

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による喘息患者血清中の 抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) IgG, IgA, IgM 抗体の検出

東京大学医学部内科物理療法学教室

伊藤幸治 木谷誠一 坂本芳雄 宮本昭正

Key words: anti-mite IgA antibody — anti-mite IgG antibody —
anti-mite IgM antibody — bronchial asthma — ELISA

(受付: 12月24日, 1983)

緒言

石坂ら¹⁾の IgE の発見以来, アトピー気管支喘息, アレルギー性鼻炎において IgE 抗体が発症に主要な役割を果たしていることが確立されている。

したがって, 現在では IgE 抗体の測定はアレルギーの臨床上広くおこなわれている。他の免疫グロブリンの中では, IgG 抗体が減感作療法との関連から多くの研究室で測定されている。すなわち, 減感作療法の結果 IgG blocking antibody が上昇し, その抗体価は例外も少なくないが臨床症状の改善とよく相関するとされているからである²⁾。気管支喘息の患者でダニに対する血清 IgA 抗体をもつ患者も散見されるが, その意義はわかっていない³⁾。

一方, 気道分泌液中には IgG よりも IgA の方が濃度が高いとされているので, 気道分泌液中では IgG 抗体のみならず, IgA 抗体の測定も意義があるかもしれない。

従来, IgG, IgA, IgM 抗体は二重抗体法で測定されてきたが, 煩雑であるので, 簡便で感度の高い方法が望まれる。特異的 IgE 抗体の測定は簡便で感度の高い IgE RAST が広く用いられている。

最近, 坂本ら⁴⁾はポリスチレン管を使用した IgG RAST で抗ダニ IgG 抗体を測定し得ることを報告した。また, 阿南ら⁵⁾は IgG, および IgG サブクラスの抗ダニ抗体を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定し得ることを報告した。我々は抗ダニ IgG 抗体のみならず, 抗ダニ IgA, IgM 抗体をも, IgE RAST と同じ原理をもち, アイトープを使わないと

いう点で簡便な ELISA で測定することを試みた。今回は初報として血清抗体測定の結果を報告する。

研究材料と方法

1. 患者血清

当科喘息外来に通院中の患者に種々のアレルギーを含む30種のアレルゲンでブリックテストをおこない, ダニに陽性, 陰性患者の血液を腕の静脈より採取し, 2-3時間室温に放置後血清を分離し, 使用まで-20℃に保存した。

2. 正常人血清

アレルギー症状のない成人健康人より上記と同様に血清を得て保存した。

3. 特異的 IgE 抗体の測定

特異的 IgE 抗体の測定は Pharmacia 社 (スウェーデン) 製の Phadezym RAST キット (塩野義製薬販売) を用いて測定した。キットの使用方法是キットの説明書および四宮⁶⁾の報告に従った。

まず, Ceska ら⁷⁾の方法に従い直径6mmの濾紙ディスクを CNBr で活性化した。この濾紙ディスクに宮本ら⁸⁾の方法によりダニ (*Dermatophagoides farinae*) の粗抗原 (鳥居薬品) を結合させた。被検血清の50μl をシオノギ製薬製のポリスチレン管に入れ, 次に上記ダニ抗原結合濾紙ディスクを1枚ずつ入れた。室温で3時間放置したのち, 洗浄液 (1l の0.9%食塩水に Tween 20の20ml を溶解したもの) の2.5ml で3回洗浄し, 次に酵素 (β-galactosidase) で標識した抗 IgE 抗体を50μl ずつ入れ, 室温で16-20時間反応させた。再び洗浄液で3回洗浄した後, 展開液 (酵素遊離剤の glutathion と基質の o-nitrophenyl-β-galactoside の

Abbreviations: BSA bovine serum albumin;
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay;
RAST radioallergosorbent assay

混合液) 200 μ l を加え, 37 $^{\circ}$ C, 120分間静置した。それに反応停止液1000 μ l を加え, ただちにブランクを対照として各試験管の発色度を420nmの吸光度で測定した。ブランクには基質液200 μ l と反応停止液のみを上記と同様に incubate したものをを用いた。

標準血清として当科で-20 $^{\circ}$ Cに保存してあるダニ IgE 抗体価の高い血清を用いた。その血清の IgE 抗体価を1000%とし正常人血清の示した抗体価の平均の2倍以上, すなわち8%以上を陽性とした。

4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による IgG, IgA, IgM 抗体の測定

1) ペルオキシダーゼ標識抗血清

ヘキスト社より購入したベーリンガーベルケ社 (西ドイツ) 製のウサギ抗ヒト IgG-Fc, 抗 IgA および抗 IgM 抗血清よりそれぞれ硫酸の40%飽和法にて γ -globulin を集め, Nakane⁹⁾ の方法で原法どおりにペルオキシダーゼを標識した。

Lowry 法¹⁰⁾ にて蛋白量を測定し, その5mg にペルオキシダーゼ5mg を標識し, 25 $\times$ 100cm の Sephadex G-200 に apply した。フラクションコレクターにて10 ml ずつ集めて, OD280 にて検出された最初の蛋白ピークをブールして約10ml に濃縮した。

2) ELISA の手順

上記のように標識した抗体を用いて以下番号の順に操作をおこない, 抗体測定をおこなった (Fig. 1)。

(1) 96個の well をもつマイクロプレート (Dinatech Laboratories, Inc. Alexandria, Virginia U.S.A.) の well に0.3M NaHCO₃ 液に溶かした10 μ g/ml のダニ (*Dermatophagoides farinae*) の粗抗原 (鳥居薬品)100 μ l を入れ, 37 $^{\circ}$ C 2時間, 又は4 $^{\circ}$ C, 一晚静

置した。アスピレーターでダニ液を吸い取った後, pH 7.2 の phosphate buffered saline (PBS) にて3回洗浄し, PBS にとかした1%ウシ血清アルブミン (BSA) の100 μ l を入れ同様に静置した。この際, 対照用として BSA 液を未使用の well に入れた。その well の数はダニ抗原液の well の数と同じである。

(2) アスピレーターで吸い取った後, 0.1% Tween 20を含むPBSにて3回洗浄し, 患者血清をIgG抗体の場合1000倍, IgA, IgM抗体の場合100倍に希釈し, その75 μ l を well に入れ同様に静置した。患者血清の最適希釈度は種々の希釈液を作って予備実験をおこなって決定した。

(3) (2)と同様に Tween を加えた PBS にて3回洗浄し, それぞれペルオキシダーゼ標識抗 IgG-Fc, 抗 IgA, 又は IgM の希釈液を75 μ l 入れ, 同様に静置した。

(4) Tween を加えた PBS で10回洗浄した後, 使用直前に1/10000量の30% H₂O₂ を加えた0.04% ortho-phenylene diamine (O-PDA) 液を75 μ l 加え, 30分間室温に放置した。

(5) 6N-H₂SO₄ を50 μ l ずつ加えて反応を停止させた。各 well の吸光度 (OD₅₀₀) を Corona Electric 社 (東京) の自動光電比色計にて測定した。

(6) データ処理: (1)-(5)の操作に平行して, BSA のみで coat した well に (2)-(5)の操作を行い, その結果得られた OD₅₀₀ は非特異的反応によるものとみなし, この値をダニで coat した well で得られた OD₅₀₀ より差引いて最終データとした。有意差検定は student の t 検定を用いた。

操作はすべて duplicate でおこない, またマイクロプレート間の性質の違いから生ずる誤差を除くために, 同一種類の免疫グロブリン抗体の測定はそれぞれ1枚のプレートを用いた。

結 果

1. ペルオキシダーゼ標識抗体及び患者血清の最適希釈度の検討

ダニ抗原にて長期減感作をおこなっている患者血清2例, 健康人2例の血清を10倍希釈し, それより更に2倍連続した系列を作った。ペルオキシダーゼ標識抗 IgG, IgA, IgM を10倍, 100倍, 1000倍に希釈し, それぞれ患者血清の希釈系列に加えた。

Fig. 2はペルオキシダーゼ標識抗 IgG の10倍希釈を

Enzyme linked immunosorbent assay of IgG, IgA or IgM antibodies to mite

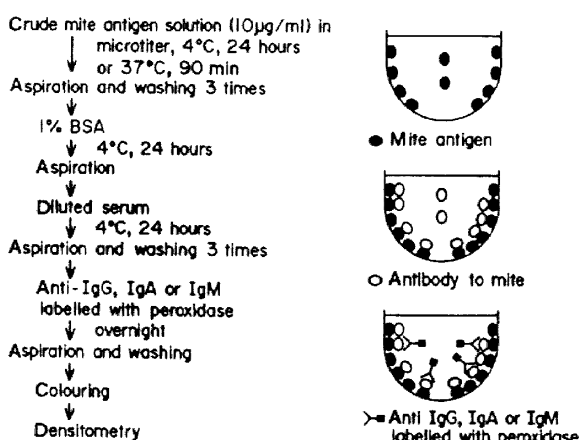


Fig. 1. Method for ELISA.

用いた時の結果である。健康人においても血清希釈度の低い場合にはかなりの吸光度 (DO) を示している。患者血清と健康人血清との間に明瞭な差のみられるのは100-1000倍の希釈である。

抗 IgG の100倍, 1000倍を用いると患者血清の示す OD は低く, 不適當と判断した。

Fig. 3は同じく10倍希釈抗 IgA を用いた場合である。患者血清と正常人との差が明瞭であるのは, それらの血清希釈が100倍前後であることが示された。したがって以後100倍希釈を用いることにした。抗 IgA の100倍, 1000倍希釈を用いて同様におこなったが, OD は低く不適當と思われた。

Fig. 4は10倍希釈の抗 IgM を用いた場合である。患者血清と正常人との間に差は認め得なかった。100倍,

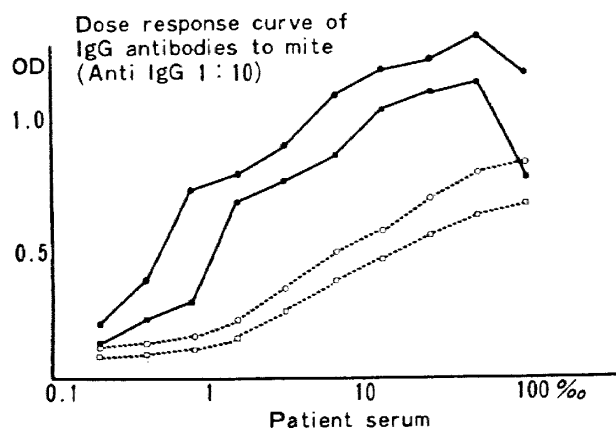


Fig. 2. Effect of serum dilution to IgG antibody level in ELISA.

● & ■ : sera from mite-allergic patients.
○ & □ : normal sera.

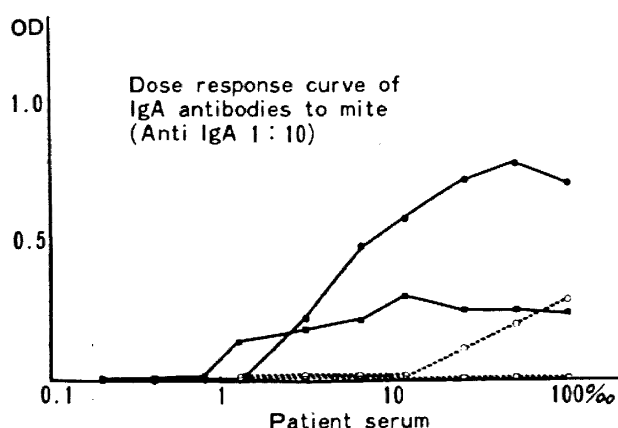


Fig. 3. Effect of serum dilution to IgA antibody level in ELISA.

● & ■ : sera from mite-allergic patients.
○ & □ : normal sera.

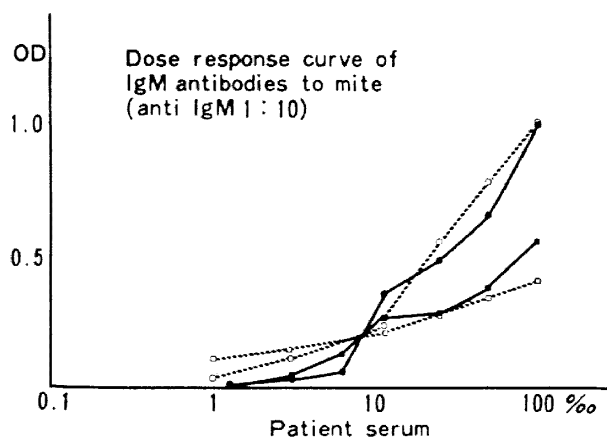


Fig. 4. Effect of serum dilution to IgM antibody level in ELISA.

● & ■ : sera from mite-allergic patients.
○ & □ : normal sera.

1000倍希釈の抗 IgM を用いて患者血清を調べたが, 正常人との間に差はなかった。

患者と正常人との間で明瞭な差があり, BSA で coat した well での OD₅₀₀ が患者, 正常人ともに0.05 以下になる条件は, IgG 抗体の場合患者血清が1000倍, IgA 抗体と IgM 抗体の場合は100倍希釈, 抗 IgG, IgA, IgM 抗体はともに10倍希釈である。以下この希釈を使用した。

2. coat するダニ抗原量の検討

マイクロタイターの well を100, 50, 10, 5, 1μg/ml の抗原100μl で coat し IgG 抗体の高い血清を1例選んで ELISA をおこなった結果, 100μg/ml よりも50

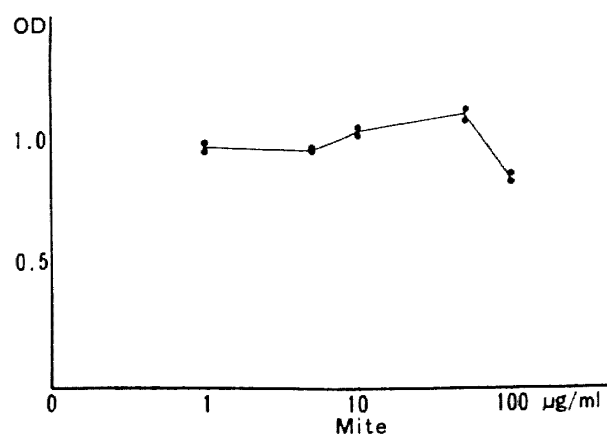


Fig. 5. Effect of mite-antigen concentration for coating wells of a microplate to ELISA of IgG antibody.

Out of 1, 5, 10 and 100μg/ml concentration of mite antigen, 50μg/ml was best for detecting IgG antibodies in 0.1ml of 1000 fold diluted patient serum.

$\mu\text{g/ml}$ の方が高い値を示し、 $10\mu\text{g/ml}$ では少し低いがほぼ同じ値を示し、 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ では低下した (Fig. 5).

$10\mu\text{g/ml}$ では $50\mu\text{g/ml}$ よりやや低いほぼ近い値が得られたので抗原節約のためすべてのアッセイで $10\mu\text{g/ml}$ を使用した。

3. ダニによる反応抑制試験

この反応系がダニに特異的か否かを調べるために、ダニ抗原を反応系に加えて抑制されるかどうかを調べた。

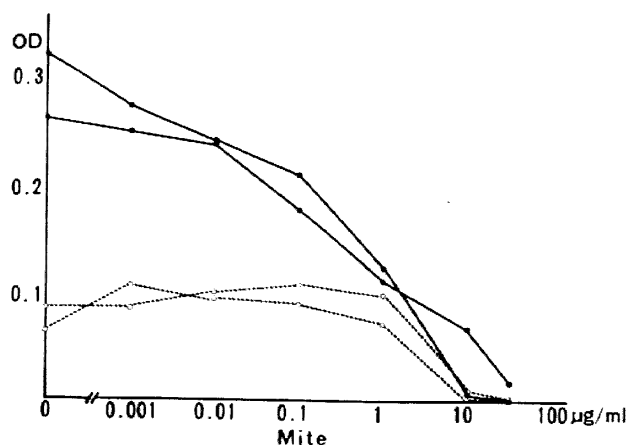


Fig. 6. Inhibition test of ELISA of IgG antibody to mite by mite antigen.

ELISA was done with $75\mu\text{l}$ of 1000 fold-diluted patient serum added priorly with $10\mu\text{l}$ of mite antigen of different concentrations.

● : sera from mite-allergic patient. ○ : normal sera.

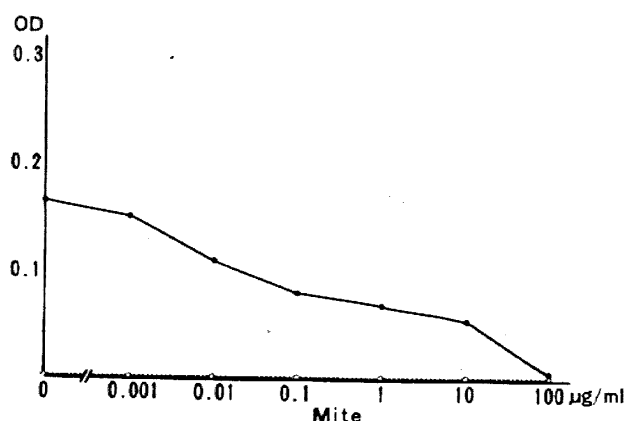


Fig. 7. Inhibition test ELISA to IgA antibody to mite by mite antigen.

ELISA was done with $70\mu\text{l}$ of 100 fold-diluted patient serum, added priorly with $10\mu\text{l}$ of mite antigen of different concentrations.

● : serum from a mite-allergic patient. ○ : normal serum.

まずダニ抗原の $100\mu\text{g}$ 、 $10\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 、 $0.1\mu\text{g}$ 、 $0.01\mu\text{g}$ または $0.001\mu\text{g}$ が $10\mu\text{l}$ のBSA液に入るように調整した。それぞれ、あらかじめダニ $10\mu\text{g/ml}$ でコートしておいたマイクロタイターのwellに入れ、ただちに1000倍希釈の患者血清 $75\mu\text{l}$ を入れ軽く振とうした。あとは既述の方法でELISAをおこなった。その結果をFig. 6, 7に示す。

IgG抗体、IgA抗体ともにダニ抗原によりdose-dependentに抑制された。IgG抗体の場合正常人でも高濃度抗原で抑制されている。このことは正常人が低濃度の抗ダニIgG抗体を有していることを示しているのかもしれない。

5. 抗ダニIgG、IgA、IgM抗体の測定

Phadezym IgE RASTで抗ダニIgE抗体を測定してIgE抗体陽性の喘息患者20例、同陰性の喘息患者20例、正常人20例を選び、抗ダニIgG、IgAおよびIgM抗体をELISAで測定した。まずIgG抗体を測定した結果をFig. 8に示す。正常人の示す値の+20以上を陽性

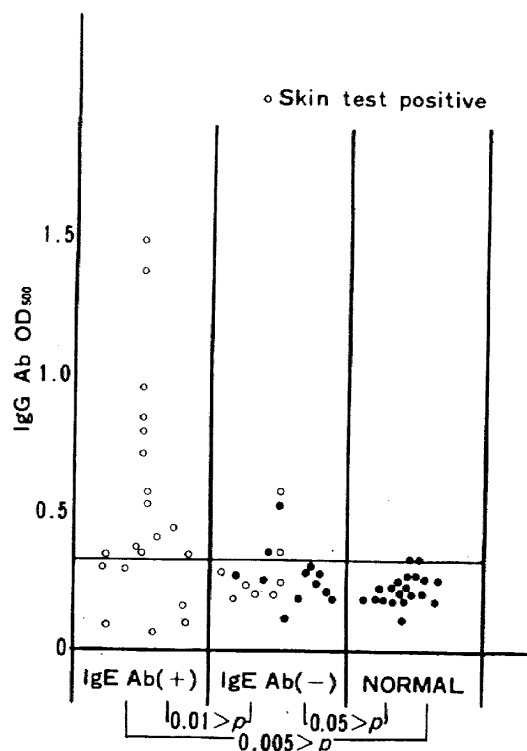


Fig. 8. IgG antibodies to mite.

IgE Ab(+) : asthma patients, IgE antibody positive in IgE RAST. IgE Ab(-) : asthma patients, IgE antibody negative in IgE RAST. NORMAL : normal individuals.

○ : skin test positive to mite antigen. ● : skin test negative to mite antigen.

There were significant differences among the three groups.

とすると、IgG 抗体陽性者は IgE 抗体陽性喘息の20例中14例 (14/20, 70%), 陰性喘息患者の4/20 (20%), 正常人の2/20 (10%) であり、三者間にそれぞれ有意差があった。Fig. 9の中央カラムの白丸は IgE RAST 陰性であっても、ブリック用のダニ抽出液(鳥居薬品)による皮膚テストで陽性を示した患者である。IgE 抗体陽性群はすべて皮膚反応(ブリック), Phadezym IgE RAST とともに陽性である (Fig. 8, 左カラム)。

IgA 抗体は IgE 抗体陽性喘息の10/19 (53%), 陰性喘息の4/20 (20%) に陽性で、正常者はすべて陰性であった (Fig. 9)。IgM 抗体は IgE 抗体陽性喘息の2/19 (10%) に陽性であったが、IgE 抗体陰性喘息および正常人との間に有意の差はなかった (Fig. 10)。

5. 各抗体間の相関関係

IgE 抗体陽性喘息患者の血清 IgG, IgA, IgM, IgE 抗体価の間の相関を調べた。OD をそのままプロットしたものでは何ら相関関係は得られなかった。そこで

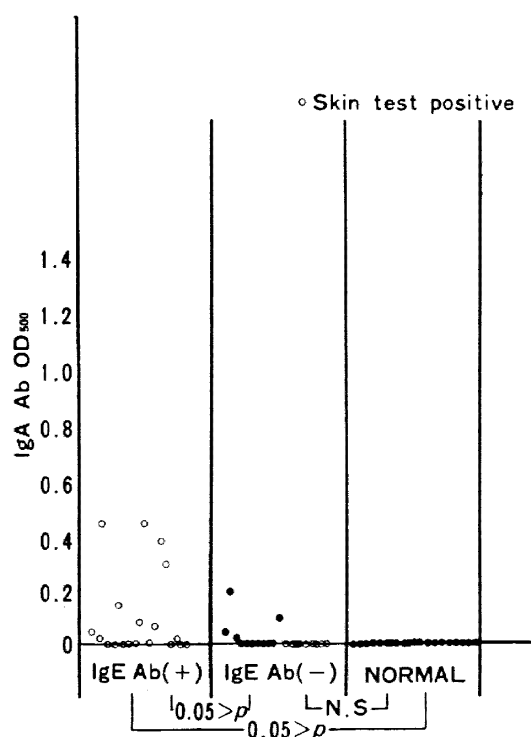


Fig. 9. IgA antibodies to mite.

IgE Ab(+): asthma patients, IgE antibody positive in IgE RAST. IgE Ab(-): asthma patients, IgE antibody negative in IgE RAST. NORMAL: normal individuals. N.S.: not significant.

○: skin test positive to mite antigen. ●: skin test negative to mite antigen.

Significantly higher IgA antibodies were detected in the group of IgE(+) than in the group of IgE(-) and the group of NORMAL.

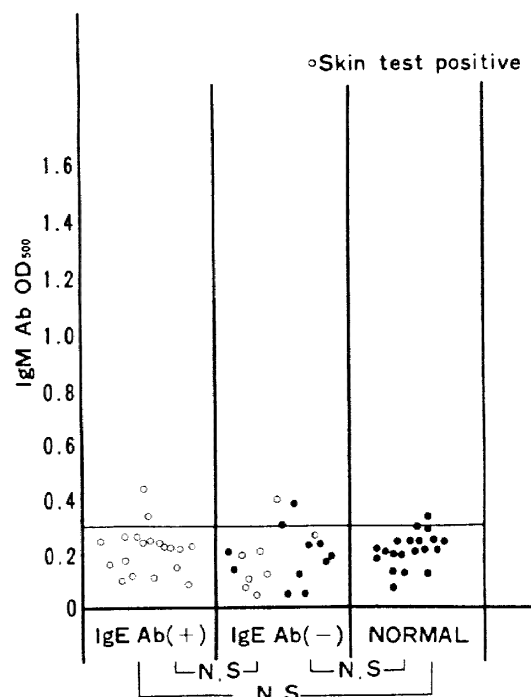


Fig. 10. IgM antibodies to mite.

IgE Ab(+): asthma patients, IgE antibody positive in IgE RAST. IgE Ab(-): asthma patients, IgE antibody negative in IgE RAST. NORMAL: normal individuals. N.S.: not significant.

○: skin test positive to mite antigen. ●: skin test negative to mite antigen.

There was no significant difference among the three groups.

ODを対数グラフにプロットしてみた。IgG, IgA抗体では減感作群を含めると相関関係は認められなかったが、未減感作群では相関関係がみられた ($r=0.824$, $p<0.01$, Fig. 11)。また、同じく未減感作群でIgE-IgM抗体間に Fig. 12のごとく相関関係がみられた ($r=0.653$, $p<0.05$)。以上の2組以外に相関関係のみられた組合せは存在しなかった。

6. 未減感作群および減感作群における各抗体間の比較

HDが10000倍以上、ダニ1000000倍以上より濃度の高いエキスを減感作をしている群を減感作群、全く減感作をおこなっていない群を未減感作群として、IgG, IgA, IgM, IgEの抗体価を比較したが、有意の差はなかった (Fig. 13)。

7. ELISAの再現性

duplicateでおこなった抗体測定の結果 (OD_{500}) をそれぞれA, Bで表し、誤差を $[A-B/A + B \text{の平均値}] \times 100\%$ で示すと、その平均値はIgG抗体7.4%(範

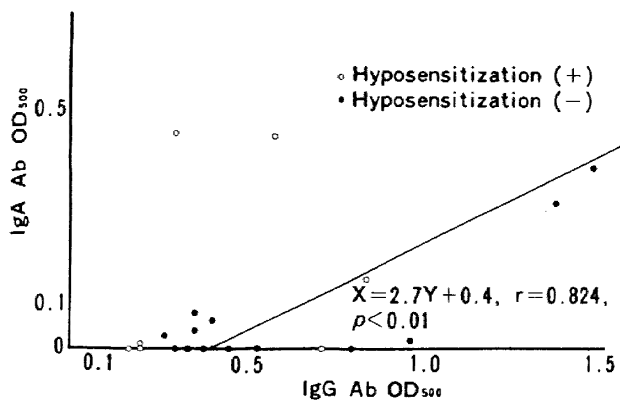


Fig. 11. Correlation between IgA- and IgG antibodies to mite in IgE-antibody positive patients.

○ : asthma patients treated with house dust or mite. ● : non-treated patients.

In the group of non-treated patients, a good correlation was found between IgA- and IgG antibodies. (OD₅₀₀ was demonstrated with logarithmic scale.)

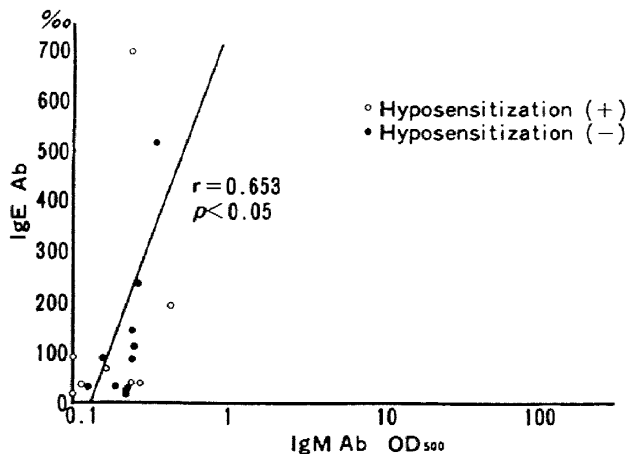


Fig. 12. Correlation between IgE- and IgM antibodies to mite.

○ : asthma patients treated with house dust or mite. ● : non-treated patients.

In the group of non-treated patients, a good correlation was found between IgE- and IgM antibodies. (OD₅₀₀ was demonstrated with logarithmic scale.)

問2.3-12.9%), IgA(範囲0.1-8.7%), IgM 抗体5.9% (範囲3.8-15%) であった。

考 察

血清中の IgG, IgA, IgM 抗体の測定は石坂ら¹¹⁾ がブタクサ花粉症において二重抗体法で測定して以来、

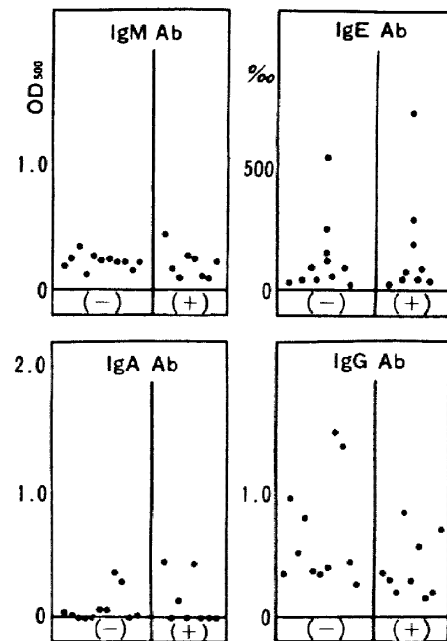


Fig. 13. Comparison of anti-mite IgG-, IgA-, IgM- and IgE antibodies between patients treated with house dust or mite antigen.

(+) : treated patients. (-) : non-treated patients.

Both groups were IgE-antibody positive in IgE RAST. There was no significant difference between the two groups in the four class of antibodies.

同法で測定されてきた。その後protein AをSepharoseに結合させてIgG抗体を測定する方法¹²⁾、更に¹²⁵I標識のprotein Aを用いたsolid phase radioimmunoassay¹³⁾が開発された。IgE抗体が操作簡便で感度の高いRAST、あるいは酵素抗体法によるRAST変法(Phadezym RASTなど)でおこなわれているが、これまでのIgG RASTやIgA RASTは非特異的反応が強くてよい結果が得られなかった。教室の坂本ら⁴⁾はポリスチレン管の内壁をダニでcoatし、これをダニ抗原結合 paper discの代りに用いてIgG RASTをおこない良好な結果を得た。またMahoneyら¹⁴⁾はpolyvinyl製のマイクロプレートのwellをダニ抗原でcoatして、IgA抗体のradioimmunoassayをおこなった。Sepulvedaら¹⁵⁾は*Aspergillus fumigatus*に対するIgGおよびIgE抗体をELISAで測定し、更にBamad¹⁶⁾はfarmer's lungの患者血清中のMicrospora faeniに対するIgG抗体をELISAで測定した。

これらを総合するとダニに対するIgG, IgA, IgM抗体をポリスチレン管又はポリビニール製のマイクロタイターを用いてradioimmunoassay、または酵素抗体

法による immunoassay は可能であると考えられた。我々はダニに対する IgG, IgA, IgM 抗体のすべてを ELISA で測定した。これはこれまで報告をみない試みである。アイソトープ標識抗体を使わなかった理由はアイソトープを使用する煩雑さを回避するためである。ELISA は二重抗体法と同様再現性が高い上、ELISA は二重抗体法に比しきわめて操作が簡便である。両者間の感度の違いや、データの相関関係は調べていない。教室の坂本⁴⁾はポリスチレン管を使用した solid phase radioimmunoassay と二重抗体法の間で、IgG 抗体のデータはよく相関し、感度は少なくとも同程度か、もしくは前者が高いと報告している。我々のおこなった ELISA では減感作、未減感作例を含む 20 例中 70% に陽性で、坂本らの solid phase radioimmunoassay (SPRIA) ではダニ減感作群 17/20 (68%), 室内塵減感作群 (10/16 (63%)), 未減感作群 9/24 (38%) に陽性で、少なくとも ELISA の感度は SPRIA と同程度であろうと思われる。ダニに対する IgG 抗体がダニに対する IgE 抗体陰性の喘息患者でも検出され、皮膚反応の陽性、陰性とも関係がなく、また正常人との間に有意差が認められる理由是不明である。

IgA 抗体については、我々が二重抗体法で以前測定した結果では、健康人の示すカウントの 1.5 倍以上を陽性とするダニ喘息 10 例中 6 例が陽性であり³⁾、宮地¹⁷⁾の成績では 9 例中 3 例が陽性であった。今回、我々の ELISA の成績では減感作、未減感作の 19 例中 10 例 (53%) に陽性であった。いずれも症例数が少ないので比較は困難だが、ELISA の感度は少なくとも二重抗体法と同程度であると思われる。

IgM 抗体は正常人と患者では差がなかったがブタクサ花粉症では IgM 抗体の検出されることが Yagi¹⁸⁾らによって報告されている。ダニによる喘息では全く検出されないか否かは更に症例を増やして検討する必要がある。今回ダニによる inhibition test で IgG, IgA 抗体ともに inhibit された点より、ダニによる ELISA はダニに特異的であるといえる。正常人で IgG 抗体が高濃度のダニで inhibit されることは正常人でも低力価の IgG 抗体を有していることを示しているのかもしれない。

減感作群と未減感作群との間で IgG, IgE 抗体に有意差がなかった。このことは坂本⁴⁾の成績と一致する。我々の成績では IgA 抗体も差がなかった。例数も少なく、また個々の例で経過を追って調べていないの

で確定的なことはいえないので更に検討したい。

血清中 IgG 抗体と IgA 抗体とが未減感作群で相関し、減感作群を加えると相関しない原因は不明であるが、おそらく抗原の侵入が吸入による場合と注射による場合では抗体の産生状況が違うのであろう。

以上の成績にもとづき喀痰中の抗体を測定し血清中の抗体との比較をおこないつつあり、次報で報告したい。

今回は血清のみの成績を報告したが、ELISA による IgG, IgA, IgM 抗体の測定はアイソトープを使わないため人体障害もなく、アイソトープ研究室を使用する煩雑さもなく、放射能減衰に伴う標識抗体の活性低下もなく、最終操作の OD 測定は瞬時で、放射能測定よりはるかに短時間で済む点など便利な点が多い。したがって、血清のみならず喀痰など種々の組織液にも応用できると思われ、アレルギーの臨床研究に資するところがあると思われる。

結 語

アレルギー患者の血清中抗ダニ IgG, IgA, IgM 抗体を簡便に測定するためにマイクロプレートを使用した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を実施し、以下の結論を得た。

① 血清 IgE 抗体陽性喘息患者の内、IgG 抗体陽性者は 70%, IgA 抗体陽性者は 53%, IgM 抗体陽性者は 10% のみであった。

② 血清 IgG 抗体と IgA 抗体との間には未減感作の喘息患者群で相関関係が認められたが、減感作群を加えると認められなかった。

③ マイクロプレートを用いた ELISA による IgG, IgA, IgM 抗体測定は、アイソトープを使用しないため、操作が簡便で臨床研究に有用と思われる。

本研究は財団法人公害対策協会財団の研究援助によった。

本研究を手伝っていただいた堀康子さん、伊藤智子さんに感謝する。

ELISA に関し御教示いただいた岩本幸子氏、血清を提供していただいた佐野靖之、奥平博一、森田 寛、工藤宏一郎、中川武正、早川哲夫、高石敏明、山内信和、灰田美知子の各氏に感謝する。

文 献

- 1) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M. M.: Physicochemical properties of reaginic antibody. IV. Presence of unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* 97, 75-85, 1966.
- 2) Lichtenstein, L.M., Norman, P.S. and Winkenwerden, W.L.: A single year of immunotherapy for ragweed hay fever. *Ann. Int. Med.* 75, 663-671, 1971.
- 3) 伊藤幸治, 佐野靖之, 宮地純樹, 森田 寛, 宮本昭正, 堀内淑彦: ^{125}I 標識抗原を用いた抗ダニ IgG, IgA 抗体の定量と喘息患者の抗体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.
- 4) 坂本芳雄, 中川武正, 伊藤幸治, 宮本昭正: 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. *アレルギー* 32, 940-946, 1983.
- 5) 阿南貞雄, 赤星吉徳, 吉村正子, 牛島信雄, 吉田彦太郎, 松山俊文, 神田源太: アトピー性皮膚炎における enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いた抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) 抗体の測定—とくに IgG, IgG subclass および IgE 抗体について. *アレルギー* 31, 244-251, 1982.
- 6) 四宮敬介: Phadezym RAST による血清中の特異 IgE 抗体の検定. *アレルギー* 31, 81-85, 1982.
- 7) Ceska, M., Erikson, R. and Varga, J.M.: Radioimmunosorbent assay of allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 49, 1-9, 1972.
- 8) 宮本昭正, 真野健次, 伊藤幸治, 富谷百合子, 堀内淑彦: paper disc を用いての radioallergosorbent test (RAST) に関する研究. *アレルギー* 9, 584-593, 1973.
- 9) Nakane, P.K. and Kawaoi, A.: Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084-1091, 1974.
- 10) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 11) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M. M.: Allergen-binding activity of γE , γG and γA antibodies in sera from atopic patients. In vitro measurement of reaginic antibody. *J. Immunol.* 98, 490-501, 1967.
- 12) Foucard, T. and Johansson, S.G.O.: Immunological studies in vitro and in vivo of children with pollinosis given immunotherapy with an aqueous and a glutaraldehyde-treated tyrosine"absorbed grass pollen extract. *Clin. Allergy* 6, 429-439, 1976.
- 13) Hamilton, R.G., Sobotka, A.K. and Adinson, N. F. Jr.: Solid phase radioimmunoassay for quantitation of antigen-specific IgG in human sera with ^{125}I -protein A from *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 122, 1073-1079, 1979.
- 14) Mahoney, G.N., Hartley, W.A. and Taylor, B.: A microtiter plate radioimmunoassay for the detection and semiquantitation of house dust mite, rye grass pollen and cows milk specific IgA antibodies. *J. Immunol. Methods* 29, 127-133, 1980.
- 15) Sepulveda, R., Longbottom, J.L. and Pepys, J.: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgE antibodies to protein and polysaccharide antigens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. Allergy* 9, 359-371, 1979.
- 16) Bamad, S.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG antibodies in farmer's lung disease. *Clin. Allergy* 10, 161-171, 1980.
- 17) 宮地純樹, 伊藤幸治, 森田 寛, 宮本昭正, 久富龍夫: 気道洗浄液および血清に関する免疫学的検討—とくに抗ダニ IgE, IgA 抗体活性について. *臨床免疫* 8, 441-447, 1976.
- 18) Yagi, Y., Maier, P., Pressman, D., Arbesman, C. E. and Reisman, R.E.: The presence of the ragweed binding antibody in the $\beta_2\text{A}$ -, $\beta_2\text{M}$ - and γ -globulins of the sensitive individuals. *J. Immunol.* 91, 83-89, 1963.

DETECTION OF SERUM IgG-, IgA- AND IgM ANTIBODIES TO MITE
(*DERMATOPHAGOIDES FARINAE*) THROUGH THE USE OF
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Koji Ito, Seiichi Kitani, Yoshio Sakamoto and Terumasa Miyamoto

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

For the simple estimation of IgG-, IgA- and IgM antibodies to mite, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out using microplates. Our findings are as follows.

1) IgG and IgA antibodies were positive in 70% and 53% respectively of asthmatic patients with positive IgE antibodies to mite. IgM antibodies were positive in only 10% of the same group of patients.

2) A significant correlation was found between the IgG antibody levels and the IgA antibody levels in asthmatic patients treated with house dust- or mite extracts. However, no correlation was found when the treated group was mixed with a group of untreated patients.

3) Measurement of IgG-, IgA- and IgM antibodies by ELISA using microplates seems to be simple and useful for clinical studies because such measurement does not require radioactive isotopes.
