短 報

ESR ラジカルイムノアッセイ法による室内環境中ダニアレルゲン(Der p 1, Der f 2)の測定

安部　悦子，會田　健，鈴木　道子，高橋　裕一，青山　正明*，押切剛伸**

Measurement of Indoor Airborne Mite Allergens (Der p 1, Der f 2) by Electron Spin Resonance Radical Immuno Assay

by Etsuko ABE,Takeshi AITA,Michiko SUZUKI,Yuichi TAKAHASHI,Masaaki AOYAMA, Yoshinobu　OSHIKIRI

室内におけるアレルギー疾患の原因アレルゲンの中で，日本ではダニアレルゲンが最も重要で，粒子径が小さいため花粉症とは異なり，下気道の症状を引き起こすといわれている[1)]．より効果的なアレルゲン解除を行うために，清掃等の行動様式により室内においてどのような量的変化が生じるのかを調査した．空中に浮遊しているダニアレルゲンはごく微量なので，まず高感度測定が可能な ESR ラジカルイムノアッセイ法の検討を行い，その方法を用いて空中ダニアレルゲン（Der p 1, Der f 2)量の経時変化を測定した．その結果，寝具の出し入れ時に急激に増加し，15 分後には低下することがわかった．

Key Words: Der p 1, Der f 2, ESR ラジカルイムノアッセイ法

Ⅰ　はじめに

国内においてアレルギー疾患を有する人の割合は年々増加傾向が認められ，また県内の状況も過去の疫学調査等から全国とほぼ同様であることがわかっている．日本の室内におけるアレルギー疾患の原因アレルゲンで最も重要といわれるダニアレルゲンについては，試料がハウスダストの場合は主に ELISA 法で測定されているが，空中に浮遊しているダニアレルゲンはごく微量なのでラジオイムノアッセイ法による測定の報告がある[2)]．我々は放射性物質を使用せず同様に高感度の測定が可能な ESR ラジカルイムノアッセイ法を用い浮遊ダニアレルゲン量の経時変化を測定し，その結果を住民に情報提供することで家庭におけるダニアレルゲン曝露の低減化をめざしている．

Ⅱ　対象と方法

室内に生息するダニの中で，ヤケヒョウヒダニおよびコナヒョウヒダニがアレルギー疾患に関与するといわれている．抗原１はダニの糞や分泌物由来，抗原 2 はダニの虫体由来でヤケヒョウヒダニ，コナヒョウヒダニ間に高い相同性がみられるが，抗原１と２の間には交差性がないことが知られている．これは，ヤケヒョウヒダニ抗原１に感作されればいずれコナヒョウヒダニ抗原１にも反応することを意味する．

今回は，試料中のヤケヒョウヒダニ抗原 1(Der p 1)とコナヒョウヒダニ抗原 2(Der f 2)の抗原量を測定した．

１．固相プレートの作成法

(抗 Der p 1, Der f 2 抗体の固相化)

抗 Der p 1 モノクローナル抗体(安枝氏より，PIA04) および抗 Der f 2 モノクローナル抗体(生化学工業，15E11)を 0.1M リン酸緩衝液（以下 PBS と略）で 10μg/ml の濃度に調整した．この抗体液を ELISA プレート(NUNC 社)の各ウエルに 100μℓ ずつ分注し，室温で４時間吸着させた．PBS で 3 回洗浄した後に各ウエルに 200μℓ の StabilGuard (SurModics, Inc., Minneapolis, MN, USA)を加え 4℃で一晩ブロッキング処理した．乾燥後，乾燥剤入り容器に入れ使用時まで 4℃に保存した．

２．空中試料の採取および抽出液の作成

空中試料は 2006 年 2 月から 2008 年 7 月に採取した．試料の採取は山形県内に居住する複数の人の協力により，サイクロンサンプラーC90M(バーカード社製）を用い 15 分間隔で採取した．このサンプラ

＊　山形県産業技術振興機構
＊＊山形県産業技術短期大学校

ーは１時間に１m^3の大気を吸引するよう設定されている．採取後の試料に 0.1%BSA 添加 0.125M 重炭酸ナトリウム溶液 100μℓ を加え室温で２時間抽出後，3000rpm，10 分間遠心し上清の一部を測定に使用した．

３．ESR ラジカルイムノアッセイ法による Der p 1，Der f 2 の測定

（１）Der p 1 抗原

固相化抗体プレートに採取した試料抽出液を 30μℓ ずつ，スタンダード溶液は 100μℓ ずつ分注した．スタンダードには Der p 1 標準液(安枝氏より)を 3%BSA 添加 PBS で 10，1，0.5，0.25，0.125，0.063，0.032ng/mL の濃度に用時調整して用いた．この緩衝液と試料用抽出液で pH と容積を調製した後，同緩衝液で 4000 倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗 Der p 1 モノクローナル抗体 50μℓ を加え混和後，4℃で一晩反応させた．なおこの抗体は，安枝氏より提供された精製抗体 PIA03 に HRP 標識キット-SH（同仁堂モレキュラーテクノロジー社）を用い酵素標識したものである．エルジア・F 洗浄液(Sysmex 社)で 5 回，蒸留水で１回洗浄後，ラジカル試薬を加え 37℃1 時間で反応させ反応を停止し，ESR 装置でラジカル強度を測定した．

（２）Der f 2 抗原

Der p 1 同様に試料及び標準溶液を分注後に，3%BSA 添加 PBS で 4000 倍に希釈した HRP 標識抗 Der f 2 モノクローナル抗体（生化学工業，13A4）50μℓ を加え混和後，室温で１時間反応させた．Der p 1 と同様に洗浄後ラジカル試薬を加え，反応停止後ラジカル強度を測定した．標準溶液には精製ダニ抗原 Der f 2（生化学工業）を Der p 1 同様の濃度に用時調整して用いた．

（１）および（２）の ESR 装置による測定法は別報[3]に従った．

Ⅲ　結果および考察

１．試料中 Der f 2 抗原の測定

Der f 2 の標準溶液から得られた検量線を示す(図 1)．Der f 2 は 16pg/mL まで測定が可能であり，100μℓ で抽出した試料を 30μℓ 使用時には 0.5pg/sample まで測定が可能であった．この条件を用い，Ｔ家において Der f 2 の室内清掃による量的変化を検討した(図 2)．

寝室内の清掃によって空中ダニアレルゲンは増加するが清掃をしていない時では清掃時の 1/10 以下の値であった．一方，窓開けをした場合は大部分室内に留まらなかった．

この結果から寝室内の清掃でダニアレルゲンが増加

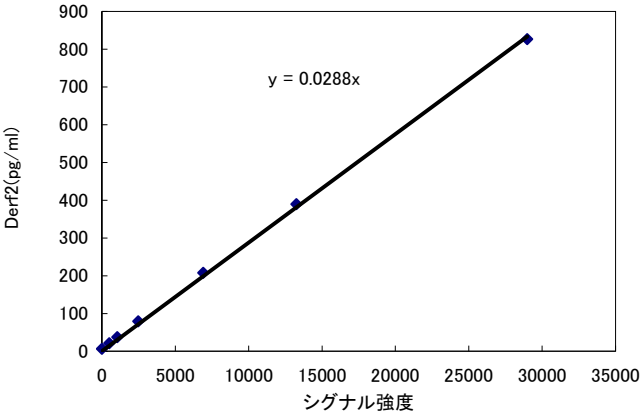
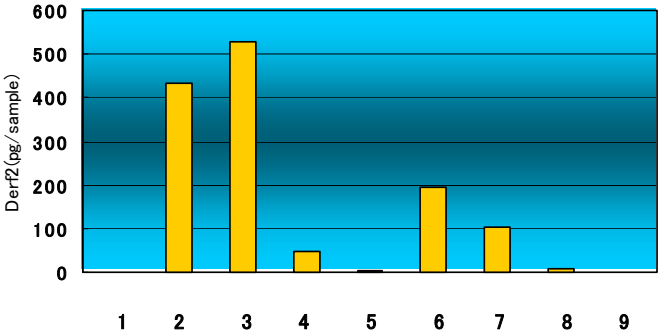


図1　Der f 2検量線



(寝室)1:掃除前，2:掃除，布団たたき，3:掃除，掃除機かけ，4:終了，5:終了，6:拭き掃除，書籍たたき，7－9:終了(各々15 分間隔)

図 2　室内清掃におけるダニアレルゲン量(Der f 2)

することを，2008 年 1 月Ｔ家以外の複数の家屋（A，B，C）において実際に清掃を行って調べた．窓開けはＣ家のみで，A，B 家では窓を閉めて実施した．採取した空中試料中 Der f 2 の量を測定した結果(図 3)，清掃前後の Der f 2 変化を比較すると検討したいずれの家屋もふとんの出し入れ時急激に増加し 15 分後には低下した．布団の出し入れにより Der f 2 の増加は通常の状態の数百倍となることから，清掃時に吸入しないような配慮が求められる．

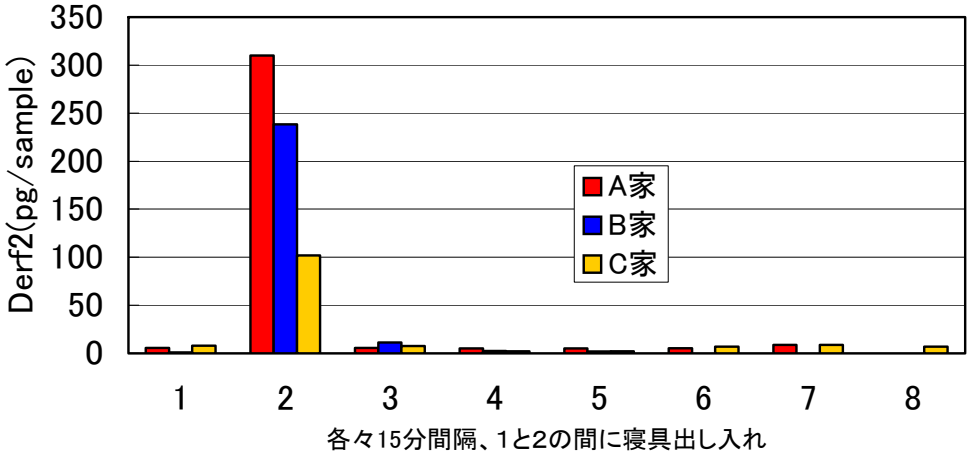


図3 寝室清掃時のダニアレルゲンの経時変化

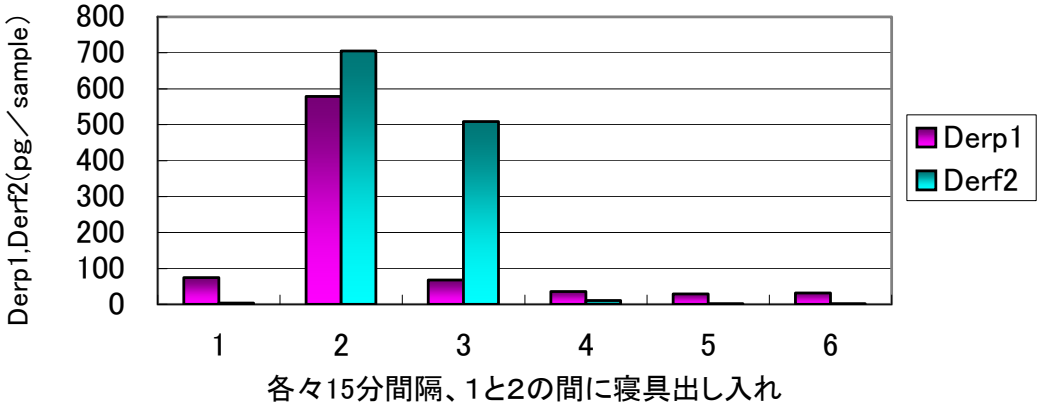


図4 空気試料中ダニアレルゲンDer p 1およびDerf2同時測定

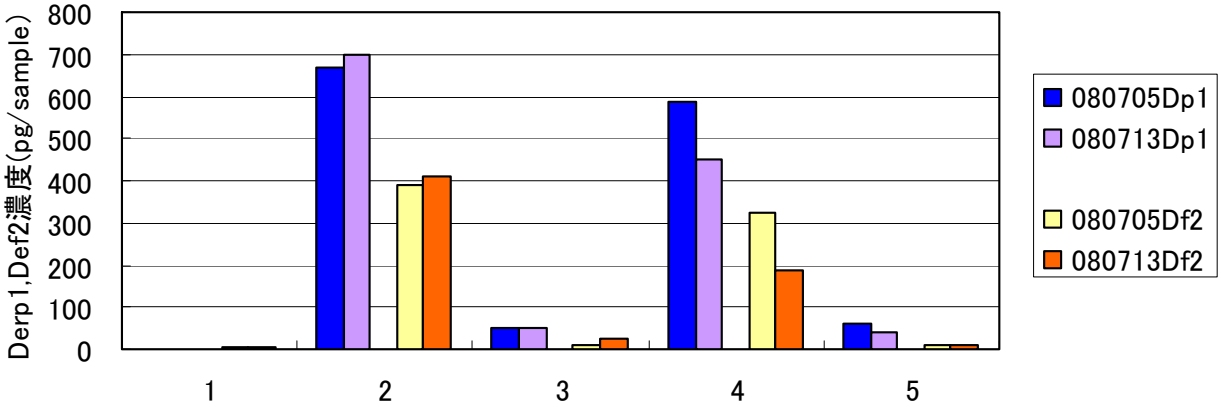
２．試料中 Der p 1，Der f 2 抗原の同時測定

2008 年 2 月に家屋Ｄで布団叩き前後の空中試料を採集し， Der p 1 および Der f 2 を同時に測定し両者の関係を見た(図 4)．その結果は Der f 2 の量が Der p 1 より多かった．室内における布団叩きはモデル実験であるが，叩くことによって虫体由来の Der f 2 が布団から多く出たとも考えられる．また，Der p 1 は 15 分後に Der f 2 は 30 分後に低下し，やや低下に要する時間が異なった．このことは両者の粒子形や存在形態に違いがあることを示唆している．

Der p 1 および Der f 2 の量は家屋ごとに差があるかをみるため，2008 年 7 月家屋Ａにおいて，寝室の清掃前，寝具の搬出，掃除，寝具の搬入，清掃後の各 15 分間のサンプリングを 2 回実施し，採集した試料を測定した（図 5）．この家屋では Der p 1 の方が Der f 2 より多かった．この場合布団は叩かず寝室から搬出と搬入を行ったが，搬出時により多くのダニアレルゲンが検出された．搬入時に減少したのは，清掃の効果と移動の過程で他の部屋に落ちたことが考えられた．また，空中 Der p 1 は 15 分後には 10 分の 1 以下に減少したが，掃除機かけおよび寝具搬入後にも清掃開始前に比べ 50pg/sample ほど増加していた．清掃開始前と同様の濃度までに低下する時間を求めることも必要と考えた．また，Ａ家の最大 Der f 2 値(400pg/ sample)は 1 月の測定値（300pg/ sample，図 3）に比べてやや多かったが，冬期，夏期の差を比較するためには検討回数

を増やす必要がある．さらに， 2007 年 8 月にも同家において同じ方式で清掃前後の Der p 1 の量的変化を測定しており，結果を比較するとほぼ同じ値が得られていた．従ってこの家屋においては 2 年間に Der p 1 量に大きな変動がなかったと言える．

これらの調査から，ダニアレルゲン感作からの回避には Sakaguchi らがすでに報告しているように，寝具のダニアレルゲンを減少するのが最も効果的であると推察された[2)]．今後，この結果を広く県民に伝え，よりダニアレルゲンの少ない環境作りをめざしたい．



1:清掃前　2:寝具搬出　3:はたきかけ，掃除機かけ4:寝具搬入　5:終了
（サンプリング 15 分間隔）
左側 2 つは，2008 年 7 月 5 日，同 7 月 13 日の Derp1 量
右側 2 つは，同一試料で測定した Derf2 量

図5　寝室清掃時の Derp1,Derf2 経時変化

謝 辞

国立病院機構相模原病院，安枝　浩博士からダニアレルゲンおよび精製抗体を提供していただき，ここに深謝いたします．

文 献

1．安枝　浩：ダニアレルゲンの免疫生物学とアレルギー疾患，アレルギー　57(7)，807-815，2008.
2．Sakaguchi M：Measurement of Indoor Airborne Mite Allergens，Allergology International，54,35-38,2005.
3．青山正明，高橋裕一：ESR ラジカルイムノアッセイ法による Cry j 1 の超高感度測定法の開発，アレルギー 53(10)，1088-1090，2004.