

ダニアレルギー患者と免疫マウスの IgE に結合する ヤケヒョウヒダニ抗原の差違について

宮崎医科大学寄生虫学講座

阿部達也 石井 明

Key words: allergen — *Dermatophagoides pteronyssinus* —
IgE-induction — mite

(受付: 12月6日, 1983)

緒言

気管支喘息などのアレルギー疾患に屋内塵中のヒョウヒダニ類が重要なアレルゲンとなることが言われて久しい¹⁾²⁾。ダニアレルギーの診断と免疫療法のためにアレルゲンの精製単離が要望されるのは当然である。ヒョウヒダニ類のアレルゲンに関しては特に *Dermatophagoides pteronyssinus* (D.p.) について精製が進んでいる³⁾⁴⁾。我々も D.p. のアレルゲンの精製を試みた⁵⁾⁷⁾。その研究過程で、D.p. 粗抽出物を水酸化アルミニウムとともに BALB/c マウスに腹腔注射すると、ヒトの主要アレルゲンとは異なる成分がマウス IgE を強く誘導することを見出し、その成分を単離精製し性質を明らかにした⁸⁾。

アレルギーの研究において最終的にはヒトが対象であることは言うまでもない。しかし、IgE 産生の調節機構などを調べるためにも実験動物モデルが必要となる。多数の抗原成分から成る D.p. 粗抽出物などをマウスに免疫した時に、IgE 抗体を誘導する成分がヒトの主要アレルゲンとは異なることは留意すべき問題を含んでいる。

D.p. 粗抽出物をマウスに免疫した時の IgE 誘導成分とヒト D.p. アレルゲンが異なる理由はいくつか考えられた。第1に、アジュバント効果を含めた感作方法の差である。ヒトでは抗原は吸入感作されているが、マウスではアジュバントとともに腹腔注射された。第2は、ヒトとマウスの遺伝子の違いのために、IgE を誘

導しやすい抗原が異なるのかもしれない⁹⁾。第3は、体内に入る抗原の成分がもともと違うのかもしれない。つまり、ヒトに吸入される D.p. アレルゲンはダニ排泄物¹⁰⁾が主と考えられるが、マウスに注射したのは構造タンパクを含む全虫体抽出物である。第4は、3番目と関連があるが、マウスに免疫した粗抽出物中のヒトアレルゲン量がマウスに IgE を誘導するには不足していた可能性がある。

筆者らはすでにマウス IgE 誘導成分(DpI)は分子量17万の高分子であることを報告している⁸⁾。今回はこの DpI を含まず、D.p. アレルギー患者プール血清に最も強く結合する成分を含む Sephacryl S-200 の分画(Fr.IIB)をBALB/cマウスに免疫し、ヒトアレルゲンがマウスに IgE を誘導できるかどうかの可能性を調べた。

材料および方法

ダニ抗原の抽出: ダニ抗原抽出液は Kabasawa and Ishii の方法⁵⁾によって調製した。つまり、D.p. 虫体を飽和食塩水により培地から分離し、0.12M トリス・塩酸緩衝液、pH 7.6 中でホモジナイズした。それを60000×g で1時間超遠心した上清を粗抽出液とした。

D.p. 抽出物のゲル濾過: Sephacryl S-200 (Pharmacia) による粗抽出物のゲル濾過は既報⁸⁾と同様に行った。約1.6gの粗抽出物を25mlの0.15M食塩を含む0.06M トリス・塩酸緩衝液、pH 7.4に溶かし、同緩衝液で緩衝化された Sephacryl S-200 (2.5×95cm) のカラムにかけた。1分画9.8ml ずつを集め、280nmの吸光度と radioallergosorbent test (RAST) によるヒ

Abbreviations: BSA bovine serum albumin;
D.p. *Dermatophagoides pteronyssinus*; ELISA
enzyme-linked immunosorbent assay; PAC
passive cutaneous anaphylaxis; pI isoelect-
ric point; RAST radioallergosorbent test

ト IgE との結合活性を測定した。ヒト IgE 結合活性の高い分画 (Fr. IIB) を集め、ダイアフロー、UM-10 (Amicon) によって脱塩、濃縮した。Sephadex G-75 (Pharmacia) によるゲル濾過は次のように行った。Fr. IIB (120mg) を 0.3M 食塩を含む 0.01M リン酸緩衝液、pH 6.9 の 2ml に溶かし、同溶液で緩衝化したカラム (1.6×66cm) にかけた。吸光度を 280nm でモニター (Uvicord S, 島津) すると同時に、分画 (2.6 ml) を集め、偶数分画のヒト IgE との結合活性を enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) により、マウス IgE とのそれを passive cutaneous anaphylaxis (PCA) により測定した。標準タンパク bovine serum albumin (BSA), ovalbumin, α -chymotrypsinogen A, cytochrome C はいずれも Sigma 社の製品を使用した。

抗血清の調製：Fr. IIB の 2 μ g と水酸化アルミニウム 2mg を既報⁸⁾に準じて 5 週令の BALB/c 雄マウス (静岡実験動物) 6 匹に腹腔注射した。注射は 0, 3, 5, 9 週に計 4 回行い、10 週目に全採血し血清をプールした。ダニアレルギー患者血清は既報⁸⁾と同一のもので、D.p. 特異 IgE の RAST スコアが高い 8 名のプール血清を使用した。

PCA 反応：PCA 反応の方法は Watanabe and Ovary¹¹⁾に従った。SD ラット (静岡実験動物) 皮内に抗 Fr. IIB マウス血清 (0.05ml) を注射し、4 時間後 1% Evans blue-生食溶液 1ml を静注し、その 10 分後に抗原溶液 (0.05ml) を皮内の同じ位置に注射した。抗体価を求める場合は抗原 1mg を含む 1% Evans blue-生食溶液 1ml を静注した。30 分後にラットを殺し皮の裏面から青色反応を測定し、8×8mm 以上を陽性とした。同一試料につき 3 匹のラットを使い力価を測り、その幾何平均を求めた。

RAST と ELISA：RAST は Ceska and Lundkvist の方法¹²⁾に従い行った。D.p. 抗原を既報⁸⁾に従いシアニン化臭素で活性化した濾紙に結合し、¹²⁵I-抗ヒト IgE 抗体は Pharmacia 社の製品を使用した。ELISA についても既報⁸⁾で述べた。つまり、各分画のタンパクを活性濾紙に結合し、洗浄処理後患者プール血清 (0.05ml, 1/100 希釈) と室温で 3 時間反応した。濾紙を洗浄後 β -D-galactosidase 標識抗ヒト IgE 抗体 (IgE [MITSUI], カイノス社) を 0.05ml 加え、室温で一晩放置した。洗浄後の濾紙に *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside 溶液 (0.1ml) を加え酵素反応を 420nm の吸光度で測定した。

等電点電気泳動：Vesterberg の方法¹³⁾に従い、Ampholine, pH 3.5-10 (LKB) を用い LKB 8101 型の変法カラム (110ml) を使用した。泳動は 1℃ で 45 時間、2-3W の電力で行った。

結 果

ヒトアレルギー分画の免疫：D.p. 粗抽出物を Sephacryl S-200 によりゲル濾過した結果を Fig. 1 に示す。マウス IgE 誘導抗原の主成分 DpI は、最初のピーク分画 I に存在することは既に述べた⁸⁾。本実験ではダニアレルギー患者プール血清と RAST で強く反応する分画 Fr. IIB を集めた。Fr. IIB を BALB/c マウスに免疫して得られた抗血清の Fr. IIB (1mg. i.v) に対する PCA 力価は 625 倍であった。また、この抗体価は熱処理 (56℃, 2 時間) によって 25 倍以下に減少した。

既に述べたように、DpI は分子量 17 万であるが、分子量 3.7 万のサブユニット構造を持つ⁸⁾。したがって、Fr. IIB には DpI のサブユニットが含まれる可能性があり、Fr. IIB に対する IgE 抗体が DpI と反応するかもしれないと考えられた。それを確認するために、抗 IIB 抗体と DpI の交叉反応を調べた。つまり、D.p. 粗抽出物に対するマウス抗血清⁸⁾と Fr. IIB に対する抗血清を使い、DpI と Fr. IIB に対する各々の PCA 力価を測定した。Fig. 2 に示すように、抗 II 血清は Fr. IIB に対して 3000 倍以上の力価を示したが、DpI に対しては全く反応を検出できなかった。一方、抗粗抽出物血清は DpI に対して 3000 倍以上の力価を示したが、Fr. IIB に対しては 280 倍であった。この結果から、Fr. IIB には DpI のサブユニットは含まれず、抗 IIB 血清中の IgE

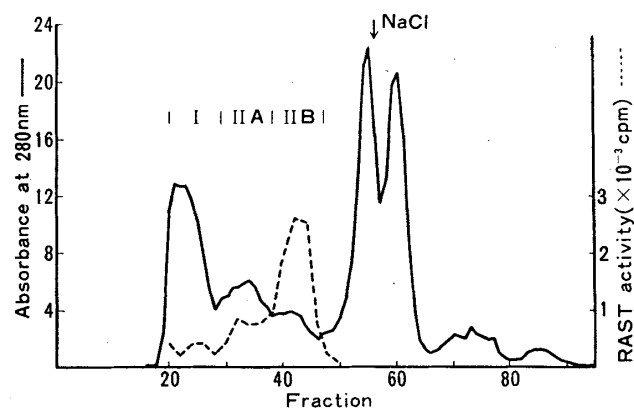


Fig. 1. Gel-filtration of crude-extract from D.p. on a Sephacryl S-200 column.

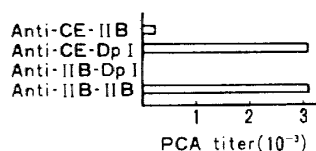


Fig. 2. Immunocross-reaction between DpI and Fr. IIB. Murine antisera to crude-extract or Fr. IIB were diluted and injected in the rat skin. DpI or Fr. IIB ($1\mu\text{g}$ each) were challenged in the same spot. Geometric mean of PCA titer from three experiments was shown.

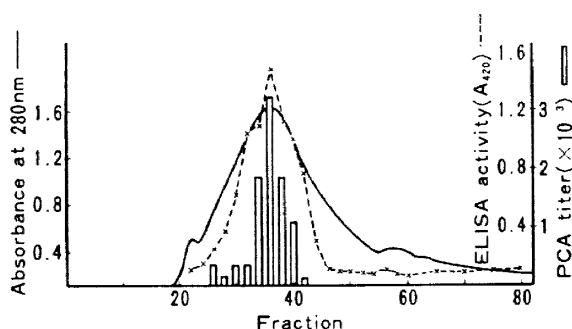


Fig. 3. Gel-filtration of Fr. IIB on a Sephadex G-75 column.

抗体は Fr. IIB に特有な成分に向けられたものであることが分った。

Sephadex G-75による Fr. IIB のゲル濾過: Fr. IIB 中のマウス IgE 誘導抗原とヒトアレルゲンが同一の成分であるかどうか、またその分子量を推定する目的で、Sephadex G-75による Fr. IIB のゲル濾過を行った。Fig. 3に示すように、ヒトアレルゲン成分とマウス IgE 結合成分は分離されず、2つの活性ピークは同じ位置に溶出された。同一カラムに BSA, ovalbumin, α -chymotrypsinogen A および cytochrome C をかけた溶出位置からこのピーク成分の分子量を推定すると、約2万であった。

ヒトアレルゲンとマウス IgE 抗原の等電点の差違: Sephadex G-75カラムで得られた Fr. IIB の主分画 (fr. 34-38) を生理食塩水に透析し、その4ml (約3 mg) を等電点電気泳動した。泳動後、集めた分画(2ml) の280nm 吸光度と pH を測定した。奇数分画は生理食塩水に対して透析し、ELISA と PCA により活性を測った。図4に示すように、ELISA によるヒトアレルゲン活性は pH 5.0と6.7を中心に2つの幅広いピークを示し、ヒトアレルゲンが電荷的には均一でないこと

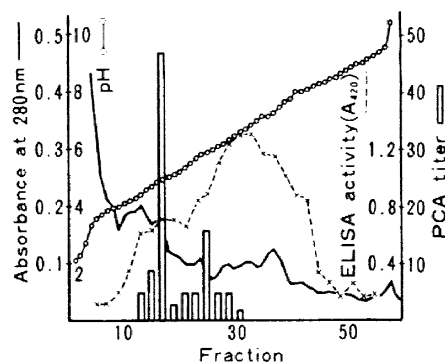


Fig. 4. Isoelectric focusing of the main components from Fr. IIB separated on the Sephadex G-75 column.

Table 1 PCA titer of the most positive component to murine IgE after absorption with patient serum

	PCA titer			Geometric mean
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
Absorbed with human serum	3^5	3^5	3^4	$3^{4.7} = 175$
Absorbed with horse serum	3^6	3^4	3^4	$3^{4.7} = 175$

Antigen(fr. 17 of the isoelectric focusing, 0.2 ml) was incubated with 0.1 ml of patient serum or normal horse serum at 4°C for 18 hr. After centrifugation, the supernatant of the mixture was used for PCA reaction.

を示唆した。PCA によるマウス IgE 結合活性は pH 5.0に鋭く強いピークと pH 5.9にそれよりも弱いピークを示した。これらの結果は量的に主要なヒトアレルゲンと Fr. IIB のマウス IgE 誘導抗原が電荷的には異なる成分であることを意味する。

しかし、等電点 (pI) 5.0のマウス IgE 抗原とヒトアレルゲン成分が同一のものかどうかについてはなお疑問が残った。そこで、pI 5.0の成分 (fr. 17) を採り、その0.2ml に D.p.アレルギー患者プール血清又は正常ウマ血清 (0.1ml) を加え、 4°C で18時間放置後、超遠心 ($20000\times g$, 30分) し、各上清を得た。その血清吸収抗原を使い、抗 IIB 血清に対する PCA 反応を行った。Table 1に示すように、患者血清で pI 5.0の成分を吸収しても、マウス IgE に対する反応性には変化がなかった。つまり、pI 5.0の分画に含まれるヒトアレルゲンはマウス IgE 抗原とは血清学的には異なるものと思われる。

考 察

我々は先に、D.p. 虫体粗抽出物を水酸化アルミニウムとともに BALB/c マウスに免疫した時、分子量17万の DpI が強くマウス IgE を誘導したが、ヒトアレルゲン成分に対する IgE は検出できなかった⁸⁾。本実験の目的は DpI を含まず、ヒトアレルゲン活性の強い分画 (Fr. IIB) をマウスに免疫して、ヒトアレルゲンに対する IgE をマウスに誘導できるかどうかを知ることであった。結果は Fr. IIB の免疫によってヒト主要アレルゲンに対するマウス IgE は検出できなかった。Fr. IIB の免疫によってマウスに IgE を誘導する成分はヒトアレルゲンとは分子量的には近いが(約2万)、電荷的には異なる成分であった。しかも、その成分は DpI とは全く交叉反応しない新たな成分であった。なお、マウス抗血清の PCA 力価は熱処理によりほぼ消失することから、本実験での PCA 反応は IgE によるものと考えられる。

Fr. IIB はヒトアレルゲン活性の強い分画である。その免疫によりヒトアレルゲンとは異なるが、ある成分に対して十分な IgE 抗体をマウスに誘導できた。したがって、ヒトアレルゲンに対する IgE をマウスで検出できなかった理由として、その含量が不足していた可能性は薄くなる。

粗抽出物の免疫の場合には、ダニの構造タンパクなどに対してマウス IgE が強く誘導され、ヒトが主として感作されていると思われるダニ排泄物¹⁰⁾などに対してはマウスの応答がその低濃度の故に低かった可能性も考えられた。しかし、ヒトアレルゲン活性の強い分画の免疫によってもなおヒトアレルゲン成分に対するマウス IgE を検出できなかったことから、ヒトアレルゲンとマウス IgE 抗原が異なる理由は、(1) アジュバント効果を含めた感作方法の違い、(2) 遺伝的差違の2つが有力に残される。つまり、ヒトアレルゲン成分が水酸化アルミニウムとともにマウス腹腔に注射されても、マウスは何らかの理由により、ヒトアレルゲンに対して IgE を強く産生せず、ほかの成分に対して IgE を産生する。それが遺伝的に決定されたものか、ヒトにおける吸入感作のように抗原が気道粘膜を通過することが重要なのか、あるいは免疫時のアジュバント効果によるものなのか、現時点では不明であり残された課題である。

D.p. 粗抽出物を Freund's 完全アジュバントとともにウサギに免疫すると、IgE 誘導の場合よりも多くの

成分に対して IgG 抗体が産生される⁸⁾。このウサギ抗体にはヒトアレルゲンに対する抗体も含まれる(未発表)。したがって、アジュバント効果はヒトとマウスでの IgE 抗原の差違に重要かもしれない。いずれにしても、本実験ではダニのヒトアレルゲンに富む分画の免疫により主要アレルゲンに対するマウス IgE を検出できなかった。これは、複数抗原の混合物による免疫でマウス IgE のモデル実験を行う際には十分留意が必要であることを示唆している。

結 語

D.p. の虫体粗抽出物から Sephacryl S-200 によるゲル濾過で、ダニアレルギー患者 IgE と結合する主分画 (Fr. IIB) を得た。Fr. IIB を水酸化アルミニウムとともに BALB/c マウスに腹腔注射し IgE 抗体を誘導した。

マウスに IgE を誘導する成分はヒト主要アレルゲンとは分子量は似ていたが、電荷的には異なっていた。つまり、Fr. IIB の免疫によってマウスにヒト主要アレルゲンに対する IgE 抗体を誘導できなかった。

ダニ抗原のように複数抗原の混合物によってマウスを免疫した時には、マウスに IgE を誘導する成分とヒトにおけるアレルゲンが必ずしも同一成分ではないことを考慮する必要がある。

稿を終るにあたり、ダニを培養して下さった長嶺祐子氏、下村 浩氏、および酵素標識抗 IgE 抗体を提供して下さい九州カイノス社に深謝致します。

文 献

- 1) Voorhorst, R., Spijksma-Boezeman, M.I.A. and Spijksma, F.Th.M.: Is a mite (*Dermatophagoides* sp.) the producer of the house dust allergen? *Allerg. Asthma* 10, 329-334, 1964.
- 2) 宮本昭正, 大島司郎, 石崎 達, 佐藤重雄: 室内塵とダニの抗原性の一致について。第1報 *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961 (Acarina, Psoroptidae) (コナヒョウヒダニ) を用いての臨床的な検討。アレルギー 17, 85-90, 1968.
- 3) Champman, M.D. and Platts-Mills, T.A.E.: Purification and characterization of the major

- allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P. *J. Immunol.* 125, 587-592, 1980.
- 4) Stewart, G.A., Butcher, A. and Turner, K.J.: Characterization of a very high density lipoprotein allergen, Dpt 4, from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 71, 340-345, 1983.
 - 5) Kabasawa, Y. and Ishii, A.: Studies on the physicochemical properties of house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens involved in reaginic reaction. *Jpn. J. Exp. Med.* 49, 51-57, 1979.
 - 6) 阿部達也, 石井 明, 下村 浩: ヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) のアレルゲンの精製. アレルギー 29, 449-449(抄録), 1980.
 - 7) Ishii, A., Shimomura, H., Hashiguchi, J. and Kabasawa, Y.: Biochemical and allergenic properties of the house dust mite extract, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 37, 285-290, 1982.
 - 8) Abe, T. and Ishii, A.: Purification of a murine IgE-inducing antigen extracted from the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Mol. Immunol.* 19, 339-346, 1982.
 - 9) Vaz, N.M. and Levine, B.B.: Immune responses of inbred mice to repeated low doses of antigen: Relationship to histocompatibility (H-2) type. *Science* 168, 852-854, 1970.
 - 10) Tovey, E.R., Chapman, M.D. and Platts-Mills, T.A.E.: Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature [Lond.]* 289, 592-593, 1981.
 - 11) Watanabe, N. and Ovary, Z.: Antigen and antibody detection by in vivo methods; a reevaluation of passive cutaneous anaphylactic reaction. *J. Immunol. Methol.* 14, 381-390, 1977.
 - 12) Ceska, M. and Lundkvist, U.: A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 9, 1021-1030, 1972.
 - 13) Vesterberg, O.: Isoelectric focusing of proteins. In "Methods in Enzymology" (Ed. by W.B. Jakoby), Academic Press, New York, Vol. XXII, pp. 389-412, 1971.

DIFFERENCE BETWEEN MITE ANTIGENS (*DERMATOPHAGOIDES*
PTERONYSSINUS) BOUND TO IgE OF ALLERGIC
PATIENTS AND THOSE BOUND TO IgE
OF IMMUNIZED MICE

Tatsuya Abe and Akira Ishii
Department of Parasitology, Miyazaki Medical College

The possibility of producing murine IgE with allergens of *Dermatophagoides pteronyssinus* (D.p.) was studied. The fraction most reactive to a pooled serum from eight mite-allergic patients (Fr.IIB) was collected from D.p. body-extract by gel-filtration on a Sephacryl S-200 column and injected to produce IgE antibody into BALB/c mice with aluminum hydroxide. The IgE-binding activities of components in Fr.IIB were measured by ELISA and PCA for human and murine sera, respectively. Sephadex G-75 column chromatography and isoelectric focusing were used to detect differences between the components bound to human and to murine IgE antibodies. The components producing the murine IgE were isoelectrically and serologically different from the allergens which were bound to human IgE. In spite of the fact that the fraction injected into the mice was allergen-rich, no murine IgE antibody against the allergens was detected in the serum.