

〔原 著〕

コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) の

非免疫学的活性に関する検討

第1報 非免疫動物における皮内反応

群馬大学医学部小児科学教室

徳山研一

田村 宏

森川昭広

三橋将人

済生会前橋病院小児科

田沢昌道

Key words: *Dermatophagoides farinae* — house dust mite — increased vascular permeability — intracutaneous test — nonimmunological activity

(受付: 1月12日, 1985)

緒 言

コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* (以下 Df) は諸外国と同様, 我国においてもアレルギー性疾患における major allergen であることは周知の事実である¹⁾²⁾. したがって, Df の抗原性及び臨床診断法に関する報告は多い. しかし, Df の抗原解析や臨床診断にはなお多くの問題が未解決のまま残されている. 例えば, Df のアレルギー診断法のうち皮内反応は, 時にその閾値の結果から特異減感作療法の初期治療量が決定されることもあり³⁾, 重要な検査法であるが, 皮内反応は一般に prick test などに比べ RAST との陽性一致率は低い⁴⁻⁷⁾. その原因の1つとして, 皮内反応では, 特にその投与濃度が高い程, 非免疫学的反応の関与が増大するためとの報告もある⁴⁾. それ故, Df のアレルギー性疾患に占める臨床的重要性を考える際, 一つには精製抗原—活性分画—を決定するか, 止むを得ず粗抗原を用いて検討する場合には非免疫学的皮膚反応活性物質の混在に十分な注意を払うことが診断や, 治療上重要となる. しかしながら現在まで, Df のアレルギー活性に関する報告は数多いが, 非免疫学的活性に関する報告は皆無に等しい.

今回我々は Df の非免疫学的活性を非免疫動物で皮内反応を実施することにより検討した. すなわち, Df

抽出物をゲル濾過にて分画し, それぞれの分画の皮内反応活性を, 非免疫学的側面から比較, 検討したので報告する.

方 法

1. Df80d の抽出及び分画化; Mao らの方法⁸⁾に従った. すなわち Df 虫体2g を borate buffer, pH 8.5 を加えながら carborandum とともに乳鉢ですり潰し, 50000×g, 30分遠沈し, 水溶性画分を得た. 得られた上清 (Df 粗抗原) に acetone を50%となるまで加えたのちに同様の遠沈操作を行った. 沈殿物を除去し, 残った上清に更に acetone を80%の濃度まで加えた. 同様の遠沈操作後, 上清は捨て, 沈殿物を空气中に放置, 乾燥させたのち蒸留水中に再溶解した (Df80d). Df80d は更に Sephadex G-100 (Pharmacia, 2.6×72 cm, 流速20ml/hr) にて蒸留水を用いてゲル濾過し, 分画した. 得られた各分画は Immersible CX-10 (Millipore) にて濃縮後, 蛋白量を Lowry 法にて測定し, -20℃にて使用まで保存した. 使用前, Millex-GS (Millipore) にて濾過滅菌した.

2. 実験動物; 非免疫雌モルモット (Hartley 系) 及び雌ラット (Wister 系) を使用した (今井実験動物飼育場). 加齢による変化を検討するため, 両動物とも生後約2-3週 (モルモット体重200g, ラット体重50g), 6-7週 (モルモット同300g, ラット同250g), 12-15週

Abbreviations: Df *Dermatophagoides farinae*;
Fr fraction; RAST radioallergosorbent test

(モルモット同450-500g, ラット同400g) の3群に分け検討した。

3. 皮内反応：アレルゲン物質中の非免疫学的活性を評価する目的で、英国の National Institute for Biological Standard and Control により開発された手法⁹⁾を用いた。すなわち、非免疫動物の背部を電気バリカンにて散髪したのち0.3% Evans blue, 1mlを静注した。その直後に各分画の50 μ lを最低1.5cmの間隔を置いて背部に皮内注射した。positive controlとしては同量の histamine 溶液 (histamindihydrochlorid, Merck) をモルモットでは100 μ g/ml, ラットでは10mg/mlの濃度に調整し、注射した。等量の生食を negative controlとした。皮内投与20分後に両動物とも ether にて殺し、背部皮膚を剥離し、色素の流出を観察した。径8mm以上の色素の流出を見た場合を陽性と判定した。また Df80d の分画に対する閾値は同分画の2倍希釈系列による皮内反応を行い、陽性と判定された最大希釈濃度とした。

4. 皮内反応に及ぼす抗ヒスタミン剤 (以下抗ヒ剤) 前投与の影響：抗ヒ剤は clemastine calcium (興和新薬) を用いた。皮内反応開始1時間前に実験動物に同剤 (4mg/ml) を1ml 腹腔内投与した。対照動物としては等量の生食を腹腔内投与したものを用いた。抗ヒ剤の前投与により histamine 投与による反応が認められないことを確認してから皮内反応の結果を判定した。

結 果

1. Df80d の分画化 (Fig. 1)：Df80d を Sephadex G-100によりゲル濾過した結果を Fig. 1に示した。このうち皮内反応には Fr v (void volume に一致して溶出された最初の分画), Fr I (分子量約25000から45000で、ヒトにおいて最もアレルゲン活性が高いと報告されている^{10,11)}分画で Mao らの報告⁹⁾に従い命名した), Fr II (分子量約15000以下の分画で同様に Mao らの報告に従い命名した) を用いた。

2. 皮内反応

1) 3分画の皮内反応陽性率：上述の3分画 (いずれも蛋白濃度1 μ g/0.05ml) を用いた皮内反応の結果を (Table) に示した。すなわち Fr v, Fr I, Fr II に対する皮内反応陽性率は、モルモットでは順に78.3%, 50%, 17.6%であった。またラットでは順に100%, 23.0%, 15.4%であった。両動物ともに Fr v に対する

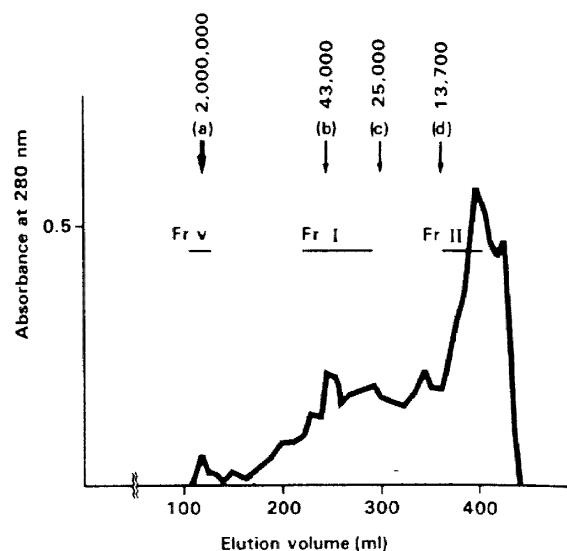


Fig. 1. Gel filtration pattern of Df80d on Sephadex G-100. Arrows indicate molecular weight. Blue dextran, ovalbumin, chymotrypsinogen A and ribonuclease A were expressed as (a), (b), (c) and (d), respectively.

Table Incidence of positive skin reaction to each Df80d fraction

	Positive number (%)		
	Fr v	Fr I	Fr II
Guinea pigs	18/23 (78.3)	11/22 (50.0)	3/17 (17.6)
Rats	17/17 (100)	3/13 (23.0)	2/13 (15.4)

1 μ g/ml of each fraction was injected intradermally.

陽性率は他の2分画に比べて高く、特にラットでは全例陽性であった。

2) Fr v に対する閾値 (Fig. 2-a and 3)：Fr v に対する幾何学的平均閾値はモルモットで0.337 μ g/ml, ラットでは3.91 μ g/mlであった。また閾値を年齢別に比較すると、ラットでは加齢による変化は認められず、モルモットでは加齢により反応性が低下した ($p < 0.05$)。

3) Fr v の皮内反応に及ぼす抗ヒ剤の影響 (Fig. 2 b)：生後6-7週のモルモット及びラットを用いて抗ヒ剤投与群及び無投与群の Fr v に対する閾値を比較した。無投与群のモルモット及びラットの幾何学的平均閾値はそれぞれ、0.83 μ g/ml, 2.97 μ g/mlであったが、前投与群では両動物とも全例1 μ g/0.05mlの濃度の Fr v に対する皮内反応は陰性で、抗ヒ剤前投与により有意に抑制された ($p < 0.001$)。

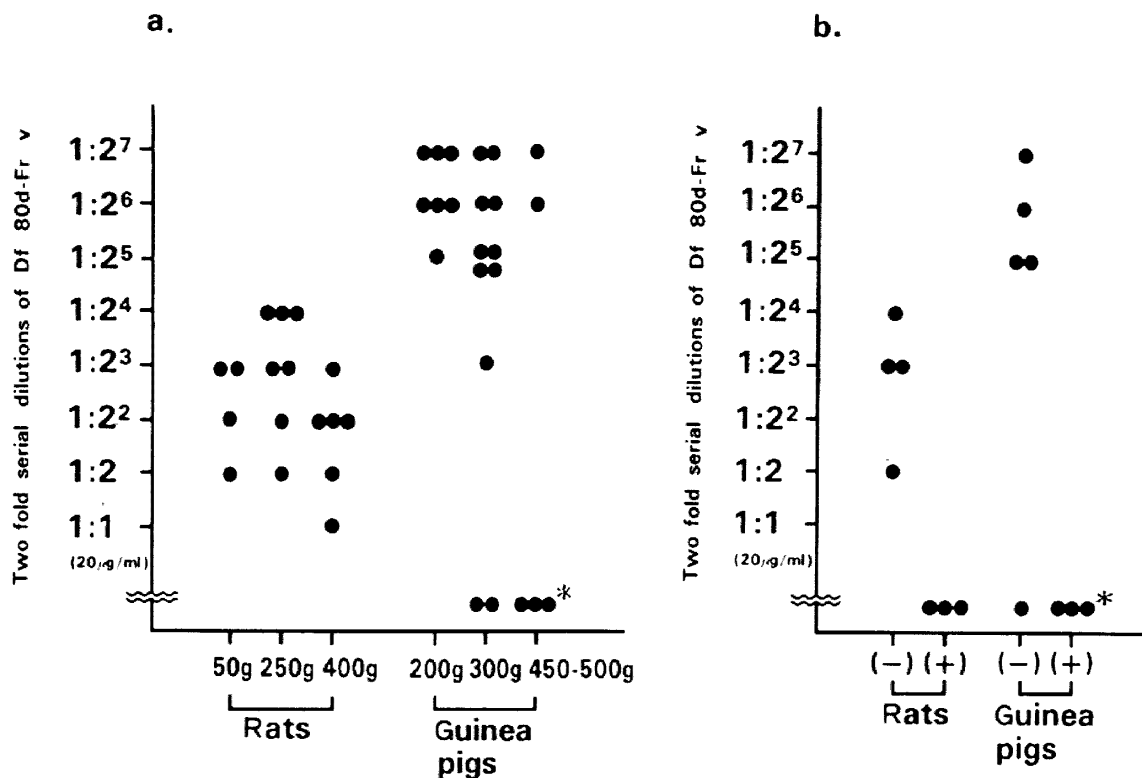


Fig. 2. End points of IC test to Fr v, and its inhibition by antihistamine. *Shows skin test-negative animal. a. End points of IC test to Fr v in nonimmunized animals. b. Inhibitory effect of antihistamine on IC test to Fr v. (-) indicates animals without pretreatment and (+) indicates animals pretreated with antihistamine.

考 察

非免疫モルモット及びラットともに Fr v に対する皮内反応陽性率は著しく高いことが今回の我々の実験で判明した。また Fr v による皮内反応陽性の機序としては、natural sensitization などの免疫・アレルギー学的な反応も現時点では完全には否定はできない。しかしながら以下の理由から非免疫学的機序による反応であると推定した。すなわち、1) 一般に可溶性抗原で感作されにくいとされる¹²⁾ラットにおいて、Fr v に対する皮内反応が全例陽性であったこと、2) 同様に、ラットの Fr v に対する皮内反応は陽性率、閾値ともに加齢による影響を受けていないこと、の2点である。これらの点は免疫・アレルギー学的には説明し難いと思われる。これに対し、今回の実験で同様にその皮内反応活性を検討した Fr I においても、モルモットでは50%と比較的高い陽性率が得られた。しかしながら、Fr v とは対照的に、感作されにくいとされるラットではその陽性率が著減している。また既に Romagnani, Nakagawa らなどによりヒトにおいては、この分画は最

もアレルギー活性が高いことが明らかとなっている¹¹⁾。以上を考えあわせると、Fr I に対するモルモットの高い皮膚反応陽性率は、natural sensitization などの免疫学的反応の関与を否定できないと思われる。一方、Fr v に対する皮内反応は抗ヒ剤にて阻止されたことから、この反応に histamine が何らかの形で関与していることが示唆された。例えば、Fr v 中に mast cell を非免疫学的に刺激して histamine などの chemical mediator を遊離させる物質が含まれる可能性、あるいは Fr v 中に histamine 類似物質が含まれ、直接血管壁に作用し、血管透過性を亢進させる可能性などである。しかしながら、その詳細は不明であり、作用機序に関しては現在検討中である。

一方、我々はヒト、特にアレルギー素因がなく、Fr v に対する特異 IgE 抗体の証明されない9名の正常人において Fr v による皮内反応を行った。その結果、全例が10⁻⁶の濃度の Fr v に対して皮内反応陽性であった(投稿中)。このことから、Fr v はヒトにおいても同様の活性を有することが示唆されている。ところで、我々は市販 Df アレルゲン(鳥居薬品)lg を Mao らの

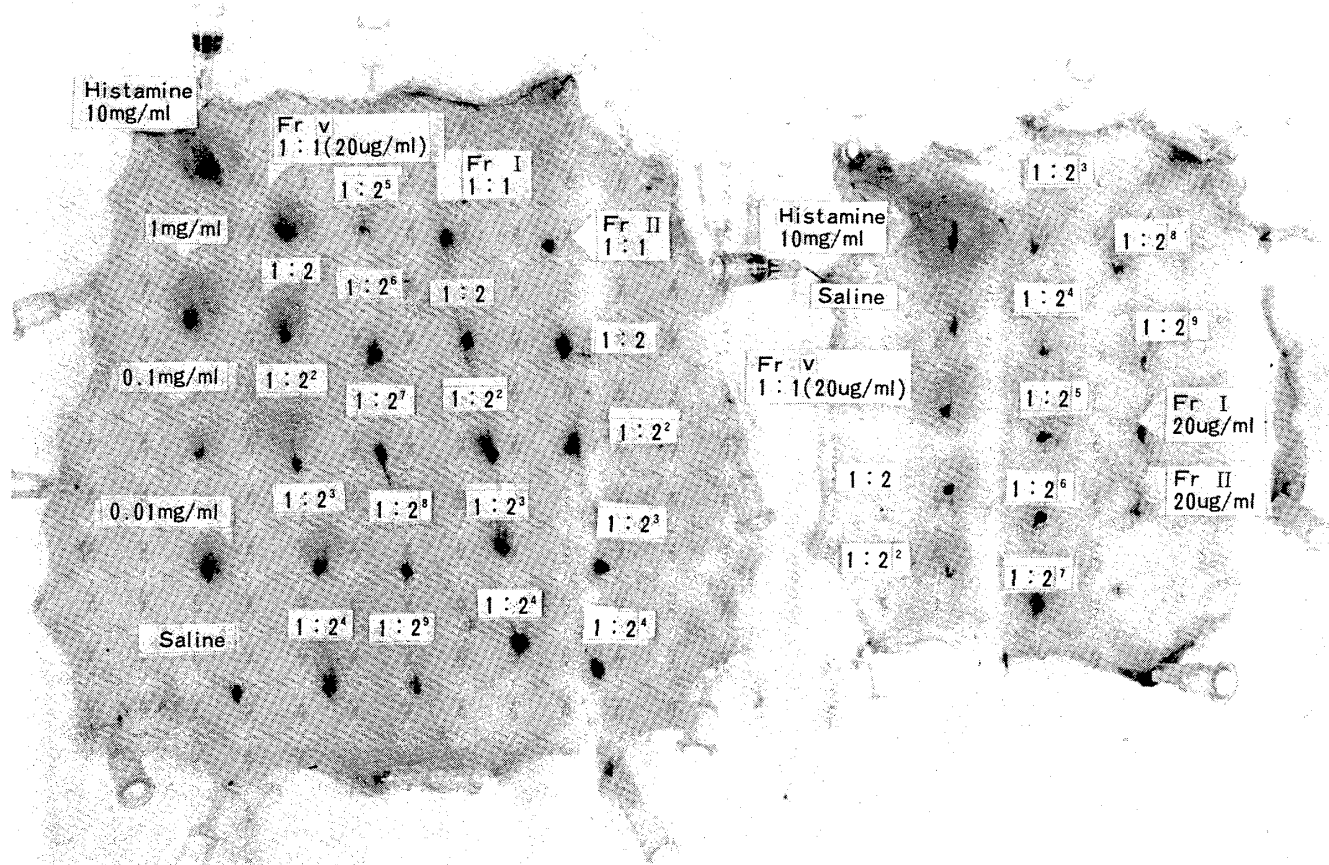


Fig. 3. IC test to each Df80d fraction in rats. Extravasation of Evans blue dye was observed by the injection with 10mg/ml and 1mg/ml of histamine and 20 μ g/ml, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml and 2.5 μ g/ml of Fr v in a rat weighing about 250grams (left), and 10mg/ml of histamine, 20 μ g/ml, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml and 2.5 μ g/ml of Fr v in a rat weighing about 50grams (right). In Fr I, II and saline, no extravasation was observed.

報告に従い抽出したところ、蛋白量として約200mgがDf80dとして抽出された。

また、今回の実験に用いたFr vはMaoらの抽出方法による粗抗原より得られたものであり、粗抗原約600mgから約2mgの同分画が抽出された。すなわちMaoらの方法によるDf粗抗原中に、Fr vは最低約0.3%含まれていることになる。しかしながら、現実の問題として、この分画がどの程度市販アレルギーによる皮内反応に影響を及ぼすか、という点に関しては、今後更に慎重な検討が必要と思われる。

いずれにせよ、今回の実験結果からは、Df粗抗原中には、非免疫学的機序により血管透過性を亢進させる、比較的高分子の活性物質が存在する可能性が示唆された。

本論文の要旨は第34回日本アレルギー学会総会（1984年、京都）にて発表した。

Df虫体を提供して下さいました鳥居薬品株式会社佐藤重雄博士、並びに本研究を終始手伝って下さった当教室の遠藤知子さんに心から感謝いたします。

最後に御指導、御校閲を賜りました黒梅恭芳教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Romagnani, S., Biliotti, G., Passalva, A. and Ricci, M.: Mites and house dust allergy. II. Relationship between house dust and mite (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*) allergens by fractionation methods. *Clin. Allergy* 2, 115-123, 1972.

- 2) Miyamoto, T., Oshima, S. and Ishizaki, T.: Antigenic relation between house dust and a dust mite, *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, by a fractionation method. *J. Allergy* 44, 282-291, 1969.
- 3) Berman, B.A. and Bierman, C.W.: Injection therapy. In "Allergic Diseases of Infancy, Childhood, and Adolescence" (ed. by C.W. Bierman and D.S. Pearlman). W.B. Saunders, Philadelphia, p. 333-333, 1980.
- 4) Reddy, P.M., Nagaya, H., Pascual, H.C., Lee, S. K., Gupta, S., Lauridsen, J.I. and Jerome, D.C.: Reappraisal of intracutaneous test in the diagnosis of reaginic allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 61, 36-41, 1978.
- 5) Perera, M.G., Bernstein, I.L., Michael, J.G. and Johansson, S.G.O.: Predictability of the radioallergosorbent test (RAST) in ragweed pollinosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 111, 605-610, 1975.
- 6) Brown, W.G., Halonen, M.J., Kaltenborn, W.T. and Barbee, R.A.: The relationship of respiratory allergy, skin test reactivity and serum IgE in a community population sample. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 328-335, 1979.
- 7) Stenius, G., Wide, L., Seymour, W., Holford-Sbievens, V. and Pepys, J.: Clinical significance of specific IgE to common allergens. *Clin. Allergy* 1, 37-55, 1971.
- 8) Mao, J.L., Dandeu, J.P., Rabillon, J., Lux, M. and David, B.: Antigens and allergens in *Dermatophagoides farinae* mite. I. Immunochemical and physicochemical study of two allergenic fractions from a partially-purified *Dermatophagoides farinae* mite extract. *Immunology* 44, 239-247, 1981.
- 9) NIBSC: Standard methods used at NIBSC for control of allergen extracts. NIBSC. London, 1977.
- 10) Nakagawa, T., Kudo, K., Okudaira, H., Miyamoto, T. and Horiuchi, Y.: Characterization of the allergenic components of the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 55, 47-53, 1977.
- 11) Mao, J.L., 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 pteronyssinus* mite cultures. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 588-596, 1983.
- 12) Lipton, M.M., Stone, S.H. and Freund, J.: Systemic and local anaphylaxis in the albino rat. *J. Immunol.* 77, 453-461, 1956.

NONIMMUNOLOGICAL ACTIVITIES OF THE HOUSE DUST MITE, *DERMATOPHAGOIDES FARINAE*

I. Intracutaneous Test in Nonimmunized Animals

Kenichi Tokuyama, Hiroshi Tamura, Akihiro Morikawa and
Masato Mitsuhashi
Department of Pediatrics, Gunma University School of Medicine
Masamichi Tazawa
Department of Pediatrics, Saiseikai Maebashi Hospital

In order to assess the nonimmunological activities of Df extract, three fractions from Df 80d (Mao et al, 1981) were applied to the intracutaneous (IC) test in nonimmunized animals (Wister rats and Hartley guinea pigs). The method proposed by the National Institute for Biological Standard and Control (London, 1977) was used for the IC test. Three fractions of Df 80d on Sephadex G-100 named Fr v (eluted at void volume), Fr I (about 25-45 K dalton) and Fr II (less than 15 K dalton) were applied to the IC test.

The following results were obtained;

1. Fr v was most active fraction in the IC test at a concentration of 1 μ g/0.05 ml. That is, a positive skin reaction was observed in 100% of the rats and 78.3% of the guinea pigs, respectively.
2. In rats, age made no difference in either the incidence of positivity or the geometrical mean values of end points of the IC test to Fr v. As far as we know, rats can not be easily sensitized with soluble antigens.
3. Skin reaction to Fr v was inhibited by antihistamine ($p < 0.001$).

These data reveal that the skin of experimental animals is highly sensitive to a high molecular weight fraction from crude Df extracts through the nonimmunological pathway.