

コナヒョウヒダニ Der I アレルゲンの 飼育培地中における蓄積とその安定性の評価

Accumulation of Group I Mite Allergen in the Cultured Medium of
Dermatophagoides farinae Hughes (Acari : Pyroglyphidae) and Stability of the Allergenicity

橋本知幸*、吉村結子*

Tomoyuki HASHIMOTO* and Yūko YOSHIMURA*

【要約】 ダニアレルゲンの活性低下に及ぼす要因を検討し、以下の結果を得た。

- 1) コナヒョウヒダニの繁殖とそのアレルゲン蓄積の関係を、繁殖培地を用いて調査した結果、Der I アレルゲン量は、生ダニ密度よりもやや遅れてピークに達し、その後の減少はほとんど認められなかった。この結果から、ダニアレルゲンは除去されない限り、蓄積し続け、生ダニ密度が同じでも Der I 量は大きく異なることが明らかになった。
- 2) 屋内塵中の Der I も、通常の屋内保存状態では、ほとんど変性しないことが示唆された。
- 3) タンニン酸水溶液 (>0.4%) を、マイクロプレートに固相したコナヒョウヒダニ粗抗原に直接曝露すると、抗原変性と見られる現象が認められ、タンニン酸が Der I のアレルゲン性を低減する効果を有することが示唆された。
- 4) 80°C の湿熱処理でも Der I のアレルゲン性はほとんど低下せず、80°C までの熱処理に対しては、Der I は変性しにくいことが認められた。

キーワード：コナヒョウヒダニ、屋内塵、ダニアレルゲン、ELISA、タンニン酸

1. 研究目的

喘息やアトピー性皮膚炎の主要な誘発原因物質となるダニアレルゲン^{1), 2)}は、屋内塵中に常在するチリダニ科ヒョウヒダニ属のダニ類によって産生され、その密度と概ね相関することが知られている³⁾。特に、ヒョウヒダニ類の糞中に多く排泄されるグループ1アレルゲン(以下、Der I)量については、屋内塵1g当たり2μgで喘息感作、10μgで発作誘発という、ダニ汚染の基準値が提唱されている²⁾。このダニ汚染基準値は、屋内塵1g当たりのダニ数にも換算され、前者が100匹/g、後者が500匹/gとされている。

しかし、このダニ数換算値は、ダニの生死が考慮されておらず、屋内塵中のヒョウヒダニ類の生息密度(以下、生ダニ密度)を反映したものではない。アレルゲン産生量に関しても、卵から成虫までの各発育ステージとの関係、生死との関係、ヒョウヒダニ類発生活消長との関係等、未知の部分

が多いまま、ダニ数とダニアレルゲン量の関係が論じられることが多いように思われる。

Der I は *in vitro* では熱や pH 変化に対して、構造的に不安定とされるが⁴⁾、実居住環境中での安定性については具体的な報告が見られない。仮に、ダニアレルゲンが、居住環境中で安定であり、長期間、アレルゲン性を維持する場合には、屋内塵中の生ダニ密度と相関しないアレルゲン量を示すことが予想される。

こうしたことから本研究では、コナヒョウヒダニ飼育培地中での生ダニ密度の変化と、それに伴って蓄積するアレルゲン量との関係と、屋内塵中でのダニアレルゲンの安定性について調査した。加えて、熱処理やタンパク変性剤であるタンニン酸処理のダニアレルゲンに対する影響についても検討を行ったので報告する。

* 財団法人日本環境衛生センター 東日本支局環境生物部
Dept. of Environmental biology, East Branch, JESC

2. 材料および方法

2.1 コナヒョウヒダニ飼育培地中における生ダニ密度とアレルゲン量の測定

水分含量 12% (W/W) のダニ飼育用粉末飼料 (MF、オリエンタル酵母社製) 98 g に、コナヒョウヒダニ (東京女子医大コロニー) の繁殖培地 2g を混和し、それを 25°C、70~80%RH に調節した密閉容器内に保存することにより、供試ダニを低密度から飼育した。混和後、ほぼ毎週 1 回、培地を十分に攪拌して、その 50mg を取り、生ダニ数を実体顕微鏡下でカウントした。培地中の生ダニが多い場合には、ブランク培地で適宜希釈して観察を行った。観察は毎回 3 連とし、2 回反復した。

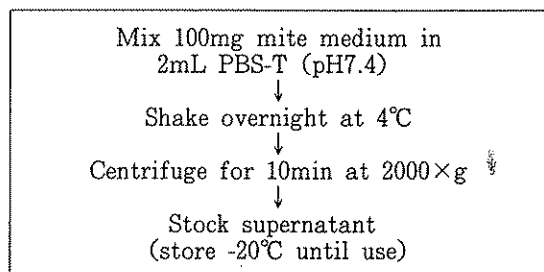


Fig. 1 Mite allergen extraction.

また、別途 100mg の培地を毎回同時に回収し、-20°C でダニを殺滅した後、アレルゲン抽出を図-1 の通りに行い、その中の Der I 量を、抗コナヒョウヒダニマウスモノクローナル抗体による測定キット (1 次抗体: 6A8、2 次抗体: 4C1; いずれも Indoor 社製; 英) を用いて、手順書に従って、サンドイッチ ELISA 法により測定した。すべてのサンプルの測定は同時に、2 連で行った。

2.2 居室内の屋内塵中ダニアレルゲンの安定性調査

実際の居室内より電気掃除機で採取した屋内塵を、200 メッシュで篩過し、微細塵を 100mg ずつ、φ2.6cm×6cmD の試験管 4 本に入れた。試験管は蓋をせず、うち 3 本は元の屋内環境下 (直射日光が 1 日数時間当たる窓辺; 温度 25-38°C、相対湿度 70%以上) で、2000 年 8 月 18 日よりそれぞれ 2 週間、4 週間および 8 週間保存し、期間終了後は -20°C で保存した。残りの 1 本は対照区として試験開始時に -20°C に保存した。その後、すべてのサンプル微細塵中の Der I 量をサンドイッチ ELISA 法により、同時に 2 連で測定し、対照区に対する Der I アレルゲン量に対する割合を算出し、残存性を評価した。

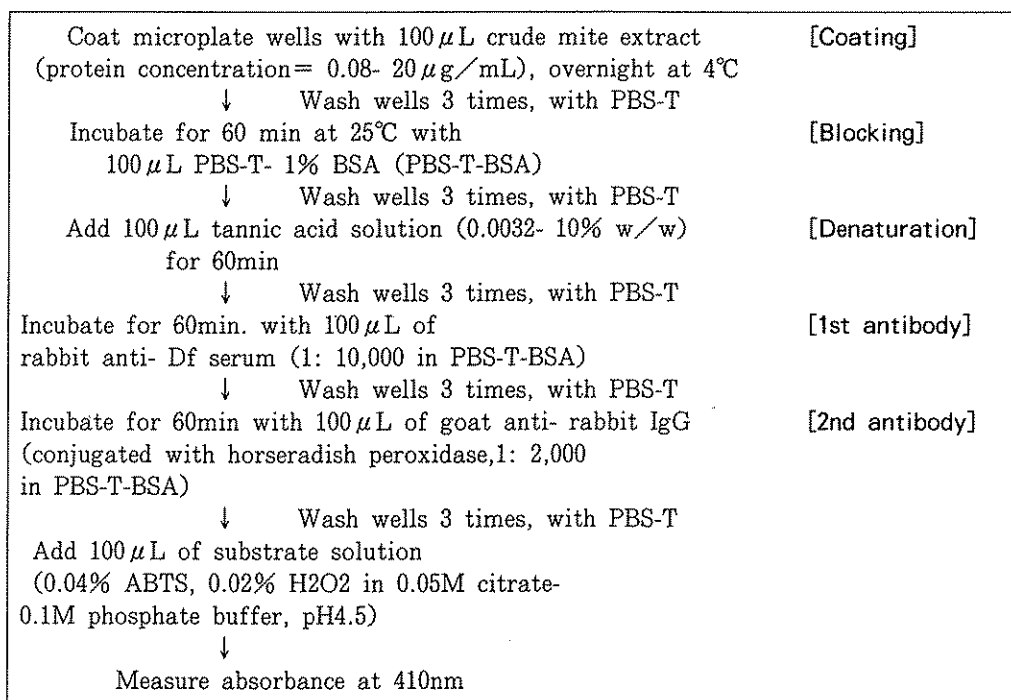


Fig. 2 ELISA protocol for tannic acid denaturation.

2.3 コナヒョウヒダニ粗抗原に対するタンニン酸処理の影響

飼育培地上から多数這い出たコナヒョウヒダニを筆先で採集し、40mg/mLの割合で0.05% Tween20-リン酸緩衝液(以下、PBS-T)に混和し、氷水中でテフロン-ガラスホモジナイザーにより破碎懸濁した。懸濁液を10000×gで30分間遠沈し、その上清を粗抗原抽出液とした。粗抗原中のタンパク濃度はCoomassie protein reagent (Pierce社製;米)で定量し、使用までは-20°Cで保存した。

次に、タンニン酸が抗体に作用せず、粗抗原にのみ作用するように、図-2のような測定系に従って、種々の濃度の粗抗原にタンニン酸水溶液を曝露し、その影響を評価した。

対照区としてタンニン酸0%区を設け、いくつかの粗抗原濃度による標準曲線を描き、タンニン酸処理区の吸光度から粗抗原の残存割合を算出した。測定は2連で行った。なお、抗コナヒョウヒダニウサギ血清は自治医科大学医動物学教室より分与されたもので、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギヤギIgGはBio rad社製(米)、タンニン酸は関東化学製を使用した。

2.4 Der I に対する加熱処理の影響

-20°Cで凍結殺滅したコナヒョウヒダニの繁殖

培地100mgをガラスシャーレに薄く伸ばし、所定温度に設定したオープン内に所定時間静置して乾熱処理した。また、所定温度に加熱したPBS-Tに混和する湿熱処理も行った。処理温度は40、60、80°Cとし、加熱時間は、乾熱処理の場合には、各温度ごとに、10、60、360分とし、湿熱処理では加熱したPBS-Tが室温で自然冷却するまでとした。各培地中のDer I量をサンドイッチELISA法により測定し、無処理対照区に対するDer I残存率を算出し、ダニアレルギーに対する加熱の影響を評価した。

3. 結果および考察

3.1 コナヒョウヒダニ生ダニ密度とアレルギー量の関係

コナヒョウヒダニ培地における生ダニ密度とDer I蓄積の推移を図-3に示す。

生ダニ数は、初期密度200匹/gであったのが、混和10週後に44900匹/gの最高値に達し、混和直後の225倍になった。しかし、それ以降は徐々に減少し、19週後には260匹/gと、実験開始時に近い密度となった。

コナヒョウヒダニの好適繁殖条件に関しては、エビオスと煮干の混合培地による実験⁹⁾が知られている。それによると、最高密度は11400匹/g

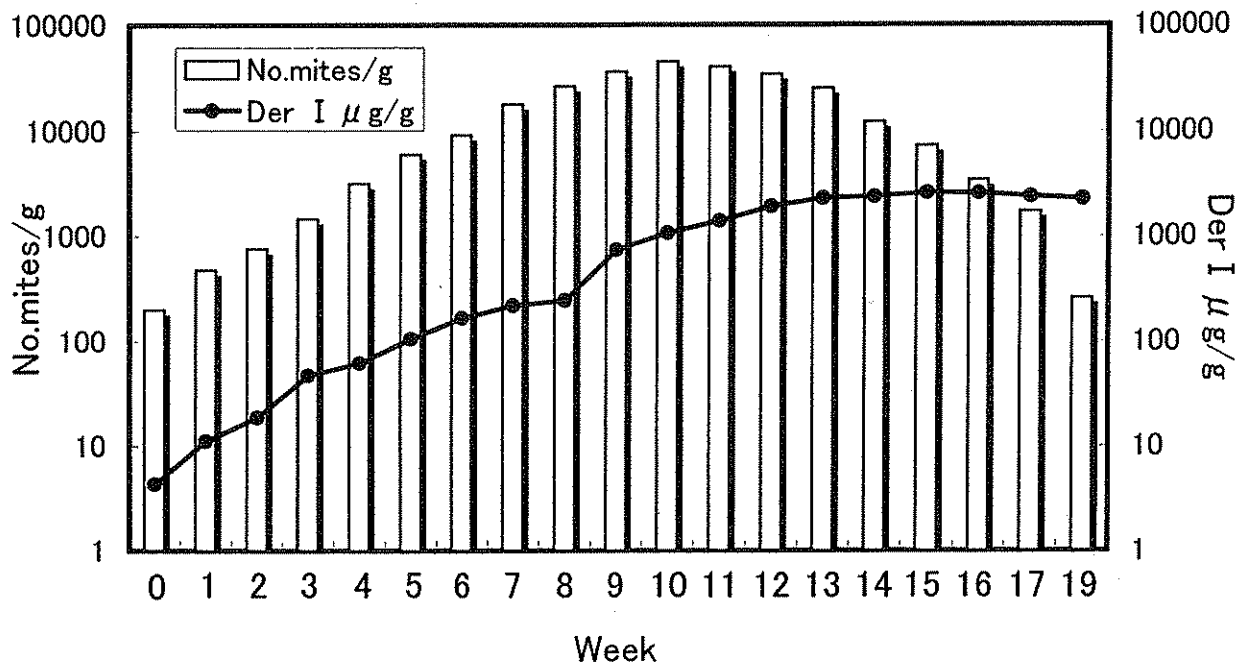


Fig. 3 Changes of mite population and allergen in the medium of *Dermatophagoides farinae*.

で、その出現も混和 23 週後で、31 週を経過してもその約 1/5 の密度を保っていたことが報告されている。この最高密度値は本実験結果よりもはるかに低く、出現時期や減少速度も大きく異なった。温湿度条件がほぼ類似していることから、この違いは飼育培地の差に起因すると考えられる。

一方、Der I は、混和直後に $4.34 \mu\text{g}/\text{g}$ であったのが、混和 15 週後に最高値 $2590 \mu\text{g}/\text{g}$ (混和直後の 598 倍) となった。16 週以降は若干の減少が見られたものの、生ダニ数ほど急激な減少ではなく、ほとんど横ばいで推移し、以後 19 週後までアレルゲン量の明らかな減少は見られなかった。なお、生ダニ初期密度と Der I 量の関係から、Der I $1 \mu\text{g}$ 当たりのダニ数を算出すると、 $46.1 \text{匹}/\mu\text{g}$ と、ダニ汚染の基準値から算出される $50 \text{匹}/\mu\text{g}$ とほぼ同等な値が得られた。生ダニのみでダニ死骸のほとんどない調整直後の飼育培地で測定する場合には、基準値との適合性は高いように思われた。

以上の結果から、繁殖培地中の生ダニ数は、増加の後、徐々に減少するが、それまでに産生された Der I は除去されない限り、培地中に蓄積し続け、変性や分解などで減少することはほとんどないと考えられた。同じ生ダニ密度を示す部屋であっても、蓄積している Der I アレルゲン量が大きく異なる可能性のあることが示唆された。

3.2 屋内塵中ダニアレルゲンの安定性

各保存期間における屋内塵中の Der I 量を表-1 に示す。供試した微細塵はコナヒョウヒダニが優占している家屋の屋内塵から分離後、試験管に入れて室内保存したものである。保存期間中、肉眼的にはカビや昆虫、ダニ類の発生は認められなかった。

Table 1 Quantity of Der I in house dust kept under room condition for 2-8 weeks.

Stock period(weeks)	Der I ($\mu\text{g}/\text{g}$)
2	10.10
4	7.03
8	10.07
Control	9.92

各保存期間における Der I 量を比較すると、4 週区の値が対照区と比較して、やや低い値であったが、8 週区は対照区と近似した値であったことから、総合的に判断して、この保存期間中の Der I の分解や変性はほとんどなかったと判断された。屋内塵中のダニアレルゲンを変性させる要因として、温湿度、光などの物理化学的要因や、昆虫、ダニ等による消化や腐敗などの生物学的要因があり、実験を行った夏季は、アレルゲン性を維持するには一年中でもっとも過酷な時期であったと考えられたが、今回の保存条件では明らかな影響は認められず、一定値を示しており、屋内塵中のアレルゲンは居住環境条件では安定性の高いことが示唆された。

なお、本実験は微細塵中のアレルゲン量を測定しており、サンプル中からダニ虫体は検出されなかった。このことは、ダニ個体の生死に拘わらず、採取した屋内塵の篩い分け処理が、アレルゲン量の評価やダニ数との相関性に大きく影響することを示唆している。

3.3 コナヒョウヒダニ粗抗原に対するタンニン酸処理の影響

コナヒョウヒダニ粗抗原に、種々の濃度のタンニン酸水溶液を反応させたときの、吸光度の変化を図-4 に、対照区吸光度の標準曲線をもとにタンニン酸処理区の粗抗原の残存率に換算した値を表-2 に示す。

対照区吸光度は、粗抗原固相濃度に依存して $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のとき、もっとも大きくなったが、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ では若干低下した。タンニン酸処理区ではタンニン酸処理後の PBS-T 洗浄の過程で白濁を生じ、この過程で、固相化されたダニ抗原やブロックしている牛血清アルブミン (BSA) の一部がタンニン酸と共に除去されていると思われた。吸光度の低下はタンニン酸濃度 0.4% (w/w) 以上から顕著で、固相濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で比較すると、0.4、2、10% 区では対照区に対して粗抗原量はそれぞれ、24.1、10.4、11.0% まで減少し、ダニアレルゲン低減効果が認められた。しかし、固相濃度やタンニン酸濃度が低いと効果は低下し、粗抗原濃度 $0.08 \mu\text{g}/\text{mL}$ ではタンニン酸 0.4% 区でも、95.0% までしか粗抗原量は減少しなかった。

タンニン酸のタンパク変性効果は広く知られており、この性質を利用してダニアレルゲン低減効

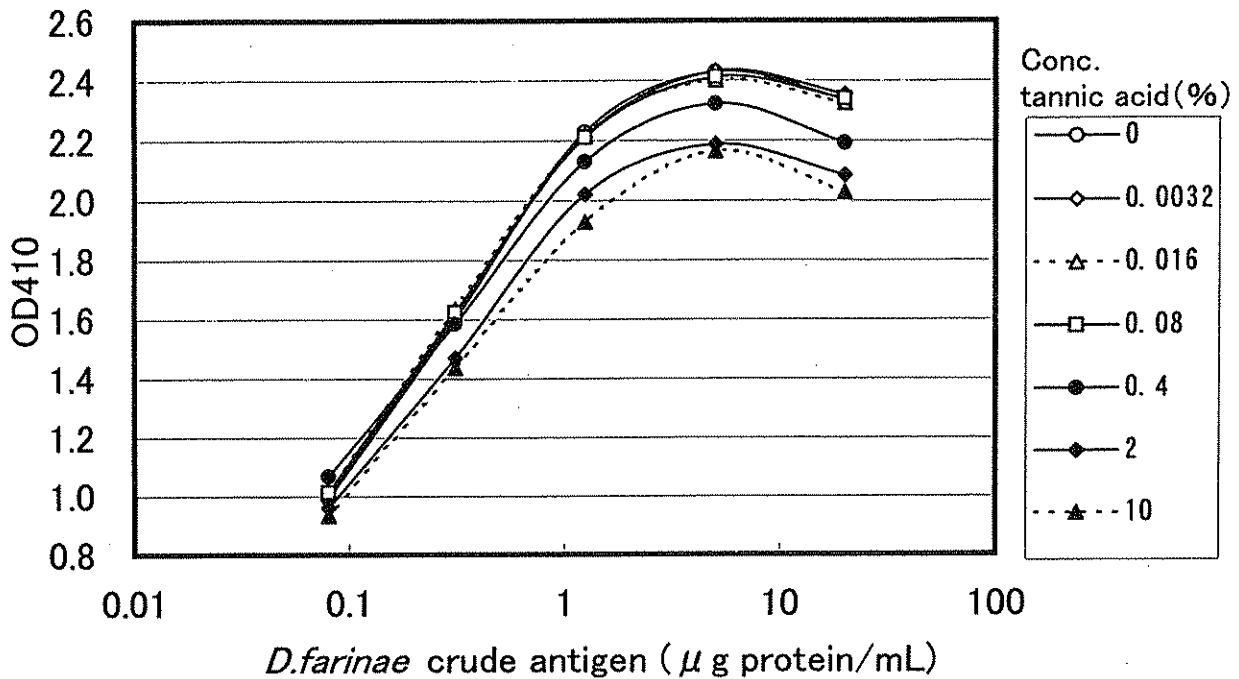


Fig. 4 Reduction of crude antigen absorbance with tannic acid.

Table 2 Effect of tannic acid (TA) on *Dermatophagoides farinae* crude antigen.

Conc. TA (%)	Residual amount of antigen vs control in %			
	0.078	0.31	1.25	5 μg/mL*
10.0	77.6	61.3	45.3	11.0
2.0	77.1	61.7	52.1	10.4
0.4	95.0	77.5	64.6	24.1
0.08	95.8	96.1	88.3	67.3
0.016	96.9	99.8	90.4	64.6
0.0032	95.8	98.1	91.4	85.2

*Crude antigen coated on microplate.

果を狙った製剤が、海外では利用されている。これまでは、タンニン酸製剤のダニアレルゲンに対する効果は、実地評価が多く、報告によって、製剤の有効性の判断が分かっているが^{6), 7)}、Woodfolk *et al.*⁸⁾ は ELISA におけるタンニン酸の影響を評価し、タンニン酸濃度 0.1% 以上で測定系の阻害が生じ、5% BSA の添加でそれを改善できるとしている。その上で、3% タンニン酸処理が有効としている。筆者らは、ELISA 阻止法⁹⁾ により、タンニン酸と抗体が直接反応する機会を排除し、タンニン酸の直接的な効果を評価した結果、*in vitro* ではタンニン酸の濃度依存的な効果が認

められた。

タンニン酸処理によって除去されたダニ粗抗原のアレルゲン性や、ヒト血清による反応性も、今後、検討する必要があるが、ダニアレルゲン低減効果が *in vitro* において認められたことで、アレルゲン回避の一手段となる可能性が支持された。

3.4 Der I に対する加熱処理の影響

コナヒョウヒダニ培地を種々の温度条件に曝露したときの、Der I 残存率を表-3 に示す。

今回の加熱処理条件の中では、80°C 湿熱条件がもっとも変性効果が高いと考えられるが、Der I

Table 3 Effect of heat treatment on Der I.

Heating condition*	Heating time	Residual amount**		
		40°C	60°C	80°C
Dry	10min	100	100	96
	60	82	100	95
	360	100	99	100
Wet	—	97	100	83

*Dry: in oven, Wet: in PBS-T at each temperature.

** : antigen vs control in percent.

Control amounts of Der I in dry and wet condition were 174 and 2759 $\mu\text{g/g}$ medium, respectively.

に対してはその条件でも、無処理区と比較して、83%のアレルゲン性を有しており、60°C以下ではほとんど変性効果が認められなかった。乾熱処理では、40°C60分間処理で、82%までアレルゲン性が低下したことが認められたが、80°C処理では95%以上の残存率を示した。こうした傾向は抗原抽出液を希釈して測定しても同様であったので、これらの加熱処理はDer Iのアレルゲン性にはほとんど影響を与えないものと判断された。

Lombardero *et al.*⁴⁾ は、¹²⁵I 標識アレルゲンをを用いたELISA法により、ダニアレルゲンに対する加熱影響を検証し、本実験と同じ抗Der f Iマウスモノクローナル抗体(4C1および6A8)を用いた場合、75°C1時間のPBS浸漬加熱処理で、Derf I濃度10~100 $\mu\text{g/mL}$ のとき、約10~60%の阻止率を得、Der Iは熱影響を受けやすいという結論を示している。本実験とは供試培地中のDer I濃度や、アレルゲン残存性の評価方法が異なるため、単純な比較は難しいが、今後、多角的に評価する必要がある。

4. 謝 辞

本研究の一部は、平成12年度科学技術庁生活・社会基盤研究および生活者ニーズ対応研究「生活環境から皮膚を守るための総合研究」の研究班「生活環境におけるアトピー性皮膚炎の増悪因子に関する研究(班長:自治医科大学医動物学教室石井明教授)」の一環として行われた。

本研究実施に際して、自治医科大学医動物学教

室松岡裕之助教授には、ウサギ血清をご提供いただいた。また、国立相模原病院臨床研究部安枝浩博士には、有意義なご助言を賜りましたので、あわせて御礼申し上げます。

5. 引用文献

- 1) Platts-Mills T.A.E. and A.L.de Weck (1989) Dust mite allergens and asthma -A world wide problem. *J.Allergy Clin. Immunol.* 83: 416- 427.
- 2) Platts- Mills T.A.E. *et al.* (1992) Dust mite allergens and asthma: Report of a second international workshop. *J.Allergy Clin.Immunol.* 89: 1046- 1060.
- 3) 安枝浩 (1996) MAb-ELISAによるヒョウヒダニアレルゲンの定量とその利用. 健康被害予防事業環境保健調査研究レポート Vol.2. 家庭環境の整備に関する研究. 1991年度~1993年度. pp12- 16. 公害健康被害補償予防協会.
- 4) Lombardero, M., P.W.Heymann, T.A.E. Platts-Mills, J.W.Fox and M.D.Chapman (1990) Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides* spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. *J. Immunol.* 144: 1353- 1360.
- 5) 脇誠治、松本克彦 (1973) コナヒョウヒダニの繁殖条件の研究. 1. 温度湿度条件と繁殖率

の関係について. 衛生動物. 23: 159- 163.

- 6) Green, W.F., N.R. Nicholas, C.M. Salome, A. J. Woolcock (1989) Reduction of house dust mites and mite allergens: effects of spraying carpets and blankets with Allersearch DMS, an acaricide combined with an allergen reducing agent. Clin. Exp. Allergy 19: 203-207.
- 7) Tovey, E. and G. Marks (1999) Current reviews of allergy and clinical immunology. Methods and effectiveness of environmental control. J. Allergy Clin. Immunol. 103: 179-191.
- 8) Woodfolk, J.A., M.L. Hayden, J.D. Miller, G. Rose, M.D. Chapman and T.A.E. Platts-Mills (1994) Chemical treatment of carpets to reduce allergen: A detailed study of the effects of the tannic acid on indoor allergens. J. Allergy Clin. Immunol. 94: 19-26.
- 9) Matsuoka, H., N. Maeda, Y. Atsuta, K. Ando and Y. Chinzei (1995) Seasonal fluctuations

of *Dermatophagoides* mite population in house dust. Jap. J. Med. Sci. Biol. 48: 103-115.

Summary

Amount of dust mite allergen in the cultured medium of *Dermatophagoides farinae* increased with the mite population, and kept the high level density (Der I > 2000 $\mu\text{g/g}$ medium) even though the population decreased. House dust also maintained the allergenicity for 8 weeks at least in a residential condition (25-38°C, >70%RH).

Heat treatment (mix with 80°C PBS-Tween) occurred only 17% reduction of the allergenicity in the medium. However, tannic acid (>0.4%) treatment clearly interfered the antigen-antibody reaction in ELISA. From these results, it was supposed that the Der I allergen was stable under high temperature (even 80°C) but sensitive with tannic acid.