コナヒョウヒダニの特異 IgG, IgM, IgA 抗体と 反応する抗原分画についての検討

☆田 島 公 夫

群馬大学医学部小児科学教室 (主任: 黒梅恭芳教授)

(昭和63年5月19日受付, 5月12日採択)

I はじめに

コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* (以下 Df) は気管支喘息の主要なアレルゲンである。Dfの特異 IgE 抗体は RAST による測定が一般的に行われ、その臨床的な意味も明らかである。また Df の特異 IgE 抗体と反応する主要分画の解析も行われ、主要分画は分子量17,000にあるとされている¹⁾。一方、Df 特異 IgG, IgM, IgA 抗体に関して近年 ELISA による測定が行われるようになり、喘息児あるいは健康人においても Df 特異 IgG, IgM, IgA 抗体が存在することが明らかとなった²⁾。しかし、その役割に関しては不明の点が多い。また、抗原のどの分画が抗体と最も強く反応しているかの解析も少ない³⁾。そこで私達は Enzyme-linked immunosorbent assay inhibition (ELISA inhibition) を行い Df 特異 IgG, IgM, IgA 抗体と反応する抗原性分画についての検討を行ったので報告する。

II 材料と方法

1. Df 虫体抗原の抽出と分画化

Df 虫体は純培養された凍結乾燥虫体を鳥居薬品株式会社より提供していただいた。Df 虫体抗原の抽出と分画化は Mao ら⁴⁾の方法に従った。すなわち、Df 虫体 5g に borate buffer, pH8.5 を加えながら carborundum と共に乳鉢で擦り潰し、50,000×g, 30分遠沈し水溶性分画を得た。得られた上清 (crude Df) を50%アセトンにて沈澱させ、さらに蒸留水に再溶解したものを Df50d とした。残った上清に更にアセトンを最終濃度が80%になるまで加え同様の遠沈操作を行った。沈澱物を蒸留水に再溶解したものを Df80d とした。蛋白質の定量は Lowry 法⁵⁾によった。Df50d は更に Sephadex G-200 (Pharm-

acia, 2.6×76cm, 流速20ml/hr) にて蒸留水を用いてゲル濾過し分画した。house dust は市販の抗原を使用した。

2. RAST inhibition による主要アレルゲン活性分画の検討

RAST inhibition は Gleich ら⁶⁾の方法に従った。

1. において得られた各分画のアレルゲン活性を検討するために、Df 特異 IgE 抗体価の高いプール血清を10倍希釈し抗原の10, 1.0, 0.1, 0.01μg/ml と等量混ぜ4℃で over night 静置し通常の RAST にて測定した。

3. ELISA による検討

1) ELISA は Engvall & Perlmann ら⁷⁾の方法に従い、更に田沢ら⁸⁾の検討を参考にして若干の改変を加えて行った。Df を0.05M carbonate buffer, pH9.5に溶解 (5μg/ml) しその100μl を96ウェルポリスチレンマイクロプレート (Immulon II MICROELISA plate, Dynatech Lab. Inc.) に分注し一晩4℃に静置した。washing buffer (0.05% Tween を含む0.05M PBS, pH7.2) で3回洗浄後、dilution buffer (2% BSA, 0.05% Tween を含む0.05M PBS, pH7.2) にて200倍 (IgG, IgM 抗体用) または50倍 (IgA 抗体用) に希釈した血清を注入し37℃で3時間静置した。washing buffer で3回洗浄後1,600倍 (抗 IgG, 抗 IgM) または800倍 (抗 IgA) に希釈した peroxidase 標識抗ヒト IgG (γ-chain), IgM (μ-chain), IgA (α-chain) rabbit immuno-globulin (DAKO) を100μl 各ウェルに注入し37℃で3時間静置した。washing buffer で3回洗浄後、substrate (0.1M citrate phosphate buffer, pH 5.0 100ml, ortho-phenylenediamine (O-PDA) 40mg, 31% H₂O₂ 40μl) を100μl 加え15~30分室温に静置した。12.5%

H₂SO₄ を加え反応を停止させた後、MicroELISA Autoreader MR580 (Dynatech) にて490nm における吸光度を測定した。

- 2) 上述の ELISA により3年以上の減感作歴のある喘息児（減感作群）12名と減感作歴の無い喘息児（非減感作群）18名について、1.において得られた各分画に対する特異 IgG, IgA 抗体価を測定した。単位は予備実験にて集めた抗体価の高い pool 血清の200倍または50倍希釈と等しい吸光度のものを100単位として表示した。

減感作は皮内反応閾値の100倍液0.05ml から開始し、同一量を2回づつ一週間間隔で皮下注射し0.05ml→0.1ml→0.2ml→0.4ml→10倍濃い濃度の0.05mlと漸増した。維持量は局所反応が起こる直前、ほぼ10⁻⁶ 0.2ml から10⁻⁵ 0.1mlとした。

4. ELISA inhibition による検討

- 1) ELISA inhibition は Df 特異 IgG, IgM, IgA 抗体価の高いプール血清の100倍または50倍希釈血清と1.において得られた各分画の100, 10, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001μg/ml 抗原液とを等量混ぜて4°C over night または37°C 3時間静置し上述の ELISA により測定した。
- 2) ELISA inhibition の特異性を検討するため ovalbumin (OA) を抗原として IgG 抗体を測定する OA ELISA に対する抑制試験を行った。
- 3) IgG ELISA の50% inhibition に要する Df50d Fr I と Df80d の抗原濃度の比 (IC₅₀ Df50d Fr I / IC₅₀ Df80d) を減感作群から8名、非減感作群から12名を無作為に抽出して測定し比較した。

III 結 果

- 1 Df50d を Sephadex G-200にて蒸留水を用いてゲル濾過した時の溶出曲線を Fig. 1 に示した。Df50d は void volume に一致して多量の高分子分画 (Fr I) が溶出し、さらに FrII, FrIII, FrIV に分画された。
- 2 RAST inhibition による主要アレルゲン活性分画の検討では Df80d に強い RAST の抑制性が認められた (Fig. 2)。Df50d Fr I, Df50d FrII の RAST の抑制性は弱かった。
- 3 ELISA による特異抗体価の検討では減感作群12名と非減感作群18名について crude Df, Df80d, Df50d Fr I に対する特異 IgG 抗体価 (Fig. 3), crude Df, Df80d, Df50d FrII に対する特異 IgA

Fig. 1. Fractionation of Df50d on Sephadex G-200. (Pharmacia, 2.6×76cm, elution with distilled water, flow rate 20ml/hr, 5 ml fractions)

Fig. 2. RAST inhibition by crude Df (●), Df50d (△), Df80d (○), Df50d Fr I (▲), Df50d Fr II (□).

Fig. 3. Comparison of antigen specific IgG antibodies between hyposensitized asthmatic children (H) and nonhyposensitized asthmatic children (N-H). (a) crude Df. (b) Df50d Fr I. (c) Df80d.

Fig. 4. Comparison of antigen specific IgA antibodies between hyposensitized asthmatic children (H) and nonhyposensitized asthmatic children (N-H). (a) crude Df. (b) Df50d Fr II. (c) Df80d.

Fig. 5. ELISA inhibition by crude Df ($\square$), Df50d ($\bullet$), Df80d ($\circ$), house dust (HD) ($\blacksquare$).
(a) IgG ELISA. (b) IgM ELISA. (c) IgA ELISA.

Fig. 6. ELISA inhibition by Df50d Fr I (●), Fr II (○), Fr III (■), Fr IV (□).
(a) IgG ELISA. (b) IgM ELISA. (c) IgA ELISA.

抗体価 (Fig. 4) を比較した。統計は Mann-Whitney の検定を用いた。いずれの抗原を用いた検討にても減感作群と非減感作群の間には有意の差は認められなかった。

4 ELISA inhibition による反応分画の検討

1) Df のアセトン分画の検討

crude Df, Df50d, Df80d, HD を使用した ELISA inhibition の結果を Fig. 5 に示した。IgG 抗体, IgM 抗体では Df50d が最も強く, IgA 抗体ではアセトン分画する以前の crude Df が最も強く ELISA を抑制した。

2) Df50d のゲル濾過分画の検討

Df50d Fr I, Fr II, Fr III, Fr IV の ELISA inhibition の結果を Fig. 6 に示した。IgG 抗体, IgM 抗体では Df50d Fr I が最も強く, IgA 抗体では Df50d Fr II が最も強く ELISA を抑制した。

3) ELISA inhibition の特異性の検討

Df50d Fr I は OA IgG ELISA を抑制しなかった (Fig. 7)。従って, Df50d Fr I による ELISA inhibition は抗原特異的なものと考えられた。

4) IgG ELISA の 50% inhibition に要する Df50d Fr I と Df80d の抗原濃度の比 (IC_{50} Df50d Fr I / IC_{50} Df80d) を減感作群から 8 名, 非減感作群から 12 名を無作為に抽出して測定し比較した。これらの

Fig. 7. Ovalbumin IgG ELISA inhibition by ovalbumin (OA) (○) and Df50d Fr I (●).

減感作群, 非減感作群間では crude Df, Df80d, Df50d Fr I に対する特異 IgG 抗体価, crude Df, Df80d, Df50d Fr II に対する特異 IgA 抗体価には有意の差は認められなかった. IC_{50} Df50d Fr I / IC_{50} Df80d は個人差が大きく 0.82 から 0.0024 に広く分布していた. Mann-Whitney の検定により有意差検定を行ったところ, 減感作群では非減感作群と比べて $P < 0.05$ で有意に小さかった (Fig. 8). ELISA による Df 特異 IgG 抗体価との相関は Spearman の順位相関により検定したが減感作群, 非減感作群ともに有意な相関は認められなかった (Fig. 9). 年齢と IC_{50} Df50d Fr I / IC_{50} Df80d の相関を, Spearman の順位相関により検討したところ, 減感作群では相関は認められなかったが, 非減感作群では $r = -0.619$, $P < 0.05$ の逆相関が認められた (Fig. 10).

Fig. 8. Comparison of IC_{50} Df50d Fr I / IC_{50} Df80d between hyposensitized asthmatic children and non-hyposensitized asthmatic children.

Fig. 9. Correlation between IC_{50} Df50d Fr I / IC_{50} Df80d and Df specific IgG antibody. (●) Hyposensitized asthmatic children, (○) Non-hyposensitized asthmatic children.

Fig. 10. Correlation between IC_{50} Df50d Fr I / IC_{50} Df80d and age. (●) Hyposensitized asthmatic children, (○) Non-hyposensitized asthmatic children.

IV 考 察

ELISA は抗原特異的 IgG, IgM, IgA 抗体の測定法として広く行われている。阿南ら⁹⁾は IgG および IgG サブクラスの抗ダニ抗体を ELISA で測定し得ることを報告した。さらに伊藤ら²⁾は micro ELISA により Df 特異 IgG, IgM, IgA 抗体が測定可能であることを報告し、喘息児あるいは健康人においても Df 特異 IgG, IgM, IgA 抗体が存在していることを明らかにした。また田沢ら⁸⁾は同様の方法により健康児と喘息児の抗ダニ IgG 抗体を測定比較し健康児では年齢と共に上昇する傾向があること、喘息児では健康児と比較し抗ダニ抗体価が高値であることを明らかにした。また、二重注射法による遮断抗体価との相関は認められなかったと報告した。一方ダニ抗原は単一の物ではなく多様な成分が含まれることは Haida¹⁾, 灰田¹⁰⁾, Arlian¹¹⁾ らの研究により明らかである。主要なアレルゲン活性分画について Mao ら⁴⁾は Df の粗抗原をアセトン沈澱法により高分子分画を多く含む Df50d と IgE 抗体と反応する分画を含む Df80d とに分画し、さらに Df80d を Sephadex G-200により分画し、分子量15,000から45,000の分画に主要アレルゲン活性が有ることを明らかにした。また Haida ら¹⁾は SDS-PAGE と HPLC により分子量17,000に主要アレルゲン活性分画があることを明らかにした。これは Mao ら⁴⁾の Df80d Fr I と Fr II の重複する部分に相当する所と考えられた。

今回私達は、Mao ら⁴⁾の方法により Df を分画し、Df80d, Df50d および Df50d のゲル濾過分画 (Df50d Fr I, FrII, FrIII, FrIV) を得た。

ELISA inhibition により特異 IgG, IgM, IgA 抗体との反応性を比較したところ、IgG, IgM 抗体と最も強く反応する分画は Df50d の void volume に溶出される高分子分画 (Df50d Fr I) であった。IgA 抗体と最も強く反応する分画はアセトン分画する以前の Df 粗抗原であった。Sephadex G-200によるゲル濾過分画では void volume より若干分子量の小さい FrII に最も強い反応が認められた。これらの結果は、Nakada ら³⁾の、分子量30,000以上に強い抗ダニヒト血清 IgG 抗体と反応する分画が認められたとした報告と同様に主要アレルゲン分画以外の分画が IgG, IgM, IgA 抗体と強く反応することを示していた。

また Nakada らは Df 抗原を Sephadex G-200によりゲル濾過し pre-allergenic portion, allergenic portion, post-allergenic portion にわけてそれぞれに対する IgG 抗体を測定しダニ減感作群、ハウスダスト減感作群、非減感作群について比較し、3群では有意差は認められなかったとした。私達は crude Df, Df80d, Df50d Fr I に対する特異 IgG 抗体価、crude Df, Df80d, Df50d FrII に対する特異 IgA 抗体価を測定し減感作歴のある喘息児12名と減感作歴の無い喘息児18名について比較したところ、いづれの抗原を用いた検討にても減感作群と非減感作群の間には有意の差は認められなかった。これは IgG 抗体に関しては Nakada らの報告と一致していた。

更に私達は高分子分画と主要アレルゲン分画について IgG 抗体との反応を比較するため減感作歴のある喘息児8名と減感作歴の無い喘息児12名について50% inhibition に要する Df50d Fr I と Df80d の抗原濃度の比 (IC_{50} Df50d FrI/ IC_{50} Df80d) を求め比較した。Mann-Whitney の検定では減感作群では非減感作群と比べて IC_{50} Df50d FrI/ IC_{50} Df80d が有意に小さかった。これは、Df に対する全抗体中に占める高分子分画に対する抗体の割合がより大きい事を示唆しているものと考えられた。従って、従来のダニ抗原を利用した減感作では主要アレルゲン分画に対する抗体よりも高分子分画に対する抗体がより多く産生されてしまう可能性が示唆された。

V 結 語

Df 特異 IgG, IgM, IgA 抗体と反応する抗原分画の解析を ELISA 及び ELISA inhibition により行い以下の事を明らかにした。

- 1 IgG, IgM 抗体と最も強く反応する分画は Sephadex G-200カラムゲル濾過の Df50d Fr I であった。IgA 抗体と強く反応する分画はそれより若干分子量が小さい Df50d FrII であった。
- 2 減感作歴のある喘息児 (減感作群) 12名と減感作歴の無い喘息児 (非減感作群) 18名について crude Df, Df80d, Df50d Fr I に対する特異 IgG 抗体、crude Df, Df80d, Df50d FrII に対する特異 IgA 抗体価を測定し比較した。いづれの抗原を用いた検討にても減感作群と非減感作群の間には有意の差は認められなかった。
- 3 減感作群から8名と非減感作群から12名を無作

為に抽出して IgG ELISA の50% inhibition に要する Df50d Fr I と Df80d の抗原濃度の比 (IC_{50} Df50d FrI/ IC_{50} Df80d) を求め比較した。減感作群では非減感作群と比べて IC_{50} Df50d FrI/ IC_{50} Df80d が有意 ($P<0.05$) に小さかった。これは、Df に対する全抗体中に占める高分子分画に対する抗体の割合がより多い事を示唆しているものと考えられた。

従って、従来のダニ抗原を利用した減感作では主要アレルゲン分画に対する抗体よりも高分子分画に対する抗体がより多く産生されてしまう可能性が示唆された。

最後に、御校閲と御指導を賜りました群馬大学医学部小児科学教室黒梅恭芳教授に深謝いたします。

ダニ抗原を提供していただいた鳥居薬品株式会社、RAST inhibition の測定に協力をしていただいた群馬大学校医学診断部門小林氏に深謝致します。

尚、本論文の要旨は第37回日本アレルギー学会（昭和62年10月）にて発表した。

文 献

- 1) Haida, M., Okudaira, H., Ogita, T. Itoh, K., Miyamoto, T., Nakajima, T. and Hongo, O.: Allergens of the house dust mite *Dermatophagoides farinae*-Immunochemical studies of four allergenic fractions. J. Allergy Clin. Immunol. 75 : 686-692, 1985.
- 2) 伊藤幸治, 木谷誠一, 坂本芳雄, 宮本昭正: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による喘息患者血清中の抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) IgG, IgA, IgM 抗体の検出. アレルギー, 33 : 158-166, 1984.
- 3) Nakada, S., Haida, M., Nakagawa, T., Ito, K. and Miyamoto, T.: Allergenic and immunogenic components of house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. Ann. Allergy, 56 : 150-155, 1986.
- 4) Le Mao, J., Dandeu, J. P., Rabillon, J., Lux, M. and David, B.: Antigens and allergens in *Dermatophagoides farinae* mite. I. Immunochemical and physicochemical study of two allergenic fractions from a partially purified *Dermatophagoides farinae* mite extract. Immunology, 44 : 239-247, 1981.
- 5) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. H. and Farr, A. L.: Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193 : 256, 1951.
- 6) Gleich, G. J., Larson, J. B., Jones, R. J. and Baer, H.: Measurement of the potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in the radioallergosorbent test. J. Allergy Clin. Immunol. 53 : 158-169, 1974.
- 7) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109 : 129-135, 1972.
- 8) 田沢昌道, 森川昭廣: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) による喘息児および健康児の血清中抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) 特異 IgG 抗体について. アレルギー, 34 : 379-386, 1985.
- 9) 阿南貞雄, 赤星吉徳, 吉村正子, 牛島信雄, 吉田彦太郎, 松山俊文, 神田源太: アトピー性皮膚炎における Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) を用いた抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) 抗体の測定. 一とくに IgG, IgG Subclass および IgE 抗体について. アレルギー, 31 : 244-251, 1982.
- 10) 灰田美知子, 長谷川真紀, 山内信和, 荻田忠厚, 奥平博一, 宮本昭正, 北郷 修: Mite アレルゲンの多様性に関する研究-Radioimmuno-electrophoresis を用いた Mite アレルゲンの同定について. アレルギー, 30 : 301-330, 1981.
- 11) Arlian, L. G., Bernstein, I. L., Geis, D. P., Vyszynski-Moher, D. L., Gallagher, J. S. and Martin, B.: Investigations of culture medium-free house dust mites. III. Antigens and allergens of body and fecal extract of *Dermatophagoides farinae*. J. Allergy Clin. Immunol. 79 : 457-466, 1987.

**IDENTIFICATION OF MAIN ANTIGENS FROM *DERMATOPHAGOIDES FARINAE*
EXTRACTS BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY INHIBITION.**

KIMIO TAJIMA

Department of Pediatrics, Gunma University School of Medicine,
(Director : Prof. Takayoshi Kuroume)

Dermatophagoides farinae was fractionated by acetone precipitation and with a Sephadex G-200 column. The Df fractions that bind with specific IgG, IgM, IgA antibodies were measured by ELISA inhibition. The fraction that bind most strongly with specific IgG and IgM antibodies was the Fr I of the Df50d. The fraction that bind most strongly with specific IgA antibodies was the Fr II of the Df50d. There were no significant differences in the IgG antibodies to crude Df, Df50d Fr I, Df80d or in the IgA antibodies to crude Df, Df50d FrII, Df80d between the serum from hyposensitized asthmatic children and the serum from non-hyposensitized asthmatic children. Fifty percent inhibiting concentration (IC_{50}) of Df50d Fr I and Df80d were measured and the ratio of IC_{50} Df50d Fr I to IC_{50} Df80d were compared between 8 hyposensitized asthmatic children and 12 non-hyposensitized asthmatic children. There was a significant difference in the IC_{50} Df50d Fr I / IC_{50} Df80d ratio between hyposensitized and non-hyposensitized asthmatic children. Hyposensitized asthmatic children may produce more antibody to this high molecular weight fraction.

Key words : *Dermatophagoides farinae*, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Abbreviations : Df *Dermatophagoides farinae*,
ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.