

コナヒョウヒダニ虫体抽出物中の リムルス反応陽性物質についての検討

(昭和63年4月30日受付)

(昭和63年6月24日受理)

群馬大学医学部小児科学教室

田 島 公 夫

Key Words : *Dermatophagoides farinae*, Endotoxin, Limulus test.

要 旨

コナヒョウヒダニ(以下 Df) 虫体抽出物の生物学的活性の解析の目的でリムルス反応陽性物質についての検討を行った。Df 粗抗原では蛋白量の約10%の重量比でリムルス反応陽性物質が検出された。また Df 虫体から Mao らの方法により分画した Df50d, Df80d ではそれぞれ1%, 0.01%の重量比でリムルス反応陽性物質が検出された。これらのリムルス反応陽性物質は Sephadex G-100カラムゲル濾過による分画では void volume に一致して溶出された。

緒 言

コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* (以下 Df) はアレルギー性疾患の主要なアレルゲンであるとともに住環境を汚染する重要な物質として生体に様々な影響を与えている。これまで Df のアレルゲン活性に関する報告は数多く行われているがそれ以外の活性についての研究は少ない¹⁾²⁾。今回私達は Df 虫体成分の生物学的活性の研究に際し基本的な問題となる内毒素の汚染についての検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. 材料: Df 虫体は純培養され、十分に腸管内容物を排泄させた凍結乾燥虫体を鳥居薬品(株)より提供された。リムルステストはリムルス HS テストワコー (Lot No. LAH 9611) を使用した。全ての器具はリムルス反応陰性の蒸留水にて洗浄後、180℃、3時間の乾熱滅菌を行った。蒸留水、緩衝液、培養液はすべてリムルス反応陰性を確認した。ゲル濾過用カラムは Sephadex G-100をアルカリエタノールにて消毒後、蒸留水にて膨潤させ、充填した。更に、0.25M NaOH にて全経路の残留蛋白及び脂質を除去した後に溶出液のリムルス反応が陰性になるまで蒸留水で洗浄した。

2. 方法: 1) Df 虫体の抽出と分画化は Mao らの方法に従った³⁾。即ち、Df 虫体 5 g 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分遠沈し水溶性画分を得た。得られた上清(Df粗抗原)を50% acetone にて沈澱させ、更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 acetone を最終濃度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。蛋白量の定量は Lowry 法⁴⁾によった。Df50d, Df80d は更に Sephadex G-100 (Pharmacia, 2.6×82cm, 流速 18ml/hr) にて蒸留水をもちいてゲル濾過し分画した。2) リムルステストを半定量化するために大腸菌レファレンスエンドトキシンの10倍希釈系列をつくり測定したところ0.01ng/ml まで測定可能であった。Df粗抗原, Df50d, Df80d, および Sephadex G-100カラム溶出液を蒸留水にて10倍希釈系列を作りリムルステストを行った。また Df からの抽出法による違いを検討するため Df 虫体をエーテルにて脱脂し0.5%フェノールに抽出した抗原についてもリムルステストを行った。3) 抽出及び分画操作中の細菌汚染の有無を確認するため Df粗抗原, Df50d, Df80d をマッコンキー培地、ブレインハートインフュージョンブイヨン(ニッスイ)にて48時間培養した。

結 果

1. Df の各画分のリムルステスト: Df粗抗原, Df50

Abbreviations

Df: *Dermatophagoides farinae* LPS: Lipopolysaccharide

d, Df80d のリムルテストの end point はそれぞれ 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-7} であった。リムルス反応に陽性を示した物質を lipopolysaccharide (LPS) と仮定し, LPS 量 (W)/蛋白量 (W) $\times 100$ (%) を求めると 10%, 1%, 0.01% であった。Df 虫体をエーテルにて脱脂し 0.5% フェノール液に抽出した Df 抗原 (1 $\mu\text{g/ml}$) ではリムルス反応は陰性であった。なお 0.5% フェノールにはリムルス反応の抑制性は認められなかった。

2. Df50d, Df80d のゲル濾過溶出液のリムルテスト: Df50d と Df80d を Sephadex G-100 カラムを用い

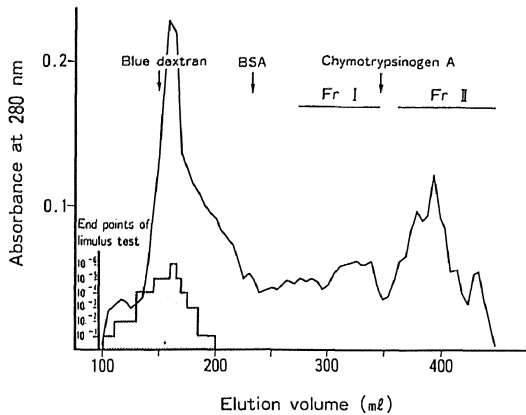


Fig. 1 Gel filtration pattern of Df50d on Sephadex G-100. Arrows indicate molecular weight marker. End points of limulus test are illustrated by the shaded area. (Pharmacia 26 $\times$ 820mm, eluted by distilled water, 18ml/min, 5ml fraction)

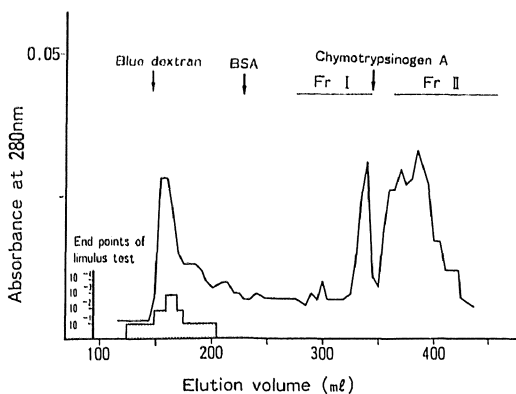


Fig. 2 Gel filtration pattern of Df80d on Sephadex G-100. Arrows indicate molecular weight marker. End points of limulus test are illustrated by the shaded area. (Pharmacia 26 $\times$ 820mm, eluted by distilled water, 18ml/min, 5ml fraction)

てゲル濾過した時の溶出曲線とリムルテストの結果を Fig. 1. と Fig. 2. に示した。

Df50d は void volume に一致した多量の高分子画分が溶出し, 更に若干分子量の小さい画分, そして Mao らの Df80dFr I, Df80dFr II に相当すると思われる画分に分画された。Df80d は void volume に一致して微量の高分子画分が溶出し, 更に分出量 45,000 から 25,000 (Fr I) および分子量 15,000 以下 (Fr II) に分画された。溶出曲線の下にリムルテストの end point を示した。リムルス反応陽性物質は Df50d, Df80d とともに void volume に一致して高濃度に検出された。

3. 細菌学的検討: Df 粗抗原, Df50d, Df80d とともに細菌は培養されなかった。実験操作中の細菌汚染によるとは考え難かった。

考 察

Peterson ら⁵⁾はハウスダストの抽出液中に微量の内毒素活性のある物質を検出し, ウサギを使用した交叉耐性, および交差抗原性の実験によりその一部が大腸菌の内毒素であることを明らかにした。Siraganian ら⁶⁾は市販のハウスダスト抽出抗原中に微量の内毒素が含まれることを, また Smith ら⁷⁾は米国で市販のダニ抗原中に微量の内毒素が検出されるが皮内反応には影響しないと報告した。しかし, 免疫学的あるいは生物学的な活性を検討する際に内毒素の存在は重要な意味を持っている。今回私達はコナヒョウヒダニ (Df) の虫体抽出成分のリムルス反応についての検討を行った。Df 虫体は純培養された凍結乾燥虫体を使用した。培地および飼料の内容については企業秘密のため知り得なかった。今回の私達の検討では, Df 粗抗原では蛋白量の約 10% の重量比で, またアセトンにより Df 粗抗原を分画した Df50d, Df80d ではそれぞれ約 1%, 約 0.01% の重量比でリムルス反応陽性物質が検出された。これらのリムルス反応陽性物質はゲル濾過による分画では void volume に一致して溶出されていた。

リムルス反応は 1956 年 F. B. Bang によりカプトガニ血球抽出成分 (Limulus Amoebocyte Lysate: LAL) が微量の内毒素によりゲル化することが発見されて以来, 内毒素の検出法として広く応用されている⁹⁾。ゲル化反応の特異性については多くの内毒素と関連標品が調べられている。今までの所, 弱いゲル化反応を起こすものとしているグラム陽性菌のペプチドグリカンが知られているが, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下で強いゲル化を起こすのは内毒素に限られている。従って今回私達が検出した物質も内毒素と考えられた。しかし今回検出された

リムルス反応陽性物質はDf粗抗原の蛋白量に対する重量比で約10%を占めていた。これはDf腸内のグラム陰性桿菌、あるいは内毒素により汚染された飼料由来とも考えられるが、量が極めて多く、Df虫体そのものにリムルス反応を陽性化する物質が存在する可能性も否定できない。

アレルギー研究の分野ではダニ虫体より抽出された物質を使用して数多くの実験が行われている。そのさいには、このようなリムルス反応陽性物質による作用を考慮にいれなければならないと考えられた。

結 論

今回私達はダニ虫体抽出成分の生物学的活性の解析の際に基本的な問題となるリムルス反応陽性物質について検討した。その結果、以下の事を明らかにした。

1. Df粗抗原では蛋白量の約10%の重量比でリムルス反応陽性物質が検出された。またDf虫体からMaoらの方法により分画したDf50d, Df80dではそれぞれ1%, 0.01%の重量比でリムルス反応陽性物質が検出された。

2. これらのリムルス反応陽性物質はSephadex G-100カラムゲル濾過による分画ではvoid volumeに一致して溶出された。

最後に、御校閲、御指導を賜った黒梅恭芳教授に感謝します。

文 献

- 1) Le Mao, J., Dandeu, J. P., Rabillon, J., Lux, M. and David, B.: Comparison of antigenic and allergenic composition of two partially purified extracts from *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronissinus* mite cultures. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 588-596, 1983.

2) Haida, M., Okudaira, K., Ogita, T., Itoh, K., Miyamoto, T., Nakajima, T. and Hongo, O.: Allergens of the house dust mite *Dermatophagoides farinae*—Immunological studies of four allergenic fractions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 75, 689-92, 1985.

3) Le Mao, Dandeu, J. P., Rabillon, J., Lux, M. and David, B.: Antigens and allergens in *Dermatophagoides farinae* mite. I. Immunological and physiological study of two allergenic fractions from a partially purified *Dermatophagoides farinae* mite extracts. *Immunology* 44, 239-247, 1981.

4) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. et al.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 256, 1951.

5) Peterson, R. D. A., Wickland, D. E. and Good, R. A.: Endotoxin activity of a house dust extract. *J. Allergy* 35, 134-142, 1964.

6) Siraganian, R. P., Baer, H., Hochstein, H. D. et al.: Allergic and biologic activity of commercial preparation of house dust extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 64: 526-533, 1979.

7) Smith, T. F. and Morrison, D. C.: Lack of interference in skin tests by endotoxin in allergen extract. *Ann. Allergy* 57, 410-412, 1986.

8) 丹羽 允, 原田敏江: 内毒素の分子構成と活性。蛋白質 核酸 酵素, 別冊: 188, 1976.

DETECTION OF LIMULUS POSITIVE SUBSTANCES IN DERMATOPHAGOIDES FARINAE EXTRACTS

Kimio Tajima

Department of Pediatrics, Gunma University School of Medicine

Limulus positive substances in *Dermatophagoides farinae* (Df) extracts were studied. Df antigens were extracted by acetone precipitation according to the method of Le Mao et al. Limulus positive substances were detected in crude Df antigen, Df50d and Df80d. The weights of limulus positive substances were estimated to be approximately 10%, 1% and 0.01% of the protein content respectively. The limulus positive substances were eluted at void volume using Sephadex G-100 column Gel-filtration.