

## IgE Kit “第一” S に関する基礎的検討

## Fundamental Studies of IgE Kit “Daiichi” S.

真坂美智子\* 佐藤 篤彦\* 吉見 輝也\* 石川 恵子\*\*  
金子 昌生\*\*

Michiko MASAKA\*, Atsuhiko SATOH\*, Teruya YOSHIMI\*,  
Keiko ISHIKAWA\*\* and Masao KANEKO\*\*

\*Second Department of Internal Medicine, \*\*Department of Radiology,  
Hamamatsu University School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi 431-31, Japan

## I. はじめに

血中 IgE の測定は, Single Radial Immunodiffusion (SRID, 免疫拡散法) で行われていたが, 高感度で, しかも一度に多量の検体が処理可能な Radioimmunoassay (以下 RIA) が開発されて以来, この方法が主流となっている. 現在 IgE の測定は, セファデックス粒子に抗体を結合した radioimmuno sorbent technique (RIST)<sup>1,2)</sup> と濾紙を固相とした サンドイッチ法<sup>3~6)</sup> とが用いられている.

IgE-RIST は, 検体をあらかじめ 10 倍希釈し, 測定に供するという煩雑さを有し比較的高濃度側の検体の測定に適する測定系である. したがって, 低濃度側では, 血清蛋白の非特異的阻害も指摘され<sup>7)</sup>, 改良の余地のある方法と考えられていた. 今回検討した IgE-RIA は, 第二抗体をセファローズ粒子にて結合させて沈殿物の安定化を図り, 検体を調製することなく 10 U/ml~2,000 U/ml まで短時間で測定ができるよう工夫されたキットで

ある. このキットに関して基礎的検討を加えたので報告する.

## 1. 方 法

キット構成は, <sup>125</sup>I-標識 IgE (5.3 ml 青色溶液), 抗 IgE 抗血清 (5.3 ml 黄色溶液), 濃度調製された 7 種類の標準液 (各 0.5 ml) および第二抗体セファローズ懸濁液 (200 ml) の各試薬より成り, 1 キットは 100 テスト用である. 測定方法の概略は, Fig. 1 に示すとおりである. なお, 測定には “日立 RMA-IWIA” を用い, 1 分カウントで計測した.

この試薬を用いて, 反応条件, 再現性, 希釈試験, 回収試験, 最小検出感度などについて検討すると同時に, 従来より広く用いられている IgE-

Standard or Sample	50 $\mu$ l
<sup>125</sup> I-IgE	50 $\mu$ l
Anti-IgE	50 $\mu$ l
↓ 1st incubation (3 hrs, room temp.)	
Second antibody (Suspension)	2 ml
↓ 2nd incubation (30 mins, room temp.)	
Centrifuge (1,500 G, 30 mins)	
↓	
Aspiration	
↓	
Count	

Fig. 1 Assay procedure of IgE kit “Daiichi” S.

**Key words:** Single radial immunodiffusion, Radioimmunoassay, Radioimmunosorbent technique, IgE.

\* 浜松医科大学第二内科

\*\* 同 放射線部

受付: 59 年 8 月 29 日

最終稿受付: 59 年 10 月 29 日

別刷請求先: 浜松市半田町 3600 (☎431-31)

浜松医科大学第二内科

真坂美智子

RIST や IgE-PRIST で得られた値と本測定系の値との互換性についても検討した。

## II. 結 果

### 1) 第一次反応条件について

第二次反応条件を室温、30分とし、第一次反応温度を4°C、室温、37°Cとし経時的な結合率の変化について検討した(Fig. 2 a-c). 室温もしくは37°Cの反応条件では、3時間で反応はほぼ平行に達しており、0濃度の結合率と最高濃度の結合率の差も70%程度あり十分信頼できる標準曲線を描くことができると思われた。また室温に比して37°Cの方がやや低濃度側での結合率が大きいと思われる(Fig. 2-d). 対照として用いた自家製プール血清(2種類)は、標準物質と同一の反応動態を示していた。当然のことながら、4°Cの反応条件では、反応はゆるやかに進行し、3時間でも反応は進んでいるようであった。そこで、最も測定しやすい室温、3時間を一次反応条件とした。

### 2) 第二次反応条件について

第一次反応条件を室温3時間と設定し、第二次反応条件を室温にて、5, 15, 30, 60分と変化させその結合率変化を観察した(Fig. 3). 15分以降、結合率に変化は認められなかったことから、二次反応は室温、30分とした。

### 3) 再現性について

キット添付の管理血清1濃度のほかにプール血清4濃度を作成し、同時再現性と測定間変動について検討した。20 U/ml 前後の低濃度領域では、同時再現性や日差再現性は、6.7%, 12.2%とやや大きい。その他の濃度領域では、同時再現性は2.6%~3.4%, 日差再現性は1.9%~7.4%とほぼ満足すべき成績であった。また、測定期間中にロットが4回変化していたが管理血清の測定値に特にロット差は認められなかった(Table 1).

### 4) 希釈試験

IgE-RIST で高値を呈した検体4種(A~D)について、キット添付の希釈剤を用いて希釈試験を

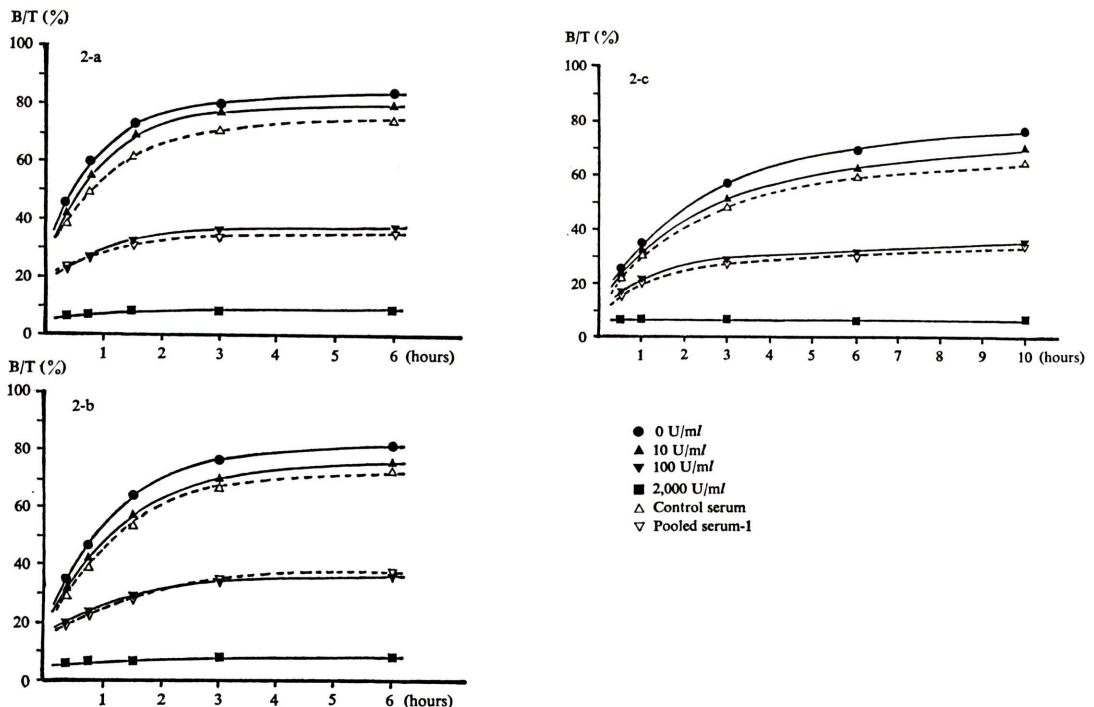


Fig. 2-a, b, c Effect of 1st incubation temperature and time on bound percents. (a) 37, (b) 25 (room temp.), (c) 4

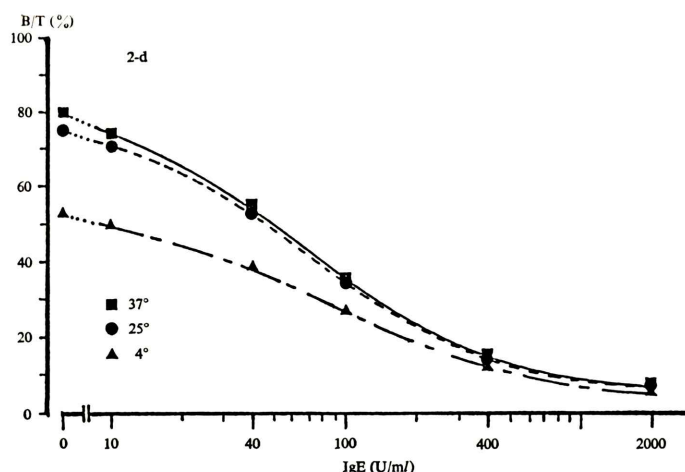


Fig. 2-d Effect of 1st incubation temperature on standard curve.

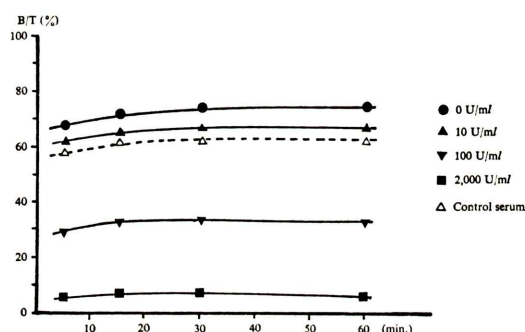


Fig. 3 Effect of 2nd incubation time on bound percents.

実施し、本測定系における希釈直線性について検討した。1,000 U/ml 以上の濃度では直線性も失われ、またばらつきも大きい。20 U/ml～1,000 U/ml の範囲内では、良好な成績を示していた (Fig. 4)。

### 5) 回収試験

RIA 検査領域の回収試験の実施方法は、多くの場合、被検血清とキット添付の標準品の等量混合の試料が用いられる。この方法は、標準物質が緩衝液の場合は特に、通常測定に供する検体と環境因子が異なってしまうため、測定系の「正確さ」を反映しないと思われる<sup>8,9)</sup>。したがって、通常測定に供する血清検体と近似した条件の試料を作成するため、添加する標準品の溶液量を血清の1/10以下の容量とした。また可能なかぎり広い濃度

領域の「正確さ」を把握する目的で、低濃度領域と高濃度領域の2種の検体を用い、また添加濃度は試料の3倍を超えない範囲とした。Table 2に明らかなように、5重測定の平均回収率は、103.3%～110.9%の間であり、正確に測定している系と考えられた。

### 6) 最小検出濃度

最小検出濃度を推定する目的で10 U/mlの標準液から5 U/ml, 2.5 U/mlの濃度を作製し、5重測定で測定し、その平均値をFig. 5に示した。この方法によると、最小検出濃度は放射能の減衰や日差再現性を考慮に入れて、10 U/ml程度と推定された。なお、標準曲線の再現性はIntercept値で図中に表示したが、C.V. 値で3.04～8.91%と良好な成績であった。

検体と標準液との液性は必ずしも同一とは限らないため、検体の最小検出濃度と、上記の標準曲線上の最小検出濃度とは一致するとは必ずしもいえない。ところが、検体の最小検出濃度を算出する方法は現在のところ定められていない状況である。今回、高IgE血清の希釈試験 (Fig. 4) や、標準曲線の再現性 (Fig. 5) の成績から、検体の最小検出濃度は20 U/ml程度と推定された。

### 7) 高感度測定法について

現法のIgE-RISTの検出限界が25 U/mlであり、IgE-PRISTでは1 U/mlと考えられるが、同

Table 1    Intraassay and interassay reproducibility

Intraassay					
No.	CS	PS-1	PS-2	PS-3	PS-4
1	100.6	17.2	553.9	67.5	141.3
2	97.9	17.9	511.0	66.3	148.0
3	95.0	20.0	499.6	67.9	136.3
4	99.7	19.4	518.5	69.5	147.1
5	103.4	18.1	528.4	70.0	142.5
6	103.0	20.8	496.5	64.8	151.3
Mean	99.9	18.9	514.7	67.6	144.4
S.D.	2.9	1.26	13.8	1.78	4.94
C.V. (%)	2.9	6.7	2.7	2.6	3.4

Interassay						
No.	CS	PS-1	PS-1	PS-3	PS-4	Lot No.
1	119.6	17.4	511.3	75.5	144.4	84001
2	99.6	13.8	500.5	67.7	164.9	"
3	111.3	14.5	516.2	66.6	138.1	84002
4	111.2	13.3	505.9	73.9	172.1	"
5	100.9	15.3	516.1	72.5	170.4	"
6	99.5	18.1	515.8	73.8	165.3	84003
7	105.2	18.9	535.3	75.9	170.1	"
8	103.0	15.4	506.8	70.0	160.6	84004
Mean	106.3	15.8	513.5	72.0	160.7	
S.D.	6.69	1.93	9.82	3.28	11.87	
C.V. (%)	6.3	12.2	1.9	4.6	7.4	

CS; Control serum,    PS; Pooled serum  
unit; U/ml

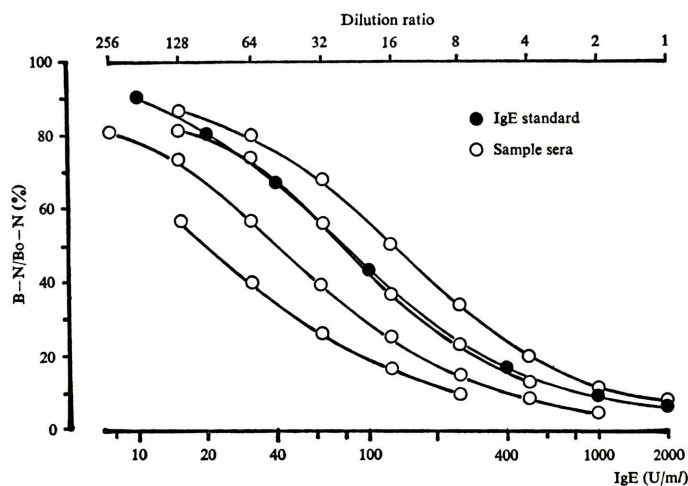


Fig. 4    Dilution test of serum IgE obtained from patients of asthma.



Table 2 Recovery test of added IgE in pooled sera

Sample	Added (U/ml)	Measured (U/ml)	Found (U/ml)	Recovery (%)
A	0	33.8±1.49	—	—
	9.1	43.9±1.25	10.1±1.25	110.9
	18.2	52.6±1.92	18.8±1.92	103.3
	36.4	71.4±1.11	37.6±1.10	103.3
B	0	147.0±3.08	—	—
	45.5	195.6±7.97	48.5±7.95	106.6
	90.9	243.6±8.11	96.7±8.80	106.4
	400.0	568.2±17.56	421.2±17.56	105.3

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{Measured (U/ml)} - \text{base (U/ml)}}{\text{added (U/ml)}} \times 100 \quad (n=5)$$

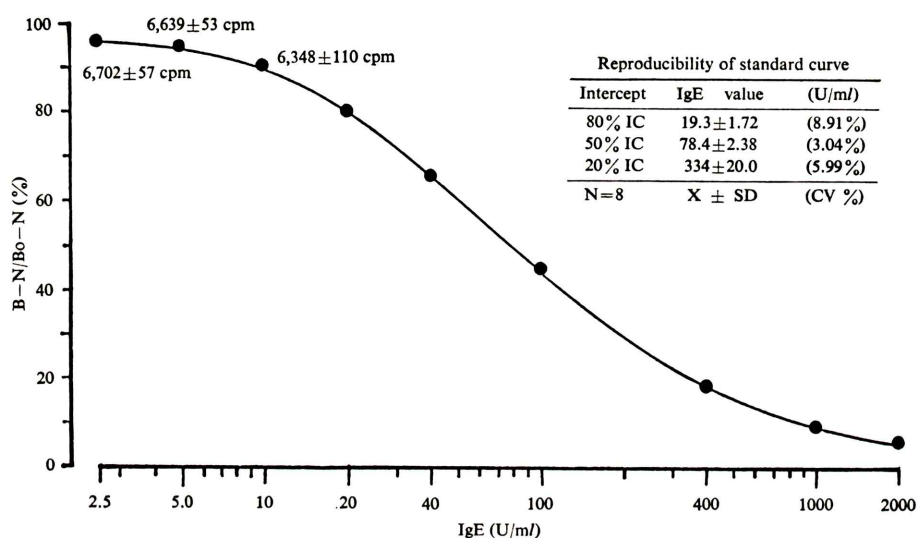


Fig. 5 inimum detectable concentration and reproducibility of standard curve.

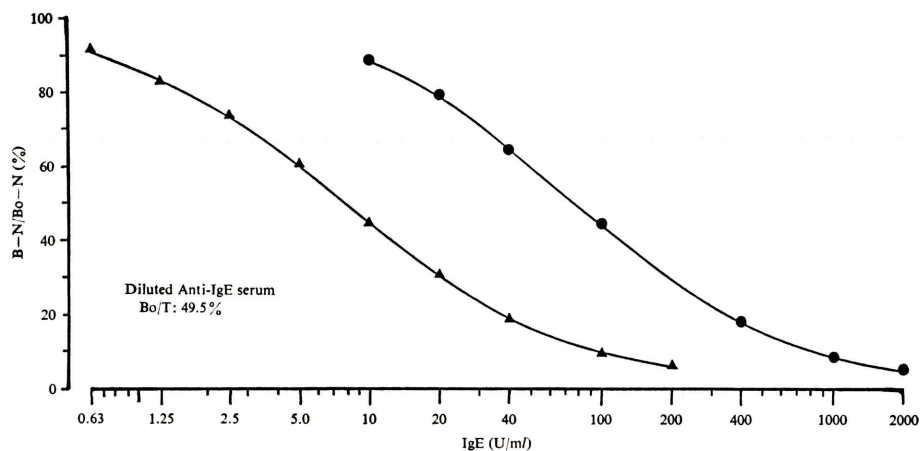


Fig. 6 High sensitivity method with diluted anti-IgE serum.

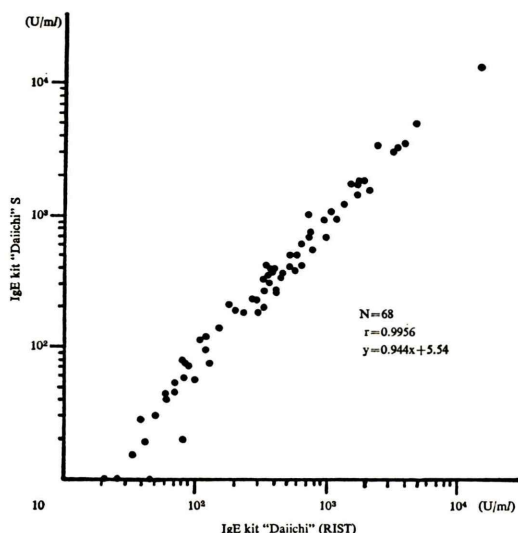


Fig. 7 Correlation between IgE kit "Daiichi" S and conventional IgE RIA kit (RIST).

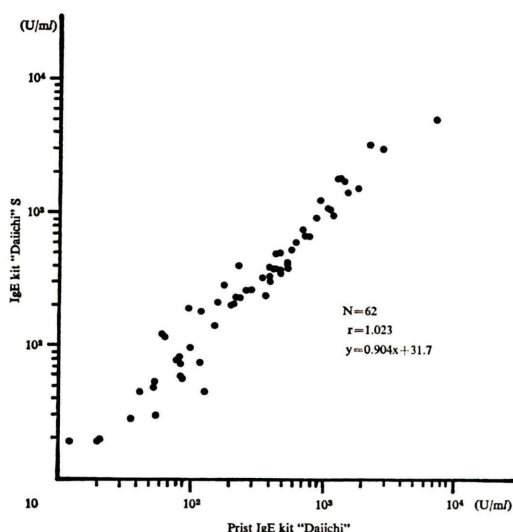


Fig. 8 Correlation between IgE kit "Daiichi" S and IgE PRIST kit.

一測定原理で、1 U/ml から 2,000 U/ml まで測定することが可能であれば検査法としての簡略化に通じる。また、IgE 測定依頼の多くは IgE が、比較的 low 値例である。そこで IgE-PRIST に準ずる検出感度を持つ方法として、抗体希釈による高感度法について検討した。キット添付の抗血清を蒸

留水にて 6 倍希釈して使用した標準曲線を Fig. 6 に示した。原法の Bo/T% 値は 75~80% 程度であったが、室温、一夜放置の一次反応条件で Bo/T% 値は 50% 程度であり、信頼性の高い標準曲線を作成することができ、しかも 1 U/ml まで測定可能と考えられた。その測定値も原法の測定値と近似していた ( $y(\text{高感度法}) = 1.08x - 5.00$ ,  $r = 0.955$ ,  $n = 16$ )。

#### 8) 現法との相関性について (Figs. 7, 8)

まずはじめに、IgE-RIST で得られた値との互換性について検討した。100 U/ml 以下の測定値では、やや解離する症例があるものの、68 例の互換性はほぼ満足できるものであった ( $y = 0.944x + 5.54$ ,  $r = 0.9956$ )。同様に IgE-PRIST との互換性についても検討したが、良好な成績であった ( $y = 0.904x + 31.7$ ,  $r = 1.023$ ,  $N = 62$ )。

### III. 考 察

RIA は、微量な生体成分を抽出などの煩雑な操作がなく、感度高く多量の検体を処理できることから日常検査法として定着している。RIA も測定時間の短縮化、手技の簡略化が最大の課題となっているため、第一抗体、あるいは第二抗体の固相化が導入されたり、第二抗体液中に抗原抗体複合部の形成や沈殿を促進させるためデキストランやポリエチレングリコールなどが添加されることが多い。本測定系も、測定時間の短縮化を目的として親和性の高い抗体を用い、かつ抗血清の濃度を上げることや液量の少量化を計っている。したがって、きわめて短時間の測定系でありながら、Bo/T% は 80% 前後と高値となっていた。

また本測定系では第二抗体に固相化抗体を導入することにより、B-F 分離の際に生じる誤差を少なくすることに成功している。測定値の誤差発生要因は数多いが、B-F 分離誤差の割合が大きいという報告もあり<sup>10)</sup>、第二抗体に固相化抗体を用いることは、二抗体法の長所を残しながら、固相化抗体法の長所も導入した方法と思われる。第一抗体に固相化抗体を用いた場合は、抗血清ロット差が反映され、測定値が変動するが、第二抗体を

固相化した場合はその差は小さいように思われた。

キットとしての基本的評価につながる再現性や信頼性を推定する回収試験、希釈試験の成績も良好であり、検査法として優れた方法と思われた。

一方、検査法の進歩はめざましく、測定手技の変遷も著しい。このことは、試料の少量化、精度の向上という福音をもたらす反面、同一症例の経過観察中に測定値が変化するという不都合もさけられない。そこで現法と評価対象法との測定値の互換性を論ずる目的で、二法の相関関係や相関係数が求められるが、その方法も種々様々である。一般的には、30例以上の症例で二法の関係を最小二乗法で求めているが、どの程度の濃度範囲で、いかなる種類の検体を用いて、何例で求めるのが適切なのか。また、低濃度側から高濃度側まで、一律に一つの数式で求めることが適切な方法なのか等々、数多くの疑問が残る。今回の検討にあたり、IgE-RISTやIgE-PRISTと本法との関係を60例以上の症例で、測定感度付近の濃度領域から10,000 U/mlの濃度領域までの検体を対象とした。また100 U/ml以下の検体と100 U/mlから400 U/mlまで、400 U/ml以上の濃度の検体分布を1対1対2の比率になるように設定した。二法の相関関係はきわめて高いが、それぞれの症例で測定値を比較すると、100 U/ml以下の低濃度側で分離例が多く、100 U/mlから2,000 U/mlまでの濃度領域では近似形が多かった。これは、各測定系の測定可能範囲や誤差の大小を反映した結果と考えられる。測定系全体の相互関係は満足すべき結果であったとしても、免疫学的測定系の場合、用いる抗血清や標識抗原、さらには反応液の組成や量など多くの因子によって測定値が変化する。また、検体も低蛋白血清もあれば溶血検体も存在するというように、個々のMatrixも決して同一条件ではない以上、予測不能な不一致例に遭遇する場合もあり、相互関係から二法の互換性を論ずる時には慎重にならざるを得ない。抗血清が異なる場合には異なる物質を測定しているというくらいの覚悟が検査室側には必要かもしれない。これからの課題として、同一検査でも数多くの

測定手技が存在する場合、Reference method ともいべき方法を設定し、現在抱えている多くの混乱を整理してゆく必要があるのではないだろうか。

#### IV. ま と め

固相二抗体法のIgE-RIAキットに関する基礎的検討を行い、次のような結果を得た。

- 1) 10 U/ml～2,000 U/ml までの広い濃度範囲を、室温で4時間以内に測定することができ、日差再現性は1.9 %～7.4 %と良好であり、希釈試験、回収試験等の成績も満足すべきものであった。
- 2) 従来から用いられているIgE-RISTやIgE-PRISTで得られた測定値との相関性は良好であった。

最後にキットを提供して下さった第一ラジオアイソトープ研究所に深謝致します。

#### 文 献

- 1) 八倉隆保, 寺西 強: IgE. 最新医学 30: 825, 1975
- 2) 信太隆夫, 小笠原光子: Sephadex を固相とした radioimmunosorbent test (Phadebas IgE Test) の基礎的検討. 基礎と臨床 7 (2): 215, 1973
- 3) 木野稔也, 今井弘行, 大島駿作, 他: Paper disc radioimmunosorbent test (PRIST) による血清 IgE 値の測定. 臨床免疫 10 (4): 511, 1978
- 4) 平松宏之, 鳥居新平, 金井 朗, 他: Paper disc を用いた IgE の radioimmunoassay 法 (PRIST) の検討について. 臨床免疫 10 (7): 755, 1978
- 5) 真坂美智子, 吉見輝也: 酵素標識抗体を用いた IgE 測定に関する基礎的検討. 医学と薬学 9 (1): 196, 1983
- 6) 向島 達, 南沢マヤ, 藤野冷子: 酵素免疫測定法 (EIA) 法による血中 IgE 測定キット (Phadezym IgE PRIST) の基礎的検討. 医学と薬学 9 (1): 191, 1983
- 7) Gleich GJ, Dunnette SL: Comparison of procedures for measurement of IgE protein in serum and secretions. J Allergy Clin Immunol 59: 377, 1977
- 8) 真坂美智子, 泉 正和, 菅野剛史: ラジオイムノアッセイ領域における添加回収試験の再検討 (トリロードサイロニンの例から). 臨床検査 28 (7): 849, 1984
- 9) 中 甫 (訳): 測定評価マニュアル. Medical Technology 別冊, 1981
- 10) 杉沢慶彦, 高橋忠重, 大阿久恒雄, 他: ラジオイムノアッセイの精度管理——誤差成分の解析と全誤差に対する寄与率——. RADIOISOTOPES 33: 130, 1984