

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/00			K 4 B 0 6 3
		A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 11/06		31/10	4 H 0 4 5
31/10		37/08	
審査請求 未請求 予備審査請求（全 54数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 515971(P2001 - 515971)	(71)出願人	オイ メディックス バイオケミカ エー ビー フィンランド, エフアイエヌ - 02700 カ ウニアイネン, アセマティエ 13
(86)(22)出願日	平成12年8月4日(2000.8.4)	(72)発明者	パサネン, アンナ - リーサ フィンランド, エフアイエヌ - 70910 ヴ オレラ, ヴァーヴェロクヤ 12
(85)翻訳文提出日	平成14年2月5日(2002.2.5)	(72)発明者	ラウティアイネン, ヤーコ フィンランド, エフアイエヌ - 70700 ク オピオ, ベルトティエ 2 ビー 3
(86)国際出願番号	PCT/FI00/00668	(74)代理人	弁理士 安達 光雄 (外 2 名)
(87)国際公開番号	W001/011366		
(87)国際公開日	平成13年2月15日(2001.2.15)		
(31)優先権主張番号	19991675		
(32)優先日	平成11年8月5日(1999.8.5)		
(33)優先権主張国	フィンランド(FI)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 選択された指標真菌の抗原性成分およびその抗原性成分の方法と試験キットでの使用

(57)【要約】

本発明は三種の指標真菌のスタキボトリス・カルタルム、アスペルギルス・ベルシカラーおよびメムノニエラ・エキナータに特有でかつ環境中の普通に存在する他の真菌類と交差反応しない抗原性成分に関する。これらの抗原性成分の次のような使用方法も開示される：結合物質を生産するための使用、真菌汚染の特質および程度の評価、必要な治療処置および適用された治療処置の成功のチェックを行うのに使用する試験キットを製造するための使用、並びにヒトが指標真菌にさらされているかどうかおよび／またはヒトのアレルギー反応と指標真菌に対する暴露との間に関連があるのかどうかをチェックするための使用。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体を誘発することができ、そして一種以上の特定の指標真菌に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的にない抗原性成分であって；下記ステップ：

- (a) 抗原性成分を一種以上の指標真菌類から単離し、
 - (b) ステップ(a)で得た抗原性成分の、他の非指標真菌類由来の抗原性成分との交差反応性を確認し、
 - (c) 指標真菌類に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的にないこれら抗原性成分を選択する、
- ステップによって獲得できることを特徴とする抗原性成分。

【請求項2】 指標真菌類がスタキボトリス、アスペルギルスおよびメムノニエラの属の真菌類から選択される請求項1に記載の抗原性成分。

【請求項3】 指標真菌がスタキボトリス・カルタルムである請求項1または2に記載の抗原性成分。

【請求項4】 指標真菌がアスペルギルス・ベルシカラーである請求項1または2に記載の抗原性成分。

【請求項5】 指標真菌がメムノニエラ・エキナータである請求項1または2に記載の抗原性成分。

【請求項6】 抗原性成分が、組み換えDNA技法によって製造される請求項1～5のいずれか一つに記載の抗原性成分。

【請求項7】 選択された指標真菌またはその成分の存在の有無を検出するのに用いる試験キットを製造するための請求項1～6のいずれか一つに記載の抗原性成分の使用。

【請求項8】 真菌汚染の特質の評価、必要な治療処置および適用された治療処置の成功のチェックを行うのに使用する試験キットを製造するための、請求項1～6のいずれか一つに記載の抗原性成分の使用。

【請求項9】 真菌汚染の程度のスクリーニング、必要な治療処置および適用された治療処置の成功のチェックを行うために使用する試験キットを製造するための、請求項1～6のいずれか一つに記載の抗原性成分の使用。

【請求項10】 ヒトが指標真菌の汚染にさらされているかどうかおよび／またはアレルギー反応の原因が指標真菌に対する暴露であるのかどうかを、汚染にさらされている疑いがあるヒト由来の血清試料中の抗体の存在の有無を確認することによって評価するのに使用する試験キットを製造するための、請求項1～6のいずれか一つに記載の抗原性成分の使用。

【請求項11】 指標真菌類由来の抗原性成分を特異的に認識してそれに結合しかつ他の真菌類の抗原性成分を認識せずそれに結合しない結合物質を製造するための、請求項1～6のいずれか一つに記載の抗原性成分の使用。

【請求項12】 真菌汚染の特質と程度の評価、必要な治療処置および適用された治療処置の成功のチェックを行うため使用する試験キットを製造するための、一種以上の指標真菌類に特有でかつ他の真菌類との交差反応性が実質的にならない請求項1～6のいずれか一つに記載の少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識しそれに結合する結合物質の使用。

【請求項13】 結合物質が、結合ペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および／または前記ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のフラグメントから選択される請求項11または12に記載の使用。

【請求項14】 選択された指標真菌類の存在の有無を検出する方法であって；その検出が、下記ステップ：

(a) 環境試料を獲得し、次いで固体の環境試料を希釈および／または抽出することによって副試料の懸濁液を調製し、

(b) 前記副試料を、少なくとも一種の指標真菌に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的でない少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識することができる一種以上の結合物質と接触させる、
ステップを含んでなる免疫化学的検定法として実施される方法。

【請求項15】 真菌汚染の特質の評価、必要な治療処置、および適用された治療処置の成功のチェックを行う方法であって；その検出が、下記ステップ：

(a) 固体または液体の環境試料を獲得し、次に副試料の懸濁液を任意に希釈または抽出することによって調製し、

(b) 前記副試料を、少なくとも一種の指標真菌に特有でかつ他の非指標真菌

類との交差反応性が実質的にない少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識できる一種以上の結合物質と接触させ、次いで

(c) 環境試料における指標真菌類の存在の有無を直接または間接の手段で記録する、

ステップを含んでなる免疫化学的検定法として実施される方法。

【請求項16】 真菌汚染の程度のスクリーニング、必要な治療処置および適用された治療処置の成功の制御を行う方法であって；検出が、下記ステップ：

(a) 汚染の疑いのある異なる領域由来の二つ以上の環境試料を獲得し、

(b) 前記試料を、少なくとも一種の指標真菌に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的にない少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識できる一種以上の結合物質と接触させ、次いで

(c) 環境試料における指標真菌類の存在の有無を直接または間接の手段で記録する、

ステップを含んでなる免疫化学的検定法として実施される方法。

【請求項17】 適用された治療処置の成功をチェックする場合、サンプリングを、適切な間隔をおいて、少なくとも一回、再々繰り返すことを特徴とする請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】 選択された指標真菌類の存在の有無を、請求項14に記載の方法で検出するのに用いる試験キットであって；少なくとも一種の指標真菌に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的にない少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識できる一種以上の結合物質が入っている試験キット。

【請求項19】 真菌汚染の特質の評価、必要な治療処置および適用された治療処置の成功の制御を、請求項15に記載の方法で行うための試験キットであって；少なくとも一種の指標真菌に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的にない少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識することができる一種以上の結合物質が入っている試験キット。

【請求項20】 真菌汚染の程度のスクリーニング、必要な治療処置および適用された治療処置の成功の制御を請求項16に記載の方法で行うための試験キットであって；少なくとも一種の指標真菌に特有でかつ他の非指標真菌類との交

差反応性が実質的にない少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識することが
できる一種以上の結合物質が入っている試験キット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の属する技術分野**

本発明は、三種の毒素産生性指標真菌のスタキボトリス・カルタルム (*Stachybotrys chartarum*)、アスペルギルス・ベルシカラー (*Aspergillus versicolor*) およびメムノニエラ・エキナータ (*Memnoniella echinata*) に特有でかつ他の真菌類との交差反応性が実質的にない抗原性成分 (antigenic component) に関する。また、結合物質の製造；ならびに前記毒素産生性真菌の存在の有無の確認、真菌による汚染の特質と程度のスクリーニング、必要な治療処置、および適用された処置が十分かつ有効であったかどうかの制御を行うための試験キットの製造に対する上記抗原性成分の使用も開示する。また、ヒトが前記選択された指標真菌に暴露されたかどうかおよび/またはその暴露とアレルギー反応の間に関連があるかどうかをスクリーニングすることに対する前記抗原性成分の使用も開示する。

【0002】**従来の技術と発明が解決しようとする課題**

建築物内で真菌が増殖すると、アレルギー性および非アレルギー性の空気伝播粒子が生成することが知られている。真菌で汚染されている建築物内で生活したりまたは労働している人は、喘息反応およびその外の反復症状例えば刺激状態を再三起こすことが特徴である。真菌で汚染された建築物が入居者にとって適切かまたは安全であるかどうかを検出できることが非常に望ましい。環境汚染特に空気汚染とアレルギーの発生の増大との関係が認識されて、アレルギーの誘発が、真菌汚染で起こっているのかどうかまたは他の刺激因子によって起こっているのかどうかを決定するため容易にかつ迅速に監視しスクリーニングする方法と機器の開発を要望する声が高まっている。汚染物の有害作用は、好ましくは、治療処置を講じる前と講じた後に、特定の指標真菌の存在の有無を判断することによって評価しなければならない。これらの方法と手段は、好ましくは、現場条件下でまさに汚染場所で複雑な装置や特別の専門的技術なしで利用できないといけない。

【0003】

マイトキシシン類が主要な役割を演じているので、特定の毒素産生性真菌類、特にスタキボトリス属、メムノニエラ属およびエー・ベルシカラーの菌株の増殖を阻害しおよび／または排除するため、これら真菌を検出する方法の開発に対して多大の努力が集中されている。治療処置の効果を評価するには、有効な試験ベースの追跡試験が必要である。今までのところ、真菌汚染の特質と程度を日常的に確認し評価できる、成功した迅速でかつ信頼性の高い現場での方法および／または試験キットはまだ開発されていない。

【0004】

容易な現場での方法によって、真菌汚染を評価する標準を開発できるであろう。この方法と試験キットは、その標準が踏襲されていることを容易にチェックすることができる。またこの方法と試験キットは、不適正な条件によって起こる経済的損失を評価することもでき、かつ適用された治療処置が有害なまたは刺激性の真菌成分を除くのに成功したかどうかをスクリーニングすることによって、治療処置の効果をチェックするのに有利である。

【0005】

その結果、起こりうる健康上の危険、および汚染した環境における真菌に対する暴露を最少限にするための修復などの治療処置の研究や評価にたづさわっているかまたは関与していて、現役で活動している環境コンサルタント、産業衛生職員、安全職員、健康検査員、獣医などの職員は、正確かつ迅速で容易に利用できる現場試験キットが緊急に必要な多くの問題に、毎日の作業で遭遇している。上記の人々にとって、健康に対して有害な真菌で汚染されている可能性があることを示唆する症状の人が、診察を受けにきたときに、真菌汚染の特質、はげしさおよび程度を不偏検定システムで正確に評価できれば有利である。真菌汚染で危険なものと余り重篤でないものを識別できれば特に有利である。また、治療処置の効果を追跡することも有益である。また、汚染の重篤度を示す不偏検定の試験結果によって、緊急性の経費および必要な治療処置とその選択された処置の採算性をより正確に予想することができる。

【0006】

上記のことは、汚染建築物について研究していて関与している人々が遭遇することが多いいくつかの問題がある状態を網羅したものではない。指導する確認回答が緊急に要求されることが多いが、この問題に対する十分な解決策はまだない。有効で迅速な現場での評価を行うための方法と合理的に評価され容易に利用できる試験キットがないということは、この分野の専門家にとって重大な弱点である。

【0007】

従来、環境の真菌汚染の診断は、真菌の増殖の目視検査、臭気の検出もしくは分析、指標真菌を選択的に増殖させる培養培地上での環境試料の培養、または環境試料の顕微鏡検査に基づいている。しかし、建築物の真菌汚染が健康異変、例えばアレルギー反応の重大な原因になりうるという認識が高まり、治療法のみならず、有害な指標真菌の存在および汚染の特質と程度を評価する診断方法と診断手段に対する要望が急激に増大している。

【0008】

何年にもわたって、汚染材料中および問題の建築物の空気中の真菌を検出するのに、培養法が利用されてきた。しかし真菌の培養期間は比較的長い時間であり一般に少なくとも一週間続くので、培養法は、特に、最も適当な治療処置を選んで建築物から汚染物を除くため迅速な決断が必要な場合、遅すぎることはない。その上に、培養法では、生存可能な真菌粒子しか検出できず、空気伝播性真菌孢子の1～25%しか生存可能でないことはよく知られている。スタキボトリス属の真菌の場合、空気中に存在する孢子の10%のみ生存可能で、培養法で検出できると考えられている。したがって、真菌バイオマス(1,3-β-グルカンまたはエルゴステロール)、細胞外多糖類、真菌代謝産物(揮発性有機代謝産物またはマイコトキシン)および(生存可能のおよび非生存可能の)全真菌粒子の測定などの各種化学的方法や直接計数する顕微鏡法は、真菌の産物を検出する別の速い方法とみなされている。しかし、これらの方法の多くは、その開発がまだ進行中の段階であり、大部分の有害な真菌の種を認識するのに十分に特異的でないかまたは広く一般に使用するには高価すぎる。

【0009】

実際問題として、例えば、問題の建築物の治療処置が計画されているときには、特定の有害指標真菌の存在を緊急に検出する必要がある。このことは、スタキボトリス属などの毒素産生性真菌の汚染が疑われる場合、特に当てはまる。基質特異性 (substrate specificity) が広いためおよび真菌を識別する選択培地がないから、培養法は優れた方法ではない。化学的方法は、大部分の真菌に共通の真菌産物を測定することを目的としているので、特定の属または種の真菌の存在を示すにはあまりにも非特異的である。その上に、真菌の種を培養法や直接計数法で確認するには、いつでも利用できるわけではない特別の専門技術や十分な設備を有する実験室が必要である。したがって、マイコトキシンを環境試料から確認しようとしても、毒素を分析するには経費が高く特別の専門技術と実験設備が必要であり、かつ試験結果とその意味を説明するには不確かであるから不可能である。

【0010】

したがって、科学知識と実際の要望に基づいて、汚染された環境由来の各種材料の、健康上有害なスタキボトリス属などの指標真菌による汚染を検出するため新しい方法が必要であることは明らかである。免疫化学的方法は、上記目的の必要条件の大部分を満たしているので、優れた代替法である。免疫化学的方法は、一般に、関連する真菌に対して選択的でかつ鋭敏である。また、この方法は真菌の生存度と無関係である。しかし、ウエスタンブロッティング法、ELISA法などの免疫学的方法は高価な測定装置と十分な設備の実験室が必要である。このような免疫化学的方法は比較的長い時間がかかり実施しにくい。したがって免疫化学的方法は、信頼性が高く、簡単でかつ迅速な現場試験法の要求を十分には満たしていない。免疫化学的試験ストリップが、現場状況の問題の一解決策として提案されている。試験ストリップは、各種環境由来の各種試料中のスタキボトリス属などの選択された指標真菌の存在を検出するのに、実用上十分な正確さを提供する。試験ストリップは、使用するのに、高価な設備または特別な専門技術を必要としない。事実、免疫化学的方法に基づいたいくつかの商業製品および試験法は特定のマイコトキシンに対して利用できるが、今までのところ、特定の指標真菌類を他の真菌類から特異的に検出して識別できる製品は開発されていない。

毒素は、測定するための最良の産物ではない。なぜならばスタキボトリス属、メムノニエラ属またはエー・ベルシカラーのすべての菌株が毒素を産生するわけではなく、すなわち毒素産生は、例えば建築物を構築中に、真菌の増殖中、特定の条件によってのみ開始されるからであり、およびこれらの種は非常に広い範囲の各種毒素を合成することができ、その毒素はすべて、まだ正確に特性が決定されていないので、マイトトキシン類を検出するということは適切な選択ではないからである。したがって、測定するため望ましい真菌産物は、スタキボトリオトキシン (stachybotryotoxin) に限定してはならず、スタキボトリス属の種の真菌などの全微生物を、スタキボトリオトキシンの代わりに確認できなければならない。

【0011】

いくつかの真菌の種が、アレルゲン性であり、アレルギー障害を起こすことが知られている。免疫グロブリンE (IgE) によって仲介される真菌アレルギーは、皮刺試験または血清試料中の抗原特異的IgE抗体の検出によって証明されている。しかし、同じ属の真菌の種が、各種の程度で交差反応を行うことが報告されており、また異なる真菌の属の種の間交差反応も観察されている。この交差反応性の一つの理由は、異なる真菌の種の抽出物が同じかまたは類似のアレルゲン性成分を含有しているということまたは多糖類と抗体の非特異的結合の結果である。真菌抽出物が臨床の試験や研究に広く使用されているにもかかわらず、真菌抽出物の交差反応性成分の特性決定にはほとんど注意がはられていない。交差反応性は、測定すべき真菌産物を、免疫化学的現場試験法を開発するために選ぶときに、考慮しなければならない要因である。

【0012】

本発明の方法、本発明の試験キットを構成する試験ストリップまたは試験スティックは、十分に特異的で選択性の迅速な免疫化学的方法と試験キットを提供することによって、上記問題の解決策を提供している。本発明の試験キットは、特定の潜在的に危険な指標真菌由来の一種以上の抗原性成分を、別々に一つずつまたは任意に組み合わせて、連続的にまたは同時に、同じ試料源から特異的に認識することができる。本発明の方法と試験キットは、汚染の特質と程度の有効で迅

速な評価および起こりうる健康上の危険、治療処置の必要性などの評価を行うことができる。

【0013】

したがって、本発明の目的は、有害な真菌の増殖の存在を検出し抑制し、そして指標真菌が起こす可能性がある健康上の危険を評価して、適当な治療処置を適用することによって特定の真菌が増殖するのを防止する改良された方法を提供することである。本発明の別の目的は、前記方法を実施するのに用いる手段を提供することである。その手段には、前記指標真菌が起源の、特異的な抗原性もしくはアレルゲン性の真菌成分、および前記抗原性の真菌成分を選択的に認識する結合物質などの物質が含まれる。

【0014】

課題を解決するための手段

本発明は、特定タイプの真菌汚染を検出する新しい方法を提供することによって、上記諸問題点の解決策を提供するものである。前記方法に利用される方法および産物と手段は、本発明の特許請求の範囲に定義されているとおりである。

図面の簡単な説明

図1はエス・カルタルム(A)、エム・エキナータ(B)およびエー・ベルシカラー(C)の抽出物のSDS-PAGEプロフィールを示す図である。

図2はエス・カルタルム特異的ウサギ抗血清によって認識されるエス・カルタルム(A)、エム・エキナータ(B)およびエー・ベルシカラーの抽出物の成分を示す図である。

図3は異なるエス・カルタルムの製剤のイムノプロットングを示す図である。

レーン1 エス・カルタルム特異的ウサギ免疫血清に対しイムノプロットされた、未処理エス・カルタルム抽出物。

レーン2 エス・カルタルム特異的ウサギ免疫血清に対しイムノプロットされた、過ヨウ素酸塩で処理されたエス・カルタルム抽出物。炭水化物の除去は、18, 19, 32, 36および41 kDaの成分に対する抗体の結合に影響した。

レーン3 カビの多い建築物内でエス・カルタルムに感作された患者の血清に

対シイムノプロットされたエス・カルタルムの、未処理のHPLCで精製された50kDaの成分（矢印）。

レーン4 カビの多い建築物内でエス・カルタルムに感作された患者の血清に
対シイムノプロットされたエス・カルタルムの、ヨウ素酸塩で処理されて、HPLCで精製された50kDaの成分（矢印）。

【0015】

発明の実施の形態

諸定義

本発明で使用される用語は、ヒトや動物の医学と診断の分野、特に現場での診断、真菌学、毒性学、免疫学および免疫化学の分野で一般にもっている意味を有している。しかし、いくつかの用語は、このような状況で、いくぶん外れているかまたは広い意味で使用される。したがって、意味が不明瞭な用語で起こる不明確さを避けるため、本明細書および本願の特許請求の範囲に使用されるいくつかの用語を以下により詳細に定義する。

【0016】

用語「評価する」は、記録された測定可能なまたは目視で検出可能な試験結果から真菌汚染の特質と程度を、および治療処置が成功したかどうかを判断もしくは評価することを意味する。その「評価」は、前記「抗原性成分」を特異的に認識してそれに結合する「結合物質」を使用して行われる特定の指標真菌の抗原性成分またはアレルゲン性成分の確認、測定または検定に基づいている。

【0017】

用語「環境試料」は、真菌で汚染されている疑いがある環境由来の物質またはダストの副試料を意味する。このような副試料は、建築材料、建築物、蓄積したダスト、下地材料、飼料、食品などから入手できるかまたは収集できる。その副試料は、代表的なものでなければならず、すなわち、被害を受けた領域または汚染領域を十分にうまく示さねばならない。

【0018】

用語「特異的に認識し結合する」は、特定の真菌汚染物いわゆる指標真菌を検出するために使用される物質が、指標真菌に特有の成分を検出するが、大部分の

真菌に共通の他の真菌成分を検出しないことを意味する。

【0019】

用語「指標真菌」は、健康に対して有害な作用があることが立証されている特定の毒素産生性真菌を意味し、これらの真菌は、それら真菌の健康に対する有害な特質と毒素を産生する容量に基づいて、本発明用を選択されている。「指標真菌」が存在しているのは、健康上の危険を避けるために治療処置が緊急に必要であることを示している。本発明の目的を達成するために選択される最も好ましい「指標真菌」は、スタキボトリス属、アスペルギルス属およびメムノニエラ属の真菌から選択され、特に、毒素産生性の種すなわち、スタキボトリス・カルタルム、アスペルギルス・ベルシカラーおよびメムノニエラ・エキナータが含まれている。

【0020】

用語「非指標真菌」は、偏在しているが、本発明の「前記指標真菌」と同程度まで毒素産生性でない他の真菌を意味する。これらの真菌は、極端に健康に有害な作用を起こさないと考えられる。「非指標真菌」が検出されたならば、誤った警報を生じ（この誤った警報は、不必要でかつ一般に非常に高価な特別の治療処置と保護処置を避けるために望ましくない）、その治療処置が実施される。非指標真菌による汚染は、ある種の治療処置を自然にもたらすがその作用は極端に切迫した広範囲のものではない。例えば、非指標真菌は、毒素産生指標真菌による汚染の場合のように、治療処置中、修理工や入居者が暴露しないように特別の保護処置を講じる必要がない。

【0021】

用語「交差反応性」は、抗体が、その抗体の産生をもともと誘発しなかった抗原に結合できることを意味する。同じ属の真菌の種は、各種の程度で交差反応を行うと報告されている。さらに、交差反応性は、異なる真菌属の種の間でも観察されている。交差反応性の一つの理由は、異なる真菌の種の抽出物が同じかまたは類似のアレルゲン性成分または免疫原性成分を含有していることがありまたは非特異的結合が糖タンパク質類、多糖類および抗体類の間に起こるということである。

【0022】

用語「交差反応性がない」は、抗原性成分によって誘発されるか、またはその抗原性化合物に特異的に結合する選択された抗体または結合物質は、非指標真菌を認識して結合することはないが、指標真菌のみを認識することを意味する。言い替えると、「交差反応性がない」ことは、指標真菌に特有のことである。

【0023】

用語「選択」は、所望の特性、例えば特異性を有しおよび/または交差反応性を欠いているという特性を有する特定の成分が、その特性例えば交差反応性が、他の真菌の特性または交差反応性と比較されて、大きな群の抗原性成分から単離することによって選択されることを意味する。

【0024】

用語「製造」は、所望の特性を有する「抗原性成分」を、通常の方法で単離、精製、特性値の決定および選択を行い、その後、それ自体公知の組み換えDNA技法によって製造することを意味する。またこの用語には、前記「抗原性成分」を特異的に認識しおよび/またはこの成分に結合する「結合物質」の製造、ならびに通常の免疫化学的方法、ハイブリドーマ法および組み換えDNA法によって「結合物質」を製造するための抗原性成分の使用も含まれる。前記「抗原性成分」および「結合物質」は、指標真菌の存在の有無を確認しかつ真菌による汚染の特質と程度を評価する方法の試験キットを製造するのに使用できる。

【0025】

「抗原性成分」として有用な成分を含有する製剤または組成物は、例えばクロマトグラフィー精製システム・ゲル濾過クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、例えばレクチンカラムのアフィニティークロマトグラフィーなどの単離・精製方法で製造することができる。得られた成分は、SDS-PAGE、ウエスタンブロットティング法などで特性を決定することができ、そして交差反応性はそれ自体公知の方法で試験することができる。

【0026】

用語「真菌汚染の特質」は、例えば毒性成分が存在している確率が高いため真

菌の汚染が重大で、かつ前記毒性成分または汚染が、その汚染の近くで暴露された人に衝撃を起こす明らかな健康上の危険性を有していることを意味する。一般に、特別な緊急の治療処置例えば広範囲にわたる修復、衛生および保護の処置が必要である。用語「真菌汚染の程度」は、健康に有害な真菌で汚染された広さを意味し、またどの位広く広がっているか、または結露とその結露で起こる真菌汚染による被害がどの程度大きくて重大であるかも示している。

【0027】

用語「診断」は、環境コンサルタント、医師、獣医などが、特定の免疫検定法または試験キットで得た試験結果に基づいて、ヒトが指標真菌の汚染にさらされているかどうかおよび/またはその暴露とアレルギー反応の間に関連があるかどうかを決定することを意味する。このような場合、真菌に暴露された疑いのある人から得た血清試料中に抗体が存在していることは、指標真菌に暴露されたことを示す確証的試験結果であり、一方、抗体が存在しないことは暴露された可能性がないことを意味する。

【0028】

用語「直接手段」には、抗原性成分の凝集が対応する抗体の存在下で起こる免疫検定法が含まれている。その凝集は、反応中に発生した濁度として、目視または分光測光法で記録することができる。換言すれば、それは抗原と抗体だけが必要であることを意味し、一方、用語「間接手段」は、結合物質すなわち抗体または抗原性成分が、それらに適切なマーカーもしくは標識、例えばラテックス粒子、金属合金、リポソーム、酵素、蛍光色素などをつけることによって検出可能にされることを示している。

【0029】

用語「抗原性成分」は、真菌起源の免疫原性成分を意味し、その成分に対する抗体を誘発することができる。結論として、本発明におけるその最も広い側面の「抗原性成分」は、アレルゲン性成分のみならず、特定の指標真菌に一般的なおよび/または特有の成分、好ましくは、他のいわゆる「非指標真菌」由来の抗原性成分と交差反応を行わない抗原性真菌成分もカバーしている。本発明の最も好ましい実施態様で、用語「抗原性成分」には、真菌汚染の特質と十分な相関関係

を示しているアスペルギルス・ベルシカラー、スタキボトリス・カルタルムおよびメムノニエラ・エキナータの抗原性製剤から得ることができる成分が含まれている。

【0030】

「抗原性成分」および/またはその量は、結合タンパク質または結合ペプチドおよび抗体を含む、前記標識真菌の抗原性成分を特異的に認識する「結合物質」によって測定される。用語「指標真菌を認識する結合物質」は、その最も広い側面で、少なくとも一種の好ましくは二種以上の抗原性成分もしくはその少なくとも一部を特異的に認識しそれと結合できる物質を意味する。このような物質は、例えば、抗原性成分と特異的に結合することができるが他の抗原性成分と交差反応を行うことができない受容体または結合タンパク質または結合ペプチドである。とりわけ、結合物質は、本発明の前記3種の指標真菌の一種以上の抗原性組成物を、別個にまたは組み合わせて特異的に認識できる抗体を意味する。これらの抗体としては、ポリクローナル抗体および/またはモノクローナル抗体およびこれら抗体のフラグメントまたは誘導体がある。必要な前提条件は、前記「結合物質」が、上記抗原性成分の少なくとも一種を特異的に認識し他の抗原性成分と交差反応をしないことである。

【0031】

前記「結合物質」は、本発明の「抗原性成分」のいずれかならびにそのフラグメント、誘導体および複合体を使用して発生させることができるが、唯一の前提必要条件は、「抗原性成分」が「抗原」として作用できることすなわち抗体を誘発することができることである。したがって、用語「結合物質」は、前記抗原性成分またはその抗原性成分を含有する組成物もしくは物質に対して特異的な抗体反応を誘発できる組成物または物質を意味する。前記抗体類は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の従来製造方法によって製造できる。モノクローナル抗体の製造方法としては、ハイブリドーマ法がある。抗体もしくは他の結合分子または特異的な結合ペプチドのような化合物は、ファージディスプレイ法で発生させて、組み換えDNA法で製造することができる。すべての方法が、当業技術者にとって周知の方法であり、実験便覧に記載されている。最も新しい技

法として、合成ポリマーの結合物質が発展している。

【0032】

用語「免疫検定法」は、前記抗原または被検成分に結合できる特異的な抗原および／または抗体を使用するリガンド結合検定法、すなわち前記3種の指標真菌由来の「抗原性成分」を検出および／または測定することができる方法または手順を意味し、その検定法において有効で特異的な試薬としては前記「抗原性成分」と特異的に結合できる少なくとも一種の抗体またはその一部分がある。また、免疫検定法の原理は、患者の血清中の真菌抗原に対する抗体を検出するのに使用することもできる。これら抗体は、対応する真菌の抗原性成分に対するこれら抗体の特異的結合によって測定される。

【0033】

使用される免疫検定法によって、特に競合免疫検定法および／または定量検定法では、本発明の「抗原性成分」は任意の試薬それぞれの標準として使用される。免疫検定法がよく知られている例は、放射線免疫検定法(RIA)、ラジオイムノメトリックアッセイ(IRMA)、蛍光イムノメトリックアッセイ(IFMA)、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、蛍光免疫測定法(FLA)、発光免疫測定法、免疫凝集測定法、タービディメトリックイムノアッセイ(turbidimetric immunoassay)、ネフェロメトリックイムノアッセイ(nephelometric immunoassay)などである。これらの方法はすべて、当業技術者によく知られており実験便覧に記載されている。基本タイプの免疫検定法としては、特に、以下に定義されている「サンドイッチアッセイ」がある。

【0034】

用語「サンドイッチアッセイ」は、一種の抗体(または抗原分子)を使用して対象の被検成分を捕獲しながら別の一種の抗体(異なる特性を有するものが多い)を使用して検出する検定法を意味する。また用語「サンドイッチアッセイ」は、被検成分の固相への化学的結合もしくは免疫化学的結合、および被検成分の固相への免疫化学的結合、および第二の(標識付き)試薬の被検成分への免疫化学的結合を使用するイムノアッセイも意味する。換言すれば、用語「サンドイッチ

アッセイ」は、試料中の抗体または抗原の量を検出または定量できる、少なくとも二種の抗体もしくは一種の抗体および一種の抗原を使用するイムノアッセイを意味する。例えば、抗原の二種の非オーバーラッピング（非競合）エピトープに結合できる二種の抗体を使用することができる。下記のように、異なるタイプの「サンドイッチアッセイ」がある。

【0035】

用語「ラテラルフロー法（Lateral Flow Technique）」は、免疫クロマトグラフィーの原理を使用するイムノアッセイを意味する。ラテラルフロー法は液体の形態の試料または被検溶液が試験ストリップにそって移動することが一般的であり、被検溶液を試験装置の膜を通じて流動させる「フロースルー法（Flow-Through Technique）」とは対照的である。

【0036】

用語「フロースルー法」は、前記サンドイッチ法に基づいていることが多いイムノアッセイを意味する。抗原を含有する試料または被検用液をスポットとして適用して、装置の膜を通じて拡散させる。

【0037】

用語「現場アッセイ」は、汚染の領域または現場で実施できる試験法を意味する。現場アッセイは試料を輸送する必要がなくそして実験設備なしでかつ適格な実験要員を必要とせずに実施される試験と手順を意味する。この用語は、病院および健康管理機関で利用される用語「ベッドサイドアッセイ（bed-side assay）」に類似している。用語「現場アッセイ」は、環境コンサルタント、産業衛生職員、健康検査員などの現場条件下で責任がある専門家が行う試験を意味する。また、汚染した建築物に入居している人が実施できるいわゆる「自己試験」も含まれる。「現場アッセイ」は好ましくは、試験ストリップのような「固体キャリア」上で実施される。各種のアレルゲン性成分を、同じストリップまたはスティック上で同時に検出することができる。

【0038】

発明全体の説明

真菌の汚染を診断する従来の方法は、真菌汚染の特質と程度を示すのに完全に

満足すべき方法ではなく、特別に健康上危険な指標真菌と危険性が低い普通の真菌を識別することができない。特定の真菌ペプチドが、建築物の真菌汚染の健康上有害な特性を評価する際に、他の真菌ペプチドより特異的であり、そして異なる汚染を診断するとき、特異性と選択性になんらかの差があるという事実に基づいて、本発明の発明者らは、特定の指標真菌由来で他の真菌と大きな交差反応性を示さない選択された特異的抗原性成分の免疫化学的測定に基づいて、真菌汚染の特質と程度を評価する方法と試験キットを開発した。

【0039】

真菌汚染の特質および関連する健康上の危険は特定の真菌に関連がある。特に、スタキボトリス属の真菌例えばエス・カルタルムのみならずその他の真菌、例えばメムノニエラ・エキナータやアスペルギルス・ベルシカラーは、特定の条件下で、いくつもの毒性が高い代謝産物（スタキボトリス属およびメムノニエラ属の真菌によるトリコセシン類およびエー・ベルシカラーによるステリグマトシチン）を産生する。トリコセシン類の激しい産生が、壁紙、石膏板、乾草やわらの湿った高セルロース含量で窒素含量が少ない材料に特に観察されている。汚染した飼料の摂取が動物のマイコトキシンに対する主な暴露経路である。トリコセシン類またはエー・ベルシカラーの毒素に暴露された後の動物の中毒症の症状としては、目、皮膚および粘膜の中毒性刺激と、これに続く、多くの器官（特に腎臓と肝臓）の壊死、血液パラメータの変化、出血および催奇形成と発癌性の作用、および毒素の摂取量によっては催奇形成と発癌性作用を含む免疫系の重篤な障害がある。ヒトの場合、汚染材料に手が触れることと、孢子を含有する空気伝播性の毒素含有孢子の吸引が、最も可能性が高い暴露経路である。したがって毒素にさらされる危険を、農業家ならびに毒素産生性の指標真菌で汚染されている建築物の入居者および／または補修員は避けることができない。ヒト中毒症の急性症状としては、いくつもの毒性、刺激性および非特異的症状があり、例えば、皮膚炎、咳、鼻炎、口腔道や鼻腔道の灼熱感、咽喉痛、発熱、頭痛、下痢、倦怠感と疲労感、痛みを伴うことがある重篤な咽頭炎と鼻の灼熱感、ならびに血液のまじった鼻滲出液がある。吸引によってさらされたヒトの中毒症の長期間の健康に対する作用はまだ分かっていない。スタキボトリス属の真菌とエー・ベルシカラ

ーは、その健康に対する有害な特性のために、室内空気の専門家が、建築物内の結露および／または健康上の問題点に関連する最も重大な二つの指標微生物と指定している。現在の知識では、特にスタキボトリス・カルタルムが、恐らく、結露の問題をかかえている建築物の最も危険な真菌であり、汚染された建築物の入居者の結露による損傷と健康に対する厳しい作用が進行していることを示す。最近の研究が、もう一つの真菌、メムノニエラ・エキナータの増殖が、汚染された材料中のスタキボトリス・カルタルムの存在と関連していることを示した。エム・エキナータの純粋培養物も、エス・カルタルムと類似のまたは同じ毒素を産生することが指摘されている。エム・エキナータに対する暴露によって起こる健康上の危険について刊行されている証拠は限定されているが、この真菌は、徹底的な研究の対象であり、そして恐らく、従来、最も危険な真菌の一つになるであろう。

【0040】

上記理由から、本発明の発明者らはスタキボトリス属の真菌を、研究に用いる基本的な指標真菌として選択したが、他の真菌特にメムノニエラ属の真菌とアスペルギルス・ベルシカラーの種も、有用な指標真菌として利用できる。上記指標真菌の分解産物 (breakdown product) および／または毒性産物を非特異的に測定することは、それら産物が、他の偏在しているが健康に対する有害性が低い非指標真菌の分解産物に対し交差反応性を有しかつマイトトキンの分析結果が不安定であるので、特に満足すべきものではないことが分かった。

【0041】

異なる真菌の種の間交差反応性は、同じかまたは類似の抗原性成分、例えば何種類もの真菌が共有している酵素が原因である。またその糖タンパク質の炭水化物成分は非特異的交差反応性を起こすことがある (Brouwer, J. Int. Arch. Allergy Immunol. 110巻166-173頁1996年; Nissen, D.ら、Ann. Allergy Asthma Immunol. 81巻247-255頁1998年)。主な指標真菌の交差反応性を研究するため、スタキボトリス・カルタルムを、人工麦芽エキスプロスおよびその天然セルロースリッチの増殖培地に似せたセルロースプロス中で増殖させた。スタキボトリス・カルタルムと10種類の真菌の種 [アルテルナリア・アルテルナータ (Altern

aria alternata)、アスペルギルス・ベルシカラー (*Aspergillus versicolor*)、オーレオバシディウム・プルランス (*Aureobasidium pullulans*)、ケトミウム・グロボスム (*Chaetomium globosum*)、クラドスポリウム・クラドスポリオイデス (*Cladosporium cladosporioides*)、メムノニエラ・エキナータ (*Memnoniella echinata*)、ペニシリウム・ブレビコンパクツム (*Penicillium brevicompactum*)、フィアロフォラ・レベンス (*Phialophora rebens*)、*Phoma* sp. (フォーマ属の種) およびウロクラディウム・ボトリチス (*Ulocladium botrytis*)] の間の交差反応性を、インヒビションイムノプロット法で試験した。

【0042】

したがって、本発明の発明者らは、前記選択された指標真菌と、本発明で定義されている毒素産生性指標真菌の群に含まれていない他の普通の真菌との間の交差反応性を試験した(表1と2)。得られた試験結果に基づいて、本発明の発明者らは、他の偏在している真菌と有意に交差反応しない特異的抗原性成分を確認した。前記選択された抗原性成分に基づいて、本発明の発明者らは、特異的な結合物質、例えば、一種以上の指標真菌由来の一種以上の特異的抗原性成分を確認することができかつ異なる種類の真菌汚染を識別できるモノクローナル抗体を製造することができた。前記抗原性成分とその特異的結合物質は、特定の指標真菌の存在の有無を記録できるのみならず、真菌汚染の特質、厳しさおよび程度を測定するのに最適であり、また先に考察した交差反応性の問題も克服する。

【0043】

上記試験で、エス・カルタルム、エー・ベルシカラーおよびメムノニエラ属の真菌の抽出物が、いくつもの抗原性成分を含有していることが分かった。

【0044】

試験した真菌の種はすべて、エス・カルタルムと交差反応性を示した。低濃度 ($2 \mu\text{g/ml}$ と $20 \mu\text{g/ml}$) の阻害剤でいくらかの交差反応性が今までに観察できたが、 2mg/ml という高いタンパク質濃度では、エス・カルタルム特異的ウサギ抗血清の、エス・カルタルムの成分との結合を少なくとも50%をレギュラーリーに阻害した。しかし、エス・カルタルム特異的抗体の、エス・カルタルムの成分に対する結合を阻害するのに必要なタンパク質濃度の明確な差

が、他の真菌の抽出物およびエス・カルタルムの抽出物の間に観察された。このような成分は検出できたが、このような成分に対する、抗血清の結合成分は、他の真菌製剤で阻害することが困難であった。タンパク質濃度が2 mg / ml の真菌製剤を得るには、抽出物の強力な濃縮を行わねばならなかった。抽出物の強力な濃縮は、現場の条件では実行できない。したがってこのような成分は、本発明において好適な成分ではない。

【0045】

エス・カルタルム抽出物の糖タンパク質は、Boehringer-Mannheim DIG Glycan Differentiation Kitによって獲得した。エス・カルタルム抽出物中の、最も豊富な炭水化物はマンノースであった。その炭水化物の部分は、分子量が30 kD以上の成分中に存在していた。エス・カルタルムの糖タンパク質の炭水化物含量の抗体結合活性に対する有意性を、エス・カルタルム抽出物を過ヨウ素酸塩で処理し（糖を除く）続いてエス・カルタルム特異的ウサギ抗血清でイムノブロッティングすることによって例示した（実施例5）。これらの試験結果を、変性前の（過ヨウ素酸塩で処理されていない）エス・カルタルム抽出物のイムノブロッティングの結果として比較した。これらの試験結果は、エス・カルタルム抽出物から炭水化物の部分を除くと、エス・カルタルム特異的ウサギ免疫血清の、該抽出物中の成分に対する結合が、変化しないままの27 kDaと50 kDaの成分を除いて部分的に低下することを示した。

【0046】

ポリクローナル抗体とELISA試験を使用して予備試験を行った。前記アレルゲン性成分または抗原性成分に対するポリクローナル抗体は十分に特異的ではなかったが、交差反応性なしの特異的抗原性成分を選択した場合、特異的結合物質を製造することができた。本発明のモノクローナル抗体は、ケーラーとミルシュウタインの独創的な方法（Nature 256巻495頁1975年）にしたがって発生させた。なおこのモノクローナル抗体製造方法は本願に援用するものである。同様に、前記抗原性真菌成分の他のエピトープを認識するモノクローナル抗体は、当業技術者が、周知の実験書の方法に基づいて製造することができる。

【0047】

産生された前記抗体は、一種または組み合わせた指標真菌の存在の有無を記録可能にすることができる標識またはマーカー分子を任意につけることができる。各種のレベル、マーカーまたはタグ（抗体またはそれぞれの抗原と結合された場合トレーサーとも呼ばれる）は公知であり、文献、実験便覧および特許刊行物に記載されている。このような標識またはマーカーは、例えば着色したラテックス粒子、フルオロクロム、リポソーム、金属コロイドなどである。しかし、かような標識やマーカーを使用する必要はないことに注目すべきである。例えばタービディメリックアッセイにおいて、ポリクローナル抗体は、そのまま用いられ、そして抗原と結合すると試料溶液は白濁する。その白濁は、抗体 - 抗原反応中に形成する抗体 - 抗原凝集体によって起こる。前記凝集体は視覚によって検出することができる。

【0048】

本発明で得た試験結果と選択された抗原性成分と製造された結合物質に基づいて、前記三種の指標真菌の存在の有無を、環境試料中に偏在している他の非指標真菌の抗原性成分と交差反応しないこれら三種の指標真菌特有の抗原性成分によって、評価する特別の方法と試験キットを開発することができた。

【0049】

各種特定の汚染物を特異的に識別することができ、かつ所望の特別の診断目的を達成するのに最も適切で有効な抗原性真菌成分を選択した。前記抗原性真菌成分を使用して、汚染の特質と程度の診断を目的とする試験キットと方法を開発した。本発明は、真菌汚染の場合の治療処置の必要性和タイプを評価するのに非常に有効な診断用具を提供するものである。その上に、これらの方法と試験キットは、追跡試験や、治療処置の成功の監視を行うための有効な手段を提供する。結局、この試験は、特に、環境コンサルタント、産業衛生職員、家屋販売業者、家屋購入者および建築業者ならびにこれらの人々の健康上の係争の依頼人による自己診断のために使用できる。

【0050】

上記のように、特定の指標真菌の存在は、真菌汚染に直接関連しているので、特異的でかつ鋭敏な生化学的指標として役立つはずである。環境試料について実

施したウエスタンブロット試験から得た試験結果は、抗体、例えばポリ抗体 (polyantibody) を有する特定の抗原性成分の存在を利用して、指標真菌の存在を確認し、かつ擬陽性と擬陰性の試験結果を最少限にして、汚染の特質と程度を示すことができることを示唆している。

【0051】

本発明の好ましい試験キットと方法が開発されて定性試験法が提供されるが、半定量試験法または定量試験法さえも開発できることに注目することが大切である。これらの試験結果は、視覚によって記録できるか、または結合反応を記録可能にすることができる基板を加えることによって直接もしくは間接的に装置によって記録することができる。本特許明細書に開示されている発明は、真菌汚染の種類を正確に評価するのに非常に有効な診断装置と、状況を修正するのに必要な治療処置を提供するものである。本発明の方法とキットは特に、特定の指標真菌の存在の有無を記録しかつ汚染の特質を評価する別の現場診断装置を提供するものである。その上に、本発明の方法と試験キットは、治療処置の効力の追跡試験を行うための有効で実用的な装置を提供するものである。

【0052】

いずれの免疫化学試験法も、原則として、汚染の特質の評価、および治療処置の効果の縦方向または横方向のスクリーニングに利用できる。しかし、視覚凝集法、フロースルー法および免疫クロマトグラフィー法が迅速な現場試験法として最適である。何種類もの抗体を別個の領域に含有している試験スティックまたは試験ストリップを製造することができ、そしてそのスティックまたはストリップで、何種類ものアレルゲン性成分を同時に検出することができる。

【0053】

本発明の具体的実施態様で、研究者は、吸収性試験ストリップまたは類似の固体キャリアを、汚染の疑いがある領域から材料の乾燥試料を取り出すことによって得た副試料と直接接触させて配置することによって試験を実施する。その乾燥試料を適切な液体キャリア、例えば緩衝液中に移して抽出され、副試料が提供される。その後、試験ストリップに、副試料抽出物から液体を、好ましくは標準化された時間、吸収させる。最後に、ディップスティックタイプの試験装置が、試

料源と接触して配置されている吸収末端を備えているように設計され、その試料源は試験装置に直接吸収される。

【0054】

現場試験キットもしくはフィールド試験キットとして利用可能な別の方法と試験キットは、下記の網羅的ではない特許刊行物に記載されている。すなわち米国特許の5591645号、5712170号、5602040号、5622871号、5656503号、4552839号、4361537号、4373932号、4552839号；ヨーロッパ特許の第149168号、154749号、7654号、191640号、212599号、158746号、225054号；国際特許願公開のWO 86/04683号、WO 86/03839号に記載されている。

【0055】

組み換えアレルゲンも、指標真菌に暴露されたヒトの血清試料中の真菌特異的抗体を確認するために使用することができる。例えば特異的IgGのレベルが高いことは、指標真菌に対する暴露の増大を示し、そして特異的IgEのレベルが高いことは、指標真菌に対するアレルギー反応が起こる可能性があることを意味する。立証された抗原成分を使用することによって、その抗体の測定値は、現行の方法と比べてより信頼性が高くかつ正確になる。

【0056】

結論として、本発明は環境試料中の、特定の指標真菌またはその抗原性成分の存在の有無を確認しそして疾病と結露で被害を受けた建築物、家屋、工場、農業環境およびその外の作業環境の真菌汚染の特質と程度を評価し；真菌汚染によって起こる健康上の危険を避けるための治療処置と保護処置の必要性和緊急性を評価し；汚染を減らしおよび／または除くために治療処置を行い、その行われた処置が成功したかどうかを評価する；のに用いる方法と試験キットに関する。好ましくは、診断は、特定の指標真菌、例えば環境試料中のスタキボトリス属の真菌のみまたはいくつかの他の指標真菌を組み合わせた真菌由来の一種以上の特異的抗原性成分を特異的に認識できる一種以上の結合物質を使用する迅速で信頼性の高い現場検定法として実施できねばならない。

【0057】

本発明の方法と試験キットの実行可能性と適用性は、実施して実験とその結果を記述する以下の実施例に例示説明されている。その実施例が、たとえ、エス・カルタルムの抗原成分とその特異的結合物質に基づいたキットの開発に限定されていても、表1と2に示す交差反応性の予備試験結果に基づいて、類似の抗原性成分と結合物質を、本発明のその外の2種の指標真菌について調製できることは明らかである。

【0058】

実施例1.

麦芽エキスパロス内での指標真菌とその他の真菌の培養

指標真菌のスタキボトリス・カルタルム(ATCC 208877の菌株)を、結露による被害を受けた建築物由来の石膏ボードから1991年に単離した。その菌株は、オランダのバーン所在のCentraalbureau voor Schimmelcultures(CBS)で同定された。試験したその他の真菌の種は、アルテルナリア・アルテルナータ(DSM 62006)、アスペルギルス・ベルシカラー(UKU 3)、オーレオバシディウム・プルランス(DSM 62074)、ケトミウム・グロボスム(UKU 4)、クラドスポリウム・クラドスポリオイデス(DSM 62121)、メムノニエラ・エキナータ(CBS 304.54)、ペニシリウム・ブレビコンパツム(ATCC 58606)、フィアロフォラ・レベンス(KTL RE27)、フォーマ属の種(UKU 8)、ウロクラディウム・ボトリチス(UKU 11)、エス・カルタルム(KTL 296)、エス・カルタルム(KTL 391)、エス・カルタルム(KTL 530)およびエス・カルタルム(KATTL)である。UKUとKTLでコードされている上記菌株はすべてCBSで同定した。そしてその他の菌株(KATTLを除く)は国際真菌コレクションから購入した。

【0059】

真菌の種は、先ず、人工の2%麦芽エキス寒天上で7~10日間25℃で増殖させ、その後、孢子懸濁液を、0.05%(v/v)のTween 20含有のリン酸塩緩衝食塩水(PBS)で調製した。上記孢子懸濁液1mlを、定置型Roux

びんに入っている2%麦芽エキスパロス100mlに接種し、その培養物を10日間25℃でインキュベートした。

【0060】

実施例2 .

指標真菌と他の真菌の、セルロースブロス内での培養

実施例1であげた真菌の種を、エス・カルタルムの天然の増殖培地（わら、石膏ボード）に似せたセルロース含有液体ブロス（Dillon, H.K., Heinsohn, P.A., Miller, J.D.編「Field Guide for the Determination of Biological Contaminants in Environmental Samples」AIHA Publications, 1996年、米国、バージニア州フェアファックス）内で実施例1に記載したのと同様にして増殖させた。

【0061】

実施例3 .

抗原抽出物の調製

菌糸と胞子を含む真菌培養物を、減圧乾燥器で乾燥し、次いで0.02%（w/v）のフェニルメチルスルホニルフルオリドと0.02%（w/v）のアジ化ナトリウムを含むリン酸塩緩衝食塩水（PBS、pH8.0）中に、1:20（w/v）で再び懸濁させた。菌糸の懸濁液を、シェーカー内で16~18hr、4℃にてホモジナイズして抽出した。遠心分離（4℃にて1000gで10分間と43000gで60分間）した後、上澄み液を、PBS（pH7.4）に対し、PBSを3回変えて4℃で24hr透析し（分子量カットオフ8kD）、滅菌濾過し（0.2μm）次いで凍結乾燥した。凍結乾燥された抽出物は-70℃で保存し、そして使用時に、水中に再び懸濁させた。これら抽出物のタンパク質含量を、ブラッドフォードの染料結合法（Bradford, M.M., Anal. Biochem. 248-254頁1976年）で測定した。

【0062】

実施例4 .

真菌の抗原に対するウサギの抗血清

麦芽エキスパロスとセルロースブロスから調製したエス・カルタルムの抽出物およびエー・ベルシカラーの抽出物（1mgタンパク質/ウサギ/免疫化）を2

週間間隔で4回皮下に注射することによって、3頭の雌のニュージーランド白ウサギの免疫化を行った。最後の免疫化を行ってから2週間後に、ターミナル血清を集めて、-70℃で保存した。

【0063】

実施例5 .

SDS-PAGE、イムノブロットングおよびインヒビションイムノブロットングドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)と電気泳動トランスファー法(electrophoretic transfer)を、Laemmli, U.K. (Nature 227巻680-685頁1970年)およびTowbin, H.ら(Proc Natl Acad Sci USA. 76巻4350-4354頁1979年)が述べた方法を使用して実施した。イムノブロットング分析の場合、抗原抽出物のエレクトロトランスファーされたタンパク質を含むニトロセルロースの膜を切断してストリップにして、ゼラチン-PBSでブロックした。真菌抽出物の免疫原性成分の特性を決定するため、前記膜のストリップを、希釈比1:5000のプールされたウサギのターミナル抗血清とともに一夜インキュベートし、次いで希釈比が1:5000のペルオキシダ-複合ブタ抗ウサギ免疫グロブリンとともに1hrインキュベートした。これらインキュベーションはすべて室温で行った。ストップをPBS-Tweenで数回洗浄した。オートラジオグラフィー反応を、ECL-ウエスタンブロットング試薬で起こさせて、免疫学的に反応性のタンパク質成分を、オートグラフィーのフィルムで検出した。交差反応性の試験に使用したインヒビションイムノブロットング分析の場合、エス・カルタルム/エー・ベルシカラー特異的抗血清を、まず他の真菌抽出物のいくつかの希釈液とともに、37℃で1hrインキュベートした。その後、さきに記載したようにして、分析を完了した。

【0064】

実施例6 .

麦芽エキスパロスおよびセルロースパロスの培養物から調製した抽出物間の、エス・カルタルムのタンパク質プロフィルと抗原性成分の比較

SDS-PAGE分析の結果、セルロースパロス中で増殖させた培養物から調製したエス・カルタルム抽出物は、タンパク質成分の数が(13)で麦芽エキス

ブロス内で増殖させた培養物から調製した抽出物の(12)より種類が多いことが明らかになった。その上に、麦芽エキスブロスで調製した抽出物は、クーマシー染料で染色したSDS-PAGEゲルの強いスミアリングを起こす小分子量の非免疫原性成分を含有していた。また、セルロースブロスで調製した抽出物が、イムノブロットング分析の結果、免疫原性成分の数が(18)で他の抽出物の(12)より多いことも明らかになった。麦芽エキスブロスで調製した抽出物中の約92,57および25kDの成分が最も強い反応を行ったが、セルロースブロスで調製した抽出物中の約60,50および31kDの成分は、ウサギ抗血清と強く反応した。図1に示す得られた試験結果は、本発明の抗原性成分を調製するのに使用する抽出物を製造する場合、セルロース含有ブロスの方が麦芽エキスブロスより優れていることを示した。

【0065】

SDS-PAGE-分析の結果、セルロースブロスで培養した真菌から調製したエム・エキナータの抽出物が13種のタンパク質成分を含有していることが明らかになったが、約48,50および60kDの成分が最も豊富であった(図1)。セルロースブロスで培養したエス・カルタルムに対して生成したウサギ抗血清は、エム・エキナータ抽出物の150,110,60,38,37,36および32kDの成分を明確に認識した(図2)。

【0066】

セルロースブロスで培養した真菌から調製したエー・ベルシカラー抽出物は18種のタンパク質成分を含有していることが明らかになったが、約100,98,85,55,および43kDの成分が最も豊富であった(図1)。麦芽エキスブロスで培養したエー・ベルシカラーに対して生成したウサギ抗血清は、セルロースブロスで培養した真菌から調製したエー・ベルシカラー抽出物中の約125,110,98,82,62,55,50,43,37,36,32および29kDの成分を明確に認識した。

【0067】

実施例7.

交差反応性の試験結果 - 適切な抗原性成分の選択

試験した真菌の種はすべて、エス・カルタルムと交差反応性を示した。いくらかの交差反応性（インヒビションイムノブロットング分析におけるエス・カルタルムの成分の0%～36%の消失）は低濃度（2 μ gと20 μ g/ml）の阻害剤ですでに知られているが、2 mg/mlというタンパク質濃度は、エス・カルタルム特異的ウサギ抗血清の、エス・カルタルムの成分への結合の64～100%を阻害した。換言すると、オートラジオグラフィーによる視覚化は、交差反応が起こったときは妨げられるかまたは阻害された。しかし、エス・カルタルム特異的抗体のエス・カルタルムの成分に対する結合を阻害するのに必要なタンパク質濃度の明確な差が、他の真菌の抽出物とエス・カルタルムの抽出物の間に認められた。上記阻害のために使用した、麦芽エキスパロスで増殖させた培養物から調製したエス・カルタルム抽出物の最低タンパク質濃度（2 μ g/ml）は45%の視覚化を妨げ、そしてセルロースパロスで増殖させた培養物から抽出物は、その成分の65%の視覚化を妨げた。エス・カルタルムに形態学的に密接に関連している真菌の種（エー・アルテルナータ、エム・エキナータおよびユー・ボトリチス）は、エス・カルタルムと、他の真菌より強く交差反応を行った。麦芽エキスパロスで増殖させたエス・カルタルムの抗原性成分であって、その成分へのエス・カルタルム特異的抗体の結合が他の真菌製剤によって容易に阻害された抗原性成分は、約67, 31, 20および17 kDの成分であったが、約77, 64, 57および25 kDの成分への結合は阻害することが困難であった。50 kDより小さい成分へのエス・カルタルム特異的抗体の結合は、他の真菌製剤によって容易に阻害されたが、約60および50 kDの成分へ結合を阻害することは困難であった。試験を行ったエス・カルタルムの5種の他の菌株は、イムノブロットング分析で、エス・カルタルム特異的ウサギ抗血清のエス・カルタルムの成分への結合を強く阻害して、類似の抗原成分を示した。

【0068】

麦芽エキスパロスで培養したエー・ベルシカラーに対して生成したウサギ抗血清は、セルロースパロスで培養したエス・カルタルム抽出物の11種の成分を明確に認識した。エム・エキナータ抽出物の場合、図は5種の成分を示した（110, 98, 82, 62および55 kD）。セルロースパロスで培養されたエス・

カルタルムに対して生成したウサギ抗血清は、セルロースブロスで培養したエー・ベルシカラー抽出物中の一成分(60 kD)を明確に認識した(図2)。エム・エキナータ抽出物の場合、図は6種の成分(150, 110, 60, 38, 37および32 kD)を示した(図2)。

【0069】

約60 kDaと50 kDaの成分は、セルロースブロスで培養したエス・カルタルムに対して最も特異的であることを、インヒビション・イムノブロッティングの試験で立証した(表1)。インヒビション・イムノブロッティング試験の結果(表1)によれば、上記50 kDaの成分は、エム・エキナータとエス・カルタルムに共有されているが、セルロースブロスで培養されたエス・カルタルムに対して生成したウサギ抗血清が、エム・エキナータ抽出物中の50 kDaの成分をごくわずかしき認識しなかったということは、交差反応性が非特異的性質をもっているということを意味している。

【0070】

約85, 55, 35および33 kDaの成分が、インヒビション・イムノブロッティング試験にて、麦芽エキスブロスで培養したエー・ベルシカラーに対して最も特異的であることを立証した(表2)。

【0071】

実施例8 .

セルロース培地上で増殖させたエス・カルタルムの抗原性成分の特性決定

糖の分析

スタキボトリス・カルタルム - 抽出物の糖タンパク質を、Boehringer-Mannheim DIG Glycan Differentiation Kitによって測定した。エス・カルタルム - 抽出物中の最も豊富な炭水化物はマンノースであった。その他の炭水化物、例えばガラクトース - β (1 - 4) - N - アセチルグルコサミンとシアル酸も同定された。分子量が30 kD以上の大部分の成分に、炭水化物の部分が存在していた。エス・カルタルムの糖タンパク質類の抗体結合活性に対する重要性を、エス・カルタルム - 抽出物を過ヨウ素酸塩で処理し(糖類の除去)、続いてエス・カルタルム特異的ウサギ抗血清でイムノブロットすること(実施例5)によって示した。

これらの試験結果は、エス・カルタルム - 抽出物から炭水化物の部分的部分的に除くと、エス・カルタルム - 抽出物特異的ウサギ免疫血清の、抽出物のいくつもの成分に対する結合が部分的に減少することを示した。エス・カルタルムに対して特異的であることを先に示した前記50 kDの成分は変化しないままである。また、過ヨウ素酸塩で処理した後、前記50 kDの成分は、ウサギ免疫血清およびカビの多い建築物内でエス・カルタルムで感作された患者の血清によってやはり認識された。しかし、その成分はうすく染色されたガラクトース - β (1 - 4) N - アセチルグルコサミンの炭水化物部分を含有していたが、炭水化物を除いても、前記50 kDの成分抗体結合に影響しなかった。

【0072】

カビの抽出物から糖の部分を除くには、暗所での50 mM過ヨウ素酸ナトリウムによる少なくとも1 hrの処理を必要とした。過ヨウ素酸塩処理の有効性を、Boehringer-Mannheim DIG Glycan Differentiation Kitでさらに糖タンパク質を分析することで確かめた。天然のエス・カルタルム抽出物中に同定された糖類（マンノース、ガラクトース - β (1 - 4) - N - アセチルグルコサミンおよびシアル酸）は、過ヨウ素酸塩で処理した後には同定できなかった。

【0073】

N - グリコシダーゼ酵素F エンドグリコシダーゼ酵素（Boehringer-Mannheim）を使用して、すべてのタイプのN - グリカン連鎖を糖タンパク質から加水分解して除いた（糖類の除去）。処理を行った後、前記50 kDaの成分の分子の大きさは変化しないままであるが、エス・カルタルム抽出物のプロフィル中の他の成分の大部分（SDS - PAGE）が消失したか、または分子の大きさが、除去された炭水化物の表示として変化した（小さくなった）。

【0074】

実施例9 .

エス・カルタルム - クロマトグラフィー精製法による抗原性成分の特性決定

1 ゲル濾過クロマトグラフィー

凍結された試料をPBS（pH 7.4）中に再び懸濁させ、次に、4 でPBSに対して、PBSを3度変えて透析した（分子量カットオフ8 kD）。最大2

50 μ l のカビ抽出物の試料を、superdex 75 HR 10 / 30 カラム (Pharmacia Biotech、スウェーデン、ウプサラ) に注入した。PBS (pH 7.4) を溶離液として使用した。ピークをすべて収集し、第一ピークから出発して同じ緩衝液と平衡させた。

【0075】

アニオン交換クロマトグラフィー

凍結された試料を PBS (pH 7.6) 中に再び懸濁させ次いで4 で20 mM トリス (pH 7.6) に対し、20 mM トリス (pH 7.6) を3回変えて透析した (分子量カットオフ8 kD)。20 mM トリス (pH 7.6) 中のカビ - 抽出物の試料を最大2 ml、同じ緩衝液と平衡させたResource Q HR 5 / 5 カラム (Pharmacia Biotech、スウェーデン、ウプサラ) に注入した。結合しているタンパク質類を、20 mM トリス (pH 7.6) 中0 ~ 1 MのNaClの線形勾配液90 mlで溶離させて、すべてのピークを収集した。

【0076】

カチオン交換クロマトグラフィー

凍結された試料を20 mM クエン酸 (pH 2.7) 中に再び懸濁させ次いで4 で20 mM クエン酸に対し、これを3回変えて透析した (分子量カットオフ8 kD)。20 mM クエン酸 (pH 2.7) 中のカビ - 抽出物の試料を最大2 ml、同じ緩衝液と平衡させたResource S HR 5 / 5 カラム (Pharmacia Biotech、スウェーデン、ウプサラ) に注入した。結合しているタンパク質類を、20 mM クエン酸 (pH 2.7) 中0 ~ 1 MのNaClの線形勾配液90 mlで溶離して、すべてのピークを収集した。

【0077】

単離されたピークのSDS - PAGEによる同定

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) を、15% アクリルアミドゲルで、Laemmliの不連続緩衝液系 (Laemmliの1970年の報告) を使用して実施した。簡単に述べると、各画分由来の50 μ l の試料を、SDSと2 -メルカプトエタノールを含有する同じ緩衝液30 μ lで還元し、次にその試料を10分間沸騰させた。その試料とPharmacia Low Molecu

lar Weight calibration kit standard (Pharmacia Biotech) を前記ゲルに注入して、電気泳動を200Vで60分間実施した。これらのゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色した。

【0078】

ニトロセルロースフィルターに移した単離されたピークのイムノブロッティング
イムノブロッティング分析を、実施例5に記載したのと同様にして行った。

【0079】

実施例10.

単離された成分の特性決定

SDS-PAGEからの特異的フラグメントの単離、タンパク質のアミノ酸配列
の決定

N末端の配列決定

SDS-PAGEゲルから得たタンパク質を、ポリニフッ化ビニリデンの膜 (Immobilon-P, Millipore) に100Vにて30分間で移した。その膜を、0.1%のクーマシーブリリアントブルーで染色し、次に50%メタノールで脱染色した。染色された50kDのバンドをメスで切り取り、次にそのバンドを室温で乾燥させた。Applied Biosystems 477A Pulsed Liquid Phaseタンパク質配列決定器を使用して、タンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。そのタンパク質のN末端の末端がブロックされていたのでアミノ酸配列は得られなかった。

【0080】

内部ペプチドの配列決定

ペプチドのアミノ酸配列を決定するためのゲル内プロテアーゼ消化を、Rosenfeldら (Rosenfeldらの1992年の報告) が述べたのと同じ小さな改変を行って実施した。SDS-PAGEは上記のようにして実施した。ゲルの特定のタンパク質バンドを切り取って、50%アセトニトリル-炭酸水素アンモニウム緩衝液 (200mM) によって、37℃にて45分間、2回洗浄した。続いて、そのゲルスライス、アセトニトリルで収縮させ、次に試料をジチオトレイトールで還元し (56℃で30分間)、次いでヨードアセトアミドでカルボキシメチル化した (暗所にて室温で15分間)。乾燥したゲルスライスを、10%のアセトニト

リルおよびTPCKで処理したトリプシン (Sigma) 0.5 μ g を含有する 100 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液 10 μ l で、部分的に膨潤させた。100 mM トリス - HCl 緩衝液 (pH 9.2)、10% アセトニトリルをゆっくり加えて、前記ゲルスライスをカバーし、次いでインキュベーションを一夜行った。60% アセトニトリル - 0.1% TFA を使用して、シェーカー内で 37℃ にて 2 回、ペプチドを抽出した。消化溶液をプールし、乾燥して容積を約 50 μ l にした。精製したペプチド類を、0.065% 三フッ化酢酸 (TFA) / 水 - 0.05% TFA / 84% アセトニトリルの勾配液を使用した、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) (μ RPC C2 / C18 ST4.6 / 100 カラム / Amersham Pharmacia) で分離した。Applied Biosystems 477A Pulsed Liquid Phase タンパク質配列決定器を使用して、前記ペプチド類のアミノ酸配列を決定した。

【0081】

実施例 11 .

組み換え DNA 法による抗原性成分の製造、メッセンジャー RNA の単離と cDNA のクローン化

分離菌株 UKU 10 エス・カルタルムを、定置型 Roux びん内に入れた 6 $\times$ 10 ml の液体セルロース培地で 25℃ にて培養した。菌糸を 7 日目に収穫した。その菌糸を遠心分離した (3000 $\times$ g、10 分間、25℃)。上澄み液を廃棄し、半乾燥の菌糸塊を液体窒素で凍結させて -70℃ で貯蔵した。その凍結抽出物を、Qiagen RLC 試薬とともに、乳鉢と乳棒ですりつぶした。全 RNA を、Qiagen RNeasy Plant Mini Kit - 法で単離した。メッセンジャー RNA を、Qiagen Oligotex mRNA Maxi Kit を使って、全 RNA から精製した。相補的 DNA 発現ライブラリーを、Stratagene ZAP - cDNA 合成キットを使って構築しそして、cDNA を Uni ZAP XR ベクター (Stratagene、米国カリフォルニア州ラ・ホーヤ) 中にクローン化した。

【0082】

実施例 12 .

cDNA ライブラリーのスクリーニング

エス・カルタルムに暴露された経歴があることが証明されていて、エス・カルタルムに対する暴露またはエス・カルタルムによる感作の典型的な臨床症状を有する患者の血清を使用して、上記cDNAライブラリーのイムノスクリーニングを行った。また、そのcDNAライブラリーのイムノスクリーニングを、エス・カルタルムの特異的ウサギ抗血清（実施例5）で行った。溶菌斑を、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトシドで処理したニトロセルロースフィルター（Amersham）上に取り上げた。そのフィルターをリン酸塩緩衝食塩水（PBS、pH7.4）中0.1%カゼインによって4hr洗浄してブロックし、さらに1:5希釈度のヒト抗血清または1:50希釈度のウサギ抗血清とともにインキュベートした。HRPで標識した1:10希釈度の抗ヒトIgE（DAKO、P0295）とHRPで標識した1:5000希釈度の抗ウサギIg（DAKO、P0399）を二次抗体として使用して4hrインキュベートした。フィルターの洗浄及び血清とコンジュゲートの希釈を、0.1%のTweenを含有するPBSで行った。インキュベーションと洗浄はすべて、ゆるやかに攪拌しながら室温で行った。オートラジオグラフィーの反応は、ECL-ウェスタンブロッティング試薬（Amersham）で起こさせ、次いで免疫学的に反応性のプラークをオートラジオグラフィーのフィルム（Amersham）で検出した。陽性プラークを取り出し、ファージ希釈とイムノブロッティングを繰り返して精製した。

【0083】

内部ペプチドの配列を決定することによって分かったアミノ酸配列を、cDNAライブラリーのスクリーニングのためのPCRプライマーを計画するモデルとして使用した。ペプチドMLNVYFYGH（配列番号：1）を使用して縮重（degenerated）PCRプライマーを製造した。その外のPCRプライマーを、pBluescript SK（+/-）ファージミッドクロニングベクター（phagemid cloning vector）用に計画した。アッパー菌株プライマー（upper strain primer）はT3プライマーAATTAACCCCTCACTAAAGGG（配列番号：2）とペプチドベースのGTYCCNATYAAATYCANCTY（配列番号：3）であった。ロウワ-菌株プライマー（lower strain primer）はT7プライマーCGGGATATCAGTCAGCATAAATG（配列番号：4）とペプチ

ドベースのG A Y G T N A Y T T Y T A Y G G N C A Y (配列番号: 5)であった。Aはアデニンであり、Cはシトシンであり、Gはグアニンであり、Tはチミンであり、YはC + Tの両者を意味し、そしてNはA + C + G + Tのすべてをコードしている。

【0084】

³²Pで標識したオリゴヌクレオチドプローブをPCR増幅(前記)によって産生されたDNA配列から設計し、そしてcDNAライブラリーのスクリーニングを、Sambrook, J.らの標準プロトコル(Molecular Cloning, A laboratory Manual、米国ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー、1989年)にしたがって行った。

【0085】

実施例13.

cDNAクローンの配列決定

挿入断片を含有するBluescript SK(-)ファージミッドをバクテリオファージUni-ZAP XR λから切り取り、そのファージミッドで、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)XL1-Blue細胞(Stratagene)を形質転換した。配列決定を行うのに使用するDNAを、Wizard Minipreps DNA Purification System(Promega)で精製した。Thermo Sequenase CY5 Dye Terminator Kit, 27-2682-01(Amersham Pharmacia Biotech)を使用し、A.L.F. and A.L.F. express DNA配列決定器で、ヌクレオチドの配列決定を行った。そのDNA配列を、データバンク(NCBI GenBank)のDNA配列を比較して、大部分の特異的エス・カルタルムDNA-フラグメントを同定した。

【0086】

PCR産物の配列決定

PCR産物をアガロースゲルから分離し、次いでGELase(商標)Agarose Gel-Digesting Preparation法(Epicentre technologies)で精製した後、DNAの配列決定を行った(上記のようにして)。

【0087】

実施例14.

ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 内での組み換えタンパク質の産生

エス・カルタルム (UKU10) の cDNA を、PCR の鋳型として使用した。そのプライマーは、特異的エス・カルタルムタンパク質のリーダー配列、およびピキア・パストリスの pHIL-D2 発現ベクター (Invitrogen、オランダ、リーク) 中にクローン化するための EcoR1 部位を含むように設計した。その外のプライマーは、ピキア・パストリスの pHIL-S1 発現ベクター中にクローン化するために設計した。プラスミドの構築は標準の方法 (Invitrogen) で実施し、そのプラスミド中に正しく挿入されていることは配列を決定することによって確認した。ピキア・パストリス菌株 GS115 (Invitrogen) を、塩化リチウム形質転換法によって、上記組み換えプラスミドで形質転換した。

【0088】

形質転換されたピキア属の酵母のシード培養物を、1.0% (v/v) グリセリンを含有するソルトベースの培地 (salt-based medium) (BMG、Invitrogen) 内で、30℃にて回転インキュベーター上で増殖させた。組み換えタンパク質を産生させるため、酵母細胞を遠心分離で収集し、グリセリンなしの同じ培地ベースの1/5に再び懸濁させ、メタノールを0.5% (v/v) になるまで添加し、次いで毎日メタノールを添加しながら、インキュベーションを6日間続けた。培養物の上澄み液を遠心分離によって収穫し、次いでその組み換えタンパク質を、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを含む方法で精製した。

【0089】

実施例15.

エス・カルタルムの特異的抗原性成分に対するモノクローナル抗体の産生

抗原の調製

実施例10と14で述べたようにして分離し精製したスタキボトリス・カルタルムに特有の抗原を、減圧乾燥のステップから始めながら、実施例3に記載したのとほぼ同様にして調製した。

【0090】

モノクローナル抗体

B a l b / c マウスに、2週間間隔で、エス・カルタルムに特有の抗原100gずつを腹腔内に3回注入することによって免疫化を行った。フロイントの完全アジュバントを第一回の注入に使用し、そしてフロイントの不完全アジュバントを第二回の注入に使用した。最後の注入はアジュバントなしで行い、そのマウスを4日後に殺し、Galfré, G.ら、Nature 266巻550-552号1977年の方法にしたがって、モノクローナル抗体を製造した。免疫化したマウスの脾臓細胞を、50%ポリエチレングリコール(MW1500)を使用して、NSI-1マウス骨髓腫細胞系と融合させた。ハイブリドーマを、抗体の産生について、ELISA法とイムノブロットング法で試験し、選択されたハイブリドーマを、限定希釈法で2回クローン化した。

【0091】

実施例16.

ディップスティックキットの製造

ニトロセルロース性ストリップ(ストリップ1、約6×25mm)の狭い領域を、スタキボトリス・カルタルムに特有の成分に対するモノクローナル抗体でコートする。着色したラテックス粒子を、同じ成分の別の抗体でコートする。そのコートされたラテックス粒子を、吸収性ポリエチレン材料のストリップ(ストリップ2)の中央部の領域の上で乾燥させる。前記ラテックス粒子の直径は、これら粒子が前記二種のストリップ材料の細孔を自由に流動できるように十分に小さい。これら二つのストリップは、接触して、ストリップ2の末端が液体中に浸漬されると、試料液体がストリップ2からストリップ1に毛細管流動できるように、プラスチック製パッキング上に取り付けられる。過大の液体を吸収させる場合、濾紙のパッドを、ストリップ2に向かい合ったストリップ1に接触するように取り付ける。このようにして製造したディップスティックを使用して、下記説明にしたがって指標真菌成分の迅速な試験を行う。

【0092】

実施例17.

環境試料の収集

環境試料の収集と調整は非常に簡単である。研究者は、汚染領域を十分良好に

代表する適切なサンプリング部位を評価して理解している。サンプリング部位から副試料（建築材料、他の基材、たまったダストなど）を採取し、緩衝溶液が入っている試験管に移し注意深く振盪する。ディップスティックを上記緩衝液中に入れ、実施例19の説明を踏襲する。

【0093】

実施例18.

試験のプロトコルの設定

試験法を開発中、各種のスタキボトリス・カルタルム菌株および他の指標真菌菌株および他の普通の非指標真菌の種の純培養物ならびに指標真菌および他の真菌および汚染環境試料の混合培養物からの試料が、既知の真菌の種で人工的に調製され、ファイルされた条件（filed condition）から収集される。

【0094】

実施例19.

イムノクロマトグラフィー試験の実施

1. 実施例17に記載したようにして得た試料を、緩衝液（Tween 20とアプロチニン（50 kIU/ml）を含有するPBS、pH 7.4）で希釈する。

2. ディップスティックの一方の末端（ストリップ2の末端）を、上記希釈された試料中に浸し、液体の前部がストリップ1に到達するまでそのまま保持し、次いで試料から取り出す。

3. 5分間のインキュベーション中に、試料が、両ストリップ中を移動させられ、そしてラテックス粒子が、液体によって、抗体をコートされた領域を越えてディップスティックの他方の末端まで輸送される。

4. ストリップ1を検査する。最少量のエス・カルタルム成分がすでに可視ライン(visible line)を起こしている。着色領域が形成されていれば、その試験結果は陽性とみなされる。

【0095】

モノクローナル抗体ベースのエス・カルタルムディップスティック試験で得たデータは、対応するELISA分析法のデータと比較することができる。ELI

S A試験のレベルが増大しているのは、陽性のディップスティック分析結果を反映している。陽性のディップスティック試験結果は、エス・カルタルムの健康に対し有害な汚染と関連があり、かつ他の有害なカビ類による汚染の可能性があることを示している。

【0096】

【表1】

表1 スタキボトリス・カルタルムの成分の交差反応性 (セルロースブロスで培養)

阻害濃度 200 μ g/ml	110	85	82	70	66	62	60	55	50	42	40	32	27	20	14	kDa
ウロクラディウム・ボトリチス	++	+++	++	+++	+++	++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
アルテルナリア・アルテルナータ	+	+	+	++	++	++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	
アスペルギルス・ベルシカラー	+	-	++	-	-	++	-	+	-	-	-	-	+++	+++	+++	
ケトミウム・グロボスム	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+++	+++	
クラドスポリウム・クラドスポリオイデス	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
フィアロフロラ・レベンス	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
ペニシリウム・ブレビコンパクツム	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	++	+	+	+	
メムノニエラ・エキナータ	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	
フオーマ	+	+	+	+	+	++	-	+	-	-	-	-	++	++	+	
オーレオバシディウム・ブルランズ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+++ = 強い交差反応性、 ++ = 中位の交差反応性、 + = わずかな交差反応性、 - = 交差反応性なし

【表2】

【配列表】

表2 アスペルギルス・ベルシカラーの成分の交差反応性 (麦芽エキスパロスで培養)

阻害濃度 200 μ g/ml	98	85	55	43	35	33	31	28	27	26	23	17	kDa
クラドスポリウム・クラドスポリオイデス	-	+	-	++	-	-	+	++	++	++	++	+++	
ウロクラディウム・ボトリチス	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+++	
アルテルナリア・アルテルナータ	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+++	+	+++	
スタキボトリス・カルタルム	+	+	+	-	+	+	++	++	++	++	++	+++	
フオーマ	++	-	-	++	-	-	-	+	+	++	-	+++	
ペニシリウム・ブレビスコンパクツム	-	-	-	++	-	-	+	+	++	++	+	+++	
エー・プルランス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
フィアロフオラ・レベンス	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	++	
ケトミウム・グロボスム	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
メムノニエラ・エキナータ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

+++ = 強い交差反応性、++ = 中位の交差反応性、+ = わずかな交差反応性、- = 交差反応性なし

SEQUENCE LISTING

<110> Oy Medix Biochemica Ab

<120> Antigenic Components of Selected Indicator Fungi and
their use in Methods and Test Kits

<130> 9D11PC

<140>

<141>

<150> 19991675

<151> 1999-08-05

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Stachybotrys chartarum

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

<400> 1

Met Leu Asn Val Tyr Phe Tyr Gly His

1

5

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Stachybotrys chartarum

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: -

<220>

<223> T3 primer

<400> 2

aattaaccct cactaaaggg

20

<210> 3

```

<211> 21
<212> DNA
<213> Stachybotrys chartarum

<400> 3
gtycnatya ayatcanct y                                21

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Stachybotrys chartarum

<220>
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: -

<220>
<223> T7 primer

<400> 4
cgggatatca gtcagcataa tg                                22

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Stachybotrys chartarum

<220>
<223> peptide

<400> 5
gaygtnaytt ytayggncay                                20

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】

エス・カルタルム（Ａ）、エム・エキナータ（Ｂ）およびエー・ベルシカラー（Ｃ）の抽出物のＳＤＳ－ＰＡＧＥプロファイルを示す図である。

【図 2】

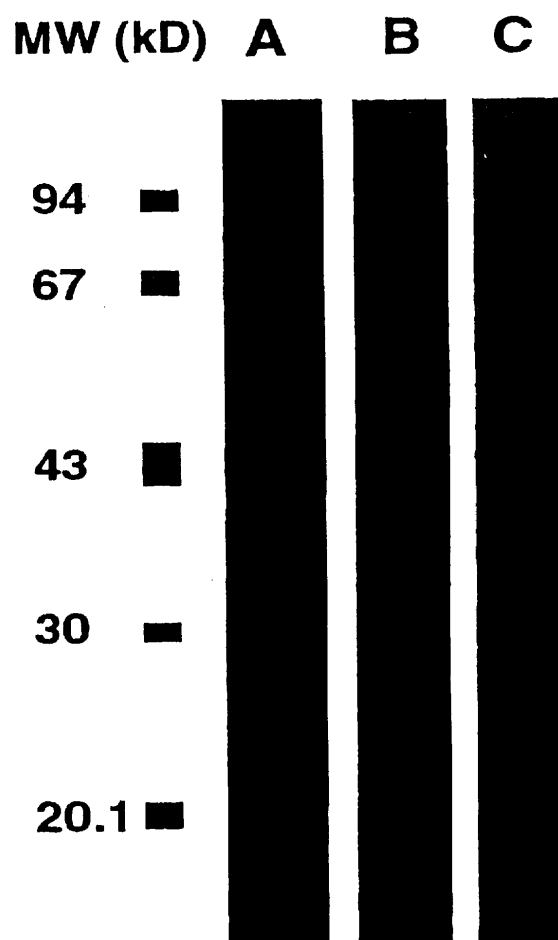
エス・カルタルム特異的ウサギ抗血清によって認識されるエス・カルタルム（Ａ）、エム・エキナータ（Ｂ）およびエー・ベルシカラーの抽出物の成分を示す図である。

【図 3】

異なるエス・カルタルムの製剤のイムノプロットングを示す図である。

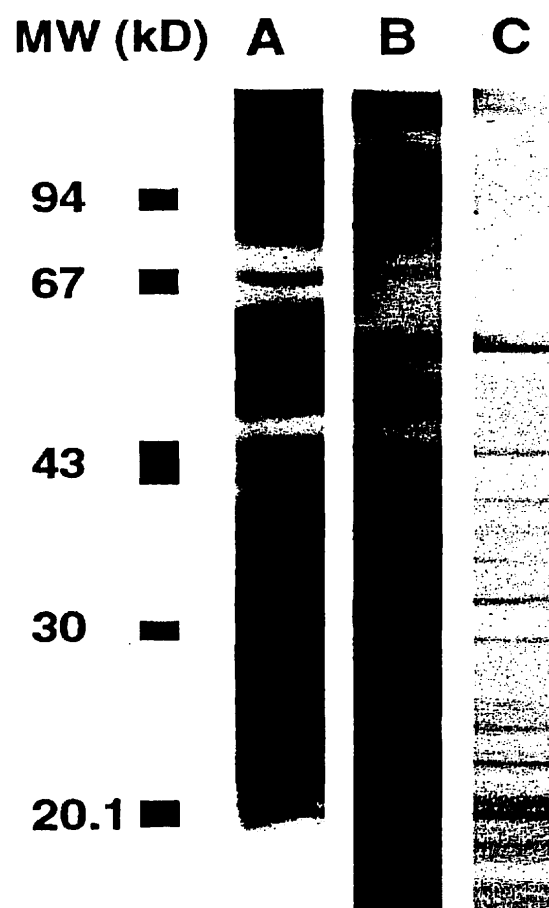
【図1】

Fig. 1



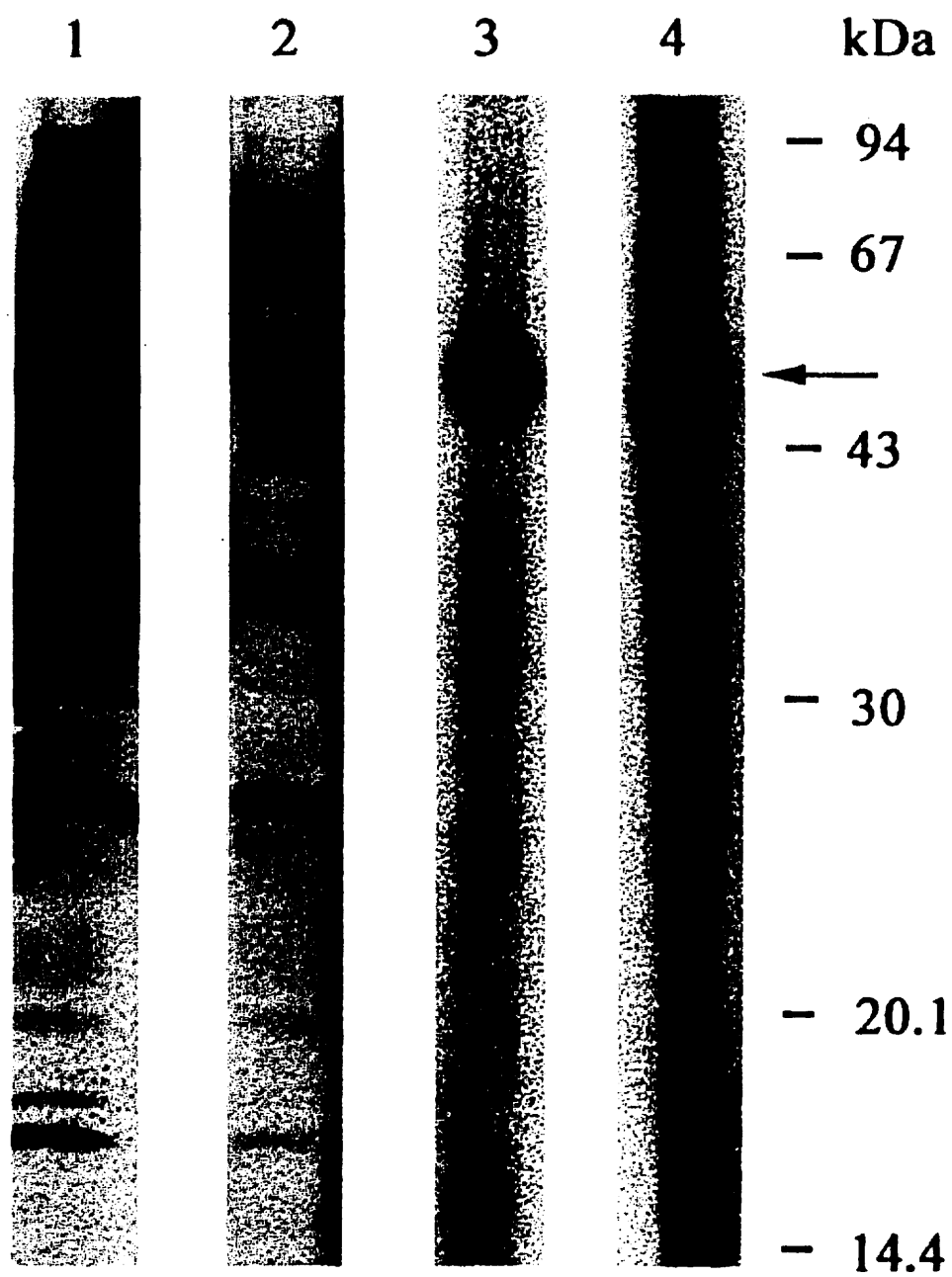
【図2】

Fig. 2



【図3】

Fig. 3



【手続補正書】特許協力条約第 34 条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成 13 年 11 月 19 日 (2001 . 11 . 19)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 非標的真菌類との交差反応性がない標的真菌の抗原性成分であって、前記抗原性成分は抗体を誘発することができ、その抗体は有害真菌の増殖の存在を検出するのにおよび前記真菌の増殖と関連した健康上の危険、前記真菌の増殖の特質および程度、必要な治療処置または適用された治療処置の成功を評価するのに有用である抗原性成分において、前記標的真菌類は健康上の危険を有することが証明されている一種以上の特定の毒素産生性指標真菌類を含み、非標的真菌類は毒素産生性がない非指標真菌類であり、前記抗原性成分は前記指標真菌類に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的になく、前記抗原性成分は下記ステップによって獲得できることを特徴とする抗原性成分：

(a) スタキボトリス、アスペルギルスおよびメムノニエラの属から選択される指標真菌類から抗原性成分を単離し、

(b) ステップ (a) で得た抗原性成分の、極端な健康上の危険を生じない他の普遍的に存在する非指標真菌類由来の抗原性成分との交差反応性を確認し；そして

(c) スタキボトリス、アスペルギルスおよびメムノニエラの属から選択される指標真菌類に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的にない抗原性成分を選択する。

【請求項 2】 指標真菌がスタキボトリス・カルタルムを含む請求項 1 に記載の抗原性成分。

【請求項 3】 指標真菌がアスペルギルス・ベルシカラーを含む請求項 1 に記載の抗原性成分。

【請求項4】 指標真菌がメムノニエラ・エキナータを含む請求項1に記載の抗原性成分。

【請求項5】 抗原性成分が、組み換えDNA技法によって製造される請求項1～4のいずれか一つに記載の抗原性成分。

【請求項6】 ヒトが指標真菌の汚染にさらされているかどうかおよび／またはアレルギー反応の原因が前記指標真菌に対する暴露であるのかどうかを、汚染にさらされている疑いがあるヒト由来の血清試料中の抗体の存在の有無を確認することによって評価するのに使用する試験キットを製造するための、請求項1～5のいずれか一つに記載の抗原性成分の使用。

【請求項7】 指標真菌類由来の抗原性成分を特異的に認識してそれに結合しかつ他の真菌類の抗原性成分を認識せずそれに結合しない結合物質を製造するための、請求項1～5のいずれか一つに記載の抗原性成分の使用。

【請求項8】 真菌汚染の特質と程度の評価、必要な治療処置および適用された治療処置の成功のチェックを行うため使用する試験キットを製造するための、一種以上の指標真菌類に特有でかつ他の非指標真菌類との交差反応性が実質的にない請求項1～5のいずれか一つに記載の少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識しそれに結合する結合物質の使用。

【請求項9】 結合物質が、結合ペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および／または前記ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のフラグメントから選択される請求項7または8に記載の使用。

【請求項10】 真菌の増殖を検出し、前記真菌の増殖によって生ずる健康上の危険を評価し、真菌汚染の特質と程度、必要な治療処置および適用された治療処置の成功のチェックを行う方法であって、検出が固体の環境試料を希釈および／または抽出することによって環境試料懸濁液から調製された副試料懸濁液からの免疫化学的検定法を用いた免疫化学的検定法として実施される方法において、前記検定法が、副試料を、請求項1～5のいずれかの少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識して結合することができる一種以上の結合物質と接触させて反応の存在の有無を記録するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項11】 適用された治療処置の成功をチェックする場合、サンプリ

ングを、適切な間隔をおいて、少なくとも一回、再々繰り返すことを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】 ヒトが指標真菌の汚染にさらされているかどうかおよび／またはアレルギー反応の原因が指標真菌に対する暴露であるかどうかを、血液または血清からの免疫検定法によって検出する方法において、血液または血清試料を請求項1～5の抗原性成分の少なくとも一種と接触させて反応の存在の有無を記録することを特徴とする方法。

【請求項13】 請求項10～11の方法のいずれかを用いて、選択された指標真菌類の存在の有無を検出するための、真菌汚染の特質を評価して必要な治療処置および適用された治療処置の成功を制御するための、真菌汚染の程度をスクリーニングして必要な治療処置および適用された治療処置の成功を制御するための試験キットにおいて、試験キットが請求項1～5の少なくとも一種の抗原性成分を特異的に認識して結合することができる一種以上の結合物質を含むことを特徴とする試験キット。

【請求項14】 血液または血清試料から請求項12に記載の免疫化学的検定法によって、ヒトが指標真菌の汚染にさらされているかどうかおよび／またはアレルギー反応の原因が指標真菌に対する暴露であるかどうかを検出するための試験キットにおいて、試験キットが請求項1～5に記載の抗原性成分を含むことを特徴とする試験キット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 00/00668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: G01N 33/569, C12Q 1/00, C07K 16/14, C07K 14/37

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)

IPC7: G01N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, CHEMICAL ABSTRACTS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9846738 A1 (BARNES-JEWISH HOSPITAL), 22 October 1998 (22.10.98), page 2 - page 4 --	1,6-20
X	US 4845197 A (FRANK P. PETERSEN ET AL), 4 June 1989 (04.06.89), see Tables III-VI for lack of crossreactivity --	1,6-20
X	BIOSIS, accession no. PREV199396076781, Reed Jon A. et al: "Immunomycolology: Rapid and specific immunocytochemical identification of fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded material."; & Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1993, vol 41, p1217-1221 -- -----	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

"B" earlier application or patent 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

8 December 2000

Date of mailing of the international search report

13-12-2000

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Carl-Olof Gustafsson/GH

Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FI 00/00668

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO	9846738	A1	22/10/98	AU 7128098 A	11/11/98
US	4845197	A	04/06/89	AT 86121 T	15/03/93
				CA 1339730 A	17/03/98
				DE 3687884 A,T	08/04/93
				EP 0222998 A,B	27/05/87
				SE 0222998 T3	
				JP 62079795 A	13/04/87

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P	37/08	C 0 7 K	14/37
C 0 7 K	14/37		14/38
	14/38	C 1 2 Q	1/04
C 1 2 Q	1/04	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/53		33/569
	33/569		33/577
	33/577	C 1 2 N	15/00
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	チカノヤ , サリ フィンランド , エフアイエヌ - 00100 ヘルシンキ , ヴェイネモイセンカツ 29 ビー 24		
F タ-ム(参考)	4B024 AA01 AA13 BA31 GA11 HA15 4B063 QA18 QA19 QQ07 QQ79 QQ96 QR48 QS33 QX01 4C085 AA02 AA08 BA49 CC01 DD62 EE01 4H045 AA10 AA11 BA10 CA15 DA86 EA29 EA52 FA74		

本发明涉及一种抗原成分，该成分对于三种指示剂真菌水生水苏木，杂色曲霉和紫锥花具有唯一性，并且不会与环境中的其他常见真菌发生交叉反应。还公开了使用这些抗原成分的方法，例如：用于产生结合剂，评估真菌污染的性质和程度，必要的治疗以及检查所应用的成功治疗。用于生产用于执行和检查人是否暴露于指示真菌和/或人的过敏反应与暴露于指示真菌之间是否存在关系的测试试剂盒。使用。

[illegible]