

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 166993

(P2003 - 166993A)

(43)公開日 平成15年6月13日 (2003.6.13)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	Q 4 C 0 8 4 N
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 17/00		A 6 1 P 17/00	
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/569	A
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 9 数)			

(21)出願番号 特願2001 - 370445(P2001 - 370445)

(22)出願日 平成13年12月4日(2001.12.4)

(71)出願人 302019245

タカラバイオ株式会社

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

(72)発明者 遠藤 政博

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

(72)発明者 大西 佳美

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

(72)発明者 竹迫 一任

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アトピー性皮膚炎の検出方法

(57)【要約】

【課題】アトピー性皮膚炎であるとの確定的な診断および原因抗原の同定を安全かつ正確になし得る、アトピー性皮膚炎の検出用試薬ならびにアトピー性皮膚炎の検出方法を提供すること。

【解決手段】単離された真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を有効成分として含有してなるアトピー性皮膚炎の検出用試薬、および前記アトピー性皮膚炎の検出用試薬と個体由来の被検試料とを接触させ、該検出用試薬に含まれる単離された真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片に対する該被検試料の I g E 抗体価を測定する工程、を含むアトピー性皮膚炎の検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を有効成分として含有してなるアトピー性皮膚炎の検出用試薬。

【請求項2】 真菌由来の抗原性タンパク質がマンガン型スーパーオキシドジスムターゼおよび/またはシクロフィリンである請求項1記載の検出用試薬。

【請求項3】 真菌がカンジダ属またはマラセチア属に属するものである請求項1または2記載の検出用試薬。

【請求項4】 真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片が不溶性担体に担持されたものである請求項1～3いずれか記載の検出用試薬。

【請求項5】 不溶性担体の形状が粒子状、シート状または容器状である請求項4記載の検出用試薬。

【請求項6】 請求項1～5いずれかに記載のアトピー性皮膚炎の検出用試薬と個体由来の被検試料とを接触させ、該検出用試薬に含まれる単離された真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片に対する該被検試料のIgE抗体価を測定する工程、を含むアトピー性皮膚炎の検出方法。

【請求項7】 被検試料が血清である請求項6記載のアトピー性皮膚炎の検出方法。

【請求項8】 IgE抗体価の測定を放射性免疫測定法(RIA)もしくは酵素免疫吸着測定法(ELISA)により行う請求項6または7記載のアトピー性皮膚炎の検出方法。

【請求項9】 請求項1～5いずれかに記載のアトピー性皮膚炎の検出用試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である真菌に対して抗菌活性を有する抗真菌剤を含有してなるアトピー性皮膚炎の治療剤。

【請求項10】 請求項6～8いずれかに記載のアトピー性皮膚炎の検出方法により真菌によるアトピー性皮膚炎が検出された個体に使用するための治療剤であって、該真菌が該検出方法に使用された検出用試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である、請求項9記載の治療剤。

【請求項11】 請求項6～8いずれかに記載のアトピー性皮膚炎の検出方法によりアトピー性皮膚炎が検出された個体に対する治療剤の選択方法であって、該検出方法に使用された検出用試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である真菌を確認する工程、ならびに確認された真菌に対して抗菌活性を有する抗真菌剤を該個体に対する治療剤として選択する工程、を含む治療剤の選択方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アトピー性皮膚炎の検出用試薬ならびにアトピー性皮膚炎の検出方法に関する。さらに本発明は、アトピー性皮膚炎の治療剤に関

する。

【0002】

【従来の技術】アトピー性皮膚炎の治療においては、非アトピー性とアトピー性の疾患では治療の方法が異なるため、まずアトピー性であるか否かを正確に診断することが重要である。また、原因となっている抗原を特定することが、適切な抗原除去療法、減感作療法を実施する上で重要である。

【0003】従来、アトピー性皮膚炎の診断は主に皮疹の性状や分布等の臨床的症狀から肉眼的あるいは問診により行われ、次いで100種を超える市販の抗原エキスや自製の抗原等の、原因抗原として疑われる粗抗原を用いて皮内テストを行い、原因抗原としての可能性の高い抗原が見つかったら、さらに放射性アレルギー吸着法(radioallergosorbent test; RAST法)等による血清中のIgE抗体価の測定、誘発テスト、または全血やリンパ球を用いたヒスタミン遊離試験を行うことにより原因抗原の同定が行われる。しかしながら、粗抗原は多くの不純物を含み、かつ明確な力価が規定されていないた

め、使用の際にはアナフィラキシー誘発や重篤な副作用の発生等の危険性を伴うため注意が必要である。また、これらの試験において血清におけるIgE抗体価の上昇を示す疾患としては、アトピー性皮膚炎以外に、気管支喘息、アレルギー性鼻炎等のアレルギー疾患、寄生虫疾患、肝炎、肝硬変、原発性肝癌等の肝疾患、全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患等が存在するため、IgE抗体価が高値であることが必ずしもアトピー性皮膚炎とは結びつかない。従って、従来の方法では、アトピー性皮膚炎であるとの確定的な診断ならびに原因抗原の同定を行うことは困難であった。すなわち、皮膚炎の症状を呈し、かつ粗抗原に反応する患者は、当該抗原に起因するアトピー性皮膚炎であると同様に診断されてしまう。

【0004】近年、アレルギーエキスの標準化の試みがなされており、一定の成果を挙げている。しかしながら、これらの標準化エキスは、含有成分量の安定化やロット間格差の減少などの長所はあるものの、やはり不純物を含んでおり、未だ使用の際の危険性を完全に排除し得るには至っていない。また、これまでに抗原性真菌としてのカンジダやマラセチアとアトピー性皮膚炎を含むアレルギー疾患との関連が多数報告されているが、アトピー性皮膚炎に特有の原因抗原の存在は未だ知られていない。

【0005】このように、アトピー性皮膚炎の確定的な診断および原因抗原の同定を安全かつ正確になし得る方法はこれまでには開発されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、アトピー性皮膚炎であるとの確定的な診断および原因抗原の同定を安全かつ正確になし得る、アトピー性皮膚炎の検出用試

薬ならびにアトピー性皮膚炎の検出方法を提供することを課題とする。さらに本発明は、アトピー性皮膚炎に対して著効を有するアトピー性皮膚炎の治療剤を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、
〔1〕 単離された真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を有効成分として含有してなるアトピー性皮膚炎の検出用試薬、〔2〕 真菌由来の抗原性タンパク質がマンガン型スーパーオキシドジスムターゼおよび/またはシクロフィリンである前記〔1〕記載の検出用試薬、〔3〕 真菌がカンジダ属または馬拉セチア属に属するものである前記〔1〕または〔2〕記載の検出用試薬、〔4〕 真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片が不溶性担体に担持されたものである前記〔1〕～〔3〕いずれか記載の検出用試薬、〔5〕 不溶性担体の形状が粒子状、シート状または容器状である前記〔4〕記載の検出用試薬、〔6〕 前記〔1〕～〔5〕いずれかに記載のアトピー性皮膚炎の検出用試薬と個体由来の被検試料とを接触させ、該検出用試薬に含まれる単離された真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片に対する該被検試料のIgE抗体価を測定する工程、を含むアトピー性皮膚炎の検出方法、〔7〕 被検試料が血清である前記〔6〕記載のアトピー性皮膚炎の検出方法、〔8〕 IgE抗体価の測定を放射性免疫測定法(RIA)もしくは酵素免疫吸着測定法(ELISA)により行う前記〔6〕または〔7〕記載のアトピー性皮膚炎の検出方法、〔9〕 前記〔1〕～〔5〕いずれかに記載のアトピー性皮膚炎の検出用試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である真菌に対して抗菌活性を有する抗真菌剤を含有してなるアトピー性皮膚炎の治療剤、〔10〕 前記〔6〕～〔8〕いずれかに記載のアトピー性皮膚炎の検出方法により真菌によるアトピー性皮膚炎が検出された個体に使用するための治療剤であって、該真菌が該検出方法に使用された検出用試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である、前記〔9〕記載の治療剤、〔11〕 前記〔6〕～〔8〕いずれかに記載のアトピー性皮膚炎の検出方法によりアトピー性皮膚炎が検出された個体に対する治療剤の選択方法であって、該検出方法に使用された検出用試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である真菌を確認する工程、ならびに確認された真菌に対して抗菌活性を有する抗真菌剤を該個体に対する治療剤として選択する工程、を含む治療剤の選択方法、に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】前記するように、従来のアトピー性皮膚炎の診断においては、アトピー性皮膚炎であるとの確定的な診断および原因抗原の同定を行うことは困難

であった。また、原因抗原を同定する際に使用する粗抗原は多くの不純物を含んでおり、副作用等が発生する危険性があった。

【0009】本発明のアトピー性皮膚炎の検出用試薬(以下、試薬という)は、アレルギー疾患全般に対し抗原性を有することが報告されている真菌に含まれるタンパク質成分に、意外にもアトピー性皮膚炎に対し特異的に抗原性を示し得るタンパク質成分が存在することを見出し、完成するに至ったものである。本発明の試薬は真菌より単離された当該タンパク質成分、すなわち、単離された抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を有効成分として含むことを1つの大きな特徴とする。従って、本発明の試薬と個体由来の被検試料とを接触させ、当該被検試料における前記有効成分に対するIgE抗体価を任意の方法により測定し、得られた測定結果に基づき、容易かつ迅速に当該個体のアトピー性皮膚炎を検出することができる。すなわち、当該個体がアトピー性皮膚炎であるとの確定的な診断を行うことができる。また、当該試薬に含まれている抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片こそが当該アトピー性皮膚炎の原因抗原であると同定することができる。

【0010】また、本発明の試薬を個体に投与することによるアレルギー反応の発生の有無を観察し、アレルギー反応の発生が確認された場合、直ちに当該個体はアトピー性皮膚炎であると判定(診断)することができ、同時に原因抗原の同定をも行いうる。

【0011】このようにアトピー性皮膚炎であると診断された場合、同時に個体の原因抗原が同定されることから、当該原因抗原の取得源である真菌に対し抗菌活性を有する抗菌剤を当該個体に対し治療剤として選択することで、当該個体のアトピー性皮膚炎に対し著効を有する治療剤を得ることもできる。

【0012】さらに、本発明の試薬は単離された抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を含むものであるので、従来の粗抗原に含まれていたような不純物は含まれておらず、抗原の力価算定も容易に行うことができるので、使用の際のアナフィラキシー誘発や重篤な副作用の発生等の危険性もない。

【0013】なお、本明細書において「個体」とは哺乳動物(たとえば、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒト)をいい、好ましくはヒトである。

【0014】本発明において有効成分として用いられる真菌由来の抗原性タンパク質としては、公知の精製方法に従って真菌から単離されたタンパク質であって、かつ少なくともIgE抗体と反応しうるタンパク質であれば特に限定されるものではない。また、同様に本発明において有効成分として用いられる前記抗原性タンパク質の抗原性断片としては、前記抗原性タンパク質の断片であって、かつ少なくともIgE抗体と反応しうる断片であれば特に限定されるものではない。抗原性断片として

は、たとえば、少なくとも抗原性タンパク質の抗原抗体反応の特異性および免疫原性を決定している構造を含んでなるものを挙げることができ、好ましくはエピトープまたは抗原決定基を含む抗原性タンパク質の断片を挙げるができる。

【0015】真菌としては特に限定されるものではないが、アレルギー疾患に対し抗原性が報告されているものが好ましい。たとえば、アルテルナリア属、アスペルギルス属、カンジダ属、クラドスポリウム属、ペニシリウム属、マラセチア属等に属する真菌を挙げるができる。中でもカンジダ属、マラセチア属またはアスペルギルス属に属する真菌がより好ましく、カンジダ属またはマラセチア属に属する真菌がさらに好ましい。

【0016】抗原性タンパク質の単離方法としては、たとえば、以下のような方法を挙げるができる。すなわち、所望の真菌を当該真菌に好適な公知の培養条件にて培養し、培養菌体を回収する。得られた菌体を細胞壁溶解酵素処理によりプロトプラスト化する。このプロトプラストを低張条件下でバーストさせ、遠心分離により可溶性の細胞質画分と不溶性の膜画分を得る。細胞質画分、ならびに界面活性剤により可溶化した膜画分を公知のタンパク質精製手段、たとえば、塩析、カラムクロマトグラフィー等に供することにより真菌由来のタンパク質成分を得る。次いで、得られたタンパク質成分につき、そのIgE抗体との反応性について調べ、IgE抗体と反応しうるタンパク質を単離し、真菌由来の単離された抗原性タンパク質とする。

【0017】IgE抗体との反応性は、本発明を特に限定するものではないが、たとえば下記のようなイムノブロット法によって調べることができる。上記のようにして得られたタンパク質をプロットしたメンブレンにアトピー性皮膚炎患者由来の血清を添加して反応させた後、メンブレンを洗浄する。このメンブレンと適切な標識を付加した抗ヒトIgE抗体とを反応させることにより、患者の有するIgE抗体と反応しうるタンパク質を検出する。患者由来IgE抗体との反応性が検出されたタンパク質を本発明において使用する抗原性タンパク質とする。

【0018】また、抗原性タンパク質の少なくとも一部のアミノ酸配列が判明している場合には、たとえば、当該アミノ酸配列を利用したハイブリダイゼーション法により真菌由来のcDNAライブラリーから前記アミノ酸配列を有するタンパク質をコードするcDNAを単離し、たとえば、公知の発現ベクターに導入し、大腸菌発現系を利用して組換え的に生産することにより抗原性タンパク質を得ても良い。

【0019】このようにして得られた本発明の抗原性タンパク質としては、たとえば、マンガン型スーパーオキシドジスムターゼ(MnSOD)、シクロフィリン等を挙げることができ、より具体的には、カンジダ属、マラ

セチア属またはアスペルギルス属に属する真菌由来のMnSODおよびシクロフィリンを挙げるができる。中でもカンジダ属またはマラセチア属に属する真菌に由来するものが好適であり、カンジダ属の真菌としてはカンジダ・アルビカンスが、マラセチア属の真菌としてはマラセチア・ファーファーが好適である。なお、アスペルギルス属の真菌としてはアスペルギルス・フミガタスが好適である。本発明の試薬としては、アトピー性皮膚炎の確定的な診断の正確性の観点から、MnSODおよび/またはシクロフィリンを含有してなる試薬が好適であり、カンジダ属またはマラセチア属に属する真菌に由来するものがより好適である。

【0020】抗原性断片は、たとえば、得られた抗原性タンパク質を酵素プロテアーゼを用いてランダムに消化し、各種ペプチド断片を得、次いで前記のようにしてそのIgE抗体との反応性について調べ、その結果、IgE抗体と反応しうるペプチド断片を選択することにより得ることができる。また、抗原性タンパク質のエピトープまたは抗原決定基を形成する部分のアミノ酸配列が既知の場合には、たとえば、当該抗原性タンパク質のプロテアーゼによる限定分解により当該アミノ酸配列を含むペプチド断片を得ることにより、あるいは真菌由来のcDNAライブラリーから当該アミノ酸配列に対応するcDNA部分を単離し、たとえば、公知の発現ベクターに導入し、大腸菌発現系を利用して組換え的に生産することにより、抗原性断片を得ても良い。

【0021】本発明の試薬は、たとえば、前記有効成分を任意の緩衝液(たとえば、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液等)に溶解することにより製造することができる。かかる場合、当該試薬は、溶液として提供されるが、一方、使用直前に、たとえば、滅菌水等の滅菌液体担体を加えて使用する凍結乾燥物として提供することもできる。また、当該試薬には、上記の緩衝成分の他、界面活性剤、防腐剤、安定化剤等のその他の成分を含有させることもできる。当該試薬における有効成分の含有量は特に限定されるものではないが、たとえば、後述する本発明のアトピー性皮膚炎の検出方法の第1の態様において使用する場合、個体由来の被検試料に含まれることが予想されるIgE抗体量に対して過剰量であるのが好ましい。

【0022】さらに、当該アトピー性皮膚炎の検出方法の第1の態様において、個体由来の被検試料、たとえば、血清試料中におけるIgE抗体の測定を行う場合に適した本発明の試薬としては、特に限定するものではないが、前記有効成分が不溶性担体に担持されてなるものを挙げるができる。また、当該不溶性担体の形状としては粒子状、シート状または容器状であるのが好ましい。かかる不溶性担体としては、たとえば、マイクロタイタープレート、遠心管、マイクロビーズ、メンブレン、ペーパーディスク等が挙げられる。なお、容器状の

担体においては、該担体に保持される溶液が接触する部位、例えばマイクロタイタープレートの場合にはウェル（穴）の部位に前記有効成分が担持される。本発明の前記有効成分の不溶性担体への担持は公知の方法により行うことができる。

【0023】また、後述するアトピー性皮膚炎の検出方法の第2の態様において使用する場合、本発明の試薬は、たとえば、抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片と、公知の安定剤もしくは担体、静菌剤もしくは抗生物質、抗酸化剤、投与対象の個体の血液と等張にする溶質等を含有してなる水溶性および非水溶性滅菌注射溶液、ならびに懸濁剤および増量剤を含有してなる水溶液および非水溶液滅菌懸濁液等として提供される。該試薬は、たとえば、封止されたアンプルおよび水薬瓶等の単回用量または複数回用量容器に入れられて提供されてもよく、また使用直前にたとえば注射用水等の滅菌液体担体を加えるだけでよい凍結乾燥された状態で提供されてもよい。また、その製造方法は公知の医薬品の製造方法に準じればよい。

【0024】当該試薬における前記有効成分の含有量は特に限定されるものではなく、当該試薬の単回用量に応じ、投与した個体において所望の免疫応答（アレルギー反応）の誘導が検出できるような範囲で適宜調整することができる。たとえば、試薬中の含有量としては、好ましくは0.1~100μg/ml程度である。

【0025】次に本発明のアトピー性皮膚炎の検出方法（以下、検出方法という）について説明する。本発明の検出方法は、本発明の試薬に含有される真菌由来の抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を認識するIgE抗体の個体での検出に基づくものである。

【0026】本発明の検出方法としては、本発明を特に限定するものではないが、たとえば、以下の態様を挙げることができる。

【0027】（1）本発明の試薬と個体由来の被検試料とを接触させ、該試薬に含まれる前記有効成分に対する当該被検試料のIgE抗体価を測定する工程、を含む方法（第1の態様）。本態様においては、前記被検試料中のIgE抗体量を測定し、個体に有意な量のIgE抗体の存在が認められた場合、個体のアトピー性皮膚炎が検出される、すなわち、当該個体はアトピー性皮膚炎であると確定的に診断される。また、使用した試薬に含有された抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片が原因抗原であると同定される。

（RASTの判定基準）

P R U 値	R A S T スコア	臨床的意義
<0.35	0	陰性
0.35-0.70	1	境界領域
0.70-3.5	2	陽性
3.5-17.5	3	強陽性
>17.5	4	最強陽性

*【0028】（2）本発明の試薬を個体に投与し、次いで当該個体におけるアレルギー反応の発生の有無を確認する工程を含み、当該反応の発生が確認された場合、当該個体においてアトピー性皮膚炎が検出される、方法（第2の態様）。本態様においては、本発明の試薬を個体に投与し、前記有効成分により誘導されるアレルギー反応の発生を指標として、個体のアトピー性皮膚炎が検出される、すなわち、当該個体はアトピー性皮膚炎であると確定的に診断される。また、使用した試薬に含有された抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片が原因抗原であると同定される。

【0029】前記第1の態様における「有意な量のIgE抗体の存在」とは、使用した本発明の試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を原因抗原であると認めるに足る量でIgE抗体が被検試料中に存在することをいう。そのような当該抗体の存在の程度は、たとえば、後述のRASTスコアにより好適に判定することができる。なお、被検試料としては、たとえば、血清を挙げることができる。

【0030】被検試料におけるIgE抗体価の測定方法としては、抗体の検出感度、その特異性の観点から、RAST、CAP system等の放射性免疫測定法（RIA）、MAST、AlloSTAT、QAS等の酵素免疫吸着測定法（ELISA）等が好適に使用される。

【0031】本発明の検出方法の第1の態様を、被検試料として血清を用い、IgE抗体価の測定をRAST法により行う場合について具体的に説明する。

【0032】RAST法においては、操作容易性の観点から、たとえば、本発明の有効成分をペーパーディスクに担持させてなる、本発明の試薬を用いるのが好適である。本発明の試薬と血清との接触は両者を混合することにより行われ、次いで、たとえば、室温（15~37）で0.5~12時間程度維持し、該試薬に含まれる有効成分と血清中のIgE抗体とを結合させる。さらに、放射性同位体（たとえば、¹²⁵I）で標識した抗IgE抗体を加えて、この結合能を測定することにより血清中のIgE抗体量を測定する。個体由来の血清中のIgE抗体価は、得られたIgE抗体量に基づきPRU（pharmacia RAST unit）として表される。PRU値には、以下のようにRASTスコアおよびその臨床的意義が規定されている：

【0033】前記RASTの判定基準に従い、RASTスコアが1以上の場合、個体のアトピー性皮膚炎が検出され、当該個体はアトピー性皮膚炎であると確定的に診断される。また、使用した試薬に含まれる有効成分が原因抗原であると同定される。

【0034】本発明の検出方法の第2の態様は、たとえば、以下のようにして行うことができる。

【0035】本発明の試薬の個体への投与は、特に限定されるものではないが、皮内投与または経皮投与により行うのが好適である。該試薬の投与量は、投与対象の個体において所望のアレルギー反応が検出できるような範囲であれば特に限定されるものではない。たとえば、投与対象の個体がヒトである場合、前記好ましい含有量範囲で抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を含有してなる本発明の試薬を皮下注射により投与する。また、パッチテストを行う場合には、前記本発明の試薬を皮膚に適用、たとえば、塗布する。各個体においては個体差（年齢、性別等）があるため、投与量は各場合に依りて適宜調整すればよい。次いで、たとえば、いずれの場合も一定期間、たとえば1～7日間経過後に、当該個体におけるアレルギー反応の発生の有無を確認する。確認は、アトピー性皮膚炎に特有の即時型反応を調べる公知の方法に従い、たとえば、本発明の試薬の適用部位の皮膚の発赤、湿疹の生成等を観察することにより行う。当該観察において何らかのアレルギー反応が認められた場合、当該個体においてアトピー性皮膚炎が検出され、当該個体はアトピー性皮膚炎であると確定的に診断される。また、使用した試薬に含まれる有効成分が原因抗原であると同定される。

【0036】また、本発明の別の態様としては、本発明の検出方法への使用に適し、アトピー性皮膚炎の確定的な診断およびその原因抗原の同定を容易かつ迅速に行うことができるアトピー性皮膚炎の検出用キットを提供する。かかるキットは、少なくとも本発明の試薬を含んでなる。当該試薬としては、保存に適する観点から、たとえば、凍結乾燥され、個装されているものが好ましい。また、RAST法等への使用に適する観点から、有効成分が不溶性担体に担持されてなるものが好ましい。

【0037】当該キットには、さらに任意に、検量のために標準として使用する各種濃度のIgE抗体や、被検試料中のIgE抗体価の測定に必要な試薬類（たとえば、放射性同位体で標識した抗IgE抗体等）が含まれていてもよい。

【0038】本発明の試薬、検出方法およびキットによれば、アトピー性皮膚炎の確定的な診断およびその原因抗原の同定を、安全に、しかも容易かつ従来に比しより正確に行うことができるので、アトピー性皮膚炎の個体に対しより有効で適切な処置（たとえば、抗原除去療法、減感作療法等）を施すことが可能となる。

【0039】また、本発明は抗真菌剤を含有してなるア

トピー性皮膚炎の治療剤を提供する。本発明の試薬を用いる前記検出方法によりアトピー性皮膚炎であると診断された個体は、当該試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片を原因抗原とする。それゆえ、当該抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である真菌の感染の関与が当該皮膚炎の原因である蓋然性が高く、当該真菌に対して抗菌活性を有する抗真菌剤は、本発明の検出方法によりアトピー性皮膚炎であると診断された個体の治療に有効である。

【0040】具体的には、本発明の試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源となる真菌に対して抗菌活性を有する抗真菌剤を含有してなるアトピー性皮膚炎の治療剤を提供する。より好適な態様としては、本発明の検出方法により真菌によるアトピー性皮膚炎が検出された個体に使用される治療剤であって、該検出方法に使用された試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である真菌に対して抗菌活性を有する抗真菌剤を含有してなる治療剤を提供する。すなわち、本発明の検出方法によりアトピー性皮膚炎と診断され、当該検出方法において使用された本発明の試薬に含まれていた抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片が原因抗原であると同定された個体に対しては、当該抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源となる真菌に対し抗菌活性を有する抗真菌剤を使用することが当該個体の治療においてはより有効である。

【0041】本発明の治療剤に含有される抗真菌剤としては、本発明の試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である真菌に対し抗菌活性を有するものであれば特に限定されるものではないが、より好ましくは、本発明の検出方法によりアトピー性皮膚炎であると診断された個体の原因抗原の取得源である真菌に対し抗菌活性を有する抗真菌剤が選択される。たとえば、原因抗原がカンジダ菌由来の抗原であると同定された場合、カンジダ菌の殺傷に対して有効な抗真菌剤（たとえば、フルコナゾール、イトラコナゾール、アンフォテリシンB等）を有効成分として含有する治療剤を提供することができる。当該治療剤によれば、本発明の検出方法によりアトピー性皮膚炎であると診断された個体の根本原因を直接的に排除することが可能となるため、非常に優れた治療効果が得られる。

【0042】本発明の治療剤は抗真菌剤のみを有効成分として含むものであってもよいが、抗真菌剤の抗菌活性を阻害しない限り、アトピー性皮膚炎に対し有効性が知られるその他の治療剤または予防剤を含有させてもよい。本発明の治療剤における抗真菌剤の含有量は特に限定されるものではなく、それぞれの抗真菌剤により異なり、適宜選択することが可能である。剤型や投与経路に応じて所望の効果をj得ることがjできる含有量であればよい。治療剤の剤型としては特に限定されるものではない

が、使用の容易性の観点から、軟膏、ローション剤、貼付剤等の経皮投与に適したものが好適である。また、当該治療剤の投与量としては、一般的には、たとえば、ヒトに適用する場合、好ましくは成人1回当たり患部に対し抗真菌剤の量に換算して1～100mg程度である。なお、治療剤は所望により単位用量形態で提供することもできる。本発明の治療剤は製薬分野の公知の方法で製造することができる。

【0043】さらに本発明の一態様として、アトピー性皮膚炎の治療剤の選択方法を提供する。すなわち、当該選択方法は、本発明の検出方法によりアトピー性皮膚炎と診断された個体に対し治療剤を選択する方法であって、(a)該検出方法に使用された試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の取得源である真菌を確認する工程、(b)確認された真菌に対して抗菌活性を有する抗真菌剤を該個体に対する治療剤として選択する工程、を含むものである。

【0044】工程(a)における真菌の確認は、本発明の検出方法により個体の診断を行い、その結果、アトピー性皮膚炎と診断された場合、当該検出方法を実施する際に使用された本発明の試薬に含まれた抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片こそが原因抗原であると同等されるため、当該抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片が、いずれの真菌に由来するものであるかを確認することにより行われる。通常、試薬に含まれる抗原性タンパク質および/またはその抗原性断片の由来は当該試薬を調製した時点で既知であるため、本発明の検出方法により当該個体がアトピー性皮膚炎であると診断された時点で、どの試薬を用いたかをチェックすることで真菌の確認を行うことができる。次いで、工程(b)において、確認された真菌に対し抗菌活性を有す*

*る抗真菌剤を当該個体に対する治療剤として選択する。かかる治療剤の選択方法により各個体に対して最も適切な治療剤の選択が可能となる。

【0045】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0046】実施例1

カンジダ・アルビカンス粗抗原(鳥居薬品製)の皮内投与に対して即時型反応を示す患者15名について下記の試験を行った。なお、これらの患者の主症状は、8名がアトピー性皮膚炎、7名がアレルギー性喘息であった。

【0047】これらの患者にカンジダ・アルビカンス由来の精製MnSODを皮内投与し、即時型反応を調べた。その結果を表1に示す。なお、表1中の数字は即時型反応を示した患者数とその割合(百分率:%)である。

【0048】表1に示すように、精製MnSODを皮内投与した場合、主症状としてアトピー性皮膚炎を示す患者では8名中6名が即時型反応を示したのに対し、アレルギー性喘息を示す患者では即時型反応を示した例はなかった。

【0049】以上の結果から、カンジダ・アルビカンス粗抗原ではアレルギー疾患(アトピー性皮膚炎、アレルギー性喘息)全般が検出されることになり、アトピー性皮膚炎患者とアレルギー性喘息患者とを区別することはできないのに対し、精製MnSODによればアトピー性皮膚炎患者だけを感度良くかつ高い特異性を持って検出できることが分かる。

【0050】

【表1】

アレルギー	主症状	
	アレルギー性喘息(7名)	アトピー性皮膚炎(8名)
粗抗原	7名(100%)	8名(100%)
MnSOD	0名(0%)	6名(75%)

【0051】実施例2

実施例1に示したアレルギー疾患患者15名のカンジダ・アルビカンス粗抗原および精製MnSODに対するIgE抗体価をRAST法により測定した。

【0052】臭化シアンによるペーパーディスクの活性化および精製MnSODのペーパーディスクへのカップリングは宮本らの方法(アレルギー、22巻、584-594頁、1973年)に準じて行なった。ポリスチレンチューブに精製MnSODをカップリングさせたペーパーディスク1枚と患者由来の血清検体(実施例1において得られたもの)50μlを加えて、室温で3時間インキュベートした。0.2%の Tween 20 を含む生理食塩水でペーパーディスクを3回洗浄後、ファルマシア製RAST-R

IAキットの¹²⁵I標識抗ヒトIgE抗体50μlを加えて、室温で一晩インキュベートした。再度3回洗浄後、ガンマカウンターで放射能を測定した。同時に測定したキットのリファレンス試薬で作成した標準曲線からIgE抗体価を算出した。標準曲線の上限(>17.5 PRU/ml)より高い値が得られた検体は、ウマ血清で10倍、又は100倍に希釈してから再度測定を行い、抗体価を算出した。

【0053】上記の測定の結果を表2に示す。表2に示されるように、カンジダ・アルビカンス粗抗原に対するIgE抗体はアレルギー疾患患者全般に存在するのに対して、精製MnSODに対するIgE抗体はアトピー性皮膚炎患者にのみ存在することが明らかになった。なお、アトピー性皮膚炎患者のうちIgE抗体価が検出限界(0.35PRU/

ml)であった患者は、実施例1において皮内テストで即時型反応を示さなかった2名であった。

*【0054】

【表2】

主症状	患者番号	I g E抗体価 (PRU/ml 血清)			
		粗抗原	RASTスコア	MnSOD	RASTスコア
アレルギー性喘息	10	0.92	2	<0.35	0
	14	0.9	2	<0.35	0
	17	0.93	2	<0.35	0
	15	0.5	1	<0.35	0
	21	<0.35	0	<0.35	0
	18	0.38	1	<0.35	0
	19	1.23	2	<0.35	0
アトピー性皮膚炎	4	1.14	2	1.36	2
	16	0.36	1	<0.35	0
	2	8.92	3	38.8	4
	27	<0.35	0	<0.35	0
	3	0.83	2	0.95	2
	7	2.67	2	54.1	4
	6	2.09	2	3.38	2
	5	2.29	2	4.94	3

RASTスコア：1以上で原因抗原であると認定される。

【0055】実施例3

実施例2と同様の試験を、実施例2とは異なる43名の患者について実施した。なお、これらの患者の主症状は、21名がアレルギー性喘息、22名がアトピー性皮膚炎であった。

【0056】また、カンジダ・アルピカンス粗抗原、精製MnSODに加えて、カンジダ・アルピカンス由来の精製シクロフィリンについても同様に血清検体中のIgE抗体価を測定した。前記シクロフィリンは、ジーン(Gene)、第96巻、第189-195頁(1990)に記載のカンジダ・アルピカンス由来のシクロフィリンをコードする遺伝子を大腸菌に導入し、当該大腸菌より精製して調製し、

*た。

【0057】その結果を表3に示す。表3中の数字は各アレルギーに関する陽性患者数、すなわちIgE抗体価が検出限界(0.35PRU/ml)以上であった患者数とその割合(百分率：%)である。

【0058】表3に示されるように、精製抗原であるMnSODとシクロフィリンに対するIgE抗体はアレルギー性喘息患者ではほとんど認められない。このことから、これらの精製抗原を使用することにより、アトピー性皮膚炎患者を特異的に検出できることが分かる。

【0059】

【表3】

アレルギー	主症状	
	アレルギー性喘息(21名)	アトピー性皮膚炎(22名)
粗抗原	7名(33.3%)	18名(81.8%)
MnSOD	0名(0%)	12名(54.5%)
シクロフィリン	1名(4.8%)	11名(50%)

【0060】実施例4

実施例2と同様の試験を、実施例2、3とは異なる43名の患者について実施した。なお、これらの患者の主症状は、21名がアレルギー性喘息、22名がアトピー性皮膚炎であった。

【0061】抗原として、マラセチア・ファーファー由来の粗抗原、ならびに精製MnSODを使用した。前記粗抗原としては、国際公開第97/21817号パンフレットに記載の方法で調製したマラセチア粗抗原を使用した。また精製MnSODは、国際公開第97/21817号パンフレットに記載のMF-3タンパク質をコードするcDNAを大腸菌に導入し、当該大腸菌より精製して調製した。

*【0062】その結果を表4に示す。表4中の数字は各アレルギーに関する陽性患者数、すなわちIgE抗体価が検出限界(0.35PRU/ml)以上であった患者数とその割合である。

【0063】表4に示されるように、精製抗原であるMnSODに対するIgE抗体はアレルギー性喘息患者では認められないのに対し、アトピー性皮膚炎患者では8割以上の患者でIgE抗体が陽性であった。このことから、精製MnSODがアトピー性皮膚炎患者の検出に極めて有用であることが分かる。

【0064】

【表4】

アレルギー	主症状	
	アレルギー性喘息(21名)	アトピー性皮膚炎(22名)
粗抗原	6名(28.6%)	22名(100%)
MnSOD	0名(0%)	18名(81.8%)

【0065】

50 【発明の効果】本発明により、単離された真菌由来の抗

原性タンパク質および/またはその抗原性断片を有効成分として含むアトピー性皮膚炎の検出用試薬、ならびに該試薬を使用するアトピー性皮膚炎の検出方法が提供され、アトピー性皮膚炎であるとの確定的な診断および原

因抗原の同定を安全かつ正確に行うことができる。また、アトピー性皮膚炎に対して著効を有するアトピー性皮膚炎の治療剤が提供される。

フロントページの続き

(72)発明者 加藤 郁之進
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 安枝 浩
神奈川県相模原市桜台18-1 国立相模原
病院臨床研究センター内

(72)発明者 秋山 一男
神奈川県相模原市桜台18-1 国立相模原
病院臨床研究センター内

Fターム(参考) 4C084 AA17 BA44 CA59 CA62 NA14
ZA892 ZB352

专利名称(译)	检测特应性皮炎的方法		
公开(公告)号	JP2003166993A	公开(公告)日	2003-06-13
申请号	JP2001370445	申请日	2001-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	宝酒造公司		
申请(专利权)人(译)	TakaraBio公司		
[标]发明人	遠藤政博 大西佳美 竹迫一任 加藤郁之進 安枝浩 秋山一男		
发明人	遠藤 政博 大西 佳美 竹迫 一任 加藤 郁之進 安枝 浩 秋山 一男		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P17/00 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/53.N A61K45/00 A61P17/00 G01N33/569.A		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/CA59 4C084/CA62 4C084/NA14 4C084/ZA892 4C084/ZB352		
其他公开文献	JP3840408B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够安全且准确地进行定性诊断性特应性皮炎和鉴定致病性抗原的特应性皮炎的检测试剂和特应性皮炎的检测方法。 解决方案：用于检测特应性皮炎的试剂，其包含作为活性成分的衍生自真菌和/或其抗原片段的分离的抗原蛋白，以及用于检测特应性皮炎的试剂和个体。 测量测试样品针对检测试剂中包含的分离的真菌衍生的抗原蛋白和/或其抗原片段的IgE抗体效价。 特应性皮炎的检测方法。

確認とくに真菌に対し抗原活性を有する

アレルギー	主症状	
	アレルギー性喘息 (7名)	アトピー性皮膚炎 (8名)
粗抗原	7名 (100%)	8名 (100%)
MnSOD	0名 (0%)	6名 (75%)