

化学発光免疫測定法による新生児乾燥濾紙血液中の Total IgE の測定—その基礎的検討と応用

米森 宏子 山口 昭弘 花井 潤師 川合 常明
福士 勝 清水 良夫 阿部 克己 菊地由生子
由利 賢次*1 石井 敏明*1 今井 敏夫*2 藤枝 憲二*3

要 旨

小児アレルギー疾患（アトピー疾患）を発症前に予防することを目的とし、その基礎的検討として乾燥濾紙血液中の Total IgE (IgE) の測定を化学発光免疫法により検討し、新生児期の IgE 測定に有用な方法を確立した。

健常児 100 例の IgE は新生児期 0.35 IU/ml から生後 1 カ月で 0.95 IU/ml と有意に上昇し、 $r = 0.5745$ の相関を示した。現在までのフィールドテストの結果で新生児期 IgE 値と両親のアレルギー歴との間には有意な関係は認められていない。

1. 緒 言

Coca と Cooke¹⁾ により提唱された“アトピー”という言葉は、I 型アレルギー症（即時型アレルギー症）すなわち IgE mediated reaction の表現型に相当すると考えられ、その発症機構は極めて複雑で多因子に及ぶ。その因子のひとつとして注目されるのが遺伝因子としてのアトピー素因 (IgE を産生しやすい素因 Atopic predisposition) である。

小児アレルギー疾患はこのアトピー素因を持つ“high allergic risk” newborn^{2), 3)} への食物抗原や吸入抗原の感作に源を発し、その後、湿疹などの皮膚疾患から、喘息、鼻炎、さらには花粉症などの症状に進行していく allergy march⁴⁾ と呼ばれる推移をたどる。このような状態を避けるためには、早期におけるアトピー素因の検出、さらに抗原となる原因物質の除去（遮断）による発症の予防が必要である。

そこで、現在新生児の先天性代謝異常症やクレチン症等のマススクリーニングのために採血されている新生児期（生後 5 日前後）の乾燥濾紙血液を用い、発症の主要な因子である Total IgE (以下 IgE) の測定とアレルギー疾患の家族歴調査の結果から、新生児期でのアレルギー疾患の発症予測の検討を行うこととした。

新生児期における血清中 IgE 濃度は 1 IU/ml 以下と低濃度であり、乾燥濾紙血液から得られる血液量も数 μl と限られていることからその測定には 0.1

IU/ml の感度が必要である。そこで今回は、基礎的検討として高感度な IgE 測定法を化学発光免疫法により確立し、その有用性と健常児の IgE レベルについて検討した。また、本年 1 月からのフィールドテストによる現在までの新生児 197 例の IgE 値及びアレルギー家族歴調査の結果、またそのうちの何例かについては生後 1 カ月での乾燥濾紙血液 IgE 及び臍帯血の血清 IgE の測定も行っているのを併せて報告する。

2. 方 法

2-1 測定法

(1) 試 薬

血清及び乾燥濾紙 IgE の測定はケミルミ IgE キット (CIBA-CORNING 社製) を用いた。これは固相化抗体として抗ヒト IgE 結合鉄微粒子、標識抗体としてアクリジニウムエステル標識抗ヒト IgE 抗体から成っている。

(2) 標準 IgE

血清 IgE はキット添付の 2 ポイント標準溶液を用いた。乾燥濾紙血液 IgE 測定時にはキット添付の標準溶液を 10 ポイント (0.0-36.0 IU/ml) になるように調製し、等量の洗浄赤血球を加えてスクリーニング用濾紙に 50 μl ずつスポットし乾燥させたものを用いた。

*1 北海道社会保険中央病院小児科 *2 札幌厚生病院小児科 *3 北海道大学医学部小児科

(3) 測定機器

ケミルミアナライザーII (CIBA-CORNING 社製) を用いた。

(4) 測定方法

血清 IgE の測定はキットの血清 IgE 測定法に従った。乾燥濾紙血液 IgE の測定は血清 IgE 測定法に改良を加えて行った。すなわち乾燥濾紙血液 4.5 mm disc 1 枚をマイクロプレートのウェルに取り、PBS75 μ l を添加後 2 時間振とう溶出し、試験管にその溶出液 50 μ l を採取、標識抗体 20 μ l と固相化抗体 100 μ l を添加して攪拌後 1 晩 (16 時間以上) 室温にて反応させた。磁気分離器 (マジックラック) を用いて精製水 1.0ml で 2 回洗浄した後、精製水 100 μ l を加えて攪拌し、ケミルミアナライザーにセットした。装置内では過酸化水素水液と水酸化ナトリウム液の添加によって標識アクリジニウムエステルから放出される光子数が測定され、濃度値が換算される。

2-2 健常児 IgE レベルの設定

健常児 100 例の新生児期と生後 1 カ月での乾燥濾紙血液 IgE を測定し、それらのレベル及び両者の関係について検討した。同時に 20 例について臍帯血の血清 IgE の測定を行い、新生児期の IgE 値との関係を検討した。

2-3 フィールドテストの実施

本年 1 月より市内 2 医療機関における新生児の乾燥濾紙血液 IgE を測定するとともに、アレルギー疾患の家族歴 (父、母、家族 (祖父母、兄弟)), 栄養法 (母乳、人工乳、混合) についての調査を行った。また 1 カ月検診時に採血が可能な場合、この時点での乾燥濾紙血液 IgE の測定、及び臍帯血が保存されている場合にはその血清 IgE の測定も行った。

3. 結果

3-1 測定法の検討

(1) 乾燥濾紙血液からの IgE の溶出時間の検討 IgE が 0IU/ml と 280IU/ml の乾燥濾紙血液に PBS を添加し 30 分、1、2、4、24 時間の振とう溶出を行ったところ 30 分の溶出時間で十分な発光強度に達していた。そこで今回は 2 時間溶出を行った。(図 1)

(2) 抗原抗体反応時間の検討

10 ポイント濃度 (0.14-280IU/ml) の乾燥濾紙血液 IgE について反応時間を 30 分、4、16 時間と変え

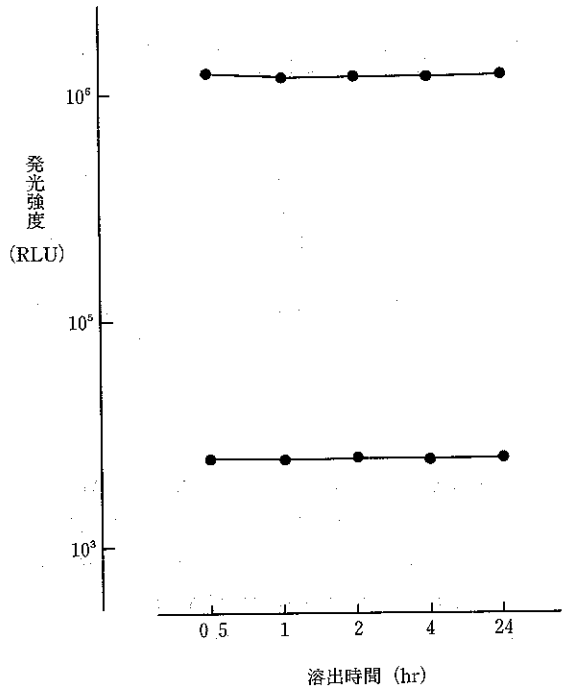


図 1 溶出時間と発光強度の関係

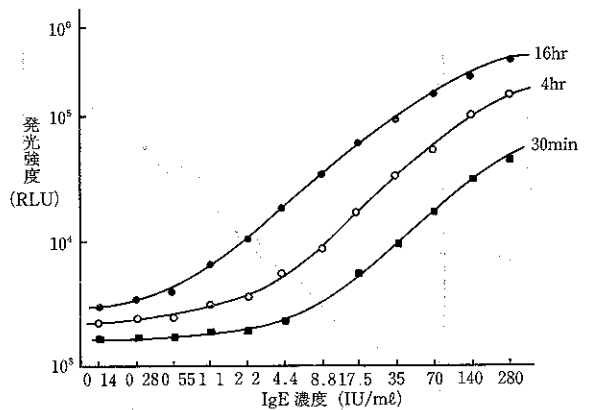


図 2 抗原抗体反応時間と発光強度の関係

てその発光強度を測定したところ、反応時間が長くなるほど発光強度及び測定感度が上昇した。この結果から 1 晩 (16 時間以上) 抗原抗体反応を行った。(図 1、図 2)

(3) 再現性

5 ポイント濃度 (IgE0 4-320IU/ml) の乾燥濾紙血液から求めた本法の再現性は測定内で変動係数 (CV) が 7.3%-11.7%、測定間で 7.9%-13.7% と良好であった。(表 1)

表1 乾燥濾紙血液I-gE測定における再現性(IU/ml)

		No.				
		1	2	3	4	5
測定内	Mean	0.43	1.25	10.14	77.8	320.9
	SD	0.05	0.13	0.74	6.86	35.11
	CV(%)	11.7	10.4	7.3	8.8	10.9
測定間	Mean	0.47	1.08	9.12	58.5	165.6
	SD	0.06	0.12	0.72	6.99	22.9
	CV(%)	11.9	11.0	9.9	11.9	13.7

(4) 乾燥濾紙血液測定値と血清測定値の相関

乳児から成人 35 例について乾燥濾紙血液 IgE 濃度と血清 IgE を測定したところ両者の相関関係は $r=0.9958$, また回帰直線では Y (乾燥濾紙血液) = $0.0092 + 0.981X$ (血清) とほぼ 1 : 1 となった。(図 3)

(5) 乾燥濾紙血液 IgE の保存条件と安定性

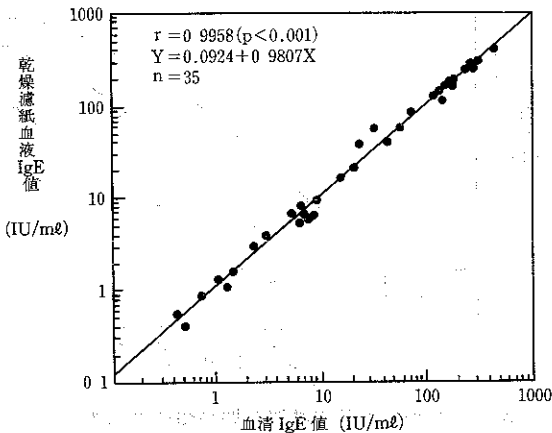


図3 乾燥濾紙血液 IgE と血清 IgE の相関

4, 25, 37°Cにおいて4週間保存したところ室温(25°C)状態でも2週間の保存において95%以上安定であった。(図4)

3-2 健常児 IgE の測定

健常児の IgE 値は新生児期で 0.35 IU/ml , 1 か月で 0.96 IU/ml となり有意に上昇し, 両者間には $r=0.5745$ と有意な相関関係が得られた。(図5) また新生児期の IgE 値と臍帯血の血清 IgE との間にも有意な

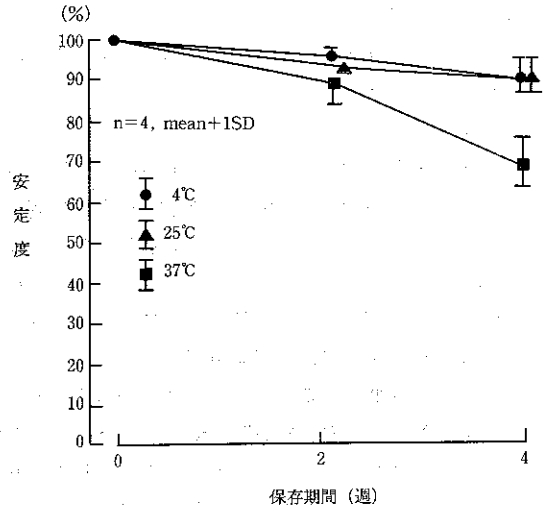


図4 乾燥濾紙血液の保存条件とその安定性

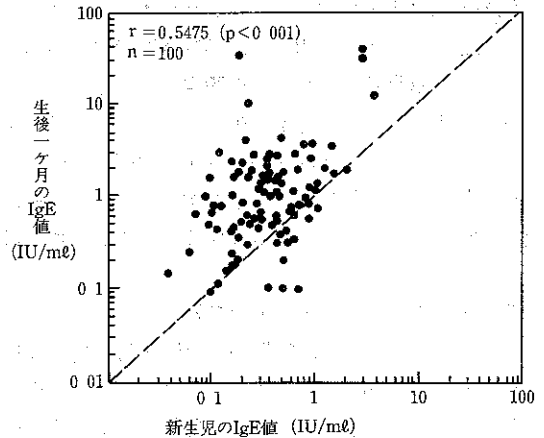


図5 新生児 IgE と生後1カ月 IgE の相関

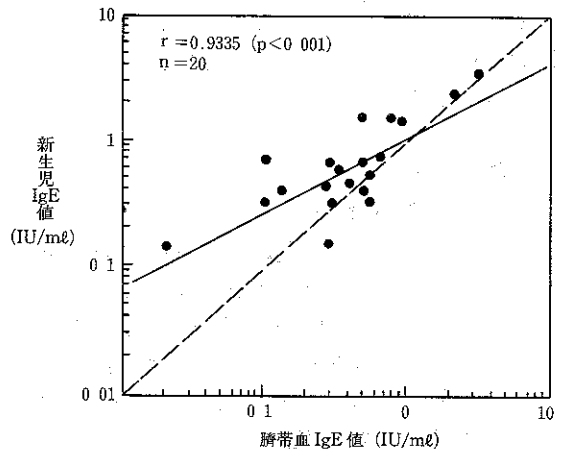


図6 臍帯血 IgE と新生児 IgE の相関

相関関係が得られた。(図6)

3-3 フィールドテスト

現在まで2医療機関の新生児197例のIgE値とアレルギー家族歴の調査結果を得ている。このうち全体の47%にあたる家庭で家族のいずれかにアレルギー歴があるとしている。そこで父親、母親のアレルギー歴の有無により4集団に分けてIgE値との関係について検討を行ったところ、両親ともにアレルギー歴の無い集団が最も平均値が低かったが、いずれの集団間にも有意差は認められなかった。(表2)

同様に94例における生後1カ月乾燥濾紙血液IgE値と両親のアレルギー歴(表3)、さらに74例の臍帯血の血清IgE値と母親のアレルギー歴(表4)についての検討も行ったが、どちらからも有意な関係は認められなかった。(Mann-Whitney検定および二標本t検定 $p < 0.05$)

表2 両親のアレルギー歴と新生児IgE
F:父親 M:母親

アレルギー歴	n	新生児IgE (Mean±SD IU/ml)
F(-) M(-)	113	0.29±0.40
F(+) M(-)	23	0.75±3.69
F(-) M(+)	24	0.38±0.49
F(+) M(+)	7	0.48±0.76

*N.S.: Not Significant/ $p < 0.05$

表3 両親のアレルギー歴と生後1カ月IgE

アレルギー歴	n	生後1カ月IgE (Mean±SD IU/ml)
F(-) M(-)	62	0.63±1.15
F(+) M(-)	9	2.20±2.97
F(-) M(+)	17	1.32±2.29
F(+) M(+)	2	0.44±0.56

*N.S.: Not Significant/ $p < 0.05$

表4 母親のアレルギー歴と臍帯血IgE

アレルギー歴	n	臍帯血IgE (Mean±SD IU/ml)
M(+)	13	0.24±1.30
M(-)	32	0.26±3.52

*N.S.: Not Significant/ $p < 0.05$

5. 考 察

IgEの産生はMiller⁹⁾により胎齢11週の胎児の肺や肝臓における存在が証明されていることから胎児期のかかなり早い時期から行われていると考えられる。出生後は、一般に加齢とともに増加し、8~12歳でピークとなり漸次減少傾向をたどる。またその血清中の濃度分布域は1~10,000IU/mlと広範囲^{9) 7) 8)}によよぶ。

従来血清IgEの測定はRIST法、PRIST法、酵素抗体法、蛍光抗体法^{9)~12)}などの方法により行われている。今回新生児期の乾燥濾紙血液IgE値の測定にあたり、さらに高感度のIgE測定法が望まれた。そこで化学発光免疫法によりその測定を目指したところ感度、測定範囲、再現性のいずれにおいても良好な結果を得ることができ、新生児期の微量な乾燥濾紙血液IgEの測定が可能となった。

すでに臍帯血IgE値がアレルギー発症の重要な指標となることはOrgel¹³⁾、Michel¹⁴⁾、Croner¹⁵⁾らにより報告されている。また佐々木¹⁶⁾は新生児期(生後2週以内)のIgE値が0.5IU/ml以上の場合高いアレルギー発症率を示し、さらに母親のアレルギー歴が強く影響を与えるとしている。現在血清IgE産生に関与する因子として免疫遺伝学的に考えられているものに、ヒトの組織適合抗原系HLA抗原(Human leucocyte antigen)に連鎖する免疫応答遺伝子に相当するものと免疫抑制遺伝子に相当する2つの遺伝子がある。これはT細胞レベルで抗原特異性IgEの産生能力を調整していると考えられている。さらにHLAに連鎖せずB細胞レベルでIgE産生を抑制することにより血清IgEを調整する遺伝子(IgE regulating gene)の存在も重要とされている¹⁷⁾。しかしその遺伝機構については、劣性、優性、及び多因子遺伝などさまざまな報告^{18) 20)}があり、また環境因子などの他因子の影響も大きくその解析は複雑である。

今回新生児197例のIgE値と家族のアレルギー歴との関係のみについて検討を行ったが、新生児期IgE値と両親のアレルギー歴には有意な関係は認められなかった。これは生後1か月でも同様であり、出生後もない時期にはIgE産生において遺伝因子以外の因子の影響が大きいことが示唆される。また臍帯血IgE値と母親のアレルギー歴との間にも有意な関係が認められなかったことは、IgEが経胎盤移行せず胎児によ

り能動的に産生されていることを裏付けているとも考えられる。

出生後どのくらいでアトピー素因の遺伝子的影響が表面化するのか、環境のアレルゲンなど遺伝に関与しない因子が及ぼす影響力についての解析、アレルギー発症時までのIgE値の上昇形態などについてさらに長期間の縦断的な検討が必要である。

6. 結 語

今後は生後6カ月、1歳、1.5歳、3歳等になった時点でのアレルギー疾患の有無及び摂取食物の調査を実施し、同時に濾紙血液採血によるIgE、及び特異IgEの測定を行い、アレルギー疾患の発症と新生児のIgE値及びアレルギー家族歴との関係の検討を進めるつもりである。

7. 文 献

- 1) Coca, A. F. & Cooke, R. A.: J Immunol, 1, 201, 1916.
- 2) Michel, F. B.: J. Allergy Clin. Immunol, 65, 423-430, 1980.
- 3) Michel, F. B.: Diagnosis and treatment of IgE mediated disease, 35-47, 1980.
- 4) 中山善弘, 他: 小児科臨床, 27, 1355-1561, 1974.
- 5) Miller D. L. et al: J. Allergy Clin. Immunol, 52, 182-188, 1973.
- 6) 吉川弘二, 他: 日小児会誌, 83, 247, 1979.
- 7) Orgel, M. A.: North Am, 22, 17, 1975.
- 8) Grundbacher, F. J.: J. Allergy Clin. Immunol, 56, 104, 1975.
- 9) 古川 漸, 他: 小児科診療, 10, 247-255, 1979.
- 10) 丹羽久生, 他: 日新生児会誌, 22, 474-477, 1986.
- 11) 吉川弘二, 他: 日小児科会誌, 83, 247-255, 1979.
- 12) 近藤雅彦, 他: 臨床検査, 35, 409-412, 1991.
- 13) Orgel, H. A., et al: J Allergy Clin Immunol, 56, 296-307, 1975.
- 14) Michel, F. B., et al: J Allergy Clin Immunol, 65, 423-430, 1980.
- 15) Croner, S., et al: Arch Dis Child, 57, 364-368, 1982.
- 16) 佐々木聖: 小児科臨床, 41, 989-997, 1988.
- 17) 我妻義則: 新小児アレルギー大系, 21, 137-156.
- 18) Marsh, D. G.: Proc Natl Acad. Sci USA, 71, 3588, 1974.
- 19) Gerrard, J. W., et al: J. Pediatrics, 85, 660, 1974.
- 20) Rasmuson, M., et al: Acta Allergy, 28, 365, 1973.

Immunochemiluminometric Assay of Total IgE in Dried Blood Samples of Newborns—Its Examination and Application

Hiroko Yonemori, Akihiro Yamaguchi, Junji Hanai
Tuneaki Kawai, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu,
Katumi Abe, Yuko Kikuchi, Kenji Yuri*¹,
Toshiaki Ishii*¹, Toshio Imai*², Kenji Fujieda*³

ABSTRACT

A immunochemiluminometric assay of total IgE (IgE) in dried blood samples for the prediction of atopic disease in asymptomatic infants was developed.

This assay resulted well for measurements of IgE of newborns. IgE levels increased significantly from newborn (0.35IU/ml) to 1 month after birth (0.95IU/ml).

The comparison between allergy history of parents and newborns IgE was not significant.

*¹ Department of Pediatrics, Hokkaido Shakai Hoken Hospital *² Department of Pediatrics, Sapporo Kousei Hospital

*³ Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine