

〔原 著〕

抗ダニ IgE ならびに IgG 抗体検出における Dot Immunobinding の応用

高知医科大学第三内科

小林 誠

酵素抗体法による dot immunobinding を応用して、気管支喘息患者血清について抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) IgE, IgG 抗体の検出を行った。抗ダニ IgE 抗体の検出において RAST との一致率は 90.0%, ELISA との一致率は 91.3% で、いずれも高い一致率を示した。ダニ, *Aspergillus fumigatus*, ウエステルマン肺吸虫の各抗原に対する特異的 IgE 抗体の同時検出が可能であった。この結果、高 IgE 血症を伴う肺疾患の補助診断として有用である可能性が示唆された。しかし抗ダニ IgG 抗体の検出に関しては signal-to-noise ratio が低く、ELISA に有用性の点で及ばなかった。

dot immunobinding assay は操作の簡便性と cost 面で有利である反面、定量法に工夫が必要と思われた。

Key words: bronchial asthma — *Dermatophagoides farinae* — dot immunobinding — ELISA — mite-specific IgE, IgG

緒 言

対象と方法

特異的 IgE 抗体の検出は I 型アレルギーの代表的疾患である気管支喘息の診断ならびに管理に重要である。検出法としては現在 RAST (radioallergosorbent test) が主に用いられ、一部 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) も試みられている。なかでも RAST は皮内反応, P-K 反応, 吸入誘発反応との相関も良好である反面¹⁾, RI を使用したり、抗原の吸着に CNBr を必要とするため操作は簡単ではない。そこで本研究では dot immunobinding を応用した抗ダニ IgE 抗体の検出を試み、RAST, ELISA との比較を行った。また同法による抗ダニ IgG 抗体の検出を行い、ELISA と比較した。

対象は当科外来に通院中の気管支喘息患者 32 例 (16 歳-60 歳, 男 21 例, 女 11 例) を選び、総 IgE 値, RAST 検査時に同時採血し、血清を分離後 -20℃ に保存した。

(1) dot immunobinding による抗ダニ IgE 抗体の測定 (dot IgE)

方法は Derer ら²⁾ に準じて行った (Table 1)。ニトロセルローズ膜 (S & S, メンブランフィルター BA85, 0.45μm) に 5mm×5mm のグリッドを描き、*Dermatophagoides farinae* 凍乾末 (鳥居) を 0.1% BSA を含む 0.01M Tris-buffered saline: 0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl, pH7.6 (TBS) で 1mg/ml の濃度に調製し、これをダニ抗原原液 (×1) とした。ニトロセルローズ膜に抗原液を ×1, ×5, ×25 と階段希釈し、Drummond の microdispenser (5μl) を用いて 1μl ずつ滴下し、乾燥させた。その後 10% FCS を含む TBS で 37℃ blocking を行った。次に 2 倍に希釈した被験血清 1ml と 24 時間室温で incubate し、TBS で 3 回洗浄後 1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgE ヤギ血清 (Miles, Lot No. 61-133, S269) 1ml と室温 2 時間 incubate した。洗浄後 4-chloro-1-naphthol (Sigma) と H₂O₂ を加えて、室温で 15-30 分間発色させた。さらに発色後蒸留水で 1 回洗浄し乾燥させた。

(2) RAST による抗ダニ IgE 抗体の測定

Received: August 27, 1985.

Accepted: November 8, 1985.

Abbreviations: dot IgE (IgG) dot immunobinding assay for mite-specific IgE (IgG); ELISA enzyme linked immunosorbent assay; ELISA IgE (IgG) ELISA for mite-specific IgE (IgG); FCS fetal calf serum; HRP horseradish peroxidase; PAP peroxidase anti-peroxidase; PBS-Tween 20 phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 0.05% Tween 20; RAST radioallergosorbent test; TBS Tris-buffered saline (pH 7.6)

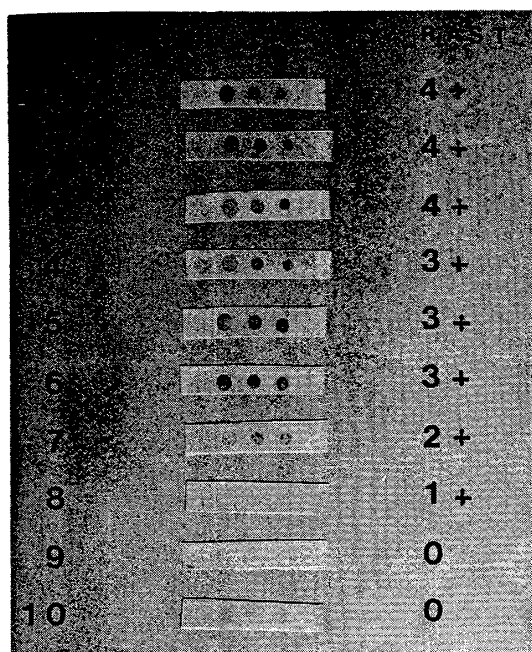


Fig. 1. The dot immunobinding assay for mite-specific IgE. dotted *D. farinae* antigen solution (1 mg/ml) was diluted 1:1(left), 1:5 (middle), 1:25 (right).

RASTはPharmacia RAST kitにより測定し、結果は半定量的に0, 1+, 2+, 3+, 4+と5段階で表示した。

(3) ELISAによる抗ダニIgE抗体の測定 (ELISA IgE)

ELISAはAliら³⁾の方法に準じてTable 2に示すごとく、(1)に用いたと同じlotのペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgEヤギ血清を使用してsingle antibody法により行った。マイクロタイタープレート(Nunc)にダニ抗原液(50 μ g/ml)100 μ lを注入し、抗原の吸着を行った(室温一晚)。blockingは10% FCSを含むPBS-Tween 20 (pH 7.4)を用い室温2時間行い、洗浄はすべてPBS-Tween 20を用いて行った。被験血清はblocking solutionにより2倍に希釈し、標識抗体は1000倍に希釈した。incubationは各100 μ l室温で各々24時間、2時間とした。発色基質にはorthophenylene-diamine (Sigma)とH₂O₂を用いて、室温8分間反応させ、2M H₂SO₄を加えて反応を停止させた。吸光度の測定は、duplicateで492nmにおいてMTP12(コナ)を用いて行った。

(4) dot immunobindingによる抗ダニIgG抗体の測定 (dot IgG)

方法はPappasら⁴⁾のdot ELISAに準じて行った。

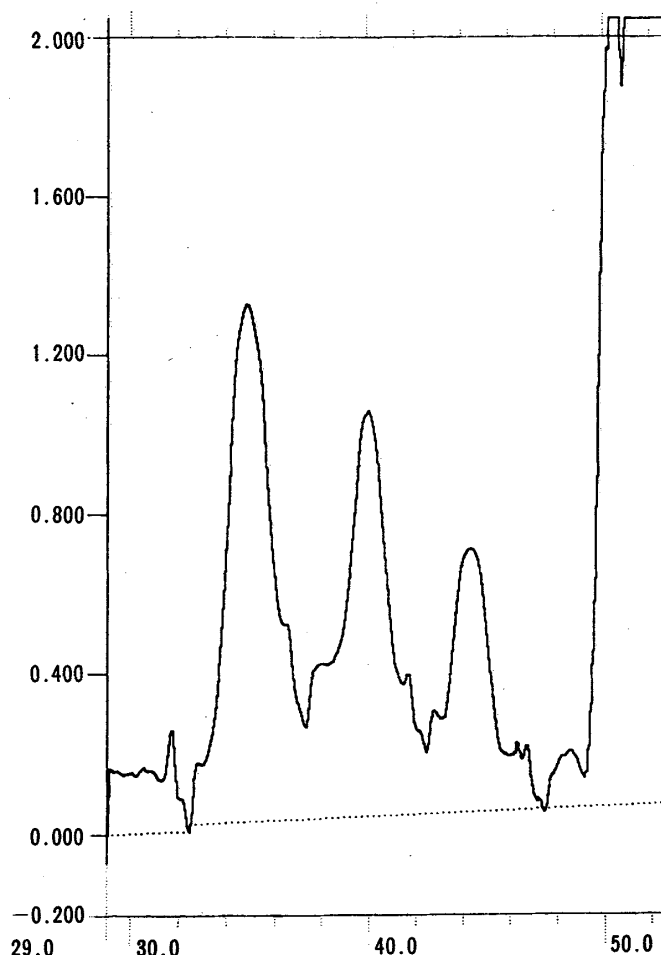


Fig. 2 Densitometry of a nitrocellulose strip (No. 5 in Fig. 1) scanned by reflectance densitometer.

すなわち、5mm×5mmのあらかじめダニ抗原液(1 mg/ml)1 μ lをdotしたニトロセルローズ膜片を、24穴のマイクロプレート(マルチプレート)のwell内に入れた。被験血清は20倍より4倍ごとに10% FCSを含むTBSにて階段希釈し、その各500 μ lを各wellに注入し、室温2時間静置した。次に0.05% Tween 20を含むTBSにて3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGヤギ血清(γ chain specific, Miles, lot No.61-130, E 085)を10% FCSを含むTBSにて1000倍に希釈して500 μ l注入し、同じく室温2時間静置した。再度洗浄後、発色は(1)に用いたと同じ4-chloro-1-naphtholとH₂O₂にて行った。結果は鮮明な青色のdotを呈する最大希釈度を抗ダニIgG抗体価としてreciprocal titerで表示した(Table 3)。

(5) ELISAによる抗ダニIgG抗体の測定 (ELISA IgG)

既報⁵⁾の抗*Aspergillus fumigatus* IgG抗体の測定に

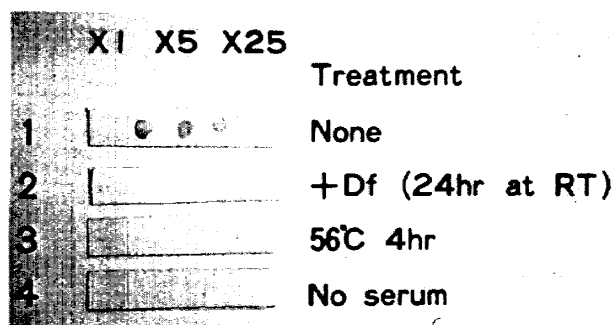


Fig. 3. Specificity of the dot immunobinding assay for mite-specific IgE. 1; a patient serum without treatment, 2; a patient serum after 24 hr incubation with *D. farinae* antigen at room temperature, 3; a patient serum after heat treatment for 4 hr at 56°C, 4; blocking solution only.

準じた。即ち (3) と同様に coat したマイクロプレートの well に 10% FCS を含む PBS-Tween 20 で 100 倍に希釈した被験血清 100 μ l を注入し、室温 2 時間静置し、PBS-Tween 20 で 4 回洗浄後、1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体 (lot No. 580208) を 100 μ l 注入し、室温 2 時間静置した。発色は para-nitrophenyl phosphate (1mg/ml) 100 μ l を加えて室温 30 分反応させた後、3M NaOH を加えて反応を停止し、型のごとく 405 nm における吸光度を duplicate で測定した。

結 果

(1) dot IgE

Derer ら²⁾の原法による 0.5 μ l の dot では被験血清の希釈倍数として 5 倍が用いられているが、本研究に用いた 1 μ l の dot では 5 倍希釈では発色に乏しく、被験血清の希釈倍数は少なくとも 2 倍以下を必要としたため、被験血清は 2 倍に希釈して測定した。標識抗体の希釈倍数については $\times 500$, $\times 1000$, $\times 2000$ の 3 段階で検討した結果、background のそまりにくい 1000 倍を至適希釈倍数と考え選択した。さらに dot に用いた抗原濃度は 1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.04mg/ml の 3 段階で比較した。Fig. 1 に示すごとく RAST 2+ 以上で青紫色の発色を認めたが、RAST 1+, 0+ と正常対照者では発色を認めなかった。また RAST 2+ の患者血清 (No. 7) では抗原希釈 1 : 1 で、1 : 5, 1 : 25 に比して発色が乏しい傾向が認められた。発色の程度は再

Table 1 Method of dot immunobinding assay for specific IgE antibody to *Dermatophagoides farinae*

- 1) *Dotting*: 1 μ l of serially diluted ($\times 1$, $\times 5$, $\times 25$) *Dermatophagoides farinae* antigen solution (1mg/ml) dotted to NC paper (5mm $\times$ 5mm grid)
- 2) *Blocking*: Dotted NC strips incubated with 10% FCS-TBS for 2hr at 37°C
- 3) *Primary incubation*: Incubate with 1ml of test sera diluted 1 : 2 in blocking solution for 24hr at RT (3 washes for 15min in TBS)
- 4) *Secondary incubation*: Incubate with 1ml of HRP-labeled goat anti-human IgE diluted 1 : 1000 in blocking solution for 2hr at RT (3 washes for 15min in TBS)
- 5) *Color development*: Develop with 4-chloro-1-naphthol and H₂O₂ for 15 - 30min at RT (wash in distilled water)
- 6) *Densitometric assay* if possible

検によっても同程度で再現性があることが窺われた。

(2) densitometric assay

densitometric assay を Fig. 1 No. 5 の strip について試みた結果を Fig. 2 に示す。2 波長クロマトスキャナー CS-930 (島津製作所) を用いて紫外吸収スペクトルを反射法で、260nm に波長を固定し測定した。

(3) dot IgE の特異性の検討

特異性検討のため被験血清 1ml に対し、ダニ抗原液 (1mg/ml) 50 μ l と室温 24 時間 incubate した。また IgE を不活化するため 56°C 4 時間の加熱処理を行った。その結果 Fig. 3 に示すごとくいずれの処理によっても発色はほぼ抑制された。

(4) 各種抗原に対する特異的 IgE 抗体の同時検出

Fig. 4 はダニ抗原, *Aspergillus fumigatus* 抗原, ウエステルマン肺吸虫抗原 (各 1mg/ml) を各々 1 μ l ずつ dot し、各患者血清と incubate した後、同様にして抗原特異的 IgE 抗体をみたものであるが、ダニ喘息、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA)、ウエステルマン肺吸虫症でそれぞれの抗原に対応して発色が認められた。

(5) dot IgE と RAST (IgE) との相関

dot IgE の結果と RAST score を比較したところ、Fig. 5 に示すごとく、RAST 1+ 以上を陽性とする両法の一致率は 30 例中 25 例 (83.3%)、RAST 2+ 以上を陽性とする 30 例中 27 例 (90.0%) となった。

(6) dot IgE と ELISA IgE との相関

抗ダニ IgE 抗体の測定を両法で比較した結果を

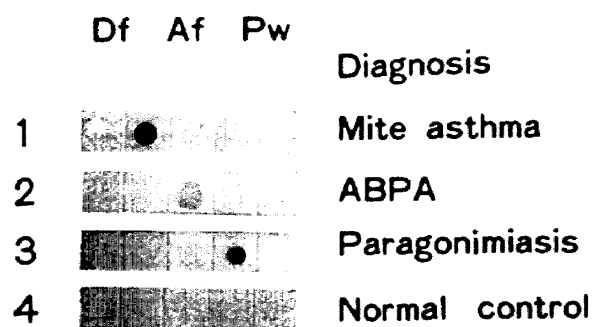


Fig. 4. Simultaneous detection for specific IgE antibodies against *D. farinae* (left), *Aspergillus fumigatus* (middle), and *Paragonimus westermani* (right). 1; a patient with mite asthma, 2; a patient with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), 3; a patient with paragonimiasis, 4; a normal subject.

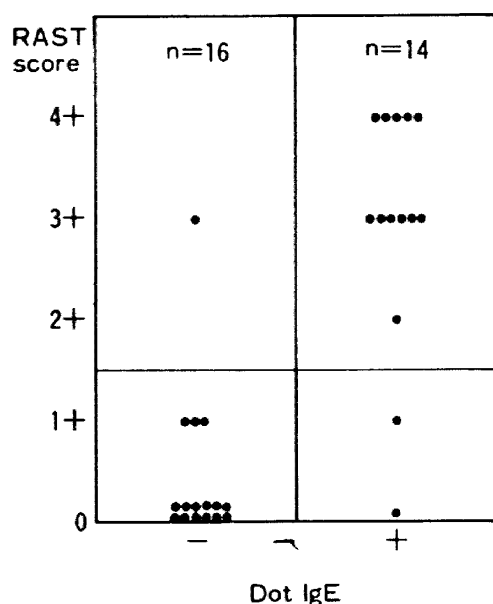


Fig. 5. Comparison between RAST and dot immunobinding assay for specific IgE antibody to *Dermatophagoides farinae*.

Table 2 Method of ELISA for specific IgE antibody to *Dermatophagoides farinae*

- 1) *Coating*: 100 μ l of *D. farinae* antigen solution (50 μ g/ml) adsorbed to microplate overnight at RT
- 2) *Blocking*: 200 μ l of PBS-Tween containing 10% FCS incubated for 2hr at RT
(3 washes in PBS-Tween)
- 3) *Primary incubation*: 100 μ l of test sera of 1:2 dilution in blocking solution incubated for 24hr at RT
(4 washes in PBS-Tween)
- 4) *Secondary incubation*: 100 μ l of HRP-labeled goat anti-human IgE of 1:1000 dilution in blocking solution incubated for 2hr at RT
(4 washes in PBS-Tween)
- 5) *Color development*: 100 μ l of substrate solution (OPD+H₂O₂) added for 8min at RT
(100 μ l of 2M H₂SO₄ added)
- 6) *Reading*: OD at 492nm by microplatephotometer

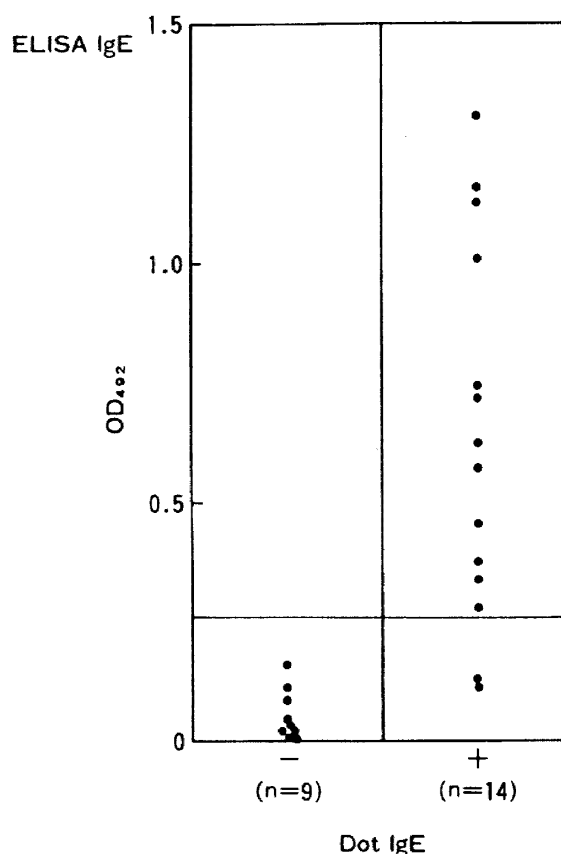


Fig. 6. Comparison between ELISA and dot immunobinding assay for specific IgE antibody to *Dermatophagoides farinae*.

— represents mean + 2SD of absorbance values for normal controls.

Fig. 6 に示す。正常対照者 (n=16) の吸光度の平均 + 2SD をこえた場合 ($OD_{492} > 0.256$) を陽性とする、ELISA IgE と dot IgE の一致率は気管支喘息患者 23 例中 21 例 (91.3%) となり、dot IgE は ELISA IgE の結果ともよく一致することが示唆された。

(7) dot IgG による抗ダニ IgG 抗体の測定

ダニ喘息患者 (MA)、非アトピー性喘息患者 (NA)、正常対照者 (NC) 各 8 名について抗ダニ IgG 抗体価をみた結果は Fig. 7 のごとくで、ダニ喘息患者で抗ダニ IgG 抗体価は高い傾向が認められたが、正常対照者で

は <20 から ×80 までの間に分布していた。

(8) ELISA IgG による抗ダニ IgG 抗体の測定

ダニ喘息患者 (n=17) の吸光度は 0.479 ± 0.446 、非

Table 3 Method of dot immunobinding assay for specific IgG antibody to *Dermatophagoides farinae*

- 1) Antigen dotted NC squares (5mm×5mm) placed in 24 well flat bottom microplate
- 2) *Primary incubation*: 500 μ l of test sera serially 4-fold diluted in 10% FCS-TBS added to each well and incubated for 2hr at RT
(3 washes in 0.05% Tween 20-TBS)
- 3) *Secondary incubation*: 500 μ l of HRP-labeled goat antihuman IgG diluted 1:1000 in 10% FCS-TBS added and incubated for 2hr at RT
(3 washes in 0.05% Tween 20-TBS)
- 4) *Color development*: Develop with 4-chloro-1-naphtol and H₂O₂ for 30min at RT
(wash in distilled water)
- 5) *Reading*: Maximum serum dilution causing the development of well defined blue dots on antigen squares considered specific IgG antibody titer to *D. farinae*

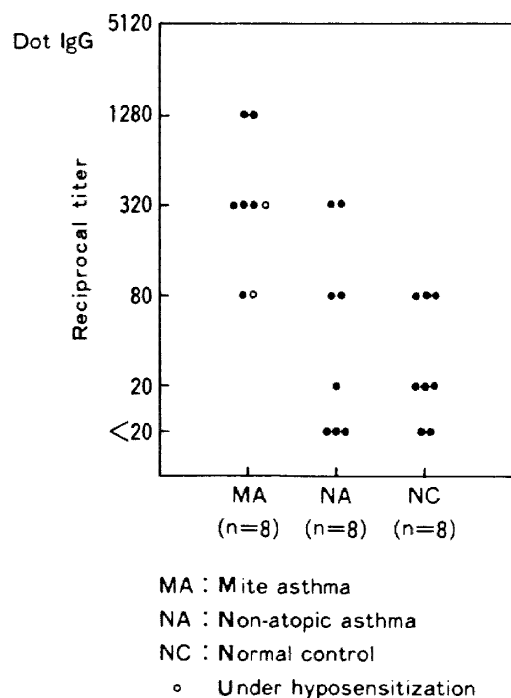


Fig. 7. Results of dot immunobinding assay for specific IgG antibody to *Dermatophagoides farinae* among patient groups. MA; mite asthma, NA; non-atopic asthma, NC; normal control, ○; patient under hyposensitization.

アトピー性喘息患者 (n=9) では 0.213 ± 0.492 , 正常対照者 (n=9) で 0.071 ± 0.088 で, ダニ喘息患者の吸光度は正常対照者に比し有意に高値を示したが ($p < 0.05$), 非アトピー性喘息患者と正常対照者の間には吸

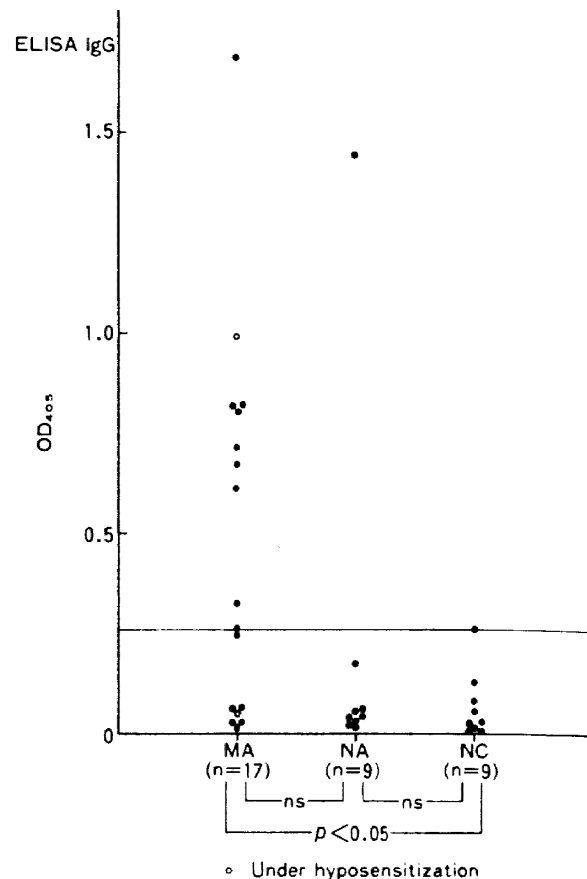


Fig. 8. Results of ELISA for specific IgG antibody to *Dermatophagoides farinae* among patient groups. MA; mite asthma, NA; non-atopic asthma, NC; normal control, ○; patient under hyposensitization, ns; not significant.

— represents mean + 2SD of absorbance values for normal controls.

光度に有意の差を認めなかった (Fig. 8). 減感作をうけていないダニ喘息患者でも抗ダニ IgG 抗体が高値をとる例がみられた。

(9) dot IgG と ELISA IgG の相関

両法で検討した23例につき成績を比較した結果を Fig. 9 に示す。ELISA IgG では正常対照者の吸光度の平均+2SD を越えた場合を陽性とし, dot IgG では reciprocal titer 80倍を越えた場合を仮に陽性と判定すると, 一致率は23例中20例 (87.8%) であった。

(10) ELISA IgE と ELISA IgG との相関 (Fig. 10)

気管支喘息患者25名について ELISA で測定した抗ダニ IgE 抗体と抗ダニ IgG 抗体の間には相関は認めなかった。

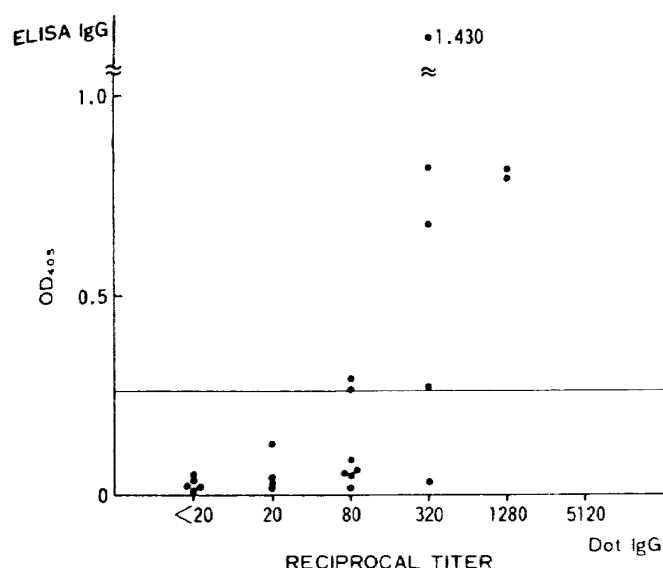


Fig. 9. Comparison between ELISA and dot immunobinding assay for specific IgG antibody to *Dermatophagoides farinae*.

— represents mean +2SD of absorbance values for normal controls.

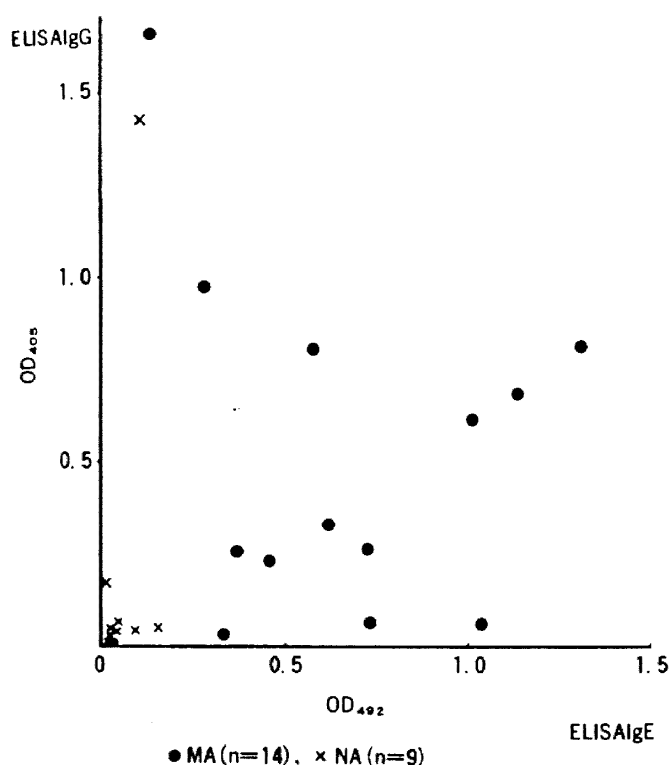


Fig. 10. Correlation between ELISA for mite-specific IgE and ELISA for mite-specific IgG. ●; mite asthma, ×; non-atopic asthma.

考 察

特異的 IgE 抗体の検出は気管支喘息の診断と治療

に重要である。現在 Wide ら⁶⁾が開発し、Ceska ら⁷⁾が改良した RAST が最も一般的な検出法であるが、RI 使用による種々の制約、CNBr による抗原吸着に伴う複雑さなどの問題がある。このため ELISA による特異的 IgE の検出が試みられている。Ali ら³⁾は抗ブタクサ IgE 抗体検出にマイクロタイタープレートを用いた indirect ELISA を開発して、比較的良好な成績を報告しているが、signal-to-noise ratio が低いことから種々の感度を上げる試みがなされている⁸⁾⁹⁾。double antibody 法は非特異的反応の関与が予想される上に、background の上昇にもつながることから、必ずしも良好な signal-to-noise ratio が達成されるとは限らない¹⁰⁾。さらに fluoroimmunoassay の導入も試みられており、抗ヒト IgE モノクローナル抗体と fluoroimmunoassay をくみあわせた IgE FASTTMが検討されている¹¹⁾。

最近 Derer ら²⁾は Hankes ら¹²⁾が考案した dot immunobinding assay がモノクローナル抗体を用いなくても抗体特異的 IgE 抗体の検出に有用であると報告しており、今回ダニ喘息患者につき *Dermatophagoides farinae* に対する IgE 抗体の検出に同法を応用し、有用性の有無を検討した。抗原の吸着は既述のごとく簡単であるが、後で densitometric assay を行うためにはクロマトスキャナーが直線的に走査する場合正確な位置づけが必須である²⁾。検出感度は dot の大きさに依存する。すなわち本研究で行った抗ダニ IgE 抗体の検出に関しては被験血清は 2 倍希釈が検出に適當であったが、0.5 μ l の dotting では 5 倍希釈で検出が可能であった。

Hankes らは dot の抗体濃度は 0.1mg/ml-1.0mg/ml の間が至適であると述べているが¹²⁾、抗原過剰の場合 Fig. 1 No. 7 の strip にみられるごとく反応を減る場合が予想されるため、抗原濃度の選択に関しては慎重な対応が必要と考えられた。

また基質としては発癌性の点で問題がなく、background がそまりにくい 4-chloro-1-naphthol が最もよいと思われるが、発色後退色しやすい欠点があり、さらに安定な基質の開発と早急な定量法の確立が期待される。しかし Ali ら¹³⁾の ELISA についての報告にみられるのと同様、本法においても陽性血清と陰性血清は画然と区別しうるようであり、操作の簡便性、cost が安価なことを考慮に入れた場合、抗ダニ IgE 抗体を all or none で判定する方法としては、今回の検討でも十分に有用であることが窺われた。また RAST で

score 1+は臨床的にあまり意義がないとされており¹⁴⁾, RAST 2+以上を陽性とする dot IgE と RAST の一致率は90.0%であり, dot IgE と ELISA IgE では91.3%で, いずれも高い一致率を示した。

Walsh ら¹⁵⁾は小麦粉など4抗原についてニトロセルローズ・ポリディスクを用いた特異的 IgE 抗体の検出を PAP 法による amplification により行って良好な成績を報告しているが, 操作がその分だけ繁雑となるため本研究では採用しなかった。しかし今後検討を加えるべき問題と考えられる。結果に示した如く, PAP 法によらなくてもダニ, *Aspergillus fumigatus*, ウエステルマン肺吸虫に対する特異抗体を同時に検出しえ, 高 IgE 血症を伴う肺疾患の補助診断に有用である可能性が示唆された。

一方抗ダニ IgG 抗体検出の面では, 必ずしも dot immunobinding assay の有用性が示されたとはいえない。これは抗体価を reciprocal titer で表示したこと, 抗ヒト IgG 抗体がポリクローナル抗体であったことが影響していると思われる。また抗ダニ IgE 抗体に関しては正常者では IgE 産生に抑制機構が働いている反面¹⁶⁾, 抗ダニ IgG 抗体に関しては抑制機構を欠き, さらに日常的に環境の中で暴露されているため正常者でも抗ダニ IgG 抗体を一部の人に検出できることと関連しているのかもしれない¹⁷⁾¹⁸⁾。しかし抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体を用いた ELISA IgG では良好な signal-to-noise ratio がえられたことを考えると, 寄生虫疾患⁹⁾, ウイルス疾患¹²⁾の診断におけるのに比して, 抗ダニ IgG 抗体検出に関しては本法の有用性は乏しいと考えざるをえず, 今後の検討課題と思われる。

結 論

(1) 抗ダニ IgE 抗体の検出において, dot IgE は RAST (IgE), ELISA IgE とほぼ同等の感度を有し, スクリーニングなどには臨床的に有用であることが示唆された。長所としては操作が簡便であること, 同時に各種の抗原に対する抗体を検出できる点が挙げられるが, 定量法に関しては工夫が必要と思われた。

(2) 抗ダニ IgG 抗体の検出においては dot IgG は ELISA IgG に比べ有用性を認め難く, むしろ ELISA IgG が signal-to-noise ratio が高く, 定量性に秀れていた。

稿を終えるに臨み, 御指導・御校閲を賜った三好勇夫教授, ならびに技術的な助言を頂いた矢野昭起博士に深謝致します。

本論文の要旨は第25回日本胸部疾患学会総会(名古屋)において発表した。

本研究の一部は昭和60年度文部省科学研究費(一般研究 C)の援助を受けた。

文 献

- 1) 伊藤幸治: レアギンの検出法, “新免疫学叢書 7 免疫とアレルギー”(畔柳武雄, 大高裕一, 松橋 直編), 医学書院, 東京, pp. 58-85, 1979.
- 2) Derer, M.M., Miesher, S., Johansson, B., Frost, H. and Gordon, J.: Application of the dot immunobinding assay to allergy diagnosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 24, 85-92, 1984.
- 3) Ali, M., Ramanarayan, M., Connell, J.T., Nalebuff, D.J., Fayemi, A.O. and Mesa-Tejada, R.: An immunoperoxidase assay for serum ragweed-specific IgE. *Ann. Allergy* 42, 231-235, 1979.
- 4) Pappas, M.G., Hajkowski, R. and Hockmeyer, W.T.: Dot enzyme-linked immunosorbent assay; a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* 64, 205-214, 1983.
- 5) 小林 誠: enzyme-linked immunosorbent assay による抗アスペルギルス (*Aspergillus fumigatus*) IgG 抗体の検出—抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体の応用を中心に, アレルギー 34, 162-172, 1985.
- 6) 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.
- 7) Ceska, M., Eriksson, R. and Valga, J.M.: Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 49, 1-9, 1972.
- 8) Metzger, W.J., Butler, J.E., Swanson, P., Reinanders, E. and Richerson, H.B.: Amplification of the enzyme-linked immunosorbent assay for measuring allergen-specific IgE and IgG antibody. *Clin. Allergy* 11, 523-531, 1981.
- 9) Rao, P.V.S., McCartney-Francis, N.L. and Metcalfe, D.D.: An avidin-biotin micro ELISA for rapid measurement of total and allergen-specific human IgE. *J. Immunol. Methods* 57, 71-85, 1983.
- 10) Voller, A., Bidwell, D.E. and Grundy, S.: Aspects of enzyme-linked immunosorbent as-

- says (ELISA) for infectious diseases. In "Immunoenzymatic Techniques" (eds. by S. Avrameas, P. Druet, R. Masseyeff and G. Feldmann), Elsevier, Amsterdam, pp. 263-271, 1983.
- 11) Seltzer, J.M., Halpern, G.M. and Tsay, Y.-G.: Correlation of allergy test results obtained by IgE FAST™, RAST, and prick-puncture methods. *Ann. Allergy* 54, 25-30, 1985.
 - 12) Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J.: A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119, 142-147, 1982.
 - 13) Ali, M., Nalebuff, D.J., Ramanarayanan, R., Fayemi, A.O. and Mesa-Tejada, R.: Assay of IgE antibodies against June and Timothy grasses by an immunoperoxidase technique. *Clin. Allergy* 10, 203-209, 1980.
 - 14) 信太隆夫：喘息とアレルギー。"気管支喘息治療のポイント" (山村雄一編)，南山堂，東京，pp. 39-63, 1984.
 - 15) Walsh, B.J., Wrigley, C.W. and Bald, B.A.: Simultaneous detection of IgE binding to several allergens using a nitrocellulose 'polydisc'. *J. Immunol. Methods* 66, 99-102, 1984.
 - 16) Deguchi, H., Suemura, M., Ishizaka, A., Osaki, Y., Kishimoto, S., Yamamura, Y. and Kishimoto, T.: IgE class-specific suppressor T cells and factors in humans. *J. Immunol.* 131, 2751-2756, 1983.
 - 17) 伊藤幸治，木谷 誠，坂本芳雄，宮本昭正：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。アレルギー 33, 158-166, 1984.
 - 18) 阿部達也，石井 明，吉原明子：ヤケヒョウヒダニ精製アレルギーの酵素抗体法への応用—特異 IgE, IgG 抗体の測定。アレルギー 34, 284-288, 1985.

THE DOT IMMUNOBINDING ASSAY FOR SPECIFIC IgE AND IgG ANTIBODIES TO *DERMATOPHAGOIDES FARINAE*

Makoto Kobayashi

Department of Medicine, Kochi Medical School

The dot immunobinding assay for specific IgE and IgG antibodies to *D. farinae* was performed on serum samples from patients with bronchial asthma with the use of peroxidase labeled anti-human IgE and IgG goat sera.

The dot immunobinding assay for mite-specific IgE showed a good correlation with both RAST (90.0% concordance) and ELISA (91.3% concordance) and appeared to have sensitivity comparable to RAST and ELISA. Simultaneous detection for specific IgE against *D. farinae*, *Aspergillus fumigatus*, and *Paragonimus westermani* antigens in a single nitrocellulose strip was possible and this may be helpful for the diagnosis of pulmonary diseases with elevated serum IgE levels.

The dot enzyme-linked immunosorbent assay was applied for the detection of mite-specific IgG. The reciprocal titer of mite asthma patients seemed to be greater than that of normal controls which ranged from ≤ 20 to 80. However, ELISA for mite-specific IgG using monoclonal anti-human IgG was more sensitive and gave a higher signal-to-noise ratio than dot-ELISA.

In conclusion, the dot immunobinding assay is technically simple, of low cost, and useful for screening allergen-specific IgE positive sera. However, the technique is rather qualitative and needs improvement to make it more quantitative.