

Phadezym RAST® による血清中の特異 IgE 抗体の検出

京都大学医学部小児科学教室

四宮敬介

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay — Phadezym RAST®
— radioallergosorbent test

(受付: 12月3日, 1981)

はじめに

Wide らにより開発された radioallergosorbent test (RAST) は抗原に対する特異 IgE 抗体を半定量的に検出したり, 抗原相互間の交叉抗原性の検討あるいは抗原力価の標準化などの用途に確立した手技として認められている. Pharmacia 社より発売されている RAST キットは日常診療の中で広く応用されている. この手技は極めて容易で再現性に富むが, 難点としては高価であること, 特異 IgE 抗体の検出に放射性同位元素で標識された2次抗体が使用されているために使用場所や使用期間が限定されること, 放射性同位元素で標識した抗体が安定性に欠けることなどがあげられる. Engvall と Perlmann²⁾ は放射性同位元素の代りに酵素を用いた抗体の標識法 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を開発した. この手技はその後の検討により放射性同位元素を用いた場合と同等の鋭敏度があることが判明し, このたび Pharmacia 社により Phadezym RAST® という名称で kit が完成された. 今回は, この Phadezym RAST® と従来の RAST との相関性や使用時の問題点について検討を行った.

方法および対象

1. 原理

RAST の場合と同じ各種の抗原を結合させた濾紙ディスクを用いる. これに被検血清をかぶせて3時間室温で

インクベートしたのち, Tween 20 を含む0.9%食塩水で3回洗浄する. この時抗原ディスク上には抗原特異抗体が結合しているが, これに β -galactosidase で標識した抗 IgE 抗体を作用させ, overnight のインクベートののち再度洗浄する. ついでこの酵素に対応する基質である o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を加えて37°C, 2時間インクベートしたのち酵素反応を停止し, 生じた o-nitrophenyl による発色の程度を420nm の吸光度により測定する.

2. 測定方法

測定方法の実際は表1に示すとおりである. reference ディスク (従来の RAST と同一のもの) および被検血清について調べたい抗原のディスクを1枚ずつプラスチックチューブに入れる. 各々の抗原について duplicate で行う. これらのチューブに reference 群には reference 血清の A, B, C, D を, それ以外のものには被検血清を各々50 μ l ずつ入れる. 室温で3時間放置したのち, 1l の0.9%食塩水に Tween 20 を20ml 溶解した洗浄液により, 1回2.5ml ずつ10分間隔で3回洗浄する. 次に酵素標識した抗 IgE 抗体を50 μ l ずつ入れ, アルミ箔で覆い室温で overnight (16-20時間) インクベートする. 再び前回と同様に2.5ml の洗浄液により10分間隔で3回洗浄する. この時, 最後に洗浄液が残らないように完全に吸引除去することが重要である. ここに基質の溶解液200 μ l を加える. この時 blank として2本の新しいチューブにもこの液をとっておく. 37°Cに調節した water bath 内で正確に2時間インクベートしたのち反応停止液1000 μ l を加える. この時 blank のチューブにも加えることを忘れてはならない. この blank を対照として各チューブの発色の程度を420nm の吸光度により測定する.

3. 結果の判定

各検体につき duplicate で測定した2つの値の平均値

Abbreviations: A⁴²⁰ absorbance at 420nm; **ALT** *Alternaria*; **CM** cow's milk; **DP** *Dermatophagoides pteronyssinus*; **ELISA** enzyme-linked immunosorbent assay; **EW** egg white; **RAST** radioallergosorbent test; **STD** standard serum

表 1 実験方法

チューブ No.	ディスク	血清	量 μ l	インク ペー ション	洗浄	酵素標識 抗 IgE 抗体 μ l	インク ペー ション	洗浄	基質溶液 μ l	インク ペー ション	反応停止 液 μ l	測定
0	blanc	—	—	—	—	—	—	—	200	—	1000	420nm で 吸 光 度 測 定
1-2	Ref.	Ref. A	50	室	洗	50	室	洗	200	37°C	1000	
3-4	Ref.	Ref. B	50	温	浄	50	温	浄	200	—	1000	
5-6	Ref.	Ref. C	50	—	液	50	16	液	200	2	1000	
7-8	Ref.	Ref. D	50	3	2.5	50	1	2.5	200	時	1000	
9-10	DP	患	50	時	ml	50	20	ml	200	間	1000	
11-12	EW	者	50	間	で	50	時	で	200	—	1000	
13-14	ALT	血	50	—	3	50	間	3	200	—	1000	
15-16	CM	清	50	—	回	50	—	回	200	—	1000	
17-18	⋮	—	50	—	—	50	—	—	200	—	1000	
19-20	⋮	—	50	—	—	50	—	—	200	—	1000	
⋮	⋮	—	⋮	—	—	⋮	—	—	⋮	—	⋮	

Ref.: reference. DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*.EW: egg white. ALT: *Alternaria*. CM: cow's milk.

をとる. score は reference A の示す吸光度以上のものを4, AとBの間のものを3, BとCの間のものを2, CとDの間のものを1, 以下のものを0とする.

4. 対象

京都大学小児科アレルギー外来に通院中の患児のうち鳥居薬品の診断用アレルゲンによる皮内反応結果がハウスダスト陽性者15例, 陰性者15例, 卵白陽性者10例, 陰性者10例, 牛乳陽性者10例, 陰性者10例, アルテルナリア陽性者10例, 陰性者10例, 合計90例を random に選択しそれらの血清について検討を試みた.

同一血清について同時に RAST kit を用いて RAST score を判定した. なおハウスダストに関しては Phadezym RAST® および RAST ではダニ抗原のうちの *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP) を用いて検討した. 吸光度の測定は島津ダブルビーム分光光度計 UV-190を用いた.

結 果

1. Phadezym による被検血清の score が1以上を示したものを陽性として, 皮内反応の結果との一致性を検討した(図1). χ^2 検定の結果, 卵白で有意の相関(有意水準5%)を示したがそのほかの抗原では有意の相関を認めなかった.

2. RAST と Phadezym による同一血清を用いて夫

Phadezym RAST(DP)

皮内反応 (HD)		+	-
	+	14	1
	-	9	6

$X^2=2.98$

Phadezym RAST(EW)

皮内反応 (EW)		+	-
	+	5	5
	-	0	10

$X^2=4.27$

Phadezym RAST(CM)

皮内反応 (CM)		+	-
	+	4	6
	-	0	10

$X^2=2.81$

Phadezym RAST(ALT)

皮内反応 (ALT)		+	-
	+	0	10
	-	0	10

図1. 抗原別皮内反応の結果と Phadezym RAST との相関.

々の抗原に対する score を判定した結果の相関について検討した(図2). DP について結果の極端に異なる例が1例認められた(Phadezym による score が4であるのに RAST による score が0であった). これは再検したが同様の結果であったので原因については不明であった. 全体の score の相関は極めて高く, 相関係数 $r=0.958$ ($p<0.001$) であった.

3. 酵素と基質の反応に関わる第3段階のインクペーション時間の影響をみるために, 標準血清Aを RAST バッファーで倍数希釈し, reference ディスクと反応さ

	4	1				19
	3			1	1	5
	2			3		
	1	1		1		
	0	55	3			
Phadezym						
RAST	0	1	2	3	4	

$r=0.958$ ($p<0.001$)

図2. Phadezym RAST と RAST による同一血清を測定した時の score の相関.

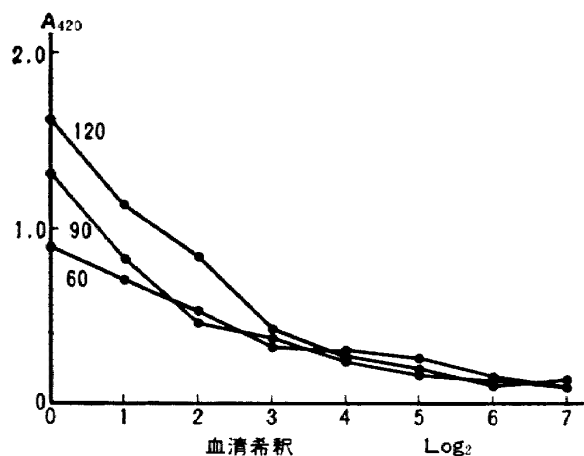


図3. 酵素と基質の反応におよぼすインキュベーション時間の影響.

標準血清 A を 1 倍希釈し, reference ディスクと反応させ, 第3段階の酵素と基質とのインキュベーションを60分, 90分, 120分と変化した時の標準曲線の変化を示す. 8 倍希釈以上の希釈ではインキュベーション時間の影響はみられなかったが, 特異抗体の濃度の高い部分ではインキュベーション時間の長いほど明確な差が得られた.

せたのちに, 37°C の water bath 中で60分間, 90分間, 120分間のインキュベーションをしたのちに反応を停止し, 吸光度を測定し比較した (図3). 血清希釈がすすんで特異 IgE 抗体が少なくなった段階ではそれほどでもなかったが, IgE 濃度の高い部分ではインキュベーション時間の影響が大きく出た. 本法の基準的な使用方法での120分間のインキュベーションでは標準血清 A の原血清の場合420nm での吸光度は平均値 ± 1 標準偏差 $= 1.55 \pm 0.14$ であった.

4. 標準血清 A, DP に対する score が4の血清, 卵白に対する score が4のものを選り RAST バッファーにより倍数希釈を128倍まで行い Phadezym にて測定した. 標準血清および卵白に対する血清では16倍までの希釈ではほぼ直線的に吸光度は下降したが, 32倍以上の希釈では変化はなだらかになり, 標準曲線は逆S字状となった (図4). 特異 IgE 抗体価の高い血清 (DP に対する血清) では, 16倍希釈までは吸光度2.0以上を示し, 32倍, 64倍希釈の部分ではじめて直線関係が得られた.

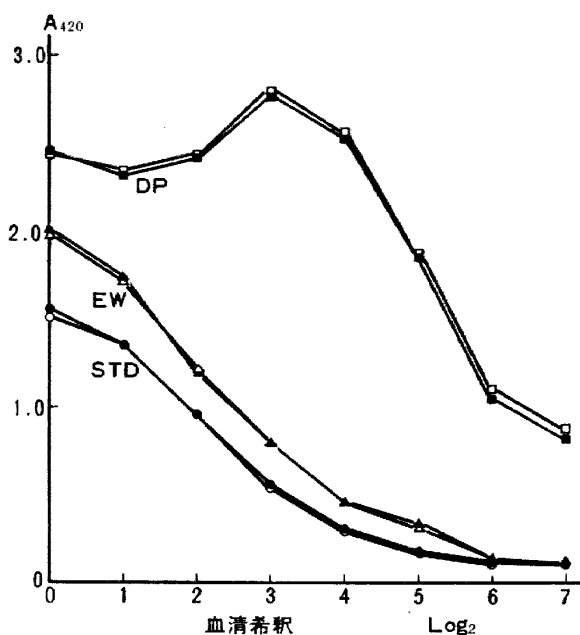


図4. 血清希釈試験と1日放置後の吸光度の変化. 標準血清 A, EW への score 4 の血清, DP への score 4 の血清を夫々倍数希釈して吸光度を測定した. ●—●, ▲—▲, ■—■は反応停止後直ちに吸光度を測定した. ○—○, △—△, □—□は反応停止後24時間室温に放置したのちに吸光度を測定した.

5. 本法では, 手技の最後に酵素の基質に対する反応を停止してのち直ちに反応液の発色の程度を吸光度で測定することになっている. 反応停止液を加えたのち検体を室温に放置すると吸光度に変化が起こるか否かを検討した (図4). 血清希釈の際に検体を quadruplicate に準備し, 最初の2本は反応停止後直ちに吸光度を測定し, 残りの2本はアルミ箔で覆い24時間室温に放置したのちに吸光度を測定し, 前者の値と比較した. 測定値はほぼ完全に一致し, score 判定に影響をおよぼすような吸光度の変化はみられなかった.

考 案

2次抗体の標識に放射性同位元素を用いた RAST では放射能測定のための高価な機械が必要であり使用場所にも制限がある。そのほか使用期限の限定、放射能による蛋白質の変性などの問題もある。この点 β -galactosidase を用いた ELISA を応用した Phadezym RAST® では使用する実験器具も特殊なものは不要であり、使用場所の制限から解放されるばかりでなく、保存期間もはるかに長く安定性が保たれる。最も肝腎な点である測定結果についても score 判定を行うかぎりでは RAST に遜色なく、両者の相関性は極めて高かった。鳥居薬品のアレルゲンによる皮内反応の結果と本法による特異 IgE 抗体の判定の間には卵白の場合を除いて有意の相関を認めず、前回 RAST において検討した結果³⁾と全く一致した。これは皮内反応に用いた抗原と RAST で用いる濾紙ディスクに結合された抗原の間に差異があること、あるいは濾紙上に結合させることによって抗原の抗原性になんらかの変化が生じた可能性があること、前回の検討では皮内反応よりも PK 反応の結果との一致性が高かったことより、皮内反応に含まれる生体反応としての曖昧さなどが原因しているものと推測された。この点については RAST キットの検討の際に詳しく行っており、今回の Phadezym RAST® は RAST と根本的に異なる点といえば、2次抗体の標識法の部分のみで使用する抗原ディスク、緩衝液、洗浄液などは同一であるため今回はこの点に関する検討は割愛した。本法の定量性に最も影響すると思われるのは、抗 IgE 抗体に標識した酵素による人工基質の分解の程度に関わる第3段階でのインキュベーションである。標準血清 A の倍数希釈を用いて標準曲線を描く時に、この第3段階のインキュベーションで37°Cの温度を一定にしてインキュベーション時間を60分、90分、120分と変化させて標準曲線を描いてみると、8倍希釈以上の希釈では時間の影響がみられなかったが、120分のインキュベーション時間では特異 IgE 抗体の濃度に応じた変化を明確にとらえる標準曲線が得られた。なお、標準血清 A の原血清を用いた37°C、120分間のインキュベーション後の吸光度は $m \pm \sigma = 1.55 \pm 0.14$ であった。標準血清 A、卵白に対する score が4であった血清、DP に対する score が4であった血清を倍数希釈して標準血清を描くと、原血清の吸光度が1.5ないし2.0の間にくる標準血清 A、卵白に対する score が4の血清では希釈と共に16倍希釈まではほぼ直線関係が得

られたが、DP に対する score が4であった血清では16倍希釈まで吸光度は2.0以上を示した。また標準血清 D (標準血清 A を50倍希釈したもの) の吸光度の上下で判定する score 1 あるいは0の定量性については、吸光度の差が有意差があるとはいえず score 1 は特異 IgE 抗体が有意に存在するとは判定しない方がよい。また score 4 と判定される群でも希釈をしてみると、吸光度の低下がみられにくいものや容易に低下してくるものがあることから、本法での特異 IgE 抗体量の定量性はきわめて曖昧であると考えられる。

本法では第3段階の酵素と基質の反応が37°C、120分間のインキュベーションののち、反応停止液を加えて停止されたのち直ちに吸光度を測定することになっている。この検体を24時間室温で放置した場合に吸光度の変化が起こるか否かの検定では全く変化は認められなかったもので、分光光度計の都合で測定が遅れても結果の判定には影響がない。またデータは示していないが、本 kit を3カ月間冷蔵庫に保存したのち使用してみたところ判定は全く変化がなかった。

最後に、本法は酵素反応を用いているため実験の途中で阻害因子の関与してくる可能性が考えられるが、緩衝液、抗 IgE 抗体の凍結乾燥品、基質およびその溶解液、反応停止液などが全て準備されていてどここの施設で用いても阻害物質の混入する可能性はきわめて少ない。洗浄液や緩衝液の調整に用いる精製蒸留水の純度に配慮すれば充分である。被検血清中に含まれるもので β -galactosidase と o-nitrophenyl galactoside の反応に対して影響をおよぼす可能性のあるものとしては、Gatti⁴⁾ によれば sphingosine, fatty acid, ceramide, β -galactonolactone, galactose などがあるが、血清は第1段階のディスクとのインキュベーションののちには0.9%食塩水で洗浄除去されるので第3段階の酵素反応の段階まで影響をおよぼすことはないと考えてよい。

まとめ

1. ELISA を応用した Phadezym RAST® は、特異 IgE 抗体の検出において RAST と極めて高い相関性を示した。
2. 第3段階のインキュベーションである酵素と基質の反応は、37°C、2時間正確に行うのがよい。この時の標準血清 A の吸光度は 1.55 ± 0.14 のあたりになる。反応停止液

を加えたのちの420nm による吸光度の測定は24時間検体を室温に放置したのちでも変化がなかった。

3. Phadezym は放射性同位元素を用いないために使用場所の制限がない。また保存に対する安定性もよく、冷蔵庫での3ヵ月間の保存では結果の判定に影響をみなかった。

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) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 817-874, 1971.

3) 四宮敬介: radioallergosorbent test (RAST) によるアレルギー診断法. 最新医学 **30**, 2213-2229, 1975.

4) Gatt, S.: β -galactosidase from rat brain EC 3.2.1.23 β -D-galactoside galactohydrolase. *Methods Enzymol.* **14**, 156-161, 1969.

DETECTION OF SPECIFIC IgE ANTIBODIES BY PHADEZYM RAST®

A Newly Developed Kit Using the Method of Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay (ELISA)

Keisuke Shinomiya

Department of Pediatrics, Kyoto University

Phadezym RAST® is a newly developed kit for an in vitro immunoassay to detect circulating specific IgE antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The working principle of the kit is identical with that of Phadebas RAST®. The reactions take place between the specific IgE antibodies in the test sample and the coupled antigen on the paper disc. After the reaction, the specific IgE antibodies are detected by a specific antibody against human IgE (Dc2) labelled with a marker enzyme. The evaluation of this kit at this time is focused on the correlation between the results with this kit and with Pharmacia RAST® and the reproducibility of the results.

Test sample sera were collected randomly from asthmatic children on the basis of the results of skin tests. The correlation between the results of skin tests and Phadezym RAST® was not so good as with Phadebas RAST®. However, the results with this kit and Phadebas RAST® correlated well ($r=0.958$, $p<0.001$). The effect of the incubation time in the third incubation where the reaction between the enzyme labelled on the anti IgE antibody and the substrate proved that two-hour of incubation at 37°C is most appropriate. To maintain reproducibility of results, it is important to keep the incubation time accurately in the third incubation. It was proved that the color change induced by the enzymatic reaction was stable overnight at room temperature after the addition of the stop solution.