

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

北海道放射線技術雑誌 (1990.03) 50号:35～39.

AbビーズIgEキットの基礎的検討

石川幸雄, 佐藤順一, 西部茂美

《ノート》

Ab ビーズ IgE キットの基礎的検討

石川 幸雄* 佐藤 順一* 西部 茂美*

要旨 IgE (血中ヒト免疫グロブリンE) は、他の免疫グロブリンに比べ微量のためRIAが適している。現在、市販されているIgE測定キットには、RIST法、二抗体法、PRIST法などがあるが、操作の簡便性や検出感度、測定範囲に多少の問題を残していると思われる。今回、高感度測定可能なAbビーズIgE(栄研)キットの基礎的検討を行った。

本法は操作が簡便でかつ精度、再現性、回収率、希釈試験などの基礎的検討は、ともに良好であり臨床的に応用可能なキットである。

北放技術誌 50:35-39, 1990

I. 緒言

IgEは、1966年石坂¹⁾らによりブタクサ花粉症患者血中に、免疫グロブリンとして微量存在が発見された成分である。その測定は、花粉症、アレルギー性気管支喘息、アトピー性皮膚炎などの診断や経過観察に極めて有用な検査法となっている^{2),3)}。

現在、市販されているIgE測定キットには、RIST法、2抗体法、PRIST法などがあるが、操作の簡便性や検出感度、測定範囲に多少の問題を残していると思われる。

今回、我々は操作の簡便性や検出感度、測定範囲に優れたimmunoradiometric assay法(以下IRMA法という)によるAbビーズIgE(栄研)を検討する機会が得られ、本法の基礎的検討を行ったので報告する。

II. 方法

II-1 測定原理

本法は¹²⁵Iをトレーサとし、モノクローナル抗体を用いたビーズ固相サンドイッチ法に基づいたIRMA法である。

II-2 測定操作手順

測定操作手順の概要はFig. 1に示すとおりである。

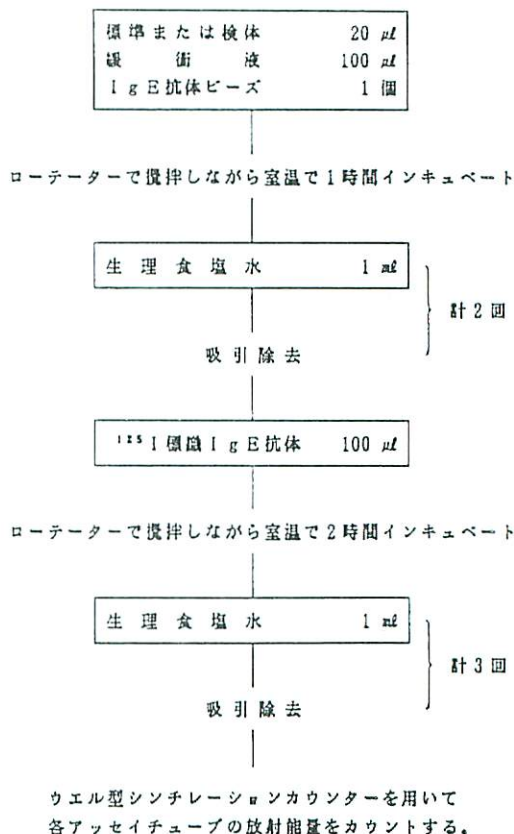


Fig. 1 測定操作手順

*旭川医科大学医学部附属病院 放射線部
(平成2年1月18日 受理)

標準曲線の回帰式は log アロカカーブ (log-logit 3 次多項式) を使用し, IgE 値を測定した。

測定器としてウェル型シンチレーションカウンタ (アロカ ARC-600) を使用した。

III. 対象

旭川医大病院を受診した外来および入院患者で, 診断の確定した総計164例を対象にした。その内訳は, 健康者80例, アレルギー性鼻炎33例, 気管支喘息26例, アトピー性皮膚炎25例である。

IV. 結果

IV-1 標準曲線と感度

標準液使用による12回測定の本キットの標準曲線を Fig. 2 に示す。各濃度におけるカウント C.V. の平均は, 低濃度側の1.6IU/ml で5.8%, 以下順に 8 IU/ml が4.0%, 40IU/ml が4.1%, 200IU/ml が6.1%, 1,000 IU/ml が2.4%, 5,000IU/ml が1.4%と, 良好な曲線の再現性が得られた。

最小検出感度測定には, キット添付の1.6IU/ml の標準液をゼロ濃度標準液で希釈し, 各濃度の平均 IgE 値を t 検定し, ゼロ濃度標準液と1%の危険率で有意差検定する方法を用いた。その結果, 本キットの検出感度は, 0.4IU/ml であった。

IV-2 第1反応 (第1インキュベーション) 時間

Fig. 3 に反応時間を室温 (25°C) で, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 20時間と7段階に変化させたときの標準液と2種類の検体の経時変化を示す。

0.5時間までは各濃度で結合率の上昇がみられるが,

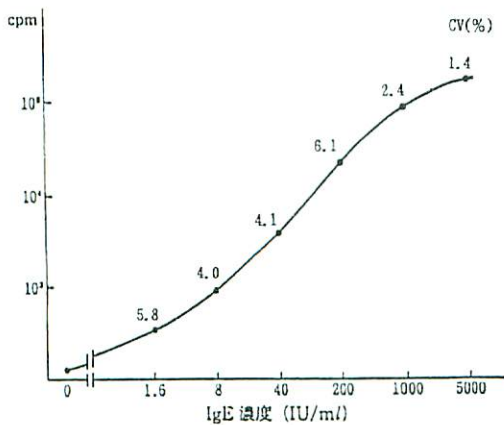


Fig. 2 標準曲線

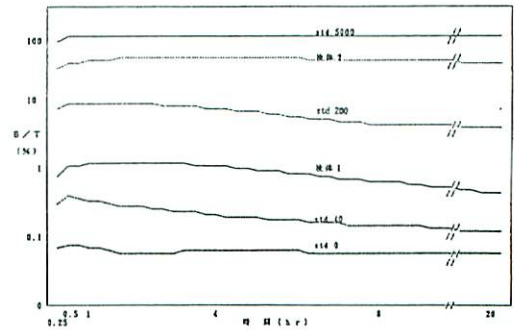


Fig. 3 第1反応時間の検討

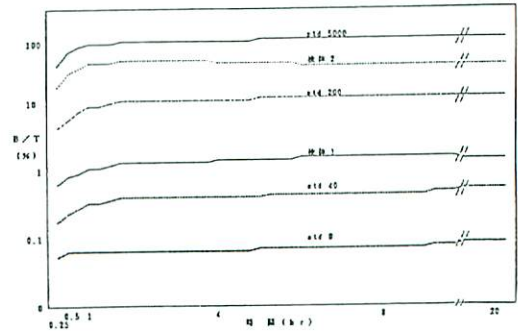


Fig. 4 第2反応時間の検討

0.5時間から20時間の間では結合率の変動は5%以下で安定した結果が得られた。

IV-3 第2反応 (第2インキュベーション) 時間

Fig. 4 に第1反応を室温 (25°C) で1時間終了後, 第2反応時間を室温 (25°C) で, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 20時間と変化させたときの標準液と2種類の検体の経時変化を示す。

2時間までは結合率の不安定な変動を示すが, 2時間から20時間までは結合率の変動は9.6%以下と安定した結果が得られた。

IV-4 再現性

アッセイ内変動を観察するため5種類の血清を用いて10回同時測定して再現性を検討した。

Table 1 に示すように変動係数 C.V. は2.98~8.63%であった。

アッセイ間変動は5種類の血清を2重測定で5回, 異なる Lot. で測定した。Table 2 に示すように変動係数 C.V. は2.13~8.10%であった。

いずれも良好な結果が得られた。

	I	II	III	IV	V
1	4.9	18.7	295.8	458.6	1439.2
2	6.2	20.1	209.4	447.6	1366.9
3	5.3	18.0	228.7	435.6	1420.7
4	4.9	18.9	235.7	423.4	1314.3
5	6.1	16.3	219.8	459.7	1243.9
6	5.3	19.9	207.4	462.1	1418.5
7	5.8	19.5	231.6	452.0	1345.8
8	5.5	18.2	211.9	442.2	1378.0
9	4.8	19.8	226.3	429.3	1332.8
10	5.6	17.1	227.5	461.4	1240.0
平均	5.44	18.65	222.91	447.19	1355.01
S.D.	0.469	1.197	11.782	13.339	76.669
C.V.%	8.629	6.418	5.295	2.983	5.215

Table 1 アッセイ内変動

	I	II	III	IV	V
1	5.8	19.8	249.7	435.0	1491.5
2	6.1	18.9	245.1	447.8	1568.0
3	6.2	19.5	259.2	534.4	1751.9
4	6.1	19.9	241.0	552.6	1728.5
5	6.6	20.1	246.1	491.8	1606.7
平均	6.16	19.64	248.22	498.32	1619.95
S.D.	0.258	0.418	6.149	40.361	93.617
C.V.%	4.183	2.126	2.478	8.099	5.578

Table 2 アッセイ間変動

サンプル血清	添加量 IU/ml	測定値 IU/ml	回収値 IU/ml	回収率 %
A	0	25.0	-	-
	4	29.8	4.8	120
	20	41.8	16.8	84
	100	107.9	82.9	82.9
	500	513.3	488.3	97.7
	平均			
B	0	100.1	-	-
	20	125.1	25	125
	100	198.0	97.9	97.9
	500	602.4	502.3	100.5
	2500	2610.7	2510.6	100.4
	平均			
C	0	309.8	-	-
	20	328.4	18.6	93
	100	410.7	100.9	100.9
	500	828.7	518.9	103.8
	2500	2919.9	2610.1	104.4
	平均			

Table 3 添加回収試験

IV-5 添加回収試験

3種類の血清にキット添付の標準液を等量添加して回収試験を行った。

Table 3 に示すように、平均回収率は、96.2%、106%、100.5%と良好であった。

IV-6 希釈試験

Fig. 5 に示すが、実線部分は標準液ゼロ濃度を用いて、3種類の異なる血清を、破線部分は緩衝液を用いて2種類の異なる血清をおのおの2~32倍まで順次希釈した場合の希釈試験の結果である。

IV-7 他法との相関

本キットとIgEキット第一・S (2抗体法, 第一ラジオアイソトープ) との相関を検討した。

Fig. 6 に示すように165例の測定値には回帰式 $y = 0.884x - 5.908$, 相関係数 $r = 0.950$ の相関があった。

IV-8 健常者のIgE値と各種疾患のIgE値

健常者80例中2例が高値 (861.3, 760.2) を示したので除外した。78例の測定値は、1.5~399.7IU/ml の範囲に分布し、平均値は 129.6 ± 104.2 IU/ml であった。正常値は平均値 + 2標準偏差以下とし、338IU/ml と決定した。

Fig. 7 に健常者と各種疾患のIgE値を示す。アレルギー性鼻炎33例で $70.7 \sim 2,688.7$ IU/ml (730 ± 550.4)、気管支喘息26例で $125 \sim 4,369$ IU/ml ($1,336.9 \pm 1,282.1$)、アトピー性皮膚炎25例で $36.5 \sim 8,881$ IU/ml

($1,879.8 \pm 1,769.9$) であった。

V. 考察

今回、我々が検討したAbビーズIgE (栄研) はIRMA法でモノクローナル抗体を用いているのが特徴である。

キットに関する一連の基礎的検討の結果、標準曲線は安定しており、測定感度は0.4IU/mlの最小検出感度を得た。従って、従来法において問題とされていた低濃度域は非特異的阻害因子の影響を受けにくく精度が良いので、検体量20μlで新生児及び乳児の正確な測定が可能となった。

希釈試験では原点に収束する直線が得られた。しかし、検体濃度が4,000IU/mlを越える場合には直線性が得られなかったため、特に高濃度検体 (4,000IU/ml以上) の測定には希釈する必要があると思われる。

本キットとIgEキット第一・S (2抗体法, 第一ラジオアイソトープ) との相関を検討したところ165例の測定値には回帰式 $y = 0.884x - 5.908$, 相関係数 $r = 0.950$ と良い相関を示した。

健常者による血中IgEの正常範囲は過去の報告によると長田⁹⁾らは330IU/ml以下、石原⁸⁾らは183IU/ml

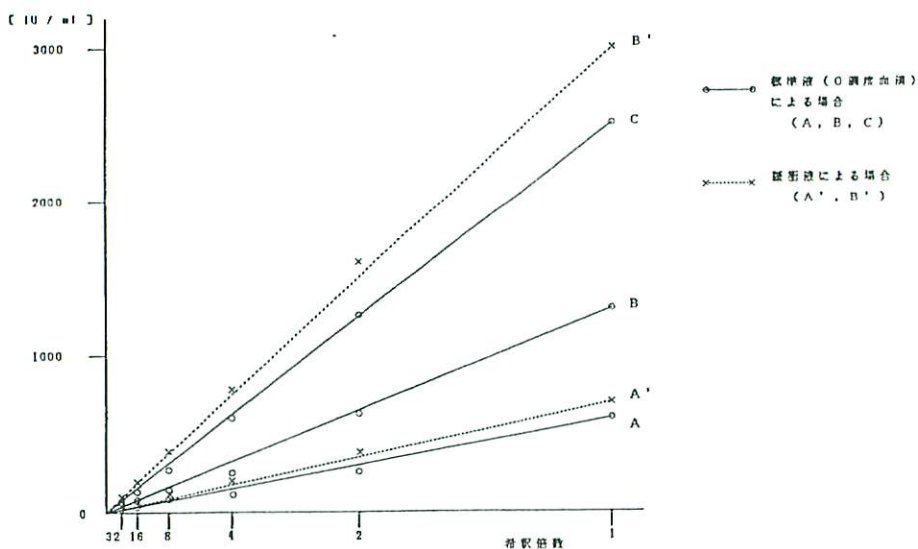


Fig. 5 希釈試験

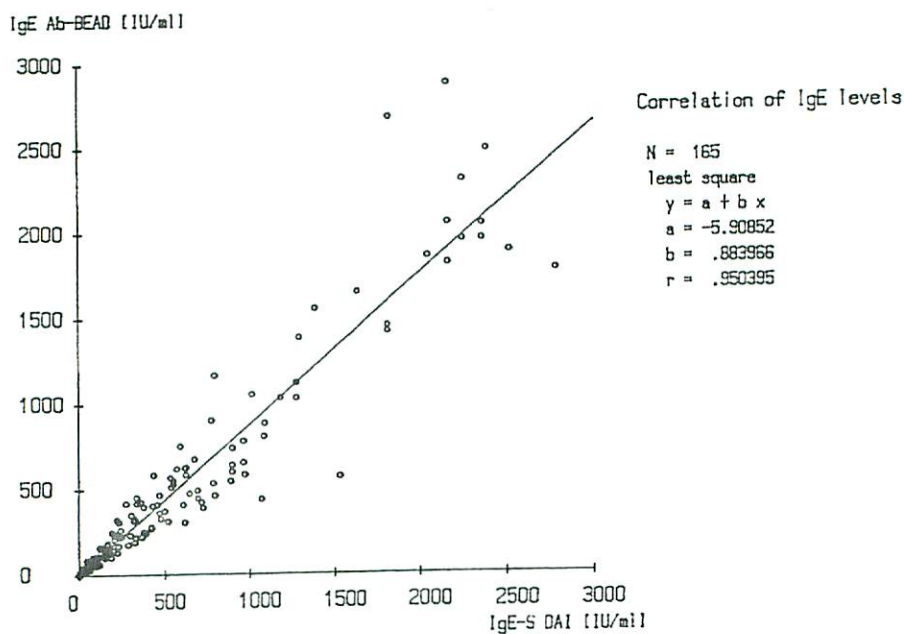


Fig. 6 他法との相関

以下、中島⁷⁾らは160IU/ml以下、千葉⁸⁾らは410IU/ml以下、高橋⁹⁾らは228IU/ml以下、柴¹⁰⁾らは416IU/ml以下、竹内¹¹⁾らは251IU/ml以下など種々の報告がなされており、真の正常値の設定には問題が多い。

今回、我々は健常者80例を対象にして測定した結果、

2例に本人の自覚症状がないアトピー性疾患が判明したので除外し、78例を対象にして正常値上限を338IU/mlとした。この様にIgEの正常値の検討には、健常者内にも無自覚なアトピー性疾患を呈している者がいることを考慮しなければいけないと考える。

