ヒョウヒダニのステージ別採集と発育消長について

下村 浩^{*1)} 石井 明^{*} 高岡 正敏^{**} 加納 六郎^{**}

^{*} 宮崎医科大学寄生虫学教室 (〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町大字木原 5200)

^{**} 東京医科歯科大学医学部医動物学教室 (〒113 東京都文京区湯島 1-5-45)

(受領: 1981年7月3日)

Collection of each stage of the house dust mite from a culture
by sieving and observation of the mode of breeding

Hiroshi SHIMOMURA,^{*} Akira ISHII,^{*} Masatoshi TAKAOKA^{**}
and Rokuro KANO^{**}

^{*} *Department of Parasitology, Miyazaki Medical College,
Kiyotake, Miyazaki 889-16, Japan*

^{**} *Department of Medical Zoology, Tokyo Medical and Dental
University, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan*

屋内塵中のヒョウヒダニ類が気管支喘息や鼻アレルギー等のアレルギーとして重要な役割をになっている事が、過去の多くの調査、研究により明らかになった(石井, 1975)。日本における喘息患者の50~80%がダニ抗原で皮内反応陽性を示し、とくにアトピー性小児喘息患者に重大な影響を与えている。屋内塵中のダニ相と患者に対するダニ感作についての研究が、Voorhorst *et al.* (1964), Maunsell *et al.* (1968), Miyamoto *et al.* (1969), Kabasawa *et al.* (1976), 高岡ら (1977 a, b.) により報告されている。

一方, Sasa *et al.* (1970), Miyamoto *et al.* (1975) はヒョウヒダニ類の大量培養に成功し、この培養ダニを用いて Ishii *et al.* (1973), Ishii and Miyamoto (1975), Kabasawa and Ishii (1979), Yago *et al.* (1980) は生化学的、免疫学的研究を進めて来た。とくに臨床面で減感作療法としての、ダニ粗抗原の使用は、さらに純粋な特異性の高い抗原の分析を必要としている。これらの問題を解決するためにヒョウヒダニの発育史、生態などの生物学的知見の蓄積がまたれる。Davidson (1972) により *Dermatophagoides farinae* の細胞培養が報告されているが、2~3日の短期培養で、細胞株

も、実験に使用し得る程度の長期培養も確立されていない。大量のダニ卵の純粋分離は、細胞培養の検討に有効である。また、喘息の原因となるダニの抗原性に関して、培地内のカビ類・培地のアレルギー性の影響を除外する目的で、無菌ダニ培養や、James and Mulla (1978) が報告しているように化学的に由来のはっきりしている人工飼料による培養を行うためにも、大量の滅菌虫卵が必要である。

今回われわれは、フルイおよびサッカロース密度勾配法を利用して、培地からの発育期を異にするダニの分別とダニ卵の分離を試みた。さらに分離して得た卵からの発育消長の観察を行い、培地からの合理的なダニ採集時期を求めた。

材料と方法

1. ヒョウヒダニ

実験に用いるダニとしては1970年医科学研究所寄生虫研究部において分離された、ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897), コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961 (以降 *D.p.*, *D.f.* と略す。)の2種を累代飼育した。

飼育条件はおおむね, Miyamoto *et al.* (1975) の方法に準じた。すなわち、動物用飼料(日本クレア)に乾

¹⁾ 現住所: 広島大学医学部寄生虫学教室 (〒734 広島市霞町 1-2-3)

乾燥酵母粉末（エビオス）を1:1に混じ、水分含量を16%に調節した培地を用いて、細胞培養用大型角瓶（ルービン）中にて飼育した。温度は25°C、相対湿度75%とし、培地は週1回混和した。

2. フルイによる分離法

分別に使用したフルイは、直径7.5cm、高さ2.5cmで、80 (177 μ m), 100 (149 μ m), 120 (125 μ m), 150 (105 μ m), 170 (88 μ m), 200 (74 μ m), 250 (63 μ m), 270 (53 μ m) の9種のメッシュを利用した(池本理化製)。

分別の方法は、フルイを235~80メッシュにダニ培地1gを載せ、水道水で各フルイにつき5分間洗い流した。各フルイ上のダニを1,000 ml ビーカーを用いて、500 ml の生理食塩水で洗い、その懸濁液に1%の中性洗剤2 ml と1%メチレンブルー5 ml を加え、約10分間室温に放置した。各フルイより得た懸濁液を濾紙を置いたブフナー濾過器で濾過した後、濾紙上のダニを採集し、必要に応じてガムクロラルで封入・同定した。ダニ数の多いときは、懸濁液を希釈し、その一部を用いて数を数え全数を算定した。またダニ分離のみを目的とする場合は、中性洗剤・メチレンブルーの処理を省いた。

3. フルイ分別のダニの生死

水流でふるい、濾紙上にこし取った直後と、その濾紙をシャーレに入れダニ培養器内に1週間置いた後、実体顕微鏡下で動きの有無を観察し、フルイ分別後のダニ(*D.f.*)の生死をステージ別に調べた。

4. 飼育ダニの算定

前述のようにして集めたダニはブフナー濾過器を用いて濾紙上にこし取り、以下の方法でその数を算定した。

使用した濾紙は直径7.0cm、面積38.48cm²で、1cm間隔の線をマス目となるように引いた。

培地を均等に攪拌したのち、メチレンブルーを加えた懸濁液を濾紙上にとり、すべてのダニをガムクロラルで封入し、各ステージの分別と数の算定をした。ダニ数が多い場合は対角線上の4ワク(各1cm²)中のダニ数を数え、濾紙の面積から求めた係数: 9.62を標本ダニ数に乗じて1g中の総ダニ数とした。

5. サッカロース密度勾配によるダニ卵分離

フルイによって培地からある程度分離された材料を用い、サッカロース濃度10, 20, 30, 40, 50, 60, 70% (w/v) について検討した。

ダニ培地5gをフルイにかけ、4の結果から *D.p.* の場合は250, 270, 325メッシュ、*D.f.* は170, 200, 250メッシュ上に残った培地を水洗し、*D.p.*, *D.f.* 各10 ml の懸濁液とした。この液1 ml を各濃度のサッカロース溶液3 ml に静かに重層し、1,000 rpm, 3分間遠心したのち、各濃度のサッカロースの沈渣中のダニ数を数え

た。回収数は全ダニ数から沈渣中のダニ数を差し引いて求められる。

6. 発育消長

D.f. の発育消長を主として観察したが、同じ条件で飼育した3ボトルの平均値をとった。

培地100 g に、前述の方法で分離し算定した虫卵1,000個を接種し、6カ月間1gずつ一定の間隔で採取し、その中の生ダニの個体数をステージ別に数えた。

結 果

1. フルイによる各ステージの分別

80~325メッシュ (175~43 μ m) のフルイを用いて、培地中の各ステージ(雌, 雄, 後若虫, 前若虫, 幼虫, 卵)の分別について検討した。フルイによって一つのステージを分離するには至らなかったが、ステージの差、すなわち虫体の大きさの違いによる大まかなフルイ分別は可能であった。

Table 1は、*D.f.* の分別の結果を示した。雌は80メッシュ、雄80, 100, 後若虫80, 100, 120, 前若虫100, 120, 幼虫120, 150, 170, 卵170, 200, 250にそれぞれ多数残った。これに対し、*D.p.* は Table 2に示すように、雌80メッシュ、雄80, 100, 後若虫80, 100, 120, 前若虫100, 120, 150, 幼虫150, 170, 200, 卵250, 270, 325のように分別された。とくに、*D.f.* の幼虫150メッシュ、卵200, 250, および *D.p.* の幼虫170, 200, 卵250, 270, 325については95%以上の回収率を得た。

Table 3は、*D.f.* を材料にして、生死ダニに対するフルイ分別法の検討を行った結果である。ダニの生死によって大差はないが、やや死ダニの分離がよかった。

Table 4は、フルイ分別によるダニの生死を見たものであるが、分別直後と1週間後の生存率を比較すると、成体ではあまり差が見られないが、前若虫、後若虫、幼虫は1/3以下に減少した。

2. サッカロース密度勾配を用いたダニ卵の分離

ダニ卵はフルイ分別によって他のステージと分離できたが、さらに培地材料等を取り除き、より純度の高い状態の採集を試みた。

Table 5で示すように、*D.p.* が *D.f.* 卵より比重の高い傾向が見られ *D.p.* は40%、*D.f.* は30%サッカロース溶液の使用により培地材料との良好な分離ができ、94%以上の卵回収率であった。

3. 発育消長の観察

培地に卵を接種後6カ月間の生死ダニ数の消長を Fig. 1に、5カ月間のステージ別の消長を Fig. 2に示した。

D.f. では卵接種後3カ月まで、生ダニ数が指数増加

Table 1 Results of sieving of mite culture with various sizes of mesh
(*Dermatophagoides farinae*)

Stage	Mesh size								Total	%
	80	100	120	150	170	200	250			
Female	3,840(49)*	144(2)	0	0	0	0	0	3,984	15	
Male	2,160(28)	1,488(16)	0	0	0	0	0	3,648	14	
Tritonymph	1,536(20)	1,920(20)	144(4)	0	0	0	0	3,600	13	
Protonymph	240(3)	5,856(62)	1,776(51)	48(2)	0	0	0	7,820	29	
Larva		48(0.5)	1,581(45)	2,976(95)	672(56)	0	0	5,277	19	
Egg	0	0	0	96(3)	528(44)	1,728(100)	288(100)	2,640	10	
Total	7,776	9,456	3,501	3,120	1,200	1,728	288	27,069		
%	29	35	13	12	4	6	1			

* Figure denotes number of each stage of *D. f.* in 1 g culture medium on a mesh. Figure in parenthesis denotes percentage of a stage on each mesh.

Table 2 Results of sieving of mite culture with various mesh
(*Dermatophagoides pteronyssinus*)

Stage	Mesh size										
	80	100	120	150	170	200	250	270	325	Total	%
Female	211* (58)	58 (7)	0	0	0	0	0	0	0	269	3
Male	58 (16)	173 (20)	58 (4)	0	0	0	0	0	0	289	3
Tritonymph	96 (26)	403 (47)	250 (18)	38 (1)	0	0	0	0	0	787	8
Protonymph	0	230 (27)	1,094 (78)	1,056 (41)	96 (8)	0	0	0	0	2,476	26
Larva	0	0	0	1,498 (58)	1,114 (92)	480 (100)	19 (2)	0	0	3,111	33
Egg	0	0	0	0	0	0	1,056 (98)	1,094 (100)	384 (100)	2,531	27
Total	365	864	1,402	2,592	1,210	480	1,075	1,094	384	9,463	
%	4	9	15	27	13	5	11	12	4		

* Figure denotes number of each stage of *D. p.* in 1 g culture medium on a mesh. Figure in parenthesis denotes percentage of a stage on each mesh.

を示し、その後5カ月まで安定して5.5カ月以降急激な減少を示した。一方死ダニ数は逐次増加し、4カ月後には生ダニと同数に達した。*D. p.* は3～6カ月を調べたが、*D. f.* に比し死ダニ数の増加がやや遅く、5カ月目に生ダニ数に追いついた。生ダニ数の急激な減少は、6カ月までには観察されなかった。

ステージ別の消長は、*D. f.* のみ観察した。雌では、3.5カ月に一度ピークがあり、5カ月に最多数約4,000となった。雄は3.5カ月に最多数約2,700となり、雌同様に5カ月にもう一つピークがあった。前若虫・後若虫はともに徐々に増加し、4.5カ月が最多であるが、前若虫の

方が約2倍の数であった。幼虫は3.5カ月に最多数となり、その数は、前若虫のピークとほぼ同じで約9,500匹/gであった。卵も幼虫と同じく3.5カ月に最多数5,700を観察したが、増加・減少の割合がゆるやかであった。

考 察

ダニ大量培養の培地からの各ステージの分別をフルイによって検討した結果、大まかな分別が可能となり、卵は完全に他のステージから分離できた。このフルイを用いる方法によって得られた卵を、さらにサッカロースを用いて培地より純粋に分離し得た。

Table 3 Number of intact and broken mites after sieving (*Dermatophagoides farinae*)

Stage		Mesh size							Total
		80	100	120	150	170	200	250	
Female	<i>a</i>	2,248	288	0	0	0	0	0	2,736
	<i>d</i>	432	288	0	0	0	0	0	720
Male	<i>a</i>	912	1,728	0	0	0	0	0	2,640
	<i>d</i>	114	1,008	0	0	0	0	0	1,122
Tritonymph	<i>a</i>	672	2,544	240	0	0	0	0	3,456
	<i>d</i>	0	96	0	0	0	0	0	96
Protonymph	<i>a</i>	336	5,760	4,320	1,872	0	0	0	12,288
	<i>d</i>	44	100	624	192	0	0	0	960
Larva	<i>a</i>	0	0	384	6,048	3,264	96	0	9,792
	<i>d</i>	0	0	0	912	480	0	0	1,392
Total	<i>a</i>	4,368	10,320	4,944	7,920	3,264	96	0	30,912
	<i>d</i>	590	1,492	624	1,104	480	0	0	4,290

a : number of intact mite (alive), *d* : number of broken mite (dead).

Table 4 Effect of sieving on activity of house dust mite (*Dermatophagoides farinae*)

	Immediately after sieving			1 week after sieving		
	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{\text{total}}$	<i>a</i>	<i>b</i>	$\frac{a}{\text{total}}$
Female	57	9	0.86	23	7	0.77
Male	65	14	0.82	24	6	0.80
Tritonymph	72	2	0.97	10	24	0.29
Protonymph	272	20	0.93	12	35	0.27
Larva	206	29	0.88	8	40	0.15
Total	672	74	0.90	76	112	0.40

a : number of active mite (alive), *b* : number of inactive mite (considered to be dead).

Table 5 Number of eggs in sediment after centrifugation at 1,000 rpm for 3 min in saccharose

Saccharose % (w/v)	<i>D. pteronyssinus</i>			<i>D. farinae</i>		
	No. of mite	Mean±SD*	%	No. of mite	Mean±SD*	%
0	209	41.8±9.0	100	276	55.2±7.8	100
10	141	29.2±6.1	68	261	52.2±9.1	95
20	71	15.4±5.6	37	32	6.4±2.7	12
30	35	7.0±1.4	17	13	2.6±2.2	5
40	13	2.6±2.5	6	3	0.6±0.8	1
50	10	2.0±1.7	5	7	1.4±0.8	3
60	2	0.4±0.5	1	1	0.2±0.4	0.4
70	4	0.8±0.8	3	5	1.0±1.1	2

* Examination was done five times in each concentration.

ヒョウヒダニの発育は, Baker *et al.* (1956), Spiessma (1967), Miyamoto *et al.* (1975) 等多く観察されているが, 分離した虫卵からの発育・増殖の報告は少ない. 発育については大島・杉田 (1966) がコナヒョウヒダニの卵からの発育史を調べ, 雌23~25日, 雄22~25日かかって成育すると述べている. 増殖に関しては, 脇・松本 (1973 a, b) が, 20g の培地に約800匹のコナヒョウヒダニを接種し, 18週後約20,000匹/g と最多数に達しており, われわれの得た結果は時期的に一致している.

今回の実験結果では, 各ステージの分離時期は, 虫卵培養開始後, *D.p.* 成虫4~5カ月, *D.f.* 成虫3~4カ月, 後若虫4.5カ月, 前若虫4.5カ月, 幼虫3.5カ月, 卵3.5カ月が最適であった. 各ステージの虫体を集めて研究材料とする場合にこれらの成績・方法を応用すれば, ステージ別個体群を相当程度の純度で集めることが可能と思われる.

Fig. 1 Number of alive and dead mites in culture medium

フルイ使用後にダニを培地に戻して飼育していないので, 正確に培養条件下の事実を反映しているとは言えないが, ダニの生存率は80%を越えており, とくに成虫はフルイ操作に対し抵抗があると思われる.

また本実験で用いたメチレンブルーを使う方法は, ダニの観察を容易にし, 動きを見ないと判別のむずかしい生虫体と新鮮死虫体の区別を, 後者だけを染め分けることにより正確なものにしている. 死虫体と脱皮殻は時間のたったものでも, 内容物の有無による透明度の相違により区別できた.

ま と め

House dust mite (ヤケヒョウヒダニ, コナヒョウヒダニ) 大量培養の培地中から, 各ステージのダニを, フルイを用いて分別し, 分離された虫卵を用いて, 発育・増殖を観察した.

1. フルイによって各ステージが, 大まかに分別され, 虫卵は完全に分離できた.
2. フルイによって分別された虫卵を, さらに飼料と分離するために, サッカロースの濃度を検討した. *D.f.* は30%, *D.p.* は40% (w/v) で94%以上回収でき, 飼料との分離も良好であった.
3. 生ダニ, 死ダニ数の増減の観察では, *D.p.*, *D.f.* ともに卵1,000個接種し, 培養開始後3カ月で生ダニ数がほぼ 10^4 に達し, 5.5カ月から減少を始めた. 死ダニは, *D.f.* では4カ月, *D.p.* は5カ月に生ダニと同数に

Fig. 2 Schematic representation of constitution of alive mite in various life stages of *D. farinae* in culture medium

なった。

4. コナヒョウヒダニのステージ別の観察で雌5カ月, 雄3カ月, 前・後若虫4カ月, 卵・幼虫3.5カ月にそれぞれ個体数のピークが見られた。

引用文献

- Baker, E. W., T. Evans, D. J. Gould, W. B. Hull and H. L. Keegan (1956) : *A Manual of Parasitic Mites of Medical or Economic Importance*, 170pp., Nat. Pest Control Ass., Inc., New York.
- Davidson, E. W. (1972) : Axenic culturing and primary cell culture of the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. Unpublished. (On file in the Acarology Laboratory, Ohio State Univ. Cited by Wharton, G. W. (1976) : House dust mites. *J. Med. Entomol.*, **12**(6) : 577-621.)
- 石井 明 (1975) : 日本におけるヒョウヒダニ類とアレルギーの研究. *衛生動物*, **26**(4) : 173-179.
- Ishii, A. and J. Miyamoto (1975) : Enzymatic hydrolysis of allergens extracted from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Jpn. J. Exp. Med.*, **45**(4) : 263-268.
- Ishii, A., K. Noda, Y. Nagai, T. Ohsawa, I. Kato, M. Yokota, S. Nakamura, T. Matsuhashi and M. Sasa (1973) : Biological and biochemical properties of house dust mite extract, *Dermatophagoides farinae*. *Jpn. J. Exp. Med.*, **43** : 495-507.
- James, D. L. and M. S. Mulla (1978) : A chemically-defined diet for the American house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **71**(5) : 785-787.
- Kabasawa, Y. and A. Ishii (1979) : Studies on the physicochemical properties of house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens involved in reaginic reaction. *Jpn. J. Exp. Med.*, **49**(1) : 51-57.
- Kabasawa, Y., A. Ishii, H. Murata and M. Takaoka (1976) : Clinical significance of the house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) in asthmatic children in Japan. *Acta Allergol.*, **31** : 442-454.
- Maunsell, K., D. G. Wraith and A. M. Cunnington (1968) : Mites and house-dust allergy in bronchial asthma. *Lancet*, **1** : 1267-1270.
- Miyamoto, J., A. Ishii and M. Sasa (1975) : A successful method for mass culture of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897). *Jpn. J. Exp. Med.*, **45** : 133-138.
- Miyamoto, T., S. Oshima, K. Mizuno, M. Sasa and T. Ishizaki (1969) : Cross antigenicity among six species of dust mites and house dust antigens. *J. Allergy*, **44**(4) : 228-238.
- 大島司郎, 杉田和子 (1966) : コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* Hughes, 1961 (Acarina : Epidermotidae) の生活史. 横浜市衛研年報, **4** : 66-69.
- Sasa, M., D. Miyamoto, S. Shinohara, H. Suzuki and A. Katsuhata (1970) : Studies on mass culture and isolation of *Dermatophagoides farinae* and some other mites associated with house dust and stored food. *Jpn. J. Exp. Med.*, **42** : 367-382.
- Spieksma, F. Th. M. (1967) : *The House-dust Mite Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897), *Producer of the House-dust Allergen* (Acari : Psoroptidae), x+65pp., V Leiden.
- 高岡正敏, 石井 明, 桃沢靖弘, 大内忠行 (1977a) : 小児喘息患者の屋内塵中のダニ相について. *衛生動物*, **28** : 237-244.
- 高岡正敏, 石井 明, 桃沢靖弘, 大内忠行 (1977b) : 小児喘息患者のダニに対する免疫反応とその屋内塵中のダニ相について. *衛生動物*, **28** : 355-361.
- Voorhorst, R., M. I. A. Spieksma-Boezema and F. Th. M. Spieksma (1964) : Is a mite (*Dermatophagoides* sp.) the producer of the house dust allergen? *Allerg. Asthma.*, **10** : 329-334.
- 脇 誠治, 松本克彦 (1973a) : コナヒョウヒダニの繁殖条件の研究. 1. 温度・湿度条件と繁殖率の関係について. *衛生動物*, **23**(3) : 159-163.
- 脇 誠治, 松本克彦 (1973b) : コナヒョウヒダニの繁殖条件の研究. 2. 各種飼料における繁殖状況について. *衛生動物*, **24**(2) : 117-121.
- Yago, A., A. Ishii, M. Takaoka, T. Matsuhashi and K. Noda (1980) : Analyses of some mite antigen found in house dust and in food material. *Jpn. J. Exp. Med.*, **50**(6) : 407-414.

Summary

An experiment was carried out to isolate each stage of house dust mites [*Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, and *D. pteronyssinus* (Trouessart, 1897)] from mass culture with sieves of different mesh sizes, and further, to separate eggs from culture medium with a saccharose sedimentation technique. The fluctuation in number and age composition of a cultured population originated from approximately 1,000 eggs, which were obtained with the present method, was traced for 6 months. Culture medium (100 g) was composed of equal amounts of dried yeast and mouse food powder.

1. The mite was separated roughly into each stage, and egg stage was purely collected by sieving.

2. More than 94% recovery was obtained at a saccharose concentration of 30% for *D. farinae* and 40% for *D. pteronyssinus* with adequate

separation from culture medium.

3. The number of live mite increased up to 10^4 mites at the 3rd month after beginning of the culture and began to decrease at the 5.5th month. On the other hand, the number of dead mites continued to increase gradually, and reached the same number to that of live

mites at the 4th month and the 5th month in *D. farinae* and *D. pteronyssinus*, respectively.

4. The population size reached the peak at the 5th, 3rd, 4th and the 3.5th month for the female, male, trito- and protonymphs and for the larva, respectively, in a culture of *D. farinae*.