 特異的IgG抗体の測定に関しては, RAST と double antibody antigen-binding assay あるいは ¹²⁵I-antigen を用いた protein A solid-phase radioimmunoassay との間に非常に良い相関が認められた。このことはIgG-RAST が他の2法とはほぼ同等の感度を有しており *D. farinae* 特異的IgG抗体の検出に有用であることを示すものと考えられた。

次に我々は, IgG-RAST で測定された放射活性をIgG量に換算することを試みた。患者血清より *D. farinae* 特異的IgG抗体を比較的少量に得て, それを用い

た標準曲線を作製することは困難であったので Aotsuka¹⁷⁾らが用いた方法に準じて定量化を行った。すなわち、チューブに付着している *D. farinae* に反応した IgG 量をもって血清中に存在する IgG 量とみなした。この方法では *D. farinae* と結合していない液相中に含まれる特異的 IgG 抗体については測定していないので得られた値は絶対量では決していない。

今回の研究ではシオノギ製ポリスチレンチューブを使用した。チューブの種類あるいはチューブのかわりにマイクロプレートを使うことで抗原付着量が異なることが予想される。抗原付着量が多いほど RAST の感度もあがると思われるので、この点の吟味も今後必要と思われる。

また今回の研究ではシオノギ製薬より供与された Pharmacia 社製 ¹²⁵I 標識抗ヒト IgG を使用したが、我々が作製した ¹²⁵I 標識抗ヒト IgG でも同様の結果を得ている。純化した抗ヒト IgG が得られれば、ポリスチレンチューブを用いた IgG-RAST は操作が簡便であり、非特異的放射活性の結合も少なく、一度のアッセイで多数の検体を処理できるという利点をもつと思われる。

本論文の要旨は第31回日本アレルギー学会総会において発表した。

文 献

- 1) Voorhorst, R., Spijksma, F.Th.M., Varekamp, H., Leupen, M.J. and Lyklema, A.W.: The house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces. Identity with house-dust allergen. *J. Allergy* 39, 325-339, 1967.
- 2) Mansell, K., Wraith, D.G. and Cunningham, A. M.: Mites and house dust allergy in bronchial asthma. *Lancet* 1, 1267-1270, 1968.
- 3) Pepys, J., Chan, M. and Hargreave, F.E.: Mites and house dust allergy. *Lancet* 1, 1270-1272, 1968.
- 4) Miyamoto, T., Oshima, S., Ishizaki, T. and Sato, S.: Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma. *J. Allergy* 42, 14-28, 1968.
- 5) Miyamoto, T., Oshima, S., Mizuno, K., Sasa, M. and Ishizaki, T.: Cross-antigenicity among six species of dust mites and house dust antigens. *J. Allergy* 44, 228-238, 1969.
- 6) Klinman, N.R. and Taylor, R.B.: General methods for the study of cells and serum during the immune response to dinitrophenyl in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 4, 473-487, 1969.
- 7) 伊藤幸治, 佐野靖之, 宮地純樹, 森田 寛, 宮本昭正 堀内淑彦: ¹²⁵I 標識抗原を用いた抗ダニ IgG, IgA 抗体の定量と喘息患者の各免疫グロブリンにおける分布の研究. アレルギー 24, 681-687, 1975.
- 8) Chapman, M.D. and Platts-Mills, T.A.E.: Measurement of IgG, IgA and IgE antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* by antigen-binding assay, using a partially purified fraction of mite extract (F₄P₁). *Clin. Exp. Immunol.* 34, 126-136, 1978.
- 9) Miyamoto, T., Akiyama, K., Ohta, K., Urata, C. and Horiuchi, Y.: Studies in atopic asthma with emphasis on correlation among various tests and various antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 279-284, 1981.
- 10) Delespesse, G., Debisschop, M.J. and Flament, J.: Measurement of IgG antibodies to house dust mite and glass pollen by a solid-phase radioimmunoassay. *Clin. Allergy* 9, 503-514, 1979.
- 11) Graham, M., Grov, A. and Oeding, P.: IgA and IgM reacting with staphylococcal protein-A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 79, 801-804, 1971.
- 12) Brunda, M.J.: Binding of human IgA subclasses to protein A. *Fed. Proc.* 37, 1278-1278 (Abstract), 1978.
- 13) Howell-Saxton, E. and Wettstein, F.O.: Characterization of human IgM interaction with protein A and *Staphylococcus aureus*. *Fed. Proc.* 37, 1853-1853(Abstract), 1978.
- 14) Patterson, R., Wang, J.L.F., Roberts, M. and Zeiss, C.R.: Comparison of radioimmunoassay techniques in the detection of IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* antigens. *J. Immunol.* 120, 66-71, 1978.
- 15) 坂本芳雄, 可部順三郎: solid-phase radioimmunoassay による抗 *Aspergillus fumigatus* IgG, IgA, IgM 抗体の測定. 日胸疾会誌 20, 1063-1067, 1982.
- 16) Grant, J.A., Goldblum, R.M., Rahr, R., Thuesen, D.O., Farnam, L. and Gillasp, J.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for immunoglobulin G antibodies against insect venoms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68, 112-118, 1981.
- 17) Aotsuka, S., Okawa, M., Ikebe, K. and Yoko-

hari, R.: Measurement of anti-double-stranded antibodies in major immunoglobulin classes.

J. Immunol. Methods 28, 149-162, 1979.

MEASUREMENT OF IgG ANTIBODIES SPECIFIC
TO *DERMATOPHAGOIDES FARINAE* BY IgG-
RADIOALLERGOSORBENT TEST (RAST)

Comparison with Double Antibody Antigen-Binding Assay and Protein A
Solid-Phase Radioimmunoassay

Yoshio Sakamoto, Takemasa Nakagawa, Koji Ito and
Terumasa Miyamoto

Department of Medicine and Physical Therapy, School of Medicine, University of Tokyo

A new method for measurement of IgG antibodies was developed by using antigen-coated polystyrene tubes and ^{125}I -anti-IgG-Fc. The sera from 65 asthmatic patients with positive skin reaction against house dust mite, *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*), were studied for the measurement of IgG antibodies specific to *D. farinae* by IgG-RAST. The results of IgG-RAST were compared with double antibody antigen-binding assay and protein A solid-phase radioimmunoassay. There was a good correlation between IgG-RAST and double antibody antigen-binding assay ($r=0.90$, $p<0.001$), and to protein A solid-phase radioimmunoassay ($r=0.88$, $p<0.001$). Thirty-seven out of the 41 patients receiving immunotherapy with *D. farinae*, or house dust extract had IgG antibodies exceeding the normal upper limit ($6.8 \mu\text{g/ml}$). In about half of the patients not receiving immunotherapy, the amount of IgG antibodies exceeded the normal upper limit. Eight patients were evaluated for IgG antibody amount before and after immunotherapy. In five of them IgG antibody amount after immunotherapy increased approximately two to threefold above the amount before immunotherapy.