

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4234207号
(P4234207)

(45) 発行日 平成21年3月4日(2009.3.4)

(24) 登録日 平成20年12月19日(2008.12.19)

(51) Int. Cl.		F I		
GO 1 N 33/569	(2006.01)	GO 1 N 33/569	F	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Q	

請求項の数 5 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願平10-528703	(73) 特許権者	500139981
(86) (22) 出願日	平成9年12月19日(1997.12.19)		ファディア・アクチボラゲット
(65) 公表番号	特表2001-507130(P2001-507130A)		Phadia AB
(43) 公表日	平成13年5月29日(2001.5.29)		スウェーデン751 37ウプサラ、ボッ
(86) 国際出願番号	PCT/SE1997/002172		クス6460
(87) 国際公開番号	W01998/028624	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成10年7月2日(1998.7.2)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成16年6月24日(2004.6.24)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	9604815-2		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成8年12月20日(1996.12.20)	(74) 代理人	100116311
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症の診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

個体由来の試料に含有される抗体が、rAsp f4およびrAsp f6ならびそれらのABPA関連フラグメントから選択される、1つまたはそれ以上のABPA関連組換え体アレルゲンと反応性があるかどうかを決定することを特徴とする、ヒト個体のABPA検査方法。

【請求項2】

組換え体アレルゲンに対する抗体、特にIgEクラスもしくはIgGクラスまたはそれらサブクラスの抗体のレベル測定のために個体由来の体液試料でインビトロ免疫検定を行うことを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】

IgEクラスの抗体が測定されることを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項4】

rAsp f4およびrAsp f6ならびそれらのABPA関連フラグメントから選択される、1つまたはそれ以上のABPA関連組換え体アレルゲンを含む、ヒト個体のABPAのインビボ検査のための組成物。

【請求項5】

ABPA検査を皮膚試験により行うことを特徴とする、請求項4記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明はアレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)の診断方法およびその方法に用

いる組換え体アレルゲンに關与する。優先期間中に、優先権出願においてrAsp f2と呼んでいたその組換え体アレルゲンは、公式にはrAsp f6と命名された。この明細書では公式名を用いる。

技術背景

アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) アレルギー性気管支肺アスペルギルス症は、アスペルギルス種、主に*A. fumigatus*が原因の非常に激しいアレルギー性複合症である。ABPAは、主にアトピー性喘息(8-12)または嚢胞性線維症(16-19)を長年患っている患者のアスペルギルス抗原に対し過敏性になる結果である。当初は稀な疾病(13)として考えられていたけれども、ABPAは近年より多い頻度で確認されている。様々な臨床的症状のABPAが、*A. fumigatus*に感作された喘息患者の約15%で生じたと報告され(14,15)、一方、嚢胞性線維症の患者では発生率が10~35%で変化したと報告されている(16,17)。ABPAは、定義された臨床的、血清学的、放射線学および病理学的特徴を有する、喘息から致命的な破壊的肺疾病までの免疫疾病であると言われる(8,18-22)。その激しさから、*A. fumigatus*に対する即座の皮膚反応性が見られる慢性喘息または嚢胞性線維症患者では、ABPAを防ぐべきである(8)。ABPAの診断基準は、喘息または嚢胞性線維症、レントゲン撮影用浸潤の記録(history of roentgenographic infiltrate)(殆どの場合)、*A. fumigatus*抽出物に対する即座の皮膚反応性、血清総IgEの上昇、*A. fumigatus*に対する抗体の沈殿、末梢における血液の好酸球増加症、喘息患者およびアスペルギルスに対する皮膚反応性の患者(ただしABPAを除く)からの血清と比較したときの*A. fumigatus*特異的血清IgEおよびIgG上昇、および遠位の気管支は正常に先細りするが、近位(中心部)気管支拡張症である(23-25)。基準が全て存在する場合、診断は容易にできる(26)。しかしながら、中心性気管支拡張症を伴う典型的なABPA患者でさえ、8つ全ての基準が同時に存在するのは稀である。気管支拡張症ならびにある程度は*A. fumigatus*特異的血清IgEおよびIgGの上昇を除くと、ABPAに特定の診断基準はない(26)。さらに肺浸潤および中心性気管支拡張症は*A. fumigatus*に感作しない嚢胞性線維症患者においても通常検出され、それは嚢胞性線維症患者のABPA診断法をより困難なものとする(16)。それゆえ、ABPAの血清学的同定はより高い診断能力を有するが、しかしながら、標準化した信頼できる菌類抽出物の欠乏により阻害される(5,7,27-29)。

Aspergillus fumigatus 抗原 疾病の免疫学的診断法の問題は、菌類抗原性の複雑さに由来する*A. fumigatus*に關係していた。*A. fumigatus*の抗原/アレルゲン抽出物には、何百もの異なるタンパク質(6,30,31)を含み、その限定された一部がヒト血清IgE(6,32,33,35)と結合できる。アレルギー性個体の血清を用いるウエスタンブロット分析により抽出物を調べると、複合体のIgE結合パターンを生ずる40を超えるIgE結合成分を菌類が作成すると報告されている(32,33)。病像をさらに複雑化するのは、異なる患者の血清IgEは多種のパターンの菌類タンパク質を認識する(6,36)。ABPA患者の場合、たとえ同じ一群(batch)の菌類抽出物を用いたとしても、疾病の段階に応じて、別の時に採取した同じ患者の血清から異なるアレルゲン性“フィンガープリント”が得られる(36,37)。ABPAを診断するための粗アレルゲン抽出物の代わりに精製天然アレルゲン性成分を用いることが提唱されている(79)。ABPAと結合する組換え体*A. fumigatus*アレルゲンは早くから報告されている(71,83)。*A. fumigatus*由来の組換え体アレルゲンについての多くの文献では、発明者が著者として記載されている(クローニングと発現:39,43,49,51,52,82,および診断方法の使用:59,66,32,71,76,81)。

優先期間の国際調査の結果

参考文献66、79および84は、特に關連しているとして類別されている。

Banerjeeら(84)は、細胞内に存在することができない抗原について報告している。報告された抗原は、ABPA患者の血清と反応するが、ABPAではなく*A. fumigatus*で感作した患者の血清と抗原が反応しないことを示唆するデータはない。

Moserら(66)およびLittleら(79)は、ABPAではなく*A. fumigatus*で感作した患者の血清およびABPA患者の血清としばしば反応するため、ABPAの鑑別診断法の見込みのない分泌タンパク質/抗原について報告している。

10

20

30

40

50

本発明の目的

本発明の大きな目的は、ABPAの改良した診断法を提供することである。

1つ目の小さな目的は、ABPA診断における十分な特異性および感度を有するインビトロ診断方法を提供することである。

2つ目の小さな目的は、免疫検定および皮膚反応性測定方法をそれぞれ含む、インビトロおよびインビボ両方のABPA診断に使用し得る十分に定義されたアレルゲン調製を提供することである。

発明

本発明の第一の主な観点は、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ABPA）の診断方法である。この観点は、反応物としてABPA関連組換え体アレルゲン、すなわち、患者のABPA疾病が*A. fumigatus*に対するアレルギー性感作に差異を生じ得るため、種々のIgクラス/サブクラス、すなわちIgEクラスまたは総IgGもしくはIgGサブクラス（IgG1, IgG2, IgG3およびIgG4）等の抗体が検出され得るエピトープを有する組換え体アレルゲンを用いることを特徴とし、特に嚢胞性線維症患者に有用である。

ABPA関連組換え体アレルゲンの観念には、起源とは無関係の、示した鑑別診断法を可能にする上記抗体結合性を有する、何れの組換え体アレルゲンも含む。それには、特に、*A. fumigatus*およびそのABPA関連フラグメントから得られるABPA関連組換え体アレルゲンを包含する。*A. fumigatus*からクローニングしたABPA関連組換え体アレルゲンとして、その観念には、*A. fumigatus*のABPA関連アレルゲンと共通の1つまたはそれ以上のABPAエピトープを有する、他の源から得られたABPA関連アレルゲンおよびフラグメントを包含する。優先日において、上記同様、*rAsp f4*および*rAsp f6*ならびにそれらのフラグメントは、最も有用なABPA関連アレルゲンであると見なされていた。ABPA関連組換え体アレルゲンについて定義したように、抗体に結合能を有する種々の誘導体形もまた含まれる。

種々の副観点には、下記のインビトロおよびインビボの試験プロトコールを含む。

2つ目の本発明の主な観点は、ABPA患者に存在するヒトIgEに結合する新規ABPA関連組換え体アレルゲンであり、本発明の第一の観点に有用となる。

本発明の第2の主観点の種々の副観点は下記から明らかであり、非誘導性、不溶性およびラベルされたABPA関連アレルゲンを含むがこれらに限定されない誘導体形を含む。

本発明の他の観点は、他のアレルゲンに行うように除感作処置のためにABPA関連アレルゲンを使用することである。

*Aspergillus fumigatus*のアレルゲンのクローニング

クローニングのストラテジには、ファージミドpComb3（47）を用い、互いに結合するロイシンジッパータンパク質JunとFosを用いた（74,48,74,75）。

システイン残基が隣接するjunロイシンジッパーをコードするDNAをウイルス性コートタンパク質のN末端に融合して得られる修飾gIII産物は、LacZプロモーターにより発現され、peIBリーダーペプチドにより*E. coli*のペリプラズムに分泌され、それゆえヘルパーファージの感染においてファージ分子に構造的に組込まれた。ファージミドの2つ目のLacZプロモーターを用いて、fosロイシンジッパードメイン（システイン残基が隣接し、*A. fumigatus*のcDNAタンパク質産物にN末端融合ペプチドとして共発現する）は、peIBリーダーペプチドを用い*E. coli*のペリプラズムに分泌された（50）。Jun-Fosヘテロ2量体化およびジスルフィド結合形成によりファージ分子に組込まれたgIII-Jun融合タンパク質は、FosロイシンジッパーをN末端連結したランダム組換え体cDNA産物のファージ表面に共有結合する（48,49）。報告されているエレメントを含むファージミドpJuFoにより、ファージ表面のcDNAライブラリーが発現され提示され、これはショットガンクローニングした*A. fumigatus*ペプチド/タンパク質をコードする場合であり、他のフィラメント状ファージシステムに用いるバイオパンニング（biopanning）法に基く強力なスクリーニング技術の適用を可能とする。ファージ表面に提示されるライブラリーからのcDNAクローニングの成功の鍵は、用いるスクリーニングストラテジにある。考えられる最も重要な要因は、選択ファージに用いるリガンドを標識すること、またはリガンドの天然のコンホメーションを維持し得る方法で固定化することである。疎水性相互作用により固相に直接固定化するとき、タ

10

20

30

40

50

ンパク質は3次元構造が変化するために生物学的活性を失い得ることを考慮しなければならない(54,55)。一般に、リガンドの既知のまたは予想される特徴よりリガンド固定化の使用方法が示される。血清抗体が認識するアレルゲン単離のため、捕獲(capture)抗体の使用は、異なる理由の有力な証明となっている。第一に、免疫グロブリン 定常ドメインC₂、C₃およびC₄に対するモノクローナル抗体は、抗体の抗原結合部位に妨げとならない。第二に、抗IgE抗体で被覆した表面は、アレルギー患者の血清のIgE抗体を選択的に固定化し得る。それゆえ、他の全血清成分を伴い相互作用および交差反応する他のイソ型血清抗体を滲いだ後、IgE結合分子を提示するファージのみ吸着し得る特定表面が得られる(51-53)。

cDNA産物を表し、*A. fumigatus*のmRNAを用いて構成されたライブラリーからファージを選択するpJuFo適用から、*A. fumigatus*で感作した患者の血清のIgE抗体に結合し得る種々様々なファージクローンを得た(表1)。

固体相支持体に固定化 -ライブラリーのスクリーニングに比べて、フィラメント状ファージの表面に表されたcDNAライブラリーのスクリーニング方法には幾つかの利点がある。血清IgEを固定化抗IgE抗体で捕獲することにより、変性せず(56,57)、そのため完全な抗原結合能を有する固定化IgEの均一表面を生ずる。最も重要な利点は、ファージライブラリーは液相中で保存され、そこではリガンドと親和性のあるファージのみが洗浄後も固体相に維持されることである(47,53)。取り除いたファージは、リガンドに親和性のあるファージを増やすために*E. coli*の感染に用い得る。それゆえ、ファージの増殖および選択の連続的段階より、リガンドと親和性のあるタンパク質を提示するファージを増やすことができる(表3)。IgE結合性タンパク質を提示する候補ファージクローンの選択後、10mL培養液から得られるファージ分子は沈殿され、各候補クローンの1010-1013ファージ分子試料が還元条件下SDS-PAGEで分析され、その後ニトロセルロース膜に移され得る(49,51)。ニトロセルロースシート上の自由結合部位を充たすためにブロッキングした後、“一次抗体”として1:10に希釈した患者の血清と共に膜をインキュベーションし、二次抗体としてマウス抗ヒトIgE mAbを用い、ファージ表面に元来存在するcDNA産物にIgEを結合させ視覚化し得る。ウエスタンブロットは、非放射性システム、および検出システムとしてセイヨウワサビ-ペルオキシダーゼ連結ヤギ抗マウスIgを用い容易に発達し得た。ファージ表面に提示される*A. fumigatus* cDNAライブラリーから増やしたIgE結合タンパク質の明確な分子量は、10から50kDa以上の範囲であった。大きさの異なるcDNA挿入物のヌクレオチド配列決定および制限酵素パターンより、オープンリーディングフレームから推定したとおり異なるタンパク質をコードしていることが示された。

*E. coli*での組換え体アレルゲンの製造

製造法の説明的例示により、rAsp f4およびrAsp f6としてデザインされ、*A. fumigatus*からクローニングした2つのABPA関連組換え体アレルゲンが得られる。

rAsp f6: rAsp f6のコーディング配列を含むDNAを、T7プロモーターの転写制御下のもと発現ベクターにクローニングした(78)。その構成は、メチオニン残基1つをアレルゲンアミノ酸配列のN末端に加え、その一方で8残基長の-VEHHHHHHをC末端に加えるという方法でデザインした。その6つのヒスチジン残基は金属キレートアフィニティークロマトグラフィーのアフィニータグの役割をする。配列確定後、その構築物を*E. coli* BL21 [pT7POL23]に導入し(77)、そのT7RNAポリメラーゼ合成は増殖培養の温度を37℃以上に上げることにより誘導される。rAsp f66を産生するために、適量の構成物質を含む1リッターLB培地に、30℃で一夜増殖したスターター培養1mLを接種した。30℃の増殖で約3時間の後、OD₆₀₀0.7で、培養温度を42℃にシフトし発現を誘導した。誘導温度でインキュベーションして4時間後、細胞を遠心分離により回収し、0.5M NaClおよび5mM イミダゾールを含む氷冷20mM Tris-HCl pH8.0(再懸濁バッファー)50mLに再懸濁した。細胞を超音波で破壊し、遠心分離で不溶性の残骸を除去した。過剰発現したアレルゲンを含む上清を0.22μmで濾過し、残存している微粒子物資を除去し、事前にNi²⁺で電荷を与え、再懸濁バッファーで平衡化した5mL HiTrapキレート化カラム(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)を2つ直列に連結した組み立て(assembly)に流し入れた。そのカラム組み立てを

10

20

30

40

50

最初に再懸濁バッファー50mLで洗浄し、次に60mMまでのイミダゾールを加えた再懸濁バッファー50mLで洗浄した。rAsp f6を溶出するために、20mM Tris-HCl pH8.0 / 0.5M NaClにおける60-500mMイミダゾールの30mL直線状勾配を適用し、1mL画分を回収しSDS-PAGEで分析した。rAsp f6を含む画分を保存し、平衡化したSuperdex 200カラム (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) でゲル濾過し、0.15M NaClで溶出した。rAsp f6を含む画分を保存し、YM5膜を装着したアミコンセルを用い濃縮した。最後に、細菌培養1Lから精製したrAsp f6収量は23mgであった。

rAsp f4: rAsp f4をコーディング配列を含むDNAをT7プロモーターの転写制御下、発現ベクターにクローニングした(78)。その構成は、11残基長のMRGSHHHHHM-をアレルゲンアミノ酸配列のN末端に加えた。その6つの構造ヒスチジン残基は金属キレートアフェニティークロマトグラフィーのアフェニティータグの役割をする。タンパク質のC末端にはアミノ酸を加えなかった。配列確定後、構成をE. coli BL21 [pT7POL23]に導入し(77)、そのT7RNAポリメラーゼの合成は増殖培養の温度を37 以上に上げることにより誘導され得る。rAsp f4を得るために、適当量の抗生物質を含むLB培地1リッターに、30 で一夜増殖したスターター培養1mLを接種した。30 の増殖で約3時間の後、OD₆₀₀0.7で、培養温度を42 にシフトし発現を誘導した。誘導温度でインキュベーションして4時間後、細胞を遠心分離により集菌し、0.5M NaClを含む氷冷20mM Tris-HCl pH8.0 50mLで再懸濁した。細胞を超音波で破壊し、遠心分離でrAsp f4タンパク質を含む不溶性物質を回収した。2M尿素、0.5M NaClおよび2%Triton X-100を含む20mM Tris-HCl pH8.0の再懸濁により不溶性物質を2回洗浄し、その後、遠心分離した。封入体を含む部分的に精製したrAsp f4を、45分間、室温、6M グアニジニウム塩酸塩、0.5M NaCl、5mMイミダゾールおよび1mM 2-メルカプトエタノールを含む20mM Tris-HCl pH8.0 (抽出バッファー) 70mLで抽出した。抽出物を遠心分離で浄化し、0.22 μm濾過により、残存している微粒子物質を除去した。過剰発現したアレルゲンを含む浄化抽出物を、事前にNi²⁺で電荷を与え、2-メルカプトエタノールを欠く抽出バッファーで平衡化した5mL HiTrapキレート化カラム (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) を2つ直列に連結し組み立てた装置に流し入れた。そのカラム装置を最初に抽出バッファー50mLで洗浄し、次いで20mM Tris-HCl pH8.0、0.5M NaCl、20mMイミダゾールおよび1mM 2-メルカプトエタノール中の6M尿素(尿素洗浄バッファー) 50mLで洗浄した。固定化rAsp f4を復元するために、尿素洗浄バッファーから0.5M NaCl、20mMイミダゾールおよび1mM 2-メルカプトエタノールを含む20mM Tris-HCl pH8.0 (復元バッファー) までの960mL直線状勾配を適用した。rAsp f4を溶出するために、復元バッファーにおいて20-1000mMイミダゾールの30mL勾配を適用し、一方、1mL画分を回収しSDS-PAGEで分析した。rAsp f4を含む画分を保存し、平衡化したSuperdex 75カラム (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) でゲル濾過し、0.15M NaClで溶出した。rAsp f4を含む画分を保存し、YM10膜を装着したアミコンセルを用い濃縮した。最後に、細菌培養1Lから精製したrAsp f4収量は34mgであった。

産生はまた、Hochliら(60-63)により報告されているベクターを用いて行った。

cDNA挿入部の分析

ABPA診断に適当なペプチド/タンパク質をコードする挿入部のみを考察する。

rAsp f6(配列番号1) . 624塩基対のオープンリーディングフレームの751塩基対の挿入部を含むクローンは、スーパーオキシドジスムターゼをコードするヌクレオチド配列と高い相関性があった。3'-非コード領域は、24塩基対のポリアデニル化テイルを有した。このcDNAクローン(配列番号1)の推定アミノ酸配列はマンガンSODと相関性があり、ヒト、ショウジョウバエ、ゴムの木、酵母、E. coliおよびマイコバクテリウムleprae酵素と48-52%の高い相関性があった。明らかにA. fumigatus MnSODは、系統発生的に隔たる種々の生物のMnSODと同程度に高い相関性配列である(43)。多数の配列のアライメントから、A. fumigatus MnSOD(rAsp f6)はヒトMnSODと高い相関領域を占めている(51.8%同一性、67.2%相関性)。A. fumigatus MnSODに対し生ずるIgEは、ABPA患者の血清から優勢的に検出される。それゆえMnSODは、ABPAとA. fumigatusアレルギーとの間の血清学的相違による識別法の候補となり得た(以下参照)。特に、組換えA. fumigatusおよびヒトMn

10

20

30

40

50

SODの両方により、*A. fumigatus* MnSODに特異的なIgEが検出レベルである*A. fumigatus*アレルギー性対象物の末梢血単核細胞増殖を誘発する。さらに、菌類とヒト組換え体MnSODsの両方により、菌類酵素に感作する個体のタイプI皮膚反応は顕現化され、環境の*A. fumigatus*アレルゲンに感作するアレルギー性個体におけるヒトMnSODとの自己-反応性 (auto-reactivity) を証明することとなった (43)。

rAsp f4 (配列番号2) . これは我々のスクリーニングシステムで発見した2つ目の組換え体ABPA関連アレルゲンであった。そのクローンには858塩基対のオープンリーディングフレームを有する1103塩基対の挿入部を含んでいた。その推定アミノ酸配列は、既知タンパク質の何れかと顕著な相同領域を占めていない。用いたcDNAによりコードされる遺伝子産物は、選択された機能：IgE結合能により特徴付けられた。

組換え体アレルゲンをを用いるインビボ試験

アレルゲン溶液を少量、個体の真皮に注入し、その結果、膨疹反応が投与した場所の付近で生ずる皮膚プリックテストにより主に説明される。

本発明の皮膚プリックテストの1つのプロトコールにより、組換え体アレルゲンを希釈液とし0.9%生理食塩水に溶解し最終濃度100 µg/mLとした。これら溶液20 µLを患者の前腕に置いた。その後、皮膚を滅菌した針で突き刺し、それを一定の角度で表皮に入れ、表皮の小部分を持ち上げた (38)。針は、汚染を防ぐために各溶液の適用後放棄した。その試験部位は、偽陽性結果を避けるため3~4cmの間隔を開けた。

皮内試験として、アレルゲン溶液 (100 µg/mL) を10倍量の血清希釈液で希釈し、10-4 µg/mL ~ 10 µg/mLの開始濃度で適用した。試験として、ヒスタミン制御により誘発する皮膚反応の膨疹の大きさが半分となる最も低い濃度の溶液から始め、溶液 (100 µL) を患者の背中に注入した。試験部位は偽陽性結果を避けるために5~8cmの間隔を開けた。ヒスタミンジヒドロクロリドを陽性対照として用い、皮膚プリックテストでは0.1%濃度で、または皮内試験では0.01%濃度でそれぞれ用いた。0.9%生理食塩水を陰性対照として用いた。15分後、膨疹の最大縦方向および横方向の直径を測定することにより、その反応を記録し、報告されている (66) ように評価した。

インビトロ診断のための組換え体*A. fumigatus*アレルゲンの用途

組換え体*A. fumigatus*アレルゲンと抗体との結合は、特定のサブクラスを含む種々のクラス (IgA, IgG, IgD, IgEおよびIgM) のアレルゲン/抗原特異的抗体を測定する免疫検定に、例えばアレルギーおよびABPAの診断と合わせて使用し得る。IgGサブクラスでは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4について述べられている。その検定の方法論は、通常の抗原/アレルゲンの従来技術で使用されるものと同様である。それゆえ適当な免疫検定プロトコールより、三つからなる免疫複合体の形成が予想される：[アレルゲン]-[抗-アレルゲン抗体]-[抗-抗体] (アレルゲンおよび抗-抗体を反応物に添加し、抗アレルゲン抗体は検定試料より得られる)。複合体は不溶性または不溶性化した形で形成される。不溶性形は、複合体形成の前、後または複合体形成の間に、アレルゲンまたは抗-抗体の何れかを固体相に結合させることにより成される。本分野の既知固体相は、チューブおよびウエルの壁であり、クロマトグラフィーおよび異種性免疫検定などで吸着物として用いる粒子状でありモノシリックである幾分の多孔性物質である。複合体量の測定のため、アレルゲンまたは抗-抗体の何れかを、分析的に検出可能な基でラベルするが、試薬は固体相と連結するか、または後で不溶性の要因となる反応物をラベルしない。既知の検出基は、酵素 (ELISA)、フルオロホア (fluorophor)、発色団、化学ルミネセンス基、放射性同位元素、金属原子、ピオチン、ハプテンなどである。クラス/サブクラス特異的抗原/アレルゲン特異的抗体を測定するために、抗体は特定クラス/サブクラスでなければならない。

通常、免疫検定型は、連続的にインキュベーションにより行う、すなわち

ステップ1：アレルゲン試料、その後

ステップ2：ステップ1で形成した複合体、すなわち抗-抗体を伴う [アレルゲン]-[抗-アレルゲン抗体] のインキュベーションまたはその逆である。ステップ1に用いる反応物が固相に結合する場合、非特異的妨害を除くために各ステップ後、分離および洗浄をしなければならない。ABPA診断のために、IgEおよびあるIgGサブクラスは測定に最も適当な

10

20

30

40

50

Igである。用いる組換え体アレルゲンが、細胞表面上でさらされることなく、分泌せずに *A. fumigatus* タンパク質から得られると信じられている。これは、ABPAに関連する最も適当な *A. fumigatus* アレルゲンは細胞結合し、例えば細胞内ペプチド/タンパク質であることを示唆し得る。

関連する抗体は、血液（血漿および血清を含む）、唾液、脳脊髄液（CSF）、気管支肺胞液（bronchioalveolar fluid）、涙（lacrymal fluid）等において見られ得る。

用いたインビトロ試験プロトコールおよび結果

組換え体アレルゲンに対するIgE抗体（および他のイソ型）の結合は、全てのアレルゲンと同じ方法を用い、ELISA（39）により評価された。簡単に言うと、ポリスチレンマイクロタイプレート（2時間37℃で、アレルゲンタンパク質（PBS中、10 μg/mL、pH8.0）で被覆した。遊離部位は、5%（W/V）非脂肪性ドライミルクパウダー（1h、37℃）を含むPBS、pH7.4でブロッキングした。洗浄後、連続して2倍に希釈した、5%Tween20を含むブロッキングバッファー中の血清でプレートをインキュベーションした（2h、37℃）。洗浄後、市販の2次抗体（66）またはTN-142、C 2ドメインに対するマウスモノクローナル抗ヒトIgE抗体（Dr C.H. Heusser, Ciba-Geigy Ltd., Basel, Switzerlandにより提供された）を血清のイソ型特異的Ig含有の定量に用いた。アレルゲンと結合するイソ型-特異的Igは、ヤギ抗マウスIgGに結合したアルカリ-ホスファターゼで検出した（66,69）。校正基準がない場合、ABPA患者二人からの血清を研究室リファレンスとして用いた。光学密度に対する血清希釈をlog-logグラフにプロットし、直線状の滴定領域を用い光学密度値を任意ELISAユニット（EU）に変換した。全てのイソ型を分析するためにリファレンス血清を任意に100 EU/mLに設定した（66,68）。抗原特異的ELISAは血清抗体の信頼性ある検出法となる。rAsp f6を用いるIgE測定のために、その結果は、固定化アレルゲンとして組換え体タンパク質用Pharmacia CAP System（Pharmacia & Upjohn, Diagnostics, Uppsala, Sweden）で確認した。

組換え体 *A. fumigatus* アレルゲンのインビトロ診断値のラージスケール評価のために、ABPA患者、および *A. fumigatus* で感作したがABPAには感作しない35名のアレルギー性喘息患者（臨床パラメータから推定した）の54血清を選択した。患者は全て喘息であり、診断および喘息の対処についての説明を受けていた（70）。陰性対照として、*A. fumigatus* に感作しない10名のアレルギー性喘息患者およびアトピー歴のない10健常者の血清を用いた。感作した個体の血清と比較して、20対照個体の血清試料は全組換え体アレルゲンでバックグラウンドより低いIgE値を示し、それはIgE検出システムが *A. fumigatus* に対する特異的感作に関係することを証明する。現在まで発見されている関連する組換え体アレルゲン（rAsp f4およびrAsp f6）のABPAを有するか、または有しない *A. fumigatus* アレルギー性喘息の血清から得られたIgE測定の結果について以下に考察する。

rAsp f4およびrAsp f6の血清学的検討により、他の組換え体 *A. fumigatus* アレルゲンで得られる病像と比較して完全に異なる病像となる。rAsp f4およびrAsp f6に特異的なIgEは、菌類で感作したアレルギー性喘息患者の35名の血清からは検出されなかった。反対に、ABPA患者の54名の血清は、rAsp f4およびrAsp f6をそれぞれ54%および78%の頻度で認識し（表3）、一方、49名の血清はアレルゲンのうち少なくとも1つを認識した。それゆえ2つのアレルゲンを用いるABPA血清学的診断は、100%の特異性および90%を超える感度を有する（表4）。MnSOD（rAsp f6）、生化学的機能が既知のタンパク質は、顕著に細胞内酵素を示す。rAsp f4の生物学的機能は不明のままである；しかしながら、rAsp f4に対するモノクローナル抗体を用いてタンパク質の位置を捜す予備実験では、そのタンパク質は菌類から分泌するわけではないことを示唆する。それゆえ両タンパク質が空気アレルゲンとして遊離形で存在することはあり得ず、*A. fumigatus* に感作するアレルギー性喘息患者はこれらアレルゲンに特異的なIgEを欠いていると説明され得る。対照的に、ABPA患者は、肺の中で菌類が増殖し、宿主防御機構より菌類細胞が破壊された結果として、非分泌性タンパク質にまたさらされることになる（3）。菌類感染に対する宿主防御機構の1つは、多形核細胞により媒介される菌糸および食作用の損害によりなる（2,3,4）。菌類に対する細胞媒介免疫応答の発現は、Tリンパ球に対する菌類抗原を処置し示す抗原提示細胞（a

10

20

30

40

50

ntigen-presenting cell)を必要とすると考えられている(1)。それゆえABPA患者は、分泌アレルゲンおよび分生子(conidia)のみにさらされる*A. fumigatus*アレルギー性個体の免疫システムが見られない。*A. fumigatus*細胞内タンパク質に対する免疫応答を高め得る。rAsp f4およびrAsp f6のインビボの妥当性は、ABPA患者、*A. fumigatus*アレルギー患者および健常者対照を典型数含む皮膚試験により評価される(以下参照)。

インビボ試験のための組換え体*A. fumigatus*アレルゲン診断値

ABPAとアレルギー性感作との可能な識別に関して、喘息のおよび*A. fumigatus*に対する付随感作性の対象を含む血清検討の最も重要な発見は、ABPA患者のrAsp f4およびrAsp f6に特異的な血清IgEレベルの上昇であった。表3に示すように、ELISAの測定としてrAsp f4-およびrAsp f6-特異的IgEは、ABPAを伴う喘息患者の血清中 54 ± 160 ELISA Units/mlおよび 47 ± 66 ELISA Units/mlの値に到達した。対照的に、これら2つのアレルゲンに特異的なIgE抗体は、事実上、ABPAの証拠のない*A. fumigatus*感作性喘息患者、および対照個体の血清中には存在しない(表3)。これらの結果に基づいて、rAsp f4およびrAsp f6は、循環するアレルゲン特異的IgE抗体に基づくABPA特異的検定の開発の反応剤としての役割をし得た。それゆえインビボのこれらのタンパク質のアレルゲン性の評価を目的とした。インビボの媒介物放出を顕現するrAsp f4およびrAsp f6能を示すために、皮内皮膚誘発の検討は、ABPAを有する12名の喘息患者、ABPAを有さない*A. fumigatus*に感作する12名のアレルギー性喘息患者および5名の健常者対照を含めて行った。*A. fumigatus*に感作性の患者および診断の選択は、臨床歴、RASTおよび報告されているように*A. fumigatus*抽出物との皮膚反応性に基いた(59,66)。全患者は喘息であり、喘息の診断および対処についての説明を受けていた(70)。検討の際、全対象では、気管支喘息は安定し、胸部感染の証拠はなく、抗ヒスタミン投薬法を受けていなかった。5名の健常対照個体は、アレルギーおよび喘息歴はなく、通常的全IgE血清レベルであった。ABPA診断は、Rosenbergら(23)およびPattersonら(24)により提唱された8基準のうち最低6つに基いている。4名のABPA患者(表5)および1名のアレルギー性喘息患者を、低用量の経口コルチコイドステロイド(5-10mg/day)で処置した。組換え体アレルゲンによるヒトを対象とする皮膚試験の倫理上の賛成は、本検討を開始する前に責任ある委員会から得た。試験する前に本手順を全個体に完全に説明し、その後同意書を得た。この検討に参加する対象の主な特徴(年齢、性別、エオシン好性白血球数、血清総IgE、rAsp f4およびrAsp f6に特異的な血清IgEならびに*A. fumigatus*に対するRASTを含む)を表5に記載した。全対象は皮内ヒスタミン変化(0.01%)に反応し皮膚試験は陽性となり、0.9%塩水には非反応的であった。結果(表5)から、ABPA患者に対するrAsp f4およびrAsp f6の反応に高い特異性があることを示唆する。事実、このグループの患者のみに、適量量のrAsp f4およびrAsp f6特異的IgEが見られた(表3および4)。予想されるように、血清中に検出し得るアレルゲン特異的IgE量が見られる個体のみ反応し、rAsp f4およびrAsp f6により皮膚変化した。これらの結果から、組換え体アレルゲンに基づくABPA高特異的診断は実施可能であることが明らかである。しかしながら、rAsp f4およびrAsp f6に基いた血清学および皮膚試験からアトピー性皮膚炎のないABPA高特異性が見られるけれども、診断の感度はたったの約90%である(表4)。今日利用可能なABPA診断基準の比較的低い特異性を考慮すると、血清学的、およびrAsp f4およびrAsp f6による皮膚試験により、本疾病の診断の考えられる改良が示されている。さらに、ABPA患者および*A. fumigatus*感作性アレルギー喘息はウエスタンブロット分析で異なるアレルゲンを認識することが観察されるとともに、両アレルゲンの特性によりABPA診断の更なる改良に基本原理を提供することになる。Borga(6)による報告の検討では、2グループの患者、すなわち*A. fumigatus*感作性アレルギーおよびABPA患者において、*A. fumigatus*アレルゲンに対する血清IgE反応性が比較された。*A. fumigatus*アレルギー患者の血清は、少なくとも35の異なる菌類IgE結合成分を認識し、その大きさは14~118kDaの範囲であり、4成分(34、39、43および83kDa)がこれら血清により検出された。ABPAグループの血清により14~150kDaの範囲の39の異なるIgE結合成分が検出され、分子量15、19、5、54、56、96、110、126および150kDaの8成分が、アレルギー患者のIgEで認識されなかった。それゆえ、検出される全ての43IgE結合成分から、31成分に対する抗体が両患者グ

10

20

30

40

50

ループに見つけられ、8つはABPAに特異的であり、4つはA. fumigatusに対する非ABPA関連感作性に特異的であった。

報告されている組換え体アレルゲンの利用性により、これらクローン化したアレルゲンに対する感作性を欠くA. fumigatusアレルギーの同定が可能となる。そのような対象物の血清は、その後、別のアレルゲンを示すファージクローンを単離するために、A. fumigatusファージ表面に表されるライブラリーをスクリーニングするのに用い得る。ファージライブラリーのスクリーニングに用いる血清の選択の基本原則と共に、バイオパンニングに基づく強力なスクリーニング法(45,47,51,52)により、妥当な時間内に別のアレルゲンの単離が可能となる。これらアレルゲンの産生、特性および評価は、ABPAおよびA. fumigatus関連感作性の両方に対する特異的診断ツールの発達に寄与することになる。

ABPA診断に特異的なアレルゲンとしてrAsp f6を用いるために、アトピー性皮膚炎を除外しなければならない。A. fumigatusに適当なRASTクラスによるアトピー性皮膚炎患者の割合が高いことから、血清中のrAsp f6特異的IgEの高い力価を示す。さらに3名のアトピー性皮膚炎患者におけるrAsp f6の皮内皮膚変化により、アレルゲンが、とれら患者において放出される強力なインビボ媒介物を誘発することが明らかとなった。特に、アトピー性皮膚炎患者の15名の血清の血清学的調査では、利用可能な他の組換え体A. fumigatusアレルゲンに特異的なIgEが全く見られない(76)。アトピー性皮膚炎患者におけるAsp f2に対する一価感作性の理由は不明である。しかしながら、rAsp f6に対する特異的IgE応答が、これら個体におけるヒトスーパーオキシドジスムターゼを認識するIgE抗体の産生に帰すると考えやすく、それは高相同性の菌類MnSODと交差反応する結果である。ヒトおよび菌類組換え体MnSOD、両方の利用性可能性により、さらに詳細にアトピー性皮膚炎の病態生理学におけるこれらのタンパク質の役割についての検討が可能となる。

嚢胞性線維症患者におけるA. fumigatusに対する感作とABPAとの血清学的識別

この検討には37名の嚢胞性線維症患者が含まれ、皮膚プリックテストを含む嚢胞性線維症およびアレルギーの通常評価を行う。Laufer(16)およびNelson(25)が提唱する臨床的および免疫学的基準により、15名がABPAであると診断された。12名の患者が、A. fumigatus抽出物に対するRASTおよび皮膚プリックテストによりA. fumigatusに対する報告された感作を有するグループに属し、10名の患者が、A. fumigatusに対する感作の欠損に基づくCF対照グループに入れられた(67)。年齢、性別、A. fumigatusに対するRASTおよび血清総IgEを含む患者の特性を表6に示す。アレルゲン特異的IgEレベルは、各個体血清中のアレルゲンrAsp f1、rAsp f3、rAsp f4およびrAsp f6について決定された。rAsp f1(43)およびrAsp f3(42)は、A. fumigatus抽出物に対する皮膚試験の陽性喘息患者で69%および76%の感作性保有率となるA. fumigatusの主なアレルゲンに相当し、その一方、rAsp f4およびrAsp f6(43)はABPA患者の血清のみにより認識される。4タンパク質はすべて、A. fumigatusに感作する喘息患者の皮膚変化によるインビボの適当なアレルゲンであると説明される。血清学的調査の結果は、A. fumigatusに感作する嚢胞性線維症の個体の大多数がrAsp f1およびrAsp f3(それぞれ85%および100%)に対するIgEを、85%が両アレルゲンに対するIgEを担持することを示す。rAsp f1およびrAsp f3は両方とも、嚢胞性線維症患者の調査した血清全てにおいて、A. fumigatusに対する感作性を診断することが重要である。最近のアレルゲンの説明(41)によると、rAsp f1およびrAsp f3は嚢胞性線維症グループの主要アレルゲンにも相当する。分析される3サブグループの個体、ABPAを伴うかまたは伴わないA. fumigatus感作性の嚢胞性線維症患者、ならびにA. fumigatus感作性を伴わない嚢胞性線維症患者において、rAsp f4およびrAsp f6に対する血清IgEの適当なレベルが、ABPA臨床診断の個体の血清中にのみ見られた。このグループにおいて、カットオフ値(>5U/mL)を超えるrAsp f6特異的IgEレベルが15名の患者の血清から10名で検出され、他方、rAsp f4特異的IgEの適当レベル(カットオフ値>7U/mL)が15名の患者の血清から13名で検出された。ABPAの指示に重要なrAsp f4-またはrAsp f6-特異的IgEの何れかのレベルが上昇すると考えられるならば、血清学的診断により全患者がカバーされ、一方、15名の患者のうち8名の患者がrAsp f6およびrAsp f4両方に対するIgEレベルが上昇した。それゆえrAsp f4およびrAsp f6のアレルゲン特異的血清学は、嚢胞性線維症および

10

20

30

40

50

A. fumigatus感作性の患者においてABPAの異なる血清学的診断に実質的に寄与する。

表1. バイオパンニングによるcDNAファージが提示するライブラリーからの典型的ファージの増大。A. fumigatus発現ライブラリーからcDNA産物を提示するファージをヒト血清IgE (51, 52)で被覆したマイクロタイタープレートのシングルウェルに適用した。吸着および多量洗浄の後、結合ファージを溶出し、ファージの増殖および選択の更なる段階のためE. coliへの感染に用いた。

10

パンニングの段階	ファージのインプット a	ファージのアウトプット b	増大因子 c	IgE特異的ファージ試験したファージ
1	1.8x10 ¹¹	4.5x10 ³	5.6x10 ⁻⁶	0/10
2	8.6x10 ¹⁰	2.4x10 ⁴	5.6x10 ⁻⁵	0/10
3	9.3x10 ¹⁰	4.6x10 ⁴	3.8x10 ⁻⁵	0/10
4	6.5x10 ¹⁰	1.1x10 ⁵	1.9x10 ⁻⁴	1/10
5	1.8x10 ¹¹	3.8x10 ⁶	2.3x10 ⁻³	8/10
6	2.1x10 ¹¹	8.4x10 ⁶	4.0x10 ⁻³	10/10
7	9.4x10 ¹⁰	5.8x10 ⁷	5.6x10 ⁻²	10/10

20

30

a) マイクロタイタープレートのシングルウェルに適用したファージ数

b) 洗浄後、ウェルから溶出したファージ数

c) パンニングの各段階のファージの収率(%収率=[溶出したファージ数×100] / [適用したファージ数])

d) ファージミドを滴下したプレートのシングルコロニーを液体培地で培養し、ファージを誘導し精製した。マイクロタイタープレートに直接被覆したファージをIgE特異的ELISAによりIgE結合能を試験した(66)。IgE特異的ファージは、血清IgEに結合可能なファージ/試験したファージ数を示す。

40

表2. ファージ表面に提示されているA. fumigatus cDNAライブラリー単離され、リガンドとして患者血清IgEを用い選択的増殖したファージの主な特性

ファージ No	挿入部の長さ ^a bp	タンパク質の 分子量 ^b (kDa)	発現 ^c mg/L culture	IgE-結合 ^d 頻度	予備的名称	皮膚試験反 応性 ^f
2	1103	40	36	<50%	rAsp f4	+
7	854	10	65	<50%	rAsp f7	nt
19	751	28	220	<50%	rAsp f6	+
28	616	21	38	<50%	rAsp f3	+
38	1123	33	25	<50%	rAsp f9	nt
46	686	18	140	<50%	rAsp f1/a ^g	+
48	1270	42	45	<50%	rAsp f5	+
51	978	34	29	<50%	rAsp f10	nt

a)ヌクレオチド配列から決定

b)ポリアクリルアミドゲルより算出

c) pDS76/RBSII, 6xHis(62)にフラグメントをサブクローニングした後、封入体タンパク質として産生。

収量は、リッター培養あたりのNi2+キレートアフラフェニティー精製したタンパク質のmgで表す。

d) 組換えタンパク質に特異的なIgEの有無をみるために、54名のABPA患者のおよびA. fumigatusに感作した35個体の血清を分析した。IgE-結合頻度は、大きい(>50%)または小さい(<50%)アレルゲンとした。

e) 非公式の名称

f) 報告(66)されているとおりに決定した皮膚試験反応性、nt = 試験していない。

g) このアレルゲンは以前に報告されている。

表3. 組換え体アレルゲンrAsp f4およびrAsp f6に対するABPAまたはA. fumigatusのアレルギー喘息患者の感作

対象グループ	rAsp f6	rAsp f4	
感作的である ABPA (n=54)	54±160a 30 (56%)b	47±66 42 (78%)	10
感作的である アレルギー (n=35)	1±1 0 (0%)	2±3 0 (0%)	
感作的である ABPA+アレルギー b (n=89)	33±89 30 (56%)	29±56 42 (78%)	20
感作的である 健常者対照 (n=20)	<5 0 (0%)	<5 0 (0%)	

a. アレルゲン+SDに結合するIgE平均値(ELISA Units/ml)

b. カットオフレベルを超えるアレルゲンに感作するIgEを示す試料数および%

(rAsp f4およびrAsp f6についてそれぞれ5および7 EU/ml)

表4. rAsp f4およびrAsp f6 IgE特異的血清学によるABPAとA. fumigatusに対する感作性の相違

アレルゲンに感作する個体数(%)

対象	rAsp f6	rAsp f4	rAsp f6/rAsp f4	rAsp f6+rAsp f4	
ABPA (n=54)	30 (56%)	42 (78%)	49 (91%)	25 (46%)	
A. fumigatus アレルギー 患者 (n=35)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	40
対照 (n=20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

ABPA患者の血清認識の特異性および選択性

	100%	100%	100%	100%	
特異性	100%	100%	100%	100%	
選択性	56%	78%	91%	47%	50

表5. 検討した対象ならびにrAsp f4およびrAsp f6に対する皮膚反応性の主な特性

対象	年齢 y	性別	Eos/ml ×106	総IgE kU/l	RAST	rAsp f6 に特異的なIgE ^a	rAsp f4	rAsp f6 に対する皮膚試験 ^b	rAsp f4
ABPA									
1	62	f	0.71	475	3	22	0	++	-
2	46	m	0.37	1508	4	177	48	++++	+++
3	28	m	0.45	4576	5	346	18	+++	+
4	59	f	0.35	10957	5	1	537	-	++
5	56	m	0.91	637	5	0	11	-	++
6	52	m	0.19	2476	5	45	46	++++	++
7	55	f	0.24	1779	5	86	33	++++	++
8	32	m	0.57	1472,	4	0	82	-	++++
9	53	m	0.23	ndc	nd	1	1	-	-
10	62	m	0.15	nd	nd	0	18	-	+
11	60	f	0.08	629	4	0	47	-	+++
12	43	m	0.53			29	8	+++	++
A. fumigatusアレルギー									
1	32	m	0.08	4913	1	4	1	-	-
2	60	m	0.20	76	3	0	0	-	-
3	30	f	0.52	67	3	1	2	-	-
4	43	f	0.05	3328	5	0	0	-	-
5	49	f	0.75	354	3	2	0	-	-

対象	年齢	性別	Eos/ml ×10 ⁶	総IgE kU/l	RAST	rAsp f6 に特異的なIgE ^a	rAsp f4	rAsp f6	rAsp f4	
6	34	m	0.19	354	2	0	0	-	-	
7	46	f	0.68	494	3	0	1	-	-	
8	59	m	0.53	116	nd	1	2	-	-	
9	58	m	0.84	>2000	3	1	1	-	-	
10	57	m	0.05	nd	nd	0	1	-	-	
11	35	f	0.41	>2000	4	0	0	-	-	
12	44	f	0.26	1759	2	1	2	-	-	
健常者対照										
1	44	m	0.18	148	0	0	0	-	-	
2	33	m	0.40	25	0	1	0	-	-	
3	30	f	0.16	39	0	0	0	-	-	
4	34	m	0.43	18	0	0	0	-	-	
5	41	m	0.26	61	0	0	1	-	-	

a) 相対的ELISA Units/ml

b) 1 μg(+), 100ng(++), 10ng(+++)または1ng(+++)濃度のrAsp f6およびrAsp f4の皮内投与に対する陽性反応

c) nd = 決定せず

表6. A. fumigatus抽出物に感作するか、またはしない喘息性線維症患者の血清学的調査

対象	年齢 y	性別	総IgE kU/l	RAST	rAspに特異的なIgE*			
					f1	f2	f3	f4
1	11	f	2398	4	1224	1	265	76
2	12	f	5226	4	233	5	867	35
3	7	m	3804	4	747	733	4027	405
4	17	m	5423	4	173	100	658	53
5	22	f	1532	4	65	5	502	44
6	15	f	1017	4	45	30	178	13
7	16	m	ndb	4	1439	381	749	422
8	28	m	2126	4	122	23	340	17
9	12	m	866	nd	1037	60	3511	524
10	16	m	945	4	402	5	1057	27
11	28	m	576	4	208	346	287	18
12	19	m	928	3	48	97	183	4
13	16	m	nd	3	195	55	145	29
14	14	m	nd	nd	81	3	128	43
15	27	f	491	4	115	118	1529	3
A. fumigatusアレルギーー								
1	12	m	435	4	63	5	453	2
2	30	f	554	4	45	5	21	2
3	24	f	323	4	2	1	1176	3
5	24	m	166	3	5	0	32	3

対象	年齢 y	性別	総IgE kU/l	RAST	f1	f2	f3	f4	
6	14	f	146	3	7	3	117	1	
7	21	m	304	4	145	1	121	4	
8	33	m	372	3	91	0	437	3	
9	16	f	103	3	3	0	131	3	
10	29	f	270	3	21	0	88	2	
11	28	m	47	2	87	2	124	4	
12	31	m	409	3	167	2	128	0	
囊胞性線維症対照									
1	20	f	56	0	2	2	9	5	
2	30	m	115	0	3	4	7	2	
3	30	m	nd	0	5	0	3	2	
4	26	f	nd	0	1	0	1	0	
5	31	m	40	0	4	0	3	2	
6	32	m	59	0	6	2	4	3	
7	30	m	22	0	5	1	3	2	
8	36	f	nd	0	4	1	3	0	
9	24	f	nd	0	1	0	4	3	
10	33	m	27	0	2	0	1	0	

a) 相対的ELISA Units/ml
b) nd = 決定せず

10

20

30

優先期間中に得られた結果

rAsp f8をコードするcDNAが単離され、rAsp f4およびrAsp f6と同じ方法で発現し、P₂酸性リボゾームタンパク質のコーディング配列に相当し、それゆえ典型的な非分泌性タンパク質を表す。臨床的に試験してないけれども、上記方法のELISAによる評価をするときタンパク質はIgE結合タンパク質を表す。ELISAから得られる限りの全結果は、rAsp f8がABPA患者の血清に高特異的であることを示す。試験した35名のアレルギー性喘息患者は、20名の健常者個体から得られた値(1.2±0.6 EU/mL)とは統計的には異ならない検出可能なrAsp f8特異的IgEレベル(2.3±0.4 EU/mL)を示さなかった。対照的に、ABPA患者54名のうち17(31%)は明らかにrAsp f8に感作した。全試料の平均EU/mL値は、全A. fumigatus感作的患者(アレルギー患者+ABPA患者、n=89)を含む全感作の8±14に相当し、19%(EU/mL 5.4±12)に相当する。しかしながら、この新しいABPA特異的アレルゲンはABPAの異なる診断の改良に寄与せず、それはrAsp f8を認識する全患者が既にrAsp f4、rAsp f6またはそれら両方を認識するためである。

40

rAsp f8のDNA配列を配列番号5に示し、相当するアミノ酸配列を配列番号6に示す。その配列は仮定したものであり、rAsp f8のDNA配列は多くとも10の位置(例えば92、94、108、156および183の位置)に間違いであるかもしれず、最終的な確認はしていない。

50

参考文献

1. Levitz et al., Clin. Infect. Dis. 14 (1992) 37-42
2. Lyman et al., Infect. Immun. 62 (1994) 1489-1493
3. Roilides et al., Infect. Immun. 61 (1993) 1185-1193
4. Romani et al., Curr. Opin. Immunol. 7 (1995) 517-523
5. Kurup et al., Clin. Microbiol. Rev. 4 (1991) 439-456
6. Borga et al., Ph.D. Thesis, Karolinska Institute, Repro Print AB, Stockholm, 1980
7. Yunginger et al., Pediatr. Clin. North Am. 30 (1988) 795-805 10
8. Greenberger et al., J. Allergy Clin. Immunol. 81 (1988) 646-650
9. Greenberger et al., Ann. Allergy 65 (1986) 444-452
10. Ricketti et al., J. Allergy Clin. Immunol. 71 (1983) 541-545
11. Greenberger et al., J. Allergy Clin. Immunol. 74 (1984) 645-653 20
12. Patterson et al., In: Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Eds Patterson et al., Ocean Side Publ., Providence J., Rhode Island, (1995) 29-33
13. Richeson et al., Postgrad. Med., 88 (1988) 217-219
14. Henderson et al., Thorax 68 (1968) 513-515
15. Basica et al., J. Allergy Clin. Immunol. 68 (1981) 98-102
16. Laufer et al., J. Allergy Clin. Immunol. 73 (1984) 44-48
17. Nikolaizik et al., Pediatr. Allergy Immunol. 2 (1981) 83-86 30
18. Patterson et al., E. Am. J. Med. 54 (1976) 16-22
19. El-Dahr et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150 (1994) 1513-1518
20. Mintzer et al., Radiology 127 (1978) 301-307
21. Neeld et al. Am. Rev. Respir. Dis. 142 (1990) 1200-1205
22. Panchal et al., Eur. Respir. J. 7 (1994) 1290-1293
23. Roseberg et al., Ann. Intern. Med. 86 (1977) 405-414 40
24. Patterson et al., Ann. Intern. 96(1982) 286-291.
25. Nelson et al., Am. Rev. Respir. Dis. 120 (1979) 863-873

26. Greenberger et al., In: Allergy, principle and practice. Eds. Middleton et al., The C.V. Mosby Company, (1988) 1219-1236
27. Kurup et al., Am. J. Clin. Pathol. 69 (1978) 414-417
28. Kauffman et al., J. Allergy Clin. Immunol. 73 (1984) 567-573
29. Creticos et al., Clin. Rev. Allergy 4 (1986) 355-361
30. Piechura et al. Immunol. 49 (1983) 657-665 10
31. Karlsson-Borga et al., J. Immunol. Meth. 136 (1991) 91-102
32. Baur et al., J. Allergy Clin. Immunol. 83 (1989) 839-844
33. Berntstein et al. J. Allergy Clin. Immunol. 86 (1990) 532-539
34. Müllbacher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 3835-3837
35. Williams et al., J. Allergy Clin. Immunol. 89 (1992) 738-745 20
36. Leser et al., J. Allergy Clin. Immunol. 90 (1992) 589-599
37. Menz et al., Pneumologie, in press.
38. Dreborg et al., Position Paper. Allergy 48 (1993) 49-82
39. Moser et al., J. Immunol. 149 (1992) 454-460
40. Cramer et al., Recombinante Allergene und ihr Potential für die allergologische Diagnostik. Pneumologie, in press
41. King et al., J. Allergy Clin. Immunol. 96 (1995) 5-14
42. Hermann et al., Recombinant allergens from *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii* share IgE-binding epitopes (submitted 1996) 30
43. Cramer et al., J. Exp. Med. 184 (1996) 265-270
44. Müller et al., J. Allergy Clin. Immunol. 96 (1995) 395-402
45. Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 4363-4366
46. Suter et al., In: Phage display of peptides and proteins. Eds. Kay et al., Academic Press, Inc, (1996) 187-205 40
47. Barbas III et al., Comp. Meth. Enzymol. 2?? (1991) 119-124
48. Pernelle et al., Biochemistry 32 (1993) 11682-11687
49. Cramer et al. Gene 137 (1993) 69-75
50. Diolez et al., J. Bacteriol. 167 (1986) 400-403

51. Cramer et al., *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 53-58
52. Cramer et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110 (1996) 41-45
53. Cramer. pJuFo: a phage surface display system for cloning genes based on protein-ligand interaction. In: *Gene Cloning and Analysis: Current Innovations*. Ed. Schaeffer. Horizon Scientific Press (in press)
54. Butler et al., In: *Structure of Antigens Vol 1*. Ed: van Regenmortel. CRC Press, Boca Raton, FL, (1992) 208-259 10
55. Butler et al., *Mol. Immunol.* 30 (1993) 1165-1175
56. Dierks et al., *Mol. Immunol.* 23 (1986) 403-411
57. Suter et al., *Immunol. Letter* 13 (1986) 313-316
58. Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467
59. Moser et al., *Agents and Actions* 43 (1993) 131-137
60. Hochuli et al., *J. Chromatogr* 411 (1987) 177-184 20
61. Hochuli et al., *Biol/Technol.* 6 (1988) 1321-1325
62. Stüber et al., In: *Immunologicas: Lefkowitz et al.* Academic Press, New York (1990) 121-152
63. Hochuli et al., In: *Genetic Engineering, Principles and Methods*. Ed: Seltow, Plenum Press, New York (1990) 87-98
64. Dudler et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1165 (1992) 201-210
65. Schenk et al., *Bio/Techniques* 19 (1995) 196-200
66. Moser et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 93 (1994) 1-11 30
67. Nikolaizik et al., Skin test reactivity to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a in patients with cystic fibrosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press).
68. Butler, *Immunochemistry of solid-phase immunoassays*. Boca Raton, CRC Press (1991).
69. Held et al., *Scand. J. Immunol.* 29 (1989) 203-209
70. Sheffer et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 88(1989) 425-434
71. Nikolaizik et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 152 (1995) 634-639 40
72. Hottiger et al., *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 736-741
73. Cramer et al., Display of cDNA libraries on phage surface: an efficient strategy for selective isolation of

- clones expressing allergens. In: Molecular Biology of Allergens and the Atopic Response. Eds: Sehon et al., Plenum Publishing Corporation. Submitted 1996.
74. Kerpolla et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 1 (1991) 71-79
75. Abate et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1032-1036.
76. Disch et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 108 (1995) 89-94
77. Mertens et al., Bio/Technology 13 (1995) 175-197
78. Mofatt et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113-130
79. Little et al., J. Allergy Clin. Immunol. 98 (1996) 55-63
80. Cramer et al., Eur. J. Biochem. 226 (1995) 460-461
81. Cramer et al., Clin. Exp. Allergy 26 (1996) in press
 "Automated specific IgE assay with recombinant allergens: evaluation of the recombinant Aspergillus fumigatus allergen I in the Pharmacia CAP System"
82. Suter et al., In: Molecular Biology and Immunology of Allergens. Eds: Kraft et al., Boca Raton, CRC Press (1993) 267-269
83. Banerjee et al., J. Lab. Clin. Med. 127 (1996) 253-262
84. Banerjee et al., Asian Pacific J. All. Immunol. 8 (1990) 13-18

配列表

配列番号 1 :

rAsp f6 DNA 配列 配列の長さ : 6 2 4

CAATACACGC	TCCCACCCCT	CCCCTACCCC	TACGATGCC	TCCAACCCCTA	50
CATCTCCCAA	CAGATCATGG	AGCTGCACCA	CAAAAAGCAC	CATCAAACCT	100
ACGTCAATGG	CCTGAATGCC	GCACTCGAGG	CGCAGAAGAA	AGCGGCGGAA	150
GCCAACGACG	TCCCAAGCT	CGTCTCCGTG	CAGCAAGCGA	TCAAATTCAA	200
CGGCGGGGGG	CACATCAACC	ATTCCCTCTT	CTGGAAGAAT	CTGGCCCCGG	250
AGAAATCCGG	GGGTGGCAAG	ATCGATCAGG	CACCGGTCCT	CAAAGCAGCC	300
ATCGAGCAGC	GTTGGGGATC	CTTCGATAAG	TTCAAGGATG	CTTTCAACAC	350
GACCCTGCTG	GGCATTGAGG	GCAGCGGATG	GGGTTGGTTA	GTGACCGACG	400
GACCCAAGGG	AAAGCTAGAC	ATTACCACAA	CCCACGACCA	GGATCCGGTG	450
ACCGGGGCGG	CCCCGTCTT	TGGGGTGGAT	ATGTGGGAGC	ATGCTTACTA	500
CCTTCAGTAC	TTGAACGACA	AAGCCTCGTA	TGCCAAGGGC	ATCTGGAACG	550
TGATCAACTG	GGCTGAAGCG	GAGAATCGGT	ACATAGCGGG	TGACAAGGGT	600
GGACACCCAT	TCATGAAGCT	GTGA			624

配列番号 2 :

rAsp f6 アミノ酸配列 配列の長さ : 2 0 7

QYTLPLPYP	YDALQPYISQ	QIMELHKKH	HQTYVNLNA	ALEAQKAAE	50
ANDVPKLVSV	QQAIFNNGG	HINHSLFWKN	LAPEKSGGK	IDQAPVLKAA	100
IEQRWGSFDK	FKDAFNNTLL	GIQSGWGWL	VTDGPKGKLD	ITTHDQDPV	150
TGAAPVFGVD	MWEHAYYLQY	LNDKASYAKG	IWNVINWAEA	ENRYIAGDKG	200
GHPFMKL					207

配列番号 3 :

rAsp f4 DNA 配列 配列の長さ : 861

GGCGAGGTCG	GCGACACTGT	CTACGCTACT	ATAAACGGTG	TCCTCGTCTC	50	10
GTGGATCAAC	GAGTGGTCCG	GCGAGGCTAA	GACCTCCGAC	GCTCCCGTCT	100	
CTCAGGCTAC	TCCCGTCAGC	AACGCTGTGG	CTGCCGCCGC	CGCCGCTTCT	150	
ACTCCGGAGC	CCAGCTCTTC	CCACTCCGAC	AGTTCTTCAT	CCTCCGGCGT	200	
CTCCGCCGAC	TGGACCAACA	CCCCTGCCGA	AGGCGAGTAC	TGCACTGACG	250	
GCTTCGGTGG	CAGGACCGAA	CCCAGCGGCT	CCGGTATCTT	CTACAAGGGC	300	
AACGTTGGTA	AACCCTGGGG	CAGCAACATC	ATCGAGGTCT	CCCCCGAGAA	350	
CGCCAAGAAG	TACAAGCACG	TCGCTCAGTT	TGTTGGCAGC	GCACTGACC	400	
CCTGGACCGT	TGTCTTCTGG	AACAAGATCG	GCCCCGATGG	TGGCCTTACT	450	20
GGCTGGTACG	GTAACTCCGC	TCTGACCCTC	CACCTCGAGG	CCGGTGAGAC	500	
CAAGTACGTG	GCATTCGACG	AGAACTCCCA	GGGTGCCTGG	GGCGCCGCAA	550	
AGGGCGACGA	GCTGCCCAAG	GACCAGTTTG	GTGGGTACTC	TTGCACCTGG	600	
GGTGAGTTCG	ACTTTGACAG	CAAAATCAAC	CACGGCTGGT	CTGGCTGGGA	650	
CGTGTCCGCC	ATTCAGGCCG	AGAATGCCCA	CCATGAGGTC	CAGGGTATGA	700	
AGATCTGCAA	TCACGCCGGC	GAGCTCTGCT	CCATCATCTC	CCACGGTCTT	750	
TCCAAGGTCA	TTGACGCCTA	CACTGCTGAT	CTGGCCGGTG	TCGATGGCAT	800	
TGGTGGCAAG	GTCGTCCCTG	GCCCTACCCG	TCTGGTCGTC	AACCTCGACT	850	30
ACAAGGAGTA	G				861	

配列番号 4 :

rAsp f4 アミノ酸配列 配列の長さ : 286

GEVGDTVYAT	INGVLVSWIN	EWSGEAKTSD	APVSQATPVS	NAVAAAAAAS	50	
TPEPSSSHSD	SSSSGVSAD	WTNTPAEGEY	CTDGFGRTE	PSGSGIFYKG	100	
NVGKPGWSNI	IEVSPENAKK	YKHVAQFVGS	DTDPWTVVFW	NKIGPDGGLT	150	
GWYGNALTL	HLEAGETKYV	AFDENSQAW	GAAKGDELPK	DQFGGYSCTW	200	
GEFDFDSKIN	HGWSGWDVSA	IQAENAHHEV	QGMKICNHAG	ELCSIISHGL	250	40
SKVIDAYTAD	LAGVDGIGGK	VVPGPTLTVV	NLDYKE		286	

配列番号 5 :

rAsp f8 DNA 配列 配列の長さ : 336

ATGAAGTACC	TCGCAGCTTT	CCTCCTCCTC	GCCCTTGCTG	GCAACACCTC	50
CCCGTCCTCT	GAGGATGTCA	AGGCCGTCCT	CTCTTCCGTT	GGCATTGATG	100
CCGATGAGGA	GCGCCTGAAC	AAGCTCATTG	CTGAGCTCGA	GGGCAAGGAC	150
CTCCAGGAGC	TCATTGCCGA	GGGTTCCACC	AAGCTCGCTT	CCGTTCCCTC	200
CGGTGGTGCT	GCCGCCGCTG	CTCCTGCCGC	TGCCGGTGCC	GCTGCCGGTG	250
GTGCTGCTGC	TCCTGCCGCT	AAGGAGAAGA	ATGAGGAGGA	GAAGGAGGAG	300
TCCGACGAGG	ACATGGGCTT	CGGTCTCTTC	GAATAA		336

配列番号 6 :

rAsp f8 アミノ酸配列 配列の長さ : 1 1 1

MKYLA AFLLL	ALAGNTSPSS	EDVKAVLSSV	GIDADEERLN	KLIAELEGKD	50
LQELIAEGST	KLASVPSGGA	AAAAPAAAGA	AAGGAAAPAA	KEKNEEEKKEE	100
SDEDMGFGLF	D				111

フロントページの続き

- (72)発明者 クラメリ, レト
スイス、ツェーハー 7 2 7 0ダヴォス ブラッツ、エーデンシュトラーセ13番
- (72)発明者 ヘンマン, シュテファニー
スイス、ツェーハー 7 2 7 0ダヴォス ブラッツ、シュポルトヴェーク10番
- (72)発明者 ブラザー, クルト
スイス、ツェーハー 7 2 7 0ダヴォス ブラッツ、オーベレ・シュトラーセ71番

審査官 竹中 靖典

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/569

G01N 33/53