

# Paper Disc Radioallergosorbent Test 法による 抗 *Dermatophagoides farinae* IgE 抗体価測定に 及ぼす IgG 抗体の抑制効果

金沢大学医学部小児科学教室

鮎井正春 平谷美智夫 伊藤 茂

押田喜博 上田智子

国立療養所医王病院小児科

武藤一彦

**Key words:** *Dermatophagoides farinae* — IgG antibody — IgE antibody —  
immunotherapy — RAST

(受付: 4月23日, 1985)

気管支喘息をはじめとするアトピー性疾患において重要な役割を演じているIgE抗体を測定するradioallergosorbent test (RAST) 法は, 1967年 Wide<sup>1)</sup>によって導入され, 現在固相担体に paper disc を用いる方法<sup>2)</sup>が一般臨床に広く用いられている。しかし, その測定原理から当然 IgE 以外の他の免疫グロブリンの影響を受けることが考えられ, またその他種々の抑制因子の存在が報告されている<sup>3)-13)</sup>。

Lynch<sup>3)</sup>はアルテルナリアにアレルギーの患者血清で, IgG 抗体が RAST 法による IgE 抗体価測定に抑制効果を与えていると報告している。Zimmerman<sup>4)</sup>は honeybee venom, ブタクサ花粉にアレルギーの患者において免疫療法後は IgE 抗体価はみかけ上低値をとり, それは免疫療法後増加した IgG 抗体による抑制効果であると報告している。また Zeiss<sup>5)</sup>はブタクサ花粉症患者において paper disc RAST 法と固相担体にポリスチレン管を用いる定量的ラジオイムノアッセイ法とを比較し, paper disc RAST においては IgE 抗体が高濃度になってくると, 測定値は平衡に達し, 他方免疫療法後増加した遮断抗体の存在のもとでは IgE 抗体価がみかけ上低値を示すことを報告して

いる。

現在までの RAST 法による IgE 抗体価測定における問題点の多くはブタクサ花粉, アルテルナリア, honeybee venom など免疫療法後に出現する IgG 遮断抗体による抑制効果として報告されているが<sup>3)-13)</sup>, 日常診療でよくみられ, また免疫療法施行前にすでに IgG 抗体を有していることが多い<sup>14)15)</sup>ダニアレルギー患者についてはほとんど検討されていない。ダニアレルギー患者の IgE 抗体価の季節的変動, 免疫療法による変動は, 現在 paper disc RAST 法で測定されているが, これらの報告<sup>16)-18)</sup>では IgG 抗体の影響にはほとんど考慮が払われていないように思われる。今回, 我々はダニ (*Dermatophagoides farinae*, *D. farinae*) について, 現在, 簡便で, 一般臨床に広く利用されている paper disc RAST 法による IgE 抗体価測定における IgG 抗体の抑制効果について検討し, さらに RAST 法の定量性についても若干の検討を加えた。

## 対象及び方法

### I. 対象

1982年11月から1983年3月に金沢大学医学部付属病院小児科外来を受診したダニアレルギー患者 (抗 *D. farinae* RAST スコア 2 以上の者) を屋内塵 (house dust, HD) による免疫療法施行群 (治療群, A群) 25

**Abbreviations:** *D. farinae* *Dermatophagoides farinae*; HD house dust; HSA human serum albumin; PBS phosphate buffered saline; PLA phospholipase-A; PRIST paper radioimmunosorbent test; RAST radioallergosorbent test

Table 1 Grouping of the tested populations

| Group                 | No. tested | Mean Age (years) | RAST values to <i>D. farinae</i> |
|-----------------------|------------|------------------|----------------------------------|
| A. Atopic (treated)*  | 25         | 9.4 (3-17)       | 29.4±3.8**                       |
| B. Atopic (untreated) | 79         | 8.3 (1-14)       | 19.8±9.0                         |
| C. Control            | 41         | 7.4 (0.5-14)     | 2.0±0.6                          |

\*House dust immunotherapy.

\*\*% of total activity added (Mean±1SD).

名, 未治療群 (B群) 79名に分け, 対照として対照群 (アトピー歴なく, 喘息症状のない抗 *D. farinae* IgE 抗体陰性者, C群) 41名を選んだ (Table 1). 各群の年齢構成は Table 1に示したようにほぼ同じである.

HD免疫療法は鳥居薬品の HD 治療用エキスで行い, 総投与量は2.0mg-1337.2mg (平均117.8mg), 投与期間は7ヵ月-7年9ヵ月 (平均4月11ヵ月) であった. 血清はただちに-20℃に凍結保存した.

## II. 血清 IgE 値の測定

Pharmacia 社製の paper radioimmunosorbent test (PRIST) キットを使用した. 単位は IU (international unit)/ml で表した.

## III. 血清 IgE 抗体価 (RAST 値) の測定

paper disc RAST 法 (Pharmacia 社製キット) により測定した. disc は Pharmacia 社のものを使用し, 単位は disc に吸着した放射活性の全放射活性に対する % で表した.

## IV. 血清 IgG 抗体価の測定

Pharmacia 社製の IgG RAST キットを使用し, 固相担体には paper disc のかわりにポリスチレン管 (シオノギ製, 内径10mm, 高さ60mm, 厚さ1mm) を用いて行った.

抗原のポリスチレン管への吸着法: リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, PBS), pH 7.4に溶解した *D. farinae* 粗抗原 (鳥居製) 100μl をポリスチレ

ン管に入れ, 18時間室温静置し, 緩衝液 (Tween 20加) にて3回洗浄して得た.

IgG 抗体価の測定: 抗原を吸着させたポリスチレン管に100μl の血清試料を添加, 24時間室温静置後, 3回洗浄したのち, 100μl (0.026μCi) のウサギ抗ヒト IgG-<sup>125</sup>I を添加する. 24時間室温静置後3回洗浄したのち, ポリスチレン管の放射活性で γ-カウンターにて測定した. 比活性はポリスチレン管に吸着した放射活性の全放射活性に対する % で表した.

なお予備実験として, ポリスチレン管に吸着させる抗原の至適濃度, IgG 抗体価の表現法, 抗原特異性の3点について検討を加えた.

## V. IgG-rich serum の精製

PBS にて平衡化した protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia 社製) カラム (K9/15, Pharmacia Fine Chemicals) に患者血清を添加し PBS にて洗浄, その後吸着した IgG を0.1M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3) にて溶出し, PBS に透析した試料を IgG-rich serum とした. IgE 抗体の不活化は56℃で4時間加熱<sup>4)</sup>して行った.

## VI. IgG-free serum の精製

0.1ml の血清を1.0ml の PBS にて平衡化した protein A-Sepharose CL-4B (濃度7.5%) と混合, 15分間振とうし, 遠心後の上清を IgG-free serum として用いた.

## VII. 統計学的検討

成績は student's t-test を用い推計学的に検討を加え,  $p < 0.05$  の時を有意差ありと判定した.

## 成 績

### I. 血清 IgG 抗体価測定における予備実験

1. ポリスチレン管に吸着させる抗原の至適濃度の決定

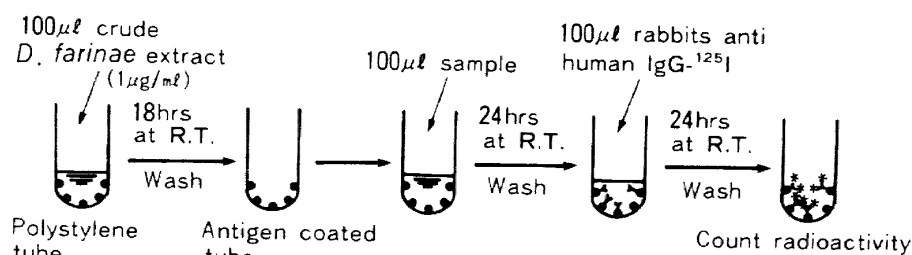


Fig. 1. Schema of the polystyrene tube radioimmunoassay for measuring anti-*D. farinae* IgG antibody levels.

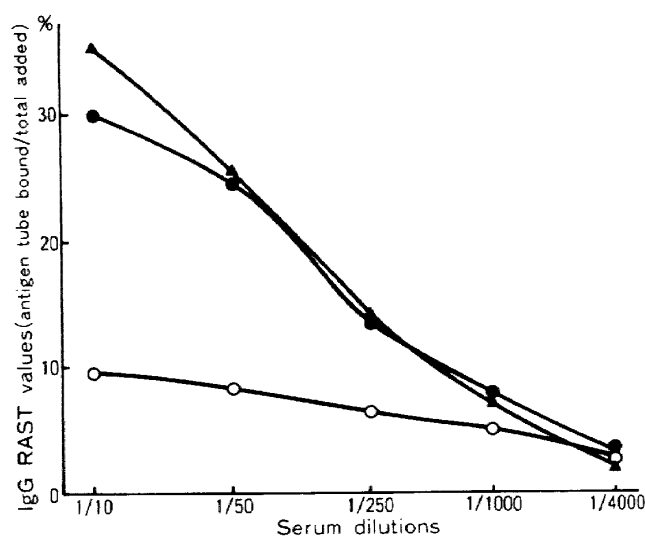


Fig. 2. Optimal concentration of the *D. farinae* extracts for tube coating. Serum of a mite allergic patient was serially diluted and added to polystyrene tubes coated with various concentrations of the *D. farinae* extracts. Concentrations of the *D. farinae* extracts of the each symbols were as follows: ○ 0.1 µg/ml; ● 1 µg/ml; ▲ 10 µg/ml.

*D. farinae* の抗原濃度 (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) を使用し, IgG 抗体価高値の患者血清の10, 50, 250, 1000, 4000倍希釈系列の IgG RAST 値を求めた (Fig. 2). 図に示されるように *D. farinae* 抗原濃度1 µg/ml, 10 µg/ml ではほぼ同様の結果が得られたので, 抗原濃度は1 µg/ml とした. なお血清の希釈は50倍まで緩衝液で行い, それ以上は0.1%ヒト血清アルブミンを含む緩衝液で行った.

## 2. 標準曲線による IgG 抗体価の表現法

IgG 抗体価高値をとるダニアレルギー患者数人より得られたプール血清を100 u/ml とし, その5, 10, 15, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 8000倍希釈液より, Fig. 3のごとく標準曲線を得た. 測定は直線部分で行われるように被検血清を希釈し, 原則として50倍希釈で測定したが, 1000 u/ml を越えるときは250倍希釈, 25 u/ml 以下の場合には10倍希釈で行った.

## 3. 抗原特異性の検討

本法が *D. farinae* に対し抗原特異性をもつことを確認するために RAST 抑制試験を次のように行った.

50倍希釈された抗体価高値の患者血清200 µl に0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml の濃度の *D. farinae* 抗原液及び対照として卵白アルブミン (ovalbumin) 溶液及び PBS を200 µl 加え, 37°C で3時間反応させたのち, 遠心後の上清の抗 *D. farinae* IgG

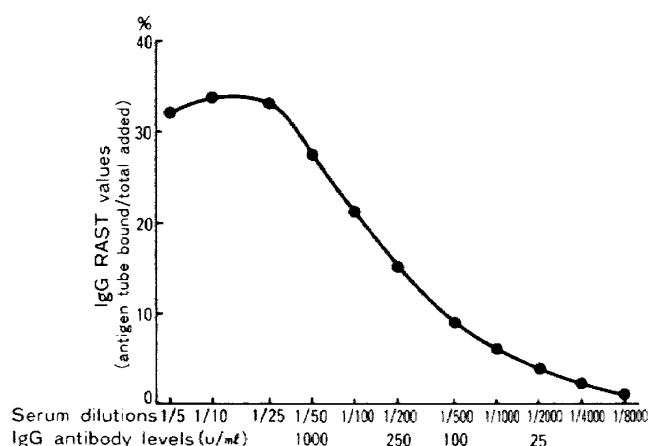


Fig. 3. Standard curve of the IgG antibody levels of the pooled sera from several patients with high IgG antibody levels. The binding value of IgG RAST at a 50-fold dilution of pooled sera was set as 1000 units/ml of the IgG antibody level. The values of unknown samples were obtained by the standard curve, but the dilution ratio was changed to 250 or 10-fold for higher (>1000 u/ml) or lower titer (<25 u/ml) sera, respectively.

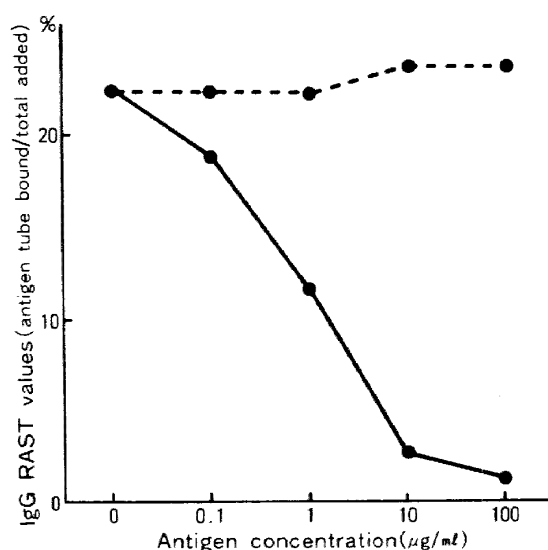


Fig. 4. Specificity of the polystyrene tube radioimmunoassay for measuring anti-*D. farinae* IgG levels using the RAST inhibition technique. The anti-*D. farinae* IgG levels of a mite allergic patient's serum were assayed after preincubation at 37°C for 3 hr with indicated concentrations of *D. farinae* (solid line) or ovalbumin (dashed line).

RAST 値を求めた. Fig. 4のごとく *D. farinae* 溶液は濃度依存的に IgG RAST 値を抑制するが, 卵白アルブミンでは抑制効果はみられず, 本法による IgG 抗体価測定は *D. farinae* 抗原特異的であるといえる. なお図

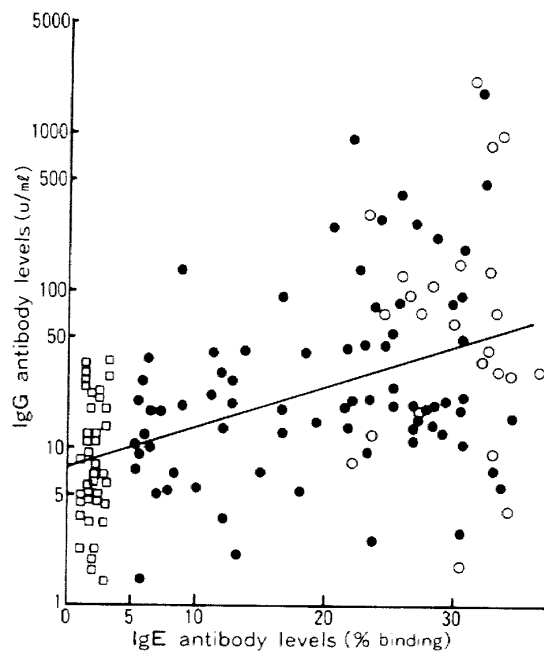


Fig. 5. Correlation between the titers of serum IgE and IgG antibody to *D. farinae*. ○ group A (treated patients); ● group B (untreated patients); □ group C (control group). Significant correlation ( $p < 0.01$ ) was observed ( $y = 7.31e^{0.060x}$  and  $r = 0.49$ ).

には示していないが、卵白アルブミンを吸着させたポリスチレン管にダニアレルギー患者の50倍希釈血清を添加しても放射活性はみられず(1.0%以下)、本法では非特異的結合はないことが確認された。

## II. IgE 抗体価と IgG 抗体価との相関

A群、B群、C群の計145人の血清 IgE 抗体価、IgG 抗体価を求め、両者の相関を求めた。 $y = 7.37e^{0.060x}$ ,  $r = 0.49$ ,  $p < 0.01$ と有意の正の相関がみられた (Fig. 5)。

また各群別にも両者の相関を求めたが、A群、C群には相関は認められず、B群においては、 $y = 7.26e^{0.058x}$ ,  $r = 0.48$ で  $p < 0.01$ と有意の正の相関がみられた。

## III. 各群の IgG 抗体価の比較

IgG 抗体価 (Mean  $\pm$  SEM u/ml) は A 群  $219.8 \pm 98.4$ , B 群  $86.9 \pm 27.7$ , C 群  $9.8 \pm 1.1$ で、A群、B群はC群に対しては、それぞれ  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ で有意に高値を示した。A群はB群に対し高い傾向があったが、その差は有意ではなかった (Fig. 6)。

## IV. IgG 抗体除去による IgE 抗体価 (RAST 値) の上昇

IgG 抗体除去による RAST 値の上昇の程度をみるために、13名の患者血清について検討した。この実験

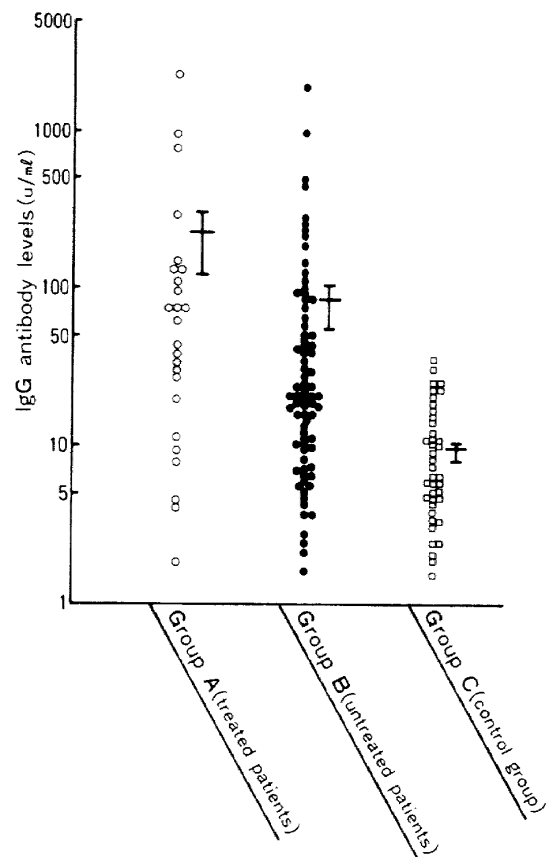


Fig. 6. Titers of anti-*D. farinae* IgG in the three groups. The vertical bars represent mean  $\pm$  SEM (u/ml). The significance of the differences between A and C ( $p < 0.01$ ) and between B and C ( $p < 0.05$ ) was evaluated by the Student's t-test.

のため、IgG-free serum を作製した同一血清をヒト血清アルブミンを結合させた CNBr 活性化 Sepharose 4 B (Pharmacia 社製) で IgG-free serum 作製の場合と同様の処理を行い、これを HSA 処理血清 (HSA-treated serum) とした。

## 1. protein A-Sepharose CL-4B 処理による IgG 抗体の除去効果

原血清 (untreated serum), IgG-free serum と HSA 処理血清の IgE 100IU/ml における IgG 抗体価を、IgG 抗体価高値の患者 7 名について求めた (Fig. 7)。IgG-free serum の IgG 抗体価の平均値 (1.67u/ml) は原血清 (124.5u/ml), HSA 処理血清 (172.3u/ml) に比べ、著明に低値となり ( $p < 0.01$ )、IgG 抗体はほとんど除去されていることが認められた。

## 2. IgG-free serum の RAST 値の上昇率

同一血清より得られた IgG-free serum と HSA 処理血清についての IgE 抗体価 (RAST 値) を比較した。Fig. 8-(A), (B) は IgG 抗体価高値患者、低値患者をそ

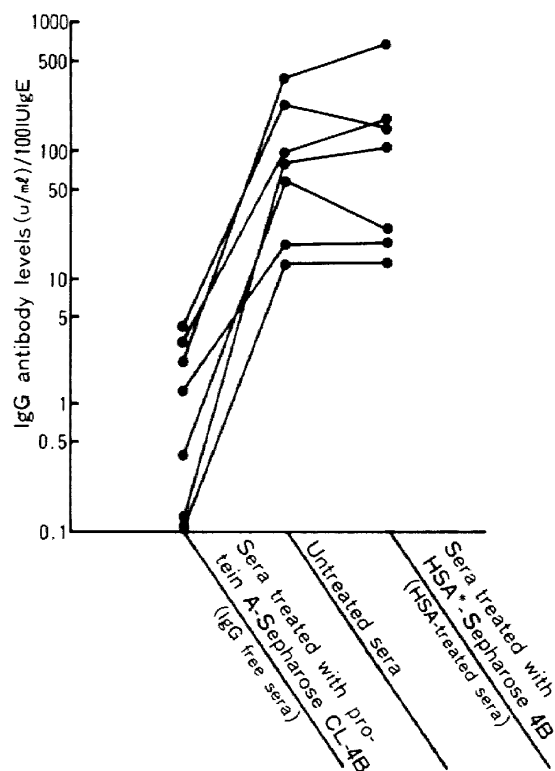


Fig. 7. Absorption of IgG by treatment with protein A-Sepharose CL-4B. The IgG antibody levels of each serum containing 100IU of IgE were compared. The mean values of anti-*D. farinae* IgG of IgG-free serum (1.67u/ml) was significantly ( $p < 0.001$ ) reduced in comparison to that of the untreated serum (124.5u/ml) and the HSA-treated serum (172.3u/ml).

それぞれ2名についての曲線である。症例4を除いてIgG-free serumの曲線の左方への移動がみられ、これは他の報告<sup>6)19)</sup>にもあるようにIgEもprotein A-Sepharose CL-4Bにより少量ではあるが除去されることによると考えられる。一定のIgE値におけるIgG-free serumとHSA処理血清のRAST値からIgG除去によるRAST値の上昇率(% increase)を以下の式で求めた。

上昇率 (%)

$$= \frac{\text{RAST 値(IgG-free serum)} - \text{RAST 値(HSA-treated serum)}}{\text{RAST 値(HSA-treated serum)}} \times 100(\%)$$

このIgE抗体価の上昇率とIgG抗体価との相関を求めたところ、両者には有意の正の相関 ( $y = 3.41 \log x - 8.35$ ,  $r = 0.88$ ,  $p < 0.01$ ) が認められ、IgG抗体価が高値をとればとる程、IgE抗体価はみかけ上低値を

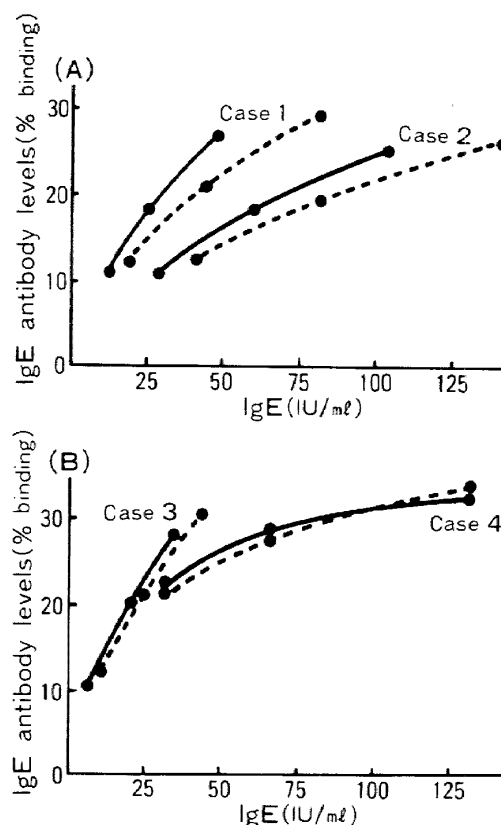


Fig. 8. Increase in the anti-*D. farinae* IgE levels (RAST values) after absorption of IgG. The IgE antibody levels (RAST values) were measured by diluting with IgG free serum (solid line) and HSA-treated serum (dashed line) obtained from individual patients. The mean difference in the IgE antibody levels between two curves at given three points of IgE levels was expressed as a % increase in the IgE antibody levels. (A) Case 1 and 2 were patients with high IgG antibody level. (B) Case 3 and 4 were patients with low IgG antibody level.

とることを示した (Fig. 9).

V. IgG-rich serum 添加によるIgE抗体価 (RAST値) の低下

IgG抗体によるRAST値の抑制効果をみるために、IgG抗体価低値の患者血清のIgG-rich serum添加後のRAST値の低下の程度を以下の方法で検討した。

IgG抗体価低値の患者血清 (IgG抗体価6.5u/ml, RAST値33%)に、PBS (0.6%ヒト血清アルブミンを含む) を患者血清の25倍量添加後のRAST値をRAST①(7.6%)、IgG-rich serumを患者血清の25倍量添加後のRAST値をRAST②とし、PBS(0.6%ヒト血清アルブミンを含む) のみのRAST値をRAST③(0.6%)として、以下の式にて、IgG-rich serum添加によるRAST抑制率(% inhibition)を求めた。

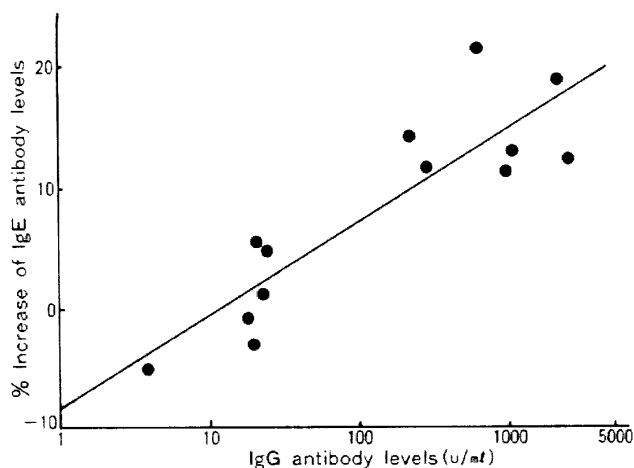


Fig. 9. Percent increases in the anti-*D. farinae* IgE levels (RAST values) after absorption of IgG and its relationship with the anti-*D. farinae* IgG levels.

% Increase =

$$\frac{\text{RAST values(IgG-free serum)} - \text{RAST values(HSA-treated serum)}}{\text{RAST values(HSA-treated serum)}} \times 100(\%)$$

Significant correlation ( $p < 0.01$ ) was observed ( $y = 3.41 \log x - 8.35$  and  $r = 0.88$ ).

$$\text{抑制率}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{RAST ②} - \text{RAST ③}}{\text{RAST ①} - \text{RAST ③}} \right) \times 100(\%)$$

Fig. 10のごとく5人について検討し, IgG 抗体価高値の血清2例の抑制率は69.6%, 82.6%とIgG 抗体価低値血清の抑制率11.6%, 2.9%, 10.1%に比べ大きな抑制効果が認められた. なお IgG-rich serum の蛋白濃度は6mg/ml に調整した.

VI. 血清希釈系列を用いての paper disc RAST 法の定量性の検討

12名の患者血清のそれぞれ1, 3, 5, 10, 25, 50, 100, 1000倍希釈系列のIgE RAST値を求めた (Fig. 11). 血清の希釈には Pharmacia 社製の paper radioimmunosorbent test (PRIST) キットの希釈液 (IgE free horse serum) を用いた. 今回, 我々の実験では, 10-25倍希釈にて初めて RAST 値が低下し始める血清が多くみられ, また原血清では30%前後とほとんど同じ RAST 値をとる血清でも10倍希釈にて10数%から30数%まで著しい差がみられ, 原血清による RAST 値では定量性が乏しいことが示された.

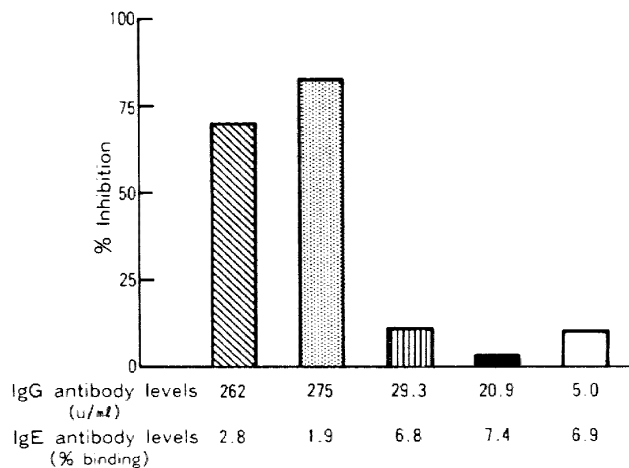


Fig. 10. The inhibitory effect of IgG-rich serum on the anti-*D. farinae* IgE levels (RAST values) assayed by paper disc RAST. The IgE antibody levels measured after adding 25-fold volume of IgG-rich serum to allergic serum with low IgG antibody levels (IgE RAST value, 33%; IgG antibody level, 6.5u/ml) were set an RAST ②. RAST ② were compared with the IgE antibody levels (RAST ①) measured after adding 25-fold volume of PBS containing 0.6% human serum albumin to the same allergic serum.

$$\% \text{ Inhibition} = \left( 1 - \frac{\text{RAST ②} - 0.6}{\text{RAST ①} - 0.6} \right) \times 100(\%)$$

(The constant number 0.6 indicates the RAST binding of PBS containing 0.6% human serum albumin.)

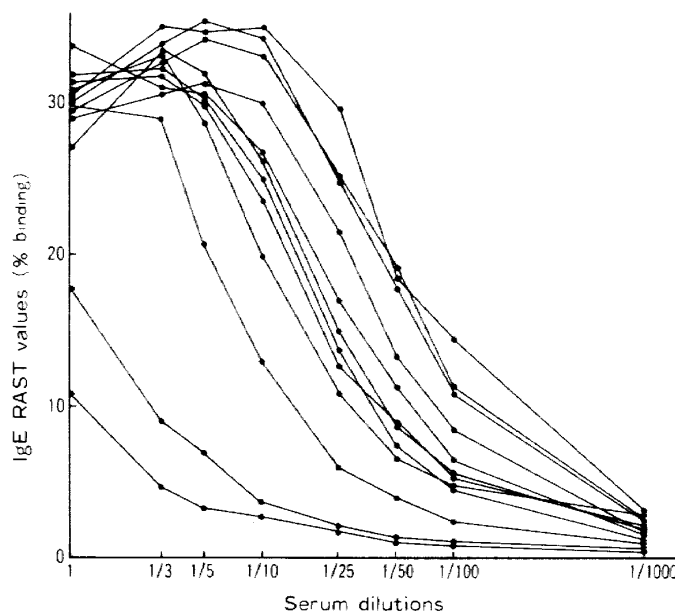


Fig. 11. RAST values to *D. farinae* in serially diluted sera of 12 mite allergic patients.

## 考 察

Ceska ら<sup>2)</sup>により臨床応用に供された paper disc RAST 法は、I 型アレルギーの原因抗原の検索に多大の貢献をなしてきたが、本法はもともと半定量的であり、多くの臨床アレルギーの研究者は本法の定量性を高めるため、種々の改良を加えてきた<sup>7)20)21)</sup>。しかも先にも述べたごとく、本法の原理から他の免疫グロブリンの抗体の存在は、必然的に見かけ上 IgE RAST 値を下げることは想像に難くない。事実当初より、いわゆる遮断抗体(IgG 抗体)が、いくつかの抗原において見かけ上 IgE 抗体価を低下させるため免疫療法後の患者血清中の IgE 抗体価の正確な判定は困難であることが報告されてきた<sup>3)-13)</sup>。更に RAST 法は抗体過剰域で測定されていることも報告されている<sup>22)</sup>。

ところで、本邦で最も普遍的なアレルゲンであるダニ(*D. farinae*)については免疫療法後はもちろん、治療前にすでに高い濃度の IgG 抗体や IgA 抗体を保有することが報告されている<sup>14)15)</sup>。しかるに、抗 *D. farinae* IgE 抗体の季節性変動や免疫療法に伴う変動の報告<sup>16)-18)</sup>においては、抑制因子の存在や本法が抗体過剰域で測定されているという問題点はあまり考慮されていないように思われる。そこで、我々はダニ(*D. farinae*)について、paper disc RAST 法による IgE 抗体価測定における IgG 抗体の抑制効果について検討した。

*D. farinae* についての今回の結果を考察する前にもう少しブタクサ花粉や honeybee venom などで行われた報告を概括してみることにする。Zimmerman ら<sup>4)</sup>はブタクサ花粉、honeybee venom にアレルギーの患者の血清を使用して RAST 法による IgE 抗体価測定における抑制因子について検索した。彼らは 56°C 4 時間加熱にて不活化した免疫療法施行患者の血清添加により、未治療患者の抗体価値が著明に低下することを発見し、これは免疫療法により増加した IgG 抗体によるものであることを確認した。さらにこの効果は paper disc と同様に固相担体にマイクロクリスタリンセルロースを用いる方法でもみられたが、Sephrose-4B を使用して固相担体に結合した抗原の容量を増大させた場合は、IgG 抗体による RAST 法への抑制効果が消失したことを報告した。Kemeny ら<sup>7)</sup>は、以前からの報告<sup>23)24)</sup>にもあるように蜂にアレルギーではない養蜂家(アレルギー症状なく IgE 抗体価低値)に IgG 抗体価高値を示す人が多いことを報告した。そして彼らの血

清を蜂アレルギーの養蜂家(アレルギー症状があり、IgE 抗体価高値)の血清に添加すると、paper disc RAST 法による IgE 抗体価が低下し、一般に IgG 抗体価高値の場合は、IgE 抗体価がみかけ上低値をとる可能性があることを報告した。Vervloet ら<sup>8)</sup>はアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の患者血清中に *Aspergillus fumigatus* 抗原に対する 2 種類の抑制因子があることを発見し、1 つは抗原特異的な遮断抗体であり、他方は正常人血清にも存在する抗原非特異的な因子であることを報告している。

これらの因子による抑制効果は、この作用機序により固相担体に結合した抗原の容量の増大により消失ないしは減少すると考えられ、そのために、Zimmerman ら<sup>4)</sup>や Sobotka ら<sup>25)</sup>は Sepharose 4B, Lynch ら<sup>3)</sup>は Sepharose 2B, Zeiss ら<sup>5)</sup>はポリスチレン管を用いた。

ところが、本邦で臨床上重要な *D. farinae* に関してこの種の報告は全くみられない。ブタクサ花粉や honeybee venom など観察された IgG 抗体(遮断抗体)による RAST 値の抑制現象が *D. farinae* にも存在するかどうか確認するため、IgG 抗体添加による RAST 値の低下、IgG 抗体除去による RAST 値の上昇の 2 つの確認を行った。Fig. 10 のごとく、IgG 抗体価高値の患者血清より得られた IgG-rich serum は明らかに IgG RAST 値を抑制しており、この時の IgG RAST 値(7.6%)、IgG 抗体価(262u/ml, 275u/ml)を示す血清は臨床的には十分あり得ると考えられる。一方、Fig. 9 のごとく IgG 抗体除去により IgG 抗体価が高ければ高い程 IgE RAST 値の上昇率が増加を示し、みかけ上 IgG 抗体により IgE RAST 値が抑制されていることを示した。

なお protein A-Sepharose CL-4B は IgG<sub>3</sub> を吸着しないので、また IgG<sub>3</sub> が抗ダニ抗体をもつかどうかは不明である。もし IgG<sub>3</sub> がダニ抗体活性をもち、その除去可能な方法があれば我々の結果は更に明瞭になるだろうと予想される。

これらの実験結果は、IgG 抗体が paper disc 上のダニ抗原と IgE 抗体との結合を拮抗的に阻害していることを示唆している。

この抑制の程度を決定する因子は、(1) IgG 抗体と IgE 抗体の分子数の比率、(2) IgG 及び IgE 抗体に対する *D. farinae* の共通の抗原決定基の数と、その共通の抗原決定基に対する IgG 及び IgE 抗体の親和性の相違、(3) IgG 及び IgE 抗体の分子数と paper disc の上抗原決定基の数との比率、などにより決定されると

考えられ、以下この3つの因子について考察を加えてみたい。

(1)のIgG抗体とIgE抗体の分子数の比率によりIgG抗体の抑制効果の強さが決定されるという機序については、Zeissら<sup>5)</sup>がブタクサで免疫療法中の患者において、IgE抗体と免疫療法後増加した $\mu\text{g}$ 単位のIgG抗体が容量に限界のあるpaper disc上で競合していると述べている。またPaullら<sup>10)</sup>はhoneybee venomで免疫療法中のphospholipase-A (PLA)にアレルギーの患者において、PLAに対するIgE抗体量は全IgE蛋白量の25.1-28.7%でIgG抗体量は全IgG蛋白量の0.073-0.210%であり、IgE抗体はng単位、一方IgG抗体は $\mu\text{g}$ 単位で存在し、IgG抗体は少なくともIgE抗体の1000倍近くは存在していることを報告した。また彼らはIgG抗体の分子数がIgE抗体の10-1000倍存在すると、固相担体にセルロースを用いたRAST法によるIgE抗体価が10-40%みかけ上低値を示すことを報告した。ダニアレルギー患者においてもIgG抗体価高値の血清においては、IgG抗体はIgE抗体にくらべ、かなり高濃度に存在していると考えられ、IgG抗体/IgE抗体の比率が大きくなればなる程、IgE抗体価測定におけるIgG抗体の抑制効果は大きくなると考えられる。(2)に関しては、先にも述べたようにhoneybee venomで免疫療法を受けた患者のIgG抗体はIgE抗体の1000倍近く存在すると推測され<sup>10)</sup>、一方ダニアレルギー患者においても、その比率はそれに近いものではないかと考えられる。しかし、このようにIgG抗体が多量に存在する中でIgE RAST法が可能であるのは、ひとつにはIgG抗体とIgE抗体の対応する抗原決定基が異なっており、拮抗する共通抗原がそれほど多くない可能性が考えられる<sup>26)27)</sup>。他方、IgG抗体とIgE抗体のpaper disc上の決定基に対する親和性に相違があることも考えられる。(3)のIgG及びIgE抗体の分子数とpaper disc上の抗原決定基の数の比率に関しては、固相担体に結合した抗原の容量の増大によりIgG抗体の抑制効果が消失することが報告されており<sup>3)-5)25)</sup>、paper disc上の抗原決定基の数が一定量を上まわれば、影響は当然無視できるものと考えられる。その為には固相担体に結合した抗原の容量の増大の他に血清を希釈する方法は有用といえよう。事実、Perelmutterら<sup>6)</sup>は、ブタクサ花粉、ライ麦に対するアレルギー患者において、protein A-Sepharose CL-4BによるIgG除去により、paper disc RAST法で測定されたIgE抗体価は25-66%上昇した

が、血清希釈により上昇率が小さくなること、つまりIgG抗体の影響が減ずることを示した。またCheungら<sup>11)</sup>は抗honeybee venom IgE抗体価測定において、IgG抗体が濃度依存的にみかけ上IgE抗体価を低下させ、さらにIgE抗体とIgG抗体の混合血清を希釈するとIgG抗体の抑制効果が消失することを示した。つまり、IgG及びIgE抗体の分子数とpaper disc上の抗原決定基の数との比率が大きい程、IgG抗体の影響を受けやすく、比率が小さければ影響は少なくなると考えられる。IgG抗体除去によるRAST値の上昇率がIgG抗体添加の際の抑制率に比べ、低かったという今回の実験結果は、IgG抗体除去操作のために血清が希釈されたために生じたものと思われる。

以上、抗*D. farinae* IgE抗体のRAST法での測定におけるIgG抗体の抑制効果を、主にブタクサ花粉、honeybee venomでの報告と比較検討を加えてきたが、ブタクサ花粉やhoneybee venomはかなり精製された抗原により検討されているのに、*D. farinae*は粗抗原を使用している点に大きな相違がある。今後より精製された抗原<sup>28)-30)</sup>による検討が望まれる。

Chapmanら<sup>14)</sup>はantigen binding assay法により、ブリックテスト陽性者の94%に*Dermatophagoides pteronyssinus*に対するIgG、IgA、IgE抗体を検出し、一方ブリックテスト陰性者ではIgE、IgA抗体は検出されず、IgG抗体のみが低濃度ではあるが30%に検出されたと報告した。今回の結果でもFig. 5のごとく、抗*D. farinae* IgE抗体価とIgG抗体価は相関しており、一方未治療患者にもIgG抗体価高値をとる場合が多数みられ、IgE抗体価に影響を与え得ることが考えられた。ところで、ブタクサ花粉、honeybee venomにアレルギーの患者においては、治療前はIgG抗体がほとんどなく、治療後はじめて上昇することが報告されており<sup>4)31)-35)</sup>、IgG抗体がIgE抗体価測定を抑制するのは免疫療法を受けているものに限られる。

以上のようにRAST法によるIgE抗体価測定にはIgG抗体がかなり大きな抑制効果を与えることがわかってきたが、今まで花粉症においてIgE抗体価の免疫療法による変動や季節性変動は次のように考えられてきた。すなわち、IgE抗体価は免疫療法後減少すること<sup>32)34)35)</sup>、花粉の飛散の季節に入ると未治療患者では上昇するが、治療を受けている患者では上昇しないか、もしくは上昇してもその程度は少ないとされている<sup>33)37)38)</sup>。しかし最近Zimmermanら<sup>4)</sup>は、これらの報告の多くはRAST法で行われており、免疫療法後IgE

抗体価が低下するようにみえるのは、治療後上昇した IgG 抗体による抑制効果のためではないかと述べている。花粉症では治療後に測定された IgE 抗体価の評価が問題とされているが、ダニにおいては治療後はもちろん、治療前にすでに IgG 抗体が高濃度に存在しており、さらに他の免疫グロブリンの存在をも考えると、paper disc RAST 法による IgE 抗体価の正確な評価は困難といえる。

加えるに、RAST 法では抗体過剰域で測定していることが報告されており<sup>22)</sup>、事実我々は IgE RAST 値 30%以上のダニアレルギー患者血清を段階希釈し RAST 値を求めたところ、10-25倍希釈にてやっと RAST 値が低下し始める血清が多くみられた。以上の 2 点、すなわち、本法は IgG 抗体や他の免疫グロブリンにより抑制されること、更にかんりの抗体過剰域で測定されているという問題点を解決し本法の定量性を高めるには現実には希釈血清を用いるのが簡便で望ましい方法であろうが、より精製された抗原を用いた検討が必要であろう。

## 結 論

ダニ (*D. farinae*) アレルギー患者 (治療群、未治療群) と対照群について、protein A-Sepharose CL-4B を使用して、IgG-rich serum, IgG-free serum を得ることにより、paper disc RAST 法による抗 *D. farinae* IgE 抗体価測定における IgG 抗体の抑制効果について検討を加え、以下の結果を得た。

1. *D. farinae* に対する IgE 抗体価と IgG 抗体価には正の相関がみられた。

2. ダニアレルギー患者では対照群に比べ IgG 抗体価は有意に高値を示した。また治療群は未治療群に比べ高い傾向がみられたが、その差は有意ではなく、未治療患者にも高値を示すものが多くみられた。

3. RAST 値は IgG 抗体除去により上昇し、添加で低下を示した。

以上より *D. farinae* に関しては免疫療法未施行の患者でも IgG 抗体価高値を示す人が多くみられ、paper disc RAST 法による IgE 抗体価は IgG 抗体や他の免疫グロブリンの影響により見かけ上低値をとることがあると考えられる。さらに本法はしばしば抗体過剰域で測定されているという問題点もあり、これらの 2 つの問題点を解決して本法の定量性を高めるには

希釈血清を用いるのが簡便で望ましい方法であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授、御教示を賜りました本学第 2 生化学教室久野滋教授に深謝致します。

なお、本論文の要旨は、第 33 回日本アレルギー学会総会 (1983) において発表した。

## 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) Ceska, M., Eriksson, R. and Varga, J.M.: Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 49, 1-9, 1972.
- 3) Lynch, N.R., Dunand, P., Newcomb, R.W., Chai, H. and Bigley, J.: Influence of IgG antibody and glycopeptide allergens on the correlation between the radioallergosorbent test (RAST) and skin testing or bronchial challenge with *Alternaria*. *Clin. Exp. Immunol.* 22, 35-46, 1975.
- 4) Zimmerman, E.M., Yunginger, J.W. and Gleich, G.J.: Interference in ragweed pollen and honeybee venom radioallergosorbent test. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 386-393, 1980.
- 5) Zeiss, C.R., Grammer, L.C. and Levits, D.: Comparison of the radioallergosorbent test and a quantitative solid-phase radioimmunoassay for the detection of ragweed-specific immunoglobulin E antibody in patients undergoing immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 105-110, 1981.
- 6) Perelmutter, L., Bergeron, M. and Mandy, F.: Assessment of the effect of IgG antibodies to ragweed and rye grass on the IgE antibody disc RAST. *Ann. Allergy* 50, 393-397, 1983.
- 7) Kemeny, D.M., Lessof, M.H. and Trull, A.K.: IgE- and IgG antibodies to bee venom as measured by a modification of the RAST method. *Clin. Allergy* 10, 413-421, 1980.
- 8) Vervloet, D., Fujita, Y., Wypych, J.L., Reisman, R.E. and Arbesman, C.E.: The inhibitory effect of serum factors on measurement of IgE aspergillus antibodies by RAST. *Clin. Allergy* 4, 359-369, 1974.
- 9) Aalberse, R.C., Reerink-Brongers, E.E. and Vermeulen, E.: RAST-inhibiting factors in

- human serum. *Int. Arch. Allergy* 45, 46-49, 1973.
- 10) Paull, B.R., Jacob, G.L., Yunginger, J.W. and Gleich, G.J.: Comparison of binding of IgE and antibodies to honeybee venom phospholipase-A. *J. Immunol.* 120, 1917-1923, 1978.
  - 11) Cheung, N.-K.V., Blessing-Moore, J., Reid, M.J., Lewiston, N.J. and Yang, G.: Reduction of interference by specific IgG with a modified microtiter solid-phase radioimmunoassay to measure honeybee venom IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 283-293, 1983.
  - 12) Johansson, S.G.O., Bennich, H. and Berg, T.: In vitro diagnosis of atopic allergy. III. Quantitative estimation of circulating IgE antibodies by the radioallergosorbent test. *Int. Arch. Allergy* 41, 443-451, 1971.
  - 13) Foucard, T., Johansson, S.G.O., Bennich, H. and Berg, T.: In vitro estimation of allergens by a radioimmune antiglobulin technique using human IgE antibodies. *Int. Arch. Allergy* 43, 360-370, 1972.
  - 14) 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 (F<sub>4</sub>P<sub>1</sub>). *Clin. Exp. Immunol.* 34, 126-136, 1978.
  - 15) D'Souza, M.F., Pepys, J., Wells, I.D., Tai, E., Palmer, F., Overell, B.G., McGrath, I.T. and Megson, M.: Hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* in house dust allergy, a controlled study of clinical and immunological effects. *Clin. Allergy* 3, 177-193, 1973.
  - 16) 中村凱次: 気管支喘息患児の血清特異 IgE 抗体の変動について, 第1編 抗 *Dermatophagoides farinae* 特異 IgE の変動について, アレルギー 28, 758-773, 1979.
  - 17) 大岩茂則, 西脇敬祐, 高納 修: RAST により観察した減感作療法に伴う IgE 抗体レベルの変動について, アレルギー 28, 924-924, 1979.
  - 18) 吉田象二, 大多和忠彦, 鏡味 勝, 板谷喬起, 富岡玖夫, 熊谷 朗: 長期減感作療法を施行した喘息患者血清中の IgE 値および特異的 IgE 値の変動, アレルギー 28, 952-953, 1979.
  - 19) Johansson, S.G.O. and Inganäs, M.: Interaction of polyclonal human IgE with protein-A from *Staphylococcus aureus*. *Immunol. Rev.* 41, 248-260, 1978.
  - 20) 大塚博邦, 奥田 稔, 坂口喜清, 大西正樹, 渡瀬隆雄, 目沢朗憲: RAST 改良法 (Nalebuff-Fadel), アレルギー 33, 71-77, 1984.
  - 21) Nalebuff, D.J., Fadal, R.G. and Ali, M.: An enthusiastic view of the use of RAST in clinical allergy. *Immunol. Allergy Pract.* 3, 77-88, 1979.
  - 22) Gleich, G.J. and Jones, R.T.: Measurement of IgE antibodies by the radioallergosorbent test. II. Analysis of quantitative relationships in the test. *J. Allergy Clin. Immunol.* 55, 346-357, 1975.
  - 23) Müller, U., Johansson, S.G.O. and Streit, C.: Hymenoptera sting hypersensitivity: IgE, IgG and haemagglutinating antibodies to bee venom constituents in relation to exposure and clinical reaction to bee stings. *Clin. Allergy* 8, 267-272, 1978.
  - 24) Yunginger, J.W., Jones, R.T., Leiferman, K.M., Paull, B.R., Welsh, P.W. and Gleich, G.J.: Immunological and biochemical studies in beekeepers and their family members. *J. Allergy Clin. Immunol.* 61, 93-101, 1978.
  - 25) Sobotka, A.K., Adkinson, N.F., Valentine, M.D. and Lichtenstein, L.M.: Allergy to insect stings. IV. Diagnosis by radioallergosorbent test (R.A.S.T.). *J. Immunol.* 121, 2477-2484, 1978.
  - 26) 灰田美知子, 伊藤幸治, 宮本昭正: ELISA 法によるダニ抗原の分析, アレルギー 32, 707-707, 1983.
  - 27) 灰田美知子, 中島敏治, 荻田忠厚, 奥平博一, 伊藤幸治, 宮本昭正: radioimmuno-electrophoresis 法 (RIEP 法) による抗ダニ IgG 抗体の検出とその意義について, アレルギー 32, 712-712, 1983.
  - 28) Chapman, M.D. and Platts-Mills, T.A.E.: Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen P<sub>1</sub>. *J. Immunol.* 125, 587-592, 1980.
  - 29) Stewart, G.A. and Turner, K.J.: Physicochemical and immunochemical characterization of the allergens from the mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 58, 259-274, 1980.
  - 30) Stewart, G.A.: Isolation and characterization of the allergen Dpt. 12 from *Dermatophagoides pteronyssinus* by chromatofocusing. *Int. Arch. Allergy* 69, 224-230, 1982.
  - 31) Yunginger, J.W. and Gleich, G.J.: Seasonal changes in IgE antibodies and their relationship to IgG antibodies during immunotherapy for ragweed hay fever. *J. Clin. Invest.* 52, 1268-1275, 1973.
  - 32) Evans, R., Pence, H., Kaplan, H. and Rocklin, R.E.: The effect of immunotherapy on humoral and cellular responses in ragweed hayfever. *J.*

- Clin. Invest.* 57, 1378-1385, 1976.
- 33) Levy, D.A., Lichtenstein, L.M., Goldstein, E.O. and Ishizaka, K.: Immunologic and cellular changes accompanying the therapy of pollen allergy. *J. Clin. Invest.* 50, 360-369, 1971.
- 34) Lichtenstein, L.M., Ishizaka, K., Norman, P.S., Sobotka, A.K. and Hill, B.M.: IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 52, 472-482, 1973.
- 35) Sadan, N., Rhyne, M.B., Mellits, E.D., Goldstein, E.O., Levy, D.A. and Lichtenstein, L.M.: Immunotherapy of pollinosis in children. Investigation of the immunologic basis clinical improvement. *N. Engl. J. Med.* 280, 623-627, 1969.
- 36) Irons, J.S., Pruzansky, J.J., Patterson, R. and Zeiss, C.R.: Studies of perennial ragweed immunotherapy. Associated changes in cellular responsiveness, total serum antigen-binding capacity, and specific IgE antibody concentrations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 59, 190-199, 1977.
- 37) Gleich, G.J., Jacob, G.L., Yunginger, J.W. and Henderson, L.L.: Measurement of the absolute levels of IgE antibody in patients with ragweed hay fever. Effect of immunotherapy on seasonal and relationship to IgG antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 60, 188-198, 1977.
- 38) Pence, H.L., Mitchell, D.Q., Greely, R.L., Updegraff, B.R. and Selfridge, H.A.: Immunotherapy for mountain cedar pollinosis. A double-blind controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 58, 39-50, 1976.

THE INHIBITORY EFFECT OF IgG ANTIBODY ON PAPER DISC  
RADIOALLERGOSORBENT TEST OF IgE ANTIBODY TO  
*DERMATOPHAGOIDES FARINAE*

Masaharu Kasei, Michio Hiratani, Shigeru Ito, Yoshihiro Oshida  
and Satoko Ueda

*Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University*

Kazuhiko Muto

*Department of Pediatrics, National Ito Hospital*

The inhibitory effect of IgG antibody on IgE antibody level assayed by paper disc RAST was evaluated using mite (*Dermatophagoides farinae*, *D. farinae*) antigen. A significant positive correlation was found between the IgE and IgG antibody levels. The IgG antibody levels in mite allergic patients were significantly higher compared with those in controls. The IgG antibody levels in the treated group (house dust immunotherapy) were higher but showed no significant difference from those in the untreated group. The RAST values were elevated by removal and suppressed by addition of IgG antibody.

These results suggested that in *D. farinae* allergic patients, the IgE antibody levels even from untreated patients when assayed by paper disc RAST indicates a lower level in the presence of IgG antibody or antibodies of other classes. Furthermore, antibody levels by this method are measured frequently with excess antibody. These factors may produce a difficulty in precise estimation of the seasonal variations in IgE antibody levels or suppression of IgE antibody levels after immunotherapy. The preciseness of quantification by this method may be improved by the use of diluted serum, which is simple and preferable for minimization of the effect of the above 2 factors.