世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6
G01N 33/564, 33/53

A1

(11) 国際公開番号
WO 95/14231

(43) 国際公開日
1995年5月26日 (26.05.95)

(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01929
(22) 国際出願日 1994年11月15日(15. 11. 94)

(30) 優先権データ
特願平5/309874 1993年11月16日(16. 11. 93) JP

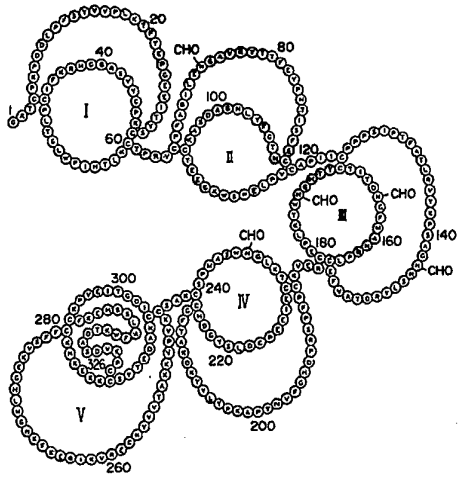
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
ヤマサ醤油株式会社(YAMASA CORPORATION)〔JP/JP〕
〒288 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 Chiba, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
松浦栄次(MATSUURA, Eiji)〔JP/JP〕
〒288 千葉県銚子市上野町285番地の24 Chiba, (JP)
永江尚人(NAGAE, Hisato)〔JP/JP〕
〒288 千葉県銚子市清川町4-651 Chiba, (JP)
五十嵐 誠(IGARASHI, Makoto)〔JP/JP〕
五十嵐佳子(IGARASHI, Yoshiko)〔JP/JP〕
〒288 千葉県銚子市新生町2丁目15番地の23 Chiba, (JP)
小池隆夫(KOIKE, Takao)〔JP/JP〕
〒060 北海道札幌市中央区北二条西18丁目1-2
Hokkaido, (JP)
(74) 代理人
弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.)
〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号
新大手町ビル331 Tokyo, (JP)

(81) 指定国
AU, CA, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : METHOD OF ASSAYING ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODY AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称 抗リン脂質抗体の測定法及びキット



(57) Abstract

A method of assaying an antiphospholipid antibody contained in a sample by using β2-glycoprotein I, wherein use is made of, instead of the same, a polypeptide having the same amino acid sequence as that of the domain IV of β2-glycoprotein I or a polypeptide which is partially different from the above polypeptide but is equivalent thereto in function, thereby permitting an easy and accurate assay of an autoantibody originating in antiphospholipid antibody syndrome.

（５７）要約

β2-グリコプロティンＩを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-グリコプロティンＩの代わりに、β2-グリコプロティンＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することにより、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の簡便でかつ正確な測定が可能となる。

情報としての用途のみ
ＰＣＴに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にＰＣＴ加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルギナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴー	IT	イタリー	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュー・ジーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ヴィェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明　　細　　書

抗リン脂質抗体の測定法及びキット

技術分野

本発明は、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法を実施するためのキットに関し、より詳細にはβ2-グリコプロティンＩを使用する代わりに、β2-グリコプロティンＩの特定のドメインと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴としたものである。

背景技術

抗リン脂質抗体の一種である抗カルジオリピン抗体の測定法としては、HarrisらによるＲＩＡ法（Lancet,iii:1211,1983）、小池らのＥＬＩＳＡ法（Clin,Exp. Immunol.,56:193,1984）などの方法が報告されている。

しかし、上述の方法は、抗カルジオリピン抗体を正確に定量できなかったり、感染症由来の抗体と抗リン脂質抗体症候群由来の抗体とを区別して測定できないといった問題を有し、必ずしも満足できるものではなかった。

松浦らは、抗リン脂質抗体症候群由来の抗カルジオリピン抗体は固相化したカルジオリピンを認識するのではなく、カルジオリピンとβ2-グリコプロテインＩ（β2-ＧＰＩ）（別名：アポリポプロテインＨまたは抗カルジオリピンコファクター）との複合体を認識することを見

い出すとともに、この原理を利用して、上述の従来法の問題点を克服しうる抗リン脂質抗体の測定法を開発した（Lancet, 336:177,1990、臨床免疫,22(Suppl.15):170,1990、WO91/06006、J.Immunol.,148: 3855,1992 ）。

さらに、松浦らのその後の研究により、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体（従来、抗カルジオリピン抗体と呼ばれていたもの）は、カルジオリピンそのものに反応するのではなく、カルジオリピン固相化プレートのような、酸素原子が存在する疎水表面と相互作用することにより構造変化したβ2-ＧＰＩを認識する抗体であることを明らかにし（J. Exp. Med.,179,457-462,(1994) 、感染・炎症・免疫, 23,9(1993)）、この原理を応用して、従来のようにカルジオリピンなどのリン脂質を使用することなく、極性基を表面に導入した担体にβ2-ＧＰＩだけを結合させた固相試薬を用いて抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体を測定する方法も開発した（WO93/16387 ）。

一方、β2-ＧＰＩは公知の糖タンパク質であり、そのアミノ酸配列及び塩基配列も既に明らかにされているが（Int.Immunol., 3, 1217-1221(1991)、Biochem.J., 277, 387(1991)、Gene, 108, 293(1991)）、（１）その分子内にシスティン－システィン結合（Ｓ－Ｓ結合）が１１個存在し、五つのドメインから構成される”スシドメイン”と呼ばれる特徴ある１次構造を持っていること（第１図参照）、（２）β2-ＧＰＩは成熟蛋白のＮ末端

側に１９個のアミノ酸から成るペプチドが付随した前駆体蛋白としてコードされており、発現された前駆体蛋白の余分なペプチドは分泌時に切断されること、などの理由から通常の大腸菌や酵母による発現系ではプロセッシング、システィン同士の結合などの発現後の蛋白の修飾が正確に行われず、活性を有するβ2-ＧＰＩを発現させることは困難であると考えられていた。

しかしながら、最近、五十嵐らは、バキュロウイルス発現系を用いることにより上記問題を克服できることを見いだし、バキュロウイルス発現系を用いて製造された組換えβ2-ＧＰＩが、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定に利用できることを報告している（Clin. Exp. Immunol.,93,19(1993)、特願平４－１５２６１９号）。

上述したように、β2-ＧＰＩが抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定に必要不可欠なタンパク質であることが疑いようのない事実であることは明らかにされたものの、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の臨床的意義については依然として未だに不明な点が多い。したがって、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体のβ2-ＧＰＩとの反応性を明らかにすることは、抗リン脂質抗体症候群の発症メカニズムの解明、及びより簡便な測定系の確立などにもつながりうることであり、今後の重要課題と考えられている。

発明の開示

本発明者らは、五つのドメインから構成されるβ2-ＧＰＩの各ドメインの抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定上の機能を解明すべく、特定のドメインを欠落させた変異タンパク質（該変異タンパク質を「欠失変異タンパク質（deleted mutant protein）」または「ドメイン欠失変異タンパク質（domain deleted mutant protein）」という）を作製し、ドメイン欠失変異タンパク質と抗体との反応性を解析した結果、①第１図に示されるβ2-ＧＰＩの第５ドメイン（ドメインＶ）にリン脂質との結合部位が存在すること、②抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）は第４ドメイン（ドメインＩＶ）を中心とする構造であること、③このエピトープは通常隠れているが、ドメインＶがリン脂質など結合することにより、構造変化を起こして抗体が認識できるようになることなどを見いだした。

本発明者らは、これらの知見を抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定への応用に関してさらに研究を重ね、本発明を完成させた。

従って、本発明は、β2-ＧＰＩを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-ＧＰＩの代わりに、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法

に使用するキットに関するものである。

また、本発明は、担体にリン脂質を結合させた固相試薬とβ2-ＧＰＩを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-ＧＰＩの代わりに、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。

さらに、本発明は、担体にβ2-ＧＰＩを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-ＧＰＩの代わりに、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインＶと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。

さらにまた、本発明は、極性基を表面に導入した担体にβ2-ＧＰＩを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-ＧＰＩの代わりに、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体

の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。

図面の簡単な説明

第１図は、ヒト血清由来β2-ＧＰＩ（Ｉ－Ｖ）の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第２図は、ドメイン欠失変異蛋白（Ｉ－ＩＶ）の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第３図は、ドメイン欠失変異蛋白（Ｉ－ＩＩＩ）の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第４図は、ドメイン欠失変異蛋白（ＩＩ－Ｖ）の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第５図は、ドメイン欠失変異蛋白（ＩＩＩ－Ｖ）の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第６図は、ドメイン欠失変異蛋白（ＩＶ－Ｖ）の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第７図は、本発明方法で得られた各ドメイン欠失変異蛋白の精製標品のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（クマシーブルー染色）による分析の結果を示したものである。

第８図は、本発明方法で得られた各ドメイン欠失変異蛋白とマウス抗ヒトβ2-ＧＰＩモノクロナール抗体の反応性をＥＬＩＳＡ法にて比較したものである。

第９図は、第８図に示した結果より判明したマウス抗ヒトβ2-ＧＰＩモノクロナール抗体に対するβ2-ＧＰＩの抗原決定基を解析したものである。

第１０図は、各ドメイン欠失変異蛋白とＳ－プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、抗カルジオリピン抗体（抗ＣＬ抗体）の抗原決定基を検討したのもである。

第１１図は、各ドメイン欠失変異蛋白とＣ－プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、抗ＣＬ抗体の抗原決定基を検討したのもである。

第１２図は、各ドメイン欠失蛋白とＳ－プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、健常人血清中の抗ＣＬ抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第１３図は、各ドメイン欠失蛋白とＳ－プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、ＳＬＥ患者血清中の抗ＣＬ抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第１４図は、各ドメイン欠失蛋白とＳ－プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、梅毒患者血清中の抗ＣＬ抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第１５図は、各ドメイン欠失蛋白とＣ－プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、健常人血清中の抗ＣＬ抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第１６図は、各ドメイン欠失蛋白とＣ－プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、ＳＬＥ患者血清中の抗ＣＬ抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第１７図は、各ドメイン欠失蛋白とＣ－プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、梅毒患者血清中の抗ＣＬ抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第１８図は、各ドメイン欠失蛋白ならびにカルジオリ

ピン固相プレートを用いたＥＬＩＳＡ法により、β2-ＧＰＩの抗カルジオリピン抗体の抗原決定基を検討したものである。

第１９図は、各ドメイン欠失変異蛋白、カルジオリピン固相プレートおよび抗β2-ＧＰＩ抗体を用いたＥＬＩＳＡ法により、β2-ＧＰＩのカルジオリピンに対する結合部位の検討結果を示したものである。なお、第１０～１９図におけるＢＬはブランクを示す。

第２０図は、各ドメイン欠失変異蛋白とヒト血清由来のβ2-ＧＰＩを用いた競合法により、β2-ＧＰＩのカルジオリピンへの結合部位の検討結果を示したものである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳述する。

１）定義

本明細書において、特にことわらない限り、以下の用語は下記の定義のとおりである。

「抗リン脂質抗体」とは、抗リン脂質抗体症候群（ＳＬＥに代表される自己免疫疾患、あるいは血栓症、神経症、習慣性流産、血小板減少などの症状を呈する一群の疾患）の患者血清中に出現する自己抗体を意味する。

「β2-ＧＰＩ中のドメイン」とは、β2-ＧＰＩ中の構造上一つのまとまりを示す領域を意味し、図１示すように、ヒトβ2-ＧＰＩは五つのドメインを有しており、Ｎ末から順番にドメインＩ、ドメインＩＩ、ドメインＩＩＩ、ドメインＩＶ及びドメインＶと命名されている。

「β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド」とは、β2-ＧＰＩがヒト由来のものである場合には、第１図に示される１８６番目のシステイン残基から２４１番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有するポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド」とは、β2-ＧＰＩがヒト由来のものである場合には、第１図に示される１８６番目のシステイン残基から３２６番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有するポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインＶと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド」とは、β2-ＧＰＩがヒト由来のものである場合には、第１図に示される１８６番目のシステイン残基から２４１番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有し、かつ２４５番目のシステイン残基から３２６番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでいないポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチド」とは、たとえば、ポリペプチド中のヒトβ2-ＧＰＩのドメインと同一のアミノ酸配列を有している部分が、

アミノ酸の欠除、置換及び／または追加によりアミノ酸配列が部分的に相違していても、抗リン脂質抗体の測定においては差異を及ぼさないようなポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。このようなポリペプチドとしては、ヒト以外のウシ、ブタなどの各種動物、特に哺乳動物に由来するβ2-ＧＰＩの特定のドメインと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを例示することができる。

２）本発明方法及びキット

本発明方法は、β2-ＧＰＩを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-ＧＰＩの代わりに、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とするものである。このような本発明方法の具体的な態様は、下記の三つに分類される。

①方法１：

担体にリン脂質を結合させた固相試薬とβ2-ＧＰＩを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-ＧＰＩの代わりに、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用する方法。

②方法２：

担体にβ2-ＧＰＩを結合させた固相試薬を利用してサ

ンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-ＧＰＩの代わりに、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインＶと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用する方法。

③方法３：

極性基を表面に導入した担体にβ2-ＧＰＩを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-ＧＰＩの代わりに、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用する方法。

(1) 本発明の方法１及びそれに使用するキット

本発明の方法１は、β2-ＧＰＩ中のドメインＶにリン脂質との結合部位が存在すること、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）はドメインＩＶを中心とする構造であること、及びこのエピトープは通常隠れているが、ドメインＶがリン脂質など結合することにより構造変化を起こし、抗体が認識できるようになるという知見を利用したものであり、担体にリン脂質を結合させた固相試薬とβ2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とし

ている。

リン脂質としては、陰性荷電を有するものであれば特に限定されない。具体的には、カルジオリピン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジル酸などのグリセロリン脂質を例示することができる。

リン脂質を結合させる担体としては、リン脂質を結合できるもので有れば特に限定されない。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、スチレン－無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成樹脂を例示することができる。担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じて適当な形状の担体を適宜選択すればよい。

リン脂質と担体との結合は、物理的吸着法、イオン結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法１に使用するポリペプチドは、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドであり、該ポリペプチドにおけるβ2-ＧＰＩとは、哺乳動物由来のβ2-ＧＰ

Ｉを例示することができ、特に第１図に示されるヒトβ2-ＧＰＩを好適なものとして例示することができる。

このようなポリペプチドは、ポリメラーゼ鎖反応法（polymerase chain reaction ；ＰＣＲ法）を用いてヒトβ2-ＧＰＩ中の必要なドメインを含有する遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させて目的とするポリペプチド（タンパク質）を生産する方法により取得することができる。

ヒトβ2-ＧＰＩのｃＤＮＡライブラリーは、ヒト肝癌細胞であるＨｅｐＧ２細胞などを用いて常法により調製することができる。また、ＨｅｐＧ２細胞のｃＤＮＡライブラリーは既に市販されており、この市販品を原料として使用することもできる（カタログナンバー９３５２０２；製造：ストラタジーン社，販売：フナコシ（株）社）。さらに、上述したようにヒトβ2-ＧＰＩの全塩基配列は既に報告されており（Int.Immunol., 3,1217-1221(1991)、Biochem. J., 277, 387(1991)、Gene, 108, 293(1991)）、この配列に基づき化学的に合成してもかまわない。

このようなヒトβ2-ＧＰＩのｃＤＮＡライブラリーを用い、ＰＣＲ法によりドメインＩＶとドメインＶを少なくとも含む遺伝子を調製する。ＰＣＲ法による目的とする遺伝子の調製は周知であり、その具体的一例は実施例に記載したとおりである。また、調製した遺伝子中に翻

訳開始コドン及び／または翻訳終始コドンが存在しない場合にはそれらのコドンを遺伝子中に人為的に導入してもかまわない。

このようにして調製した遺伝子のバキュロウイルスを用いた発現法も公知の方法を適宜応用することにより実施することができる。すなわち、バキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下に調製した上記の遺伝子を挿入して組換え型バキュロウイルスを作製し、これを発現ウイルスベクターとして使用する。

組換え型バキュロウイルスを調製する際に使用するウイルスは、バキュロウィルスに分類されるものであればいずれのものであってもよい。具体的には、オートグラファ・カルフォルニカ（Autographa Californica、ＡＴＣＣ　ＶＲ－１３４４　以下ＡｃＮＰＶと略す）、ボンビックス・モリ（Bombyx mori ）などの核多角体病ウイルスが好適である。

バキュロウイルスは長鎖のウイルスＤＮＡ（たとえば、ＡｃＮＰＶのウイルスＤＮＡは１３０Ｋｂもある）を有し、発現したい遺伝子を発現制御領域（プロモーターなど）の下流に直接挿入して発現ウイルスベクターを構築するのは不可能である。そこで、手順としては、まず遺伝子発現制御領域を含むウイルスＤＮＡ断片を切り出し、これを大腸菌などを宿手とするプラスミドにクローニングしてトランスファー（転移）ベクターを調製する。次ぎに、この転移ベクターに発現目的とする遺伝子を含む

ＤＮＡ断片をバキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下の適当な箇所に挿入し、これを野生型バキュロウイルスＤＮＡと共に昆虫細胞にコートランスフェクトし、相同的組み換えによって目的とするドメインを含む遺伝子がバキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下に挿入されている組換え型バキュロウイルスを調製する。

組換え型バキュロウイルスを調製するのに使用する転移ベクターは、少なくとも相同的組換えのための領域、遺伝子発現制御領域およびクローニングサイトをその構成要素として含有する。

相同的組換えのための領域としては、相同的組換えを起こす機能を有するものであれば制限されない。通常はバキュロウィルスのＤＮＡ配列の一部分またはそれに相当するものが使用され、特に他のＤＮＡ断片の挿入により不活化されてもウィルスの増殖に影響を及ぼさない領域のものが好ましい。このようなバキュロウィルスの増殖に非必須なＤＮＡ領域としては、たとえばポリヘドリン遺伝子（science, 219, 715-721(1983)）の領域などを例示することができ、このポリヘドリン遺伝子領域を相同的組換えを起こすように、たとえば、クローニングサイトの両側に配置する。

遺伝子発現制御領域としては、組換え型バキュロウィルスを昆虫細胞に感染させた時に目的の遺伝子を発現させることのできるものであれば特に限定されない。たとえば、バキュロウィルスのポリヘドリン蛋白をコードす

る遺伝子のプロモーター、１０Ｘポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーター、basic protein のプロモーターなどの各種プロモーターを含有する領域を使用することができる。遺伝子発現制御領域としてポリヘドリン遺伝子のプロモーターを用いる場合、発現量をより高くするために開始コドンの一部を含むその上流の５’非翻訳領域を完全に残し、更に３’側のポリヘドリン遺伝子の余剰な部分を全て取り除いた形で使用するのが好ましい（J.Gen.Virol., 68, 1233-1250(1987),特開平１－２８５１９８号）。

クローニングサイトは、プロモーターなどの遺伝子発現制御領域の下流の適当な箇所に発現目的のＤＮＡ断片を挿入するためのものであり、たとえば、制限酵素認識配列を含む適当なリンカーを常法にしたがって遺伝子発現制御領域の下流の適当な箇所に配置すればよい。

このような条件を満足する転移ベクターとしては、たとえばｐＡｃ３７３、ｐＡｃＹＭ１などが例示でき、特にｐＡｃＹＭ１が好適である。これらの転移ベクターはいずれも公知の方法にしたがって調製することができる（たとえば、特開平１－２８５１９８号公報、Mol.Cell. Biol., 3, 2156(1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8404(1985)、Nature, 315, 592(1985)、J.Gen. Virol.,68,1233-1250 (1987)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)、実験医学、第７巻、１４６頁（１９８９））。

このような転移ベクターに上記のＰＣＲ法にて調製し

た遺伝子を挿入し、この転移ベクターＤＮＡと野生型バキュロウイルスＤＮＡとを昆虫細胞にコートランスフェクトし、相同的組み換えによって発現目的のドメインをを含む遺伝子がバキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下に挿入されている組換え型バキュロウイルスをスクリーニングする。

野生型バキュロウイルスとしては、転移ベクターを調製する際に使用したウイルスと同じものを使用すればよく、ウイルスからのＤＮＡの調製は常法により行うことができる。また、組換え型ウィルスの選別を簡易にするため、ウィルスＤＮＡの組換え箇所にβ－ガラクトシダーゼをコードする１ａｃＺ遺伝子を挿入しておくことが好ましい。このような１ａｃＺ遺伝子を挿入したウイルスＤＮＡは既に市販されているので（ファーミンジェン社などから発売されている）、それを使用してもかまわない。

ウイルスＤＮＡ及び転移ベクターＤＮＡを感染させる細胞としては、使用するウイルスに応じて適宜選定して使用する。たとえば、ウイルスとしてＡｃＮＰＶを使用する場合、感染させる細胞としてはスポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda ）細胞などの夜盗蛾由来の細胞を使用することができる。

コートランスフェクション及び組換え型バキュロウイルスのスクリーニングは常法に従って操作することができる（たとえば、Texas Agricultural Experiment

Station Bulletin No1555 Texas A&M University(1987)、特開昭６０－３７９８８号、特開昭６１－５７８７号参照）。

上記のようにして調製した組換え型バキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、これを培養し、培養物中から目的とするポリペプチド（タンパク質）を採取する。

組換え型バキュロウイルスを感染させる細胞としては、組換え型バキュロウイルスが増殖可能なものであれば特に制限されない。たとえば、ＡｃＮＰＶを基に組換え型バキュロウイルスを作製した場合、組換え型ウイルスを感染させる細胞としてはスポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda ）細胞などの夜盗蛾由来の細胞が好ましい。

細胞を培養する培地としては、グレース培地、ＳＦ－９００培地、イーエックスセル４００培地などの昆虫細胞の培養に常用されているものを使用すればよい。また、血清を含有したもの、血清を含有していないもののいずれも使用可能であるが、目的とするポリペプチドの精製を容易にするため、培養当初から無血清培地を使用するか、培養初期は血清含有培地を使用し、培養２４時間頃に無血清培地に切り替えるのが好ましい。

組換え型バキュロウイルスを感染させた細胞の培養は、常法によって行うことができ、たとえば、２０～３０℃でポリペプチドが充分に発現される時間（６０～７２時間程度）培養すればよい。

培養物から目的とするポリペプチドの採取は蛋白の精製法として常用されている方法を適宜組み合わせることにより実施することができる。その中でも特に、抗β2-ＧＰＩ抗体またはカルジオリピンなどのリン脂質を用いるアフィニティークロマトグラフィー法が効果的である。

本発明の方法１は、このようにして得られたβ2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと担体にリン脂質を結合させた固相試薬とを使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬とポリペプチドを使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、反応様式による分類としては競合反応法と非競合反応法が知られているが、本発明においてはいずれの方法も採用できる。また、検出方法による分類としては抗原抗体反応の結果を直接検出する非標識法（ネフェロメトリーなど）となんらかのマーカーを使用して検出する標識法が知られているが、本発明はどちらの方法であってもよい。さらに、ＢＦ分離を行う必要のあるヘテロジニアス法と必要のないホモジニアス法が知られており、本発明にはいずれの方法を適用してもよい。すなわち、これら公知の一般法の中から本発明の測定法の目的に適合する方法を適宜選択すればよい。

なお、一般的方法の詳細については、たとえば以下の文献に詳細に記載されている。

①入江　寛編「続ラジオイムノアッセイ」（株）講談社、

昭和５４年５月１日発行

②石川栄治ら編「酵素免疫測定法（第２版）」（株）医学書院、１９８２年１２月１５日発行

③臨床病理　臨時増刊　特集第５３号「臨床検査のためのイムノアッセイー技術と応用－」臨床病理刊行会、１９８３年発行

④「バイオテクノロジー事典」（株）シーエムシー、１９８６年１０月９日発行

⑤「Methods in ENZYMOLOGY Vol.70」（Immunochemical techniques (Part A)）

⑥「Methods in ENZYMOLOGY Vol.73」（Immunochemical techniques (Part B)）

⑦「Methods in ENZYMOLOGY Vol.74」（Immunochemical techniques (Part C)）

⑧「Methods in ENZYMOLOGY Vol.84」（Immunochemical techniques (Part D:Selected Immunoassay))

⑨「Methods in ENZYMOLOGY Vol.92」（Immunochemical techniques (Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))

（⑤～⑨はアカデミックプレス社発行）

たとえば、ＥＬＩＳＡ法を例に挙げ、本発明の方法１を具体的に説明すれば、まず、リン脂質を結合させたプレートの各ウエルにβ2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを反応させ、次に被検試料（たとえば、血液、血清など）

を添加し、ポリペプチドと被検液中の抗体を反応させる。次に、ウエルを洗浄後、酵素標識抗免疫グロブリン抗体（たとえば、ペルオキシダーゼ標識抗ＩｇＧ抗体など）を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に基質（ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及びテトラメチルベンチジンなど）を添加し、いずれかの相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成しておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗体の量を算出すればよい。なお、反応に使用するポリペプチドは、被検液と同時に反応させても構わない。

本発明の方法１を実施するためのキットも、上述の担体にリン脂質を結合させた固相試薬とβ2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを構成試薬として包含することを特徴としており、その他の構成試薬は採用した測定法に合致するように適宜組み合わせればよい。

たとえば、上記ＥＬＩＳＡ法を実施するためのキットは下記の試薬から構成される。

①担体にリン脂質を結合させた固相試薬

②β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド

③酵素標識抗免疫グロブリン抗体

④基質溶液

⑤既知濃度の標準抗体液

（2）本発明の方法２及びそれに使用するキット

本発明の方法2は、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）はドメインＩＶを中心とする構造であり、自己抗体の測定には必ずしもドメインＶは必要でないという知見を利用したものであり、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインＶと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを担体に結合させた固相試薬を使用することを特徴とする方法である。

方法2に使用するポリペプチドは、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインＶと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドであり、該ポリペプチドにおけるβ2-ＧＰＩとは、哺乳動物由来のβ2-ＧＰＩを例示することができ、特に第1図に示されるヒトβ2-ＧＰＩを好適なものとして使用することができる。

このようなポリペプチドは、前述の本発明の方法1と同様に、ポリメラーゼ鎖反応法（polymerase chain reaction；ＰＣＲ法）を用いてヒトβ2-ＧＰＩ中の必要なドメインを含有する遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させ、目的とするポリペプチド（タンパク質）を生産する方法により取得することができる。

ポリペプチドを結合させる担体としては、上記ポリペプチドを結合できるもので有れば特に限定されない。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、スチレン－無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成樹脂を例示することができる。

また、上記担体は、極性基をその表面に導入したものであっても構わない。ここで、極性基としては、水酸基、カルボキシル基、カルボニル基、ホルミル基、イミノ基、酸素ラジカルなどの酸素原子に由来するものが好ましい。

このような担体は、タンパク質の吸着性の高い疎水性表面を有する合成樹脂、より具体的にはポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、スチレン－無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成樹脂に、極性基を常法により化学的に導入することにより調製することができる。また、上記の疎水表面を有する合成樹脂に紫外線、放射線（ｘ線、β線、γ線など）、荷電粒子（プロトン、α粒子など）などを照射する方法、または上記の疎水表面を有する合成樹脂をオゾンで処理する方法によっても上記担体を調製することができる。

このような極性基をその表面に導入した担体の具体例としては、ＥＢプレート（ラボシステムズ社製）、Ｈタ

イププレート、Cタイププレート（住友ベークライト社製）、マキシソーププレート（ヌンク社製）などを例示することができる。

担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じた適宜な形状の担体を選択すればよい。

ポリペプチドと担体との結合は、物理的吸着法、イオン結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法2は、このようにして得られた、β2-GPI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させたものを固相試薬として使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬を使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、ELISA法を例に挙げ、本発明の方法2を具体的に説明すれば、まず、β2-GPI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた上記の固相プレートの各ウエルに被検試料（たとえば、血液、血清など）を添加し、ポリペプチドと被検液中の抗体を反応させる。次に、ウエルを洗浄後、

酵素標識抗免疫グロブリン抗体（たとえば、ペルオキシダーゼ標識抗ＩｇＧ抗体など）を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に基質（ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及びテトラメチルベンチジンなど）を添加し、いずれかの相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成しておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗体の量を算出すればよい。

本発明の方法２を実施するためのキットも、上述のβ2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインＶと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた固相試薬を構成試薬として包含することを特徴としており、その他の構成試薬は採用した測定法に合致するように適宜組み合わせればよい。

たとえば、上記ＥＬＩＳＡ法を実施するためのキットは下記の試薬から構成される。

①β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインＶと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた固相試薬

②酵素標識抗免疫グロブリン抗体

③基質溶液

④既知濃度の標準抗体液

(3) 本発明の方法３及びそれに使用するキット

本発明の方法３は、β2-ＧＰＩ中のドメインＶにリン脂質との結合部位が存在すること、抗リン脂質抗体症候

群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）はドメインＩＶを中心とする構造であること、このエピトープは通常隠れているが、ドメインＶがリン脂質など結合することにより構造変化を起こし、抗体が認識できるようになること、及び極性基をその表面に導入した担体がリン脂質の代わりになり得るという知見を利用したものであり、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合したものを固相試薬として使用することを特徴としている。

本発明の方法３で使用するポリペプチドは、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであり、該ポリペプチドにおけるβ2-ＧＰＩとは、哺乳動物由来のβ2-ＧＰＩを例示することができ、特に図１に示されるヒトβ2-ＧＰＩを好適なものとして使用することができる。

このようなポリペプチドは、前述の本発明の方法１と同様に、ポリメラーゼ鎖反応法（polymerase chain reaction；ＰＣＲ法）を用いてヒトβ2-ＧＰＩ中の必要なドメインを含有する遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させ、目的とするポリペプチド（タンパク質）を生産する方法により取得することができる。

ポリペプチドを結合させる担体としては、前述したような極性基をその表面に導入したものであれば特に限定されない。

担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じた適宜な形状の担体を選択すればよい。

ポリペプチドと担体との結合は、物理的吸着法、イオン結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法３は、このようにして得られた、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合させたものを固相試薬として使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬を使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、ＥＬＩＳＡ法を例に挙げ、本発明の方法３を具体的に説明すれば、まず、β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合させた固相プレートの各ウエルに被検試料（たとえば、血液、血清など）を添加し、ポリペプチドと被検液中の抗体を反応させる。

次に、ウエルを洗浄後、酵素標識抗免疫グロブリン抗体（たとえば、ペルオキシダーゼ標識抗ＩｇＧ抗体など）を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に基質（ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及びテトラメチルベンチジンなど）を添加し、いずれかの相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成しておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗体の量を算出すればよい。

本発明の方法３を実施するためのキットも、上述のβ2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合させた固相試薬を構成試薬として包含することを特徴としており、その他の構成試薬は採用した測定法に合致するように適宜組み合わせればよい。

たとえば、上記ＥＬＩＳＡ法を実施するためのキットは下記の試薬から構成される。

①β2-ＧＰＩ中のドメインＩＶとドメインＶと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合させた固相試薬

②酵素標識抗免疫グロブリン抗体

③基質溶液

④既知濃度の標準抗体液

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

（１）Ｃ末端側からのドメイン欠失遺伝子の作製

ポリメラーゼ鎖反応（polymerase chain reaction ；ＰＣＲ）を用いて様々なドメインを欠失させたヒトβ2-ＧＰＩの遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させて目的のドメイン欠失変異蛋白を生産させた。

５番目のドメイン（ドメインＶ）を欠失した遺伝子の作製のため、まずＰＣＲに用いるプライマーを設計する。本実施例においては、鋳型として用いたヒトβ2-ＧＰＩ遺伝子はバキュロウィルス発現系で組換えウィルスの作製で用いる転移ベクター（ｐＡｃＹＭ１）のＢａｍＨＩ部位に挿入されているため、ヒトβ2-ＧＰＩ遺伝子の５’非翻訳領域の上流に位置し、転移ベクター内に存在するポリヘドリン開始コドンのすぐ上流の配列を５’プライマーとして用いた。

この結果、５’プライマーの配列は下記のとおりとなり、ＰＣＲで増幅されたＤＮＡ断片の片側（目的の遺伝子の５’側）にＢａｍＨＩ部位を設ける事ができる。

5’-GTAAT AAAAA AACCT ATAAA T-3’

また、ヒトβ2-ＧＰＩは第１図に示すように、ドメイン分子内の二つのＳ－Ｓ結合（ドメインＶのみ三つ）によって巻き寿司様の二次構造を形成しており、ドメインの単位は二つのＳ－Ｓ結合ごとに区切ることができる。それで、３’プライマーの設計は、ドメインＩＶの末端部分からドメインＶの頭までの配列に相補的な配列、塩

基配列から見れば、開始コドンＡＴＧのＡを＋１とした場合、＋７６３から＋７９２までの３０個の塩基に相補的な配列を利用した。さらに、ドメインＩＶの最後のシスティンの後に終止コドンを設けて該コドンで翻訳が停止するようにするとともに、得られた遺伝子を転移ベクター等にクローン化しやすいように終止コドンのすぐ下流にＥｃｏＲＩ部位を設けた。この結果、3'プライマーの配列は下記のとおりとなり、ＰＣＲによって増幅されたＤＮＡ断片はＢａｍＨＩとＥｃｏＲＩによって切り出すことができる。

5'-ACAGA ATTCT TAACA ACTTG GCATG GCAGA-3'

次に、化学合成した上記の２つのプライマーを鋳型として、β2-ＧＰＩ遺伝子を組み込んだｐＡｃＹＭ１を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲを行うためのキットは市販されており（GeneAmpTM PCR Reagent Kit with AmpliTaqTM DNA polymerase，宝酒造販売、ホフマンーラロッシュ社製造）、ＰＣＲの具体的操作はそのキットに添付している説明書に従って行った。

この様にして増幅されたＤＮＡ断片は、０．９％の濃度のアガロース電気泳導により分離し、ＤＮＡ断片を含むアガロース部分を回収、精製した。アガロースから目的のＤＮＡ断片を回収する方法としては、そのアガロース断片を一度凍らせた後に融解し、滲み出てくる水溶液を回収する方法によっても行うことができる。また、このためのキットも幾つか市販されており（DNACELL，

草野科学器械製作所製造、第一化学薬品（株）販売、GENECLEAN II、フナコシ（株）販売）、該キットを利用して目的のＤＮＡ断片を回収、精製することもできる。

通常、ＰＣＲによって増幅されたＤＮＡ断片の末端は平滑ではなく、5’側にＡが突出しているため、Ｔ４ＤＮＡ　ポリメラーゼを使用したキット（DNA Blunting Kit、宝酒造製造・販売）を用いて平滑化した。

平滑化されたＤＮＡ断片は、ＳｍａＩ切断されたｐＵＣ１１８断片とライゲーション反応を行い、ｐＵＣ１１８のＳｍａＩ部位に一旦クローニングした。ライゲーション反応は、Ｔ４リガーゼを使用したキット（DNA Ligation Kit, 宝酒造製造・販売）を用いて行った。

この様にして増幅・クローンされたＤＮＡ断片をＤＩ－ＩＶ遺伝子（第２図）と呼ぶ。

用いる3’プライマーを替えることにより、上記と異なるドメイン欠失遺伝子を作製する事ができる。たとえば、3’プライマーとして＋５８３から＋６１２までの配列を基にし、これに終止コドン及びＥｃｏＲＩ部位を導入した下記の塩基配列を有する3’プライマーを用いて、上記と同様の方法にてドメインＩＶとドメインＶの両ドメイン欠く遺伝子（ＤＩ－ＩＩＩ遺伝子：第３図）を作製した。

5’-TTTGA ATTCT CAGCA TTCTG GTAAT TTAGT-3’

（２）Ｎ末端側からのドメイン欠失遺伝子の作製

Ｎ末端側からのドメイン欠失遺伝子もＣ末端側からの

ドメイン欠失遺伝子の作製と同様の方法にて行うことができるが、N末側の遺伝子配列を単純に欠失させると分泌のためのリーダー配列も失ってしまう。よって、目的の蛋白を分泌発現させるためにリーダー配列をコードしているDNA断片とN末側のドメインを欠失している遺伝子断片とをアミノ酸の読みとり枠が一致するように連結する作業が必要である。

まず、リーダー配列をコードするDNA断片をPCRを用いて調製する。これは、C末側からのドメイン欠失遺伝子の作製と全く同様の作業によって行うことができる。すなわち、PCRに用いる5'プライマーは前記のものと同じものを用いた。また、3'プライマーはリーダー配列からドメインIにかけての領域(+49から+72)に相補的な配列を基にして、これにEcoRI部位を導入した下記の配列のものを用いた。

5'-GGGAG AATTC CGTCC TGCAA TAGC-3'

各プライマーを用いてPCRを行い、リーダー配列を含む断片を増幅した後、前述の方法で目的のDNA断片を精製し、pUC118へのクローニングを行った。

次に、N末側のドメインを欠失した遺伝子のPCRによる作製においては、鋳型としてβ2-GPIのcDNAがpUC118にクローンされているものを用い、3'プライマーとしてマルチクローニングサイトのHindIII部位の外側の配列を有する下記のものを用いた。通常、塩基配列の決定に良く使用されるM13プライマ

ーもしくはユニバーサルプライマー等も同様の領域の配列を用いており、それらを使用する事もできる。

5'-CCCAG TCACG ACGTT GTAAA-3'

5'プライマーは、各々欠失させるドメインからその次のドメインへかけての領域の配列を利用し、シグナル配列とアミノ酸の読みとり枠が一致するようにＥｃｏＲＩ部位を導入した。発現させたいドメインと5'プライマーの塩基配列及び利用した塩基配列の位置は下記のとおりである。

・ドメインＩを欠失する遺伝子（ＤＩＩ－Ｖ遺伝子：第４図）

5'-ACTCT GAATT CTACA CCCAG AGTAT GT-3' （+226から+252まで）

・ドメインＩ及びＩＩを欠失する遺伝子（ＤＩＩＩ－Ｖ遺伝子：第５図）

5'-GTCTG GAATT CCATC ATCTG CCCTC CA-3'（+406から+432まで）

・ドメインＩ、ＩＩ及びＩＩＩを欠失する遺伝子（ＤＩＶ－Ｖ遺伝子：第６図）

5'-CCGAA TTCCA GGGAA GTAAA ATGCC CA-3' （+592から+618まで）

上記の5'プライマー及び3'プライマーを用いてＰＣＲを行い、前述した方法と全く同様の操作で目的のＤＮＡ断片を回収・精製してｐＵＣ１１８へクローン化した。

（３）Ｎ末、Ｃ末両側のドメインを欠失した遺伝子の作製

ＤＩＩ－Ｖ遺伝子を鋳型として、Ｃ末側のドメインを欠失した遺伝子の作製方法と同様の操作を行う事により、ドメインＩ及びドメインＶを欠失した遺伝子を作製した。これは、後述のｐＶＬＤ２５を鋳型として、5’プライマー及び3’プライマーは前述のＤＩＩ－Ｖ遺伝子を作製した時と同一のものを用いてＰＣＲを行い作製した。この遺伝子をＤＩＩ－ＩＶ遺伝子と呼ぶ。

（４）各欠失遺伝子の転移ベクターへの導入

各ドメイン欠失遺伝子をバキュロウィルスに導入して昆虫細胞において発現させるため、ｐＵＣ１１８より目的遺伝子を切り出し、転移ベクターｐＶＬ１３９３へクローンし直した。

すなわち、Ｃ末側のドメイン欠失遺伝子（ＤＩ－ＩＶ及びＤＩ－ＩＩＩ）の場合、ＢａｍＨＩとＥｃｏＲＩで切り出せるようにプライマーを設計してあるので、同制限酵素で切断し、目的の断片をアガロース電気泳動によって回収・精製した。そして、転移ベクターであるｐＶＬ１３９３のＢａｍＨＩ部位とＥｃｏＲＩ部位の間に挿入した。それぞれ作製した組換えプラスミドをｐＶＬＤ１４及びｐＶＬＤ１３と呼ぶ。

また、Ｎ末側からのドメインの欠失遺伝子（ＤＩＩ－Ｖ，ＤＩＩＩ－Ｖ及びＤＩＶ－Ｖ）の場合、まずリーダー配列を含む断片を先にｐＶＬ１３９３へ移した。すな

わち、リーダー配列を含む断片はやはりＢａｍＨＩとＥｃｏＲＩで切断できるように設計されているので、同断片として切り出し、ｐＶＬ１３９３のＢａｍＨＩ－ＥｃｏＲＩ部位間に挿入した。このプラスミドをｐＶＬＬＳ１と呼ぶ。次に、Ｎ末側からのドメイン欠失遺伝子（ＤＩＩ－Ｖ，ＤＩＩＩ－Ｖ及びＤＩＶ－Ｖ）は前述のようにＥｃｏＲＩとＢａｍＨＩで切断でき、ＥｃｏＲＩ部位でリーダー配列とアミノ酸の読みとり枠が一致するように設計されている。よって、ＥｃｏＲＩとＢａｍＨＩで切り出し、アガロース電気泳動によって断片を回収・精製した後、ｐＶＬＬＳ１のＥｃｏＲＩ部位とＢｇｌＩＩ部位の間に挿入した。この結果作製した組換えプラスミドをそれぞれｐＶＬＤ２５、ｐＶＬＤ３５及びｐＶＬＤ４５と呼ぶ。

Ｎ末及びＣ末の両側のドメインを欠失した遺伝子（ＤＩＩ－ＩＶ）の場合はリーダー配列を含んだままＢａｍＨＩで切り出せるので、同酵素で切断後、アガロース電気泳動によって目的のＤＮＡ断片を回収・精製した。そして、ｐＶＬ１３９３のＢａｍＨＩ部位とＢｇｌＩＩ部位の間に挿入した。この結果作製された組換えプラスミドをｐＶＬＤ２４と呼ぶ。

これらｐＶＬＤ１３，１４，２５，３５，４５，２４をバキュロウィルスＤＮＡとともに昆虫培養細胞ｓｆ９（Spodoptera frugiperda cell：ファーミンジェン社などから入手可能）にコートランスフェクションを行った。

トランスフェクション後、３日目の培養上清からプラークアッセイにより組換えウィルスを選択した。まず、培養上清を１０倍、１００倍及び１０００倍希釈し、これを直径３５ｍｍのディッシュに用意した1×10^6個の昆虫細胞に接種した。１時間吸着させた後にウィルス液を捨て、重層寒天培地を２ｍｌ加えた。この寒天培地は、予め蒸留水で３％に溶かし滅菌した低融点寒天（Sea Plaque）を１０％ＦＣＳを添加した培養液で１％に希釈しておいたものである。重層した培地が固まった後、１ｍｌの培養液をさらに重層する。

２７℃で３日間培養後、０．０１％ニュートラルレッド及び４％Ｘ－ｇａｌを加えたＰＢＳを１．０ｍｌ加えて染色し、プラークを判別し易くする。非組換えウィルス由来のプラークはβ－ガラクトシダーゼの産生により青色を呈するのに対し、組換えウィルスのプラークはβ－ガラクトシダーゼをコードしている遺伝子とドメイン欠失遺伝子が組み換わっているために白色になる。組換えウィルスと思われる白色のプラークをさらに３回ほどプラークアッセイを繰り返して、純化したクローンを得た。この組換え型ウィルスをMultiplicity of Infection（Ｍ．Ｏ．Ｉ．）＝１０で1×10^7細胞のｓｆ細胞に感染させて、７５ｍｌ容のプラスティック・フラスコで７２時間、１０％のウシ胎児血清を含んだグレース培地で培養した。

培養後、培養液を５０００ｘｇの条件で遠心して培養

上清を得た。また、遠心により得られた細胞にＰＢＳと電気泳動用緩衝液とをおのおの５０μｌ加えて１００℃で１０分間加熱して細胞抽出液を調製した。培養上清及び細胞抽出液（各１０μｌ）をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）処理に付し、泳動後クマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）による染色及び抗β2-ＧＰＩ抗血清を用いたウェスタンブロット法によりβ2-ＧＰＩドメイン欠失変異蛋白の産生を確認した。

その結果、ＣＢＢによる染色分析において、試料としてβ2-ＧＰＩドメイン欠失遺伝子、ＤＩＶ－Ｖ、ＤＩＩＩ－Ｖ、ＤＩＩ－Ｖ、ＤＩ－ＩＩＩ、ＤＩ－ＩＶを挿入した各組換え型ウィルスの感染細胞から調製したものを使用した場合、分子量約２０、３５、３８、３０、３８キロダルトンの移動度の箇所に野生型バキュロウィルスの感染細胞から調製した試料では検出できない特異的なバンドが検出された。また、ウェスタンブロット法による分析により、抗β2-ＧＰＩ抗血清はドメイン欠失遺伝子を挿入した組換え型ウィルスの感染細胞から調製した試料に特異的に出現したバンドにのみ反応することから、これらの蛋白が、ドメイン欠失変異蛋白であることが確認された。

次に、組換え型ウィルスを昆虫細胞に感染させた後、一定時間毎に培養液を分取し、ドメイン欠失変異蛋白の産生の経時変化をウェスタンブロット法によって解析した。その結果、培養上清、細胞抽出液の何れも試料にお

いても培養開始２４時間後にドメイン欠失変異蛋白の産生が確認でき、６０～７２時間後が最も産生量が高かった。

（５）バキュロウィルスを用いて昆虫細胞で産生されたβ2-ＧＰＩドメイン欠失変異蛋白の精製

組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞培養上清からのβ2-ＧＰＩドメイン欠失変異蛋白の精製は、抗β2-ＧＰＩモノクロナール抗体を用いたアフィニティーカラムにより行った。

すなわち、まずセファロースＣＬ４Ｂ樹脂（ファルマシア社）５ｍｌにマウス抗β２－ＧＰＩモノクロナール抗体Ｃｏｆ２０またはＣｏｆ２３（WO92/19755）を５ｍｇ結合させたアフィニティーカラムを常法により調製した。そして、組換え型ウィルスをＭ．Ｏ．Ｉ．＝１０で1×10^8個のｓｆ細胞に感染させ、無血清培地（ＳＦ－９００、キブコ社製）を使用して７２時間培養して得た上清１００ｍｌを、５０ｍＭ塩化ナトリウム含有１０ｍＭリン酸緩衝液（ＰＢＳ、ｐＨ７．４）２リットル（Ｌ）に対し一晩透析した後、同緩衝液にて平衡化したアフィニティーカラムにアプライし、蛋白を抗体に結合させた。この時、ＤＩＶ－Ｖの場合はＣｏｆ２３を結合させたカラムを使用し、他のドメイン欠失蛋白（ＤＩＩＩ－Ｖ、ＤＩＩ－Ｖ、ＤＩ－ＩＩＩ、ＤＩ－ＩＶ）ではＣｏｆ２０を結合させたカラムを使用した。

次に、充分量の同緩衝液でカラムを洗浄した後、１Ｍ

グリシン塩酸緩衝液（ｐＨ２．５）にて蛋白を溶出、回収した。回収した蛋白画分は、直ちにＰＢＳ（ｐＨ７．４）２リットル（Ｌ）に対して一晩透析を行い、次に透析チューブと４０％ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）溶液を用いた方法にて濃縮を行った。濃縮後、１５０ｍＭ塩化ナトリウム含有ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．２）２Ｌに対し一晩透析を行い、得られた蛋白を精製標品とした。

このような方法を用いて調製した各ドメイン欠失変異蛋白の精製標品はＳＤＳ－ＰＡＧＥ（クマシーブルー染色）にて分析した結果、純度９５％以上という極めて高度に精製されたものであり（第７図）、作製した２種類のアフィニティーカラムクロマトグラフィー法が極めて効果的であることが明かとなった。また、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果から、各ドメイン欠失蛋白は表１に示す分子量であることが判明した。

表１．　各ドメイン欠失蛋白の分子量

	分子量（ kDa ）
ＤＩＶ－Ｖ	１８．９
ＤＩＩＩ－Ｖ	３２．７
ＤＩＩ－Ｖ	３４．５
ＤＩ－ＩＩＩ	２５．６
ＤＩ－ＩＶ	３６．４

（６）ドメイン欠失変異蛋白を用いた抗β2-ＧＰＩモノクローナル抗体の抗原決定基（epitope）の解析

得られた各種のドメイン欠失変異蛋白（ＤＩＶ－Ｖ，ＤＩＩＩ－Ｖ，ＤＩＩ－Ｖ，ＤＩ－ＩＩＩ，ＤＩ－ＩＶ）ならびに全ドメインを有するリコンビナント蛋白（ＤＩ－Ｖ(whole)）の各溶液（１０μｇ／ｍｌ）を５０μｌ／ウエルずつ９６ウェルマイクロタイタープレート（住友ベークライト社、Ｓプレート）の各ウエルに入れ、４℃で一晩インキュベートした。０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０含有リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ：ｐＨ７．４）（２００μｌ）を用いて３回洗浄した後、３％ゼラチン溶液（２００μｌ）を各ウエルに入れ、更に室温で１時間静置した。

ゼラチン液を除去した後、精製抗β2-ＧＰＩモノクローナル抗体（Ｃｏｆ－１８，Ｃｏｆ－１９，Ｃｏｆ－２０，Ｃｏｆ－２１，Ｃｏｆ－２２，Ｃｏｆ－２３）溶液（０．２μｇ／ｍｌ）を１００μｌずつ入れ、室温にて１時間静置した。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（２００μｌ）にて３回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウスＩｇＧ抗体を１００μｌずつ入れ、室温にて１時間静置した。上記と同様に洗浄の後、発色液（０．３ｍＭテトレメチルベンジジン、０．０００３％H_2O_2）１００μｌを加え、正確に１０分反応させた。２Ｎ H_2SO_4、１００μｌを加えて反応を停止させ、４５０ｎｍの吸光度を測定した。

結果を第8図に示す。この結果をより、各精製抗β2-ＧＰＩモノクローナル抗体の抗原決定基を解析したのが第9図である。このように、ドメイン欠失変異蛋白を用いることにより、各抗β2-ＧＰＩ抗体の抗原決定基を容易に解析することができる。

（7）ドメイン欠失変異蛋白を用いたモノクローナル抗カルジオリピン抗体（抗ＣＬ抗体：ＷＢ－ＣＡＬ－１：J.Immunol.,149,1063-1068(1992)）、および抗リン脂質抗体症候群患者血清中の自己抗体の抗原決定基（epitope）の解析および自己抗体の検出

方法１；

全ドメインを有するリコンビナントβ2-ＧＰＩ蛋白（ＤＩ－Ｖ(whole)）、ならびに得られた各種のドメイン欠失変異蛋白（ＤＩＶ－Ｖ，ＤＩＩＩ－Ｖ，ＤＩＩ－Ｖ，ＤＩ－ＩＩＩ，ＤＩ－ＩＶ）の各溶液（１０μｇ／ｍｌ）を５０μｌ／ウエルずつ９６ウェルマイクロタイタープレート（住友ベークライト社、Ｓプレートおよび Ｃ－プレート）の各ウエルに入れ、４℃で一晩インキュベートした。なお、Ｃ－プレートは Ｓ－プレートの表面に化学的にカルボキシル基を導入したものである。次に、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（２００μｌ）にて３回洗浄した後、３％ゼラチン溶液、２００μｌを各ウエルに入れ、更に室温で１時間静置した。

ゼラチン液を除去した後、適宜希釈した精製モノクローナル抗カルジオリピン抗体（抗ＣＬ抗体：ＷＢ－

ＣＡＬ－１）もしくは抗リン脂質抗体症候群患者の陽性血清を１００μｌずつ入れ、室温にて１時間静置した。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（２００μｌ）にて３回洗浄し、ペルオキシダーゼで標識された抗マウスＩｇＧ抗体もしくは抗ヒトＩｇＧ抗体を１００μｌずつ入れ、室温にて１時間静置した。同様の洗浄の後、発色液（０．３ｍＭテトラメチルベンジジン、０．０００３％H_2O_2）１００μｌを加え、正確に１０分反応させた。２Ｎ　H_2SO_4、１００μｌを加え、反応を停止させ、４５０ｎｍの吸光度を測定した。

精製モノクローナル抗カルジオリピン抗体（抗ＣＬ抗体）を用い、Ｓプレートでの測定結果を図１０に、Ｃプレートの測定結果を第１１図に示す。また、健常人血清４例、ＳＬＥ患者血清３例、梅毒患者血清３例を用いて、Ｓプレートで測定した結果を図１２～１４に、Ｃプレートで測定した結果を第１５～１７図に示す。

その結果、カルボキシル基を導入していないプレート（Ｓ－プレート）に直接ドメイン欠失変異蛋白を抗原として固相化した場合、ドメインＶを欠損したドメインＩＶを含むドメイン欠失変異蛋白で抗ＣＬ抗体が測定可能であることが明きらかとなった（第１０図）。それに対し、カルボキシル基を導入したプレート（Ｃ－プレート）にドメイン欠失蛋白を固相化した場合、ヒト血清由来β2-ＧＰＩを固相化した時と同様にドメインＩＶおよびＶを有するドメイン欠失変異蛋白で抗ＣＬ抗体が測定

可能であった（第１１図）。なお、ドメインＶを欠失した蛋白であるＤＩ－ＩＶでも、カルボキシル基を導入したプレート上で抗ＣＬ抗体を測定することが可能である（第１１図）ことから、少なくともドメインＩＶを有する変異蛋白が抗ＣＬ抗体の測定に有用であることが確認された。

また、ヒト血清を測定した場合、ＳＬＥ患者では抗ＣＬ抗体と同様の挙動を示した（第１６図）。しかし、健常人および梅毒患者では特徴的な抗体の結合は見られなかった。

方法２；

ウシ心臓由来のカルジオリピン（５０μｇ／ｍｌエタノール溶液）を５０μｌ／ウエルずつ９６ウエルマイクロタイタープレート（Immulon-1 、Dynatech社製）に入れ、減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、全ドメインを有するリコンビナントβ2-ＧＰＩ蛋白（ＤＩ－Ｖ(whole)）およびドメイン欠失蛋白（ＤＩＶ－Ｖ，ＤＩＩＩ－Ｖ，ＤＩＩ－Ｖ，ＤＩ－ＩＩＩ，ＤＩ－ＩＶ）の各溶液（１０μｇ／ｍｌ）を１００μｌ／ウエルずつ各ウエルに入れ、室温にて１時間静置した。洗浄後、適宜希釈した抗カルジオリピン抗体（抗ＣＬ抗体）を１００ｕｇ／ｍｌずつ加え、３０分反応させた。更に、洗浄し、ペルオキシダーゼで標識した抗マウスＩｇＧ抗体もしくは抗ヒトＩｇＧ抗体を１００μｌずつ入れ、室温にて１時間静置した。同様に洗浄の後、発色

液（０．３ｍＭテトラメチルベンジジン、０．０００３％H_2O_2）１００μｌを加え、正確に１０分反応させた。２Ｎ　H_2SO_4、１００μｌを加え、反応を停止させ、４５０ｎｍの吸光度を測定した。

その結果を第１８図に示す。この結果、カルジオリピンを用いるＥＬＩＳＡ（ａＣＬ－ＥＬＩＳＡ）の系に用いた場合、少なくともドメインＶとドメインＩＶを含むドメイン欠失変異蛋白を使用することにより抗ＣＬ抗体の結合が認められた（第１８図）。従って、ａＣＬ－ＥＬＩＳＡの系においては、ドメインＶとドメインＩＶを含むドメイン欠失蛋白を用いることで抗ＣＬ抗体の検出が可能であることを確認した。

（８）β２－ＧＰＩのリン脂質（カルジオリピン）結合部位の解析

方法１；

ウシ心臓由来のカルジオリピン（５０μｇ／ｍｌエタノール溶液）を５０μｌ／ウエルずつ９６ウエルマイクロタイタープレート（Immulon-1 、Dynatech社製）に入れ、減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、全ドメインを有するリコンビナントβ2-ＧＰＩ蛋白（ＤＩ－Ｖ(whole)）およびドメイン欠失蛋白（ＤＩＶ－Ｖ，ＤＩＩＩ－Ｖ，ＤＩＩ－Ｖ，ＤＩ－ＩＩＩ，ＤＩ－ＩＶ）の各溶液（１０μｇ／ｍｌ）を１００μｌ／ウエルずつ各ウエルに入れ、室温にて１時間静置した。洗浄後、適宜希釈した抗β2-ＧＰＩ抗体を１００ｕｇ／

ｍｌずつ加え、３０分反応させた。更に、洗浄し、ペルオキシダーゼで標識された抗マウスＩｇＧ抗体もしくはペルオキシダーゼで標識された抗ヒトＩｇＧ抗体を１００μｌずつ入れ、室温にて１時間静置した。同様の洗浄の後、発色液（０．３ｍＭテトラメチルベンジジン、０．０００３％ H_2O_2）１００μｌを加え、正確に１０分反応させた。２Ｎ H_2SO_4、１００μｌを加え、反応を停止させ、４５０ｎｍの吸光度を測定した。

結果を第１９図に示す。その結果、ドメイン欠失変異蛋白のうち、リン脂質（カルジオリピン）と結合し得たのはドメインＶを有する蛋白であった。

方法２；

ウシ心臓由来のカルジオリピン（５０μｇ／ｍｌエタノール溶液）を５０μｌ／ウエルずつ９６ウエルマイクロタイタープレート（Immulon-1 、Dynatech社製）に入れ、減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、インヒビターとして全ドメインを有するリコンビナントβ2-ＧＰＩ蛋白（ＤＩ－Ｖ(whole)）およびドメイン欠失変異蛋白（ＤＩＶ－Ｖ，ＤＩＩＩ－Ｖ，ＤＩＩ－Ｖ，ＤＩ－ＩＩＩ，ＤＩ－ＩＶ）の各溶液（０－５０μｇ／ｍｌ）を5ｕｇ／ｍｌのビオチン化ヒト血清由来β2-ＧＰＩ（全量１００μｌ／ウエル）と、室温にて１時間インキュベートした。洗浄後、アビジン化ペルオキシダーゼを１００μｌ／ウエルずつ加え、１５分反応させた。洗浄の後、発色液（０．３ｍＭテトラメチルベンジジン、

0．0003％ H_2O_2）100μ1を加え、正確に10分反応させた。2N H_2SO_4、100μ1を加え、反応を停止させ、450nmの吸光度を測定した。

結果を第20図に示す。その結果、ドメインVを有するドメイン欠失蛋白がビオチン化ヒト血清由来β2-GPIのリン脂質に対する結合を強く阻害することが確認された。

以上の解析の結果、①β2-GPIの第5ドメイン（ドメインV）にリン脂質との結合部位が存在すること、②抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）は第4ドメイン（ドメインIV）を中心とする構造であること、③このエピトープは通常隠れているが、ドメインVがリン脂質など結合することにより、構造変化を起こし、抗体が認識できるようになることが確認された。

産業上の利用可能性

β2-GPI中の特定のドメインを含有するポリペプチドを使用することにより、感染症由来の抗カルジオリピン抗体の影響を受けることなく、抗リン脂質抗体症候群由来に自己抗体（抗カルジオリピン抗体）のみを特異的に測定することができるようになった。このような特徴は、従来法においてはβ2-GPIの存在下及び非存在下の二種の条件下で測定を行うことにより初めてその分別定量が可能であったのに比べて、極めて有利である。

請 求 の 範 囲

1. β2-グリコプロティンIを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-グリコプロティンIの代わりに、β2-グリコプロティンI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。

2. β2-グリコプロティンI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドをキットの構成試薬として含むことを特徴とする、請求の範囲第1項記載の方法を実施するためのキット。

3. ポリペプチドが、ヒト由来のβ2-グリコプロティンI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含むものである、請求の範囲第1項記載の測定法または請求の範囲第2項記載のキット。

4. 担体にリン脂質を結合させた固相試薬とβ2-グリコプロティンIを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-グリコプロティンIの代わりに、β2-グリコプロティンI中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗

体の測定法。

5. β2-グリコプロティンI中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチド、および担体にリン脂質を結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含むことを特徴とする、請求の範囲第4項記載の方法を実施するためのキット。

6. ポリペプチドが、ヒト由来のβ2-グリコプロティンI中のドメインIV及びドメインVと同一のアミノ酸配列を含むものである、請求の範囲第4項記載の測定法または請求の範囲第5項記載のキット。

7. 担体にβ2-グリコプロティンIを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-グリコプロティンIの代わりに、β2-グリコプロティンI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。

8. β2-グリコプロティンI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを担体に結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含むことを特徴とする、請求の範囲第7項記載の方法を実施するための

キット。

9. ポリペプチドが、ヒト由来のβ2-グリコプロティンI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたものである、請求の範囲第7項記載の測定法または請求の範囲第8項記載のキット。

10. 極性基を表面に導入した担体にβ2-グリコプロティンIを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-グリコプロティンIの代わりに、β2-グリコプロティンI中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。

11. β2-グリコプロティンI中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを極性基を表面に導入した担体に結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含有することを特徴とする、請求の範囲第10項記載の方法を実施するためのキット。

12. ポリペプチドが、ヒト由来のβ2-グリコプロティンI中のドメインIV及びドメインVと同一のアミノ酸配列を含むものである、請求の範囲第10項記載の測定法または請求の範囲第11項記載のキット。

FIG. 1

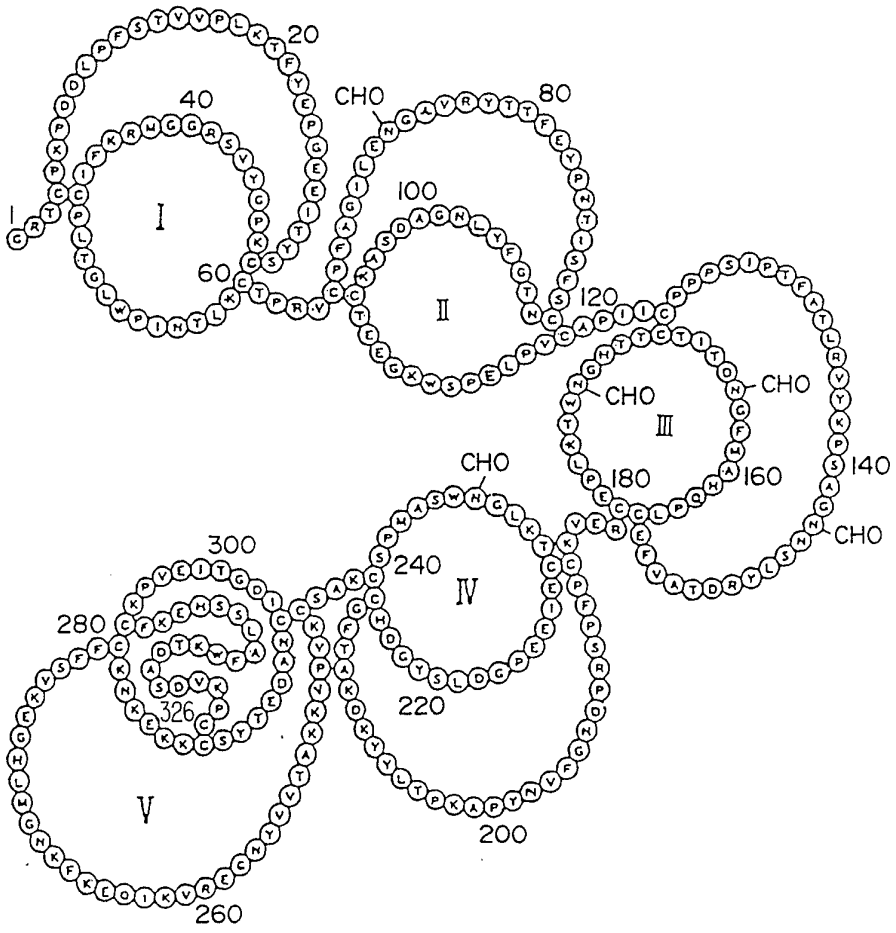

I
II
III
IV
V
CHO
CHO
CHO
CHO
CHO
1
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
326

FIG. 2

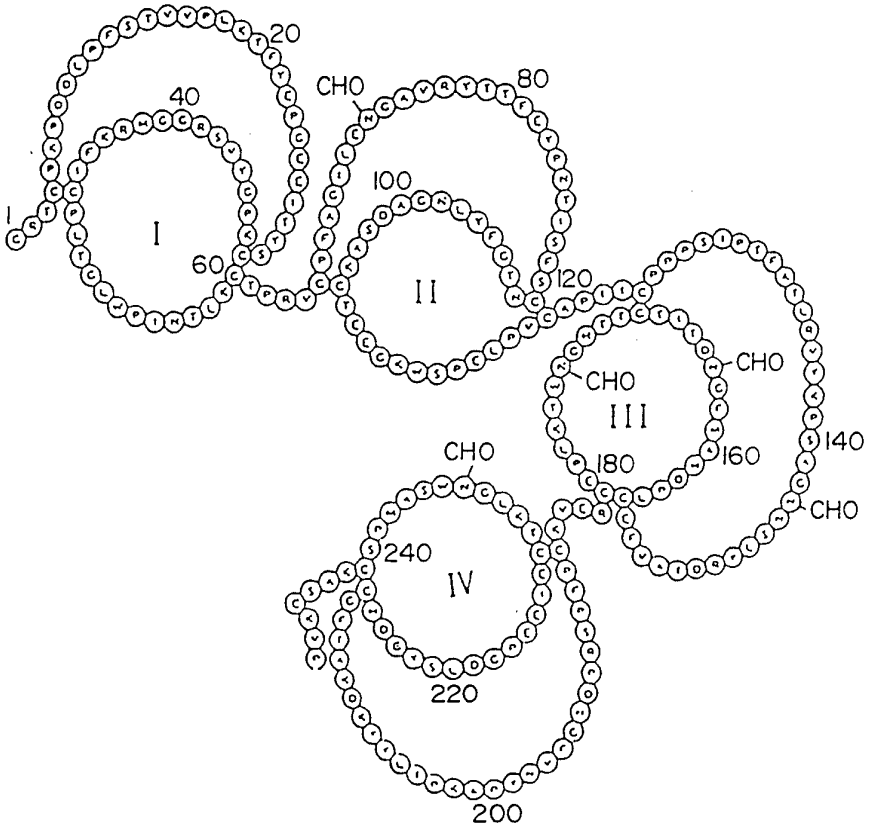

1
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
CHO
I
II
III
IV

FIG. 3

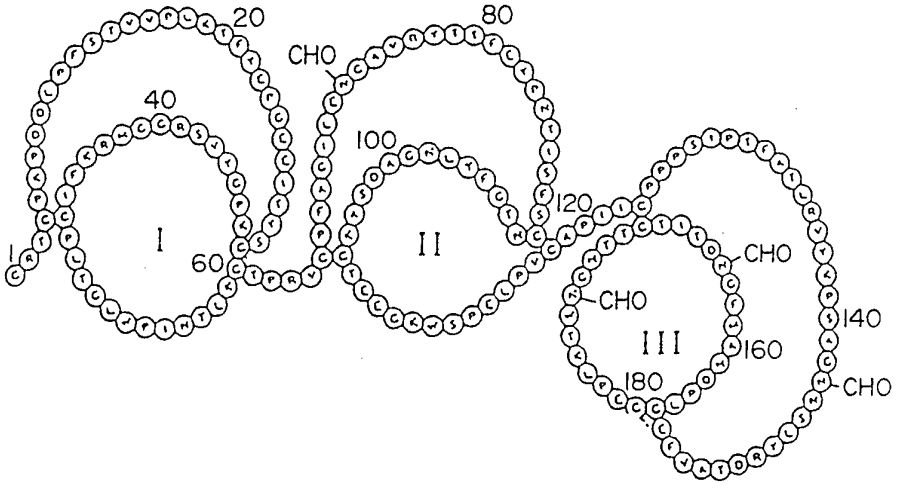

1
20
40
60
80
100
120
140
160
180
CHO
I
II
III

FIG. 4

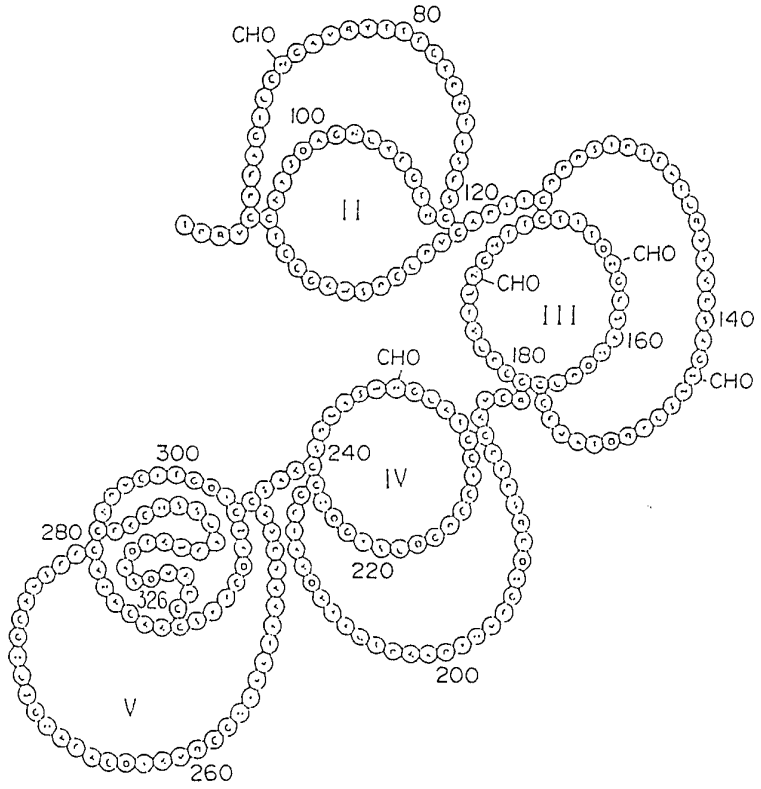

80
CHO
100
II
120
CHO
CHO
III
140
160
180
CHO
CHO
300
240
IV
280
220
326
200
V
260

FIG. 5

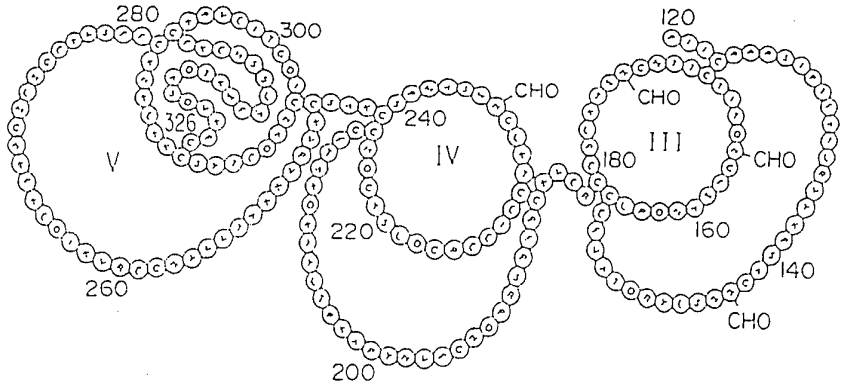

280
300
326
V
240
CHO
IV
220
200
260
120
CHO
III
180
CHO
160
140
CHO

FIG. 6

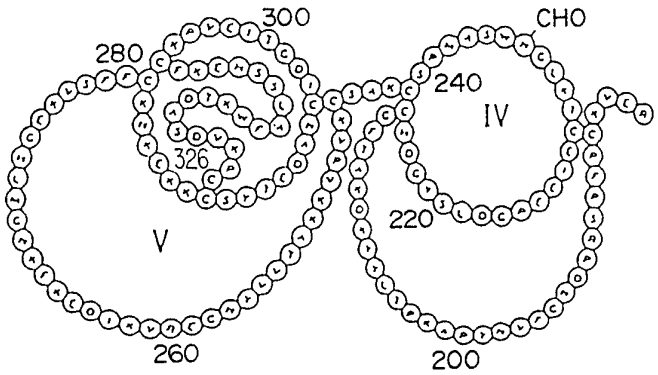
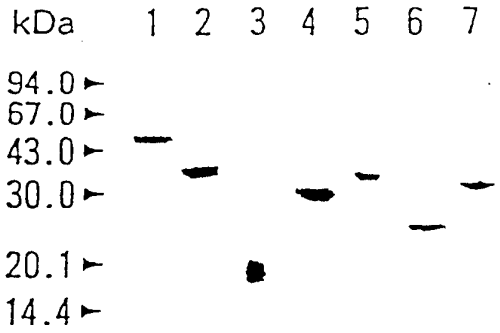


FIG. 7



レーン1；血清由来 β_2-GPI

2；リコンビナント β_2-GPI
(DI-V，全構造 (whole))

3；DIV-V

4；DIII-V

5；DII-V

6；DI-III

7；DI-IV

FIG. 8

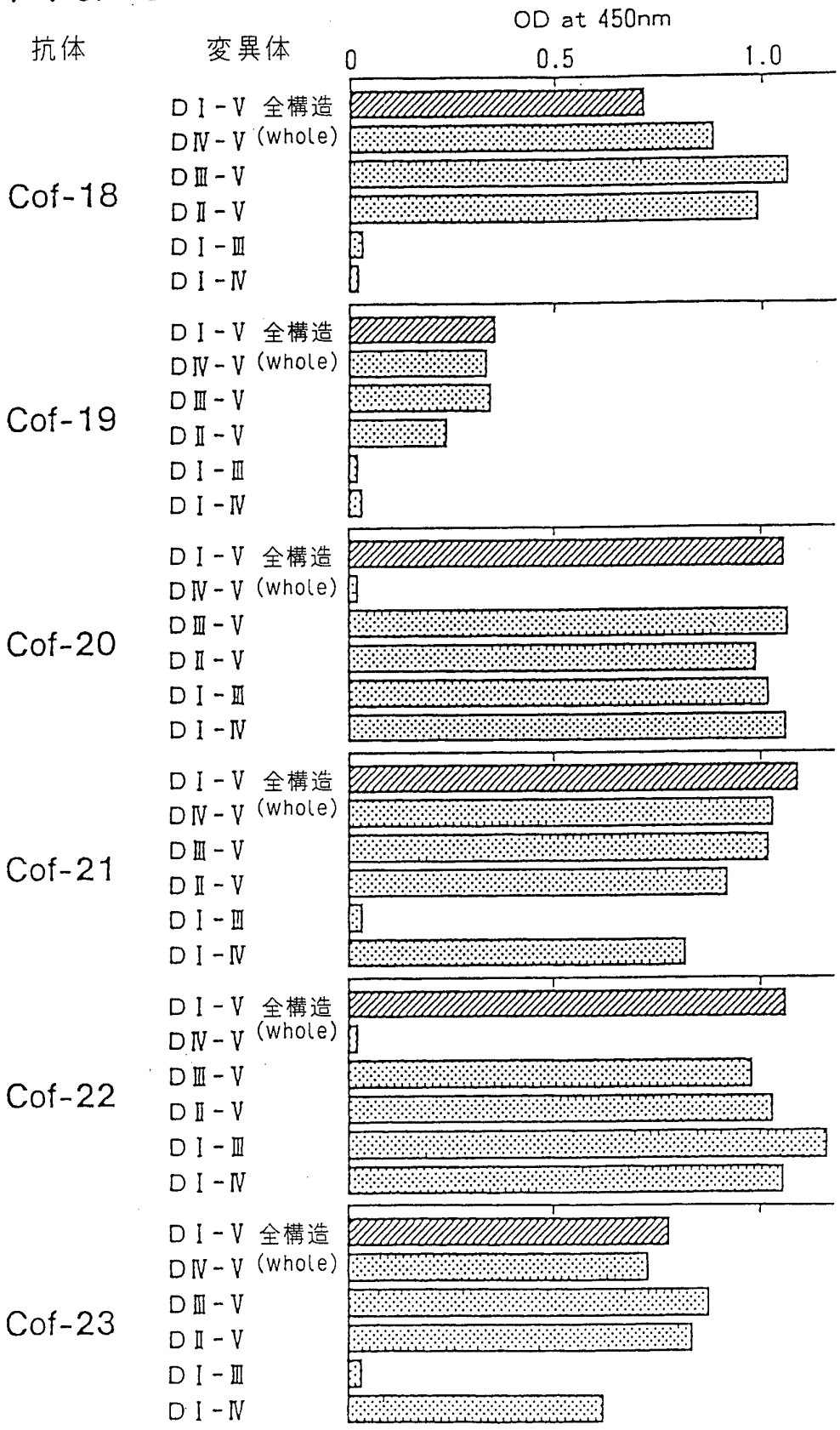

抗体
変異体
OD at 450nm
0
0.5
1.0
Cof-18
Cof-19
Cof-20
Cof-21
Cof-22
Cof-23
DI-V 全構造
DIV-V (whole)
DIII-V
DII-V
DI-III
DI-IV

FIG. 9

	欠失変異蛋白 DIV-V DIII-V DII-V DI-III DI-IV	エピトープ
Cof-18	+ + + − −	V
Cof-19	+ + + − −	V
Cof-20	− + + + +	III
Cof-21	+ + + − +	IV
Cof-22	− + + + +	III
Cof-23	+ + + − +	IV

FIG. 10

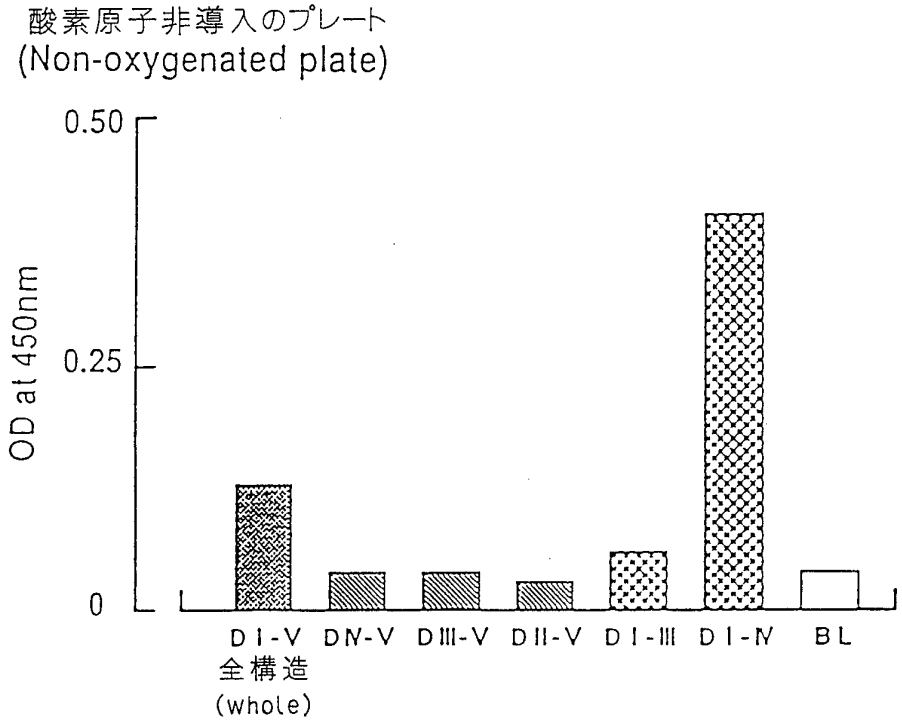

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)
0.50
0.25
0
OD at 450nm
D I-V 全構造 (whole)
DIV-V
DIII-V
DII-V
D I-III
D I-IV
BL
欠失変異蛋白

FIG. 11

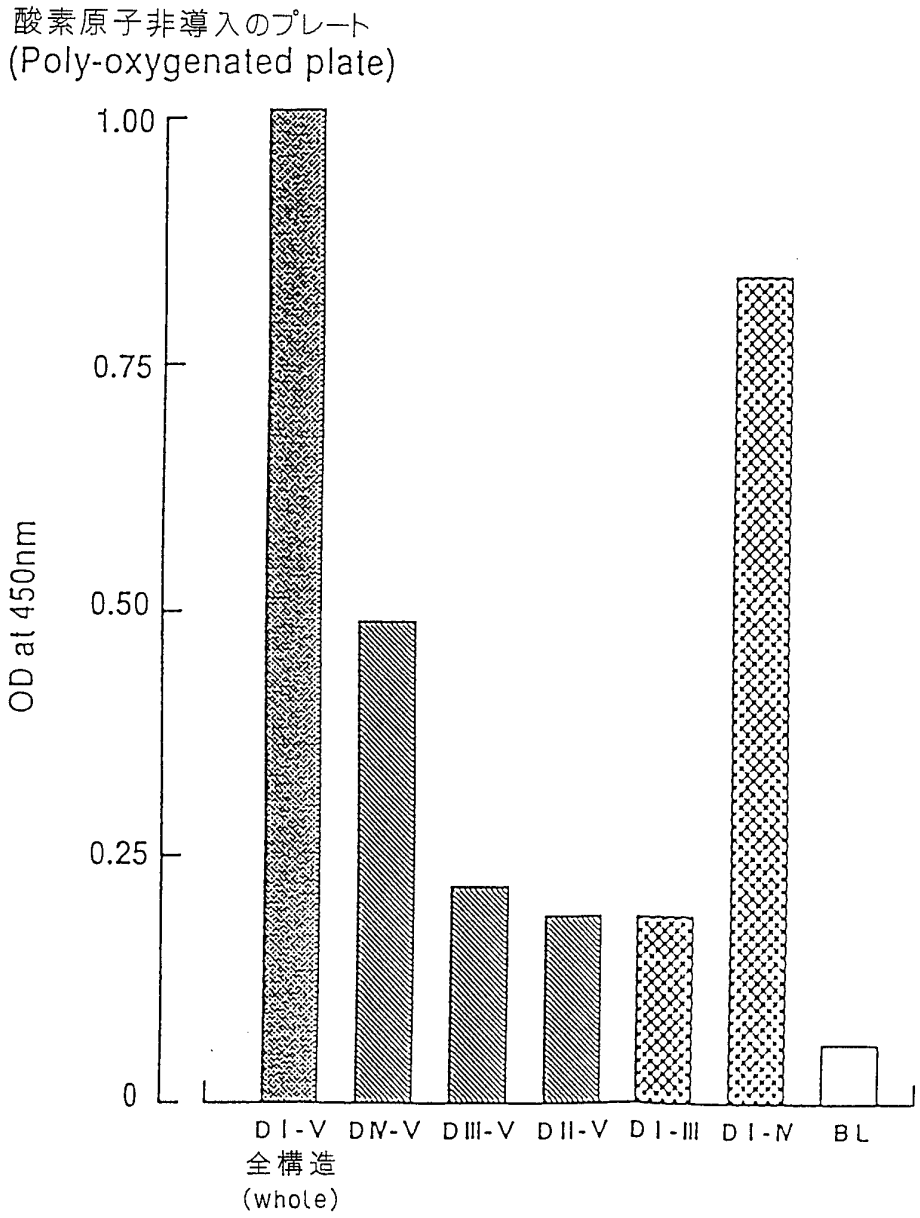
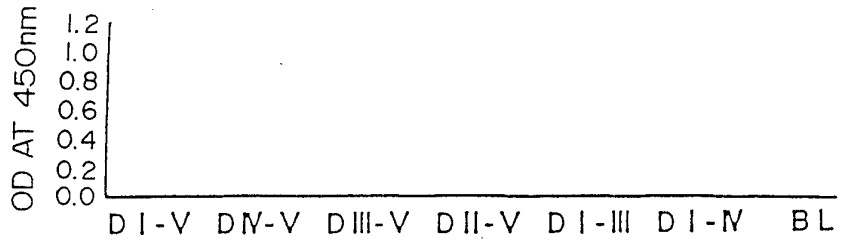

酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)
1.00
0.75
0.50
0.25
0
OD at 450nm
DI-V 全構造 (whole)
DIV-V
DIII-V
DII-V
DI-III
DI-IV
BL
欠失変異蛋白

FIG. 12

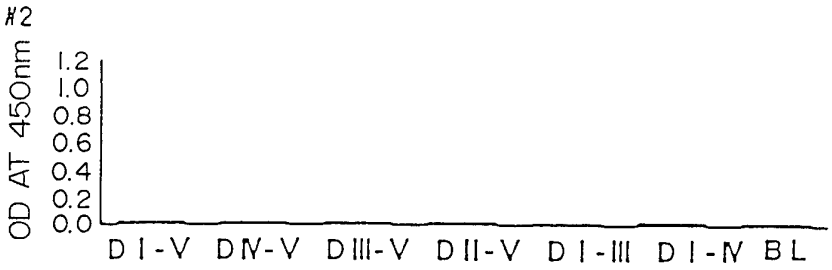
酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

健常人 #1



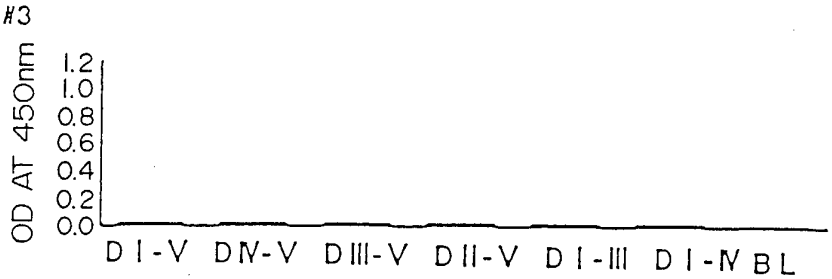
欠失変異蛋白

#2



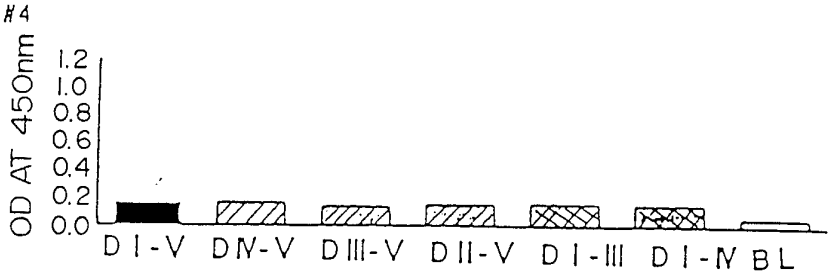
欠失変異蛋白

#3



欠失変異蛋白

#4



欠失変異蛋白

FIG. 13

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

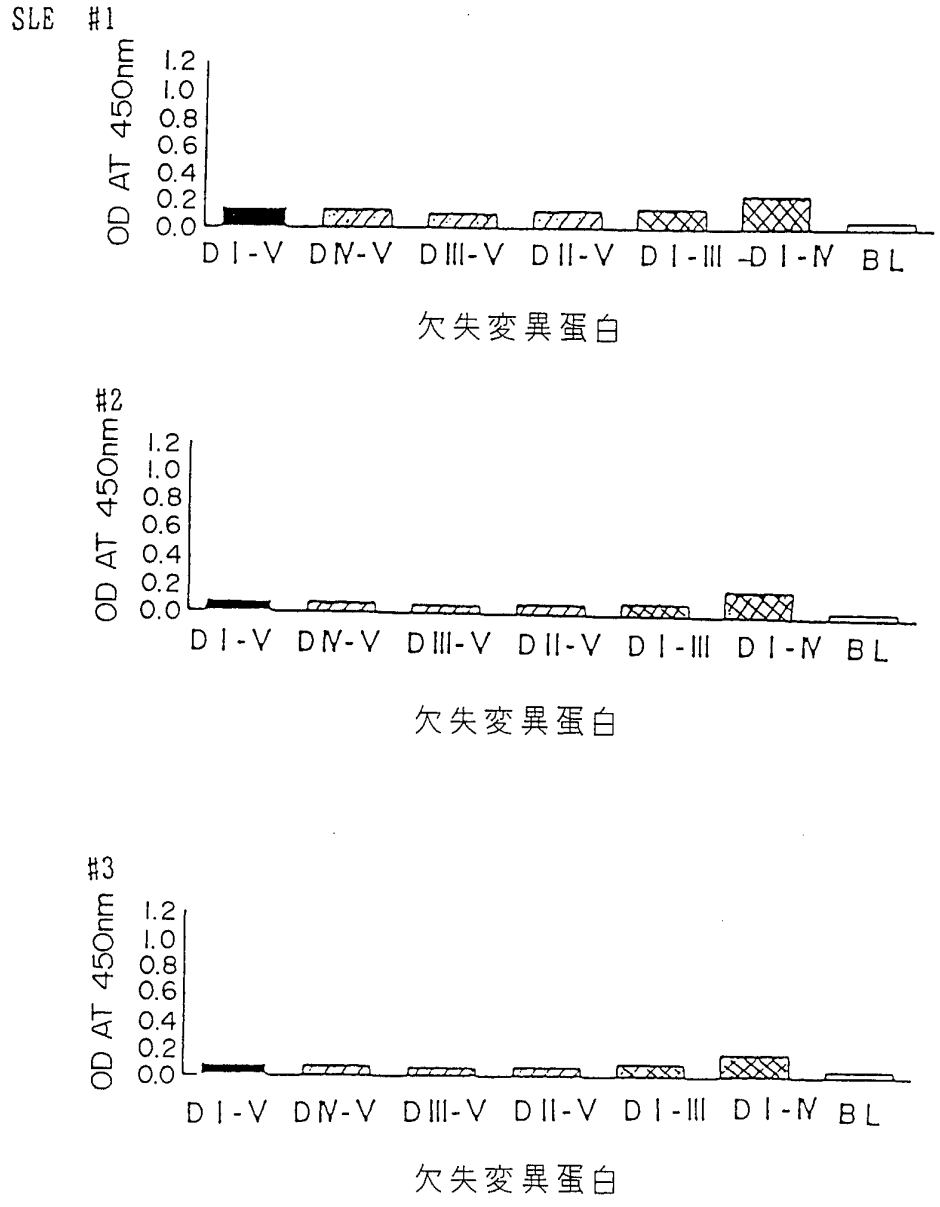
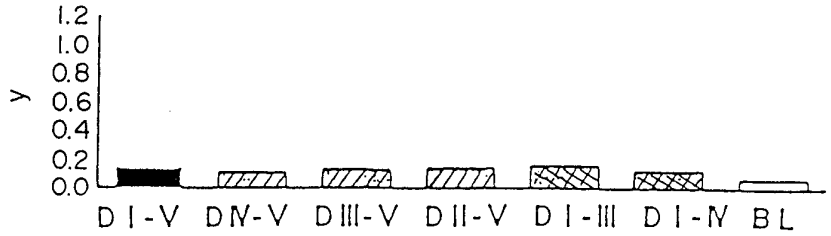


FIG. 14

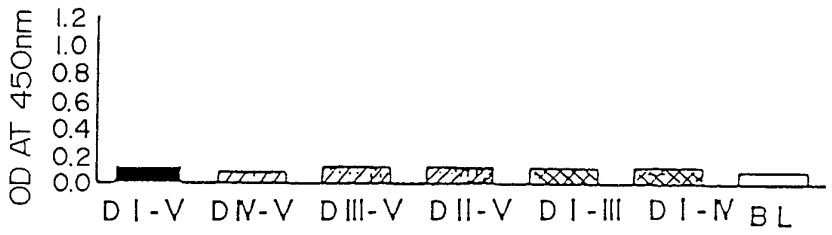
酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

梅毒患者#1



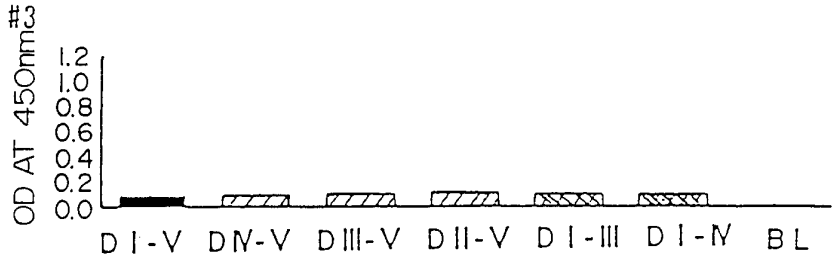
x

#2



欠失変異蛋白

#3



欠失変異蛋白

FIG. 15

酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)

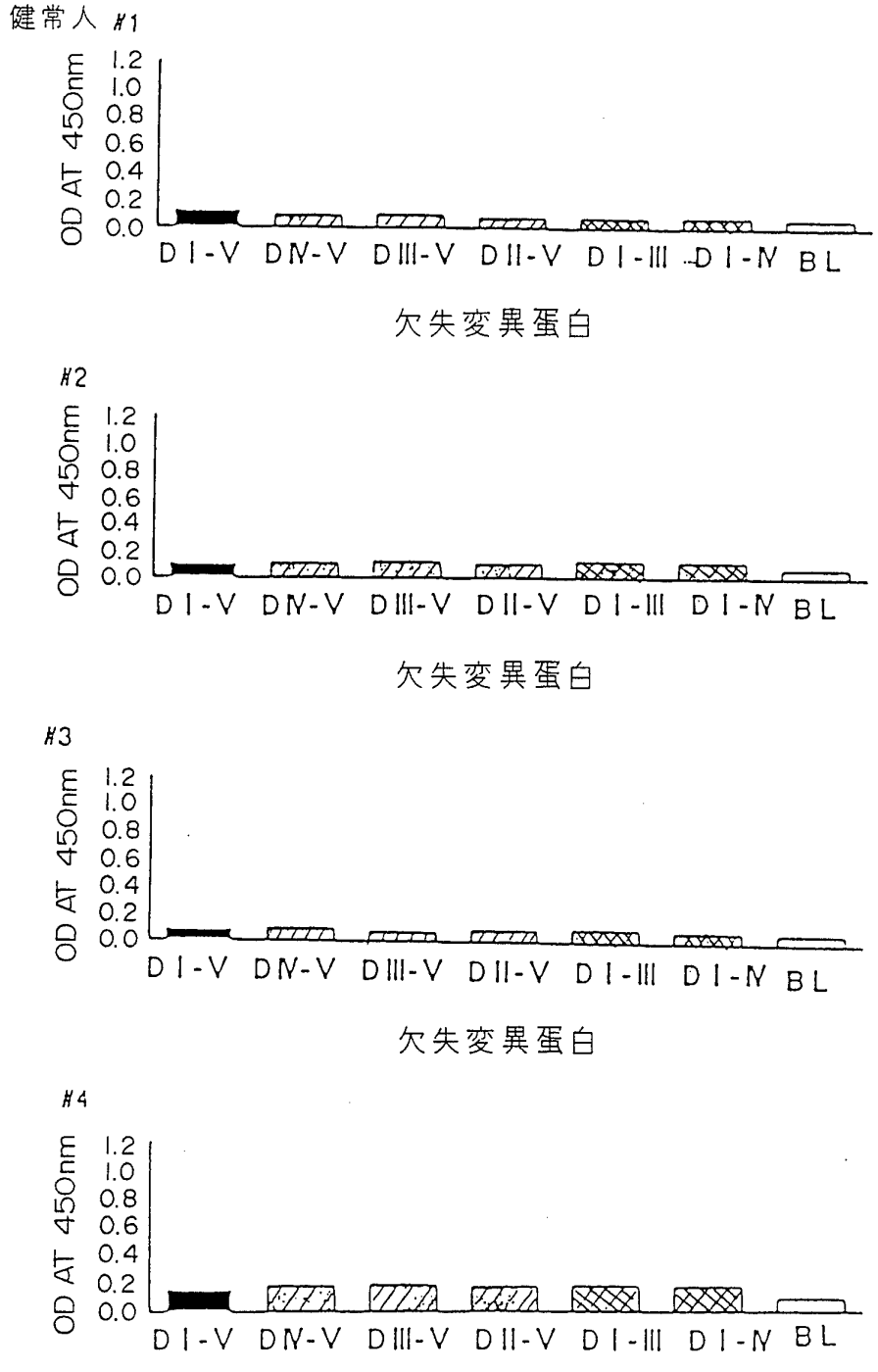


FIG. 16

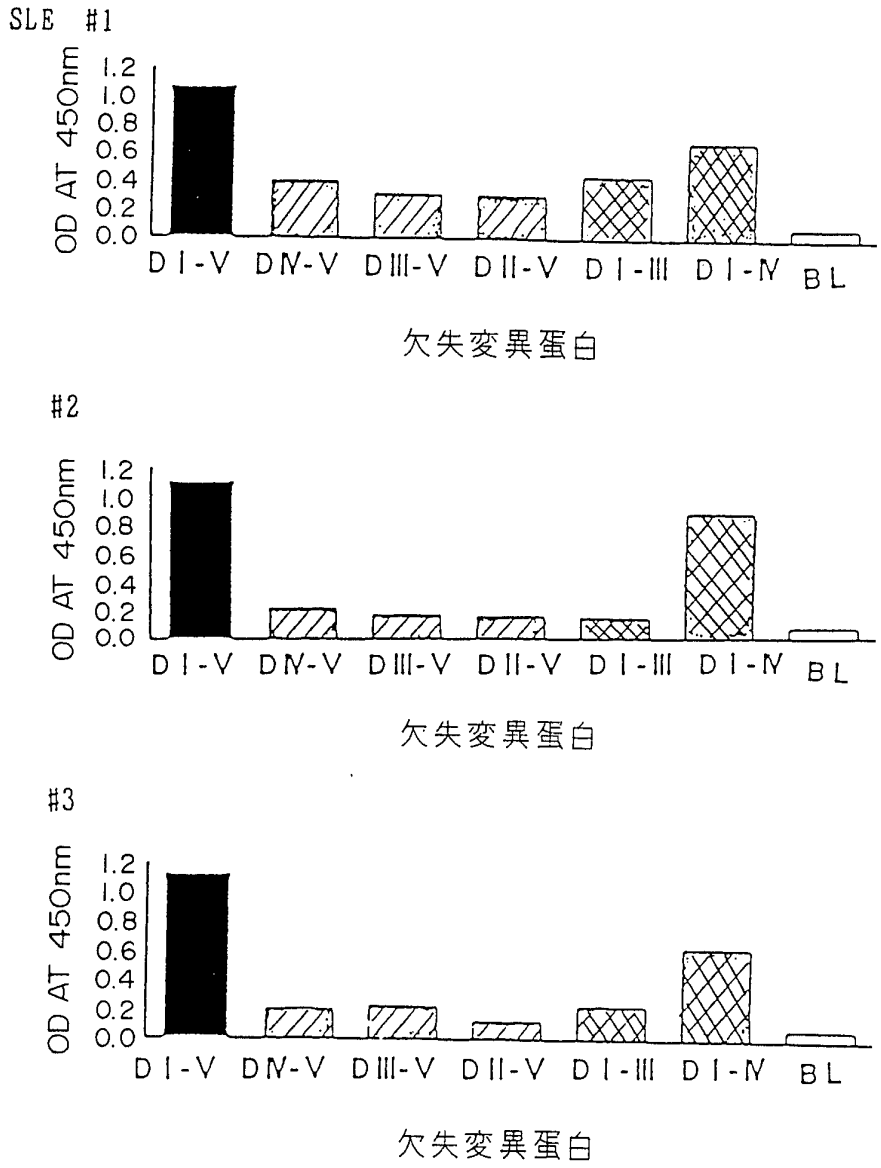
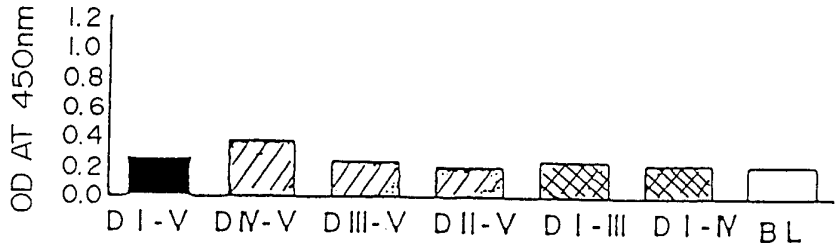

酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)
SLE #1
OD AT 450nm
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DI-V DIV-V DIII-V DII-V DI-III DI-IV BL
欠失変異蛋白
#2
OD AT 450nm
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DI-V DIV-V DIII-V DII-V DI-III DI-IV BL
欠失変異蛋白
#3
OD AT 450nm
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DI-V DIV-V DIII-V DII-V DI-III DI-IV BL
欠失変異蛋白

FIG. 17

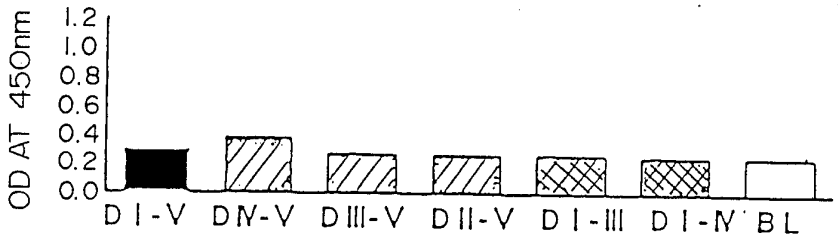
酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)

梅毒患者 #1



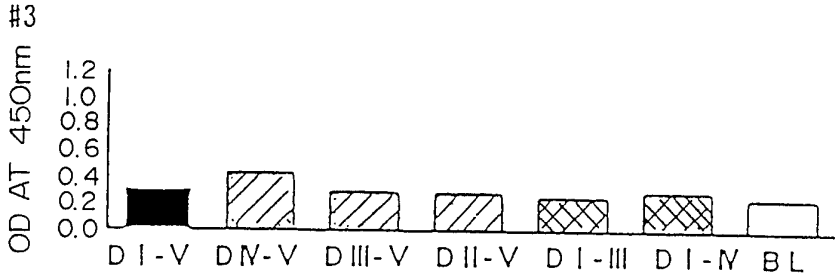
欠失変異蛋白

#2



欠失変異蛋白

#3



欠失変異蛋白

FIG. 18

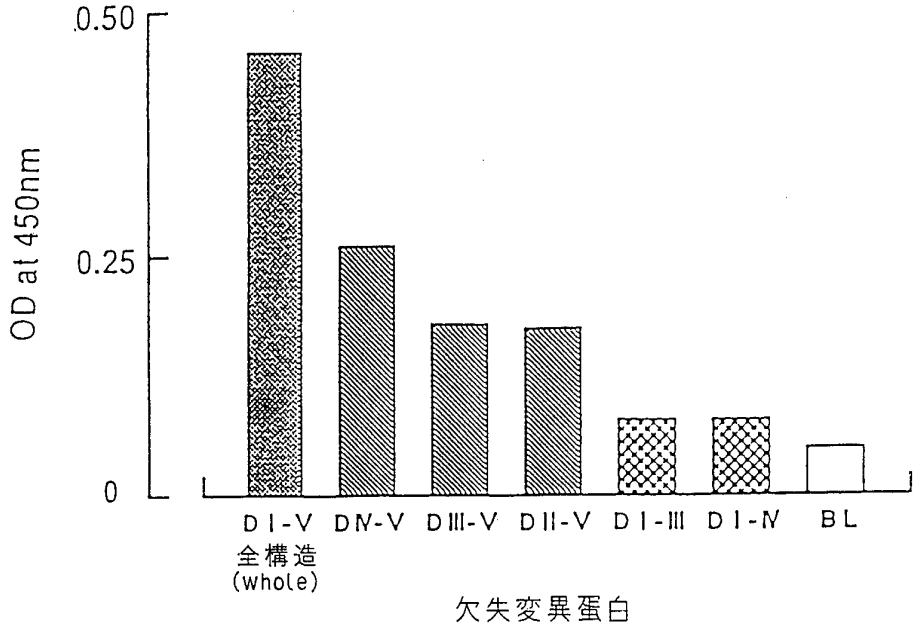

0.50
0.25
0
OD at 450nm
D I-V
全構造
(whole)
DIV-V
DIII-V
DII-V
D I-III
D I-IV
BL
欠失変異蛋白

FIG. 19

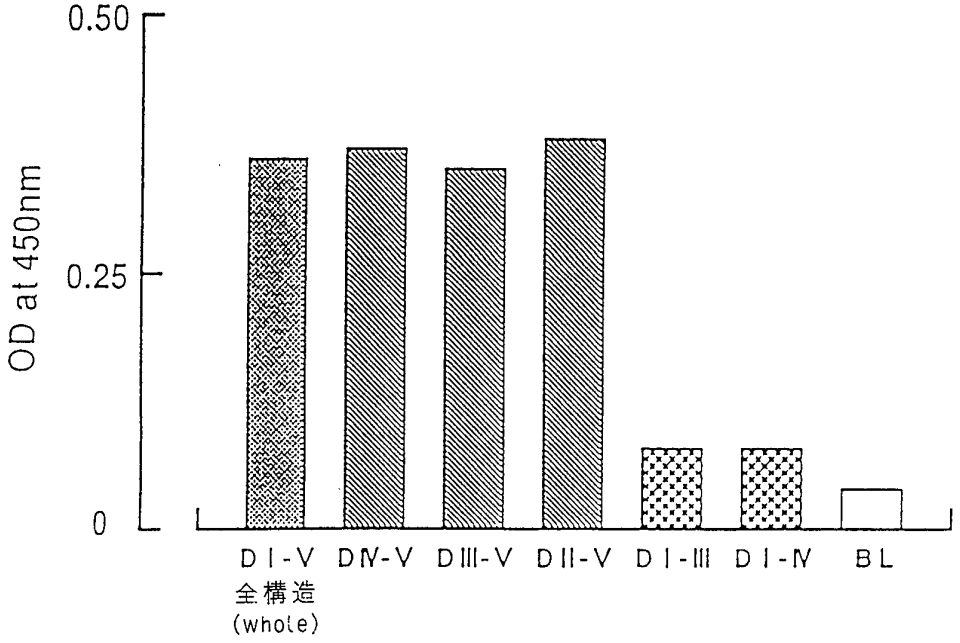
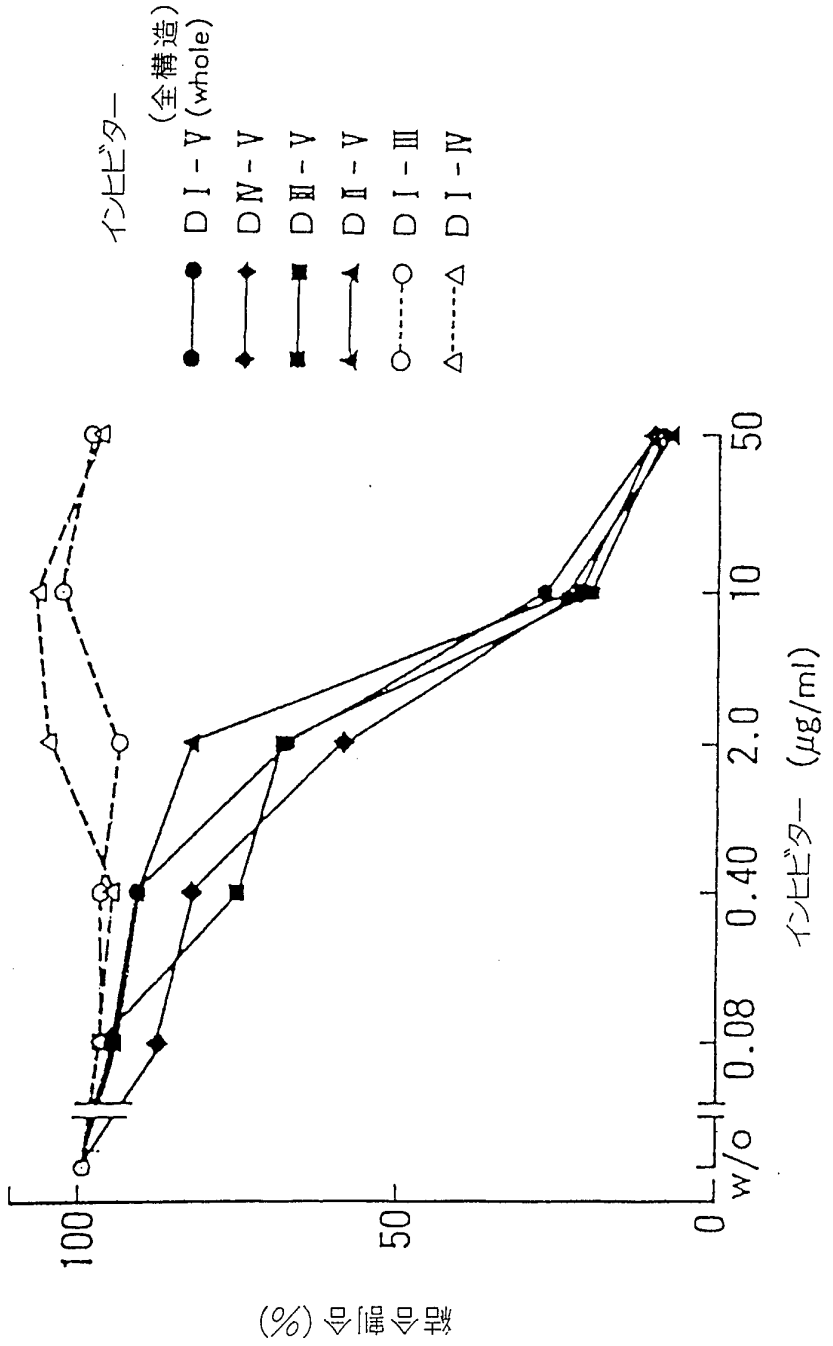

0.50
0.25
0
OD at 450nm
D I-V
全構造
(whole)
DIV-V
DIII-V
DII-V
D I-III
D I-IV
BL
欠失変異蛋白

FIG. 20


インヒビター
(全構造)
(whole)
DI-V
DIV-V
DIII-V
DII-V
DI-III
DI-IV
結合割合 (%)
100
50
0
w/o
0.08
0.40
2.0
10
50
インヒビター (μg/ml)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/01929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^6 G01N33/564, 33/53

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)

Int. Cl^6 G01N33/564, 33/53

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

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1994
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1994

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A1, 93/16387 (Yamasa Corp.), August 19, 1993 (19. 08. 93),	1-12
A	WO, A1, 91/06006 (Yamasa Corp.), May 2, 1991 (02. 05. 91), &EP, A, 450099	1-12
A	JP, A, 4-506415 (Yamasa Corp.) November 5, 1992 (05. 11. 92), &WO, A, 91/15772	1-12

☐ 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

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
January 30, 1995 (30. 01. 95)	February 21, 1995 (21. 02. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 94 / 01929

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ G01N33/564, 33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ G01N33/564, 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926－1994年

日本国公開実用新案公報 1971－1994年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	WO, A1, 93/16387（ヤマサ醤油株式会社）, 19. 8月. 1993（19. 08. 93）	1－12
A	WO, A1, 91/06006（ヤマサ醤油株式会社）, 2. 5月. 1991（02. 05. 91）&EP, A, 450099	1－12
A	JP, A, 4－506415（ヤマサ醤油株式会社）, 5. 11月. 1992（05. 11. 92） &WO, A, 91/15772	1－12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
30. 01. 95

国際調査報告の発送日
21.02.95

名称及びあて先
日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）
亀田宏之 印
2J 9015

電話番号 03－3581－1101 内線 3252