

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-323598

(P2005-323598A)

(43) 公開日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	K
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10	4 B O 2 4
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04	4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-143233 (P2005-143233)	(71) 出願人	302019245
(22) 出願日	平成17年5月16日 (2005.5.16)		タカラバイオ株式会社
(62) 分割の表示	特願平10-512027の分割		滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
原出願日	平成9年8月29日 (1997.8.29)	(74) 代理人	100095832
(31) 優先権主張番号	特願平8-255400		弁理士 細田 芳徳
(32) 優先日	平成8年9月4日 (1996.9.4)	(72) 発明者	竹迫 一任
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		滋賀県大津市秋葉台4-20-208
(31) 優先権主張番号	特願平9-99775	(72) 発明者	水谷 滋利
(32) 優先日	平成9年3月31日 (1997.3.31)		滋賀県蒲生郡安土町宮津1-86
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	遠藤 政博
			滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハー
			モパレス草津405号
		(72) 発明者	加藤 郁之進
			京都府宇治市南陵町1-1-150

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真菌抗原及びその製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 真菌を原因とする疾患に対して有効で、より安全な生物学的製剤、例えば、ワクチン組成物、減感作治療用組成物、又は診断用組成物として使用することのできる真菌抗原を提供すること。

【解決手段】 カンジダ アルピカンスに由来するワクチン活性又はアレルゲン活性を有する抗原性タンパク質であって、特定アミノ酸配列を有し、かつ分子量 (S D S - P A G E、還元条件下) が約 65,000 である抗原性タンパク質からなる真菌抗原、別の特定アミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせた配列を有し、かつ、ワクチン活性又はアレルゲン活性を有するペプチドからなる真菌抗原。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カンジダ アルビカンスに由来するワクチン活性又はアレルゲン活性を有する抗原性タンパク質であって、配列表の配列番号：1に示す部分アミノ酸配列を有し、かつ分子量（SDS-PAGE、還元条件下）が約65,000である抗原性タンパク質からなる真菌抗原。

【請求項 2】

配列表の配列番号：5に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせた配列を有し、かつ、ワクチン活性又はアレルゲン活性を有するペプチドからなる真菌抗原。

10

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の真菌抗原をコードする核酸。

【請求項 4】

配列表の配列番号：7に示す塩基配列を有する、請求項 3 記載の核酸。

【請求項 5】

請求項 4 記載の核酸に 0.5% SDS、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール 400、0.01% 変性サケ精子 DNA を含む 6 × SSC 中で、50 にて 12～20 時間インキュベートした後、0.5% SDS を含む 0.1 × SSC 中、50 で洗浄する条件においてハイブリダイズ可能な、ワクチン活性又はアレルゲン活性を有するペプチドをコードする核酸。

20

【請求項 6】

カンジダ アルビカンスに由来するワクチン活性又はアレルゲン活性を有する抗原性タンパク質であって、配列表の配列番号：3に示す部分アミノ酸配列を有し、かつ分子量（SDS-PAGE、還元条件下）が約30,000である抗原性タンパク質からなる真菌抗原。

【請求項 7】

カンジダ アルビカンスに由来するワクチン活性又はアレルゲン活性を有する抗原性タンパク質であって、配列表の配列番号：4に示す部分アミノ酸配列を有し、かつ分子量（SDS-PAGE、還元条件下）が約62,000である抗原性タンパク質からなる真菌抗原。

30

【請求項 8】

請求項 1、2、6、7 いずれか記載の真菌抗原を含有することを特徴とする、個体に投与して真菌に対する感染防御免疫を誘導し又は治療効果を有するワクチン組成物。

【請求項 9】

請求項 8 記載のワクチン組成物を投与することを含む、真菌に対する非ヒト脊椎動物の免疫応答を刺激する方法。

【請求項 10】

請求項 1、2、6、7 いずれか記載の真菌抗原を含有することを特徴とするサイトカイン放出剤。

【請求項 11】

請求項 1、2、6、7 いずれか記載の真菌抗原を含有することを特徴とする、個体に投与して真菌に対するアレルギー性疾患を予防し又は治療効果を有するアレルゲン組成物。

40

【請求項 12】

請求項 11 記載のアレルゲン組成物を投与することを含む、真菌に対する非ヒト脊椎動物のアレルギー反応を抑制する方法。

【請求項 13】

請求項 1、2、6、7 いずれか記載の真菌抗原を含有することを特徴とする、該真菌による疾患の診断用組成物。

【請求項 14】

請求項 13 記載の診断用組成物を使用することを含む、真菌による非ヒト脊椎動物の疾

50

患を診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞壁を有する病原性微生物である真菌による感染症、アレルギー疾患の予防又は治療、及び真菌による疾患の診断に有効な真菌抗原及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

真菌は、ヒト、動物を始めとする脊椎動物に感染して種々の疾病を引き起こすことが知られている。例えば、ヒトの皮膚、口腔等に表在性真菌症を起こし、内臓、脳等に全身性真菌症を起こし、ペット、家畜等の動物に対しても同様の感染症を起こす。このうち、ヒトに感染して、全身性真菌症を起こす原因真菌の主なものとしては、カンジダ属（カンジダ アルビカンス（*Candida albicans*）他）、クリプトコッカス属（クリプトコッカス ネオフォルマンズ（*Cryptococcus neoformans*）他）、アスペルギルス属（アスペルギルス フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）他）、カリニ肺炎菌（ニューモシスチス カリニ（*Pneumocystis carinii*））等が知られ、表在性真菌症では、皮膚、口腔、膈等に感染するカンジダ属、手足の皮膚に感染する白癬菌（トリコフィトン メンタグロフィテス（*Trichophyton mentagrophytes*）、トリコフィトン ルブルム（*Trichophyton rubrum*）他）等が主なものと考えられている。

10

【0003】

家畜等に感染症を起こす真菌としては皮膚糸状菌（Dermophytes）が多く、上記のトリコフィトン（トリコフィトン ベルコーサム（*Trichophyton verrucosum*）他）の他に、ミクロスポルム（ミクロスポルム カニス（*Microsporum canis*）、ミクロスポルム ジブセウム（*Microsporum gypseum*）他）が知られている。生活環境中にはこれら以外にも多様な真菌が存在し、ヒト、動物に感染を引き起こすと考えられている。さらに、近年、広範囲抗生物質の多用、免疫抑制剤の使用、免疫抑制作用を持った制癌剤の使用等により、これらの薬剤の投与を受けている患者は免疫的易感染宿主（immunocompromised host）となり、健常人では病原性の低い真菌による日和見感染が増大している。また、AIDS患者においては、口腔カンジダ症が繰り返し発生する他、各種真菌症が併発する。また、血管内カテーテル留置、特に経中心高カロリー輸液法（IVH）による治療を受けている患者では、カテーテルに起因して真菌、特にカンジダによる感染症が起こる。

20

30

【0004】

一方、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎をはじめとするアレルギー性疾患が急激に増大しつつあるが、この中で真菌を原因とするアレルギー性疾患も非常に多い。

【0005】

アレルギー性疾患の多くは、その疾患の原因抗原に感作されることにより、血清及び組織において、アレルゲンである抗原に特異的なIgE抗体（レアギン抗体）が産生され、該IgE抗体が肥満細胞及び好塩基球のレセプターに結合する。再びその抗原に暴露されると、細胞に結合したIgEと抗原とが細胞表面上で架橋し、IgE-抗原相互作用の生理学的効果を生ずる。これらの生理学的効果はケミカルメディエーターであるヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、好酸球遊送因子又は各種ロイコトリエン等の放出を介して現れる。それらの効果は抗原が体内に入る経路及び肥満細胞又は好塩基球上にIgEが沈着するパターンに依存して全身的又は局所的性質であり得る。

40

【0006】

全身的症状はアナフィラキシーショックが含まれ、血管内での抗原に対するIgE-好塩基球応答が起こる。その結果、主として平滑筋の収縮と毛細管の拡張が起こり、発疹、嘔吐、下痢、呼吸困難等の症状が現れ、激しい場合は死に至る。また、局所的症状は一般に抗原が体内に入った位置の上皮表面に起こり、発赤や丘疹として現れる。局所的症状が小気管支の平滑筋の収縮の場合、気管支喘息として現れる。

【0007】

50

アレルギー性疾患を引き起こす原因菌としては、ペニシリウム属 (Penicillium)、カンジダ属 (Candida)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、アルタナリア属 (Alternaria)、クラドスポリウム属 (Cladosporium)、マラセチア属 (Malassezia)、ボトリチス属 (Botrytis)、ムーコル属 (Mucor)、リゾプス属 (Rhizopus)、オーレオバシジウム属 (Aureobasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、トリコデルマ属 (Trichoderma)、ヘルミンソスポリウム属 (Helminthosporium)、ノイロスポラ属 (Neurospora)、ワレミア属 (Wallemia)、ロドトルラ属 (Rhodotorula)、トリコフィトン属 (Trichophyton) が知られている。

【0008】

真菌感染症に対する治療法としては、抗真菌剤による治療が一般的であり、表在性真菌症に対しては多くの薬剤が開発されており、また、全身性感染症に対しても幾つかの優れた薬剤が開発されている。しかし、その効果は有効性、毒性、副作用などの面から不十分である。例えば、古くから使用されてきたアンホテリシンBは重篤な腎障害を始めとする種々の副作用が起こる。また、フルコナゾールを始めとする各種のアゾール系抗真菌剤が開発されたが、作用が静菌的であり、感染症が再発することが多い、また多用により耐性菌が出現し始めている。耐性菌が出現すると、現在実用化されている抗真菌剤の多くが類似の作用メカニズムを有しているため交差耐性となり、大きな問題となる可能性がある。表在性真菌症の場合でも、各種治療薬が開発されているが、長期の治療期間を要する、又再発を繰り返すなど、どれも十分とはいえず、さらに優れた薬剤の開発が望まれている。さらに、爪白癬のように外用剤だけの治療では不十分であるため、グリセオフルビン等の内服薬を必要とする表在性真菌症もある。この際、長期にわたる投与が必要となり、薬剤による種々の副作用が生じる。また、表在性真菌症や、AIDSにおける口腔カンジダ症のように、繰り返し感染が発生するため、有効な抗真菌剤が開発されても費用の面で大きな問題がある。このように抗真菌剤による治療はいろいろの問題がある。

【0009】

生体には本来これらの外来からの侵入物である微生物と戦う感染防御力がある。この力を利用したものがワクチンである。病原性細菌に対してはワクチンによる感染予防が実施されており、古くから使用されかなりの効果を挙げている。細菌感染症に対するこれらのワクチンは、弱毒菌(結核菌)、死菌(コレラ菌)、トキシイド(ジフテリア菌、破傷風菌)、細胞表面の莢膜多糖体等の精製抗原(百日咳菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌、髄膜炎菌)を抗原として使用している。ワクチンは病原菌の抗原性分子に対する抗体、及び細胞性免疫により感染防御力を宿主に与えている。抗体は病原菌により分泌される毒性物質の中和、病原菌の細胞表面分子に結合して宿主細胞への侵入を防ぐ役割を果たすと考えられる。細胞性免疫では、CD4+細胞、CD8+T細胞が中心的役割を果たし、その病原菌の抗原性分子を認識し、病原菌に特異的な防御反応を活性化している。これらの病原菌の有する抗原性分子である免疫原性物質が単離同定され、これらの免疫原を感作抗原(ワクチン)として用いている研究もいくつかある。この場合、上記のように細胞表面分子である莢膜多糖体が免疫原としてよく使用されている。

【0010】

真菌は環境中に非常に多くの数、種類が存在しており、脊椎動物はほとんど全てこれらの真菌に感作されている。また、生体に常在している真菌も多い。従って、脊椎動物では一般にこれらの真菌に対する種々の生体防御免疫反応が用意されている。真菌感染に対して重要な働きをしている免疫反応には、活性化されたマクロファージや多形核白血球(PMN)が食菌作用や殺菌作用を示し、主役として働いているが、抗体や細胞性免疫が寄与していることも知られている。真菌は、その細胞表面にマンナン、グルカン、キチン等の多糖を主成分とする細胞壁を有しており、真菌細胞によってはその含量が全細胞の30%近くを占める場合がある(非特許文献1)。これらの細胞壁成分の中でマンナンが最も抗原性が高い。マンナンは細胞表層に存在する多糖であり、この多糖部分に対する抗体が多量に作られる。ザイモザン(Zyosan)を始めとする真菌細胞壁グルカンも種々の生理活性を有しており、非特異的な免疫増強作用を有することが知られている。真菌の細胞表面の

マンナンを始めとする細胞壁成分が、感染においても細胞の生体への接着分子として重要な働きをしていると考えられている。

【0011】

そして、クリプトコッカスのガラクトキシロマンナン（非特許文献2）やカンジダ アルビカンスの接着因子であるホスホマンノプロテイン（特許文献1）がワクチンとして、またこれらの抗原性分子に対する抗体が感染防御活性を有することが報告されている。カンジダの生菌、死菌による感染防御免疫の誘導に関しても多くの報告（非特許文献3）がある。この場合も細胞表面分子である細胞壁成分に対する生体防御免疫反応が主として機能していると考えられてきた。

【0012】

その他真菌に対するワクチンとしては、リボソームワクチン（非特許文献4）が、カンジダ アルビカンス、トリコフィトンを始めとする真菌による感染症に対して試験され、実験動物、さらに一部ヒト、家畜に対する効果も検討されている。また、最近では、エノラーゼやストレスタンパク質HSP90（特許文献2）が感染防御活性を誘導できることが報告されている。

【0013】

しかし、上記の抗原性分子はいずれもまだ十分な有効性を確認されているとは言えない。また、多様性の高い哺乳類に対して、単一の抗原性分子を用いた治療により十分な有効性を得られるかは疑問である。

【0014】

一方、アレルギー性疾患の治療法としては、抗ヒスタミン薬、ステロイド性抗炎症薬、メディエーター遊離抑制薬などが使用されている。しかし、抗ヒスタミン薬は、倦怠感、眠気、めまい等、ステロイド剤は、副腎萎縮、機能不全、胃潰瘍など様々な副作用の危険性があり、メディエーター遊離抑制剤も、問題となるアレルギー性疾患以外に関与しているメディエーターの作用をも抑制する危険性がある。この点において、抗原診断により特定されたアレルゲンとの暴露の機会を減らす予防法、及び/又はこれらの原因アレルゲンを用いた減感作療法が優れた治療法とされている。

【0015】

従って、アレルギー疾患に対しては、まず原因となっている抗原を同定する診断が必要であり、そのためにまず100種を超える市販のアレルゲンエキス、時には自製のものについて、疑わしい抗原エキスを皮内テストにより試験している。可能性の高い抗原が見つかり、血清中のIgE抗体価の測定、誘発テスト、又は全血やリンパ球を用いたヒスタミン遊離試験により抗原を特定することができる。

【0016】

ヒトにアレルギー症状を惹起させるアレルゲンとしては、天然に存在する多くのものが知られているが、市販の食品などのアレルゲンエキスは天然のアレルゲンを原料とした粗抽出物である。従って、当然多くの物質の集合体であり、また複数の抗原が含有されている。近年になって、分離精製技術及びアレルゲン活性評価法が進展した結果、多くの食品アレルゲンから、アレルゲンの本体である抗原性タンパク質が単離同定されてきた。

【0017】

また、環境中に存在するアレルゲンであるダニ、スギ花粉、ネコの毛などからもそれぞれより主要なアレルゲンとしてDer p 1（非特許文献5）、Cry j 1（非特許文献6）、Fel d 1（非特許文献7）と命名された抗原性タンパク質が単離されている。更に、これらのアレルゲンタンパク質をコードする遺伝子も単離され、遺伝子工学的手法により純粋なアレルゲンタンパク質を大量に調製することが可能になっている。

【0018】

一方、真菌のアレルゲンを単離する努力もなされている。真菌細胞内に存在するタンパク質から、例えばカンジダ・アルビカンスよりアルコールデヒドロゲナーゼ（Can a 1）（非特許文献8）エノラーゼ（非特許文献9）や、アスペルギルス・フミガタスよりリボトキシン（Asp f 1a）（非特許文献10）等の抗原性タンパク質が単離同定され、これら

10

20

30

40

50

のいくつかがアレルゲンとして作用することが知られている。

【0019】

しかし、カンジダ、アスペルギルスを含めて一般的に真菌アレルゲンの場合、単一の主要アレルゲンといえるものが抗原性タンパク質として存在する場合は少なく、複数の抗原性タンパク質が存在し（非特許文献11）、個人によって異なる抗原、また、各個人が複数の抗原をアレルゲンとして認識し反応している。即ち、例えば同じカンジダアレルギーといっても、各個人の反応する抗原は異なる場合が多く、しかも各個人が複数のカンジダ由来抗原に反応していることが知られている。

【0020】

現在市販されている診断用又は治療用アレルゲンエキスは、単なる抽出物や、ほとんど精製されてなく、さらに含有成分についても管理されていないものが殆どである。真菌アレルゲンエキスとしては、カンジダ、アスペルギルス、アルタナリア、クラドスポリウム、マラセチア、ペニシリウムなどがある。しかしこれらの製造法は、前記のような食品や環境中の天然アレルゲン由来のアレルゲンエキスと異なる。つまり、原因真菌の培養細胞自体ではなく、各々の属に属する代表的菌株を、ある限定した栄養源を含む人工培地で長期培養して得られる、副次産物とも言える培養液中の菌体外分泌物を原料とする。従って、本製造法により得られる抗原は、自己細胞の消化物や細胞外分泌物であり、マンナン、グルカンを始めとする細胞壁多糖が主成分と考えられるが、これらの抗原の含量及び他の抗原性タンパク質の種類も明らかになっていない。さらに、製造者間で品質が異なるため、使用に際しては十分な注意が必要である。

【0021】

市販の真菌アレルゲンエキスにも多く含まれる細胞壁多糖、特にマンナンは、一部のアレルギー患者において主要なアレルゲンとして働く一方、健常人でも細胞壁多糖に対するIgG、IgMを多量に持っている。さらに、マンナン自身、特に中性マンナンは、マウスに対する致死的作用といった毒性を有していることも知られている（非特許文献12）。また細胞壁グルカンも炎症を引き起こす等の病理学的作用を有することが知られている（非特許文献13）。

【0022】

従って、抗原であるマンナンを始めとする細胞壁成分や真菌細胞自身をワクチンとして利用する際には過敏症を引き起こすなどの危険性がある。また、アレルギー性疾患の減感作治療等においても、必ずしも細胞壁成分が主要なアレルゲンとして働いているわけではないので、細胞壁成分を含有するアレルゲン組成物を用いる場合、その抗原性が危惧され、人に投与する際は慎重になる必要がある。この点において、現在市販の真菌アレルゲンエキスは全く不満足なものである。さらに、有効な抗原が、十分量含有されている診断用及び/又は治療用の医薬組成物は知られていない。

【特許文献1】WO 95 / 31998 号公報

【特許文献2】特表平4-502257号公報

【非特許文献1】Klis, R.U. et al., *Yeast*, Vol.10, 851-869(1994)

【非特許文献2】Devi, S.J.N. et al., *Infect. Immun.*, Vol.59, 3700-3707, (1991)

【非特許文献3】Segal, E. et al. *Critical Reviews in Microbiology* Vol.14 229-271(1987)

【非特許文献4】Segal, E., *Handbook of Applied Mycology, Volume 2: Immunizations against fungal diseases in man and animals.*, Humans, animals and insects.

【非特許文献5】Smith, W.A. et al. *Clin. Exp. Allergy*, Vol.24, 220-228(1994)

【非特許文献6】Sone, T. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.199, 619-625(1994)

【非特許文献7】Morgenstern, J.P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.88, 9690-9694(1991)

【非特許文献8】Shen, H.D. et al., *Clin. Exp. Allergy*, Vol.21, 675-681(1991)

【非特許文献9】Ishiguro, A. et al., *Infect. Immun.*, Vol.60, 1550-1557(1992)

【非特許文献10】Mosor, M. et al., *J. Immunol.*, Vol.149, 454-460(1992)

10

20

30

40

50

【非特許文献 1 1】Stewart, G.A. et al., Clin. Exp. Allergy, Vol. 26, 1020-1044 (1996)

【非特許文献 1 2】日本医真菌誌第 36 巻, 203-208, (1995)

【非特許文献 1 3】Kogan, G. et al. Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides. 251-258 (1989)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

上記のように、真菌症の増大に伴い、さらに現在使用されている抗真菌剤の副作用、耐性菌の出現、医療費の問題等から、有効性の高い、さらに安全性の高い、新たな真菌症の治療薬の開発が強く望まれている。抗真菌剤に比べてワクチンは多くの利点を有しており、これらの真菌による感染症に対するワクチンを見い出すことができれば、これらの感染症に感染することに伴う苦痛や衰弱を防止することができるだけでなく、これらの感染症の治療を目的とする薬剤の投与量を明確に減少させることもできる。さらに、この様に薬剤の使用を回避することにより、抗菌剤の過剰投与による病原性微生物に対する選択圧が減少し、耐性菌の出現を減少させることができる。しかし、現在のところそのような有効性の高いワクチンは発見されていない。また、単独の抗原で感作するよりも、複数の抗原で感作する方が耐性、有効性という点でより優れた感染防御を誘導できると期待される。

10

【0024】

一方、アレルギー疾患の増大に伴い、治療用或いは診断用アレルギーエキスとして数多く市販されているが、有効成分は明らかになっていないものが多い。真菌に関しても、真菌細胞のどの部分に由来する成分であるかも明らかになっていないが、製法上、その主要成分は細胞壁由来多糖体であり、明らかに細胞内由来の抗原成分が少なく、抗原成分に非常に偏りがあると考えられる。従って、市販の真菌アレルギーエキス、及び同様な方法で得られる抗原エキスでは十分な治療及び診断は実施できないと考えられ、従来のアレルギーエキスに含有される成分とは異なる、しかも、その成分の含量が異なるアレルギーエキスは高い有効性を発揮することが期待される。また、アレルギー性疾患に有効とされる減感作療法の現状は、抗原液を週 1 ~ 2 回、少量ずつ皮内に投与し 3 ~ 4 カ月かけて増量し、維持量に挙げ、更に 1 ~ 3 年投与し続ける必要がある。従って、増量が容易及び / 又は投与量を上げることが可能である抗原組成物の使用は、優れた治療効果をより容易に得られることが期待できる。また、ヒトを始めとする哺乳類は一般的に多様であり、たとえ一種類の真菌に感染又はアレルギー状態になったとしても、抗原として認識されるものは異なる可能性が高い。従って多様な抗原成分を十分量含有する抗原が望ましい。

20

30

【0025】

さらに、原因抗原を特定することは、有効な治療法を選択する為の診断上重要であり、その抗原を用いた減感作治療などの有効性の高い、さらに安全性の高い治療も可能となる。従って未知の抗原を特定することは、これらの点から好ましい。

【0026】

したがって本発明の目的は、このような真菌を原因とする疾患に対して有効で、より安全な生物学的製剤、例えば、ワクチン組成物、減感作治療用組成物、又は診断用組成物として使用することのできる真菌抗原を提供することにある。さらに本発明の目的は、かかる真菌抗原の製造方法、該真菌抗原をコードする核酸を提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0027】

本発明者らは、従来主として抗原性分子として研究されてきた真菌の細胞壁成分に、生体に対し好ましくない免疫反応を引き起こすものがあるため、真菌細胞より細胞壁を取り除き、得られるプロトプラストを原料として細胞壁成分以外の抗原性、ワクチン及び / 又はアレルギーとして活性を有する物質を探索した。その結果、感染症を引き起こす真菌由来のプロトプラストより得られる細胞膜タンパク質や細胞小器官膜タンパク質を含有する不溶性画分が、意外にも強い抗原性を有しており、更に、実質的に細胞壁成分を含んでい

50

ないにも関わらずワクチンとして生の細胞と比べ同等以上の活性を有していることを明らかにした。また、この不溶性画分より界面活性剤等の可溶化剤を用いて得られる可溶化画分も強い抗原性を有しており、さらにワクチンとしても強い活性を有していることを明らかにした。

【 0 0 2 8 】

さらに、本発明品は数種の抗原の混合物として得られるため、特定の抗原成分単独投与よりも幅広い免疫応答が期待でき、実際従来検討されていた抗原成分のいずれよりも強いワクチン活性を有していることを明らかにした。更に該抗原はリンパ球を始めとする免疫担当細胞を刺激して細胞より I F N - 等のサイトカインを放出させる活性を有していることを明らかにした。なおサイトカインを放出する細胞として、例えば T リンパ球、ナチュラルキラー (N K) 細胞等が挙げられる。一方、アレルギー性疾患の原因真菌由来のプロトプラストより得られる不溶性画分が、強い抗原性を有しており、さらに、アレルギーとして十分な活性を有していることを明らかにした。また、この不溶性画分より界面活性剤等の可溶化剤を用いて得られる可溶化画分も強い抗原性を有しており、アレルギーとしても十分な活性を有していることを明らかにした。また、疾患の原因真菌由来のプロトプラストより得られる不溶性画分及び / 又は不溶性画分より得られる可溶化画分が、診断用の抗原として十分な活性を有していることを明らかにした。さらにこの画分より、従来解明されていなかった抗原性を有するタンパク質を単離することに成功し、本発明を完成させた。

10

【 0 0 2 9 】

即ち、本発明の要旨は、

〔 1 〕 細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞より得られる不溶性画分であることを特徴とする真菌抗原、

〔 2 〕 細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞が、該真菌細胞のプロトプラスト又はスフェロプラストである前記〔 1 〕記載の真菌抗原、

〔 3 〕 不溶性画分が、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞をバーストして得られる前記〔 1 〕又は〔 2 〕記載の真菌抗原、

〔 4 〕 不溶性画分が、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞をバーストして得られる成分を約 1 0 0 0 0 0 × g の条件下で遠心分離処理に付して得られる沈殿画分である前記〔 1 〕又は〔 2 〕記載の真菌抗原、

30

〔 5 〕 不溶性画分が細胞小器官を含有する前記〔 1 〕～〔 4 〕いずれか記載の真菌抗原、

〔 6 〕 細胞小器官がミトコンドリア、核、ライソソーム、及び液胞からなる群より選ばれる 1 種以上のものである前記〔 5 〕記載の真菌抗原、

〔 7 〕 不溶性画分が細胞膜タンパク質及び / 又は細胞小器官の膜タンパク質を含有する前記〔 1 〕～〔 6 〕いずれか記載の真菌抗原、

〔 8 〕 前記〔 1 〕～〔 7 〕いずれか記載の不溶性画分より分別抽出される可溶化画分である真菌抗原、

〔 9 〕 可溶化画分が可溶性タンパク質である前記〔 8 〕記載の真菌抗原、

〔 1 0 〕 界面活性剤を含有する緩衝液により分別抽出される前記〔 8 〕又は〔 9 〕記載の真菌抗原、

40

〔 1 1 〕 前記〔 8 〕～〔 1 0 〕いずれか記載の真菌抗原であって、糖群特異的吸着体に対して結合性を有する真菌抗原、

〔 1 2 〕 糖群特異的吸着体がコンカナバリン A 固定化体である前記〔 1 1 〕記載の真菌抗原、

〔 1 3 〕 前記〔 8 〕～〔 1 0 〕いずれか記載の真菌抗原であって、糖群特異的吸着体に対して結合性を有しない真菌抗原、

〔 1 4 〕 糖群特異的吸着体がコンカナバリン A 固定化体である前記〔 1 3 〕記載の真菌抗原、

〔 1 5 〕 真菌細胞が、カンジダ属 (Candida) 、アスペルギルス属 (Aspergillus) 、

50

- クリプトコッカス属 (Cryptococcus)、ムーコル属 (Mucor)、リゾプス属 (Rhizopus)、アブシジア属 (Absidia)、ノカルジア属 (Nocardia)、ヒストプラズマ属 (Histoplasma)、ブラストミセス属 (Blastomyces)、コクシジオイデス属 (Coccidioides)、トリコフィトン属 (Trichophyton)、ミクロスポルム属 (Microsporum)、エピダーモフィトン属 (Epidermophyton)、スポロトリックス属 (Sporothrix)、黒色真菌 (Dematiaceus fungi)、マラセチア属 (Malassezia)、ニューモシスチス属 (Pneumocystis)、ペニシリウム属 (Penicillium)、アルタナリア属 (Alternaria)、クラドスポリウム属 (Cladosporium)、ボトリチス属 (Botrytis)、オーレオバシジウム属 (Aureobasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、トリコデルマ属 (Trichoderma)、ヘルミンソスポリウム属 (Helminthosporium)、ノイロスポラ属 (Neurospora)、ワレミア属 (Wallemia) 及びロドトルラ属 (Rhodotorula) に属する真菌からなる群より選ばれる 1 種類以上の真菌より得られる前記〔1〕～〔14〕いずれか記載の真菌抗原、
- 〔16〕 真菌細胞が、カンジダ アルビカンスの少なくとも一菌株の細胞である前記〔1〕～〔15〕いずれか記載の真菌抗原、
- 〔17〕 真菌細胞が、アスペルギルス フミガタスの少なくとも一菌株の細胞である、前記〔1〕～〔15〕いずれか記載の真菌抗原、
- 〔18〕 真菌細胞が、クリプトコッカス ネオフォルマンスの少なくとも一菌株の細胞である、前記〔1〕～〔15〕いずれか記載の真菌抗原、
- 〔19〕 真菌細胞が、トリコフィトン属、ミクロスポルム属、又はエピダーモフィトン属に属する皮膚系状菌の一菌株の細胞である、前記〔1〕～〔15〕いずれか記載の真菌抗原、
- 〔20〕 カンジダ アルビカンスに由来するワクチン活性又はアレルゲン活性を有する抗原性タンパク質であって、配列表の配列番号：1 に示す部分アミノ酸配列を有し、かつ分子量 (SDS - PAGE、還元条件下) が約 65,000 である抗原性タンパク質からなる真菌抗原、
- 〔21〕 ワクチン活性又はアレルゲン活性を有する、配列表の配列番号：5 に示すアミノ酸配列の全部又はその一部を含むペプチドからなる真菌抗原、
- 〔22〕 配列表の配列番号：5 に記載のアミノ酸配列、又はその一部からなるアミノ酸配列において、1 又は 2 以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも 1 つを生じさせ、かつ、ワクチン活性又はアレルゲン活性を有するペプチドからなる真菌抗原、
- 〔23〕 前記〔20〕～〔22〕いずれか記載の真菌抗原をコードする核酸、
- 〔24〕 配列表の配列番号：7 に示す塩基配列の全部又はその一部を有する、前記〔23〕記載の核酸、
- 〔25〕 前記〔23〕又は〔24〕記載の核酸にハイブリダイズ可能な、ワクチン活性又はアレルゲン活性を有するペプチドをコードする核酸、
- 〔26〕 カンジダ アルビカンスに由来するワクチン活性又はアレルゲン活性を有する抗原性タンパク質であって、配列表の配列番号：2 に示す部分アミノ酸配列を有し、かつ分子量 (SDS - PAGE、還元条件下) が約 25,000 である抗原性タンパク質からなる真菌抗原、
- 〔27〕 ワクチン活性又はアレルゲン活性を有する、配列表の配列番号：6 に示すアミノ酸配列の全部又はその一部を含むペプチドからなる真菌抗原、
- 〔28〕 配列表の配列番号：6 に記載のアミノ酸配列、又はその一部からなるアミノ酸配列において、1 又は 2 以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも 1 つを生じさせ、かつ、ワクチン活性又はアレルゲン活性を有するペプチドからなる真菌抗原、
- 〔29〕 前記〔26〕～〔28〕いずれか記載の真菌抗原をコードする核酸、
- 〔30〕 配列表の配列番号：8 に示す塩基配列の全部又はその一部を有する、前記〔29〕記載の核酸、
- 〔31〕 前記〔29〕又は〔30〕に記載の核酸にハイブリダイズ可能な、ワクチン活

10

20

30

40

50

性又はアレルゲン活性を有するペプチドをコードする核酸、

〔 3 2 〕 カンジダ アルビカンスに由来するワクチン活性又はアレルゲン活性を有する抗原性タンパク質であって、配列表の配列番号： 3 に示す部分アミノ酸配列を有し、かつ分子量（ S D S - P A G E、還元条件下）が約 3 0 , 0 0 0 である抗原性タンパク質からなる真菌抗原、

〔 3 3 〕 カンジダ アルビカンスに由来するワクチン活性又はアレルゲン活性を有する抗原性タンパク質であって、配列表の配列番号： 4 に示す部分アミノ酸配列を有し、かつ分子量（ S D S - P A G E、還元条件下）が約 6 2 , 0 0 0 である抗原性タンパク質からなる真菌抗原、

〔 3 4 〕 （ 1 ）真菌の生細胞を得る工程、

（ 2 ）細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞を得る工程、

（ 3 ）細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞をバーストさせる工程、及び

（ 4 ）不溶性画分を得る工程、

の各工程を含むことを特徴とする、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞より得られる不溶性画分である真菌抗原の製造方法、

〔 3 5 〕 （ 1 ）真菌の生細胞を得る工程、

（ 2 ）細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞を得る工程、

（ 3 ）細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞をバーストさせる工程、

（ 4 ）不溶性画分を得る工程、

（ 5 ）不溶性画分より可溶化画分を分別抽出する工程、

の各工程を含むことを特徴とする、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞より得られる不溶性画分を分別抽出して得られる、可溶化画分である真菌抗原の製造方法、

〔 3 6 〕 さらに、得られる可溶化画分を糖群特異的吸着体を用いて精製する工程を設ける前記〔 3 5 〕記載の製造方法、

〔 3 7 〕 可溶化画分が可溶性タンパク質を含有する前記〔 3 5 〕又は〔 3 6 〕記載の製造方法、

〔 3 8 〕 不溶性画分より可溶化画分を分別抽出する工程が、界面活性剤を含有する緩衝液を用いて不溶性画分を可溶化する工程を含む前記〔 3 5 〕～〔 3 7 〕いずれか記載の製造方法、

〔 3 9 〕 糖群特異的吸着体がコンカナバリン A 固定化体である前記〔 3 6 〕～〔 3 8 〕いずれか記載の製造方法、

〔 4 0 〕 細胞壁溶解酵素処理及び/又は物理的処理により、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞を得る前記〔 3 4 〕～〔 3 9 〕いずれか記載の製造方法、

〔 4 1 〕 細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞が、該真菌細胞のプロトプラスト又はスフェロプラストである前記〔 3 4 〕～〔 4 0 〕いずれか記載の製造方法、

〔 4 2 〕 細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞をバーストして得られる成分を約 1 0 0 0 0 0 × g の条件下で遠心分離処理に付して不溶性画分を得る前記〔 3 4 〕～〔 4 1 〕いずれか記載の製造方法、

〔 4 3 〕 前記〔 1 〕～〔 2 2 〕、〔 2 6 〕～〔 2 8 〕、〔 3 2 〕～〔 3 3 〕いずれか記載の真菌抗原、又は前記〔 3 4 〕～〔 4 2 〕いずれか記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有する生物学的製剤、

〔 4 4 〕 前記〔 1 〕～〔 2 2 〕、〔 2 6 〕～〔 2 8 〕、〔 3 2 〕～〔 3 3 〕いずれか記載の真菌抗原、又は前記〔 3 4 〕～〔 4 2 〕いずれか記載の製造方法で製造される真菌抗

10

20

30

40

50

原を含有することを特徴とする、個体に投与して真菌に対する感染防御免疫を誘導し又は治療効果を有する医薬組成物、

〔45〕 前記〔1〕～〔22〕、〔26〕～〔28〕、〔32〕～〔33〕いずれか記載の真菌抗原、又は前記〔34〕～〔42〕いずれか記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有することを特徴とする、個体に投与して真菌に対する感染防御免疫を誘導し又は治療効果を有するワクチン組成物、

〔46〕 前記〔45〕記載のワクチン組成物を投与することを含む、真菌に対する脊椎動物の免疫応答を刺激する方法、

〔47〕 ワクチン組成物の投与対象となる脊椎動物において、該免疫応答によりワクチン組成物の製造に使用した真菌及び/又はその近縁菌の増殖を抑制し、該真菌及び/又はその近縁菌に起因する疾病を予防または治療する前記〔46〕記載の方法、

〔48〕 前記〔1〕～〔22〕、〔26〕～〔28〕、〔32〕～〔33〕いずれか記載の真菌抗原、又は前記〔34〕～〔42〕いずれか記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有することを特徴とするサイトカイン放出剤、

〔49〕 前記〔1〕～〔22〕、〔26〕～〔28〕、〔32〕～〔33〕いずれか記載の真菌抗原、又は前記〔34〕～〔42〕いずれか記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有することを特徴とする、個体に投与して真菌に対するアレルギー性疾患を予防し又は治療効果を有するアレルゲン組成物、

〔50〕 前記〔49〕記載のアレルゲン組成物を投与することを含む、真菌に対する脊椎動物のアレルギー反応を抑制する方法、

〔51〕 アレルゲン組成物の投与対象となる脊椎動物において、該免疫応答によりアレルゲン組成物の製造に使用した真菌及び/又はその近縁菌に起因するアレルギー性疾患を予防または治療する前記〔50〕記載の方法、

〔52〕 前記〔1〕～〔22〕、〔26〕～〔28〕、〔32〕～〔33〕いずれか記載の真菌抗原、又は前記〔34〕～〔42〕いずれか記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有することを特徴とする、該真菌による疾患の診断用組成物、

〔53〕 前記〔52〕記載の診断用組成物を使用することを含む、真菌による脊椎動物の疾患を診断する方法、に関するものである。

【発明の効果】

【0030】

本発明の真菌抗原は、真菌を原因とする、感染症に対して有効性の高いワクチン、アレルギー性疾患の減感作治療用組成物、サイトカイン放出剤、疾患の診断薬などの生物学的製剤として利用できる。すなわち、本発明の真菌抗原は、ワクチン効果で比較した場合、生菌免疫と同等の効果を示し、従来真菌抗原に比べかなり優れている。また本発明の真菌抗原は安全性の面でも、生菌を含まない、毒性が低い他、細胞壁成分の含量が低いいため、ワクチンや減感作治療用製剤に利用した場合、マンナン、グルカン等の細胞壁成分による副作用を抑え、個体に有利な免疫反応を強化することができる。また、アレルギー性疾患の検査においても、高感度である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

以下、本発明を説明する。

本発明の真菌抗原は、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞より得られる不溶性画分であることを特徴とするものである。かかる真菌抗原は、例えば生物学的製剤として使用される。本発明の真菌抗原は、感染症の原因真菌又はアレルギー性疾患の原因真菌より得られるものであり、感染症の原因真菌に由来するものは、脊椎動物に獲得自動免疫を誘導しうるものであるため、特にワクチン組成物として好適に使用できる。一方、アレルギー性疾患の原因真菌に由来するものは、脊椎動物の減感作に利用することができ、アレルギー性疾患の予防及び治療に好適に使用できる。さらに、かかる真菌抗原は、真菌による疾患の診断に好適に使用できる。

【0032】

1. 真菌細胞について

本発明で使用される真菌としては、ヒト、動物を始めとする脊椎動物に病原性を有する真菌又はその真菌と近縁のものであれば特に限定はない。例えば、カンジダ属 (*Candida*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、ムーコル属 (*Mucor*)、リゾプス属 (*Rhizopus*)、アブシジア属 (*Absidia*)、ノカルジア属 (*Nocardia*)、ヒストプラズマ属 (*Histoplasma*)、ブラストミセス属 (*Blastomyces*)、コクシジオイデス属 (*Coccidioides*)、トリコフィトン属 (*Trichophyton*)、ミクロスポルム属 (*Microsporum*)、エピダーモフィトン属 (*Epidermophyton*)、スポロトリックス属 (*Sporothrix*)、黒色真菌 (*Dematiaceous fungi*)、マラセチア属 (*Malassezia*)、ニューモシスチス属 (*Pneumocystis*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、アルタナリア属 (*Alternaria*)、クラドスポリウム属 (*Cladosporium*)、ボトリチス属 (*Botrytis*)、オーレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、ヘルミンソスポリウム属 (*Helminthosporium*)、ノイロスポラ属 (*Neurospora*)、ワレミア属 (*Wallemia*)、及びロドトルラ属 (*Rhodotorula*) に属する真菌からなる群より選ばれる1種類以上の真菌が挙げられる。

10

【0033】

本発明における脊椎動物の真菌感染症としては、ヒトの場合、カンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコッカス症、ムーコル症、放線菌症、ヒストプラズマ症、ブラストミセス症、各種皮膚真菌症、癬風、カリニ肺炎等が挙げられる。したがって、本発明において、ワクチン組成物に用いられる真菌は、かかる真菌感染症の原因菌であることが有用性の観点から好ましい。

20

【0034】

具体的には、カンジダ症原因菌であるカンジダ アルピカンス、カンジダ トロピカリス (*C. tropicalis*)、カンジダ グラブラタ (*Candida glabrata*) 等；アスペルギルス症原因菌であるアスペルギルス フミガタス、アスペルギルス フラブス (*Aspergillus flavus*) 等；クリプトコッカス症原因菌であるクリプトコッカス ネオフォルマンズ等；ムーコル症原因菌であるムーコル エスピー (*Mucor sp.*)、アブシジア エスピー (*Absidia sp.*)、リゾプス エスピー (*Rhizopus sp.*)；放線菌症原因菌であるノカルジア アステロイデス (*Nocardia asteroides*) 等；その他内臓に真菌感染症を起こす原因菌であるトリコスポロン クタネウム (*Trichosporon cutaneum*)、ロドトルラ グルチニス (*Rhodotorula glutinis*)、ゲオトリクム カンジズム (*Geotrichum candidum*)、ニューモシスティス カリニ (*Pneumocystis carinii*)、コクシジオイデス イミチス (*Coccidioides immitis*)、パラコクシジオイデス ブラシリエンシス (*Paracoccidioides brasiliensis*)、ヒストプラズマ カプスラツム (*Histoplasma capsulatum*)、ブラストミセス デルマチチディス (*Blastomyces dermatitidis*) 等；皮膚糸状菌 (デルマトフィテス (*Dermatophytes*)) であるトリコフィトン属 (トリコフィトン メンタグロフィテス (*Trichophyton mentagrophytes*)、トリコフィトン ルブルム (*Trichophyton rubrum*)、トリコフィトン ベルコーサム (*Trichophyton verrucosum*))、ミクロスポルム属 (ミクロスポルム カニス (*Microsporum canis*)、ミクロスポルム ジプセウム (*Microsporum gypseum*))、エピダーモフィトン エスピー (*Epidermophyton sp.*)；黒色真菌 (デマチアセウス フンギ (*Dematiaceous fungi*)) であるフィアロフォラ エスピー (*Phialophora sp.*)、クラドスポリウム エスピー (*Cladosporium sp.*)；癬風菌であるマラセチア ファーフアー (*Malassezia furfur*)；その他皮膚真菌症原因菌としてはスポロトリックス シェンキ (*Sporothrix schenckii*)、フォンセカエア ペドロソイ (*Fonsecaea pedrosoi*) 等が挙げられる。

30

40

【0035】

使用される菌株としては、治療または予防しようとする真菌症の原因菌と近縁のものであれば特に限定されないが、病原性 (例えばマウスに対する致死毒性) を有する菌株が望ましい。使用される菌株の代表例としては、カンジダ症に対しては、例えば、カンジダ アルピカンス ATCC 10231、TIMM 1768、TIMM 0239；アスペルギルス症に対しては、アス

50

ペルギルス フミガタス ATCC 28212, ATCC 42202, TIMM 1776 ; クリプトコッカス症に対してはクリプトコッカス ネオフォルマンズ ATCC 24067 、TIMM 0354 、夾膜欠損したクリプトコッカス ネオフォルマンズ TIMM0357が挙げられる。

【0036】

また細胞よりのサイトカイン放出を目的として使用される場合、真菌抗原としては健常人においても免疫感作を受けている常在真菌由来であることが好ましく、特にカンジダ アルビカンス由来の抗原が好ましい。

【0037】

一方、アレルギー反応の抑制に使用される場合、本発明のアレルゲン組成物に含有される真菌抗原の調製に用いられる真菌は、ヒトに対しアレルギー症状を惹起する原因菌であることが有用性の観点から好ましい。

10

【0038】

具体的には、カンジダ属真菌であるカンジダ アルビカンス、カンジダ トロピカリス、カンジダ グラブラタ、カンジダ ボイディニイ (*Candida boidinii*) 等；アスペルギルス属真菌であるアスペルギルス フミガタス、アスペルギルス レストリクツス (*Aspergillus restrictus*)、アスペルギルス ヴェルシコラ (*Aspergillus versicolor*) 等；トリコフィトン属真菌であるトリコフィトン メンタグロフィテス (*Trichophyton mentagrophytes*) ；マラセチア属真菌であるマラセチア ファーフアー；ムーコル属真菌であるムーコル ラセモサス (*Mucor racemosus*) ；リゾプス属真菌であるリゾプス オリザエ (*Rhizopus oryzae*) ；ペニシリウム属真菌であるペニシリウム ノタタム (*Penicillium notatum*) ；アルタナリア属真菌であるアルタナリア アルタナタ (*Alternaria alternata*)、アルタナリア キクチアナ (*Alternaria kikuchiana*) ；クラドスポリウム属真菌であるクラドスポリウム クラドスポリオイデス (*Cladosporium cladosporioides*)、クラドスポリウム カリオニイ (*Cladosporium carionii*) ；ボトリチス属真菌であるボトリチス シネラ (*Botrytis cinerea*) ；オーレオバシジウム属真菌であるオーレオバシジウム プルランス (*Aureobasidium pullulans*) ；フザリウム属真菌であるフザリウム オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) ；トリコデルマ属真菌であるトリコデルマ ヴィリダエ (*Trichoderma viridae*) ；ヘルミンソスポリウム属真菌であるヘルミンソスポリウム マイジス (*Helminthosporium maydis*) ；ノイロスポラ属真菌であるノイロスポラ クラサ (*Neurospora crassa*) ；ワレミア属真菌であるワレミア セビ (*Wallemia sebi*) ；ロドトルラ属真菌であるロドトルラ グルチニス (*Rhodotorula glutinis*) 等が挙げられる。

20

30

【0039】

使用される菌株としては、治療または予防しようとするアレルギー症の原因菌と近縁のものであれば特に限定されない。代表例としては、カンジダ抗原を調製するためには、カンジダ属真菌、例えばカンジダ アルビカンス ATCC 10231、同TIMM 1768、カンジダ ボイディニイ ATCC 18810；アスペルギルス抗原を調製するためには、アスペルギルス属真菌、例えばアスペルギルス フミガタス ATCC 28212、同TIMM 1776、アスペルギルス レストリクス ATCC 16912 ；アルタナリア抗原を調製するためには、アルタナリア属真菌、例えばアルタナリア アルタナ IFO 31188；マラセチア抗原を調製するためには、マラセチア属真菌、例えばマラセチア ファーフアー ATCC 14521、同TIMM 2782 が挙げられる。

40

【0040】

本発明において、真菌を原因とする疾患の診断に使用される真菌抗原の場合、用いられる真菌は、疾患の原因となる上記の真菌が好ましい。

【0041】

2. 真菌抗原について

本明細書において、「細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞」における「細胞壁を実質的に除去した真菌細胞」とは、該真菌細胞のプロトプラストないしはプロトプラスト様のものをいう。また、「細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞」とは、スフェロプラストないしはスフェロプラスト様のものをいう。

50

即ち、細胞壁を実質的に除去した真菌細胞の典型的なものは、該真菌細胞のプロトプラストであり、細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞の典型的なものは該真菌細胞のスフェロプラストである。したがって、「細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞より得られる不溶性画分」とは、不溶性画分が該真菌細胞のプロトプラスト又はスフェロプラスト等より得られるものであることを意味する。

【0042】

また、「細胞壁の少なくとも一部を除去」するとは、細胞壁構成成分である、例えばマンナン、グルカンを、細胞壁としての機能である形態の維持、低張液に対する浸透圧耐性を失わせる程度に除去することであり、同時に細胞壁成分に起因した副作用が少なくとも生じない程度に細胞壁を除去することをいう。本発明においては、真菌細胞は細胞壁を実質的に除去したものをを用いることが好ましいが、生体に投与した場合、細胞壁由来の成分が生体に対し悪影響、例えば過敏症、致死作用を示さなければ、細胞壁成分が一部残存したものをを用いても良い。不溶性画分は、具体的には細胞膜、細胞小器官（ミトコンドリア、核、ライソソーム、液泡等）、および細胞小器官膜といった、比較的大きい細胞内構造体と共に、細胞膜に結合したタンパク質や細胞小器官の膜に結合したタンパク質を含有する。なお、本発明における不溶性画分は、上記の成分を全て含有する必要はなく、少なくとも一成分を含有するものであれば良い。

10

【0043】

さらに、この不溶性画分には、リン脂質や糖脂質をはじめとする脂質、糖質、核酸等が含有されていてもよい。さらに、細胞壁の一部が残存している真菌細胞を用いた場合、本発明の真菌抗原を生体に投与した際、細胞壁由来の成分が量的に又は質的に生体に対し悪影響、例えば過敏症、致死作用を示さなければ、細胞壁由来の成分を含有していても良い。これら細胞壁由来抗原成分の混入量は、例えば、後述の実施例で示すように細胞壁成分に対する抗血清を用いた凝集反応に対する、阻害活性の測定等により定量することができる。

20

【0044】

かかる本発明における不溶性画分は、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞を例えばペーストすることにより得ることができる。さらには、上記のようにペーストして得られる成分を約100000×gの条件下で遠心分離処理に付して得られる沈殿画分を不溶性画分として用いることもできる。

30

【0045】

さらに、本発明の真菌抗原は、本発明における不溶性画分より分別抽出される可溶化画分であっても良い。該可溶化画分には主として抗原性のある可溶性タンパク質が含有されている。その他、糖質、脂質も含有されていてもよい。可溶化画分は、例えば、精製工程において濾過滅菌を実施することができ、熱や有機溶媒による滅菌操作に対し不安定な抗原成分を、可溶化工程により活性を維持した状態で調製することが可能になる。かかる可溶化画分は、可溶化剤を含有する緩衝液、例えば界面活性剤を含有する緩衝液を用いて分別抽出することにより得ることができる。

【0046】

さらに、本発明の真菌抗原は、目的に応じた分離精製手段により不溶性画分又は可溶化画分をさらに精製した画分であっても良い。例えば、カンジダ アルビカンス TIMM1768を原材料として得られる可溶化画分を、糖群特異的吸着体を用いて得られる、該吸着体に対して結合性を有する分子を含有する画分も、本発明の真菌抗原として使用することができる。糖群特異的吸着体としては、例えば、コンカナバリンA（ConA）固定化体が挙げられる。ConAは、 α -D-マンノピラノース、 β -D-グルコピラノース、及びこれらに立体的に類似した糖残基を含む分子と結合するため、ConA固定化樹脂により、可溶化画分に含まれる成分を、各成分に含有される糖残基の違いにより、いくつかの画分にさらに分離することができる。例えば、カンジダ アルビカンスTIMM1768可溶化画分より分離される、ConA結合性の画分（ConA結合性糖残基を有するタンパク質含量の高い画分）は、マウスに投与した場合、十分な感染防御活性を示す。

40

50

【0047】

一方、糖群特異的吸着体に対して結合性を有しない分子よりなる画分にも各種の本発明の真菌抗原が存在する。即ち、本発明の真菌抗原としては、更に上記の様にして得られる糖群特異的吸着体に対して結合性を有しない分子よりなる画分も含むものであり、さらにこの画分を精製して得られる画分であってもよい。例えば、カンジダ アルビカンスTIMM 1768由来のConA非結合画分を、更にイオン交換クロマトグラフィー等に付すことにより、配列表の配列番号：1に示す部分アミノ酸配列を有し、分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約65,000を示す抗原性タンパク質、配列表の配列番号：2に示す部分アミノ酸配列を有し、分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約25,000を示す抗原性タンパク質、配列表の配列番号：3に示す部分アミノ酸配列を有し、分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約30,000を示す抗原性タンパク質、配列表の配列番号：4に示す部分アミノ酸配列を有し、分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約62,000を示す抗原性タンパク質を含有する精製画分が得られる。精製画分或いは単離された抗原性タンパク質は本発明の真菌抗原として用いられるものであり、真菌を原因とする疾患の治療、診断に有用である。特に単離された抗原性タンパク質は、診断における原因抗原の同定等の面で有用である。

10

【0048】

これらの抗原性タンパク質は、カンジダ アルビカンスに由来するものであり、カンジダ アルビカンスによる感染症に対するワクチン活性、又はカンジダ アルビカンスによるアレルギー症状の予防・治療に有用なアレルゲン活性を有する。本明細書において、ワクチン活性とは本発明の真菌抗原を用いて常法により調製されたワクチンがワクチンとして有効な薬理作用を発揮することを意味し、アレルゲン活性とは、アレルギー患者の血清を用いた、RAST法等による本発明の真菌抗原に対するIgE抗体価測定試験において、異常高値を示すこと、又は本発明の真菌抗原を用いた皮膚テストにおいて陽性反応を示す作用を有することを意味する。

20

【0049】

さらに、本発明は、前記のような単離された抗原性タンパク質と免疫学的に同等の性質を有する機能的同等物をも本発明の真菌抗原として包含する。例えば、各種カンジダ アルビカンス、更にカンジダ アルビカンス以外のカンジダ属真菌の機能的同等物も本発明に含まれる。即ち、上記4種の抗原性タンパク質のうち、分子量約65,000の抗原性タンパク質はサッカロマイセス セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のミトコンドリア局在ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(DLDH)と、分子量約25,000の抗原性タンパク質はサッカロマイセス セレビスエのミトコンドリア局在スーパーオキシドジスムダーゼ(SOD)と、分子量約30,000の抗原性タンパク質はサッカロマイセス セレビスエのシトレートシンターゼ(citrate synthase)と、分子量約62,000の抗原性タンパク質はサッカロマイセス セレビスエの液胞型アミノペプチダーゼI(vacuolar aminopeptidase I)とホモロジーを有するが、ワクチン活性及び/又はアレルゲン活性等の免疫学的性質が同等の抗原も本発明に包含される。

30

【0050】

ここで、免疫学的に同等の性質を有する機能的同等物とは、1又は2以上のアミノ酸が置換、挿入、欠失又は付加されたタンパク質であって、ワクチン活性及び/又はアレルゲン活性等の免疫学的性質が同等のものをいう。

40

【0051】

また、単離された抗原性タンパク質を基に、抗原性断片を作成することもできる。抗原性断片を作製するには、例えば、単離された抗原性タンパク質を原料として、リシルエンドペプチダーゼ、トリプシン等のプロテアーゼによる酵素消化、臭化シアン等による化学的処理による切断後、目的の抗原性を有する断片をタンパク質の精製において既知の方法により単離精製することにより得ることができる。更に、抗原性断片の化学構造に関する情報を基に、ペプチド合成技術を利用して化学合成による製造も可能である。本発明の抗原性断片には、哺乳類、特にヒトにおける免疫応答、例えば最小量のIgEの刺激、Ig

50

Eの結合、IgG及びIgM抗体の生産の誘起、又は増殖などのT細胞応答及び/又はリンホカイン分泌及び/又はT細胞アナージー誘導などを引き起こす作用を有する、真菌由来の抗原性タンパク質の断片が含まれる。

【0052】

抗原性断片の抗原性は、ヒトのボランティアへの皮膚試験、皮内試験の他、RAST、ELISA、又はヒスタミン遊離などの試験管内試験においても評価することができる。

【0053】

なお、真菌抗原の安定性の強化及び/又は所望の反応性の強化、すなわち治療目的からすれば、個体防御免疫能の誘導強化や、アレルギー反応を減弱化または酵素活性を消失させるのに、また診断目的からすれば、抗原と抗体の特異的結合の強化を行うために、抗原性タンパク質或いは抗原性断片を改変し、誘導体化したり、ポリエチレングリコール(PEG)法[Wie et al, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., Vol.64, 84-99, (1981)]を用いてPEGと結合させることができる。タンパク質の改変には、ピリジルエチル化、還元、アルキル化、アシル化、適当な担体への化学的カップリング、温和なホルマリン処理、又は塩酸グアニジン処理も含まれる。

10

【0054】

一方、単離された抗原性タンパク質の部分アミノ酸配列の情報をもとに、PCR等により該抗原をコードする核酸を単離することができる。以下にその一例について述べる。

【0055】

まず目的抗原性タンパク質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作成する。次に該抗原性タンパク質を発現している細胞のゲノムDNAを鋳型とし、抗原性タンパク質の部分アミノ酸配列をコードすると推定される核酸塩基配列を基に設計された増幅用プライマーとなるオリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドと増幅用プライマー対を形成しうる適当なオリゴヌクレオチドを用いPCRを行う。該PCRにより得られたDNA断片をプローブとしたハイブリダイゼーションによりcDNAライブラリーから目的とする抗原性タンパク質をコードするDNAを選択することが出来る。例えば、配列表の配列番号：1に記載したアミノ酸配列情報、カンジダ アルビカンスTIMM1768のcDNAライブラリー及びカンジダ アルビカンスTIMM1768のゲノムDNAを用いた上記方法により配列表の配列番号：5に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする、配列表の配列番号：7に示す塩基配列を有するDNAを単離することが出来る。

20

30

【0056】

また目的抗原性タンパク質を発現している細胞のRNA及び抗原性タンパク質の部分アミノ酸配列をコードすると推定される核酸塩基配列を基に設計された増幅用プライマー等を用いたRT-PCRによっても該抗原性タンパク質をコードする核酸を単離することが出来る。例えば、配列表の配列番号：2に記載したアミノ酸配列情報及びカンジダ アルビカンスTIMM1768のRNAを用いた上記方法により配列表の配列番号：6に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする、配列表の配列番号：8の塩基配列を有するDNAを単離することができる。

【0057】

なお、本発明において配列表の配列番号：5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質からなる真菌抗原をコードする核酸は配列表の配列番号：7に示す塩基配列を有する核酸に特に限定されない。同様に配列表の配列番号：6に示すアミノ酸配列を有するタンパク質からなる真菌抗原をコードする核酸も、配列表の配列番号：8に示す塩基配列を有する核酸に特に限定されない。即ち遺伝子上でアミノ酸を指定するコドン(3つの塩基の組み合わせ)はアミノ酸の種類ごとに1~6種類ずつが存在することが知られている。したがってあるアミノ酸配列をコードする核酸はそのアミノ酸配列にもよるが多数存在することができる。核酸は自然界において決して安定に存在しているものではなく、その塩基配列に変異が起こることはまれではない。核酸上に起こった変異がそこにコードされるアミノ酸配列には変化を与えない場合(サイレント変異と呼ばれる)もあり、この場合には同じアミノ酸配列をコードする異なる核酸が生じたといえる。したがってある特定のアミノ酸

40

50

配列をコードする核酸が単離されても、それを含有する生物が継代されていくうちに同じアミノ酸配列をコードする多種類の核酸ができていく可能性は否定できない。さらに同じアミノ酸配列をコードする多種類の核酸を人為的に作製することは種々の遺伝子工学的手法を用いれば困難なことではない。

【0058】

たとえば遺伝子工学的なタンパク質の生産において、目的のタンパク質をコードする本来のDNA上で使用されているコドンが宿主中では使用頻度の低いものであった場合には、タンパク質の発現量が低いことがある。このような場合にはコードされているアミノ酸配列に変化を与えることなく、コドンを宿主で繁用されているものに人為的に変換することにより、目的タンパク質の高発現を図ることが行われている（たとえば特公平7-102146号）。このように特定のアミノ酸配列をコードする多種類の核酸は人為的に作成可能なことは言うまでもなく、自然界においても生成されうるものである。

10

【0059】

更に本発明における真菌抗原をコードする核酸には、配列表の配列番号：5又は6の塩基配列の全部又はその一部からなる核酸にハイブリダイズ可能で、該核酸にコードされるペプチドが本発明の真菌抗原と同等のワクチン活性又はアレルゲン活性を有する核酸も包含される。ハイブリダイズ可能とは以下の条件が例示される。

【0060】

すなわち、DNAを固定したメンブレンを0.5% SDS、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400、0.01%変性サケ精子DNAを含む6xSSC(1xSSCは0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0を示す)中で、50℃にて12~20時間、プローブとともにインキュベートする。インキュベーション終了後、0.5% SDSを含む2xSSC中、37℃での洗浄から始めて、SSC濃度は0.1倍までの範囲で、また、温度は50℃までの範囲で変化させ、固定されたDNA由来のシグナルがバックグラウンドと区別できるようになるまでメンブレンを洗浄したうえ、プローブの検出を行う。

20

【0061】

上記核酸を利用すれば、遺伝子工学的手法により大腸菌、酵母、カビ、哺乳類細胞等において組み換えタンパク質として抗原性タンパク質を製造することが出来る。また該核酸の一部を用いることにより、該抗原性タンパク質の抗原性断片を遺伝子工学的手法により製造することが出来る。

30

【0062】

上記遺伝情報が得られれば、当然、抗原性タンパク質の機能的同等物を、抗原性タンパク質をコードする核酸の特定部位の突然変異誘発を用い、既知の方法により抗原性タンパク質の構造を改変し、得ることができる。例えば、タンパク質をコードする核酸の1又は2以上の塩基の置換、挿入、欠失又は付加によってアミノ酸残基の置換、挿入、欠失又は付加を起こすことができる。具体的には、配列表の配列番号：5あるいは配列番号：6に記載のアミノ酸配列、又はその一部からなるアミノ酸配列において、1又は2以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせ、かつ、ワクチン活性又はアレルゲン活性を有するペプチドからなる真菌抗原は、本発明の抗原性タンパク質の変異体であり機能的同等物の一例として本発明の範囲内である。さらに、生物活性を保持したままの変異体を選択することも可能である。

40

【0063】

なお本発明の真菌抗原をコードする核酸には、本発明における抗原性タンパク質の抗原性断片や前記のような抗原性タンパク質の変異体をコードする核酸も包含される。

【0064】

該変異体の作製方法としては、ギャップド・デュプレックス法[Wilfried, K. et al., Nucleic Acids Research, Vol.12, 24, 9441-9456(1984)]、デレーション法[Celeste, Y.P. et al., Gene, Vol.33, 103-119, 1985]、PCR法(Gene, Vol.102, 67-70, (1991))、ウラシルDNA法[Thomas, A.K. et al., Methods in Enzymology, Vol.154, 367-382(1987)]やカ

50

セット変異法 [James, A.W. et al., Gene, Vol. 34, 315-323(1985)] 等が知られている。

【0065】

本発明の真菌抗原（実施例1におけるCa-LSP）の毒性は低く、20mg/kgをマウスの静脈内に投与しても、全く異常は認められないものである。

【0066】

3. 真菌抗原の製造方法

細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞より得られる不溶性画分である真菌抗原を製造する方法としては、例えば、

(1) 真菌の生細胞を得る工程、

(2) 細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞を得る工程、 10

(3) 細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞をバーストさせる工程、

(4) 不溶性画分を得る工程、

といった工程を含む製造方法が挙げられる。

【0067】

工程(1)

工程(1)は、真菌の生細胞を得る工程である。より具体的には、真菌を生育に適した培地で培養し、新鮮な真菌の生細胞を得る工程である。

【0068】

まず、真菌の培養は、各々に適した炭素源、窒素源、その他の栄養源を含む栄養培地で、生育可能な温度、条件で実施すればよい。通常、真菌の培養に用いられる栄養培地としては、サブロー培地、ポテトデキストロース培地、ツァベックドックス培地、麦芽培地、イーストニトロゲンベース・グルコース合成培地等が広く用いられる。必要に応じて、血清や血清アルブミンを添加してもよい。また、癩風菌のようにオリブオイル等を添加した培地が生育に適している真菌もある。培養温度は、15~45℃位が一般的であるが、真菌によっては、培養温度により形態が変化する（二形性真菌と言われるものが多い）ものもあり、適宜選択する必要がある。例えば、カンジダ アルピカンスの場合、25~37℃が好適に使用される培養温度であるが、30℃前後では通常の培地では酵母状の生育をするが、37℃付近では菌糸状の生育をしやすい。二形性の真菌では、細胞壁構成成分、膜タンパク質を含む細胞内タンパク質等のタンパク質成分も変化するため、目的に応じて培養条件を変えてもよい。真菌は、通常の培養条件では凝集したり菌塊を形成し不均一な細胞懸濁液になるものが多く、この場合、次工程で細胞壁溶解酵素等を十分に作用させることができない。そこで、なるべく均一な細胞懸濁液を得るために、培養方法を工夫してもよい。例えば、アスペルギルス フミガタスの場合、0.5~1MのNaClを培地に添加する等、塩濃度を高めることで解消される。また、真菌としては上記に記載の真菌が挙げられる。

【0069】

工程(2)

工程(2)は、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞を得る工程である。細胞壁の除去の程度は少なくとも浸透圧に感受性を示す程度であれば良いが、更にプロトプラストの形態になるまで細胞壁を除去するのが好ましい。よって、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞としては、該真菌細胞のプロトプラスト又はスフェロプラストが好ましい。 40

【0070】

細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞を得るには、例えば、真菌細胞に細胞壁溶解酵素を作用させたり、真菌細胞を物理的に処理することにより達成できる。また、細胞壁溶解酵素処理と物理的処理とは併用しても良い。

【0071】

細胞壁溶解酵素としては種々のものが知られているが、市販の製品としてはザイモリエ 50

ース（生化学工業社製）、リチカーゼ（シグマ社製）、ヤタラーゼ（大関 - 宝酒造社製）、キチナーゼ（宝酒造社製）、トリコデルマライジングエンザイム（ノボ - シグマ社製）、カタツムリ腸管消化酵素 - グルクロニダーゼ（シグマ社製）、ラミナリアーゼ（シグマ社製）等がある。これらの酵素は、各種の細胞壁多糖（キチン、1,3-グルカン、マンナン、ガラクトマンナン、キシログルカン等）の溶解酵素よりなり、さらにプロテアーゼも含有しているものが多い。

【0072】

真菌細胞の細胞壁を溶解し、浸透圧に感受性の裸の細胞、例えばプロトプラストを調製するためには、まず、培養により得られた新鮮な細胞を洗浄後、0.8 ~ 1.5Mのソルビトールやマンニトール、NaClを含有する高張緩衝液中に懸濁する。これに必要な量の細胞壁溶解酵素を、酵素に適した温度、緩衝液、pHで10分間~数時間作用させ、細胞壁を除去する。この際、プロテアーゼを作用させることにより細胞壁をよりきれいに除去することができる場合もある。真菌によってはプロテアーゼを作用させる必要がない場合もあり、その際はPMSF、ペプスタチン等のプロテアーゼインヒビターを加えてもよい。

10

【0073】

また、物理的処理方法としては、例えば2.5Mのショ糖溶液のような高張緩衝液中で目的菌体を懸濁することにより原形質分離を起こさせ、ナイフで細胞壁を切り取る方法がある。

【0074】

工程（3）

工程（3）は、工程（2）で得られる、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞をバーストさせる工程である。細胞をバーストさせる方法として、例えば、超音波処理、フレンチプレスによる処理の他、浸透圧差を利用した低張液処理がある。低張液処理でバーストさせるには、まず細胞を高張液で充分洗浄した後、低張液、即ち生理食塩水またはイオン強度が低い緩衝液（例えば、カンジダアルピカンスTIMM 1768の場合、生理食塩水）に懸濁することにより実施できる。使用される緩衝液としては、例えば、pH5~8のリン酸緩衝液、クエン酸緩衝液等が挙げられる。細胞小器官をなるべく傷つけずに回収しようとする場合、イオン強度を適当に選択すればよい。例えば、ミトコンドリアを菌体内と同様の機能を有する状態で調製しようとする場合、例えば、0.5~0.6Mのソルビトールや0.25Mのショ糖を含有する緩衝液中で超音波やワーリングブレンダーやフレンチプレス等で処理することにより、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した細胞をバーストさせ、ミトコンドリアを菌体内と同様の機能を有する状態のまま得ることができる。

20

30

【0075】

工程（4）

工程（4）は、不溶性画分を得る工程である。

工程（3）で得られる、バーストして得られる成分を、遠心分離又はろ過することにより沈殿や残存物を得、このものを不溶性画分とする。バーストして得られる成分は必要に応じて超音波又はガラスビーズによりさらに細かく破碎してもよい。

【0076】

不溶性画分を得るための遠心分離の条件としては特に限定されるものではないが、好ましくは約100000×g以下、より好ましくは10000×g以下であり、遠心分離の時間は好ましくは10分間~3時間である。

40

【0077】

10000×g以下の遠心分離で沈殿として回収されるものとしては細胞膜及びミトコンドリア、核、ライソソーム、液泡等の細胞小器官がある。また、細胞膜タンパク質や細胞小器官膜タンパク質は、膜に結合した状態で沈殿として得られる。

【0078】

100000×gで1時間程度遠心分離すると、リボソームも沈殿として回収されるが、これも含有していてもよい。また、遠心分離の条件を変化させ、各々の細胞小器官をあ

50

る程度分離することもできる、例えば、1000×g程度の遠心分離で核を分離することもできる。また、ショ糖等を用いた密度勾配遠心分離により上記の細胞小器官を分離精製することもできる。ろ過により不溶性画分を回収したり、粒子の大きさによりある程度分別することも可能である。

【0079】

このようにして得られる不溶性画分は、真菌細胞のプロトプラスト又はスフェロプラスト等の、細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞から得られるものであるため、不溶性画分中に混入し得る細胞壁成分の量は少ないものである。例えば、本発明の不溶性画分中の細胞壁成分の量は、細胞壁成分を抗原とする、抗原抗体反応を利用することにより定量することができる。より具体的には、後述の実施例で示すように例えば真菌細胞としてカンジダ アルピカンスTIMM 1768を用いる場合、抗カンジダ血清である因子血清No.1(ヤترون製)を用いて不溶性画分中の血清型Aマンナンを定量することができる。このようにして測定される血清型Aマンナンの量は、検出限界値(0.5mg/mL)以下であるのが好ましい。

10

【0080】

上記のようにして得られる不溶性画分は、エタノール、イソプロパノール、フェノール、アセトニトリル等の有機溶媒による洗浄及び殺菌処理、または加熱処理による殺菌処理をすることもできる。

【0081】

本発明における不溶性画分は、上記のようにして得ることができる。また、本発明においては、かかる不溶性画分を分別抽出して得られる可溶化画分も真菌抗原である。可溶化画分は、例えば以下のような工程を含む製造方法により得ることができる。

20

(1) 真菌の生細胞を得る工程、

(2) 細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞を得る工程、

(3) 細胞壁を実質的に除去した、又は細胞壁の少なくとも一部を除去した真菌細胞をバーストさせる工程、

(4) 不溶性画分を得る工程、

(5) 不溶性画分より可溶化画分を分別抽出する工程。

【0082】

本発明においては、さらに所望により工程(6)として可溶化画分は、目的に応じ通常分離精製手段により分離精製してもよい。

30

上記の工程のうち、工程(1)~工程(4)は、不溶性画分の製造方法と同じである。但し、本製造工程で使用する不溶性画分中の細胞壁成分は、臨床的に使用できる程度まで除去されていることが好ましいが、必ずしも不溶性画分そのものを真菌抗原として用いる場合の除去の程度と同等である必要はない。というのは、真菌細胞の細胞壁にはグルカン、キチン等が多く含まれており、これらの中には、例えば、界面活性剤により可溶化されない成分もあり、これらの成分は次の可溶化画分を得る工程で除去することができるからである。以下、工程(5)および工程(6)について説明する。

【0083】

40

工程(5)

工程(5)は、不溶性画分より可溶化画分を分別抽出する工程である。分別抽出には一般に使用される可溶化方法を用いることができる。可溶化剤としては、例えば、NaCl、KCl等の塩、EDTA等のキレート剤、ブタノール等の有機溶媒や、尿素等のタンパク質変性剤を溶解した緩衝液等を用いることができるが、可溶化成分の安定性、及び抽出効率の面から界面活性剤を含有した緩衝液を用いることが好ましい。また十分な抽出効果が得られない場合、上記の有機溶媒やタンパク質変性剤を併用しても良い。一般的には、工程(4)にて得られる不溶性画分を、適当な界面活性剤等の可溶化剤を含有する緩衝液で一定時間懸濁後、遠心分離処理や濾過により不溶性成分を除去することにより可溶化画分を得ることができる。したがって、本明細書において可溶化画分には、不溶性画分に付

50

随する水溶性成分、例えば細胞小器官内水溶性成分等、及び/又は可溶化処理にて可溶化される成分、例えば細胞膜タンパク質、脂質等が含有される。また、臨床的に使用可能な界面活性剤を使用すれば、かかる界面活性剤を除去することなく、該可溶化画分をそのまま真菌抗原として用いることができる。

【0084】

本発明で使用する不溶性画分に含まれる膜タンパク質等の可溶化に用いる界面活性剤としては、オクチルチオグルコシド、Lubrol PX, Triton X-100, Nonidet P-40 等が好ましい。また臨床的に使用可能な界面活性剤としてはイオン性（陰イオン性、陽イオン性、両性）界面活性剤（例えばアルキルスルホネート、塩化ベンザルコニウム等）及び非イオン性界面活性剤（例えばポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンソルピタン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル類、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類等）が含まれる。本発明で使用する界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤が好ましく、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油としては、例えば NIKKOL HCO-40、HCO-50、HCO-60（日光ケミカルズ社製）、ユニオックス HC-40、HC-50、HC-60（日本油脂社製）などが挙げられる。

10

【0085】

ポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル類としては、例えば NIKKOL GO-430、GO-440、GO-460、GL-1、Atllox 1045A、1196、G-1045、G-1441（花王アトラス社製）などが挙げられる。ポリオキシエチレンソルピタン脂肪酸エステル類としては、TWEEN 20、TWEEN 40、TWEEN 60、TWEEN 80、EMASOL 1130、EMASOL 3130、NIKKOL TL-1010、TP-10、TS-10などが挙げられる。ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル類としては、例えば NIKKOL TMGS-15、TMGS-5などが挙げられる。ポリエチレングリコール脂肪酸エステル類としては、例えば NIKKOL MYL-110、MYS-10などが挙げられる。ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類としては、NIKKOL NP-10、EMULGEN 810などが挙げられる。

20

【0086】

なお、抗原性維持等の面で、可溶性成分に対し最適な種類の界面活性剤及び濃度を選択するのは当然である。一般に、界面活性剤の濃度は、界面活性剤を水性溶媒に溶解したときにミセルを形成する濃度、即ち、臨界ミセル濃度（以下、CMCと略記する）以上であれば有効である。さらにCMC以上またはCMCの10倍までの濃度で好適に用いられ、特にCMCからCMCの5倍までの濃度で可溶化を実施すると好適に作用する。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液が挙げられる。

30

【0087】

可溶化は、通常約4℃の低温で1時間～一晩放置または攪拌することにより行われる。この際、プロテアーゼインヒビターを添加してもよい。可溶性化画分は、例えば、可溶化処理液を約100000×gで1時間程度の遠心分離処理した上清、又は濾過処理による濾液として得られる。また該上清や該濾液を可溶化剤を含まない緩衝液や臨床的に使用可能な界面活性剤を含有する緩衝液に対して透析することにより、可溶化に用いた可溶化剤を除去することもできる。可溶性化画分は、エタノール、イソプロパノール、フェノール、アセトニトリル等の有機溶媒による洗浄及び殺菌処理、または加熱処理による殺菌処理をすることもできる。

40

【0088】

また、可溶化画分を、可溶化剤を含まない緩衝液に対して透析した場合、脂質を始めとする疎水性成分の一部は沈澱として得られる。本明細書においては、かかる沈澱成分及び溶液成分のいずれも可溶化画分の範疇である。

【0089】

さらに、本発明においては、工程（6）として所望により可溶化画分は、目的に応じ通

50

常の分離精製手段、例えば、含有成分の親和性、荷電状態、分子量、疎水性等の違いによる分離精製手段を用い、さらに精製しても良い。例えば、糖群特異的吸着体を用い、糖タンパク質に含有される糖残基の違いで分画して精製することができる。糖群特異的吸着体としては、例えば、ConA固定化体が挙げられる。特に、ConA結合性糖残基（C - 3、C - 4、C - 6のヒドロキシル基が未置換の、 α -D - グルコース残基及び α -D - マンノース残基）を有する成分、例えば、真菌に多いConA結合性マンノース残基に富む糖タンパク質等の分離には、ConA結合樹脂が好適に使用される。精製には、目的に応じた緩衝液を用いることが望ましく、界面活性剤、有機溶媒等を添加しても良い。更に、イオン交換樹脂、ゲル濾過担体を用い精製度を上げて良い。

【0090】

また、本発明においては、前記のような本発明の真菌抗原をコードする核酸を用いて一般的な遺伝子工学的的手法により容易に本発明の真菌抗原を製造することができる。

【0091】

4. 生物学的製剤について

本発明の生物学的製剤は、上記に記載の真菌抗原を有効成分として含有するものである。生物学的製剤とは、ワクチン又はこれに類似する製剤であって、感染性疾病の病原微生物に由来して、疾病又は障害の診断、予防若しくは治療に使用される製剤であり、本発明においては真菌を原材料とする。その他、本発明の抗原を利用して得られる治療血清等も含む。なかでも、多種類の真菌タンパク質を含有している本発明の真菌抗原は、脊椎動物に獲得自動免疫を誘導しうるものであり、特にワクチン組成物として好適に使用できる。即ち、本発明の、脊椎動物の真菌感染症に対し感染防御又は治療効果を有するワクチン組成物は、上記の真菌抗原を有効成分として含有するものである。本発明の生物学的製剤やワクチン組成物の有効成分として含有される真菌抗原は、例えば上記の製造方法により得ることができる。なお、本明細書において、ワクチン組成物を単にワクチンという場合がある。

【0092】

本発明の真菌抗原をワクチン組成物として使用する際には、より強い体液性及び/または細胞性免疫を得るために、該真菌抗原を下記のようなアジュバントを含む懸濁液又は溶液として製剤化し投与することが好ましい。アジュバントは普通、抗原と共に投与されるが、抗原投与の前または後に与えてもよい。哺乳類のワクチン接種に適当なアジュバントとしては、フロイント（Freund's）の完全または不完全アジュバント；水酸化アルミニウム、みょうばん等の無機物ゲル；リゾレシチン、ジメチルオクタデシルアンモニウムブロミド、リゾレシチン等の界面活性剤；硫酸デキストラン、ポリIC等のポリアニオン；ムラミルジペプチド、タフトシン等のペプチド；Ribi社製のモノフォスフォリルリピドA（MPL）；CytRx社製のTiterMax；コレラトキシンのBサブユニットがあるが、これらには限定されない。抗原はまたリポソームまたは他のマイクロキャリアーに取り込ませて投与することができる。当然、いくつかの異なる真菌の抗原を混合して用いることも可能である。それによって、複数の真菌感染症に対する防御免疫を誘導することもできる。本発明のワクチン組成物は、フルコナゾール、アンホテリシンB等の抗真菌剤や β -ラクタム系抗生物質を始めとする各種の抗細菌性抗菌剤と併用してもよい。特に、抗真菌剤とは相加的又は相乗的に働き有効性を発揮する。

【0093】

脊椎動物は、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、ヒト及びヒト以外の哺乳類であり、これらは抗原と反応して抗体を産生する。その結果、全脊椎動物がワクチン類と反応することができる。ワクチンは一般にヒトまたは家畜動物などの哺乳類に適用するが、上記の性質を有すれば、例えば魚類などの営利目的に飼育された脊椎動物も本発明の対象に含まれる。

【0094】

投与方法としては、経口、経粘膜（鼻、膣等）、経皮（皮下または皮内）的に、または静脈内に投与すればよい。代表的な初回投与量は、タンパク質量として0.001～5 mg/kg体重であるが、必要とする予防又は治療の程度に応じて、投与量を増加したり、

10

20

30

40

50

投与回数を増大させればよい。

【0095】

本発明の真菌抗原である、不溶性画分又はそれに由来する可溶化画分を投与すると、強い細胞性免疫及び/又は体液性免疫を誘導することができ、これにより真菌感染を防御又は治療することができる。防御又は治療の対象となる真菌のみならず、他の真菌に対しても不十分であるが防御効果、治療効果を誘導することができる。これは、真菌相互の抗原の共通性、及び/又は免疫系が活性化されることにより、スーパーオキシドアニオンや、一酸化窒素、各種サイトカインが遊離され、これらが幅広い抗微生物活性を有しているからと考えられる。

【0096】

また、本発明は、1)上記に記載の真菌抗原、又は上記に記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有することを特徴とする、個体に投与して真菌に対する感染防御免疫を誘導し又は治療効果を有する医薬組成物、2)上記に記載の真菌抗原、又は上記に記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有することを特徴とする、個体に投与して真菌に対する感染防御免疫を誘導し又は治療効果を有するワクチン組成物、3)該ワクチン組成物を投与することを含む、真菌に対する脊椎動物の免疫応答を刺激する方法、及び4)ワクチン組成物の投与対象となる脊椎動物において、該免疫応答によりワクチン組成物の製造に使用した真菌及び/又はその近縁菌の増殖を抑制し、該真菌に起因する疾病を予防または治療する、真菌に対する脊椎動物の免疫応答を刺激する方法、を提供する。

【0097】

本発明の真菌抗原は生物学的製剤として、上記ワクチン組成物のほか、サイトカイン放出剤、アレルギー性疾患の減感作治療等に使用可能なアレルゲン組成物として用いることができる。さらに、皮膚反応による感染の経験の有無、スクラッチテストによるアレルギー性疾患、等の診断を行う為の生体内診断及び/又は実験室診断に用いることができる。実験室診断に用いる製剤には、例えばマイクロタイター試薬、ラテックス凝集試薬、免疫比濁試薬、酵素免疫試薬等の免疫学的診断薬も含む。

【0098】

本発明のサイトカイン放出剤を、個体に対し使用する際には、凍結乾燥粉末若しくは適当な塩溶液や懸濁液、又は上記アジュバントを含む懸濁液又は溶液の形で用いることが出来る。また該サイトカイン放出剤は放出されたサイトカインが有効である疾患の治療剤として用いることも出来る。例えば、放出されたサイトカインがIFN- γ である場合、該サイトカイン放出剤は癌や細菌感染症、アレルギーの治療剤として用いることが出来る。

【0099】

投与方法としては、経皮(皮下又は皮内)、肺吸入、経粘膜(鼻、眼、膣など)、経口、舌下、又は静脈内に投与すればよい。例えば、癌の治療を目的とした場合、代表的な投与量は、ヒトの場合0.02 μ g~1mg/kg/回であるが、対象となる疾患及び目的に応じて、投与量を増加したり、投与回数を増大させればよい。

【0100】

本発明のアレルゲン組成物をアレルギー性疾患の予防や治療の目的で患者に投与する際には、適当な塩溶液や懸濁液の形で用いることができ、ポリエチレングリコールやフェノールを添加してもよい。更に上記のような、哺乳類のワクチン製剤化に使用されるアジュバントを含む懸濁液又は溶液として投与することもできる。アジュバントは、普通、抗原と共に投与されるが、抗原投与の前または後に与えてもよい。抗原はまたリポソームまたは他のマイクロキャリアに取り込ませて投与することができる。当然、不溶性画分又はその可溶化画分、更にいくつかの異なる真菌の同様の画分と混合して用いることもでき、また市販の真菌アレルゲンエキス、ハウスダスト、スギなどの各種アレルゲンエキス、及び/又は精製アレルゲンと混合して用いることも可能である。それによって、複数のアレルゲンに感受性のあるアレルギー性患者に、複数のアレルゲンに対する減感作免疫を誘導することができる。

【0101】

10

20

30

40

50

投与方法としては、経皮（皮下または皮内）、肺吸入、経粘膜（鼻、眼、膺等）、経口、舌下、又は静脈内に投与すればよい。代表的な投与量は、治療を目的とする場合、投与ルートにより異なり、例えば0.2 ng ~ 0.1 mg / kg / 回であるが、必要とする予防や治療の程度に応じて、投与量を増加したり、投与回数を増大させればよい。

【0102】

また、本発明は、1) 上記に記載の真菌抗原、又は上記に記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有することを特徴とする、個体に投与して真菌に対するアレルギー性疾患を予防し又は治療効果を有するアレルゲン組成物、2) アレルゲン組成物を投与することを含み、真菌に対する脊椎動物のアレルギー反応を抑制する方法、及び3) アレルゲン組成物の投与対象となる脊椎動物において、該免疫応答によりアレルゲン組成物の製造に使用した真菌及び/又はその近縁菌に起因するアレルギー性疾患を予防または治療する、真菌に対する脊椎動物のアレルギー反応を抑制する方法を提供する。

10

【0103】

本発明の真菌抗原を、生体内診断の目的で個体に対し、例えば、吸入誘発試験、皮膚テスト、鼻や眼の粘膜試験で使用する際は、凍結乾燥粉末、若くは適当な塩溶液や懸濁液の形で用いることができ、ポリエチレングリコールやフェノールを添加してもよい。パッチテストには、白色ワセリンを基剤としてラウリル硫酸ナトリウム等の界面活性剤を添加したものに上記抗原成分を溶解したものを使用することができる。

【0104】

また本発明の真菌抗原は、実験室診断、例えば、抗原抗体反応である凝集反応、沈降反応、中和反応、標識抗体法等を用いた診断法、ヒスタミン遊離試験、リンパ球幼若化試験、白血球遊走阻止試験等にも使用することができる。例えば、IgE抗体価測定用の抗原として使用する際には、ペーパーディスク、セルローススポンジ、マイクロプレート等の固相体に上記抗原成分を固定化して使用することができる。

20

【0105】

また、本発明は、1) 上記に記載の真菌抗原、又は上記に記載の製造方法で製造される真菌抗原を含有することを特徴とする、真菌による疾患の診断用組成物、2) 該組成物を使用することを含み、真菌による脊椎動物の疾患の診断方法、を提供する。

【0106】

本発明の対象となる脊椎動物は、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、ヒト及びヒト以外の哺乳類であり、これらは抗原と反応して抗体を産生する。その結果、全脊椎動物が抗原と反応することができる。本発明の真菌抗原は、一般にヒトまたは家畜動物などの哺乳類に適用するが、上記の性質を有すれば、例えば魚類などの営利目的に飼育された脊椎動物も本発明の対象に含まれる。

30

【実施例】

【0107】

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に限定されるものではない。

【0108】

実施例1（カンジダ アルビカンス細胞の細胞分画および不溶性画分の調製）

40

1) プロトプラスト細胞の調製：カンジダ アルビカンスTIMM 1768のサブロー寒天斜面培養物の一白金耳分をYPD培地（yeast extract 1重量%、ポリペプトン2重量%、グルコース2重量%）を入れた試験管に植菌した。30℃で24時間振とう培養後、培養液の一部を、三角フラスコに入れたYPD培地に植菌し、35℃で一晩振とう培養した。得られた培養液から、2,000 × g、10分間の遠心分離処理により細胞を集めた。なお、得られた細胞は酵母型であった。細胞を滅菌水で1回洗浄後、SSB溶液（0.8 M ソルビトール入り50 mM リン酸緩衝液pH 7.5）で1回洗浄した。細胞を再度適当量のSSB溶液に懸濁後、該SSB溶液の1/8容量の100 mM EDTA含有SSB溶液、及び適当量の2-メルカプトエタノールを加え、緩やかに振とうした。続いて、この懸濁液に、終濃度0.3 mg/mLとなるようにザイモリース20 T（生化学工業社製）を加え、35℃で1時間緩

50

やかに振とうした。さらに、終濃度 1mg/mL となるようにトリコデルマ・ライジングエンザイム（シグマ社製）を加え、35 で1時間緩やかに振とうした。得られた懸濁液を2,000 × g、10分間の遠心分離処理に付し、プロトプラスト細胞を集めた。この細胞をSSB溶液で十分に洗浄し、細胞分画に供した。

【0109】

2) プロトプラスト細胞からの細胞分画および抗原液の調製：上記の様にして得られたプロトプラスト細胞に、約 4×10^9 cell/mL となるよう滅菌生理食塩水を加え、十分攪拌した後、氷上に10分間静置した。プロトプラスト細胞がバーストしたことを確認後、10,000 × g、30分間遠心し、得られた沈殿を不溶性画分（以下、Ca-LSPという）とした。遠心上清をさらに100,000 × g、60分間遠心し、得られた沈殿をリボソーム画分（以下、HSP という）、そして遠心上清を可溶性画分（以下、HSS という。この画分にHSP90 およびエノラーゼが含まれていた）とした。Ca-LSPを再度生理食塩水に懸濁後、超音波処理、さらに沸騰水浴下、5分間処理し殺菌することにより、膜タンパク質等を含むLSP抗原液を調製した。HSP についても、適当なタンパク質濃度になるように生理食塩水に懸濁し、抗原液とした。HSS についてもタンパク質濃度を測定し、適当量を抗原として使用した。2 Lの培養液より得られた細胞を上記のように処理して得られたCa-LSP抗原液のタンパク質濃度は2.3 mg/mLであった（タンパク質量はBSAを標準としてピシンコニン酸（BCA）試薬により定量した）。

10

【0110】

3) 真菌細胞の細胞壁除去の程度の確認：細胞壁の除去の程度は、顕微鏡下の細胞形態観察、細胞を生理食塩水中でバーストさせた後の生菌数、及び血清因子を用いた凝集反応の阻害による相対的定量法により確認した。例えば、カンジダ アルビカンス、アスペルギルス フミガタスの細胞の場合、上記の方法により細胞壁が除去されると、顕著な形態の変化を起こした（第1図、第2図）。また、上記の方法で作製したプロトプラスト細胞を生理食塩水中でバーストさせたところ、含有される生菌の比率は1%未満であった。また、作製したCa-LSP抗原液を100 μlとり、YPD寒天培地上に広げ、30 で4日間培養したが、カンジダ アルビカンス細胞のコロニーの出現は見られず、Ca-LSP抗原液には生菌は存在しなかった。HSP 抗原液、HSS 抗原液からもコロニーの出現は見られなかった。

20

【0111】

一方、抗カンジダ血清である因子血清No.1（ヤترون製）はカンジダ アルビカンスTI MM 1768（血清型A）を凝集させるが、この凝集に対する阻害活性を指標に、不溶性画分に含有される細胞壁成分の残存量を、構成成分である細胞壁マンナンの量として定量した。細胞壁マンナン含量の比較対照として、市販のカンジダアレルゲンエキスであるアレルゲンスクラッチエキス「トリイ」カンジダ（鳥居薬品社製）を用いた。

30

【0112】

陽性コントロールとして、小林らの方法[Kobayashi, H. et al., Arch. Biochem. Biophys. Vol.272, 364-375, (1989)]により、カンジダ アルビカンスJ-1012株（血清型A）より精製した血清型Aマンナンの各種濃度の溶液を用いた。その結果、市販のカンジダアレルゲンエキス（タンパク質濃度約0.4 mg/ml）中には、4.5 mg/mlの血清型Aカンジダ アルビカンス細胞壁マンナン（以下、「血清型Aマンナン」と略す。）が含有されていたが、Ca-LSP（タンパク質濃度約2.3 mg/mL）では凝集阻害は起こらず、本発明の抗原成分中の血清型Aマンナンの含有量は、本法による検出限界値の0.5mg/mL以下であることが明らかとなった。即ち、本発明の真菌抗原は、タンパク質量が多く、細胞壁マンナン量は前記の方法では検出限界値以下であることから従来のアレルゲンエキスと明らかに異なることが示された。

40

【0113】

得られたCa-LSP抗原液について中性糖、脂質、核酸含量を測定すると共に、一部をとり凍結乾燥後秤量した。その結果、上記の例のCa-LSP抗原液10mLには、凍結乾燥残さとして約130 mg（タンパク質23 mg、中性糖2 mg、脂質8 mg、NaCl 計算値90 mg、その他として核酸、水分が少量）が含まれていた。

50

【0114】

実施例2 (アスペルギルス フミガタス不溶性画分の調製)

1) アスペルギルス フミガタス不溶性画分 (Af-LSP) の調製 - 1 : アスペルギルス フミガタスTIMM 1776 のサブローデキストロース寒天斜面培養物に0.1重量% ツィーン80を含む生理食塩水を加え孢子懸濁液を作製した。この懸濁液の一部を、三角フラスコに入れたポテトデキストロース培地 (ディフコ社製) に植菌し、30 で一晚振とう培養した。得られた培養液をガラスフィルターでろ過し菌体を集めた。菌体を0.8 M NaClを含む10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) に懸濁後、終濃度10 mg/mLとなるようにヤタラーゼ (宝酒造社製) を加え、30 で4時間緩やかに振とうした。得られた懸濁液をガラスフィルターでろ過し、プロトプラスト細胞を集めた。

10

【0115】

この細胞を0.8 M NaClで2回洗浄後、得られたプロトプラスト細胞に 1×10^8 cell/mLとなるよう滅菌生理食塩水を加え、バーストさせた。10,000 × g、30分間の遠心により、不溶性画分を回収した。この不溶性画分を再度生理食塩水に懸濁後、超音波処理、さらに沸騰水浴下、5分間処理し滅菌し、アスペルギルス フミガタス不溶性画分Af-LSP抗原液1 (タンパク質濃度約0.9 mg/mL) とした。

2) アスペルギルス フミガタス不溶性画分 (Af-LSP) の調製 - 2 : 上記の1)と同様にして作製した孢子懸濁液の一部を、三角フラスコに入れた0.8 M NaClを含むポテトデキストロース培地 (ディフコ社製) に植菌し、30 で一晚振とう培養した。培養液の濁度は1)と同等であった。得られた培養液をガラスフィルターでろ過し菌体を集めた。菌体を0.8 M NaClを含む10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) に懸濁後、ヤタラーゼ (終濃度10 mg/mL)、トリコデルマ ライジング エンザイム (終濃度3 mg/mL)、及びザイモリエース20T (終濃度1 mg/mL) を加え、30 で2時間緩やかに振とうした。細胞懸濁液をガラスフィルターでろ過し、濾液よりプロトプラスト細胞を集め細胞数を計測したところ、1)で得られた同一培養液量当たりプロトプラスト数の約2倍であった。従って、本培養方法により、プロトプラスト細胞収率が上がるということが明らかとなった。この細胞を0.8M NaClで2回洗浄後、得られたプロトプラスト細胞を、上記1)と同様に処理し、アスペルギルス フミガタス不溶性画分Af-LSP抗原液2とした。

20

【0116】

実施例3 (クリプトコッカス ネオホルマンズ不溶性画分 (Crn-LSP) の調製)

クリプトコッカス ネオホルマンズTIMM 0354 のサブローデキストロース寒天斜面培養物の一白金耳分を三角フラスコに入れたYPD培地に植菌し、30 で一晚振とう培養した。得られた培養液から遠心により細胞を集め、細胞を滅菌水で1回洗浄後、1 M ソルビトール、100 mM EDTA 入り100 mMクエン酸緩衝液 (pH 5.8) に懸濁し、終濃度5 mg/mLとなるようにトリコデルマ・ライジングエンザイムを加え、37 で1時間緩やかに振とうした。得られた懸濁液を、2,000 × g、10分間の遠心につけ、プロトプラスト細胞を集めた。この細胞を上記の高張緩衝液で洗浄後、 1×10^8 cell/mLとなるよう滅菌生理食塩水を加え、プロトプラスト細胞を懸濁し、バーストさせた。10,000 × g、30分間の遠心により、不溶性画分を回収した。この不溶性画分を再度生理食塩水に懸濁後、超音波処理、さらに沸騰水浴下、5分間処理し滅菌し、その後、10,000 × g、30分間の遠心により、不溶性画分を回収した。この不溶性画分をクリプトコッカス ネオホルマンズ不溶性画分Crn-LSP抗原液 (タンパク質濃度2.9 mg/mL) とした。

30

40

【0117】

実施例4 (カンジダ アルピカンス不溶性画分Ca-LSPからの可溶化画分の調製)

実施例1で得られたCa-LSP抗原液 (タンパク質濃度2.3 mg/mL) 100 mLに、100 mMオクチルチオグルコシドを含む40 mM ビストリス緩衝液 (pH 6.5) を100 mL加えた。4 で一晚攪拌後、100,000 × g、1時間遠心し、上清として50mMオクチルチオグルコシドによる可溶化画分 (Ca-LSP-S) の溶液200 mLを得た (タンパク質濃度0.4 mg/mL)。この溶液のうち100 mLを限外ろ過 (分画分子量10,000) で濃縮後、リン酸緩衝生理食塩水に対して透析し、オクチルチオグルコシドを除去した。さらにポアサイズ0.22 μmのメンブランフィ

50

ルターでろ過し、界面活性剤を除去した可溶化画分 (Ca-LSP-SD) の溶液 20 mL (タンパク質濃度 1.3 mg/mL) を得た。

【0118】

実施例 5 (カンジダ アルビカンス可溶化画分 (Ca-LSP-S) の ConA カラムによる分画)

実施例 4 で得られた、Ca-LSP-S の残り 100 mL を限外ろ過により濃縮 (タンパク質濃度 3 mg/mL) 後、オクチルグルコシドの終濃度が 20 mM になるように、1.5 倍量の 20 mM ビストリス緩衝液 (pH 6.5) を加えた。得られた溶液に、終濃度が 0.25 M になるように NaCl を、さらに、終濃度が 1 mM になるように CaCl₂ 及び MnCl₂ を添加した。次に、このものを緩衝液 A (20 mM ビストリス、20 mM オクチルチオグルコシド、0.25 M NaCl、1 mM CaCl₂、1 mM MnCl₂ (pH 6.5)) で予め平衡化した ConA sepharose 4B (Pharmacia-LKB) のカラムに供した。緩衝液 A で非吸着成分を洗浄し、得られた通過画分及び、洗浄画分を合わせ、ConA カラム非吸着画分とした。次に、0.25 M のメチル-D-グルコースを含む緩衝液 A により ConA カラム吸着成分を溶出し、これを ConA カラム溶出画分とした。得られた ConA カラム非吸着画分、及び ConA カラム溶出画分を限外濾過 (分画分子量 10000) で濃縮し得られた濃縮液をそれぞれ、Ca-ConA-Pass 及び Ca-ConA-Elute とした。

10

【0119】

実施例 6 (ワクチン製剤の調製)

1) 油中水系 (不完全フロイントアジュバント) 製剤の調製

上記の、不溶性画分である各種 LSP (Ca-LSP 等) 由来、LSP 由来の界面活性剤除去可溶化画分 (Ca-LSP-SD 等)、及び ConA カラム溶出画分 (Ca-ConA-Elute) の抗原液の必要量を取り、等容量の不完全フロイントアジュバント (以下、IFA と略す) (ディフコ社製) と十分に混合し、油中水系のワクチン製剤とした。

20

2) アラム製剤の調製

上記の、不溶性画分である上記の各種 LSP、又は LSP 由来の界面活性剤除去可溶化画分 (Ca-LSP-SD 等) の抗原液の必要量を取り、攪拌しながら等量のアラム (ピアス社製) を滴下し、すべてを添加後、さらに 30 分間攪拌し、ワクチン製剤とした。

【0120】

実施例 7 (カンジダ アルビカンス由来の不溶性画分 Ca-LSP と、HSP、HSS 各抗原液のワクチン活性の比較および生菌ワクチンとの比較)

1) Ca-LSP、HSP、HSS 各抗原液のワクチン活性の比較: 実施例 1 で得られた Ca-LSP、HSP、HSS 各抗原液を、タンパク質濃度として 400 µg/mL となるように生理食塩水で希釈した。実施例 6 に従い、希釈液に等量の IFA を加えワクチン製剤とし、C57BL/6 マウス (6 週齢、雌、一群当たり 5 匹) に一匹当たり 0.1 mL ずつ皮下接種により免疫した。また、抗原液の代わりに生理食塩水を用いた群を対照とした。一週間後、再度同量を皮下接種した。即ち、一匹当たりの投与量はいずれの抗原も 20 µg タンパク質/回となる。二回目の免疫の一週間後、全ての免疫マウスに、サブロー・デキストロース液体培地で培養して得られたカンジダ アルビカンス TIMM 1768 細胞を 2.5×10^5 個ずつ静脈内感染させた。感染後、30 日間生死を観察した。

30

結果を表 1 に示す。不溶性画分の Ca-LSP はリボソーム画分 (HSP) や可溶性画分 (HSS) より強いワクチン活性を示した。

40

【0121】

【表 1】

投与群	平均生存日数 ± 標準偏差	30日後生存数 / 使用マウス数
生理食塩水	5.8 ± 1.6	0 / 5
Ca-LSP	> 28.8 ± 2.7	4 / 5
HSP	7.6 ± 3.4	0 / 5
HSS	7.4 ± 0.9	0 / 5

【0122】

50

2) カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSPと生菌ワクチンとのワクチン活性の比較：Ca-LSPの投与量が0.2 μg タンパク質相当/回、2 μg タンパク質相当/回、20 μg タンパク質相当/回となるように、Ca-LSP抗原液の濃度を調製後、実施例6に従いワクチン製剤とし、実施例7-1)と同様にC57BL/6 マウス(1群当たり5匹)に一週間隔で2回皮下接種により免疫した。また、カンジダ アルビカンス TIMM 1768をサブロー・デキストロース培地で一晚振とう培養し、細胞を遠心で回収、生理食塩水で洗浄し、得られた細胞を 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 個/mLとなるように生理食塩水に懸濁した。各々の懸濁液に等量のIFAを加え混合後、マウスに一匹当たり0.1 mLずつ皮下接種により免疫した。一週間後、上記と同様に調製した生菌カンジダ細胞を同量ずつ皮下接種した。即ち、一匹当たりの投与量は 5×10^4 、 5×10^5 、 5×10^6 個/回となる。対照として、生理食塩水と等量のIFAを混合したものを一週間隔で2回皮下接種により投与した。二回目の免疫の一週間後、全ての免疫マウスに、サブロー・デキストロース培地で培養して得られたカンジダ アルビカンス TIMM 1768細胞を 2.5×10^5 個ずつ静脈内感染させた。感染後、30日間生死を観察した。

結果を表2に示す。Ca-LSPは、投与量が2 μg タンパク質相当/回でも強い感染防御活性を示し、生菌免疫より優れた感染防御作用を示した。

【0123】

【表2】

投与群	1回当たりの投与量	平均生存日数 ±標準偏差	30日後生存数 /使用マウス数
生理食塩水	—	4.0 ± 1.4	0/5
Ca-LSP	0.2*	9.6 ± 2.5	0/5
	2	> 27.6 ± 4.3	2/5
	20	> 30.0 ± 0.0	5/5
生菌	5×10^4 個	16.8 ± 6.3	0/5
	5×10^5 個	19.6 ± 9.0	0/5
	5×10^6 個	> 20.8 ± 10.1	2/5

*: μg タンパク質相当

【0124】

実施例8(カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSP由来の界面活性剤除去可溶化画分の感染防御活性)

実施例4で調製したCa-LSP由来の界面活性剤除去可溶化画分(Ca-LSP-SD)の投与量が20 μg タンパク質相当/回となるように希釈後、実施例6に従いワクチン製剤とし、実施例7-1)と同様にC57BL/6 マウス(1群当たり5匹)に1週間隔で2回皮下免疫した。対照として、カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSPのIFAとの製剤、及び生理食塩水とIFAとの混合物で同様に免疫した。免疫後1週目に、カンジダ アルビカンス TIMM 1768細胞を 2.5×10^5 個ずつ静脈内感染させた。感染後、30日間生死を観察した。結果は表3のとおりである。LSP可溶化画分も不溶性画分であるLSPと同等の感染防御活性を示した。

【0125】

【表3】

投与群	平均生存日数±標準偏差	30日後生存数/使用マウス数
生理食塩水	6.6 ± 2.9	0/5
Ca-LSP	> 26.8 ± 4.7	2/5
Ca-LSP-SD	> 24.6 ± 5.1	2/5

10

20

30

40

50

【0126】

実施例9 (カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSP由来Ca-ConA-Elute の感染防御活性)

実施例5で得られた、ConA結合性マンノース含有糖タンパク質含量の高い画分であるCa-ConA-Eluteを、タンパク質濃度として4 µg / mLとなるように生理食塩水で希釈した。実施例6に従い、希釈液に等量のIFAを加えワクチン製剤とし、実施例7-1)と同様にC57BL/6 マウス(6週齢、雌、一群当たり5匹)に投与し、カンジダ アルビカンスTIMM 1768 感染に対する防御作用を確認した。結果を表4に示す。Ca-ConA-Eluteは、投与量が0.2 µg タンパク質相当/回で十分な感染防御活性を示した。

【0127】

【表4】

投与群	平均生存日数 ± 標準偏差	30日後生存数/使用マウス数
生理食塩水	4.0 ± 1.4	0 / 5
Ca-ConA-Elute	> 20.8 ± 12.3	2 / 5

10

【0128】

実施例10 (各種マウスカンジダ症全身感染モデルでのカンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSPのワクチン作用)

1) ワクチン接種マウスの免疫低下状態での感染防御: 実施例1で調製したCa-LSPの投与量が20 µg タンパク質相当/回となるように希釈後、実施例6に従いワクチン製剤とし、実施例7-1)と同様にC57BL/6 マウス(1群当たり5匹)に1週間隔で2回皮下免疫した。対照として、生理食塩水とIFAとの混合物で同様に免疫した。2回目の免疫後、3日目に免疫マウスにサイクロフォスファミドを200 mg / kg腹腔内に投与し、免疫抑制状態にした。その4日後に、カンジダアルビカンス TIMM 1768細胞を 5×10^4 個ずつ静脈内感染させた。感染後、30日間生死を観察した。結果は表5のとおりである。サイクロフォスファミドにより免疫能を低下させても、Ca-LSP免疫群では十分な感染防御作用を有していた。

20

30

【0129】

【表5】

投与群	平均生存日数±標準偏差	30日後生存数/使用マウス数
生理食塩水	1.6 ± 1.3	0 / 5
Ca-LSP	> 27.6 ± 5.4	4 / 5

40

【0130】

2) Ca-LSPのワクチン作用の持続: 実施例1で調製したCa-LSPの投与量が20 µg タンパク質相当/回となるように希釈後、実施例6に従いワクチン製剤とし、実施例7-1)と同様にC57BL/6 マウス(1群当たり5匹)に1週間隔で2回皮下免疫した。2回目の免疫後、34日目にカンジダ アルビカンスTIMM 1768 細胞を 1×10^5 個ずつ静脈内感染させた。感染後、12日目に屠殺、無菌的に両腎を摘出し、6 mLの生理食塩水を加え、ホモゲナイザーを用いてホモジェネートを得た。これを生理食塩水で希釈後($\times 1, \times 10, \times 100$)、希釈液の100 µlをサブロー・デキストロース寒天培地上に広げ、30°Cで1日間培養し、出現するコロニー数を測定した。結果を表6に示す。この結果より明らかのように、Ca-LSPによる免疫により、免疫後34日目でも感染防御免疫は働いており、腎菌数は減少

50

した。

【 0 1 3 1 】

【 表 6 】

投与群	菌数 (× 1 0 ³) *
生理食塩水	9100, 1400, 2800, 1600, — **
Ca-LSP	130, 26, 0, 0, 0

* : 5匹それぞれの両腎ホモジェネート (6 mL) 中の菌数

** : 屠殺前に死亡

10

【 0 1 3 2 】

実施例 1 1 (カンジダ アルビカンス TIMM 0239による感染)

実施例 1 で調製したCa-LSPの投与量が20 μg タンパク質相当 / 回となるように希釈後、実施例 6 に従いワクチン製剤とし、実施例 7 - 1) と同様にC57BL/6 マウス (1 群当たり 5 匹) に 1 週間隔で 2 回皮下免疫した。また、Ca-LSPの代わりに生理食塩水を用いたものを対照とした。免疫後 1 週間目に、免疫した抗原の由来するカンジダ アルビカンス TIMM 1768と異なるカンジダ アルビカンスTIMM 0239 細胞を 5×10^5 、 1×10^6 個ずつマウス (各群 5 匹) に静脈内感染させた。感染後、30日間生死を観察した。結果は表 7 のとおりである。この結果よりカンジダ アルビカンスの一菌株由来のLSP で免疫すれば、他のカンジダ アルビカンス株に対しても感染防御免疫が誘導されることが明らかである。

20

【 0 1 3 3 】

【 表 7 】

感染細胞数 (個)	投与群	平均生存日数 ± 標準偏差	30日後生存数 / 使用マウス数
5×10^5	生理食塩水	8.6 ± 8.7	0 / 5
5×10^5	Ca-LSP	> 30.0 ± 0.0	5 / 5
1×10^6	生理食塩水	2.0 ± 0.7	0 / 5
1×10^6	Ca-LSP	> 24.0 ± 9.2	2 / 5

30

【 0 1 3 4 】

実施例 1 2 (カンジダ アルビカンス生細胞で免疫されたマウスのCa-LSPに対する特異的遅延型過敏症 (DTH) 反応)

実施例 7 - 2) と同じ方法で 5×10^4 、 5×10^5 、 5×10^6 個の生菌でC57BL/6 マウス (各群 5 匹) を 1 週間隔で 2 回皮下免疫した。また、Ca-LSPの IFA との製剤を 0.2、2、20 μg タンパク質相当 / 回となるようにC57BL/6 マウス (各群 5 匹) に 1 週間隔で 2 回皮下免疫した。免疫後 6 日目に 200 μg タンパク質相当 / mLのCa-LSP抗原液 50 μl を各マウスのフットパッド (foot pad) に皮下投与した。24時間後にフットパッドの腫れを測定した。

40

【 0 1 3 5 】

結果を表 8 に示す。この結果より、生菌で感作されたマウス個体内で、Ca-LSPを抗原として認識するDTH 反応が誘導されている、即ち感染防御免疫が成立しているマウス個体では、Ca-LSPに対する細胞性免疫が成立していることが明らかとなった。また、Ca-LSPで免疫したマウスにおいてはCa-LSPに対する強い細胞性免疫が誘導されていた。

50

【 0 1 3 6 】

【 表 8 】

投与群	1 回当たりの 投 与 量	フットパッドの腫れ ($\times 10^{-2}$ mm) ±標準偏差
生理食塩水	—	14.2 ± 9.5
生菌	5×10^4 個	123.0 ± 34.5
	5×10^5 個	114.8 ± 21.2
	5×10^6 個	144.0 ± 17.1
Ca-LSP	0. 2 *	85.0 ± 16.6
	2	109.2 ± 26.5
	2 0	120.4 ± 18.6

* : μ g タンパク質相当

10

【 0 1 3 7 】

実施例 1 3 (カンジダ アルビカンス細胞で免疫されたマウスの脾臓リンパ球のカンジダ アルビカンスCa-LSPに対する特異的増殖)

実施例 7 - 2) と同じ方法で 5×10^6 個の生菌で免疫したBALB/cマウスより、最終免疫後 1 5 日目に脾臓を取り出し、RPMI-1640 培地中でホモゲナイズし細胞懸濁液とした。これにRPMI-1640 培地を加え洗浄遠心後、細胞を10%牛胎児血清 (FCS) 添加したRPMI-1640 培地に再懸濁した。この細胞懸濁液をナイロンウールカラムに入れ、37 で1時間培養後、10%FCS 添加RPMI-1640 培地で溶出し、T細胞リッチな画分を得た。遠心で細胞を集め、10%添加RPMI-1640 培地に 1×10^7 個/mLとなるように懸濁した。適当に希釈したCa-LSP抗原液を100 μ l ずつ96ウェルマイクロプレートに分注後、細胞懸濁液を100 μ l ずつ加え、37 、5%CO₂ 条件下で培養、2日後に、³H-チミジン (0.5 μ Ci/ウェル) を加えた。1 8 時間培養後、細胞を回収し、細胞への³H-チミジン取り込み量を測定した。

20

結果を表 9 に示す。免疫マウス由来の脾細胞はCa-LSPに対して濃度依存的な増殖を示した。

30

【 0 1 3 8 】

【 表 9 】

Ca-LSP濃度**	³ H-チミジン取込み (cpm) ±標準偏差	刺激指数 (S I) *
0	2477 ± 219	1.0
0.05	2882 ± 334	1.2
0.5	14357 ± 2771	5.8
5	41736 ± 2326	16.9

* : $S I = \frac{[\text{Ca-LSP添加時の}^3\text{H-チミジン 取込み量(cpm)}]}{[\text{Ca-LSP無添加時の}^3\text{H-チミジン 取込み量(cpm)}]}$ ** : μ g タンパク質相当

40

【 0 1 3 9 】

実施例 1 4 (カンジダ アルビカンス生菌で免疫または感作された哺乳動物血中のカンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSP由来のタンパク質に対する抗体)

1) カンジダ アルビカンス生菌で免疫されたマウス血中のCa-LSP由来のタンパク質に対する抗体 : 実施例 7 - 2) と同じ方法で 5×10^6 個の生菌で免疫したBALB/cマウスより抗カンジダ血清を調製した。次に、Ca-LSPにSDS 電気泳動用サンプルバッファーを加え、沸騰水浴下 3 分間処理後、遠心し、上清を12.5% SDS-PAGEにかけた。電気泳動後、PVDF膜

50

にブロッティング、ブロックエースで一晩ブロッキング、その後、50倍希釈抗血清を反応させ、そして、二次抗体としてラット抗マウスIgG抗体を用いて抗原性タンパク質を検出したところ、第3図(レーン1)に示すように、免疫され、感染防御免疫が成立しているマウス血清中には、Ca-LSPに含まれるいくつかのタンパク質に対するIgG抗体が誘導されていることが明らかとなった。なお、分子量65,000付近に検出されるタンパク質は、実施例15に示すタンパク質である。

【0140】

2)ウサギの抗カンジダ血清に含まれるCa-LSPに対する抗体：市販のウサギ抗カンジダ血清(大日本製薬より購入)を一次抗体として、また、ヤギ抗ウサギIgG抗体を二次抗体として用いて、実施例14-1)と同様にCa-LSPに含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離、PVDF膜にブロッティング、ウェスタンブロッティング法により抗原性タンパク質を検出したところ、第3図(レーン2)に示すように、ウサギ抗カンジダ血清中には、Ca-LSPに含まれるいくつかのタンパク質に対する抗体が誘導されていることが明らかとなった。即ち、ウサギにおいても、Ca-LSPに含まれる成分が抗原として作用することが明らかとなった。65kD付近に検出されるタンパク質は、上記と同様に実施例15に示すタンパク質である。

10

【0141】

3)ヒト血中のCa-LSPに対する抗体：カンジダ アルビカンスはヒトの常在菌であり、殆どのヒトがカンジダ アルビカンス細胞に感作されていることが知られている。そこで、健康人血中にCa-LSP由来のタンパク質に対する抗体が存在するか否かを調べるために、健康ヒト血清を一次抗体として、ヤギ抗ヒトIgG抗体を二次抗体として用い、実施例14-1)と同様にCa-LSP由来のタンパク質についてウェスタンブロッティング法により抗原性タンパク質を検出した。その結果、第3図(レーン3)に示すように、健康ヒト血清中には、Ca-LSPに含まれるいくつかのタンパク質に対するIgG抗体が検出され、ヒトにおいても、Ca-LSPに含有されるタンパク質は抗原として作用することが明らかとなった。

20

【0142】

実施例15(カンジダ アルビカンス可溶化画分(Ca-LSP-S)からの抗原性タンパク質の精製)

1)タンパク質の単離：実施例5で得られたCa-ConA-Passを、予め緩衝液B(20mMピストリス、20mMオクチルチオグルコシド、1mM CaCl₂、1mM MnCl₂(pH6.5))で平衡化させたMonoQカラム(Pharmacia-LKB社製)に供し、緩衝液Bによる洗浄後、0-0.8M NaClの直線勾配をもつ緩衝液Bによる溶出を行った。得られた画分について実施例14-1)と同一条件でイムノブロッティングを行い、いくつかのマウス抗カンジダ血清に対して陽性を示すタンパク質を含む画分を集め、緩衝液Bによる透析を行った。

30

得られた透析液を、緩衝液Bで予め平衡化させたハイドロキシアパタイト(三井東圧社製)に供し、緩衝液Bによる洗浄後、0-0.5M NaClの直線勾配をもつ緩衝液Bによる溶出を行った。溶出画分について、再度実施例14-1)と同一条件でイムノブロッティングを行い、マウス抗カンジダ血清と強く反応する分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約65,000のタンパク質、及び抗カンジダ血清と弱く反応する分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約25,000のタンパク質を単離した。

40

【0143】

得られた2種のタンパク質のN末端アミノ酸配列を、L-500型高速アミノ酸分析計(日立製作所社製)を用い決定したところ、各々配列表の配列番号：1及び配列表の配列番号：2に示すアミノ酸配列を有すると予想された。得られたアミノ酸配列情報について、既知タンパク質とホモロジー検索を行ったところ、分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約65,000のタンパク質はサッカロマイセス セレピシエのミトコンドリア局在ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(DLDH)と、分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約25,000のタンパク質はサッカロマイセス セレピシエのミトコンドリア局在スーパーオキシドデスムターゼ(SOD)とホモロジーを有し、何れもミトコンドリア由来のタンパク質であると推定された。

50

【0144】

また、一方、Ca-ConA-PassのMonoQ カラムによる分画により得られた画分について、実施例13と同様の方法で免疫マウス脾臓リンパ球に対する増殖誘導活性を測定すると共に、SDS-PAGEによるタンパク質の分離及び銀染色による分析を行った。Ca-ConA-PassのMonoQ カラムによる分画における0.12M NaCl付近に溶出された画分を集め、再度MonoQ カラムにかけ、0-0.24M NaClの直線濃度勾配を持つ緩衝液Bにより溶出を行った。得られた溶出画分から分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約30000のタンパク質を単離することができた。

【0145】

同様に、Ca-ConA-PassのMonoQ カラムによる分画により、0.64M NaCl付近に溶出された画分についても、再度MonoQ カラムにかけ、0.24-0.8M NaClの直線濃度勾配を持つ緩衝液Bにより溶出を行った。得られた溶出画分から分子量(SDS-PAGE、還元条件下)約62,000のタンパク質を単離することができた。これらのタンパク質は、実施例14-1)記載のマウス抗カンジダ血清との反応性は非常に低いですが、実施例13と同様の方法で調製した生菌免疫マウス脾臓リンパ球に対しては、最終タンパク質濃度5 μ g/mLで明らか³H-チミジンの取込みを促進し、増殖誘導活性を有することが明らかとなった。

【0146】

得られた2種のタンパク質のN末端アミノ酸配列を、L-500型高速アミノ酸分析計(日立製作所社製)を用い決定したところ、各々配列表の配列番号:3及び配列表の配列番号:4に示すアミノ酸配列を有すると予想された。得られたアミノ酸配列情報について、既知タンパク質とホモロジー検索を行ったところ、分子量約30,000のタンパク質はサッカロマイセス セレピシエのシトレートシンターゼ(citrate synthase)と、分子量約62,000のタンパク質はサッカロマイセス セレピシエの液胞型アミノペプチダーゼI(vacuolar aminopeptidase I)とホモロジーを有することが分かった。

【0147】

2)単離したタンパク質の抗原性試験:実施例13と同様の方法により、上記単離された4種のタンパク質(分子量約65,000のタンパク質、分子量約25,000のタンパク質、分子量約30000のタンパク質及び分子量約62,000のタンパク質)について生菌免疫マウス由来の脾臓リンパ球細胞への³H-チミジン取り込み量を測定した。その結果、1アッセイ当たり5 μ g/mlのタンパク質量で、何れのタンパク質も増殖誘導活性を示した。

【0148】

更に、実施例12と同様の方法により、生菌免疫マウスのフットパッドに皮下投与しDTH反応を誘導するか試験した。上記4種の抗原性タンパク質について試験を行った結果、5 μ g/回の投与で何れのタンパク質も有意にフットパッドの腫れを検出した。

以上の結果より、単離された4種のタンパク質は、何れも感染防御免疫の成立した個体に認識されるタンパク質であることが明らかとなった。

【0149】

実施例16(カンジダ アルビカンス不溶性分画Ca-LSPで免疫されたマウス由来の脾細胞の移入による感染防御能の獲得)

実施例7-1)と同様にCa-LSPのIFAとの製剤をBALB/cマウス(1群5匹)に0.1mLずつ1週間隔で2回皮下免疫した。投与量は20 μ g タンパク質相当/回である。対照として、生理食塩水とIFAとの混合物で同様に免疫した。2回目の免疫後1週目に、5匹の免疫したマウスより脾臓を摘出し、RPMI-1640培地中でホモゲナイズし細胞懸濁液(約 8×10^7 個/0.5mL)とし、この0.5mLをC.B.-17/scidマウス(各群5匹)に移入した。1日後、カンジダ アルビカンス TIMM 1768細胞を各マウスに 5×10^4 個ずつ静脈内感染させた。さらに対照として、正常な(脾臓細胞を移入していない)C.B.-17/scidマウス(5匹)に同数のカンジダ アルビカンス TIMM 1768細胞を静脈内感染させた。感染後、5日目に屠殺、無菌的に両腎を摘出し、6mLの生理食塩水を加えてホモゲナイズし、ホモジェ

ネットを得た。これを生理食塩水で希釈後 ($\times 1, \times 10, \times 100$)、希釈液の100 μL をサブロー・デキストロース寒天培地上に広げ、30 で1日間培養し、出現するコロニー数を測定した。結果を表10に示した。

【0150】

【表10】

移入脾細胞	菌数 ($\times 10^2$) *	平均菌数 \pm 標準偏差 ($\times 10^2$ 個)
なし (正常)	239, 119, 151, 119, 110	148 \pm 54
生理食塩水	21, 61, 85, 155, 172	99 \pm 64
Ca-LSP	9, 17, 2, 49, 182	52 \pm 75

* : 5匹それぞれの両腎ホモジェネート (6 mL) 中の菌数

【0151】

Ca-LSP免疫マウス由来の脾細胞を移入することにより、正常のマウスに比べ有意に ($p < 0.05$) 腎菌数は減少した。即ち、Ca-LSPにより免疫されたマウスの脾細胞による養子免疫が可能であることが明らかとなった。

【0152】

実施例17 (アスペルギルス フミガタス不溶性画分Af-LSPのワクチン活性)

実施例2-1)で調製したAf-LSP抗原液1を用い、実施例6に従いワクチン製剤を調製し、C57BL/6マウスに2、20 μg タンパク質相当/回、1週間隔で2回皮下免疫した。対照として、生理食塩水とIFAとの混合物と同様に免疫した。免疫後、8日目にアスペルギルス フミガタスTIMM 1776の胞子を 2×10^6 個ずつ静脈内感染させた。感染後、30日間生死を観察した。

【0153】

結果は表11のとおりである。20 μg タンパク質相当/回、2回の投与で明らかな感染防御効果が見られ、2 μg タンパク質相当/回でも有意な延命が見られた。即ち、Af-LSPもワクチンとして有用である可能性が示された。

【0154】

【表11】

投与群	1回当たりの投与量	平均生存日数 \pm 標準偏差	30日後生存数 / 使用マウス数
生理食塩水	—	5.3 \pm 0.5	0 / 6
Af-LSP	2*	9.6 \pm 4.8	0 / 5
	20	> 11.7 \pm 6.5	2 / 6

* : μg タンパク質相当

【0155】

実施例18 (アスペルギルス フミガタス生細胞を投与したマウス血中のアスペルギルス フミガタス不溶性画分Af-LSP由来のタンパク質に対する抗体)

アスペルギルス フミガタスTIMM 1776の胞子懸濁液 (1×10^8 個/mL) を等量の完全フロイントアジュバントと混合し、この0.1 mLを1週間隔で2回BALB/cマウスに皮下免疫した。免疫後、1週間目に採血し、抗アスペルギルス血清を得た。

【0156】

実施例2-1)で調製したAf-LSP抗原液1をSDS-PAGEで分離後、PVDF膜にブロッティング

10

20

30

40

50

グし、抗アスペルギルス血清を一次抗体として、ウサギ抗マウスIgG抗体を二次抗体として用いて、実施例14-1)と同様にウエスタンブロッティングにより抗原性タンパク質を検出したところ、第4図(レーン1)に示すようにAf-LSP中のタンパク質に対する抗体が含まれていた。すなわち、アスペルギルス感染において、Af-LSPに含有されているタンパク質は、生体に抗原として認識される。従って、実施例17に示したように、Af-LSPに対する免疫を誘導しておくことにより特異的な防御効果を期待できると思われる。

【0157】

実施例19(真菌由来の不溶性画分間の交差反応性)

1)抗カンジダ血清または抗アスペルギルス血清の他の種類の真菌由来のタンパク質に対する交差反応性: Af-LSP抗原液1、Crn-LSPをSDS-PAGEで分離後、PVDF膜にブロッティングし、抗カンジダ血清(実施例14-1))を一次抗体として、ウサギ抗マウスIgG抗体を二次抗体として用いて、実施例14-1)と同様にウエスタンブロッティングにより抗原性タンパク質を検出したところ、抗カンジダ血清は第5図に示すようにCrn-LSP由来のタンパク質に対して交差反応性を示した(レーン2)。また、アスペルギルス由来のAf-LSPに対しても弱い交差反応性が認められた(レーン3)。なお、レーン1は、不溶性画分としてCa-LSPを用いた例である。

10

【0158】

また、Crn-LSPをSDS-PAGEで分離後、PVDF膜にブロッティングし、抗アスペルギルス血清(実施例18)を一次抗体として、ウサギ抗マウスIgG抗体を二次抗体として用いて、実施例14-1)と同様にウエスタンブロッティングにより抗原性タンパク質を検出したところ、抗アスペルギルス血清は、クリプトコッカス由来のCrn-LSP中に含まれるタンパク質に対しても弱いながら交差反応した(第4図、レーン2)。

20

【0159】

2)特異的な細胞性免疫の誘導およびCa-LSP免疫マウスにおけるAf-LSPに対する細胞性免疫: Ca-LSP、Af-LSP抗原液1それぞれのIFAとの製剤を、C57BL/6マウスに0.2μgタンパク質相当/回、2μgタンパク質相当/回、20μgタンパク質相当/回、1週間隔で2回皮下免疫した。対照として、生理食塩水とIFAとの混合物で同様に免疫した。免疫後、6日目にAf-LSPを20μgタンパク質相当/50μlずつ各マウス(各群5匹)のフットパッドに皮下投与した。24時間後にフットパッドの腫れを測定した。結果を表12に示す。Af-LSP免疫群で腫れが大きいことから、Af-LSPにかなり選択性を有するDTH反応が誘導されていることが明らかとなった。一方、Ca-LSP 20μgタンパク質相当免疫群においてもAf-LSPに対しても有意なDTH反応が生じており、交差反応する細胞性免疫が誘導されていることが明らかとなった。即ち、異なる真菌間で交差反応するタンパク質が存在することが示された。従って、一種のLSPを用いて異なる真菌による感染を防御できると思われる(実施例20参照)。

30

【0160】

【表 1 2】

投与群	1 回 当 たり の 投 与 量	フットパッドの腫れ (10^{-2} mm) ±標準偏差
生理食塩水	—	6.8 ± 5.8
Af-LSP	0.2*	21.0 ± 16.1
	2	42.6 ± 18.8
	20	90.0 ± 37.1
Ca-LSP	0.2*	7.4 ± 3.4
	2	5.2 ± 5.7
	20	28.0 ± 10.9

* : μ gタンパク質相当

10

【0161】

実施例 2 0 (カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSPのマウスアスペルギルス症感染モデルでのワクチン効果)

20

Ca-LSPのIFAとの製剤をC57BL/6マウスに20 μ gタンパク質相当/回、1週間隔で2回皮下免疫した。対照として、生理食塩水とIFAとの混合物で同様に免疫した。免疫後、8日目にアスペルギルス フミガタスTIMM 1776の胞子を 2×10^6 個ずつ静脈内感染させた。感染後、30日間生死を観察した。結果は表13のとおりである。Ca-LSPで免疫することによりアスペルギルス感染に対する感染防御免疫も誘導することができることが明らかとなった。

【0162】

【表 1 3】

投与群	平均生存日数 ±標準偏差	30日後生存数 /使用マウス数
生理食塩水	6.4 ± 0.9	0 / 6
Ca-LSP	> 22.6 ± 9.0	2 / 5

30

【0163】

実施例 2 1 (菌糸型カンジダ アルビカンス細胞の調製及び菌糸型細胞由来の不溶性画分Ca-LSP-Mの調製)

40

実施例 1と同様に、カンジダ アルビカンスTIMM 1768をYPD培地で30℃で24時間振とう培養して得られた培養液の一部を、三角フラスコに入れたFCS10%添加RPMI-1640培地に植菌し、37℃で4時間振とう培養し、菌糸型カンジダ アルビカンス細胞を得た。培養液をガラスフィルターでろ過し細胞を回収後、SSB溶液で洗浄、再度SSB溶液に懸濁した。その後、実施例 1と同様にザイモリエース、トリコデルマ・ライジングエンザイムで処理した。菌糸状細胞とプロトプラスト細胞を分離するために、得られた懸濁液をガラスフィルターでろ過し、ろ液を回収した。得られたろ液を1,000 \times g、5分間遠心し、プロトプラスト細胞を集めた。この細胞をSSB溶液で洗浄後、滅菌生理食塩水を加え、十分攪拌した後、氷上に10分間静置した。プロトプラスト細胞がバーストしたことを確認後、10,000 \times g、30分間遠心し、得られた沈殿を菌糸型細胞由来の不溶性画分(以下、Ca-LSP-Mという)とした。

50

【0164】

Ca-LSP-Mは生理食塩水に懸濁後、超音波処理、さらに沸騰水浴下、5分間処理して殺菌し、培養菌体液100mLより膜タンパク質等を含むCa-LSP-M抗原液2mLを得た(タンパク質濃度1.2mg/mL)。Ca-LSP-M及び対照としてCa-LSP(いずれもタンパク質量として約4 μ g)をSDS-PAGEで分離後、PVDF膜にブロッティングし、抗カンジダ血清(実施例14-1)を一次抗体として、ラット抗マウスIgG抗体を二次抗体として用いて、実施例14-1と同様にウエスタンブロッティングにより抗原性タンパク質を検出した。その結果、第6図(レーン2)に示すように、抗カンジダ血清中にはCa-LSP-Mに含まれるいくつかのタンパク質に対するIgG抗体が誘導されており、第3図のレーン1の酵母型細胞のCa-LSPとは異なるバンドも存在した(第6図のレーン1)。さらに、抗体量も多いと思われた。なお、本実施例で用いた菌糸型カンジダアルビカンス細胞の細胞壁除去処理前後の、細胞の形態の変化を第7図に示す。

10

【0165】

実施例22(ヒト皮膚反応による診断)

実施例1で得られたCa-LSPの生理食塩水溶液(タンパク質濃度2.3mg/mL)を生理食塩水でタンパク質濃度1.0mg/mLになるように希釈後、さらに100倍、1000倍に希釈した。皮膚反応は、各希釈液を20 μ lずつパッチスター(鳥居薬品製)に浸み込ませたものを、ボランティア4人の腕皮膚面に2日間貼付後、パッチスターを剥がしてから1時間後の皮膚の状態を、紅斑や丘疹の有無により診断した。判定は、国際接触皮膚炎症研究グループ(ICDRG)の基準に従った。4人のうちアレルギー体質の2人に明らかな紅斑が見られ、1人もわずかな紅斑が見られた。従って、本発明の真菌抗原が、個体のDTH反応を利用した診断に有効であることが明らかとなった。

20

【0166】

実施例23(ヒト血漿中IgE抗体価の測定)

臭化シアンによるペーパーディスクの活性化、及び抗原(実施例4で得られたCa-LSP-Sを、タンパク質濃度として100 μ g/mLに希釈した溶液)のペーパーディスクへのカップリングは、宮本らの方法[Miyamoto et al. Allergy, Vol. 22, 584-594(1973)]を参考に実施した。ヒト血漿中IgE抗体価の測定は、ポリスチレンチューブに抗原をカップリングさせた上記ペーパーディスク1枚とヒト血清50 μ Lを加えて、室温で3時間放置した。次いで、0.2%のツイーン20を含む生理食塩水でペーパーディスクを3回洗浄後、RAST-RIAキット(Pharmacia社製)の¹²⁵I標識抗ヒトIgE抗体50 μ Lを加えて室温で16時間放置した。

30

【0167】

上記洗浄液で再度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RAST-RIAキットの対照試薬で作成した標準曲線からIgE抗体価を算出した。アレルギー患者のうち、市販の診断用アレルギー皮内エキス(鳥居薬品社製)の皮内テストで陽性の24人について、Ca-LSP-Sに対するIgE抗体価を測定したところ、15人が陽性であった(0.35 PRU/mL以上を陽性とした)。従って、アレルギー患者において、Ca-LSP-Sに対する陽性率は高く、不溶性画分からなる本発明の真菌抗原がIgE抗体検出に有効であることが明らかとなった。

40

【0168】

実施例24(Ca-LSPによるヒト末梢血リンパ球(PBMC)からのサイトカイン産生)

PBMCは健常人から成分採血により採血を行い、白血球画分を集めさらに以下の分離方法に従って調製した。すなわち、採血液をRPMI-1640培地で約2倍希釈後、フィコール-パック(Ficoll-Paque)分離液(ファルマシア社製)上に重層し、500 \times gで20分間室温で遠心した。中間層のPBMCをピペットで回収、洗浄して90%牛胎児血清(FCS、インターゲン社製)と10%ジメチルスルホキシド(シグマ社製)からなる保存液に懸濁した状態で液体窒素中に保存した。Ca-LSPによるPBMC処理は以下のように行った。

50

【0169】

上記保存PBM C検体を融解後、ヒトA B血清(アーバインサイエンス社製)を終濃度5%(v/v)となるように添加したRPMI-1640培地に懸濁し、 1.5×10^6 個/mlとなるように希釈し24穴マイクロプレートに1ウェルあたり1ml分注した。次に実施例1で得られたCa-LSPの生理食塩水溶液(タンパク質濃度2.3mg/ml)を、添加量が5 μ gタンパク質相当/ウェルになるよう生理食塩水で希釈したCa-LSP抗原液を1ウェルあたり50 μ l加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で培養した。培養開始後7日目に培養上清を分取し、IFN- γ 量をヒトIFN- γ ELISAキット(Amersham Life Science社製)を使用して測定した。測定は製造元のプロトコールに従い実施した。なおキットの検出限界値は、0.002ng/mlである。

10

【0170】

7日目のIFN- γ の量を第8図に示す。ヒトPBM CはCa-LSPに対して反応しIFN- γ を産生した。なお15検体のIFN- γ 産生量は 1.435 ± 1.210 (平均 \pm SD)ng/mlの範囲に分布した。

【0171】

対照としてCa-LSP抗原液の代わりに生理食塩水50 μ l/ウェルを加えて同様にしてIFN- γ の量を測定した。該ウェルにおけるIFN- γ の検出量はキットの検出限界値以下であった。

【0172】

実施例25(真菌アレルギー皮内反応診断試薬および診断用滴定試薬の調製)

20

実施例1で調製されたCa-LSP抗原液を乾燥させて粉末状で採取して、真菌アレルギー疾患に対する皮内反応診断試薬及び真菌アレルギー診断用滴定試薬として用いる。皮内反応診断試薬には0.5%フェノールを添加した0.9%生理食塩水を溶媒とし、タンパク質濃度で1mg/mlとし、これの1000倍希釈液を調製して用いる。また、真菌アレルギー診断用滴定試薬には、タンパク質濃度として1mg/mlの濃度でハックス緩衝液に溶解し、これをヒスタミン遊離滴定用試薬の原液としてその希釈液を用いる。

【0173】

実施例26(減感作治療用抗原製剤の調製)

実施例1で調製されたCa-LSP抗原液を乾燥させて粉末状で採取して、真菌アレルギー疾患に対する減感作治療剤として用いる。アレルゲン活性成分を1mg/mlの濃度で0.5%フェノールを添加した0.9%生理食塩水に溶解し、減感作治療用抗原の原液とする。

30

【0174】

実施例27(カンジダ アルビカンス抗原性タンパク質をコードする核酸の単離)

1)分子量約65,000のタンパク質をコードするDNAの単離:実施例15-1)で単離した分子量約65,000のタンパク質(以下、65Kタンパク質と称す)をコードする核酸を単離するため、始めにカンジダ アルビカンスTIMM1768株のcDNAライブラリーを作製した。

【0175】

まず菌体より全RNAを抽出、精製するため、上記の菌を200mlYPD培地で35 $^{\circ}$ Cで培養後、2000 \times g、5分間の遠心分離処理により細胞を回収し、一度蒸留水で洗浄した。得られた細胞を液体窒素により急速凍結し、乳鉢により凍結細胞を粉末状に破碎した。この細胞粉末より、RNAエクストラクションキット(RNA extraction kit, フェルマシア社製)を用いて全RNAを回収、精製した。この全RNAからオリゴデックス-dT30<スーパー>(oligotex-dT30, 宝酒造社製)を用いて、ポリ(A)⁺RNAを調製した。次にタカラcDNA合成キット(宝酒造社製)を用いて、ポリ(A)⁺RNA5 μ gからcDNAを合成した。合成されたcDNAをラムダファージベクターSCREEN-1(ノバジェン社製)と連結した後、ファージメーカーシステム、ファージパックエクストラクト(ノバジェン社製)によりインビトロパッケージングを行いcDNAライブラリーを構築した。

40

【0176】

50

実施例 15 - 1) のアミノ酸配列解析により 65 k タンパク質は サッカロマイセス セレピシエの DL DH のホモログと推定された。そこで他種生物の DL DH において、高度に保存されたアミノ酸配列をコードすると推定される塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド DL 2 と配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列の一部をコードすると推定される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド DL 1 を合成、精製し PCR 用のプライマーとした。DL 1 の塩基配列を配列表の配列番号：9 に、DL 2 の塩基配列を配列表の配列番号：10 に示す。PCR の鋳型とするため、カンジダ アルビカンス TIMM 1768 株からゲノム DNA を P. フィリップセン (P. Philippsen) らの方法 [メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第 194 巻、第 169 ~ 175 頁 (1991)] により抽出、精製した。精製したゲノム DNA を鋳型として DL 1 と DL 2 をプライマーとして用いた PCR を行った。PCR の反応条件は 94 にて 1 分、55 にて 1.5 分、72 にて 2 分の温度シフトを 30 サイクルおこなった。その結果、約 1 kb の大きさの DNA が増幅してきた。この DNA を pUC 118 ベクター (宝酒造社製) にクローニングした後、DNA 塩基配列を決定したところ、該増幅 DNA の塩基配列は配列表の配列番号：13 に示す通りであり、該塩基配列がコードすると予想されるアミノ酸配列は 65 k タンパク質の N 末端より決められたアミノ酸配列と一致した。従って得られた増幅 DNA 断片は 65 k タンパク質をコードする DNA の一部分であることが明らかとなった。

10

【0177】

次に、65 k タンパク質をコードする cDNA 全長を得るため、上記増幅 DNA 断片をプローブとして用いて、cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。前記のようにして得られた cDNA ライブラリーを宿主大腸菌 ER 1647 株に接種し、トップアガロース (0.7% アガロースを含む LB 培地) と混合後、LB プレート上に重層し、37 一夜培養することにより、プラークを形成させた。生じたプラークをナイロンメンブレン (Hybond-N、アマシャム社製) へ移し、プラークハイブリダイゼーションを行った。上記の PCR 断片 1 kb をランダムプライマー DNA ラベリングキット (宝酒造社製) と [a-³²P] dCTP で標識しハイブリダイゼーションのプローブとして用いた。1.6 × 10⁵ 個のプラークをスクリーニングした結果、多数のファージクローンがプローブとハイブリダイズした。このなかから、シグナルの強い 28 個のクローンについて、さらに解析した。すなわち、大腸菌内でのオートマチックサブクローニングにより、これらのファージから cDNA を含む領域を自動的にサブクローニングされたプラスミドを有する大腸菌を得た。これらの大腸菌からプラスミドを精製し、cDNA の長さ及び制限酵素切断による DNA バンドのパターンを比較し、65 k タンパク質遺伝子を含むと考えられる cDNA を選び、塩基配列を決定した。その DNA 塩基配列を配列表の配列番号：7 に示す通りであり、この塩基配列より 65 k タンパク質は配列表の配列番号：5 に示したアミノ酸配列を有するタンパク質であることが推定された。

20

30

【0178】

2) 分子量約 25,000 の抗原性タンパク質をコードする DNA の単離：実施例 15 - 1) で単離した分子量約 25,000 のタンパク質 (以下、25K タンパク質と称す) をコードする核酸を単離するため、先ず配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の一部をコードすると推定されるオリゴヌクレオチド SO 1 と SO 2 を合成、精製し PCR 用のプライマーとした。配列表の配列番号：11 に SO 1 の塩基配列を、配列表の配列番号：12 に SO 2 の塩基配列を示す。次に 1) において精製されたポリ (A)⁺ RNA 0.5 μg を用いて TaKaRa RNA LA PCR kit (AMV) Ver. 1.1 (宝酒造社製) を使用し、RT-PCR を行った。すなわち、oligo(dT)20-M4 adaptor プライマーを用いて、ポリ (A)⁺ RNA 0.5 μg から、AMV 逆転写酵素の反応 (45、30 分間) により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし、SO 1 と M13M4 プライマー (宝酒造社製) をプライマーとして、94 にて 0.5 分、55 にて 2 分、72 にて 2 分の温度シフトを 35 サイクルの条件で、PCR 反応をおこなった。さらに、上記 PCR 反応液を鋳型として、2 回目の PCR 反応 (nested PCR 反

40

50

応)を行った。この反応では、プライマーとして、S O 2 と M 1 3 M 4 プライマーを用いた。P C Rの結果、約700bpの大きさのDNAが増幅してきた。このDNAをpUC118ベクターにクローニングした後、DNA塩基配列を決定した。そのDNA塩基配列を配列表の配列番号：8に示す。該塩基配列にコードされると予想されるアミノ酸配列は配列表の配列番号：6に示す通りであり、そのN末端部分は25kタンパク質より決められたアミノ酸配列と一致した。このPCR断片はSODとホモロジーを有する25kタンパク質をコードするDNAであることが明らかとなった。

【0179】

配列表

配列番号：1

10

配列の長さ：50

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：33、44、49 不明のアミノ酸

配列：

Ala	Ser	Thr	Lys	Lys	Tyr	Asp	Val	Val	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	Pro
1				5						10				15
Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Ala	Ile	Lys	Ala	Ala	Gln	Leu	Gly	Leu	Asn
				20						25				30
Thr	Ala	Xaa	Ile	Glu	Lys	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Xaa	Leu
				35						40				45
Asn	Val	Gly	Xaa	Ile										
				50										

20

配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：26、29、30 不明のアミノ酸

配列：

Lys	Tyr	Ser	Leu	Pro	Glu	Leu	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ser	Ala	Thr	Glu
1				5						10				15
Pro	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gln	Ile	Asn	Glu	Ile	Xaa	Tyr	Thr	Xaa	Xaa
				20						25				30

30

配列番号：3

40

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ala	Ser	Ala	Glu	Pro	Thr	Leu	Lys	Gln	Arg	Leu	Glu	Glu	Ile	Leu
1				5						10				15
Pro	Ala	Lys	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Gln	Phe	Lys	Lys	Glu	His	Gly
				20						25				30

50

Lys

配列番号 : 4

配列の長さ : 30

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Lys	Phe	Thr	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Ala	Asp	Asp	Tyr	Ile	10
1				5					10					15	
Glu	Phe	Thr	Tyr	Lys	Asn	Pro	Thr	Ile	Tyr	His	Val	Val	Asn	Phe	
				20					25					30	

配列番号 : 5

配列の長さ : 491

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met	Leu	Arg	Ser	Phe	Lys	Ser	Ile	Pro	Ala	Asn	Gly	Lys	Leu	Ala	
1				5					10					15	
Gln	Phe	Val	Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Lys	Lys	Tyr	Asp	Val	Val	Val	
				20					25					30	
Ile	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Ala	Ile	Lys	Ala	Ala	
				35					40					45	
Gln	Leu	Gly	Leu	Asn	Thr	Ala	Cys	Ile	Glu	Lys	Arg	Gly	Ala	Leu	
				50					55					60	
Gly	Gly	Thr	Cys	Leu	Asn	Val	Gly	Cys	Ile	Pro	Ser	Lys	Ser	Leu	30
				65					70					75	
Leu	Asn	Asn	Ser	His	Leu	Leu	His	Gln	Ile	Gln	His	Glu	Ala	Lys	
				80					85					90	
Glu	Arg	Gly	Ile	Ser	Ile	Gln	Gly	Glu	Val	Gly	Val	Asp	Phe	Pro	
				95					100					105	
Lys	Leu	Met	Ala	Ala	Lys	Glu	Lys	Ala	Val	Lys	Gln	Leu	Thr	Gly	
				110					115					120	
Gly	Ile	Glu	Met	Leu	Phe	Lys	Lys	Asn	Lys	Val	Asp	Tyr	Leu	Lys	
				125					130					135	
Gly	Ala	Gly	Ser	Phe	Val	Asn	Glu	Lys	Thr	Val	Lys	Val	Thr	Pro	40
				140					145					150	
Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Ala	Gln	Glu	Val	Glu	Ala	Asp	His	Ile	Ile	
				155					160					165	
Val	Ala	Thr	Gly	Ser	Glu	Pro	Thr	Pro	Phe	Pro	Gly	Ile	Glu	Ile	
				170					175					180	
Asp	Glu	Glu	Arg	Ile	Val	Thr	Ser	Thr	Gly	Ile	Leu	Ser	Leu	Lys	
				185					190					195	
Glu	Val	Pro	Glu	Arg	Leu	Ala	Ile	Ile	Gly	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	
				200					205					210	
Leu	Glu	Met	Ala	Ser	Val	Tyr	Ala	Arg	Leu	Gly	Ser	Lys	Val	Thr	50

	215	220	225	
Val Ile Glu Phe	Gln Asn Ala Ile Gly	Ala Gly Met Asp Ala	Glu	
	230	235	240	
Val Ala Lys Gln	Ser Gln Lys Leu Leu	Ala Lys Gln Gly Leu	Asp	
	245	250	255	
Phe Lys Leu Gly	Thr Lys Val Val Lys	Gly Glu Arg Asp Gly	Glu	
	260	265	270	
Val Val Lys Ile	Glu Val Glu Asp Val	Lys Ser Gly Lys Lys	Ser	
	275	280	285	
Asp Leu Glu Ala	Asp Val Leu Leu Val	Ala Ile Gly Arg Arg	Pro	10
	290	295	300	
Phe Thr Glu Gly	Leu Asn Phe Glu Ala	Ile Gly Leu Glu Lys	Asp	
	305	310	315	
Asn Lys Gly Arg	Leu Ile Ile Asp Asp	Gln Phe Lys Thr Lys	His	
	320	325	330	
Asp His Ile Arg	Val Ile Gly Asp Val	Thr Phe Gly Pro Met	Leu	
	335	340	345	
Ala His Lys Ala	Glu Glu Glu Gly Ile	Ala Ala Ala Glu Tyr	Ile	
	350	355	360	
Lys Lys Gly His	Gly His Val Asn Tyr	Ala Asn Ile Pro Ser	Val	20
	365	370	375	
Met Tyr Thr His	Pro Glu Val Ala Trp	Val Gly Leu Asn Glu	Glu	
	380	385	390	
Gln Leu Lys Glu	Gln Gly Ile Lys Tyr	Lys Val Gly Lys Phe	Pro	
	395	400	405	
Phe Ile Ala Asn	Ser Arg Ala Lys Thr	Asn Met Asp Thr Asp	Gly	
	410	415	420	
Phe Val Lys Phe	Ile Ala Asp Ala Glu	Thr Gln Arg Val Leu	Gly	
	425	430	435	
Val His Ile Ile	Gly Pro Asn Ala Gly	Glu Met Ile Ala Glu	Ala	30
	440	445	450	
Gly Leu Ala Leu	Glu Tyr Gly Ala Ser	Thr Glu Asp Ile Ser	Arg	
	455	460	465	
Thr Cys His Ala	His Pro Thr Leu Ser	Glu Ala Phe Lys Glu	Ala	
	470	475	480	
Ala Leu Ala Thr	Phe Asp Lys Pro Ile	Asn Phe		
	485	490		

配列番号 : 6

配列の長さ : 188

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ala Thr Glu Pro Tyr	Ile Thr Gly Gln Met	Asn Glu Ile His Tyr	
1	5	10	15
Thr Lys His His	Gln Thr Tyr Val Asn	Asn Leu Asn Ala Ser	Ile
	20	25	30
Glu Gln Ala Val	Glu Ala Lys Ser Lys	Gly Glu Val Lys Lys	Leu

50

	35	40	45	
Val Ala Leu Gln Lys Ala Ile Asn Phe Asn Gly Gly Gly Tyr Leu				
	50	55	60	
Asn His Cys Leu Trp Trp Lys Asn Leu Ala Pro Val Ser His Gly				
	65	70	75	
Gly Gly Gln Pro Pro Ser Glu Asp Ser Lys Leu Gly Lys Gln Ile				
	80	85	90	
Val Lys Gln Phe Gly Ser Leu Asp Lys Leu Ile Glu Ile Thr Asn				
	95	100	105	
Gly Lys Leu Ala Gly Ile Gln Gly Ser Gly Trp Ala Phe Ile Val				10
	110	115	120	
Lys Asn Lys Ala Asn Gly Asp Thr Ile Asp Val Ile Thr Thr Ala				
	125	130	135	
Asn Gln Asp Thr Val Thr Asp Leu Asn Leu Val Pro Leu Ile Ala				
	140	145	150	
Ile Asp Ala Trp Lys His Ala Tyr Tyr Leu Gln Tyr Gln Asn Val				
	155	160	165	
Lys Ala Asp Tyr Phe Lys Asn Leu Trp His Val Ile Asn Trp Lys				
	170	175	180	
Glu Ala Glu Arg Arg Phe Glu Phe				20
	185			

配列番号 : 7

配列の長さ : 1750

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

CTCAGAGAGA CCGGACTAAA GATTCTATAA ATATTCTTTC TTTCTGTTCA CATTATATAT	60	30
TCTTCTCAAC AAATGTTAAG ATCATTCAAA TCTATTCCAG CCAATGGAAA ATTGGCCCAG	120	
TTTGTAGAT ATGCATCAAC CAAGAAATAC GACGTTGTTG TCATTGGTGG TGGACCAGGT	180	
GGGTACGTTG CTGCCATCAA GGCCGCTCAA TTAGGATTA AACTGCCTG TATTGAAAAA	240	
AGAGGTGCAT TGGGTGGTAC TTGTTTGAAT GTTGGTTGTA TCCCATCCA ATCTTTATTG	300	
AACAACCTCC ATTTATTACA CCAAATCCA CACGAAGCCA AAGAAAGAGG TATTTCCATC	360	
CAAGGTGAAG TTGGCGTTGA TTTTCCAAAA TTGATGGCTG CCAAGGAAAA AGCCGTCAAA	420	
CAATTGACCG GTGGTATTGA AATGTTGTTT AAAAAGAACA AGGTTGACTA CTTGAAAGGA	480	
GCCGTTCTT TTGTTAACGA AAAAACCCTC AAAGTCACTC CAATTGACGG CAGCGAAGCA	540	
CAAGAAGTTG AAGCCGACCA CATCATCGTT GCTACTGGGT CTGAACCAAC TCCATTCCCA	600	
GGTATTGAAA TAGATGAAGA AAGAATTGTC ACTTCTACTG GTATTTTATC ATTGAAAGAA	660	40
GTACCAGAAA GATTAGCCAT CATTGGTGGG GGTATCATTG GTTTGGAAAT GGCTTCCGTT	720	
TACGCAAGAT TGGGCTCTAA AGTCACTGTT ATCGAATTCC AGAACGCTAT TGGTGCCGGT	780	
ATGGATGCTG AAGTTGCTAA ACAATCTCAA AAATTATTGG CCAAACAAGG TTTGGACTTC	840	
AAATTAGGTA CAAAGTTTGT TAAAGGTGAA AGAGATGGTG AAGTGGTCAA GATCGAAGTT	900	
GAAGATGTCA AATCCGGTAA AAAATCTGAC CTTGAAGCCG ATGTCTTGTT GGTTGCCATT	960	
GGTAGAAGAC CATTTACTGA AGGTTTGAAC TTTGAAGCCA TTGGTTTAGA GAAAGATAAC	1020	
AAGGGAAGAT TGATTATTGA CGACCAATTC AAGACTAAAC ATGACCACAT CAGAGTTATT	1080	
GGGGATGTCA CATTCCGTCC TATGTTGGCC CACAAGGCTG AAGAAGAAGG TATCGCTGCT	1140	
GCTGAATACA TCAAGAAAGG TCACGGTCAT GTAAACTATG CTAACATCCC TTCTGTTATG	1200	
TATACTCACC CAGAAGTTGC CTGGGTTGGT TTAACGAAG AACAAATTGAA AGAACAAGGC	1260	50

ATCAAATACA AAGTAGGTAA ATTCCCATTG ATTGCCAACT CCAGAGCTAA AACCAACATG 1320
 GACTACTGATG GTTTCGTGAA ATTCATTGCT GATGCCGAAA CCCAAAGAGT GTTGGGTGTC 1380
 CACATTATTG GTCCAAATGC AGGTGAAATG ATTGCTGAAG CTGGTTTGGC CTTAGAATAT 1440
 GGTGCTTCCA CGGAAGACAT TTCAAGAACA TGTCATGCTC ATCCAACTTT ATCTGAAGCT 1500
 TTCAAGGAAG CTGCTTTGGC CACCTTTGAT AAGCCAATCA ACTTTTAAAA GTGATACTGA 1560
 ATACAACAGT AATGAAAAGT AAATACTAAA ATAATTTGAT TTGATTTTTT TTACTTTTTT 1620
 TTCACTCTTT TGCTCTCATT TTTAAGGTTA TCTAAATACT GAATTATCTG AGCCATATAA 1680
 GACAATCACA TCTATACATA AATACACAAA TAATAACACA TATATATTTA TTTTGAAAAA 1740
 AAAAAAAAAA 1750

10

配列番号 : 8

配列の長さ : 7 2 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

GCCACTGAAC CGTACATCAC AGGACAAATG AACGAAATTC ACTACACTAA ACATCACCAA 60
 ACTTATGTTA ACAACCTTAA TGCTTCAATT GAACAAGCCG TTGAAGCCAA ATCTAAAGGT 120
 GAAGTTAAAA AATTGGTTGC CTTACAAAAA GCCATCAATT TCAACGGTGG TGGTTACCTC 180
 AATCATTGTT TGTGGTGGAA AACTTTGGCT CCTGTCTCTC ACGGTGGTGG TCAACCACCA 240
 AGTGAAGATT CCAAATTAGG TAAACAAATC GTCAAACAAT TTGGTTCTTT GGATAAATTG 300
 ATTGAAATCA CCAATGGCAA ATTGGCTGGT ATTCAGGTT CTGGATGGGC TTTTATTGTT 360
 AAAAAACAAAG CCAATGGTGA TACTATTGAT GTCATACCA CTGCTAACCA AGATACTGTT 420
 ACTGATCTAA ACTTGGTTCC ATTGATTGCT ATTGATGCTT GGAAACATGC TTATTATTTG 480
 CAATACCAAA ATGTTAAAGC TGATTACTTC AAGAACCTTT GGCATGTTAT CAACTGGAAG 540
 GAAGCTGAAA GAAGATTTGA ATTTTAAGTT ACTGGACAAA AGTCAAGTAC ATATTTAAAT 600
 CCAATATTAG AAAATAAAG AGTTACTTCC GATAGTGCTG ATTTTGTTTA ATATTTCCCC 660
 ATTGTATATA AGTATATATG CAAGAATATA TTCCTGATTG TGATGTAAAA AAAAAAAAAA 720
 A 721

20

30

配列番号 : 9

配列の長さ : 2 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の種類 (合成DNA)

配列の特徴 : 3 (イノシン)、9 (イノシン)、12 (イノシン)、15 (イノシン)

配列 :

GGNTAYGTNG CNGCNATHAA RGC 23

40

配列番号 : 10

配列の長さ : 2 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の種類 (合成DNA)

配列の特徴 : 6 (イノシン)、15 (イノシン)、18 (イノシン)

配列 :

TCYTCNGCYT TRTGNGCNAR CAT 23

50

配列番号 1 1

配列の長さ : 3 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の種類 (合成 DNA)

配列 :

AARTAYWSNY TNCCNGARYT NGAYTAYGAR TT 32

10

配列番号 1 2

配列の長さ : 2 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の種類 (合成 DNA)

配列 :

GCNACNGARC CNTAYATHWS NGGNCA 26

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 9 4 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

GGGTACGTGG CGGCGATCAA GGCCGCTCAA TTAGGATTAA ACACTGCCTG TATTGAAAA 60
 AGAGGTGCAT TGGGTGGTAC TTGTTTGAAT GTTGGTTGTA TCCCATCCAA ATCTTTATTG 120
 AACAACTCCC ATTTATTACA CCAAATCCAA CACGAAGCCA AAGAAAGAGG CATTCTATC 180
 CAAGGTGAAG TTGGCGTTGA TTTTCCAAAA TTGATGGCTG CCAAGGAAAA AGCCGTCAAA 240
 CAATTGACCG GTGGTATTGA AATGTTGTTT AAAAAGAACA AGGTTGACTA CTTGAAAGGA 300
 GCCGGTCTT TTGTTAACGA AAAAACCCTC AAAGTCACTC CAATTGACGG CAGCGAAGCA 360
 CAAGAAGTTG AAGCCGACCA CATCATCGTT GCTACTGGGT CTGAACCAAC TCCATTCCCA 420
 GGTATTGAAA TAGATGAAGA AAGAATTGTC ACTTCTACTG GTATTTTATC ATTGAAAGAA 480
 GTACCAGAAA GATTAGCCAT CATTGGTGGG AGTATCATTG GTTTGGAAAT GGCTTCCGTT 540
 TACGCAAGAT TGGGCTCTAA AGTCACTGTT ATCGAATTCC AGAACGCTAT TGGTGCCGGT 600
 ATGGATGCTG AAGTTGCTAA ACAATCTCAA AAATTATTGG CCAAACAAGG TTTGGACTTC 660
 AAATTAGGTA CAAAGTTTGT TAAAGGTGAA AGAGATGGTG AAGTGGTCAA GATCGAAGTT 720
 GAAGATGTCA AATCCGGTAA AAAATCTGAC CTTGAAGCCG ATGTCTTGTT GGTTGCCATT 780
 GGTAGAAGAC CATTACTGA AGTTTTGAAC TTTGAAGCCA TTGGTTTAGA GAAAGATAAC 840
 AAGGGAAGAT TGATTATTGA CGACCAATTC AAGACTAAAC ATGACCACAT CAGAGTTATT 900
 GGGGATGTCA CATTCCGTCC TATGCTCGCC CACAAAGCCG AAGA 944

20

30

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 8 0 】

【 図 1 】 第 1 図は、カンジダ アルビカンス T I M M 1 7 6 8 細胞 (酵母型) の細胞壁除去前後の形態を示す図である。微分干渉顕微鏡 (ニコン社製) を用い、倍率はいずれも 1 0 0 0 倍である。A は細胞壁除去前の細胞であり、B は細胞壁除去後の細胞である。

【 図 2 】 第 2 図は、アスペルギルス フミガタス細胞の細胞壁除去前後の形態を示す図である。微分干渉顕微鏡 (ニコン社製) を用い、倍率はいずれも 4 0 0 倍である。A は細胞壁除去前の細胞であり、B は細胞壁除去後の細胞である。

50

【図3】第3図は、マウスの抗カンジダ血清（レーン1）、ウサギの抗カンジダ血清（レーン2）、及び健常ヒト血清（レーン3）に含まれる、カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSP由来のタンパク質に対する抗体の存在を示す図である。

【図4】第4図は、マウスの抗アスペルギルス血清に含まれる、アスペルギルス フミガタス不溶性画分 Af-LSP 由来のタンパク質（レーン1）及びクリプトコッカスネオホルマンズ不溶性画分 Crn-LSP由来のタンパク質（レーン2）に対する抗体の存在を示す図である。

【図5】第5図は、マウスの抗カンジダ血清に含まれる、カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSP由来のタンパク質（レーン1）、クリプトコッカス ネオホルマンズ不溶性画分 Crn-LSP由来のタンパク質（レーン2）及びアスペルギルス フミガタス不溶性画分 Af-LSP 由来のタンパク質（レーン3）に対する抗体の存在を示す図である。

10

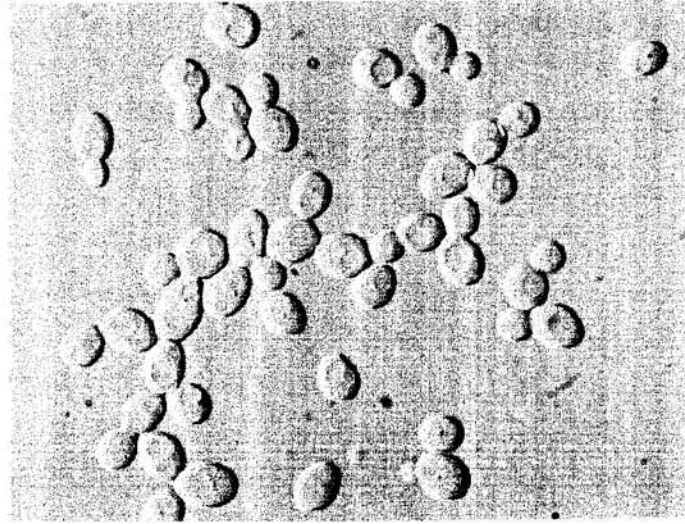
【図6】第6図は、マウスの抗カンジダ血清に含まれる、酵母型カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSP由来のタンパク質（レーン1）及び菌糸型カンジダ アルビカンス不溶性画分Ca-LSP-M由来のタンパク質（レーン2）に対する抗体の存在を示す図である。

【図7】第7図は、菌糸型カンジダ アルビカンス細胞の細胞壁除去前後の形態を示す図である。微分干渉顕微鏡（ニコン社製）を用い、倍率はいずれも400倍である。Aは細胞壁除去前の細胞であり、Bは細胞壁除去後の細胞である。

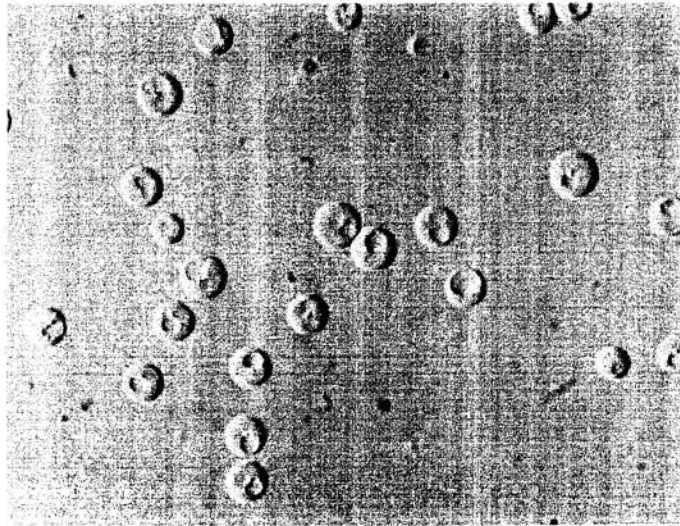
【図8】第8図は、ヒト末梢血リンパ球（PBMC）を含むRPMI-1640培地にCa-LSP抗原液を添加し、培養開始後7日目のヒトIFN- γ 産生量を示す図である。

【図1】

第1図



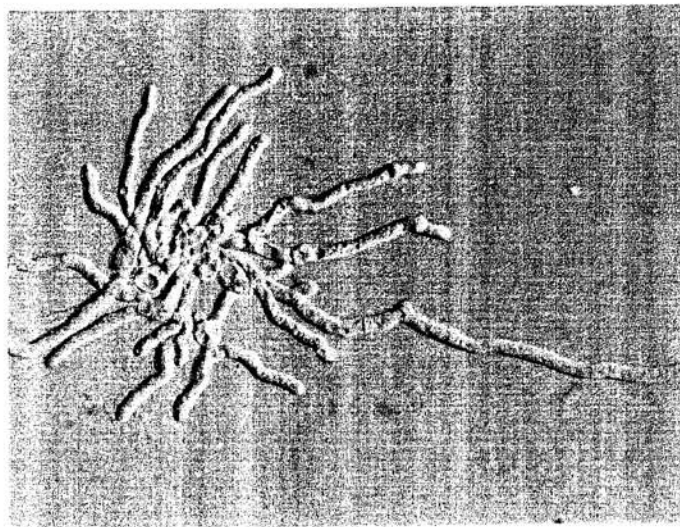
A



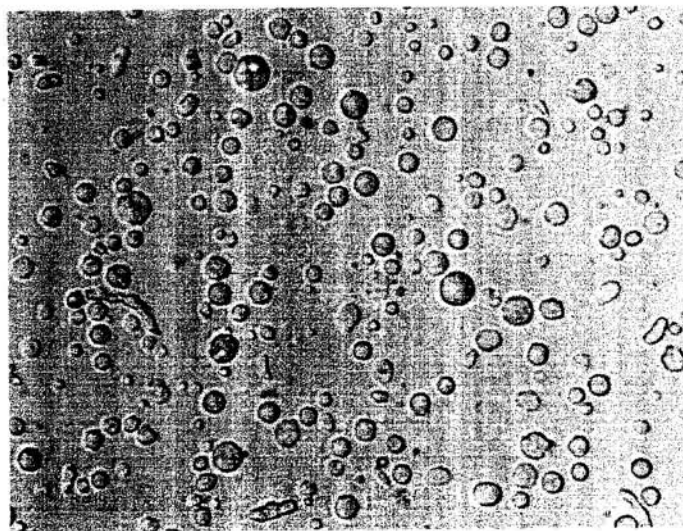
B

【図 2】

第 2 図



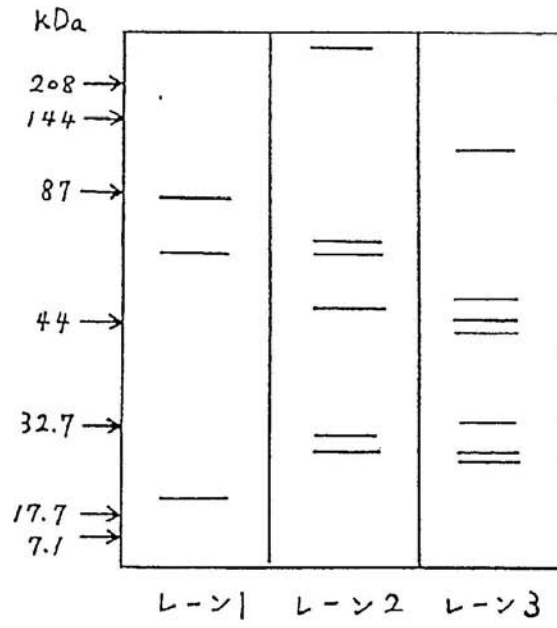
A



B

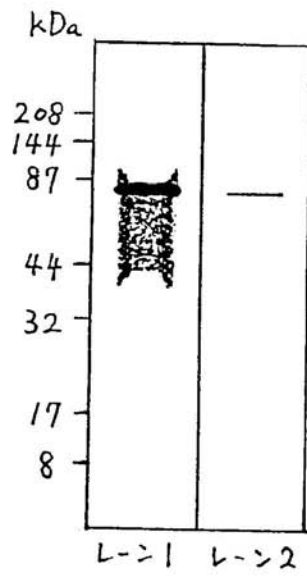
【 図 3 】

第 3 図



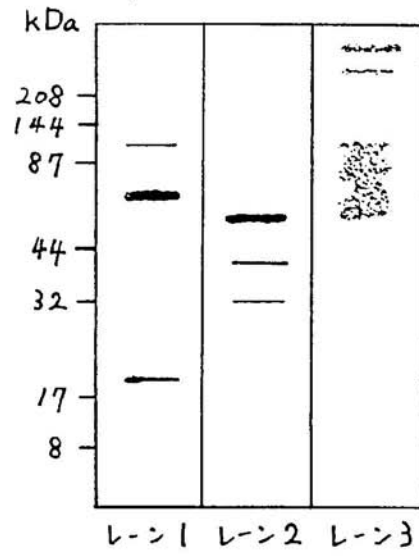
【 図 4 】

第 4 図



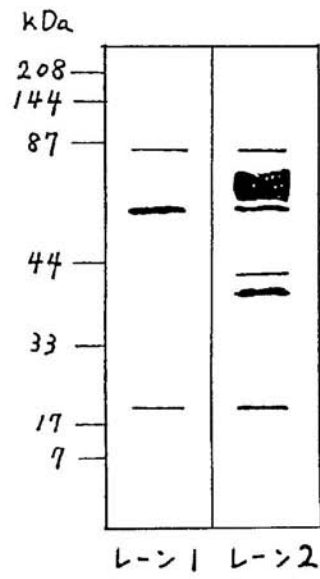
【図5】

第5図



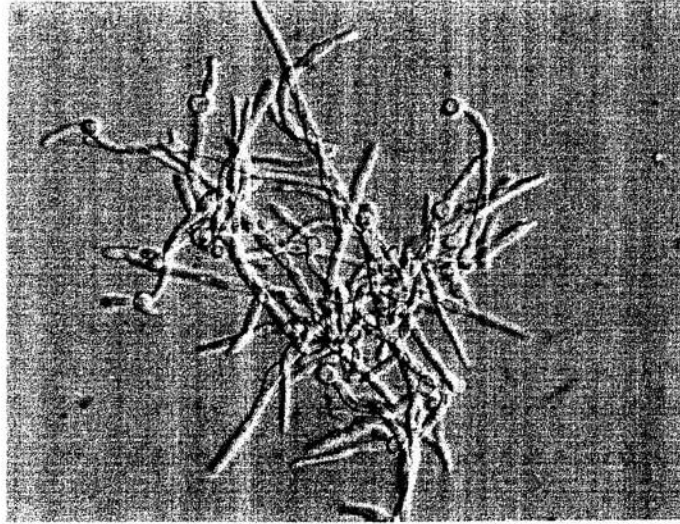
【図6】

第6図

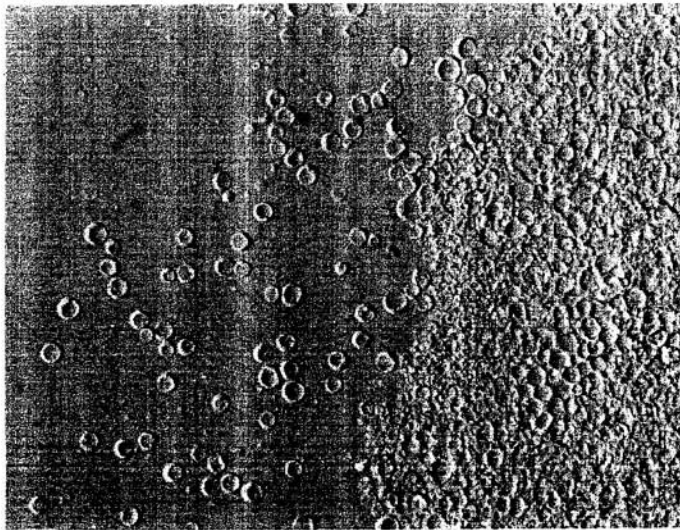


【図7】

第7図



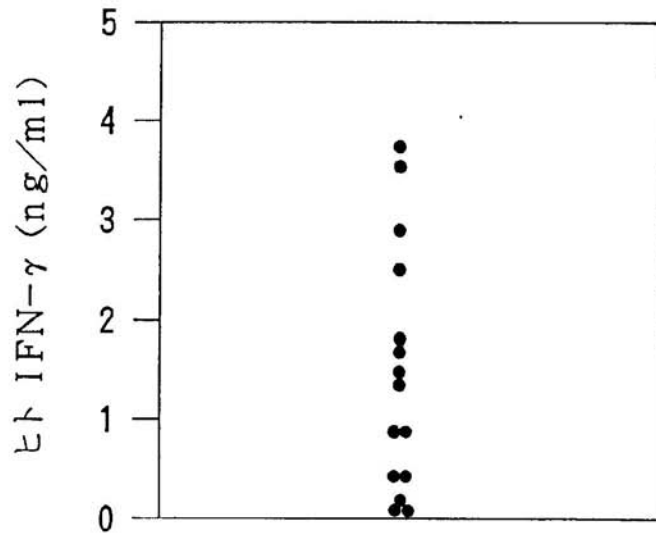
A



B

【 図 8 】

第 8 図



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/40	C 0 7 K 14/40	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Q
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 CA04 CA11 DA06 EA03 HA11
4C085 AA03 AA04 BA49 CC01 DD21 EE01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA15 DA86 EA29 EA31 FA74

专利名称(译)	真菌抗原及其制备方法		
公开(公告)号	JP2005323598A	公开(公告)日	2005-11-24
申请号	JP2005143233	申请日	2005-05-16
[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	竹迫一任 水谷滋利 遠藤政博 加藤郁之進		
发明人	竹迫 一任 水谷 滋利 遠藤 政博 加藤 郁之進		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/35 A61P31/10 A61P37/00 A61P37/04 A61P37/08 C07K14/37 C07K14/40 C12N15/09 C12N15/31 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/40 A61K39/00 A61K39/0002 A61K39/35 C07K14/37 C12P21/00 G01N33/56961 Y10S435/921 Y10S435/922		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.K A61P31/10 A61P37/00 A61P37/04 A61P37/08 C07K14/40 G01N33/53.Q G01N33/569.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/HA11 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/BA49 4C085/CC01 4C085/DD21 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA15 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/FA74		
优先权	1996255400 1996-09-04 JP 1997099775 1997-03-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：使用对真菌引起的疾病有效且更安全的真菌抗原，例如作为疫苗组合物，用于治疗脱敏的组合物或诊断组合物。提供。解决方案：从具有疫苗活性或变应原活性的抗原蛋白衍生自白色念珠菌，该抗原蛋白具有特定的氨基酸序列，且分子量（在还原条件下为SDS-PAGE）约为65,000，具有在氨基酸序列中的几个氨基酸残基的缺失，添加，插入或取代中的至少一种并且具有疫苗活性 或者，由具有过敏原活性的肽组成的真菌抗原。 [选择图]无

投与群	平均生存日数±標準偏差	30日後生存数/使用マウス数
生理食塩水	5.8 ± 1.6	0/5
Ca-LSP	> 28.8 ± 2.7	4/5
HSP	7.6 ± 3.4	0/5
HSS	7.4 ± 0.9	0/5