

ヤケヒョウヒダニ精製アレルゲンの酵素抗体法への応用

—特異 IgE, IgG 抗体の測定—

宮崎医科大学寄生虫学教室

阿部達也

岡山大学医学部寄生虫学教室

石井 明

宮崎医科大学小児科

吉原明子

Key words: *Dermatophagoides pteronyssinus* — ELISA — IgE

(受付: 3月6日, 1985)

緒 言

ヤケヒョウヒダニ, *Dermatophagoides pteronyssinus* (D.p.)は *D. farinae* と並び屋内塵中の主要なアレルゲンの一つであり¹⁾, 気管支喘息などの原因物質となっている。ダニアレルギーの研究上精製アレルゲンの有用性はいうまでもなく, D.p.に関しては主要アレルゲンの精製が報告されている²⁾³⁾。今回われわれはヒト血清中のダニ特異 IgE 抗体との結合性を指標にして, D.p.培養培地から比較的簡単な方法で主要アレルゲンを精製した。この精製アレルゲンと培地粗抽出物を使って喘息患者血清中の特異 IgE と IgG 抗体を酵素抗体法により測定した。

材料および方法

1. ダニ抗原の抽出

Miyamoto らの方法⁴⁾によって3カ月培養した D.p. を含む粉末培地10gを100mlのphosphate buffered saline (PBS, pH7.0)で5分間抽出し, 0.02M トリス, 塩酸緩衝液, pH7.2に透析して培地抽出液 (CME) を得た。培地のみを同一条件下に3カ月放置し, CME と同様にして CME (—) を得た。

2. 血清

喘息で入院した患者39名 (9-15歳)の血清を初回使用までは-20℃に保存し, 融解後は0.05%に NaN₃ を加え4℃に保存し1週間以内に使用した。上記39名の患者とは別に D.p.特異 IgE 抗体価の高いアレルギー患者8名の血清をブールし陽性コントロールとした。正常な健康成人20名 (22-37歳)の血清を集め, 上記と同様に保存, 使用した。

3. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

特異 IgE 抗体の測定はマイクロプレートを用いた ELISA 法で行った。Nunc Immuno Plate II 96F (Roskilde, Denmark) を0.1M NaHCO₃に溶かした0.1mlの抗原液 (CME: 20μg/ml; Dpl: 10μg/ml) で4℃一晩コートした。プレートを0.1% Tween 20-生理食塩水 (Tw-生食, 0.25ml) で3回洗浄し, 0.2mlのTwを含まない10%正常ウマ血清-生食で室温, 1時間インキュベートし余分なwell表面をコートした。ウマ血清を除いた後プレートを洗わずに, 10%ウマ血清-Tw-生食で1:10に希釈したヒト血清 (0.05ml) を加えた。室温で3時間反応後, Tw-生食で3回, 10%ウマ血清-Tw-生食で1回洗浄した。そこに10%ウマ血清-TW-生食で1:20に希釈したガラクトシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体 (MBL 社, 名古屋, code 258) を0.03ml加え, 25℃で一晩反応させた。Tw-生食で4回洗浄し, 0.1mlの0.1% o-nitrophenyl-β-D-galactoside (Sigma, U.S.A.)-1.5mM MgCl₂-0.7% 2-mercaptoethanol-0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) を加え, 37℃で1.5時間反応させた。酵素反応を0.1mlの0.2M Na₂CO₃添加で止め, 自動吸光度計 Titertek Multis-

Abbreviations: D.p. *Dermatophagoides pteronyssinus*; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; CME culture medium extract with D.p.; CME (—) culture medium extract without D.p.; Tw Tween 20; PBS phosphate buffered saline

kan (Flow Lab.)で414nmの吸光度を測定した。試料の比較は同一プレートにて行い、2穴の平均値を求めた。血清を含まないブランク値の2倍以上を陽性とした。

特異IgG抗体の測定は上記の一部を変えて行った。Nunc プレートをIgE 測定の場合と同様に抗原とウマ血清でコートした。プレートに10%ウマ血清-Tw-生食で1:50に希釈した0.05ml ヒト血清を加え、37°Cで2時間反応させた。Tw-生食で3回、ウマ血清-Tw-生食で1回洗浄後、10%ウマ血清-Tw-生食で1:500に希釈したパーオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(Miles-Yeda, Israel, code 61-231)を0.05ml 加え、37°Cで2時間反応させた。Tw-生食で4回洗浄したプレートに0.1mlの0.04%2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)(Sigma)-0.05% H_2O_2 (30%) - 0.05M クエン酸-リン酸緩衝液, pH5.0を加え⁵⁶⁾ 37°Cで1時間反応させ、Multiskan で405nmの吸光度を測定した。2穴の平均値を求め、IgE 測定の場合と同様に陽性基準を定めた。

4. カラムクロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーはDE52 (Whatman, England)のカラム($\phi 1.6 \times 24\text{cm}$)を0.02M トリス塩酸緩衝液 pH7.2で平衡化して行った。0.5M NaCl に対する直線塩濃度勾配(計300ml)で溶出し、流速30ml/hrで4.9ml ずつの分画を集めた。ゲル濾過はSephadex G-75 (Pharmacia, Sweden)のカラム($\phi 16 \times 64\text{cm}$)を使い、PBSを溶出液として行った。流速11ml/hrで2.7ml ずつの分画を集めた。蛋白の濃縮はUM-10膜 (Amicon, U.S.A.)で行った。

5. 電気泳動

SDS-電気泳動はWeber and Osbornの方法⁷⁾により、10% polyacrylamide gelで行った。試料は2-mercaptoethanol処理した。等電点電気泳動はVesterbergの方法⁸⁾により、Ampholine, pH3.5-10 (LKB, Sweden)を110mlのカラムに満たし、試料約1mgを添加した。泳動は1°Cで46時間、3-1Wで行い、泳動後2ml ずつの分画を集めた。各分画を透析し、IgE 結合活性をELISAにより測定した。

抗原のIgE 結合活性を測る時は試料をプレートにコートし1:20に希釈した陽性プール血清を使い上記と同様にELISAを行った。

6. 吸収試験

10%ウマ血清-Tw-生食で1:10に希釈した喘息患者血清(0.13ml)に精製アレルゲン(1.2及び0.3mg/

ml)またはPBS 0.13mlを加え、37°Cで1時間インキュベートした。この混合液を検体としてCME (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)でコートしたプレートでIgE-ELISAを行った。2穴の平均値を求め、PBS コントロールに対する精製アレルゲンの値の百分率を求めた。

結 果

1. 主要アレルゲンの精製

CME(約300mg)をDE52カラムにかけた溶出パターンをFig. 1に示す。塩濃度勾配により溶出される最初のピークとその後に徐々に溶出される部分を図示するように分け取った。濾紙-ELISA⁹⁾で測定したヒトIgE結合活性は第2と第3分画に強く、第4分画にも認められた。第3分画をゲル濾過すると分子量15,000から60,000位にかけて幅広くIgE結合活性が分布し、第2分画よりも分子量的に不均一にみえたので第2分画についてのみ精製を進めた。第2分画をSephadex G-75カラムにかけて結果をFig. 2に示す。IgE結合活性は分子量24,000付近に検出された。横棒で示した分画を集め、同一カラムで再クロマトするとタンパクのピークに一致して単一なIgE結合活性のピークが得られた。それをDplと呼ぶ。

Dpl(約40 μg)をSDS-電気泳動にかけたパターンをFig. 3に示す。Dplはほぼ単一なバンドを示し、標準タンパクの移動度から求めた分子量は27,000であっ

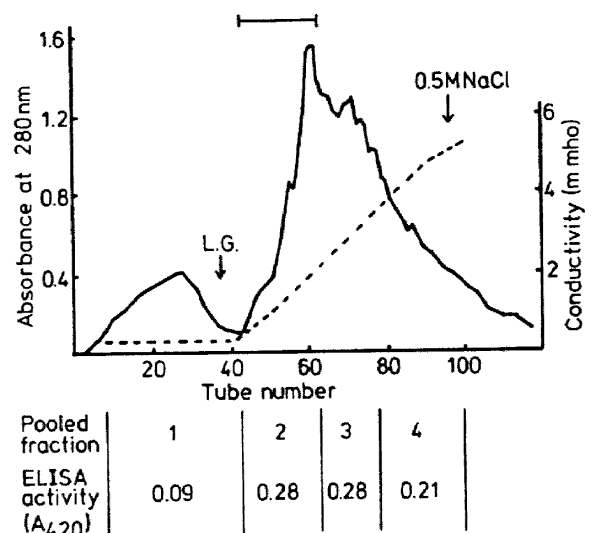


Fig. 1. Chromatography of culture medium extract (CME) on a DE52 column.

—: absorbance at 280 nm.: conductivity. L.G.: start point of linear concentration gradient.

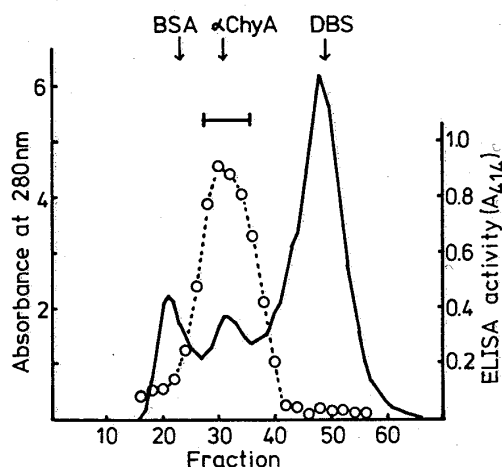


Fig. 2. Gel filtration of the second fraction on a Sephadex G-75 column. Eluted position of bovine serum albumin (BSA), α -chymotrypsinogen A (α ChyA) and p-diazobenzenesulfonic acid (DBS) are shown.

—: absorbance at 280nm. ○-----○: ELISA activity.

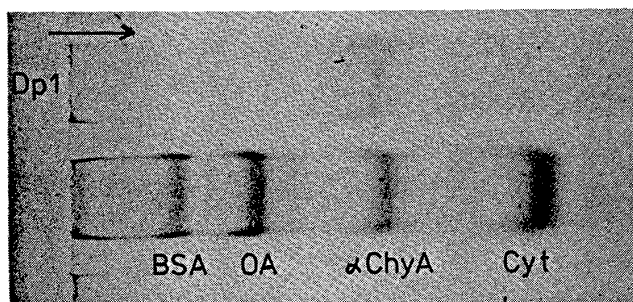


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified allergen Dp1. Standard proteins, bovine serum albumin (BSA; 67,000), ovalbumin (OA; 43,000), α -chymotrypsinogen A (α ChyA; 25,000) and cytochrome C (Cyt; 13,000) are shown.

た。Dp1 の等電点電気泳動では pH 4.0-4.7 と 5.9-7.0 に 2 つの IgE 結合活性のピークが検出された。また Dp1 を 90℃ で 1 時間熱処理すると 0℃ に置いたコントロールの 40% に IgE 結合活性が失活した。

D.p. を含まない培地抽出液 CME (—) は陽性プール血清に対する IgE 結合活性を全く検出できなかった。

2. 喘息患者血清中の特異 IgE と IgG 抗体

喘息患者血清中の特異 IgE 抗体を CME または精製アレルゲンを抗原として測定した結果を Fig. 4 に示す。CME を抗原とした時は 44% (17/39), 精製アレルゲンを抗原とした時は 64% (25/39) が陽性であった。CME 又は精製アレルゲンのいずれかに陽性の者の中では 96% (25/26) が精製アレルゲンに陽性であった。

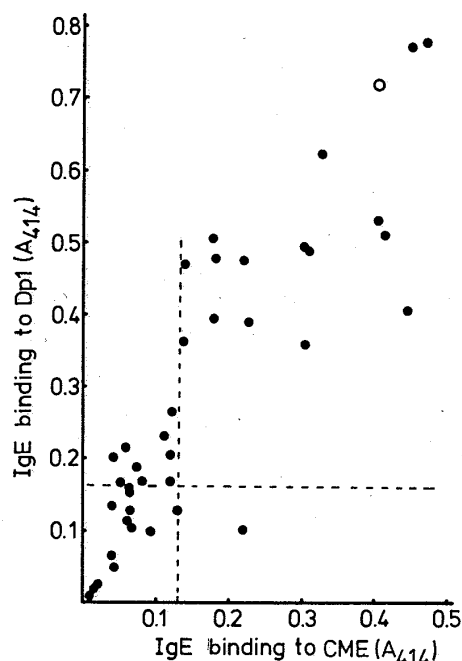


Fig. 4. Mite-specific IgE antibodies in the sera from asthmatic patients.

○: positive control, -----: positive limit.

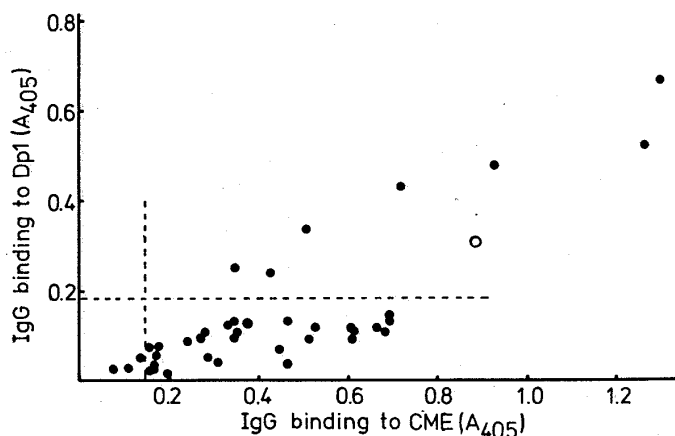


Fig. 5. Mite-specific IgG antibodies in the sera from asthmatic patients.

○: positive control, -----: positive limit.

いずれかに陽性の血清のほとんどが CME よりも精製アレルゲンに対して高値を示した。

特異 IgG 抗体の測定結果を Fig. 5 に示す。CME による陽性者は 92% (36/39) であったが精製アレルゲンにはわずか 18% (7/39) が陽性であった。全ての血清が精製アレルゲンよりも CME に対して高値を示し、IgE の結果とは対照的であった。

3. 正常人血清中の特異 IgE と IgG 抗体価

正常血清の IgE 抗体価を CME を抗原として測定すると陽性コントロール吸光度 0.47 ± 0.01 (n=4,

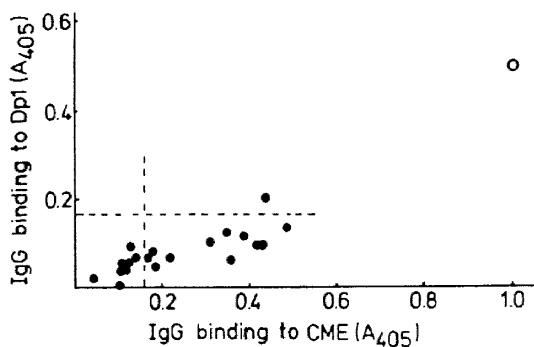


Fig. 6. Mite-specific IgG antibodies in the normal sera.

○ : positive control, ----- : positive limit.

Table 1 Absorption of the CME-specific IgE antibody with purified allergen Dp 1

Serum No.	Original IgE titer (A_{414}) against		%IgE titer after absorption with Dp 1		
	CME	Dp1	Control	0.3mg/ml	1.2mg/ml
2	0.04	0.20	100	0	0
18	0.30	0.36	100	1	0
32	0.33	0.62	100	10	0

mean $\pm$ S.D.) に対して 0.008 ± 0.026 ($n=20$) であり, 精製アレルゲンを抗原とした時は陽性コントロール 0.81 ± 0.03 ($n=4$) に対して正常血清は 0.006 ± 0.019 ($n=20$) となり, いずれも正常血清中に特異 IgE 抗体を検出できなかった。

特異 IgG 抗体は Fig. 6 に示すように CME 抗原では 60% (12/20) が陽性であったが, 精製アレルゲンを抗原とした時は 5% (1/20) が陽性であった。CME に陽性反応を示した正常血清 12 検体について CME (—) に対する IgG 抗体を測定したところ, 6 検体が陽性 (0.33 ± 0.17) であった。

4. 精製アレルゲンによる CME 特異 IgE 抗体の吸収

精製アレルゲンに対する特異 IgE 抗体価の異なる 3 名の患者血清を精製アレルゲンで吸収した後, CME に対する IgE 抗体価を測定した結果を Table 1 に示す。いずれも精製アレルゲンによって CME に対する抗体価は完全に吸収された。

考 察

D.p. 培養培地からヒト IgE 結合性を指標にして精製

したアレルゲン Dp1 は SDS-電気泳動による分子量 27000, 等電点 4.0-4.7 と 5.9-7.0, 熱により IgE 結合活性が失活するなどの性質から Chapman らの報告した antigen P₁²⁾ と同じものと思われる。

精製アレルゲン Dp1 と CME を抗原として喘息患者血清中の特異 IgE と IgG 抗体を測定したところ, 明らかな違いがみられた。特異 IgE 抗体に関しては陽性者のうち 2 検体を除き全ての血清が CME よりも精製アレルゲンで高値を示したのに対し, 特異 IgG 抗体では逆に全ての血清が精製アレルゲンよりも CME で高値を示した。このことから CME 中の IgG 結合抗原には精製アレルゲン以外のものが存在することが示唆される。また正常血清を用いた実験結果から示されるように培地成分に対する IgG 抗体の寄与も考慮する必要があるであろう。いっぽう特異 IgE 抗体の測定ではほとんどの血清が精製アレルゲンの方で高値を示したことは, CME 中の IgE 結合活性のほとんどが精製アレルゲンによることを示唆し, それは精製アレルゲンによって血清中の CME 特異 IgE 抗体が完全に吸収されることから確認された。したがって精製アレルゲンは CME 中の主要アレルゲンと言える。

正常血清では特異 IgE 抗体は検出されなかったが, CME に IgG 抗体陽性反応を示した 12 検体のうち CME (—) に陰性であった少なくとも 6 検体, つまり正常血清の 30% (6/20) はダニ IgG 抗体陽性と考えられる。Chapman ら¹⁰⁾ も非アレルギー者の 30% に特異 IgG 抗体を検出している。伊藤ら¹¹⁾ は皮内反応陰性の正常者には ELISA で特異 IgG 抗体は検出されないが, 阻害反応から正常血清中に特異 IgG 抗体が存在することを指摘した。ダニが普遍的に存在することから正常血清中にも特異 IgG 抗体が存在するのは自然な事であり, 正常血清中に特異 IgE 抗体が検出されなかったのは正常者の IgE 産生に特異的抑制機構が働いているためと考えられる¹²⁾。

本実験では用いた血清と提供者の皮内反応および減感作との関係は調べなかった。精製アレルゲンと皮内反応および減感作による IgG 抗体の変化との関係など今後さらに検討が必要と思われる。

喘息患者血清を提供して下さった国立療養所宮崎東病院の鬼塚黎子小児科医長およびダニを培養して下さいた八谷敏子氏に深謝致します。

本研究の一部は文部省科学研究費 (58480169) によって行った。

文 献

- 1) Voorhorst, R., Spieksma, F.Th. M., Varekamp, H., Leupen, M.J. and Lyklema, A.W.: The house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces. Identity with the house-dust allergen. *J. Allergy* 39, 325-339, 1967.
- 2) Chapman, M.D. and Platts-Mills, T.A.E.: Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P₁. *J. Immunol.* 125, 587-592, 1980.
- 3) Stewart, G.A.: Isolation and characterization of the allergen Dpt. 12 from *Dermatophagoides pteronyssinus* by chromatofocusing. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 69, 224-230, 1982.
- 4) Miyamoto, J., Ishii, A. and Sasa, M.: A successful method for mass culture of the house dust mite. *Dermatophagoides pteronyssinus* (Troussart, 1897). *Jpn. J. Exp. Med.* 45, 133-138, 1975.
- 5) Chan, A.H. and Cotter, D.A.: An improved coupled assay for detecting glucose released by acid glucosidases. *Microbios Letters* 15, 7-15, 1980.
- 6) Matsuda, H., Tanaka, H., Blas, B.L., Noseñas, J.S., Tokawa, T. and Ohsawa, S.: Evaluation of ELISA with ABTS, 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid), as the substrate of peroxidase and its application to the diagnosis of schistosomiasis. *Jpn. J. Exp. Med.* 54, 131-138, 1984.
- 7) Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412, 1969.
- 8) Vesterberg, O.: Isoelectric focusing of proteins. In "Methods in Enzymology, Vol. XXII" (ed. by W.B. Jakoby). Academic Press, New York pp. 389-412, 1971.
- 9) 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.
- 10) Chapman, M.D. and Platts-Mills, T.A.E.: Measurement of IgG, IgA and IgE antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* by antigen-binding assay, using a partially purified fraction of mite extract (F₄P₁). *Clin. Exp. Immunol.* 34, 126-136, 1978.
- 11) 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.
- 12) Deguchi, H., Suemura, M., Ishizaka, A., Ozaki, Y., Kishimoto, S., Yamamura, Y. and Kishimoto, T.: IgE class-specific suppressor T cells and factors in humans. *J. Immunol.* 131, 2751-2756, 1983.

APPLICATION OF A PURIFIED ALLERGEN FROM *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* FOR ELISA

—Detection of Specific IgE and IgG Antibodies—

Tatsuya Abe

Department of Parasitology, Miyazaki Medical College

Akira Ishii

Department of Parasitology, Okayama University Medical School

Akiko Yoshihara

Department of Pediatrics, Miyazaki Medical College

A major allergen (Dp1) was purified from the culture medium extract (CME) of *Dermatophagoides pteronyssinus*. The IgE and IgG antibodies specific to Dp1 and CME were measured in human sera by microplate-ELISA. CME-specific IgE antibody was detected in 44% and Dp1-specific IgE antibody was detected in 64% of the sera from asthmatic patients. CME-specific IgG antibody was detected in 92% of the sera from asthmatic patients, while Dp1-specific IgG antibody was demonstrated in only 18% of the same sera. Neither CME-specific nor Dp1-specific IgE antibody was detected in 20 normal sera. As for IgG antibody in normal sera, CME-specific IgG antibody was demonstrated in 60%, while Dp1-specific IgG antibody was detected in 5% of the same sera. Dp1 showed greater IgE-binding activity than CME in most sera from asthmatic patients, indicating that most IgE-binding activities in CME is due to Dp1. The possibility was also confirmed by the fact that anti-CME IgE antibody was absorbed with Dp1. Thus, Dp1 should be called a major allergen in CME.