原 著

肺アスペルギロームの患者血清における *Aspergillus fumigatus* 抗原に対する沈降素の研究： 抗原の種類、ならびに agar gel double diffusion と counterimmunoelectrophoresis の比較

池 本 秀 雄 森 健

順天堂大学医学部内科

山 崎 み ど り

順天堂大学医学部共同細菌

Aspergillus 属、特に *A. fumigatus* に対する血清中沈降素の証明は肺アスペルギルス症、殊に肺アスペルギロームの補助診断に欠かせられないものとなつている。今回は確実に診断された *A. fumigatus* による肺アスペルギロームの患者血清を主対象として、*A. fumigatus* の3粗抗原、即ち培養濾液抽出物、分生子の“cell-sap”ならびに菌糸の“cell-sap”を使用して、agar gel double diffusion (DD) および counterimmunoelectrophoresis (CIE) を行い、*A. fumigatus* 沈降素検出の精度、感度等を比較検討した。これまではかかる研究の報告には接しないと思われるので、これらの成績を報告する。

研究材料ならびに方法

抗原

A. fumigatus (ATCC 26430) を使用して次の如く3種の抗原を作製した。

(1) 培養濾液抽出抗原

Longbottom ら¹⁾の方法に則つた。既報²⁾のごとく、*A. fumigatus*を Sabouraud's broth に植え、37°C、3週間

振盪培養 (200ml 培地を有する容量500ml の後述の如き振盪フラスコを1分間、110ストロークの速度で水平方向に振盪) を行つた後、培養液を Seitz 濾過器で濾過し、その濾液をセルロース・チューブに入れ、一昼夜、流水にて透析し、凍結乾燥し、粉末を得た。

(2) 分生子抗原

A. fumigatus を Sabouraud's agar で37°C、約1週間培養し、分生子をかき集め、蒸留水に浮遊ないし懸濁し、これを凍結 (-25°C)、X-press 細胞破碎機 (Biotec社, Sweden, U.S.A., U.K.)により加圧 (2,000kg/cm²)、破碎し、遠沈後上清の凍結乾燥によつて粉末を得た。分生子の1種の“cell-sap”である。

(3) 菌糸抗原

A. fumigatus の菌糸要素のみを取り出す方法は既報の如く、久内³⁾の方法を応用した。即ち *A. fumigatus* を Sabouraud's agar で27°C、約5日間培養後、ごく微量の分生子を、200ml Erlenmeyer フラスコ内の Sabouraud's broth (約50ml) に植え、27°C、1~2日間培養した。次いでこの液状培地の水面近く、または深部に浮遊する綿状の若い小集落1個を駒込ピペットで吸い上げ、これを胴体がビール樽状で、つまり肩部がほぼ平坦で、首の細長い振盪フラスコ (容量500ml) (培養濾液抽出抗原の作製に使用したものと同じ) 内の Sabouraud's broth (約200ml) に投じ、直ちに37°Cの孵卵器内に設置した振盪機に載せ、1分間110ストロークの率で水平方向に振盪培養を行つた (培養濾液抽出抗原の作製の場合と

Hideo IKEMOTO, Takeshi MORI* and Midori YAMAZAKI**: Detection of *Aspergillus fumigatus* precipitins in pulmonary aspergilloma: A comparison of 3 kinds of *Aspergillus fumigatus* antigens by both agar gel double diffusion and counterimmunoelectrophoresis, from the Internal Medicine* and the Central Laboratory of Bacteriology**, Juntendo University School of Medicine, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

同じ)。なお振盪の際、液状培地が付着するのを防止するため綿栓の周囲を硫酸紙で包んだ。数日間振盪後、培地内に浮遊する、ほぼ同心性の中空部を有する直径10mm内外の球型ないし球卵型の *Aspergillus* 菌球は分生子柄、分生子の真菌要素を欠き、菌糸のみの集塊であり、菌糸の配列は zonation を示した。このいわば人工的 *Aspergillus* 菌球を、分生子抗原作製の場合と同様に、凍結後に X-press 細胞破碎機によつて加圧、破碎した。遠沈後上清をセルロース・チューブに入れ1昼夜、流水にて透析し、その後凍結乾燥して粉末を得た。菌糸の1種の“cell-sap”である。

以上の3抗原は、原則として使用時に蒸留水で30mcg/mlの濃度に等しく溶解した。

血清

(1) 臨床的、X線学的、菌学的(喀痰等より *A. fumigatus* を分離)に、または剖検により確実に診断された肺アスペルギローム10例の血清を研究の主対象とした。

(2) 対照としては、細菌感染症等の患者36例ならびに25歳以下の健康男子100例の各血清を用いた。

(3) 以上のほか、*A. fumigatus* で免疫したウサギ血清をも実験に供した。生理的食塩水に約3%の濃度に溶解した培養濾液抽出抗原液5mlと Freund's complete adjuvant 5mlの混合液を homogenizer (Virtis 社) で約30分間ホモジナイズしたものを、ウサギの耳静脈に1回0.2mlを5日間隔で注射し、凝集反応または沈降反応により血清中の抗体の上昇を確認した上で、最終注射後10日目に全採血を行つた。

方法

DD は既報¹⁾の如く Ouchterlony 法²⁾によつた。

CIE は Howe らの方法を応用した Gocke, Howe法³⁾に準じて行つた。1.2%の agar-agarose (1対1の比に pH 8.6 veronal buffer に溶解)の7mlを8.5×6.5cmのガラス板に広げた(厚さ約1.3mm)。次に抗原、血清を入れる穴(いずれも直径2mm, 間隔2mm)の2対の列を作つた。陰極に近い方の穴に抗原、陽極に近い穴に血清をキャピラリーで各々約4μl 入れ、2~3mA/cmの電流を流し(電圧約80mV)、約30分間泳動ないし通電した後、沈降線の有無、数、形等を観察した。原則的には、抗原濃度は30mg/ml、血清は原液としたが、このほか抗原希釈、血清希釈による沈降素の半定量をも行つた。

以上の如く、3種の抗原の診断上の特異性、有用性、それに DD と CIE の精度、感度等を検討したが、同時

に特に DD を駆使して、lot 別の培養濾液抽出抗原の比較、つまり抗原の standardization、3種抗原間の共通性等についても、一部の血清を使用して検討した。

なお被検血清は、採血時期はまちまちで、一部は数年前に遡るものもあったが、何れも-20℃に保存したものである。原則として同一血清についての DD、CIE の検査は同時に施行したが、貯蔵血清がごく微量になつたものでは、DD の沈降線の数には以前の成績を参照した。

成績

1. 3種抗原の精度、感度ならびに培養濾液抽出抗原の lot 差 (DD による)

まず典型的な肺アスペルギロームの1患者血清を使用し、前記の3種抗原の特異性、共通性、培養濾液抽出抗原の lot (昭和50年、51年度に各々作製したもの)による差異を DD によつて検討した。その成績は写真1、図1に示した如くである。培養濾液抽出抗原の2つの lot には僅かな差異がみられたのにすぎず、一方分生子抗原には特異の沈降線が少なくとも1本あつたが、培養濾液抽出抗原と共通のものは認め難かつた。これに反し、菌糸抗原では少なくとも明瞭な沈降線はみられなかつた。なお各抗原の濃度は何れも30mg/ml で、血清は非希釈のものである。

次に *A. fumigatus* 免疫ウサギの血清を使用して、培養濾液抽出抗原 (30mg/ml)、分生子抗原 (15mg/ml および60mg/ml) ならびに菌糸抗原 (15mg/ml および60mg/ml) との間の沈降線の有無、共通性等を検査した。その結果は写真2、3、図2に示した如くである。培養濾液抽出抗原には明瞭な沈降線がみられ、分生子抗原にも同様にみられ、両者間には一部共通性があることが推定された。これに反し、菌糸抗原では2濃度共に沈降線は認められなかつた。

2. 3種抗原の CIE、DD における比較

肺アスペルギロームの典型例の4例の血清を使用して、CIE、DD における3種抗原の精度ならびに感度を比較検討した。その結果は表1に示した如くである。

即ち CIE における沈降線は、培養濾液抽出抗原では3~8本(平均4.5本)、分生子抗原では1~3本(平均2本)、菌糸抗原では1(淡い帯状)~2本(平均1本)であつた。次に DD における沈降線は、培養濾液抽出抗原では1~4本(平均2本)、分生子抗原では3例が0、1例が2本、菌糸抗原では3例が0、1例が2本(淡い帯状)であつた。

一方、健康者を含む対照群136例の血清では何れの抗

写真1 肺アスペルギロームの患者血清と各種抗原との間の寒天ゲル内沈降反応

図1 写真1の説明図

写真2 *A. fumigatus* 免疫ウサギ血清と各種抗原との間の寒天ゲル内沈降反応

写真3 同上 (ただし抗原濃度が異なる)

図2 写真2, 3の説明図

原, 方法でも沈降線は認められなかつた. なお各抗原の濃度は何れも30mg/mlで, 血清は非希釈のものである.

3. 培養濾液抽出抗原を使用しての CIE による血清中沈降素の半定量

これまでの成績から培養濾液抽出抗原を使用する CIE が, 肺アスペルギロームの患者血清の *A. fumigatus* 沈降素を検出する上で感度が最も高いことが分つた. そこで患者血清の数をさらに増し, 10例について同様の検査を行うとともに, 血清希釈, 抗原希釈により沈降素検出が可能な最低濃度の測定, つまり沈降素の半定量を試みた. 一方, 同一抗原を使用しての DD における沈降線

写真4 桑〇七〇

写真5 飯〇清〇

写真6 石〇は〇

写真7 金〇幸〇

写真8 金〇ふ〇

写真9 白〇芳〇

写真10 山〇や〇

写真11 伊〇と〇じ

図3 CIE にみられる lines のタイプ (Mackenzie ら, 1975) : 説明は本文

表1 肺アスペルギローム患者血清と3種抗原との間の沈降反応—CIE と DD の比較

方 法		CIE			DD		
抗 原		培 濾	分 生 子	菌 糸	培 濾	分 生 子	菌 糸
肺アスペル ギローム	石 ○ は ○	4~ 8	3	2(1)	2~ 4	2	(2)
	飯 ○ 清 ○	5	2	2	1	0	0
	桑 ○ 七 ○	4	1(1)	(1)	1	0	0
	金 ○ 幸 ○	3	3	(1)	2	0	0

数字は沈降線の数 () は薄い沈降線 抗原濃度は全て30mcg/ml

表2 肺アスペルギローム患者血清と培養濾液抽出抗原との間の沈降反応—CIE における沈降線ならびに血清希釈, 抗原希釈による半定量

		CIE			DD
		沈降線	血清希釈	抗原希釈	(沈降線)
肺アスペル ギローム	桑○ 七○	(本) 4	(倍) 2	(mg/ml) 0.92	(本) 1
	飯○ 清○	5	2	1.88	1
	金○ ふ○	2	2	0.23	0~ 1
	天○ 義○	7	2	0.92	1
	石○ は○	4~ 8	64	0.23	2~ 4
	金○ 幸○	3	8	0.46	2
	谷 ○ 成	4	1	30	0~ 1
	白○ 芳○	7	8	0.23	3
	山○ や○	5~ 6			[7]
対 照	伊○と○じ	3~ 5			[5~ 6]
	他の疾患 36人	0			0
	健康者 100人	0			0

[] 内数字は以前に行つた DD の沈降線の数

の数とも比較した。この際、貯蔵血清が微量のものについては、2, 3年前施行した DD における沈降線と比較せざるをえなかつた。表2のなかで示した[]内数字がそれである。

成績は表2に掲げた如くである。即ち CIE (抗原濃度30mg/ml) によると、肺アスペルギローム10例の血清では2~ 8本 (平均4.5本) (DD では同時に施行した8例では平均1.5本で、以前に施行した2例を加えると平均2.5本) の沈降線が検出された。次に血清中沈降素半定量 (CIE により8例に施行) では、血清希釈 64倍まで陽性が1例、8倍まで陽性が2例、2倍まで陽性が4例で、一方抗原希釈では0.23~1.88mg/ml まで陽

性のものが殆どを占めた。しかし沈降線の数とこれらの半定量の成績とはは相関々係はみられていない。

4. CIE における沈降線の解釈 (読み方)

Mackenzie ら⁷⁾の報告 (図3) にもあるように、抗原と血清の各穴の間にみられる線の解釈 (読み方) には注意する必要がある。2本以上の線 (A) がみられるときは沈降線と判定し易い。しかし1本のときも直線 (B) であるか、もしくは血清と反対側にカーブ (C) しているときは判読は困難ではない。もし抗原抗体反応が血清の穴のなかで一部行われると、その穴から沈降線の一部が陰極に向つて2本 (D) 現われることがあるというが、私共の今回の実験ではみられていない。ただ血清の穴に接近して (1mm 内外)、しかもその穴に沿つたカーブ (F, G) は健康人血清でも少なからずみられたが、このような線は真の沈降線ではないと判定した。なおEのような線は多分特異的なものと思われる⁷⁾。

今回、肺アスペルギロームの患者の血清にみられた沈降線のうち、8例を選んでその写真を呈示する (写真4—11)

考 察

Aspergillus, 特に *A. fumigatus* による、またはこれが関与する肺アスペルギローム、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、アレルギー性胞隔炎ないし肺臓炎、気管支喘息等の患者血清中の *Aspergillus* に対する沈降素の検出に CIE が駆使されており⁶⁻¹¹⁾、その殆んどは CIE が従来の DD に比して感度が勝ることを報じている。Philpot ら⁸⁾はロンドンの Bencard, パリーの Pasteur 研究所の商品化された抗原、それに Mycological Reference Laboratory の種々の自家製抗原について精度を比較検討はしているが、今回の著者らのような培養濾液抽出物、菌糸のみの “cell-sap” 抗原、分生子のみの “cell-sap” 抗原の3者を同時に比較した研究報告に

はこれまで接しないように思われる。

今回の研究では、3種の抗原の中では培養濾液抽出物が最も優れ、CIEはDDに勝ることが明瞭に示された。CIEはこのほか、約30分の短時間で判定が可能であり、しかも1回に使用する血清は約4 μ lの微量で足りることもDDに比べて優れた利点であつた。ただCIEも感度の点からみると、著者ら¹²⁾が以前に報告した培養濾液抽出物で感作した間接赤血球凝集反応には劣るように思われる。

今回は確実に診断された肺アスペルギローム10例の患者血清を中心に検討したが、菌糸や分生子の“cell-sap”抗原に対する沈降素が検出されないものが少なくなく、DDにおいては特にそうであつたのに反し、培養濾液抽出抗原では、少なくともCIEでは全例に複数の沈降線が観察されている。このような成績からすれば肺アスペルギロームの血清学的診断に資せられる血清中の沈降素ないし沈降抗体は、*A. fumigatus*の菌体成分に対する抗体というよりは、むしろ本菌の代謝産物に対する抗体ではないかと考えられる。事実、Van Kyら¹³⁾は免疫ウサギの血清の免疫電気泳動法により、*A. fumigatus*の産生する酵素が18~19種あることを確かめており、肺アスペルギルス症の患者血清と共通する沈降素はchymotrypsin I, II, catalase, glucuronidase I, IIなどの酵素性抗原に対するものであると報告している。

結 論

確実に診断された*Aspergillus fumigatus*による肺アスペルギローム10例の血清を主対象とし、血清中の*A. fumigatus*抗原に対する沈降素を検出するに当つて、培養濾液抽出物、分生子および菌糸のX-press細胞破碎機による各“cell-sap”の3種の粗抗原を使用し、counterimmunoelectrophoresisと従来のagar gel double diffusionを行い、血清学的診断の精度、感度などを比較検討した。

その結果、3種の抗原のなかでは培養濾液抽出抗原が最も優れた。本抗原を使用し血清中の沈降素を検出する際、counterimmunoelectrophoresisはagar gel double diffusionに比して次の如き利点があつた。(1)精度と感度が勝つた。(2)速かに沈降素が検出できた(約30分)。(3)1回に使用する血清は約4 μ lの微量で足りた。

以上の成績から、*A. fumigatus*の培養濾液抽出物を抗原とするcounterimmunoelectrophoresisは肺アスペルギロームの血清学的診断上きわめて有用と考えられる。

文 献

- 1) Longbottom, J. & Pepys, J.: Pulmonary aspergillosis: diagnostic and immunological significance of antigens and C-substance in *Aspergillus fumigatus*. J. Path. Bact., **88**: 141—151, 1964.
- 2) 池本秀雄, 柴田貞子: 肺アスペルギロームの診断に用いる沈降反応用抗原(培養濾液抽出物)の作製法とその評価. 真菌誌, **13**: 44—46, 1972.
- 3) 久内 治: *Aspergillus* 菌球の試験管内作製実験, とくに人肺の*Aspergillus* 菌球との比較と発生機転の考察. 真菌誌, **12**: 112—121, 1971.
- 4) Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels. Acta Path. Microbiol. Scand., **26**: 507—515, 1949.
- 5) Gocke, D.J. & Howe, C.: Rapid detection of Australian antigen by counterimmunoelectrophoresis. J. Immunol., **104**: 1031—1032, 1970.
- 6) Galusso, J.C., Fridman, J.L. & Negroni, R.: Rapid diagnosis of pulmonary mycosis by counterimmunoelectrophoresis. Mycopathologia mycol. appl., **51**: 143—146, 1973.
- 7) Mackenzie, D.W.R. & Philpot, C.M.: Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycological procedure. Mycopathologia, **57**: 1—7, 1975.
- 8) Philpot, C.M. & Mackenzie, D.W.R.: A comparison of *Aspergillus fumigatus* antigens by counterimmunoelectrophoresis. Mycopathologia, **58**: 19—20, 1976.
- 9) Flaherty, D.K., Barboriak, J., Emanuel, D., Fink, J., Marx, J., Moore, V., Reed, C.E. & Roberts, R.: Multilaboratory comparison of three immunodiffusion methods used for the detection of precipitating antibodies in hypersensitivity pneumonitis. J. Lab. Clin. Med., **84**: 298—306, 1974.
- 10) Ward, G.W. & Kohler, P.F.: Counterimmunoelectrophoresis as a rapid method for detection of *Aspergillus* precipitins in pulmonary disease. Chest, **63**: 495—515, 1973.
- 11) Phanuphak, P., Salvaggio, J., Fink, J. & Kohler, P.: Incidence of serum precipitins against organic-dust antigens in different populations by counterimmunoelectrophoresis. Chest, **68**: 753—758, 1975.
- 12) Ikemoto, H. & Shibata, S.: Indirect haemagglutination in pulmonary aspergilloma diagnosis. Sabouraudia, **11**: 167—170, 1973.
- 13) Van Ky, P.T., Torck, C., Vauccelle, T. & Floc'h, F.: Etude comparee sur immunoelectrophoregramme des enzymes de l'extrait antigenique d'*Aspergillus fumigatus*, reveles par des serums experimentaux et des serums de malades d'aspergillose. Sabouraudia, **7**: 73—84, 1969.

(昭和52年1月24日受付)