

《原 著》

## モノクローナル抗体を用いた高感度 IgE イムノラジオ メトリックアッセイの開発

坂本 春喜\* 今井 淳子\* 飯沼 一茂\* 早川 進\*  
柳川 佳信\* 池田 獻\* 倉田 邦夫\*

**要旨** われわれは、mouse monoclonal antibody (McAb) を用い、高感度で、従来にない広い測定範囲をもつヒト血中 IgE 測定用 immunoradiometricassay (IRMA) を開発した。本 IgE IRMA は、IgE の Fc 部を認識する McAb をポリスチレンビーズ固相化抗体に、また  $^{125}\text{I}$  標識抗 IgE McAb には、Fab 部を認識する McAb を使用した、いわゆる Two-site-sandwich method による IRMA である。この測定系は、ヒト血清 IgM, IgG, アルブミンとの交差反応率がそれぞれ、 $6.2 \times 10^{-6}$ ,  $1.9 \times 10^{-6}$ ,  $6.2 \times 10^{-7}$  % と特異性が極めて高く、かつ測定感度が  $6 \times 10^{-4}$  IU/tube、測定範囲が 0.01~20 IU/tube と高感度で、広測定範囲を持つことが特徴である。測定再現性も変動係数 (CV%) で 2.2~4.3 と良く、Phadebas IgE PRIST, Pharmacia IgE RIA との比較では、 $y = 1.12x - 0.19$  ( $r = 0.96$ )、および  $y = 0.97x - 5.9$  ( $r = 0.97$ ) とそれぞれ良好な相関を示すことを認めた。

### I. はじめに

IgE クラスの抗体は、アレルギー疾患において主要な役割をはたしている<sup>1)</sup>。したがって、血中 IgE を測定することは、アトピー性アレルギー疾患の診断に重要となっている<sup>2,3)</sup>。一方、寄生虫感染のような場合にも、血中 IgE の上昇が認められ<sup>4)</sup>、IgE 測定の有用性が指摘されている。さらに近年、小児科領域においても新生児のアレルギー疾患の将来的予知が可能との知見も報告され、血中 IgE 測定の重要性が認識されつつある<sup>5,6)</sup>。

これまで、血中 IgE の測定には、radioimmunoassay, enzyme linked immunosolbentassay など、種々の IgE 測定法が報告されている<sup>7,8)</sup>。ところが、polyclonal antibody を使用した方法では、他 Ig クラスのみならず、イディオタイプで

の交差反応性から、その測定値の評価が問題となる場合があるとの報告もある<sup>9)</sup>。最近 McAb を用いた測定系も、Sancho ら<sup>8)</sup>により報告されているが、特異性、測定感度、測定範囲さらに、測定法としての簡便さなどの点からみると、まだ充分満足出来る測定系の開発は成されてはいないと言える。

今回、われわれは、認識エピトープの異なる 2 種 McAb を使用した、高感度で、かつ広測定範囲を有する IRMA を開発したので、ここに報告する。

### II. 材 料

ヒトミエローマ IgE (my-IgE) は、International ENZYMES Inc. (USA) から入手した。Freund's complete adjuvant (FCA) は、ヤトロン社 (Japan) のものを、ヒト IgG, IgM, アルブミン、ウシ血清アルブミン (BSA) はそれぞれ、MILES 社 (USA) のものを、仔牛血清は、日本バイオテスト研究所のものを使用した。そして、 $\text{Na}^{125}\text{I}$  溶液は、アマーシャム社 (England) のものを使用した。

\* ダイナボット株式会社

受付：昭和 63 年 7 月 23 日

最終稿受付：2 年 5 月 14 日

別刷請求先：東京都港区虎ノ門 3-8-22 第 33 森ビル  
(番号 105)

ダイナボット株式会社

坂 本 春 喜

### III. 方 法

#### 感作方法および細胞融合

ヒト my-IgE 40  $\mu$ g 相当を, FCA と混和エマルジョン化したものを, IgE 抗体作製用抗原とした。3匹の balb/c マウスの皮内に, 10 日間隔で 2 回 IgE 感作抗原を投与した。2回目の感作後 37 日目に腹腔内投与(ブースタ)を行った。ブースタ後 3 日目に, 脾臓細胞を取り次し, P3UI ミエローマ細胞と 35% (w/v) ポリエチレンギリコールを用い細胞融合を行った。HAT 培地による選別ののち, 融合細胞を 96 well のプレートへ移し培養を開始した。

#### スクリーニング

ハイブリドーマ培養上清と,  $^{125}$ I 標識 my-IgE, 热処理  $^{125}$ I 標識 my-IgE との結合反応性を指標に, スクリーニングを行った。さらに陽性を示した培養上清につき, ヒト IgG, IgM, アルブミンとの交差反応性を検討し IgE と, または, 热処理 IgE と特異的に反応する種々ハイブリドーマのみをさらに培養した。

#### McAb 調製と $^{125}$ I 標識方法

各種抗 IgE McAb は, 40% 飽和硫酸沈殿画分として, 培養上清から調製した。調製 McAb は, クロラミン T 法により  $^{125}$ I の標識を行った。 $^{125}$ I 標識 McAb の分離精製には, Sephadex G-200 によるゲル濾過法を用いた。 $^{125}$ I 標識 McAb は, 最終的には, 0.37 MBq (10  $\mu$ Ci)/ $\mu$ g の比放射活性をもつ製品が得られた。

#### 抗体吸着ビーズの調製

抗 IgE McAb 吸着ポリスチレンビーズの調製は, Ziola ら<sup>10)</sup> の方法にしたがった。1/4" ポリスチレンビーズ 1 個当たり, 3  $\mu$ g の抗 IgE McAb を吸着反応に用いた。室温で overnight 吸着反応後, 生理食塩水で充分洗浄し, 減圧乾燥から使用した。

#### IgE IRMA 操作法

本法は, Two-site-IRMA 法に基礎をおくものとした。すなわち, 標準 IgE もしくは検体を 20  $\mu$ l, 50% 仔牛血清を含むホウ酸緩衝液 200  $\mu$ l, さらに抗 IgE McAb 固材化ポリスチレンビーズ 1 個を,

反応用トレイにて混合反応させた。室温 2 時間反応ののち, 精製水 1 ml にて洗浄を行い, 各反応ウェル中に  $^{125}$ I 標識抗 IgE McAb 200  $\mu$ l を添加した。室温で 2 時間振とう反応させたのち, 精製水 1 ml にて 3 回洗浄を行い, 洗浄後反応ビーズをカウンティングチューブに移したのち, ウェル型ガンマーカウンターにて放射活性を測定した (Fig. 1)。

### IV. 結 果

#### 抗 IgE McAb の作製とその性質

IgE 分子の特性として, 56°C の熱処理により Fc 部の立体構造が変化し本来持つ抗原性に変化をきたすことが, これまで報告されている<sup>11)</sup>。われわれは, 上記 IgE 分子の特性を利用し, また得られた McAb の組み合せ試験 (dual-binding test) から 7 グループ計 25 種の抗 IgE McAb を選別作製することができた (Table 1)。これらは, Fab 部 (もしくは熱安定 Fc 部, 糖鎖部) を認識する A, B, C, D の 4 グループ, 热不安定 Fc 部を認識する E, F の 2 グループと, イディオタイプを認識するグループ G の計 7 グループ (各エピ

standard or sample	20 $\mu$ l
buffer	200 $\mu$ l
anti-IgE McAb coated bead	1 p.c.
<hr/>	
Incubation at R.T. for 2hs (shaking)	
<hr/>	
Washing with D.W. 1 ml (x3)	
<hr/>	
anti-IgE McAb- $^{125}$ I	200 $\mu$ l
<hr/>	
Incubation at R.T. for 2hs (shaking)	
<hr/>	
Washing with D.W. 1 ml (x3)	
<hr/>	
Count	

Fig. 1 Assay procedure for IgE IRMA.

Table 1 Classification of anti IgE monoclonal antibodies

epitope	McAb no.
<b>Heat stable Fc or Fab</b>	
A	F3H4 F3H14 F3H22 F3H32
B	F3H36 F3H37 F3H58
C	F3H6
D	F3H17 F3H23
<b>Heat unstable Fc</b>	
E	F3H11 F3H13 F3H16 F3H29 F3H30 F3H41 F3H46 F3H50 F3H55 F3H56 F3H60
F	F2H6 F2H19
<b>Idiotype</b>	
G	F1H35 F1H38

Table 2 Possibility of dual binding

		epitope						
		A	B	C	D	E	F	G
epitope	A	—	—	○	○	○	○	○
	B	—	—	—	○	○	○	○
	C	○	—	—	○	○	○	○
	D	○	○	○	—	○	○	○
	E	○	○	○	○	—	○	○
	F	○	○	○	○	○	—	○
	G	○	○	○	○	○	○	—

トープ相当) であった。また dual-binding 成立の可能性は、Table 2 に示す結果であった。これにタンパク化学的な純度、免疫化学的な活性の点から選択を加え、ビーズ固相化用 McAb に F<sub>3</sub>H<sub>29</sub> を、<sup>125</sup>I 標識抗 IgE McAb に F<sub>3</sub>H<sub>22</sub> をそれぞれ選び、Two-site-IRMA の系を開発した。

#### 測定系抗体の特性

F<sub>3</sub>H<sub>29</sub>, F<sub>3</sub>H<sub>22</sub> の各 McAb について、<sup>125</sup>I 標識 IgE を用い、池田らの方法<sup>12)</sup>に準じ affinity constant K を求めた。F<sub>3</sub>H<sub>29</sub> McAb は、K=5.66×10<sup>9</sup> l/mole, F<sub>3</sub>H<sub>22</sub> McAb は、K=6.51×10<sup>9</sup>

Table 3 Specificity of IgE IRMA

material	tested conc. (mg/ml)	cross reactivity (%)
Human albumin	55	< 6.2×10 <sup>-7</sup>
Human IgG	18	< 1.9×10 <sup>-6</sup>
Human IgM	5.5	< 6.2×10 <sup>-6</sup>

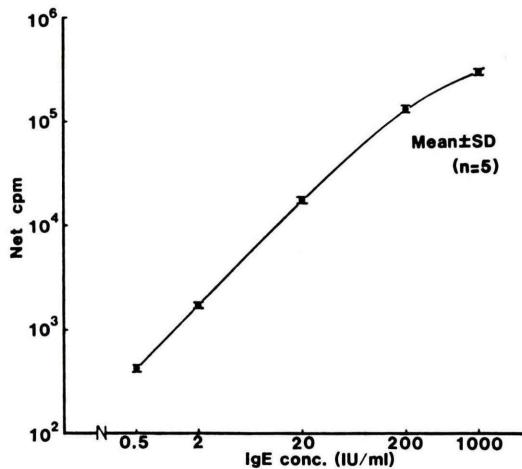


Fig. 2 Typical standard curve of IgE IRMA.

Table 4 Intra-assay reproducibility of IgE IRMA

	Control serum				
	A	B	C	D	E
Mean (IU/ml)	1.27	78.1	128	356	639
SD (IU/ml)	0.03	1.72	4.86	12.1	26.8
CV (%)	2.7	2.2	3.8	3.4	4.2

(n=10)

l/mole であった。また本測定系の特異性は、ヒト血清 IgG, IgM, アルブミンとの交差反応率でそれぞれ、1.9×10<sup>-6</sup>% 以下、6.2×10<sup>-6</sup>% 以下、6.2×10<sup>-7</sup>% 以下であった (Table 3)。

#### 測定系の基礎的検討

簡便かつ短時間で行える本 IgE IRMA の標準曲線を Fig. 2 に示した。この IgE IRMA の感度は、6×10<sup>-4</sup> IU/tube であり、測定範囲は 0.01~20 IU/tube であった。測定結果の再現性は、同一測定内で変動係数 (CV%) が 2.2~4.2%，日差間で 2.2~4.3% であった (Table 4, 5)。さらに、5

Table 5 Inter-assay reproducibility of IgE IRMA

	Control serum				
	A	B	C	D	E
Mean (IU/ml)	1.29	78.5	132	377	633
SD (IU/ml)	0.05	1.72	4.10	13.5	27.3
CV (%)	4.2	2.2	3.1	3.6	4.3
					(n=5)

Table 6 Analytical recovery of IgE IRMA

Sample no.	Original conc. (IU/ml)	IgE added (IU/ml)			IgE conc. by IgE IRMA (IU/ml)		
		39.0	99.7	205	39.0	99.7	205
1	171	213	107	273	102	365	94.5
2	215	255	100	310	95.3	415	97.1
3	288	329	104	394	106	478	92.5
4	227	269	108	328	101	437	103
5	170	207	93.6	273	103	380	102
Average		103		102		97.8	

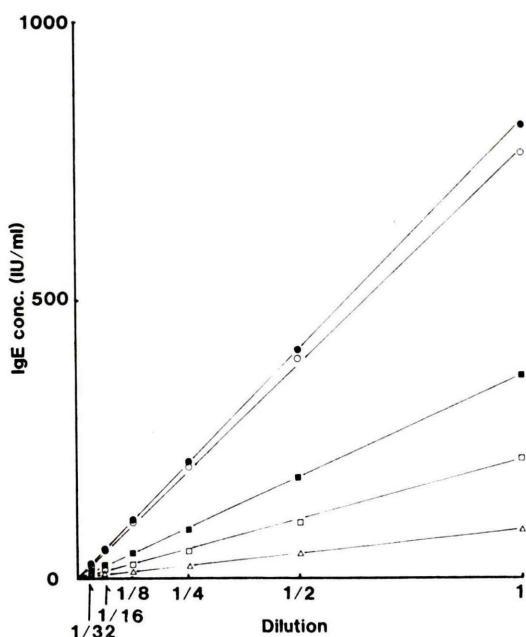


Fig. 3 Dilution studies.

$$y = 0.97x - 5.8$$

$$r = 0.97$$

$$n = 64$$

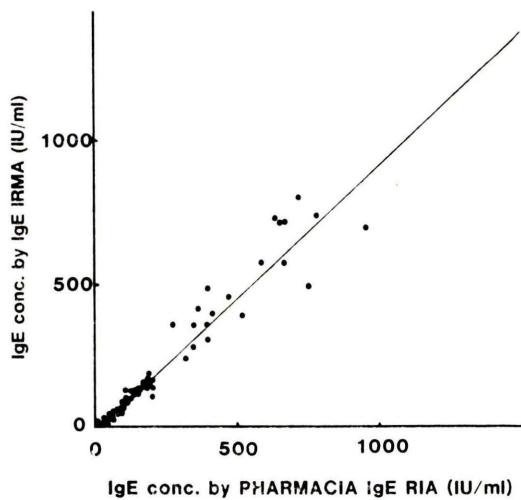


Fig. 4 Correlation between PHARMACIA IgE RIA and IgE IRMA.

$$y = 1.12x - 0.19$$

$$r = 0.96$$

$$n = 71$$

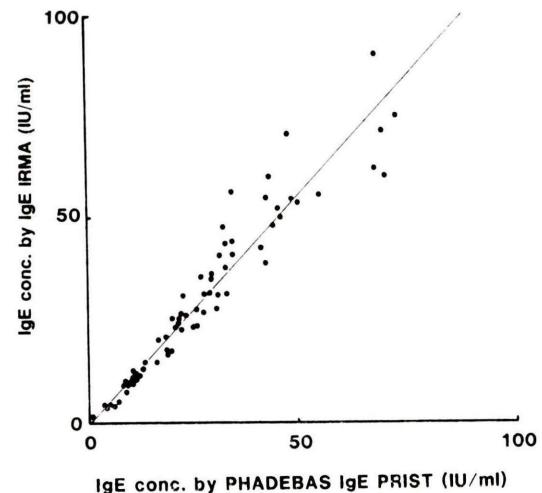


Fig. 5 Correlation between PHADEBAS IgE PRIST and IgE IRMA.

種類の血清検体を用いての添加回収試験では、回収率は  $100 \pm 5.0\%$  であった (Table 6)。5種類の血清検体による、生理食塩水を希釈液に用いて行った希釈試験では、良好な直線性がえられる結果であった (Fig. 3)。

### 他測定法との測定結果の比較

種々の IgE 濃度を有する血清検体 71種類を用い、Phadebas IgE PRIST と、また同じく 64種類を用い Pharmacia IgE RIA との相関につき検討した。その結果、PRIST とは  $y = 1.12x - 0.19$ ,  $r = 0.96$  Pharmacia IgE RIA とは  $y = 0.97x - 5.8$ ,  $r = 0.97$  との成績がえられた (Fig. 4, 5)。

## V. 考 察

われわれは、McAb を用い使用検体量が  $20 \mu\text{l}$  と比較的少量で、 $0.01 \sim 20 \text{ IU/tube}$  と広い測定範囲を持ち、かつ最少検出感度が  $6 \times 10^{-4} \text{ IU/tube}$  と、特異的に血中 IgE を測定できる高感度 RIMA 系を開発した。まず、抗 IgE McAb として Table 1 に示したように、7グループ計 25種類の McAb を得ることができた。これら McAb の分析から、IgE 分子上で熱不安定な Fc 部には、2種類以上のエピトープが存在すること、熱安定 Fc 部、Fab 部もしくは糖鎖部には、4種以上のエピトープが存在することがそれぞれ想定された。さらに、Table 2 に示した結果から、空間的な、これら各エピトープの配列として、 $\text{H}_3\text{N-G} \cdot \text{epitope-A} \cdot \text{epitope-B} \cdot \text{epitope-C} \cdot \text{epitope-D} \cdot \text{epitope-E(F)} \cdot \text{epitope-F(E)} \cdot \text{epitope-COOH}$  の可能性が示唆された。IgE 分子のエピトープについては、Francisco ら<sup>13)</sup> や Ichimori ら<sup>14)</sup> が報告している結果とほぼ一致するものであった。

われわれは、得られた McAb のうちエピトープ E を認識する McAb と、エピトープ A を認識する McAb を組み合せて利用することで、つまり、ビーズ固相化 McAb に  $\text{F}_3\text{H}_{29}$  を、 $^{125}\text{I}$  標識 McAb に  $\text{F}_3\text{H}_{22}$  を用い、IgE を特異的にかつ高感度で測定する Two-site immunoradiometric assay 系を確立することが可能であった。

本 IgE IRMA は、検体の IgE 濃度として  $0.5 \sim$

$10^3 \text{ IU/ml}$  まで直接に測定でき、かつ反応時間も 4時間と比較的短時間に測定結果をうることができた。この点でも、従来、高感度用、通常測定用と 2種別個の測定方法にたよっていたことが大きく改善されるものと期待できる。再現性についても測定可能な全領域で、CV% が 2.2~4.3% と満足出来る成績がえられ、希釈直線性や添加回収率でも、良好な成績がえられたことから、日常臨床上の検体測定に充分対応できると考えられた。このような特性をもつ本 IgE IRMA は、アトピー性疾患の診断や減感作治療時の経過観察に応用可能である。一方小児科領域で、アレルギー疾患の予知が可能との報告もあり、IgE 値で  $1 \sim 2 \text{ IU/ml}$  濃度域での再現性にすぐれた測定法が期待されている。最近、Sancho<sup>8)</sup>、Kemeny<sup>15)</sup>、Poulson<sup>16)</sup> らにより血中 IgE の高感度測定法が報告されているが、いずれもその測定範囲、測定感度、簡便さの点から臨床診断上充分満足できる方法とは言えないものであった。その点では、本 IgE IRMA は、充分な適応能を有する測定系と言える。臨床的には勿論、さらに、細胞培養上清中の IgE 値測定など、微量濃度検体を対象とする研究分野での使用も可能と考えられる。また、われわれが開発した血中 IgE 測定用 IRMA の特性に加え、本 IgE IRMA の特異性を利用することで、IgE 結合因子、抗 IgE 自己抗体を測定することや、アレルギー発症機序、IgE 生体の防御における働きを解明することにも寄与できるものと期待される。

## 文 献

- Ishizaka K, Ishizaka T: Identification of  $\gamma\text{E}$  antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* **99**: 1187-1198, 1967
- Berg T and Johanssen SGO: IgE concentrations in children with atopic disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **36**: 219-232, 1969
- Havnen J, Amlie PA, Havatum M, et al: IgE concentrations in allergic asthma in children. *Arch Dis Child* **48**: 850-855, 1973
- Radermecker MM, Bekhti A, Poncelet E, et al: Serum IgE levels in protozoal and helminthic infections. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **47**: 285-291, 1974

- 5) Kjellman NIM: Predictive value of high IgE levels in children. *Acta Paedior Scand* **65**: 465-471, 1976
- 6) Businco L, Marchetti F, Pellegrin G, et al: Predictive value of cord blood IgE levels in "at-risk" newborn babies and influence of type of feeding. *Clin Allergy* **13**: 503-508, 1983
- 7) Blanchard GC, Gardner RE: A solid-phase fluorimmunoassay for human IgE. *J Immunol Meth* **52**: 81-90, 1982
- 8) Sancho J, Francisco S-M, Olga Felipe, et al: Quantitative measurement of human immunoglobulin E using monoclonal antibodies to distinct epitopes. *J Immunol Meth* **90**: 71-76, 1986
- 9) Spiegelborg HL, Plummer JM, Ruedi J, et al: Lack of Pokeweed mitogen-induced IgE formation in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* **131**: 3001-3005, 1983
- 10) Ziola BR, Matikainen MT, Salmi A: Polystyrene balls as the solide phase of a double antibody radioimmunoassay for human serum albumin. *J Immunol Meth* **17**: 309-315, 1977
- 11) Dorrington KJ, Bennich H: Thermally Induced Structural changes in Immunoglobulin E. *J Biol Chem* **248**: 8378-8384, 1973
- 12) Ikeda I, Iinuma K, Kurata K: Graphical determination of affinity constant for labelled and unlabelled ligand from angiotensin I RIA. *Jpn J Nucl Med* **20**: 385-390, 1983
- 13) Francisco S-M, Morago G, Angel L, Cobri et al: Monoclonal antibodies to three distinct epitopes on human IgE: Their use for determination of Allergen Specific IgE. *J Immunol Meth* **73**: 367-378, 1984
- 14) Ichimori Y, Kurokawa T, Ikeyama S, et al: Establishment of hybridomas secreting monoclonal antibodies against Ce 2 and Ce 4 domains of human IgE. *Hybridoma* **4**: 47-53, 1985
- 15) Kemeny DM, Urbanek R, Samuel D, et al: Increased sensitivity and specificity of a sandwich ELISA for measurement of IgE antibodies. *J Immunol Meth* **78**: 217-226, 1985
- 16) Poulsen LK, Malling HJ, Sondergaard I, et al: A sensitive and reproducible method for the determination of subnanogram quantities of immunoglobulin E. *J Immunol Meth* **92**: 131-136, 1986

### Summary

#### The Development of High Sensitive IgE Immunoradiometricassay Using Monoclonal Antibody

Haruki SAKAMOTO, Junko IMAI, Kazushige IINUMA, Susumu HAYAKAWA,  
Yoshinobu YANAGAWA, Isao IKEDA and Kunio KURATA

*Dainabot Co., Ltd. (Research and Development Department)*

We have developed two-site immunoradiometric assay (IRMA) for quantitation of human serum IgE, using two different anti-IgE monoclonal antibodies which recognize different epitopes on IgE molecule. We obtained 25 different monoclonal antibodies classified seven groups, and then two different monoclonal antibodies were selected for bead coater and tracer after checking the titer and specificity of each antibody. IgE IRMA we developed here showed good performance in terms of specificity, sensitivity and reproducibility. No cross-reactivity to IgG, IgM and albumin in the level of normal range was observed. The sensitivity

for IgE assay was  $0.6 \times 10^{-3}$  IU/tube and measurable range was 0.01-20.0 IU/tube (0.5-10<sup>3</sup> IU/ml). Coefficient of variations of Intra assay were 2.2-4.3% and average recovery yield was 92.5-108%. Good correlations with Phadebas IgE PRIST and Pharmacia IgE RIA were obtained i.e.,  $y = 1.12x - 0.19$  ( $r = 0.96$ ) and  $y = 0.97x - 5.9$  ( $r = 0.7$ ), respectively. These results indicate that the assay system will contribute much to the routine diagnosis for atopic allergy disease and parasitic infections.

**Key words:** monoclonal antibody, IgE, immunoradiometric assay.