

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) による

喘息児および健康児の血清中抗ダニ

(*Dermatophagoides farinae*) 特異 IgG 抗体について

群馬大学医学部小児科

田澤昌道 森川昭広

Key words: anti-Df IgG antibody — blocking antibody —
bronchial asthma — ELISA

(受付: 4月23日, 1985)

緒言

研究材料および方法

コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae* 以下 Df) はヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) とともに屋内塵の主要抗原物質であり¹⁾, 本抗原物質に対する特異 IgE 抗体が喘息患児血清中に高率に検出される。一方, Df に対する特異 IgG 抗体については種々の方法²⁾³⁾で測定されているが, その意義についてはいまだ明らかではない。しかし, 枯草熱では減感作療法による特異 IgG 抗体の上昇と臨床症状の改善がよく相関することが報告され⁴⁾, 特異 IgG 抗体, 特に IgG4 抗体が遮断抗体とする意見が強い。

一方, 屋内塵については木村らが二重注射法を用いて遮断抗体と臨床症状の関連を検討している⁵⁾⁶⁾。今回, 著者らは enzyme-linked immunosorbent assay (以下 ELISA) を用い Df 特異 IgG, IgG4 抗体測定の基礎的検討を行うとともに, 健康児および喘息児における抗体の年齢的推移, 二重注射法による遮断抗体価と ELISA による特異 IgG, IgG4 抗体価について検討を行ったので報告する。

1. 被検血清

当科喘息外来通院中の2歳から12歳までの屋内塵陽性で減感作療法未施行の気管支喘息児21名より採血し, 血清分離後測定まで-20℃に保存した。対照血清としては ATS-DLD のアンケートで本人および家族にアレルギー性疾患のないことが確かめられた健康児, および当科心臓外来を受診し機能性心雑音と診断された児の血清を用いた。二重注射法により遮断抗体価既知の血清は木村より提供されたものを用いた。

2. ELISA による抗 Df IgG 抗体の測定

基本的には Engvall and Pearlman⁷⁾の方法に従ったが, 阿南ら⁸⁾の報告を参考に一部改変し, 実験は全て duplicate で行った。

1) Df を 0.05M carbonate buffer, pH 9.5 に 0.1, 1, 5, 10, 20 μg/ml の濃度に溶解し, その 100 μl を 96 ウェルのポリスチレンマイクロプレート (Immulon II MICROELISA plate, Dynatech Lab. Inc.) に注入, 4℃一晩 incubation を行った。washing buffer (0.05% Tween 20 を含む 0.05M PBS, pH 7.2) で各ウェルを3回洗浄した。洗浄後, 抗 Df 特異 IgG 抗体価の高いブール血清 (standard serum 以下 S.S.) を 100 倍から 1600 倍まで希釈を行い, それぞれの濃度の異なる抗原をカップリングしたウェルに注入した。なお, 予備実験で抗原液のみを注入したウェルと抗原をカップリング後 1% ウシ血清アルブミン (以下 BSA) を注入し, 4℃一晩静置したウェルで同一血清を用いて吸光度を検討したところ, 測定値に有意の差を認めなかったの で, 以後の実験には BSA を用いなかった。

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; CV coefficient of variation; Df *Dermatophagoides farinae*; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; PBS phosphate buffered saline; RAST radioallergosorbent test; S.S. standard serum

2) 被検血清および標準血清

被検血清は予備実験で至適と思われた200倍に希釈し、予備実験で集め得た S.S. を100倍から3200倍まで希釈し各々その100 μ l をウェルに注入した。希釈液は2%BSA, 0.02%Na₂N₃, 0.05%Tween 20を含む0.05 M PBS, pH 7.2を用いた。各血清を注入後37°C 3時間 incubation を行った。

3) washing buffer で3回洗浄後1600倍に希釈した peroxylase 標識 F(ab')₂ fragment 抗ヒト IgG (Cappel)を100 μ l 各ウェルに注入した。37°C, 2時間 incubation を行った。

4) 3)と同様に洗浄後 substrate (0.1M citrate phosphate buffer, pH 5.0 100ml, ortho-phenylenediamine (O-PDA) 40mg, 31%H₂O₂ 40 μ l) を100 μ l 加え、15-30分室温に放置した。

5) 2.5M H₂SO₄ 150 μ l を加え反応を停止させた後 Micro ELISA Autoreader MR 580 (Dynatech) にて 490nm における吸光度を測定した。

6) IgG4測定の場合には、2)の終了後 washing buffer で3回洗浄し3000倍に希釈した抗ヒト IgG4マウスモノクローナル抗体(BRL)を100 μ l 各ウェルに注入した。37°C 1時間 incubation 後洗浄し、1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスグロブリン血清(BRL)を注入し、37°C 2時間 incubation を行った。その後は4)と同様の操作を行った。

7) Df による抑制試験

この実験系から Df 特異 IgG, IgG4抗体を検出しているか否かを検討するために Df を用いた抑制試験を行った。抑制試験では Df の100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 μ g/ml 抗原液および生理食塩水と100倍に希釈した S.S. を等量混ぜ、37°C 3時間 incubation し、その100 μ l をあらかじめ Df の5 μ g/ml でコートしておいたマイクロプレートのウェルに注入した。以後、抗 Df IgG, IgG4抗体の測定は既述の ELISA により行った。

8) 抗 Df IgG および IgG4抗体価の表示は S.S. を100倍 (100unit) から3200倍 (3125unit) まで倍々希釈を行った血清より標準曲線を作製し unit (以下U) で示した。なお、抗原と IgG の非特異的吸着は10カ月-1歳の健康児の血清を用いて検討し、抗原とペルオキシダーゼ標識抗 IgG の非特異的吸着についての検討は血清希釈用の buffer を用いて行ったが、いずれの場合も吸光度は低値であったので血清希釈用 buffer を back ground とした。

3. ELISA とポリスチレン管を用いた IgG RAST

の比較

Sakamoto ら³⁾の方法に従いポリスチレン管による IgG RAST と ELISA を同一血清について行い比較検討した。

4. 遮断抗体価の測定および血清

遮断抗体価の測定は木村らの報告⁵⁾に従い直接二重注射法により行った。すなわち、直接二重注射法による遮断抗体価の測定は、56°C, 4時間加熱した患者血清に生理的食塩水を加えて2倍希釈系列を作り、各希釈血清の0.02ml を患者自身の前腕皮内に注射し、血清による発赤、膨疹反応の消失した後、各血清注射部位に皮内反応閾値濃度の抗原液0.02ml を重ねて注射した。遮断抗体価は抗原注射15分後に判定した。対照は生理食塩水および皮内反応閾値濃度の抗原注射部位の反応を用いた。また、皮膚反応による遮断抗体価測定の日に採血した血清を分離後 ELISA による Df 特異 IgG 抗体測定まで-20°C にて保存した。なお、二重注射法による遮断抗体価測定の際の抗原としては、屋内塵エキス (鳥居薬品 K.K.) を用いた。

5. 統計処理には Student t-test を用いた。

結 果

1) 至適抗原濃度、血清希釈、抗原量の検討

2-1)の方法で行った結果、用いる抗原液の濃度は5 μ g/ml、血清希釈は200倍が適当と思われた (Fig. 1)。上記条件のもとでペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 血清の希釈度を検討した。Fig. 2は抗血清を400-12800倍まで倍々希釈して得られた OD490nm における値である。抗血清の希釈が400-3200倍の間で血清200倍希釈時の OD490nm は1.0以上の値であったので、抗血清節約のため1600倍を至適血清濃度とした。

2) 至適 incubation 時間の検討

1)の条件のもとで第一段階 (抗原と被検血清との反応) および第二段階 (被検血清とペルオキシダーゼ標識抗 IgG 血清との反応) の至適 incubation 時間の検討を行った。その結果、scale out しない程度のできるだけ高値と考え、第一段階は3時間、第二段階は2時間が適当と思われた (Fig. 3)。

3) Df による抑制試験

2-7)の方法により抑制試験を行った結果、IgG 抗体および IgG4抗体ともに抗原量の多い程吸光度は低く、dose dependent に抑制された。また、吸光度から算出

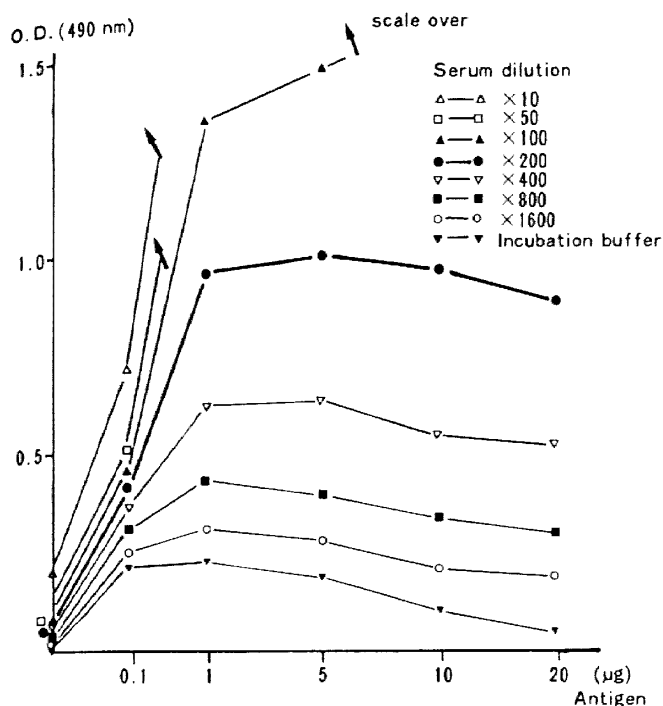


Fig. 1. Appropriate serum dilution and antigen coated in polystyrene microplate.

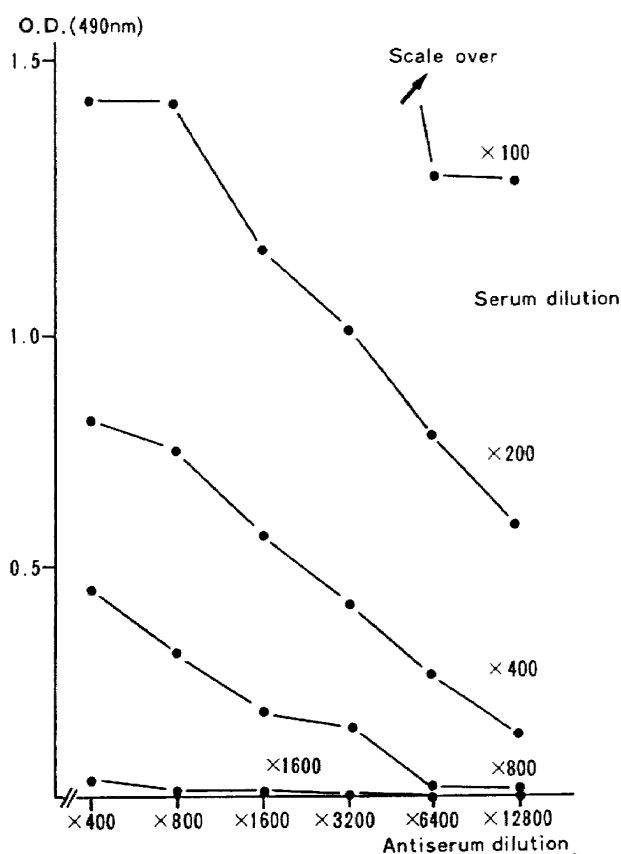


Fig. 2. Appropriate dilution of HRP labelled anti IgG antibody.

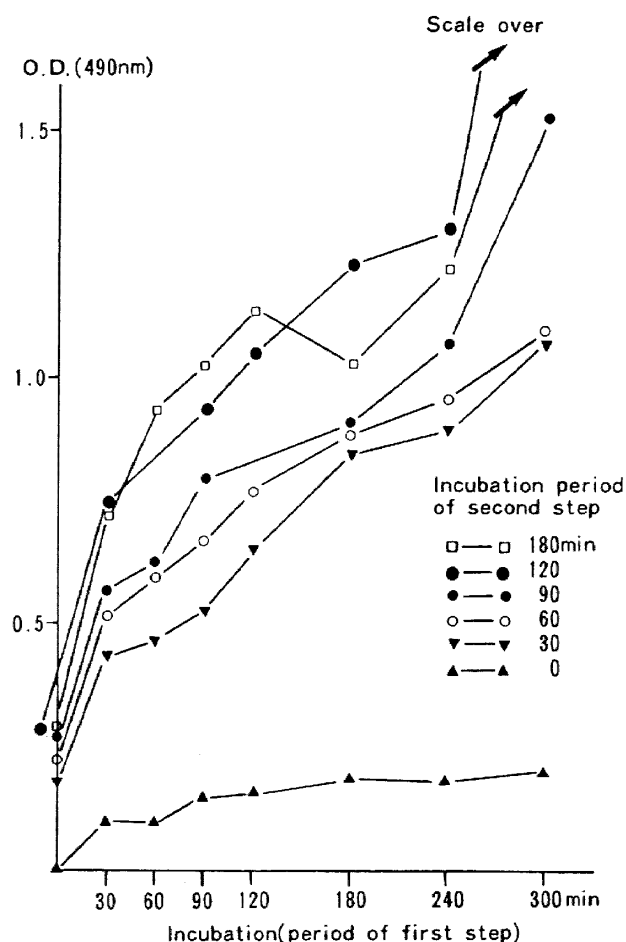


Fig. 3. Appropriate incubation time.

した50%inhibitionに要するDfの量はIgG抗体で1.7 μ g, IgG4抗体で450ngであった (Fig. 4).

4) 標準曲線

予備実験中に集め得たS.S.を100倍から3200倍まで倍々希釈した。100倍希釈のS.S.を示す吸光度を100 unit (U)とし、以下200倍を50U, 400倍を25U, 800倍を12.5U, 1600倍を6.25U, 3200倍を3.125Uとした。Fig. 5はDfに対するIgG抗体, Fig. 6はIgG4抗体の標準曲線の1例であり、各プレート毎に必ず標準曲線を作製した。

5) ポリスチレン管を使用した solidphase radio-immunoassay と ELISA との比較

喘息児血清、健康児血清の計26検体についてポリスチレン管を使用したIgG RASTとELISAを行い比較検討した。その結果、IgG RASTはY軸にbound % (B%)で、ELISAはX軸にUで示した。両者の間には $r=0.779$, 1.0%以下の危険率で高度の相関を示した。回帰曲線は $B\%=0.56 \times U + 4.48$ であった (Fig. 7)。

6) 健康児および健康成人の抗Df IgG抗体

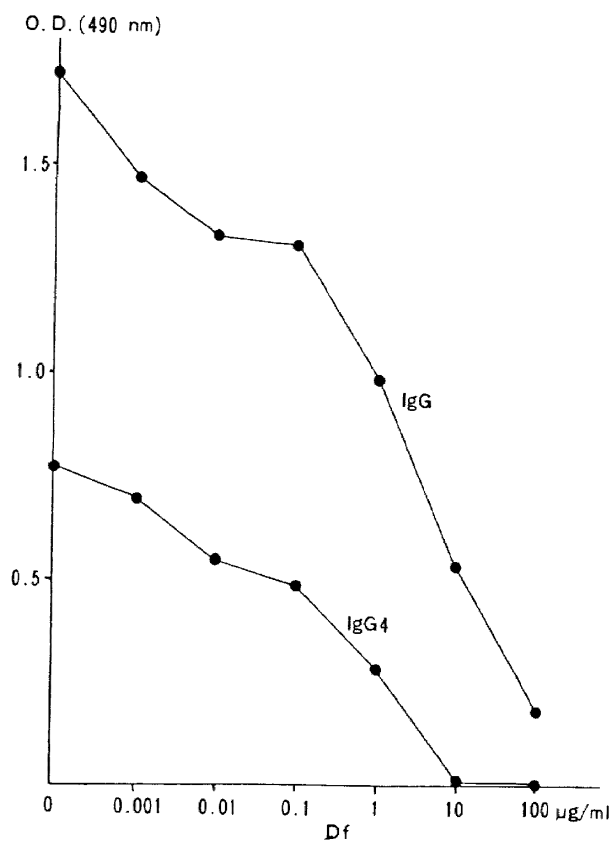


Fig. 4. Inhibition test of ELISA of IgG and IgG4 antibody to Df by Df antigen.

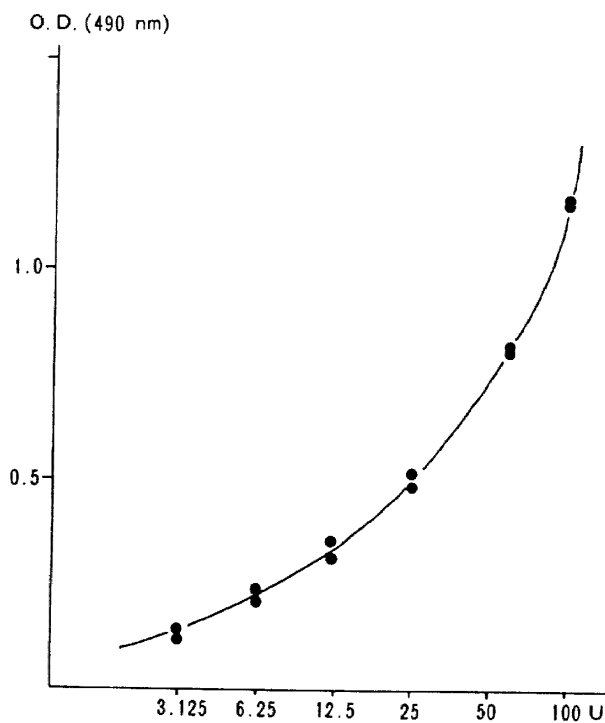


Fig. 5. Standard curve of IgG antibody against Df.

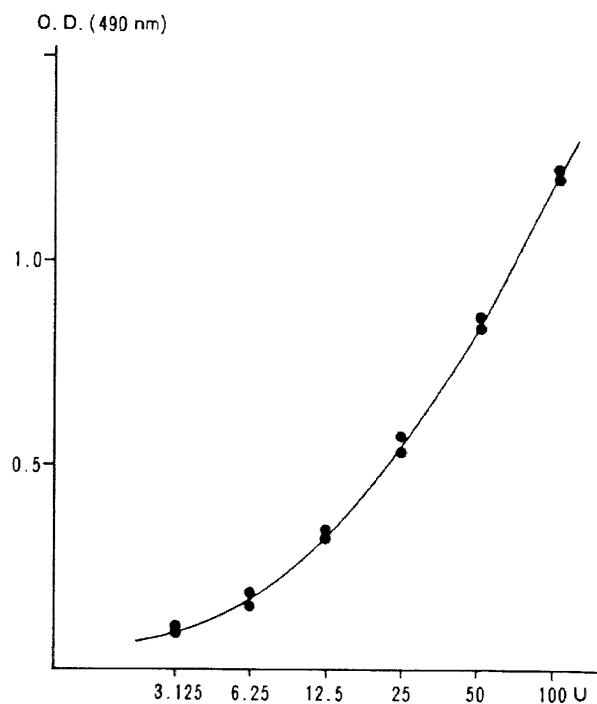


Fig. 6. Standard curve of IgG4 antibody against Df.

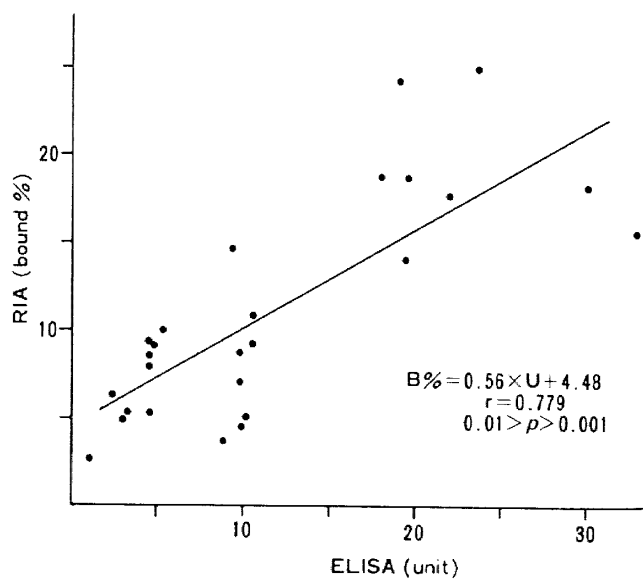


Fig. 7. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay.

Fig. 8のごとく、0-2歳までは $4.05 \pm 2.68U$ 、3-5歳では $4.85 \pm 1.67U$ 、6-8歳では $9.19 \pm 3.45U$ 、9-12歳では $11.80 \pm 5.23U$ と年齢とともに抗Df IgG抗体価は上昇した。0-2歳、3-5歳と6-8歳、9-12歳との間には1%以下の危険率で有意の差が認められた。また、0-2歳、3-5歳児と成人の比較では2%以下の危険率で有意に成人の方が高値を示した。

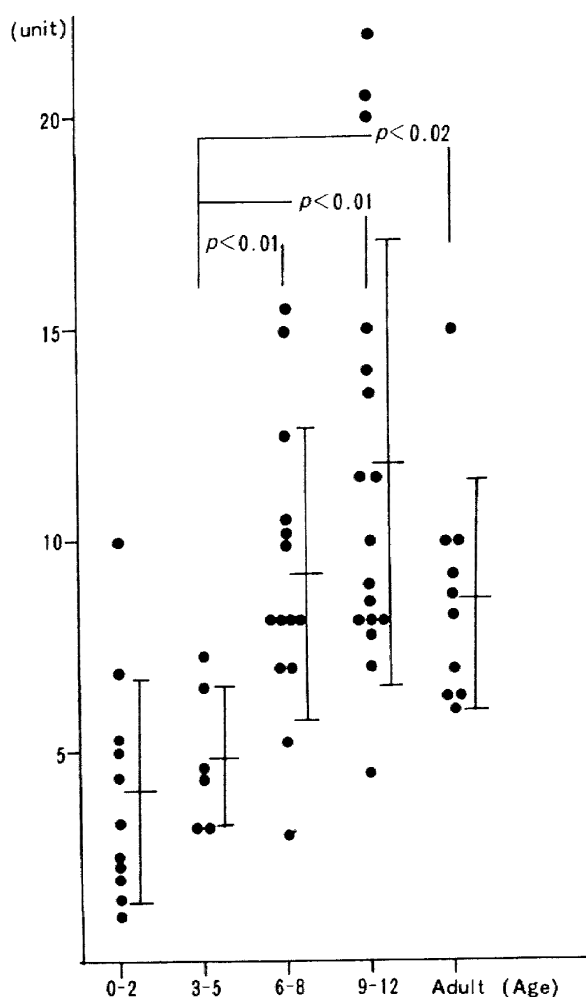


Fig. 8. Change in IgG antibodies against Df by age.

7) 喘息児の抗 Df IgG 抗体

減感作療法未施行の喘息児について抗 Df IgG 抗体量を測定し、健康児の抗体量と比較した。1歳台では気管支喘息と診断しえない場合があるので除外し、2歳以降の明らかに診断しうる児の血清を用いた。その結果、2-5歳では 19.29 ± 12.26 U、6-8歳では 17.33 ± 8.24 U、9-12歳では 20.49 ± 9.9 Uと健康児と比し前2者では危険率2%以下、後者では危険率1%以下で有意の高値を示した (Fig. 9)。

8) 遮断抗体価と抗 Df IgG および IgG4抗体価の比較

屋内塵について、二重注射法による遮断抗体価を測定した喘息児19名について、同時に採血した血清を用いて抗 Df IgG および IgG4抗体を測定し比較した。その結果、両者の間には有意な相関関係は認められなかったが、遮断抗体価の低い例ではELISAでは10U以下の者が多い傾向がみられた。しかし、遮断抗体価

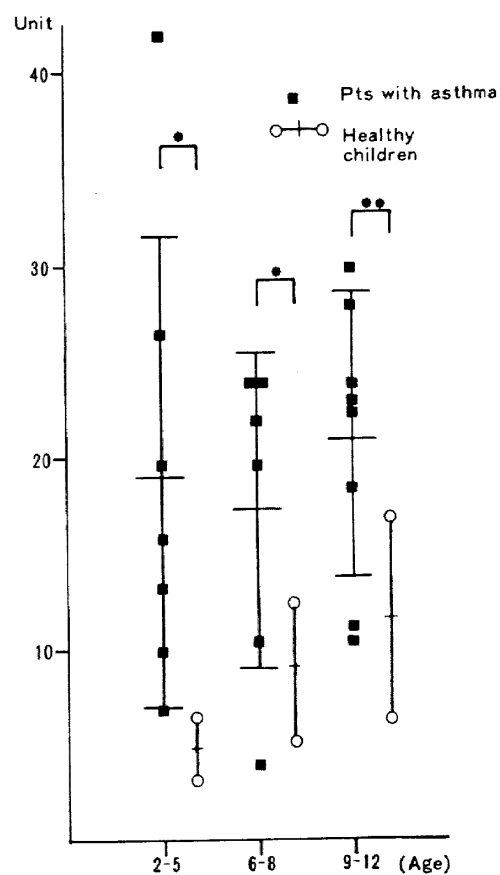


Fig. 9. Comparison of IgG antibodies against Df between asthmatic and healthy children. (* $p < 0.02$, ** $p < 0.01$)

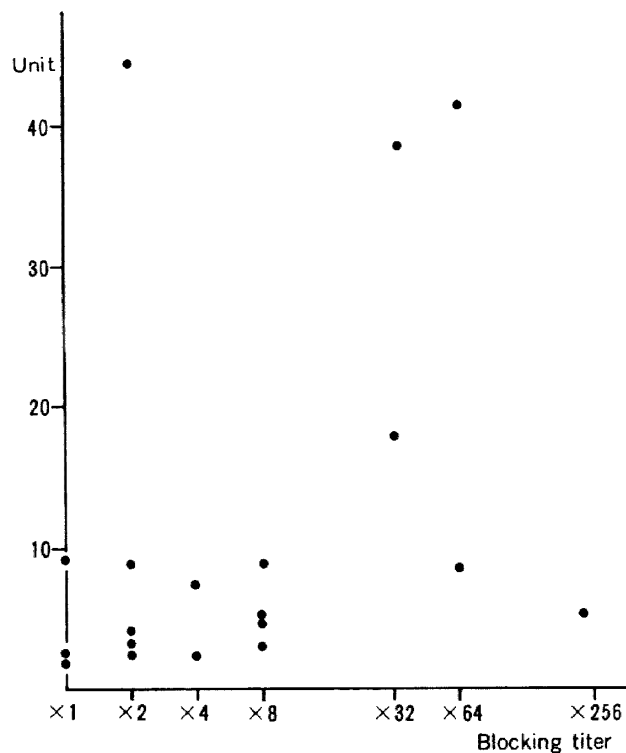


Fig. 10. Relationship between IgG antibody and blocking titer against Df.

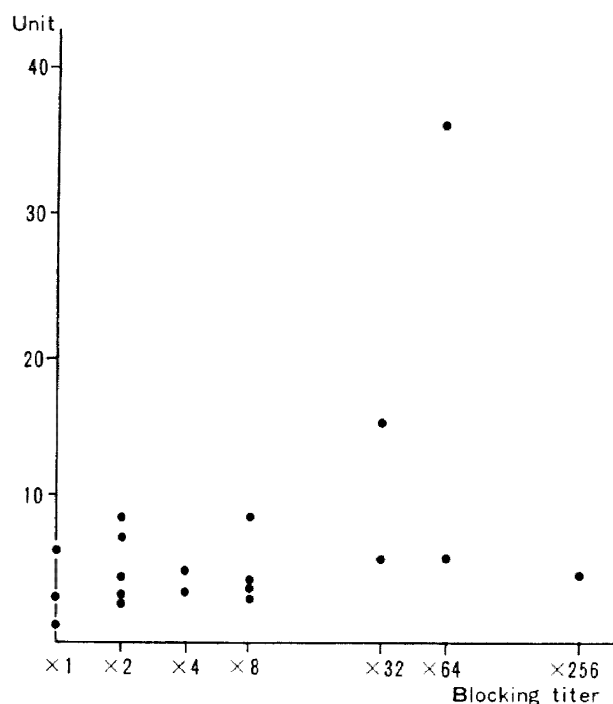


Fig. 11. Relationship between IgG4 antibody and blocking titer against Df.

が高い例では ELISA による測定値は一定の傾向は示さなかった (Fig. 10, 11).

考 案

in vitro の抗原特異 IgG 抗体の半定量的測定方法として、radioimmunoassay では二重抗体法⁹⁾、Protein A-Sepharose を担体として用いる方法¹⁰⁾、¹²⁵I-標識 Protein A を用いる方法¹¹⁾、IgG RAST 法³⁾が、報告されている。一方、ELISA はアイソトープを用いる煩雑さがなく、また半減期を考慮に入れる必要がないので近年広く用いられるようになった¹²⁾¹³⁾。また、その感度も solidphase radioimmunoassay と同程度であるといわれている。現在、特異 IgG 抗体の検索に用いられているポリスチレン管を用いた IgG RAST 法と我々が用いた ELISA 法を比較したところ、高度の相関があり、ELISA は IgG RAST と同等またはそれ以上の感度を有していると思われた。感度上昇の原因の 1 つとしてペルオキシダーゼ標識 F (ab')₂ 抗ヒト IgG (Fc specific) を用いたことがあげられる。予備実験で用いたペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG に比し、非特異反応が明らかに減少した。また、標準曲線作製に関しても常に一定の形態の標準曲線が描けるようになった。

ELISA は同一条件のもとで行っても日を変えて行うと同一血清で異なった吸光度がみられる。そこで我々は RAST の PRU を参考にして high titer pooled serum の希釈系列を各プレートごとに置き、得られた標準曲線より未知検体の特異 IgG を unit で示した。その結果、同一血清を異なった日に測定しても coefficient of variation (CV: 標準偏差/測定平均 U) は 6.8% 以下と良好な結果であった。

また、特異 IgG4 抗体の測定については 2 種類の抗血清を使用するためその抗体の特異性の確認が必要である。今回我々が用いた第 1 抗体は抗ヒトマウス IgG4 モノクローナル抗体であり、その特異性は IgG1, G2, G3, G4, pooled human IgG による抑制試験により確認されている¹⁴⁾。また、図には示さないが、第 2 抗体の希釈試験を行ったところ吸光度は dose dependency が認められた。今後、抑制試験の検討が必要であろう。

伊藤ら¹²⁾は健康成人でも抑制試験の結果から抗 Df IgG 抗体を有していることを報告している。我々は健康児の Df 特異 IgG 抗体の年齢的推移を観察したところ、年齢とともに上昇する傾向を認めた。我々の測定した 0 歳児のうち最小年齢の者は 7 カ月であり母体からの移行した IgG とは考え難く、児が産生したものと考える方が妥当であろう。年齢を区切って観察すると 0-2 歳と 3-5 歳ではほとんど差がみられないが、6-8 歳では 3-5 歳の約 2 倍に増加し、9-12 歳では更に増加した。小児では総 IgG の増加は生後 6 カ月から 2 歳で急激に増加し、3-5 歳ではほぼ成人値に近づくパターンをとり Df 特異 IgG 抗体の増加パターンとは明らかに異なる。むしろ総 IgE の増加パターンまたは小児気管支喘息患者における Df 特異 IgE 抗体の検出率増加パターンに類似する。

一方、喘息児では減感作療法とともに特異 IgG 抗体が上昇することが知られている。我々は減感作療法前の喘息児の血清について検討し、いずれの年齢でも健康児に比し有意に高値を示した。これらの事実が何を意味するかについては詳細な臨床像、各種の抗原特異免疫グロブリンの測定、抗原特異 IgG サブクラスの測定などの検討が必要であろう。

最後に二重注射法による遮断抗体価と ELISA 法による特異 IgG、IgG4 抗体価の関係について検討した。二重注射法による遮断抗体の測定には抗原として屋内塵を用いた。本来ならば ELISA と同様 Df を用いるべきであるが、現在 Df が in vitro のみの使用に限られており、また屋内塵と Df との間には共通抗原性が認め

られる¹⁵⁾ことから、今回は屋内塵を用いた。今回の成績ではIgG, IgG4抗体ともに有意の相関が認められなかった。今後更に検討の必要があろう。

結 語

小児気管支喘息児および健康児の血清について抗Df特異IgG抗体をELISA法を用いて検討した。その結果、健康児では年齢とともに特異IgG抗体の増加がみられた。一方、喘息児について検討し、減感作療法前でも健康児に比し有意に高値を示した。また、二重注射法による屋内塵に対する遮断抗体価と抗Df特異IgG, IgG4抗体との間には明らかな相関は認められなかった。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師、群馬大学小児科黒梅恭芳教授に深謝いたします。また、貴重な血清を提供していただきました群馬県立ガンセンター小児科木村利定博士、IgG RASTを行っていただきましたシオノギ製薬検査薬品部大西成雄氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 宮本昭正, 大島司郎, 石崎 達, 佐藤重雄: 室内塵とダニの抗原性の一致について 第1報 *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961 (Acarina, Psoroptidae)を用いての臨床的検討。アレルギー 17, 85-90, 1968.
- 2) 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児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.
- 3) Sakamoto, Y., Nakagawa, T., Ito, K. and Miyamoto, T.: Solid-phase radioimmunoassay for the measurement of IgG antibodies specific for the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Ann. Allergy* 52, 303-308, 1984.
- 4) Lichtenstein, L.M., Norman, P.S. and Winkler, W.L.: A single year of immunotherapy for ragweed hayfever. *Ann. Int. Med.* 75, 663-671, 1971.
- 5) 木村利定, 堤 博子, 田沢昌道, 森川昭広: 二重注射法 (double injection test) による遮断抗体の測

- 定。アレルギー 29, 1-9, 1980.
- 6) 木村利定, 今井博子: 減感作療法の研究 II. 遮断抗体の変動について。アレルギー 31, 224-232, 1982.
- 7) Engvall, E. and Pearlman, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109, 129-135, 1972.
- 8) 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.
- 9) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M. M.: Allergen-binding activity of rE, rG and rA antibodies in sera from atopic patients. In vitro measurement of reaginic antibody. *J. Immunol.* 98, 490-501, 1967.
- 10) 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 tyrosin absorbed grass pollen extract. *Clin. Allergy* 6, 429-439, 1976.
- 11) Delespesse, G., Debisschop, M.J. and Flament, J.: Measurement of IgG antibodies to house dust mite and grass pollen by solid-phase radioimmunoassay. *Clin. Allergy* 9, 503-514, 1979.
- 12) 伊藤幸治, 木谷誠一, 坂本芳雄, 宮本昭正: enzyme-linked immunosorbent assayによる喘息患者中の抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) IgG, IgA, IgM抗体の検出。アレルギー 33, 158-166, 1984.
- 13) 宇理須厚雄, 肥田康俊, 鳥居新平, 近藤 久, 富田隆夫, 近藤 謙: *Candida albicans* 菌体を固相としてRASTによる特異IgE抗体, ELISAによる特異IgG抗体の測定。アレルギー 32, 282-288, 1983.
- 14) Cheung, N.V., Blessing-Moore, J., Reid, M.J. and Yang, G.: Honey bee venom specific immunoglobulin G₄ in honey bee sting allergic patients and bee keepers. *Ann. Allergy* 50, 155-160, 1983.
- 15) Miyamoto, T., Oshima, S., Mizuno, K. and Ishizaka, T.: Cross-antigenicity among six species of dust mites and house dust antigen. *J. Allergy* 44, 228-238, 1969.

DETECTION OF SERUM IgG, IgG4 ANTIBODIES TO MITES (*DERMATOPHAGOIDES FARINAE*) IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA AND IN HEALTHY CHILDREN THROUGH THE USE OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Masamichi Tazawa and Akihiro Morikawa

Department of Pediatrics, Gunma University School of Medicine

Serum IgG antibodies to mites (*Dermatophagoides farinae*) in patients with asthma and in healthy children were studied using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The following results were obtained.

- 1) IgG antibodies to mites were estimated to increase with age even in healthy as well as asthmatic children.
 - 2) In patients with bronchial asthma, IgG antibodies to mites were higher than those of healthy children.
 - 3) There was no correlation between the titers of the blocking antibodies to house dust using the double injection method and levels of IgG, IgG4 antibody to mites in asthmatic children.
-