

Sephadex 結合抗体を使用する IgE の radioimmunoassay 法の検討

蒲 生 鉄 男*

I. 結 言

γ E は 1966 年石坂ら¹⁾²⁾により枯草熱患者血清中に reagin 活性の carrier として発見され仮に命名された免疫グロブリンである。その後まもなく Johansson ら³⁾⁴⁾は myeloma 蛋白 IgND を発見した。 γ E と IgND 両者は同一クラスの免疫グロブリンであることが確認され⁵⁾, IgE または γ E は新しい免疫グロブリンのクラスとして世界的に承認されることになった⁶⁾。

血清 IgE 値の測定は、すでに 1967 年 Johansson⁷⁾が彼の発見した IgND を用いて solid phase radioimmunoassay により行っている。radioimmunoassay に使用した標識 IgE のための精製 IgE は IgE myeloma から得ているが、世界でも IgE myeloma 患者はなお数例しか発見されておらず、ことに日本では入手できなかったためこの定量法は一般には行い得なかった。そのため、抗 IgE を使った Mancini ら⁸⁾の方法による single radial immunodiffusion およびその感度を上げるために改良された 2~3⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾の方法が行われているが、感度が低いこと、感度を上げるには操作が煩雑すぎることに小児期、特に乳幼児期の低い血清 IgE 値の検討には満足し得ないものであった。

著者は Sephadex 結合抗体¹²⁾を使用する IgE radioimmunoassay (Phadebas IgE test Pharmacia 社製)について検討する機会を得たので、その成績を報告する。

II. 測 定 法

本法は immunosorbent の担体として Sephadex を使う solid phase radioimmunoassay である。すなわち抗

* 大阪大学医学部小児科学教室

受付：47 年 9 月

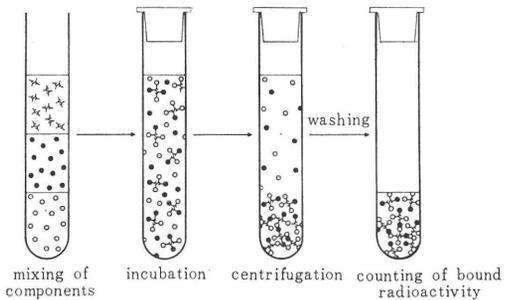
別刷請求先：大阪市福島区堂島浜通 3 丁目 1 (〒553)

大阪大学医学部小児科学教室

蒲生鉄男

IgE 抗体は Sephadex 粒子に結合¹²⁾されているために、反応終了後は単なる遠心沈澱操作によって結合した標識 IgE を分離することができる(図 1)。1 kit は 50 検体用で Sephadex-anti IgE complex, IgE standard, ¹²⁵I 標識 IgE および buffer はすべて使用時に蒸留水に溶解することにより調製できるようになっている。IgE standard 及び被検血清の稀釈には全てこの buffer を使用した。なお 1 kit 中の ¹²⁵I 標識 IgE は IgE 量ほぼ 75 単位*, ¹²⁵I 量は製造日において 3.7 μ Ci である。

- 1) 標準 IgE 溶液または被検血清の適当な稀釈液 0.1 ml を disposable tube (シオノギチューブ) にとる。



S = Sephadex particle } Sephadex-Anti-IgE complex
 - = IgE antibody
 ● = labelled IgE (IgE-¹²⁵I)
 ○ = unlabelled IgE (IgE standard and/or unknown sample)

図 1 測定原理

* IgE の単位は WHO の Reference Standard 68-341 を基準にし、この血清中の IgE 濃度を 1,000 U/ml とされている。IgE 1 単位は約 1 ng と考えられていた¹⁾が、最近 IgE 1 単位は 2.42 ng に相当するという報告²⁾もあり、IgE 1 単位の重量単位はまだ確定されていない。なお IgE (IgND) の分子量は 196,000 とされている³⁾。

- 1) Ishizaka, K., et al.: J. Immunol., **105**, 1459, 1970.
- 2) Bazaral, M. et al.: J. Allergy Clin. Immunol., **49**, 189, 1972.
- 3) Johansson, S. G. O. et al.: Immunology, **13**, 381, 1967.

- 2) ^{125}I 標識 IgE を含む溶液 0.1 ml を各 tube に加える。
- 3) 抗 IgE 抗体結合 Sephadex 溶液 1 ml を各 tube に加える。
- 4) 各 tube に栓をし, Sephadex 粒子が沈澱しないように rotator で毎分約 25 回転させながら incubate する。この incubation の適当な温度および時間については検討を行った。
- 5) 2,000 rpm (約 800 G) で 2 分間遠心沈澱する。栓をとって再び遠心沈澱する。
- 6) 管底に沈澱した Sephadex 粒子を吸引しないように注意しながら tube の底から 5 mm 以上の上清を吸引してすてる。
- 7) 生理食塩水 2 ml を加えて, 再び遠心沈澱し 6) と同様の方法で上清を除くことにより洗滌する。
- 8) 操作 7) をさらに 2 回くり返す。
- 9) well type scintillation counter (Aloka 製 auto-well) で各 tube の radioactivity を測定する。
- 10) O sample 時の結合した ^{125}I IgE の計数率 (B_0) または total ^{125}I IgE の計数率 (T) に対する標準 IgE および被検血清の計数率 (B) の比 (B/B_0 または B/T) を計算する。
- 11) 片対数グラフを用いて横軸に IgE 濃度の対数をと, 縦軸に上記の計数率比をプロットして標準曲線を作成する。
- 12) 標準曲線より各被検血清の IgE 濃度を読みとる。

III. 検討成績

1. incubation の条件

37°C, 室温 (19°C~25°C) 及び 4°C について比較した (図 2)。反応は検討した範囲では温度の高い場合ほど早く, 37°C の場合が最大であった。37°C と室温での incubation の場合の B_0/T はよく似た増加曲線を示し, 両者共 4°C の場合にくらべ 21 時間までは増加率が大きであるが 2 日以後の増加率は小さい。4°C の場合は反応は遅いが, 3 日目には 37°C 及び室温の曲線に近づいてくる。したがって反応速度からだけ見れば 37°C がよいが, 室温との B_0/T の差は 21 時間で 1.3%, 45 時間で 1.7% の差にすぎず, 室温での incubation で十分である。又, 室温 incubation の場合の標準曲線から, incubation 時間が長いほど曲線の傾斜が急になり standard deviation が減少する傾向にあったが (図 3), 2 日間 (44 時間) 以上での B_0/T の増加率の減少から 2 日間

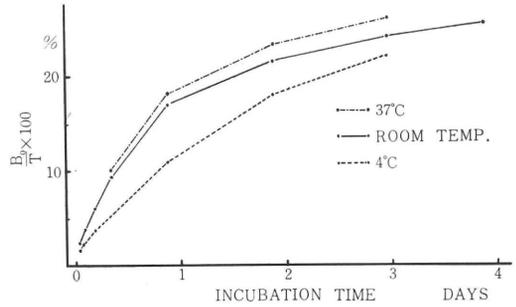


図 2 ^{125}I IgE と抗体との結合の時間的關係

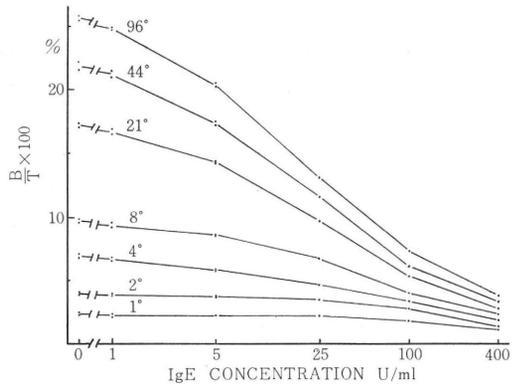


図 3 反応時間による標準曲線の変化 (室温)

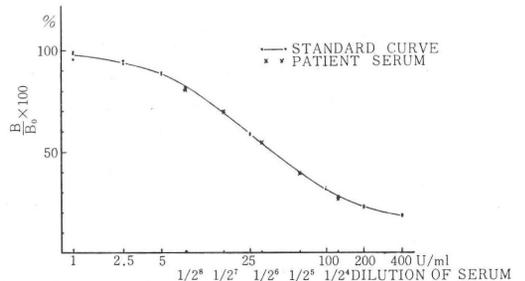


図 4 標準曲線と稀釈高 IgE 濃度患者血清 (室温 24 時間 incubation)

以上の incubation では時間の割には曲線の傾斜が増大しない為に室温 2 日間の incubation が適当である。

2. 被検血清の稀釈の影響

図 4 は 24 時間室温 incubation の場合の標準血清と高 IgE 血清の稀釈系列とを同一グラフにプロットしたものである。高 IgE 血清の稀釈系列による阻害曲線のスロープは標準血清による曲線のそれによく一致した。

図 5 は稀釈血清の IgE 値を測定し, 測定結果に対して稀釈倍数を掛けることによって原血清中の IgE 濃度を

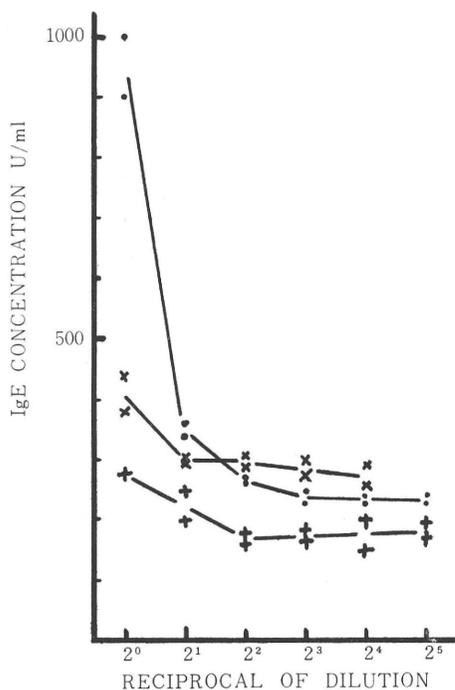


図 5 血清 IgE 測定値に及ぼす稀釈の影響

求め、縦軸に IgE 濃度；横軸に稀釈倍数をとったものである。ほぼ 2^2 倍稀釈以下の稀釈率の低い場合には血清 IgE 値は高値を示した。原血清と 11 倍稀釈血清について、反応系に終末濃度 0.01 M の EDTA を加えたものと加えないものとで測定したが、EDTA 添加によって原血清の異常高値は改善されなかった (表 1)。

3. single radial immunodiffusion 法との比較

同一血清について、ヘキスト社製パルチゲン γ E により、single radial immunodiffusion 法⁸⁾で測定した IgE 値と本法で測定した IgE 値を比較した。ただし、single radial immunodiffusion 法の感度の関係で被検血清の IgE 濃度は 1,000 U/ml 以上のものを使用した、両方法による測定値はよく一致している (表 2)。

4. 回収試験

11 倍稀釈被検血清に稀釈標準血清を等量添加して duplicate で測定し回収率を調べた (表 3)。結果は高濃度でやや高くなる傾向があるが最低 98%、最高 116%、平均 104.4% であった。

5. 測定誤差及び再現性

2 日間 (44 時間) 室温で incubate し、稀釈標準血清を triplicate で測定して標準曲線を作成し、その作成し

表 1 原血清及び稀釈血清の IgE 測定値に及ぼす EDTA 添加の影響 (EDTA 最終濃度 0.01 M)

method	without EDTA		with EDTA	
	undiluted serum (U/ml)	diluted serum ($\times 11$) (U/ml)	undiluted serum (U/ml)	diluted serum ($\times 11$) (U/ml)
M. S.	385 \pm 5	86.9 \pm 0.8	173 \pm 18	85.3 \pm 13.8
K. N.	>400	3,795 \pm 165	>400	3,795 \pm 495
S-5	360 \pm 20	242 \pm 33	445 \pm 35	234 \pm 3
T. G.	>400	228 \pm 3	>400	226 \pm 22

表 2 radioimmunoassay 法及び single radial immunodiffusion 法での血清 IgE 測定値の比較

method	radioimmunoassay method		single radial immunodiffusion method
	reciprocal of serum dilutions	IgE values (U/ml)	IgE values (U/ml)
K. O.	$\times 121$	9,815 \pm 235	9,750
H. T.	$\times 121$	3,515 \pm 305	3,880
K. K.	$\times 242$	3,510 \pm 120	3,900
H. M.	$\times 121$	3,510 \pm 0	3,700
A. Y.	$\times 66$	2,475 \pm 35	2,450

表 3 一定量の検体に各種濃度の標準 IgE 血清を添加した際の回収率

添加 IgE 量	U/ml	測定値	U/ml	理論値	U/ml	回収率	%
0		32.0 ± 2.0					
5		37.3 ± 2.7		37.0		101	
12.5		43.8 ± 3.2		44.5		98	
25		58.0 ± 2.0		57.0		102	
50		84.5 ± 0.5		82.0		103	
100		140.0 ± 13.0		132.0		106	
200		270.0 ± 30.0		232.0		116	

表 4 同一稀釈標準血清を triplicate で測定した場合の測定誤差

IgE concentration of measured standard serum (U/ml)	obtained IgE values (U/ml)			mean ± S. D. (U/ml)	S. D./mean (%)
2.5	2.0	2.5	2.9	2.47 ± 0.37	15.0
5	4.4	4.7	5.5	4.87 ± 0.46	9.5
10	9.3	10.5	11.0	10.27 ± 0.71	6.9
25	23.0	24.0	25.5	24.17 ± 1.03	4.3
100	97	100	105	100.7 ± 3.30	3.3
200	200	200	205	202.5 ± 2.50	1.2
400	370	380	410	386.7 ± 17.0	4.4

た標準曲線から逆に IgE 値を読みとることによって測定値のばらつきを見た (表 4). IgE 値の高濃度と低濃度において誤差が大きくなる傾向があった. これは標準曲線が IgE の高濃度と低濃度の所で傾斜がゆるやかになるためであるが, 最も誤差の大きかったのは検討した最低濃度 2.5 U/ml の所で, 誤差は 15% であった.

又, 同一検体を 11 倍稀釈し, duplicate で 8 回測定した場合の再現性は 177.7 ± 15.2 U/ml (177.7 U/ml ± 8.5%) であった.

IV. 考 案

正常人血清中 IgE 濃度は非常に低いので, 通常 single radial immunodiffusion⁸⁾ 法では成人正常値を測定することが出来ず, 感度を上げるのに種々考案されている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾が, それでも 50~100 U/ml 位までが限度でかつ測定に日数を要する. radioimmunoassay が IgE 値の測定によい方法である⁷⁾が, 精製 IgE が得にくいために, 一般に行われなかった.

Phadebas IgE test は Sephadex 粒子に抗体を結合させた solid phase radioimmunoassay¹²⁾ であって, 第 2 抗体の必要がなく, 簡便である点ですぐれている.

incubation の条件の検討の結果, 37°C incubation が最も反応が早かったが, 室温 incubation との差は小さ

く, 実際には室温での incubation の方が便利でよい. また反応時間は長いほど Bo/T が上った. しかし, 室温 incubation 2 日間以後は反応の速度が比較的遅くなるので室温 2 日間の incubation が適当である.

普通第 2 反応の段階に原因があると考えられているが, 2 抗体法においては血清原液での測定値は異常高値を示すことが知られている¹³⁾. 本法では第 2 反応が使われていないにもかかわらず, 血清原液では 2 抗体法の場合とよく似た異常高値が見られた. 2 抗体法の場合には EDTA 添加によって, この現象を抑えられる¹⁴⁾が, 本法では EDTA 0.01 M を加えても, この現象には全く影響を与えなかった. 又, Sephadex 結合抗体を使用する iusulin の solid phase radioimmunoassay ではこのような現象がみられない¹⁵⁾. さらに, 著者等^{16), 17)}は被検血清に人血清アルブミン結合 bromoacetylcellulose を加え, 4°C 20 時間 incubate することにより, 血清原液でも本法での IgE 測定の際に異常高値を与えない様になることを報告している. すなわち, 本法の血清原液での異常高値は Sephadex 結合抗体を使用する solid phase radioimmunoassay の一般的な性質ではなく, 血清中の何らかの成分による反応の阻害又は標識 IgE の damage に対する影響によると考えられる. 健康成人血清の IgE に関しては諸家の報告はほぼ一定しているが, 低レ

ベルのため血清原液での測定が必要となる新生児血清の IgE 値についてはいまだ一定しない。Sephadex 結合抗体を使用する radioimmunoassay によって、健常新生児臍帯血清 IgE 値を Johansson¹⁸⁾ は 36.3 ng/ml (この場合 1 ng はほぼ 1 U), 著者等¹⁷⁾ は 2.45 U/ml, bromoacetylcellulose 結合抗体法で Bazaral 等¹⁹⁾ は 2.1 U/ml, 2 抗体法で Stevenson 等²⁰⁾ は 39.3 ng/ml (1 ng はほぼ 1 U) と報告している。これら報告値の一定しない原因は人種の差によるとも考えられるが、異常高値を与えるものが血清中に存在することがこの様な大きな相違を与える主因ではないかと考えられる。いずれにしても、single radial immunodiffusion 法との比較成績から、血清を十分に稀釈した場合には両方法での測定値はよく一致した。また、稀釈血清の測定結果から、異常高値を抑えるには 2³ 倍以上の稀釈血清で測定することが必要であることが判った。

V. 結 論

Sephadex 結合抗 IgE 抗体を使用する IgE radioimmunoassay kit を検討し、次の結果を得た。

1. incubation の条件は室温 2 日間が適当である。
2. 原血清では異常高値を与えるので、被検血清は 8 倍以上の稀釈血清で測定する必要がある。
3. 8 倍稀釈血清を使用し、室温 2 日間 incubation した場合の検知限界は誤差 15% 以内で 20 U/ml である。

本法は再現性、回収率共に良好で、簡単な操作により臨床的に問題となる IgE 濃度範囲を測定できるすぐれた方法である。

(Phadebas IgE test を提供いただいた塩野義製薬株式会社に深謝します)

文 献

- 1) Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Hornbrook, M. M.: Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.*, **97**. 75. 1966.
- 2) Ishizaka, K. & Ishizaka, T.: Identification of γ E antibodies as a carrier of reaginic activity: *J. Immunol.*, **99**. 1187. 1967.
- 3) Johansson, S. G. O. & Bennich, H.: Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*, **13**. 381. 1967.

- 4) Johansson, S. G. O., Bennich, H. & Wide, L.: A new class of immunoglobulin in human serum. *Immunology*, **14**. 265. 1968.
- 5) Bennich, H. et al.: A comparative antigenic study of γ E-globulin and myeloma-IgND. *J. Immunol.*, **102**. 884. 1969.
- 6) Bennich, H., Ishizaka, K., & Johansson, S. G. O., Rowe, D. S., Stanworth, D. R. & Terry, W. D.: Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **38**. 151. 1968.
- 7) Johansson, S. G. O.: Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. *Lancet*, *ii*. 951. 1967.
- 8) Mancini, G., Carbonara, A. & Hermans, J.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, **2**. 235. 1965.
- 9) 多田富雄, 高橋英則: IgE の測定法, Indirect single radial immunodiffusion method. 免疫実験操作法 p. 209. 日本免疫学会編, 1971.
- 10) 伊藤幸治: IgE の測定法 (¹²⁵I 法), 免疫実験操作法 p. 201. 日本免疫学会編, 1971
- 11) Centifanto, Y. M. et al.: A simplified method for measuring human IgE. *J. Immunol.*, **107**. 608. 1971.
- 12) Wide, L & Porath, J. : Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex coupled antibodies. *Biochim, biophys. Acta*, **130**. 257. 1966.
- 13) Morgan, C. R., et al.: Studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay system. *Diabetes.*, **13**. 1. 1964.
- 14) Morgan, C. R., et al.: Further studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay system. *Diabetes*, **13**. 579. 1964.
- 15) 森下寿々枝等: 固相法によるインスリン測定. 最新医学, **27**. 1037. 1972.
- 16) 蒲生鉄男, 豊島協一郎, 西田勝: RIST での低レベル IgE 値測定に関する検討: 第 22 回日本アレルギー学会総会, 大阪, 1972.
- 17) 蒲生鉄男, 西田勝, 豊島協一郎: RIST の検討とそれによる健常小児血清 IgE 値について: 第 9 回小児アレルギー研究会, 東京, 1972.

- 18) Johansson, S. G. O. : Serum IgND levels in healthy children and adults. *Int. Arch. Allergy*, **34**. 1. 1968.
- 19) Bazaral, M., Orgel, H. A. & Hamburger, R. N. : IgE levels in normal infants and mothers and an inheritance hypothesis. *J. Immunol.*, **107**. 794. 1971.
- 20) Stevenson, D. D., Orgel, H. A. et al. : Development of IgE in newborn human infants. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **48**. 61. 1971.

Summary

Studies on radioimmunoassay for IgE by the use of Sephadex-coupled antibodies

Tetsuo GAMO

Department of Pediatrics, School of Medicine, Osaka University

Determination of IgE level in serum by radioimmunoassay have not been carried out in Japan until very recently, since purified preparation of IgE for radioiodination has not been available.

Recently, the author had opportunity to use the radioimmunoassay kit (Phadebas IgE test, manufactured by Pharmacia AB) consisting of Sephadex-coupled anti-IgE antibodies, ^{125}I -IgE and standard serum containing IgE as reference.

In the present study, some optimal conditions in the reactions using the radioimmunoassay kit were investigated.

1) The optimal conditions for incubation were found to be at room temperature for 2 days in practical use.

2) IgE values obtained from diluted serum samples more than 8-fold by the radioimmunoassay were consistent with those obtained by single radial immunodiffusion method.

Undiluted serum samples, however, yielded higher values than those obtained with diluted serum samples. These higher values from undiluted serum samples were not influenced by the addition of 0.01 M EDTA. Thus, it may be recommended that test serum samples should be diluted more than 8-fold prior to the radioimmunoassay.

3) The IgE concentration as low as 20 U/ml could be measured within 15% error by this radioimmunoassay. The recovery rate was 104.4% (98~116%).