

Aspergillus restrictus のアレルゲンとしての意義に関する研究

a) 名古屋大学医学部小児科

b) 国立療養所中部病院小児科

c) 神戸市環境保健研究所

坂本龍雄^{a)} 伊藤浩明^{a)} 山田政功^{a)} 井口淑子^{b)}上田雅乃^{b)} 松田良夫^{c)} 鳥居新平^{a)}

近年、好稠性真菌検出用培地を用いた生活環境真菌の分布調査が行われるようになり、好稠性真菌である *Aspergillus restrictus* が室内塵から多数検出されることが明らかとなった。そこで、著者らは *A. restrictus* のアレルゲンとしての意義を明らかにするため、気管支喘息児94名（平均年齢12.0歳）を対象に、*A. restrictus* の皮膚プリック試験ならびに radioallergosorbent test (RAST) を行った。なお、比較のため *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, 室内塵についても同様の検討を行った。その結果、皮膚プリック試験の陽性率は *A. restrictus* 8.5%, *A. fumigatus* 8.5%, *A. alternata* 16.0%, 室内塵73.4%であった。RASTの陽性率は *A. restrictus* 28.7%, *A. fumigatus* 23.4%, *A. alternata* 37.2%, 室内塵79.8%であった。したがって、*A. restrictus* は IgE の関与する即時型過敏症の原因アレルゲンとなりうると考えられた。そして、皮膚プリック試験と RAST の陽性率から、*A. restrictus* がアレルギー疾患の原因アレルゲンとして、室内塵、*A. alternata* には及ばないが、*A. fumigatus* に匹敵する役割を担っている可能性が示唆された。

Key words: *Alternaria alternata* — *Aspergillus fumigatus* — *Aspergillus restrictus* — RAST — skin prick test

緒言

近年、住宅構造の気密性の強化や室内のインテリア化に伴って、保温性の向上、結露形成および有機栄養物の滞留など真菌の生育に適した条件が室内環境中に多く存在するようになってきた¹⁾²⁾。室内環境真菌は室内・室外のいずれにも発生源を有しているが、このような室内環境の変化は、室内由来の室内環境真菌の発生・分布に大きな影響を及ぼしていると考えられる。好湿性・中湿性真菌検出用培地と好稠性真菌検出用培地を同時に用いた我が国での室内塵中の真菌分布調査³⁾⁴⁾によれば、検出される総コロニー数はいずれの培地を用いた場合も大差ないが、検出真菌叢に明らかな違いを認めた。とりわけ注目される点は、後者の培地を用いると好稠性真菌に分類される *Aspergillus restrictus* および *Wallemia sebi* がきわめて多数検出され

たことであり、このことは、これらの真菌が優勢室内真菌であることを意味している。これらの真菌は好湿性、中湿性真菌と違って、室内塵中での増殖が可能なが多く^{5)~7)}、最近の室内環境の変化に伴ってその分布が広がってきている可能性がある。

これまでに、*W. sebi* は *Aspergillus fumigatus* に匹敵するアレルゲン性を有することが示唆されているが⁸⁾、*A. restrictus* に関しては、弁置換術後の心内膜炎⁹⁾や気管支内 Aspergilloma¹⁰⁾¹¹⁾の原因真菌となることが知られているものの、アレルギー疾患の発症に及ぼす役割については十分な検討が行われていない。そこで、著者らは *A. restrictus* のアレルゲンとしての意義を明らかにするため、気管支喘息児を対象に *A. restrictus* の皮膚プリック試験ならびに radioallergosorbent test (RAST) を施行した。なお、比較のため *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, 室内塵についても同様の検討を行った。

Received: April 13, 1990

Accepted: July 30, 1990

Abbreviations: RAST radioallergosorbent test;
SD standard deviation; YNB yeast nitrogen
base

対象ならびに方法

1. 対象

名古屋大学医学部付属病院分院、国立療養所中部病院、名古屋掖済会病院の小児科で治療中の気管支喘息児94名を対象とした。男64名、女30名、年齢は3歳から18歳（平均年齢12.0歳）で、小児アレルギー研究班による気管支喘息の重症度分類によると重症18名、中等症57名、軽症19名であった。なお、入院患者の重症度は入院開始時のものとした。

2. 抗原の作製

(1) *Aspergillus restrictus* 抗原

A. restrictus 002（神戸市環境保健研究所保存株）の胞子を、滅菌プラスチックシャーレ（LXシャーレ；栄研）に作製した yeast nitrogen base（YNB；Difco Laboratories, Mich.）6.7g/l、蔗糖600g/l、寒天15g/lの組成をもつ YNB・蔗糖寒天培地の表面に様に塗抹接種した後、25℃、3週間培養した。得られた培地表面上の菌体および培地の表層部分を採取し、これを4℃のCoca抽出液（比率1：5 W/V）に浮遊し、Polytron homogenizer（Kinematica, Switzerland）を用いて5分間、間歇的にhomogenizeした。次に、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℃、30分）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) *Alternaria alternata* 抗原

A. alternata 001（神戸市環境保健研究所保存株）の胞子を、滅菌プラスチックシャーレに作製した Czapek Dox 寒天培地（Gibco Diagnostics, Wis.）の表面に様に塗抹接種した後、25℃、11日間培養した。試料の採取および抗原作製の方法は *A. restrictus* と同様に行った。

(3) *Aspergillus fumigatus* 抗原

A. fumigatus NUM11017（名古屋大学医学部病態制御研究施設医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⁹⁾に従った。

(4) 室内塵抗原

鳥居薬品より提供された凍乾末を用いた。

3. 皮膚ブリック試験

皮膚ブリック試験は、50%グリセリンに溶解した *A. restrictus*, *A. fumigatus*, *A. alternata*, 室内塵抗原液を用いて患者の前腕で行った。抗原濃度は真菌抗原で

は20mg/ml、室内塵抗原では10mg/mlとした。15分後に膨疹径（長径と短径の平均値）を計測し、50%グリセリンによる膨疹径より3mm以上大きい場合を陽性とした。なお、検査実施前に、DSCGを除く抗アレルギー剤（3日以上）、抗ヒスタミン剤（3日以上）、テオフィリン製剤（12時間以上）、β₂交感神経刺激剤（12時間以上）の投薬を中止した。ステロイド剤の内服を続けている患者はいなかった。

4. 特異 IgE 抗体の測定

(1) ポリ塩化ビニールマイクロプレートを用いた RAST

方法の詳細はすでに報告した⁹⁾が、今回、固相抗原の蛋白濃度を *A. restrictus* 50μg/ml, *A. fumigatus* 20μg/ml, *A. alternata* 50μg/ml, 室内塵50μg/mlとし、血清希釈は4倍とした。また、対照群として35名の非アトピー患者血清を用いた。特異 IgE 抗体価は下記に定義した standard deviation (SD) units で表し、この値が2よりも大きい場合を RAST 陽性と判定した。

$$\text{SD units} = \frac{(\text{実測値} - \text{対照群の平均値})}{\text{対照群の標準偏差値}}$$

(2) Phadebas RAST

A. fumigatus, *A. alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Candida albicans* ならびにダニの一種である *Dermatophagoides pteronyssinus* の特異 IgE 抗体価を Phadebas RAST kit（Pharmacia Diagnostics, Sweden）を用いて測定した。なお、scoreが2以上の場合を陽性と判定した。

結 果

1. 皮膚ブリック試験

皮膚ブリック試験陽性者は、気管支喘息児94名中、*A. restrictus* 8名(8.5%)、*A. fumigatus* 8名(8.5%)、*A. alternata* 15名(16.0%)、室内塵69名(73.4%)であった。50%グリセリンによる膨疹径を差し引いた *A. restrictus* 皮膚ブリック試験陽性値は平均値(標準偏差値) 4.12 (1.16) mm, 最大値6.5mm, 最小値3.0mmであり、*A. fumigatus* ではそれぞれ3.44 (0.50)mm, 4.0mm, 3.0mm, *A. alternata* は4.60 (1.45)mm, 8.0mm, 3.0mm, 室内塵は4.90 (1.71)mm, 12.0mm, 3.0mmであった。*A. restrictus* 皮膚ブリック試験陽性者は陰性者に比べ *A. fumigatus* および *A. alternata* 皮膚ブリック試験陽性率が有意に高かったが、室内塵

皮膚ブリック試験陽性率に関しては有意差を認めなかった (Table 1).

2. RAST

A. restrictus, *A. fumigatus*, *A. alternata*, 室内塵 RAST について, RAST 陽性血清を用いた血清希釈試験, および固相抗原を inhibiting antigen とする抑制試験を行った. 結果を Fig. 1, 2 に示すが, 本研究に用いた RAST はいずれも固相化した抗原と結合した IgE 抗体を特異的に検出していると考えられた.

RAST の結果は Fig. 3 のごとくであった. RAST 陽性者は, 気管支喘息児 94 名中, *A. restrictus* 27 名 (28.7%), *A. fumigatus* 22 名 (23.4%), *A. alternata* 35 名 (37.2%), 室内塵 75 名 (79.8%) であった. また,

Table 1 Prevalences of positive skin prick tests to *A. fumigatus*, *A. alternata* and house dust in patients with and without positive skin prick test to *A. restrictus*

Skin prick test	<i>A. restrictus</i>		Significance
	Positive (n=8)	Negative (n=86)	
<i>A. fumigatus</i>	75.0%	2.3%	$p < 0.01$
<i>A. alternata</i>	75.0%	10.5%	$p < 0.01$
House dust	100.0%	70.9%	n.s.

n.s.: not significant.

Significance was determined by Fisher's exact test.

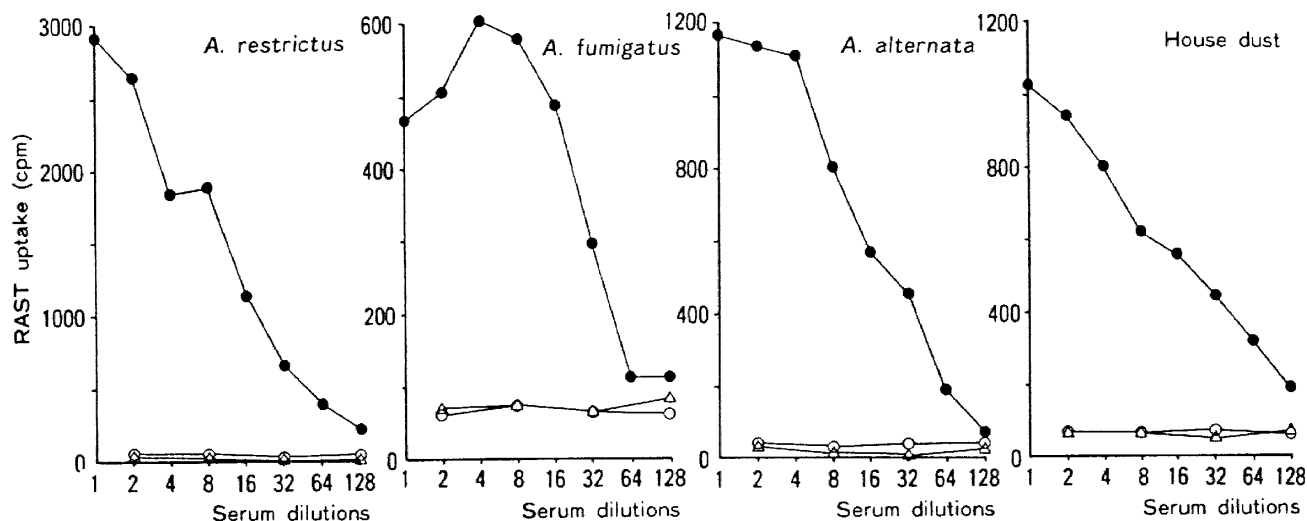


Fig. 1. Effects of serum dilution for RAST to *A. restrictus*, *A. fumigatus*, *A. alternata* and house dust using polyvinyl chloride microplate as solid-phase sorbent. Sera obtained from an asthmatic patient (●) with positive RAST to solid-phase antigen and two nonatopic patients (○, △) were serially diluted, ranging from 1:2 to 1:128.

Table 2 Correlation between skin prick test and RAST

Skin prick test		RAST		Prevalence of positive RAST	Significance
		Positive	Negative		
<i>A. restrictus</i>	Positive	7	1	87.5%	$p < 0.01$
	Negative	20	66	23.3%	
<i>A. fumigatus</i>	Positive	5	3	62.5%	$p < 0.05$
	Negative	17	69	19.8%	
<i>A. alternata</i>	Positive	14	1	93.3%	$p < 0.01$
	Negative	21	58	26.6%	
House dust	Positive	60	9	87.0%	$p < 0.01$
	Negative	15	10	60.0%	

Significance was determined by χ^2 test or Fisher's exact test.

SD units で表した *A. restrictus* RAST 陽性値の平均値 (標準偏差値) は 21.10 (54.01), 最大値 285.11, 最小値 2.22 であり, *A. fumigatus* ではそれぞれ 30.18 (73.00), 345.60, 2.21, *A. alternata* では 24.76 (39.34), 184.60, 2.70, 室内塵では 14.19 (18.52), 122.86, 2.08 であった. Phadebas RAST の *A. fumigatus*, *A. alternata*, *C. herbarum*, *P. notatum*, *C. albicans*, *D. pteronyssinus* の RAST 陽性率はそれぞれ 23.4%, 30.9%, 27.7%, 21.3%, 26.6%, 92.6% であった.

皮膚プリック試験と RAST の関係を Table 2 に示す. すなわち, *A. restrictus* 皮膚プリック試験陽性者は陰性者に比べ *A. restrictus* RAST 陽性率が有意に高かった. また, 皮膚プリック試験と RAST のこのよ

うな関係は *A. fumigatus*, *A. alternata*, 室内塵にも認められた.

3. *A. restrictus* RAST 陽性者の臨床アレルギー学的特徴 (Table 3)

A. restrictus RAST 陽性者は陰性者に比べアトピー性皮膚炎の罹患率, *A. fumigatus*, *A. alternata*, *C. herbarum*, *P. notatum*, *C. albicans* RAST の陽性率が有意に高値を示した. しかし, アレルギー性鼻炎の罹患率, 気管支喘息の重症度, 総 IgE 値, 室内塵, *D. pteronyssinus* RAST の陽性率には有意差を認めなかった.

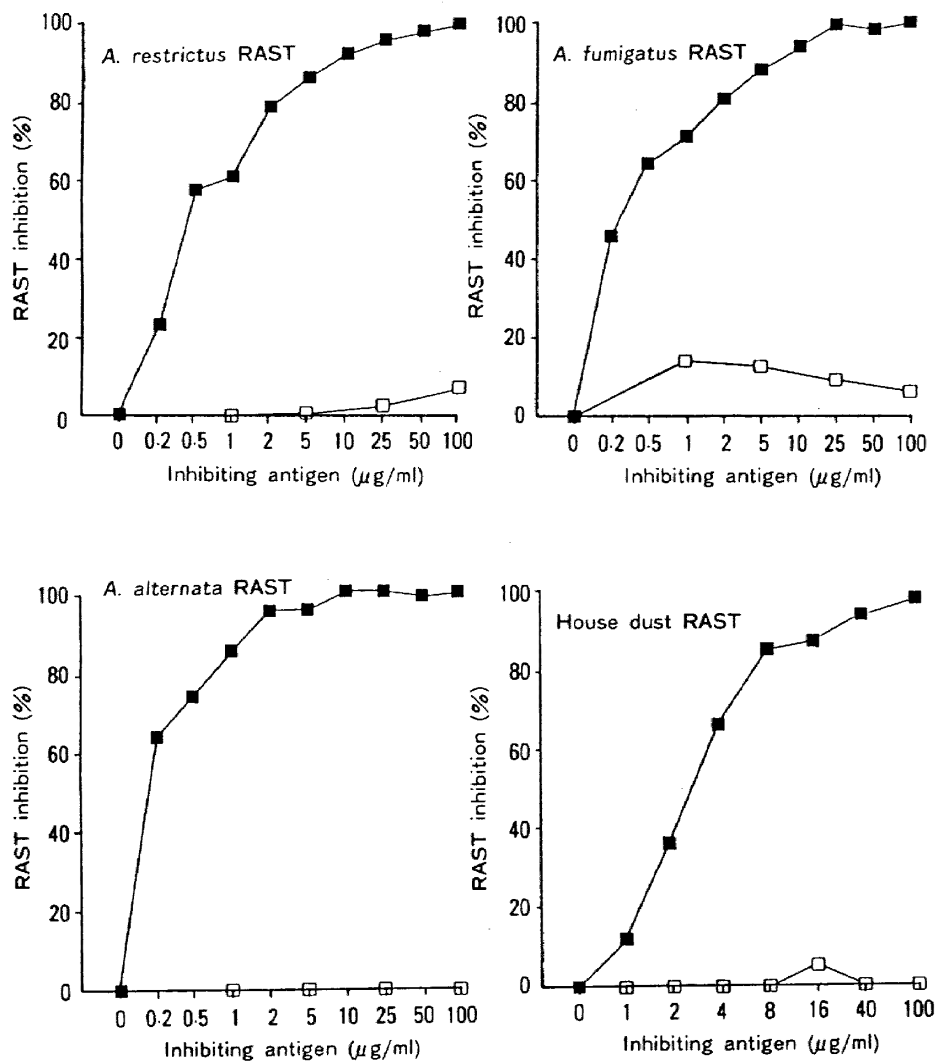


Fig. 2. Inhibitions of *A. restrictus* RAST, *A. fumigatus* RAST, *A. alternata* RAST and house dust RAST by each solid-phase antigen (■) and bovine serum albumin (□; Sigma Chemical, Mo.).

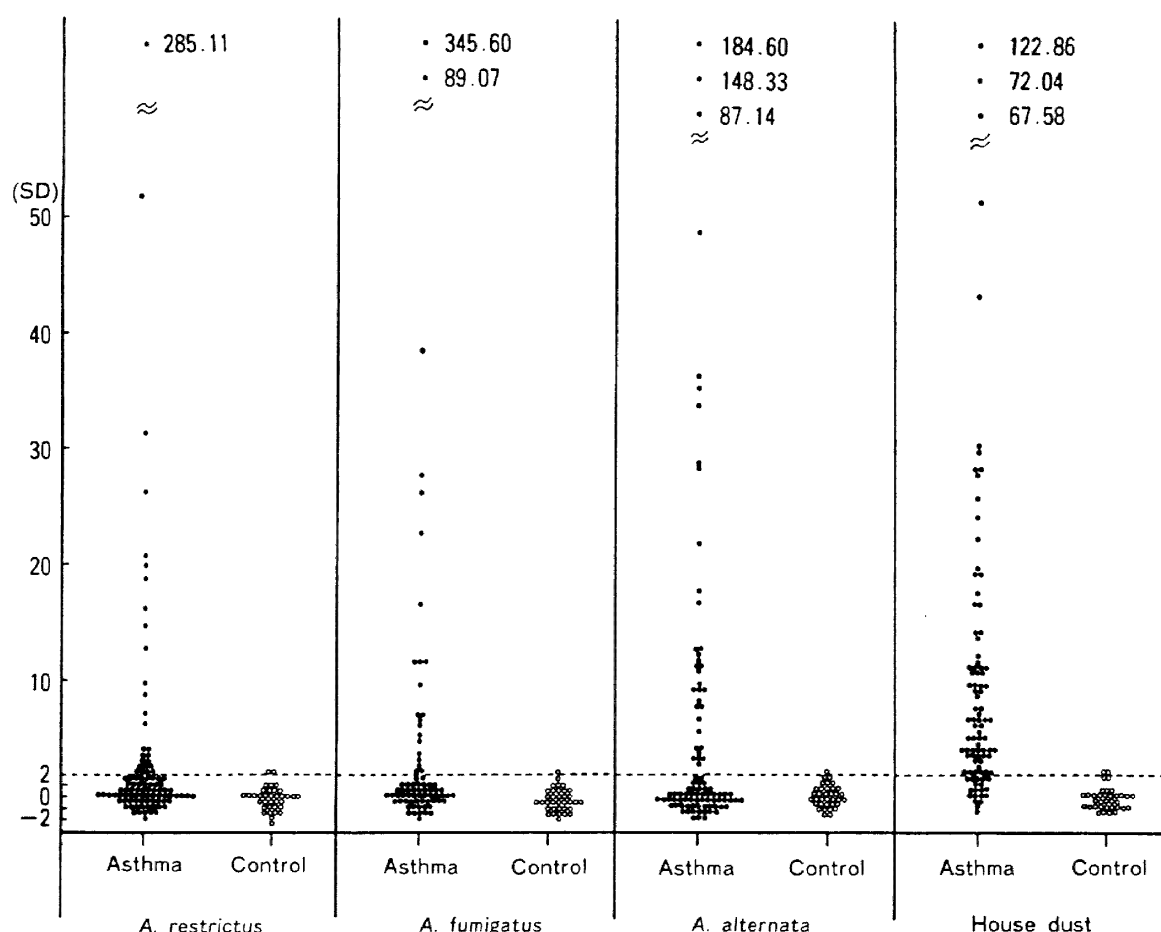


Fig. 3. Results of RAST for *A. restrictus*, *A. fumigatus*, *A. alternata* and house dust. The RAST values over 2 SD units were defined as positive. Horizontal dotted line represents the lowest positive RAST value.

考 察

Rijckaert は気管支喘息患者の一部が *A. restrictus* に対する即時型皮膚反応を示すことを報告している。しかし、著者らの知る限りでは、*A. restrictus* のアレルゲンとしての意義に関する研究はそのほかにはみられない。本研究では、94名の気管支喘息児から *A. restrictus* に対して即時型皮膚反応を示す8名の即時型過敏症患児を見い出し、この8名のうちの7名を含む27名の患者血清中に *A. restrictus* 特異 IgE 抗体を証明した。この真菌の皮膚プリック試験陽性者は陰性者に比べ *A. restrictus* RAST 陽性率が有意に高く、*A. restrictus* は IgE 抗体の関与する即時型過敏症の原因となりうると考えられた。また、*A. restrictus* の皮膚プリック試験および RAST の陽性率は、*A. alternata*、室内塵の陽性率よりも低値であるが、*A. fumigatus* の陽性率に相当する値を示した。このことから、*A. restrictus* がアレルギー疾患の原因アレルゲンとして、

室内塵や *A. alternata* には及ばないものの、*A. fumigatus* に匹敵する役割を担っている可能性が推測された。

A. restrictus が気管支でのアレルギー反応を惹起しうることを実証するためには気管支吸入誘発試験を行うことが必要であり、今回の皮膚プリック試験と RAST の結果からだけではこのことを証明できない。しかし、*A. restrictus* は長径が $4.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 、短径が $3.0 \sim 3.5 \mu\text{m}$ の楕円形の孢子¹²⁾を形成し、この大きさの粒子は細気管支まで容易に侵入することができる⁹⁾と考えられていることから気管支喘息の発症に関与している可能性が予想される。また、真菌とアトピー性皮膚炎の発症との関連性はあまり注目されていないが、本研究では、*A. restrictus* RAST 陽性者は陰性者に比べアトピー性皮膚炎の罹患率が有意に高く、*A. restrictus* がアトピー性皮膚炎の発症に関係している可能性が示唆された。今後、種々のアレルギー症状の発現や増悪に *A. restrictus* がどの程度関与している

Table 3 Clinical and laboratory data of *A. restrictus* RAST positive and negative asthmatic patients

	<i>A. restrictus</i>		Significance
	Positive (n=27)	Negative (n=67)	
Mean age(yrs.)	12.89	11.64	n.s. ³
Severity of asthma			
Mild	3	16	n.s. ¹
Moderate	19	38	
Severe	5	13	
Prevalence of allergic disease (%)			
Allergic rhinitis	51.9	64.2	n.s. ¹
Atopic dermatitis	48.1	22.4	$p < 0.05^1$
Mean serum IgE (IU/ml)	1759.5	1003.7	n.s. ³
Incidence of positive RAST (%)			
<i>A. fumigatus</i> ^a	70.4	4.5	$p < 0.01^2$
<i>A. alternata</i> ^a	85.2	17.9	$p < 0.01^2$
House dust ^a	77.8	80.6	n.s. ¹
<i>C. herbarum</i> ^b	66.7	11.9	$p < 0.01^1$
<i>A. fumigatus</i> ^b	59.3	9.0	$p < 0.01^1$
<i>A. alternata</i> ^b	66.7	16.4	$p < 0.01^1$
<i>P. notatum</i> ^b	66.7	3.0	$p < 0.01^2$
<i>C. albicans</i> ^b	66.7	10.4	$p < 0.01^1$
<i>D. pteronyssinus</i> ^b	92.6	92.5	n.s. ²

n.s.: not significant.

Significance was determined by χ^2 test (1), Fisher's exact test (2) or t-test (3).

a: RAST using polyvinyl chloride microplate as solid-phase sorbent.

b: Phadebas RAST.

と、*A. restrictus* 抗原が他の真菌抗原と共通アレルゲン性を有していることなどの諸要因が組み合わさって作り出されたものと推測される。

著者らは、*A. fumigatus*, *A. alternata* を inhibiting antigen として用いると、*A. restrictus* RAST が明らかに抑制されることを確かめた(未発表)。また、本研究では *A. restrictus* と *A. fumigatus* の RAST 陽性者が示すこれらの抗原の RAST 値の間には、有意な相関が認められ($r=0.9576$, $p<0.01$)、また、*A. restrictus* と *A. alternata* の RAST の間にも同様の関係 ($r=0.6102$, $p<0.01$)がみられた。これらのことから、*A. restrictus* は、*A. fumigatus* と *A. alternata* のいずれとも共通アレルゲン性を有するものと思われる。一般に、共通アレルゲン性は真菌間に広範に存在するが、分類学的関係とは必ずしも一致しないようである¹³⁾⁻¹⁷⁾。したがって、ある真菌をアレルギー疾患の原因アレルゲンと決定するためには、その真菌が真菌アレルギー患者の生活環境中に多数存在することが、必須の条件となると考えられる。その意味で、*A. restrictus* が優勢室内真菌であるという事実は、この真菌がアレルギー疾患の重要な原因のひとつである可能性を支持するものである。そして、現代人が1日の生活時間の多くを室内で過ごすことを考え合わせると、そのアレルゲンとしての意義はいっそう重要性を増すものと思われる。

のかについて解明していく予定である。

A. restrictus は優勢室内塵真菌であると考えられており、そのアレルゲン成分は室内塵アレルゲンの構成要素となっているものと思われる。しかし、本研究では *A. restrictus* RAST 陽性者と陰性者の室内塵 RAST 陽性率には有意な差がみられず、また、*A. restrictus* と室内塵の RAST 陽性者が示すこれらの抗原の RAST 値の間には有意な相関がみられなかった($r=-0.0269$, $p>0.05$)。したがって、*A. restrictus* は室内塵の主要アレルゲンにはなっていないと考えられた。

A. restrictus RAST 陽性者の多くは他種の真菌にも同時に感作されていることが明らかとなった。こうした臨床アレルギー学的特徴は、*A. restrictus* RAST 陽性者が他の真菌に対して高い IgE 抗体産生の免疫応答性を有していること、*A. restrictus* だけでなく他の真菌にも多く暴露されやすい環境で生活してきたこ

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) 鳥居新平：室内環境真菌とのかかわりあい。“喘息はなぜ増えているのか”(寺道由晃, 古庄巻史 編), 国際医学出版, 東京, pp.69-80, 1987.
- 2) 井上真由美：建物のカビその発生と処理方法。日本建築士会連合会, 東京, pp.18-62, 1979.
- 3) 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.
- 4) 松田良夫：真菌と室内汚染。Curr. Concepts Infect. Dis. 16, 18-23, 1987.
- 5) Lustgraaf, B.v.d. and Bronswijk, J.e.M.H.v.:

- Fungi living in house dust. *Ann. Allergy* 39, 152, 1977.
- 6) Rijckaert, G.: Exposure to fungi in modern homes. *Allergy* 36, 277-278, 1981.
 - 7) Cole, G.T. and Samson, R.A.: The conidia. In "Mould Allergy" (ed. by Y. Al-Doory, J.F. Domson), Lea & Febiger, Philadelphia, pp.66-103, 1984.
 - 8) 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.
 - 9) Mencl, K., Otčenášek, M., Špaaček, J. and Řehulová, E.: *Aspergillus restrictus* and *Candida parapsilosis*—Agents of endocarditis after heart valve replacements. *Mykosen* 28, 127-133, 1984.
 - 10) 沢崎博次：肺アスペルギルス症の外科的治療。真菌と真菌症 5, 45-56, 1964.
 - 11) 玉城 繁, 檀原 高, 名取 博, 吉良枝郎, 金森弘明, 他：A. *restrictus* による気管支内 Aspergilloma の一手術例。日胸疾会誌 18, 464-469, 1980.
 - 12) Raper, K.B. and Fennel, D.I.: *Aspergillus restrictus* group. In "The genus *Aspergillus*" Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 222-237, 1965.
 - 13) Salvaggio, J. and Aukrust, L.: Mold-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68, 327-346, 1981.
 - 14) Hoffman, D.R. and Kozak, P.P.: Shared and specific allergens in mold extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 213, 1979.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.

ALLERGENICITY OF THE OSMOPHILIC FUNGUS *ASPERGILLUS RESTRICTUS* EVALUATED BY SKIN PRICK TEST AND RADIOALLERGOSORBENT TEST

Tatsuo Sakamoto¹⁾, Komei Ito¹⁾, Masanori Yamada¹⁾, Hideko Iguchi²⁾, Masano Ueda²⁾, Yoshio Matsuda³⁾ and Shimpei Torii¹⁾

1) Department of Pediatrics, Nagoya University School of Medicine

2) Department of Pediatrics, National Chubu Hospital

3) Public Health Research Institute of Kobe City

Recently large amounts of *Aspergillus restrictus*, a species of osmophilic fungi, have been detected in house dust using culture media with low water activity. But little attention has been paid to this fungus as an allergen. In the present study, the authors examined the allergenic activity of *A. restrictus* by skin prick tests and radioallergosorbent tests (RAST) on 94 asthmatic patients (mean age 12.0, range 3-18). *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* and house dust were used for comparison. In the skin prick tests, *A. restrictus*, *A. fumigatus*, *A. alternata* and house dust elicited positive reactions in 8 (8.5%), 8 (8.5%), 15 (16.0%) and 69 (73.4%) patients, respectively. RAST showed positive reactions in 27 (28.7%) subjects for *A. restrictus*, 22 (23.4%) for *A. fumigatus*, 35 (37.2%) for *A. alternata*, and 75 (79.8%) for house dust. These results indicated that some asthmatic individuals showed immediate-type hypersensitivity to *A. restrictus*, and the prevalence of hypersensitivity of *A. restrictus* determined by skin prick tests and RAST was comparable with that of *A. fumigatus* but lower than that of *A. alternata* or house dust. This indicates that this fungal species may be of importance as a causative agent in atopic diseases.