

## 室内塵中ヒョウヒダニアレルゲン簡易測定キット 「アクロテスト」の有用性の検討

稲 葉 綾 子      栗 原 和 幸      五 藤 和 子      竹ノ内 裕 実  
神奈川県立こども医療センターアレルギー科

**key words** : アクロテスト, ダニアレルゲン, Der I, 簡易測定キット

### 要 旨

アレルギー疾患の増悪因子として重要な、室内塵中のヒョウヒダニアレルゲンを半定量できる簡易キットとして新しく開発されたアクロテストの有用性を従来のELISA法と比較検討した。29家庭において家庭用電気掃除機の紙パック内に集積した塵のダニアレルゲン濃度をアクロテストとELISA法によるDer Iを測定して比較した。アクロテストの再現性、検体量、反応温度の影響を検討した。アクロテストの判定値を5段階のAclogradeに、ELISA法でのDer Iを5段階のELISA classにスコア化すると、相関係数0.602 ( $p < 0.0001$ ) で有意な相関がみられた。再現性も比較的安定し、温度、量による影響も受けにくかった。1回の測定に必要な塵の量が多いという問題点はあるものの、特殊な設備を必要とせず、簡便に行える利点があり、患者が各家庭で簡便にダニアレルゲンのスクリーニングを行うのに有用な検査方法と思われる。

### はじめに

気管支喘息、アトピー性皮膚炎を初めとして、アレルギー疾患の抗原としてヒョウヒダニは重要であり<sup>1-3)</sup>、治療の中でもダニ対策を中心とした環境整備が大きな位置を占めている<sup>4-6)</sup>。しかし、個々の患者に即した、より具体的な環境整備の指導には、患者の各家庭のダニ抗原量を把握することがまず必要となる<sup>6)</sup>。今回我々は、室内塵に含まれるヒョウヒダニアレルゲンを半定量できる簡易キット「アクロテスト」を使用する機会を得たのでその有用性を検討した。

### 対象と室内塵の採取方法

対象は、気管支喘息やアトピー性皮膚炎で神奈川県立こども医療センターアレルギー科に通院中の患者のうち主治医が任意に抽出した7家庭と、当センター職員の22家庭であり、1998年2月から8月の間に室内塵を採取した。採取方法は、職員については各家庭で使用する家庭用掃除機を用いて家屋全体で採取し、紙パック内に集積した微細塵を用い、患者については同じく各家庭で使用する家庭用掃除機に、ダニを通さない高密度繊維（帝人マイクロガード<sup>(C)</sup>）製の小袋をとりつけて居間の床全体を5分かけて採取した。両者より得られた塵から、一部をとりわけてアクロテス

トに用い、一部をELISA法での測定に用いた。

### ELISA法によるDer Iの測定

ELISA法は簡LCDに依頼し、塵1gあたりのDer pIとDer fIの量 ( $\mu\text{g/g}$ ) を測定し、その和をDer I ( $\mu\text{g/g}$ ) として表し、今回の検討に用いた。

### アクロテストの測定

アクロテストは、反応紙上のpolyclonal抗ヒョウヒダニ抗体と、附属の専用スプーン一杯の塵中のダニアレルゲンを1時間室温で反応させ、赤色系の呈色反応を利用した1回分ずつのキットである。添付の説明書では、図1左部分のように呈色の濃さにより、反応を3段階に判定するが、今回我々は右のように、新たに0から4の5段階のAclogradeを設けて判定した。尚、説明書では、Aclograde 4に相当するstrongly positiveはDer Iで $2\mu\text{g/g fine dust}$ 以上とされている。

### ELISA法とAclogradeとの対応関係

ELISA法によるDer Iを表1のようにELISA classとして1から5までの5段階に分けた。この分類によるとAclograde 4はELISA class 3以上に相当することとなる。

### アクロテストとELISA法の相関

同一検体でのアクロテストとELISA法でのDer I、及び、AclogradeとELISA classの相関を検討した。

### 試料及び判定者による誤差、試料の量と反応温度が及ぼす影響

再現性については、5検体をそれぞれ5個のキット計25個を同時に反応させた。判定は4人で行いその平

均値をとった。判定者による誤差については、無作為に抽出した5検体に対し4人の判定者の判定値を比較した。

反応温度の影響をみるために、同一検体を、標準的な室温の範囲内と考えられる26度と、低温下として5度、高温下として37度の3種類の温度で反応を行った。判定値は4人の判定者の平均をとった。

試料の量による影響に対しては、5検体で規定の量

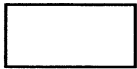
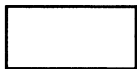
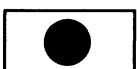
|                                      |                                                                                    | Aclograde |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Negative(no spot)                    |   | 0         |
|                                      |                                                                                    | 1         |
| Weakly positive<br>(light-pink spot) |   | 2         |
|                                      |                                                                                    | 3         |
| Strongly positive<br>(pink spot)     |  | 4         |

図 1 Aclogradeの設定

表 1 ELISA classとDer Iの対応

| ELISA class | Der I ( $\mu$ g/g fine dust)<br>(Der p I +Der f I ) |
|-------------|-----------------------------------------------------|
| class 1     | < 0.5                                               |
| class 2     | 0.5~2.0                                             |
| class 3     | 2.0~10                                              |
| class 4     | 10~50                                               |
| class 5     | > 50                                                |

(付属のスプーンすりきり 1 杯,  $0.02 \pm 0.008\text{g}$ ,  $n=38$ ) と, その1/2, 1/4量を同時に反応させた. 判定値は 4 人の判定者の平均をとった.

結 果

アクロテストとELISA法の相関

同じ検体を用いて測定したAclogradeとELISA法で

Der Iの相関を図 2 に示す. Aclogradeは 4 人の判定者の平均値を用いた. 尚, 各判定者は事前に他の判定者の判定値は知られていなかった.

検体数61, 相関係数は0.322 ( $p=0.011$ ) であり, グラフ中の分布をみると, キットに添付の説明書では, Aclograde 4 は  $2\mu\text{g/g fine dust}$  以上に相当するとなっているが, 実際には  $10\mu\text{g/g fine dust}$  前後から反応していることがわかる.

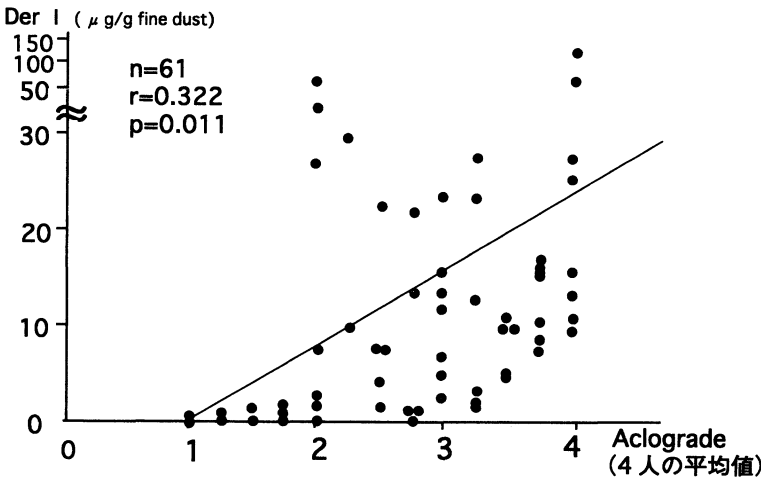


図 2 AclogradeとDer Iの相関

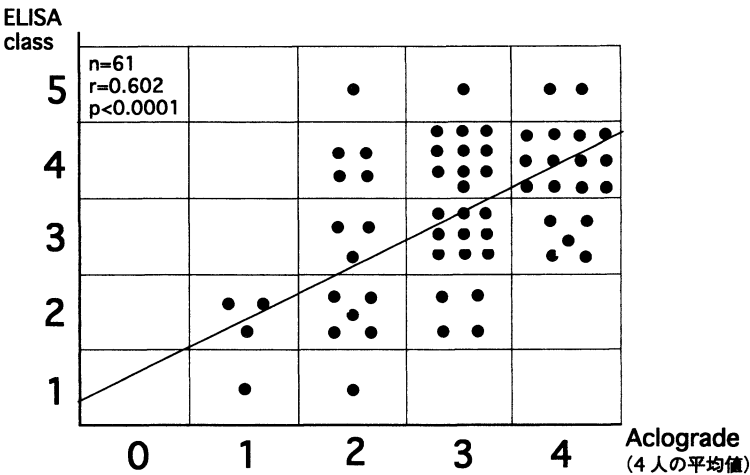


図 3 AclogradeとELISA classの相関

次にAclogradeとELISA classの相関を図3に示す。Aclogradeは4人の平均値の小数点以下を四捨五入して表示した。AclogradeとELISA classの相関係数は0.602 ( $p<0.0001$ )と有意な相関を認めた。

# 再現性と判定者による誤差

同一検体の5個はそれぞれ直線で結ばれている。1検体につき各5個の判定の変動計数(標準偏差/平均値 $\times 100$  (%))は5検体の平均で17.5%となった。(図4)

判定者による誤差は図5に示す。4人の判定者の判定値のずれは1段階以内にとどまり、変動係数は平均

11.3%であった。

# 反応温度、検体の量による影響

26度と、5度、37度の3種類の温度で各5検体を測定した結果、各温度間では有意な差はみられなかったが、低温下で判定値が低くなる試料もみられた。(図6)

検体の量による影響については、いずれも有意差はみられなかったが、1/4量で低値にでるものもあった。(図7)

# 考 察

アクロテストは反応紙上にコーティングされた抗

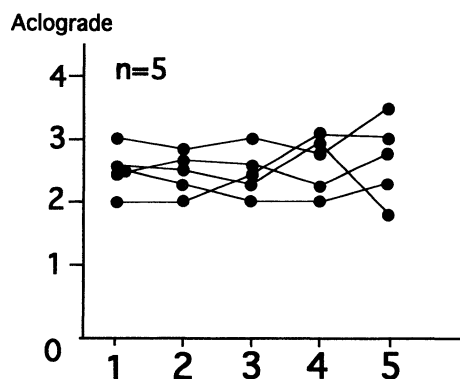


図4 同一検体における再現性

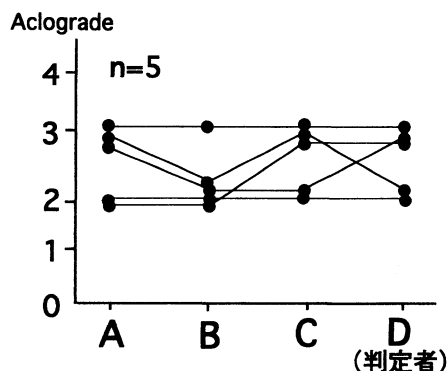


図5 判定者による誤差

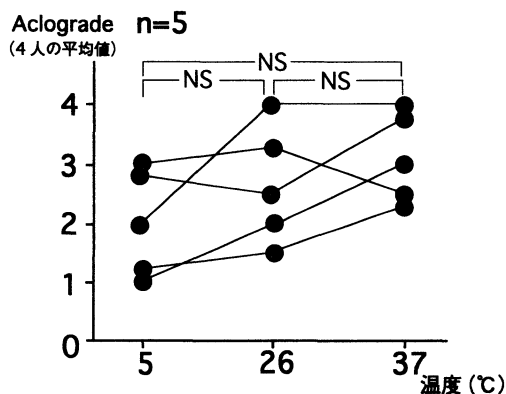


図6 反応温度による影響

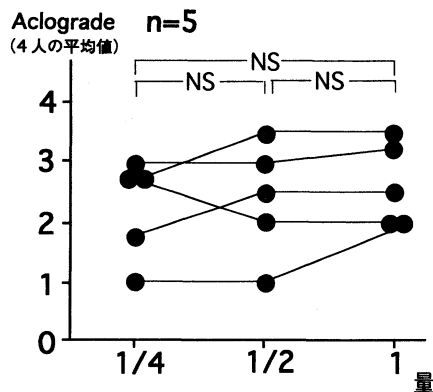


図7 試料の量による影響

ヒョウヒダニ抗体と試料中のヒョウヒダニアレルゲンの結合を赤色系の色素 (Saramon Brilliant Pink) の呈色強度を利用して判定している<sup>7,8)</sup>。抗原抗体結合反応と反応液中のコロイド状の色素の結合はキット付属の容器内で室温で行うため、特別な環境を必要とせず、どこにおいても測定できる利点を有する。それに対し、現在ダニアレルゲン測定に広く用いられているELISA法は、精度が高いという長所の反面、測定に特殊な機器と技術を要するという短所を有する。その他にはこれまでに簡易キットとしてACAREX<sup>®9,10)</sup>が発売されているが、これは、ダニをはじめとするクモ綱の糞中に含まれるグアニンを測定しており、ダニアレルゲンそのものを測定していないこと、測定値にばらつきが多い<sup>11)</sup>ことなどから一般的に広く使用されるには至っていない。そのため、本キットの、ダニアレルゲンを直接、簡便に測定できる利点は大きいといえる。

測定に用いる試料については、説明書では、未使用の紙パックをつけた掃除機を用いて採取した塵、もしくは寝具や家具を直接たたいて採取した塵のうち、あらい繊維や粗大なかけらを取り除いて細かな粉末状の塵を用いるよう記載されている。家庭用掃除機を用いた場合、紙パック内には粗大なかけらや毛髪などの測定に適さないもの多く混在するため、紙パックの内袋と外袋の間に蓄積した微細塵が測定に適すると考えられる。(内袋のメッシュは最大で200~300  $\mu\text{m}$ のため、これを通過した塵の大きさは100  $\mu\text{m}$ 以下で安定している)<sup>12)</sup>しかし、一部屋の1回分の掃除では、1回の測定に必要な付属スプーン1杯の塵(約0.02g)を採取できないため、各部屋毎のダニアレルゲンレベルの測定は難しく、家屋全体での測定に限られるという限界が生じる。

キット添付の説明書では、アクロテストの判定は、図1のように呈色の濃さにより3段階で行っているが、3段階では細かな判定が難しいため、今回は独自に5段階のAclogradeを設定して検討に用いた。今回の検討ではAclogradeに対しELISA法によるDer IとELISA classのそれぞれで有意な相関を認めた。図2をみると今回の検討ではAclograde 0と判定された検体はなく、Aclograde 1と判定された検体のELISA法でのDer Iの最低量は0.36  $\mu\text{g/g fine dust}$ であった。また、4人の判定値がいずれもAclograde 4になった検体でのELISA法でのDer Iの最低量は9.52  $\mu\text{g/g fine dust}$ であった。添付の説明書においては、strongly positiveは2  $\mu\text{g/g fine dust}$ 以上とされており、一見今回の検討と

ずれがみられる。しかし、図1にみられるようにstrongly positiveにはAclograde 4のみでなくAclograde 3も一部含まれる。図2よりAclogradeの4人の平均値が3台の分布をみるとELISA法でのDer Iの最低量は1.65  $\mu\text{g/g fine dust}$ であった。このため、説明書のように3段階に判定すると2  $\mu\text{g/g fine dust}$ 以上は全て一括されてしまうが、5段階のAclogradeを用いることにより、さらに10  $\mu\text{g/g fine dust}$ 以上が判別し得ることとなり、よりの確かなダニ抗原量の把握が可能となる。このアクロテストは、少なくともDer Iが0.36  $\mu\text{g/g fine dust}$ 以上の場合は、検出可能であり、逆にAclograde 4の場合はDer Iは最低10  $\mu\text{g/g fine dust}$ 以上はあると考えて環境整備を指導する必要があるといえよう。

今回の検討では、再現性については判定値のずれは1.25grade以内、判定者による誤差は1grade以内と比較的安定した結果を得た。この要因としては、アクロテストの測定法が複雑なプロセスを必要とせず簡便に行えることが考えられ、環境整備を進めてゆくなかで、ダニアレルゲン濃度の経時的な指標として使用できる可能性も考えられる。

また温度の影響については添付の説明書には、反応温度は室温においてとされており、特に反応温度の細かな指定はない。今回の検討でも3種類の温度下ではいずれも判定値に有意差は認めなかったが、低温下で低値に出るものもみられたため、寒冷地での測定、及び同一家屋での経時的測定でも季節による温度差が著しい場合には留意が必要となろう。また、1回の測定に使用される塵は付属のスプーンすりきり1杯だが、スプーンが小さく、体積としてはかるため、量に誤差が生じる可能性がある。しかし、今回の検討では1/4量ではやや低めにでる傾向があるものの、3種いずれの量でも有意差は認めなかったため、実際の測定時の秤量の誤差はほとんど影響ない範囲と思われる。ただし、前述のように、一部屋の1回分の掃除のみでは、1回の測定に必要な塵を採取できないため、各部屋毎のダニアレルゲンレベルの測定は難しく、家屋全体での測定が望ましいといえる。

以上のようにアクロテストはヒョウヒダニアレルゲン濃度の絶対値の判定には適さないが、特殊な設備を必要とせず、誰でも簡便に行える利点は大きく、ある程度の幅を持ったクラス分けとして、また妥当な価格で提供されればELISA法での測定が必要かどうかのスクリーニングとして有用である。

本論文の要旨は第35回日本小児アレルギー学会

(1998年9月 大阪府)で発表した。

尚キットを提供していただいた東京MI商會に深謝致します。

## 文 献

- 1) Platts-Mills, T. A. E., Thomas, W. R., Aalberse, R. C., Verveloet, D., and Chapman, M. D. : Dust mite allergens and asthma. report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 89, 1046-1060, 1992.
- 2) Voorhost, R., Spieksma-Boezeman, M. I. T. and Spieksma, F. T. M. : Is a mite (*Dermatophagoides* sp.) the producer of the house dust allergen? *Allergic Asthma* 10, 329-334, 1964.
- 3) Miyamoto, T., Oshima, S., Ishizaki, T. and Sato, S. : Allergic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae* Huges, 1961) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma. *J. Allergy* 42, 14-28, 1968.
- 4) National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH, Global Initiative for Asthma, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NHLBI/WHO Workshop Report. National Institute of Health, pub no 95-3659, 1995.
- 5) 日本アレルギー学会 アレルギー疾患治療ガイドライン95年版改訂, ライフサイエンス・メディカ東京, 1995.
- 6) 高増哲也, 栗原和幸, 猪又直子, 五藤和子 : アレルギー疾患患者の家庭内の塵のダニ抗原量の測定. *日小ア誌* 11, 263-267, 1997.
- 7) Mistrello, G., Gentili, M., Roncarolo, D., Antoniotti, P., Ottoboni, F., Falagiani, P. : Dot immunobinding Assay for Detection of Mite Antigens in House-Dust Samples. *J. Med. Entomol.* 35, 143-147, 1998.
- 8) Mistrello, G., Gentili, M., Falagiani, P., Roncarolo, D., Riva, G., Tinelli, M. : Dot immunobinding assay as a new diagnostic test for human hydatid disease. *Immunol. Lett.* 47, 79-85, 1995.
- 9) Van Bronswijk, J. E. M. H., Bischoff, E., Schirrmacher, W., Berrens, L., and Schober, G. : A rapid House-dust Allergen Test. Preliminary Results. *J. Med. Entomol* 23, 217-218, 1986.
- 10) Van der Brempt, X., Haddi, E., Charpin, D., and Vervloet, D. : Comparison of the ACAREX test with monoclonal antibodies for the quantification of mite allergens. *J. Allergy Clin Immunol* 87, 130-132, 1991.
- 11) 武藤敦彦, 橋本知幸, 田中生男, 安枝 浩, 佐々木 聖 : ACAREX TESTによるダニアレルゲンの半定量について. 家庭環境の整備に関する研究, 1991年度~1993年度

## EVALUATION OF USEFULNESS OF ACLOTTEST IN MEASURING OF MITE ANTIGEN IN HOUSE-DUST SAMPLES

Ayako Inaba, Kazuyuki, Kurihara, kazuko Goto, Hiromi Takenouti  
*Department of Allergy, Kanagawa Children's Medical Center*

House dust mite is the chief allergen for atopic patients, and for environmental control, it is important to measure the level of this antigen in house dust of each patient's house. We investigated the usefulness of ACLOTTEST, a new simple kit for detecting mite antigens in house dust. Using 61 dust samples gathered by electronic cleaner in 29 houses, there was a statistically significant relationship between Aclograde (5-grade classification of the results of ACLOTTEST) and ELISA class (5-grade classification of Der I measured by sandwich ELISA), and the correlation coefficient was 0.602. Though larger quantity of dust sample is needed for ACLOTTEST than for sandwich ELISA, ACLOTTEST is simple, rapid, and requires no specific instrumentation.

These observations suggest that ACLOTTEST is useful as a simple method to detect the level of mite antigen in house dust samples by patients themselves.