

Serum IgE Antibody Titers against  
Dermatophagoides farinae assayed by Paper Disc  
Radioallergosorbent Test are suppressed in the  
Presence of the Specific IgG Antibody

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7758">http://hdl.handle.net/2297/7758</a>

## Paper disc RAST 法による抗 *Dermatophagoides farinae* IgE 抗体価測定に及ぼす IgG 抗体の抑制効果

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

紮 井 正 春

(昭和59年12月10日受付)

Paper disc radioallergosorbent test (paper disc RAST)法による IgE 抗体価測定における IgG 抗体の抑制効果を, 小児気管支喘息に最も普遍的なアレルゲンであるダニ (*Dermatophagoides farinae*, *D. farinae*) について検討した。血清は, ダニアレルギー患者 104 名 (免疫療法施行群, 以下治療群 25 名, 未治療群 79 名) 及び対照群 41 名より得た。血清 IgE 値は paper radioimmunosorbent test (PRIST) 法, 血清 IgE 抗体価 (RAST 値) は paper disc RAST 法, 血清 IgG 抗体価は固相担体にポリスチレン管を用いるラジオイムノアッセイ法で測定した。IgG-rich serum, IgG-free serum は Protein A-Sepharose CL-4B を用いて得た。IgE 抗体価と IgG 抗体価には有意の正の相関がみられた ( $y=7.37 e^{0.060x}$ ,  $r=0.49$ ,  $p<0.01$ )。IgG 抗体価 (Mean  $\pm$  SEM u/ml) は治療群 219.8  $\pm$  98.4, 未治療群 86.9  $\pm$  27.7 で対照群 9.8  $\pm$  1.1 に対し, それぞれ  $p<0.01$ ,  $p<0.05$  で有意に高値を示した。治療群は未治療群に対し高い傾向があったが, その差は有意ではなかった。IgG 抗体除去による RAST 値の上昇の程度は HSA 処理血清 (同一血清を人血清アルブミンを結合した CNBr 活性化 Sepharose 4B で処理) の RAST 値に対する IgG-free serum の RAST 値の上昇率を, 同一濃度の IgE 値で求めた。IgG 抗体価と RAST 値の上昇率には有意の正の相関 ( $y=3.41 \log x - 8.35$ ,  $r=0.88$ ,  $p<0.01$ ) がみられ, IgG 抗体が多い程, IgE 抗体価のみかけ上の低下が大きいことを示した。IgG 抗体価低値の患者血清に, IgG 抗体価高値の 2 患者血清より得た IgG-rich serum を添加した場合, RAST 値の抑制率は 69.6, 82.6% と著明であり, 一方 IgG 抗体価低値の 3 患者の血清からの IgG-rich serum では, 11.6, 2.9, 10.1% と小さかった。

以上より, *D. farinae* に関しては, 未治療の患者でも paper disc RAST 法による IgE 抗体価は IgG 抗体や他の免疫グロブリンにより見かけ上低値をとることが考えられた。さらに本法はしばしば抗体過剰域で測定されているという問題もあり, これらの 2 つの問題点を解決して本法の定量性を高めるには希釈血清を用いるのが簡便で望ましい方法であると考えられる。

**Key words** *Dermatophagoides farinae*, RAST, IgE antibody, IgG antibody, immunotherapy

気管支喘息をはじめとするアトピー性疾患において重要な役割を演じている IgE 抗体を測定する radioallergosorbent test (RAST) 法は, 1967 年 Wide ら<sup>1)</sup> によって導入され, 現在固相担体に paper disc を用いる方法<sup>2)</sup> が一般臨床に広く用いられている。しかし, その測定原理から当然 IgE 以外の他の免疫グロブリンの影響を受けることが考えられ, またその他種々の抑制因子の存在が報告されている<sup>3-13)</sup>。

Linch ら<sup>3)</sup> はアルテリナリアにアレルギーの患者血清で, IgG 抗体が RAST 法による IgE 抗体価測定に抑制効果を与えていると報告している。Zimmerman ら<sup>4)</sup> は honeybee venom, ブタクサ花粉にアレルギーの患者において免疫療法後は IgE 抗体価はみかけ上低値をとり, それは免疫療法後増加した IgG 抗体による抑制効果であると報告している。また Zeiss ら<sup>5)</sup> はブタクサ花粉症患者において paper disc RAST 法と固

Abbreviations: *D. farinae*, *Dermatophagoides farinae*; HD, house dust; HSA, human serum albumin; PBS, phosphate buffered saline; PLA, phospholipase-A; PRIST, paper radioimmunosorbent test; RAST, radioallergosorbent test.

相担体にポリスチレン管を用いる定量的ラジオイムノアッセイ法とを比較し, paper disc RAST においては IgE 抗体が高濃度になってくると, 測定値は平衡に達し, 他方免疫療法後増加した遮断抗体の存在のもとでは IgE 抗体価がみかけ上低値を示すことを報告している。

現在までの RAST 法による IgE 抗体価測定における問題点の多くはブタクサ花粉, アルテリナリア, honeybee venom 等で免疫療法後に出現する IgG 遮断抗体による抑制効果として報告されているが<sup>13-15</sup>, 日常診療でよくみられ, また免疫療法施行前にすでに IgG 抗体を有していることが多い<sup>14,15</sup> ダニアレルギー患者についてはほとんど検討されていない。ダニアレルギー患者の IgE 抗体価の季節的変動, 免疫療法による変動は, 現在 paper disc RAST 法で測定されているが, これらの報告<sup>16-18</sup>では IgG 抗体の影響にはほとんど考慮が払われていないように思われる。今回, 著者はダニ (*Dermatophagoides farinae*, *D. farinae*) について, 現在, 簡便で一般臨床に広く利用されている paper disc RAST 法による IgE 抗体価測定における IgG 抗体の抑制効果について検討した。

### 対象及び方法

#### I. 対象

1982年11月から1983年3月に金沢大学医学部付属病院小児科外来を受診したダニアレルギー患者(抗 *D. farinae* RAST スコア 2 以上の者)を屋内塵 (house dust, HD) による免疫療法施行群 (治療群, A 群) 25 名, 未治療群 (B 群) 79 名に分け, 対照として対照群 (アトピー歴なく, 喘息症状のない抗 *D. farinae* IgE 抗体陰性者, C 群) 41 名を選んだ (表 1)。各群の年齢構成は表 1 に示したようにほぼ同じである。

HD 免疫療法は鳥居薬品の HD 治療用エキスで行ない, 総投与量は 2.0 mg ~ 1337.2 mg (平均 117.8

mg), 投与期間は 7 ヶ月 ~ 7 年 9 ヶ月 (平均 4 年 11 ヶ月) であった。血清はただちに  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結保存した。

#### II. 血清 IgE 値の測定

Pharmacia 社製の paper radioimmunosorbent test (PRIST) キットを使用した。単位は IU (International Unit)/ml で表わした。

#### III. 血清 IgE 抗体価 (RAST 値) の測定

paper disc RAST 法 (Pharmacia 社製キット) により測定した。disc は Pharmacia 社のものを使用し, 単位は disc に吸着した放射活性の全放射活性に対する % で表わした。

#### IV. 血清 IgG 抗体価の測定

Pharmacia 社製の IgG RAST キットを使用し, 固相担体には paper disc のかわりにポリスチレン管 (シオノギ製, 内径 10 mm, 高さ 60 mm, 厚さ 1 mm) を用いて行った。

抗原のポリスチレン管への吸着法: リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, PBS), pH 7.4 に溶解した *D. farinae* 粗抗原 (鳥居製) 100  $\mu\text{l}$  をポリスチレン管に入れ, 18 時間室温静置し, 緩衝液にて 3 回洗浄して得た。

IgG 抗体価の測定: 抗原を吸着させたポリスチレン管に 100  $\mu\text{l}$  の血清試料を添加, 24 時間室温静置後, 3 回洗浄したのち, 100  $\mu\text{l}$  (0.026  $\mu\text{Ci}$ ) のウサギ抗ヒト

Table 1. Grouping of the tested populations

Group	No. tested	Mean Age (years)	RAST values to <i>D. farinae</i>
A. atopic (treated)*	25	9.4 (3-17)	29.4 $\pm$ 3.8**
B. atopic (untreated)	79	8.3 (1-14)	19.8 $\pm$ 9.0
C. control	41	7.4 (0.5-14)	2.0 $\pm$ 0.6

\* house dust immunotherapy

\*\* % of total activity added (Mean  $\pm$  ISD)

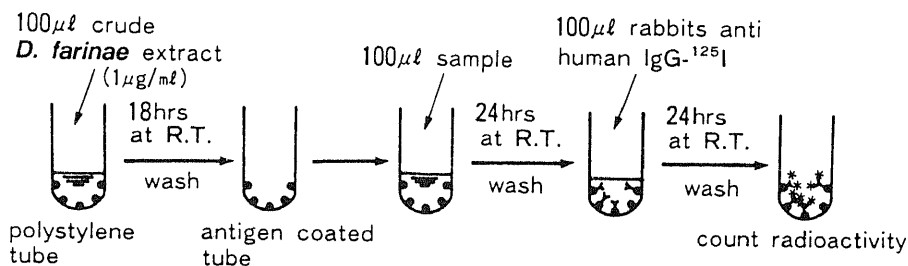


Fig. 1. Schema of the polystyrene tube radioimmunoassay for measuring anti-*D. farinae* IgG antibody levels.

IgG-<sup>125</sup>I を添加する。24 時間室温静置後 3 回洗浄したのち、ポリスチレン管の放射活性を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。比活性はポリスチレン管に吸着した放射活性の全放射活性に対する % で表わした。

なお予備実験として、ポリスチレン管に吸着させる抗原の至適濃度、IgG 抗体価の表現法、抗原特異性の 3 点について検討を加えた。

#### V. IgG-rich serum の精製

PBS にて平衡化した Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia 社製) カラム (K 9/15, Pharmacia Fine Chemicals) に患者血清を添加し、PBS にて洗浄、その後吸着した IgG を 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3) にて溶出し、PBS に透析した試料を IgG-rich serum とした。IgE 抗体の不活化は 56°C で 4 時間加熱<sup>4)</sup>して行った。

#### VI. IgG-free serum の精製

0.1 ml の血清を 1.0 ml の PBS にて平衡化した Protein A-Sepharose CL-4B (濃度 7.5%) と混合、15 分間振とうし、遠心後の上清を IgG-free serum として用いた。

#### VII. 統計学的検討

成績は student's *t*-test を用い推計学的に検討を加え、 $p < 0.05$  の時を有意差ありと判定した。

### 成 績

#### I. 血清 IgG 抗体価測定における予備実験

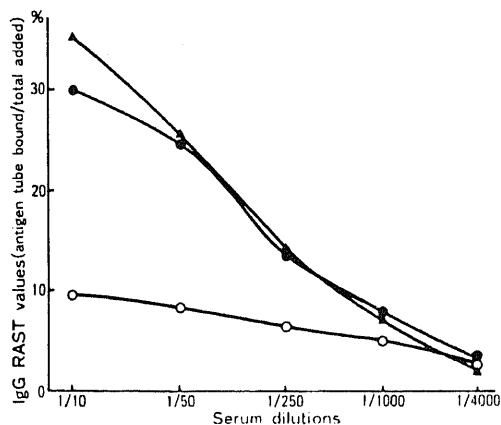


Fig. 2. Optimal concentration of the *D. farinae* extracts for tube coating. Serum of a mite allergic patient was serially diluted and added to polystyrene tubes coated with various concentrations of the *D. farinae* extracts. Concentrations of the *D. farinae* extracts of the each symbols were as follows: ○, 0.1 µg/ml; ●, 1 µg/ml; ▲, 10 µg/ml.

#### 1. ポリスチレン管に吸着させる抗原の至適濃度の決定

*D. farinae* の抗原濃度 (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) を使用し、IgG 抗体価高値の患者血清の 10, 50, 250, 1000, 4000 倍希釈系列の IgG RAST 値を求めた (図 2)。図に示されるように *D. farinae* 抗原濃度 1 µg/ml, 10 µg/ml ではほぼ同様の結果が得られたので、抗原濃度は 1 µg/ml とした。なお血清の希釈は 50 倍まで緩衝液で行ない、それ以上は 0.1% 人血清アルブミンを含む緩衝液で行った。

#### 2. 標準曲線による IgG 抗体価の表現法

IgG 抗体価高値をとるダニアレルギー患者数人より得られたプール血清を 1000 u/ml とし、その 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 倍希釈液より、図 3 の如く標準曲線を得た。測定は直線部分で行なわれるように被験血清を希釈し、原則として 50 倍希釈で測定したが、1000 u/ml を越えるときは 250 倍希釈、25 u/ml 以下の場合は 10 倍希釈で行った。

#### 3. 抗原特異性の検討

本法が *D. farinae* に対し抗原特異性をもつことを確認する為に RAST 抑制試験を次のように行った。

50 倍希釈された IgG 抗体価高値の患者血清 200 µl に 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml の濃度の *D. farinae* 抗原液及び対照として卵白アルブミン (ovalbumin) 溶液及び PBS を 200 µl 加え、37°C で

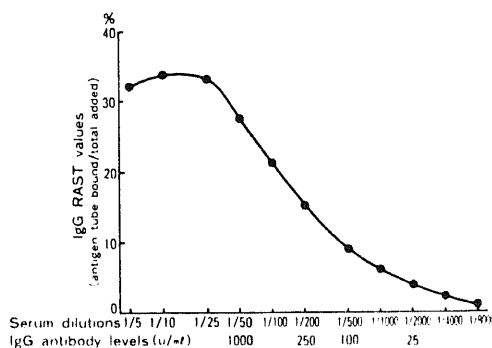


Fig. 3. Standard curve of the IgG antibody levels of the pooled sera from several patients with high IgG antibody levels. The binding value of IgG RAST at a 50-fold dilution of pooled sera was set as 1000 units/ml of the IgG antibody level. The values of unknown samples were obtained by the standard curve, but the dilution ratio was changed to 250 or 10-fold for higher (>1000 u/ml) or lower titer (<25 u/ml) sera, respectively.

3時間反応させたのち、遠心後の上清の抗 *D. farinae* IgG RAST 値を求めた。図4の如く *D. farinae* 溶液は濃度依存的に IgG RAST 値を抑制するが、卵白アルブミンでは抑制効果は見られず、本法による IgG 抗体価測定は *D. farinae* 抗原特異的であるといえる。なお図には示していないが、卵白アルブミンを吸着させたポリスチレン管にダニアレルギー患者の50倍希釈血清を添加しても放射活性は見られず(1.0%以下)、本法では非特異的結合はないことが確認された。

II. IgE 抗体価と IgG 抗体価との相関

A 群, B 群, C 群, の計 145 人の血清 IgE 抗体価, IgG 抗体価を求め、両者の相関を求めた。  $y = 7.37e^{0.060x}$ ,  $r = 0.49$ ,  $p < 0.01$  と有意の正の相関がみられた(図5)。

III. 各群の IgG 抗体価の比較

IgG 抗体価 (Mean  $\pm$  SEM u/ml) は A 群 219.8  $\pm$  98.4, B 群 86.9  $\pm$  27.7, C 群 9.8  $\pm$  1.1 で A 群, B 群は C 群に対して、それぞれ  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  で有意に高値を示した。A 群は B 群に対し高い傾向があったが、その差は有意ではなかった(図6)。

IV. IgG 抗体除去による IgE 抗体価 (RAST 値) の上昇

IgG 抗体除去による RAST 値の上昇の程度をみる

為に、13名の患者血清について検討した。この実験の為、IgG-free serum を作製した同一血清を人血清アルブミンを結合させた CNBr 活性化 Sepharose 4B (Pharmacia 社製) で IgG-free serum 作製の場合と同様の処理を行ない、これを HSA 処理血清 (HSA-treated serum) とした。

1. Protein A-Sepharose CL-4B 処理による IgG 抗体の除去効果

原血清 (untreated serum), IgG-free serum と HSA 処理血清の IgE 100 IU/ml における IgG 抗体価を、IgG 抗体価高値の患者 7 名について求めた(図7)。IgG-free serum の IgG 抗体価の平均値 (1.67 u/ml) は原血清 (124.5 u/ml), HSA 処理血清 (172.3 u/ml) に比べ、著明に低値となり ( $p < 0.001$ ), IgG 抗体はほとんど除去されていることが認められた。

2. IgG-free serum の RAST 値の上昇率

同一血清より得られた IgG-free serum と HSA 処理血清についての IgE 抗体価 (RAST 値) を比較した。図8-(A), (B) は IgG 抗体価高値患者, 低値患者それぞれ 2 名についての曲線である。症例 4 を除いて IgG-free serum の曲線の左方への移動がみられ、これは他の報告<sup>9)10)</sup>にもあるように IgE も Protein A-Sepharose CL-4B により少量ではあるが除去される

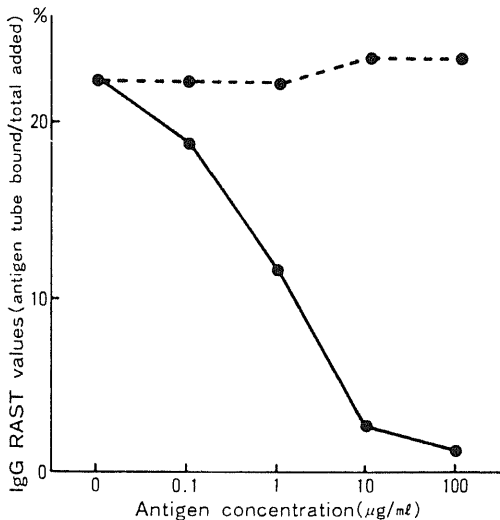


Fig. 4. Specificity of the polystyrene tube radioimmunoassay for measuring anti-*D. farinae* IgG levels using the RAST inhibition technique. The anti-*D. farinae* IgG levels of a mite allergic patient's serum were assayed after preincubation at 37°C for 3 hr with indicated concentrations of *D. farinae* (solid line) or ovalbumin (dashed line).

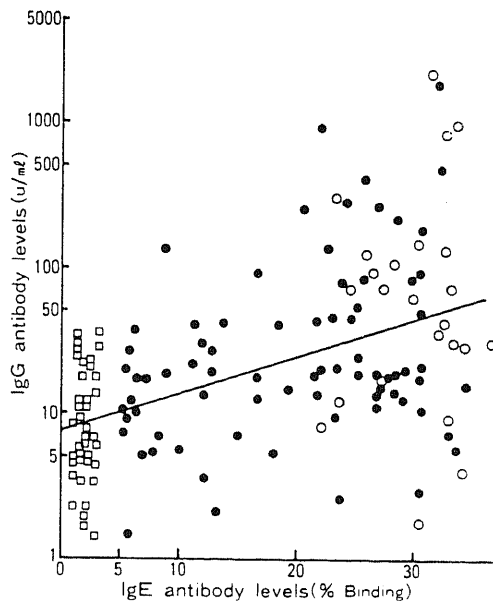


Fig. 5. Correlation between the titers of serum IgE and IgG antibody to *D. farinae*. ○, Group A (treated patients); ●, group B (untreated patients); ▲, group C (control group). Significant correlation ( $p < 0.01$ ) was observed ( $y = 7.31e^{0.060x}$  and  $r = 0.49$ ).

ことによると考えられる。一定の IgE 値における IgG-free serum と HSA 処理血清の RAST 値から IgG 除去による RAST 値の上昇率 (%increase) を以下の式で求めた。

$$\text{上昇率 (\%)} = \frac{\text{RAST 値 (IgG-free serum)} - \text{RAST 値 (HSA-treated serum)}}{\text{RAST 値 (HSA-treated serum)}} \times 100 (\%)$$

この IgE 抗体価の上昇率と IgG 抗体価との相関を求めたところ、両者には有意の正の相関 ( $y = 3.41 \log x - 8.35$ ,  $r = 0.88$ ,  $p < 0.01$ ) が認められ、IgG 抗体価が高値をとればとる程、IgE 抗体価はみかけ上低値をとることを示した (図9)。

V. IgG-rich serum 添加による IgE 抗体価 (RAST 値) の低下

IgG 抗体による RAST 値の抑制効果をみるために、IgG 抗体価低値の患者血清の IgG-rich serum 添加後

の RAST 値の低下の程度を以下の方法で検討した。

IgG 抗体価低値の患者血清 (IgG 抗体価 6.5 u/ml, RAST 値 33%) に、PBS (0.6% 人血清アルブミンを含む) を患者血清の 25 倍量添加後の RAST 値を RAST ① (7.6%)、IgG-rich serum を患者血清の 25 倍量添加後の RAST 値を RAST ②とし、PBS (0.6% 人血清アルブミンを含む) のみの RAST 値を RAST ③ (0.6%) として、以下の式にて、IgG-rich serum 添加による RAST 抑制率 (%inhibition) を求めた。

$$\text{抑制率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{RAST ②} - \text{RAST ③}}{\text{RAST ①} - \text{RAST ③}} \right) \times 100 (\%)$$

図 10 の如く 5 人について検討し、IgG 抗体価高値の血清 2 例の抑制率は 69.6%、82.6% と IgG 抗体価低値血清の抑制率 11.6%、2.9%、10.1% に比べ大きな抑制効果が認められた。なお IgG-rich serum の蛋白濃度は 6 mg/ml に調整した。

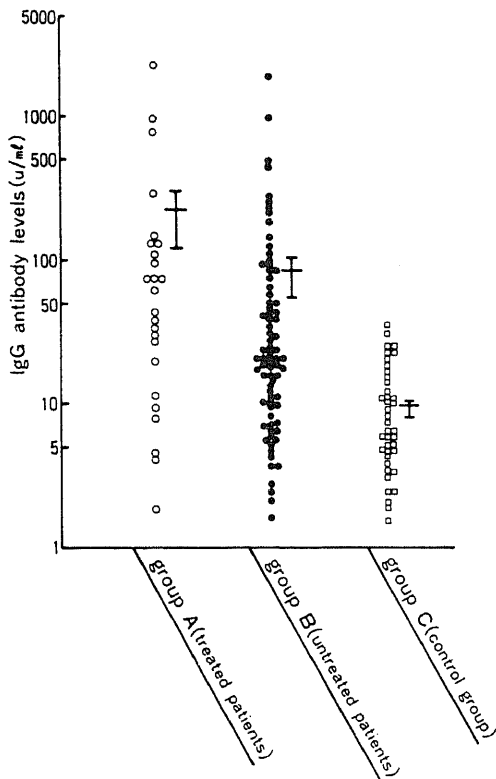
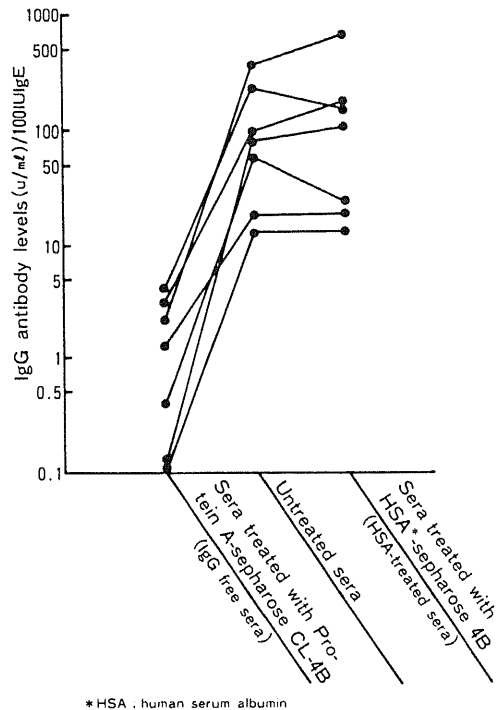


Fig. 6. Titers of anti-*D. farinae* IgG in the three groups. The vertical bars represent mean  $\pm$  SEM (u/ml). The significance of the differences between A and C ( $p < 0.01$ ) and between B and C ( $p < 0.05$ ) was evaluated by the Student's *t*-test.



\* HSA, human serum albumin

Fig. 7. Absorption of IgG by treatment with Protein A-Sepharose CL-4B. The IgG antibody levels of each serum containing 100 IU of IgE were compared. The mean values of anti-*D. farinae* IgG of IgG-free serum (1.67 u/ml) was significantly ( $p < 0.001$ ) reduced in comparison to that of the untreated serum (124.5 u/ml) and the HSA-treated serum (172.3 u/ml).

考 察

Ceska ら<sup>2)</sup>により臨床応用に供された paper disc RAST 法は、I 型アレルギーの原因抗原の検索に多大の貢献をなしてきたが、本法はもともと半定量的であり、多くの臨床アレルギーの研究者は本法の定量性を高めるため、種々の改良を加えてきた<sup>7)20)21)</sup>。しかも先にも述べた如く、本法の原理から他の免疫グロブリンの抗体の存在は、必然的に見かけ上 IgE RAST 値を下げることは想像に難くない。事実当初より、いわゆる遮断抗体 (IgG 抗体) が、いくつかの抗原においてみか

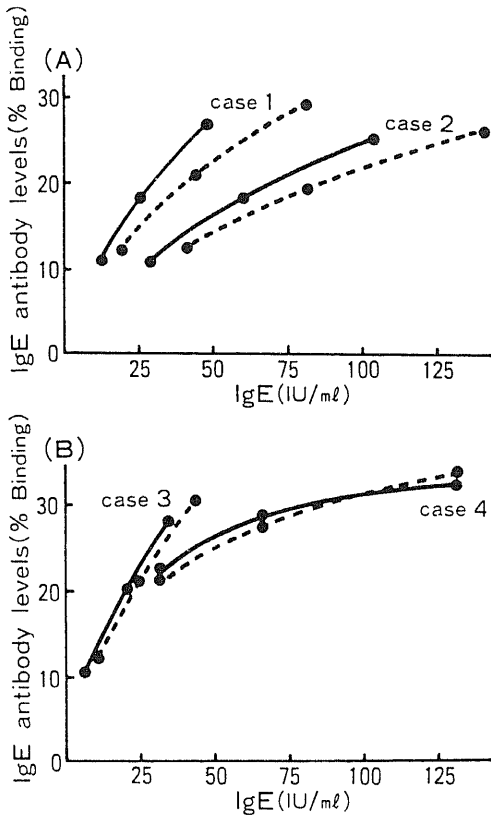


Fig. 8. Increase in the anti-*D. farinae* IgE levels (RAST values) after absorption of IgG. The IgE antibody levels (RAST values) were measured by diluting with IgG-free serum (solid line) and HSA-treated serum (dashed line) obtained from individual patients. The mean difference in the IgE antibody levels between two curves at given three points of IgE levels was expressed as a % increase in the IgE antibody levels. (A) Case 1 and 2 were patients with high IgG antibody level. (B) Case 3 and 4 were patients with low IgG antibody level.

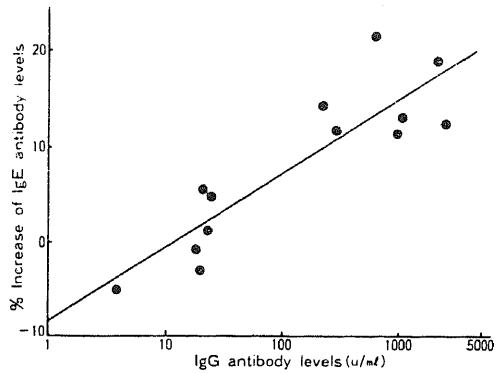


Fig. 9. Percent increases in the anti-*D. farinae* IgE levels (RAST values) after absorption of IgG and its relationship with the anti-*D. farinae* IgG levels.

$$\% \text{Increase} = \frac{\text{RAST values (IgE-free serum)} - \text{RAST values (HSA-treated serum)}}{\text{RAST values (HSA-treated serum)}} \times 100 (\%)$$

Significant correlation ( $p < 0.01$ ) was observed ( $y = 3.41 \log x - 8.35$  and  $r = 0.88$ ).

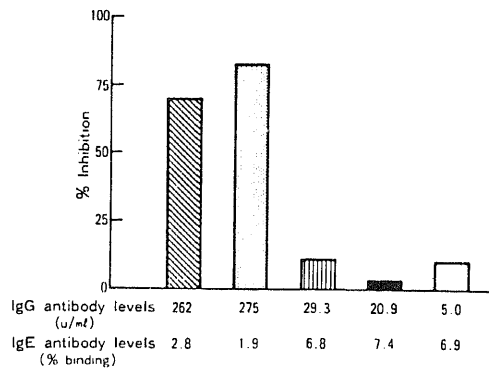


Fig. 10. The inhibitory effect of IgG-rich serum on the anti-*D. farinae* IgE levels (RAST values) assayed by paper disc RAST. The IgE antibody levels measured after adding 25-fold volume of IgG-rich serum to allergic serum with low IgG antibody levels (IgE RAST value, 33%; IgG antibody level, 6.5 u/ml) were set as RAST ②. RAST ② were compared with the IgE antibody levels (RAST ①) measured after adding 25-fold volume of PBS containing 0.6% human serum albumin to the same allergic serum.

$$\% \text{Inhibition} = \left( 1 - \frac{\text{RAST ②} - 0.6}{\text{RAST ①} - 0.6} \right) \times 100\%$$

(The constant number 0.6 indicates the RAST binding of PBS containing 0.6% human serum albumin.)

け上 IgE 抗体価を低下させるため免疫療法後の患者血清中の IgE 抗体価の正確な判定は困難であることが報告されてきた<sup>9-13)</sup>。更に RAST 法は抗体過剰域で測定されていることも報告されている<sup>22)</sup>。

ところで、本邦で最も一般的なアレルゲンであるダニ (*D. farinae*) については免疫療法後はもちろん、治療前にすでに高い濃度の IgG 抗体や IgA 抗体を保有することが報告されている<sup>14)15)</sup>。しかるに、抗 *D. farinae* IgE 抗体の季節性変動や免疫療法に伴う変動の報告においては、抑制因子の存在や本法が抗体過剰域で測定されているという問題点はあまり考慮されていないように思われる。そこで、著者はダニ (*D. farinae*) について、paper disc RAST 法による IgE 抗体価測定における IgG 抗体の抑制効果について検討した。

*D. farinae* についての今回の結果を考察する前にもう少しブタクサ花粉や honeybee venom などで行なわれた報告を概括してみることにする。Zimmerman ら<sup>4)</sup>はブタクサ花粉、honeybee venom にアレルギーの患者の血清を使用して RAST 法による IgE 抗体価測定における抑制因子について検索した。彼らは 56°C 4 時間加熱にて不活化した免疫療法施行患者の血清添加により、未治療患者の RAST 値が著明に低下することを発見し、これは免疫療法により増加した IgG 抗体によるものであることを確認した。さらにこの効果は paper disc と同様に固相担体にマイクロクリスタリンセルロースを用いる方法でもみられたが Sepharose 4B を使用して固相担体に結合した抗原の容量を増大させた場合は IgG 抗体による RAST 法への抑制効果が消失したことを報告した。Kemeny ら<sup>7)</sup>は、以前の報告<sup>23)24)</sup>にもあるように蜂にアレルギーでない養蜂家 (アレルギー症状なく IgE 抗体価低値) に IgG 抗体価高値を示す人が多いことを報告した。そして彼らの血清を蜂アレルギーの養蜂家 (アレルギー症状があり IgE 抗体価高値) の血清に添加すると、paper disc RAST 法による IgE 抗体価が低下し、一般に IgG 抗体価高値の場合は、IgE 抗体価がみかけ上低値をとる可能性があることを報告した。Vervloet ら<sup>8)</sup>はアレルギー性気管支肺膿菌症の患者血清中に *Aspergillus fumigatus* 抗原に対する 2 種類の抑制因子があることを発見し、1 つは抗原特異的な遮断抗体であり、他方は正常人血清にも存在する抗原非特異的な因子であることを報告している。

これらの因子による抑制効果は、その作用機序により固相担体に結合した抗原の容量の増大により消失ないしは減少すると考えられ、その為に、Zimmerman ら<sup>4)</sup>や Sobotka ら<sup>25)</sup>は Sepharose 4B、Linch ら<sup>3)</sup>は

Sepharose 2B、Zeiss ら<sup>5)</sup>はポリスチレン管を用いた。

ところが、本邦で臨床上重要な *D. farinae* に関してこの種の報告は全くみられない。ブタクサ花粉や honeybee venom 等で観察された IgG 抗体 (遮断抗体) による RAST 値の抑制現象が *D. farinae* にも存在するかどうか確認するため、IgG 抗体添加による RAST 値の低下、IgG 抗体除去による RAST 値の上昇の 2 つの確認を行った。図 10 の如く、IgG 抗体価高値の患者血清より得られた IgG-rich serum は明らかに IgE RAST 値を抑制しており、この時の IgE RAST 値 (7.6%)、IgG 抗体価 (262 u/ml, 275 u/ml) を示す血清は臨症的には十分あり得ると考えられる。一方、図 9 の如く IgG 抗体除去により IgG 抗体価が高ければ高い程 IgE RAST 値の上昇率が増加を示し、みかけ上 IgG 抗体により IgE RAST 値が抑制されていることを示した。

これらの実験結果は、IgG 抗体が paper disc 上のダニ抗原と IgE 抗体との結合を拮抗的に阻害していることを示唆している。

この抑制の程度を決定する因子は、(1) IgG 抗体と IgE 抗体の分子数の比率、(2) IgG 及び IgE 抗体に対する *D. farinae* の共通の抗原決定基の数とその共通の抗原決定基に対する IgG 及び IgE 抗体の親和性の相違、(3) IgG 及び IgE 抗体の分子数と paper disc 上の抗原決定基の数との比率、などにより決定されると考えられ、以下この 3 つの因子について考察を加えてみたい。

(1) の IgG 抗体と IgE 抗体の分子数の比率により IgG 抗体の抑制効果の強さが決定されているという機序については、Zeiss ら<sup>5)</sup>がブタクサで免疫療法中の患者において、IgE 抗体と免疫療法後増加した  $\mu\text{g}$  単位の IgG 抗体が容量に限界のある paper disc 上で競合していると述べている。また Paull ら<sup>10)</sup>は honeybee venom で免疫療法中の phospholipase-A (PLA) にアレルギーの患者において、PLA に対する IgE 抗体量は全 IgE 蛋白質量の 25.1~28.7% で IgG 抗体量は全 IgG 蛋白質量の 0.073~0.210% であり、IgE 抗体は ng 単位、一方 IgG 抗体は  $\mu\text{g}$  単位で存在し、IgG 抗体は少なくとも IgE 抗体の 1 万倍近くは存在していることを報告した。また彼らは IgG 抗体の分子数が IgE 抗体の 10~1000 倍存在すると、固相担体にセルロースを用いた RAST 法による IgE 抗体価が 10~40% みかけ上低値を示すことを報告した。ダニアレルギー患者においても IgG 抗体価高値の血清においては、IgG 抗体は IgE 抗体にくらべ、かなり高濃度に存在していると考えられ、IgG 抗体/IgE 抗体の比率が大きくなればなる程、IgE 抗体価測定における IgG 抗体の抑制効果は大



きくなると考えられる。(2)に関して、先にも述べたように honeybee venom で免疫療法を受けた患者の IgG 抗体は IgE 抗体の 1 万倍近く存在すると推測され<sup>10)</sup>、一方ダニアレルギー患者においても、その比率はそれに近いものではないかと考えられる。しかし、このように IgG 抗体が多量に存在する中で IgE RAST 法が可能であるのは、ひとつには IgG 抗体と IgE 抗体の対応する抗原決定基が異っており、拮抗する共通抗原がそれ程多くない可能性が考えられる<sup>26)27)</sup>。他方、IgG 抗体と IgE 抗体の paper disc 上の決定基に対する親和性に相違があることも考えられる。(3)の IgG 及び IgE 抗体の分子数と paper disc 上の抗原決定基の数の比率に関しては、固相担体に結合した抗原の容量の増大により IgG 抗体の抑制効果が消失することが報告されており<sup>3-5)25)</sup>、paper disc 上の抗原決定基の数が一定量を上まわれれば、影響は当然無視できるものと考えられる。その為には固相担体に結合した抗原の容量の増大の他に血清を希釈する方法は有用といえよう。事実、Perelmutter ら<sup>6)</sup>は、ブタクサ花粉、ライ麦に対するアレルギー患者において、Protein A-Sepharose CL-4B による IgG 除去により、paper disc RAST 法で測定された IgE 抗体価は 25~66% 上昇したが、血清希釈により上昇率が小さくなること、つまり IgG 抗体の影響が減ずることを示した。また Cheung ら<sup>11)</sup>は抗 honeybee venom IgE 抗体価測定において、IgG 抗体が濃度依存的にみかけ上 IgE 抗体価を低下させ、さらに IgE 抗体と IgG 抗体の混合血清を希釈すると IgG 抗体の抑制効果が消失することを示した。つまり、IgG 及び IgE 抗体の分子数と paper disc 上の抗原決定基の数との比率が大きい程、IgG 抗体の影響を受けやすく、比率が小さければ影響は小さくなると考えられる。IgG 抗体除去による RAST 値の上昇率が IgG 抗体添加の際の抑制率に比べ、低かったという今回の実験結果は IgG 抗体除去操作のために血清が希釈されたために生じたものと思われる。

以上、抗 *D. farinae* IgE 抗体の RAST 法での測定における IgG 抗体の抑制効果を、主にブタクサ花粉、honeybee venom での報告と比較検討を加えてきたが、ブタクサ花粉や honeybee venom はかなり精製された抗原により検討されているのに、*D. farinae* は粗抗原を使用している点に大きな相違がある。今後より精製された抗原<sup>28-30)</sup>による検討が望まれる。

Chapman ら<sup>14)</sup>は antigen binding assay 法により、ブリックテスト陽性者の 94% に *Dermatophagoides pteronyssinus* に対する IgG, IgA, IgE 抗体を検出し、一方ブリックテスト陰性者では IgE, IgA 抗体は検出されず、IgG 抗体のみが低濃度ではあるが 30% に検出

されたと報告した。今回の結果でも図 5 の如く、抗 *D. farinae* IgE 抗体価と IgG 抗体価は相関しており、一方未治療患者にも IgG 抗体価高値をとる場合が多数みられ、IgE 抗体価に影響を与え得ることが考えられた。ところで、ブタクサ花粉、honeybee venom にアレルギーの患者においては、治療前は IgE 抗体がほとんどなく、治療後はじめて上昇することが報告されており<sup>9)31-35)</sup>、IgG 体が IgE 抗体価測定を抑制するのは免疫療法を受けているものに限られる。

以上のように RAST 法による IgE 抗体価測定には IgG 抗体がかなり大きな抑制効果を与えることがわかってきたが、今まで花粉症において IgE 抗体価の免疫療法による変動や季節性変動は次のように考えられてきた。すなわち、IgE 抗体価は免疫療法後減少すること<sup>32)34)36)</sup>、花粉の飛散の季節に入ると未治療患者では上昇するが治療を受けている患者では上昇しないか、もしくは上昇してもその程度は少ないとされている<sup>33)37)38)</sup>。しかし最近 Zimmerman ら<sup>4)</sup>は、これらの報告の多くは RAST 法で行なわれており、免疫療法後 IgE 抗体価が低下するようにみえるのは、治療後上昇した IgG 抗体による抑制効果のためではないかと述べている。花粉症では治療後に測定された IgE 抗体価の評価が問題とされているが、ダニにおいては治療後はもちろん、治療前にすでに IgG 抗体が高濃度に存在しており、さらに他の免疫グロブリンの存在をも考えると、paper disc RAST 法による IgE 抗体価の正確な評価は困難といえる。

加えるに、RAST 法では抗体過剰域で測定していることが報告されており<sup>22)</sup>、事実我々は IgE RAST 値 30% 以上のダニアレルギー患者血清を段階希釈し RAST 値を求めたところ、10~25 倍希釈にてやっと RAST 値が低下し始める血清が多くみられた。以上の 2 点、即ち本法は IgG 抗体や他の免疫グロブリンにより抑制されること、更に、かなりの抗体過剰域で測定されているという問題点を解決し本法の定量性を高めるには現実には希釈血清を用いるのが簡便で望ましい方法であろうが、より精製された抗原を用いた検討が必要であろう。

## 結 論

ダニ (*D. farinae*) アレルギー患者 (治療群、未治療群) と対照群について、Protein A-Sepharose CL-4B を使用して、IgG-rich serum, IgG-free serum を得ることにより、paper disc RAST 法による抗 *D. farinae* IgE 抗体価測定における IgG 抗体の抑制効果について検討を加え、以下の結果を得た。

1. *D. farinae* に対する IgE 抗体価と IgG 抗体価

には正の相関がみられた。

2. グニアレルギー患者では対照群に比べIgG抗体価は有意に高値を示した。また治療群は未治療群に比べ高い傾向がみられたが、その差は有意ではなく、未治療患者にも高値を示すものが多くみられた。

3. RAST値はIgG抗体除去により上昇し、添加で低下を示した。

以上より *D. farinae* に関しては免疫療法未施行の患者でもIgG抗体価高値を示す人が多くみられ、paper disc RAST法によるIgE抗体価はIgG抗体や他の免疫グロブリンの影響により見かけ上低値をとることがあると考えられる。さらに本法はしばしば抗体過剰域で測定されているという問題点もあり、これらの2つの問題点を解決して本法の定量性を高めるには希釈血清を用いるのが簡便で望ましい方法であると考えられる。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深謝致します。また直接御指導頂きました平谷美智夫博士、武藤一彦博士はじめ、終始研究に御協力頂きました小児科アレルギーグループの諸先生方に感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第33回日本アレルギー学会総会(1983)において発表した。

#### 文 献

- 1) Wide, L., Bennich, H. & Johansson, S. G. O.: Diagnosis of allergy by an *in-vitro* test for allergen antibodies. *Lancet*, 2, 1105-1107 (1967).
- 2) Ceska, M., Eriksson, R. & Varga, J. M.: Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 49, 1-9 (1972).
- 3) Lynch, N. R., Dunand, P., Newcomb, R. W., Chai, H. & Bigley, J.: Influence of IgG antibody and glycopeptide allergens on the correlation between the radioallergosorbent test (RAST) and skin testing or bronchial challenge with *alterinaria*. *Clin. Exp. Immunol.*, 22, 35-46 (1975).
- 4) Zimmerman, E. M., Yunginger, J. W. & Gleich, G. J.: Interference in ragweed pollen and honeybee venom radioallergosorbent test. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 66, 386-393 (1980).
- 5) Zeiss, C. R., Grammer, L. C. & Levits, D.: Comparison of the radioallergosorbent test and a quantitative solid-phase radioimmunoassay for the detection of ragweed-specific immunoglobulin E antibody in patients undergoing immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 67, 105-110 (1981).
- 6) Perelmutter, L., Bergeron, M. & Mandy, F.: Assessment of the effect of IgG antibodies to ragweed and rye grass on the IgE antibody disc RAST. *Ann. Allergy*, 50, 393-397 (1983).
- 7) Kemeny, D. M., Lessof, M. H. & Trull, A. K.: IgE and IgG antibodies to bee venom as measured by a modification of the RAST method. *Clin. Allergy*, 10, 413-421 (1980).
- 8) Vervloet, D., Fujita, Y., Wypych, J. I., Reisman, R. E. & Arbesman, C. E.: The inhibitory effect of serum factors on measurement of IgE aspergillus antibodies by RAST. *Clin. Allergy*, 4, 359-369 (1974).
- 9) Aalberse, R. C., Reerink-Brongers, E. E. & Vermeulen, E.: RAST-inhibiting factors in human serum. *Int. Arch. Allergy*, 45, 46-49 (1973).
- 10) Paull, B. R., Jacob, G. L., Yunginger, J. W. & Gleich, G. J.: Comparison of binding of IgE and antibodies to honeybee venom phospholipase-A. *J. Immunol.*, 120, 1917-1923 (1978).
- 11) Cheung, N-K. V., Blessing-Moore, J., Reid, M. J., Lewiston, N. J. & Yang, G.: Reduction of interference by specific IgG with a modified microtiter solid-phase radioimmunoassay to measure honeybee venom IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 71, 283-293 (1983).
- 12) Johansson, S. G. O., Bennich, H. & Berg, T.: *In vitro* diagnosis of atopic allergy. III. Quantitative estimation of circulating IgE antibodies by the radioallergosorbent test. *Int. Arch. Allergy*, 41, 443-451 (1971).
- 13) Foucard, T., Johansson, S. G. O., Bennich, H. & Berg, T.: *In vitro* estimation of allergens by a radioimmune antiglobulin technique using human IgE antibodies. *Int. Arch. Allergy*, 43, 360-370 (1972).
- 14) Chapman, M. D. & Platts-Mills, T. A. E.: Measurement of IgG, IgA and IgE antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* by antigen-binding assay, using a partially purified fraction of mite extract (F<sub>4</sub>P<sub>1</sub>). *Clin. Exp. Immunol.*, 34, 126-136 (1978).
- 15) D'Souza, M. F., Pepys, J., Wells, I. D., Tai, E., Palmer, F., Overell, B. G., McGrath, I. T. & Megson, M.: Hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* in house dust allergy: a controlled study of clinical and immunological

- effects. Clin. Allergy, 3, 177-193 (1973).
- 16) 中村凱次: 気管支喘息患児の血清特異 IgE 抗体の変動について. 第 1 編 抗 *Dermatophagoides farinae* 特異 IgE の変動について. アレルギー, 28, 758-773 (1979).
- 17) 大岩茂則・西脇敬祐・高納 修: RAST により観察した減感作療法に伴う IgE 抗体レベルの変動について. アレルギー, 28, 924 (1979).
- 18) 吉田象二・大多和忠彦・鏡味 勝・板谷喬起・富岡玖夫・熊谷 朗: 長期減感作療法を施行した喘息患者血清中の IgE 値および特異的 IgE 値の変動. アレルギー, 28, 952-953 (1979).
- 19) Johansson, S. G. O. & Inganäs, M.: Interaction of polyclonal human IgE with Protein-A from *Staphylococcus aureus*. Immunol. Rev., 41, 248-260 (1978).
- 20) 大塚博邦・奥田 稔・坂口喜清・大西正樹・渡瀬隆雄・目沢朗憲: RAST 改良法 (Nalebuff-Fadel). アレルギー, 33, 71-77 (1984).
- 21) Nalebuff, D. J., Fadal, R. G. & Ali, M.: An enthusiastic view of the use of RAST in clinical allergy. Immunol. Allergy Pract., 3, 77-88 (1979).
- 22) Gleich, G. J. & Jones, R. T.: Measurement of IgE antibodies by the radioallergosorbent test. II. Analyses of quantitative relationships in the test. J. Allergy Clin. Immunol., 55, 346-357 (1975).
- 23) Müller, U., Johansson, S. G. O. & Streit, C.: Hymenoptera sting hypersensitivity: IgE, IgG and haemagglutinating antibodies to bee venom constituents in relation to exposure and clinical reaction to bee stings. Clin. Allergy, 8, 267-272 (1978).
- 24) Yunginger, J. W., Jones, R. T., Leiferman, K. M., Paull, B. R., Welsh, P. W. & Gleich, G. J.: Immunological and biochemical studies in beekeepers and their family members. J. Allergy Clin. Immunol., 61, 93-101 (1978).
- 25) Sobotka, A. K., Adkinson, N. F., Valentine, M. D. & Lichtenstein, L. M.: Allergy to insect stings. IV. Diagnosis by radioallergosorbent test (R. A. S. T.). J. Immunol., 121, 2477-2484 (1978).
- 26) 灰田美知子・伊藤幸治・宮本昭正: ELISA 法によるダニ抗原の分析. アレルギー, 32, 707 (1983).
- 27) 灰田美知子・中島敏治・荻田忠厚・奥平博一・伊藤幸治・宮本昭正: radioimmuno-electrophoresis 法 (RIPE 法) による抗ダニ IgG 抗体の検出とその意義について. アレルギー, 32, 712 (1983).
- 28) Chapman, M. D. & Platts-Mills, T. A. E.: Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen P<sub>1</sub>. J. Immunol., 125, 587-592 (1980).
- 29) Stewart, G. A. & Turner, K. J.: Physico-chemical and immunochemical characterization of the allergens from the mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 58, 259-274 (1980).
- 30) Stewart, G. A.: Isolation and characterization of the allergen Dpt 12 from *Dermatophagoides pteronyssinus* by chromatofocusing. Int. Arch. Allergy, 69, 224-230 (1982).
- 31) Yunginger, J. W. & Gleich, G. J.: Seasonal changes in IgE antibodies and their relationship to IgG antibodies during immunotherapy for ragweed hay fever. J. Clin. Invest., 52, 1268-1275 (1973).
- 32) Evans, R., Pence, H., Kaplan, H. & Rocklin, R. E.: The effect of immunotherapy on humoral and cellular responses in ragweed hay fever. J. Clin. Invest., 57, 1378-1385 (1976).
- 33) Levy, D. A., Lichtenstein, L. M., Goldstein, E. O. & Ishizaka, K.: Immunologic and cellular changes accompanying the therapy of pollen allergy. J. Clin. Invest., 50, 360-369 (1971).
- 34) Lichtenstein, L. M., Ishizaka, K., Norman, P. S., Sobotka, A. K. & Hill, B. M.: IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. J. Clin. Invest., 52, 472-482 (1973).
- 35) Sadan, N., Rhyne, M. B., Mellits, E. D., Goldstein, E. O., Levy, D. A. & Lichtenstein, L. M.: Immunotherapy of pollinosis in children. Investigation of the immunologic basis clinical improvement. N. Engl. J. Med., 280, 623-627 (1969).
- 36) Irons, J. S., Pruzansky, J. J., Patterson, R. & Zeiss, C. R.: Studies of perennial ragweed immunotherapy. Associated changes in cellular responsiveness, total serum antigen-binding capacity, and specific IgE antibody concentrations. J. Allergy Clin. Immunol., 59, 190-199 (1977).
- 37) Gleich, G. J., Jacob, G. L., Yunginger, J. W. & Henderson, L. L.: Measurement of the absolute levels of IgE antibody in patients with ragweed hay fever. Effect of immunotherapy on seasonal and relationship to IgG antibodies. J. Allergy Clin. Immunol., 60, 188-198 (1977).
- 38) Pencè, H. L., Mitchell, D. Q., Greely, R. L.,

Updegraff, B. R. & Selfridge, H. A.: Immuno-therapy for mountain cedar pollinosis. A double-

blind controlled study. J. Allergy Clin. Immunol., 58, 39-50 (1976).

**Serum IgE Antibody Titers against *Dermatophagoides farinae* assayed by Paper Disc Radioallergosorbent Test are suppressed in the Presence of the Specific IgG Antibody** Masaharu Kasei, Department of Pediatrics (Director: prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med. Soc. 93, 832 - 842 (1984)

**Key words:** *Dermatophagoides farinae*, RAST, IgE antibody, IgG antibody, Immunotherapy

#### Abstract

The inhibitory effect of IgG antibody on the IgE antibody levels assayed by the radioallergosorbent test (RAST) was analyzed using mite (*Dermatophagoides farinae*; *D. farinae*) antigen, which is a very common allergen in childhood bronchial asthma. The serum was collected from 104 mite allergic patients, including 25 cases under immunotherapy (treated group), 79 cases without immunotherapy (untreated group), and also from 41 non-allergic individuals as control. The serum IgE levels were determined by the paper radioimmunosorbent test (PRIST), the serum IgE antibody levels (RAST values) by the paper disc RAST, and the serum IgG antibody levels by the polystyrene tube radioimmunoassay. IgG-rich and IgG-free sera were obtained by passing through Protein A-Sepharose CL-4B column. There was a significant positive correlation between the IgE and IgG antibody levels ( $y=7.37e^{0.060x}$ ,  $r=0.49$ ,  $p<0.01$ ). The IgG antibody levels ( $M\pm SEM$  u/ml) were  $219.8\pm 98.4$  and  $86.9\pm 27.7$  in the treated and untreated groups respectively, which were significantly higher ( $p<0.01$  and  $p<0.05$ , respectively) compared with  $9.8\pm 1.1$  in the control group. Despite the higher level in the treated group than in the untreated group, the difference was not significant between them. Percent increase of the RAST values by removal of IgG antibody was calculated from the difference of the RAST values between IgG-free and HSA-treated sera (treated by CNBr-activated Sepharose 4B coupled with human serum albumin). There was a significant positive correlation between IgG antibody levels and percent increase of IgE antibody levels (RAST values) ( $y=3.4\log x-8.35$ ,  $r=0.88$ ,  $p<0.01$ ). When the IgG-rich serum from 2 patients with high IgG antibody was added to the serum of patients with low IgG antibody, the IgE antibody levels (RAST values) were markedly suppressed by 69.6 and 82.6%, respectively. On the other hand, when the IgG-rich serum was obtained from 3 patients with low IgG antibody, the RAST values were suppressed by only 11.6, 2.9 and 10.1%, respectively. The results in the present experiments with *D. farinae* suggest that the IgE antibody levels assayed by the paper disc RAST, even from untreated patients, show lower levels due to the inhibitory effect of the IgG antibody or antibodies of other classes. Moreover, the antibody levels in this method has frequently been measured with excess amounts of the antibody. To solve these problems and to improve the preciseness of quantification in this method, the use of diluted serum may be a simple and preferable way.