

Aspergillus restrictus のアレルゲンとしての意義

—*Aspergillus fumigatus* との共通アレルゲン性に関する検討—

名古屋大学医学部小児科

坂本龍雄 伊藤浩明 山田政功 鳥居新平

神戸市環境保健研究所

松田良夫

好稠性真菌の *Aspergillus restrictus* は室内環境中に多数分布している。以前、著者らは皮膚プリック試験と radioallergosorbent test (RAST) の結果から、*A. restrictus* のアレルゲン性が *Aspergillus fumigatus* に匹敵する可能性があることを明らかにした。本研究では、RAST 抑制試験を用いて、*A. restrictus* の *A. fumigatus* との共通アレルゲン性の程度を調べ、*A. restrictus* のアレルゲンとしての意義を検討した。これらの真菌に RAST 陽性を示す血清をプールして用いると、M40Y 液体培地で3週間培養して得られた、株の異なる2種類の *A. restrictus* 菌体抗原は *A. fumigatus* RAST (YNB 液体培地で3週間培養して得られた菌体抗原を使用) を80%以上抑制した。そして、*A. fumigatus* 抗原は2菌株の *A. restrictus* RAST を約75%抑制した。また、血清を個々に用いた場合、8例のうち5例で、2種類の *A. restrictus* 抗原がいずれも *A. fumigatus* RAST を60%以上抑制した。これらの結果は、11例の *A. fumigatus* RAST 陽性血清のうち9例が2種類の *A. restrictus* にも RAST 陽性であったこととともに、*A. restrictus* と *A. fumigatus* 間に共通アレルゲン性が存在すること、そして、この共通アレルゲン成分には *A. fumigatus* の主要アレルゲンの一部が含まれている可能性を示している。

Key words: *Aspergillus fumigatus* — *Aspergillus restrictus* — cross allergenicity — RAST inhibition test — SDS-PAGE

緒言

好稠性真菌検出用培地を用いた室内塵中の真菌分布調査^{1)~4)}により、*Aspergillus restrictus* が優勢室内真菌であることが見いだされた。そして、著者ら⁵⁾は喘息児における *A. restrictus* の皮膚プリック試験と radioallergosorbent test (RAST) の陽性率が *Aspergillus fumigatus* に匹敵することを明らかにした。また、両者の RAST 値に有意な相関を見出し、共通アレルゲン性が存在する可能性を示唆した。

近年、共通アレルゲン性を有する真菌の組み合わせが多数報告されている^{6)~13)}。このことは、共通アレルゲン成分に感作された患者に対して、複数の真菌がアレルギー症状を引き起こす可能性があることを意味し

ている。したがって、種々の真菌抗原間の特異性と共通アレルゲン性の程度を明らかにすることは、環境中の真菌とアレルギー症状との因果関係を解明するうえで重要な意義を持つと考えられる。そこで、本研究では *A. restrictus* の *A. fumigatus* との共通アレルゲン性の程度を RAST 抑制試験を用いて調べ、*A. restrictus* のアレルゲンとしての役割を検討した。

対象と方法

1. 抗原の作製

(1) *Aspergillus restrictus* 抗原

A. restrictus 002ならびに004 (神戸市環境保健研究所保存株) の胞子を M40Y 液体培地 (組成: 麦芽エキス20g/l, 酵母エキス5g/l, 蔗糖400g/l) に接種し、25℃で3週間静置培養した。減圧濾過により、glass filter を通して菌体を採取し、蒸留水で十分洗浄した後、ethyl ether で脱脂した。この菌体を4℃のCoca抽出液 (比率1:10 W/V) に浮遊し、polytron homogen-

Received: May 7, 1991

Accepted: July 31, 1991

Abbreviations: PBS 0.01M phosphate buffered saline; RAST radioallergosorbent test; SD standard deviation; SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

izer (Kinematica, Switzerland) を用いて 5 分間、間歇的に homogenize した。そして、この懸濁液を 4℃、72 時間、stirrer で緩徐に攪拌し、遠心分離 (10000×g, 4℃, 30min) 後、上清を 4℃の蒸留水で一晩透析した。次に、pore size 0.45μm の membrane filter (Millipore, Mass.) で濾過し、凍結乾燥後、使用時まで -20℃ で保存した。

(2) *Aspergillus fumigatus* 抗原

A. fumigatus NUM11017 (名古屋大学医学部病態制御研究施設真菌研究部門保存株) の菌体抗原を用いたが、抗原の作製はすでに報告した方法¹²⁾に従った。

2. 蛋白量の測定

真菌抗原中の蛋白含量は Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Calif.) を用いて測定した。

3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Laemmli¹⁴⁾が報告した SDS-PAGE により、*A. restrictus* 002, 004 および *A. fumigatus* 抗原に含まれる蛋白の分離を試みた。試料は、蛋白濃度が 2mg/ml となるよう抗原を蒸留水に溶解し、同量の sample buffer (0.0625M Tris-HCl buffer, pH 6.8; 2% SDS; 20% glycerol; 2% 2-mercaptoethanol; bromophenol blue) を加えた後、5 分間煮沸して作製した。そして、この試料は 50μl/lane ずつ用いられた。slab gel は separating gel 中に 14% acrylamide を含む Tefco gel (TEF Corporation, Japan) を使用した。泳動後、Coomassie brilliant blue (Sigma Chemical Company, Mo.) で、gel 中の蛋白バンドを検出した。また、蛋白の分子量マーカーとして MW-SDS-70L kit (Sigma Chemical Company, Mo.) に含まれる次の 7 種の蛋白を用いた: α-lactalbumin (分子量 14200), trypsin inhibitor (soybean, 20100), trypsinogen (24000), carbonic anhydrase (29000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36000), albumin (egg, 45000), albumin (bovine, 66000)。

4. 対象血清

A. fumigatus 特異 IgE 抗体を有する喘息患者血清 11 検体 (Table 1) を用いた。*A. fumigatus* 特異 IgE 抗体は、すでに報告したポリ塩化ビニールマイクロプレートを用いた RAST¹²⁾で測定し、非アトピー患者 64 名から得た血清の平均 RAST 値よりも 2 standard deviations (SD) 以上大きい場合を RAST 陽性と判定した。

5. *A. restrictus* 特異 IgE 抗体の測定

A. fumigatus と同様、ポリ塩化ビニールマイクロプレートを用いた RAST を用いて測定した。なお、固相抗原の蛋白濃度は 50μg/ml とし、血清希釈は 4 倍とした。また、対象患者血清と年齢を一致させた同数の非アトピー患者血清を対照群として用い、これらの平均 RAST 値よりも 2SD 以上大きい場合を RAST 陽性と判定した。

6. RAST 抑制試験

A. fumigatus と *A. restrictus* に RAST 陽性を示す血清 (case 1, 2, 3, 5, 6) を等量ずつ混ぜ合わせてプール血清を作製した。次に各種抗原を蛋白濃度が 0.8, 1.6, 3.2, 6, 12, 24, 50, 100, 200, 400μg/ml となるよう 0.01M phosphate buffered saline (pH 7.2, PBS) に溶解した。そして、プール血清をこの抗原溶液で 4 倍に希釈した後、4℃, 18 時間静置し、RAST 値を測定した。また、蛋白濃度が 200μg/ml の *A. restrictus* 002, 004 および *A. fumigatus* の抗原溶液で個々の血清 (case 1~8) を 4 倍に希釈し、4℃, 18 時間静置後、*A. fumigatus* RAST を行った。RAST 抑制率は抗原を添加しない RAST 値に対する抗原添加により減じた RAST 値の百分率として表した。

結 果

1. 蛋白含量ならびに SDS-PAGE

抗原の蛋白含量は *A. restrictus* 002 が 10.6%, *A. restrictus* 004 が 13.1%, *A. fumigatus* が 8.3% であった。

Fig. 1 に示すように、SDS-PAGE により分離された蛋白バンドの数は *A. restrictus* 002 が 18 本、*A. restrictus* 004 が 16 本、*A. fumigatus* が 7 本であった。これに加えて、*A. restrictus* 004 と *A. fumigatus* の lane には広い範囲にわたって淡く均一に染まった部分が認められ、それは前者では分子量 41200~57400、および 14700 から以下、後者では分子量 66500 から以下に位置していた。また、2 菌株 (strain) の *A. restrictus* には 6 種類の蛋白バンド (分子量 30000, 35600, 36900, 44000, 69000, 74300) が共通して検出されたが、*A. restrictus* と *A. fumigatus* には共通の蛋白バンドは認められなかった。

2. RAST

A. fumigatus および *A. restrictus* RAST について血清希釈試験、RAST 抑制試験を行ったが、Fig. 2,

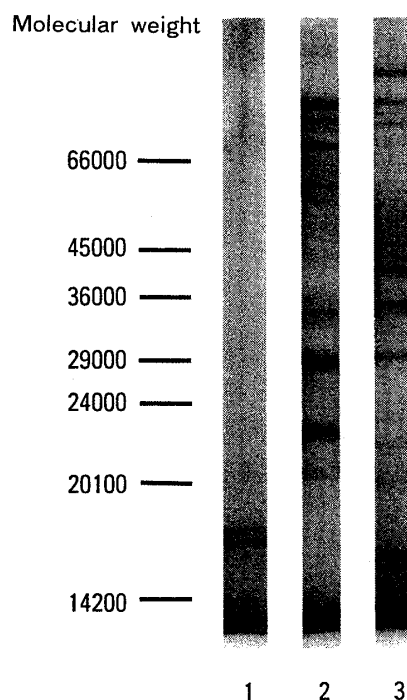


Fig. 1. SDS-PAGE of three fungal extracts after staining with Coomassie brilliant blue. Lane 1, *A. fumigatus*; lane 2, *A. restrictus* 002; lane 3, *A. restrictus* 004.

Table 1 Results of RAST to *A. fumigatus* and two strains of *A. restrictus* of all subjects

Case	Age (yr)	RAST value(cpm)		
		<i>A. fumigatus</i>	<i>A. restrictus</i>	
			Strain 002	Strain 004
1	21	1808*	1228*	902*
2	14	723*	575*	821*
3	17	623*	551*	504*
4	14	478*	123	115
5	8	408*	587*	673*
6	22	295*	199*	205*
7	15	232*	697*	398*
8	15	224*	195*	207*
9	10	180*	229*	312*
10	14	175*	416*	437*
11	11	171*	139	175*

RAST values over the mean plus 2SD of nonatopic controls were determined as positive and are indicated by * in this table. The lowest RAST value defined as positive was 146cpm in *A. fumigatus* RAST, 160cpm in *A. restrictus* 002 RAST, and 134cpm in *A. restrictus* 004 RAST. Total count was approximately 20000cpm per well in each RAST.

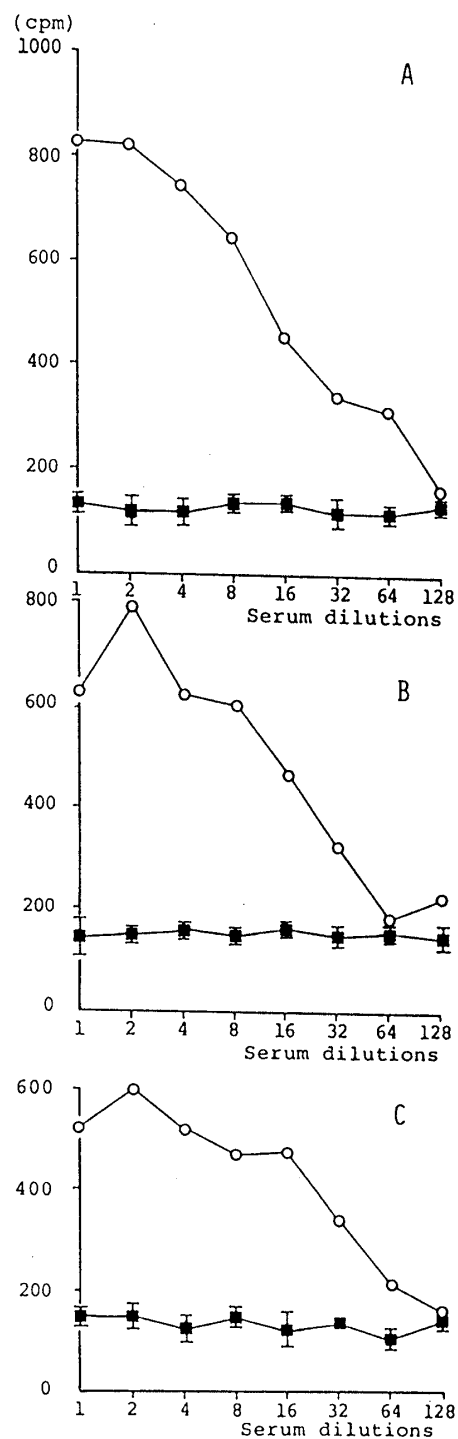
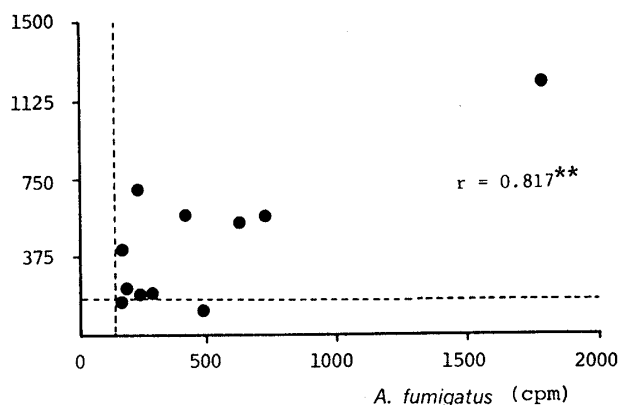


Fig. 2. Effect of serum dilutions for RAST to *A. fumigatus* (A) and *A. restrictus* strain 002 (B) and 004 (C) using polyvinyl chloride microplate as a solid-phase sorbent. A serum pool prepared from five asthmatic patients with highly positive RAST to solid-phase antigen was serially diluted, ranging from 1:2 to 1:128 (○). Sera obtained from four nonatopics were used as a control, the RAST values of which were shown as mean $\pm$ SD (■). Total count was approximately 20000 cpm per well in each RAST.

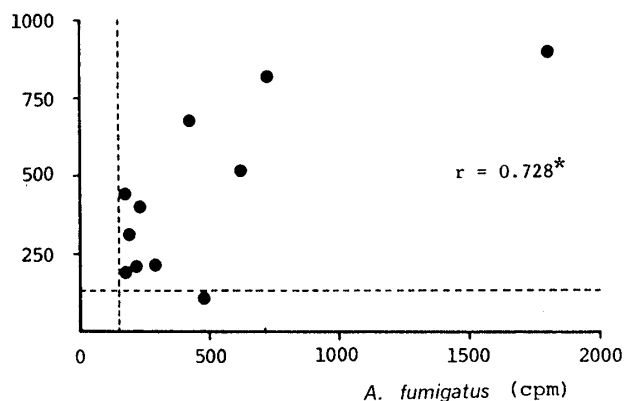
Fig. 4 に示すごとくいずれも固相抗原と結合した IgE 抗体を特異的に検出していると考えられた。

11例の *A. fumigatus* RAST 陽性血清が示す *A. restrictus* 002, 004 RAST の陽性率はそれぞれ81.8%, 90.9%であった (Table 1)。また, *A. restrictus* の菌株間, ならびにこれらと *A. fumigatus* の RAST 値の

A. restrictus 002 (cpm)



A. restrictus 004 (cpm)



A. restrictus 004 (cpm)

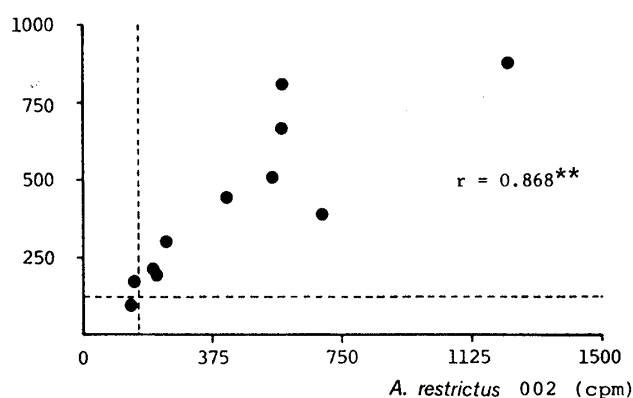


Fig. 3. Correlation between RAST values of *A. fumigatus* and two strains of *A. restrictus*. The number of subjects, which showed positive RAST to *A. fumigatus*, was 11. Dotted line represents the lowest RAST value defined as positive. Significance is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

間には有意な相関がみられた (Fig. 3)。

3. RAST 抑制試験

Fig. 4 に示すごとく, *A. fumigatus* RAST は最大濃度の *A. restrictus* 002, 004によりそれぞれ86.6%, 81.3%抑制された。また *A. fumigatus* による抑制率は 87.9%であった。 *A. restrictus* 002 RASTは, *A. fumigatus* により74.7%抑制され, *A. restrictus* 002, 004の

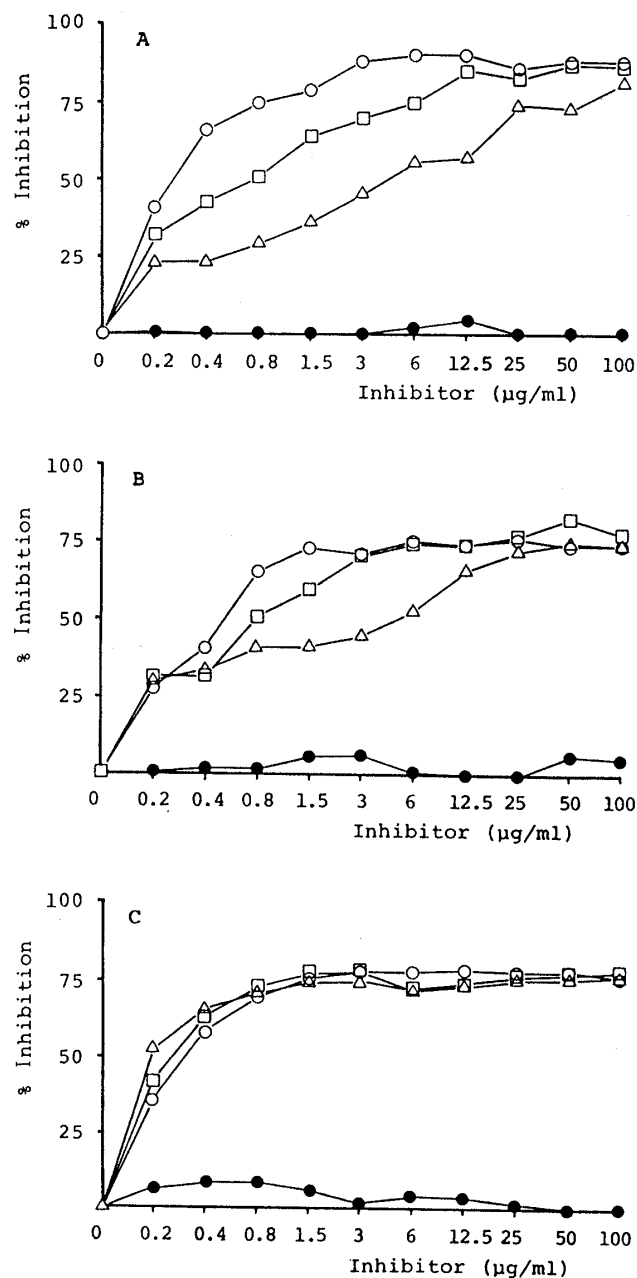


Fig. 4. Inhibitions of RAST to *A. fumigatus* (A), and *A. restrictus* strain 002 (B) and 004 (C). Three fungal extracts (○, *A. fumigatus*; □, *A. restrictus* 002; △, *A. restrictus* 004) and bovine serum albumin (●, Sigma Chemical Company, Mo.) were used as an inhibiting antigen.

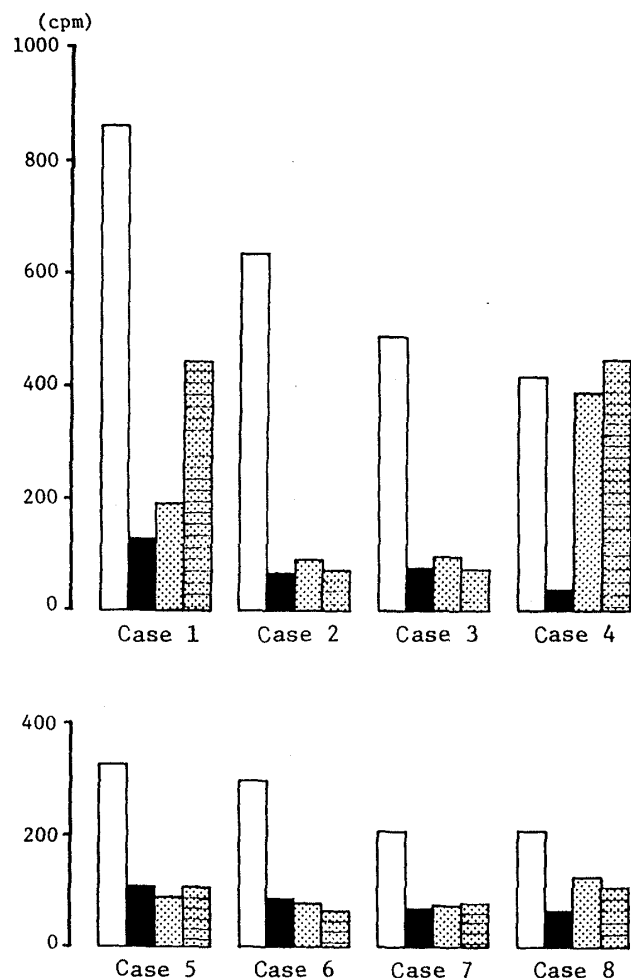


Fig. 5. Inhibitions of *A. fumigatus* RAST using individual sera (case 1~8) with positive RAST to *A. fumigatus*. Open columns indicate RAST values uninhibited. Solid columns and two kinds of stippled ones (■, ▨) represent RAST values inhibited by *A. fumigatus* and *A. restrictus* strain 002 and 004, respectively. Total count was approximately 20000 cpm per well.

抑制率はそれぞれ78.0%, 74.7%であった。*A. restrictus* 004 RAST に対する *A. fumigatus* の RAST 抑制率は75.8%であり, *A. restrictus* 002, 004はそれぞれ78.0%, 76.0%であった。

血清を個別に用いた場合, *A. fumigatus* による抑制率の平均値は78.7%, SDは11.0%であり, *A. restrictus* 002はそれぞれ63.3%, 26.7%, また, *A. restrictus* 004は59.4%, 31.1%であった。Fig. 5に示すように, 血清case 2, 3, 5, 6, 7を用いた *A. fumigatus* RAST 抑制試験では, *A. restrictus* が固相抗原の *A. fumigatus* に相当する RAST 抑制を示したが, 一方, 血清case 4ではいずれの *A. restrictus* も *A. fumi-*

gatus RASTを有意に抑制しなかった。また, 血清case 1では *A. restrictus* 002と004の *A. fumigatus* RAST 抑制率がそれぞれ77.8%, 48.0%であり, 明らかな差異を認めた。

考 察

RASTの結果は, *A. fumigatus* RAST陽性血清の多くが *A. restrictus* RAST陽性を示し, 両者のRASTの間には有意な相関が存在することを明らかにした。プール血清を用いた RAST 抑制試験は, *A. restrictus* が *A. fumigatus* RASTを, そして, *A. fumigatus* が *A. restrictus* RASTを強く抑制することを示した。また, 個々の血清を用いた *A. fumigatus* RAST 抑制試験では, 半数以上の血清に *A. restrictus* による60%以上の RAST 抑制が認められた。以上の結果から, *A. restrictus* と *A. fumigatus* 間に共通アレルゲン性が存在していること, そして, この共通アレルゲン成分は *A. fumigatus* の主要アレルゲンの一部を含んでいる可能性があることが明らかとなった。このことは, *A. restrictus* が *A. fumigatus* アレルギーの症状発現に実際に関与している可能性を予想させ, 今後, *A. restrictus* のアレルゲンとしての臨床的意義がこうした観点からも検討される必要があることを意味している。

これまでの多くの研究^{6)8)~13)}は属の異なる真菌間に共通アレルゲン性が存在することを明らかにしている。一方, 同属の菌種間に関する検討は十分ではなく, *Aspergillus* 属に関しては, 著者らの知る限り, 本研究と Karr らの報告⁷⁾以外に見いだせない。しかし, これらの報告はいずれも同属の真菌抗原に共通アレルゲン成分が多く含まれている可能性を示唆している。

A. restrictus と *A. fumigatus* は共通アレルゲン性を示したが, SDS-PAGEの蛋白バンドのパターンはまったく異なっていた。したがって, これらの真菌のIgE抗体と結合する共通エピトープは分子量の異なる蛋白上に存在するものと思われる。Teeら¹⁰⁾は, Western blotting抑制試験を用いて *A. fumigatus*, *A. tenuis*, *Cladosporium herbarum*の共通アレルゲン性を検討しているが, その結果もまた分子量の異なる蛋白上に共通エピトープが存在する可能性を示唆している。RASTの固相に用いたポリ塩化ビニールマイクロプレートには蛋白以外の物質, 例えば多糖体などもコー

ティングされることから、これらの物質が共通アレルゲン成分になっている可能性も考えられる。しかし、*A. fumigatus* の主要なアレルゲン活性は多糖体分画ではなく蛋白分画に認められる¹⁵⁾¹⁶⁾と考えられており、著者らも、限られた症例ではあるが、Western blotting で *A. fumigatus* と *A. restrictus* のアレルゲンバンドを検出したが、いずれのアレルゲンバンドも多糖体が分布すると考えられる separating gel の最上部に一致する nitrocellulose membrane 上には見いだせなかった（未発表）。

A. restrictus 002と004は菌体の外観、湿重量、孢子形成に違いを認め、抗原の蛋白含量、SDS-PAGE の蛋白バンドの種類も同一ではなかった。そして、RAST や RAST 抑制試験で評価したアレルゲン性もまた完全な一致が得られなかった。このような菌株間のアレルゲン性の差異は *Alternaria alternata*¹⁷⁾, *A. fumigatus*¹⁸⁾, *Candida albicans*¹⁹⁾, *C. herbarum*²⁰⁾ などでも報告されており、同一の培養条件のもとでも、菌株によって生育の程度が異なることを意味している。また、抗原作製の手技上の差異や培養期間中の菌の変異などが原因でおこる batch-to-batch variation¹⁶⁾も、菌株間のアレルゲン性の差異に避けがたく含まれてくるものと思われる。真菌抗原の作製にあたっては、培養条件と抗原抽出条件を慎重に選択する必要があるが、それだけではなく適切な菌株を用いることも重要である²¹⁾²²⁾。

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて御指導くださいました名古屋大学医学部小児科学教室渡邊一功教授、名古屋大学医学部病態研医真菌研究部門田中健治教授に感謝致します。

文 献

- 1) 森 實, 尾上洋一, 高橋孝則: 一般家庭におけるカーペットの微生物汚染について. 防菌防黴 13, 109-117, 1985.
- 2) 松田良夫: 真菌と室内汚染. *Curr. Concepts Infect. Dis.* 6, 18-23, 1987.
- 3) Lustgraaf, B.v.d.: Xerophilic fungi in mattress dust. *Mykosen* 20, 101-106, 1977.
- 4) Rijckaert, G.: Exposure to fungi in modern homes. *Allergy* 36, 277-278, 1981.
- 5) 坂本龍雄, 伊藤浩明, 山田政功, 井口淑子, 上田

- 雅乃, 他: *Aspergillus restrictus* のアレルゲンとしての意義に関する研究. アレルギー 39, 1492-1498, 1990.
- 6) Hoffman, D.R. and Kozak, P.P.: Shared and specific allergens in mold extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 213, 1979.
- 7) Karr, R.M., Wilson, M.R., Anicetti, V.R., Lehrer, S.B., Butcher, B.T. and Salvaggio, J.E.: An approach to fungal antigen relationships by radioallergosorbent test inhibition. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 194-198, 1981.
- 8) Agarwal, M.K., Jones, R.T. and Yunginger, J. W.: Shared allergenic and antigenic determinants in *Alternaria* and *Stemphylium* extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 437-444, 1982.
- 9) O'Neil, C.E., Reed, M.A., Hughes, J.M., Butcher, B.T. and Lehrer, S.B.: *Fusarium solani*: Evidence for common antigenic/allergenic determinants with other Fungi Imperfecti. *Clin. Allergy* 17, 127-133, 1987.
- 10) Tee, R.D., Gordon, D.J. and Taylor, A.J.N.: Cross-reactivity between antigens of fungal extracts studied by RAST inhibition and immunoblot technique. *J. Allergy Clin. Immunol.* 79, 627-633, 1987.
- 11) O'Neil, C.E., Hughes, J.M., Butcher, B.T., Salvaggio, J.E. and Lehrer, S.B.: Basidiospore extracts: Evidence for common antigenic/allergenic determinants. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 85, 161-166, 1988.
- 12) Sakamoto, T., Urisu, A., Yamada, M., Matsuda, Y., Tanaka, K. and Torii, S.: Studies on the osmophilic fungus *Wallemia sebi* as an allergen evaluated by skin prick test and radioallergosorbent test. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90, 368-372, 1989.
- 13) O'Neil, C.E., Horner, W.E., Reed, M.A., Lopez, M. and Lehrer, S.B.: Evaluation of Basidiomycete and Deuteromycete (Fungi Imperfecti) extracts for shared allergenic determinants. *Clin. Exp. Allergy* 20, 533-538, 1990.
- 14) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- 15) Kim, S.J., Chaparas, S.D., Brown, T.M. and Anderson, M.C.: Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus*. II. Fractionation and electrophoretic, immunologic, and biologic activity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118, 553-560, 1978.
- 16) Longbottom, J.L. and Austwick, P.K.C.: Antigens and allergens of *Aspergillus fumigatus*.

- I. Characterization by quantitative immunoelectrophoretic techniques. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78, 9-17, 1986.
- 17) Steringer, I., Aukrust, L. and Einarsson, R.: Variability of antigenicity/allergenicity in different strains of *Alternaria alternata*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 84, 190-197, 1987.
- 18) Wallenbeck, I., Aukrust, L. and Einarsson, R.: Antigenic variability of different strains of *Aspergillus fumigatus*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 73, 166-172, 1984.
- 19) Savolainen, J., Viander, M., Einarsson, R. and Koivikko, A.: Allergenic variability of different strains of *Candida albicans*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90, 61-66, 1989.
- 20) Swärd-Nordmo, M., Almeland, T.L. and Aukrust, L.: Variability in different strains of *Cladosporium herbarum* with special attention to carbohydrates and contents of two important allergens (Ag-32 and Ag-54). *Allergy* 39, 387-394, 1984.
- 21) Reed, C.E.: What we do and do not know about mold allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76, 773-775, 1985.
- 22) Hoffman, D.R.: かびアレルゲン “かびアレルギー” (Y. Al-Doory, J.F. Domson 編著, 田中健治, 鳥居新平 訳), 学会出版センター, 東京, pp.110-123, 1988.

ALLERGENIC RELATIONSHIPS BETWEEN *ASPERGILLUS RESTRICTUS*
AND *ASPERGILLUS FUMIGATUS* DETERMINED BY
RADIOALLERGOSORBENT TEST INHIBITION

Tatsuo Sakamoto, Komei Ito, Masanori Yamada and Shimpei Torii
Department of Pediatrics, Nagoya University School of Medicine

Yoshio Matsuda
Public Health Research Institute of Kobe City

Recently *Aspergillus restrictus*, a species of osmophilic fungi, has been found to be widely distributed in our inhabited environment. The authors reported previously that the prevalence of hypersensitivity to this fungal species determined by skin prick test and radioallergosorbent test (RAST) was comparable with that to *Aspergillus fumigatus*. In this study, the allergenic relationships between the two fungi were examined by RAST and RAST inhibition tests in which *A. restrictus* extracts prepared from mycelial mats of two different strains cultured in M40Y liquid medium and *A. fumigatus*, one made from a mycelial mat cultured in YNB liquid medium containing 3% sucrose, were used. In the RAST inhibition tests using a serum pool obtained from five patients with highly positive RAST to these species, the two extracts of *A. restrictus* inhibited RAST to *A. fumigatus* by over 80%, and *A. fumigatus* extract inhibited RAST to the two strains of *A. restrictus* by approximately 75%. In *A. fumigatus* RAST inhibition tests using individual sera with positive *A. fumigatus* RAST, a strong inhibition (>60%) elicited by each extract of *A. restrictus* was observed in 5 of 8 sera tested. In RAST, nine of 11 serum samples with positive RAST to *A. fumigatus* showed positive RAST to both strains of *A. restrictus*. There was a significant correlation between the RAST values of the two fungal species. These results give evidence of the presence of shared allergenic components between the two fungi, and indicate that these components may contain part of major allergens of *A. fumigatus*.