

〔原 著〕

液相免疫測定法による IgE 抗体測定法 AlaSTAT の基礎的検討

千葉大学医学部第二内科

岩本逸夫 山崎博臣 木村 亮 落合賢一
中川典明 田中早苗 富岡玖夫 吉田 尚

液相によるアレルゲン特異的 IgE 抗体測定法 AlaSTAT が血清 IgE 抗体を正確に定量するか否かを調べるため、ハウスダスト (HD) 陽性アレルギー性気管支喘息患者 (32名) と健常人 (14名) 血清中の抗 HD および抗ダニ IgE 抗体量を本法により検討した。AlaSTAT による抗ダニ IgE 抗体量は、抗ダニ IgE 抗体をダニ抗原により吸収した前後の総 IgE 蛋白量の差とよく一致した (前者は後者の113%, $n=4$)。また精製 IgE 蛋白 (50-10000IU/ml) の添加は本法による特異的 IgE 抗体量を増加させず、遮断抗体陽性血清の添加は同 IgE 抗体量を減少させなかった。さらに、本法での抗 HD および抗ダニ IgE 抗体量は RAST によるそれら IgE 抗体価と強い正の相関を示した (各々 $r=0.90$, $p<0.001$ と $r=0.86$, $p<0.001$, $n=46$)。

以上から、液相免疫測定法 AlaSTAT による特異的 IgE 抗体の測定は特異的 IgE 抗体の絶対量を容易に測定でき、しかも遮断抗体と非特異的 IgE 蛋白の影響のない秀れた測定法と考えられた。

Key words: allergen-specific IgE antibody — AlaSTAT — liquid-phase immunoassay — radioallergosorbent test (RAST)

はじめに

アレルギー性疾患の診断と治療のためにはアレルゲン特異的 IgE 抗体の測定が必須である。特異的 IgE 抗体の *in vitro* 測定法としては radioallergosorbent test (RAST)¹⁾ が広く用いられており、皮膚テストおよび誘発試験の結果と良く一致することも知られている²⁾。しかし、RAST が固相による免疫測定法であるため、特異的 IgE 抗体の絶対量 (すなわち、IgE 蛋白量) をルチンに測定することは、一部の複雑な RAST 変法³⁾⁻⁵⁾を除き不可能である⁶⁾。これは固相免疫測定法では固相担体に結合させるアレルゲン量を厳密にキャリブレーションすることが困難なことが主な理由である⁶⁾。また RAST による特異的 IgE 抗体の測定は IgG クラスの遮断抗体や大量の非特異的 IgE 蛋白の存在により影響されることが知られている⁷⁾。

今回アレルゲン特異的 IgE 抗体を絶対量として測定するため、固相免疫測定法の上記欠点を解決するために新しく開発された液相による IgE 抗体測定法

AlaSTAT⁸⁾ の基礎的検討を行った。液相免疫測定法による特異的 IgE 抗体の測定は特異的 IgE 抗体の絶対量を容易に測定でき、しかも遮断抗体と非特異的 IgE 蛋白の影響がない秀れた測定法と考えられた。

方 法

1. 対象

ハウスダスト (HD) に対する IgE 抗体陽性のアレルギー性気管支喘息患者 (特異的減感作未施行例) 32名と健常人14名を対象とした。HD 陽性気管支喘息の診断は米国胸部疾患学会の気管支喘息診断基準⁹⁾を満たし、HD1に対する RAST が0.7PRU/ml 以上とした。健常人はアレルギー性疾患の症状・既往がなく、HD を含む吸入アレルゲン30種に対する皮膚ブリックテスト陰性、かつ血清総 IgE 値100IU/ml 以下の者とした。

2. 液相免疫測定法による特異的 IgE 抗体の測定

液相免疫測定法による抗 HD IgE 抗体と抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) IgE 抗体の測定は、AlaSTAT キット (Diagnostic Products Corp., 米国) を用いて行った。本法では可溶性担体に結合したアレルゲンとそれに対応する特異的抗体との反応が液相で行

Received: May 1, 1990

Accepted: June 15, 1990

Abbreviations: HD house dust; RAST
radioallergosorbent test

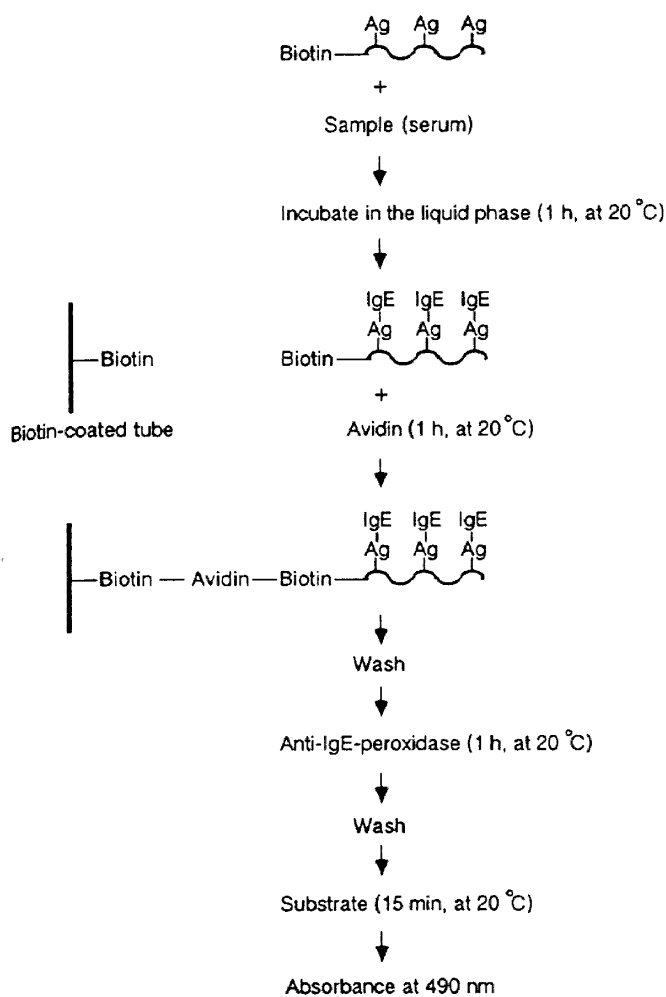


Fig. 1. Measurement of allergen-specific IgE antibody by a liquid-phase enzyme immunoassay AlaSTAT.

Ag, an allergen coupled to soluble polymer matrix; IgE, IgE antibody for the corresponding allergen.

われる (Fig. 1)⁸⁾. 反応後アレルゲン-抗体複合物をアビジン-ビオチン結合により試験管壁に補獲する。その後ペルオキシターゼ結合抗 IgE モノクローナル抗体を反応させ、酵素免疫法により IgE 抗体量を定量する。

まず被験血清 50 μ l と HD (Greer 社) または ダニ (*D. farinae*, Greer 社) 結合ビオチン化可溶性担体 100 μ l をビオチン被膜試験管内で 20 °C, 1 時間反応させた (Fig. 1). 次にアビジン 50 μ l を加え, 20 °C, 1 時間反応させた。洗浄用緩衝食塩水で 2 回洗浄後, ペルオキシターゼ結合マウス抗ヒト IgE モノクローナル抗体 200 μ l を加え, 20 °C, 1 時間反応させた。その後, 基質として 0-フェニレンジアミン 500 μ l を加え 15 分間反応させた後, 1N 硫酸 500 μ l を加えて反応を停止させた。発色は

吸光度 490nm (Sopheia 1000, Diagnostic Products Corp.) にて測定した。特異的 IgE 抗体量は添付の標準血清 (抗チモシー IgE 抗体 1.5, 3, 15 と 30 IU/ml) による標準曲線から算出した。なお各測定は duplicate で行った。

3. 総 IgE 蛋白の測定

血清総 IgE 蛋白の定量は, マウス抗ヒト IgE モノクローナル抗体を結合した可溶性担体を用いた AlaSTAT⁸⁾により測定した。

4. 特異的 IgE 抗体量の検討

液相免疫測定法 AlaSTAT により特異的 IgE 抗体の絶対量が測定できるか否かを調べるため, アレルゲンによる吸収実験を行い特異的 IgE 抗体量を算出した。すなわち, HD 陽性気管支喘息患者 (4 名) の血清 (抗ダニ IgE 抗体 18.87-38.94 IU/ml 含有) 500 μ l をヒト血清アルブミンまたは *D. farinae* 結合 Sepharose 4 B 500 μ l と 4 °C, 一晚反応させ, その上清中の総 IgE 蛋白量および抗ダニ IgE 抗体量を測定した。ヒト血清アルブミンまたは *D. farinae* 結合 Sepharose 4B は CNBr-活性化 Sepharose 4B (Pharmacia) 2ml にヒト血清アルブミン (Sigma) または *D. farinae* 抗原 (鳥居薬品) 2mg を結合させて作製した。

5. 非特異的 IgE 蛋白と IgG 遮断抗体の影響

非特異的 IgE 蛋白が AlaSTAT による特異的 IgE 抗体測定に影響するか否かを調べるため, IgE 骨髄腫患者から精製した IgE 蛋白を用いた添加実験を行った。すなわち, 精製 IgE 蛋白 (50-10000 IU/ml)¹⁰⁾ 50 μ l を用いて AlaSTAT を行い, 抗 HD および抗ダニ IgE 抗体を測定した。同様に, 精製 IgE 蛋白 (50-10000 IU/ml) 50 μ l を用いて RAST を行い抗 HD および抗ダニ IgE 抗体を測定し, 特異的 IgE 抗体測定に対する影響を検討した。

次に, IgG 遮断抗体が AlaSTAT による特異的 IgE 抗体測定に影響するか否かを, RAST interference 法¹¹⁾¹²⁾に準じて, HD 減感作療法中の気管支喘息患者加熱処理血清を用いて検討した。すなわち遮断抗体陽性血清として HD (鳥居薬品) による減感作療法施行中の喘息患者 5 名のプール血清を 56 °C, 4 時間加熱処理したものを用いた¹¹⁾⁻¹³⁾。またそのコントロール血清として健康人血清を同様に加熱処理したものを用いた。まずこれら遮断抗体陽性血清またはコントロール血清 25 μ l を HD 結合可溶性担体 100 μ l と 20 °C, 1 時間反応させた。次に減感作療法未施行の HD 陽性喘息患者血清 (4 検体) (抗 HD IgE 抗体 4.21-7.46 IU/ml 含有) 25

Table 1 Measurement of anti-*D. farinae* IgE antibody by a liquid-phase allergen-specific IgE enzyme immunoassay AlaSTAT compared to that calculated from total IgE protein

Sample #	Anti- <i>D. farinae</i> IgE antibody (IU/ml)		A/B (%)
	Allergen-specific IgE immunoassay (A)*	Absorption experiment (B)**	
1	18.87	18.7	100.9%
2	21.34	19.1	117.3%
3	34.96	30.4	115.5%
4	38.94	32.7	119.1%
Total			113.1±7.2%

*Values obtained by a liquid-phase allergen-specific IgE enzyme immunoassay Ala-STAT.

**Values assessed by the difference in total IgE proteins before and after the absorption with *D. farinae*-coupled Sepharose 4B immunosorbent.

μlを加え、20℃、1時間反応させた。それ以降の操作は上述のAlaSTATと全く同じに行った。同様にRASTにおいても、まず遮断抗体陽性血清またはコントロール血清25μlをHD結合 paper discと20℃、1時間反応させ、その後上述の抗 HDIgE 抗体含有血清25μlを加え20℃、3時間反応させた。それ以降の操作は後述する RAST と全く同じ方法で行った。

6. RAST

Phadebas RAST キット (Pharmacia) を用いて測定した。すなわち、被験血清50μlをHD1またはダニ(*D. farinae*)結合 paper discと20℃、3時間反応させた。次に paper disc を洗浄し、¹²⁵I-抗ヒト IgE 抗体50μlを加え、4℃で一晩反応させた。洗浄後、paper disc の放射活性をγカウンターにて測定した。RAST による IgE 抗体価は、添付の標準血清により PRU (Phadebas RAST Unit) として算出した。

7. データ解析

データは平均±SD で表した。2群間の差の検定はスチューデント t 検定を用いた。2変数の相関は最小2乗法による一次回帰式により相関係数を求めた。

結 果

1. 液相免疫測定法によるアレルギー特異的 IgE 抗体量の測定

液相免疫測定法によるアレルギー特異的 IgE 抗体測定法 AlaSTAT が、アレルギー特異的 IgE 抗体の絶対量を正確に測定するかどうかを調べるため、Ala-

STAT により測定された抗ダニ(*D. farinae*) IgE 抗体量をダニ抗原 immunosorbent による吸収前後の総 IgE 蛋白量の差と比較検討した。抗ダニ IgE 抗体(18.87-38.94IU/ml)を含むHD陽性気管支喘息患者血清(4検体)をダニ抗原結合 Sepharose 4B immunosorbent と4℃、一晩インキュベートすると、抗ダニ IgE 抗体は完全に吸収され、AlaSTAT では検出されなかった(0.10IU/ml以下)。また血清総 IgE 蛋白は、ダニ抗原 immunosorbent による吸収後18.7-32.7 IU/ml 低下した(Table 1)そして AlaSTAT により測定される抗ダニ IgE 抗体量は、吸収実験から算出された同抗体量とよく一致した(113.1±7.2%, 平均±SD, n=4)(Table 1)。なおヒト血清アルブミン immunosorbent による吸収では抗ダニ IgE 抗体量および血清総 IgE 蛋白量の有意の低下は認めなかった。

次に、HD陽性気管支喘息患者血清中の抗HDおよび抗ダニ IgE 抗体量を AlaSTAT により測定した。これら血清抗 HDIgE 抗体と抗ダニ IgE 抗体は、各々 8.72±10.64IU/ml(n=32)と14.28±11.11IU/ml(n=32)であった。またそれら特異的 IgE 抗体は血清総 IgE 蛋白の各々3.4±2.5%(n=32)と6.2±4.9%(n=32)と高い比率を占めていた。

2. 非特異的 IgE 蛋白と IgG 遮断抗体の影響

液相免疫測定法 AlaSTAT による特異的 IgE 抗体の測定が非特異的 IgE 蛋白の存在により影響されるかどうかを検討した。精製 IgE 蛋白(50-10000IU/ml)の添加は AlaSTAT による抗HDおよび抗ダニ IgE 抗体測定に有意の効果を及ぼさなかった(各4測定)(Fig. 2)。

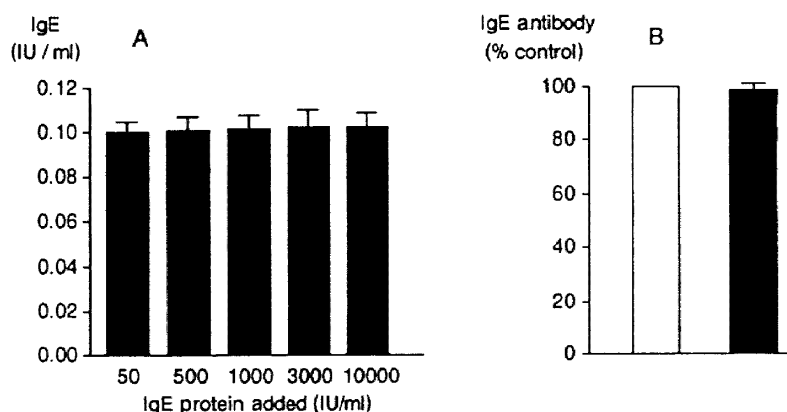


Fig. 2. Effects of nonspecific IgE protein (A) and heat-inactivated blocking serum (B) on the measurement of IgE antibody by AlaSTAT.

A; the values of anti-HD and anti-mite IgE antibodies ($n=4$, respectively) were determined by AlaSTAT after the addition of nonspecific IgE protein (50 to 10000 IU/ml) and were expressed as the mean values of the 8 measurements. B; the values of anti-HD IgE antibody (4.21 to 7.46 IU/ml) were determined in the presence of pooled heat-inactivated (56°C , 4h) serum from allergic asthmatics on HD immunotherapy (■) or from normal subjects (control serum; □) ($n=4$).

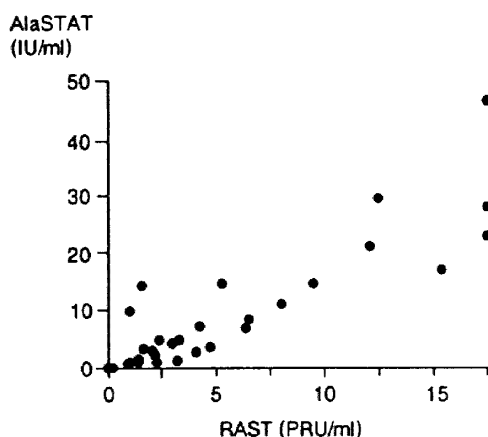


Fig. 3. Correlation between the values of anti-HD IgE antibodies by RAST and those by AlaSTAT.

3. RAST との相関

HD 陽性気管支喘息患者 (32名) と健康人 (14名) の血清抗 HD および抗ダニ IgE 抗体量を AlaSTAT と RAST により測定しその相関を調べた。両者間の抗 HD IgE 抗体量 ($r=0.90$, $p<0.001$) (Fig. 3) と抗ダニ IgE 抗体量 ($r=0.86$, $p<0.001$) は強い正の相関を認めた。また AlaSTAT による抗 HD および抗ダニ IgE 抗体陽性 (0.35 IU/ml 以上) 率を RAST と比較すると、抗 HD および抗ダニ IgE 抗体とも感度 100%, 特異性 100% であった。

考 案

次に、IgG 遮断抗体が AlaSTAT による特異的 IgE 抗体の測定に影響を与えるか否かを調べるため、HD 減感作療法中の喘息患者の加熱処理 (56°C , 4 時間) 血清¹¹⁾⁻¹³⁾ の AlaSTAT による抗 HD IgE 抗体測定値に対する効果を検討した。その結果、遮断抗体陽性加熱処理血清は AlaSTAT による抗 HD IgE 抗体 (4.21-7.46 IU/ml) の測定に有意の効果を及ぼさなかった (Fig. 2)。しかし、遮断抗体陽性加熱処理血清は RAST による抗 HD IgE 抗体量を 33% 低下させた ($p<0.005$, $n=4$)。後者の結果は以前の報告¹¹⁾⁻¹³⁾ と一致する。

アレルギー特異的 IgE 抗体の *in vitro* の測定には RAST が広く用いられ、臨床的に有用であることが示されている²⁾。しかし、RAST は固相免疫測定法であるため、個々のアレルギーに対する特異的 IgE 抗体の絶対量をルチンに測定するのは困難である⁶⁾。また非特異的 IgE 蛋白や遮断抗体の影響をうけやすいこと⁷⁾も欠点である。今回の研究から、液相免疫測定法による特異的 IgE 抗体測定法 AlaSTAT は、非特異的 IgE 蛋白および遮断抗体の影響なしに、特異的 IgE 抗体の絶対量を正確に測定しようと考えられた。すなわち、AlaSTAT による特異的 IgE 抗体量は、吸収実験による IgE 蛋白量とよく一致した (Table 1)。また、非特

異的IgE蛋白(10000IU/mlまで)およびHD減感作療法中の喘息患者から得られた遮断抗体陽性血清はAlaSTATによる特異的IgE抗体の測定に影響を及ぼさなかった(Fig. 2). さらに, AlaSTATによる特異的IgE抗体量は, RASTによるそれと強い正の相関を有した(Fig. 3).

液相免疫測定法による特異的IgE抗体の測定は, 多数のアレルゲンに対する特異的IgE抗体の絶対量をルチンに測定するのに適していると考えられた. すなわち, 液相免疫測定法AlaSTATは上述のごとく吸収実験で確認したIgE蛋白量とよく一致する. しかも, アレルゲンが溶液状態にあるため, 個々の測定系のアレルゲン量を標準曲線が完全に一致するように調節することができ, それにより個々のアレルゲンに対する特異的IgE抗体の絶対量を測定することが可能である. 一方, RAST変法(RAST elutionとRAST absorption)³⁾⁻⁵⁾を用いて, ブタクサなど一部アレルゲンに対する特異的IgE抗体の絶対量の測定が試みられてきたが, 非常に煩雑で時間がかかるため, ルチンの測定法としては用いられていない. またRASTは固相免疫測定法であるため, 使用されている個々のアレルゲン量を, その各々の標準曲線が一致するように調整することはかなり困難であり⁶⁾, したがって特異的IgE抗体の絶対量を定量するには適していない. 特異的IgE抗体量を絶対量で測定することは, 種々の測定法による結果を比較検討する上でも必須であり, 今後は特異的IgE抗体量を絶対量で表わす必要性が示されている¹⁴⁾. したがって, 液相免疫測定法AlaSTATは理論的にも, 今回の基礎的検討でも秀れた特異的IgE抗体の測定法と考えられる.

アレルギー性気管支喘息患者の血清中特異的IgE抗体は, 血清総IgE蛋白の中で高い比率を占めていた. すなわち, HD陽性気管支喘息患者血清中の抗HDおよび抗ダニIgE抗体は血清総IgE蛋白の各々3.4%と6.2%を占めていた. この結果は, RAST elution法による枯草熱患者血清中抗ブタクサIgE抗体が血清総IgE蛋白の6%であるという報告と一致する³⁾. またPlatts-Millsらは液相免疫測定法の1つであるantigen-binding assayにより花粉アレルギー患者血清中の抗マグサ(rye grass)IgE抗体がやはり血清総IgE値の8%を占めていたと報告している¹⁵⁾. 一方健康人では血清抗HDおよび抗ダニIgE抗体量は血清総IgE蛋白の約0.5%またはそれ以下と考えられる(予備実験, 未発表データ). 今後個々のアレルゲンに

対する特異的IgE抗体量を定量することにより, アレルギー性疾患における特異的IgE抗体と総IgE蛋白との関係がより明確にされ, 病因解明の糸口となることが期待される¹⁶⁾. なお主要アレルゲンがダニであるとされるHDに対するIgE抗体量が抗ダニIgE抗体量よりも低値を示すことから, 可溶性担体に結合しているHD量を増加させた際に抗HD IgE抗体量が抗ダニIgE抗体量よりも多くなるかは興味あるところである.

最後にAlaSTATにより測定される特異的(抗HDと抗ダニ)IgE抗体量がin vitro測定法として最も多く用いられているRASTのそれと相関するか否かを検討した. その結果, 両者間で強い正の相関が認められ, 臨床的に有用と考えられた. またRASTと比較した感度および特異性も非常に良好であった.

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) Yunginger, J.W.: Clinical significance of IgE. In "Allergy: Principles and Practice" (ed by E. Middleton Jr., C.E. Reed, E.F. Ellis, N.F. Adkinson Jr. and J.W. Yunginger), St. Louis, Mosby, pp. 849-860, 1988.
- 3) Schellenberg, R.R. and Adkinson, N.F.: Measurement of absolute amounts of antigen-specific human IgE by a radioallergosorbent test (RAST) elution technique. *J. Immunol.* 115, 1577-1582, 1975.
- 4) Gleich, G.J. and Jacob, G.L.: Immunoglobulin E antibodies to pollen allergens account for high percentage of total Immunoglobulin E protein. *Science* 190, 1106-1110, 1975.
- 5) Gleich, G.J., Jacob, G.L., Yunginger, J.W. and Henderson, L.L.: Measurement of the absolute levels of IgE antibodies in patients with ragweed hay fever. Effect of immunotherapy on seasonal changes and relationship to IgG antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 60, 188-198, 1977.
- 6) Homburger, H.A. and Katzmann, J.A.: Methods in laboratory immunology. Principles and interpretation of laboratory tests for allergy. In "Allergy: Principles and Practice" (E. Middleton Jr. C.E. Reed, E.F. Ellis, N.F. Adkinson Jr. and J.W. Yunginger), St. Louis,

- Mosby, pp.402-418, 1988.
- 7) Adkinson, N.F.: The radioallergosorbent test in 1981-limitations and refinements. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 87-89, 1981.
 - 8) El Shami, A.S. and Alaba, O.: Liquid-phase in vitro allergen-specific IgE assay with in situ immobilization. *Adv. Biosciences* 74, 191-201, 1989.
 - 9) American Thoracic Society: Definition and classification of chronic bronchitis, asthma, and pulmonary emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.* 85, 762-769, 1962.
 - 10) Nawata, Y., Koike, T., Yanagisawa, T., Iwamoto, I., Itaya, T., Yoshida, S. and Tomioka, H.: Anti-IgE autoantibody in patients with bronchial asthma. *Clin. Exp. Immunol.* 58, 348-356, 1984.
 - 11) Zimmermann, E.M., Yunginger, J.W. and Gleich, G.J.: Interference in ragweed pollen and honeybee venom radioallergosorbent tests. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 386-393, 1980.
 - 12) Gleich, G.J., Zimmermann, E.M., Gleich, M.C. and Yunginger, J.W.: Measurement of IgG blocking antibodies by interference in the radioallergosorbent test. *J. Immunol.* 126, 575-579, 1981.
 - 13) 柳沢孝夫, 縄田泰史, 岩本逸夫, 小池隆夫, 板谷喬起, 富岡秋夫, 熊谷 朗: 気管支喘息患者血清中の抗 IgE 抗体の解析. *アレルギー* 32, 87-94, 1983.
 - 14) Bernstein, I.L.: Proceedings of the task force on guidelines for standardizing old and new technologies used for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 487-526, 1988.
 - 15) Platts-Mills, T.A.E., Snajdr, M.J., Ishizaka, K. and Frankland, A.W.: Measurement of IgE antibody by an antigen-binding assay: Correlation with PK activity and IgG and IgA antibodies to allergens. *J. Immunol.* 120, 1201-1210, 1978.
 - 16) Burrows, B., Martinez, F.D., Halonen, M., Barbee, R.A. and Cline, M.G.: Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N. Engl. J. Med.* 320, 271-277, 1989.

A NOVEL LIQUID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY AlaSTAT FOR IgE ANTIBODY DETERMINATION

Itsuo Iwamoto, Hiroomi Yamazaki, Akira Kimura, Kenichi Ochiai, Noriaki Nakagawa,
Sanae Tanaka, Hisao Tomioka and Sho Yoshida

The Second Department of Internal Medicine, Chiba University School of Medicine

To determine whether a novel liquid-phase enzyme immunoassay AlaSTAT for allergen-specific IgE antibody determination can be used to measure the absolute amounts of serum IgE antibodies, we examined the amounts of anti-house dust (HD) and anti-mite IgE antibodies in sera of 32 HD-sensitized allergic asthmatics and 14 normal subjects by this immunoassay. The amounts of anti-mite IgE antibody in serum measured by this immunoassay were found to be consistent with those assessed by the difference in serum total IgE proteins before and after the absorption with mite allergen (the value determined by this immunoassay was 113% of the latter one, $n=4$). Neither nonspecific IgE protein (50 to 10000 IU/ml) nor the heat-inactivated blocking serum affected the measurement of allergen-specific IgE antibody by the liquid-phase immunoassay. There were strong correlations between the values of anti-HD and anti-mite IgE antibodies by RAST and those by AlaSTAT ($r=0.90$, $p<0.001$ and $r=0.86$, $p<0.001$, $n=46$, respectively). Our results indicate that the commercially available liquid-phase allergen-specific IgE enzyme immunoassay can be used to measure the absolute amounts of serum IgE antibodies without interference of nonspecific IgE protein or IgG blocking antibody.