

ダニ主要アレルゲンとプロテアーゼとの
関連に関する研究

1996年

安藤 徹

目次

序論		1
第1章	ダニ (Df) 粗抗原抽出エキス (CME) 中におけるプロテアーゼの検出	5
1-1	実験材料および方法	6
1-2	CMEによって惹起された血管透過性に対する薬物の作用	12
1-3	CME投与後の血漿プロテアーゼ活性	12
1-4	<u>In vitro</u> での血漿プロテアーゼ活性	14
1-5	CME皮内投与による血管透過性の亢進	14
1-6	CME中のプロテアーゼ活性	14
1-7	Aprotininによる皮膚刺激の抑制	19
1-8	CMEゲルクロマトグラフィー分画物中のプロテアーゼ活性	19
1-9	各プロテアーゼの酵素化学的性質	19
1-10	CMEの60%飽和硫酸分画	22
1-11	要約、考察	25
第2章	CME中に存在するシステインプロテアーゼの精製	35
2-1	実験材料および方法	35
2-2	システインプロテアーゼの精製	40
2-3	ゲル内沈降反応	44
2-4	N末端アミノ酸配列	44
2-5	アミノ酸組成	48
2-6	要約、考察	48
第3章	ダニ排泄物抽出エキス (MFE) 中のトリプシン様プロテアーゼの精製	55
3-1	実験材料および方法	55
3-2	トリプシン様プロテアーゼの精製	58
3-3	精製トリプシン様プロテアーゼの酵素化学的性質	59
3-4	精製トリプシン様プロテアーゼのアレルゲン活性	64

3-5	N-末端アミノ酸配列	69
3-6	アミノ酸組成	69
3-7	要約、考察	69
第4章	室内塵抽出エキス (HDE) のプロテアーゼ活性とダニ主要アレルゲン量との関連について	77
4-1	実験材料および方法	78
4-2	Der f I および Der f II assay 系の特異性の検討	82
4-3	HDE 中のアレルゲン活性	83
4-4	HDE 中のプロテアーゼ活性	83
4-5	HDE 中のトリプシン様プロテアーゼと Der f III との 基質特異性	89
4-6	HPLCゲルクロマトグラフィーによるダニ由来および室内塵由来 トリプシン様プロテアーゼ活性の検出	89
4-7	ダニ主要アレルゲン量と他の指標との相関	93
4-8	トリプシン様プロテアーゼ活性と他の指標との相関	93
4-9	各種アレルゲンエキス中のトリプシン様プロテアーゼ活性	105
4-10	要約、考察	105
第5章	コナヒョウヒダニとチリカブリダニとの抗原性の関連について	111
5-1	実験材料および方法	114
5-2	チリカブリダニ虫体抽出エキス中のプロテアーゼ活性	116
5-3	<u>Pp</u> 抽出エキスと <u>Df</u> 抽出エキスのSDS-PAGE分析	116
5-4	交差抗原性	118
5-5	交差アレルゲン性	118
5-6	要約、考察	123
総括		126
参考文献		131
謝辞		146

主 論 文 目 錄	1 4 7
參 考 論 文	1 4 9
主查、副查名	1 5 0

略語表

<u>Df</u>	: コナヒョウヒダニ (<u>Dermatophagoides farinae</u>)
<u>Dp</u>	: ヤケヒョウヒダニ (<u>Dermatophagoides pteronyssinus</u>)
<u>Pp</u>	: チリカブリダニ (<u>Phytoseiulus persimilis</u>)
CME	: ダニ粗抗原抽出エキス (Crude Mite Extract)
MBE	: ダニ虫体抽出エキス (Mite Body Extract)
MFE	: ダニ排泄物抽出エキス (Mite Feacal Extract)
WCE	: ダニ培養物抽出エキス (Mite Whole Culture Extract)
PB	: リン酸緩衝液 (phosphate buffer)
PBS	: リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline)
MW	: 分子量 (molecular weight)
SDS-PAGE	: SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
RAST	: 放射性アレルゲン吸着試験 (radioallergosorbent test)
ELISA	: 酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay)
kDa	: キロダルトン (kilodalton)
HD	: 室内塵 (House Dust)
HDE	: 室内塵抽出エキス (House Dust Extract)
PCA	: 受身皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis)

序 論

近年、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのIgE抗体の関与する、吸入性I型アレルギー（アトピー）性疾患は増加傾向にある。これら疾患の原因物質はアレルゲンと呼ばれ、最も重要なアレルゲンは家の中のホコリ、すなわち室内塵である。わが国諸外国を問わず、アトピー性疾患の50%以上は室内塵であるといわれている。

ところで室内塵は様々な物質の混合物であり、その中には動物の皮膚、真菌、花粉類などのアレルゲンが含まれるが、その中のどの物質がアレルゲンとして最も重要なのか長い間不明であった。1960年代にVoorhorst¹⁾らやわが国の宮本ら²⁾によって室内塵中の最も重要なアレルゲンは、チリダニ科ヒョウヒダニ属(Dermatophagoides)に属するヤケヒョウヒダニ(Dermatophagoides pteronyssinus 以下Dp)とコナヒョウヒダニ(Dermatophagoides farinae 以下Df)であることが明らかにされた。これらのダニは別名house dust miteと呼ばれ、この2種で室内塵中に生息するダニの大半を占めている³⁾。

ダニ抗原抽出エキスをイムノブロットで解析すると、20種類以上のアレルゲンが検出される⁴⁾。これらアレルゲンの中にはアレルギー反応を起こすのに最も重要であると言われている主要(major)アレルゲンと呼ばれるものが存在する。一般に、主要アレルゲンとはヒト粘膜を容易に通過することのできる分子量1-4万の間の蛋白質で、しかもそのアレルゲンの関与するアレルギー性疾患において、80%以上の患者が感作されている物質であると定義されている⁵⁾。

ダニ抗原抽出エキス中にはアレルゲン以外にも多数の蛋白質が存在し、その構成が複雑である。それ故、ダニ主要アレルゲンの精製は、比較的構成成分の簡単なブタクサ花粉等の場合とは異なり、困難であった。こうした状況の中、Chapman⁶⁾らは、ダニの主要アレルゲンである antigen P1すなわち現在の Der p 1 を世界で最初に精製した。彼らは、D p の抽出エキスから、Sephadex G-75 , block electrophoresis, preparative isoelectric focusing(IEF)を用いて Der p 1 を精製した。その後同様な conventional なカラムワークにより幾つかの研究グループによりダニ主要アレルゲンが分離精製されたが、精製した研究者によって名称が異なっていたため、混乱を避けるために、現在ではグループ I アレルゲンあるいはグループ II アレルゲンというふうに統一されている⁷⁾。ところでもう一つのグループ I アレルゲンである Der f 1 は Heymann⁸⁾, Lind⁹⁾らによって精製された。以下同様にグループ II アレルゲン (Der p II, Der f II)^{10, 11, 12, 13)} とグループ III アレルゲン (Der p III, Der f III)^{14, 15)} がその後約 10 年間の間に精製され多くの知見が得られた。最近これらの主要アレルゲンはほとんどクローニングされ、全アミノ酸配列が決定されている^{16, 17, 18, 19, 20, 21, 22)}。

グループ I アレルゲンとグループ III アレルゲンはダニ排泄物中に多く含まれ、それぞれ 25 kDa, 29 kDa の蛋白質であり、両者のアレルゲン活性は比較的熱に不安定である。前者には糖鎖が結合しており、後者は時として 30 kDa の分子もあり多形性に富んでいる。一方、グループ II アレルゲンは 14 kDa の虫体由来の蛋白質であり、熱に安定である。

モルモットで抗ダニIgE抗体価を受身皮膚アナフィラキシー反応で測定する時、色素の漏出が起こり判定できないことを経験してきた。本研究は、この原因がDf中に存在するプロテアーゼであること、さらにはこのプロテアーゼの特徴の究明を目的とした。すなわち、Df粗抗原抽出エキス(CME)中に存在し、モルモット血漿の補体系等に関与する各種セリンプロテアーゼを活性化させ血管透過性を亢進させる物質の解明を行った。さらにこの物質がプロテアーゼであることより、ダニ抽出エキス中に存在する各種プロテアーゼの精製を行い、そのプロテアーゼの性質を明らかにすることを第1の目的とした。次いで得られたプロテアーゼとダニ主要アレルゲン蛋白との関係を明らかにすることを第2の目的とした。具体的には、抗ダニIgE抗体価測定時モルモットの血管透過性を亢進させる物質がダニ中のプロテアーゼであること、さらにCME中にシステインプロテアーゼとセリンプロテアーゼ(トリプシン型)が存在することを第1章で明らかにした。第2章においては、システインプロテアーゼを単離し、その酵素学的性質を明らかにするとともに、このプロテアーゼがダニの主要アレルゲンの1つあるDerfI蛋白そのものであることを明らかにした。次いで、ダニ排泄物抽出エキス(MFE)中のセリンプロテアーゼを精製し、基質特異性と阻害剤に対する検討から、これがトリプシン様プロテアーゼに属することが判明した。さらにこのプロテアーゼがDerfIIIである可能性を明らかにした。さらに第2章、第3章を通じ、これらプロテアーゼ活性を指標に各種カラムワークを行えば、簡易に主要アレルゲンを精製できることを示した。また第4章においては、室内塵抽出エ

キス (H D E) 中のダニ主要アレルゲン量とダニ中に存在するトリプシン様プロテアーゼ活性との関連を検討した。さらに H D E 中のダニ主要アレルゲン量とトリプシン様プロテアーゼ活性との相関を調べ、トリプシン様プロテアーゼ活性を指標にして、ダニ主要アレルゲン量を推定することは困難であることを明らかにした。第 5 章においては農作物に被害を及ぼすハダニの天敵農薬として使用されているチリカブリダニ (Phytoseiulus persimilis) についてもプロテアーゼ活性を測定し、コナヒョウヒダニとチリカブリダニとの抗原性の関連についても検討した。

第 1 章 ダニ (D f) 粗 抗 原 抽 出 エ キ ス (C M E) 中 に お け る プ ロ テ ァ ー ゼ の 検 出

動物実験における抗原特異的な抗体を測定する方法としては、in vitroでの測定法およびin vivoでの測定法がある。in vitroでの測定法としては、沈降反応、凝集反応、RAST法、ELISA法などが一般的に用いられている。in vivoでの方法としては、受身皮膚アナフィラキシー(Passive Cutaneous Anaphylaxis:PCA)反応が一般的である。PCA反応の場合、正常の動物の皮内に測定しようとする段階希釈した抗体を注射する(受身感作)。投与された抗体は、皮膚組織中に存在する肥満細胞に結合する。抗体を投与してから一定時間後に色素と抗原の混合液を静脈内に惹起注射すると、肥満細胞上で抗原抗体反応が生じ化学伝達物質が放出され、血管透過性が亢進し、その結果として皮内に色素斑が生じる。生じた色素斑の面積は皮内に前もって投与した抗体の濃度に依存することから、色素斑の面積を測定すれば抗体の力価が判定できる。PCA反応は手軽であるため、各種アレルギー性実験動物モデルを作製する場合一般的に応用されている。実験的喘息モデルに使用される動物種としては、一般的にモルモットが用いられる。モルモットの気道は他の動物種と比較し各種化学伝達物質に対して反応性が良好である。実験的喘息モデルを作製する場合、まず動物を抗原で感作し、血中に抗原特異的抗体が存在することを証明しなければならない。ダニ抗原を用い、まずこの試みを行った。

Graziano²³⁾らの方法に従い、ダニ粗抗原抽出エキス(Crude Mite Extract: CME)でモルモットを能動的に感作した。感作したモルモットから血清を得てPCA反応により、血中IgE抗体を証明しようと試みた。その結果、前もって抗体を皮内に投与したモルモットに色素とCMEの混合液を静脈内投与すると、投与されたモルモットは全身性アナフィラキシー様の反応を生じ死亡する現象が認められた。またこの場合、全身の血管透過性が亢進し、色素の漏出が全身において認められた(通常、他の抗原では、このような現象は認められない。)。そこで本研究においては、この原因を解明した。その結果、惹起抗原に用いたCME中にある種のプロテアーゼが存在し、モルモットに投与した場合このプロテアーゼがモルモット体内の各種酵素系を活性化し、その結果モルモットが全身性アナフィラキシー様の反応を生じ死亡することを証明した。またCME中に存在するプロテアーゼについての酵素化学的性質並びにこれらプロテアーゼの活性とアレルギー活性との関連についても検討した。

1-1) 実験材料および方法

CME凍結乾燥末の調製¹¹⁾:

培養したDfを飼料と分離後、5倍量のエーテルで4℃、1晩脱脂した。1グラムの脱脂したダニに対して20mlのPBS(0.085 M NaCl)を含む0.002 Mリン酸緩衝液(pH7.4)を加え、4℃で48時間スターラー攪拌し抽出した。これを遠心(10,000g, 30分, 4℃)し上清と沈渣に分け、上清はさらに精製水で48時

間、4℃で透析した。透析内液は0.45μmのメンブレンフィルターで濾過後、凍結乾燥しこれをCME凍結乾燥末とした。また透析外液を凍結乾燥し、CME透析外液(dialysate)とした。

使用動物：

Hartley系雄性モルモット(体重200-300g, 松本実験動物)を用いた。薬物の効果を見る場合1群7-8匹とし、血中酵素活性並びに皮膚刺激性試験においては、1群3匹とした。

薬物の血管透過性に対する作用：

FUT-175(3 mg/kg)あるいはdiphenhydramine(3 mg/kg)を静脈内投与し、3分後に1 mg proteinのCMEを含む1% Evans blue生理食塩溶液1 mlを静脈内投与した。30分後に放血致死せしめ両耳に滲出した色素量をKatayamaらの方法²⁴⁾により測定した。

CME投与後の血漿プロテアーゼ活性：

心採血にて、クエン酸血液を各動物あたり、0.6 ml採取した後、3 mgのCMEを各々の動物に静脈内投与した。30分後に心採血により、再度クエン酸血液を得た。血漿分離後、血漿中のトリプシン様プロテアーゼ活性を測定した²⁵⁾。AT III(anti-thrombin III)活性は、クロモレートAT III(鳥居薬品)キットにより、また補体価(CH50)はMayerの変法²⁶⁾により測定した。

In vitroでの血漿プロテアーゼ活性：

クエン酸処理モルモット血漿0.9 mlとCME (10 mg/ml)0.1mlとを混合し、37°C 0分、10分、20分および30分間反応させた。反応終了後、残存補体活性およびトリプシン様プロテアーゼ活性を上述の方法により測定した。

皮膚刺激性試験：

1% Evans blue生理食塩溶液1 mlを静脈内投与後、直ちに正常モルモットの背部皮内にCME、CME透析外液および陰性controlとしての牛血清アルブミン(BSA)各々100, 10 ug/mlを皮内投与(0.1 ml/site)した。30分後に動物をクロロホルムにて殺し、背部皮膚に出現した色素斑の直径を測定し、面積を求めた。

アプロチニンCME混合溶液の血管透過性に対する作用：

CME (200 ug/ml) をアプロチニン (200 u/ml) と等量混合し37°C 5分間反応させた。その後混液0.1 mlをモルモットの皮内投与し、さらに2% Evans blue 0.5 mlを静脈内投与した。30分後に動物をクロロホルムにて殺し、背部皮膚に出現した色素斑の直径を測定し、面積を求めた。

CME凍結乾燥末のゲルクロマトグラフィー：

100mgのCME凍結乾燥末を3 mlのPB (100 mM, pH 7.4) に溶

解後、上記PBで平衡化したSephacryl S-200(ファルマシア社)カラム(25 X 850 mm)でゲルクロマトグラフィーを行った。溶出液の280nmの吸光度を蛋白の指標とし、5 mlずつ分画した。

プロテアーゼ活性の測定²⁵⁾ :

プロテアーゼの基質として、t-Butyloxycarbonyl-L-phenyl-L-alanyl-L-seryl-L-arginine-4-methyl-coumaryl-7-amide(Boc-Phe-Ser-Arg-MCA:トリプシン基質)、t-Butyloxycarbonyl-L-Valyl-L-leucyl-L-lysine-4-methyl-coumaryl-7-amide(Boc-Val-Ley-Lys-MCA:プラスミン基質)、succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine-4-methyl-coumaryl-7-amide(Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA:キモトリプシン基質)、succinyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanine(Suc-Ala-Pro-Ala-MCA:エラスターゼ基質)を用い、これらはすべてペプチド研究所より入手した。プロテアーゼ活性の測定は以下のように行った。各試料分画0.1 mlと0.1 MのPB(pH 7.0)に溶解した各プロテアーゼ基質0.9 ml(10 μ mol)とを混合し、37°C、15分間インキュベートした。その後15%酢酸2 mlで反応を停止させ、遊離される7-アミノ-4-メチルクマリル(AMC)の蛍光強度をEx=380 nm, Em=460 nmで蛍光光度計(RF-450, 島津機器)により測定した。

プロテアーゼの至適pHの検討:

以下の緩衝液を用いてプロテアーゼの至適pHを求めた。グリシン-塩酸緩衝液(0.1 M, pH 2.0, 4.0)、クエン酸緩衝液

(0.1 M, pH 5.0)、リン酸緩衝液(0.1 M, pH 6.0, 7.0)、トリス-塩酸緩衝液(0.1 M, pH 8.0, 9.0)。PK.1プロテアーゼの基質としてBoc-Phe-Ser-Arg-MCA、PK.2およびPK.3プロテアーゼの基質としてBoc-Val-Leu-Lys-MCAを用いた。またプロテアーゼ活性は上記に記述した方法で測定した。

プロテアーゼの熱安定性に対する検討：

PK.1, 2, 3の各プロテアーゼを0.1 MのPB(pH 7.0)で37, 45, 55℃の温度条件下、各時間インキュベートした。残存したプロテアーゼ活性を、PK.1プロテアーゼの場合Boc-Phe-Ser-Arg-MCAを基質として、PK.2およびPK.3プロテアーゼではBoc-Val-Leu-Lys-MCAを基質として用い測定した。

各種試薬のプロテアーゼ活性に及ぼす影響：

以下の各種阻害剤および活性化剤を用いて、PK.1, 2, 3の各プロテアーゼに対する影響を検討した。aprotinin(トラジロール バイエル社)、MR-20(ミラクッド 持田製薬)、soybean trypsin inhibitor(SBTI, シグマ社)、N-tosyl-L-lysine chloromethylketone(TLCK, ペプチド研究所)、N-tosyl-L-phenyl alanine chloromethylketone(TPCK, ペプチド研究所)、leupeptin(ペプチド研究所)、ヨード酢酸(和光純薬)、FUT-175(フサン 鳥居薬品)、L-システイン1塩酸塩(cysteine, 国産化学)、EDTA(半井化学)、EGTA(半井化学)。PK.1プロテアーゼではBoc-Phe-Ser-Arg-MCAを基質として、PK.2およびPK

.3 プロテアーゼでは Boc-Val-Leu-Lys-MCA を基質として各プロテアーゼ活性を測定した。

硫酸分画とゲルクロマトグラフィー

CME凍結乾燥末5グラムを200 mlのPBS(0.085 M NaClを含む0.002 M PB, pH7.4)に溶解し、4℃で100%飽和硫酸溶液を添加し、最終濃度60%飽和になるように調製した。上清と沈殿を遠心(10,000 g, 1時間, 4℃)で分画後、沈殿分画は30 mlのPBSに溶解し、PBSで4℃, 1晩透析した。上清はポリエチレングリコール(MW50 kDa 和光純薬)を用いて20mlに濃縮後、PBSで4℃, 1晩透析した。透析後、両分画について各々 Sephacryl S-200のカラム(50 X920 mm)を用いてゲルクロマトグラフィーを行った。10 ml づつ分画し、各分画物中のプロテアーゼ活性を測定した。

アレルギー活性の測定

アレルギー活性はELISA法によって測定した。Sephacryl S-200の各画分をPBSで100倍に希釈し、この0.1 mlをBr-CN活性化濾紙と反応させアレルギーを濾紙に結合させた²⁷⁾。室温で1晩インキュベート後、0.1M NaHCO₃で濾紙を洗浄し、次いで1M β-エタノールアミン(pH 9.0)と室温で3時間反応させ未反応の活性基をブロックした。その後アレルギー結合濾紙を0.1M NaHCO₃で1回、0.1M 酢酸緩衝液(pH 4.0)で3回洗浄した。ついでこの濾紙に0.05 mlのプールしたヒト抗ダニ血清(R

AST スコア > 4) を加え 37°C 3 時間反応させ、洗浄後、 0.05 ml の β ガラクトシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体 (ファルマシア社) と室温で 16 時間反応させた。PB で 3 回洗浄後、 0.2 ml の 0 -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド溶液を加え、 37°C 2 時間反応後、 1.5 ml の 0.1 M NaCO_3 溶液で反応を停止させた。 420 nm の吸光度を測定し、アレルギー活性とした。

1-2) CME によって惹起された血管透過性に対する薬物の作用

CME を静脈内投与した時に惹起される血管透過性亢進に対する FUT-175 (セリンプロテアーゼ阻害剤) の作用を Fig. 1-1 に示した。control 群に比べて FUT-175, diphenhydramine 両投与群では、耳に滲出した色素量が抑制傾向であり、特に FUT-175 投与群でその抑制が大きかった。また control 群では、8 例中 6 例においてアナフィラキシー様反応が認められたが、FUT-175 投与群では 8 例中 2 例のみ認められ、また diphenhydramine 投与群 ($n=7$) では、全く認められなかった。

1-3) CME 投与後の血漿プロテアーゼ活性

CME 静脈内投与投与前のトリプシン様プロテアーゼ活性の 3 例での平均は、 4.5 ± 0.44 であった。一方、CME 静脈内投与投与後では、 13.2 ± 5.90 であり活性が増大した。Thrombin, Factor Xa の生体内阻害剤である AT III は、CME 投与後約 30% 減少し、

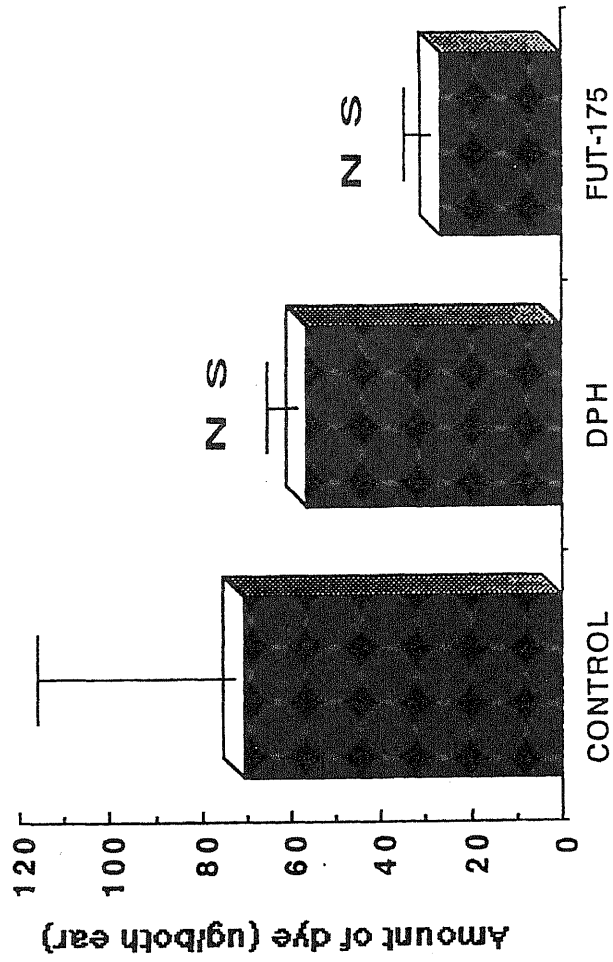


Fig. 1-1. Effects of diphenhydramine (DPH) and FUT-175 on vascular permeability in guinea pigs. DPH (3 mg/kg) or FUT-175 (3 mg/kg) was injected intravenously. After 3 min, 1 % Evans blue solution in saline containing CME (1 mg) was injected intravenously into all animals.

補体価も約20%の減少を示した(Table 1-1)。

1-4) In vitroでの血漿プロテアーゼ活性

In vivoで確認されたCMEによるセリンプロテアーゼの活性化が血小板、白血球等を介して生じるものかどうかを確認するために、モルモットクエン酸血漿にin vitroでCMEを添加した(Fig. 1-2)。CMEを血漿に添加することにより、補体系は消費されトリプシン様プロテアーゼ活性は上昇した。

1-5) CME皮内投与による血管透過性の亢進

CMEを皮内投与し、血管透過性が亢進するかどうか検討した。BSAおよびCME透析外液ではほとんど血管透過性を亢進させなかった。一方CMEは、10 ug/mlの濃度においても強い血管透過性の亢進を示した(Fig. 1-3)。

1-6) CME中のプロテアーゼ活性

ダニ抗原中には約分子量200kDa程度の高分子量分画に刺激物質が存在することが報告されている²⁸⁾。そこでCME自身にプロテアーゼ活性が存在するかどうか検討した(Fig. 1-4)。CMEと血漿、合成基質の混合物ではすでに見られたようにプロテアーゼ活性が検出されたが、血漿非添加の系においてもトリプシン様プ

Table 1-1 Effects of CME on plasma serine protease activities
in guinea pig in vivo.

Exp. No	TLA 1)		ATIII 2)		CH50	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1	5.2	25.0	92.7	45.0	140	97.6
2	3.7	7.3	94.1	80.8	112	98.0
3	4.7	7.3	92.9	78.2	129	102
Mean±S. E.	4.5 +0.44	13.2 +5.90	93.2 +0.44	68.0 +11.52	127 +8.1	99* +1.4

1) TLA (Trypsin-like protease activity) was expressed as $X10^{-8}$ AMC
release/ml/min.

2) ATIII activity was measured by the inhibition % of thrombin
added guinea pig plasma.

* $p < 0.05$ t-Test

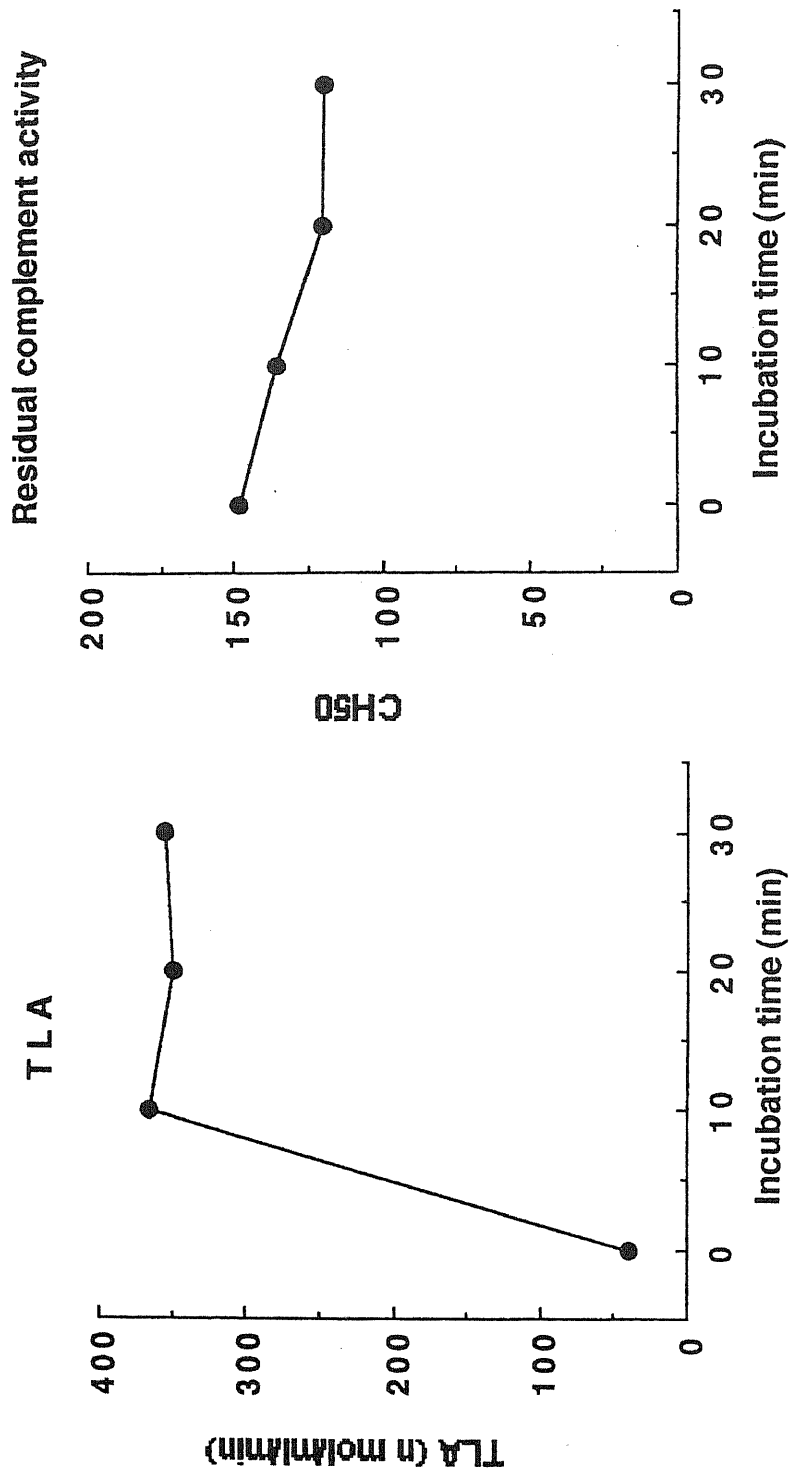


Fig. 1-2. Effects of CME on complement activity and plasma trypsin-like activity (TLA) in vitro. After CME (1 mg) was incubated with guinea pig plasma added citrate, TLA and the residual complement activity were measured as described in Materials and Methods.

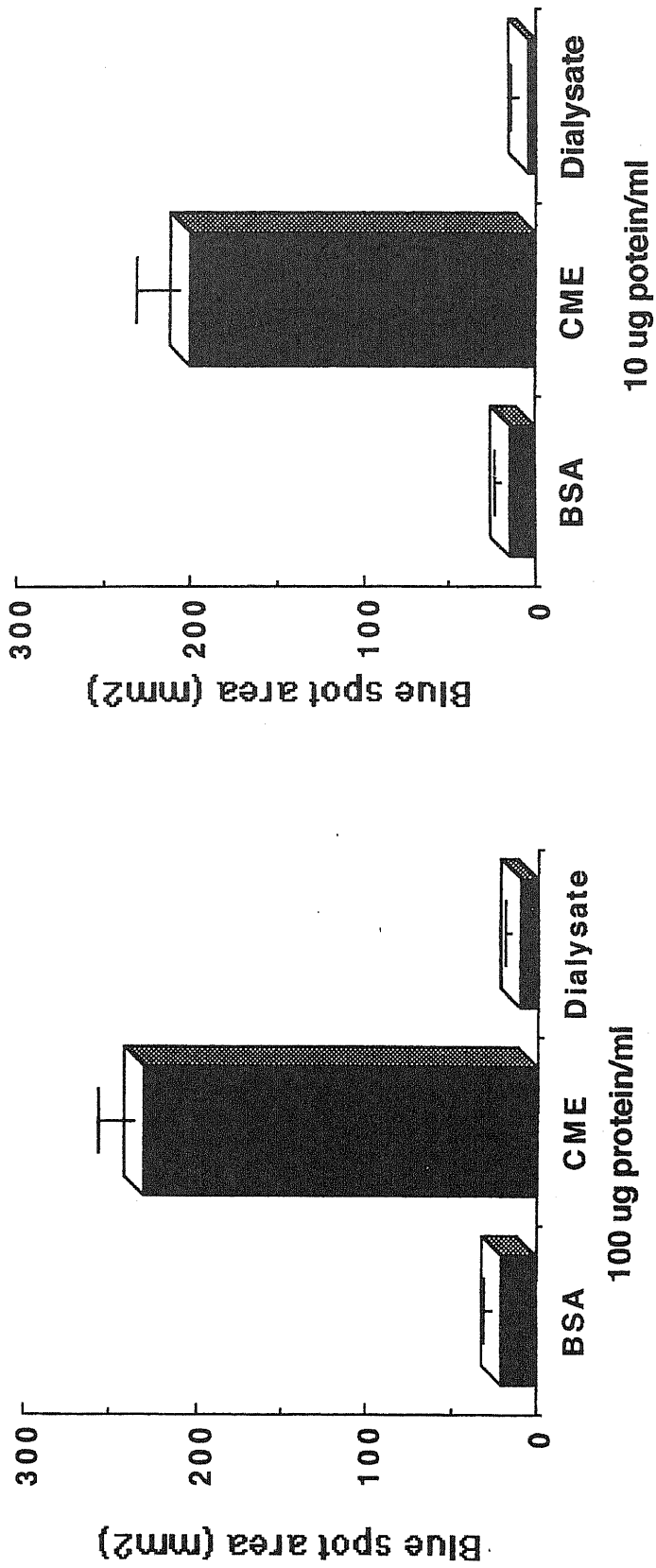


Fig. 1-3. Effects of CME and its dialysate on vasular permeability in guinea pigs. After intravenous injection of 1 % Evans blue solution in saline (1 ml), aliquatos (0.1 ml) of various concentrations of samples were injected intradermally. Vasular permeability spots on the inside surface of the skin, which was obtained after killing the animal, at 30 min after the injection of the test sample.

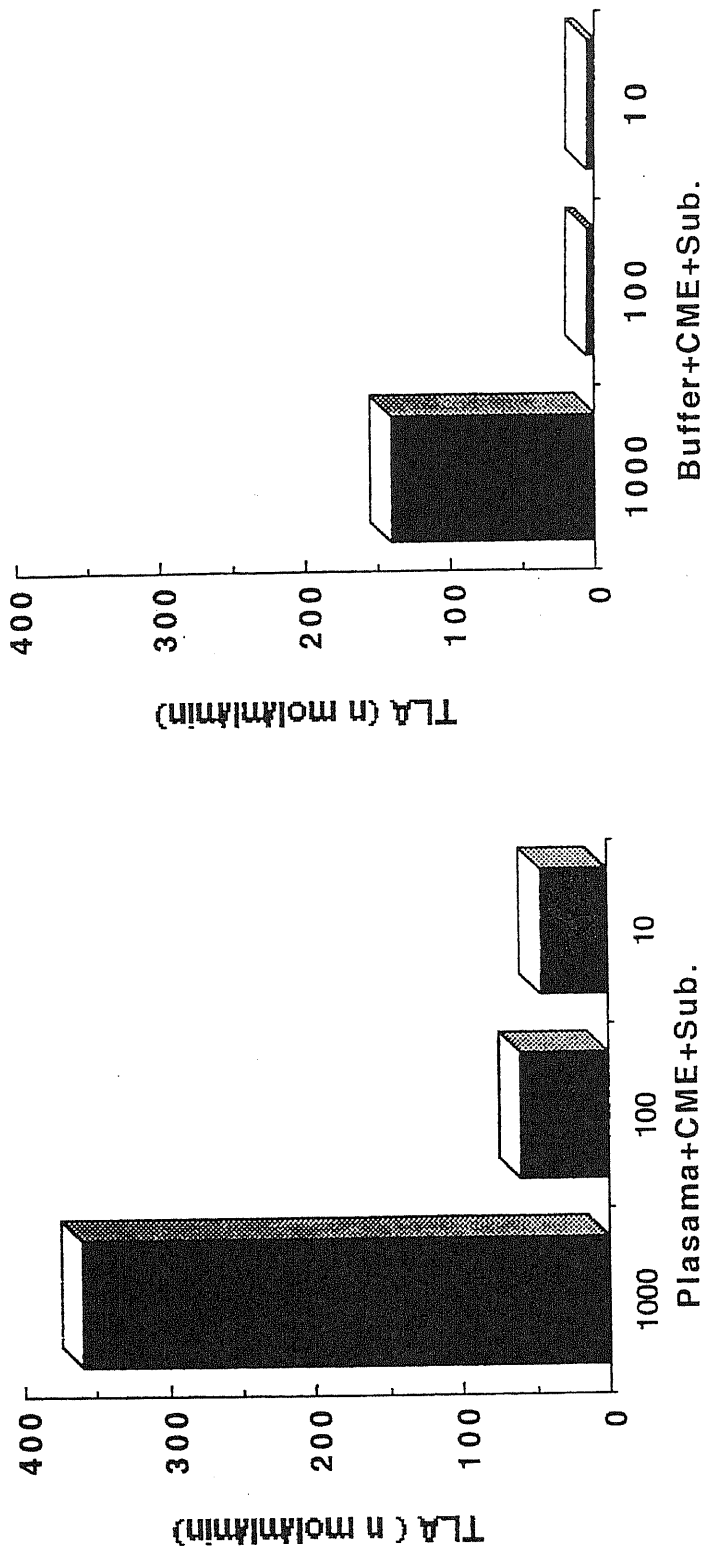


Fig. 1-4. Detection of the trypsin-like activity in CME. The trypsin-like protease activity in CME was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA as substrate.

ロテアーゼ活性が検出された (Fig. 1-4)。

1-7) Aprotinin による皮膚刺激の抑制

CME を aprotinin と共に混合したものをモルモット皮内に投与したところ、aprotinin 非添加群に比べて有意 ($p < 0.01$) に皮膚刺激性の抑制が認められた (Fig. 1-5)。

1-8) CME ゲルクロマトグラフィー分画物中のプロテアーゼ活性

CME ゲルクロマトグラフィー分画物中のプロテアーゼ活性を Fig. 1-6 に示した。MW60kDa 付近の位置に、基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA および Boc-Val-Leu-Lys-MCA を加水分解するプロテアーゼ活性が検出された。一方、MW30 および 20kDa 付近の位置に、基質 Boc-Val-Leu-Lys-MCA および Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA を加水分解するプロテアーゼ活性が検出された。基質 Suc-Ala-Pro-Ala-MCA を加水分解するプロテアーゼ活性はすべての分画において検出されなかった。フラクション No. 57 および 58, 66-68, 71-73 を各々プールして、それぞれ PK. 1, PK. 2, PK. 3 と命名した。

1-9) 各プロテアーゼの酵素化学的性質

a) 各プロテアーゼの至適 pH

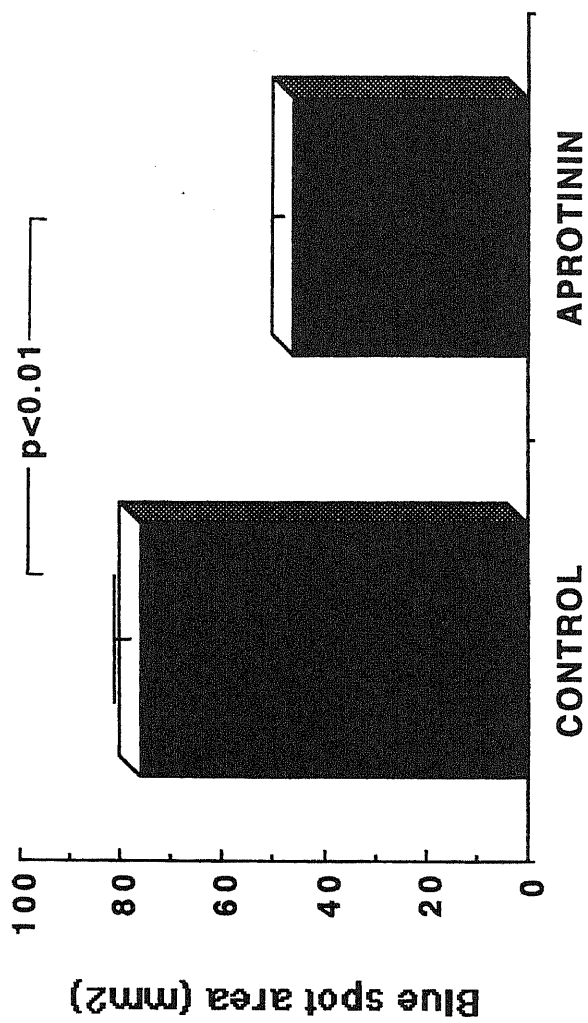


Fig. 1-5. Effect of aprotinin on vascular permeability caused by CME in guinea pigs. After CME (200 ug/ml) was incubated with aprotinin (200 u/ml) at 37 C for 5 min, aliquatos (0.1 ml) of mixture were injected intradermally and then 0.5 ml of 2 % Evans blue solution was injected intravenously. Blue spot area on the inside surface of the skin, which was measured after killing the animal, at 30 min after the injection of the test sample. Significantly different from the control group at $p < 0.01$ (Students t-test).

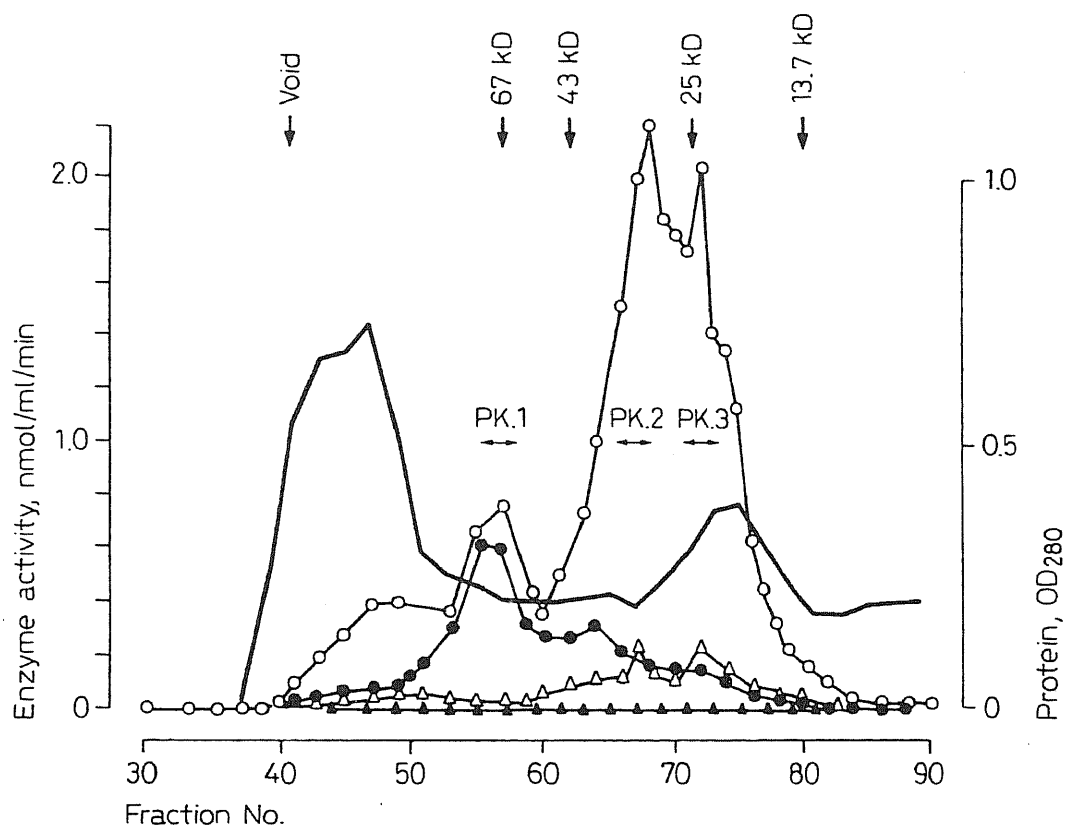


Fig. 1-6. Protease activities in the gel-filtrated CME. CME was gel filtrated using Sephacryl S-200. Five milliliters of each eluate was collected. The protein content (—) of the fraction was measured for optical density at 280 nm. The protease activities in the fractions were measured using Boc-Val-Leu-Lys-MCA (○), Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (●), Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (△), and Suc-Ala-Pro-Ala-MCA (▲) as substrates.

PK.1プロテアーゼの至適pHは7.0-8.0であった。一方基質Boc-Val-Leu-Lys-MCAを用いた時のPK.2とPK.3の至適pHは5.0であった(Fig.1-7)。

b) 加熱によるプロテアーゼ活性への影響

PK.1, PK.2, PK.3の各々のプロテアーゼ活性は、45°C、40分間の熱処理によりそれぞれ、20, 60, 50%低下した。55°CでのPK.1の残存活性は約40%であったが、PK.2, PK.3のプロテアーゼ活性は、55°C、20分間の熱処理により完全に失活した(Fig.1-8)。

c) 各種試薬のプロテアーゼ活性に及ぼす影響

各種試薬のプロテアーゼ活性に及ぼす影響をTable1-2に示した。PK.1のプロテアーゼ活性はaprotinin, MR-20, SBTI, FUT-175, TLCKやleupeptinによって阻害された。システインやEDTA, EGTAはPK.1の活性に影響をあたえなかった。PK.2とPK.3のプロテアーゼ活性はaprotinin, MR-20, SBTI, FUT-175とTPCKによって阻害されなかったが、TLCK, leupeptinやヨード酢酸によって阻害された。またシステインとEDTAはPK.2とPK.3プロテアーゼを活性化した。

1-10) CMEの60%飽和硫安分画

a) 60%飽和硫安上清ゲルクロマトグラフィー分画物中のプロテアーゼ活性とアレルギー活性

CMEの60%飽和硫安上清分画をSepahacryl S-200ゲルクロ

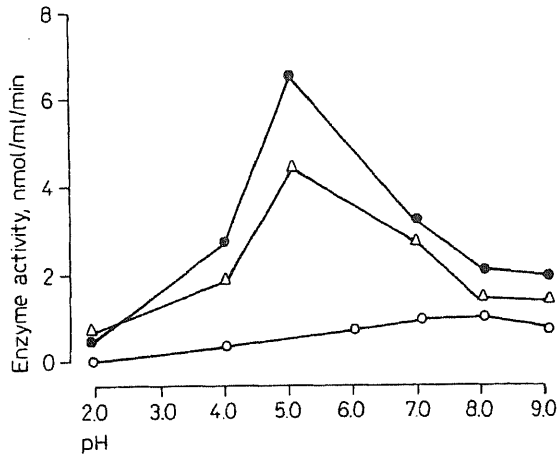


Fig. 1-7. Effects of pH on the activity of PK.1, PK.2, and PK.3 proteases. The PK.1 protease activity (○) was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA; PK.2 (●) and PK.3 (△) protease activities were determined using Boc-Val-Leu-Lys-MCA.

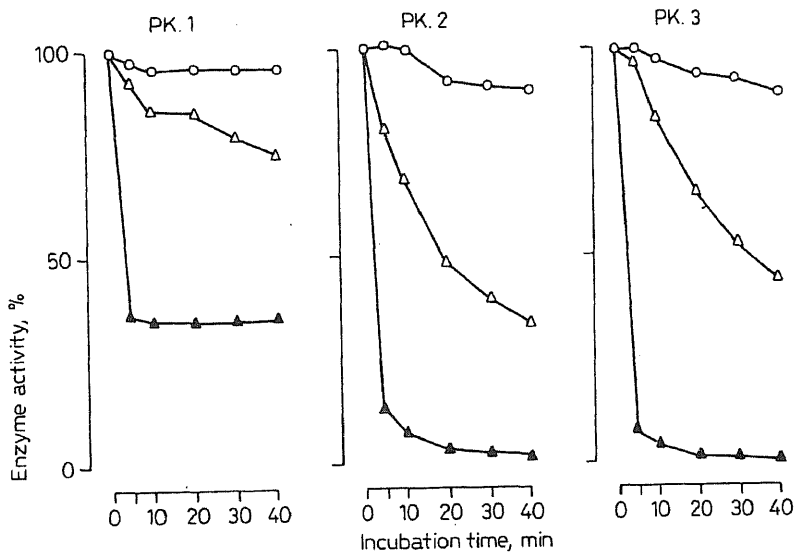


Fig. 1-8. Effects of heating on the activities of PK.1, PK.2, and PK.3 protease. PK.1, PK.2, and PK.3 fractions were heated at 37 (○), 45 (△), and 55 C (▲) for 0-40 min in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0). The remaining activity was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (pH 7.0) for PK.1 protease and Boc-Val-Leu-Lys-MCA in 100 mM acetate buffer (pH 5.0) for PK.2 and PK.3 protease.

Table 1-2 Effect of various agents on the activities of PK.1, PK.2, and PK.3 proteases.

Agents	Concentration μM	Inhibition, %		
		PK.1	PK.2	PK.3
Aprotinin ^a	1	14.9	0	0
	10	21.9	0	0
MR-20 ^b	1	21.9	0	0
	10	29.2	0	0
SBTI	1	28.5	0	0
	10	36.7	0	0
FUT-175	1	33.1	0	0
	10	43.2	0	0
TLCK	10	70.2	72.1	67.5
	100	86.2	89.4	91.8
TPCK	1	6.0	0	0
	10	13.0	4.6	0
Leupeptin	1	86.9	93.8	93.0
	10	94.7	97.1	97.3
Iodoacetic acid	10	0	81.6	83.0
	100	9.7	92.5	96.9
Cysteine	10	0	-7.5	-103.1
	100	0	-276.7	-420.3
EDTA	10	0	-28.4	-13.1
EGTA	10	0	-5.9	0

^a KIU/ml.
^b U/ml.

マトグラフィーでさらに分画した(Fig.1-9)。PK.1とPK.2のプロテアーゼ活性は分子量約60および30kDaの位置に検出されたがPK.3は20kDaの位置に検出されなかった。アレルギー活性は各々60, 30, 20kDaの位置に検出された。

b) 60%飽和硫酸沈殿ゲルクロマトグラフィー分画物中のプロテアーゼ活性とアレルギー活性

CMEの60%飽和硫酸沈殿分画をSepahacryl S-200ゲルクロマトグラフィーでさらに分画した(Fig.1-10)。強いPK.2並びにPK.3プロテアーゼ活性が約30と20kDaの位置に検出され、同時にこれらの分画にまた強いアレルギー活性が検出された。

1-5) 要約、考察

要約

- ① モルモットにCMEを in vivo で投与すると、血管透過性の亢進が認められた。この時、血漿トリプシン様プロテアーゼ活性の上昇とATⅢおよび補体価の減少が認められた。
- ② CME自身にもトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。
- ③ CMEと同時にあるいはCME投与3分間前にセリンプロテアーゼ阻害剤を皮内投与あるいは静脈内投与するとき、いずれにおいても血管透過性の亢進が抑制された。

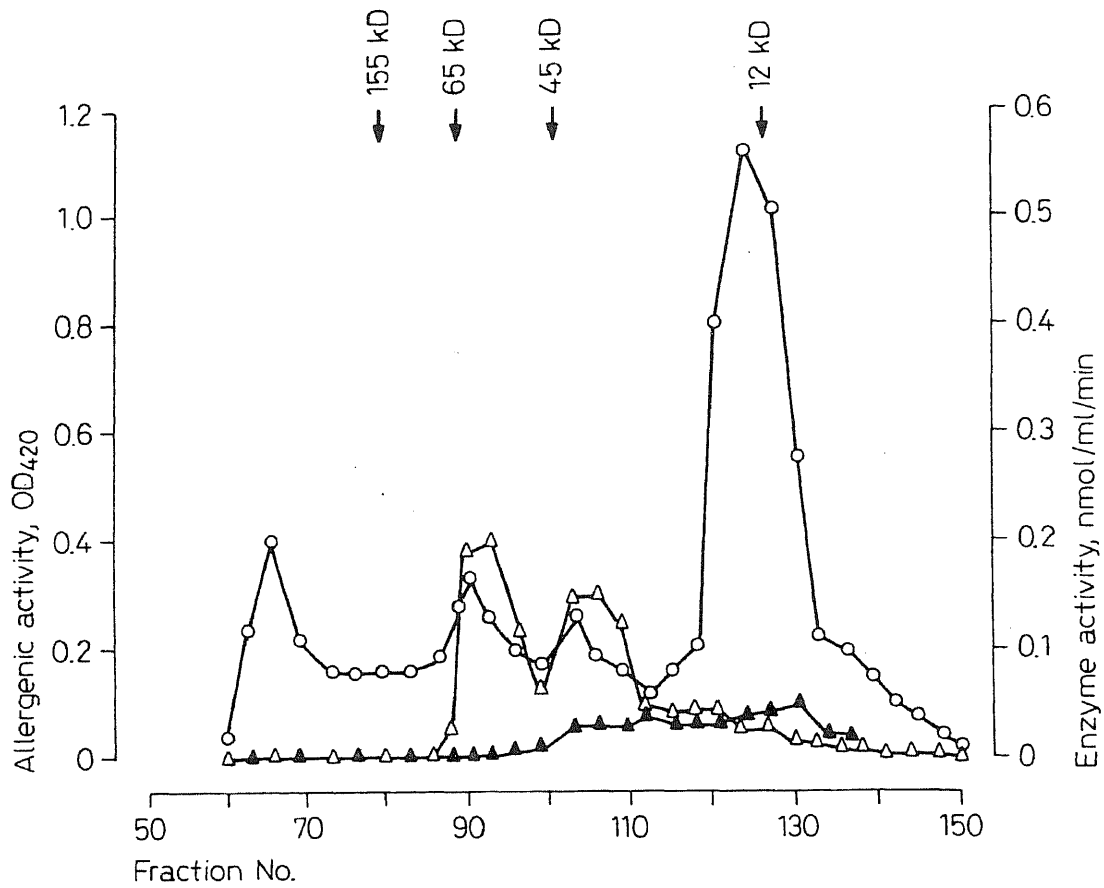


Fig. 1-9. Gel filtration pattern of supernatant. The supernatant of the ammonium sulfate fractionation (60% saturation) was applied to a Sephacryl S-200 column, and each 10 ml of the eluate was collected. The allergenic activity (○) against anti-mite human IgE was detected by ELISA, and protease activities were measured using Boc-Val-Leu-Lys-MCA (△) and Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (▲).

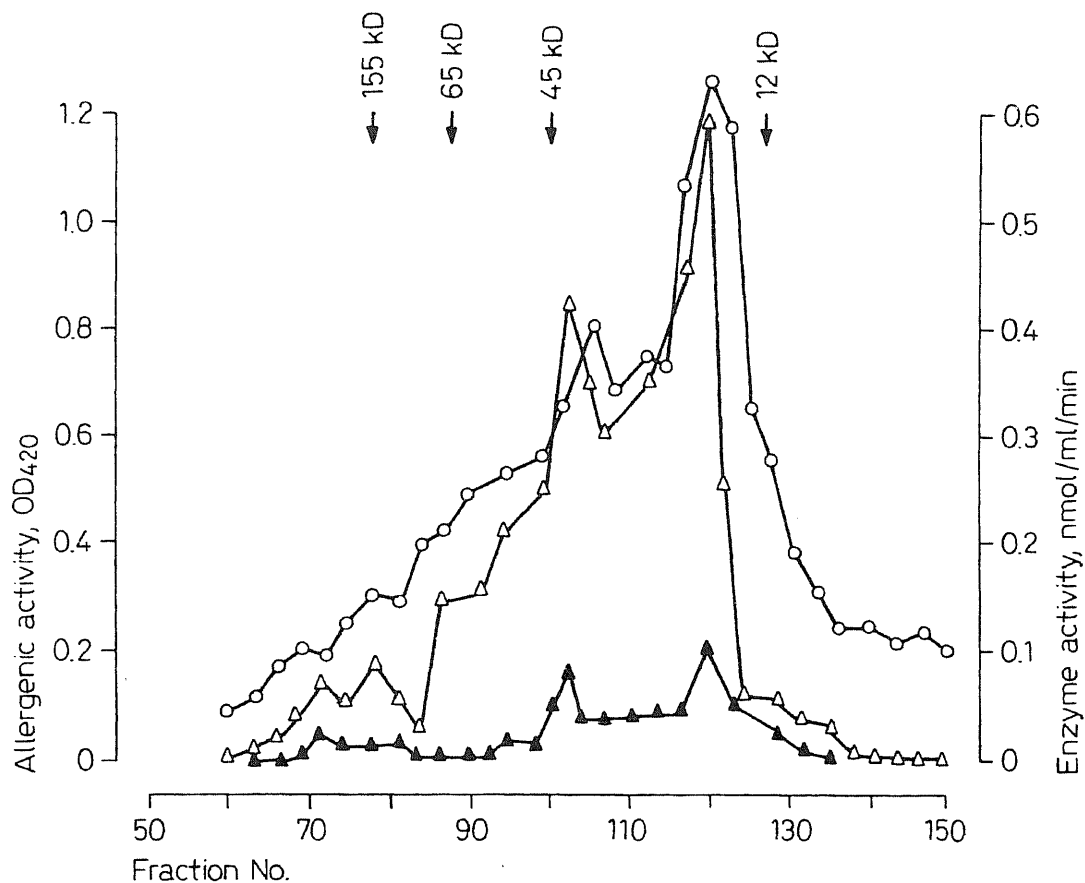


Fig. 1-10. Gel filtration pattern of precipitate. The precipitate of the ammonium sulfate fractionation (60% saturation) was applied to a Sephacryl S-200 column, and each 10 ml of the eluate was collected. The allergenic activity (○) against anti-mite human IgE was measured by ELISA, and protease activity was detected using Boc-Val-Leu-Lys-MCA (△) and Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (▲).

④ C M E を Sephacryl S-200 でゲルクロマトグラフィーを行うと分子量の異なる3種のプロテアーゼ活性が検出された。

⑤ PK.1プロテアーゼはMW60kDa 付近の位置に検出され、基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCAc および Boc-Val-Leu-Lys-MCA を加水分解し、この活性は aprotinin, MR-20, FUT-175 や SBTI などのセリンプロテアーゼ阻害剤によって阻害を受けた。

⑥ PK.2 および PK.3 プロテアーゼは各々 MW 約 30 および 20kDa の位置に検出され、基質 Boc-Val-Leu-Lys-MCA および Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA を加水分解し、この活性は TLCK, leupeptin やヨード酢酸によって阻害を受け、システインや EDTA によって活性化された。

⑦ PK.3 プロテアーゼ活性は 60% 飽和硫酸の沈殿分画に存在し、この分画には同時に強いアレルギー活性が検出された。

考察

C M E に対する抗体を受身感作したモルモットに C M E と色素の混液を静脈内投与すると、投与された動物は全身での血管透過性が亢進するとともにアナフィラキシー様反応を発症し死亡した。この原因として以下の3つの原因が推測された。①皮内に注射した抗体の力価が強すぎたため、抗体が皮内局所にとどまらず全身的に受身感作されてしまった。②ダニ抗原は通常環境中に存在するため、正常と思われたモルモットがすでに自然感作を受けていた。③モルモットは、アレルギー反応以外の非免疫的な作用で死亡した。

本反応がアレルギー反応に起因するのか、非アレルギー反応なのかを証明するのに最も直接的かつ簡便な方法は、測定感度の点から

RAST法、ELISA 法等を用い in vitro で抗原特異的抗体を証明することである。しかしこれらの方法を実施するための抗体（抗モルモットIgE 抗体）は世界においてまだ作製されていなかった。そこで別の方法で証明しようと試みた。

①の可能性を否定するためには、抗体を投与していない正常のモルモットで本現象が発現するかどうか検討するのが適切である。そこで正常モルモットにCMEと色素の混合液を静脈内投与した。その結果、8例全例に血管透過性の亢進と8例中6例にアナフィラキシー様反応が観察された。このことから、皮内に注射した抗体の力価が強すぎたため、抗体が皮内局所に止まらず全身的に受身感作されてしまった可能性は否定できた。

次に②の可能性について検討を加えた。自然の状態で感作を受ける動物モデルとしては、Inoら²⁹⁾の報告するダニ自然感作イヌ、Pattersonら³⁰⁾の報告するブタクサ自然感作イヌ、スギ花粉自然感作サル³¹⁾などが報告されているが、モルモットでの報告はない。先にも述べたが、自然感作を受けているかどうかを証明するためには、in vitro で抗原特異的IgE 抗体を証明するのが確実であるが不可能であった。そこで、in vivo での証明を試みた。本反応がアレルギー性の反応である場合、ヒスタミン等の化学伝達物質が介在するはずである。そこで抗ヒスタミン剤を前処置すれば本反応が抑制されるものと推測した。実験を行った結果、ジフェンヒドラミン前処置により、血管透過性の亢進は軽度抑制されるにすぎなかった。本実験で用いたジフェンヒドラミンの投与量は、モルモットにおけるアレルギー反応を完全に抑制できる量であることがすでにわかっ

ていた。このことから、モルモットが自然感作を受けている可能性が否定できた。

さらに、③の可能性について検討を加えた。Nagataら³²⁾は、ヒト血漿にハウスダストを添加すると、補体系が活性化することを報告している。補体系は、血液凝固・線溶系、カリクレインーキニン系などと密接に関連する³³⁾。すなわち、補体系が活性化すれば血液凝固・線溶系およびカリクレインーキニン系が活性化する可能性が考えられる。補体系の活性化の結果として生じるC3a およびC5aは、アナフィラトキシンとして働く。カリクレインーキニン系の活性化として生じるキニン類は、血管透過性を亢進させると共にショック症状を引き起こす。凝固・線溶系の活性化は、血栓を誘発する。そこで、in vivoにおいてCMEがこれらの系を活性化しているのどうか検討した。FUT-175は、補体系、血液凝固・線溶系およびカリクレインーキニン系に関与するセリンプロテアーゼの強力な阻害薬である。そこで、FUT-175前処理により本反応が抑制されるかどうか検討した。その結果、FUT-175前処置はCME誘発によるモルモットの血管透過性亢進およびアナフィラキシー様反応を強く抑制した。このことから、CMEがこれらの系を活性化している可能性が考えられた。そこで次ぎに、CMEが補体系、血液凝固・線溶系、カリクレインーキニン系などを活性化していることをex vivoにて直接証明することとした。CMEをモルモットに静脈内投与し、血漿を得、血漿中のパラメーターを測定した。補体系の活性化の指標として補体価(CH50)を、血液凝固・線溶系の活性化の指標として、anti-thrombinIII(ATIII)を、また血中のトリプシン様プロテア

ーゼの総活性を測定した。その結果、CME投与によりCH50およびAT IIIは枯渇により低下するとともに、トリプシン様プロテアーゼの総活性が上昇し、生体内において補体系、血液凝固・線溶系が活性化している可能性が示唆された。さらに、in vitroにおいて血漿にCMEを添加し、これらの系が活性化するかどうか検討を加えた。その結果、反応時間に依存し、トリプシン様プロテアーゼの総活性の上昇およびCH50の低下が観察された。以上 in vivo, ex vivo および in vitro の3つの実験系を通じ、CMEが各種酵素系を活性化し、これが in vivo で認められた全身の血管透過性亢進およびアナフィラキシー様反応の原因となっている可能性を証明した。

CMEが血中のプロテアーゼを活性化する場合、2つのメカニズムが考えられる。1つは、CME自身がエンドトキシンのように振る舞い、生体内のプロテアーゼを活性化するというメカニズムである。エンドトキシンは、血中の補体系、血液凝固・線溶系、カリクレインーキニン系を活性化させることが知られている³⁴⁾。もう一つは、CME中にプロテアーゼが存在し、このプロテアーゼが、血中の補体系、血液凝固・線溶系、カリクレインーキニン系を活性化させるというようなメカニズムである。急性膵炎のような病態の場合、消化酵素のトリプシンが血中に遊離され、これが血中の補体系、血液凝固・線溶系、カリクレインーキニン系を活性化させることが知られている³⁵⁾。そこでCME中にプロテアーゼが存在するかどうか検討した。その結果、CME中にトリプシン様セリンプロテアーゼが弱いながら存在し、CMEを血漿に添加すると、トリプシン様セリンプロテアーゼ活性が増加する現象が認められた。すなわち

、CMEを血漿に添加した場合、CME中に存在するトリプシン様セリンプロテアーゼが、補体系、血液凝固・線溶系、カリクレイン-キニン系に關与するトリプシン様セリンプロテアーゼを活性化するメカニズムが示唆された。

前述の in vivo の実験では、FUT-175 を用いることによりCMEを投与した生体内において、補体系、血液凝固・線溶系、カリクレイン-キニン系の活性化が關与する可能性を示唆した。FUT-175 は、補体系に關与するセリンプロテアーゼのC1s, C1r等を抑制すると共に、血液凝固・線溶系のthrombin, plasmin, カリクレイン-キニン系のカリクレインなどを幅広く抑制する³⁶⁾。CME投与による生体での血管透過性の亢進には、これらの系のうちどの系の活性化が重要なのか、in vivo でさらに検討を加えた。aprotinin は、カリクレインおよびplasminの阻害薬であり、補体系および凝固系のセリンプロテアーゼを抑制しない³⁷⁾。CMEをモルモットの皮内に注射した場合に発現される血管透過性の亢進をaprotininが抑制するどうかを検討した。aprotininはCMEによる血管透過性の亢進を有意に抑制したことから、カリクレイン-キニン系の活性化がCME中のトリプシン様プロテアーゼによる血管透過性の亢進に重要であると思われた。

さらにCME中に存在するプロテアーゼについて詳細な検討を行った。すでにStewardら³⁸⁾は、ダニ抽出エキス中の酵素とアレルギーとの関連を報告している。彼等はAlkaline phosphatase等を含む19種類の酵素活性を測定し、15種類の酵素活性を検出している。交差免疫電気泳動を用いた実験で、アレルギー活性を有すると思わ

れる酵素は、esterase, acid phosphatase, B-glucuronidaseの3種であると報告している。トリプシンおよびキモトリプシン活性も同時に測定しているが、これらプロテアーゼ活性は検出されなかったと報告している。しかし、先に述べたように、MCA基質を用いた場合、CME中にトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。この違いは主に、彼等の用いたApi-Zym systemは発色基質であり、蛍光基質であるMCA基質を用いた測定法に比べて、感度が低いためにプロテアーゼ活性が検出されなかったと思われる。

次に、CME中のプロテアーゼについてゲルクロマトグラフィーを行いそのcharacterizationを行った。Sephacryl S-200ゲルクロマトグラフィーを行うと分子量の異なる3種のプロテアーゼ活性が検出された。PK.1プロテアーゼはMW60kDa付近の位置に検出され、C末端側にアルギニンやリジンを有する合成ペプチド基質Boc-Phe-Ser-Arg-MCAおよびBoc-Val-Leu-Lys-MCAを加水分解し、その至適pHは7.0-8.0であった。またPK.1の活性はaprotinin, MR-20, FUT-175やSBTIなどのセリンプロテアーゼ阻害剤によって阻害を受けた。セリンプロテアーゼは活性中心がセリン残基であり、その基質特異性から3種のグループに分類される。トリプシン様プロテアーゼ、キモトリプシン様プロテアーゼとエラスターゼである。トリプシン様プロテアーゼはリジンやアルギニンのC末端側のペプチド結合を特異的に加水分解し、キモトリプシン様プロテアーゼはチロシンやフェニルアラニンのC末端側のペプチド結合を特異的に加水分解する。一方エラスターゼはアラニンのC末端側のペプチド結合を特異的に加水分解する。PK.1プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ阻害

剤によって特異的にその活性が阻害され、しかもリジンやアルギニンのC末端側のペプチド結合を特異的に加水分解することより、ダニ由来のセリンプロテアーゼでトリプシン様プロテアーゼに属するものであると思われる。一方PK.2およびPK.3プロテアーゼはTLCKやleupeptin、ヨード酢酸によって阻害され、aprotinin、MR-20やFUT-175などのセリンプロテアーゼ阻害剤では阻害されなかった。代表的なシステインプロテアーゼであるパインやカテプシンBはTLCKやleupeptin、ヨード酢酸によって阻害を受け、システインによって活性化されることが知られている³⁹⁻⁴²⁾。またカテプシンBの至適pHは酸性領域である³⁹⁾。以上各種阻害剤ならびに至適pHの実験結果より、PK.2およびPK.3プロテアーゼは、カテプシンBなどのようなシステインプロテアーゼであると思われる。

またPK.3プロテアーゼは、CMEの60%飽和硫酸沈殿分画に存在し、しかもゲルクマトグラフィーでの分子量が20kDaであることは、ダニの主要アレルゲンの1つであるDerf1の物理化学的性質と一致していた⁷⁾。よって、PK.3プロテアーゼは、Derf1である可能性が示唆された。

第 2 章 C M E 中 に 存 在 す る シ ス テ イ ン プ ロ テ ア ー ゼ の 精 製

C M E 中 に 存 在 す る シ ス テ イ ン プ ロ テ ア ー ゼ (PK.3) は、60% 飽和硫安沈殿分画に存在し、ゲルクロマトグラフィーでの分子量が20kDaであった。この物理化学的性質はダニの主要アレルゲンの1つであるDer f 1の性質と類似していた。しかもシステインプロテアーゼ活性分画に強いアレルゲン活性が検出されたことより、両者の関連が第1章において示唆された。

そこで本章においてはダニ粗抗原抽出エキスよりシステインプロテアーゼ活性を指標にしてこの酵素を精製し、これがDer f 1と同一分子であるかどうか論ずる。

2 - 1) 実 験 材 料 お よ び 方 法

C M E 凍 結 乾 燥 末 の 調 製 : 第 1 章 と 同 じ

抗 C M E 血 清 の 調 製 :

C M E 凍 結 乾 燥 末 の saline 溶 液 (4 mg/ml) を 等 量 の complete Freund's adjuvant (ディフコ社) と 混 じ、その 1 ml を ウ サ ギ (New Zealand White) の 皮 下 腎 筋 数 ケ 所 に 1 週 間 隔 で 計 6 回 注 射 し た。最 後 の 注 射 か ら 10 日 目 に 全 採 血 を し、ウ サ ギ 抗 C M E 抗 体 を 得 た。ウ サ ギ 抗 Der f 1 血 清 お よ び Der f 1 標 品 は、安 枝 博 士 (国 立 相 模 原 病 院) よ り 供 与 さ れ た。

ゲル内沈降反応：

ゲル内沈降反応はオクテロニーの方法に従って行った⁴³⁾。

システインプロテアーゼ活性の測定：

基質に Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (ペプチド研究所) を用いた。0.1 ml のカラム分画に、0.1 M PB (pH 6.0) に溶解した上記基質溶液 (10 μ mol) 0.8 ml, 活性化剤として 0.02 M システイン 0.05 ml と 0.02 M EDTA 0.05 ml とを混合し、反応溶液を計 1 ml とした。37°C 30 分間インキュベート後、15% 酢酸 2 ml を加え反応を停止させた。その後の蛍光強度の測定は第 1 章の方法に準じた。

システインプロテアーゼの精製：

精製方法を Fig. 2-1 に示した。1.5 グラムの C M E を 50 ml の 0.01 M PBS (pH 7.0) に溶解し、4 °C 1 時間攪拌した。次ぎにこの液を遠心 (10,000g, 4°C, 1 時間) し、上清分画を得、これに 100% 飽和硫酸溶液を添加し、60% 飽和硫酸になるように調製した。遠心 (10,000g, 4°C, 1 時間) し、60% 飽和硫酸沈殿分画を 0.02 M の PB (pH 6.0) 10 ml に溶解し、同緩衝液に対して透析して硫酸を除いた後、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel (ファルマシア社) カラム (1.5 X 10 cm) を用いて溶出し、さらに 0-0.3 M NaCl で直線的溶出を行った。非吸着分画中の強いシステインプロテアーゼ活性を示す分画を集めプールし、これを Fr.1 とした。Fr.1 を 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) で透析後、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel カラム (2.5 X 7.5 cm) を用いて溶出し、さらに緩衝液の pH を

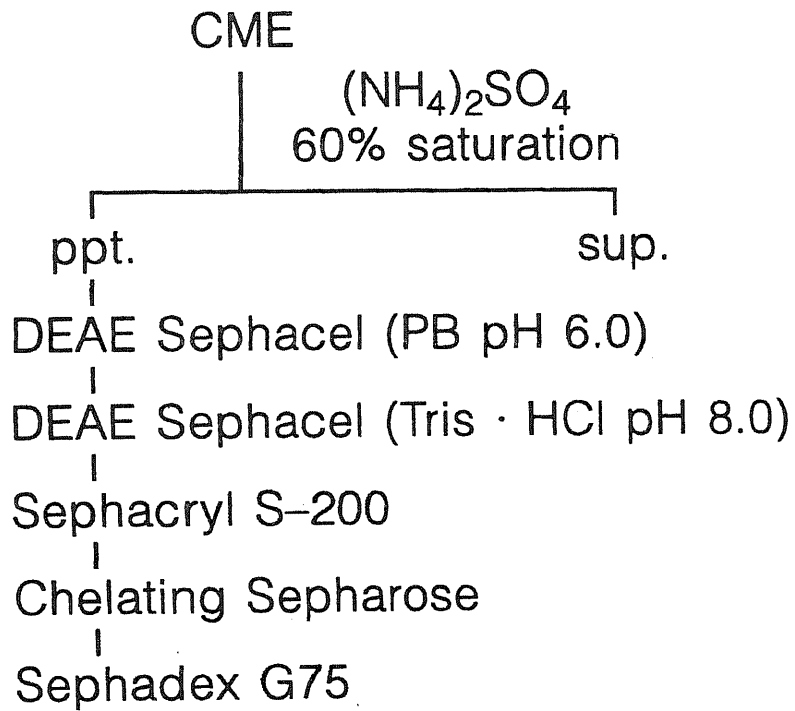


Fig. 2-1. Diagram of the isolation procedure for cysteine protease.
sup=Supernatant; ppt=precipitate.

変え、緩衝液の塩濃度を0.05 M Tris-HCl(pH 7.4)+0.2 M NaCl、0.05 M Tris-HCl(pH 7.4)+0.5 M NaClと高めて、段階的溶出を行った。強いシステインプロテアーゼ活性の認められた0.05 M Tris-HCl(pH 7.4)+0.2 M NaCl溶出分画を集めてFr.2とした。45mlのFr.2をPM-10 メンブレン (アミコン社) を用いて限外濾過法により6.5 mlに濃縮した。次ぎにFr.2を0.02 M PBS(pH 6.0)で平衡化したSephacryl S-200(2.5 X 88 cm)を用いてゲルクロマトグラフィーを行った。システインプロテアーゼ活性の認められた分画をプールし (Fr.3:90ml)を20 mlに濃縮し、0.05 M Tris-acetate (pH7.5)+0.5 M NaClで透析した。この試料を同緩衝液であらかじめ平衡化し、亜鉛を結合させたSephacryl S-200(2.5 X 88 cm)でキレートクロマトグラフィーを行い、pHを6.5, 5.5, 4.5と段階的に下げ溶出させた。システインプロテアーゼ活性の認められた0.05 M Tris-acetate(pH5.5)+0.5 M NaCl 溶出分画を集めプールし、これをFr.4とし3 mlに濃縮後、0.02 M PBS(pH 6.0)で平衡化したSephadex G-75 カラム (1.9 X 77 cm) でゲルクロマトグラフィーを行った。すべての操作において、280 nmの吸光度を蛋白の指標として、モニターした。

アレルギー活性の測定：

アレルギー活性の測定はSakaguchi ら⁴⁴⁾の蛍光ELISA法により行った。すべてのカラム分画物を0.1 M 炭酸緩衝液で100倍に希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロプレート (Immulon II ダイナテック社) に1 wellあたり0.05 ml 添加し、室温で1晩放置し

た。次いで1 wellあたり0.05%のTween 20を含むPBS (pH 7.4) 洗浄液0.3 mlで3回洗浄した。次いで3%ゼラチンを1 wellあたり0.3 ml添加し、ブロッキングを行った。上記洗浄液でプレートを3回洗浄後、5倍に希釈したヒト抗ダニプール血清 (RASTスコア>4) を1 wellあたり0.05 ml添加し室温で3時間インキュベートした。その後プレートを4回洗浄し、10倍希釈したβガラクトシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgE抗体 (ファルマシア社) を1 wellあたり0.05 ml添加し室温で16時間反応させた。プレートを4回洗浄後、0.1 mMの4-メチルウンベリフェリルβ-Dガラクトシド溶液を1 wellあたり0.1 ml添加し室温で2時間インキュベートした。次いで0.1 Mのグリシン-NaOH (pH 10.4) を1 wellあたり0.1 ml添加し反応を停止させた。遊離されてくる4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度 (Ex=365 nm, Em=450 nm) を、マイクロプレート用蛍光光度計 (MTP-22F コロナ電機) で測定した。10 μMの4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度を1000 F.I. (Fluorescence Intensity) とした。

N末端アミノ酸配列分析：

システインプロテアーゼの最終精製物についてさらにHPLCクロマトグラフィー (Model 130 A, Applied Biosystem社; カラム C8 300 A, 2.1 ID X 30mm) を行った。緩衝液Aは、0.1%トリフロロ酢酸、緩衝液Bは0.1%トリフロロ酢酸を含む70%アセトニトリルを用いて0から100%緩衝液Bまで直線的溶出を行った (流

速 0.2 ml/分)。精製したシステインプロテアーゼのN末端アミノ酸配列の決定は、gas phase protein sequencer (Model 471A, Applied Biosystems社) により行った。

アミノ酸組成分析：

アミノ酸組成分析は Waters Pico-Tag system により行った。

2-2) システインプロテアーゼの精製

CME の 60% 飽和硫酸沈殿分画を 0.02 M PB (pH 8.0) で平衡化した DEAE-Sephacel カラムを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った (Fig. 2-2)。強いシステインプロテアーゼ活性とアレルギー活性が非吸着分画に検出され、しかもこの分画の蛋白量は非常に多かった。吸光度 280 nm で 1.0 以上を示す分画をプールしこれを Fr. 1 とした。次ぎにこの Fr. 1 を 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した DEAE-Sephacel カラムを用いて再度陰イオン交換クロマトグラフィーにより段階的溶出を行った (Fig. 2-3)。0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) + 0.2 M NaCl で溶出される分画において強いシステインプロテアーゼ活性とアレルギー活性が検出された。この分画を Fr. 2 とし、これを Sephacryl S-200 でゲルクロマトグラフィーを行った結果を示したのが Fig. 2-4 である。システインプロテアーゼ活性のシングルピークが分子量約 20 kDa の位置に検出され、この部分を集めて Fr. 3 とした。一方、大部分の蛋白は void 分画に検出された。Fr. 3 を次ぎに亜鉛をキレートイオンとしたキレ

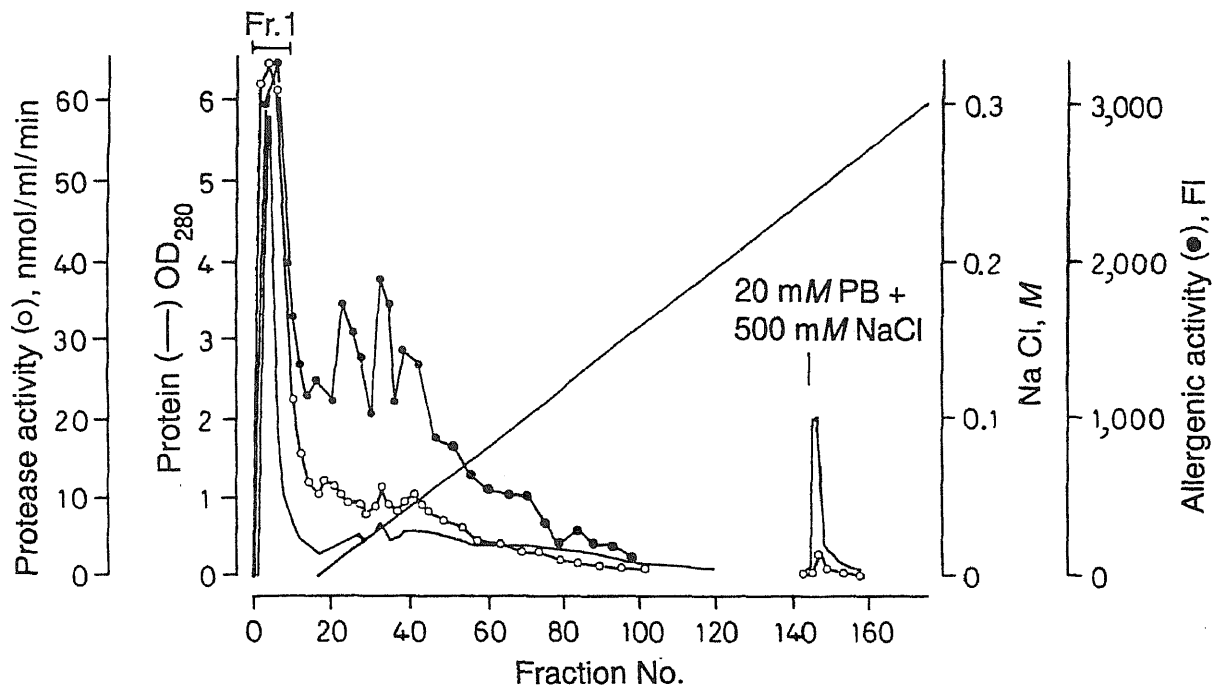


Fig. 2-2. Chromatography of the 60% ammonium sulfate precipitate of mites on a DEAE-Sephacel column (1.5x10 cm) equilibrated with 0.02 M PB (pH 6.0). The linear gradient elution was performed with 0.02 M PB (pH 6.0) containing sodium chloride from 0 to 0.3 M, and 5 ml of each eluate was collected. FI=Fluorescence intensity.

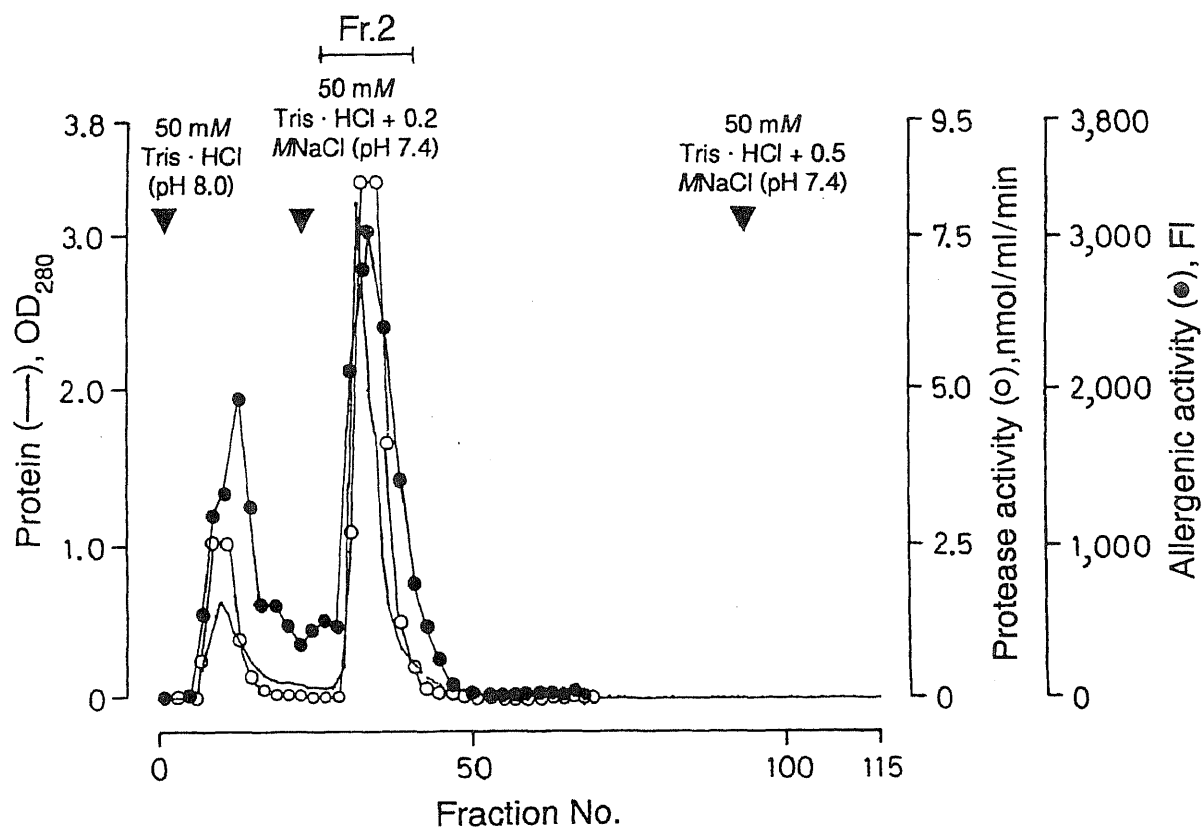


Fig. 2-3. Chromatography of Fr.1 (compare with fig.2) on a DEAE-Sephacel column (2.5 x7.5 cm) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0). The stepwise elution was performed with 0.05 M Tris-HCl, containing 0.2 M NaCl (pH 7.4), and 0.05 M Tris-HCl containing 0.5 M NaCl (pH 7.4). Aliquots of 5 ml were collected.

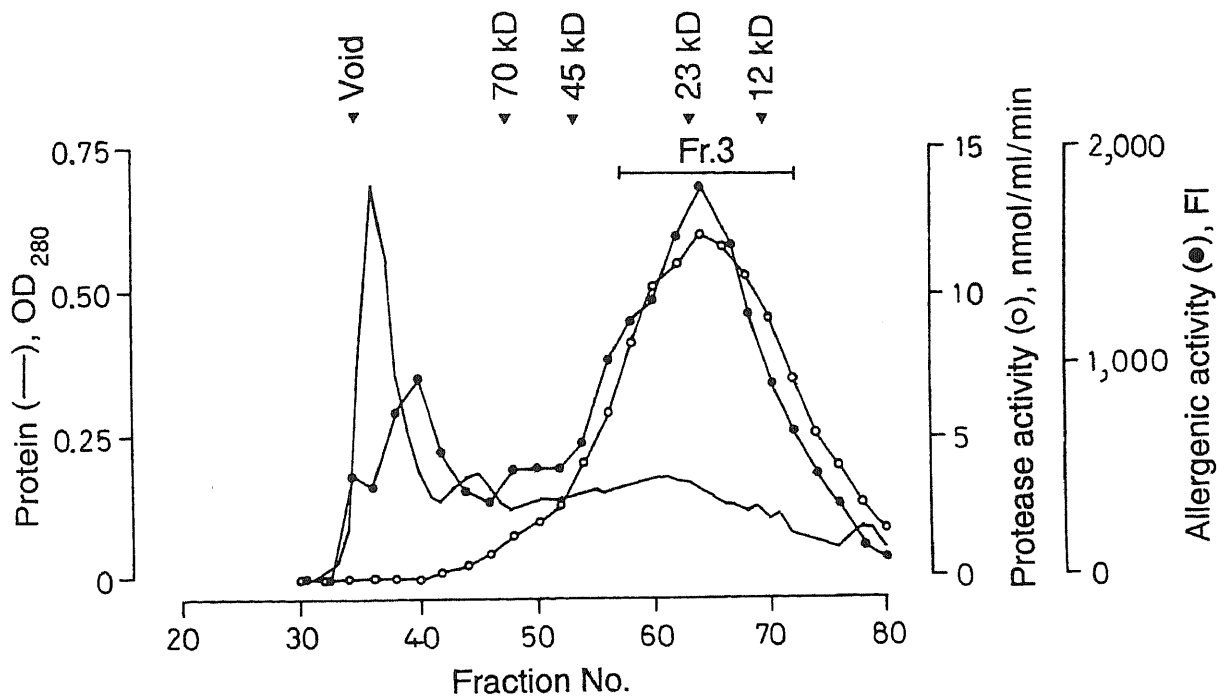


Fig. 2-4. Chromatography of Fr.2 (compare with fig.3) on a Sephacryl S-200 column (2.5 x 88 cm) equilibrated with 0.02 M PBS (pH 6.0), and 5 ml of each eluate was collected.

レートクロマトグラフィーを行った (Fig. 2-5)。強いシステインプロテアーゼ活性とアレルギー活性が 0.05 M Tris-acetate (pH 5.5) + 0.5 M NaCl で溶出される分画に検出され、この分画を Fr. 4 とした。Fr. 4 を Sephadex G-75 カラムを用いてゲルクロマトグラフィーを行った結果を示したのが Fig. 2-6 である。MW 20 kDa の位置にシステインプロテアーゼ活性、アレルギー活性並びに吸光度 280nm の蛋白が共に一致する単一ピークが得られた。ピーク分画は集められ、再度 55% 飽和硫酸分画を行いその沈殿分画を最終精製物とし、以下の実験に供した。なお最終精製物の比活性 (153 nmol/min/mg protein) は、出発材料 (CME) の比活性 (24 nmol/min/mg protein) に比べて約 6.5 倍に上昇した。

2-3) ゲル内沈降反応

最終精製物の精製度をゲル内沈降反応で確認した (Fig. 2-7)。この最終精製物および Der f I 標品について、Der f I に対して作製したウサギ抗 Der f I 抗体との間でゲル内沈降反応を行った。両者とも抗 Der f I 抗体との間に明瞭な 1 本の沈降線をつくり、しかもこれらの沈降線は fuse していた (Fig. 2-7a)。また最終精製物あるいは Der f I 標品とウサギ抗 CME 血清との間には fuse する明瞭な 1 本の沈降線が認められた。一方 CME と抗 CME 血清との間には数本の沈降線が検出された (Fig. 2-7b)。

2-4) N 末端アミノ酸配列

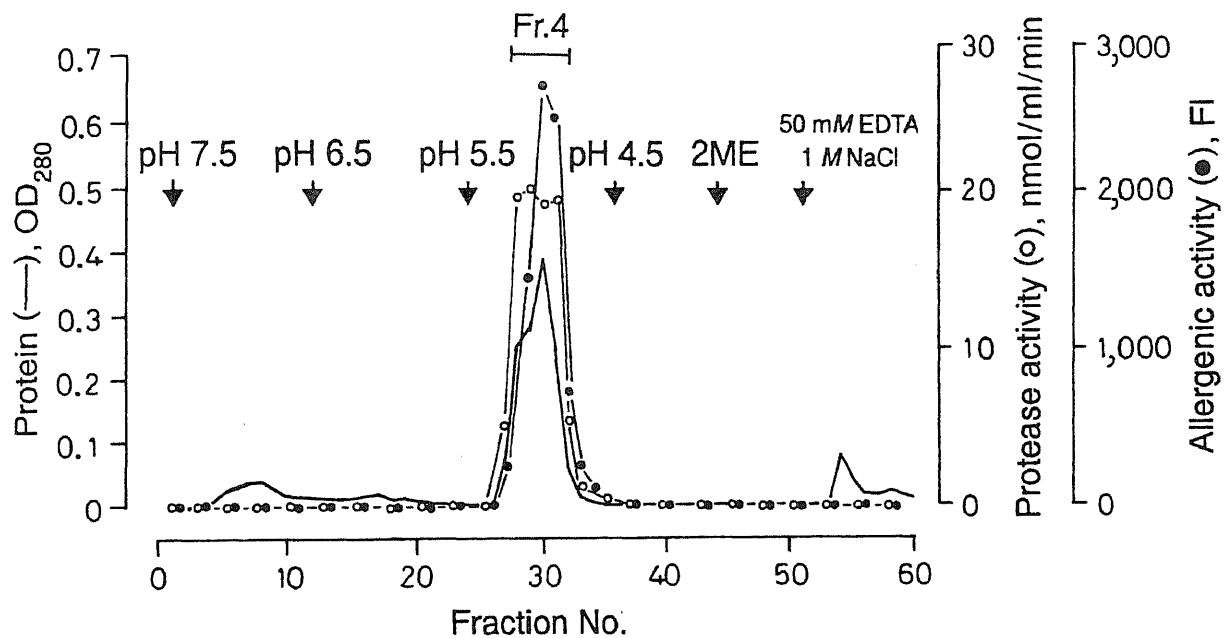


Fig. 2-5. Chromatography of Fr.3 (compare with fig.4) on chelating Sepharose 6B. The column (1.5 x 8 cm) was chelated with zinc ion and equilibrated with 0.05 M Tris-acetate containing 0.5 M sodium chloride (pH 7.5). The samples was eluted with a stepwise decrement in pH of the Tris-acetate buffer; pH 6.5, pH 5.5, pH 4.5. Aliquots of 5 ml were collected.

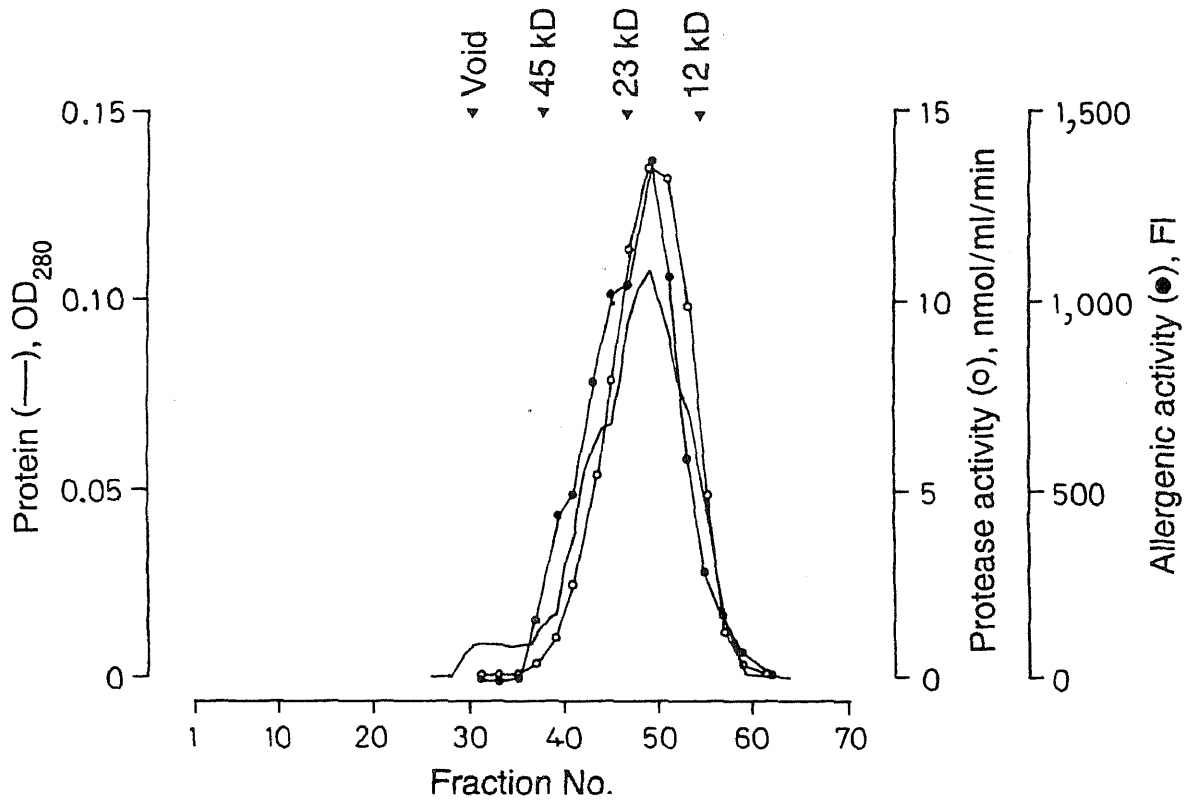
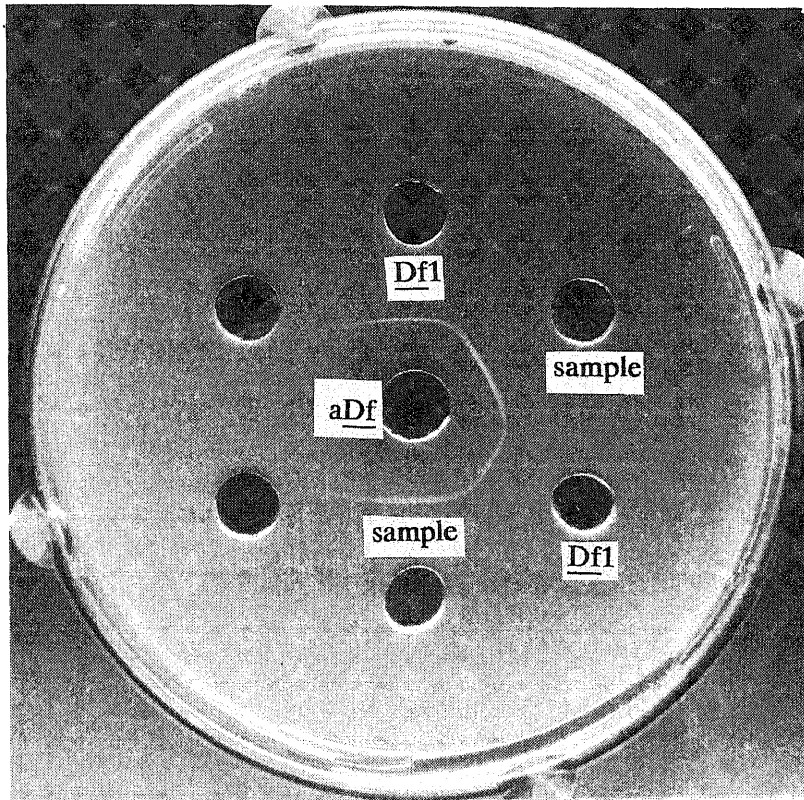
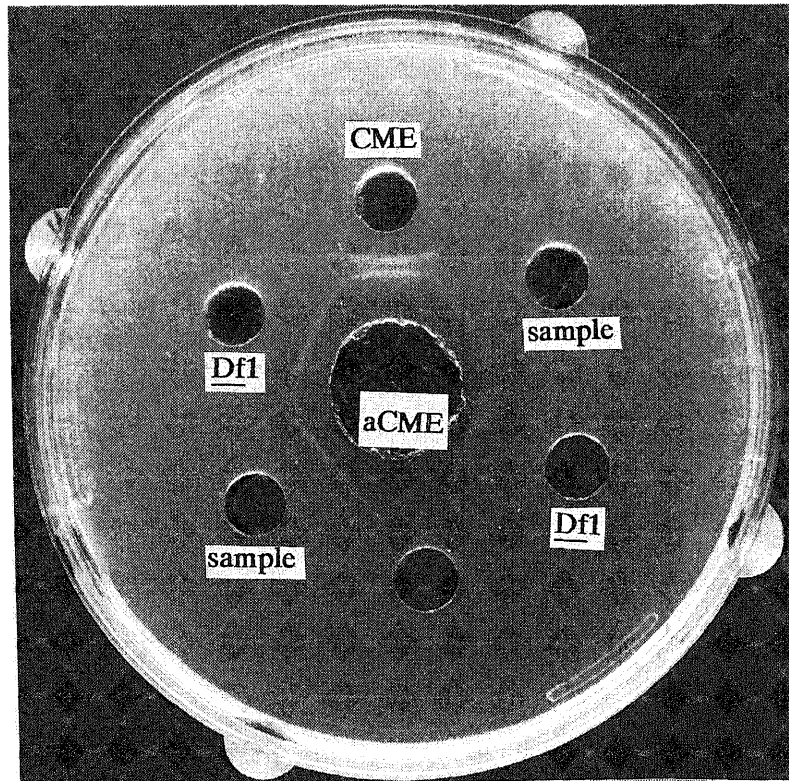


Fig. 2-6. Chromatography of Fr.4 (compare with fig.5) on a Sephadex G-75 column (1.9 x 77 cm) equilibrated with 0.02 M PBS (pH 6.0). Aliquots of 3 ml were collected.



a



b

Fig.2-7 Double immunodiffusion. a: Result between sample (the final preparation) and Der f I (DfI) with anti-Der f I (aDf) sera. b: Result between sample (the final preparation) and Der f I with anti-crude mite extract (aCME) sera.

最終精製物と Der f I の N 末端 10 残基のアミノ酸配列は、完全に一致した (Fig. 2-8)。

2-5) アミノ酸組成

最終精製物のアミノ酸組成は、すでに Yasueda ら⁴⁵⁾ によって報告されている Der f I のそれとほぼ同等であった (Table 2-1)。

2-6) 要約、考察

要約

① C M E の 60% 飽和硫安沈殿分画について DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィー、亜鉛キレートクロマトグラフィー、Sephacryl S-200, Sephadex G-75 ゲルクロマトグラフィーによりシステインプロテアーゼの精製を試みた

② 最終精製段階の Sephadex G-75 ゲルクロマトグラフィーにて、分子量 20 kDa の位置にシステインプロテアーゼ活性、アレルギー活性および吸光度 280 nm が共に一致する単一ピークが得られた。

③ 上記ピークの 55% 飽和硫安沈殿分画を最終精製物とし、最終精製物および Der f I 標品について、Der f I に対して作製したウサギ抗 Der f I 抗体との間でゲル内沈降反応を行ったところ、両者とも抗 Der f I 抗体との間に明瞭な 1 本の沈降線をつくり、しかもこれらの沈降線は fuse していた。

Cysteine protease

1

10

NH₂-Thr-Ser-Ala-Cys-Arg-Ile-Asn-Ser-Val-Asn-

Der f I

1

10

NH₂-Thr-Ser-Ala-Cys-Arg-Ile-Asn-Ser-Val-Asn-

Fig. 2-8. Sequence of N-terminal amino acids comparing cysteine protease and Der f I. Der f I sequence data were obtained from Heymann et al.[8].

Table 2-1 Amino acid analysis of cysteine protease and Der f I.
 Data of amino acid composition of Der f I was obtained from Yasueda
 et al. [44].

Amino acid	Residues /100 residues	
	Cysteine protease	Der f I
Asparatic acid	13.4	11.0
Theronine	5.8	5.7
Serine	8.3	6.7
Glutamic acid	12.9	13.0
Proline	3.2	3.2
Glycine	10.0	9.1
Alanine	6.6	6.5
1/2Cystine	2.2	2.4
Valine	4.7	6.4
Methionine	1.8	2.2
Isoleucine	4.7	7.4
Leucine	6.2	4.6
Tyrosine	6.2	7.3
Phenylalanine	2.7	1.7
Histidine	4.0	3.4
Lysine	1.0	1.3
Tryptophan		1.5
Arginine	6.3	6.7

④最終精製物のN末端10残基のアミノ酸配列はDer f Iのそれと完全に一致し、またアミノ酸組成もDer f Iのそれとほぼ同等であった。

考察

第1章においてCME中に少なくとも2種類のプロテアーゼすなわちトリプシン様プロテアーゼとシステインプロテアーゼが存在することが判明した。またシステインプロテアーゼの物理化学的性質(分子量や熱に対して不安定であることなど)がダニの主要アレルゲンの1つであるDer f Iのそれと類似していることから両者の関連が示唆された。そこでCME中のシステインプロテアーゼの精製を試み、Der f Iと同一分子であるかどうか検討した。システインプロテアーゼの精製を試みるにあたって、同時に存在するトリプシン様プロテアーゼの影響をなくす必要がある。予備実験の結果から基質にSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCAを用い、反応溶液のpHは6.0にし、システインプロテアーゼの活性化剤としてのシステインとEDTAを添加する系が最も適していることが判明した。よってこの測定系を用いて、第1章の結果より、CMEの60%飽和硫酸沈殿分画を出発材料とした。ダニの主要アレルゲンのクローニングに世界で最初に成功したChuaら¹⁶⁾は、グループIアレルゲンであるDer p Iのアミノ酸配列はパパイン、カテプシンBおよびアクチニジンなどのシステインプロテアーゼのアミノ酸配列と20%以上の相同性を示し、特に活性中心付近のアミノ

酸残基で顕著であると報告している。そこでヒトやラットのカタプシンBの精製法に従い⁴⁶⁾、ダニのシステインプロテアーゼの精製を試みた。Barrettらは、0.02 M PB(pH 6.0)で平衡化したDEAE陰イオン交換クロマトグラフィーでこれらカタプシンBがカラムに吸着することを報告しているが、ダニのシステインプロテアーゼは吸着しないことより、等電点が両者では異なることが示唆された。システインプロテアーゼ活性の強い非吸着部分について、再度pHを変えてDEAE陰イオン交換クロマトグラフィーさらにはSephacryl S-200ゲルクロマトグラフィーを行った。その結果システインプロテアーゼ活性はMW 20kDaの位置に検出された。予備実験によりダニのシステインプロテアーゼは亜鉛イオンによって、その活性が阻害されることが分かっていたので、次ぎのカラムワークとして亜鉛イオンを用いたキレートクロマトグラフィーを行った。システインプロテアーゼ活性は、0.05 M Tris-acetate(pH 5.5)+0.5 M NaClで溶出された分画に単一ピークとして検出された。さらにSephadex G-75でゲルクロマトグラフィーを行ったところ分子量20 kDaの位置にシステインプロテアーゼ活性、アレルギー活性および吸光度280 nmが共に一致する単一なピークが得られた。さらにこのピーク部分より55%飽和硫酸沈殿分画を得て、これを最終精製物とした。最終精製物は、CMEの60%飽和硫酸沈殿分画に存在し分子量が20 kDaであり、強いアレルギー活性を有していた。さらにはこの精製物はゲル内沈降反応でウサギ抗Der f I体との間に明瞭な1本の沈降線を生じ、しかもこの沈降線はDer f I標品とウサギ抗Der f I抗体との間できた沈降

線と完全に fuse していた。また最終精製物と Der f I の N 末端 10 残基のアミノ酸配列は完全に一致し、また最終精製物のアミノ酸組成は、Der f I のそれとほぼ同等であった。以上のことより C M E から精製されたシステインプロテアーゼは、ダニの主要アレルゲンの 1 つである Der f I そのものであることが明らかにされた。またダニのシステインプロテアーゼがどの分画に存在するか、篩を用いて、ダニ培養物を分画した。28-100 mesh 分画物中には、飼料が含まれ、100-200 mesh 分画物中にはダニが含まれ、200 mesh 篩過物中には排泄物と卵が多量に含まれることが顕微鏡下観察された。これら 3 分画を各々抽出し、その抽出液中のシステインプロテアーゼ活性を測定したところ、排泄物の含まれる 200 mesh 篩過物中に最も強いプロテアーゼ活性が検出された (data not shown)。グループ I アレルゲンが排泄物に多く含まれると同様⁴⁷⁾、システインプロテアーゼも排泄物中に多く含まれることより、両者の関連が強く示唆された。

グループ I アレルゲンである Der f I がシステインプロテアーゼであることさらにこのものがダニの排泄物中に多量に含まれることは Der f I がダニの消化酵素である可能性を示唆している。Tovey らは⁴⁸⁾、Der p I に対するウサギポリクロナール抗体を用いて組織免疫を行い、消化管が強く染色された報告している。さらにシステインプロテアーゼ活性を指標にすれば、従来行なわれている、多くのステップからなる ELISA 法等の検出法に比べて、1 段階で、しかも 30 分という短時間で、Der f I を検出できる。このことは多量の Der f I を短時間に精製することを可能にし、

その結果この分子に関する多くの知見が得られ、ダニアレルギーの治療法等に有益な情報を与えるものと思われる。

第 3 章 ダニ排泄物抽出エキス (MFE) 中のトリプシン様プロテアーゼの精製

前章でダニの主要アレルゲン Der f I はシステインプロテアーゼであることを論じた。ところで Der f I は序論で述べたようにダニの排泄物由来のアレルゲンであるといわれている⁴⁷⁾。そこでダニ排泄物抽出エキス中のプロテアーゼ活性を測定したところ、システインプロテアーゼ活性と同時にトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。このトリプシン様プロテアーゼ活性は第 1 章で述べたダニ虫体抽出エキス中で検出された活性に比べて極めて強かった。一方 Heymann らおよび Steward らはダニの第 3 のアレルゲンである Der f III および Der p III を精製し、それらの N 末端 20 残基のアミノ酸配列がウシのトリプシンやスズメバチのキモトリプシンなどのセリンプロテアーゼと高い相同性があることを報告している^{14, 15)}。この章では、ダニ排泄物抽出エキス (Mite Faecal Extract: MFE) 中に検出されたトリプシン様プロテアーゼと Der f III との関連について述べる。

3-1) 実験材料および方法

MFE の調製 :

ダニ (D f) を動物飼料を入れた平底フラスコで、25°C, 75% の相対湿度の条件下で 1 ヶ月間培養した。このダニ培養物を 250

meshの篩で篩過し、得られたダニ排泄物分画（32.7グラム）を65 mlのsalineで30分間抽出した。これを遠心（10,000 g, 60 min, 4 °C）し、その上清をメンブレンフィルター（0.45 μm）で濾過し、この濾液をMFEとした。

トリプシン様プロテアーゼの精製：

MFE（655 ml）をポリエチレングリコール（MW 50kDa）を用いて200 mlに濃縮し、これを0.02 MのPB（pH 6.0）に透析後、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel カラム（15 X 150 mm）を用いて溶出し、さらに緩衝液のNaCl濃度を0から0.4 Mで直線的溶出を行った。0.15 M NaClで溶出された強いトリプシン様プロテアーゼ活性を含む分画をプールし、ポリエチレングリコールで10.1 mlに濃縮した。さらにこの濃縮液を硫酸塩析し、トリプシン様プロテアーゼ活性の強い60から80%の飽和硫酸沈殿分画を得、0.05 MのPB（pH 7.4）1 mlに溶解した。この試料をSuperdex 75 pg（ファルマシア社）カラム（26 X 800 mm）を用いてゲル濾過した。

トリプシン様プロテアーゼ活性の測定：

トリプシン様プロテアーゼ活性の測定には、トリプシンの合成基質であるBoc-Phe-Ser-Arg-MCA（ペプチド研究所）を用いた。測定方法は第1章の方法に準じた。他の合成基質、Boc-Gln-Gly-Arg-MCA（Factor XIIIa基質）、Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA（Factor Xa基質）、Boc-Glu-Lys-Lys-MCA（プラスミン基質）、Boc-Gln-Arg-Arg-MCA（プラスミン基質）、Boc-Val-Leu-Lys-MCA（プラ

スミン基質), Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (キモトリプシン基質), Suc-Ala-Ala-Ala-MCA (エラスターゼ基質), Ala-MCA (アミノペプチダーゼ基質)もペプチド研究所より購入した。また第1章で使用した以外のプロテアーゼ阻害剤として以下のものを使用した。p-aminobenzamidineはシグマ社より、antipain⁴⁹⁾、chymostatin⁵⁰⁾、pepstatin⁵¹⁾、E-64⁵²⁾は、ペプチド研究所より購入した。

アレルギー活性の測定法:

アレルギー活性の測定法は第2章の方法に準じた。喘息患者23名(男:13名、女:10名、年齢16-65歳)のダニプリック試験陽性のアレルギー患者血清(DfのRASTスコア>3)を使用した。

SDS ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE):

SDS-PAGEはLaemmliの方法に従い、4-20%のグラージェントゲルを用いて2-メルカプトエタノール還元条件下で行った⁵³⁾。

蛋白質の測定:

蛋白質の測定は、Bradford法⁵⁴⁾により標準蛋白としてウシ血清アルブミン(BSA)を用いて行った。

アミノ酸組成分析:

アミノ酸組成分析はWaters Pico-Tag systemにより行った。

精製したトリプシン様プロテアーゼと Der f III とのアミノ酸組成の比較は S Δ Q システムにより比較した⁵⁵⁾。

N 末端アミノ酸配列分析：

精製したトリプシン様プロテアーゼの N 末端アミノ酸配列分析は第 2 章の方法に準じた。

統計解析：

統計解析は Student's の t-test で行った。

3 - 2) トリプシン様プロテアーゼの精製

トリプシン様プロテアーゼの精製を行うにあたって、最も適当な出発材料を選択するために、ダニ虫体抽出エキス (Mite Body Extract: M B E = C M E)、ダニ培養物抽出エキス (Whole Culture Extract: W C E)、ダニ排泄物抽出エキス (M F E) 中のトリプシン様プロテアーゼ活性を比較した。M F E と W C E 中のトリプシン様プロテアーゼ活性は、M B E 中のトリプシン様プロテアーゼ活性よりも、各々 2,000 倍、1,000 倍強かった。さらに、SDS-PAGE による分析結果から M F E 中の蛋白質の種類は、W C E 中のそれよりも少なかったことより、ダニのトリプシン様プロテアーゼの精製のための出発材料を M F E に決定した。M F E を 0.02 M PB (pH 6.0) で透析後、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharcel カラムを用いて溶出し、さらに緩衝液の NaCl 濃度を 0 から 0.

4 M で直線的溶出を行った。0.15 M NaCl で溶出された分画に強いトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された (Fig. 3-1a)。これらの分画をプールし濃縮後、飽和硫酸分画を行ったところ、60% から 80% 飽和硫酸分画間において強いトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。この分画を集めて Superdex 75 pg カラムを用いてゲルクロマトグラフィーを行った。蛋白の主要ピークとプロテアーゼ活性のピークが一致した (Fig. 3-1b)。マーカー蛋白を基に推定したトリプシン様プロテアーゼの分子量は 34kDa であった。強いプロテアーゼ活性を示した分画 (Fr. 40-44) をプールし、還元条件下 4-20% のグラージェントゲルを用いて SDS-PAGE を行った (Fig. 3-2)。トリプシン様プロテアーゼは MW34kDa の位置に単一バンドとして検出された。各ステップでの比活性を Table 3-1 に示した。精製トリプシン様プロテアーゼの比活性は出発材料の M F E に比較して 13.5 倍に上昇し、収量は 300 μ g であった。

3-3) 精製トリプシン様プロテアーゼの酵素化学的性質

a) 至適 pH と至適温度

精製したプロテアーゼの至適 pH は 8.0 であり (Fig. 3-3a) であり、また至適温度は 47°C であった (Fig. 3-3b)。

b) 加熱による酵素活性への影響

精製プロテアーゼの活性は、37°C 1 時間の熱処理によりその活性が約 40% に低下した。また 56°C 20 分間の熱処理によりその活性

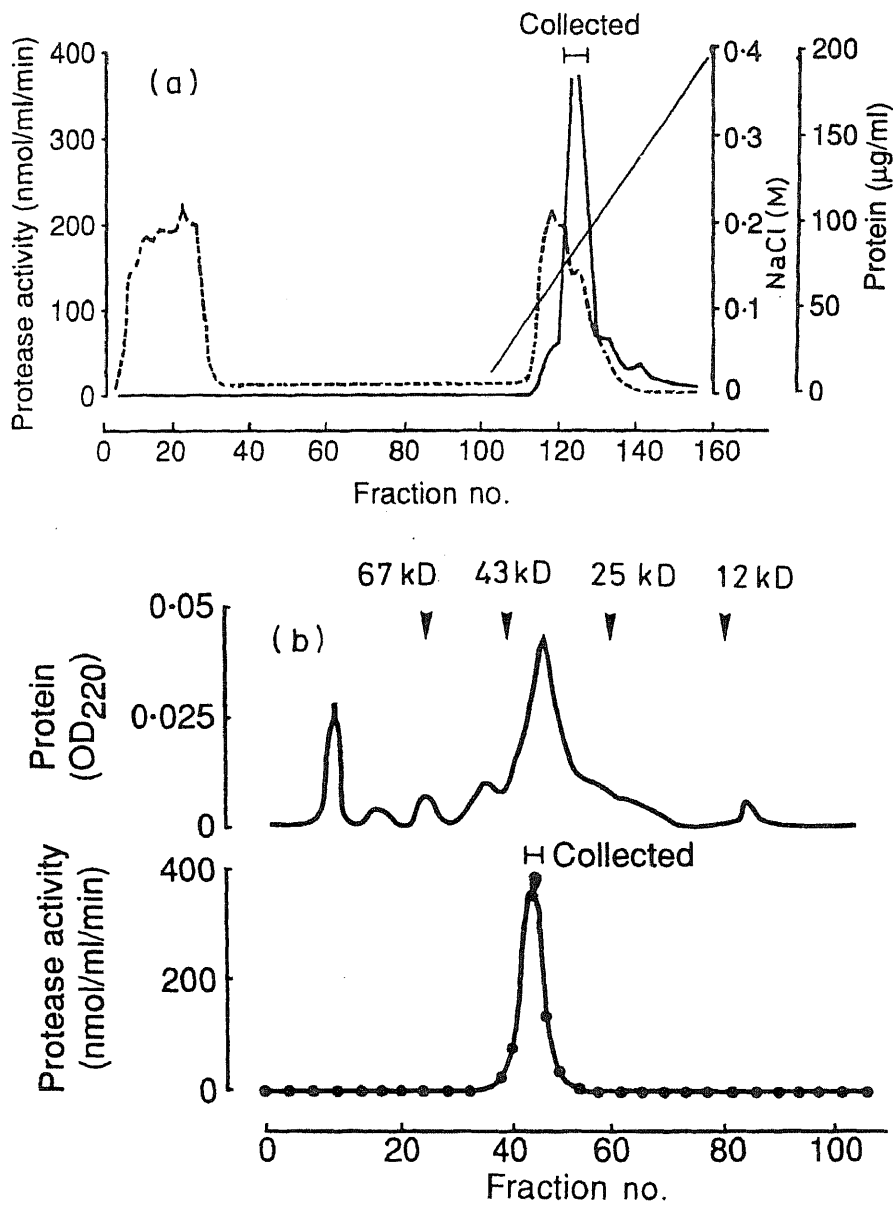


Fig. 3-1. Chromatographic patterns in purification steps of trypsin-like protease *D. farinae*. (a) Anion exchange chromatography on DEAE-Sephacel (1.5 x 15 cm) equilibrated with 0.02 M phosphate buffer (pH 6.0). The linear gradient elution was performed with 0.02 M phosphate buffer (pH 6.0) containing sodium chloride from 0-0.4 M (3 ml/tube). Fractions from 122 to 129 were collected to obtain the trypsin-like protease. —, protease activity. — — —, protein. (b) Gel chromatography on Superdex 75 pg (2.6 x 80 cm; 3 ml/tube). Fractions from 40 to 44 were collected.

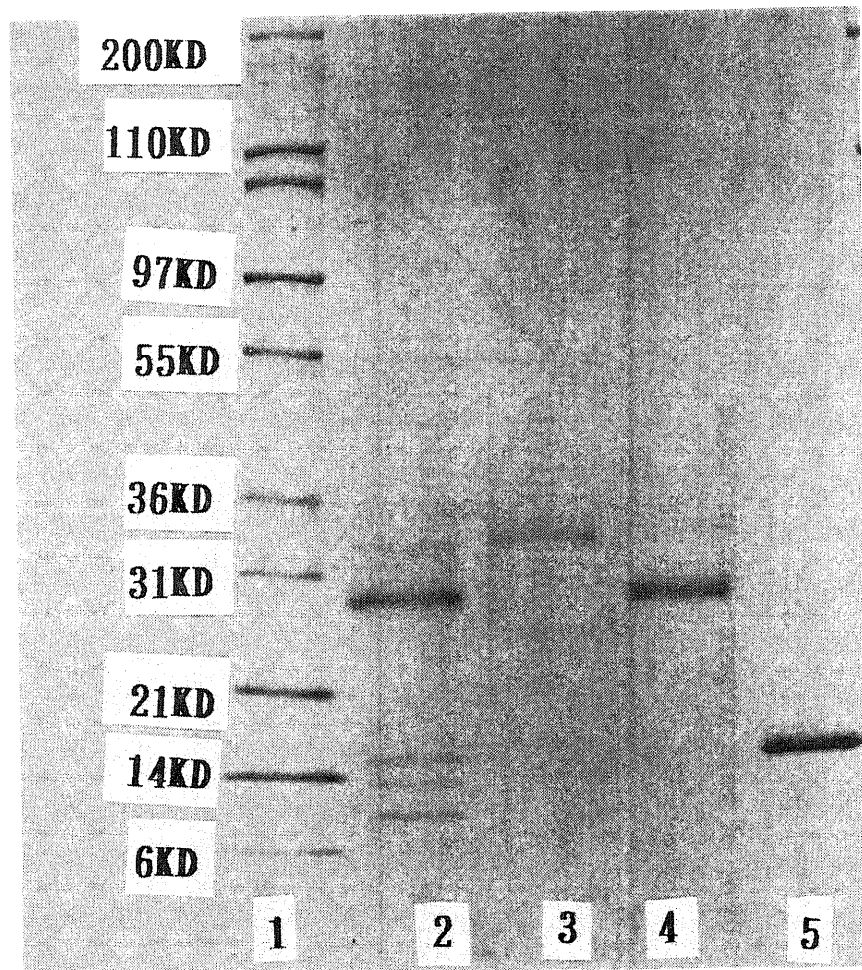


Fig. 3-2. SDS-PAGE pattern of purified trypsin-like protease from *D.farinae*. Samples were analysed on 4-20% gradient acrylamide gel under reducing conditions. Lane 1, marker protein. Lane 2, starting material (MFE). Lane 3, purified trypsin-like protease. Lane 4, Der f I. Lane 5, Der f II.

Table 3-1 Purification of mite trypsin-like protease

Purification step	Specific activity		Purification factor
	u/ μ g protein		
Extraction	1817	1.0	
DEAE-Sephacel	14677	8.0	
Superdex 75 pg	24354	13.5	

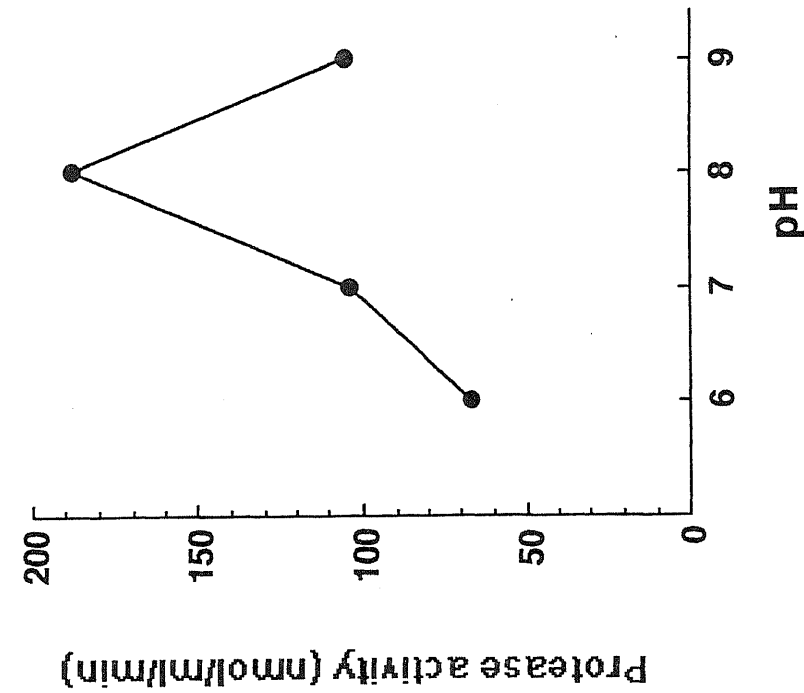


Fig. 3-3a Effect of pH on the activity of purified trypsin-like protease. Protease activity was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA in 0.1 M PB (pH 6.0 and 7.0) and 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0 and 9.0).

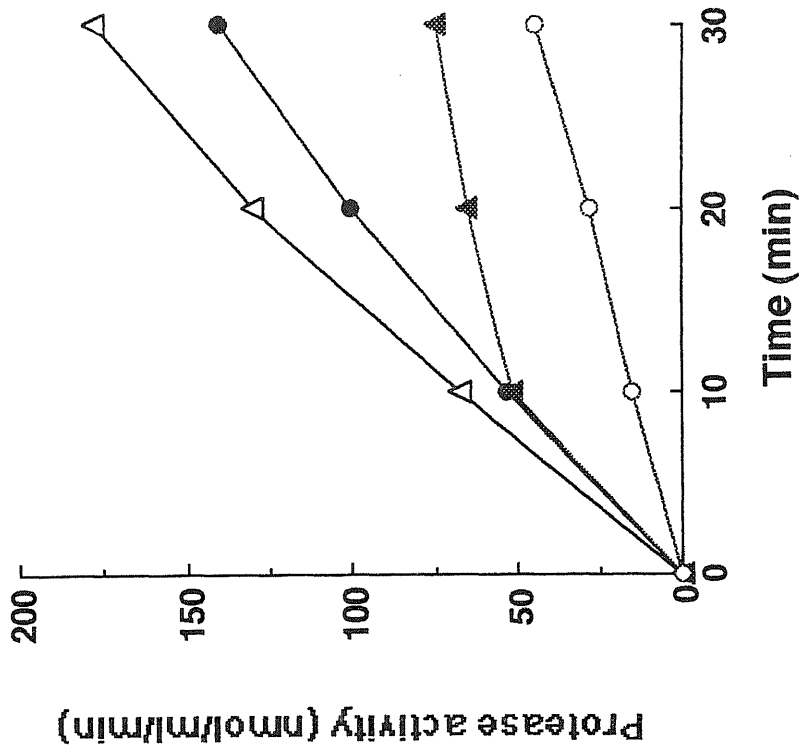


Fig. 3-3b Optimum temperature. Protease activity was measured at various temperature (○ 25°C, ● 37°C, △ 47°C, ▲ 56°C) using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0).

は完全に失活した (Fig. 3-4)。

c) 基質特異性

各種セリンプロテアーゼや他のクラスのプロテアーゼに対する合成基質を用いて、精製プロテアーゼの基質特異性を検討した。このプロテアーゼはアルギニンやリジンのC末端側のペプチド結合を比較的特異的に加水分解した (Fig. 3-5)。

d) 阻害剤の影響

精製したプロテアーゼの活性は、SBTI, leupeptinやFUT-175 などのようなトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤によって阻害されたが、システインプロテアーゼの阻害剤であるE-64やヨード酢酸、キモトリプシンの阻害剤であるキモスタチンあるいはアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチンによっては阻害されなかった (Table 3-2)。

3-4) 精製トリプシン様プロテアーゼのアレルゲン活性

ダニ (Df) に感作された23名の喘息患者の血清を用いて、精製トリプシン様プロテアーゼのアレルゲン活性を調べた (Fig. 3-6)。トリプシン様プロテアーゼの陽性率は70%であり、主要アレルゲンのDer f I およびDer f IIの陽性率79%、83%と同様に高かった。これら3種類の精製アレルゲン間においては、アレルゲン活性に統計的に有意な差は認められなかった (トリプシン様プロテ

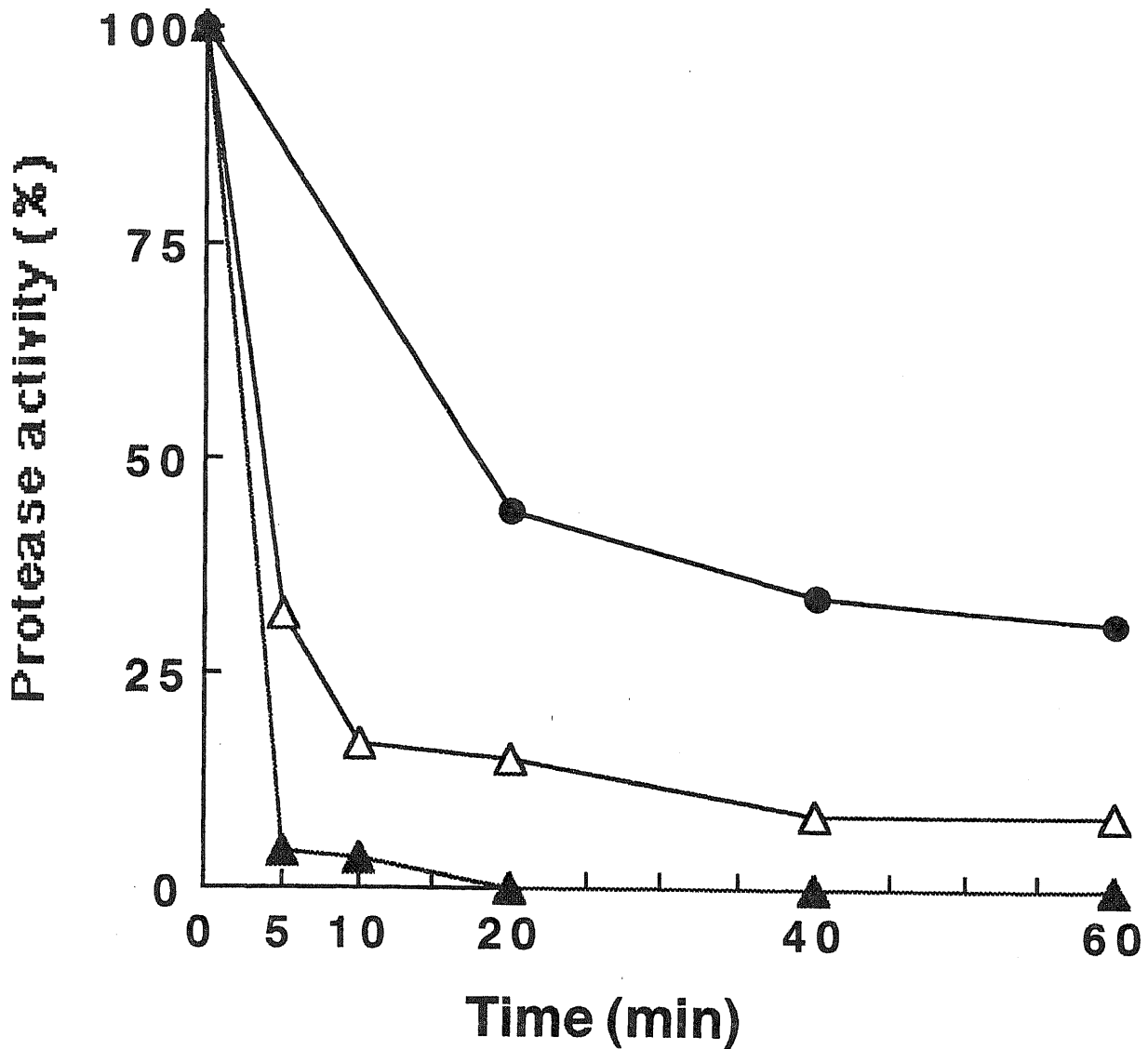


Fig. 3-4. Effect of heating on the activity of purified trypsin-like protease. Protease was incubated with 37(●), 47(△), 56(▲)C for 5-60 min in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), and the remaining activity was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0).

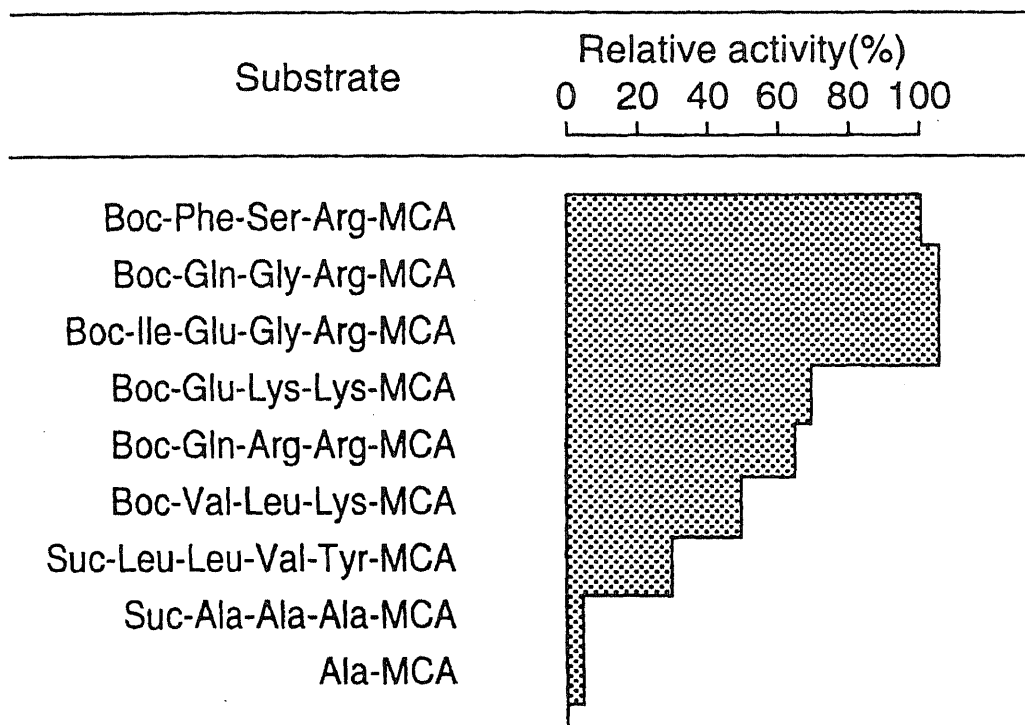


Fig. 3-5. Substrate specificity of purified trypsin-like protease. Trypsin-like protease was incubated with various synthetic substrates, and the protease activities were compared with that obtained by using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA.

Table 3-2 Effects of various inhibitors on the activity of the purified trypsin-like protease

Material	Concentration (μ m)	Inhibition (%)
Aprotinin	1 KIU/ml	99.6
SBTI	1	99.3
TLCK	100	50.0
<i>p</i> -aminobenzamidine	1000	57.9
FUT-175	1	99.4
Leupeptin	1	98.0
Antipain	10	91.8
TPCK	10	0
Chymostatin	10	0
Iodoacetic acid	100	0
E-64	10	0
Pepstatin	10	0

* KIU, Kalligenogenase inhibitory unit.

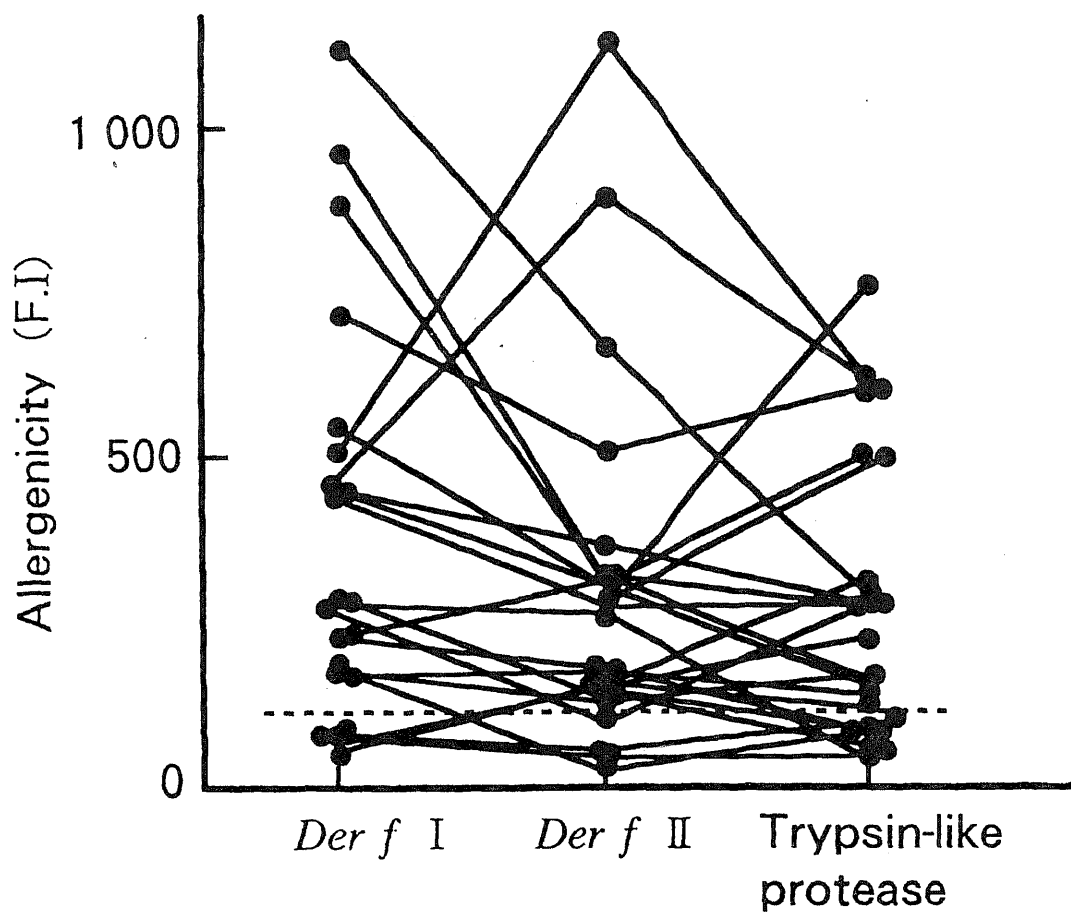


Fig. 3-6. Allergenic activity of trypsin-like protease to 23 mite allergic patients' sera. Allergenic activity of trypsin-like protease was measured by fluorometric ELISA. The hatched line means cut off value. Cut off value is 100 fluorescense intensity (F.I.). It was determined using sera eight skin test negative control subjects.

アーゼ：360 ± 51、Der f I:445 ± 69、Der f II:347 ± 63)。また各患者間によって、3種類のアレルゲンと反応するパターンは異なっていた。

3-5) N末端アミノ酸配列

精製トリプシン様プロテアーゼのN末端20残基のアミノ酸配列とDfプロテアーゼ、Der f III、Der p IIIさらにはウシトリプシンのような他のセリンプロテアーゼのN末端アミノ酸配列との比較をTable 3-3に示した。トリプシン様プロテアーゼは他のプロテアーゼと50%以上の相同性を示した。トリプシン様プロテアーゼとDfプロテアーゼあるいはトリプシン様プロテアーゼとDer f IIIとの相同性を比較したところ、それぞれ20残基中17残基あるいは15残基が一致していた。

3-6) アミノ組成

精製トリプシン様プロテアーゼとDer f IIIとのアミノ酸組成を比較した。両者間のSΔQユニットは、12SΔQであり、非常に類似していると判断された(Table 3-4)。

3-7) 要約、考察

要約

Table 3-3 N-terminal amino acid sequence of trypsin-like protease, D.farinae protease, Der f III, Der p III and other serine protease

Protein	Sequence
	1 20
Trypsin-like protease	I V G G V K A Q A G D X P Y Q I X L Q X
<i>D. farinae</i> protease	I V G G V K A Q A G D X P Y Q I S L Q S
<i>Der f</i> III	I V G G V K A L A G D X P Y E I S L E V
<i>Der p</i> III	I V G S E K A L A G E X P Y Q I S
Hornet chymotrypsin	I V G G T D A P R G K Y P Y Q V S L R A
Bovine trypsin	I V G G Y T C G A N T V P Y Q V S L N S

One letter code used for amino acid sequences. D.farinae protease, Der f III, and Der p III sequence data were obtained from Kohmoto et al. [56], Heymann et al. [15], and Steward et al. [14] respectively, whereas hornet chymotrypsin and bovine trypsin sequence data were obtained from Jany et al. [57] and James et al. [58] respectively.

Table 3-4 Amino acid analysis of trypsin-like protease and Der f III. Data of amino acid composition of Der f III were obtained from Heymann et al.[15]

Amino acid	Residues/100 residues	
	Trypsin-like protease	<i>Der f III</i>
Aspartic acid	11.8	11.6
Threonine	5.0	5.9
Serine	7.9	8.8
Glutamic acid	11.4	9.7
Proline	5.1	5.2
Glycine	12.2	11.4
Alanine	6.9	6.6
1/2 Cystine	NA	NA
Valine	8.0	6.7
Methionine	2.0	2.1
Isoleucine	6.3	6.3
Leucine	6.1	7.4
Tyrosine	4.9	3.8
Phenylalanine	1.5	2.3
Histidine	2.1	2.2
Lysine	5.5	6.6
Arginine	3.3	3.4

- ① ダニ (Df) 排泄物抽出エキス中から DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィー、Superdex 75 pgゲルクロマトグラフィーによりセリンプロテアーゼを精製した。
- ② SDS-PAGE還元条件下このプロテアーゼの分子量は34kDaであった。
- ③ 至適 pH と至適温度は、それぞれ 8.0 と 47℃であった。
- ④ このプロテアーゼはリジンおよびアルギニン残基の C 末端のペプチド結合を選択的に加水分解した。またこの活性は SBTI や FUT-175 などのトリプシン様プロテアーゼ阻害剤によって阻害されたが、キモトリプシンの阻害剤であるキモスタチンやシステインプロテアーゼ阻害剤である E-64 やヨード酢酸などによって阻害されなかった。
- ⑤ 上記阻害実験の結果より、精製されたセリンプロテアーゼはトリプシン様プロテアーゼ型であることが判明した。
- ⑥ 精製トリプシン様プロテアーゼはアレルゲン活性を有していた。
- ⑦ トリプシン様プロテアーゼの抗原性は Der f I や Der f II とは完全に異なっていた。
- ⑧ トリプシン様プロテアーゼのアミノ酸組成と N 末端 20 残基のアミノ酸配列は Der f III のそれと非常に類似していた。

考察

第 2 章においてダニ中のシステインプロテアーゼは Der f I そ

のものであり、このアレルゲンが排泄物に多く含まれていることより⁴⁷⁾、Der f I はダニの消化酵素である可能性を考察した。同様な考えで、もしトリプシン様プロテアーゼがダニの消化酵素であるならば、ダニの排泄物抽出エキス (M F E) 中あるいは排泄物を含む培養物抽出エキス (W C E) に多量に存在するはずである。そこでこれらの抽出エキスとダニ虫体抽出エキス (M B E) 中に含まれるトリプシン様プロテアーゼ活性を比較したところ、前者において強い活性が認められた。これらの結果はダニのトリプシン様プロテアーゼが Der f I 同様消化酵素である可能性を示唆するものである。こうして、トリプシン様プロテアーゼ精製の出発材料として、M F E が選ばれた。硫酸分画、DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィー、Superdex 75 pg ゲルクロマトグラフィーによりトリプシン様プロテアーゼを精製した。SDS-PAGE並びにゲルクロマトグラフィーでの分子量は同一な 34kDa であった。第 1 章で報告した M B E 由来のトリプシン様プロテアーゼの分子量は約 60kDa であることより、ダニには少なくとも 2 種類のトリプシン様プロテアーゼが存在する可能性が示唆された。そこでこれら両者のプロテアーゼが同一のものであるかどうか、基質特異性、阻害剤に対する感受性あるいは至適 pH などの酵素化学的性質を比較検討したところ、非常に類似していた。よって、ダニには分子量の異なる少なくとも 2 種類のトリプシン様プロテアーゼが存在するものと思われる。

最近 Takahashi らは⁵⁹⁾、D f の W C E から D. farinae (D f) プロテアーゼと命名したセリンプロテアーゼを精製し、さらこの

DfプロテアーゼとDer f III とのN末端20残基のアミノ酸配列が非常に類似していることを報告している⁵⁶⁾。しかし両者は完全に一致しているわけではない。しかもDfプロテアーゼがアレルゲンであるのかどうかの検討は全くなされていなかった。そこで、MFEより精製したトリプシン様プロテアーゼとDfプロテアーゼおよびDer f III とのN末端20残基のアミノ酸配列を比較した。その結果トリプシン様プロテアーゼとDfプロテアーゼのN末端20残基のアミノ酸配列は非常に類似していた。このことは両者が同一分子であることを示唆している。一方、トリプシン様プロテアーゼとDer f III の場合はわずかな違いが認められた。この違いは、精製に用いたダニ(Df)自身の違いによるものかも知れない。同様な現象がDer p III とD. pteronyssinus から精製されたトリプシン⁶⁰⁾においても認められた。さらに精製トリプシン様プロテアーゼはアレルゲン活性を有しており、ダニ(Df)に感作されている喘息患者23名のうち16名の患者IgE抗体と反応した(陽性率70%)。このトリプシン様プロテアーゼはDer f I やDer f IIとは異なる分子である。それはSDS-PAGEでの移動度あるいは上記患者におけるIgE抗体との反応性がDer f I やDer f IIのそれとは完全に異なることから否定できる。ところでHeymannら¹⁵⁾はDer f III の患者IgE抗体との反応は51名中18名(陽性率16%)であると報告している。一方Stewartらは55名の患者IgE抗体がすべてDer p III と反応したと報告している⁶⁰⁾。これら3者間での陽性率の違いの可能性として1)人種による違い2)患者を選ぶ際に行うプリック試験に用いたダニ抗原の違い3)アレルゲ

ンとIgE抗体との結合を測定する方法論の違い等が考えられる。しかし陽性率は異なっているにもかかわらず、MFEから精製したトリプシン様プロテアーゼとDer f IIIは多くの点で似ている。すなわちトリプシン様プロテアーゼとDer f IIIの分子量はそれぞれSDS-PAGEで34kDa, 29kDaであること、前者は60-80%飽和硫酸分画に、後者は50-80%飽和硫酸分画に存在する。またトリプシン様プロテアーゼとDer f IIIのアミノ酸組成やN末端アミノ酸配列はほぼ同じである。以上の結果は、ダニのトリプシン様プロテアーゼはDer f IIIそのものであることを強く示唆している。

第1-3章の結果および他の研究者の結果より、ダニの3種類の主要アレルゲンすなわちグループI、II、IIIアレルゲンの内、2種類がプロテアーゼであることが判明した。Matsuzakiら⁶¹⁾は、ダニ(Df)に感作された喘息患者とアトピー性皮膚炎患者において、Der f IおよびDer f IIに対する血清中のIgE抗体価を測定した時、アトピー性皮膚炎の患者においてはDer f Iに対するIgE抗体が優位で、一方喘息患者においてはDer f IIに対するIgE抗体価が優位であると報告している。アトピー性皮膚炎において、システインプロテアーゼ活性を有するDer f Iがそのプロテアーゼ活性ゆえDer f IIに比べて侵入しやすく、その結果Der f Iに対するIgE抗体価がDer f IIに比べて高いのであろうという彼等の仮説は魅力的なものである。ブタやウシのトリプシンやパイン等のプロテアーゼに対する職業性アレルギーも報告されており^{62, 63, 64)}、これらプロテアーゼの生物学的性質が感受性の高いヒトにおける感作に寄与しているものと思われる。

また第1章で示したように、トリプシン様プロテアーゼには強い刺激作用があるため、Der f 111 はアレルゲンとしてIgE抗体を産生させるという性質の他に、アレルギー性炎症を増悪させている可能性があると思われる。

第 4 章 室内塵抽出エキス (H D E) 中のプロテアーゼ活性とダニ主要アレルゲン量との関連について

コナヒョウヒダニ (Df) には、システインプロテアーゼとトリプシン様プロテアーゼが存在し、これらのプロテアーゼはそれぞれダニの主要アレルゲンである Der f I と Der f III そのものであることが前章までで明らかとなった。

ところで、室内塵中で最も重要なアレルゲンは、ヒョウヒダニであることは既に序論で述べたとおりである。一般に室内塵 1 グラム中にグループ I アレルゲンが 2 μ g 以上存在するとダニアレルゲンに感作される危険性が高まり、10 μ g 以上存在すると、ダニアレルギー喘息患者において発作が誘発される危険性が高まること、多くの疫学的調査から知られている (65, 66, 67, 68, 69)。現在、ダニアレルギー患者の治療法としては、薬物療法、特異的減感作療法等が知られている。しかし、小児科領域においては薬物が小児にとって負担になるため、もっぱら環境を整備し、室内からダニを除去しようという考えが推奨されている。こうして室内塵中のダニ主要アレルゲン量をこれらアレルゲンに対するポリクロナール抗体あるいはモノクロナール抗体を用いた sandwich ELISA 法により測定し、治療に役立ていこうという試みが多くなされている (70, 71, 72, 73, 74)。しかし、これら ELISA 法は繁雑な操作と時間を要する。ところで、ダニのグループ I アレルゲンがシステインプロテアーゼであり、またグループ III アレルゲンがトリプシン様プロテアーゼであるならば、

これらプロテアーゼ活性を指標にしてダニ主要アレルゲン量を推定することが可能かもしれない。そこで、この可能性を検討するために、本章では、室内塵抽出エキス (House Dust Extract: H D E) 中のプロテアーゼ活性とダニ主要アレルゲン量とを測定し、両者の間の関連の有無について述べる。

4-1) 実験材料および方法

H D E の調製 :

千葉県および東京に住む30件の家庭の室内塵を用いた。これらの室内塵はすべて、篩過され (0.3 mm)、fine dustのみ集められた。100mgの室内塵を0.05M PB (pH 7.4) 5 mlに溶解させ、室温2時間スターラー攪拌し、抽出した。これを遠心 (1,500 g, 15分, 4°C) し、その上清を0.80 μ mのメンブレンフィルターで濾過し、その濾液をH D Eとした。

各種アレルゲンエキス :

室内塵中に含まれる可能性のある、花粉類、食品類、真菌類並びにペットの毛などのアレルゲンエキス (44種) は、市販診断用アレルゲンスクラッチエキス (鳥居薬品) を用いた。

室内塵中のダニ数の測定 :

室内塵5 mg中のダニ数を光学顕微鏡下、測定した。

H P L CゲルクロマトグラフィーによるH D Eの分画：

8検体のH D Eについて、その10 ulをTSK gel G3000SW (0.78 X 30 cm :東ソー) にかき、H P L Cゲルクロマトグラフィーを行った(Buffer:0.05 M PB, pH 7.4, flow rate:0.5 ml/min) 。0.5 mlずつ分画し、各分画中のトリプシン様プロテアーゼ活性を測定した。

プロテアーゼ活性の測定：

H D E並びに各種アレルギーエキス中のプロテアーゼ活性の測定は、MCA合成ペプチド基質を用い第1章に準じて行なった。また各種合成ペプチド基質は第3章に準じた。

精製アレルギー：

Der f 1, Der p 1 およびDer f 11, Der p 11 標準品は、安枝浩博士(国立相模原病院)より供与された。

ウサギ抗血清とそのIgG分画

安枝博士より供与されたDer f 1を等量のcomplete Freund's adjuvant(ディフコ社)と混じ、その1 mlをウサギ(New Zealand White)の皮下臀筋数ヶ所に1週間隔で計4回注射した。最後の注射から10日目に全採血をし、ウサギ抗Der f 1血清を得た。得られた抗血清の力価をゲル内沈降反応で測定したところ、8倍であった。抗血清の一部から硫酸塩析とProtein GカラムによりIgG分画を得た。

IgG のビオチン標識⁷⁵⁾

抗血清の IgG 分画 (5mg in 0.1M NaHCO₃ 5 ml) にジメチルホルムアミドに溶解した 1 mg/ml の N-hydroxysuccinimidobiotin (シグマ社) の溶液, 500ul を加え、室温で静置した。4 時間後、反応混合物を borate buffered saline, pH 8.0 で平衡化した P-10 カラムに添加し、void volume に溶出するビオチン化 IgG を得た。

Der f I および Der f II 含量の測定

H D E 中の Der f I 含量の測定は、安枝らの sandwich ELISA 法に準じて行なった⁷⁶⁾。ポリスチレン製 96 穴マイクロプレート (Immuon II ダイナテック社) の各 well に、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) で 2 ug/ml の抗 Der f I IgG 分画 0.05 ml を加え、25°C で 1 晩放置した。次いで 1 well あたり 0.05 % の Tween 20 を含む PBS (pH 7.4) 洗浄液 0.3 ml で 3 回洗浄した。次いで 3 % ゼラチンを 1 well あたり 0.3 ml 添加し、ブロッキングを行なった。上記洗浄液でプレートを 4 回洗浄後、1% BSA-lactose で希釈した精製アレルギーの標準溶液 (10-0.16 ng/ml), あるいは 1% BSA-lactose で希釈した H D E 溶液 (10, 100, あるいは 1000 倍希釈液) を 1 well あたり 0.05 ml 加え、25°C で 2 時間インキュベートした。その後プレートを 4 回洗浄し、次いでビオチン化した抗血清の IgG 分画 (抗 Der f I → 1 ug/ml) を 1 well 当たり 0.05 ml 加え 25°C で 2 時間インキュベートし、再び 4 回洗浄した。その後、well に 1% BSA-lactose で 4000 倍に希釈したストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRPO) 結合物 (BRL 社) 0.1 ml を加え、25°C で 1

時間インキュベート、次いで4回洗浄後、基質（*o*-フェニレンジアミン）を1 wellあたり0.1 ml加え、室温で30分間酵素反応を行った。最後に、2N硫酸0.1 mlを加えて反応を停止後、マイクロプレート光度計（MTP-22 コロナ電気）にて490nmの吸光度を測定した。標準溶液による吸光度から標準曲線を描き、その標準曲線から各HDE中のDer f I濃度を求めた。Der f IIの測定は赤川らの方法に準じた⁷³⁾。すなわちDer f II特異的モノクローナル抗体（15E11）を1次抗体に、また2次抗体にHRPOを結合させたDer f II特異的モノクローナル抗体（13A4）を用いたsandwich ELISA法によりDer f II含量を測定した。

総アレルギー活性（allergenic activity）の測定

HDEのアレルギー活性の測定は、第1章の方法に準じた。すなわち各HDEをCentriprep, 10(MW cut off 10kDa: アミコン社)で2.5倍に濃縮後、この液を原液とし、2倍希釈系列で6段階希釈し、Br-CN活性化濾紙と反応させた。HDEに対するIgE血清として、市販HDE（鳥居薬品）のスクラッチテストで陽性な患者プール血清を用いた。反応終了後、各HDEについて抗原希釈曲線をもとめ、これよりプラトーの OD_{420} の値を100%結合とし、各HDE希釈液の OD_{420} 値を結合率(%)に変換し、50%結合活性を示すHDEの抗原濃度（抽出倍率相当）をもとめた。50%結合濃度が0.01(1:100で抽出される試料の濃度を0.01として表した)であるHDEの総アレルギー活性を1とし、各試料の相対力価を算出した。

ダニ抗原活性 (antigenic activity) の測定

ポリスチレン製96穴マイクロプレート (Immulon II ダイナテック社) の各wellに、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) で100倍に希釈した各HDE 0.05 mlを加え、25°Cで1晩放置した。次いで1 wellあたり0.05%のTween 20を含むPBS (pH 7.4) 洗浄液0.3 mlで3回洗浄した。次いで3%ゼラチンを1 wellあたり0.3 ml添加し、ブロッキングを行なった。上記洗浄液でプレートを3回洗浄後、1%BSA-lactoseで1000倍希釈したウサギ抗CME血清を1 wellあたり0.05 ml加え、25°Cで2時間インキュベートした。その後プレートを4回洗浄し、次いで5000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRPO) 結合ヤギ抗ウサギ抗体 (カッペル社) を1 wellあたり0.05 ml加え25°Cで2時間インキュベートし、再び4回洗浄した。その後、wellに、基質 (o-フェニレンジアミン溶液) 0.1 mlを加えて25°Cで30分間酵素反応を行なった。最後に、2N硫酸0.1 mlを加えて反応を停止後、マイクロプレート光度計 (MTP-22 コロナ電気) にて490nmの吸光度を測定し、この値を各HDEのダニ抗原活性とした。

4-2) Der f I および Der f II assay系の特異性の検討

ヒョウヒダニには D f , D p それぞれに2つのグループの主要アレルゲン、Der I (Der f I / Der p I) と Der II (Der f II / Der p II) がある。そこで Der f I および Der f II assay 系に及ぼす Der p I および Der p II の影響を標準曲線を書かせることによっ

てFig. 4-1, Fig. 4-2に示した。Der f I およびDer f IIの検出感度は各々 0.16 ng/ml, 1.25 ng/mlであるが, 両系共にDer p I およびDer p IIに対し、50-100倍以上の感度でDer f I およびDer f IIを測定でき、H D E中のDer f I およびDer f II含量の特異的測定が可能であることが判明した。またDer f IIとDer p IIに等しく反応する抗血清を用いて、H D E中のDer II含量を測定した。これらの系を用いて、H D E中のDer f I, Der f II, 並びにDer II含量を測定し、これより1グラムfine dust中に含まれる主要アレルゲン量を換算した (Fig. 4-3)。室内塵1グラム中に2 ug以上のDer f Iを含む試料は、30件中12件であった。

4-3) H D E中のアレルゲン活性

各H D E中のアレルゲン活性を抗原希釈曲線として書かせた時ほとんどの試料のプラトー値は、OD420で0.7-1.2の値を示し、また抗原希釈曲線のパターンもかなり類似していた。次ぎにこれら抗原希釈曲線の縦軸のOD420値を結合率に変換した代表例をFig. 4-4に示した。50%結合濃度が0.01(1:100相当)であるH D E濃度のアレルゲン活性を1とした時の、各試料の相対力価の分布をFig. 4-5に示した。最低値(0.19)と最高値(12.82)の比は約70倍であった。

4-4) H D E中のプロテアーゼ活性

トリプシン様プロテアーゼの合成ペプチド基質であるBoc-Phe-

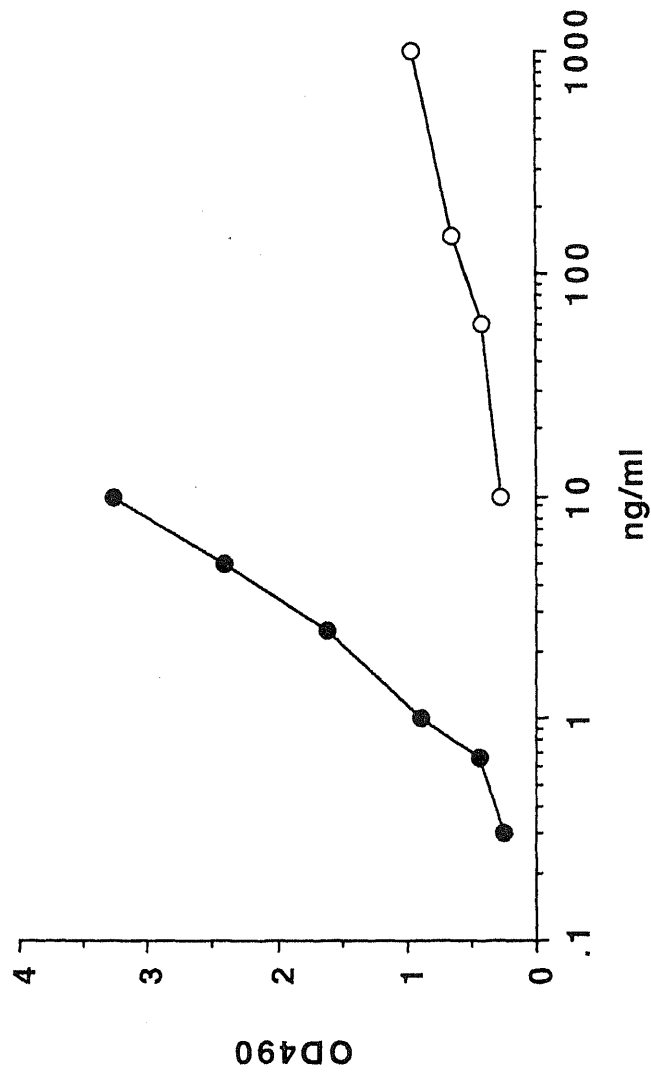


Fig.4-1-1. Typical standard curve of Der f 1 (●), Der p 1 (○) in the Der f 1-ELISA.

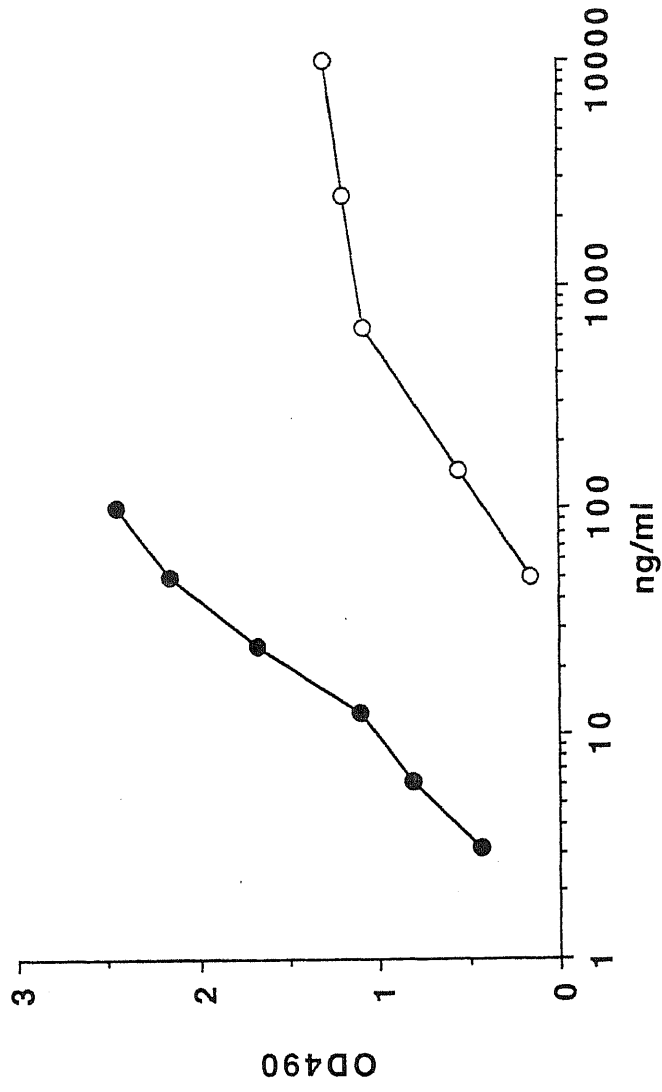


Fig.4-2. Typical standard curve of Der f 2 (●), Der p 2 (○) in the Der f 2-ELISA.

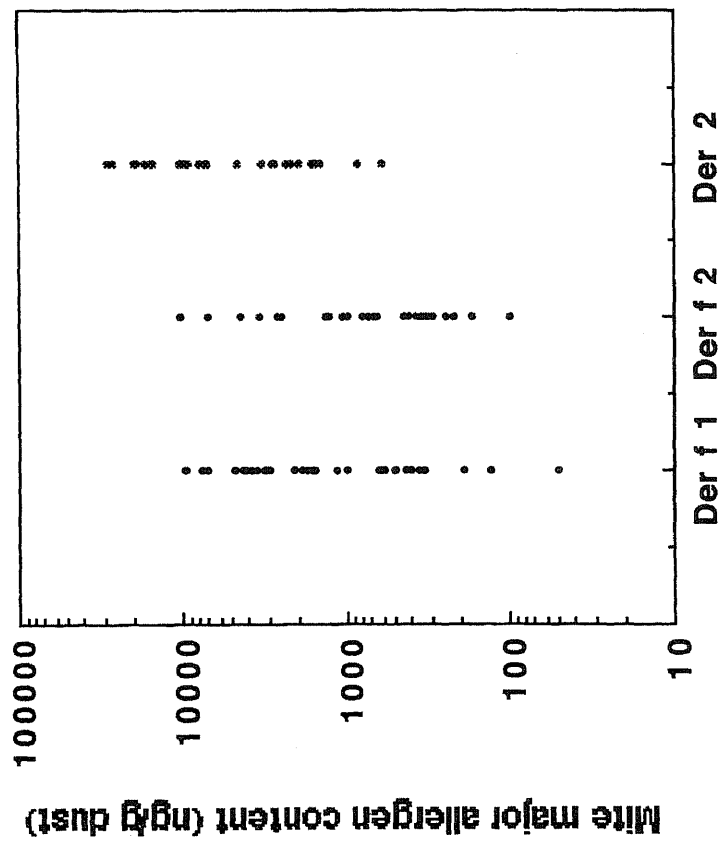


Fig.4-3. Distribution of mite major allergen content in 30 house dust samples.

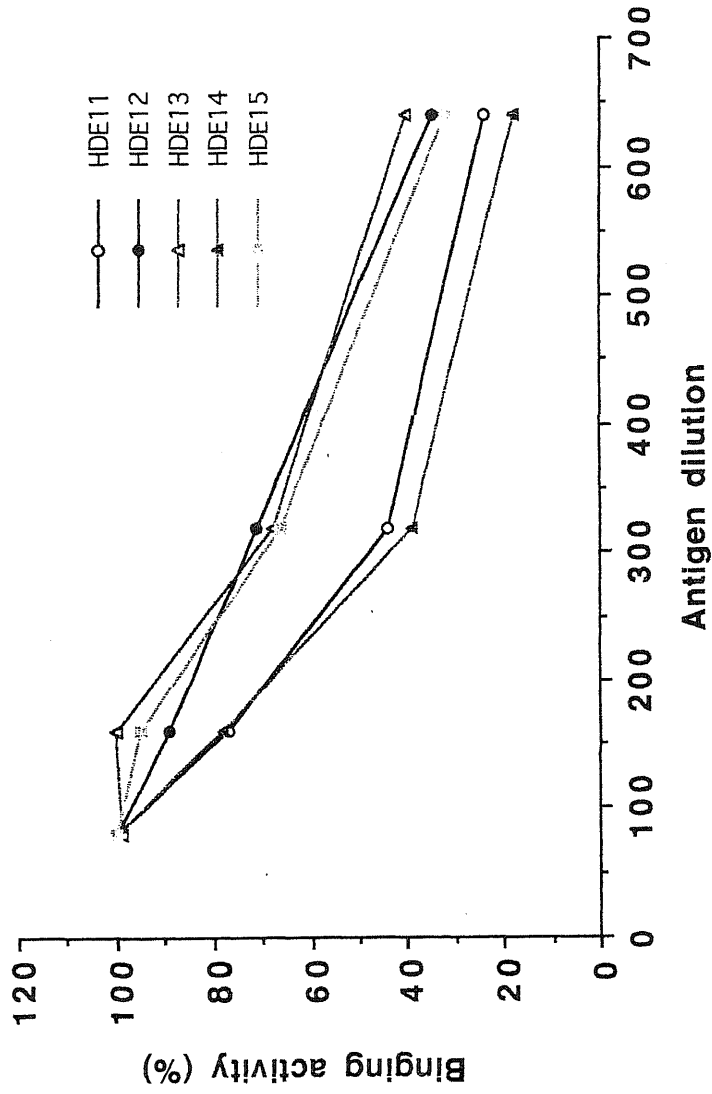


Fig.4-4. Typical binding activity of HDE to human α -HDE IgE antibody.

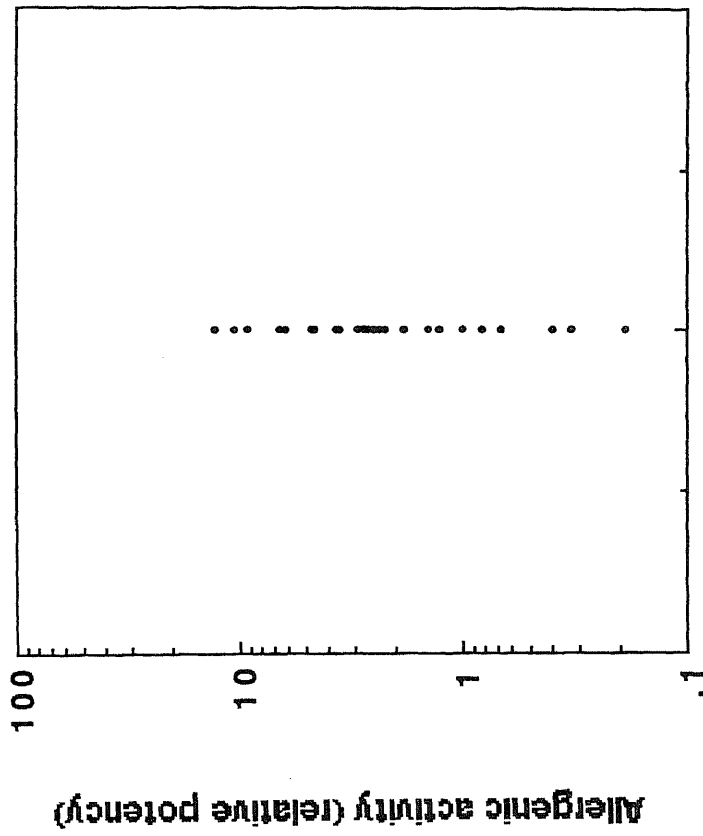


Fig.4-5. Distribution of allergenic activity in 30 house dust samples. Allergenic activity was determined by comparing the 50% binding activity of each HDE.

Ser-Arg-MCA を用いた時、いずれの試料においてもプロテアーゼ活性が検出された (Fig. 4-6) 。最高値と最低値との比は約 200 倍であった。一方基質に suc-Leu-Leu-Val-Try-MCA を用いて、1 mM cysteine の有無によりシステインプロテアーゼ活性を測定したが、いずれの検体も cysteine により活性化されず、システインプロテアーゼ活性は検出されなかった。

4-5) H D E 中のトリプシン様プロテアーゼと Der f III との基質特異性

9 種の合成ペプチド基質を用いて、強いトリプシン様プロテアーゼ活性を示した H D E 中の 3 検体と Der f III との間における、基質特異性を比較した (Table 4-1) 。ダニ由来のトリプシン様プロテアーゼ (Der f III) と室内塵由来のトリプシン様プロテアーゼとの基質特異性は極めて類似していた。

4-6) H P L C ゲルクロマトグラフィーによるダニ由来および室内塵由来トリプシン様プロテアーゼ活性の検出

M B E および M F E の H P L C ゲルクロマトグラフィーによるトリプシン様プロテアーゼ活性の溶出パターンを Fig. 4-7 に示した。M B E 由来のトリプシン様プロテアーゼおよび M F E 由来の Der f III の活性ピークの retention time は各々 18-19 min, 20-21 min であった。次ぎに H D E 8 検体について同様に H P L C ゲルクロマトグラフィーによるトリプシン様プロテアーゼ活性を測定した。H D E No. 3, 4, 7 においては、その活性ピークの retenti-

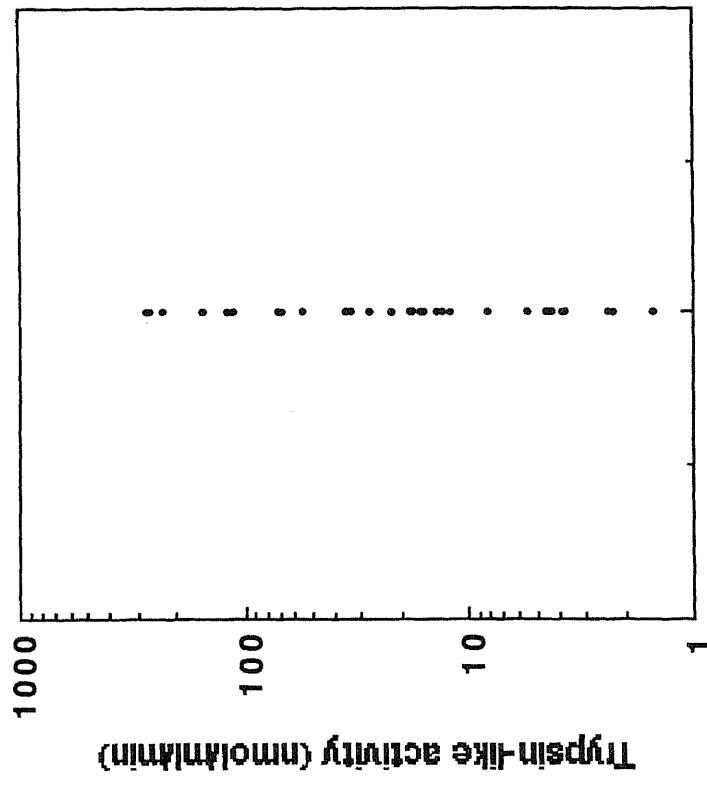


Fig.4-6. Distribution of trypsin-like activity in 30 house dust samples.

Table 4-1 Comparison of substrate specificity

Substrate	HD6	HD13	HD27	Der f 3
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	100	100	100	100
Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	138	142	138	132
Boc-Ilu-Glu-Gly-Arg-MCA	79	76	79	120
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	40	41	40	66
Boc-Glu-Arg-Arg-MCA	98	82	98	72
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	31	36	31	51
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	8	8	8	3
Suc-Ala-Ala-Ala-MCA	2	0	0	0
Ala-MCA	5	1	0	1

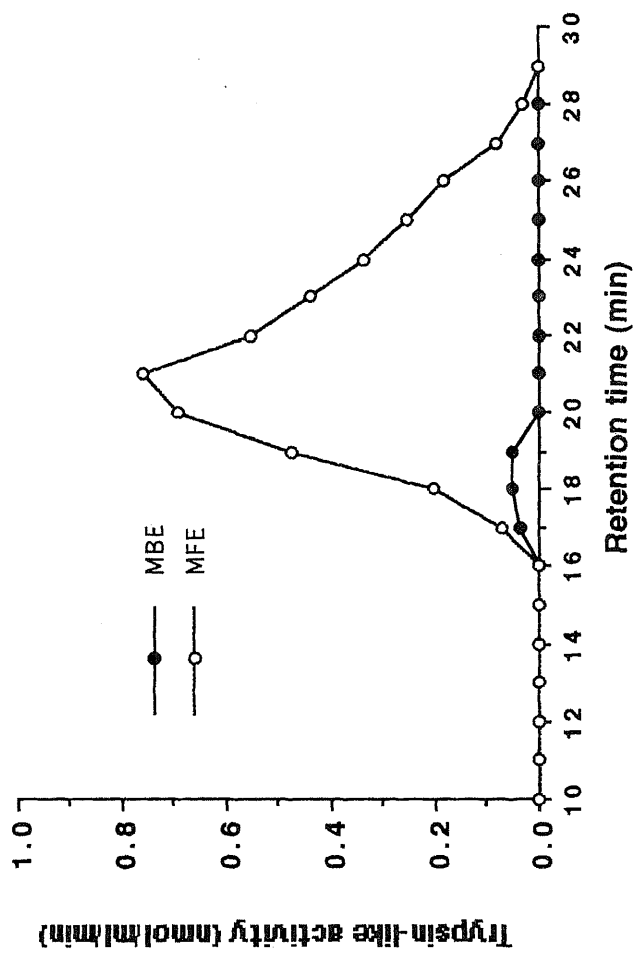


Fig. 4-7. HPLC gel chromatographic patterns of MBE and MFE. Each sample (10 μ l) was applied to a TSK gel (G3000SW), and each 1 ml of the eluate was collected. Trypsin-like protease activity was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA.

on time はそれぞれ 18, 18, 19 min であった (Fig. 4-8)。さらに H D E No. 6 では 19, 24 min に、No. 30 では 20, 24, 27 min に活性ピークが検出された (Fig. 4-9)。他の 3 検体も含めた活性ピークの retentime を Table 4-2 に示した。

4-7) ダニ主要アレルゲン量と他の指標との相関

H D E 30 検体での Der f I 含量と Der f II 含量との相関係数は $r=0.800$ であり、極めて良い相関が認められた (Fig. 4-10)。また Der f I 含量と総アレルゲン活性あるいは Der f II 含量と総アレルゲン活性との相関係数は、各々 $r=0.636$, $r=0.680$ であり、これらの間において良い相関が認められた (Fig. 4-11, 4-12)。さらに H D E 中のダニ数とダニ抗原活性との相関係数は、 $r=0.608$ であった (Fig. 4-13)。

4-8) トリプシン様プロテアーゼ活性と他の指標との相関

H D E 30 検体でのトリプシン様プロテアーゼ活性と Der f II との相関係数は、 $r=0.223$ と非常に低く、しかも負の相関を示した。また Der f II と Der p II の総和である Der II 量との相関係数も $r=0.069$ であり、相関が認められなかった (Fig. 4-14, 4-15)。またトリプシン様プロテアーゼ活性と Der f I との相関係数も $r=0.001$ であり負の相関を示した。さらにトリプシン様プロテアーゼ活性とダニ抗原活性、ダニ数の相関係数は各々 $r=0.210$, $r=0.218$ でいずれも低かった (Fig. 4-16, Fig. 4-17)。

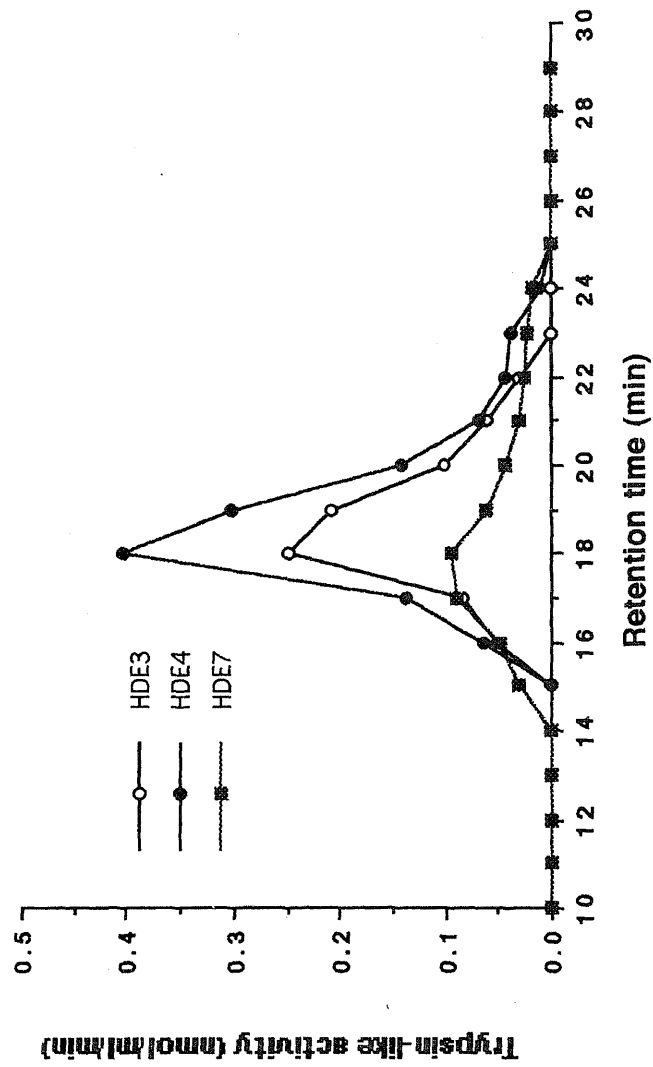


Fig. 4-8. HPLC gel chromatographic patterns of HDE3, HDE4 and HDE7. Each sample (10 ul) was applied to a TSK gel (G3000SW), and each 1 ml of the eluate was collected. Trypsin-like protease activity was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA.

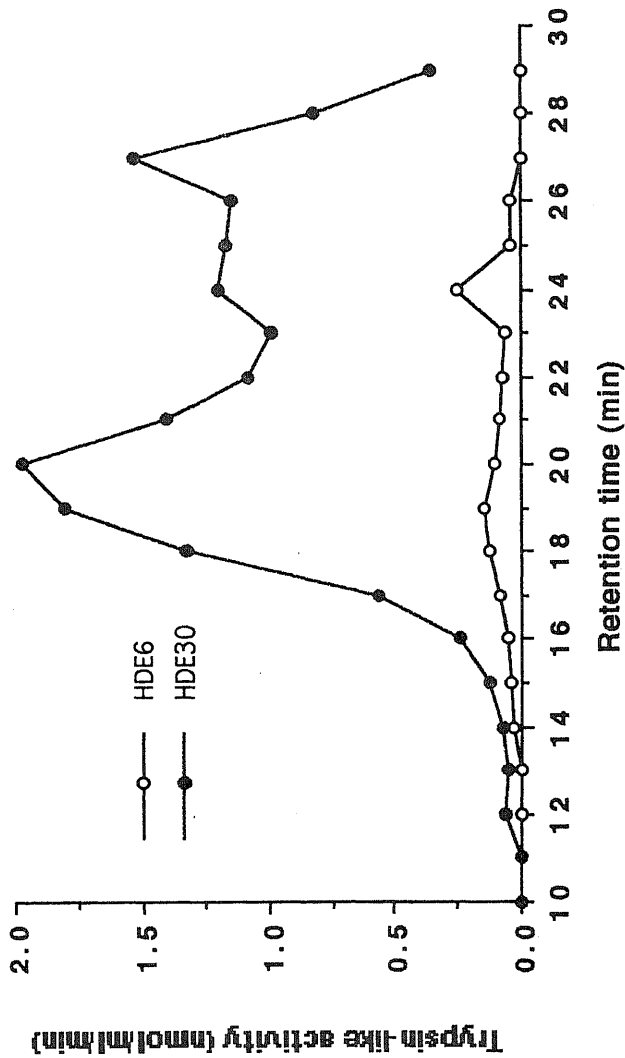


Fig.4-9. HPLC gel chromatographic patterns of HDE6 and HDE30. Each sample (10 ul) was applied to a TSK gel (G3000SW), and each 1 ml of the eluate was collected. Trypsin-like protease activity was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA.

Table 4-2 Presumptive origin of HD trypsin
by HPLC retention time

Source	Retention time(min)	Origin
M. Body	18-19	—
M. Feces	20-21	—
HDE3	18	M. Body
HDE4	18	M. Body
HDE6	19	M. Body
	24	Unknown
HDE7	19	M. Body
HDE12	21	M. Feces
HDE14	18	M. Body
HDE29	19	M. Body
HDE30	20	M. Feces
	24	Unknown
	27	Unknown

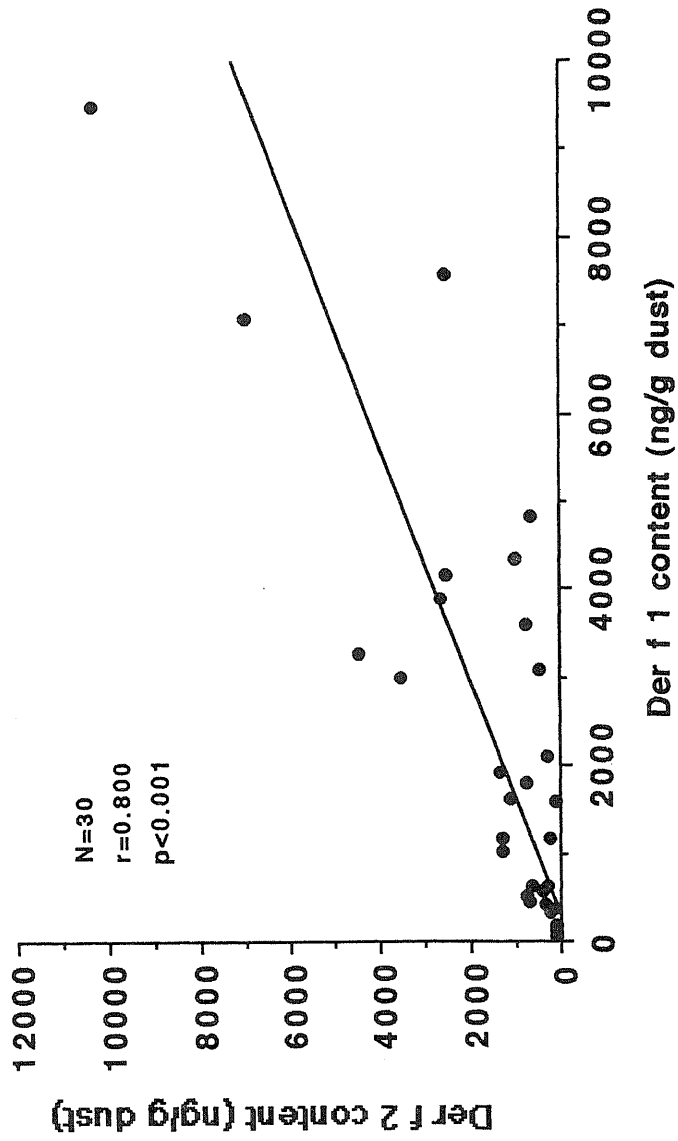


Fig.4-10. Regression line between Der f 1 content and Der f 2 content in 30 house dust samples.

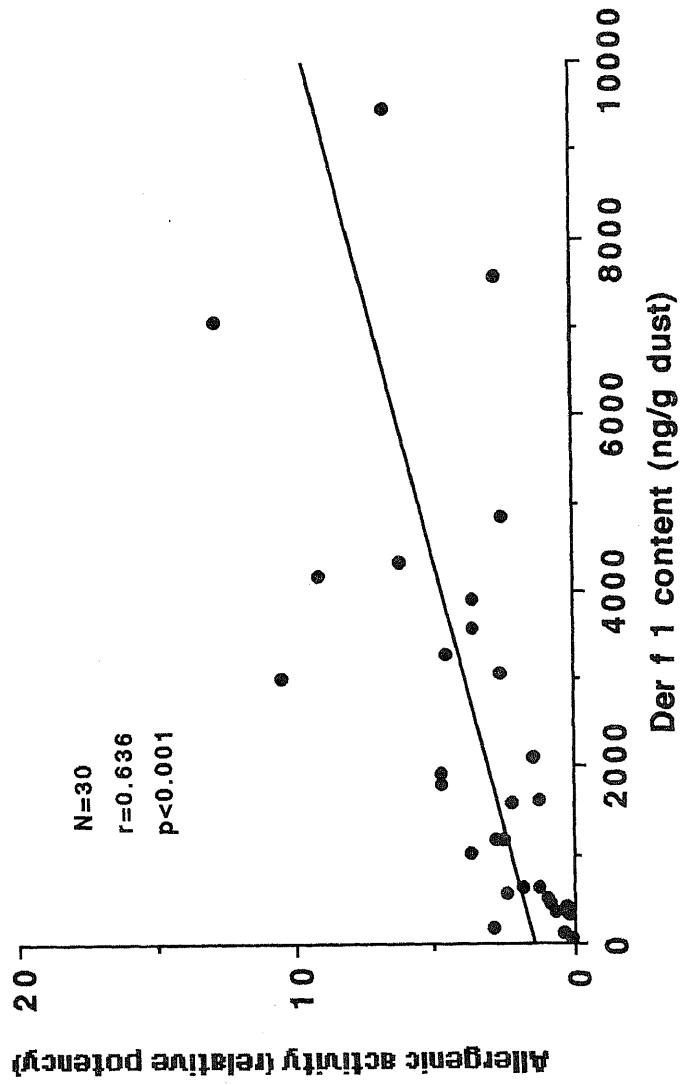


Fig.4-11. Regression line between Der f 1 content and allergenic activity in 30 house dust samples.

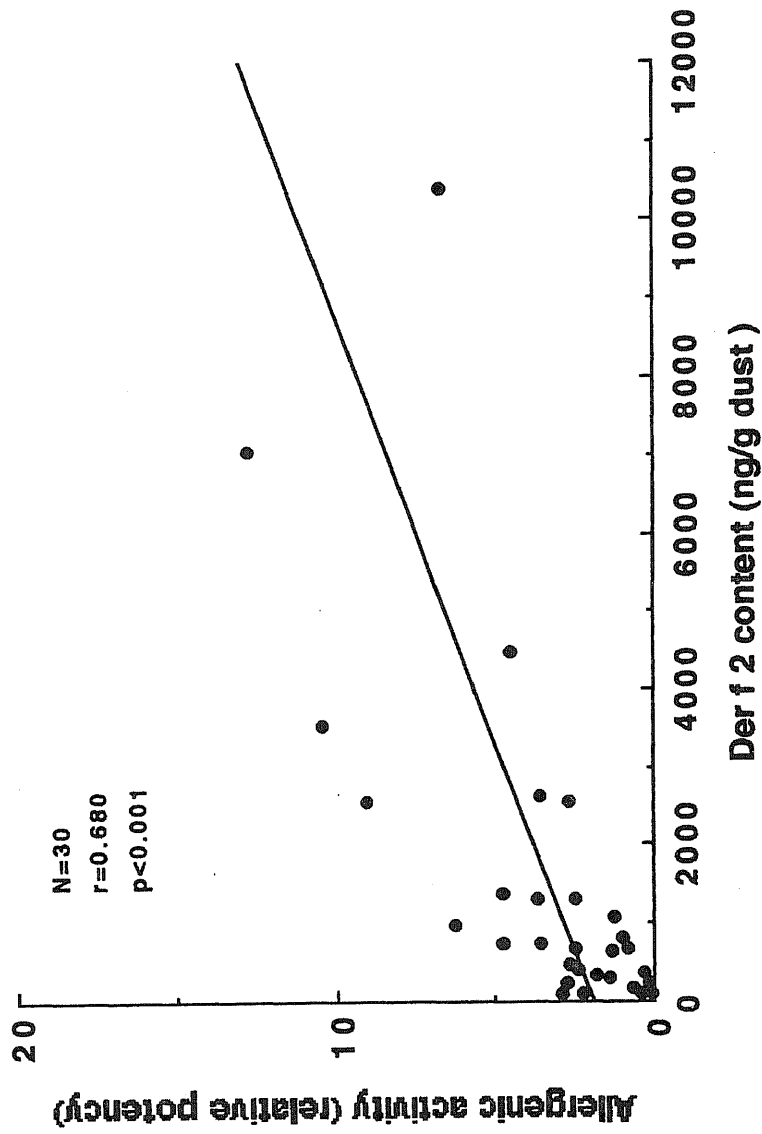


Fig.4-12. Regression line between Der f 2 content and allergenic activity in 30 house dust samples.

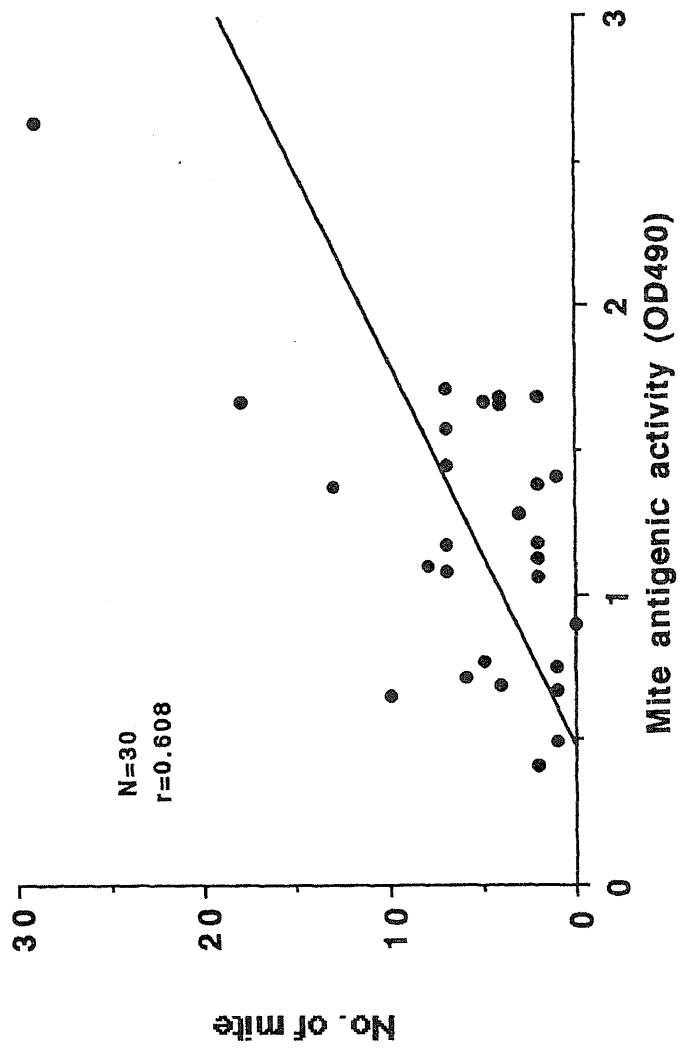


Fig. 4-13. Regression line between mite antigenic activity and number of mites in 30 house dust samples.

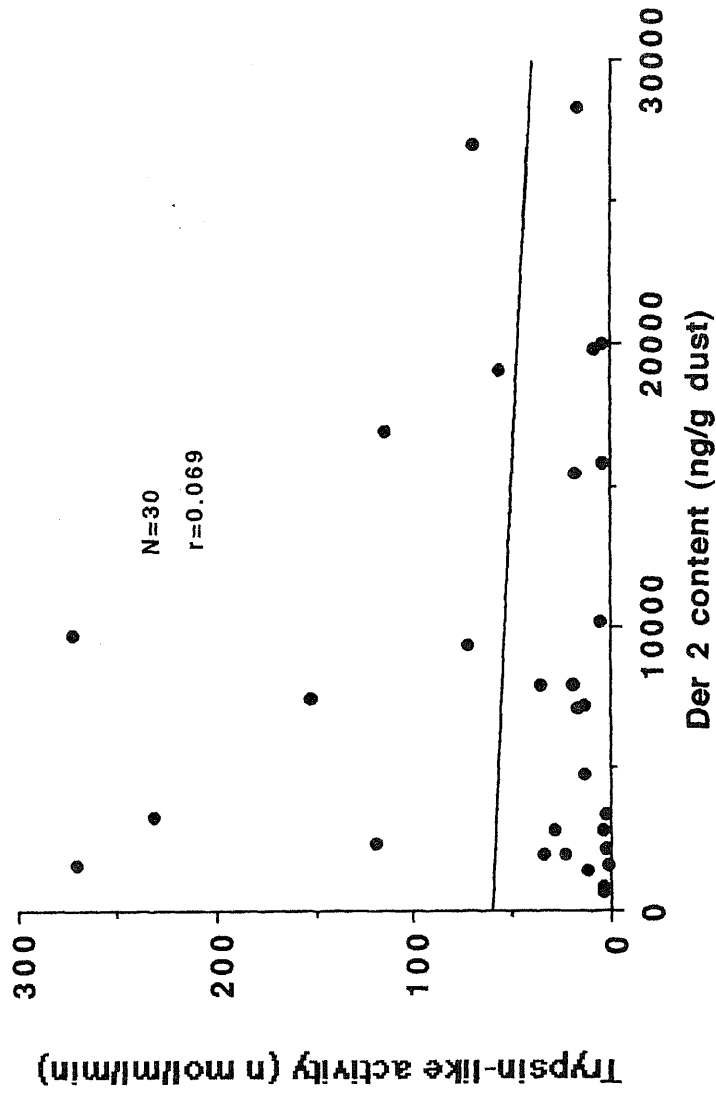


Fig.4 -15. Regression line between Der 2 content and trypsin-like activity in 30 house dust samples.

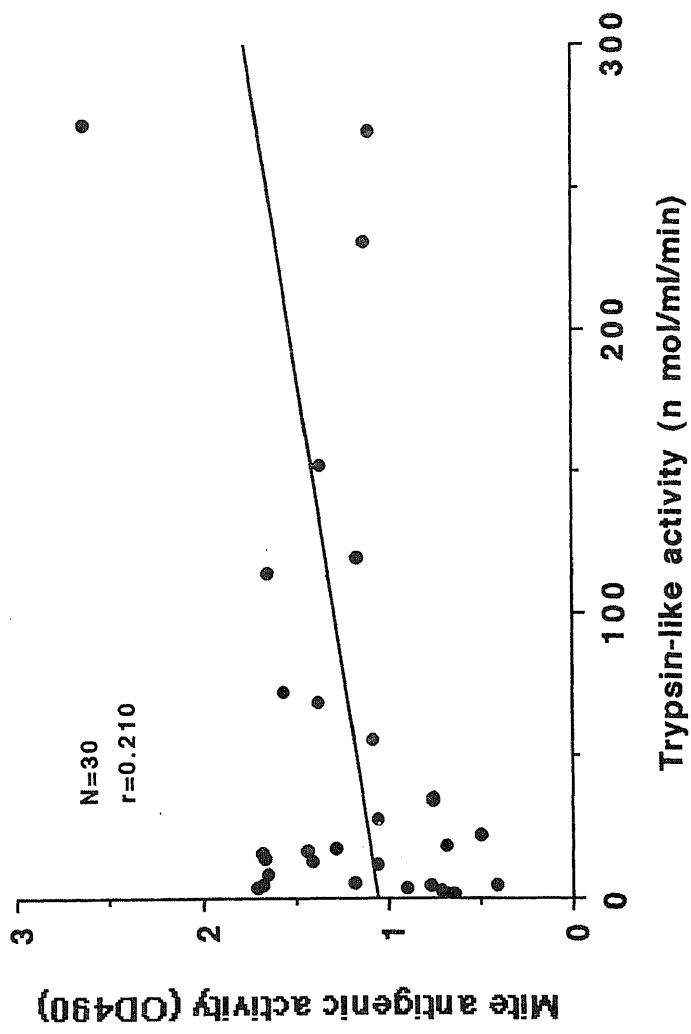


Fig.4-16 . Regression line between trypsin-like activity and mite antigenic activity in 30 house dust samples.

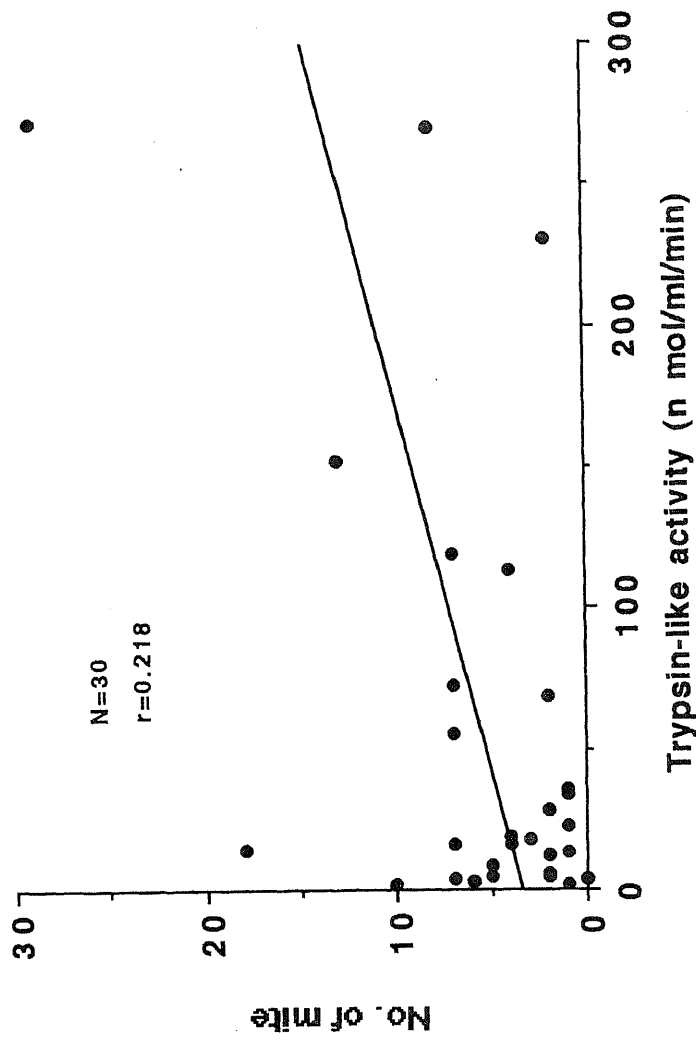


Fig. 4-17. Regression line between trypsin-like activity and number of mite in 30 house dust samples.

4-9) 各種アレルゲンエキス中のトリプシン様プロテアーゼ活性
室内塵中に含まれる可能性のある花粉類、真菌類、イヌやネコの皮屑、食品類を含む44種のアレルゲンエキスについてトリプシン様プロテアーゼ活性を測定した。犬毛、猫毛等にトリプシン様プロテアーゼ活性が検出されたが、最も強い活性を示したのはアルテルナリアであった(Fig. 4-18)。

4-10) 要約、考察

要約

- ① 各家庭30件の室内塵よりHDEを調製し、各検体中のDer f I, Der f II, Der II含量、総アレルゲン活性、プロテアーゼ活性、総ダニ抗原活性、ダニ数を測定した。
- ② Der f I およびDer f II測定のためのsandwich ELISA系を確立した。その結果室内塵1グラム中に2 μ g以上の高いDer f Iを含む試料は、30件中12件であった。
- ③ HDE中の総アレルゲン活性の最低値と最高値の比は約70倍であった。
- ④ HDE30検体すべてにトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。トリプシン様プロテアーゼ活性の最低値と最高値の比は約200倍であった。一方システインプロテアーゼ活性は、全く検出されなかった。
- ⑤ 9種の合成ペプチド基質を用いて、HDE由来のトリプシン様

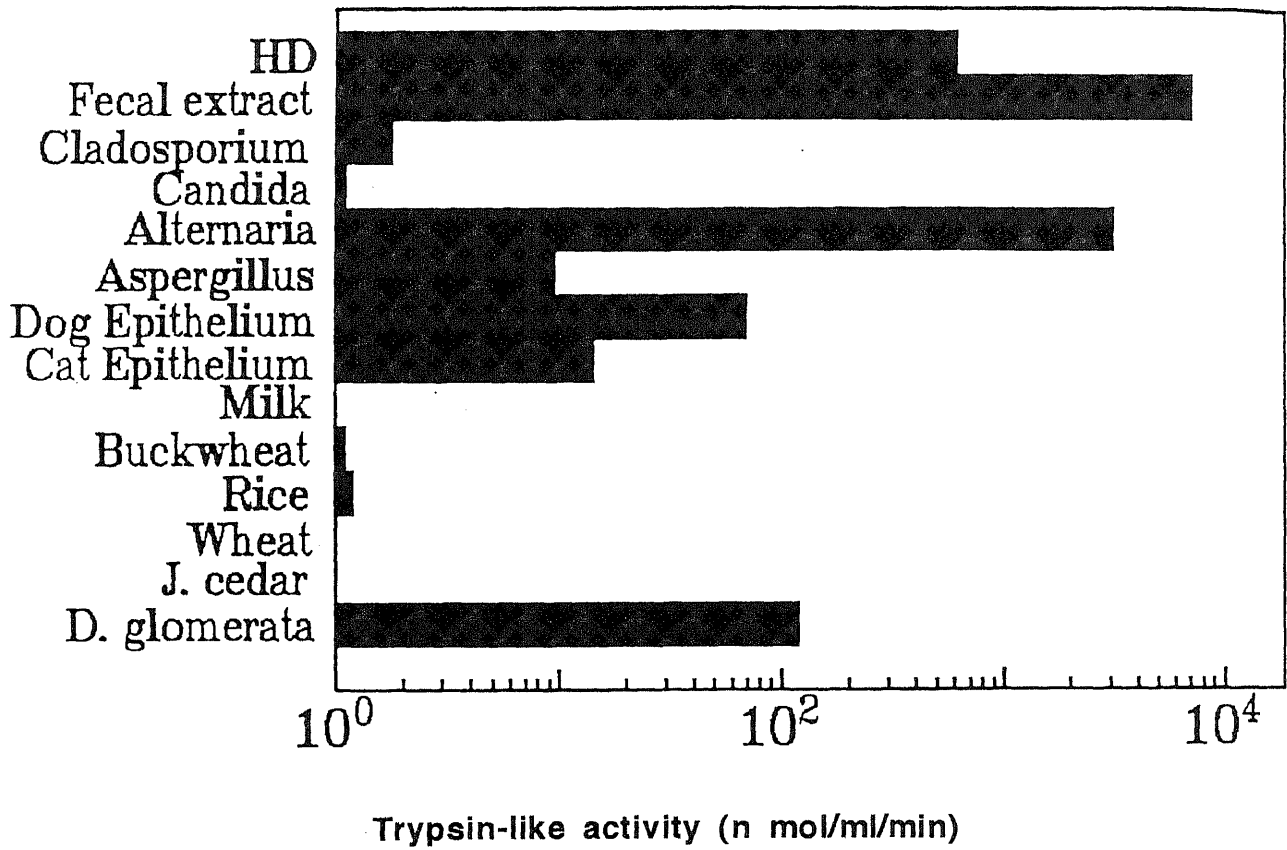


Fig.4-18. Trypsin-like activities in various allergens were determined using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA as substrate.

プロテアーゼと Der f III との基質特異性を比較検討したところ、極めて類似していた。

⑥ ダニ由来および室内塵由来のトリプシン様プロテアーゼの分子量を retention time を指標にして HPLC ゲルクロマトグラフィーにて比較検討したところ、HDE 由来のトリプシン様プロテアーゼの多くは、ダニ虫体由来のトリプシン様プロテアーゼと同じ位置に溶出された。

⑦ HDE 中の Der f I と Der f II との相関は極めて良かった ($r=0.800$)。一方、トリプシン様プロテアーゼ活性と Der f I あるいは Der f II との相関は、認められなかった。またトリプシン様プロテアーゼ活性と他の指標 (ダニ抗原活性等) との相関も、主要アレルゲン同様低かった。

⑧ 室内塵中に含まれる可能性のある他のアレルゲンエキスについてトリプシン様プロテアーゼ活性を測定したところ、アルテルナリアに強いトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。

考察

第2章および第3章において、コナヒョウヒダニの主要アレルゲンである Der f I と Der f III が各々システインプロテアーゼとトリプシン様プロテアーゼであることを論じてきた。ところで室内塵中には、ケナガコナダニ、ササラダニ類、ニクダニ類等 30-40種のダニが生息していると言われている^{77,78)}。中でも気管支喘息等のアレルギー性疾患に関与するヒョウヒダニ類がダニ総数の70-80%

を占めると言われている。

吸入性アレルギー関与の気管支喘息やアレルギー性鼻炎等の予防治療法として、現在薬物療法、特異的減感作療法、環境整備の3種の方法が施行されている。これらの中で、薬物療法は成長期の幼児にとって負担になることから、また特異的減感作療法は頻回の通院並びに治療効果が現われるまで長時間（1-3年）かかることなどから、環境整備が小児科領域において特に注目されている。しかし寝具類を含む住宅環境からダニアレルゲンを除去するにしても、個人個人によりその程度が異なり、ダニアレルゲン量を示す客観的指標が必要である。従来ダニ汚染の指標としては、まずダニ虫体数が用いられてきたが、この方法では判断の基準となる形態学的な知識が要求され少数の専門家のみ測定可能であり、かつ非常に時間を要した。こうして最近ダニ主要アレルゲンに対する抗体を用いた sandwich ELISA法により、ダニ主要アレルゲン量を測定しようという試みがなされている^{70,71,72,73,74}。しかし、これらの方法はダニ数の測定に比較すれば、正確ならびに敏速になったものの、各家庭で測定するには、繁雑かつ多くの時間と特別な設備を要する。そこで最近ダニの尿成分のグアニンを指標にした簡易な半定量的キット（ACAREX test）が開発され、グアニン量とダニのグループIアレルゲン量との間に高い相関があるとの報告がある^{79,80}。ところでヒョウヒダニの主要アレルゲンがシステインプロテアーゼやトリプシン様プロテアーゼであることが判明したので、これらのプロテアーゼ活性を指標にすれば、ACAREX test 同様簡便にダニ主要アレルゲン量を推定することが可能かもしれない。そこでこの可能性を追及

するために、H D E のプロテアーゼ活性を測定し、これとダニ主要アレルゲンとの関連を検討した。

まず H D E 中のプロテアーゼ活性を測定したところ、システインプロテアーゼ活性は検出されなかったものの、30 検体全例においてトリプシン様プロテアーゼ活性が高感度の MCA 基質で検出された。また同様な結果が発色基質である N-benzoyl-DL-arginine-pNA を用いても得られた。しかも様々な合成 MCA 基質を用いてその基質特異性を検討したところ H D E のトリプシン様プロテアーゼと Der f III の基質特異性は非常に類似していた。また Der f III と M B E 由来のトリプシン様プロテアーゼとの基質特異性も類似していた (data not shown)。これらの結果より H D E 由来のトリプシン様プロテアーゼはダニ由来である可能性が示唆された。

そこでさらにこの可能性を確かめるために、M B E および M F E 由来のトリプシン様プロテアーゼの活性ピークの retention time を HPLC ゲルクロマトグラフィーにて求めたところ、M B E は 18-19 min、M F E は 20-21 min であった。次ぎに H D E 8 検体について同様に HPLC ゲルクロマトグラフィーによりトリプシン様プロテアーゼ活性を測定したところ、多くの retention time は 18, 19 min であり、M B E 由来のそれと類似していた。一方中には、M F E 由来の Der f III の retention time と一致するものが認められた。またアルテルナリアの活性ピークの retention time と一致する 24 min にも活性ピークが検出され、H D E 由来のトリプシン様プロテアーゼは、何種類かの混合物によるものであることが示唆された。

次ぎに H D E 中のダニ主要アレルゲン量がこれらトリプシン様プ

ロテアーゼ活性で代用可能か、両者の相関を調べた。Der f I 量と Der f II 量は $r=0.800$ と高い相関を示し、この測定系が正しく各々のアレルゲンを特異的に測定していることが確かめられた。しかし、Der f II 量とトリプシン様プロテアーゼ活性との相関係数は、 $r=0.223$ と低く、室内塵中のトリプシン様プロテアーゼにはダニに依存するものと依存しないもののが存在することが判明した。また Der f II 量と Der p II 量との総和である Der II 量も $r=0.069$ であり、相関が認められなかった。また Der f I 量とトリプシン様プロテアーゼ活性との相関係数は $r=0.001$ であり同様に、相関が認められなかった (data not shown)。このことより、H D E 中のトリプシン様プロテアーゼを指標にして、ダニ主要アレルゲン量を推定することは困難であると思われた。ところで室内塵中の構成物質は花粉類、真菌類、食品等多岐にわたる。そこで室内塵中に含まれる可能性のある 44 種のアレルゲンエキスについてトリプシン様プロテアーゼ活性を測定したところ、真菌のアルテルナリア (Alternaria kikuchiana) に強い活性が検出された。このことより、H D E 中のトリプシン様プロテアーゼの由来の 1 つの候補として、アルテルナリアが示唆された。H D E 中に含まれるトリプシン様プロテアーゼの正確な由来は、現在のところ不明である。しかし、第 1 章で述べたように、トリプシン様プロテアーゼには強い起炎作用があるため、ダニアレルギー患者において、アレルギー性炎症反応を増悪させる因子として作用している可能性が考えられる。それ故トリプシン様プロテアーゼ活性を測定することは、大変意義があるものと思われる

第 5 章 コナヒョウヒダニとチリカブリダニとの抗原性の関連について

コナヒョウヒダニ (Df) (Fig. 5-1a) 中には、システインプロテアーゼとトリプシン様プロテアーゼが存在し、各々が主要アレルゲンであること、またハウスダストイト (DfとDp) が主要なアレルゲンである室内塵中にもトリプシン様プロテアーゼが存在することが前章までで明らかとなった。

ところで植物や果樹に寄生し、害を及ぼすダニとしてミカンハダニやナミハダニなどのハダニ類が知られている。これらのダニは殺ダニ剤に対して容易に抵抗性を獲得しやすいため、大抵の殺ダニ剤は役に立たない。そこでヨーロッパや北アメリカ等では、ハダニの天敵である捕食性のチリカブリダニ (Phytoseilus persimilis: Pp) (Fig. 5-1b: 津久井誠博士 (トーマン株) より写真掲載許可) を用いた、生物農薬の試みがなされている^{81, 82, 83, 84})。ハウスダストマイトであるDfと捕食性のダニであるPpは、分類学的に非常に異なる亜目に属する (Fig. 5-2: Df無気門類, Pp中気門類)。ハウスダストマイトとコナダニ (storage mite) との交差反応性に関する研究はかなり行われている^{85, 86})。しかし、これらのダニは同じ亜目に属する (Astigmatata)。異なった亜目に属するダニ間の交差反応性に関する研究はほとんど行われていない。また、ハウスダストマイトとチリカブリダニとの抗原性を調べることは、非常に重要である。すなわちハダニを扱う従事者がハウスダストマイトに感作され

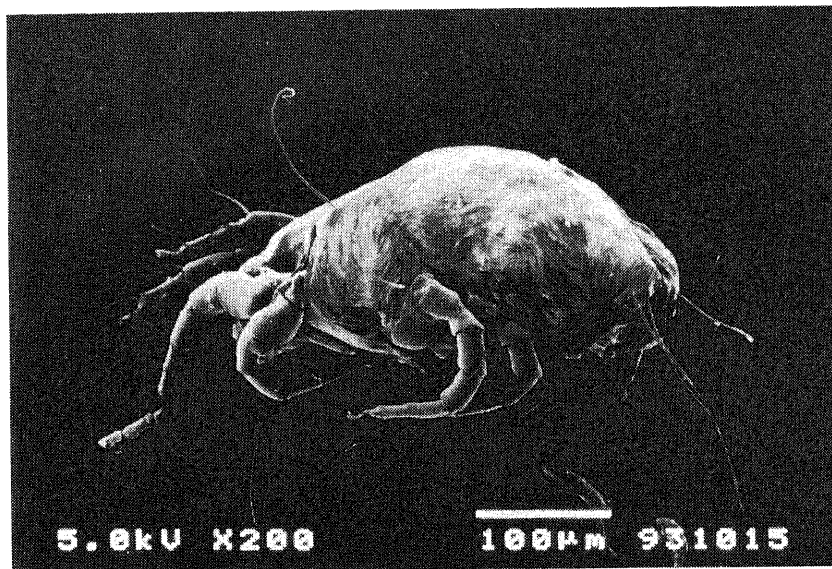


Fig. 5-1a. Electron micrograph showing the house dust mite, D. farinae.

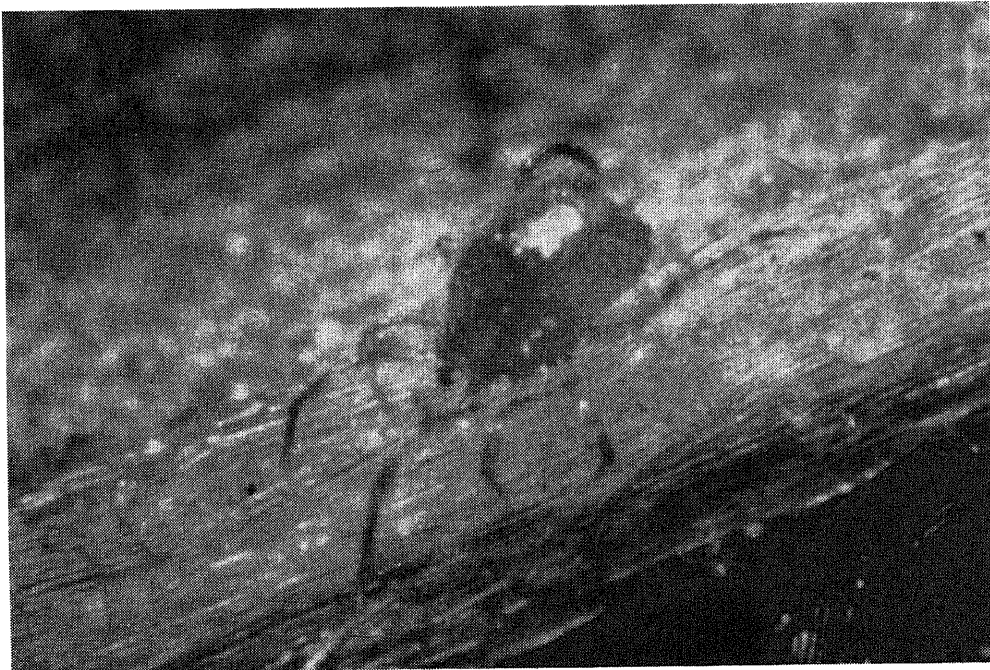


Fig. 5-1b. Phytoseilus persimilis.

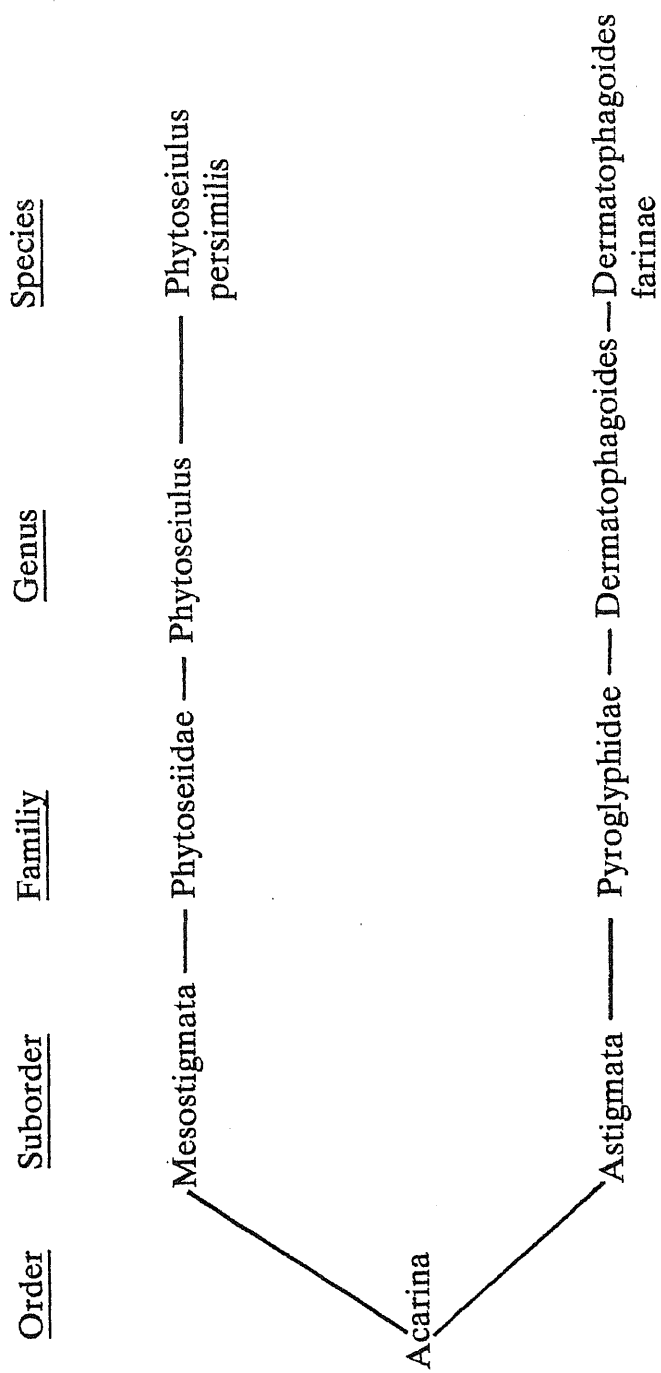


Fig. 5-2. The taxonomic position of the predacious mite P.persimilis and the house dust mite D.farinae.

ている場合、両者に共通抗原性があれば、アレルギー症状を呈する可能性があるからである。

そこで、本章では Df と Pp の間に共通抗原性があるかどうか検討し、その安全性について論ずる。

5-1) 実験材料および方法

ダニ虫体抽出エキス：

チリカブリダニ虫体は Spidex (コッパアート社、オランダ) を使用し、Df 虫体抽出エキス同様ダニ虫体 100mg を第 1 章の方法に準じて調製した。

ウサギ抗 Df 血清：

第 2 章で作製したものを使用した。Der f I および Der f II に対するウサギ血清は安枝らの方法⁴⁵⁾ に準じて作製した。

イムノブロッキング：

14%ゲルで SDS-PAGE を行った後⁵³⁾、Towin ら⁸⁷⁾ の方法に従ってイムノブロッキングを行った。SDS-PAGE で分離した蛋白質を polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon, ミリポア社) に転写した。PVDF membrane をウサギ抗 Df 血清あるいはウサギ抗 Der f I あるいは Der f II と室温で 2 時間反応後、3,000 倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRPO) 標識ヤギ抗ウサギ IgG (カッペル社) と室温で 2 時間反応した。最終的に PVDF

membraneをコニカイムノステインHRP-1000（生化学工業）で発色させた。

プロテアーゼ活性の測定：

プロテアーゼ活性の測定は、第1章に準じた。

アレルギー活性の測定：

第1章の方法に準じて測定した。すなわち、DfあるいはPp抽出エキスをBr-CN活性化濾紙に結合させ、Dfに感作されている20名の喘息患者血清（Dfプツリクテスト陽性、RASTスコア>3）との反応によりELISA法にてアレルギー活性を測定し、またその強度をPhadebas Rast Unit（PRU）表示した⁸⁸⁾。

ELISA inhibition:

ダニ虫体抽出エキス（DfおよびPp）は0.1%BSAを含む0.02M PBSで1mg/mlの濃度より2倍希釈系列で10段階以上希釈した。各試料0.07mlと10,000倍に希釈したウサギ抗Df血清0.07mlを混合し（中和溶液）、25℃24時間インキュベートした。なおcontrolとしてダニ虫体抽出エキスの代わりにBSA-PBSを用いウサギ抗Df血清と混合したものの調製した。一方ポリスチレン製96穴マイクロプレートの各wellに、0.1M炭酸緩衝液（pH 9.5）で希釈した10ug/mlのDf溶液を加え、25℃で1晩放置した。次いで1wellあたり0.05%のTween 20を含むPBS（pH 7.4）洗浄液0.3mlで3回洗浄した。次いで3%ゼラチンを1wellあたり0.3ml添加

し、室温で1次間ブロッキングを行った。上記洗浄液でプレート4回洗浄後、1 wellあたり中和溶液を0.05 ml 加え25℃で2時間反応させた。その後プレートを4回洗浄後4,000倍に希釈したHRP0標識ヤギ抗ウサギIgG (カッセル社) を1 wellあたり0.05 ml 加え、25℃で2時間インキュベートした。4回洗浄後、1 wellあたり、基質 (o-フェニレンジアミン溶液) 0.1 mlを加え、室温で30分間酵素反応を行った。2 N 硫酸0.1 mlで反応停止後、THERMO MAX マイクロプレートリーダー (Molecular Device社) にて490 nmの吸光度を測定した。% inhibition は次ぎの式でもとめた。

中和溶液でのOD490 値

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{\text{中和溶液でのOD490 値}}{\text{control 溶液でのOD490 値}} \times 100$$

なおバックグラウンド値 (平均OD490=0.02) は実測値から差し引かれ、% inhibition が求められた。

5-2) チリカブリダニ虫体抽出エキス中のプロテアーゼ活性

P p 虫体抽出エキス中には、トリプシン様プロテアーゼ活性は検出されたが、システインプロテアーゼ活性はまったく検出されなかった (Fig. 5-3)。一方 D f 虫体抽出エキス中には、両プロテアーゼ活性が検出された。

5-3) Pp抽出エキスと Df抽出エキスの SDS-PAGE分析

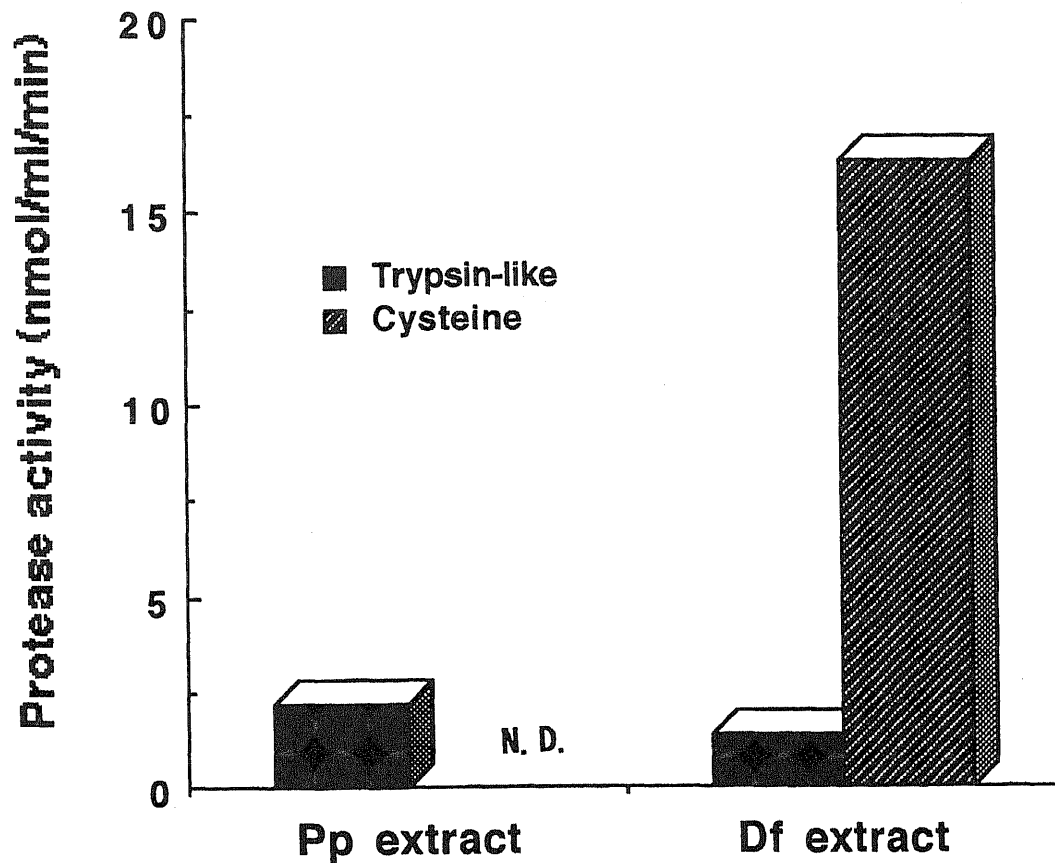


Fig. 5-3. Protease activities in Pp and Df extracts. Trypsin-like protease activity was measured using Boc-Phe-Ser-Arg-MCA in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) and cysteine protease activity was measured using Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA in 0.1 M PB (pH 6.0) containing 1 mM cysteine. N.D.(not detected).

Pp抽出エキスとDf抽出エキスでのSDS-PAGEにおける泳動パターンをFig. 5-4に示した。両エキスとも多くのバンドが検出されしかもPp抽出エキスにもDer f I やDer f IIの分子量に相当する付近にバンドが検出された。

5 - 4) 交差抗原性

イムノブロッティング解析で、ウサギ抗Df血清とPp虫体抽出エキスとの間において、4つの交差抗原性を有する蛋白質が検出された。それぞれの分子量は、70, 72, 75, 110kDaであった(Fig. 5-5)。一方ウサギ抗Der f I および抗Der f IIとPp虫体抽出エキスとの間には、反応が認められなかった。Pp抽出エキスとDf抽出エキスとの交差抗原性の程度を定量するために、ウサギ抗Df血清を用いたELISA inhibitionを行った(Fig. 5-6)。1 mg/mlの高濃度Pp抽出エキスを用いても50% inhibitionは起こらなかった。20% inhibitionに必要なPp抽出エキスの濃度(500 ug/ml)は、Df抽出エキスに必要な濃度(0.44 ug/ml)の約2,000倍であった。

5 - 5) 交差アレルギー性

Df抽出エキス結合濾紙あるいはPp抽出エキス結合濾紙とヒト抗DfIgE抗体との反応は、Pp抽出エキス結合濾紙においては20例中例が陽性を示し、その平均PRU値は1.4であった。一方、Df抽出エキス結合濾紙での平均PRU値は42.8であった(Table 5-1)。

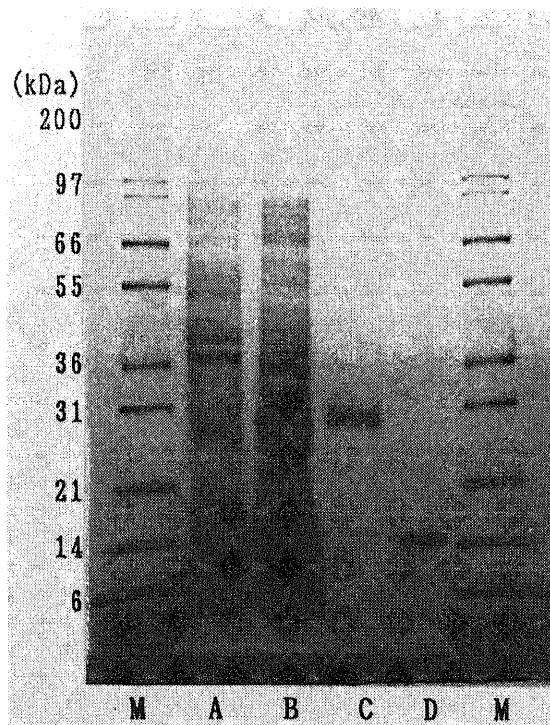


Fig. 5-4. SDS-PAGE pattern of Pp and Df extracts. Each sample was analyzed on 4-20% gradient polyacrylamide gel under reducing condition. Lane A, Pp extract. Lane B, Df extract. Lane C, Der f I. Lane D, Der f II. Lane M, marker proteins.

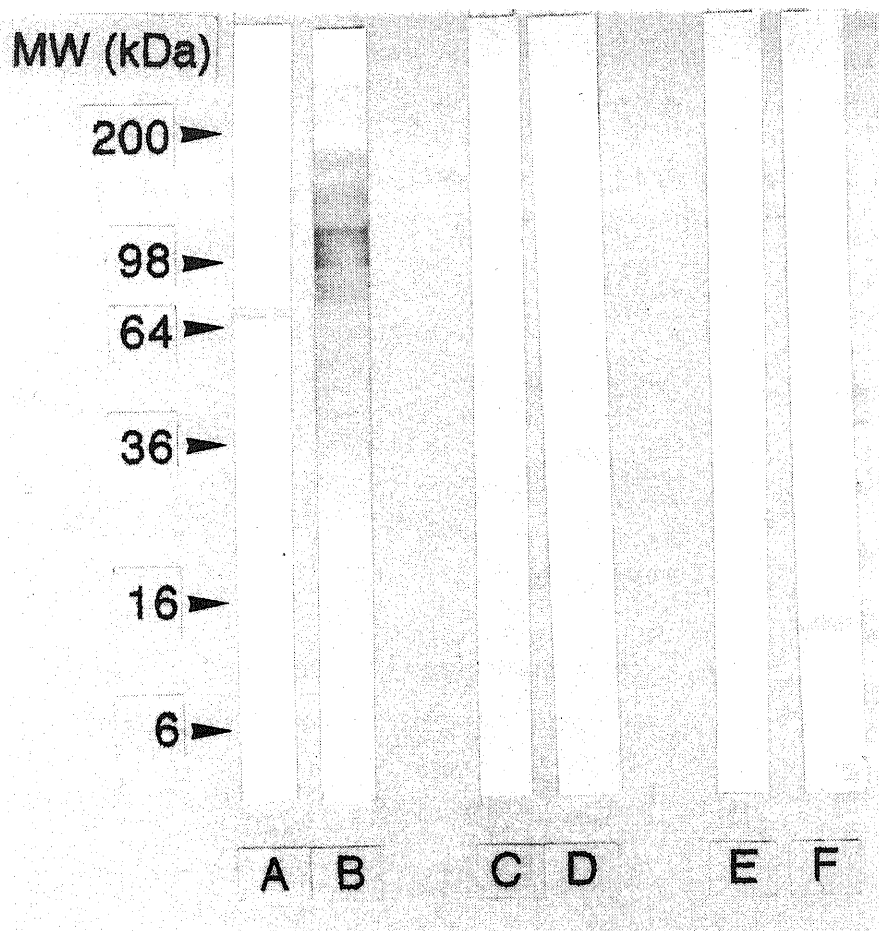


Fig. 5-5 Immunoblot analyses of Df and Pp extract with either rabbit anti-Der f I and Der f II sera or rabbit anti-Df sera.

Lane A: a staining of Pp extract with rabbit anti-Df sera and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG.

Lane B: a staining of Df extract with rabbit anti-Df sera and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG.

Lane C: a staining of Pp extract with rabbit anti-Der f I sera and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG.

Lane D: a staining of Df extract with rabbit anti-Der f I sera and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG.

Lane E: a staining of Pp extract with rabbit anti-Der f II sera and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG.

Lane F: a staining of Df extract with rabbit anti-Der f II sera and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG.

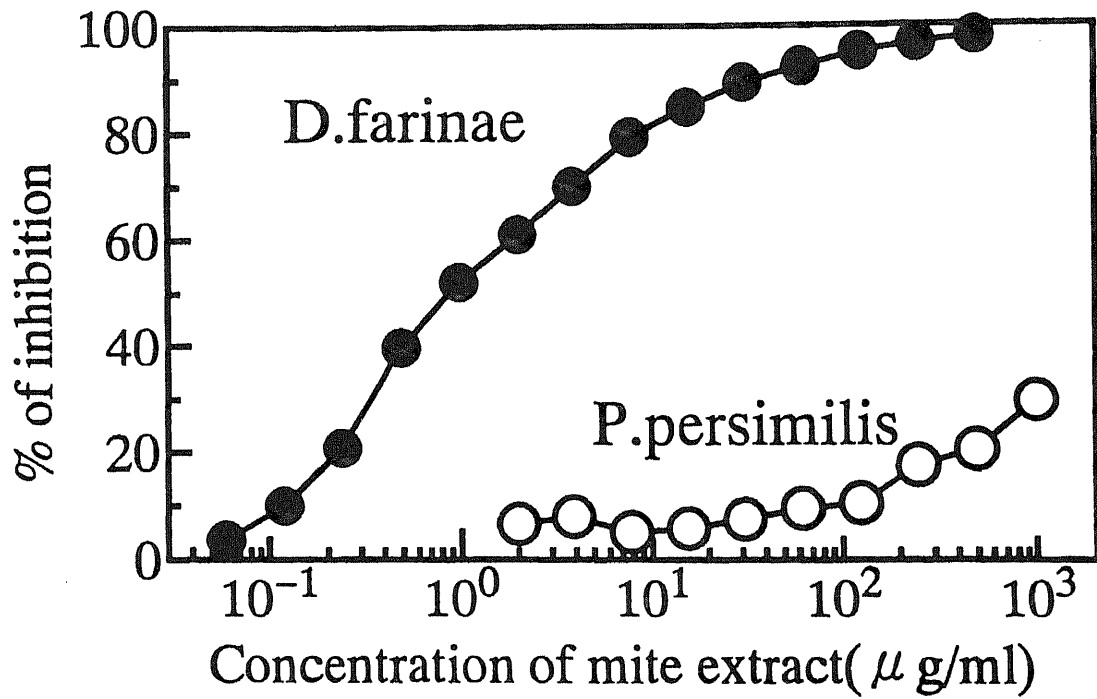


Fig. 5-6. ELISA-inhibition of rabbit anti-Df IgG by D. farinae(●) and P. persimilis(○).

Table 5-1 Specific IgE to Df and Pp allergens

Sera No.	RAST (PRU/ml)	
	<i>Df</i>	<i>Pp</i>
1	52.5	<0.35
2	20.2	<0.35
3	17.0	1.1
4	4.9	<0.35
5	11.5	0.50
6	12.9	<0.35
7	11.3	<0.35
8	6.5	<0.35
9	58.8	<0.35
10	25.9	<0.35
11	125.6	4.0
12	80.2	<0.35
13	13.6	<0.35
14	70.3	<0.35
15	144.8	0.41
16	5.4	<0.35
17	120.9	1.1
18	7.7	<0.35
19	25.1	<0.35
20	41.7	<0.35

5 - 6) 要約、考察

要約

- ① ハウスダスト中のダニである Df と捕食性のダニである Pp との抗原性の関連を調べた。
- ② Pp 虫体抽出エキス中には、トリプシン様プロテアーゼ活性は検出されたが、システインプロテアーゼ活性はまったく検出されなかった。
- ③ イムノプロット法による解析によると、これら異なった亜目に属するダニ間には、弱い交差抗原性が認められた。しかし、この反応性は、Df の主要アレルゲンである Der f I と Der f II には関連していなかった。
- ④ ELISA inhibition による結果から 20 % inhibition に必要な Pp 抽出エキスの濃度は、Df 抽出エキスの濃度の約 2000 倍であった。
- ⑤ Df と Pp との交差アレルゲン性は極めて弱いものであった。

考察

ハウスダストマイトであるコナヒョウヒダニ (Df) やヤケヒョウヒダニ (Dp) と貯蔵食品に寄生する storage mite である Lepidoglyphus destructor、Glycyphagus domesticus、Tyrophagus putrescentiae、Acarus siro との共通抗原性に関する研究はかなり行われているが^{85, 86)}。しかもこれらのダニは同じ亜目に属し、共にア

アレルギー症状を引き起こす^{1, 2, 89, 90)}。ところで、ハウスダストマイトと捕食性のダニであるチリカブリダニ (Pp) との間の共通抗原性に関する研究は、行われていない。これらのダニは異なる亜目に属する⁹¹⁾。しかし、ハウスダストマイトに感作されている農業従事者がチリカブリダニを扱う場合、喘息や鼻炎などのアレルギー症状を起こす危険性があるかどうかを調べることは非常に重要である。Pp抽出エキスにはDf抽出エキス同様幅広い分子量にわたって多くの蛋白質が存在した。そこでまずDfとPpとの間に交差抗原性があるかDfに対するウサギ血清を用いたイムノブロット法により検討した。その結果Pp抽出エキスの中に4種類の交差抗原性を有する蛋白質が検出されたが、いずれも分子量が70kDa以上であり、Dfの主要アレルギーであるDer f IあるいはDer f IIとは関連がなく、その交差反応性は弱いものであることが示唆された。またPp抽出エキス中には、システインプロテアーゼ活性が検出されなかったことも、Der f Iに相当するアレルギーが存在しないことを示唆している。一方トリプシン様プロテアーゼ活性は検出されたが、この活性は極めて弱いものであり、Der f III分子に相当する蛋白質とは異なるものと思われる。次ぎにこの交差反応性の程度をDfに対するウサギ血清を用いたELISA inhibition法により比較検討したところ、20% inhibitionを与えるPp抽出エキスの濃度は、Df抽出エキスの2,000倍以上であった。よってDfとPpとの間の交差抗原性は、非常に弱いことが判明した。

つぎにDfに感作された20名の喘息患者血清を用いて、交差アレルギー性を検討した。その結果、Pp抽出エキス結合濾紙においては20

例中 5 例が陽性を示し、その平均 P R U 値は 1.4 であった。一方、Df抽出エキス結合濾紙での平均 P R U 値は 42.8 であることより、両者の共通アレルギー性は極めて弱いものであることが判明した。今回ハウスダストマイトのもう一方の種であるヤケヒョウヒダニ (Dp) と Pp との交差反応性は検討していない。Df と Dp の主要アレルギーである Der f I と Der p I 並びに Der f II と Der p II との抗原性はほとんど同一であると報告されている⁴⁵⁾。さらに他の分子においても同様な事が言われている。よって Dp と Pp との交差アレルギー性も非常に低いと思われる。Df と Dp のアレルギー性疾患における重要性は、これらのダニ数が他種のダニに比べて室内塵中に多いことに起因する。Pp は温室のような閉鎖環境で、ハダニに対する天敵農薬として利用されている。Astarira は、ナミハダニに対する職業アレルギーを報告している^{92,93)}。一方 Pp に対する職業アレルギーの報告はまだない。Pp はナミハダニを捕食することによって、それらの増加を抑制する。1 匹の Pp が多くのナミハダニを捕食するので、Pp の数はナミハダニほど増加しないと思われる。また Pp はハダニ類がいなくなると自然に消滅してしまう。これらの理由から、Pp に対する職業性アレルギーは、ナミハダニに対する職業性アレルギーに比べて非常に少ないと思われる。さらに Df と Pp との交差抗原性および交差アレルギー性は極めて弱いこと、またこの交差反応は Df の主要アレルギーである Der f I や Der f II とは関連していないことより、Df に感作されたヒトにおいて、Pp によるアレルギー症状の誘発は、極めて希であると思われる。

総 括

気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのIgE抗体の関与するI型アレルギー（アトピー）性疾患の原因物質（アレルゲン）として最も重要なコナヒョウヒダニに着目し、これに含まれるプロテアーゼと主要アレルゲンとの関連について検討した。さらに室内塵抽出エキス中のプロテアーゼ活性を指標にして、簡易にダニ主要アレルゲン量が測定可能かどうか検討した。また農作物に被害を及ぼすハダニの天敵生物農薬として使用されているチリカブリダニについてもプロテアーゼ活性を測定し、さらにはコナヒョウヒダニとの共通抗原性について検討を行った。得られた結果は以下の7点に総括される。

1. モルモットにCMEを in vivo で投与すると、血管透過性の亢進が認められ、同時に血漿トリプシン様プロテアーゼ活性の上昇とATIIIおよび補体価の減少が認められた。またCME自身にもトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。CMEと同時にあるいはCME投与3分間前にセリンプロテアーゼ阻害剤を皮内投与あるいは静脈内投与するとき、いずれにおいても血管透過性の亢進が有意に抑制された。これらの結果より、CME中のトリプシン様プロテアーゼがモルモットにおける血管透過性の亢進に関与していることが示唆された。
2. CMEをSephacryl S-200ゲルクロマトグラフィー分画したところ、分子量の異なる3種のプロテアーゼ活性が検出された。

PK.1プロテアーゼはMW60kDaの位置に存在し、この活性はaprotininやFUT-175およびSBTIなどのセリンプロテアーゼ阻害剤によって阻害を受けた。また合成ペプチド基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCAや Boc-Val-Leu-Lys-MCA の様に、アルギニンやリジンのC末端側のペプチド結合を選択的に加水分解し、至適pHが7.0-8.0であった。以上のことよりPK.1プロテアーゼはDf由来のセリンプロテアーゼでトリプシン様プロテアーゼ型であることが判明した。

一方PK.2およびPK.3プロテアーゼはBoc-Val-Leu-Lys-MCA および Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA を加水分解し、それぞれMW30および20kDaの位置に検出された。またこの活性は、TLCKやleupeptinおよびヨード酢酸によって阻害を受け、システインやEDTAによって活性化されたことから、Df由来のシステインプロテアーゼであることが判明した。さらにDfの主要アレルゲンDer f Iが存在するダニ抽出エキスの60%飽和硫酸沈殿分画およびDer f IのゲルクロマトグラフィーでのMW20kDaの位置にPK.3システインプロテアーゼ活性が検出されたことより、両者の関連が強く示唆された。

3. CMEの60%飽和硫酸沈殿分画よりシステインプロテアーゼの精製を試みたところ、各種クロマトグラフィーのいずれの段階においても、システインプロテアーゼ活性と強いアレルゲン活性が同一の分画に常に検出された。また最終カラムステップのSephadex G-75ゲルクロマトグラフィーにおいて、システイン

プロテアーゼ活性、アレルギー活性およびOD₂₈₀ が共に一致する単一なピークが得られた。最終精製物である上記ピークの55%飽和硫酸沈殿分画のアミノ酸組成はDer f Iのそれとほぼ同等であり、N末端10残基のアミノ酸配列はDer f Iのそれと完全に一致した。さらにゲル内沈降反応により最終精製物と抗Der f Iとの間に沈降線が生じた。以上の結果よりDf由来のシステインプロテアーゼはDer f Iそのものであることが立証された。

4. セリンプロテアーゼ活性の強いMFEより、硫酸塩析、陰イオン交換およびゲルクロマトグラフィーによりセリンプロテアーゼを精製した。SDS-PAGEによるこのプロテアーゼのMWは34kDaであり、至適pHおよび温度はそれぞれ8.0 および47℃であった。また合成ペプチド基質のリジンおよびアルギニンのC末端のペプチド結合を選択的に加水分解し、FUT-175等のトリプシン様プロテアーゼ阻害剤によってその活性が阻害され、他のシステインプロテアーゼ阻害剤やキモトリプシン阻害剤等では阻害されないことから、このものはDf由来のトリプシン様プロテアーゼであることが判明した。精製トリプシン様プロテアーゼはアレルギー活性を有し、ダニアレルギー患者血清を用いた時の陽性率は、Der f IやDer f IIと同様に高かった。またこのもののN末端20アミノ酸残基の配列ならびにアミノ酸組成はすでに報告されているDer f IIIのそれと非常に類似していた。さらにSDS-PAGEでの分子量ならびに硫酸での溶解性などの物理化学

的性質も Der f III と類似していた。以上のことより、Df由来のトリプシン様プロテアーゼは Der f III そのものであることが立証された。

5. 上記結果より Df中のシステインプロテアーゼあるいはトリプシン様プロテアーゼ活性を指標にすることにより、従来行われているヒト抗ダニ IgE 抗体との結合活性を指標にした ELISA 法等による精製法に比較して、短期間に Der f I や Der f III を多量に精製することが可能であると思われる。このことは、これらアレルゲンのアレルギー性疾患における生理的意義の解明に寄与し、ダニアレルギーの発症あるいは治療に役立つ情報を提供するものと思われる。

6. 各家庭 30 件の室内塵より室内塵抽出エキス (HDE) を調製し、各検体中の Der f I, Der f II, Der III 含量、総アレルゲン活性、プロテアーゼ活性、総ダニ抗原活性、ダニ数を測定し、これらの関連を検討した。HDE 30 検体すべてにトリプシン様プロテアーゼ活性が検出されたが、システインプロテアーゼ活性は全く検出されなかった。また HDE 由来のトリプシン様プロテアーゼと Der f III との基質特異性は極めて類似しており、さらに HPLCゲルクロマトグラフィーにおけるダニ由来および室内塵由来のトリプシン様プロテアーゼ活性ピークの retention time は、ほぼ同じであった。しかし、トリプシン様プロテアーゼ活性と Der f I 量あるいは Der f II 量との相関は、認

められなかった。またトリプシン様プロテアーゼ活性と他の指標（総ダニ抗原活性等）との相関も、主要アレルゲン同様低かった。以上のことより、HDE中のトリプシン様プロテアーゼ活性を指標にしてダニ主要アレルゲン量を推定することは、困難であると思われた。しかしトリプシン様プロテアーゼには強い起炎作用あるため、ダニアレルギー患者におけるアレルギー性炎症反応を増悪させている可能性が考えられる。それ故、室内塵中のトリプシン様プロテアーゼを測定することは大変意義があるものと思われる。また真菌である Alternaria kikuchiana に強いトリプシン様プロテアーゼ活性が検出されたことより、HDE中のプロテアーゼ源としての可能性が示唆された。

7. 異なった亜目に属するコナヒョウヒダニ (Df) とチリカブリダニ (Pp) との間には弱い共通抗原性が認められた。しかしこれらの共通抗原性は Der f I あるいは Der f II 分子とは関連していなかった。また Pp 抽出エキス中にシステインプロテアーゼ活性は検出されなかったことより、Der f I 様の分子は存在しないと思われる。一方トリプシン様プロテアーゼ活性は検出されたが、Der f III のそれに比べて非常に弱いものであり、このプロテアーゼは Der f III 分子に相当する蛋白質とは異なるものと思われる。また Df とヤケヒョウヒダニとは、非常に強い共通抗原性があることより、ヒョウヒダニに感作されたヒトにおいて Pp によるアレルギー症状の誘発は極めてまれであると推察される。

参 考 文 献

1. Voorhorst R, Spieksma FTM, Varekamp H, Leupen MJ and Lyklema AW.: The house dust mite (Dermatophagoides pteronyssinus) and the allergen it produces. Identity with the house dust allergen. J Allergy 39, 325-339 (1967)
2. Miyamoto T, Oshima 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 bronchial asthma. J Allergy 42, 14-28 (1968)
3. Platts-Mills TAE and De Weck AL.: Dust mite allergens and asthma—a world wide problem. J Allergy Clin Immunol 83, 416-427 (1989)
4. Baldo BA, Ford SA and Tovey ER.: Toward a definition of the 'complete' spectrum and rank order of importance of the allergens from the house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus. In: Said el Shami A, Merrett TG, eds. Advances in the bioscience, vol 74. Allergy and molecular biology. Oxford: Pergamon Press, 13-31 (1989)
5. King TP.: Immunochemical properties of some atopic allergens. J Allergy Clin Immunol 64, 159-163 (1979)
6. Chapman MD and Platts-Mills TAE.: Purification and characterization of the major allergens from Dermatophagoides pteronyssinus-antigen P1. J Immunol 125, 587-592 (1980)

0)

7. Platts-Mills TAE and Chapman MD.: Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. *J Allergy Clin Immunol* 80, 755-775 (1987)
8. Heymann PW, Chapman MD and Platts-Mills TAE.: Antigen Der f I from the mite Dermatophagoides farinae: structural comparison with Der p I from D. pteronyssinus and epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies. *J Immunol* 137, 2841-2847 (1986)
9. Lind P.: Demonstration of close physicochemical similarity and partial immunochemical identity between the major allergen, Dp 42, of the house dust mite, D. pteronyssinus and corresponding antigens of D. farinae (Df 6) and D. microceras (Dm 6). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 79, 60-65 (1986)
10. Lind P.: Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus. *J Allergy Clin Immunol* 76, 753-761 (1985)
11. Haida M, Okudaira H, Ogita T, Ito K, Miyamoto T, Nakazima T and Hongo O.: Allergens of the house dust mite Dermatophagoides farinae. Immunochemical studies of four allergenic fractions. *J Allergy Clin Immunol* 76, 686-692 (1985)

12. Holck A, Dale S and Sletten K. Purification and characterization of a major allergen from the house dust mite Dermatophagoides farinae. *Allergy* 41, 408-417 (1986)
13. Yasueda H, Mita H, Yui Y and shida T.: Isolation and characterization of two allergens from Dermatophagoides fainae. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 81, 214-223 (1986)
14. Steward GA, Thompson PJ and Simpson RJ.: Protease antigens from house dust mite. *Lancet* 2, 154-155 (1989)
15. Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW and Platts-Mills TAE.: Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mite (Dermatophagoides spp.). *J Allergy Clin Immunol* 83, 1055-1067 (1989)
16. Chua KY, Steward GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM and Turner KJ.: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p I. *J Exp Med* 167, 175-182 (1988)
17. Chua KY, Dilworth RJ and Thomas WR.: Expression of Dermatophagoides pteronyssinus allergen Der p II in Escherichia coli and binding studies with human IgE. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 91, 118-123 (1990)
18. Yuuki T, Okumura Y, Ando T, Yamakawa H, Suko M, Haida M and Okudaira H.: Cloning and sequencing of cDNAs corresponding to mite major allergen Der f II. *Jpn J Allergol*

39. 557-561 (1990)
19. Dilworth RJ, Chua KY and Thomas WR. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust allergen, Der f I. *Cli Exp Allergy* 21, 25-32 (1991)
 20. Trudinger M, Chua KY and Thomas WR. cDNA encoding the major house dust mite allergen Der f II. *Cli Exp Allergy* 21, 33-38 (1991)
 21. Yuuki T, Okumura Y, Ando T, Yamakawa H, Suko M, Haida M and Okudaira H.: Cloning and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen Der f II in Escherichia coli. *Agric Biol Chem* 55, 1233-1238 (1991)
 22. Smith WA, Chua KY, Kuo MC, Rogers BL and Thomas WR.: Cloning and sequencing of the Dermatophagoides pteronyssinus group III allergen, Der p III. *Cli Exp Allergy* 24, 220-228 (1994)
 23. Graziano F, Harley C, Gunderson L and Askanese PW.: IgE antibody production in guinea pigs treated with cyclophosphamide. *J Immunol* 127, 1067-1070 (1981)
 24. Katayama S, Shionoya H and Ohtake S.: A novel method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol Immunol* 22, 89-101 (1978)
 25. Iwaki M, Ino Y, Motoyoshi A, Ozeki M, Sato T, Kurumi M

- and Aoyama T.: Pharmacological studies of FUT-175, nafamostat mesilate. Effects on the pancreatic enzymes and experimental acute pancreatitis in rat. *Jpn J Pharmacol* 41, 155-162 (1986)
26. Mayer MM.: Complement and complement fixation. In *Experimental Immunochemistry* (Edited by Kabat EA and Mayer MM), Edn 2, pp. 133-157. Thomas, Springfield, Ill.
27. Ceska M, Eriksson R and Varga JM.: Radioimmunosorbent assay of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 49, 1-9 (1972)
28. 徳山研一, 田村宏, 森川昭広, 三橋将人, 田沢昌道.: コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) の非免疫学的活性に関する検討. *アレルギー* 34, 213-217 (1985)
29. Ino Y, Yamakawa H, Iwaki M, Okudaira H, Suko M and Miyamoto T.: Dogs hypersensitivity in house dust mites. *Jpn J Allergol* 38, 580-582 (1989)
30. Patterson R.: Investigation of spontaneous hypersensitivity of the dogs. *J Allergy* 31, 351-363 (1960)
31. 中村伸, 峰沢満, 後藤俊二, 橋本道子, 和秀雄.: ニホンザルにおけるスギ花粉自然感作の特徴. *アレルギー* 40, 981 (1991)
32. Nagata S and Glovsky MM.: Activation of serum complement with allergens. *J Allergy Clin Immunol* 80, 24-32 (1987)
33. 田中健蔵編.: 血栓症, メジカルビュー社 PP. 133-138 (1989)
34. Erdod EG and Miwa I.: Effect of endotoxin shock on the plasma kallikrein-kinin system of the rabbit. *Federation*

- proceedings. 27, 92 (1968)
35. Beck JT, Pinter E, Solymer J, McKenna RD and Ritchie AC .: The role of pancreatic enzymes in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gastroenterology* 43, 60-70 (1962)
 36. Aoyama T, Ino Y, Ozeki M, Oda M, Sato T, Koshiyama Y, Suzuki S and Fugita M.: Pharmacological studies of FUT-175, nafamostat mesilate I. inhibition of protease activity in vitro and in vivo experiments. *Jpn J Pharmacol* 35, 203-227 (1984)
 37. 猪好孝, 鈴木邦彦, 佐藤拓夫, 岩城正廣.: Nafamostat mesilate と各種セリン蛋白分解酵素阻害剤の in vitro における作用の比較研究. *日薬理誌* 88, 449-455 (1986)
 38. Steward GA, Butcher A, Lees K and Ackland J.: Immunochemical and enzymatic analyses of extracts of the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus. *J Allergy Clin Immunol* 77, 14-23 (1986)
 39. Barrett AJ.: Human cathepsin B. Purification and some properties of the enzymes. *Biochem J* 131, 801-822 (1973)
 40. Greenberg DM.: Plant proteolytic enzymes. *Methods Enzymol* 2, 54-64 (1955)
 41. Umezawa H.: Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Methods Enzymol* 45, 678-694 (1976)
 42. Ikezawa H, Aoyagi T, Takeuchi T and Umezawa H.: Effect

- of protease inhibitors of actinomycetes on lysosomal peptide hydrolases from swine liver. *J Antibiotics* 24, 488-490 (1971)
43. Ouchterlony O.: Antigen-antibody in gels. IV. Types of reaction in co-ordinated system of diffusion. *Acta Pathol Microbial Scand* 32, 231-240 (1953)
44. Sakaguchi M, Inoue S and Suzuki S.: Fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of IgE antibody to Cryptomeria japonica. *Jpn J Allergol* 35, 233-237 (1986)
45. Yasueda H, Mita H, Yui Y and Shida T.: Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from Dermatophagoides pteronyssinus and the corresponding allergens from Dermatophagoides farinae. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88, 402-407 (1989)
46. Barrett AJ and Kirschke H.: Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* 80, 535-561 (1981)
47. Tovey ER, Chapman MD and Platts-Mills TAE.: Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature* 289, 592-593 (1981)
48. Tovey ER and Baldo BA.: Localization of antigens and allergens in thin sections of the house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus. *J Med Entomol* 27, 368-376 (1990)

0)

49. Suda H, Aoyagi T, Hamada T, Takeuchi T and Umezawa H.: Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J Antibiotics* 25, 263-266 (1972)
50. Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Kunimoto S, Matsuzaki M, Hamada M and Takeuchi T.: Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes. *J Antibiotics* 23, 425-427 (1970)
51. Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M and Takeuchi T.: Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J Antibiotics* 23, 259-262 (1970)
52. Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohumura H, Sawada J and Tanaka I.: Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric Biol Chem* 42, 523-536 (1978)
53. Laemmli UK.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T4 bacteriophage. *Nature* 227, 680-681 (1970)
54. Bradford M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976)
55. Marchalonis JJ and Weitman LK.: Relatedness among proteins: a new method and its application to immunoglobulins.

- lin. Comb Biochem Physiol 38, 609-625 (1971)
56. Kohmoto S, Koderu Y, Takahashi K, Nishimura H, Matushima A and Inada Y.: Activation of kallikrein-kinin system in human plasma by a serine protease from mite. J Clin Biochem Nutr 10, 15-20 (1991)
57. Jany KD, Bekelar K, Pfleiderer G and Ishay J.: Amino acid sequence of an intact chymotrypsin from the larvae of the hornet, Vespa orientalis. Biochem Biophys Res Commun 56, 396-402 (1983)
58. James MNG, Delbaere LTJ and Brayer AG.: Amino acid sequence alignment of bacterial and mammalian pancreatic serine protease based on topological equivalences. Can J Biochem 56, 396-402 (1978)
59. Takahashi K, Aoki T, Kohmoto S, Nishimura H, Koderu Y, Matushima A and Inada Y.: Activation of Kallikrein-kinin system in human plasma with purified serine protease from Dermatophagoides farinae. Int Arch Allergy Appl Immunol 91, 80-85 (1990)
60. Steward GA, Ward LD, Simpson RJ and Thompson PJ.: The group III allergen from the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus is a trypsin-like enzyme. Immunology 75, 29-35 (1992)
61. Matsuzaki G, Shu U, Ando T, Suko M, Ito K and Okudaira H.: Anti-Dermatophagoides farinae group I and II antibodies

- ies in atopic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 99, 463-465 (1992)
62. Wiessmann KJ and Bauer X.: Occupational lung disease following long-term inhalation of pancreatic extracts. *Eur J Respir Dis* 66, 13-20 (1985)
63. Van Toorenbergen AW, Huijskes-Heins MIE, Dieges PH and Leijnse B.: Occupational allergy to pancreatic powder: characterization of IgE-binding antigens in pancreatic extracts by immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 87, 650-654 (1991)
64. Bauer X, König G, Bencze K and Fruhmann G.: Clinical symptoms and bronchial provocation test in thirty-three papain workers: evidence for strong immunogenic potency and clinically relevant proteolytic effects of airborne papain. *Clin Allergy* 12, 9-17 (1983)
65. Lau S, Falkenborst G, Weber A, Werthmann I, Lind P, Butner-Goetz P and Wahn U.: High mite allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* 84, 728-725 (1989)
66. Wood RA, Eggleston PA, Mudd KE and Adkinson NF.: Indoor allergen levels as a risk factor for allergic sensitization [Abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 83, 199 (1989)
67. Peat JK, Britton WJ, Salome CM and Woolcock AJ.: Bronch-

- ial hyperresponsiveness in two populations of Australian school children. III. Effects of exposure to environmental allergens. Clin Allergy 17, 297-300 (1987)
68. Arruda K, Rizzo MC, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills TAE and Naspitz CK.: Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo; Brazil. Clin Exp Allergy 21, 433-439 (1991)
69. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TAE and Cogswell J.: Exposure to house dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood: a prospective study. N Engl J Med 323, 52-507 (1990)
70. Chapman MD, Heymann PW, Wilkins SR, Brown MJ and Platts-Mills TAE.: Monoclonal immunoassays for major dust mite (Dermatophagoides) allergens, Der p I and Der f I, and quantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts. J Allergy Clin Immunol 80, 184-194 (1987)
71. Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TAE, Miller JD, Lopets M and Chapman MD.: A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major Dermatophagoides spp. allergens, Der p I and Der f I. J Immunol Methods. 118, 227-235 (1989)
72. Kind P.: Enzyme-linked immunosorbent assay for determin-

- ation of major excrement allergens of house dust mite species D. pteronyssinus, D. farinae and D. microceras. Allergy 41, 442-451 (1986)
73. Akagawa M, Mori T, Ando T and Okudaira H.: Preparation of specific a major mite allergen, Der f II, by an enzyme linked immunosorbent assay system using monoclonal anti-Der f II antibodies. Biosci Biotech Biochem 56, 1725-1727 (1992)
74. Ovsynannikova IG, Varies LD, Heymann PW and Chapmann MD.: Monoclonal antibodies to group II Dermatophagoides spp. allergens: Murine immune response, epitope analysis, and development of a two-site ELISA. J Allergy Clin Immunol 94, 537-546 (1994)
75. Miyazawa H, Inouye S, Sakaguchi M and Koizumi K.: A reverse-sandwich ELISA for IgG antibody to a pollen allergen. J Allergy Clin Immunol 82, 407-413 (1988)
76. 安枝浩, 秋山一男, 前田裕二, 早川哲夫, 金子富志人, 長谷川真紀, 信太隆夫.: Enzyme-linked immunosorbent assay によるスギ花粉、ヒョウヒダニアレルゲンの定量とアレルゲンエキス標準化への応用. アレルギー 40, 1218-1225 (1991)
77. 宮本昭正, 長野準, 小林節雄, 中島重徳編集.: 吸入性抗原 - 主に喘息の病因として -. メディカル トリビューン社 pp71-93 (1988)
78. 江原昭三編.: ダニのはなし 技報堂出版 pp60-90 (1990)

79. Le Mao J, Pauli G, Tekaia F, Hoyet C, Bishoff E and David B.: Guanine content and Dermatophagoides pteronyssinus allergens in house dust samples. J Allergy Clin Immunol 83, 926-933 (1989)
80. Van der Brempt X, Haddi E, Michel-Mguyen A, Fayon JP, Soler M, Charpin D and Vervloet D.: Comparison of the ACAREX test with the monoclonal antibodies for the quantification of mite allergens. J Allergy Clin Immunol 87, 130 -132 (1991)
81. Chant DA.: An experiment in biological control of Tetranychus telarius(L.)(Acarina:Tetranychidae) in a green house using the predacious mite Phytoseilus persimilis Athias-Henriot (Phytoseiidae) Can Ent 93, 437-443 (1961)
82. Oatman ER, McMurtry JA and Voth V.: Suppression of the two-spotted spider mite on strawberry with mass release of Phytoseilus persimilis. J Econ Ent 61, 1517-1521 (1968)
83. Van de Vrie M, McMurtry JA and Huffaker CB.: Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: a review III. Biology, ecology, and pest status, and host-plant relation of tetranychids. Hilgardia 41, 343-432 (1972)
84. 森 樊 須.:天敵農薬 - チリカブリダニとその生態と応用 -. 社団法人日本植物防疫協会 pp83-88 (1993)
85. Griffin P, Ford AW, Alterman L, Thompson J, Parkinson C,

- Blainey AD, Davies RJ and Topping MD.: Allergenic and antigenic relationship between three species of storage mite and the house dust mite, Dermatophagoides farinae. J Allergy Clin Immunol 84, 108-117 (1989)
86. Van Hage-Hamsten M, Johansson SGO, Johansson E and Wiren A. Lack of allergenic cross-reactivity between storage mites and Dermatophagoides pteronyssinus. Clin Allergy 17, 23-31 (1987)
87. Towin H, Staehelim T and Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)
88. Evans R.: III. Variability in the measurement of specific IgE antibody by the RAST procedure. J Allergy Clin Immunol 69, 245-252 (1982)
89. Cunnigton AM.: Mites in bed room air. Nature 217, 1271-1272 (1968)
90. Eaton KK, Dowings FS, Griffiths DA, Lynch S, Hockland S and McNulty DW.: Storage mites culturing, sampling technique, identification and their role in house dust allergy in rural areas in the United Kingdom. Annals of allergy 55, 62-67 (1985)
91. 江原昭三編.: 日本ダニ類図鑑. 全国農村教育協会. (1980)
92. Reunala T, Bjorksten F, Forstrom L and Kanerva L.: IgE-

mediated occupational allergy to a spider mite. Clin Allergy 13, 383-388 (1983)

93. Astarita C, Franzese A, Scala G, Sporoviero S and Raucci G.: Farm worker's occupational allergy to Tetranychus urticae: clinical and immunologic aspects. Allergy 49, 466-471 (1994)

謝 辞

終りに臨み、本研究をまとめるにあたり、終始懇切なご指導とご鞭撻を頂き、さらに本論文のご校閲を賜りました恩師、千葉大学薬学部澤井哲夫教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行並びに完成に至るまで、直接ご指導、ご鞭撻を頂き、さらに本論文のご校閲を賜りました鳥居薬品株式会社研究所猪好孝博士に厚くお礼申し上げます。また有益なご指導とご助言を頂きました東京大学医学部物療内科奥平博一講師を初めとする諸先生方に厚く感謝いたします。

さらに本研究の機会を与えて頂くとともに実験のご協力を頂いた鳥居薬品株式会社研究所諸兄諸姉に厚くお礼申し上げます。

主 論 文 目 録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Y. Ino, T. Ando, M. Haida, K. Nakamura, M. Iwaki, H. Okudaira and T. Miyamoto.: Characterization of the proteases in the crude mite extract. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 89, 321-326 (1989) 国際誌
2. T. Ando, Y. Ino, M. Haida, H. Maeda, H. Yamakawa, M. Iwaki and H. Okudaira.: Isolation of cysteine protease in the crude mite extract, *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 96, 199- 205 (1991) 国際誌
3. T. Ando, R. Homma, Y. Ino, G. Ito, A. Miyahara, H. Yamakawa, M. Iwaki, Y. Okumura, M. Suko, M. Haida and H. Okudaira.: Is a trypsin-like protease of mites a Der f III allergen? *Jpn J Allergol* 41, 704-707 (1992) 学会誌
4. T. Ando, R. Homma, Y. Ino, G. Ito, A. Miyahara, T. Yanagihara, H. Kimura, S. Ikeda, H. Yamakawa, M. Iwaki, Y. Okumura, M. Suko, M. Haida and H. Okudaira.: Trypsin-like protease of mites: Purification and characterization of trypsin-like protease from mite faecal extract *Dermatophagoides fari-*

nae. Relationship between trypsin-like protease and Der
f III. Clin Exp Allergy 23, 777-784 (1993) 国際誌

5. R. Homma, T. Ando, A. Miyahara, H. Kimura, G. Ito, N. Uesato,
Y. Ino and M. Iwaki.: Antigenic relationship between the
house dust mite Dermatophagides farinae and the predaci-
ous mite Phytoseilus persimilis. Jpn J Allergol 43, 1351
-1354 (1994) 学会誌

参 考 論 文

1. T. Yuuki, Y. Okumura, T. Ando, H. Yanakawa, M. Suko, M. Haida and H. Okudaira.: Cloning and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen Der f II in Escherichia coli. Agric Biol Chem 55, 1233-1238 (1991)

学会誌

2. M. Akagawa, T. Mori, T. Ando and H. Okudaira.: Preparation of specific monoclonal antibodies against Der f II, one of the major allergens of Dermatophagoides farinae. Jpn J Allergol 40, 1239-1242 (1991) 学会誌

3. T. Yuuki, Y. Okumura, T. Ando, H. Yamakawa, M. Suko, M. Haida M. Dohi and H. Okudaira.: Synthesis of biologically active recombinant Der f II. Int Arch Allergy Appl Immunol 94, 354-356 8. (1991) 国際誌

4. H. Yasueda, H. Mita, K. Akiyama, T. Shida, T. Ando, S. Sugiyama and H. Yamakawa.: Allergens from Dermatophagoides mites with chymotryptic activity. Clin Exp Allergy 23, 384-390 (1993) 国際誌

主 査 、 副 査 名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行なわれた。

主査 千葉大学教授 (薬学部) 薬学博士 澤井哲夫

副査 千葉大学教授 (薬学部) 薬学博士 五十嵐一衛

副査 千葉大学教授 (薬学部) 薬学博士 斎藤和季

副査 千葉大学教授 (薬学部) 薬学博士 堀江利治

副査 千葉大学教授 (薬学部) 薬学博士 小林 弘