

ヤケヒョウヒダニ虫体抗原に対する気管支喘息患者の 免疫応答

宮崎医科大学第二内科

松岡 均 宇野久光 河野清秀 津田和矩

千阪小児科医院

千阪治男

岡山大学医学部寄生虫学

石井 明

ダニによる気管支喘息患者の発症や病態に關与する免疫機構を検討することを目的として、家塵中のアレルゲンとして重要なヤケヒョウヒダニ(Dp)に対する気管支喘息患者の免疫応答を検討した。Dp虫体より分画したアレルゲンDp2は、分子量約15000であった。血清Dp2特異IgE抗体および特異IgG抗体の陽性率は、患者群で71.1%, 53.9%であり、健康対照者群では、0%, 21.0%であった。抗体価頻度分布では、IgG抗体は両群で差はなかったが、IgE抗体はあきらかに患者群で高値の者が多かった。Dp2に対するin vitroのリンパ球増殖反応は、高反応群と低反応群に分れた。高反応群は患者群にのみ認められた。反応した細胞はCD4陽性細胞で、Dp2に特異的な反応と考えられた。しかし、リンパ球増殖反応と血中IgE抗体価とは相関せず、それぞれ異なった機構に制御されているものと思われた。HLAとの相関では、特異IgE抗体高値群にHLA-A11, HLA-Bw61の増加傾向がみられたが有意ではなかった。一方、リンパ球増殖高応答群にHLA-Bw62の増加が認められた($p < 0.05$)。in vitroのDp2特異リンパ球増殖反応に關与するT細胞とin vivoでの特異IgE抗体産生に關与するT細胞とは、HLAとの相関の成績からも、異なった免疫応答機構に属するものと思われた。

Key words: bronchial asthma — *Dermatophagoides pteronyssinus* — HLA — specific IgE — specific T cell proliferation

緒 言

1966年 Ishizaka ら¹⁾によりレアギン抗体としてIgE抗体が同定されて以来、アレルギーとIgE抗体の關係の解明が進み、その発症機構やIgE抗体の生体内での産生調節機構の研究が続けられている。

代表的なアレルギー疾患の1つである気管支喘息についても、主要なアレルゲンの1つとして室内塵中のヒョウヒダニが重要であることが指摘され²⁾⁻⁴⁾、気管支喘息とダニの關連が検討されている⁵⁾。近年、ダニ抗原の精製が試みられているが、ダニ抗原に対する特異抗体⁶⁾や特異的なリンパ球の反応^{6,7)}についての報告は少ない。

一方、家系調査⁹⁾や双生児の調査¹⁰⁾などの成績からアレルギー疾患の発症や病態に遺伝要因が關与していることが指摘されている。ダニアレルギーやダニによる気管支喘息の免疫遺伝学的な検討としてHLAとの相関^{11,12)}の検索もなされているが、用いられている抗原は粗抗原に近く、また、HLAとの相関も確定していない。

我々は気管支喘息患者のダニ虫体由来抗原に対する免疫応答を検討するために、家塵中の主要なアレルゲンとされるヤケヒョウヒダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*, Dp)の虫体より、主要アレルゲンDp2

Received: November 28, 1987

Accepted: April 28, 1988

Abbreviations: Df *Dermatophagoides farinae*; Dp *Dermatophagoides pteronyssinus*; Dpcr *Dermatophagoides pteronyssinus* crude extract; ELISA enzyme linked immunosorbent assay; FCS fetal calf serum; HLA human leukocyte antigen; Ir-genes immune response genes; Is-genes immune suppression genes; MHC major histocompatibility complex; PBS phosphate buffered saline; SDS-PAGE sodium dodecyl-sodium-polyacrylamide gel electrophoresis; SI stimulation index

を分画した。これを用いて、気管支喘息患者血清中の特異 IgE 抗体、特異 IgG 抗体および *in vitro* のリンパ球増殖反応を測定した。さらに、これらの喘息患者の HLA class I 抗原を検討し、Dp に対する免疫応答性に関与する免疫遺伝学的要因の解析も加えたので報告する。

対象と材料

1. ヤケヒョウヒダニ (Dp)

Miyamoto らの方法¹³⁾により継代培養した Dp を、培地より虫体のみを分離した。虫体を 0.12M トリス塩酸緩衝液、pH 7.6 にてポッターホモジナイザーでホモジネートし 60000×g, 60 分遠心分離して得た上清を粗抗原 (Dpcr) とした。また、ダニ抗原に対するコントロールの抗原としてカンジダ抗原 (鳥居薬品株式会社より供与) を用いた。

2. 患者および健康対照者

外来通院中の気管支喘息患者をアトピー型あるいは非アトピー型を問わずに 152 名 (男 92 名, 女 60 名, 年齢 6-56 歳, 平均年齢 18.3 歳) を対象とした。なお、アレルギー疾患の既往のない 62 名 (男 46 名, 女 16 名, 年齢 6-53 歳, 平均年齢 22.0 歳) を健康対照群とした。

a) 血清: 上記 214 名の血清は使用するまで -40℃ に保存した。また、上記の患者以外にあらかじめ Dp に対する RAST スコア 4 以上の気管支喘息患者 11 名を選び、その血清を陽性コントロールとした。

b) 末梢血リンパ球 (PBL): ヘパリン加採血した末梢血より Ficoll-Conray 法¹⁴⁾で分離した。この PBL を RPMI1640 にて 2 回洗浄して増殖反応試験に供した。また、HLA class I 抗原のタイピングに使用するまで 20% ヒト血清, 10% DMSO 加 RPMI1640 に浮遊し、-80℃ に保存した。

方 法

1. ゲル濾過

Sephadex G-75 (Pharmacia 社) カラム (1.6×90cm) を用い、1M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) を溶出液としてゲル濾過した。各画分の Dp 特異 IgE 抗体との結合活性を、Dp に対する陽性コントロール 5 名のブール血清を用いて ELISA で測定した。

2. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Laemli らの方法¹⁵⁾に従い、7.5%-30% の不連続 SDS 分離ゲルを用いた SDS-PAGE をおこなった。染色は、0.25% クマジーブリリアントブルー-メタノール-酢酸-蒸留水溶液で行い、脱色は、メタノール-酢酸-蒸留水溶液を使用した。

3. enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Dp 特異抗体の測定はマイクロタイタープレートを用いる阿部らの ELISA の方法¹⁶⁾に準じた。プレート (Immuno Plate II 96F, Nunc 社) を、0.1ml の抗原液 (特異 IgE 抗体測定の場合: Dp2, Dpcr とともに 20μg/ml, 特異 IgG 抗体測定の場合: Dp2, Dpcr とともに 2μg/ml) でコートした。

特異 IgE 抗体の測定には、被検血清を 10% ウマ血清, 0.1% Tween 20 加 0.85% NaCl 溶液で 1:10 に希釈しプレートに加えた。二次抗体として 1:20 に希釈したガラクトシダーゼ標識抗ヒト IgE ヤギ抗体 (MBL 社) を用いた。基質液は 0.1% o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラシド (Sigma 社), 1.5mM MgCl₂, 0.7% 2-メルカプトエタノール, 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した。酵素反応を 0.2M Na₂CO₃ で停止し、自動吸光度計 (Titertek Multiskan, Flow Lab. 社) で 414nm の吸光度を測定した。

特異 IgG 抗体の測定は上記の方法の一部を変えて行った。プレートに 1:50 に希釈した被検血清を加え反応させた。二次抗体として 1:1000 に希釈したパーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ヤギ抗体 (MBL 社) を用いた。基質液は、0.04% 2,2'-アジノビス-3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸 (Sigma 社), 0.05% H₂O₂ (30%), 0.05M クエン酸-リン酸緩衝液, pH 5.0 とし、405nm の吸光度を測定した。IgE 抗体, IgG 抗体とも被検血清の比較は同一プレートで行い 2 ウェルの平均値を求めた。ブランクのウェルの吸光度の 2 倍以上を陽性と判定した。

4. 末梢血リンパ球サブセットの分離

a) T 細胞の分離: ナイロンウールへの付着性により、PBL を T 細胞と非 T 細胞とに分離した¹⁷⁾。シリンジに充填したナイロンウールを 5% ウシ胎児血清 (FCS) 加 RPMI1640 で洗浄し、PBL 浮遊液をシリンジに注ぎ 37℃ で 1 時間静置後 37℃ の 5% FCS 加 RPMI1640 で試験管に溶出した非付着細胞を T 細胞として用いた。次に 4℃ の 5% FCS 加 RPMI1640 でナイロンウールを十分に洗浄し、試験管に溶出した細胞

を付着細胞とし、非 T 細胞とした。

b) T 細胞サブセットの分離: Wysocki らの panning 法¹⁸⁾によった。抗体付着シャーレは 0.05M トリス緩衝液 (pH 9.5) で希釈したヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cappel 社) をプラスチックシャーレ (Lux 社) に 4℃ で 1 晩静置した後に、PBS で 2 回、5% FCS 加 PBS で 1 回洗浄した。PBL を抗 CD8 (Leu2a) または抗 CD4 (Leu3a) の単クローン抗体 (Becton Dickinson 社) と室温で 60 分反応させた。これを 5% FCS 加 PBS で洗浄後、上記抗体付着シャーレに単クローン抗体と反応させた細胞浮遊液を入れ、氷上で反応させた。70 分後に 5% FCS 加 PBS でシャーレを洗浄し、非付着細胞を得た。これらを CD8⁺ および CD4⁺ 細胞群とした。それぞれの細胞群を FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Tago 社) を用い、間接蛍光抗体法で検討した。各々 CD8⁺ 細胞は 95% 以上または CD4⁺ 細胞は 93% 以上で

あった。

5. in vitro 末梢血リンパ球増殖反応

培養液に浮遊したリンパ球を抗原添加あるいは無添加で、平底 96 穴マイクロタイタープレート (Nunc 社) に分注し、37℃、5% CO₂、飽和水蒸気圧下に培養した。測定の 16 時間前に 1 μ Ci/well の ³H-thymidine (NEN 社) を加え、その取り込みを液体シンチレーションカウンター (Aroka 社) で測定した。各検体の cpm 値は 3 穴の平均値とした。また、抗原添加検体の cpm 値を抗原無添加検体の cpm 値で除した値を stimulation index (SI) とし、SI 値 2 以上を高応答とした。

6. HLA 抗原のタイピングおよび抗原頻度の検定

HLA class I 抗原のタイピングは、NIH の標準 microcytotoxicity 法¹⁹⁾で行った。また、HLA 抗原の頻度は、あらかじめ第 9 回日本 HLA ワークショップの血清でタイピングした 120 名をコントロールした。患者群

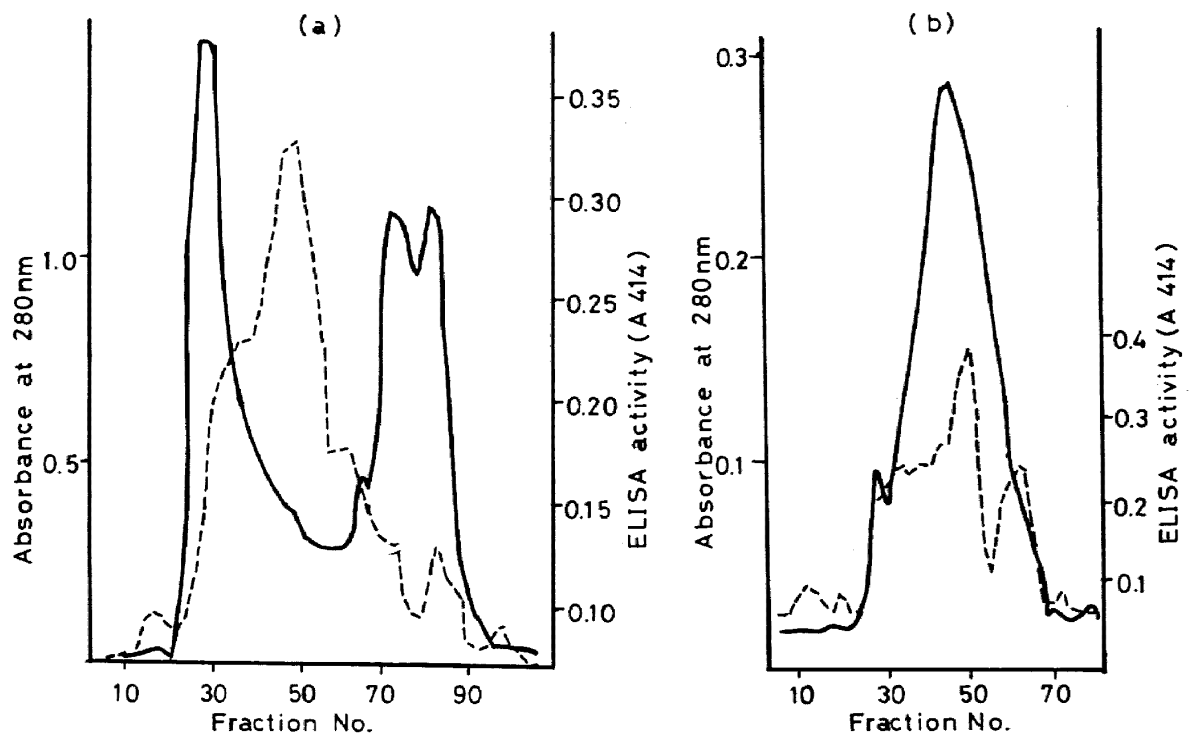


Fig. 1. Elution patterns and ELISA activity.

Elution patterns of gel filtration of crude extract from *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) bodies on Sephadex G-75 column ($\phi 1.6 \times 90$ cm), eluted with 1 M phosphate buffered saline (pH 7.2). Each fraction (3 ml) was collected at a flow rate of 20 ml/h, then assayed for the binding activity to IgE antibody in pooled sera from five Dp related asthmatics by IgE-ELISA. (a): Crude extract from Dp bodies was applied to the column. (b): Fraction No. 35-60 in (a) was rechromatographed in the same condition. Fraction No. 48-51 were collected and designated as Dp2.

—: protein content (absorbance at 280 nm)
 ---: ELISA activity (absorbance at 414 nm)

と健康対照群の間の HLA 抗原の頻度の検定は、 χ^2 検定によった。

結 果

1. Dp 虫体由来アレルゲン

Dp2cr を Sephadex G-75 カラムでゲル濾過した溶出パターンと、ELISA で測定した IgE 結合活性を Fig. 1 (a) に示した。IgE 結合性の高い No. 35-No. 60 の画分を集め、再度同一条件でゲル濾過すると Fig. 1 (b) のごとく、280nm の吸光度のピークにはほぼ一致して IgE 結合活性が認められた (Fig. 1 (b) の No. 48-No. 51)。これを Dp2 と呼び、ダニ虫体由来アレルゲンとした。

Dp2 の SDS-PAGE の泳動パターンは Fig. 2 に示したようにほぼ単一のバンドを示し、標準タンパクの移動度から求めた分子量は約 15000 であった。

2. Dp2 による Dp 特異 IgE 抗体の吸収試験

患者血清中の特異 IgE 抗体が主に Dp2 に対するものであるか否かを明らかにするために、Dp2 抽出時に用いた血清とは別の 6 名のプール血清を種々の濃度の Dp2 で吸収した後、Dp2cr を抗原として IgE 抗体価を測定した結果を Fig. 3 に示した。添加した Dp2 の量に依存して Dp2cr に対する IgE 抗体はほぼ完全に吸収された。

3. 血清中の特異抗体

a) 健康対照群血清中の特異 IgE 抗体：健康対照群における血清中の特異 IgE 抗体を測定した。Dp2cr を

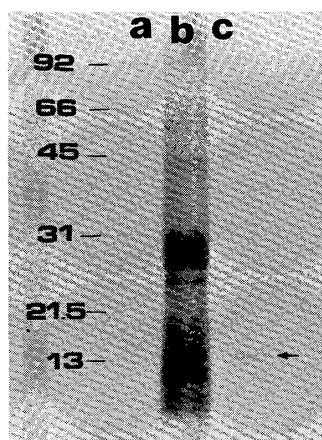


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophorogram stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue. a: marker proteins, b: Dp2cr, c: Dp2.

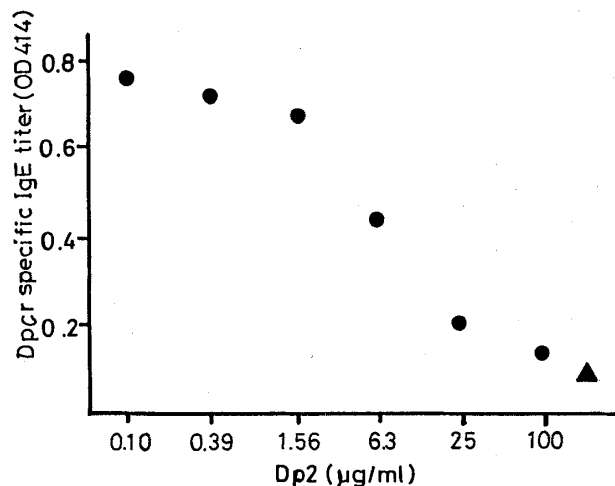


Fig. 3. Absorption of the Dp specific IgE antibodies with Dp2.

One ml of pooled sera from six, Dp-related asthmatics was incubated with 1ml of Dp2 solution (0-200 μ g/ml) overnight at room temperature. The supernatant were assayed for Dp2cr specific IgE antibody titers by IgE-ELISA.

▲: IgE antibody titer of background.

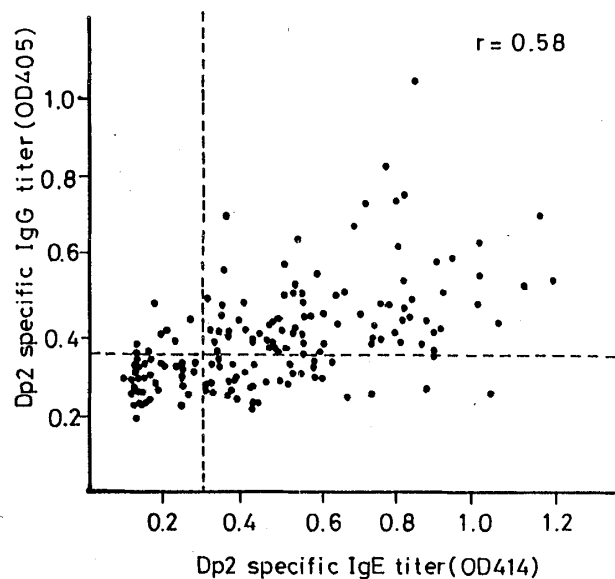


Fig. 4. Correlation between specific IgE and IgG antibodies to Dp2 in the sera from 152 asthmatics. -----: positive limit.

抗原として測定した場合は、健康対照群の吸光度は、 0.17 ± 0.04 ($n=62$, mean $\pm$ S.D.) であり、陽性コントロール血清は 0.48 ± 0.17 ($n=6$) であった。次に、Dp2 を抗原とした場合、健康対照群の吸光度は 0.16 ± 0.04 ($n=62$)、陽性コントロール群は 0.84 ± 0.21 ($n=6$) であった。

健康対照群血清中には Dp2 および Dpcr のいずれに対する特異 IgE 抗体も検出できなかった。b) 患者血清中の特異 IgE 抗体と IgG 抗体：血清の Dp 特異抗体の陽性率を Table 1 に示した。患者群で、特異 IgE 抗体は Dp2 を抗原とした場合は 71.1% (108/152 名)、Dpcr を抗原とした場合は、57.2% (87/152 名) が陽性

Table 1 Positive ratio of Dp specific antibodies in the sera from asthmatics and non-asthmatics

Antibodies	IgE		IgG	
	Dp2	Dpcr	Dp2	Dpcr
Asthmatics (n=152)	108 (71.1%)	87 (57.2%)	82 (53.9%)	104 (68.4%)
Healthy controls (n=62)	0	0	13 (21.0%)	11 (17.7%)

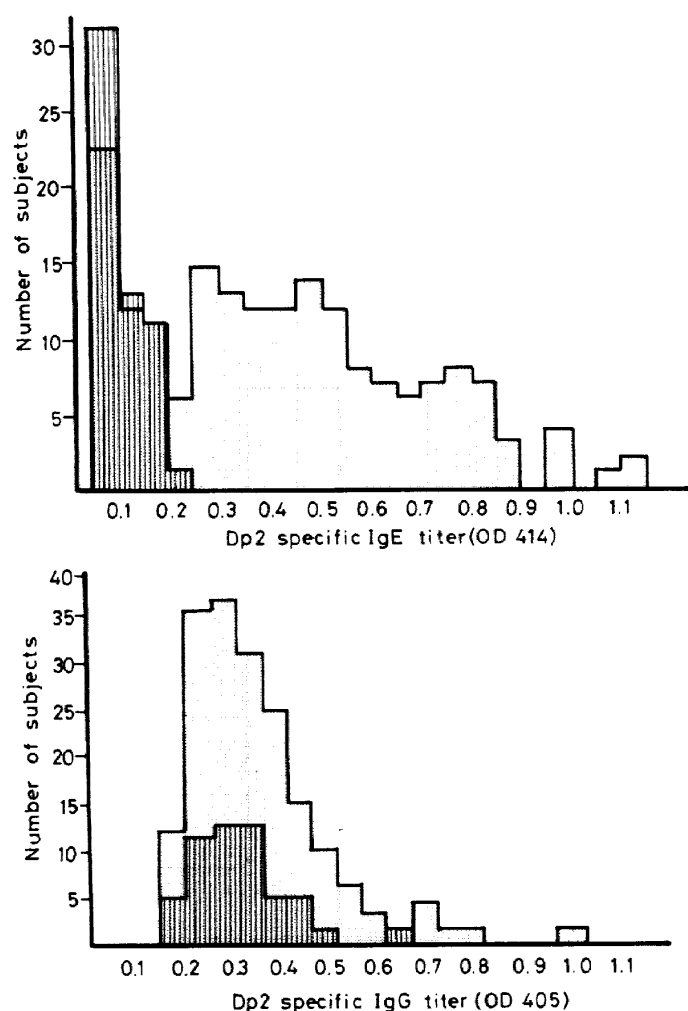


Fig. 5. Histograms of Dp2 specific IgE and IgG antibody titers in the sera from asthmatics and healthy controls.

▨: asthmatics (n=152). □: healthy controls (n=62).

であった。一方、特異 IgG 抗体は Dp2, Dpcr に対してそれぞれ、53.9% (82/152 名)、68.4% (104/152 名) の陽性率であった。患者群の Dp2 に対する特異 IgE 抗体と IgG 抗体価の間には $r=0.58$ で両者に弱い相関がみられた (Fig. 4)。また、健康対照群では前述のように、特異 IgE 抗体は検出されず、特異 IgG 抗体の陽性率は Dp2, Dpcr それぞれに対して、21.0% (13/62 名)、17.7% (11/62 名) であった。

c) 特異抗体価の頻度分布：血清の Dp2 特異 IgE 抗体および IgG 抗体価の頻度分布を Fig. 5 に示した。IgE 抗体価の頻度分布は患者群 (152 名) と健康対照群 (62 名) に明らかな相違が認められ、患者群は高 IgE 値を示す者が多かった。一方、IgG 抗体価は患者群と対照

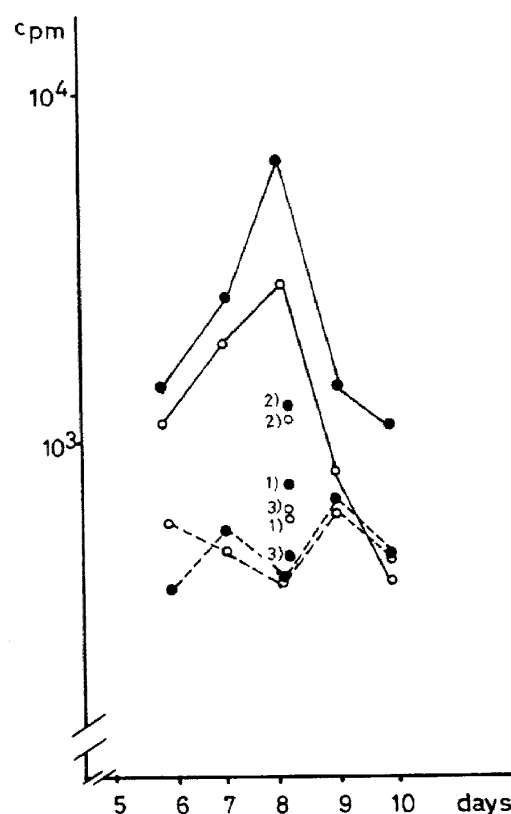


Fig. 6. Kinetics study of Dp2 induced lymphocyte proliferative response. PBL (1×10^5 /well) were incubated with Dp2 (10μ g/ml) in 10% FCS RPMI1640 for 8 days. One μ Ci/well ^{3} H-thymidine was pulsed 16 hours before the harvesting, and cpm was counted with a liquid scintillation counter. The numbers 1), 2), 3) on day 8 mean the cpm of cultures stimulated with Dp2, 0.01 μ g/ml, 1 μ g/ml and 50 μ g/ml respectively.

○, ●: asthmatics. (n=2)

—: stimulated with Dp2 (10μ g/ml).

- - -: unstimulated.

群で、ほぼ同様な分布を示した。

4. 末梢血リンパ球増殖反応

a) リンパ球増殖反応の kinetic study : あらかじめ, Dp2のタンパク濃度を $0.01\text{--}50\mu\text{g/ml}$, 細胞数を $1\text{--}2\times 10^5/\text{ウェル}$ にして, リンパ球増殖反応の至適条件を検討し, 抗原濃度は $10\mu\text{g/ml}$, 細胞数は $1\times 10^5/\text{ウェル}$ とした. 培養日数は, Fig. 6に示したように, ヤケヒョウヒダニに対する特異IgE抗体高値を示す気管支喘息患者2名の末梢血リンパ球について6-10日間の培養の結果, ^3H -thymidineの取り込みは, 培養8日目で最大値を示したため, 8日目の取り込みを測定した.

b) リンパ球増殖反応の抗原特異性 : 抗原特異性を検討するために, Dp2特異IgE抗体価高値を示す気管支喘息患者3名を対象として, Dp2またはカンジダ抗原に対するリンパ球増殖反応を検討した (Fig. 7). 症例Aでは, 両抗原に対して反応がみられたが, 症例Bではカンジダ抗原のみに, また症例Cでは, Dp2のみに反応がみられた. すなわち, このリンパ球の増殖反応はDp2に抗原特異的であった.

c) Dp2による末梢血リンパ球増殖反応 : リンパ球増殖反応は $\text{SI} > 2$ の高応答群と $\text{SI} < 2$ の低応答群の2群に分かれた. 高応答者は患者群の50名中25名の50%にみられたが, 健康対照群では, 高応答を示すものは26名中1名も認められなかった (Fig. 8).

d) Dp2に対する増殖リンパ球サブセット : Dp2に対するリンパ球増殖反応が高応答の患者3名を対象と

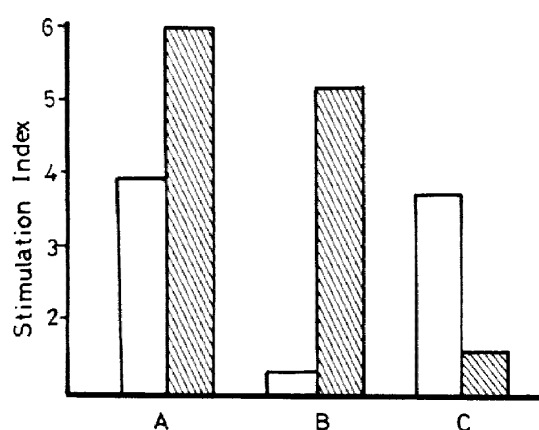


Fig. 7. Lymphocyte proliferative response specific to Dp2.

A, B, C: asthmatics. □: stimulated with Dp2 ($10\mu\text{g/ml}$). ▨: stimulated with *Candida* antigen ($10\mu\text{g/ml}$).

Stimulation Index; (cpm in culture stimulated with Dp2)/(cpm in unstimulated cultures).

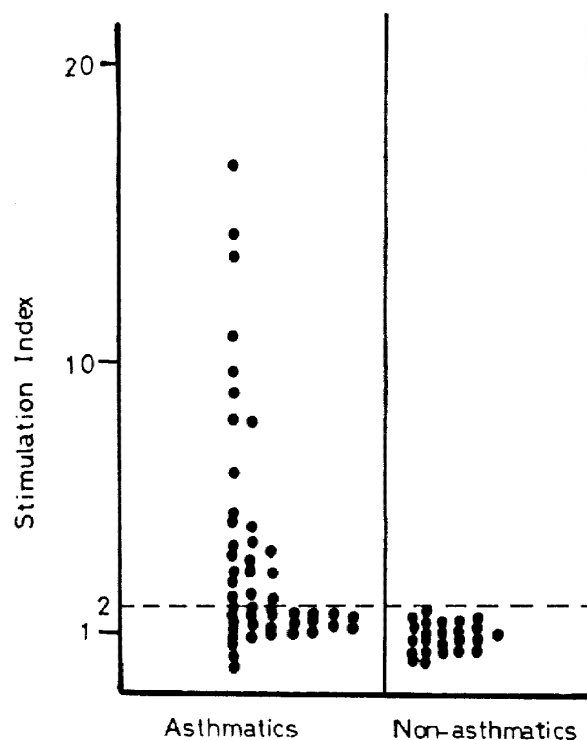


Fig. 8. The lymphocyte proliferative responses to Dp2 in fifty asthmatics and twenty five healthy controls.

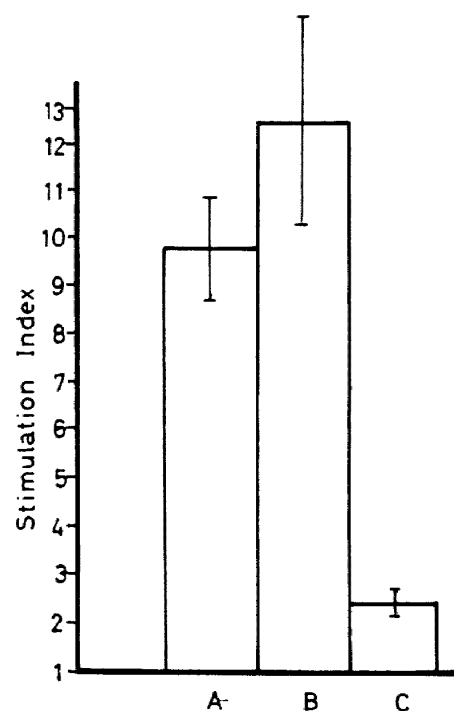


Fig. 9. Dp2 induced proliferative response of T cell rich lymphocytes separated by nylon-wool column. (n=3)

A: whole cells. B: non-adherent cells. C: adherent cells (each cell counts was adjusted as $1\times 10^5/\text{well}$).

Table 2 Subsets of peripheral lymphocyte responding to Dp2

Subjects	Antigen	Lymphocytes	
		CD8 ⁺	CD4 ⁺
A	Free Dp2	372 1060(2.85)	3068 3216(1.05)
B	Free Dp2	1413 6965(4.93)	1748 8648(2.03)
C	Free Dp2	1330 7221(5.42)	1700 3805(2.23)

Subjects A, B, C are asthmatics with high titer of Dp2 specific IgE antibody and high responders in proliferative response to Dp2.

cpm () : Stimulation Index.

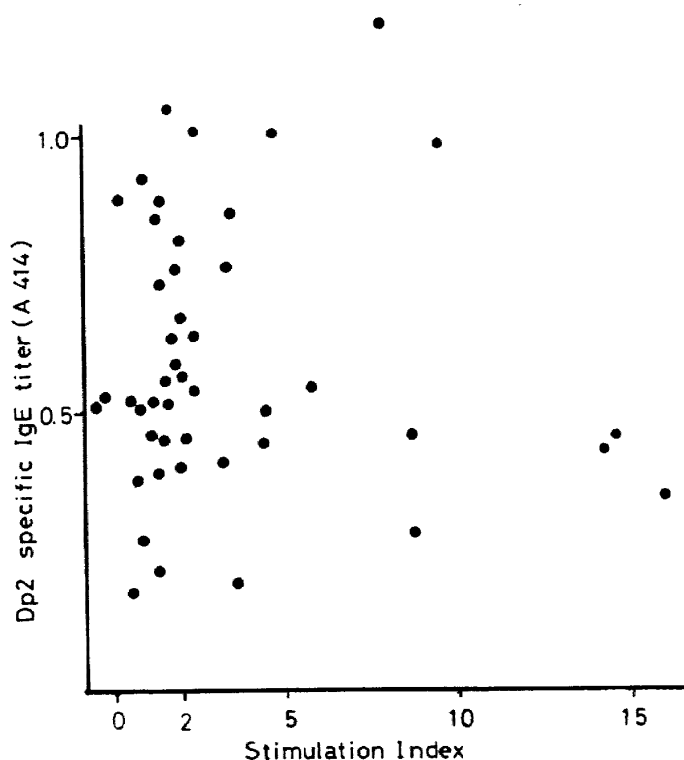


Fig. 10. Correlation between stimulation induces of Dp2 specific lymphocyte proliferation and Dp2 specific IgE titers in the sera from fifty asthmatics.

した。ナイロンウールへの付着細胞と非付着細胞のDp2に対する増殖反応のSIの成績をFig. 9に示した。Dp2に反応するのは、非付着細胞であった。次に、どのサブセットがDp2に反応するのか検討するために、単クローン抗体を用いてサブセットの分離を行った。3例ともCD8⁺群がCD4⁺群に比して2.4倍から2.7倍の高反応を示した (Table 2)。

5. 血清特異抗体価とリンパ球増殖反応

Table 3 Association between HLA class I and asthmatics

(A) Association between HLA class I antigens and the Dp2-specific IgE antibody titer

	Asthmatics (n=34)	Controls (n=120)
A11	9(26.4%)	22(19.0%)
Bw61	12(35.2%)	28(23.0%)

(B) Association between HLA class I and the Dp2 induced lymphocyte proliferative response

	Asthmatics		Controls (n=120)
	SI>2(n=18)	SI<2(n=16)	
Bw62	6(33.3%)	0	17(14.0)

Asthmatics vs. control : $\chi^2=0.253$.

Asthmatics (SI>2) vs. control : $\chi^2=4.140$ $p<0.05$.

気管支喘息患者50名において、血清 Dp2特異 IgE 抗体価と Dp2特異リンパ球増殖反応の SI 値に有意の相関は認められなかった (Fig. 10)。成績は示さなかったが、Dp2特異 IgG 抗体価とリンパ球増殖反応の SI 値との間にも相関は認められなかった。

6. HLA との相関

血清 Dp2特異 IgE 抗体陽性の患者群で、HLA-A11が26.3%、HLA-Bw61が35.2%と対照的に比して頻度の増加傾向を示したが有意ではなかった。一方、Dp2特異リンパ球増殖反応の高応答群においては、HLA-Bw62の頻度が33.3%と対照群の14.0%に比して有意 ($p<0.05$) に増加していた (Table 3)。

考 察

アトピー型気管支喘息のアレルゲンとしては、Voorhost ら²⁾が1964年に室内塵中に生息するダニが重要であることを皮内反応などより明らかにした。その後、ダニの属に関して Voorhost ら³⁾はヤケヒョウヒダニ (Dp) が、Miyamoto ら⁴⁾はコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinea*, Df) が室内塵の主要アレルゲンであることを示した。この両者はブリックテスト、吸入誘発試験や特異 IgE 抗体結合活性において強い交差反応を示すとされている²⁰⁾²¹⁾。

ダニアレルゲンについてのこれまでの研究では、活性成分は単一ではなく、約10000から50000程度の比較的低分子量の範囲に高い活性が認められることが明らかにされている。Dp の主要アレルゲンとしてこれま

でに報告されたものは、P1のような培地から分画されたもの²²⁾と、DpXのようなダニ虫体由来のもの²¹⁾とに大別できる。分子量は前者が約30000、後者は約15000で両者には交差反応はないとされている²¹⁾。

我々は、Dp虫体成分のゲル濾過画分のアレルゲン活性をプレートを用いたIgE-ELISAで測定し、アレルゲンDp2を得た。これは、分子量約15000で、これまで報告されている虫体由来のアレルゲン²¹⁾とほぼ同一であった。

Dp2を抗原とした吸収試験で、Dpによる気管支喘息患者プール血清中のDp特異IgE抗体をほぼ完全に吸収しえた。このことは、Dp2がヤケヒョウヒダニ虫体の主要なアレルゲン活性の大きな部分をしめることを示すもので、Dp2が虫体由来の主要アレルゲンの1つであることを示すものであると思われた。つぎに、血清中のDp2特異抗体価の頻度分布を比較した。特異IgE抗体は、患者群では低抗体価から高抗体価まで広く分布したが、対照群は全員低抗体価であった。一方、特異IgG抗体の場合は両群の抗体価の頻度分布にほとんど差は認められなかった。これを特異抗体の陽性率でみると、健康対照群で、特異IgE抗体は1例も検出されなかったが、Dp特異IgG抗体は少なくとも17.7%の血清で陽性であった。健康人血清中にDp特異IgG抗体が存在することはChapmanらも報告しており⁸⁾、ヒョウヒダニ類が我々の生活環境に普遍的に生息することを考えると、ヒト血清中に抗ダニIgG抗体が検出されることは自然なことであろう。一方、対照群血清中に特異IgE抗体が検出されなかったのは、特異IgE抗体産生系には特異IgG抗体産生系とは異なった統御機構が存在することを示唆するものといえる²³⁾。

つぎに、Dp2に対する免疫応答機構の1つとして、Dp2に対するin vitroでの末梢血リンパ球の増殖反応を検討した。このリンパ球の反応は高応答群と低応答群に分かれ、高応答群は患者群のみにみられた。また、Dp2のかわりにカンジダ抗原を用い、その増殖反応の特異性を検討した。その結果、Dp2高応答者にカンジダ抗原に反応する者としていない者が存在し、またDp低応答者でもカンジダ抗原には反応する者が存在した。以上の結果は、この増殖反応がDp2に特異的であることを示すものと言えよう。さらに、このDp2に反応する細胞は、ナイロンウール非付着性でCD4陽性であることから、ヘルパーT細胞と考えられた。Rawleら⁶⁾は、Dpの培地由来アレルゲンであるP1を用い、Dpアレ

ルギー患者の末梢血リンパ球の増殖反応を検討している。それによると患者群が高反応群と低反応群とに分かれ、反応するリンパ球はCD4 (OKT4) 陽性のヘルパーT細胞であるという。しかし、彼らの報告では増殖反応がP1に特異的であるかどうかは検討されていない。我々の成績から、Dp虫体由来アレルゲンがダニによる気管支喘息患者の末梢血ヘルパーT細胞の抗原特異的な増殖反応を惹起し得ることが明らかになった。Halvorsenら⁷⁾はDf抗原に対する末梢血T細胞の増殖反応を検討し、患者群だけでなく健康対照者群にも高応答者が存在することを示した。我々やRawleらの成績とHalvorsenらの結果の相違は抗原の差異によるものと思われる。すなわち、我々はIgE抗体との結合活性を指標として分離した抗原を用いた。一方、Halvorsenらの抗原は、虫体抽出液より分子量5000以下と、70000以上の成分を除いたものであり、我々の抗原よりも多くの成分が含まれているためと考えられる。

T細胞サブセットは生体内の免疫応答を調節するそれぞれ特有の機能を有することが明らかにされている。高IgE血症を呈するアトピー患者では、サプレッサーT細胞の機能低下²³⁾や、IgE抗体産生促進に働くヘルパーT細胞の存在²⁴⁾の報告があり、IgE産生調節にもT細胞が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし、今回の成績では、Dp2によるリンパ球増殖反応と血清Dp特異IgE抗体価あるいは特異IgG抗体価との間には有意な相関が認められず、in vitroでDp2に特異的な増殖反応を示すT細胞がin vivoでDp特異抗体産生の調節に関与しているという一義的な関係は見いだせなかった。他の細胞性免疫の関与した反応に関連があるのかもしれない。Rawleら⁶⁾もP1特異IgE抗体価とT細胞増殖反応に相関を見いだしておらず、Dp2と同様に培地由来アレルゲンについても、反応するT細胞のin vivoでの特異抗体産生への関与は明らかでないようである。このようにダニ抗原については、T細胞増殖反応と特異抗体産生の2つの免疫応答の間に解離が存在したが、スギ花粉症の場合はこの両者間に正の相関が報告されている。特異抗体産生調節にヘルパーT細胞が関与していることは十分に考えられるが、特異抗原に対して増殖するヘルパーT細胞が特異抗体産生や疾患の発症または病態にどのように働いているかは、今後in vitroでのIgE抗体産生系におけるT細胞の特異抗体産生調節作用についての検討を含め、今後の課題であろう。

生体の抗体産生はMHCに連鎖した抗原特異的な免疫応答遺伝子 (Ir-genes) や免疫抑制遺伝子 (Is-genes) により調節されていることが知られ²⁵⁾, IgE 抗体産生系も Ir-genes が存在し遺伝的調節機構に制御されることが明らかにされている²⁶⁾. ブタクサアレルギー²⁷⁾²⁸⁾やスギ花粉症患者の in vitro での IgE 抗体産生能²⁹⁾が特定の HLA と関連していることより, アレルギー疾患でも抗原に特異的な免疫応答が遺伝的に支配されると考えられている. ダニアレルギーと HLA の関連¹¹⁾¹²⁾は, これまでの報告では, 用いられたダニアレルゲンが粗抗原であり, また関連も確定されていない. そこで我々は, Dp2に高い特異 IgE 抗体価を示した患者について HLA class I 抗原の検討を行った. 血清 Dp 特異 IgE 抗体高値患者群には, HLA-A11, HLA-Bw61の増加をみたが有意ではなく, 特定の HLA class I 抗原との明らかな関連を見いだせなかった. 一方, Dp2特異的リンパ球増殖反応高応答群で HLA-Bw62が有意に増加していた. Fig. 10 に示したように血清 Dp2特異 IgE 抗体価と Dp2特異的リンパ球増殖反応には関連がみられず, この2つの反応は異なった免疫応答機構によると思われる. なお, HLA-Bw62は特定の class II 抗原との強い連鎖不平衡の関係ではなく Dp2特異的リンパ球増殖反応と Bw62は一義的な関連とも考えられるが, 疾患による特定の HLA ハプロタイプの存在も考えられ, 今後, class II 抗原との関連の検討をして確認する必要がある. また, Dp2特異的免疫応答における HLA 抗原の生物学的機能の解析は今後の課題であろう.

以上のように, Dp 虫体由来の主要アレルゲンに対する免疫応答の検討は, ヒトにおける IgE 抗体産生の免疫遺伝学的調節機構や, アレルギー疾患発症機構の解明に資するものと思われた.

結 語

気管支喘息患者を対象としてヤケヒョウヒダニ (Dp) 虫体由来抗原に対する in vivo および in vitro の免疫応答を調べ, HLA class I 抗原との関連について検討を加え, 以下の成績を得た.

- 1) Dp 虫体成分のゲルろ過により得た主要アレルゲン Dp2は, 分子量約15000であった.
- 2) Dp による気管支喘息患者血清中の特異 IgE 抗体は, Dp2を用いた吸収試験によってほぼ吸収された

ことより Dp2は Dp 虫体由来の主要アレルゲンと考えられた.

3) 患者群の Dp2特異 IgE および IgG 抗体陽性率はそれぞれ71.1%, 53.9%であり, 健康対照群の 0 %, 21.0%と有意差があった ($p<0.01$).

4) Dp2特異 IgE 抗体価と IgG 抗体価の頻度分布は明らかに異なり, 産生制御機構が異なると思われた.

5) Dp2に対するリンパ球増殖反応は, 高応答群と低応答群に分かれた. 患者群のみに高応答群がみられ, 対照群は全て低応答であった. 反応するリンパ球は, ヘルパーT細胞と考えられた.

6) 血清特異抗体価とリンパ球増殖反応との間には関連がみられなかった.

7) HLA class I 抗原との関連では, 血清 Dp2特異 IgE 抗体陽性者群には, 特定の HLA 抗原との有意な関連はみられなかった. 一方, リンパ球増殖反応陽性者群には, HLA-Bw62が増加していた ($p<0.05$).

8) Dp2に特異的に増殖反応を示すヘルパーT細胞は, 特異抗体産生の調節機構とは一義的な関係はなく, 異なった免疫応答機構に属する細胞と思われた.

本論文の要旨は, 第36回日本アレルギー学会総会 (1986年, 岐阜) において発表した.

文 献

- 1) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Honbrook, M.M.: Physico-chemical properties of human reaginic antibody IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* 97, 75-85, 1966.
- 2) Voorhorst, R., Spieksma-Boezeman, M.I. and Spieksma, F.Th.M.: Is a mite (*Dermatophagoides sp.*) the producer of the house-dust allergen? *Allerg. Asthma.* 10, 329-334, 1964.
- 3) Voorhorst, R., Spieksma, F.Th.M., Varekamp, H., Leupen, M.J. and Lyklema, A.W.: The house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and allergens it produces. Identity with the house-dust allergen. *J. Allergy* 39, 325-339, 1967.
- 4) Miyamoto, T., Ohshima, S., Ishizaki, T. and Sato, S.: Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961) and house dust as a causative

- antigen in brochial asthma. *J. Allergy* 42, 14-28, 1968.
- 5) Ishii, A., Shimomura, H., Hashiguchi, J. and Kabayama, Y.: Biochemical and allergenic properties of the house dust mite extract, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 37, 285-290, 1982.
 - 6) 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.
 - 7) Rawle, F.C., Mitchell, E.B. and Platts-Mills, T. A.E.: T cell responses to the major allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, antigen P1: Comparison of patients with asthma, atopic dermatitis, and perennial rhinitis. *J. Immunol.* 133, 195-201, 1984.
 - 8) Halvorson, R., Bosnes, V. and Thorsby, E.: T cell response to a *Dermatophagoides farinae* allergen preparation in allergics and healthy controls. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 80, 62-69, 1986.
 - 9) Blumenthal, M.N., Amos, D.B., Noreen, H., Mendell, N.R. and Yunis, E.J.: Genetic mapping of Ir locus in Man: Linkage to second locus of HL-A. *Science* 184, 1301-1303, 1974.
 - 10) Bazaral, M., Orgel, A.H. and Hamburger, R.N.: Genetics of IgE and allergy: Serum IgE levels in twins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 54, 288-304, 1974.
 - 11) Nakai, Y., Kano, T., Moriuchi, J., Wakisaka, A., Aizawa, M., Tsuneta, H., Togashi, K., Sakiyama, Y., Wagatsuma, Y. and Matsumoto, S.: Association between the MB system and asthma in Japanese. *Hum. Immunol.* 4, 265-270, 1982.
 - 12) Ishikawa, T. and Kitao, Y.: Genetic control of in vivo IgE antibody production specific to *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 77, 210-212, 1985.
 - 13) Miyamoto, J., Ishii, A. and Sasa, M.: A successful method for mass culture of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897). *Jpn. J. Exp. Med.* 45, 133-138, 1975.
 - 14) Cutts, J.H.: "Cell separation, methods in hematology." Academic Press, New York, p. 1438-1442, 1970.
 - 15) Laemli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
 - 16) 阿部達也, 石井 明, 吉岡明子: 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. *アレルギー* 34, 284-288, 1985.
 - 17) Julius, M.H., Simpson, E. and Herzen, L.A.: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3, 645-651, 1973.
 - 18) Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2844-2848, 1978.
 - 19) Staff, Research Resources Branch, National Institute of Allergy and Infectious Diseases: In Manual of Tissue Typing Technique, 1976, Bethesda, Md. 1976.
 - 20) Pepys, J., Chan, M. and Hargreave, F.E.: Mite and house-dust allergy. *Lancet* 1, 1270-1272, 1968.
 - 21) Lind, P. and Løwenstein, H.: Identification of allergens in *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body extract by crossed radioimmuno-electrophoresis with two different rabbit antibody pools. *Scand. J. Immunol.* 17, 263-273, 1983.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) Zimmerman, B., Underdown, B.J., Ellis, J. and James, O.: Cloned helper T cell for IgE: Characterization of T cells cloned from an atopic donor with high serum IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77, 70-79, 1986.
 - 25) Benacerraf, B. and McDevitt, H.O.: Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 175, 273-279, 1972.
 - 26) Vaz, N.M. and Levine, B.B.: Immune responses of inbred mice to repeated low dose of antigen: Relationship to histocompatibility (H-2) type. *Science* 168, 852-854, 1970.
 - 27) Marsh, D.G., Hsu, S.H., Roebber, M., Ehrlich-Kautzky, E., Freidhoff, L.R., Meyers, D.A., Pollard, M.K. and Bias, W.B.: HLA-Dw2: A genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5 I. Response resulting primarily from natural antigenic

- exposure. *J. Exp. Med.* 155, 1439-1451, 1982.
- 28) Levine, B.B. and Stember, R.H.: Ragweed hay fever: Genetic control and linkage to HL-A haplotypes. *Science* 173, 1201-1203, 1972.
- 29) Matsushita, S., Muto, M., Suemura, M., Saito,

Y. and Sasazuki, T.: HLA-linked nonresponsiveness to *Cryptomeria Japonica* pollen antigen. I. Nonresponsiveness is mediated by antigen-specific suppressor T cell. *J. Immunol.* 138, 109-115, 1987.

THE IMMUNE RESPONSE SPECIFIC TO *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* BODY ANTIGEN IN ASTHMATICS

Hitoshi Matsuoka, Hisamitsu Uno, Kiyohide Kawano and Kazunori Tsuda
Second Department of Internal Medicine, Miyazaki Medical College

Haruo Chisaka
Chisaka Pediatrics Clinic

Akira Ishii
Department of Parasitology, Okayama University School of Medicine

The immune responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) were studied to elucidate the immunological mechanism involved in the pathogenesis of mite related bronchial asthma. The allergenic fraction Dp2 was isolated from Dp body, and its molecular weight was estimated as approximately 15,000. Dp specific IgE in pooled sera from Dp-related asthmatics was almost completely absorbed with Dp2, indicating that Dp2 was a major allergen of Dp body. The positive ratios of Dp2 specific IgE and IgG antibodies were 71.1% and 53.9% in the sera from asthmatics, and 0% and 21.0% in the sera from non-asthmatics, respectively. The frequency distributions of specific IgE antibody titers were different from those of specific IgG titers in asthmatics and non-asthmatics, suggesting that production of specific IgE and IgG antibodies might be controlled by separate mechanisms. High response of Dp2-induced peripheral blood lymphocyte proliferation was observed only in asthmatics. The lymphocytes responding to Dp2 were CD4 positive cells, and this response was specific to Dp2. The stimulation index of Dp2-induced lymphocyte proliferative response did not correlate with the values of serum specific IgE or IgG antibody titers in asthmatics. The frequencies of HLA-A11 and HLA-Bw61 in asthmatics with high specific IgE titers were slightly increased compared with those in non-asthmatics. The frequency of HLA-Bw62 in asthmatics with high lymphocyte response was significantly increased compared with that in non-asthmatics ($p < 0.05$). The production of Dp2-specific IgE antibody in vivo seemed to be controlled by different T-cell subsets which proliferated to Dp2 in vitro, since there was no correlation between the titer of Dp2 specific IgE in the sera and the grade of lymphocyte proliferation in vitro, and furthermore no concordance of the associated HLA class I antigens between them.