

RAST 法による日本住血吸虫症患者血清の特異的 IgE 値と全 IgE 値ならびに皮内反応閾 値との関係

宮本 昭正 伊藤 幸治

東京大学物療内科

石崎 達 保坂 幸男

久津見晴彦 大友弘士

国立予防衛生研究所寄生虫部

薬袋 勝

山梨県立衛生研究所地方病科

(昭和50年2月10日 受領)

緒言

抗原抗体反応系において即時型反応に関与する抗体は免疫グロブリン中の IgE 抗体であることが Ishizaka and Ishizaka (1967) によつて発見されて以来, IgE の研究は各国で盛んに行なわれている。

従来, 寄生虫疾患の殆んどすべての患者で, 該当寄生虫の虫体抽出抗原を用いた皮膚反応が, 即時型反応でも陽性に出る事実から, 寄生虫疾患においてもレアギン抗体の存在が重要視されていた。ところで血清 IgE の定量が可能になつて以来, 寄生虫疾患々々者血清中の IgE 値の研究が相次いで発表され, 外国では Johansson *et al.* (1968), Hogarth-Scott (1969), Rosenberg *et al.* (1970), Arbesman *et al.* (1972) の発表があり, 我国では伊藤ら(1972), 小島ら(1972), 石崎ら(1973, 1974) の発表がある。

それらの発表はいずれも現在寄生虫症罹患者の患者がときには数千 ng/ml を越える大量の IgE 値を示すことをみとめているが, 量的には必ずしも皮内反応と比例しない。

そこで最近では IgE 値を全 IgE 値と特異抗原に対応する IgE 値 (specific IgE 抗体値) に分け, 後者をとくに注目するようになってきた。なお特異的 IgE 値の定量は今迄かなり複雑であり広く用いられなかつたが

最近 Wide *et al.* (1967) によつて開発された radioallergosorbent technique (RAST) は手技が比較的簡単であるので次第に広く用いられるようになってきた。

喘息などのアトピー性疾患においてはすでに, 宮本ら(1973, 1974, 1975) が室内塵抗原およびその主要成分であるチリダニ (*Dermatophagoides farinae*), ついでブタクサ, スギ花粉, ソバなどの吸入性および食餌性抗原を使用し RAST 法で specific IgE 抗体の定量を行ない, これを total IgE 値および皮内反応閾値と比較し, specific IgE 抗体値が皮内反応閾値とかなりよく相関することを報告した。

寄生虫疾患についての specific IgE 抗体の測定はまだ緒についたばかりで報告が少なく, 第3回国際寄生虫学会において Dessaint *et al.* (1974) が報告しているだけである。我々は本論文で, 日本住血吸虫症患者を対象に, RAST 法で specific IgE 抗体を測定し, これと single radial immunodiffusion technique での total IgE 値(伊藤ら, 1972), 日本住血吸虫成虫抽出 Melcher 抗原(1943)による皮内反応閾値(石崎ら, 1964)との相関を検討したので報告する。

研究対象と方法

1. 対象: 対象は昭和48年3月, 山梨県下の日本住血吸虫流行地に於て検診した患者44名である。検診に際

し、全例に日本住血吸虫抗原皮内反応と採血を行なった。なおこの患者群は、数年前の検診で糞便中に日本住血吸虫卵を発見したので、3年前に地域の病院等において Stibnal などにより駆虫を行なっている。本調査にあたり、3回にわたり検便（MIFC 集卵法改良法、太田、佐藤、1957）を行つたが全例虫卵陰性であつた。しかし、いずれも皮膚反応は陽性を示した。対象の性別、年齢構成は表1の如くである。

表1 対象患者年齢分布

	年 齢 分 布					計
	30~39	40~49	50~59	60~69	70~	
男	2	8	6	3	1	20
女	4	6	5	8	1	24
計	6	14	11	11	2	44

2. 特異的 IgE の半定量法 (Wide *et al.* 1968)

原理：図1に模式したように固形物（本研究では pa-

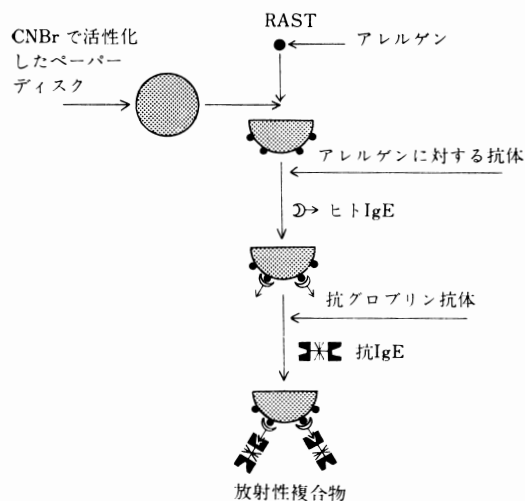


図1. radioallergosorbent test (RAST) の模式図

per disc を使用) と結合させた抗原と、それに対する抗体 (specific IgE) を結合させ、次いで isotope で標識した anti-IgE 抗体をこれに結合させ、残余の anti IgE を洗い流して残った物質中の放射能を count し、その値を標準血清での値と比較することで specific IgE 値を半定量する。

方法：宮本ら(1973)の検討に基き、次の方法で行なつた。

1) 抗原液作成；日本住血吸虫成虫の凍結乾燥虫体を

脱脂後 veronal buffered saline を用いて抽出し、総蛋白量として5000 γ /ml に相当する抗原液を作成した。

2) 抗原との coupling；宮本ら(1973)の検討した方法で抗原液(10ml に5mg を溶解)と CNBr で活性化した paper disc を incubate して抗原を結合した disc を作成。

3) 患者血清0.05ml 中に抗原結合 paper disc 1枚を入れ、1晩振盪し、次いで0.1% Tween 20含有borate buffer saline を約2ml 加え振盪後吸引し洗浄。この操作を3回繰返した。

4) 洗浄したこの paper disc に I¹²⁵ ラベル anti IgE を0.1ml (count が約8万/minute になるように稀釈したもの) を加え、室温で overnight 振盪後0.1% borate buffer saline(phosphate buffer saline でもよい) で3回洗浄して過剰の anti IgE を除去。

5) 残つた disc の放射能を count

6) 基準曲線の作成

チリダニに強く感作され、チリダニに対する IgE 抗体をかなり大量有すると思われる患者血清を標準血清とし、これを倍々稀釈し、ダニ抗原を結合させた paper disc に対して既述の方法で RAST を施行した。そして血清稀釈を横軸に I¹²⁵ の counts を縦軸にとつて曲線を描き、これを標準曲線とし、被検患者血清を用いての RAST の I¹²⁵ の counts から standard 血清の IgE 抗体に対する%を求めた。なお我々はこの standard 血清を RAST 施行の際に常に standard として用い比較の基準にしている。

3. Total IgE の測定：Arbesman *et al.* (1972) の方法により次の如く行つた。すなわち①1.2%のアガロースを煮沸してとかし、56°C に冷えるのを待つて I¹²⁵ でラベルした Anti IgE を加え、これを3×4インチの硝子板に均等に流して固め、②これに内径4mmのコルク borer で孔を作り、③この孔に被検血清と倍々稀釈した標準血清をマイクロピペットで1.5 μ l 入れ、④温箱の中に入れて2日間放置、⑤その後 Borate buffer saline に浸して2日間洗浄、⑥後乾燥させ、⑦フィルム用カセットに入れて寒天面にX線フィルムを接触させて1~2日放置、⑧現像し、⑨孔のまわりに出来たリングの直径を測定、⑩標準血清のリングから作製した標準曲線と、被検血清でのリングの直径とを対比させて IgE を測定した。

4. 皮内反応閾値：日本住血吸虫成虫抽出 Melcher 抗原(石崎、1964)の protein 30 μ g/ml 基準液から生食

表 2 諸検査成績一覧表 (3年前駆虫患者)

	氏名	年齢	日住虫卵		IgE ng/ml	Specific IgE (RAST)		皮内反応 閾値*		氏名	年齢	日住虫卵		IgE ng/ml	Specific IgE (RAST)		皮内反応 閾値*
			前	現在		cts/min	%					前	現在		cts/min	%	
男性	TM	32	+	-	600	0	0	4	女性	IM	38	+	-	647	647	3.4	64
	YT	38	+	-	1250	876	4.6	128		SS	39	+	-	195	0	0	8
	TT	40	+	-	150	154	1.4	32		OI	45	+	-	200	0	0	4
	IK	40	+	-	140	0	0	4		WT	45	+	-	210	566	2.8	8
	OT	41	+	-	120	0	0	4		NM	45	+	-	160	223	1.5	16
	TH	43	+	-	370	0	0	8		IT	47	+	-	1150	1400	12.1	128
	IT	44	+	-	190	780	3.9	16		IK	48	+	-	340	985	5.3	256
	IY	46	+	-	850	0	0	8		NY	48	+	-	1350	1524	13.9	16
	SY	47	+	-	200	0	0	4		IH	53	+	-	270	2250	16.0	16
	IM	49	+	-	150	0	0	2		IH	54	+	-	120	0	0	4
	(20) IY	50	+	-	800	355	2.0	16		(24) IS	55	+	-	740	180	1.4	8
	HY	53	+	-	155	0	0	4		IK	56	+	-	120	0	0	8
	IT	53	+	-	300	863	4.5	32		FH	57	+	-	120	240	1.6	64
	IK	56	+	-	190	0	0	2		SF	61	+	-	190	2960	22.4	32
	ST	58	+	-	130	0	0	4		OY	62	+	-	27	0	0	1
	YK	59	+	-	150	0	0	4		ON	62	+	-	400	0	0	2
	NG	63	+	-	120	52	1	16		TM	65	+	-	300	0	0	4
	IK	66	+	-	1100	980	5.4	16		YK	67	+	-	300	0	0	16
	OT	66	+	-	2500	2250	16.0	16		YH	68	+	-	1700	870	4.5	8
	TU	73	+	-	450	0	0	2		WK	68	+	-	5800	326	1.9	8
女性 OK	33	+	-	1500	937	4.9	8	YK	69	+	-	140	0	0	4		
YK	37	+	-	160	3656	31.6	1024	TT	70	+	-	2000	4469	46.3	128		

水で倍々稀釈系列を作り、0.005目盛のある皮内注射器(0.25ml)と皮内針を使い、抗原液約0.02mlを患者の前腕内側皮内に注射し、15分後に膨疹と発赤について直角に交わる直径の平均値をもとめ、石崎の判定基準(1961)により陽性を判定し、皮内反応陽性閾値をもとめ稀釈倍率で表わした。皮内反応閾値は半定量ながら組織固着 specific IgE 値を表わすと考えられる(石崎、1973)。

研究成績

研究成績を一覧表にまとめたものが表2である。この表において血清中 Total IgE 値は ng/ml で表わし、specific IgE 値は放射能 count/minute そのものと counts 数から標準血清に対する%の値に換算したものとを併記した。この表から specific IgE 抗体は対象者の52% (23/44) に証明された。なお研究成績は次の如く解析した。

1. Specific IgE 値と皮内反応閾値の関係

日本住血吸虫抗原に対する血清中の specific IgE 値の anti IgE 抗体 count そのものと、同抗原皮内反応陽性閾値の関係をしらべると図3の如く正相関をみとめた。相関係数 $\gamma = +0.676$ で0.1%以下の危険率で有意であった。この関係は specific IgE 値を%で表わしても同様で、図4の如く正相関がみとめられ、 $\gamma = +0.669$ でその値は count のときと殆んど同値であった。やはり0.1%以下の危険率で有意であった。

この事実は血流中に循環している specific IgE 量と組織(皮膚)に固着している specific IgE が一定の平衡関係にあることを示していると考えられる。

2. Specific IgE 値と Total IgE 値との関係

RAST 法によつて得た specific IgE 値 (counts/minute) と single radial immunodiffusion による total IgE 値 (ng/ml) の相関を検討したのが図5である。

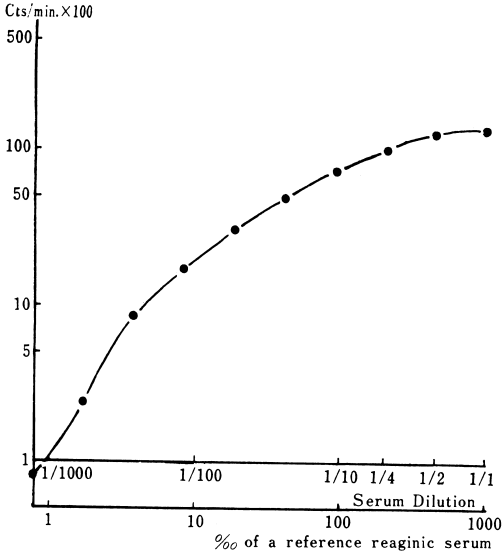


図2 RAST の Standard curve

(注) Counts の低いところでは図を拡大し, % の決定を容易にした

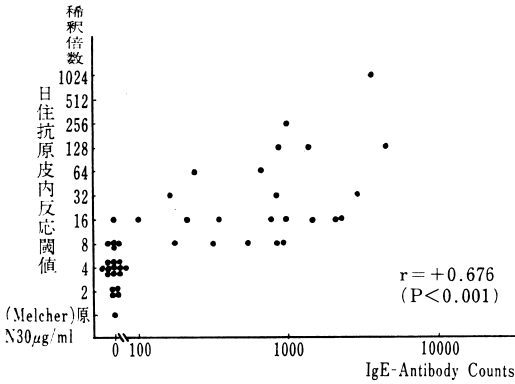


図3 RAST 法による Specific IgE 値と日本住血吸虫 Melcher 抗原皮内反応閾値との関係

両者の間の相関係数は $r = +0.265$ で、この相関係数の有意性の危険率は $0.05 < P < 0.1$ であつて有意とはいえない。数が増加して有意性をみとめたとしても $r = +0.26$ 程度では相関因子が26%で無関係の因子が74%ということになって両者の相関を重要視出来ない。したがつて、日本住血吸虫に対する specific IgE 抗体と total IgE 値は相関しないと推察出来る。

3. Total IgE 値と皮内反応閾値の関係

Total IgE と日本住血吸虫 Melcher 抗原に対する皮内反応閾値の関係を検討すると図6如くである。両者の

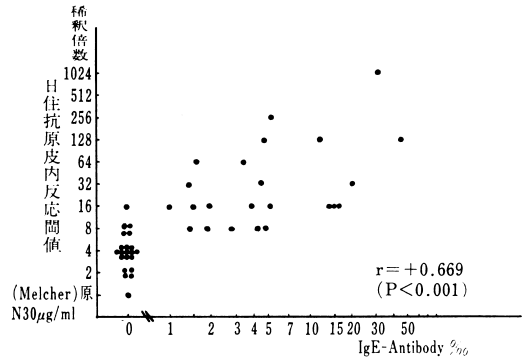


図4 RAST 法による Specific IgE 値と日本住血吸虫 Melcher 抗原皮内反応閾値との関係

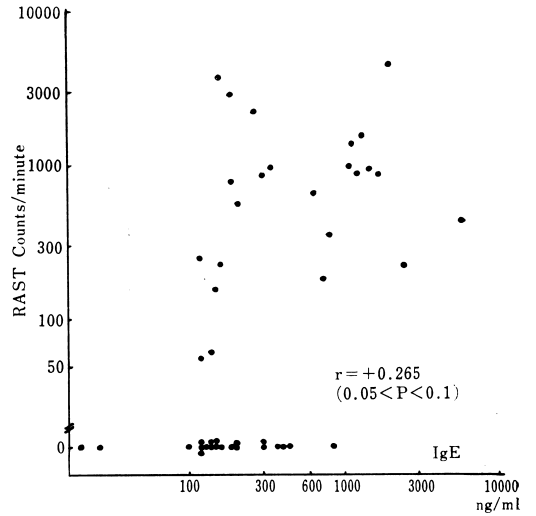


図5 RAST 法による日本住血吸虫抗原に対する Specific IgE 値と Total IgE 値との関係

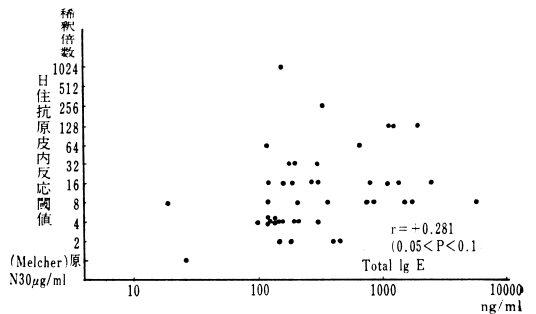


図6 Total IgE 値 (ng/ml) と日本住血吸虫 Melcher 抗原皮内反応閾値との関係

相関係数 $\gamma = +0.281$ で、その有意性の危険率は $0.05 < P < 0.1$ であるので有意とはいえないかった。数が増加して有意性をみとめたとしても、このままの取扱いは $\gamma = +0.28$ で相関因子26%、無関係因子72%であるから両者の相関を重要視出来ない。したがって total IgE 値と皮内反応閾値すなわち組織固着 specific IgE 値は相関しないと推察できる。

考 察

既報(石崎ら, 1974)の如く RIST 法(Radioimmunosorbent test)による血清中の total IgE 値は日本住血吸虫症患者、とくに現在罹患者では増加しているが、その増加の傾向は現在罹患者の半数が正常値をしめし、他の半数が著しく増加をしめして一元的なものではなかった。したがって total IgE 値と日本住血吸虫抗原による皮内反応閾値との間には相関がみられなかった。また既報(Miyamoto *et al.* 1974)のようにアトピー疾患でも specific IgE 抗体値は total IgE 値と必ずしも相関しない。そこで寄生虫疾患においてはどうかを検討した結果、RAST 法で日本住血吸虫症既往者44名中23名(52%)に該当抗原に対する specific IgE 抗体(0~46%)をみとめた。

ハウスダストまたチリダニ抗原に対する IgE 抗体は PK 反応と正相関をしめすことが、しられている。Des-saint *et al.* (1974) も PK 反応と比較して、マンソン住血吸虫抗原に対する specific IgE 値が相関することを報告している。定量的 PK 反応は IgE の皮膚固着性を利用した血清中のレアギン(IgE 抗体)の定量法であるが、recipient をうることは必ずしも容易ではなく問題なしとしない。今回皮内反応閾値を示標にして、血清中の specific IgE との関係をしらべてみたところ、血清中の specific IgE 抗体と該当抗原による皮内反応陽性閾値との間には正相関がえられた。すでに皮内反応閾値は定量的 PK 反応による血清中のレアギン値と直線相関をなすことが知られている(石崎ら, 1964, 1968; Miyamoto *et al.* 1969)。

レアギンは IgE 抗体であるので、上記の正相関の意味を考えてみたい。皮内反応閾値の意義を証明するのに石崎ら(1968)は定量的 P-K 反応を利用したが本研究の成績は皮内反応閾値がレアギン値をかなりよく表現することを RAST 法によつて再確認したことになる。従つて皮内反応閾値の利用価値を再確認したことにもなるわけである。

次に血清 IgE 値と皮膚反応閾値、すなわち、皮膚固着 IgE 値との正相関は、IgE が血清中から組織に固着し、一方では組織から IgE が離れてゆく代謝課程が平衡関係にあることを証明していると考えられる。

なお上記の相関関係は抗体活性を有する specific IgE についてだけ認められて、total IgE については証明できず、また specific IgE 抗体と total IgE 間にも量的な相関が証明出来なかつた。これは、アトピー疾患における抗原と total IgE、および specific IgE との関係と同様で、寄生虫抗原においてもその様な関係にあることを確認しえたことになる。

総括と結論

山梨県の日本住血吸虫症流行地において、3年前に駆虫を実施した患者44名(32~73歳、男20、女24)について、血清 IgE 値の測定、血清 specific IgE 抗体値の定量(RAST 法)、皮内反応閾値の決定、検便集卵を実施して次の結果をえた。

1. 対象者は全部糞便内虫卵が陰性化していた。
2. 血清 IgE 値は 27~5,800 ng/ml、血清日住抗原 specific IgE 抗体は RAST での counts で 0~4469 counts/min (standard 血清の 0~46%)、日住抗原皮内反応閾値は基準液(prot. 30 μ g/ml)よりその 2^{-10} 稀釈液の開であつた。
3. 血清の specific IgE 抗体値と日住抗原皮内反応閾値は $\gamma = +0.7$ で正相関し、0.1%以下の危険率で有意であつた。
4. 血清 specific IgE 抗体値と血清値 IgE とは相関が認められなかつた。血清 IgE と日住抗原皮内反応閾値との間にも相関がなかつた。
5. 血清 specific IgE (血液内循環中)と組織固着 specific IgE (日住抗原皮内反応閾値)とはその代謝上、平衡関係にあると考えられる。

文 献

- 1) Arbesman, C. E., Ito, K., Wypych, J. I. & Wicher, K. (1972): Measurement of serum IgE by a one-step single radial radio diffusion method. *J. Allergy & Clinical Immunol.*, 49, 2, 72-80.
- 2) Dessaint, J. P., Bout, D., Watter, P. and Capron, A. (1974): Immunoglobulin in human helminthic infections determination of specific IgE antibodies by specific immunosorbents. *Proceedings of Third International Congress of Parasitology*, 2, 1042.

- 3) Hogarth-Scott, R. S., Johansson, S. G. O. & Bennich, H. (1969) : Antibodies to *Toxocara* in the sera of visceral larvamigrans patients : The significans of raised levels of IgE. Clin. Exp. Immunol., 5, 619-625.
- 4) Ishizaka, K. and Ishizaka, T. (1967) : Identification of γ E-antibodies as a carrier of reaginic activity. J. Immunol., 99, 1187.
- 5) 石崎達, 荒木英斉, 久津見晴彦(1961) : 皮内反応の基礎的研究(1) 即時皮内反応陽性判定規準及び反応の特質に就て. アレルギー, 10, 5, 307-317.
- 6) 石崎達, 飯島利彦, 伊藤洋一(1924) : 日本住血吸虫病の診断法の研究(2) 日本住血吸虫抗原皮内反応の判定規準と診断的価値. 寄生虫誌, 13, 5, 387-396.
- 7) 石崎達, 飯島利彦, 伊藤洋一(1968) : 日本住血吸虫抗原皮内反応及びその陽性限界閾値(稀釈法)の意義. 寄生虫誌, 17, 1, 60-66.
- 8) 石崎達(1973) : 寄生虫皮内反応の本質とその応用. 寄生虫誌, 22, 1, 13-33.
- 9) 石崎達, 小早川隆敏, 伊藤洋一, 保阪幸男, 津久見晴彦, 葉袋勝, 梶原徳昭, 三木阿い子(1973) : 日本住血吸虫感染者の IgE レベルと皮内反応閾値の関係. 寄生虫誌, 22, 1, 東日本支部大会記事特集, 補頁17.
- 10) 石崎達, 小早川隆敏, 伊藤洋一, 保阪幸男, 久津見晴彦, 葉袋勝, 梶原徳昭, 三木阿い子(1974) : 日本住血吸虫症患者の血清 IgE 値について. 寄生虫誌, 23, 201-206.
- 11) Ito, K., Sawada, T. and Sato, S. (1972) : Increased serum IgE level in individuals infected with *Schistosoma japonicum*, *Wuchereria bancrofti* or hookworm, and the changes by treatment in schistosomiasis. Jap. J. Exp. Med., 42, 115-123.
- 12) Johansson, S. G. O., Bennich, H. & Wide, L. (1968) : A new class of immunoglobulin in human serum. Immunol., 14, 265-272.
- 13) Kojima, S., Yokogawa, M. and Tada, T. (1972) : Raised levels of serum IgE in human helminthiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 21, 913-918.
- 14) Melcher, L. D. (1943) : An antigenic analysis of *Trichinella spiralis*. J. Infect. Dis., 73, 31-39.
- 15) 宮本昭正, 真野健次, 伊藤幸治, 富谷百合子, 堀内淑彦(1973) : Paper disc を用いての Radioallergosorbent Test (RAST) に関する研究. アレルギー, 22(9), 584-593.
- 16) Miyamoto, T., Johansson, S.G.O., Ito, K. and Horiuchi, Y. (1974) : Atopic allergy in Japanese subjects: Studies primarily with radioallergosorbent test. J. Allergy & Clin. Immunol., 53, 1, 9-19.
- 17) 宮本昭正, 真野健次, 森田寛, 工藤宏一郎, 佐野靖之, 伊藤幸治, 堀内淑彦(1955) : Radioallergosorbent test (RAST) を用いての臨床的検討. アレルギー, 印刷中.
- 18) Miyamoto, T., Furuya, K., & Mizuno, K. (1969) : Studies of skin sensitizing antibody : PK titer in relation to the end point of intracutaneous skin test and the concentration of antigen, and neutralization of skin sensitizing antibody with antigen. アレルギー, 18, 10, 836-841.
- 19) 太田秀浄, 佐藤重房(1957) : 寄生虫卵各種集卵法についての研究,特に日本住血吸虫卵の MIFC 法による集卵法について. 北関東医学雑誌, 7, 68-74
- 20) Rosenberger, E. R., Whalen, G. E., Bennich, H. & Johansson, S.G.O. (1970) : Increased circulating IgE in a new parasitic disease-human intestinal capillariasis. New Eng. J. Med., 283, 1148.
- 21) Wide, L., Bennich, H. & Johansson, S.G.O. (1967) : Diagnosis of allergy by an invitro test for allergen antibodies. Lancet, ii, 1105.

Abstract

SPECIFIC IgE ANTIBODY AND TOTAL IgE IN SERA, AND
THRESHOLD VALUES OF SKIN TEST IN PATIENTS
OF *SCHISTOSOMIASIS JAPONICA*

TERUMASA MIYAMOTO, KOJI ITO

(*Department of Medicine & Physical Therapy, University of Tokyo
School of Medicine, Tokyo*)

TATSUSHI ISHIZAKI, YUKIO HOSAKA, HARUHIKO KUTSUMI

HIROSHI OHTOMO

(*Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo*)

AND

MASARU MINAI

(*Department of Endemic Diseases, Yamanashi Prefectural Hygiene Laboratory*)

Forty four adult-patients of in an endemic area in Yamanashi Prefecture were investigated from the immunological aspects. They were treated three years ago and have become negative for ova in feces.

The range of total IgE in serum by single radial immunodiffusion method was between 27 to 5800 ng/ml. The specific IgE in serum to the antigen of *Schistosoma japonicum* was between 0 to 46% of standard IgE antibody by RAST, and the threshold titer of positive skin reaction to the antigen of *S. japonicum* was between 0 to 2^{-10} concentration.

There was a close positive correlation between the titer of specific IgE and the threshold titer of positive skin reaction due to the antigen of *S. japonicum* and the correlation coefficient was +0.67. It was highly significant as $P < 0.001$. However, no significant correlations was noted between the specific IgE antibody titer and the total IgE level, and between threshold titer of positive skin test and the total IgE level.

The fact of close correlation between the titer of specific IgE antibody and the threshold titer of positive skin reaction to the antigen of *S. japonicum* may indicate that the balance exists between specific IgE in serum and that in tissue (mast cells & basophiles).