

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-500620

(P2009-500620A)

(43) 公表日 平成21年1月8日(2009.1.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 N	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2008-520024 (P2008-520024)	(71) 出願人	501173391 アンステイテュ・パストゥール INSTITUT PASTEUR フランス国パリ、リュ、デュ、ドクトール 、ルー、25-28
(86) (22) 出願日	平成18年6月30日 (2006.6.30)	(71) 出願人	500025477 アンステイテュ、ナショナル、ド、ラ、サ ント、エ、ド、ラ、ルシエルシュ、メディ カル (アンセルム) INSTITUT NATIONAL D E LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDIC AL (INSERM) フランス国パリ、リュ ド トルビアク、 101
(85) 翻訳文提出日	平成20年3月4日 (2008.3.4)		
(86) 国際出願番号	PCT/IB2006/003039		
(87) 国際公開番号	W02007/015177		
(87) 国際公開日	平成19年2月8日 (2007.2.8)		
(31) 優先権主張番号	05291428.0		
(32) 優先日	平成17年7月1日 (2005.7.1)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アスペルギルス感染のための *in vitro* 診断法およびキット

(57) 【要約】

本発明は、被験体の血清または血漿サンプルにおいてリボヌクレアーゼ (RNU)、カタラーゼ (CA) およびジペプチジルペプチダーゼ V (DPPV) アスペルギルス抗原のうち少なくとも2つの組み合わせに対する抗体の量を決定することによる、アスペルギルス感染の *in vitro* 診断法に関する。本発明はまた、前記組み合わせを含んでなる診断キットに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体の血清または血漿サンプルにおいてアスペルギルス抗原に対する抗体の量を決定することによる、アスペルギルス感染の *in vitro* 診断法であって、

a) 前記抗体および前記抗原との間で得ることができる免疫複合体の形成のために、前記血清または血漿サンプルを、アスペルギルス抗原と共にインキュベートすること、および、

b) 該アスペルギルス抗原に対する抗体の量を決定すること、
を含んでなり、該アスペルギルス抗原が、下記抗原：

リボヌクレアーゼ (RNU) 抗原、

カタラーゼ (CA) 抗原、および

ジベプチジルペプチダーゼ V (DPPV) 抗原、

の少なくとも 2 つの組み合わせからなる群から選択される、診断法。

【請求項 2】

工程 (b) において、陰性参照の血清または血漿サンプルで得られた量と比較して、前記 2 つの抗原の少なくとも 1 つの抗原に対する抗体の有意に上回る量が決定されることが、アスペルギルス感染の指標となる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

アスペルギルス抗原が固相支持体上にコーティングされている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗原のそれぞれが、固相支持体上の異なる位置にコーティングされている、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

固相支持体が酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) プレートであり、該方法が、

a) 前記血清または血漿サンプルを、該 ELISA プレート上にコーティングされたアスペルギルス抗原と共にインキュベートすること、

b) ELISA プレートから、アスペルギルス抗原と結合していない前記血清または血漿サンプルの抗体を除去すること、

c) 酵素をコンジュゲートさせた抗免疫グロブリン (抗 Ig) 抗体を接触させること (ここで、抗 Ig 抗体は、前記血清または血漿サンプルの抗体と結合できる、

d) ELISA プレートから、前記血清または血漿サンプルの抗体と結合していない抗 Ig 抗体を除去すること、

e) 酵素に対応する可溶性基質を加えること、および

f) ELISA プレートのウェルの吸光度の値を ELISA リーダーにて適切な波長で読み取ること、

を含んでなり、

前記抗体の量が、得られた吸光度の値により決定される、

請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

アスペルギルス抗原が、RNU および CA 抗原の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

アスペルギルス抗原が、RNU および DPPV 抗原の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

アスペルギルス抗原が、CA および DPPV 抗原の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

アスペルギルス抗原が、RNU、CA および DPPV 抗原の組み合わせを含む、請求項

10

20

30

40

50

1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

RNU、CA および DPPV アスペルギルス抗原の少なくとも 1 つが、組換え抗原である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも 1 つの組換えアスペルギルス抗原が、発現ベクター中の対応する cDNA の増幅産物のクローニングにより得られる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

対応する cDNA の増幅産物が、前記少なくとも 1 つのアスペルギルス抗原に特異的なプライマー対を用いて、アスペルギルス・フミガーツスの cDNA ライブラリーから得られる、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 13】

RNU 抗原に特異的なプライマー対が、配列番号 1 および配列番号 2 である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

CA 抗原に特異的なプライマー対が、配列番号 3 および配列番号 4 である、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

DPPV 抗原に特異的なプライマー対が、配列番号 5 および配列番号 6 である、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 16】

アスペルギルス抗原が、さらにガラクトマンナン (GM) 抗原を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

GM 抗原が、アスペルギルス培養物から精製により得られる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

特定のアスペルギルス菌株に対する検出シグナルの固有のプロフィールが決定される、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

それぞれのアスペルギルス菌株に関して検出シグナルプロフィールと標準プロフィールを比較し、被験体が感染している菌株の同定を可能にすることをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

30

【請求項 20】

アスペルギルス感染がアスペルギルス腫および / またはアレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) を引き起こす、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

ABPA を引き起こすアスペルギルス感染が、嚢胞性繊維症に罹患している被験体ならばに嚢胞性繊維症に罹患していない被験体において診断される、請求項 20 に記載の方法。

40

【請求項 22】

アスペルギルス感染が侵襲性アスペルギルス症であり、これが移植を受ける被験体において免疫抑制の前に診断可能である、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

免疫不全のヒトにおけるアスペルギルス感染の診断が可能である、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

血清または血漿サンプルにおいてアスペルギルス抗原に対する抗体の量を決定するための診断キットであって、

(a) 下記アスペルギルス抗原の少なくとも 2 つの組み合わせ：

50

R N U 抗原、
C A 抗原、および
D P P V 抗原

を含んでなる、キット。

【請求項 25】

前記アスペルギルス抗原がコーティングされている固相支持体をさらに含む、請求項 24 に記載の診断キット。

【請求項 26】

(b) マーカーをコンジュゲートさせた抗 I g 抗体を含有する溶液をさらに含んでなる、請求項 24 または 25 に記載の診断キット。

10

【請求項 27】

(c) 洗浄バッファをさらに含む、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項 28】

アスペルギルス抗原が、R N U、C A および D P P V 抗原の組み合わせを含んでなる、請求項 24 ~ 27 のいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項 29】

アスペルギルス抗原が、G M 抗原をさらに含んでなる、請求項 24 ~ 28 のいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項 30】

固相支持体が E L I S A プレートであり、マーカーが酵素である、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の診断キット。

20

【請求項 31】

(d) 酵素に対応する可溶性基質を含有する溶液をさらに含んでなる、請求項 30 に記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、被験体の血清または血漿サンプルにおいて、リボヌクレアーゼ (R N U)、カタラーゼ (C A) およびジペプチジルペプチダーゼ V (D P P V) アスペルギルス抗原の少なくとも 2 つの組合せに対して向けられた抗体の量を決定することによる、アスペルギルス感染の *in vitro* 診断のための方法に関する。本発明はまた、前記組合せを含む診断キットにも関する。

30

【0002】

アスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*) は、免疫適格者ならびに免疫不全宿主において様々な感染症の原因となる日和見病原体である。異なるタイプのアスペルギルス症の管理は、両タイプの患者における診断の確立が困難であることにより上手くいかないことが多い。診断策は、患者の免疫学的状態に合わせてなされる (Latge J., *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.)。免疫不全宿主および侵襲性アスペルギルス症患者において、検査室診断のための「ゴールド・スタンダード」は、循環抗原を見つけ出すことである。免疫適格宿主のアスペルギルス症では、特異的抗アスペルギルス抗体の存在に基づいて診断する。

40

【0003】

抗アスペルギルス抗体量の測定のための新規の定量的および再現性のあるアッセイの開発は、多くの理由から、近年新たな関心を集めている：(i) 結核、肺癌、気腫および慢性閉塞性気管支肺疾患の再発により、すでに空洞を有する患者の数が増加している；これらの患者はアスペルギルス腫を引き起こす危険性があり、血清学的調査は、臨床学的には無症状の重篤なアスペルギルス腫に罹患する可能性のあるこれらの患者に対して、臨床学的関連性があるとしている (Chu et al. 2004 *J. Clin. Microbiol.* 42:665-669; Denning, D. W. 1998. *Clin. Infect. Dis.* 26:781-803; Meersseman et al. 2004, *Am. J. Resp*

50

ir. Crit. Care Med. 170:621-625); (i i) カビアレルゲンに対するアトピーは喘息の重篤度を悪化させる; 英国での最近の研究では、カビ感作は重篤な喘息発作と関連があり、入院を要することが示されている(Nelson et al., 1999, J. Allergy Clin. Immunol. 104:775-785; O'Driscoll et al., 1998, American Rev. Respir. Dis. 157:A623; Zureik et al., 2002, Bmj 325:411-414)。皮膚プリックテストの定量化またはこれらのテストで用いられる粗真菌抽出物中のいくつかの真菌に共通の I g E 結合アレルゲンの存在については、常に議論されてきたため、現在はアスペルギルスアレルゲンに対する喘息患者の感作を定量化するためには、抗アスペルギルス抗体力価の測定が適切であるとされている; (i i i) A B P A は、高齢の嚢胞性繊維症患者集団で最もよく起こる、カビアレルギーの極端な徴候である; このリスク集団の年齢は引き続き増加し、A B P A は診断が難しい合併症を残すため、この病態に関しては正確な血清学的診断が最も役立つであろう(Stevens et al., 2003, Clin. Infect. Dis. 3:S225-S264); (i v) 最後に、最近のデータから、抗体の定量化はまた、I A にかかるリスクがある患者集団においても有用であることが示されている。

免疫不全の集団における侵襲性アスペルギルス症発生のピークは、現在では、免疫系が再初期化される時期である移植 6 ヶ月後にその発現時期が変わってきている(Morgan et al., 2004, Med. Mycol. 00:1-10)。さらに、最近の臨床学的調査では、集中治療室において血液学的な悪性腫瘍のない患者における I A の罹患率の増加が示された(Meersseman et al., 2004, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 170:621-625)。これらの、比較的免疫適格である患者における I A は、アスペルギルスに対する抗体力価の増加に関連している可能性がある。また、患者は、アスペルギルスに侵されていながら移植されている可能性があることも示唆されている(しかし、詳細には調べられてはいない)。移植される患者における免疫抑制に先立って認められる高い抗体力価は、既存のアスペルギルス感染を示唆するものであり、菌学的検査および/または抗真菌薬の予防的処置の指標となり得る。

【 0 0 0 4 】

アスペルギルス症患者における抗体検出は、免疫電気泳動法、対向免疫電気泳動法または血球凝集法などの半定量的方法において、粗抗原を用いてさらに行われる(Latge et al., 1991, Infect. Immun. 59:2586-2594)。自家製造された粗抗原バッチを用いる E L I S A 法も導入されてきているが、しかし、診断を担当する異なる研究所間の標準化がなされていないことは、バッチ間変動があるために、アスペルギルス症診断における効率の比較の評価を困難にしている。

【 0 0 0 5 】

嚢胞性繊維症の被験体は、慢性的にアスペルギルス属の真菌に侵される可能性がある。アスペルギルス属の真菌はアレルゲンとして活動し、肺の内部で過敏性反応を誘発し、A B P A を引き起こし得る。A B P A の臨床的特徴は、嚢胞性繊維症の呼吸器系症状により隠されるか似ている可能性があり、結果として過剰診断をもたらしやすい。50%もの嚢胞性繊維症の被験体が、いつかどれかの陽性血清学的試験が陽性となるであろう。

【 0 0 0 6 】

侵襲型のアスペルギルス症は、環境汚染、化学療法薬および抗生物質の一層の使用などが原因の免疫抑制された状態において、ますます重要となってきている。最も感染しやすい宿主は、臓器移植症例、白血病またはヒト免疫不全ウイルス(H I V)患者などの、免疫不全患者である。

【 0 0 0 7 】

従来の研究、特に C r a m e r i のグループによる研究では、免疫化学的試験による抗アスペルギルス抗体の再現性のある定量は、組換え抗原を用いて達成し得ることが示されている(Cramer R., Chem Immunol 2002; 81: 73-93; Cramer R, Kodzius R., Comb Chem High Throughput Screen 2001; 4: 145-155; Herrmann S. et al. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 601-607; Kodzius R. et al, Comb Chem High Throughput Screen 2003; 6: 147- 154; Kurup VP. et al., CHn Exp Allergy 2000; 30: 988-993)。この 10 年の間に、発明者らはアスペルギルス・フミガーツスのいくつかの抗原を特徴づけ、その中

10

20

30

40

50

には、Biguetのグループの研究以来、アスペルギルス症の診断の研究に用いられている古典的な「キモトリブシンおよびカタラーゼ抗原」またはLongbottomの抗原Cがある(Beuavais A. et al. J Biol Chem 1997; 272: 6238-6244 ; Calera JA. et al. Infect Immun 1997; 65: 4718-4724; Kobayasbi H. et al. Infect Immun 1993; 61: 4767-4771; Latge JP. et al Infect Immun 1991; 59: 2586-2594.; Paris S. et al. FEMS Microbiol Let t 1993; 111: 31-36)。

【 0 0 0 8 】

これらの既知のアスペルギルス抗原にもかかわらず、これまでに、いずれの被験体に対しても再現性のある、アスペルギルス感染を診断するin vitro法は存在しない。実際に、特定のアスペルギルス抗原に対して向けられた抗体レベルは被験体によって異なり、診断用の主たる抗原は被験体によって同じではない。これはおそらく、様々な被験体のB細胞集団における遺伝的多様性のためであろう；それはまた、真菌の菌株がin vivoでそれぞれの抗原を様々な量で生成することに関連しているかもしれない。

10

【 0 0 0 9 】

よって、患者が誰であっても効果的で再現性のある、被験体におけるアスペルギルス感染の新規in vitro診断方法が求められている。発明者らは、共に組合せた場合に、高い信頼性で被検体がアスペルギルス感染であると結論付けるのに有意な結果をもたらすものを、当業者に公知の複数のアスペルギルス抗原から選択することにより、そのような新規の方法を開発した。

【 0 0 1 0 】

本法は、アスペルギルス腫およびA B P Aの診断に適している。A B P Aの特異的な診断は、非常に困難な課題である嚢胞性繊維症ならびに非嚢胞性繊維症患者の間であっても可能である。抗アスペルギルス抗体の検索はまた、免疫抑制療法を待つ患者におけるアスペルギルスの初感染の追跡にも使用可能である。

20

【 0 0 1 1 】

第1の態様において、本発明は、被験体の血清または血漿サンプルにおいてアスペルギルス抗原に対する抗体の量を決定することによる、アスペルギルス感染のin vitro診断方法であって、

a) 前記抗体および前記抗原との間で得ることができる免疫複合体の形成のために、前記血清または血漿サンプルをアスペルギルス抗原と共にインキュベートすること、および

30

b) アスペルギルス抗原に対する抗体の量を決定すること、
を含み、

アスペルギルス抗原は、下記抗原：

リボヌクレアーゼ(RNU)抗原、

カタラーゼ(CA)抗原、および

ジペプチジルペプチダーゼV(DPPV)抗原、

の少なくとも2つの組合せからなる群から選択される、方法に関する。

【 0 0 1 2 】

本願明細書において、「免疫グロブリン」および「抗体」とは、区別せずに用いられる。

40

【 0 0 1 3 】

RNU、CAおよびDPPV抗原は、アスペルギルス・フミガーツスから得るのが好ましい。

これらの抗原を得るためには、例えば、精製、化学合成(固相法)または前記抗原をコードする核酸および発現ベクター(以下参照)を用いる分子生物学などの、当業者に十分公知のいずれの方法を用いてもよい。

【 0 0 1 4 】

「被験体」とは、任意の哺乳類、好ましくは、ヒトを意味する。

【 0 0 1 5 】

50

好ましくは、工程 (b) において、陰性参照の血清または血漿サンプルで得られた量と比較した場合に、前記 2 つの抗原のうち少なくとも 1 つの抗原に対する抗体の有意に上回る量が決定されることが、アスペルギルス感染の指標となる。

【 0 0 1 6 】

陰性参照の血清または血漿サンプルで得られた量と比較して、有意に上回る量をどのように決定するかは当業者であれば分かる。通常、適切な統計学的分析法が用いられる (実施例、特に実施例の paragraphs 6 「抗原コーティングおよび E L I S A 」を参照) 。有意に上回る量は、本発明の方法で用いられる条件によって異なる。「陰性参照の血清または血漿サンプル」という表現は、アスペルギルス感染にかかっていない被験体から得られた任意の血清または血漿サンプルを意味する。

10

【 0 0 1 7 】

免疫複合体形成のために適切な媒体、適切な条件、およびプロトコールは、免疫学の分野で働く当業者に公知である。例として、用いることのできる様々な方法およびプロトコールは、「国立衛生研究所」の John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober - Wiley Interscience により毎年更新 (4 巻) および編集される「免疫学における最新のプロトコール」に記載されている。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、該アスペルギルス抗原は、固相支持体上にコーティングされている。有利には、前記抗原のそれぞれは、該固相支持体上の異なる位置にコーティングされている。

【 0 0 1 9 】

抗原コーティングは、好ましくは、直接的またはスパーサーを用いて間接的に、当業者に公知の様々な固相支持体上で実現し得る。該固相支持体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロンまたは天然もしくは修飾セルロースが挙げられる。これらの支持体は、可溶性または不溶性であってよい。マイクロビーズ、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) ストリップ、または (E L I S A) プレートなどのマイクロタイタープレート中に存在してもよい。

20

【 0 0 2 0 】

例として、工程 (a) において、該血清または血漿サンプルは、あらかじめ固相支持体上にコーティングされている該アスペルギルス抗原と共にインキュベートすることができる。次に、コーティングされているアスペルギルス抗原と免疫複合体を形成していない、該血清または血漿サンプルの該抗体を、例えば洗浄バッファーを用いて除去する。以下に示す工程において、マーカークとコンジュゲートさせた抗免疫グロブリン (抗 I g) 抗体 (抗 I g G 、 抗 I g E および 抗 I g A 抗体など) を、固相支持体上に形成された免疫複合体と接触させればよい。該免疫複合体の該抗体と相互作用しなかった、コンジュゲート抗 I g 抗体を除去する。最後に、工程 (b) において、該マーカークを用いて得られる該検出シグナルにより前記抗体の量を決定する。

30

【 0 0 2 1 】

使用してもよいマーカークは当業者に十分公知であり、酵素 ; 色素 ; 放射性発光剤 (例えば 線カウンターまたはシンチレーションカウンター、オートラジオグラフィなどを用いて検出され得る ^{14}C 、 ^{36}Cl 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{152}Eu 、 ^{59}Fe 、 3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{75}SE および ^{99m}Tc など)、生物発光剤、化学発光 (chemiluminescent) 剤 (ルミノール、ジオキセタン、ルシフェラーゼ、ルシフェリン)、蛍光剤、およびリン光剤などの発光剤 ; ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、5 - プロモ - デオキシウリジンなどのリガンド ; 放射性同位元素から選択されてよい。従って、該抗 I g 抗体は、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 α - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、アンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、1 a リンゴ酸デヒドロゲナーゼまたはグルコース - 6 リン酸デヒドロゲナーゼなどの酵素とコンジュゲートさせる。蛍光マーカークは、例えば、フルオレセインおよびその派生物、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C)、アロフィコシアニン (A P C)、フィコエリト

40

50

リン - シアニン 5 (P C 5) およびフィコエリトリン (P E)、カルセイン (A M)、赤色蛍光テトラメチル - ロダミンまたはロダミンおよびその派生物、G F P (緑色蛍光タンパク質)、ダンシル、ウンベリフェロンなどであってよい。

【 0 0 2 2 】

好ましい実施形態では、固相支持体は E L I S A プレートであり、該方法は、

a) 前記血清または血漿サンプルを、E L I S A プレート上にコーティングされたアスペルギルス抗原と共にインキュベートすること、

b) E L I S A プレートからアスペルギルス抗原と結合していない前記血清または血漿サンプルの抗体を除去すること、

c) 酵素とコンジュゲートさせた抗免疫グロブリン (抗 I g) 抗体と接触させること (ここで、前記抗 I g 抗体は、前記血清または血漿サンプルの該抗体と結合可能である)、

d) E L I S A プレートから前記血清または血漿サンプルの該抗体と結合していない抗 I g 抗体を除去すること、

e) 酵素に対応する可溶性基質を加えること、および

f) E L I S A プレートのウェルの吸光度の値を E L I S A リーダーにて適切な波長で読み取ること、

を含んでなり、

前記抗体の量が、得られた吸光度の値により決定される。

【 0 0 2 3 】

適切な媒体および条件は、例えば、以下に用いられたようなものであってよい (実施例、特に実施例のパラグラフ 6 「抗原コーティングおよび E L I S A 」を参照)。

【 0 0 2 4 】

有利には、酵素および対応する可溶性基質は、

アルカリ性ホスファターゼおよび可溶性基質 4 - ニトロフェニルリン酸 (P N P P) ;

ペルオキシダーゼおよび可溶性基質オルトフェニレンジアミン (O P D) ;

- ガラクトシダーゼおよび可溶性基質 2 - ニトロフェニル - ガラクトシド (O N P G) ; または

グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼおよび可溶性基質グルコース - 6 - リン酸 (G 6 P)

からなる群から選択される。

【 0 0 2 5 】

一実施形態では、アスペルギルス抗原は R N U および C A 抗原の組合せを含む。別の実施形態では、アスペルギルス抗原は、R N U および D P P V 抗原の組合せを含む。さらに別の実施形態では、アスペルギルス抗原は、C A および D P P V 抗原の組合せを含む。最も好ましくは、アスペルギルス抗原は、R N U、C A および D P P V 抗原の組合せを含む。

【 0 0 2 6 】

該アスペルギルス抗原に加えて、ガラクトマンナン (G M) 抗原、ポリ糖類抗原もまた、使用することができる。この G M 抗原は、アスペルギルス培養物の精製により得ることができ (例えば、パート I : 「材料および方法」、ポイント 3 : 「ガラクトマンナンの精製」を参照)、または当業者に十分公知の任意の他の方法により得ることもできる。

【 0 0 2 7 】

有利には、R N U、C A、D P P V および G M 抗原のそれぞれは、0 . 1 ~ 1 0 μ g / m L、より有利には、1 μ g / m L の範囲の密度で該固相支持体上にコーティングされる。

【 0 0 2 8 】

さらに好ましい実施形態では、R N U、C A および D P P V アスペルギルス抗原の少なくとも 1 つは、組換え抗原である。有利には、R N U、C A および D P P V アスペルギルス抗原の少なくとも 2 つは、組換え抗原である。最も有利には、R N U、C A および D P P V アスペルギルス抗原の 3 つが組換え抗原である。

10

20

30

40

50

【0029】

好ましくは、少なくとも1つの組換えアスペルギルス抗原は、発現ベクター中の対応するcDNAの増幅産物のクローニングにより得られる。より好ましくは、対応するcDNAの増幅産物は、前記の少なくとも1つのアスペルギルス抗原に特異的なプライマー対を用いてアスペルギルス・フミガーツスcDNAライブラリーから得られる。

【0030】

当業者であれば、RNU、CAおよびDPPV抗原のクローニングおよび組換え発現を実現するために分子生物学および細胞生物学的ツールを自由に使うことができる(例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.(1989)およびAusubel et al., *Current Protocol in Molecular Biology*, J. Wiley & Sons, NY (1992)を参照)。例えば、細菌宿主および対応する既知の細菌プラスミド、酵母細胞/酵母発現ベクター、昆虫細胞/昆虫発現ベクター、哺乳類細胞/哺乳類発現ベクターなど、様々な発現宿主/ベクターの組合せを用いることができる。さらに、これらのベクター中で任意の好適な発現制御配列を用いることができる。

10

【0031】

好ましくは、前記の少なくとも1つの組換えアスペルギルス抗原は、GS115およびKM71酵母株などのピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)酵母、ならびにpKJ111(Monod M. et al, *Contrib Microbiol* 1999; 2:182-192)、pKJ113(Borg-von Zepelin M. et al, *Mol Microbiol* 1998; 28: 543- 554)、pHILS1およびpPICZ A(Invitrogen)などの好適な発現ベクターを用いて得られる。

20

【0032】

使用してよいcDNAライブラリーは、Monod M. et al (1991)のアスペルギルス・フミガーツスgt11cDNAライブラリーである。

【0033】

有利には、RNU抗原に特異的なプライマー対は、配列番号1および配列番号2である。より有利には、CA抗原に特異的なプライマー対は、配列番号3および配列番号4である。最も有利には、DPPV抗原に特異的なプライマー対は、配列番号5および配列番号6である。

【0034】

もう1つの好ましい実施形態では、特定のアスペルギルス菌株に対する検出シグナルの固有のプロフィールが決定される。

30

【0035】

より好ましくは、本発明の該方法は、それぞれのアスペルギルス菌株に関して検出シグナルプロフィールと標準プロフィールを比較し、該被験体が感染している菌株の同定を可能にすること、をさらに含む。

【0036】

好ましくは、アスペルギルス感染は、アスペルギルス腫および/またはアレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)を引き起こす。

【0037】

アスペルギルス腫は、アスペルギルス真菌の菌糸部分の塊に起因する、特徴的な肺の病変であり、繊維性の壁の肺空洞内に球状の塊を形成し、通常それが気管支へと続く。

40

【0038】

より好ましくは、ABPAを引き起こすアスペルギルス感染は、嚢胞性繊維症に罹患している被験体ならびに嚢胞性繊維症に罹患していない被験体において診断される。

【0039】

有利には、アスペルギルス感染は侵襲性アスペルギルス症であり、これは移植を受ける被験体において免疫抑制の前に診断可能である。

【0040】

より有利には、免疫不全のヒト、有利には、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染し

50

ているヒトにおけるアスペルギルス感染の診断を可能にする。

【0041】

第2の態様において、本発明は、血清または血漿サンプル中のアスペルギルス抗原に対する抗体の量を決定するための診断キットであって、

(a) 下記アスペルギルス抗原：

RNU抗原、

CA抗原、および

DPPV抗原

の少なくとも2つの組み合わせを含んでなる、診断キットに関する。

【0042】

好ましくは、本発明の診断キットは、前記アスペルギルス抗原でコーティングされている固相支持体をさらに含む。有利には、前記抗原のそれぞれは、固相支持体上の異なる位置にコーティングされている。

【0043】

有利には、該診断キットは、

(b) マーカーとコンジュゲートさせた抗Ig抗体を含有する溶液をさらに含む。

【0044】

より有利には、該診断キットは、

(c) 洗浄バッファー

をさらに含む。

【0045】

一実施形態では、アスペルギルス抗原は、RNUおよびCA抗原の組合せを含む。別の実施形態では、アスペルギルス抗原は、RNUおよびDPPV抗原の組合せを含む。さらに別の実施形態では、アスペルギルス抗原は、CAおよびDPPV抗原の組合せを含む。最も好ましくは、診断キットのアスペルギルス抗原は、RNU、CAおよびDPPV抗原の組合せを含む。

【0046】

さらなる実施形態では、診断キットのアスペルギルス抗原は、GM抗原をさらに含む。

【0047】

有利には、RNU、CA、DPPVおよびGM抗原のそれぞれは、 $0.1 \sim 10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、より有利には、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の範囲の密度で該固相支持体上にコーティングされる。

【0048】

さらに好ましい実施形態では、RNU、CAおよびDPPVアスペルギルス抗原の少なくとも1つは、組換え抗原である。有利には、RNU、CAおよびDPPVアスペルギルス抗原の少なくとも2つは、組換え抗原である。最も有利には、RNU、CAおよびDPPVアスペルギルス抗原の3つが組換え抗原である。

【0049】

好ましい実施形態では、固相支持体はELISAプレートであり、マーカーは酵素である。

【0050】

より好ましい実施形態では、診断キットは、

(d) 酵素に対応する可溶性基質を含有する溶液をさらに含む。

【0051】

第3の態様において、本発明はヒトにおけるアスペルギルス感染の診断のための下記の抗原：

RNU抗原、

CA抗原、および

10

20

30

40

50

D P P V 抗原

の少なくとも2つの組合せの使用に関する。

【0052】

好ましくは、R N U、C AおよびD P P V抗原の組み合わせである。

【0053】

別の好ましい実施形態では、E L I S A試験が診断に用いられる。

【0054】

さらに好ましい実施形態では、アスペルギルスの感染がアスペルギルス腫および/またはアレルギー性気管支肺アスペルギルス症(A B P A)を引き起こす場合の本発明の使用である。好ましくは、A B P Aを引き起こすアスペルギルス感染は、嚢胞性繊維症を罹患している被験体ならびに嚢胞性繊維症に罹患していない被験体において診断される。

【0055】

別の好ましい実施形態では、アスペルギルス感染は侵襲性アスペルギルス症であり、これは移植を受けるヒトにおいて免疫抑制の前に診断可能である。

【0056】

別の好ましい実施形態では、本発明の使用は、免疫不全のヒト、有利には、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)に感染しているヒトにおける該アスペルギルス感染の診断を可能にする。

【0057】

本発明を、以下の実施例でさらに詳細に説明する。これらの実施例は、単に例示のために示されるものであり、添付の特許請求の範囲を限定するものではない。多くの実施状況に当たっては様々なシナリオが関連するが、それらは当業者にとって単に例示を目的とするものである。従って、本発明は任意のおよび総ての変形形態を包含すると解釈され、それらは本明細書で示される教示の結果として明らかとなる。

【実施例】

【0058】

I. 材料および方法

1. 菌株およびプラスミド

使用する菌株A. フミガーツスは、臨床由来の菌株C B S 1 4 4 . 8 9である。組換え抗原を発現させるために、ピキア・パストリスG S 1 1 5およびK M 7 1、ならびに発現ベクターp K J 1 1 1 (Monod M. et al., 1999)、p K J 1 1 3 (Borg-von Zepelin M. et al., 1998)、p H I L S 1およびp P I C Z A (Invitrogen)を用いた。総てのプラスミドクローニング実験は、大腸菌(E. coli) X L 1 b l u eにおいて行った。バクテリオファージg t 1 1 (Promega)の増殖用には大腸菌L E 3 9 2を使用した。

【0059】

2. 組換えポリペプチドの産生

A. フミガーツス抗原のc D N Aは、あらかじめ構築されたg t 1 1のc D N Aライブラリーの 10^6 クローンから調製されたD N Aを用い、P C Rにより得た(Monod M. et al., 1991)。プライマーは、アルカリプロテアーゼA L P (Monod M. et al., 1993, FEMS Microbiol Lett. 106:39-46)、メタロプロテアーゼM E P (Jaton-Ogay et al., 1994, Mol. Microbiol. 14:917-928)、アスパラギン酸プロテアーゼP E P (Reichard et al., 1995, FEMS Microbiol. Lett. 130:69-74)、リボヌクレアーゼR N U (Paris et al., 1993, FEMS Microbiol. Lett. 111:31-36)、スーパーオキシドジスムターゼS O D (Holdom et al., 2000, J. Clin. Microbiol. 38:558-562)、カタラーゼC A T (Calera et al., 1997, Infect. Immun. 65:4718-4724)、ジペプチジルペプチドI V D P P I V (Beauvais et al., 1997, Infect. Imm. 65:3042-3047)、およびジペプチジルペプチダーゼV D P P V (Beauvais et al., 1997, J. Biol. Chem.:6238-6244)をコードする遺伝子のゲノムD N A配列から得た(表1)。標的D N Aを200ng、濃度42mMのセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドをそれぞれ10 μ l、およびデオキシヌクレオチド混合物(d N T Pをそれぞれ10mM含有)8 μ lを、P C Rバッファー(10mM T r i s -

10

20

30

40

50

塩酸 pH 8.3、50 mM 塩化カリウムおよび 1.5 mM 塩化マグネシウム) 100 μ l に溶解させた。それぞれの反応物に、2.5 U の Amp l i T A Q DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer) を加えた。反応混合物を 94 °C にて 5 分間インキュベートし、94 °C にて 0.5 分間、55 °C にて 0.5 分間、および 72 °C にて 0.5 分間の 25 サイクルを行い、最後に 72 °C にて 10 分間インキュベートした。

【0060】

発現プラスミドは、cDNA PCR 産物を P. パストリス発現ベクターにクローニングすることにより構築した。該 PCR 産物は、PCR 精製キット (Roche Diagnostics) を用いて精製し、その部位がプライマーの 5' 末端にあらかじめ設計されている制限酵素で消化した (表 1)。P. パストリス形質転換、形質転換体の選択、およびメタノール媒体中での組換え酵素の生成は、従前に記載されているように行った (Beggah S. et al., Microbiology 2000; 146: 2765-2773; Borg-von Zepelin M. et al., 1998)。DPPIV を除き、総ての 6xHis 標識タンパク質が Probond カラム (Invitrogen) に結合した。0.5 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM、pH 6 のリン酸バッファーでカラムを洗浄した後、50 mM ヒスチジンを用いて Ni²⁺ カラムからタンパク質を溶出させた。RNU を溶出させるためには、500 mM イミダゾールバッファー pH の使用が必要であり、該タンパク質を 50 mM ヒスチジン溶液に対して透析した。50 mM ヒスチジン溶液中に様々な抗原を可溶化させることは、抗原のマイクロタイタープレートへの直接コーティングを可能にしたものの、イミダゾールはコーティングおよびそれに続く比色定量反応を妨害した (データは示されていない)。

【0061】

他の抗原とは対照的に、DPPIV は Ni²⁺ カラムに結合しなかった。1/1000 に希釈した抗ポリヒスチジクロン His 1 モノクローナル抗体 (Sigma) を用いる DPPIV のウエスタンブロット解析は陰性であったが、DPPV 対照は陽性であった (データは示されていない)。この結果は、Ni カラムに結合しなかった理由は、タンパク質の特異的三次元構造のために、6His 標識が Ni へ接近できなかったためではなく、DPPIV 組換えタンパク質中に 6His 標識の配列コードがなかったためであることを示している。DPPIV p の精製は、従前に記載されているものを一部変更して行った (Beauvais A. et al. Infect Imm 1997; 65: 3042-3047)。DPPIV p を精製するために、ピキアの培養濾液を 4 倍容量のエタノールで沈澱させ、この沈殿物を水に溶かし、pH 8.0 の 20 mM Tris 塩酸バッファーに対して透析した。タンパク質を Mono Q HR 5/5 カラムにロードし、0 ~ 500 mM の塩化ナトリウムを用いてタンパク質を溶出させた。前述 (Beauvais A. et al., 1997) のように測定された、ジペプチジルペプチダーゼ活性を含む画分を合わせ、真空濃縮した。最終精製は、0.12 M の塩化ナトリウムを含有する pH 8.0 の 20 mM の Tris 塩酸バッファーを用いて、Superdex 200 HR 10/30 ゲル浸透カラムで行った。精製されたタンパク質は、前述の (Beauvais A. et al., 1997) ジペプチジルペプチダーゼ活性を有していることが実証された。

【0062】

異なるバッチの抗原の純度は、SDS PAGE において 10% 分離用アクリルアミドゲルにオーバーロードした後、夾雑タンパク質バンドを欠くことにより、コントロールした。

【0063】

3. ガラクトマンナン (GM) の精製

従前に記載されているように (Hearn et al., 1990, In R. A. Samson and J.I. Pitt (ed.), Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification, Plenum Press, London, New York)、A. フミガーツスを培養槽の中で 40 時間増殖させた。ヒドラジンの商品化が終了したため、GM の精製は別のプロトコールに従って行った。該培養濾液をエタノールで沈澱させ、その沈殿物を最初に、アミラーゼ (バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis) 由来、Sigma A4551 参照) を、100 mM の酢酸ナトリウムバッファー pH 5.6 中、1:30 の割合で (乾重量) で用いて 37 °C にて 3 日間消化し、次

に、プロナーゼ(ストレプトミセス・グリセウス(streptomyces griseus)由来、Sigma P5 147参照)を1:6の割合で(乾重量)37で3日間インキュベートした。反応混合物を100にて10分間沸騰させ、さらに水酸化ナトリウム(1M終濃度)の存在下で60にて1時間処理した。中和した後、GMを透析して凍結乾燥させた。GMの純度は、前述のように(Fontaine et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:27594-27607, Large et al., 1994, Infect. Immun. 62:5424-5433)ガスクロマトグラフィーにより確認した。

【0064】

4. 患者

病変は、それぞれの病院で確立されている基準に従って、臨床症状に基づいて各施設で特定した。3つの施設で、57人のアスペルギルス腫患者、および41人の対照を採用した(トゥールーズ、グルノーブルおよびストラスブル)。さらに、トゥールーズの施設では、患者あたり2~9(平均3.9)サンプルを連続して採取した。トゥールーズおよびグルノーブルの施設では、嚢胞性繊維症集団中の16人のABPA患者および51人の対照を分析した。嚢胞性繊維症ではない集団中の12人のABPA患者を27人の対照と比較した。トゥールーズにおいては、14人のABPA患者(嚢胞性繊維症または非嚢胞性繊維症バックグラウンド)の患者ごとの連続サンプル(3~16、平均8.6)が利用可能であった。総てのIA患者は、セントルイス病院(パリ)由来であり:23人はIAであることが判明しているかまたはIAであると疑われ、21人はIAである可能性があり、および34人は対照であり、IA患者として免疫抑制または/および移植されていた。それぞれの一連の患者に対して、1~5サンプル(平均7.5)、2~11サンプル(平均6)、および1~12サンプル(平均3.9)が、それぞれ、IAであると判明している/疑われる患者、IAである可能性がある患者、および対照患者について入手可能であった。移植前または免疫抑制療法開始前に、患者あたり1~7血清もまた入手可能であった。

【0065】

5. 免疫電気泳動(IEP)

メーカーの取扱説明書に適応させた後、Beckman-IEP Paragon systemを用いて、高速の免疫電気泳動を行った。要するに、アスペルギルスの菌体抗原および代謝産物抗原(Sanofi Pasteur Diagnosis, Marnes la Coquette, France)の泳動を、100Vにて12分間行った。原血清と共に18~24時間インキュベーションを継続させた。クエン酸ナトリウムで洗浄した後、カタラーゼ活性を持つ沈降素の存在を3%過酸化水素を用いて可視化し、乾燥させたゲルをクーマシーブルー染色またはパラゴンバイオレットアシッド染色した後に沈降素の総数を計数した。

【0066】

6. 抗原コーティングおよびELISA

カタラーゼは4µg/mlでコーティングした以外は、総ての抗原は1µの濃度で、総てのタンパク質抗原およびガラクトマンナンを用いてELISAプレート(Greiner Ref. 762070)をコーティングした。コーティングの後、ウェルを空にして、2%Tween 20を添加したPBS 300µlで満たした。室温にて1時間インキュベーションした後、PBS/Tween溶液を、5%グルコースおよび2.5%脱脂乳を含有するPBS 300µlと交換し、プレートを室温にて2分間インキュベートした。ウェルを再び空にし、オープン中で60にて10分間乾燥させた。乾燥後、プレートを凍結保存した。抗原のコーティング濃度およびプロトコールは、これらの濃度が抗アスペルギルス抗体を多量に含有することが知られているアスペルギルス腫患者由来の血清プールの最適なOD値の読み取りを保証することを示した予備試験に基づくものであった。患者血清は、0.05%Tween 20および1%BSAを含有するPBS中で500倍希釈した。トゥールーズおよびセントルイス由来の血清は、発明者の研究所で分析した。グルノーブルおよびストラスブルの血清は、従来以下の工程:患者血清と共に37にて1時間インキュベーションし;0.05%Tween 20を含むPBSで5回洗浄し;ペルオキシダーゼとコンジュゲートさせた二次抗IgG(H+L)抗体(Sigma)と共にインキュベーションし;

5回洗浄し、OD値読み取りのためにオルトフェニレンジアミン(OPD)と共にインキュベーションすることを含む、パスツールで用いられているプロトコルに従って現地で試験した。実験は二重測定で行い、少なくとも1回は繰り返した。

【0067】

7. 統計学的解析

データの統計学的解析は、JMPソフトウェア(SAS, Cary, NC)を用いて行った。平均値を算出し、標準誤差はコンピューターで計算した。用いた方法は、分散分析に続いて、スチューデントのt検定により解析された最小二乗平均差を用いる平均の順位付けであった。有意性を求めるために、ピアソン相関のr値を用いる密度楕円フィッティングを介して、1つの連続可変量の別の可変量に対する分布を分析する二変量解析を行った。判別分析では、抗原に対するOD値を、病変に基づいてあらかじめ定義された患者群に分類した。解析は、群の分類に最も適した、二次元においてポイントおよび多変量平均を示す正準プロットとして提示した。感度、特異性、陰性的中率および陽性的中率は、対照患者から計算した最適カットオフ値に基づいて推定した。

10

【0068】

II. 結果

1. アスペルギルス腫

図1は、タンパク質抗原のうちで、DPPV、カタラーゼおよびリボヌクレアーゼ抗原が、患者と対照の間を最も判別することを示す。対照血清における抗体レベルは高いが、DPPIVもまた、アスペルギルス腫患者の同定に有用であった。一方では、プロテアーゼ(アスパラギン酸、メタロおよびセリン-プロテアーゼ)ならびにスーパーオキシドジスムターゼはアスペルギルス腫患者において特異的な液性応答反応を誘発しなかった(セリンプロテアーゼについてはデータは示されていない)。3元配置分散分析では、施設×抗原×病変の相互作用因子に関して有意な応答($p = 0.03$)が示された。これは、トゥールーズの患者では判別されたが、他の施設においては判別されなかったDPPIVに対する応答に起因するものであった(データは示されていない)。その一方で、リボヌクレアーゼ、ジペプチジルペプチダーゼおよびカタラーゼの判別効率は、3施設において良好であった。抗RNU、抗CATおよび抗DPPV抗体レベルは、試験を行った総ての3つの施設の患者集団において、対照集団よりも有意に高かった。表2は、試験に含まれる抗原の数が増えると共に、試験の感度が高くなることを示している；3つの抗原を用いて得られたOD値をコンピューターで計算した場合、最大値95%に達した。その一方で、複数の抗原を使用した場合、特異性の値はわずかに低下した。

20

30

【0069】

発明者らは患者ごとの複数の連続サンプルを有しているので、トゥールーズの施設の患者の詳細な解析を行った。この一連の患者において、ガラクトマンナン(GM)抗原もまた試験し、前記で判別可能であることが示された3つの判別組換えタンパク質抗原、RNU、CATおよびDPPVと比較した。ELISAのOD値は、ガラクトマンナン抗原もまた、この病変に関して判別可能であることを示した。対照患者のOD値の平均は、GMおよびCAT抗原の値の方がRNUおよびDPPVよりも高かった。試験条件下では、アスペルギルス腫患者血清中のRNU、DPPV、GMおよびCATそれぞれに対し、 0.82 ± 0.05 、 0.95 ± 0.08 、 1.0 ± 0.07 および 0.71 ± 0.04 の平均OD値が得られ、一方、対照患者血清中のこれらの値は、 0.26 ± 0.07 、 0.25 ± 0.06 、 0.74 ± 0.06 および 0.47 ± 0.09 であった。総ての抗原に関して良好な相関スコアが得られ、最も良好な相関は、GM、CATおよびDPPV抗原で得られた。さらに、二変量解析では、得られたIEPバンド数と、3つの組換え型抗原およびGMで得られたOD値との間に、良好で統計学的に有意な相関が示された。沈降素バンド数と最もよい相関が得られたのは、DPPVのOD値でr値は0.6(図2)であり、RNU、GMおよびCATではそれぞれ0.38、0.31および0.28の値が得られた。

40

【0070】

50

トゥールー病院の13人の患者の動態分析から、患者間でこの4つの異なる抗原に対する抗体力価に変動が見られることが示された(4人の患者の例として図3)。全体としてアスペルギルス腫患者と対照患者の間に有意差があったが(図1)、抗体の応答は患者にも抗原にも依存していなかった。第一に、個々の抗原に対する抗体のレベルは患者によって異なっていた。例えば、患者Mazでは、CATおよびDPPVに対する応答に最高のOD値が伴っていたが、患者Berでは、これら2つの抗原では最低のOD値しか得られなかった。第二に、抗体のレベルはまた極めて経時的に抗原および患者に依存している可能性があった。例えば、患者Benでは、抗原RNUに対する抗体のレベルが上昇していたが、同じ患者で、試験した他の3つの抗原に対する抗体のレベルは時間が経っても一定であった(図3)。

【0071】

2. ABPA

ABPAは嚢胞性繊維症患者ならびに非嚢胞性繊維症患者双方の主要な合併症である。嚢胞性繊維症患者は多くの場合、アスペルギルスが定着し、この定着が高いレベルの抗アスペルギルス抗体を伴っている場合があり、これが、嚢胞性繊維症集団において定着患者と本当のABPA患者を識別することを困難にしている。このため、本発明者らは、嚢胞性繊維症を有しない対照、嚢胞性繊維症を有する対照、嚢胞性繊維症を有しないABPAおよび嚢胞性繊維症を有するABPA、の4集団の患者を分析した。

【0072】

図4は、本発明者らのELISAが、ABPA患者と、アトピー集団または嚢胞性繊維症集団の双方の対照患者とを識別可能であったことを示す。正準プロットにおいて総ての抗体データをプールしたところ、4つの異なる集団の厳格な分離が示された(図5)。アスペルギルス腫患者の場合と同様、最も判別性の高い3つの抗原は、総ての臨床施設で、RNU、CATおよびDPPVであった(表3)。

【0073】

この試験により、嚢胞性繊維症患者が総ての抗原、特にDPPVに対する抗アスペルギルス抗体を高いレベルで有していたことが確認された。この結果は、総ての嚢胞性繊維症患者がA.フミガーツスを永久的に保持しているという事実と一致した。しかしながら、これらの抗体力価は、ABPA患者で見られた抗アスペルギルス力価よりも低いままであった。これらのデータから、嚢胞性繊維症患者の追跡調査中に抗体力価のモニタリングを用いれば、定着の悪化または/およびABPA病変の発症を同定することができることが示唆された。表4は、分析した嚢胞性繊維症集団の特異性、感受性ならびにABPAの陰性および推定値を示している。これら3つの異なる各抗原を個別に考えると、最低の感受性値(38%)はCATで得られた。最高の診断パラメーター値はRNUとDPPVの組合せで得られた。よって、これらの2つの抗原は、ABPAの診断にとって最も有益な抗原であると考えられた。ABPA集団を非嚢胞性繊維症のバックグラウンドにおいて分析した場合にも同様のデータが認められた(データは示されていない)。

【0074】

アスペルギルス腫患者では、患者間でも同じ患者で経時的にでも、抗原に対する抗体力価に有意な変動が見られた(図6)。例えば、患者Audは低い抗DPPV力価を有していたが、患者Delは低い抗RNU力価を有し、これに対して、患者AubはRNUに対して高レベルの抗体力価を有していた。抗体のレベルは、患者AubとDelでは一定であったが、患者Audではかなり変動があった。抗体力価の上昇はABPAエピソードと関連があるものと思われたが、抗体力価の低下は患者の改善と相関していた(図6)。

【0075】

3. 侵襲性アスペルギルス症

免疫適格集団またはアトピー集団において病態を示した最も判別性の高い抗原がRNU、CATおよびDPPVであったことから、これら3つの抗原を試験し、侵襲性アスペルギルス症における抗体の状態を調べた。さらに、GMに対する抗体は、アスペルギルス腫患者の肺組織における真菌増殖に関連し(上記参照)、また、ガラクトマンナン抗原血症

10

20

30

40

50

の検出に基づく I A の診断に用いられる P l a t e l i a キットで得られる偽陰性の原因であることが示唆された (Hearn et al., 1995, J. Clin. Microbiol. 33:982-986; Herbrecht et al., 2002, J. Clin. Oncol. 20:1898-906) ことから、この抗体を分析した。I A であることが判明している、また I A が疑われる免疫不全患者および同じ臨床処置を受けたが真菌感染が見られなかった対照のコホートにおいて、これら 4 つの抗原に対する抗体レベルを測定した。

【 0 0 7 6 】

まず、同じ患者で、移植または免疫抑制後と臨床的 I A 診断後の血清力価を比較したところ、これらの免疫不全患者における I A 過程では抗体レベルの上昇はないことが示された (誤差 d f 1 1 8 で、p 値 0 . 8 3)。この結果により、本発明者らの研究において、I A を有する免疫不全患者は疾病の進行中、真菌に対する、検出可能な抗体を産生しなかったことが確認された。C A T、R N U、D P P V または G M に対する抗体レベルとは対照的に、同じ血清における循環ガラクトマンナンのレベルは I A に関して判別可能であり、I A の進行中、経時的に抗原の放出量の増加を伴っていた (誤差 d f 1 1 8 で、p 値 < 0 . 0 1)。

【 0 0 7 7 】

疾病の経過中、抗体のレベルには変化はなかったが、I A であることが判明している患者集団における抗体応答の分析によれば、試験した 4 つの抗原に対する高レベルの抗体が、判明している (proven) / 疑わしい (probable) 侵襲性アスペルギルス症の発生と正の相関があることが示された。表 5 は、最も判別性の高い抗原が C A T と、それより劣るが D P P V であったことを示している。R N U および G M は判別性が低かった (表 5 ではこれら 2 つの抗原の感受性の値が低いことを参照)。図 7 は、患者の供試血清で得られた、C A T 抗原および D P P V 抗原の場合の O D 値に基づく階層的クラスタリングを示しており、それぞれ 1 0 人 (a 群) および 1 3 人 (b 群) を含む 2 群の患者が明確に区別された。低力価の患者群 (b) で示された O D 値は、対照群 (c) とは有意に異なっていなかった。これに対し、抗体力価の高いもう 1 つの患者群 (a) での O D 値は他の b 群および c 群と有意に異なっていた (図 8)。集団 a (患者 1 0 人) と対照集団 (3 4 人) について得られた感受性および特異性の最高値はそれぞれ D P P V では 8 9 % と 7 0 %、C A T では 1 0 0 % と 9 7 % であった。患者のこの部分集団における抗 A . フミガー ツス抗体の検出は、I A の極めてよい推定因子となる。これらの患者の免疫抑制前の血清に高レベルの抗体が存在することは、これらの患者が移植または免疫抑制処置前に感染していたことを示唆した。本発明者らの E L I S A 試験条件下で得られた O D 値に対して J M P ソフトウェアのパーティションプラットフォームを用い、ここでサンプル抽出した集団では、これら 4 つの抗原に対して陰性の血清の指標となる O D 値は、R N U、D P P V、C A T および G M についてそれぞれ 0 . 2 1、0 . 1 2、0 . 4 4 および 0 . 5 4 であった。同じ抗原に対して 0 . 3 6、0 . 3 5、1 . 0 8 および 1 . 0 5 を超える値はアスペルギルス感染の指標となった。ロジスティック回帰データから、p 値 < 0 0 0 1 である最も判別性の高い抗原は C A T および D P P V であったことが確認された (データは示されていない)。

【 0 0 7 8 】

免疫適格患者では、種々の抗原に対する各患者の応答に重要な変動が見られた。図 9 は、異なる 6 人の患者における抗体抗原反応の漸進的変化の例を示している。上記で定義した群の患者 P I E、B A R および R U D では、最大の反応性を誘導する抗原はそれぞれ G M、C A T および D P P V であった。患者 G O R では、R N U および G M に対する抗体は高レベルであったが、C A T および D P P V に対する抗体は低レベルであった。図 9 に示される患者 G O R または P I E では、循環体液中の低レベルの抗原性ガラクトマンナンは高い抗 G M 抗体力価に関連しているものと思われ、I A であることが判明している患者において抗 G M 抗体と P l a t e l i a 指数の間で得られる相関係数は - 0 . 0 4 であった (d f 1 7 2 で、有意でない p 値 0 . 2 2)。この研究では、I A P l a t e l i a における陰性結果は、抗 G M 抗体の存在と直接の関係はなかった。

【 0 0 7 9 】

これらのデータは、免疫抑制前の患者の血清における抗体レベルの感度測定は、I A の良好な陽性推定値となることを示した(図 1 0)。この結論は判明している患者と対照患者を分析した場合に得られたものである。また、疑わしい患者の何人がが本当に I A であることを示唆する抗体レベルに基づく疑わしい集団と対照集団の分離にはある傾向が存在する。

【 0 0 8 0 】

I I I . 考察

E L I S A 形式を用いた、種々のクラスのアスペルギルス症患者の抗体応答に関するこの研究では、本発明者らの研究室でこれまでに同定されたりボヌクレアーゼ、ジペプチルペプチダーゼ V および菌糸カタラーゼ 1 である 3 つの組換え抗原の重要な診断可能性が示された(Beauvais et al., 1997, Infect. Imm. 65:3042-3047; Calera et al., 1997, Infect. Immun. 65:4718-4724; Large, J., 1999, Clin. Microbiol. Rev. 12:310-350; Paris, S. et al., 1993, FEMS Microbiol. Lett. 111:31-36)。

10

【 0 0 8 1 】

これら 3 つの抗原がアスペルギルス腫、A B P A および I A の診断に使用できる場合、これら 3 つの各抗原の個々の能力は分析される集団によって異なる。カタラーゼは、免疫適格集団および免疫不全集団の双方において最も有用な抗原であった。アスペルギルス腫患者では、R N U および D P P V 抗原は C A T と同等か、または高い判別性であった。A B P A 患者では、最も判別性の高い抗原は R N U および D P P V であった。I A 患者では、R N U は適当な抗原とは言えなかったが、D P P V および総ての C A T はほとんどの場合で認識された抗原であった。さらに、アスペルギルス症患者の追跡調査では、どの抗原に対する抗体のレベルも患者によって異なること、および主要な診断抗原が患者によって異なることが多いことが示された。この結果が異なる患者の B 細胞集団における遺伝的変異によるものであるかどうか、あるいはそれが *in vivo* において種々の量の個々の抗原を産生する感染性の真菌株と関連しているのかどうかはこれまでのところまだ分かっていない。A B P A 患者ではアスペルギルス腫患者よりも低い感受性および陽性的中率が得られた。この結果は、この病変の診断が難しいことと一致していた。最も重要であり、生命を脅かすアスペルギルス症、すなわち、アスペルギルス腫、A B P A および侵襲性肺アスペルギルス症の診断にとっては、リボヌクレアーゼ抗原、カタラーゼ抗原およびジペプチルペプチダーゼ抗原のうち少なくとも 2 つ、最良には 3 つの関連が理想的である。

20

30

【 0 0 8 2 】

嚢胞性繊維症対照集団では、高力価の抗アスペルギルス抗体が見られた。この結果は、これらの患者の共通の持続的 A . フミガーツス定着と一致していた。興味深いことに、D P P I V タンパク質に対する抗体のレベルは、非嚢胞性繊維症集団中の A B P A 患者よりも嚢胞性繊維症対照集団でより高かったが、このことは、C D 2 6 と相同なこの抗原は、嚢胞性繊維症の病変で役割を果たす可能性があることを示唆している。本発明者らの研究では、A B P A は、アトピー集団または嚢胞性繊維症集団で、特異的抗アスペルギルス抗体の定量によってのみ診断可能であることが示された。C r a m e r i のグループによる集団では、A B P A の診断に関して同じ抗体が同定されなかった(Hemmann et al., 1999, J. Allergy Clin. Immunol. 104:601-607)。C r a m e r i の研究室による抗原選択はファージディスプレイ系に基づいたものであり、この C A T 抗原および D P P V 抗原は、C r a m e r i のライブラリーで示されるに至らない可能性がある高分子量タンパク質抗原である。R . C r a m e r i との共同研究では、D a v o s の A B P A 患者が R N U 、C A T および D P P V と有意に反応することが示されていることから(Cramer, personal communication)、これもこういったケースであると思われる。さらに、C r a m e r i の研究では、一次選択は I g E 結合に基づいていたが、本発明者らの分析は I g G レベルを考慮したものであり、A B P A では、特異的抗アスペルギルス I g E および I g G がこれらの患者の種々のエピトープを認識し得ることが分かっている。

40

【 0 0 8 3 】

50

本発明者らの研究の最も重要な発見は、移植を受ける患者の約半数に高力価の抗アスペルギルス抗体が存在するということであった。これまでに、免疫不全の I A 患者における抗アスペルギルス抗体の存在を報告している刊行物がいくつかある(Hearn et al., 1995, J. Clin. Microbiol. 33:982-986; Herbrecht et al., 2002, J. Clin. Oncol. 20:1898-906)。この研究で検討された、患者の疾病の経過中に抗体レベルの増加が見られないということは、抗体の発生は真菌感染に対する患者の応答ではないことを示唆している。これに対し、免疫抑制療法を受ける大部分の患者が入院時に実際にアスペルギルス感染を有していたことを示唆している。興味深いことに、本発明者らのグループによる初期の疫学研究では(Chan et al., 2002, J. Clin. Microbiol. 40:2041-2045; Debeauvais et al., 1995, Can. J. Bot. 73:1087-1091)、症例の約 50% で I A の起源が院内にあったことを示している。この抗体検出試験では、I A 患者の約 50% (10 / 23 人) が入院時の感染であったことが示唆された。これらの結果は、免疫抑制前に定着している可能性があること、およびこの潜伏アスペルギルス感染が今、相当数の患者で I A の起源として推測されていることから、I A リスクのある患者にとっては最も重大である。抗体を探すということは、集中免疫療法およびその後の移植を始める前に、本質的なスクリーニングとなりうる。肺から真菌を排除する試みが行えるということから、これらの知見は総て、免疫抑制前の患者の管理に大きな影響を及ぼす。また、免疫不全状態における抗アスペルギルス抗体試験の重要性は、I A のピークが移植後 6 か月に移ること(Morgan et al., 2004, Med. Mycol. 00:1-10)、および集中管理室からの免疫適格患者の出現(Meersseman et al., 2004, Crit. Care Med. 170:621-625)という点でも強調される。

10

20

【 0 0 8 4 】

これまでの研究では、免疫不全患者の真菌感染にける循環抗原のクリアランスに多量の抗体の存在が関与している可能性があることが報告された。このような知見は、低い抗原レベルが高いマンナン抗体濃度と関連しているカンジダ感染でも繰り返し見られている(Sendid et al., 2003, J. Clin. Microbiol. 41:4551-4558; Sendid et al., 1999, J. Clin. Microbiol. 37:1510-1517)。アスペルギルス感染でもまた、いくつかの研究が、偽陰性抗原血症判定が、血清中に高レベルの抗ガラクトマンナン抗体の存在によることを示唆している(Herbrecht et al., 2002, J. Clin. Oncol. 20:1898-906; Marr et al., 2004, J. Infect. Dis. 190:641-649; Pinel et al., 2003, J. Clin. Microbiol. 41:2184-2186)。本発明者らの試験では、GM に対する抗体の存在が数種の血清では、低力価の抗原と関連していると思われ、GM 抗原濃度と抗 GM 抗体濃度間に統計学的に有意な負の相関は示すことができない。I A 偽陰性患者によっては、低レベルの GM と抗 GM 抗体がともに見られた。これらの偽陰性データは説明できないままであるが、Platelia キットにおいて偽陰性を作り出す抗体の能力を排除するか、または少なくとも最小とする。

30

【 0 0 8 5 】

これらの知見は総て、治癒または真菌の除去という点で、免疫抑制前の患者の管理に大きな影響を及ぼす。I A の起源としての潜伏アスペルギルス感染は今や相当数の患者に対して予測される。

【 0 0 8 6 】

表1 P. パストリスにおけるA. フミガーツス抗原の産生のために用いる材料

遺伝子 遺伝子バンク 受託番号	増幅プライマー ^a	方向	封入アミノ 酸配列 ^b	クローニング部位を 含むPCR産物 ^c	クローニングおよび (線状化)部位を含む クローニングベクター
X85092	7: GTTCTCGAGTCCCTGTGGTCCAGCCGCGC	5'-3'	17:(R)VPVVQPR	PEP(61-1185)	pKJ113
	8: TCCG/GATCCCTA(GTGATG) ₃ TGCCTGAGGGGCGAAGCCGAG	3'-5'	18: LGFAPQAH ₆ *	XhoI-BamHI	XhoI-BamHI (SmaI)
	9: CTGC/TCGAGCGCCTGICCAAGAAACTCGT	5'-3'	19:(R)APVQETR	ALP(61-1209) XhoI-	pKJ113
	10: AGCG/GATCCCTA(GTGATG) ₃ AGCAATGCCAATTGAGGCAAG	3'-5'	20:LAYNGNAH ₆ *	BamHI	XhoI-BamHI (EcoRI)
	11: CTGTTT/AAACATCCCGCTCACCAGTCTTAC	5'-3'	21:(K)HPAHQSY	MEP(55-1899) DraI-	pKJ111
	12: GTCTTT/AAACTA(GTGATG) ₃ ACAGACACCACCTGGGGACCTC	3'-5'	22: EVPSGVCH ₆ *	DraI	SmaI (BglII)
	13: TCGGAT/ATCGCCAATTGACGTCCTCGTCAACCA	5'-3'	23:(LA)IDVPRQP	DPPIV(43-2295)	pKJ111 SmaI (BglII)
	14: TGCGAT/ATCCTA(GTGATG) ₃ CAGAACAGACTTCITGCTCCA	3'-5'	24: WSKKSVLH ₆ *	EcoRV-EcoRV	
	5: GCG/AATTCCTTACACCTGAGCAGCTAATC	5'-3'	25:(EF)LTPEQLI	DPPV(55-2163)	pHLS1
	6: GCA/GATCTA(GTGATG) ₃ GTTATAATTCACAACCCGGAC	3'-5'	26: VPVVVNYNH ₆ *	EcoRI-BglII	EcoRI-BamHI (BglII)
	1: TAGC/TCGAGCCTCGCCCTCGACGCT	5'-3'	27:(RA)SPLDA	RNU(64-528)	pKJ113
	2: ACCG/GATCCCTA(GTGATG) ₃ AGAACACACAGTCTCAAGTC	3'-5'	28: DLRLCSH ₆ *	XhoI-BamHI	XhoI-BamHI (EcoRI)
	3: AATGC/TCGAGTATGTCCCTATATGACCGGC	5'-3'	29:(R)VCFYMTG	CAT(46-2010)	pKJ111
	4: GGTA/GATCTCTA(GTG) ₃ ATCCACGGGAAACCGGTC	3'-5'	30: DRFPVDH ₆ *	XhoI-BglII	XhoI-BamHI (BglII)
	15: CAAC/TCGAGAAAAGAGTCAAGGCTGTTGCTGTCCTC	5'-3'	31: VKAVAVL	SOD(4-1386)	pPICZea XhoI-NoI
	16: TAAGC/GGCCGCATTA(GTGATG) ₃ AGCGGGATACCAATGAC	3'-5'	32: VIGIAAH ₆ *	XhoI-NoI	(DraI)
RVU					
M55508					
U97574					
AF128886					

^a斜線は、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を示す。

^b括弧内は、認識部位配列にコードされ、A. フミガーツス抗原のN末端に付加されるアミノ酸を示し、アステリクスは停止を示す。

^c括弧内の数字は、A. フミガーツス抗原cDNA上の増幅産物のヌクレオチド位を表す。

^d太字の数字は配列番号番号に相対的なものである。

【表 2】

表2 ELISAによるアスペルギルス腫の診断におけるリボヌクレアーゼ (RNU)、カタラーゼ (CAT) およびジペプチジルペプチダーゼV (DPPV) の効率。患者数を表の上の部分に示し、感受性、特異性、陽性および的中率を患者応答に対して算出した%で評価する。3施設からのデータをプールし、1人の患者から複数の血清が得られた場合には各患者1血清を無作為に選択した。

	RNU	DPPV	CAT	CAT +	CAT +	RNU +	RNU +
				RNU	DPPV	DPPV	DPPV
							CAT
真の陰性	40	40	40	39	39	39	38
偽陽性	1	1	1	2	2	2	3
真の陽性	46	45	44	53	53	52	54
偽陰性	11	12	13	4	4	5	3
感受性	81 %	79 %	77 %	93 %	93 %	91 %	95 %
特異性	98 %	98 %	98 %	95 %	95 %	95 %	93 %
陽性的中率 (PPV)	78 %	77 %	75 %	91 %	91 %	89 %	93 %
陰性的中率 (NPV)	98 %	98 %	98 %	96 %	96 %	96 %	95 %

10

20

30

【 0 0 8 8 】

【表 3】

表 3 嚢胞性繊維症を持つまたは持たない患者における ABPA 診断のための判別抗原を示すスチューデント検定のデータ

レベル		
cf-abpa, DPPIV	A	
cf, DPPIV	B	
abpa, DPPIV	BC	10
cf-abpa, DPPV	BC	
abpa, RNU	BCD	
cf-abpa, CAT	CDE	
cf-abpa, SOD	CDEF	
cf-abpa, RNU	CDEF	
abpa, CAT	CDEFG	
対照, DPPIV	CDEF	
abpa, SOD	CDEFGH	
abpa, DPPV	DEFGHI	
cf, SOD	EFG	
cf-abpa, MEP	EFGHIJK	
対照, SOD	FGHIJK	20
cf, CAT	GHI K	
cf, MEP	IJKL	
cfabpa, PEP	HIJKLMN	
abpa, MEP	HIJKLMNO	
cf, PEP	J LM	
abpa, PEP	JKLMNOP	
対照, MEP	LMNO	
cf, RNU	LMNO	
cf, DPPV	LMNO	
対照, PEP	MNOP	
対照, CAT	NOP	
対照, DPPV	OP	
対照, RNU	P	30

同じ文字で結ばれていないレベルは有意差有り

【表 4】

表 4 嚢胞性繊維症集団における ABPA 患者および対照患者で個別にまたは併せて考えた場合の、3つの抗原 RNU、CAT および DPPV に対する抗体判定の結果 (凡例は表 2 と同じ)

	RNU	DPPV	CAT	CAT +	CAT +	RNU +	RNU +
				RNU	DPPV	DPPV	DPPV
							CAT
真の陰性	50	48	50	49	48	47	47
偽陽性	1	3	1	2	3	4	4
真の陽性	8	12	6	9	12	14	14
偽陰性	8	4	10	7	4	2	2
感受性	50 %	75 %	38 %	56 %	75 %	88 %	88 %
特異性	98 %	94 %	98 %	96 %	94 %	92 %	92 %
陽性的中率 (PPV)	86 %	92 %	83 %	88 %	92 %	96 %	96 %
陰性的中率 (NPV)	89 %	80 %	86 %	82 %	80 %	78 %	78 %

10

20

【 0 0 9 0 】

【表 5】

表5 IA患者の診断におけるリボヌクレアーゼ (RNU)、カタラーゼ (CAT)、ジペプチジルペプチダーゼV (DPPV) およびガラクトマンナン (GM) の効率。
計算は、入院時、免疫抑制療法前の患者の抗体応答に基づいて行った (凡例は表2と同じ)。

	RNU	DPPV	CAT	GM	
真の陰性	35	34	26	35	10
偽陽性	0	1	9	0	
真の陽性	3	7	18	4	
偽陰性	20	16	5	19	
感受性	13 %	30 %	78 %	17 %	
特異性	100 %	97 %	74 %	100 %	20
陽性的中率 (PPV)	64 %	68 %	84 %	65 %	
陰性的中率 (NPV)	100 %	88 %	67 %	100 %	

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】アスペルギルス腫および対照患者の血清中の7つの組換え抗原に対する抗体反応の図である。値は、3施設からの57人の患者および41人の対照のELISAの光学密度(OD)の平均値(患者1人当たり1血清)を示す。「診断可能性」の欄にアスタリスクがある抗原から得られるOD値は、施設、抗原および病変を因子とする3元配置分散分析において有意差がある(DPPIVは1施設でのみ有意)。

【図2】IEPバンド数および抗DPPV抗体レベルの相関図である(OD値で示されている)。直線のフィット(DPPVのOD値 = 0.3 + 0.05 IEPバンド数)は統計学的に有意である(p < .0001 誤差df 101)。

【図3】4人のアスペルギルス腫患者(Ben、Ber、Pin、Maz)の血清における、CAT、RNU、DPPVおよびGMに対する抗体レベルの追跡調査。抗組換え抗原抗体レベルは、OD値で示してある。CAT = 、DPPV = ; RNU = ; GM =

【図4】7つの組換え抗原に対するABPA患者およびそれぞれに対応するアトピー性または囊胞性繊維症対照の抗体反応を示す図である。示したOD値は、12人のABPAおよび16人のABPA/囊胞性繊維症および51人の囊胞性繊維症および37人の対照患者の平均である(患者1人あたり1血清、2施設)。データの有意性は表3に示す。

【図5】ABPA集団のそれぞれの対照からの分離を示す正準プロット(Canonical plot)。判別分析のために、総ての組換え抗原から得られたOD値を用いた。正準プロットは、最も離れた患者群の二次元におけるポイントおよび多変量平均を示す。円の大きさは、平均に対する95%信頼限界に相当する。有意差のある群は、円が交差ししない傾向がある。

【図6】4人のABPA患者(Aud、Bod、Aub、Del)の血清におけるCAT、RNU、およびDPPVに対する抗体レベルの追跡調査。抗組換え抗原抗体レベルは、OD値で示してある。バーは、臨床医により定められたABPAの期間を示す(CAT = ; DPPV = ; RNU =)。

【図7】IAであることが判明している23人の患者の階層的クラスタリング（ウォード法）。クラスタリングは、患者の入院時に採取された血清中のCATおよびDPPV抗原を用いるELISAにより得られたOD値に基づいている；a：抗体力価の高い患者；b：抗体力価の低い患者。

【図8】移植前の抗体力価が高いIA患者集団（a）は、患者集団bおよび対照集団とは異なっていたことを示す一元配置分散分析（患者のクラスタリングに関しては図7を参照）。ひし形部分の平均値は、サンプルの平均および95%信頼区間を示す。円は、スチューデントの両側検定を視覚化したものである：結果の有意性は、2つの円が交差しないことにより示される。

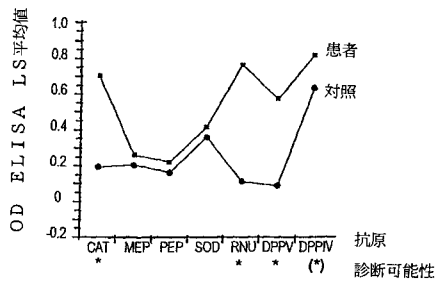
【図9】IAであることが判明している6人の患者における、RNU、CAT、DPPV、GMおよびGM抗原に対する抗体力価の漸進的变化。0日は、患者の入院時に最初のサンプルを採取した日である。移植（行われる場合）は、矢印で示されている。患者であるPIE、BARおよびRUDは、DPPVおよびCATに対する抗体レベルが高いことを特徴とするクラスター（図7参照）に属している。患者であるMOU、MORおよびGORは、CATおよびDPPVに対する抗原レベルの低い患者のクラスターbに属している。
 CAT = ; DPPV = ; RNU = ; GM = ; GM Ag (黒丸)

【図10】入院時の抗体レベルで判別された3つの患者集団（明らかなIA、IAが疑われるもの、または陰性）を示す正準プロット。判別分析のために、DPPV、GM、RNUおよびCAT抗原から得られたOD値を用いた。正準プロットは、最も離れた患者群の二次元におけるポイントおよび多変量平均を示す。円の大きさは、平均に対する95%信頼限界に相当する。有意差のある群は、円が交差しない傾向がある。

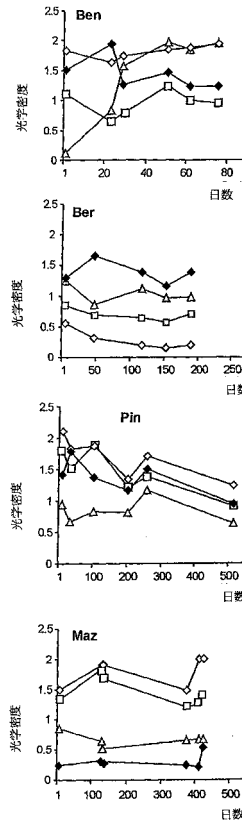
10

20

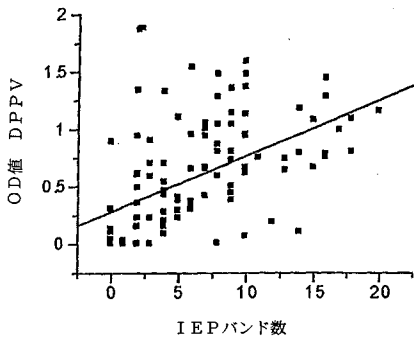
【図1】



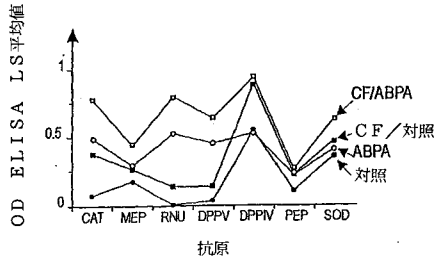
【図3】



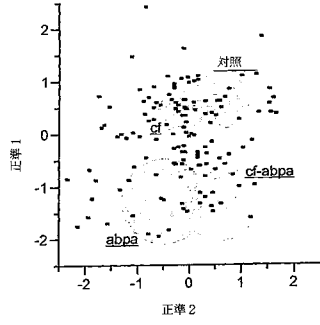
【図2】



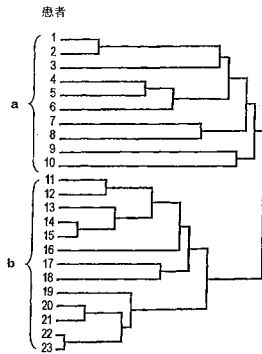
【 图 4 】



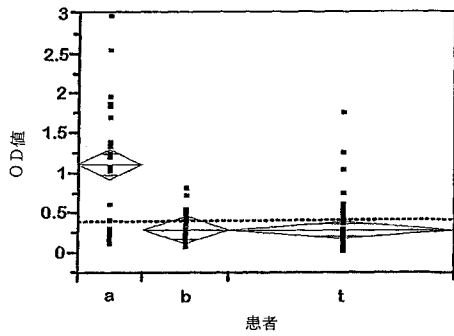
【 图 5 】



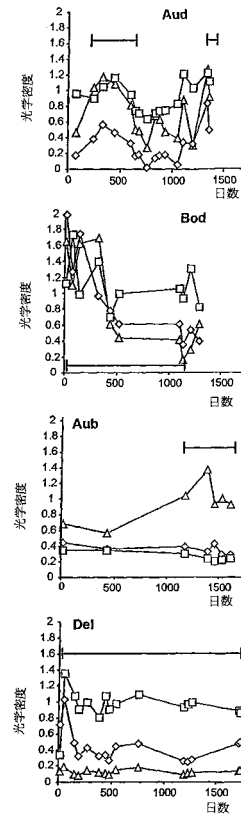
【 图 7 】



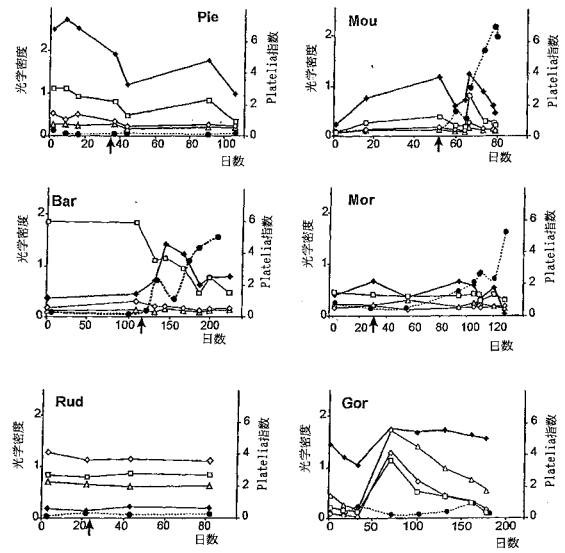
【 图 8 】



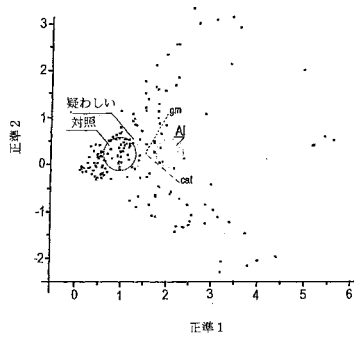
【 图 6 】



【 图 9 】



【 図 1 0 】



【 配 列 表 】

2009500620000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2006/003039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/569 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 104 768 A (COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH) 6 June 2001 (2001-06-06) the whole document page 7, line 18 - line 19	1-31
A	CALERA JOSE ANTONIO ET AL: "Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of <i>Aspergillus fumigatus</i> " INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 11, 1997, pages 4718-4724, XP002356599 ISSN: 0019-9567 cited in the application the whole document	1-31
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 January 2007		Date of mailing of the international search report 30/01/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer STRICKER, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2006/003039

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BEUVAIS A ET AL: "BIOCHEMICAL AND ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF A NEW DIPEPTIDYL- PEPTIDASE ISOLATED FROM ASPERGILLUS FUMIGATUS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 272, no. 10, 7 March 1997 (1997-03-07), pages 6238-6244, XP002047736 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document</p>	1-31
A	<p>US 2005/074410 A1 (CRAMERI RETO ET AL) 7 April 2005 (2005-04-07) the whole document</p>	1-31
P,X	<p>SARFATI JACQUELINE ET AL: "Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis." DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE AUG 2006, vol. 55, no. 4, August 2006 (2006-08), pages 279-291, XP002414702 ISSN: 0732-8893 Epub 2006 Apr 19 the whole document</p>	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2006/003039

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1104768	A	06-06-2001	NONE
US 2005074410	A1	07-04-2005	NONE

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100075812

弁理士 吉武 賢次

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74)代理人 100137497

弁理士 大森 未知子

(72)発明者 アン、ポーベ

フランス国イシ、レ、ムリノー、パサージュ、ド、ランデュストリ、3

(72)発明者 ジャン ポール、ドゥボピュイ

フランス国ル、ベシネ、ブルパール、ド、ベルジク、37

(72)発明者 ジャン ポール、ラジェ

フランス国イシ、レ、ムリノー、パサージュ、ド、ランデュストリ、3

(72)発明者 ソフィー、パリ

フランス国パリ、アブニュ、フェリ、フォル、64

(72)発明者 ジャクリーヌ、サルファティ

フランス国クラマール、リュ、ド、シャティリオン、72 - 76

Fターム(参考) 4B024 AA13 BA31 CA03 CA12 DA06 DA12 EA04 HA11

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009500620A5	公开(公告)日	2009-07-30
申请号	JP2008520024	申请日	2006-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	法国巴斯德研究所 研究所，国家，德，拉，城主，D，德，拉，RECHERCHE，医疗（安瑟伦）		
[标]发明人	アンボーベ ジャンポールドウボピユイ ジャンポールラジェ ソフィーパリ ジャクリーヌサルファティ		
发明人	アン、ボーベ ジャン-ポール、ドウボピユイ ジャン-ポール、ラジェ ソフィー、パリ ジャクリーヌ、サルファティ		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/56961 G01N33/6854 G01N2333/38 G01N2333/908 G01N2333/922 G01N2469/20 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/569.F G01N33/53.N G01N33/543.545.N C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA03 4B024/CA12 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/HA11		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	2005291428 2005-07-01 EP		
其他公开文献	JP2009500620A JP4959697B2		

摘要(译)

本发明涉及一种体外诊断曲霉菌的方法，该方法是通过测定对象的血清或血浆样品中针对至少两种核糖核酸酶（RNU），过氧化氢酶（CA）的组合的抗体的量来确定的。和二肽基肽酶V（DPPV）曲霉抗原。本发明还涉及包含所述组合的诊断试剂盒。