

《ノート》

二抗体法 RIA による IgE 測定法

Measurement of IgE by Double Antibody Radioimmunoassay

島村 正道* 松本 知明** 吉岡 毅** 原田 義孝**

Masamichi SHIMAMURA*, Tomoaki MATSUMOTO**, Kowashi YOSHIOKA**
and Yoshitaka HARADA**

*College of Medical Science, Kumamoto University

**Department of Pediatrics, Institute of Constitutional Medicine, Kumamoto University

I. はじめに

免疫グロブリン E (IgE) の微量測定には、現在、二抗体法¹⁻⁵⁾、Paper radioimmunosorbent test (PRIST) 法⁶⁻¹⁰⁾、2-stage method^{11,12)}、酵素免疫測定法^{13,14)}、など¹⁵⁾が用いられているが、実際、われわれが kit を入手でき、容易に測定できるのは PRIST 法のみである。

近年、気管支喘息をはじめとするアトピー性疾患における免疫学的立場からの臍帯血中の IgE 量、唾液、母乳、尿などの体液中の IgE 量の測定、ヒトリンパ球を用いての in vitro 法による IgE 産生解析など、微量の IgE を正確に測定する必要が生じてきた。しかしこれらの IgE 量は、1 U/ml 以下のこともあり、PRIST 法で測定するには、濃縮操作を必要とすることもある。実際、臍帯血や母乳は 1 U/ml 以下という報告^{9,12)}もあり、また、ヒトリンパ球を 2×10^6 個培養した場合に産生される IgE 量は、0.2 U/ml 程度のこともあり、このレベルの測定は容易でなかった。また、二抗体法

を用いる場合には、¹²⁵I-IgE を自らラベルしなければならず、困難な問題が多かった。

そこで、われわれは、微量 IgE を正確に測定するために、二抗体法による測定を全て市販の製品を用いて行い、基礎的検討と PRIST 法による成績との比較をしたので報告する。

II. 測定材料および方法

1. 標準 IgE および検体

Phadebas IgE Test Kit (Pharmacia) または PRIST Kit (Pharmacia) の標準 IgE を Kit の操作手順に従い溶解する。Fig. 1 の如く、buffer を用いて、各濃度に稀釈し、0.1 ml 各チューブにとる。測定検体も 0.1 ml ずつとり、duplicate もしくは triplicate で測定する。

2. 抗 IgE 血清

Behringwerke 社 (Lot 1023 A) Anti-human IgE (Rabbit) を buffer を用いて、Fig. 1 の如く感度に応じて稀釈する。これを 1 のチューブに各 0.1 ml 加え、室温で 24~48 時間インキュベーションする。

3. ¹²⁵IgE

Phadebas IgE Test Kit (Pharmacia) ¹²⁵I-IgE を kit の操作手順に従い溶解する (IgE としての総量約 150 ng)。buffer を用いて、IgE としての濃度

Key words: Double antibody radioimmunoassay, IgE, Anti-IgE, ¹²⁵I-IgE.

* 熊本大学医療技術短期大学部

** 同 体質医学研究所小児体質学研究部

受付: 56年11月30日

最終稿受付: 57年9月6日

別刷請求先: 熊本市九品寺 4-24-1 (☎862)

熊本大学医療技術短期大学部

島村 正道

3~5 ng/ml となるように希釈する。これを1のチューブに各0.1 ml 加え、室温で24~48時間インキュベーションする。

4. 抗ウサギ γ -globulin 血清

Behringwerke 社 (Lot 150106 A) Anti-rabbit γ -globulin (Goat) を、Fig. 1 の如く、buffer を用いて希釈し、1のチューブに各0.1 ml 加える。さらに、未免疫のウサギ血清を buffer で200倍に希釈し、各チューブに0.1 ml 加える。これを4°Cで、24~48時間インキュベーションする。

5. 遠沈・洗浄

各チューブに、生食水2 ml を加え、4°C, 3500 rpm で30分間遠沈する。遠沈後、上清を、アスピレーターを用いて、沈澱物を吸引しないように、管底より5 mm のところまで、吸引・除去する。この操作を2回繰り返す。

6. 測定・標準曲線の作成

シンチレーション・オートガンマーを用いて、各チューブ3~5分測定する。えられたカウント数より、片対数グラフの対数目盛にIgE濃度、整

数目盛に百分率をとり、標準曲線を作成する。

7. PRIST 法による測定

Pharmacia 社 PRIST Kit の操作手順に従い実施した。なお、二抗体法との比較の際の標準IgEは、同一Lotを用い、インキュベーション時間は、第1インキュベーション6時間、第2インキュベーション24時間とし、生食水による洗浄は5回実施した。

III. 成績

1. 抗IgE血清の希釈

抗IgE血清の希釈が標準曲線におよぼす影響を検討するために、希釈率を、10,000倍、40,000倍として実施した。Fig. 2は、抗IgE血清添加後、24時間インキュベーションした時の標準曲線である。図から明らかなように、40,000倍希釈の方が、低濃度域での直線域からの読み取りが正確にでき、10,000倍希釈の5~8倍の感度を示した。これは、Merretらの報告と同様な結果であった⁴⁾。

2. インキュベーション時間

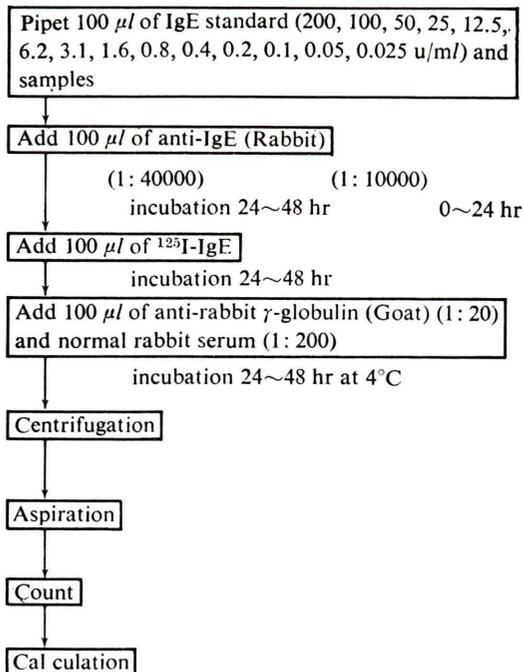


Fig. 1 Assay procedure.

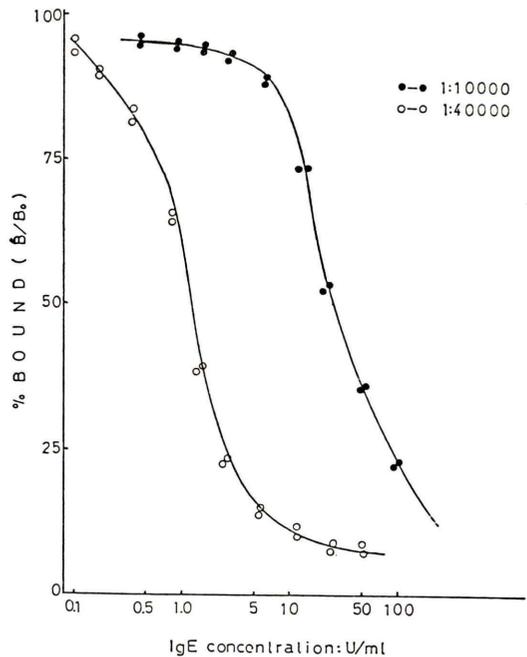


Fig. 2 IgE standard curve of double antibody radioimmunoassay.

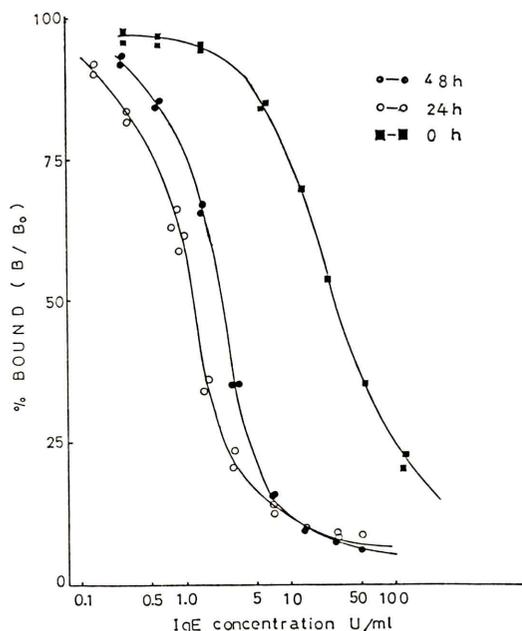


Fig. 3 Effect of incubation time on standard curve of double antibody radioimmunoassay.

抗 IgE 血清希釈を 40,000 倍とし、抗 IgE 血清添加後のインキュベーションを室温(10°C~25°C)で、0, 24, 48 時間と変化させて実施した (Fig. 3)。24, 48 時間のインキュベーションでは、標準曲線の直線域は、ほとんど変化なく、0.5 U/ml 以下での読取りが可能であった。インキュベーション時間 0 の場合は、直線域が、4 U/ml 以上からになり、2 U/ml 以下は読取り不可能であった。したがって

24時間のインキュベーションが必要である。

3. ¹²⁵I-IgE

Phadebas IgE Test Kit (Pharmacia) の ¹²⁵I-IgE の総放射能が約 2.5 mCi であり、IgE としての総量が 150 ng 程度である。本実験では、1 検体あたり IgE 濃度として、3~5 ng/ml (放射能 0.05~0.08 mCi) を用いた。Merret, Gleich らは、IgE 濃度として 1 ng/ml 以下で実施しているが^{1,3)}、本実験では、1 ng/ml 以下であれば、測定時間を 10 分以上とらねば、測定精度は上がらず実用的でない。IgE 濃度 5 ng/ml 以上とすれば、測定時間は 3 分で十分であり、安定した成績がえられた。

4. 再現性

異なる 5 回の測定でえられた抗 IgE 血清、40,000 倍希釈の場合の標準 IgE について、再現性を検討した。IgE 濃度 0 のカウント数 (Bo) で、各 IgE 濃度のカウント数 (Bi) を除した値 (%) の 5 回の平均値、標準偏差、変動係数を Table 1 に示した。変動係数 (C.V) は 0.5~13% と濃度依存が認められた。

5. PRIST 法との比較

本法による測定値と PRIST 法による測定値を比較するために、同一検体を PRIST 法により測定した。Phadebas PRIST Kit による標準曲線を Fig. 4 に示す。両者の測定値を 1 U/ml 以下、1~5 U/ml、5 U/ml 以上と 3 段階に分けて、Fig. 5-1、Fig. 5-2 に示した。40,000 倍希釈の場合は、2 U/

Table 1 Reproducibility of IgE standard curve

IgE level	No of assay					Mean	SD	CV
	1	2	3	4	5			
50 U/ML	10.7	8.3	7.4	8.3	9.4	8.81%	1.12	12.8
25	12.1	11.1	8.7	11.0	10.0	10.58	1.15	10.8
12.5	12.5	11.3	11.0	11.5	13.3	11.92	0.85	7.2
6.2	15.7	17.5	14.5	17.3	16.8	16.35	1.11	6.8
3.1	24.9	27.0	22.7	25.8	25.0	25.08	1.40	5.6
1.6	46.0	42.5	38.5	44.1	41.1	42.46	2.57	6.0
0.8	66.8	65.8	63.6	65.6	65.5	65.46	1.04	1.6
0.4	84.2	81.8	83.0	82.6	81.1	82.54	1.06	1.3
0.2	93.9	90.2	89.3	92.1	91.5	91.40	1.58	1.7
0.1	95.7	93.8	94.5	95.7	95.9	95.12	0.83	0.8
0.05	96.9	97.3	98.2	98.1	98.0	97.70	0.51	0.5

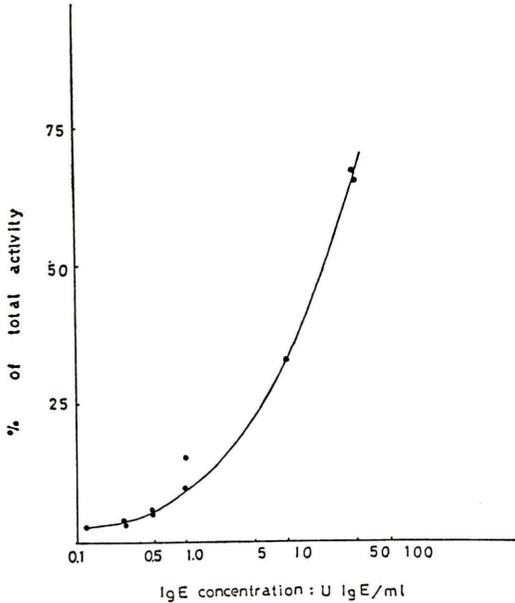


Fig. 4 Standard curve of Phadebas PRIST Kit.

mI 前後で最もよく一致し、5 U/ml 以上では、PRIST 法による測定値が高くなる。1 U/ml 以下になると、本法による測定値が急に高くなり、相関も悪くなる。10,000 倍希釈の場合は、10 U/ml 前後で最もよく一致し、高濃度域になるにつれ、PRIST 法による測定値が高くなる傾向にあった。これらはいずれの場合も、Merret らの高濃度域までの安定した相関とは、やや異なる結果であった³⁾。

IV. 考 案

近年、各種アレルギー疾患における IgE の意義を解明するために、血清 IgE 量の測定に加え、各種体液中の IgE 量の測定、ヒトリンパ球を用いての in vitro 法による IgE 産生解析が行われるようになり、これら相互の関連性を知ることは、きわめて興味ある問題である。

しかし、臍帯血、各種体液、ヒトリンパ球を用いての in vitro による IgE 産生解析などにおける IgE 量は、きわめて微量であり、正確に測定することは困難が多かった。実際、これらの IgE 量は、研究者、測定方法によりさまざまであり、

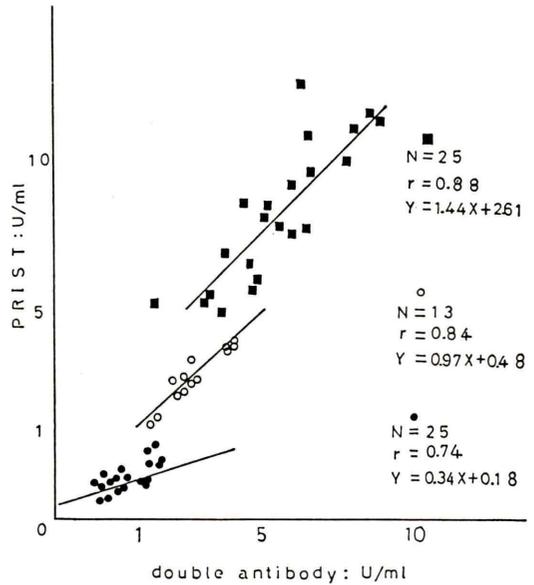


Fig. 5-1 Relationship between values measured by PRIST Kit and double antibody radioimmunoassay (1: 40,000).

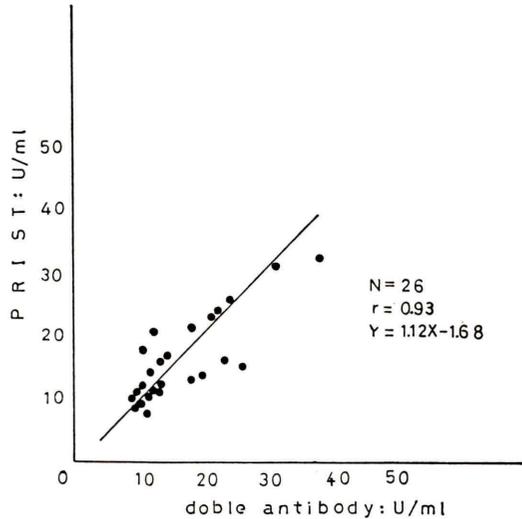


Fig. 5-2 Relationship between values measured by PRIST Kit and double antibody radioimmunoassay (1: 10,000).

臍帯血では、PRIST 法で、Johansson らは 0.4 U/ml⁸⁾、平松らは 0.5 U/ml 以下で測定不能⁹⁾、RIST 法で、上田らは 6 U/ml¹⁰⁾、母乳では、

PRIST 法で, Gleich, 平松らはともに 1 U/ml 以下, RIST 法で, 120~690 U/ml と大きな違いを示している⁹⁾. したがって, 微量の IgE 量の測定法を確立することは, きわめて大切な問題である.

わが国においては, 低濃度域の IgE 量の測定は, Phadebas PRIST Kit が主に用いられ, 信頼性も高く, すぐれた報告がなされている. しかし, 今回, われわれが目的としたような 1 U/ml 以下のデータ解析する場合には, 標準曲線の直線域からの読取りが容易でない場合もあり, また, 濃縮操作を行えば, 誤差を生じやすいこともある.

今回, われわれが試みた二抗体法は, 全て市販の製品を用いているために, ¹²⁵I による IgE のラベルの問題も解消し容易に測定できる利点がある. また, 低濃度域での標準曲線の直線性も満足ゆくものがえられ, PRIST 法との相関も, Fig. 5-1, Fig. 5-2 の如く, 狭い範囲に限ってみれば, 良好な結果が認められた.

最後に, 本法は, PRIST 法に比べ, 操作, インキュベーションともに, 2 回多く必要とするが, 1 U/ml 以下の微量 IgE の測定にも十分利用でき, 臍帯血, 唾液, 尿などの体液中の IgE 量, 小児における微量血液からの血清レベルの IgE 量, の測定に, 十分役立つものと思われる.

V. おわりに

市販の製品を用いて, 二抗体法による IgE 測定法が確立できた. その測定範囲は, 抗 IgE 血清の希釈で自由に選択できる利点があり, とくに, 低濃度域での測定に役立つものと考えられた.

文 献

- 1) Gleich GJ, Averbeck AK, Swedlund HA: Measurement of IgE in normal and allergic serum by radioimmunoassay. *J Lab Clin Med* 4: 690-698, 1971
- 2) Lynn nye, Merret TG, Landon J, White RJ: A detailed investigation of circulating IgE levels in a normal population. *Clin Allerg* 1: 13-24, 1975
- 3) Merret TG, Merret J: Method of quantifying circulating IgE. *Clin Allerg* 8: 543-557, 1978
- 4) 中田重俊, 他: 微量 IgE 測定の研究: 第 9 回臨床免疫. 学会抄録集, 170, 1981
- 5) 中田重俊, 他: 微量 IgE 測定の研究: 第 31 回アレルギー. 学会抄録集, 548, 1981
- 6) Kjellman NI M, Lanner A, Roth A: Predictive value of serum IgE level during rush hyposensitization. *Clin Allerg* 7: 465-471, 1977
- 7) Matsumoto T, Yoshioka K, Miyamoto Y, et al: IgE biosynthesis and IgE bearing cells in atopic and normal peripheral blood. *Ann Allerg* 47: 47-51, 1981
- 8) Johansson SGO, Berglund A, Kjellman NIM: Comparison of IgE values as determined by different solid phase radioimmunoassay method. *Clin Allerg* 6: 91-98, 1976
- 9) Ceska M, Lundkvist U: A new simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 9: 1021-1030, 1972
- 10) 平松宏之, 吉田政己, 上田雅乃, 他: Paper disc を用いた radioimmunoassay (PRIST) 法の検討について. *臨床免疫* 7: 755-762, 1978
- 11) 宮本力, 大河内賢一, 三宅有: 体液中の IgE 測定. *アレルギー* 24: 773-779, 1975
- 12) Johansson SGO, Bennich H, Wide L: A new class immunoglobulin in human serum. *Immunology* 14: 265-272, 1968
- 13) 近江徹広, 無江秀次, 井田志郎, 他: ELISA 法による血中 IgE 値の測定について. 第 31 回アレルギー学会抄録集, 550, 1981
- 14) 星恵子, 高橋秀仁, 小林清美, 他: 総 IgE および特異 IgE 抗体のビーズ ELISA 法 Phadezyme 法. 第 31 回アレルギー学会抄録集, 549, 1981
- 15) 蒲生鐵男: 低レベル血清 IgE 値の測定法の検討. *アレルギー* 22: 693-698, 1973
- 16) 上田雅乃, 鳥居新平, 吉田政己, 他: 健康小児の免疫グロブリン値. *臨床免疫* 9: 165-172, 1977

1) Gleich GJ, Averbeck AK, Swedlund HA: Measure-