

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による抗アスペルギルス (*Aspergillus fumigatus*) IgG 抗体の検出

— 抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体の応用を中心に —

高知医科大学第三内科

小林 誠

Key words: ABPA — Aspergilloma — mouse monoclonal antibody to human IgG
— ELISA — IgG antibody to *Aspergillus fumigatus*

(受付: 1月7日, 1985)

緒 言

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) は肺アスペルギルス症の原因として重要な真菌である。その診断には喀痰からの菌体の証明が重要であるが、検出率は必ずしも高くはない¹⁾。そこで補助診断として本症特に肺アスペルギローマやアレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) の診断に際して *A. fumigatus* に対する沈降抗体の証明が最も普遍的な手段と考えられている²⁾。沈降抗体は主に IgG 抗体とされ、近年二重免疫拡散法 (double immuno-diffusion) や counterimmunoelectrophoresis 法を初め種々の方法がその検出に用いられているが³⁾、沈降抗体陰性例も存在する⁴⁾。そこで最近では検出感度をあげるため、さらに鋭敏な検出法として radioimmunoassay (RIA)⁵⁻⁸⁾ や enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)⁹⁻¹¹⁾ が開発され検討段階にある。

本研究ではアフィニティー精製抗ヒト IgG ヤギ血清ならびに抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体を標識抗体として用い、マイクロプレートを利用した ELISA による抗アスペルギルス (*A. fumigatus*) IgG 抗体の検出を試み良好な結果を得たので報告する。さ

らに二重免疫拡散法および counterimmunoelectrophoresis 法との比較検討を行った。

対象および方法

1. 対象は診断の確定した肺アスペルギローマ患者 9 例、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) 4 例、*A. fumigatus* に対する皮内反応が陽性か RAST score が 2 + 以上の気管支喘息患者 7 例である。対照としては本学職員でアレルギー性疾患のない健康人 15 名 (23 歳-45 歳までの男 9 名、女 6 名) を選んだ。血液は肘静脈より採血し、2-3 時間室温に放置後、血清を分離し、測定まで -20℃ に保存した。

2. ELISA による抗アスペルギルス (*A. fumigatus*) IgG 抗体の測定

抗アスペルギルス IgG 抗体の測定は Sepulveda ら⁹⁾の方法に準じて行った。以下標識抗体としてアルカリ・フォスファターゼでラベルしたアフィニティー精製抗ヒト IgG ヤギ血清を用いた場合を ELISA (goat)、同じく抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体を用いた場合を ELISA (mono) とした (Fig. 1)。

(1) ELISA (goat)

① 抗原の吸着

A. fumigatus 凍結乾燥末 (鳥居) を予備実験の結果、20 μg/ml の濃度に 0.05M carbonate buffer (pH 9.6) に溶解してポリスチレン・マイクロタイタープレート (Nunc) の各 well あたり 100 μl 分注し、一晚室温に静置した。

Abbreviations: ABPA allergic bronchopulmonary aspergillosis; CIE counterimmunoelectrophoresis; DD double immunodiffusion; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; FCS fetal calf serum; NRS normal rabbit serum; PBS-Tween phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20; PIE pulmonary infiltration with eosinophilia; RIA radioimmunoassay

1. Antigen adsorbed to microplate
 $100\mu\text{l}$ /well of *Aspergillus fumigatus* antigen($20\mu\text{g}/\text{ml}$) added
 ↓ Overnight at room temperature
 Wash 3X with PBS-Tween
2. Test serum incubated
 $100\mu\text{l}$ /well of 200X diluted serum with PBS-Tween/10% FCS
 ↓ 2hr at room temperature
 Wash 3X with PBS-Tween
3. Add alkaline phosphatase* labeled antibody
 $100\mu\text{l}$ /well of goat anti-human IgG* or mouse monoclonal anti-human IgG*
 ↓ 3hr at room temperature
 Wash 3X with PBS-Tween
4. Add enzyme substrate
 $100\mu\text{l}$ /well of para-nitrophenyl phosphate (1mg/ml)
 ↓ 30min at room temperature
 $100\mu\text{l}$ /well of 3N NaOH added
5. Measurement of OD at 405nm

Fig. 1. Method for ELISA.

② 被験血清の添加

0.05% Tween 20を含む pH 7.2の PBS (PBS-Tween) で3回洗浄後, 10%仔ウシ胎児血清 (FCS) を含む PBS-Tween で200倍に希釈した被験血清を $100\mu\text{l}$ 注入し, 室温で2時間静置した。

③ 標識抗体の添加

PBS-Tween で3回洗浄後, PBS-Tween で3000倍に希釈したアルカリ・フォスファターゼ標識抗ヒト IgG ヤギ血清 (γ -chain specific, Tago Lab. Lot No. 90-10-02) を $100\mu\text{l}$ 分注し, 室温3時間静置した。

④ 基質液の添加

PBS-Tween で3回洗浄後, 基質液として diethanolamine buffer (pH 9.8) で1mg/ml に調整した para-nitrophenyl phosphate (Sigma) を $100\mu\text{l}$ 添加して室温30分間静置した。

⑤ 反応の停止

3M NaOH $100\mu\text{l}$ を各 well に添加して反応を停止した。

⑥ 吸光度の測定

コロナ社製マイクロプレート・フォトメーター MTP 12 を用いて 405nm における吸光度の測定を行った。なお, 測定はすべて duplicate で行った。

⑦ データ処理

有意差の検定には Student の t 検定を用いた。

(2) ELISA (mono)

被験血清の希釈には10%正常ウサギ血清 (NRS) を含む PBS-Tween を用い, 標識抗体として後述の方法で作製したアルカリ・フォスファターゼ標識抗ヒト

IgG マウスモノクローナル抗体 (Lot No. 580208) を800倍に希釈して使用した。それ以外の点は ELISA (goat) と同様に行った。

3. アルカリ・フォスファターゼ標識抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体の作製

Avrameas¹²⁾の方法によりマウス抗ヒト IgG (Fc) モノクローナル抗体 (和光) をアルカリ・フォスファターゼ (Sigma Type VII S) で標識した。

4. 二重免疫拡散法 (DD)

1%の濃度に agarose A 37 (半井) を veronal buffer (pH 8.6, $\mu=0.05$) に溶解しゲル化させ, Ouchterlony 法により行った¹³⁾。なお被験血清は lymphogel (Gel-man science) で3倍に濃縮して用い, 抗原は $20\text{mg}/\text{ml}$ に溶解した鳥居製 *A. fumigatus* 凍乾末あるいは Hollister-Stier 製の *A. fumigatus* 抗原液を用いた。結果の判定は48時間後に沈降線の有無で肉眼的に行った。

5. counterimmunoelectrophoresis (CIE) 法

池本³⁾の方法に準じた。8cm×8cm のガラス板上に 1.5mm の厚さになるように1% agarose A37 (veronal buffer pH 8.6, $\mu=0.05$ に溶解) を拡げ, 次に抗原と血清を入れる well の2対の列を作り, 陰極側に二重免疫拡散法に用いたと同じ *A. fumigatus* 抗原液, 陽極側に被験血清を各 well あたり $5\mu\text{l}$ 注入し, 2-3mA/cm で30分間通電した。最終判定は0.9% NaCl 中に2日間浸し, 乾燥後5分間アミドブラック染色を施し, さらに2%酢酸で洗浄して沈降線の有無を判定した。

結 果

1. 血清の希釈度の吸光度の関係

陽性血清 (●) と陰性血清 (○) で倍数希釈し, それぞれ ELISA (mono) と ELISA (goat) 両方で吸光度を測定し, プロットした結果を Fig. 2 に示す。陰性血清の吸光度は ELISA (mono) で ELISA (goat) より低いのにに対し, 陽性血清の吸光度は ELISA (mono) の場合, ELISA (goat) より高値を示した。この結果より陽性血清と陰性血清の吸光度の差が最も大きくかつ陰性血清の吸光度が0.2を越えない血清希釈度として200倍を選び, 以後200倍を被験血清の希釈倍数とした。また同一の陽性血清を用いてプレートごとの dose-response curve を描いてプレート間の比較を行った。

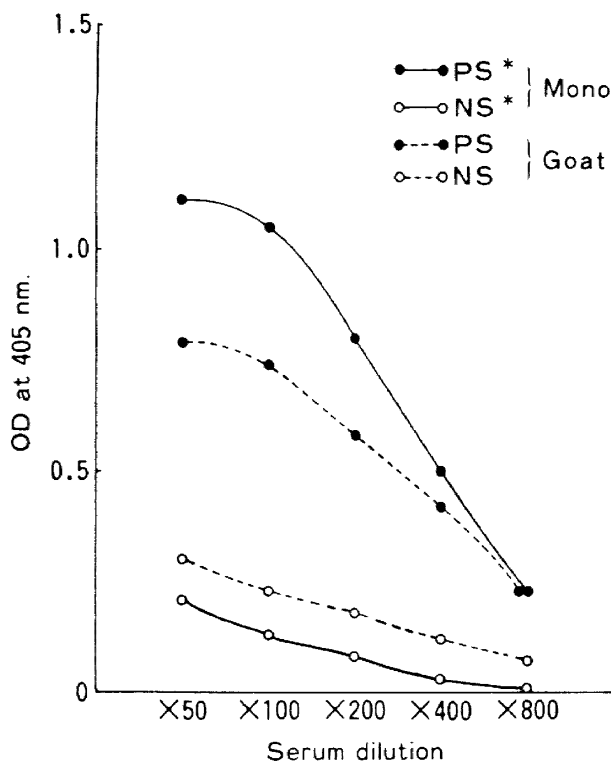


Fig. 2. Effect of serum dilution and comparison of ELISA (mono) with ELISA (goat).

●—● positive serum, ○—○ negative serum: ELISA (mono), ●---● positive serum, ○---○ negative serum: ELISA (goat).

*PS: positive serum, NS: negative serum.

2. *A. fumigatus* 抗原による抑制試験

この反応系が *A. fumigatus* に特異的か否かを調べるため、伊藤ら¹⁴⁾に準じて、*A. fumigatus* 抗原を反応系に加えて、抑制されるかどうかを調べた。まず前述の *A. fumigatus* 抗原を200 μ g/ml, 20 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 0.02 μ g/mlの各濃度になるように10% FCS-PBS-Tweenあるいは10% NRS-PBS-Tweenで調整した。それぞれ50 μ lをあらかじめ *A. fumigatus* 抗原 (20 μ g/ml) で coat したマイクロタイタープレートの well に入れ、直ちに100倍希釈した陽性血清50 μ lを入れ軽く振とうした。あとは既述の方法で ELISA を行った。その結果は Fig. 3 に示すごとくであり、抗原の添加により抑制されることが判明した。

3. ELISA (goat) (Fig. 4)

肺アスペルギローマ患者血清の吸光度 (平均 $\pm$ SD) は0.571 $\pm$ 0.099, ABPA 患者では0.600 $\pm$ 0.121, 気管支喘息患者では0.184 $\pm$ 0.079, 正常対照者では0.108 $\pm$ 0.077であった。肺アスペルギローマ患者群と ABPA 患者群の吸光度は正常対照者群の吸光度に比べ有意に高値を示した ($p < 0.001$)。これに対し気管支喘息患者

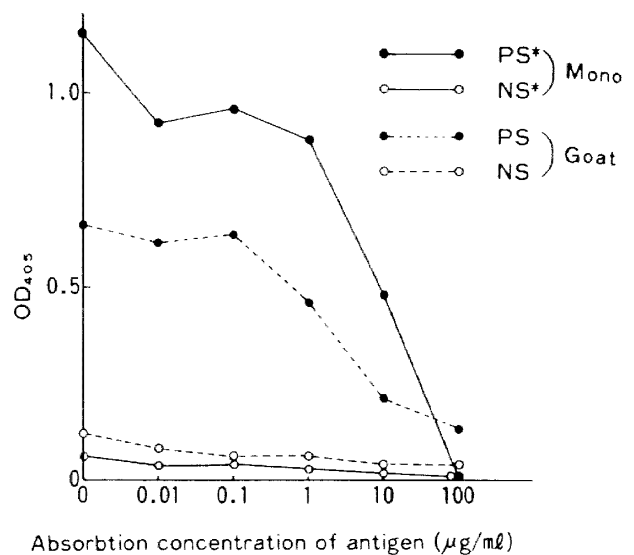


Fig. 3. Inhibition test of ELISA of IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* by *Aspergillus fumigatus* antigen.

ELISA was done with 50 μ l of 100fold-diluted patient serum added priorly with 50 μ l of *Aspergillus fumigatus* antigen of different concentrations.

●—● positive serum, ○—○ negative serum: ELISA (mono), ●---● positive serum, ○---○ negative serum: ELISA (goat).

*PS: positive serum, NS: normal serum.

群の吸光度は正常対照者群の吸光度と有意の差を認めなかった。

4. ELISA (mono) (Fig. 5)

肺アスペルギローマ患者血清の吸光度 (平均 $\pm$ SD) は0.926 $\pm$ 0.477, ABPA 患者の吸光度は1.271 $\pm$ 0.497, 気管支喘息患者では0.133 $\pm$ 0.064, 正常対照者では0.094 $\pm$ 0.049であった。ELISA (goat) の場合と同様、肺アスペルギローマ患者群ならびに ABPA 患者群の吸光度は正常対照者群の吸光度に比し有意に高値であった ($p < 0.001$)。一方気管支喘息患者群と正常対照者群の吸光度の間には有意の差は認められなかった。

5. ELISA (goat) と ELISA (mono) との比較

Fig. 6に示すごとく、肺アスペルギローマ患者と ABPA 患者群では ELISA (mono)の吸光度は ELISA (goat)に比し高値をとる傾向にあり、幅広く分布する傾向が窺われた。一方気管支喘息患者と正常対照者群の吸光度は ELISA (mono)の吸光度が ELISA (goat)に比しより低値を示す傾向が認められた。

肺アスペルギローマ, ABPA ならびに気管支喘息患者につき ELISA (mono) と ELISA (goat) の吸光度

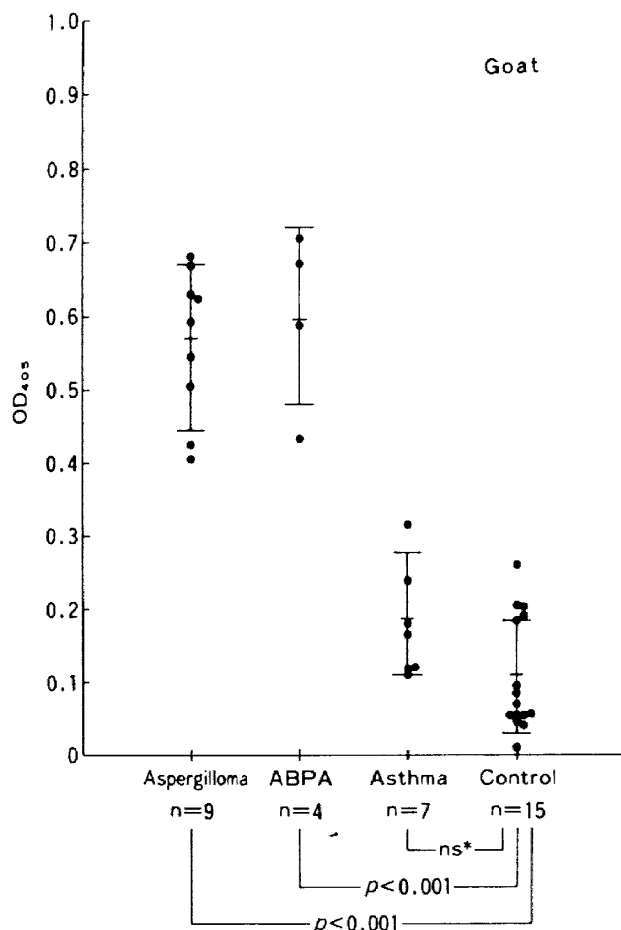


Fig. 4. Specific IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* antigen by ELISA using alkaline phosphatase labelled affinity purified anti-human IgG goat serum: ELISA (goat).

Horizontal bars represent mean $\pm$ SD values.

* ns: not significant.

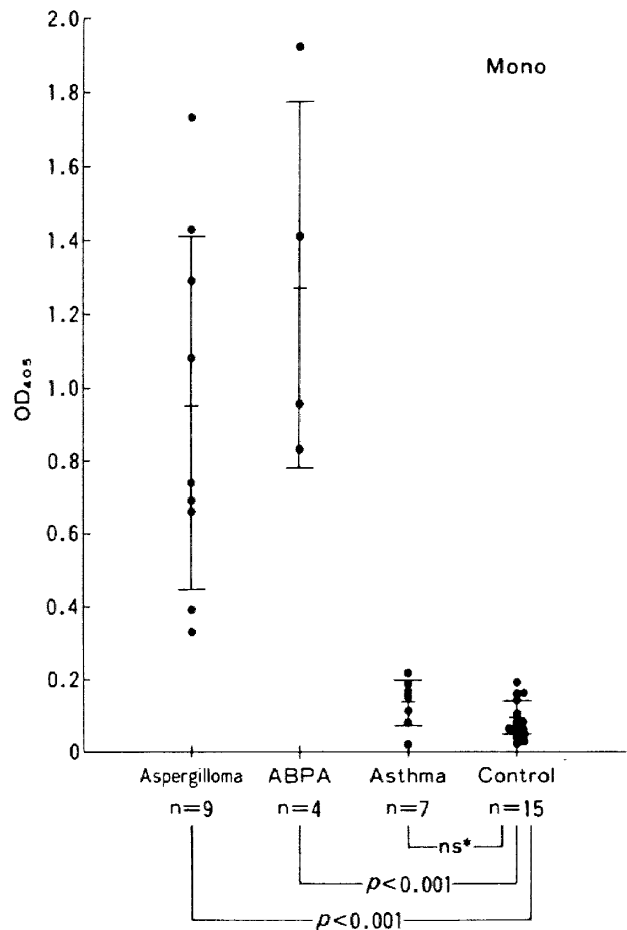


Fig. 5. Specific IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* antigen by ELISA using alkaline phosphatase labelled mouse monoclonal antibody to human IgG: ELISA (mono).

Horizontal bars represent mean $\pm$ SD values.

* ns: not significant.

の相関をみると、Fig. 7に示すごとく、 $r=0.8793$ で $p<0.001$ と有意な正の相関が認められた ($Y=2.412X-0.346$).

6. DD と ELISA IgG 値との比較 (Fig. 8)

肺アスペルギローマと ABPA 患者を DD 陽性群 ($n=7$) と DD 陰性群 ($n=6$) に分けて検討した。

(1) ELISA (goat)では DD 陽性群の吸光度(平均 $\pm$ SD)は 0.616 ± 0.085 , DD 陰性群では 0.538 ± 0.111 で両者間の吸光度に有意の差は認められなかった ($p<0.2$).

(2) ELISA (mono)では DD 陽性群の吸光度(平均 $\pm$ SD)は 1.276 ± 0.449 , DD 陰性群の吸光度は 0.747 ± 0.394 で、陽性群の吸光度は陰性群に比し有意に高値であった ($p<0.05$).

7. CIE と ELISA IgG 値との比較 (Fig. 9)

同様に肺アスペルギローマ患者と ABPA 患者と CIE 陽性群 ($n=9$) と CIE 陰性群 ($n=4$) とに分けて検討した。

(1) ELISA (goat)では CIE 陽性群の吸光度は 0.623 ± 0.080 , CIE 陰性群の吸光度は 0.482 ± 0.078 で、CIE 陽性群の吸光度は陰性群に比し有意に高値を示した ($p<0.05$).

(2) ELISA (mono)では CIE 陽性群の吸光度は 1.231 ± 0.431 , CIE 陰性群の吸光度は 0.584 ± 0.280 で、同様に陽性群の吸光度は陰性群に比し有意に高値を示した ($p<0.05$).

8. ELISA と DD ならびに CIE 各法の陽性率の比較

ELISA については吸光度が 0.3 以上を陽性と判定し

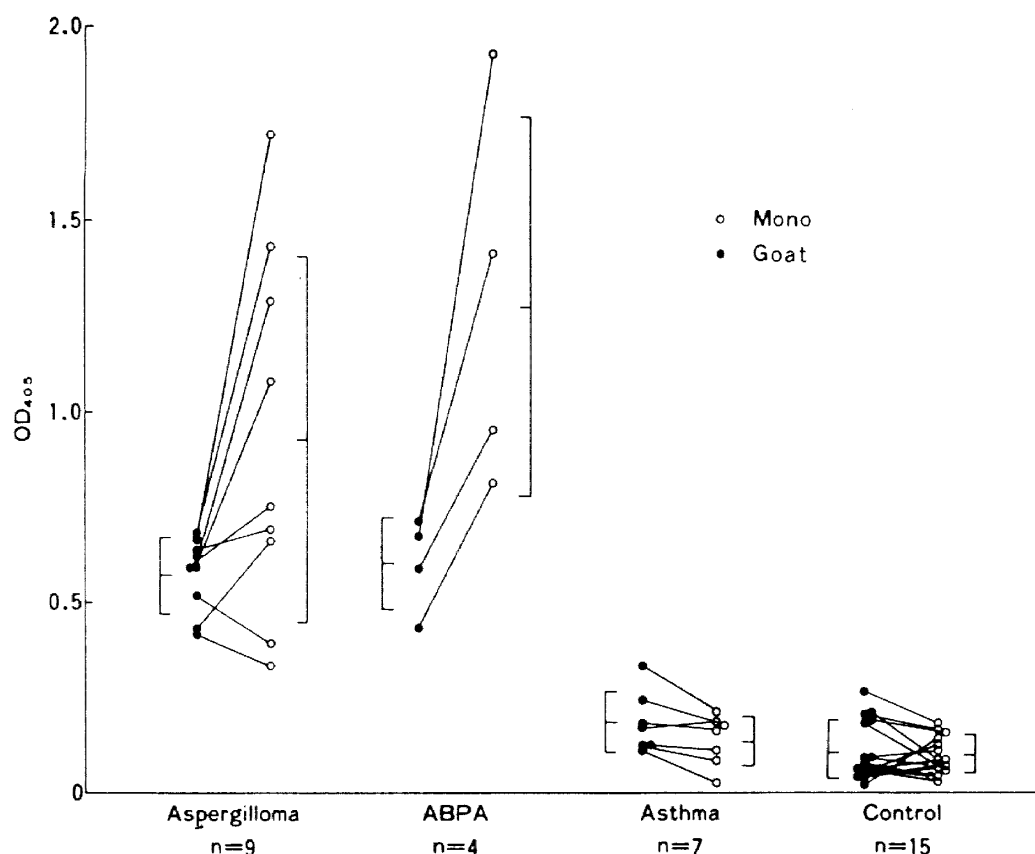


Fig. 6. ELISA values for specific IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* antigen.

● ELISA (goat), ○ ELISA (mono).

Horizontal bars represent mean $\pm$ SD values.

て結果を検討した (Table 1).

陽性率は肺アスペルギローマ患者 9 例中 DD 5 例, CIE 6 例, ELISA (goat) と ELISA (mono) はいずれも 9 例全例で陽性であった。次に ABPA 患者 4 例中 DD 2 例, CIE 3 例, ELISA (goat) と ELISA (mono) ではいずれも 4 例全例で陽性であった。これに対し気管支喘息患者 7 例中 ELISA (goat) で 1 例のみ陽性であった以外, DD, CIE, ELISA (mono) については全例陰性であった。以上の結果 ELISA は DD, CIE に比し感度の点で秀れており, なかでも ELISA (mono) が特異性に秀れていることが窺われた。

9. ABPA 患者における抗アスペルギルス IgG 抗体価の推移と臨床経過 (Fig. 10)

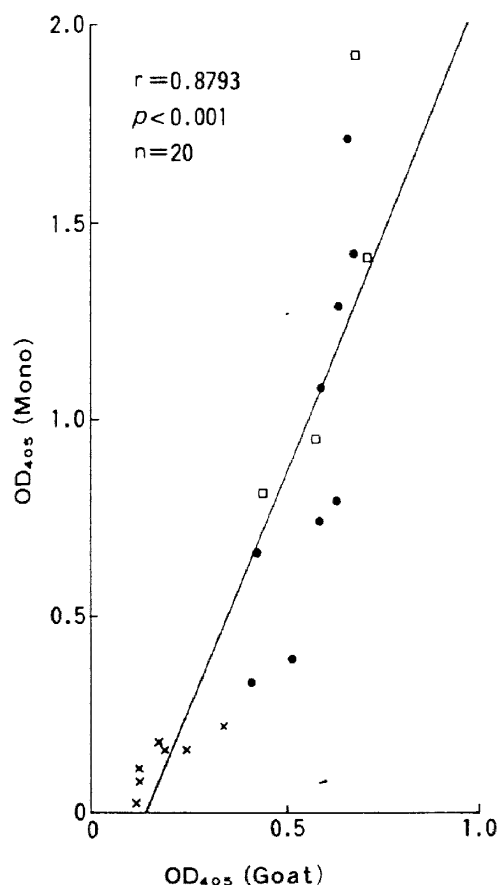
当科で経験した ABPA の 1 例 (patient No. 10) につき検討した。

症例は 54 歳の女性で数年前より毎年肺炎をくり返した既往がある。昭和 57 年 6 月より胸部異常陰影と高熱をきたし某院へ入院, 抗結核剤, 抗生剤の投与に反応せず, 当科へ精査のため入院した。Rosenberg and

Patterson の診断基準¹⁵⁾で ABPA と診断し, ステロイド投与を行い軽快した。昭和 58 年 7 月に至り左舌区の肺炎像を呈して再入院となる。再度ステロイド治療により陰影は消失した。全経過を通じて次第に総 IgE 値は低下傾向が認められた。第 2 回入院以降, 経時的に採血した血清につき, ELISA で抗アスペルギルス IgG 抗体を測定したが, 陰影の消退に併行して ELISA IgG 値も低下することが判明した。

考 察

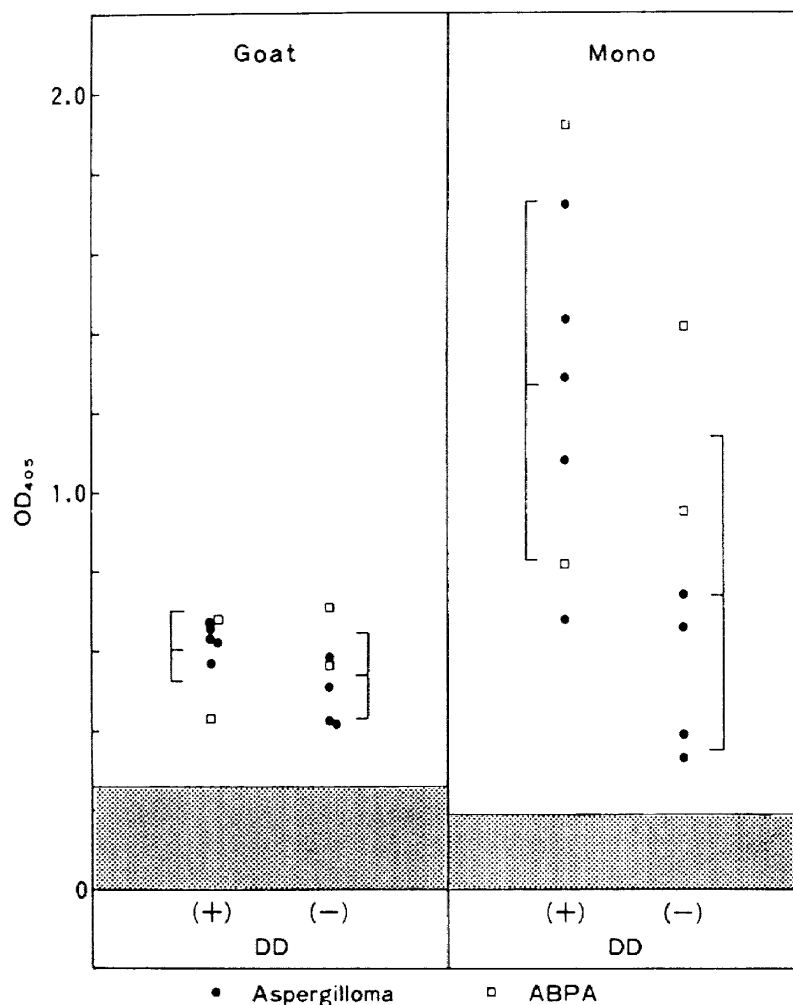
A. *fumigatus* に対する血中抗体の検出には古くより種々の方法が試みられてきた³⁾。二重免疫拡散法 (Ouchterlony 法)²⁾, 補体結合反応¹⁶⁾, counter-immunoelectrophoresis 法¹⁷⁾, 間接赤血球凝集反応¹⁸⁾, 間接蛍光抗体法¹⁹⁾, さらに最近では RIA, ELISA などの方法が開発され臨床上有用であることが報告されている。特に ELISA については放射線被曝の恐れもな



• Aspergilloma □ ABPA × Asthma

Fig. 7. Comparison of affinity purified goat antihuman IgG with mouse anti-human IgG in ELISA for specific antibody to *Aspergillus fumigatus* antigen.

Mono: ELISA (mono), Goat: ELISA (goat).



Shaded area represents the mean $\pm$ 2SD for normal control

Fig. 8. Comparison of specific IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* antigen by ELISA with precipitins to *Aspergillus fumigatus* by double immunodiffusion (DD).

Goat: ELISA (goat). Mono: ELISA (mono).

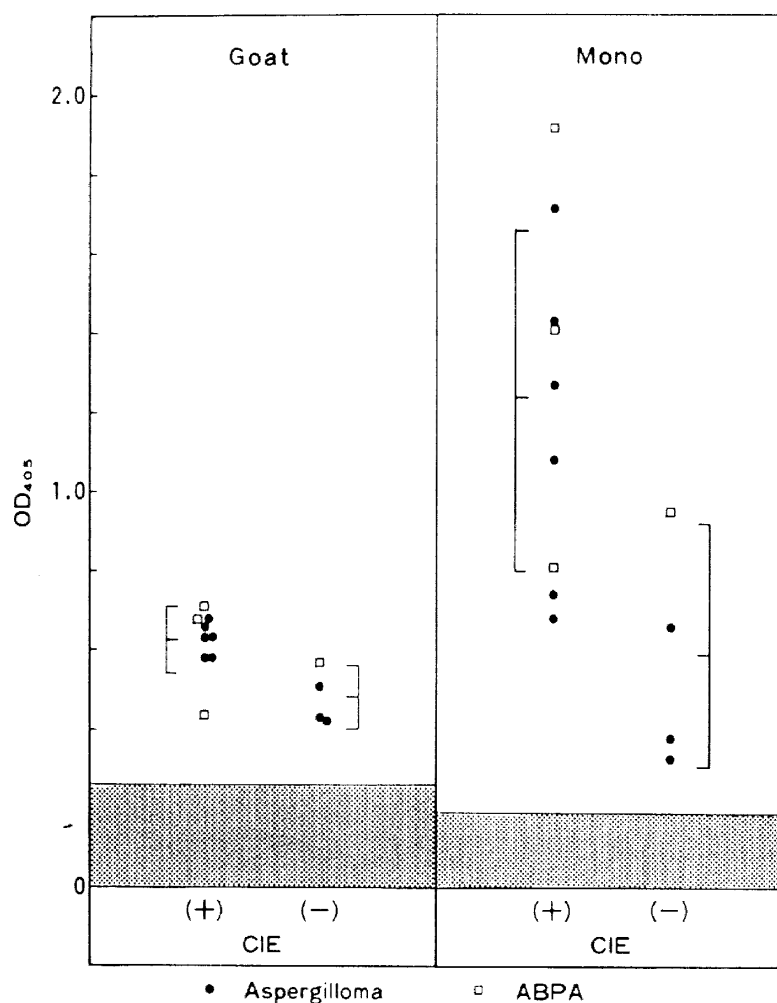
Horizontal bars represent mean $\pm$ SD values.

く、従って特殊な設備を要せず、試薬は比較的安価で、標識抗体の保存性もよいなどの長所を有し、しかも感度の点でも劣ることがないとされている⁹⁾。

今回 ELISA を用いて肺アスペルギローマ、ABPA、気管支喘息の 3 患者群について抗アスペルギルス (*A. fumigatus*) IgG 抗体の検出を行った結果、ELISA 両法で肺アスペルギローマ、ABPA の両患者群の吸光度はいずれも正常対照者群に比し有意に高値 ($p<0.001$) を示したのに対し、気管支喘息患者群では正常対照者群と吸光度に有意の差は認めなかった。以上は従来の諸家の報告に一致した結果であった⁹⁾²⁰⁾。さらに ELISA (mono) と ELISA (goat) を比較すると、前者が background が低く、しかも ELISA 陽性を示

す肺アスペルギローマ、ABPA 患者の吸光度は幅広く分布する傾向が認められた。以上の結果は用いた抗体の種類あるいは標識方法により抗体あたりに結合している活性酵素の量の違いを反映している可能性も否定できないが、むしろモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の認識する抗原の違い、即ち、ポリクローナル抗体はアフィニティー精製を行ってもアスペルギルス抗原に結合する若干の非特異的 IgG を含め認識するのに対し、モノクローナル抗体では特異的 IgG をより選択的に認識している結果ではないかと考えられた。しかし概して ELISA (mono) と ELISA (goat) の結果は良好な相関を示した ($r=0.8793$, $p<0.001$)。

次に沈降抗体陽性群と陰性群で吸光度を比較すると



Shaded area represents the mean $\pm$ 2SD for normal control

Fig. 9. Comparison of specific IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* antigen by ELISA with antibodies against *Aspergillus fumigatus* antigen by counterimmuno-electrophoresis (CIE).

Goat: ELISA (goat), Mono: ELISA (mono).

Horizontal bars represent mean $\pm$ SD values.

二重免疫拡散法と counterimmunoelectrophoresis 法の両者とも陽性群で吸光度が高値を示す傾向が認められた。しかし、以前より沈降抗体の結果と ELISA IgG 値の間に解離が認められることが報告されている。Kauffman ら²⁰⁾はその原因について 2 つの可能性を示唆している。すなわち、ELISA の測定している抗体は沈降線を形成しないがポリスチレンには吸着しうる抗原に対する抗体である可能性と、抗原の吸着のメカニズムによる制約のためかあるいはより強い結合力をもつ抗原との競合の結果、沈降線を形成しうる抗原成分の一部しかポリスチレンの表面に結合していない可能性である。Sepulveda ら⁹⁾は ELISA を用いた抗 *A. fumigatus* IgG 抗体の測定の際、*A. fumigatus* 蛋白抗原と同様に多糖体抗原についても通常の吸着法により

良好な結果を得、肺アスペルギローマ患者では蛋白抗原に対する抗体価が高いのに対し、ABPA ではむしろ多糖体抗原に対する抗体価が高いと述べている。一方坂本ら⁸⁾は多糖体抗原については poly-L-lysine を介した Gray²¹⁾の吸着法を勧めている。今回の研究では症例数が少なく、この解離の原因については検討し得なかった。

各検出法の感度について検討してみると、ELISA (mono) $\geq$ ELISA (goat) $>$ CIE $>$ DD の順に感度が良好であった。また background が低い点より ELISA (mono) が特異性が最も高いことが窺われた。

Greenberger ら¹⁰⁾や Kauffman ら²⁰⁾は ELISA の検出感度を上げる目的で double antibody 法を用いているが、操作時間が長くなり、操作自体も複雑化し、そ

Table 1 Results of different methods for detecting specific IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* antigen among subjects in this study

Case No.	Age	Sex	Diagnosis	DD*	CIE*	ELISA*(OD>0.3)	
						Goat**	Mono**
1	78	M	Aspergilloma	+	+	+	+
2	76	M	Aspergilloma	+	+	+	+
3	59	M	Aspergilloma	-	-	+	+
4	84	M	Aspergilloma	+	+	+	+
5	73	M	Aspergilloma	+	+	+	+
6	71	M	Aspergilloma	+	+	+	+
7	64	F	Aspergilloma	-	-	+	+
8	71	M	Aspergilloma	-	+	+	+
9	75	M	Aspergilloma	-	-	+	+
10	54	F	ABPA***	-	-	+	+
11	57	F	ABPA	-	+	+	+
12	61	F	ABPA	+	+	+	+
13	50	F	ABPA	+	+	+	+
14	48	M	Asthma	-	-	-	-
15	63	F	Asthma	-	-	-	-
16	21	M	Asthma	-	-	+	-
17	66	F	Asthma	-	-	-	-
18	35	M	Asthma	-	-	-	-
19	33	M	Asthma	-	-	-	-
20	42	M	Asthma	-	-	-	-

*DD: Double immuno-diffusion, CIE: Counterimmunoelectrophoresis.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

**Goat: Alkaline phosphatase labeled goat anti-human IgG.

Mono: Alkaline phosphatase labeled mouse monoclonal anti-human IgG.

***ABPA: Allergic bronchopulmonary aspergillosis.

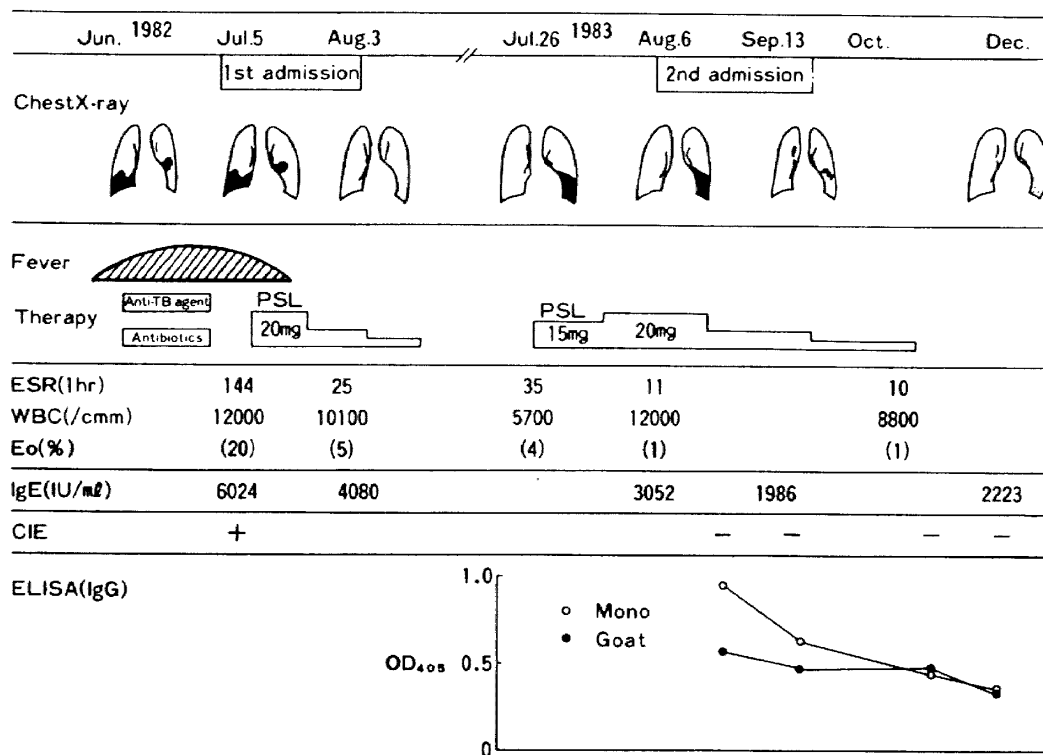


Fig. 10. Clinical course of patient No. 10 with allergic broncho-pulmonary aspergillosis.

PSL: prednisolone.

の上非特異的反応が加わる可能性も予想される。これに対し本研究では Sepulveda ら⁹⁾の方法を改変し、アフィニティー精製抗ヒト IgG ヤギ血清あるいは抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体を標識抗体として用い、single antibody 法により検出感度を上げ、良好な結果を得た。

ABPAはPIE症候群を呈し、免疫学的にはCoombs-GellのI型とIII型のアレルギー反応の関与する興味深い疾患であり、本邦でも症例報告は増加している²²⁾²³⁾。発作性気道閉塞、末梢血好酸球増多、*A. fumigatus*に対する沈降抗体陽性、肺浸潤影の既往、中枢性気管支拡張症が特徴とされている。既に総IgE値、特異的IgE値とともに沈降抗体価がABPAの病勢に一致するという報告がみられるが^{24)~27)}、Rosenbergら²⁸⁾、秋山ら²⁹⁾はRIAを用いて総IgE値、特異的IgE及び特異的IgG値が病勢に一致して増減すると報告している。本研究に示したごとくELISA IgG値はABPAの病勢を反映することが窺われ、前記の報告とほぼ一致する結果をえた。

沈降抗体が証明できない肺アスペルギローマ症例、ABPA症例の存在が知られているが、これらの症例についてもELISAにより抗アスペルギルスIgG抗体を検出できる可能性が示唆された。特にABPAは放置すれば再燃をくり返し、気管支拡張症が増強し、ついには肺線維症に至ることが指摘されており³⁰⁾、その早期診断は重要である。またアスペルギルスに起因する喘息との鑑別診断に有用であることが判明した。今後ともさらに症例数を増して検討することが必要と考えられた。

結 語

標識抗体としてアフィニティー精製抗ヒトIgGヤギ血清と抗ヒトIgGマウスモノクローナル抗体を利用し、マイクロプレートを用いたELISAによる抗アスペルギルス(*A. fumigatus*)IgG抗体の検出法を検討した。肺アスペルギローマ、ABPA患者では有意に高値を、気管支喘息患者では正常対照者と同様に低値を示した。検出法による感度は、ELISA (mono)、ELISA (goat)、CIE、DDの順で高かった。ABPA患者についてはELISA IgG値が病勢を示すマーカーとして重要であるばかりでなく、早期診断にも有用であることが判明し、ABPAの管理に役立つことが示唆さ

れた。

稿を終えるに臨み御指導・後校閲を賜った三好勇夫教授、標識モノクローナル抗体を分与して頂いた田口博国助教授、ならびに技術的な助言を頂いた新谷憲治講師、当院小児科小倉英郎講師に深謝致します。さらに貴重な血清を分与して頂いた、高知日赤病院呼吸器科橋本卓樹先生、高知市民病院呼吸器科中山正先生、府中総合病院内科佐藤俊雄先生、公立学校共済組合中国中央病院内科宮田明先生に謝意を表します。

本論文の要旨は第24回日本胸部疾患学会総会(東京)において発表した。

文 献

- 1) Pepys, J., Ridell, R.W., Citron, K.M., Clayton, Y. M. and Short, E.I.: Clinical and immunological significance of *Aspergillus fumigatus* in the sputum. *Am. Rev. Respir. Dis.* 80, 167-180, 1959.
- 2) Longbottom, J.L. and Pepys, J.: Pulmonary aspergillosis: Diagnostic and immunological significance of antigen and C substance in *Aspergillus fumigatus*. *J. Pathol. Bacteriol.* 88, 141-151, 1964.
- 3) 池本秀雄: 真菌症の血清学的診断, 臨床免疫 13(Suppl. 3), 277-282, 1981.
- 4) 檀原 高: immunoradiometric assay 法による血清IgG型抗アスペルギルス抗体の検出—肺アスペルギローマ症例におけるゲル内沈降反応との対比, 日胸疾会誌 21, 745-752, 1983.
- 5) Jacoby, B., Longbottom, J.L. and Pepys, J.: The uptake of *Aspergillus fumigatus* protein by serum IgG antibody from patients with pulmonary aspergillosis. *Clin. Allergy* 7, 117-125, 1977.
- 6) Wang, J.L.F., Patterson, R., Rosenberg, M. and Cooper, B.J.: Serum IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* as a diagnostic aid in an allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117, 917-927, 1978.
- 7) Patterson, R., Wang, J.L.F., Robert, M. and Zeiss, C.R.: Comparison of radioimmunoassay techniques in the detection of IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* antigen. *J. Immunol.* 120, 66-71, 1978.
- 8) 坂本芳雄, 可部順三郎: solid-phase radioim-

- munassay による抗 *Aspergillus fumigatus* IgG, IgA, IgM 抗体の測定. 日胸疾会誌 20, 1063-1067, 1982.
- 9) Sepulveda, R., Longbottom, J.L. and Pepys, J.: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgE antibodies to protein and polysaccharide antigens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. Allergy* 9, 359-371, 1979.
 - 10) Greenberger, P.A. and Patterson, R.: Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Lab. Clin. Med.* 99, 288-293, 1982.
 - 11) Mäntyärvi, R.A., Jousilahti, P. and Katila, M. L.: Antibodies to *Aspergillus fumigatus* in farmers' lung patients measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Allergy* 10, 187-194, 1980.
 - 12) Avrameas, S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde; use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6, 43-52, 1969.
 - 13) 渡辺一功, 山崎みどり: 肺アスペルギルス症の血清学的診断. 検査と技術 7, 775-781, 1979.
 - 14) 伊藤幸治, 木谷誠一, 坂本芳雄, 宮本昭正: enzyme-linked immunosorbent assay による喘息患者血清中の抗ダニ (*Dermatophagoides farinae*) IgG, IgA, IgM 抗体の検出. アレルギー 33, 158-166, 1984.
 - 15) Rosenberg, M., Patterson, R., Mintzer, R., Cooper, B.J., Roberts, M. and Harris, K.H.: Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann. Int. Med.* 86, 405-414, 1977.
 - 16) Walter, J.E. and Jones, R.D.: Serologic tests in diagnosis of aspergillosis. *Dis. Chest* 53, 729-735, 1968.
 - 17) Mackenzie, D.W.R. and Philpot, C.M.: Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycoserological procedure. *Mycopathologia* 57, 1-7, 1975.
 - 18) Ikemoto, M. and Shibata, S.: Indirect haemagglutination in pulmonary aspergilloma diagnosis. *Sabouraudia* 11, 167-170, 1973.
 - 19) Warnock, D.W.: Indirect immunofluorescence test for the detection of *Aspergillus fumigatus* antibodies. *J. Clin. Pathol.* 27, 911-912, 1974.
 - 20) Kauffman, H.F., Beaumont, F., Meuers, H., van der Heide, S. and de Vries, K.: Comparison of antibody measurements against *Aspergillus fumigatus* by means of double-diffusion and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Allergy Clin. Immunol.* 72, 255-261, 1983.
 - 21) Gray, B.M.: ELISA methodology for polysaccharide antigens: Protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes. *J. Immunol. Methods* 28, 187-192, 1979.
 - 22) 西村 浩, 信太隆夫: 喘息性好酸球増加症. 日本臨床 41, 602-607, 1983.
 - 23) 田村静雄: 気管支肺アスペルギルス症. 呼吸 2, 23-35, 1983.
 - 24) Golbert, T.M. and Patterson, R.: Pulmonary allergic aspergillosis. *Ann. Intern. Med.* 72, 395-403, 1970.
 - 25) Slavin, R.G., Million, L. and Cherry, J.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Characterization of antibodies and results of treatment. *J. Allergy* 46, 150-155, 1970.
 - 26) Turner, K.J., Elder, J.L., O'Mahony, J. and Johansson, S.G.O.: The association of lung shadowing with hypersensitivity responses in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin. Allergy* 4, 149-160, 1974.
 - 27) Imbeau, S.A., Nichols, D., Flaherty, D., Dickie, H. and Reed, C.: Relationships between prednisone therapy, disease activity, and the total serum IgE level in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62, 91-95, 1978.
 - 28) Rosenberg, M., Patterson, R., Roberts, M. and Wang, J.: The assessment of immunologic and clinical changes occurring during corticosteroid therapy for allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am. J. Med.* 64, 599-606, 1978.
 - 29) 秋山一男, 伊藤幸治, 宮本昭正, 堀内淑彦, 信太隆夫, 油井泰雄, 西村 浩: アレルギー性気管支肺アスペルギルス症の免疫学的研究—血清総IgE値, IgE, IgG, IgA, IgM 抗体面と臨床経過との関連. 日胸疾会誌 17, 250-258, 1979.
 - 30) Hendrick, D.J.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Semin. Respir. Med.* 5, 240-245, 1984.

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF SERUM IgG ANTI-
BODIES TO *ASPERGILLUS FUMIGATUS* ANTIGEN USING
MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY TO HUMAN IgG

Makoto Kobayashi

Department of Medicine, Kochi Medical School

IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus* antigen were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Two alkaline phosphatase labelled antibodies were used. One was affinity purified goat anti-human IgG serum, and the other, mouse monoclonal antibody to human IgG. The assays with these antisera were designated ELISA (goat) and ELISA (mono), respectively. Double immuno-diffusion and counter-immunoelectrophoresis for the detection of precipitating antibodies to *Aspergillus fumigatus* antigen were performed in parallel. The results are as follows.

1) ELISA IgG antibody titers to *Aspergillus fumigatus* in patients with aspergilloma and allergic broncho-pulmonary aspergillosis were significantly higher than those in normal controls, but those in patients with aspergillus asthma were in the normal range.

2) Patients who had precipitating antibodies in double immuno-diffusion or counterimmunoelectrophoresis showed relatively higher ELISA IgG values than those who did not.

3) The sensitivity for detection of the specific IgG antibodies was ELISA (mono)>ELISA (goat)>counterimmuno-electrophoresis>double immuno-diffusion.

4) ELISA IgG values appears to be a useful marker for early detection and disease activity of allergic broncho-pulmonary aspergillosis.