

(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2004-231535

(P2004-231535A)

(43) 公開日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/47	CO7K 14/47	4H045
GO1N 33/53	GO1N 33/53	
GO1N 33/564	GO1N 33/564	D
// CO7K 7/00	CO7K 7/00	ZNAZ

審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 91 頁)

(21) 出願番号	特願2003-19760 (P2003-19760)	(71) 出願人	000002288 三洋化成工業株式会社 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
(22) 出願日	平成15年1月29日 (2003.1.29)	(72) 発明者	國近 誠 京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化成工業株式会社内
		Fターム(参考)	4H045 AA30 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 CA40 EA51

(54) 【発明の名称】 p 53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 p 53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、感度及び特異性に優れた測定試薬を提供すること。

【解決手段】 p 53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thrなどのアミノ酸配列であってかつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を必須構成単位としてなるポリペプチドを含んでなることを特徴とする免疫測定用試薬を用いる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

p53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr (1)、Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg (2)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys (3)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr (4)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (5)、Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn (6)、又はLys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp (7)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であってかつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を必須構成単位としてなるポリペプチドを含んでなることを特徴とする免疫測定用試薬。

【請求項2】

p53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr (1)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、かつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドと、Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp (7)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、かつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドとを含んでなることを特徴とする免疫測定用試薬。

【請求項3】

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg (2)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Th

r Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys
 (3)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg
 Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro
 Tyr (4)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met
 Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr
 Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn
 Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His
 Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (5)、又はGlu Glu
 Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His
 Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala 10
 Leu Pro Asn (6)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、か
 つアミノ酸個数が8~20個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドをさ
 らに含んでなる請求項2に記載の試薬。

【請求項4】

ポリペプチドを構成するアミノ酸の個数が、10~50個である請求項1~3のいずれか
 に記載の試薬。

【請求項5】

ポリペプチドが水不溶性担体に結合されてなる請求項1~4のいずれかに記載の試薬。

【請求項6】

請求項1~5のいずれかに記載の試薬と、抗ヒトイムノグロブリン抗体を含有してなる免
 疫測定用試薬キット。 20

【請求項7】

抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識化合物で標識されてなる請求項6記載の試薬キット。

【請求項8】

標識化合物が酵素である請求項7記載の試薬キット。

【請求項9】

請求項6~8のいずれかに記載の試薬キットをサンドイッチ法に適用し、抗ヒトイムノグ
 ロブリン抗体を定量することにより、検体中のp53遺伝子産物に対する自己抗体の有無
 を判断する工程を含むp53遺伝子産物に対する自己抗体の免疫測定方法。

【請求項10】

化学発光酵素免疫測定法による請求項9記載の免疫測定方法。 30

【請求項11】

検体中のp53遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断する工程において、検体として
 血液を用い、この検体に対する抗ヒトイムノグロブリン抗体量と、
 複数の健常人の血液に対する抗ヒトイムノグロブリン量から設定される基準値とを比較す
 ることを含む請求項9又は10に記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、p53遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬、免疫測
 定用試薬キット及び抗p53遺伝子産物自己抗体の免疫測定方法に関するものである。 40

【0002】

【従来の技術】

p53遺伝子は、393個のアミノ酸からなる核内リン酸化蛋白質(以下、p53遺伝子
 産物)をコードする癌抑制遺伝子であり、種々のヒト癌において高頻度に欠失と点突然変
 異が認められ(非特許文献1)、変異型p53遺伝子産物は非常に長い半減期を有するこ
 とから、癌細胞ではその発現が増加し、蓄積することが知られている(非特許文献2)。
 一方、乳癌又は肺癌等の癌患者においては、血中にp53遺伝子産物と反応する自己抗体
 が出現することがウエスタンブロット法及び免疫沈降法等で認められている(非特許文
 献3)。そして、p53遺伝子産物の全体(アミノ酸393個)又は断片(アミノ酸100 50

個程度)を固相化した担体を用いる p 5 3 遺伝子産物に対する自己抗体の測定法が知られている(例えば、特許文献1)。

【0003】

【非特許文献1】サイエンス(Science), 250, 1233頁, 1990年

【非特許文献2】オンコジーン(Oncogene), 6, 1699頁, 1991年

【非特許文献3】インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー(Int. J. Cancer), 30, 403頁, 1982年

【特許文献1】

特開平9-229933号公報

【0004】

10

【発明が解決しようとする課題】

従来の p 5 3 遺伝子産物に対する自己抗体の測定法では、自己抗体を保有しない健常人からの検体の測定値と自己抗体を保有する癌患者からの検体の測定値との差が小さく(感度が低い)、また自己抗体を保有しない健常人の検体でも非特異的反応により誤った測定数値となる場合があった。

したがって、本発明の目的は、p 5 3 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、感度及び特異性に優れた測定試薬を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために鋭意研究を行った結果、本発明者らは、p 5 3 遺伝子産物のより小さなペプチド断片(つまり p 5 3 遺伝子産物中の特定のアミノ酸配列からなるペプチド)が自己抗体と特異的に結合することを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、p 5 3 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、Se

20

r Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu
Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pr
o Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Se
r Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr(1)

、Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser

30

Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg(2)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys T

hr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys(3)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Ar

g Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pr
o Tyr(4)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Me

t Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Th
r Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly As

n Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Hi
s Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg(5)、Glu Glu

40

Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His
Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala

Leu Pro Asn(6)、又はLys Asp Ala Gln Ala Gl
y Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser

Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser
Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys

Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp(7)に含まれる少なくとも

1種のアミノ酸配列であってかつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を必須構成単位としてなるポリペプチドを含んでなることを特徴とする免疫測定用試薬である。

【0006】

50

また、p53遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr (1)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、かつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドと、

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly
Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys 10
Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His
Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro

Asp Ser Asp (7)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、かつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドとを含んでなることを特徴とする免疫測定用試薬である。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の免疫測定用試薬に含まれるポリペプチドとしては、p53遺伝子産物 {Met
Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu
Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp 20
Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val
Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp
Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu
Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp
Glu Ala Pro Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro
Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr
Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp
Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys
Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu
Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser 30
Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn
Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys
Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro
Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala
Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu
Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg
Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro
Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu
Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr
Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu 40
Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr
Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser
Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile
Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser
Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu
Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp
Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys
Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro
Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn
Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys 50

Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln
 Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe
 Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys
 Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly
 Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser
 Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys
 Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp
 Ser Asp (62) } 中に含まれる特定のアミノ酸配列を必須構成単位としてなるポリペプチドである。特定のアミノ酸配列とは、アミノ酸配列(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)又は(7)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であってかつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列である。

10

【0008】

特定のアミノ酸配列中のアミノ酸の個数は、抗原性及び調製等の観点から、8~50が好ましく、さらに好ましくは8~30、特に好ましくは8~20である。

【0009】

特定のアミノ酸配列としては、アミノ酸配列(1)に含まれるアミノ酸配列(A)、アミノ酸配列(2)に含まれるアミノ酸配列(B)、アミノ酸配列(3)に含まれるアミノ酸配列(C)、アミノ酸配列(4)に含まれるアミノ酸配列(D)、アミノ酸配列(5)に含まれるアミノ酸配列(E)、アミノ酸配列(6)に含まれるアミノ酸配列(F)、及びアミノ酸配列(7)に含まれるアミノ酸配列(G)が含まれる。

20

アミノ酸配列(1)に含まれるアミノ酸配列(A)としては、Ser Asp Pro
 Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr
 Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu
 Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln
 Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
 Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr (1)、Ser Asp P
 ro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser (8)、Gln Glu
 Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu (9)、Leu
 Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu (10)、
 Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu (30
 11)、Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe
 Thr (12)、Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro
 Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp
 Lys Leu (13)、Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
 Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
 Ser Pro Leu (14)、Leu Pro Glu Asn Asn Val
 Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp
 Asp Leu Met Leu (15)、Pro Ser Gln Ala Met A
 sp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile G
 lu Gln Trp Phe Thr (16)、Glu Pro Pro Leu S
 er Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys L
 eu (17)、及び Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
 Asp Ile (18) 等が挙げられる。

30

40

これらのうち、アミノ酸配列(17)及び(18)が好ましい。

【00010】

アミノ酸配列(2)に含まれるアミノ酸配列(B)としては、Thr Pro Ala
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu
 Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr
 Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg (2)、Thr Pro A
 la Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser (19)、Trp Pr

50

o Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln (20)、Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg (21)、Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser (22)、Ser Trp Pro Leu Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg (23)、Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser (24)、及び Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr (25) 等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列 (24) 及び (25) が好ましい。

10

【0011】

アミノ酸配列 (3) に含まれるアミノ酸配列 (C) としては、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys (3)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr (26)、Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys (27)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro (28)、Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys (29)、及び Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr (30) 等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列 (30) が好ましい。

20

【0012】

アミノ酸配列 (4) に含まれるアミノ酸配列 (D) としては、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr (4)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn (31)、Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr (32)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg (33)、Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr (34)、及び Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val (35) 等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列 (35) が好ましい。

30

【0013】

アミノ酸配列 (5) に含まれるアミノ酸配列 (E) としては、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (5)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly (36)、Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile (37)、Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu (38)、Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (39)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro (40)、Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser (41)、Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu (42)、Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (43)

40

50

)、Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg
Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu
(44)、及びAsn Ser Phe Glu Val His Val Cys A
la Cys Pro(45)等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列(44)及び(45)が好ましい。

【0014】

アミノ酸配列(6)に含まれるアミノ酸配列(F)としては、Glu Glu Asn
Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu
Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu
Pro Asn(6)、Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys G 10
ly Glu Pro His(46)、His Glu Leu Pro Pro G
ly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn(47)、G
lu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro(4
8)、Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro G
ly(49)、Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala L
eu Pro Asn(50)、及びGly Glu Pro His His Glu
Leu Pro Pro Gly Ser(51)等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列(51)が好ましい。

【0015】

アミノ酸配列(7)に含まれるアミノ酸配列(G)としては、Lys Asp Ala 20
Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg
Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys
Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu
Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp(
7)、Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro G
ly(52)、Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His L
eu Lys(53)、Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr S
er Arg His(54)、Lys Lys Leu Met Phe Lys T
hr Glu Gly Pro Asp Ser Asp(55)、Lys Asp A
la Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser A 30
rg Ala(56)、Ser Arg Ala His Ser Ser His L
eu Lys Ser Lys Lys Gly Gln(57)、Lys Gly G
ln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met P
he(58)、Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro A
sp Ser Asp(59)、Gly Lys Glu Pro Gly Gly S
er Arg Ala His(60)、Ser Lys Lys Gly Gln S
er Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe(6
1)等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列(60)及び(61)が好ましい。

【0016】

これらの特定のアミノ酸配列のうち、自己抗体との反応性(特異性及び感度)等の観点から、アミノ酸配列(A)及びアミノ酸配列(G)が好ましく、さらに好ましくはアミノ酸配列(1)、(7)、(13)、(16)、(17)、(18)、(52)、(53)、(54)(55)、(56)、(58)、(60)及び(61)、特に好ましくはアミノ酸配列(17)、(18)、(60)及び(61)である。

【0017】

そして、ポリペプチドには、ポリペプチド1分子あたりに、これらの特定のアミノ酸配列の少なくとも1種を含んでいればよく、2種以上を同時に含んでもよい。また、ポリペプチド1分子あたりに、これらの特定のアミノ酸配列の繰り返し配列(重合体)を含んでもよい。

40

30

50

ポリペプチドとしては、アミノ酸配列(1)～(61)からなる群より選ばれる少なくとも1種を含んでなるポリペプチド及びこれらの繰り返し配列(重合体)を含んでなるポリペプチド等が含まれる。

これらのうち、アミノ酸配列(1)～(61)からなる群より選ばれる少なくとも1種を含んでなるポリペプチドが好ましく、さらに好ましくはアミノ酸配列(1)～(61)のいずれか1種を含むポリペプチドである。

【0018】

ポリペプチドは、これらの特定のアミノ酸配列のみから構成されていてもよく、さらにN末端及び/又はC末端にビオチン、チオグリコール酸、及び/又はリンカーとして用いるアミノ酸(システイン、リジン、チロシン、グルタミン酸及びアスパラギン酸等)等が含まれていてもよい。また、さらにN末端が無水酢酸、N-アセチルイミダゾール等でアセチル化されていてもよく、C末端が水溶性カルボジイミド(例えば、1-エチル-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩)、イソオキサゾリウム(例えば、N-メチル-5-フェニルイソオキサゾリウムフルオロボレート)等でアミド化されていてもよい。ビオチン又はチオグリコール酸で修飾されていることが好ましく、さらに好ましくはポリペプチドを水不溶性担体と結合する場合の簡便性からビオチンで修飾されていることである。又、これらの修飾は組み合わせて用いることもできる。

10

N末端及び/又はC末端にアミノ酸を含む場合、このアミノ酸の個数は、N末端又はC末端当たり、1～5が好ましく、さらに好ましくは1～3、特に好ましくは1～2である。N末端及び/又はC末端にビオチン及び/又はチオグリコール酸を含む場合、ビオチン又はチオグリコール酸の個数はポリペプチド当たり1～5が好ましく、さらに好ましくは1～3、特に好ましくは1～2である。

20

【0019】

ポリペプチドを構成するアミノ酸の個数は、10以上が好ましく、さらに好ましくは11以上、特に好ましくは13以上、最も好ましくは15以上であり、また、50以下が好ましく、さらに好ましくは40以下、特に好ましくは30以下、最も好ましくは25以下である。

【0020】

ポリペプチドは、従来公知の遺伝子組み換え法、又はペプチド合成法等で作成できる。遺伝子組み換え法は、比較的アミノ酸数の多いポリペプチドを容易に作成できるというメリットがあるけれど、宿主由来の狭雑蛋白が存在すること、ポリペプチドが融合蛋白として生産される点で、検体との非特異的反応を生じやすいというデメリットがある。従って、これらの方法のうち、ペプチド合成法が好ましい。

30

遺伝子組み換え法としては、SV40ウイルス、E1アデノウイルス、E6パピローマウイルス等をヒト線維芽細胞等の細胞に導入した後、トランスフォーマントから抽出したmRNAからcDNAを作製し、これをPCR法によって増幅した後制限酵素で切断し、断片をベクターに組み込み、得られた発現ベクターで大腸菌等の宿主を形質転換し、必要あれば誘導処理した後、宿主を培養し、菌体溶解物から目的とする融合蛋白質を抽出し、精製する。このようにして、ポリペプチドを含む融合蛋白質を作成できる(例えば、生化学実験法45「組み換えタンパク質生産法」, 学会出版センター社, 2001年)。又、p53遺伝子配列から目的のポリペプチドに該当する遺伝子配列をDNA合成機で合成した後、ベクターに組み込むことで、同様にポリペプチドを作成できる。

40

【0021】

ペプチド合成法は、溶液中でも、あるいは固体支持体上でも達成できるが固相支持体を用いた固相合成法が好ましく、さらに好ましくは自動ペプチド合成機を用いた固相合成法である。ポリペプチド合成法は、一般に、t-ブチルオキシカルボニル(BOC基)又は9-フルオレニルメトキシ-カルボニル(Fmoc基)で保護された活性化アミノ酸を使用する。その他、具体的な合成操作、側鎖保護の種類、および切断法等は、例えば、ソリッドフェーズペプタイドシンセシス第2版、ピースケミカル社、1984(Stewart及びYoung, "Solid Phase Peptide Synthesis

50

is”，第2版，Pierce Chemical Company，1984）、及びソリッド フェーズ ペプチド シンセシス、アイ アール エル社、1989（Atherton及びSheppard，“Solid Phase Peptide Synthesis”，IRL Press，1989）に詳細に記述されている。

【0022】

本発明の免疫測定用試薬は、このようなポリペプチドの少なくとも1種を含んでいればよいが、2種以上のポリペプチドを含んでいることが、自己抗体との反応性（特異性及び感度）がより高くなる点で好ましい。さらに好ましくはアミノ酸配列（A）を含むポリペプチドとアミノ酸配列（G）とを含むポリペプチドを含むことであり、特に好ましくはアミノ酸配列（A）を含むポリペプチド及びアミノ酸配列（G）を含むポリペプチドに加え、アミノ酸配列（B）～（F）のうち少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むこと、最も好ましくはアミノ酸配列（A）～（G）のいずれかを含むポリペプチドをそれぞれ1個ずつ含むことである。

10

【0023】

本発明の免疫測定用試薬の好ましいポリペプチドの組合せ例としては、例えば、次の組合せが例示できる。なお、カッコ内の数字は、アミノ酸配列番号に対応しており、そのアミノ酸配列からなるポリペプチドを表す。すなわち、（1）+（7）は、アミノ酸配列（1）からなるポリペプチドとアミノ酸配列（7）からなるポリペプチドとの組合せを表す。（1）+（7）、（17）+（60）、（18）+（61）、（17）+（61）、（17）+（18）+（60）+（61）、（1）+（7）+（2）、（1）+（7）+（24）+（25）、（1）+（7）+（3）、（1）+（7）+（30）、（1）+（7）+（4）、（1）+（7）+（35）、（1）+（7）+（5）、（1）+（7）+（44）+（45）、（1）+（7）+（6）、（1）+（7）+（51）、（1）+（7）+（2）+（3）、（1）+（7）+（2）+（4）、（1）+（7）+（2）+（5）、（1）+（7）+（2）+（6）、（1）+（7）+（3）+（4）、（1）+（7）+（3）+（5）、（1）+（7）+（3）+（6）、（1）+（7）+（4）+（5）、（1）+（7）+（4）+（6）、（1）+（7）+（5）+（6）、（1）+（7）+（2）+（3）+（4）、（1）+（7）+（2）+（3）+（5）、（1）+（7）+（2）+（3）+（6）、（1）+（7）+（3）+（4）+（5）、（1）+（7）+（3）+（4）+（6）、（1）+（7）+（4）+（5）+（6）、（1）+（7）+（2）+（4）+（5）、（1）+（7）+（2）+（4）+（6）、（1）+（7）+（2）+（5）+（6）、（1）+（7）+（3）+（5）+（6）、（1）+（7）+（2）+（3）+（4）+（5）、（1）+（7）+（3）+（4）+（5）+（6）、（1）+（7）+（2）+（4）+（5）+（6）、（1）+（7）+（2）+（3）+（5）+（6）、（1）+（7）+（2）+（3）+（4）+（5）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（3）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（4）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（5）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（3）+（4）、（17）+（18）+（60）+（61）+（3）+（5）、（17）+（18）+（60）+（61）+（3）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（4）+（5）、（17）+（18）+（60）+（61）+（4）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（5）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（3）+（4）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（3）+（5）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（3）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（3）+（4）+（5）、（17）+（18）+（60）+（61）+（3）+（4）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（4）+（5）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（4）+（5）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（4）+（6）、（17）+（18）+（60）+（61）+（2）+（5）+（6）、（17）+（18）+（

20

30

40

50

エポキシ樹脂、フェノール樹脂、絹、フィブロイン、リグニン、ヘミセルロース、キチン、エポナイト、ゴム、ガラス、石英、シリコン及びセラミックス等が挙げられる。これらのうち、ポリスチレン、ガラス、石英及びシリコンが好ましく、さらに好ましくはポリスチレン及びガラス、特に好ましくはガラスである。

【0026】

水不溶性担体の形状は、使用する目的に合わせて自由に決定でき、真球状や円盤状のビーズ、板状や棒状のスティック、試験管、及び不織布やフィルターのストリップ（短冊状の細片）、微粒子等が挙げられる。これらのうち、ビーズ及び微粒子が好ましく、さらに好ましくは真球状のビーズである。

【0027】

水不溶性担体の大きさは、使用する目的に合わせて自由に決定できるが、通常は内径4～10mm、深さ10～20mm程度の反応容器に投入できる大きさである（水不溶性担体が試験管の場合を除く。）。真球状ビーズの場合、直径（mm）は1～10が好ましく、さらに好ましくは2～8、特に好ましくは3～7である。円盤状ビーズの場合、直径（mm）は1～10が好ましく、さらに好ましくは2～8、特に好ましくは3～7であり、厚さは（mm）は0.1～5が好ましく、さらに好ましくは0.2～2、特に好ましくは0.3～1である。スティックの場合、長さ（mm）は2～10が好ましく、さらに好ましくは3～8、特に好ましくは4～7である。また、スティックの断面積（ mm^2 ）は1～25が好ましく、さらに好ましくは2～16、特に好ましくは3～9である。なお、断面積とは、長軸方向に対して垂直に切断した際の切断部分の断面積を意味する。試験管の場合、長さ（mm）は5～100が好ましく、さらに好ましくは8～80、特に好ましくは10～20である。また、試験管の内径（mm）は、5～20が好ましく、さらに好ましくは6～16、特に好ましくは8～12である。ストリップの場合、長さ（mm）は、5～100が好ましく、さらに好ましくは10～80、特に好ましくは10～50である。また、ストリップの幅（mm）は、1～20が好ましく、さらに好ましくは2～16、特に好ましくは3～10である。厚さは（mm）は0.1～2が好ましく、さらに好ましくは0.1～0.5である。不織布やフィルターの平均孔径（ μm ）は、0.1～10が好ましく、さらに好ましくは0.3～5である。微粒子の場合、平均粒子径（ μm ）は0.01～200が好ましく、さらに好ましくは0.1～50、特に好ましくは0.2～10である。平均粒子径は、透過型電子顕微鏡法、光学顕微鏡による整列測定法等で測定できる。

【0028】

ポリペプチドを水不溶性担体に結合する方法としては、化学的に結合する方法及び物理吸着による方法の従来公知の方法等で行うことができる。化学的に結合する方法としては、水不溶性担体表面に導入されたアミノ基及びノ又はスルフヒドリル基等の官能基と、ポリペプチドのアミノ基及びノ又はスルフヒドリル基等の官能基とを結合剤（グルタルアルデヒド、サクシナルデヒド、*m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロサクシンイミドエステル及び*o*-フェニレンビスマレイミド等）で架橋する方法（米国特許第4280992号明細書及び同第3652761号明細書等）等が挙げられる。物理吸着による方法としては、水不溶性担体がポリスチレンの場合、ポリペプチドの0.001～0.04%（W/V）炭酸緩衝水溶液（pH9.0）に水不溶性担体を適当時間浸漬する方法（バイオシム・バイオフィズ・アクタ、251巻、427頁、1971年）等が挙げられる。この方法は、担体がポリスチレン以外の物質、例えばポリプロピレン、シリコン、ガラス及びセルロース等にも適用できる。また、ポリペプチドを特異的結合物質（例えば、抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖、相補的遺伝子鎖等）を利用して間接的に水不溶性担体に結合することもできる。例えば、ポリペプチドをビオチンで修飾し、アビジンを結合した水不溶性担体と反応することで、ポリペプチドを水不溶性担体に結合できる。アビジンとしては、卵白由来アビジン及びストレプトアビジン等が使用でき、ストレプトアビジンが好ましい。これら特異的結合物質のうち抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖については例えば、[生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」, 東京

10

20

30

40

50

化学同人社，1989年]に記載のもの、相補的な遺伝子としては公開特許公報平6-186232号に記載の相補的な遺伝子、例えばポリデオキシアデニル酸とポリチミジル酸の組み合わせ等が挙げられる。

【0029】

これらのうち、化学的に結合する方法及び特異的結合物質を用いる方法が好ましく、さらに好ましくは特異的結合物質を用いる方法である。特異的結合物質を用いる方法のうち、アビジン-ビオチン結合を利用した方法である。

【0030】

ポリペプチドは従来免疫測定に使用される緩衝液等に溶解されていてもよい。緩衝液は例えば、リン酸緩衝液及びグッド(Good)の緩衝液等が使用でき、蛋白、塩及びノ又は界面活性剤等を含有していてもよい。蛋白としては、アルブミン(牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、マウス血清アルブミン、オバルブミン、コナルブミン及びラクトアルブミン等)、抗体(正常ウサギIgG及び正常マウスIgG等のポリペプチドとの結合性がない抗体)及びゼラチン等が挙げられる。塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び臭化リチウム等が挙げられる。界面活性剤としては、ソルビタンラウリン酸モノエステルエチレンオキシド付加物(商品名:ツイーン20及びツイーン40、ICIアメリカ社)等のノニオン界面活性剤等が挙げられる。また、ポリペプチドが結合した水不溶性担体は、上述の緩衝液に浸漬した状態でもよいが、ポリペプチドを含む水不溶性担体全体を糖類及び蛋白質でコーティングした後乾燥した状態が好ましい。コーティング・乾燥方法としては、例えば糖類と蛋白質とを含有する溶液中に浸漬したのち乾燥させる方法(特開平09-318628号公報及び特公平5-41946号公報)等が挙げられる。

10

20

【0031】

本発明の免疫測定用試薬キットは、ポリペプチドを含む免疫測定用試薬と共に、抗ヒトイムノグロブリン抗体を含む試薬を含有していることが好ましい。

抗ヒトイムノグロブリン抗体は、従来公知の方法で作成されたものが使用できる。例えば、ヒトイムノグロブリンを適当な動物(例えば、マウス、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ等)に免疫し、得られた抗血清から塩析、イオン交換カラム等で抗体を精製して作成できる。抗ヒトイムノグロブリン抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、また、(Fab')²、Fab'等の抗体断片でもよい。尚、ヒトイムノグロブリンとは、IgG、IgA、IgM等の全てのイムノグロブリンを含むが、通常はIgG及びIgMであり、主にIgGである。

30

【0032】

抗ヒトイムノグロブリン抗体は、標識化合物で標識されていることが好ましい。標識化合物としては従来公知のものが使用でき、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質及び酵素等が用いられる。アイソトープとしては、¹²⁵I等が挙げられ、蛍光物質としてはユーロピウム錯体等が挙げられ、発光物質としてはN-メチルアクリジウムエステル等が挙げられ、酵素としては西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ等が挙げられる。これらの標識化合物のうち、酵素が好ましく、さらに好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ、特に好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼである。

40

【0033】

標識化合物を抗ヒトイムノグロブリン抗体に標識する方法は従来公知の方法等が適用でき、「続生化学実験講座5 免疫生化学実験法」(日本生化学会編、東京化学同人、1986年発行、102~112頁に記載の方法等が用いられ、例えば、次の(1)~(4)の方法等が適用できる。

(1) 標識化合物がアイソトープの場合、クロラミンTを酸化剤として用いて放射性ヨウ素を抗ヒアルロン酸抗体又は配位子のチロシン残基に導入する方法。

(2) 標識化合物が蛍光物質の場合、フルオレセインイソチオシアネートを緩衝液中で抗ヒアルロン酸抗体又は配位子に反応させ、抗ヒアルロン酸抗体又は配位子のリシン残基に結合させる方法。

50

(3) 標識物質が発光物質の場合、商品名「アクリジニウム誘導体 - I」(同人化学研究所社製)を緩衝液中で抗ヒアルロン酸抗体又は配位子に反応させ、抗ヒアルロン酸抗体又は配位子のアミノ基に結合させる方法。

(4) 標識物質が酵素の場合、酵素の持つアミノ基と抗ヒアルロン酸抗体又は配位子の持つチオール基をN - スクシンイミジル - 6 - マレイドヘキサノエート等の二架橋性試薬で結合する方法。

【0034】

本発明の免疫測定用試薬キットには、本発明の免疫測定用試薬を含めば、試薬の剤型及び試薬キットの構成等に制限はなく、例えば、ポリペプチドが、水不溶性担体及び/又は標識化合物と結合したかたちで試薬キットに含まれてもよく、ポリペプチド単独で含まれていてもよい。すなわち本発明の試薬キットは、比濁法、ラテックス凝集法及び比濁法等のホモジニアス免疫測定法にも、不溶性担体を用いたヘテロジニアス免疫測定法にも適用できる。これらのうち、測定感度の点で、標識化合物を標識され抗ヒトイムノグロブリン抗体を含むヘテロジニアスなサンドイッチ免疫測定法用の試薬キットが最も好ましい。すなわち、ペプチドと検体とを反応させるとポリペプチドに対する自己抗体のみが特異的にペプチドと結合する。そこで、抗ヒトイムノグロブリン抗体を加えると、該抗体は自己抗体と結合し、免疫複合体「ポリペプチド - 自己抗体 - 抗ヒトイムノグロブリン抗体」を形成する。この免疫複合体中の抗ヒトイムノグロブリン抗体を定量することで自己抗体量を定量できる。抗ヒトイムノグロブリン抗体量は標識化合物の量を測定することにより定量することができる。

10

20

【0035】

標識化合物の測定は、標識化合物の種類により従来公知の方法等で実施できる。標識化合物が発光物質の場合、例えば適当な波長の励起光の照射によって生じる蛍光量を光電子増倍管により定量する。標識化合物が化学発光物質の場合、例えばアクリジニウムエステルではアルカリ溶液を加えることにより生じる発光量を光電子増倍管により定量する。

【0036】

標識化合物が酵素の場合、適当な基質を反応させることにより酵素活性を吸光度(吸光度測定法)、蛍光量(蛍光量測定法)又は発光量(化学発光量測定法)として測定できる。例えば、酵素がペルオキシダーゼの場合、基質としては2, 2' - アジノ - ビス(3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸)ニアンモニウム(ABTS)(吸光度測定法)及びルミノール/過酸化物質(化学発光量測定法)等を選択できる。酵素がアルカリフォスファターゼの場合、基質としてはp - ニトロフェニルフォスフェート(吸光度測定法)、4 - メチルウンベリフェリルリン酸(4 - MUP)(蛍光量測定法)及び3 - (2' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3' - ホスホリルオキシ)フェニル - 1, 2 - ジオキセタン・ニナトリウム(AMPPD)(化学発光量測定法)等を選択できる。吸光度は分光光度計、蛍光量及び化学発光量は光電子増倍管により定量される。これらのうち、化学発光量測定法が好ましく(すなわち、本発明の試薬キットを用いて自己抗体を定量する方法としては化学発光酵素免疫測定法が好ましい。)、さらに好ましくはペルオキシダーゼとルミノール/過酸化物質との組合せ又はアルカリフォスファターゼとAMPPDとの組み合わせによる化学発光量測定法である。

30

40

【0037】

ルミノールとしては、ルミノール、イソルミノール、N - アミノヘキシル - N - エチルイソルミノール(AHEI)、N - アミノブチル - N - エチルイソルミノール(ABEI)及びこれらの金属塩等が含まれる。これらの金属塩としては、アルカリ金属(ナトリウム及びカリウム等)塩及びアルカリ土類金属(カルシウム及びマグネシウム等)塩等が使用できる。これらのうち、ルミノール及びルミノールの金属塩が好ましく、さらに好ましくはルミノールの金属塩、特に好ましくはルミノールのナトリウム塩である。過酸化物質としては、無機過酸化物質及び有機過酸化物質のいずれも使用できる。無機過酸化物質としては、過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム、過ホウ酸カリウム、過酸化酸、過酸化炭酸、過酸化二炭酸、次亜塩素酸、次亜塩素酸カリウム、亜塩素酸、塩素酸、塩素酸ナトリウム、過塩素酸

50

、過臭素酸、ペルオクソ硫酸及びペルオクソリン酸等が挙げられる。有機過酸化物としては、例えば、過酢酸、過プロピオン酸、ジメチルスルホキシド(DMSO)、トリエチルアミノオキサイド、メチルジエチルアミノオキサイド及び過酸化フタロイル等が挙げられる。これらのうち、保存安定性等の観点から、無機過酸化物が好ましく、さらに好ましくは過酸化水素である。

【0038】

本発明の免疫測定用試薬キットには、ポリペプチドを含む試薬(本発明の免疫測定用試薬)、抗ヒトイムノグロブリンを含む試薬に加えて、さらに反作用緩衝液、B/F分離用緩衝液及びコントロール試料等を含むことができる。反作用緩衝液及びB/F分離用緩衝液としては従来免疫測定に使用される緩衝液等が使用でき、蛋白、塩及び/又は界面活性剤等を含むリン酸緩衝液及びグッド(Good)の緩衝液等が使用できる。蛋白としては、アルブミン(牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、マウス血清アルブミン、オバルブミン、コナルブミン及びラクトアルブミン等)、抗体(正常ウサギIgG及び正常マウスIgG等のp53ポリペプチドとの結合性がない抗体)及びゼラチン等が挙げられる。塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び臭化リチウム等が挙げられる。界面活性剤としては、ソルビタンラウリン酸モノエステルエチレンオキサイド付加物(商品名:ツイーン20及びツイーン40、ICIアメリカ社)等のノニオン界面活性剤等が挙げられる。

10

【0039】

コントロール試料は、検体にp53遺伝子産物に対する自己抗体が存在するかを判断するための比較試料として用いるものであり、通常、自己抗体を含まない試料(陰性コントロール)及び自己抗体を含む試料(陽性コントロール)が用意される。陰性コントロールとしては、免疫反作用緩衝液と同様な蛋白等を含む緩衝液、p53遺伝子産物に対する自己抗体を保有しないヒトプール血清等が使用できる。陽性コントロールとしては、p53遺伝子産物に対する自己抗体を保有するヒトプール血清、免疫反作用緩衝液と同様な蛋白等を含む緩衝液でp53遺伝子産物に対する自己抗体を含む血清を添加したものが使用できる。

20

【0040】

本発明の免疫測定用試薬キットで測定される検体は、ヒト由来の体液であれば特に限定されず、例えば血液、尿、唾液、リンパ液、胆汁、胃液、膵液等が挙げられ、さらに生体から採取された組織のホモジネート抽出液等も用いることができる。このうち好ましいのは血液及び尿であり、より好ましくは、血液(全血、血清、血漿等を含む)である。

30

【0041】

本発明の試薬キットを用いたp53遺伝子産物に対する自己抗体を測定する方法(サンドイッチ測定法)の具体例(工程1~6)を以下に示す。

工程1. 検体と、ポリペプチドの結合した水不溶性担体とを反応させて反応混合物(複合体1を含む)を得る。

工程2. 工程1の反応混合物から未反応物を除き(B/F分離)、複合体1を得る。

工程3. 工程2で得られた複合体1と、標識化合物で標識された抗ヒトイムノグロブリン抗体とを反応させて反応混合物(複合体2を含む)を得る。

40

工程4. 工程3反応混合物から未反応物を除き(B/F分離)、複合体2を得る。

工程5. 複合体2の標識化合物の量を測定する。

工程6. 標識化合物の量を用いて、陰性コントロール及び/又は陽性コントロールと比較し、自己抗体の有無を判定する。

【0042】

検体中のp53遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断する工程(上述の例では工程6)において、検体である血液での抗ヒトイムノグロブリン抗体量(抗ヒトイムノグロブリンに標識された標識化合物量として測定される)と、複数の健常人の血液での抗ヒトイムノグロブリン量(抗ヒトイムノグロブリンに標識された標識化合物量として測定される)から設定される基準値とを比較するで自己抗体の有無を判定することが好ましい。

50

基準値の設定方法は、例えば「臨床検査薬ガイド1999～2000, p64～71、文光堂(1999)」、「臨床検査データブック1997-1998, p8～13, 医学書院(1997)」に記載された方法で行うことができる。すなわち複数の健常人(少なくとも50人以上、好ましくは120人以上)を測定し、標識化合物量を求める(化学発光酵素免疫測定法の場合、発光量となる)。標識化合物量を統計処理{パラメトリック法、ノンパラメトリック法等[パラメトリック法は母集団が正規分布(べき乗変換しても可)を示す場合に使用し、ノンパラメトリック法は母集団が正規分布しない場合に使用される。]}し、標本群の95%を含む範囲を求める基準範囲とし、上限を上限基準値、下限を下限基準値と設定する。従って、上限基準値を越えた検体については自己抗体を有する可能性が高いが、5%の確率で健常人でも越える場合がある。これを防ぐため、通常は上限基準値にさらに係数を乗じ、及び/又は付加したカットオフ値を設定することが行われる。すなわちカットオフ値を超えた検体を自己抗体が有るものとして判定する。カットオフ値の設定は、上限基準値とp53遺伝子産物に対する自己抗体を有する検体の分布下限の値との関係で設定するが、通常は上限基準値の1.5～3倍程度の値である。

10

【0043】

上述の陰性コントロール及び陽性コントロールは、設定したカットオフ値を簡易に再現できるように調製したものである。例えば、陰性コントロールの測定値(標識化合物量)の3倍がカットオフ値となる、陰性コントロールと陽性コントロールの平均値がカットオフ値となる等、の設定が可能である。

【0044】

20

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0045】

<合成例1>

1. ポリペプチドの合成

エチレンジアミンで官能化しそれに酸不安定リンカー{4-(2',4'-ジメチルオキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシ酢酸}をカップリングさせたペプシンKポリアミド-キーゼルグアー樹脂(Pepsyn K polyamide-Kesellguhr resin: Milligen, Novato, カリフォルニア)を固相として、表1に示したポリペプチドをテトラヘドロンレター(Rink, tetrahedron Lett. (1987) 28: 3787)に記載された化学合成法により合成した。

30

【0046】

なお、1 側鎖のw-アミノ基はBocにより保護し、-アミノ基はFmocで保護した。

2 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基によりアルギニンのグアニジノ基を保護した。

3 ヒスチジンのイミダゾリル基をBoc又はトリチル基で保護し、システインのスルフヒドリル基をトリチル基で保護した。

40

4 ペプチドの延長反応は、ジソプロピルカルボジイミドを用いてヒドロキシベンゾトリアゾールエステル形成することによりカップリングを行うアルギニンの場合を除いて、付加するアミノ酸のカルボキシル基を活性化し形成させたO-ペンタフルオロフェニルエステル類とペプチドの-アミノ基をカップリングすることにより実行した。

5 すべてのペプチドのN末端を酢酸無水物でN-アセチル化した。

6 すべての合成をミリゲン9050ペプシンセサイザー(Milligen 9050 PepSynthesizer: Novato, カリフォルニア)(連続フロー法)を用いて行った。

7 補集剤(アニソール及び1,2-エタンジチオール)の存在下でトリフルオロ酢酸を用いて、固相とポリペプチドとを切断し、ジエチルエーテルで抽出し粗合成ポリペプチ

50

ドを得た。

8 これらの粗合成ポリペプチドをC18-逆相クロマトグラフィーカラム(YMC-Hydrosphere C18 20×150、ワイエムシィ社製で精製{溶出液はA:水/TFA(体積比:100/0.1)とB:アセトニトリル/TFA(体積比:100/0.1)のグラジエント(Bの割合として0~40体積%)、流速1.0mL/mL、温度37、検出は220nmの波長を使用。}後、凍結乾燥して、表1の合成ポリペプチドP1~P11を得た。

【0047】

【表1】

合成ポリペプチド	合成ポリペプチドを構成するアミノ酸配列
P1	Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu (17)
P2	Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile (18)
P3	Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser (24)
P4	Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr (25)
P5	Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr (30)
P6	Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val (35)
P7	Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu (44)
P8	Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro (45)
P9	Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser (51)
P10	Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His (60)
P11	Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe (61)

10

20

30

【0048】

2. 合成ポリペプチドへのビオチンによる修飾

合成ポリペプチドP1の1重量部とビオチン残基導入試薬(商品名[Biotin Sulfo-OSu]、株式会社同仁化学研究所)1重量部を炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH7.5)1000重量部に溶解し、30で2時間、静置反応した。反応溶液をC18-逆相クロマトグラフィーで精製し、ビオチン結合ポリペプチドP1(PB-1)を作成した。P2~P11についても同様にしてビオチン結合ポリペプチド(PB-2~PB-11)を作成した。

40

【0049】

<実施例1>

1. 合成ポリペプチド結合ビーズの作成

(1) アビジン結合ビーズの作成

ストレプトアビジン(ロシュダイアグノティクス株式会社より購入)をpH9の0.1M炭酸緩衝液に20μg/mLの濃度で溶解した。この溶液20mLに、直径3.2mmのポリスチレンビーズ(イムノケミカル社製)1000個を加え、2~10で48時間静置させて、ポリスチレンビーズにストレプトアビジンを物理吸着させた。その後、溶液をアスピレーターで吸引除去し、20mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝

50

液 (pH 7.2) でビーズを2回洗浄し、アビジン結合ビーズを調製した。このアビジン結合ビーズを再度50 mLの0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液に浸漬し、浸漬状態で冷蔵(2~10)保存した。

【0050】

(2) p53ポリペプチド結合ビーズ(PBビーズ)の作成

浸漬液をアスピレーターで除いたアビジン結合ビーズ1000個を、合成ポリペプチドPB1を2 µg/mLの濃度で含むリン酸緩衝水溶液(0.02 M, pH 7.0) 20 mLに加え、4~10 で24時間反応(2時間に1回転倒攪拌)した。その後、緩衝水溶液をアスピレーターで吸引除去し、20 mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH 7.2)でビーズを2回洗浄した後、10重量%のショ糖を含むリン酸緩衝液(pH 7.2)に30分間浸漬後、リン酸緩衝液をアスピレーターで除き、ビーズをろ紙上に撒き室温(約25)で風乾し、合成ポリペプチド結合ビーズ(PB1ビーズ)を調整し、乾燥剤(シリカゲル)を入れた密閉容器中で冷蔵保存した。

10

【0051】

2. 免疫反作用緩衝液の作成

0.02 Mのリン酸緩衝液(pH 8.0)に、カゼインを3 g/L及び塩化ナトリウムを8.5 g/Lの濃度になるように添加し、免疫反作用緩衝液を作成した。使用時まで冷蔵保存した。

【0052】

3. ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体の作成

抗ヒトイムノグロブリンポリクローナル抗体(ダコジャパン(株)製)及び西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(東洋紡(株)製)を用い、文献[エス・ヨシタケ、エム・イマガワ、イー・イシカワ、エトール; ジェイ・パイオケム, Vol. 92 (1982) 1413-1424]に記載の方法でペルオキシダーゼ標識抗 2 - マイクログロブリンポリクローナル抗体を調製し、冷凍(-30)保存した。

20

【0053】

4. 酵素標識抗体液の作成

上記で作成した免疫反作用緩衝液及びペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いて次の通り酵素標識抗体液を作成した。すなわち、免疫反作用緩衝液100 mLにペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を蛋白量で100 µg添加し、攪拌混合し、これを酵素標識抗体液とした。

30

【0054】

5. 過酸化水素液の調製

200 µLの35%過酸化水素水を脱イオン水1リットルに溶解し、過酸化水素水とした。使用するまで冷蔵保存した。

【0055】

6. 基質液の調製

ルミノール(東京化成製)0.18 g及び4-(シアノメチルチオ)フェノール0.1 g(三新化学製)を0.1 M(モル/L)、pH 8.5のトリス/塩酸緩衝液1リットルに溶解した。使用するまで遮光、冷蔵保存した。

40

【0056】

<実施例2~18>

1. 合成ポリペプチド結合ビーズの作成

実施例1と同様にして、表2及び3に示した実施例2~18の合成ポリペプチド結合ビーズを調整し、乾燥剤(シリカゲル)を入れた密閉容器中で冷蔵保存した。尚、複数の合成ポリペプチドを組み合わせて使用する場合(実施例12~18)、各合成ポリペプチドの量は同じとし、総量が2 µg/mLになるようにした。

【0057】

また、免疫反作用緩衝液、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体、酵素標識抗体液、過酸化水素液及び基質液は、実施例1で作成したものをを用いた。

50

【0058】

<比較例1> GST融合p53蛋白質の作製

特開平9-229933号公報に記載の方法に準じて、4種類の蛋白質、すなわち、p53遺伝子のN末端からのアミノ酸配列が1-112のペプチド、108-310ペプチド、306-393ペプチド、1-393ペプチドとGST(グルタチオンSトランスフェラーゼ)との各融合蛋白質を以下の通り作製した。

【0059】

1. p53遺伝子の調製

ヒト線維芽細胞WI-38のSV40トランスフォーマントであるWI-38VA13よりRNAを抽出した。抽出は、AGPC法を用いて、次のようにして行った。

10

【0060】

(AGPC法試薬の調製)

(1) 1M クエン酸ナトリウム(pH7.0)の調製

クエン酸三ナトリウムの29.4gを蒸留水80mlに溶解した後、クエン酸を加えて、pH7.0にあわせた後、水を加えて100mlとした。そして、オートクレーブ(120、20分)してから使用した。

(2) D液の調製

GTC(グアニジウムチオシアネート)236.3g(4M)、ザルコシル 2.5g(0.8重量%)、1M クエン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 12.5ml(25mM)及び蒸留水250mlを85℃で加温溶解した後、室温に戻し、水で496mlにあわせた。細孔径0.45µmボルトトップフィルターで濾過して保存した。使用時にこの保存溶液50mlに対して2-メルカプトエタノール360µl(0.1M)を加え、D液とした。

20

(3) 2M 酢酸ナトリウム(pH4.0)の調製

酢酸ナトリウム トリハイドレート 27.2gを蒸留水10mlに溶解させた後、酢酸を用いてpH4.0にあわせ、蒸留水を加えて100mlとした。細孔径0.45µmボルトトップフィルターで濾過して使用した。

【0061】

(AGPC法の操作)

(1) チューブにD液0.5mlを加え、WI-38VA13細胞(大日本製薬株式会社より購入)を分散し、細胞を破壊した。

30

(2) さらに、2M 酢酸ナトリウム 50µl、フェノール 0.5ml及びクロロホルム/イソamilアルコール(体積比49/1) 100µlを順次加え、1種類いれるごとに、チューブを2~3回振り、混ぜた。

(3) 10秒間激しく混ぜた後、15分間氷冷した。

(4) 遠心加速度10,000Gで10、20分間遠心した後、下部に分離した水層を、DNAを含む中間層が混入しないように、別のチューブに分取した。

(5) 分取した水層に、イソプロパノール0.5mlを加え、-20℃で1時間冷やした。次に、10分間遠心(10,000G、0)し、RNAを沈殿させた。

(6) 沈殿したRNAを0.5mlのD液に再び溶解し、イソプロパノール0.5mlを加え、-20℃で1時間置く。

40

(7) 遠心してRNAを沈殿させ、沈殿を80重量%エタノール水溶液1mLで洗い、乾燥させた後、水に溶解する。

【0062】

このようにして抽出したmRNAから、次の反応条件にて、Reverse Transcriptase(RT)反応によりcDNAを作成した。RT反応は、GIBCO/BR LのReverse Transcriptase(商品名 Superscript)を使用した。反応組成は次のとおりである。50mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン/塩酸緩衝液(pH8.3)、75mM塩化カリウム水溶液、3mM塩化マグネシウム水溶液、10mM dNTP(デオキシリボヌクレオシド 5'-トリフォスフェ

50

ート混合物)、7.5 µg/mlのランダムノナー(シグマ社から購入)、RNasein(プロメガ社、RNaseインヒビター)を1000U/ml、RNaseH-(リバーストランスクリプターゼ)を200,000U/ml。

【0063】

2. 組み換え遺伝子の作成及び発現

作成したcDNAを制限酵素BamHIの認識配列を5'末端に有するPCRprimerにて増幅後、BamHIにて消化し、pGEX-5X-2ベクターのBamHI部位に組み込んだ。シーケンス法にてインサートが正しく組み込まれていることを確認した後、大腸菌BL21(DE3), LysS(Novagen社)にトランスフォーム後、0.1mMのイソプロピルチオベータガラクトシド(IPTG)にて37、2時間あるいは25、6時間誘導をかけた。大腸菌の細胞ライゼイトより目的の融合蛋白質をグルタチオンセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィー法にて抽出、精製し、GST融合p53蛋白質(GST1[アミノ酸配列1-112を含む]、GST2[アミノ酸配列108-310を含む]、GST3[アミノ酸配列306-393を含む]、GST4[アミノ酸配列1-393を含む])を得た。

【0064】

1. GST融合p53蛋白質結合ビーズ(GSTビーズ)の作成

実施例1のアビジン結合ビーズの作成に準じて作成した。すなわち、GST融合p53蛋白質GST1をpH9の0.1M炭酸緩衝液に20µg/mlの濃度で溶解した。直径3.2mmのポリスチレンビーズ(イムノケミカル社製)1000個をこの溶液20mlに加え、2~10で48時間静置させて、ポリスチレンビーズにGST1を物理吸着させた。その後、溶液をアスピレーターで吸引除去し、20mlの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH7.2)でビーズを2回洗浄した後、20mlの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH7.2)に浸漬して24時間冷蔵で放置した。浸漬液をアスピレーターで吸引除去し、20mlの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH7.2)でビーズを2回洗浄した後、10重量%のショ糖を含むリン酸緩衝液に浸漬後、液をアスピレーターで除き、ビーズをろ紙上に撒き室温で風乾し、GST1結合ビーズ(GST1ビーズ)とし、乾燥剤(シリカゲル)を入れた密閉容器中で冷蔵保存した。

【0065】

<比較例2~5>

1. GST融合p53蛋白質結合ビーズの作成

比較例1と同様にして、表3に示した比較例2~5のGST融合p53蛋白質結合ビーズを調整し、乾燥剤(シリカゲル)を入れた密閉容器中で冷蔵保存した。

尚、複数のGST融合p53蛋白質を組み合わせて使用する場合(比較例5)、各GSTの量は同じとし、総量が20µg/mlになるようにした。

2. その他試薬の作成

免疫反作用緩衝液、酵素標識抗体液、過酸化水素液及び基質液、は実施例1で作成したものをを用いた。

【0066】

<実施例19>

健常人プール血清及び癌患者血清を測定した例である。

1. 検体

当社ボランティア50名から採取した血清を各0.2mlずつ混合し、健常人プール血清10mlを作成し、又、癌患者から得た血清(患者1~3)を各10mlを用意し検体として用いた。

【0067】

2. 免疫反応操作

12x75mm試験管中に、免疫測定用緩衝液300µL、検体(健常人プール血清又は癌患者血清)10µL、及びPBビーズ又GSTビーズ1個を加え、37で、10分間

10

20

30

40

50

反応させた。反応液をアスピレーターで除去した後、生理食塩水 2 mL を加てビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水 2 mL を加え同様に洗浄した。次に、酵素標識抗体液 300 μ L を、洗浄後のビーズに加え 37、10 分反応させた。反応液をアスピレーターで除去し、生理食塩水 2 mL を加えビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水 2 mL を加え同様に 2 回洗浄した。洗浄後のビーズについて、酵素活性の測定を行った。

【0068】

3. 酵素活性測定操作

洗浄後のビーズが入った試験管 (12 × 75 mm) をアロカ社製ルミネッセンスリーダー BLR - 201 型のサンプルホルダーにセットし、基質液 200 μ L 及び過酸化水素水 200 μ L を加え化学発光反応を開始した。発光反応開始 40 秒後から 10 秒間の発光量を積算計測し、これを酵素活性を示す発光量とした。なお、表 2 及び 3 中の数値は、上段が発光量を示し、下段は健常人プール血清の発光量を 1.0 としたときの各発光量の相対値である。

10

【0069】

【表 2】

		合成ポリペプチド又は GST融合p53蛋白質	発光量 (cps)			
			健常人 プール 血清	患者1 血清	患者2 血清	患者3 血清
実	1	PB1	2345 1.0	8641 3.7	21670 9.2	30794 13.1
	2	PB2	2365 1.0	7642 3.2	18624 7.9	24367 10.3
	3	PB3	1867 1.0	2364 1.3	3246 1.7	9864 5.3
	4	PB4	2736 1.0	7597 2.8	3987 1.5	13678 5.0
	5	PB5	2104 1.0	2698 1.3	9760 4.6	16073 7.6
施	6	PB6	1967 1.0	3090 1.6	10347 5.3	14062 7.1
	7	PB7	1730 1.0	2980 1.7	15687 9.1	12068 7.0
例	8	PB8	2439 1.0	6345 2.6	16781 6.9	3408 1.4
	9	PB9	2467 1.0	3601 1.5	3974 1.6	8634 3.5
	10	PB10	1971 1.0	9680 4.9	26341 13.4	28640 14.5
	11	PB11	1868 1.0	5607 3.0	19790 10.6	24674 13.2
	12	PB1,PB2,PB10,PB11	2261 1.0	18690 8.3	39645 17.5	56971 25.2

10

20

30

【表 3】

		合成ポリペプチド又は GST融合p53蛋白質	発光量 (cps)			
			健常人 プール 血清	患者1 血清	患者2 血清	患者3 血清
実 施 例	13	PB1,PB2,PB10,PB11,PB3,PB4	2100 1.0	21067 10.0	40684 19.4	64394 30.7
	14	PB1,PB2,PB10,PB11,PB5	2468 1.0	17964 7.3	42063 17.0	73620 29.8
	15	PB1,PB2,PB10,PB11,PB6	2179 1.0	18304 8.4	44091 20.2	72694 33.4
	16	PB1,PB2,PB10,PB11,PB7,PB8	2069 1.0	21096 10.2	46803 22.6	70678 34.2
	17	PB1,PB2,PB10,PB11,PB9	2542 1.0	18063 7.1	40640 16.0	60117 23.6
	18	PB1,PB2,PB10,PB11,PB3,PB4 ,PB5,PB6,PB7,PB8,PB9	2406 1.0	26784 11.1	52310 21.7	89672 37.3
比 較 例	1	GST1	5863 1.0	17936 3.1	41367 7.1	61670 10.5
	2	GST2	7306 1.0	10631 1.5	24304 3.3	30973 4.2
	3	GST3	6431 1.0	18679 2.9	36219 5.6	43679 6.8
	4	GST4	8034 1.0	18634 2.3	40607 5.1	53724 6.7
	5	GST1,GST2,GST3	6246 1.0	19682 3.2	43064 6.9	63713 10.2

10

20

30

【0070】

4. 測定結果

結果を表2及び3に示した。実施例では比較例に比べ、健常人プール血清の発光量が低く、発光量比（表中下段の数値で、各測定発光量を健常人プール血清の測定発光量で除した値）が大きいことが判る。又、患者血清では個別のPBに対して反応性が低い場合があっても、複数のPBを組み合わせることにより感度が向上することが判る。

40

【0071】

<実施例20>

複数の健常人血清を測定して基準値を求め、カットオフ値を設定し、癌患者10名からの血清を測定し、p53遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断した例である。

【0072】

1. 検体の測定

実施例18で調整した合成ポリペプチド結合ビーズ（固相化PB1, PB2, PB10, PB11, PB3, PB4, PB5, PB6, PB7, PB8, PB9）及び比較例5で

50

作成した GST 融合 p 5 3 蛋白質結合ビーズ (固相化 GST 1 , GST 2 , GST 3) を用いて、実施例 1 9 の方法で、健常人ボランティア 1 2 0 名からの血清検体及び実施例 1 9 の健常人プール血清を測定した。

健常人ボランティア 1 2 0 名の測定値 (発光量) の分布を図 1 (実施例 1 8) 及び 2 (比較例 5) に示した。図 1 の通り実施例 1 8 の合成ポリペプチド結合ビーズでは発光量が低く、分布の範囲も狭いが、比較例 5 の GST 融合 p 5 3 蛋白質結合ビーズ (図 2) では発光量が高く、分布の範囲も広いことが判った。なお、図の横軸は発光量 (cps) であり、点は検体の分布 (1 点が 1 検体に対応) を示す。

【 0 0 7 3 】

2 . カットオフ値の設定

健常人の測定値 (発光量) を統計処理ソフト「STATFLEX v . 4 . 1」(アーテック社製)を用いて分布型を解析した結果、実施例 1 8 の合成ポリペプチド結合ビーズについての発光量分布は、歪度 1 . 4 9、尖度 4 . 9 0 であるのに対して、比較例 5 の GST 融合 p 5 3 蛋白質結合ビーズについての発光量分布は、歪度 1 . 9 8、尖度 7 . 2 4 であった。なお、いずれの分布も正規分布していなかった。ノンパラメトリック法で 9 5 % の信頼区間を求めたところ、実施例 1 8 の合成ポリペプチド結合ビーズについての基準値は、発光量 1 2 4 5 ~ 9 3 9 7 であったのに対して、比較例 5 の GST 融合 p 5 3 蛋白質結合ビーズについての基準値は、発光量 3 7 7 1 ~ 1 7 5 3 0 であった。ここで上限発光量の 1 . 5 倍の発光量をカットオフ値と設定すると、実施例 1 8 について発光量 1 4 0 9 5、比較例 5 について発光量 2 6 2 9 4 であった。この時、実施例 1 8 についての健常人 20 プール血清の発光量は 2 4 0 6 であり、カットオフ値の 1 / 5 . 8 6 であり、比較例 5 についての健常人プール血清の発光量は 6 2 4 6 であり、カットオフ値の 1 / 4 . 2 1 であった。従って、健常人プール血清を、陰性コントロールとして測定した場合、実施例 1 8 の合成ポリペプチド結合ビーズではカットオフ値 = 「健常人プール血清測定発光量」× 5 . 8 6 と設定され、一方、比較例 5 の GST 融合 p 5 3 蛋白質結合ビーズではカットオフ値 = 「健常人プール血清測定発光量」× 4 . 2 1 と設定された。

【 0 0 7 4 】

3 . 検体の測定

表 4 記載の癌患者 1 0 名 (患者 4 ~ 1 3) から採取した血清検体及び陰性コントロールとして実施例 1 9 で作成した健常人プール血清を測定した。測定は、実施例 1 8 の合成ポリ 30 ペプチド結合ビーズ、及び比較例 5 の GST 融合 p 5 3 蛋白質結合ビーズを用いて実施例 1 9 と同様に行なった。

4 . 判定結果

健常人プール血清を陰性コントロールとし、実施例 2 0 で設定し係数でカットオフ値 (「健常人プール血清測定発光量」×係数) を求めた。カットオフ値以上 (カットオフ比 1 . 0 以上) の測定値を自己抗体陽性、カットオフ値未満 (カットオフ比 1 . 0 未満) の測定値を自己抗体陰性と判断した。結果を表 4 に示した。

【 0 0 7 5 】

【表 4】

検体	実施例18の合成ポリペプチド結合ビーズ			比較例5のGST融合p53蛋白質結合ビーズ		
	発光量 (cps)	カットオフ比	判定	発光量 (cps)	カットオフ比	判定
健常人プール血清	2540	—	—	6468	—	—
患者4	96342	6.5	陽性	64368	2.4	陽性
患者5	25342	1.7	陽性	23608	0.9	陰性
患者6	13480	0.9	陰性	16498	0.6	陰性
患者7	45370	3.0	陽性	51302	1.9	陽性
患者8	20677	1.4	陽性	21367	0.8	陰性
患者9	168037	11.3	陽性	263410	9.7	陽性
患者10	29067	2.0	陽性	25782	0.9	陰性
患者11	80734	5.4	陽性	94682	3.5	陽性
患者12	16386	1.1	陽性	31098	1.1	陽性
患者13	216347	14.5	陽性	187036	6.9	陽性
カットオフ値	14884	1.0	—	27230	1.0	—

表4から、比較例5のGST融合p53蛋白質結合ビーズではカットオフ値が高く、相対的に癌患者の発光量が低くなる（カットオフ比が小さくなる）ため、陰性と判定され頻度が高くなった。これは、健常人検体の測定値が、非特異吸着等の原因で、その分布が広いことに起因している。

これに対して、実施例18の合成ポリペプチド結合ビーズではカットオフ値と癌患者検体の発光量差が大きく（カットオフ比が大きく）、自己抗体陰性と判断される頻度が小さかった。

【0076】

【発明の効果】

本発明のp53遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬は、非特異的反応が少なく、感度及び特異性に極めて優れている。すなわち、自己抗体を保有しない健常人からの検体の測定値と自己抗体を保有する癌患者からの検体の測定値との差が十分に大きく（高感度）、また自己抗体を保有しない健常人の検体に対して非特異的反応が極めて少ないので高精度の測定ができる。従って、本発明の測定試薬、測定試薬キット及び測定法によると、癌の極めて正確な診断が可能となる。

【0077】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例18の免疫測定用試薬を用いて、健常人ボランティア120名の測定値（発光量）の分布を示したグラフである（実施例20）。

【図2】比較例5の免疫測定用試薬を用いて、健常人ボランティア120名の測定値（発光量）の分布を示したグラフである（実施例20）。

【0078】

【配列表】

10

20

30

40

<110>三洋化成工業株式会社 ; SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

<120>抗癌遺伝子産物自己抗体測定用試薬

<160>62

<210>1

<211>50

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp

1

5

10

15

Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser

20

25

30

Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp

35

40

45

Phe Thr

50

10

20

<210>2

<211>30

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>2

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser

1 5 10 15

10

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg

20 25 30

<210>3

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

20

<400>3

Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn

1 5 10 15

Lys Met Phe Cys

20

<210>4

30

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>4

Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val

1 5 10 15

Val Val Pro Tyr

20

40

<210>5

<211>45

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>5

Tyr	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro	Ile	10
1				5				10						15		
Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	
				20				25						30		
Asn	Ser	Phe	Glu	Val	His	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg				
		35					40					45				

<210>6

<211>25

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>6

Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	His	Glu	Leu	Pro	Pro	20
1				5				10						15		
Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn								30
			20					25								

<210>7

<211>43

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>7

Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly	Gly	Ser	Arg	Ala	His	Ser	40
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

1 5 10 15
 Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys
 20 25 30
 Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 35 40

10

<210>8
 <211>10
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>8

Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser
 1 5 10

20

<210>9
 <211>10
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>9

Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu
 1 5 10

30

<210>10
 <211>10
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>10

40

Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu

1 5 10

<210>11

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>11

Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu

1 5 10

<210>12

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>12

Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr

1 5 10

<210>13

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>13

Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp

1 5 10 15

Leu Trp Lys Leu

20

10

20

30

40

<210>14

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>14

Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val

1

5

10

15

10

Leu Ser Pro Leu

20

<210>15

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

20

<400>15

Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp

1

5

10

15

Asp Leu Met Leu

20

<210>16

30

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>16

Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu

1

5

10

15

Gln Trp Phe Thr

20

40

<210>17

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>17

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu

1

5

10

15

10

<210>18

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>18

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile

1

5

10

20

<210>19

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>19

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser

1

5

10

30

<210>20

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>20

40

Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln
 1 5 10

<210>21

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

10

<400>21

Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg
 1 5 10

<210>22

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

20

<400>22

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser
 1 5 10 15

<210>23

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

30

<400>23

Ser Trp Pro Leu Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser
 1 5 10 15

Tyr Gly Phe Arg
 20

40

<210>24

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>24

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser

1

5

10

15

10

<210>25

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>25

Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr

1

5

10

20

<210>26

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>26

Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr

1

5

10

30

<210>27

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>27

40

Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys

1 5 10

<210>28

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

10

<400>28

Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro

1 5 10

<210>29

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

20

<400>29

Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys

1 5 10

<210>30

<211>8

<212>PRT

<213>Homo sapiens

30

<400>30

Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr

1 5

<210>31

<211>10

40

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>31

Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn

1 5 10

<210>32

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>32

Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr

1 5 10

<210>33

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>33

Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg

1 5 10

<210>34

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>34

Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr

1 5 10

10

20

30

40

<210>35

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>35

Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val

1

5

10

10

<210>36

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>36

Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly

1

5

10

20

<210>37

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>37

Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile

1

5

10

30

<210>38

<211>10

<212>PRT

40

<213>Homo sapiens

<400>38

Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu

1 5 10

<210>39

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>39

Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg

1 5 10 15

<210>40

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>40

Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro

1 5 10 15

<210>41

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>41

Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser

1 5 10 15

10

20

30

40

<210>42

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>42

Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu

1

5

10

10

<210>43

<211>12

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>43

Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg

1

5

10

20

<210>44

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>44

Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile

1

5

10

15

30

Ile Thr Leu Glu

20

<210>45

<211>11

<212>PRT

40

<213>Homo sapiens

<400>45

Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro

1 5 10

<210>46

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>46

Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His

1 5 10

<210>47

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>47

His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn

1 5 10

<210>48

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>48

Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro

1 5 10

10

20

30

40

<210>49

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>49

Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly

1 5 10

10

<210>50

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>50

Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn

1 5 10

20

<210>51

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>51

Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser

1 5 10

30

<210>52

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>52

40

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly

1 5 10

<210>53

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

10

<400>53

Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys

1 5 10

<210>54

<211>10

<212>PRT

20

<213>Homo sapiens

<400>54

Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His

1 5 10

<210>55

<211>13

30

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>55

Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp

1 5 10

<210>56

40

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>56

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala

1 5 10

<210>57

10

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>57

Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln

1 5 10

20

<210>58

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>58

Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe

1 5 10

30

<210>59

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>59

Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp

1 5 10

40

<210>60

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>60

Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His
 1 5 10

10

<210>61

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>61

Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe
 1 5 10 15

20

<210>62

<211>393

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>62

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
 1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
 20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
 35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

30

40

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365

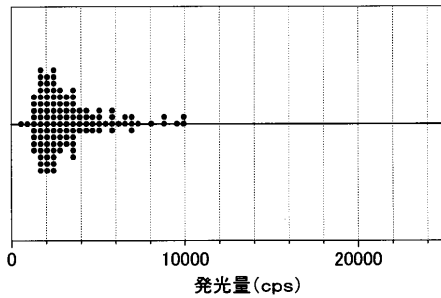
Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390

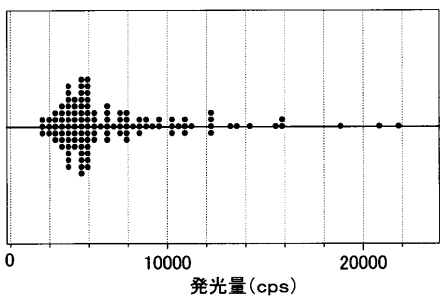
10

20

【 図 1 】



【 図 2 】



【手続補正書】

【提出日】平成15年2月14日(2003.2.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】p53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser
 r Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Le
 u Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Le
 u Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Le
 u Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Th
 r (1)、Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser
 Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe
 Arg (2)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr C
 ys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met P
 he Cys (3)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp As
 p Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Va
 l Pro Tyr (4)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cy
 s Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Le
 u Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gl
 y Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Va
 l His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (5)、Glu
 Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His
 His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg
 Ala Leu Pro Asn (6)、又はLys Asp Ala Gln Al
 a Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala Hi
 s Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gl
 n Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Ph
 e Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp (7)に含まれ
 る少なくとも1種のアミノ酸配列であってかつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ
 酸配列を必須構成単位としてなるポリペプチドを含んでなることを特徴とする免疫測定用
 試薬。

【請求項2】p53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であっ
 て、Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Se
 r Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Le
 u Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Le
 u Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Le
 u Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Th
 r (1)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、かつアミノ酸の個数が8~
 50個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドと、
 Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly
 Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys
 Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His
 Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro
 Asp Ser Asp (7)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、かつ
 アミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドとを

含んでなることを特徴とする免疫測定用試薬。

【請求項3】 Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pr
o Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Se
r Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Ph
e Arg (2)、 Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr
Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met
Phe Cys (3)、 Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp As
p Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Va
l Pro Tyr (4)、 Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cy
s Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Le
u Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gl
y Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Va
l His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (5)、又はG
lu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro H
is His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys A
rg Ala Leu Pro Asn (6)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列
であって、かつアミノ酸個数が8~20個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリ
ペプチドをさらに含んでなる請求項2に記載の試薬。

【請求項4】ポリペプチドを構成するアミノ酸の個数が、10~50個である請求項1~
3のいずれかに記載の試薬。

【請求項5】ポリペプチドが水不溶性担体に結合されてなる請求項1~4のいずれかに記
載の試薬。

【請求項6】請求項1~5のいずれかに記載の試薬と、抗ヒトイムノグロブリン抗体を
含有してなる免疫測定用試薬キット。

【請求項7】抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識化合物で標識されてなる請求項6記載の
試薬キット。

【請求項8】標識化合物が酵素である請求項7記載の試薬キット。

【請求項9】請求項6~8のいずれかに記載の試薬キットをサンドイッチ法に適用し、抗
ヒトイムノグロブリン抗体を定量することにより、検体中のp53遺伝子産物に対する自
己抗体の有無を判断する工程を含むp53遺伝子産物に対する自己抗体の免疫測定方法。

【請求項10】化学発光酵素免疫測定法による請求項9記載の免疫測定方法。

【請求項11】検体中のp53遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断する工程におい
て、検体として血液を用い、この検体に対する抗ヒトイムノグロブリン抗体量と、
複数の健常人の血液に対する抗ヒトイムノグロブリン量から設定される基準値とを比較す
ることを含む請求項9又は10に記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、p53遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬、免疫測
定用試薬キット及び抗p53遺伝子産物自己抗体の免疫測定方法に関するものである。

【0002】

【従来技術】

p53遺伝子は、393個のアミノ酸からなる核内リン酸化蛋白質(以下、p53遺伝子
産物)をコードする癌抑制遺伝子であり、種々のヒト癌において高頻度に欠失と点突然変
異が認められ(非特許文献1)、変異型p53遺伝子産物は非常に長い半減期を有すること
から、癌細胞ではその発現が増加し、蓄積することが知られている(非特許文献2)。
一方、乳癌又は肺癌等の癌患者においては、血中にp53遺伝子産物と反応する自己抗体
が出現することがウエスタンブロット法及び免疫沈降法等で認められている(非特許文
献3)。そして、p53遺伝子産物の全体(アミノ酸393個)又は断片(アミノ酸100
個程度)を固相化した担体を用いるp53遺伝子産物に対する自己抗体の測定法が知られ

ている（例えば、特許文献1）。

【0003】

【非特許文献1】サイエンス (Science), 250, 1233頁, 1990年

【非特許文献2】オンコジーン (Oncogene), 6, 1699頁, 1991年

【非特許文献3】インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー (Int. J. Cancer), 30, 403頁, 1982年

【特許文献1】

特開平9-229933号公報

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従来 of p53 遺伝子産物に対する自己抗体の測定法では、自己抗体を保有しない健常人からの検体の測定値と自己抗体を保有する癌患者からの検体の測定値との差が小さく（感度が低い）、また自己抗体を保有しない健常人の検体でも非特異的の反応により誤った測定数値となる場合があった。

したがって、本発明の目的は、p53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、感度及び特異性に優れた測定試薬を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために鋭意研究を行った結果、本発明者らは、p53 遺伝子産物のより小さなペプチド断片（つまりp53 遺伝子産物中の特定のアミノ酸配列からなるペプチド）が自己抗体と特異的に結合することを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、p53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr (1)、Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg (2)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys (3)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr (4)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (5)、Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn (6)、又はLys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp (7) に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であってかつアミノ酸の個数が8～50個であるアミノ酸配列を必須構成単位としてなるポリペプチドを含んでなることを特徴とする免疫測定用試薬である。

【0006】

また、p53 遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬であって、S

er Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser G
 ln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu L
 eu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu P
 ro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu S
 er Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr (1
)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、かつアミノ酸の個数が8~50個
 であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドと、

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly
 Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys
 Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His
 Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro
 Asp Ser Asp (7)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であって、かつ
 アミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列を構成単位としてなるポリペプチドとを
 含んでなることを特徴とする免疫測定用試薬である。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の免疫測定用試薬に含まれるポリペプチドとしては、p53遺伝子産物 {Met
 Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu
 Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp
 Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val
 Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp
 Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu
 Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp
 Glu Ala Pro Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro
 Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp
 Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys
 Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu
 Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser
 Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn
 Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys
 Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro
 Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala
 Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu
 Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg
 Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro
 Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu
 Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr
 Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu
 Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr
 Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser
 Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile
 Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser
 Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu
 Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp
 Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys
 Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro
 Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn
 Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys
 Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln

I l e A r g G l y A r g G l u A r g P h e G l u M e t P h e
 A r g G l u L e u A s n G l u A l a L e u G l u L e u L y s
 A s p A l a G l n A l a G l y L y s G l u P r o G l y G l y
 S e r A r g A l a H i s S e r S e r H i s L e u L y s S e r
 L y s L y s G l y G l n S e r T h r S e r A r g H i s L y s
 L y s L e u M e t P h e L y s T h r G l u G l y P r o A s p
 S e r A s p (6 2) } 中に含まれる特定のアミノ酸配列を必須構成単位としてなるポリペプチドである。特定のアミノ酸配列とは、アミノ酸配列(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)又は(7)に含まれる少なくとも1種のアミノ酸配列であってかつアミノ酸の個数が8~50個であるアミノ酸配列である。

【0008】

特定のアミノ酸配列中のアミノ酸の個数は、抗原性及び調製等の観点から、8~50が好ましく、さらに好ましくは8~30、特に好ましくは8~20である。

【0009】

特定のアミノ酸配列としては、アミノ酸配列(1)に含まれるアミノ酸配列(A)、アミノ酸配列(2)に含まれるアミノ酸配列(B)、アミノ酸配列(3)に含まれるアミノ酸配列(C)、アミノ酸配列(4)に含まれるアミノ酸配列(D)、アミノ酸配列(5)に含まれるアミノ酸配列(E)、アミノ酸配列(6)に含まれるアミノ酸配列(F)、及びアミノ酸配列(7)に含まれるアミノ酸配列(G)が含まれる。

アミノ酸配列(1)に含まれるアミノ酸配列(A)としては、S e r A s p P r o
 S e r V a l G l u P r o P r o L e u S e r G l n G l u T h r
 P h e S e r A s p L e u T r p L y s L e u L e u P r o G l u
 A s n A s n V a l L e u S e r P r o L e u P r o S e r G l n
 A l a M e t A s p A s p L e u M e t L e u S e r P r o A s p
 A s p I l e G l u G l n T r p P h e T h r (1)、S e r A s p P
 r o S e r V a l G l u P r o P r o L e u S e r (8)、G l n G l u
 T h r P h e S e r A s p L e u T r p L y s L e u (9)、L e u
 P r o G l u A s n A s n V a l L e u S e r P r o L e u (1 0)、
 P r o S e r G l n A l a M e t A s p A s p L e u M e t L e u (1 1)、
 S e r P r o A s p A s p I l e G l u G l n T r p P h e
 T h r (1 2)、S e r A s p P r o S e r V a l G l u P r o P r o
 L e u S e r G l n G l u T h r P h e S e r A s p L e u T r p
 L y s L e u (1 3)、G l n G l u T h r P h e S e r A s p L e u
 T r p L y s L e u L e u P r o G l u A s n A s n V a l L e u
 S e r P r o L e u (1 4)、L e u P r o G l u A s n A s n V a l
 L e u S e r P r o L e u P r o S e r G l n A l a M e t A s p
 A s p L e u M e t L e u (1 5)、P r o S e r G l n A l a M e t A
 s p A s p L e u M e t L e u S e r P r o A s p A s p I l e G
 l u G l n T r p P h e T h r (1 6)、G l u P r o P r o L e u S
 e r G l n G l u T h r P h e S e r A s p L e u T r p L y s L
 e u (1 7)、及びA s p A s p L e u M e t L e u S e r P r o A s p
 A s p I l e (1 8) 等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列(17)及び(18)が好ましい。

【00010】

アミノ酸配列(2)に含まれるアミノ酸配列(B)としては、T h r P r o A l a
 A l a P r o A l a P r o A l a P r o S e r T r p P r o L e u
 S e r S e r S e r V a l P r o S e r G l n L y s T h r T y r
 G l n G l y S e r T y r G l y P h e A r g (2)、T h r P r o A
 l a A l a P r o A l a P r o A l a P r o S e r (1 9)、T r p P r
 o L e u S e r S e r S e r V a l P r o S e r G l n (2 0)、L y

s Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg (21)、Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser (22)、Ser Trp Pro Leu Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg (23)、Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser (24)、及び Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr (25) 等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列 (24) 及び (25) が好ましい。

【0011】

アミノ酸配列 (3) に含まれるアミノ酸配列 (C) としては、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys (3)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr (26)、Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys (27)、Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro (28)、Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys (29)、及び Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr (30) 等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列 (30) が好ましい。

【0012】

アミノ酸配列 (4) に含まれるアミノ酸配列 (D) としては、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr (4)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn (31)、Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr (32)、Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg (33)、Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr (34)、及び Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val (35) 等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列 (35) が好ましい。

【0013】

アミノ酸配列 (5) に含まれるアミノ酸配列 (E) としては、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (5)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly (36)、Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile (37)、Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu (38)、Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (39)、Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro (40)、Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser (41)、Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu (42)、Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg (43)、Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg

Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu
(44)、及びAsn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro(45)等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列(44)及び(45)が好ましい。

【0014】

アミノ酸配列(6)に含まれるアミノ酸配列(F)としては、Glu Glu Asn
Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu
Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu
Pro Asn(6)、Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys G
ly Glu Pro His(46)、His Glu Leu Pro Pro G
ly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn(47)、G
lu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro(4
8)、Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro G
ly(49)、Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala L
eu Pro Asn(50)、及びGly Glu Pro His His Glu
Leu Pro Pro Gly Ser(51)等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列(51)が好ましい。

【0015】

アミノ酸配列(7)に含まれるアミノ酸配列(G)としては、Lys Asp Ala
Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg
Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys
Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu
Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp(
7)、Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro G
ly(52)、Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His L
eu Lys(53)、Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr S
er Arg His(54)、Lys Lys Leu Met Phe Lys T
hr Glu Gly Pro Asp Ser Asp(55)、Lys Asp A
la Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser A
rg Ala(56)、Ser Arg Ala His Ser Ser His L
eu Lys Ser Lys Lys Gly Gln(57)、Lys Gly G
ln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met P
he(58)、Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro A
sp Ser Asp(59)、Gly Lys Glu Pro Gly Gly S
er Arg Ala His(60)、Ser Lys Lys Gly Gln S
er Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe(6
1)等が挙げられる。

これらのうち、アミノ酸配列(60)及び(61)が好ましい。

【0016】

これらの特定のアミノ酸配列のうち、自己抗体との反応性(特異性及び感度)等の観点から、アミノ酸配列(A)及びアミノ酸配列(G)が好ましく、さらに好ましくはアミノ酸配列(1)、(7)、(13)、(16)、(17)、(18)、(52)、(53)、(54)(55)、(56)、(58)、(60)及び(61)、特に好ましくはアミノ酸配列(17)、(18)、(60)及び(61)である。

【0017】

そして、ポリペプチドには、ポリペプチド1分子当たり、これらの特定のアミノ酸配列の少なくとも1種を含んでいればよく、2種以上を同時に含んでもよい。また、ポリペプチド1分子当たり、これらの特定のアミノ酸配列の繰り返し配列(重合体)を含んでもよい。

ポリペプチドとしては、アミノ酸配列(1)~(61)からなる群より選ばれる少なくとも

も1種を含んでなるポリペプチド及びこれらの繰り返し配列(重合体)を含んでなるポリペプチド等が含まれる。

これらのうち、アミノ酸配列(1)~(61)からなる群より選ばれる少なくとも1種を含んでなるポリペプチドが好ましく、さらに好ましくはアミノ酸配列(1)~(61)のいずれか1種を含むポリペプチドである。

【0018】

ポリペプチドは、これらの特定のアミノ酸配列のみから構成されていてもよく、さらにN末端及び/又はC末端にビオチン、チオグリコール酸、及び/又はリンカーとして用いるアミノ酸(システイン、リジン、チロシン、グルタミン酸及びアスパラギン酸等)等が含まれていてもよい。また、さらにN末端が無水酢酸、N-アセチルイミダゾール等でアセチル化されていてもよく、C末端が水溶性カルボジイミド(例えば、1-エチル-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩)、イソオキサゾリウム(例えば、N-メチル-5-フェニルイソオキサゾリウムフルオロボレート)等でアミド化されていてもよい。ビオチン又はチオグリコール酸で修飾されていることが好ましく、さらに好ましくはポリペプチドを水不溶性担体と結合する場合の簡便性からビオチンで修飾されていることである。又、これらの修飾は組み合わせて用いることもできる。

N末端及び/又はC末端にアミノ酸を含む場合、このアミノ酸の個数は、N末端又はC末端当たり、1~5が好ましく、さらに好ましくは1~3、特に好ましくは1~2である。N末端及び/又はC末端にビオチン及び/又はチオグリコール酸を含む場合、ビオチン又はチオグリコール酸の個数はポリペプチド当たり1~5が好ましく、さらに好ましくは1~3、特に好ましくは1~2である。

【0019】

ポリペプチドを構成するアミノ酸の個数は、10以上が好ましく、さらに好ましくは11以上、特に好ましくは13以上、最も好ましくは15以上であり、また、50以下が好ましく、さらに好ましくは40以下、特に好ましくは30以下、最も好ましくは25以下である。

【0020】

ポリペプチドは、従来公知の遺伝子組み換え法、又はペプチド合成法等で作成できる。遺伝子組み換え法は、比較的アミノ酸数の多いポリペプチドを容易に作成できるというメリットがあるけれど、宿主由来の狭雑蛋白が存在すること、ポリペプチドが融合蛋白として生産される点で、検体との非特異的応答を生じやすいというデメリットがある。従って、これらの方法のうち、ペプチド合成法が好ましい。

遺伝子組み換え法としては、SV40ウイルス、E1アデノウイルス、E6パピローマウイルス等をヒト線維芽細胞等の細胞に導入した後、トランスフォーマントから抽出したmRNAからcDNAを作製し、これをPCR法によって増幅した後制限酵素で切断し、断片をベクターに組み込み、得られた発現ベクターで大腸菌等の宿主を形質転換し、必要あれば誘導処理した後、宿主を培養し、菌体溶解物から目的とする融合蛋白質を抽出し、精製する。このようにして、ポリペプチドを含む融合蛋白質を作成できる(例えば、生化学実験法45「組み換えタンパク質生産法」, 学会出版センター社, 2001年)。又、p53遺伝子配列から目的のポリペプチドに該当する遺伝子配列をDNA合成機で合成した後、ベクターに組み込むことで、同様にポリペプチドを作成できる。

【0021】

ペプチド合成法は、溶液中でも、あるいは固体支持体上でも達成できるが固相支持体を用いた固相合成法が好ましく、さらに好ましくは自動ペプチド合成機を用いた固相合成法である。ポリペプチド合成法は、一般に、t-ブチルオキシカルボニル(BOC基)又は9-フルオレニルメトキシ-カルボニル(Fmoc基)で保護された活性化アミノ酸を使用する。その他、具体的な合成操作、側鎖保護の種類、および切断法等は、例えば、ソリッドフェーズペプタイドシンセシス第2版、ピースケミカル社、1984(Stewart及びYoung, "Solid Phase Peptide Synthesis", 第2版, Pierce Chemical Company, 1984)、及び

ソリッド フェーズ ペプチド シンセシス、アイ アール エル社、1989 (Atherton及びSheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis", IRL Press, 1989) に詳細に記述されている。

【0022】

本発明の免疫測定用試薬は、このようなポリペプチドの少なくとも1種を含んでいればよいが、2種以上のポリペプチドを含んでいることが、自己抗体との反応性(特異性及び感度)がより高くなる点で好ましい。さらに好ましくはアミノ酸配列(A)を含むポリペプチドとアミノ酸配列(G)とを含むポリペプチドを含むことであり、特に好ましくはアミノ酸配列(A)を含むポリペプチド及びアミノ酸配列(G)を含むポリペプチドに加え、アミノ酸配列(B)~(F)のうち少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むこと、最も好ましくはアミノ酸配列(A)~(G)のいずれかを含むポリペプチドをそれぞれ1個ずつ含むことである。

【0023】

本発明の免疫測定用試薬の好ましいポリペプチドの組合せ例としては、例えば、次の組合せが例示できる。なお、カッコ内の数字は、アミノ酸配列番号に対応しており、そのアミノ酸配列からなるポリペプチドを表す。すなわち、(1)+(7)は、アミノ酸配列(1)からなるポリペプチドとアミノ酸配列(7)からなるポリペプチドとの組合せを表す。(1)+(7)、(17)+(60)、(18)+(61)、(17)+(61)、(17)+(18)+(60)+(61)、(1)+(7)+(2)、(1)+(7)+(24)+(25)、(1)+(7)+(3)、(1)+(7)+(30)、(1)+(7)+(4)、(1)+(7)+(35)、(1)+(7)+(5)、(1)+(7)+(44)+(45)、(1)+(7)+(6)、(1)+(7)+(51)、(1)+(7)+(2)+(3)、(1)+(7)+(2)+(4)、(1)+(7)+(2)+(5)、(1)+(7)+(2)+(6)、(1)+(7)+(3)+(4)、(1)+(7)+(3)+(5)、(1)+(7)+(3)+(6)、(1)+(7)+(4)+(5)、(1)+(7)+(4)+(6)、(1)+(7)+(5)+(6)、(1)+(7)+(2)+(3)+(4)、(1)+(7)+(2)+(3)+(5)、(1)+(7)+(2)+(3)+(6)、(1)+(7)+(3)+(4)+(5)、(1)+(7)+(3)+(4)+(6)、(1)+(7)+(3)+(4)+(5)+(6)、(1)+(7)+(2)+(3)+(4)+(5)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(3)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(4)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(5)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(3)+(4)、(17)+(18)+(60)+(61)+(3)+(5)、(17)+(18)+(60)+(61)+(3)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(4)+(5)、(17)+(18)+(60)+(61)+(4)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(4)+(5)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(3)+(4)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(3)+(5)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(3)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(3)+(4)+(5)、(17)+(18)+(60)+(61)+(3)+(4)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(4)+(5)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(4)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(2)+(5)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(3)+(5)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)+(3)+(5)+(6)、(17)+(18)+(60)+(61)

+ (2) + (3) + (4) + (5)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2)
 + (3) + (4) + (6)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (3) + (4)
 + (5) + (6)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2) + (4) + (5)
 + (6)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2) + (3) + (5) + (6)
 、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2) + (3) + (4) + (5) + (6)
 、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (3 0)、(1 7)
 + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (3 5)、(1 7) + (1 8)
 + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (4 4) + (4 5)、(1 7) + (1 8)
 + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0)
 + (6 1) + (3 0) + (3 5)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (3 0)
 + (4 4) + (4 5)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (3 0) + (5 1)
 、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (3 5) + (4 4) + (4 5)、(1 7)
 + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (3 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0)
 + (6 1) + (4 4) + (4 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1)
 + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (3 5)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1)
 + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (4 4) + (4 5)、(1 7) + (1 8) + (6 0)
 + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0)
 + (6 1) + (3 0) + (3 5) + (4 4) + (4 5)、(1 7) + (1 8) + (6 0)
 + (6 1) + (3 0) + (3 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1)
 + (3 5) + (4 4) + (4 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1)
 + (2 4) + (2 5) + (3 5) + (4 4) + (4 5)、(1 7) + (1 8) + (6 0)
 + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (3 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0)
 + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (4 4) + (4 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8)
 + (6 0) + (6 1) + (3 0) + (4 4) + (4 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8)
 + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (3 5) + (4 4) + (4 5)
 、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (3 5)
 + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (3 0) + (3 5) + (4 4)
 + (4 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5)
 + (3 5) + (4 4) + (4 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1)
 + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (4 4) + (4 5) + (5 1)、(1 7) + (1 8)
 + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (3 5) + (4 4) + (4 5)
 + (5 1)

これらのうち、(1) + (7) + (2) + (3) + (4) + (5) + (6)、(1 7) +
 (1 8) + (6 0) + (6 1) + (2) + (3) + (5) + (6)、及び (1 7) + (1
 8) + (6 0) + (6 1) + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (3 5) + (4 4) + (4
 5) + (5 1) が好ましく、さらに好ましくは (1 7) + (1 8) + (6 0) + (6 1)
 + (2 4) + (2 5) + (3 0) + (3 5) + (4 4) + (4 5) + (5 1) である。

【 0 0 2 4 】

本発明の免疫測定用試薬は、上記のポリペプチドを含めば、試薬の剤型及び構成等に制限はなく、例えば、ポリペプチドが、水不溶性担体及び/又は標識化合物と結合したかたちで試薬に含まれてもよく、ポリペプチド単独で含まれていてもよい。すなわち本発明の試薬は、比濁法、ラテックス凝集法及び比濁法等のホモジニアス免疫測定法にも、水不溶性担体を用いたヘテロジニアス免疫測定法にも適用できる。これらのうち、測定感度の点で、ヘテロジニアス免疫測定法用の試薬が好ましい。すなわち、本発明の免疫測定試薬は、ポリペプチドが水不溶性担体に結合して用いることが好ましい。

【 0 0 2 5 】

水不溶性担体としては、特開平 2 - 2 0 5 7 7 4 号公報に記載の担体等が使用でき、無機物及び有機物等が使用でき、例えば、セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリウレタン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリエステル、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、絹、フィブロイン、リグニン、ヘミセルロース、キチン

、エポナイト、ゴム、ガラス、石英、シリコン及びセラミックス等が挙げられる。これらのうち、ポリスチレン、ガラス、石英及びシリコンが好ましく、さらに好ましくはポリスチレン及びガラス、特に好ましくはガラスである。

【0026】

水不溶性担体の形状は、使用する目的に合わせて自由に決定でき、真球状や円盤状のビーズ、板状や棒状のスティック、試験管、及び不織布やフィルターのストリップ（短冊状の細片）、微粒子等が挙げられる。これらのうち、ビーズ及び微粒子が好ましく、さらに好ましくは真球状のビーズである。

【0027】

水不溶性担体の大きさは、使用する目的に合わせて自由に決定できるが、通常は内径4～10mm、深さ10～20mm程度の反応容器に投入できる大きさである（水不溶性担体が試験管の場合を除く。）。真球状ビーズの場合、直径（mm）は1～10が好ましく、さらに好ましくは2～8、特に好ましくは3～7である。円盤状ビーズの場合、直径（mm）は1～10が好ましく、さらに好ましくは2～8、特に好ましくは3～7であり、厚さは（mm）は0.1～5が好ましく、さらに好ましくは0.2～2、特に好ましくは0.3～1である。スティックの場合、長さ（mm）は2～10が好ましく、さらに好ましくは3～8、特に好ましくは4～7である。また、スティックの断面積（mm²）は1～25が好ましく、さらに好ましくは2～16、特に好ましくは3～9である。なお、断面積とは、長軸方向に対して垂直に切断した際の切断部分の断面積を意味する。試験管の場合、長さ（mm）は5～100が好ましく、さらに好ましくは8～80、特に好ましくは10～20である。また、試験管の内径（mm）は、5～20が好ましく、さらに好ましくは6～16、特に好ましくは8～12である。ストリップの場合、長さ（mm）は、5～100が好ましく、さらに好ましくは10～80、特に好ましくは10～50である。また、ストリップの幅（mm）は、1～20が好ましく、さらに好ましくは2～16、特に好ましくは3～10である。厚さは（mm）は0.1～2が好ましく、さらに好ましくは0.1～0.5である。不織布やフィルターの平均孔径（μm）は、0.1～10が好ましく、さらに好ましくは0.3～5である。微粒子の場合、平均粒子径（μm）は0.01～200が好ましく、さらに好ましくは0.1～50、特に好ましくは0.2～10である。平均粒子径は、透過型電子顕微鏡法、光学顕微鏡による整列測定法等で測定できる。

【0028】

ポリペプチドを水不溶性担体に結合する方法としては、化学的に結合する方法及び物理吸着による方法の従来公知の方法等で行うことができる。化学的に結合する方法としては、水不溶性担体表面に導入されたアミノ基及び/又はスルフヒドリル基等の官能基と、ポリペプチドのアミノ基及び/又はスルフヒドリル基等の官能基とを結合剤（グルタルアルデヒド、サクシナルデヒド、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロサクシンイミドエステル及びo-フェニレンビスマレイミド等）で架橋する方法（米国特許第4280992号明細書及び同第3652761号明細書等）等が挙げられる。物理吸着による方法としては、水不溶性担体がポリスチレンの場合、ポリペプチドの0.001～0.04%（W/V）炭酸緩衝水溶液（pH9.0）に水不溶性担体を適当時間浸漬する方法（バイオシム・バイオフィズ・アクタ、251巻、427頁、1971年）等が挙げられる。この方法は、担体がポリスチレン以外の物質、例えばポリプロピレン、シリコン、ガラス及びセルロース等にも適用できる。また、ポリペプチドを特異的結合物質（例えば、抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖、相補的遺伝子鎖等）を利用して間接的に水不溶性担体に結合することもできる。例えば、ポリペプチドをビオチンで修飾し、アビジンを結合した水不溶性担体と反応することで、ポリペプチドを水不溶性担体に結合できる。アビジンとしては、卵白由来アビジン及びストレプトアビジン等が使用でき、ストレプトアビジンが好ましい。これら特異的結合物質のうち抗原-抗体、アビジン-ビオチン、レクチン-糖鎖については例えば、[生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」, 東京化学同人社, 1989年]に記載のもの、相補的な遺伝子としては公開特許公報平6-1

86232号に記載の相補的な遺伝子、例えばポリデオキシアデニル酸とポリチミジル酸の組み合わせ等が挙げられる。

【0029】

これらのうち、化学的に結合する方法及び特異的結合物質を用いる方法が好ましく、さらに好ましくは特異的結合物質を用いる方法である。特異的結合物質を用いる方法のうち、アビジン-ビオチン結合を利用した方法である。

【0030】

ポリペプチドは従来免疫測定に使用される緩衝液等に溶解されていてもよい。緩衝液は例えば、リン酸緩衝液及びグッド(Good)の緩衝液等が使用でき、蛋白、塩及びノ又は界面活性剤等を含含有していてもよい。蛋白としては、アルブミン(牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、マウス血清アルブミン、オバルブミン、コナルブミン及びラクトアルブミン等)、抗体(正常ウサギIgG及び正常マウスIgG等のポリペプチドとの結合性がない抗体)及びゼラチン等が挙げられる。塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び臭化リチウム等が挙げられる。界面活性剤としては、ソルビタンラウリン酸モノエステルエチレンオキシド付加物(商品名:ツイーン20及びツイーン40、ICIアメリカ社)等のノニオン界面活性剤等が挙げられる。また、ポリペプチドが結合した水不溶性担体は、上述の緩衝液に浸漬した状態でもよいが、ポリペプチドを含む水不溶性担体全体を糖類及び蛋白質でコーティングした後乾燥した状態が好ましい。コーティング・乾燥方法としては、例えば糖類と蛋白質とを含有する溶液中に浸漬したのち乾燥させる方法(特開平09-318628号公報及び特公平5-41946号公報)等が挙げられる。

【0031】

本発明の免疫測定用試薬キットは、ポリペプチドを含む免疫測定用試薬と共に、抗ヒトイムノグロブリン抗体を含む試薬を含有していることが好ましい。

抗ヒトイムノグロブリン抗体は、従来公知の方法で作成されたものが使用できる。例えば、ヒトイムノグロブリンを適当な動物(例えば、マウス、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ等)に免疫し、得られた抗血清から塩析、イオン交換カラム等で抗体を精製して作成できる。抗ヒトイムノグロブリン抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、また、 (Fab') ²、 Fab' 等の抗体断片でもよい。尚、ヒトイムノグロブリンとは、IgG、IgA、IgM等の全てのイムノグロブリンを含むが、通常はIgG及びIgMであり、主にIgGである。

【0032】

抗ヒトイムノグロブリン抗体は、標識化合物で標識されていることが好ましい。標識化合物としては従来公知のものが使用でき、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質及び酵素等が用いられる。アイソトープとしては、¹²⁵I等が挙げられ、蛍光物質としてはユーロピウム錯体等が挙げられ、発光物質としてはN-メチルアクリジウムエステル等が挙げられ、酵素としては西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ等が挙げられる。これらの標識化合物のうち、酵素が好ましく、さらに好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ、特に好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼである。

【0033】

標識化合物を抗ヒトイムノグロブリン抗体に標識する方法は従来公知の方法等が適用でき、「続生化学実験講座5 免疫生化学実験法」(日本生化学会編、東京化学同人、1986年発行、102~112頁に記載の方法等が用いられ、例えば、次の(1)~(4)の方法等が適用できる。

(1) 標識化合物がアイソトープの場合、クロラミンTを酸化剤として用いて放射性ヨウ素を抗ヒアルロン酸抗体又は配位子のチロシン残基に導入する方法。

(2) 標識化合物が蛍光物質の場合、フルオレセインイソチオシアネートを緩衝液中で抗ヒアルロン酸抗体又は配位子に反応させ、抗ヒアルロン酸抗体又は配位子のリシン残基に結合させる方法。

(3) 標識物質が発光物質の場合、商品名「アクリジニウム誘導体-I」(同人化学研究

所社製)を緩衝液中で抗ヒアルロン酸抗体又は配位子に反応させ、抗ヒアルロン酸抗体又は配位子のアミノ基に結合させる方法。

(4) 標識物質が酵素の場合、酵素の持つアミノ基と抗ヒアルロン酸抗体又は配位子の持つチオール基をN-スクシンイミジル-6-マレイドヘキサノエート等の二架橋性試薬で結合する方法。

【0034】

本発明の免疫測定用試薬キットには、本発明の免疫測定用試薬を含めば、試薬の剤型及び試薬キットの構成等に制限はなく、例えば、ポリペプチドが、水不溶性担体及び/又は標識化合物と結合したかたちで試薬キットに含まれてもよく、ポリペプチド単独で含まれていてもよい。すなわち本発明の試薬キットは、比濁法、ラテックス凝集法及び比濁法等のホモジニアス免疫測定法にも、不溶性担体を用いたヘテロジニアス免疫測定法にも適用できる。これらのうち、測定感度の点で、標識化合物を標識され抗ヒトイムノグロブリン抗体を含むヘテロジニアスなサンドイッチ免疫測定法用の試薬キットが最も好ましい。すなわち、ペプチドと検体とを反応させるとポリペプチドに対する自己抗体のみが特異的にペプチドと結合する。そこで、抗ヒトイムノグロブリン抗体を加えると、該抗体は自己抗体と結合し、免疫複合体「ポリペプチド-自己抗体-抗ヒトイムノグロブリン抗体」を形成する。この免疫複合体中の抗ヒトイムノグロブリン抗体を定量することで自己抗体量を定量できる。抗ヒトイムノグロブリン抗体量は標識化合物の量を測定することにより定量することができる。

【0035】

標識化合物の測定は、標識化合物の種類により従来公知の方法等で実施できる。標識化合物が蛍光物質の場合、例えば適当な波長の励起光の照射によって生じる蛍光量を光電子増倍管により定量する。標識化合物が化学発光物質の場合、例えばアクリジニウムエステルではアルカリ溶液を加えることにより生じる発光量を光電子増倍管により定量する。

【0036】

標識化合物が酵素の場合、適当な基質を反応させることにより酵素活性を吸光度(吸光度測定法)、蛍光量(蛍光量測定法)又は発光量(化学発光量測定法)として測定できる。例えば、酵素がペルオキシダーゼの場合、基質としては2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウム(ABTS)(吸光度測定法)及びルミノール/過酸化物質(化学発光量測定法)等を選択できる。酵素がアルカリフォスファターゼの場合、基質としてはp-ニトロフェニルフォスフェート(吸光度測定法)、4-メチルウンベリフェリルリン酸(4-MUP)(蛍光量測定法)及び3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・二ナトリウム(AMPPD)(化学発光量測定法)等を選択できる。吸光度は分光光度計、蛍光量及び化学発光量は光電子増倍管により定量される。これらのうち、化学発光量測定法が好ましく(すなわち、本発明の試薬キットを用いて自己抗体を定量する方法としては化学発光酵素免疫測定法が好ましい。)、さらに好ましくはペルオキシダーゼとルミノール/過酸化物質との組合せ又はアルカリフォスファターゼとAMPPDとの組み合わせによる化学発光量測定法である。

【0037】

ルミノールとしては、ルミノール、イソルミノール、N-アミノヘキシル-N-エチルイソルミノール(AHEI)、N-アミノブチル-N-エチルイソルミノール(ABEI)及びこれらの金属塩等が含まれる。これらの金属塩としては、アルカリ金属(ナトリウム及びカリウム等)塩及びアルカリ土類金属(カルシウム及びマグネシウム等)塩等が使用できる。これらのうち、ルミノール及びルミノールの金属塩が好ましく、さらに好ましくはルミノールの金属塩、特に好ましくはルミノールのナトリウム塩である。過酸化物質としては、無機過酸化物質及び有機過酸化物質のいずれも使用できる。無機過酸化物質としては、過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム、過ホウ酸カリウム、過酸化酸、過酸化炭酸、過酸化二炭酸、次亜塩素酸、次亜塩素酸カリウム、亜塩素酸、塩素酸、塩素酸ナトリウム、過塩素酸、過臭素酸、ペルオクソ硫酸及びペルオクソリン酸等が挙げられる。有機過酸化物質として

は、例えば、過酢酸、過プロピオン酸、ジメチルスルホキシド(DMSO)、トリエチルアミンオキシド、メチルジエチルアミンオキシド及び過酸化フタロイル等が挙げられる。これらのうち、保存安定性等の観点から、無機過酸化物が好ましく、さらに好ましくは過酸化水素である。

【0038】

本発明の免疫測定用試薬キットには、ポリペプチドを含む試薬(本発明の免疫測定用試薬)、抗ヒトイムノグロブリンを含む試薬に加えて、さらに反应用緩衝液、B/F分離用緩衝液及びコントロール試料等を含むことができる。反应用緩衝液及びB/F分離用緩衝液としては従来免疫測定に使用される緩衝液等が使用でき、蛋白、塩及び/又は界面活性剤等を含むリン酸緩衝液及びグッド(Good)の緩衝液等が使用できる。蛋白としては、アルブミン(牛血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、マウス血清アルブミン、オバルブミン、コナルブミン及びラクトアルブミン等)、抗体(正常ウサギIgG及び正常マウスIgG等のp53ポリペプチドとの結合性がない抗体)及びゼラチン等が挙げられる。塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び臭化リチウム等が挙げられる。界面活性剤としては、ソルビタンラウリン酸モノエステルエチレンオキシド付加物(商品名:ツイーン20及びツイーン40、ICIアメリカ社)等のノニオン界面活性剤等が挙げられる。

【0039】

コントロール試料は、検体にp53遺伝子産物に対する自己抗体が存在するかを判断するための比較試料として用いるものであり、通常、自己抗体を含まない試料(陰性コントロール)及び自己抗体を含む試料(陽性コントロール)が用意される。陰性コントロールとしては、免疫反应用緩衝液と同様な蛋白等を含む緩衝液、p53遺伝子産物に対する自己抗体を保有しないヒトプール血清等が使用できる。陽性コントロールとしては、p53遺伝子産物に対する自己抗体を保有するヒトプール血清、免疫反应用緩衝液と同様な蛋白等を含む緩衝液でp53遺伝子産物に対する自己抗体を含む血清を添加したもの等が使用できる。

【0040】

本発明の免疫測定用試薬キットで測定される検体は、ヒト由来の体液であれば特に限定されず、例えば血液、尿、唾液、リンパ液、胆汁、胃液、涙液等が挙げられ、さらに生体から採取された組織のホモジネート抽出液等も用いることができる。このうち好ましいのは血液及び尿であり、より好ましくは、血液(全血、血清、血漿等を含む)である。

【0041】

本発明の試薬キットを用いたp53遺伝子産物に対する自己抗体を測定する方法(サンドイッチ測定法)の具体例(工程1~6)を以下に示す。

工程1. 検体と、ポリペプチドの結合した水不溶性担体とを反応させて反応混合物(複合体1を含む)を得る。

工程2. 工程1の反応混合物から未反応物を除き(B/F分離)、複合体1を得る。

工程3. 工程2で得られた複合体1と、標識化合物で標識された抗ヒトイムノグロブリン抗体とを反応させて反応混合物(複合体2を含む)を得る。

工程4. 工程3反応混合物から未反応物を除き(B/F分離)、複合体2を得る。

工程5. 複合体2の標識化合物の量を測定する。

工程6. 標識化合物の量を用いて、陰性コントロール及び/又は陽性コントロールと比較し、自己抗体の有無を判定する。

【0042】

検体中のp53遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断する工程(上述の例では工程6)において、検体である血液での抗ヒトイムノグロブリン抗体量(抗ヒトイムノグロブリンに標識された標識化合物量として測定される)と、複数の健常人の血液での抗ヒトイムノグロブリン量(抗ヒトイムノグロブリンに標識された標識化合物量として測定される)から設定される基準値とを比較するで自己抗体の有無を判定することが好ましい。

基準値の設定方法は、例えば「臨床検査薬ガイド1999~2000, p64~71、文

光堂(1999)」、「臨床検査データブック1997-1998、p8~13、医学書院(1997)」に記載された方法で行うことができる。すなわち複数の健常人(少なくとも50人以上、好ましくは120人以上)を測定し、標識化合物量を求める(化学発光酵素免疫測定法の場合、発光量となる)。標識化合物量を統計処理〔パラメトリック法、ノンパラメトリック法等〔パラメトリック法は母集団が正規分布(べき乗変換しても可)を示す場合に使用し、ノンパラメトリック法は母集団が正規分布しない場合に使用される。〕〕し、標本群の95%を含む範囲を求める基準範囲とし、上限を上限基準値、下限を下限基準値と設定する。従って、上限基準値を越えた検体については自己抗体を有する可能性が高いが、5%の確率で健常人でも越える場合がある。これを防ぐため、通常は上限基準値にさらに係数を乗じ、及び/又は付加したカットオフ値を設定することが行われる。すなわちカットオフ値を超えた検体を自己抗体が有るものとして判定する。カットオフ値の設定は、上限基準値とp53遺伝子産物に対する自己抗体を有する検体の分布下限の値との関係で設定するが、通常は上限基準値の1.5~3倍程度の値である。

【0043】

上述の陰性コントロール及び陽性コントロールは、設定したカットオフ値を簡易に再現できるように調製したものである。例えば、陰性コントロールの測定値(標識化合物量)の3倍がカットオフ値となる、陰性コントロールと陽性コントロールの平均値がカットオフ値となる等、の設定が可能である。

【0044】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0045】

<合成例1>

1. ポリペプチドの合成

エチレンジアミンで官能化しそれに酸不安定リンカー{4-(2',4'-ジメチルオキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシ酢酸}をカップリングさせたペプシンKポリアミド-キーゼルグアー樹脂(Pepsyn K polyamide-Keseliguhr resin: Milligen, Novato, カリフォルニア)を固相として、表1に示したポリペプチドをテトラヘドロンレター(Rink, tetrahedron Lett. (1987) 28: 3787)に記載された化学合成法により合成した。

【0046】

なお、1 側鎖のw-アミノ基はBocにより保護し、-アミノ基はFmocで保護した。

2 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基によりアルギニンの Guanidino 基を保護した。

3 ヒスチジンのイミダゾリル基をBoc又はトリチル基で保護し、システインのスルフヒドリル基をトリチル基で保護した。

4 ペプチドの延長反応は、ジイソプロピルカルボジイミドを用いてヒドロキシベンゾトリアゾールエステル形成することによりカップリングを行うアルギニンの場合を除いて、付加するアミノ酸のカルボキシル基を活性化し形成させたO-ペンタフルオロフェニルエステル類とペプチドの-アミノ基をカップリングすることにより実行した。

5 すべてのペプチドのN末端を酢酸無水物でN-アセチル化した。

6 すべての合成をミリゲン9050ペプシンセサイザー(Milligen 9050 Pepsynthesizer: Novato, カリフォルニア)(連続フロー法)を用いて行った。

7 補集剤(アニソール及び1, 2-エタンジチオール)の存在下でトリフルオロ酢酸を用いて、固相とポリペプチドとを切断し、ジエチルエーテルで抽出し粗合成ポリペプチドを得た。

8 これらの粗合成ポリペプチドをC18-逆相クロマトグラフィーカラム(YMC-Hydrosphere C18 20×150、ワイエムシィ社製で精製{溶出液はA:水/TFA(体積比:100/0.1)とB:アセトニトリル/TFA(体積比:100/0.1)のグラジュエント(Bの割合として0~40体積%)、流速1.0mL/mL、温度37、検出は220nmの波長を使用。}後、凍結乾燥して、表1の合成ポリペプチドP1~P11を得た。

【0047】

【表1】

合成ポリペプチド	合成ポリペプチドを構成するアミノ酸配列
P1	Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu (17)
P2	Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile (18)
P3	Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser (24)
P4	Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr (25)
P5	Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr (30)
P6	Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val (35)
P7	Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu (44)
P8	Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro (45)
P9	Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser (51)
P10	Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His (60)
P11	Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe (61)

【0048】

2. 合成ポリペプチドへのビオチンによる修飾

合成ポリペプチドP1の1重量部とビオチン残基導入試薬(商品名[Biotin Sulfo-Osu]、株式会社同仁化学研究所)1重量部を炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH7.5)1000重量部に溶解し、30で2時間、静置反応した。反応溶液をC18-逆相クロマトグラフィーで精製し、ビオチン結合ポリペプチドP1(PB-1)を作成した。P2~P11についても同様にしてビオチン結合ポリペプチド(PB-2~PB-11)を作成した。

【0049】

<実施例1>

1. 合成ポリペプチド結合ビーズの作成

(1) アビジン結合ビーズの作成

ストレプトアビジン(ロシュダイアグノティクス株式会社より購入)をpH9の0.1M炭酸緩衝液に20µg/mLの濃度で溶解した。この溶液20mLに、直径3.2mmのポリスチレンビーズ(イムノケミカル社製)1000個を加え、2~10で48時間静置させて、ポリスチレンビーズにストレプトアビジンを物理吸着させた。その後、溶液をアスピレーターで吸引除去し、20mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH7.2)でビーズを2回洗浄し、アビジン結合ビーズを調製した。このアビジン

結合ビーズを再度50 mLの0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液に浸漬し、浸漬状態で冷蔵(2~10)保存した。

【0050】

(2) p53ポリペプチド結合ビーズ(PBビーズ)の作成

浸漬液をアスピレーターで除いたアビジン結合ビーズ1000個を、合成ポリペプチドPB1を2 µg/mLの濃度で含むリン酸緩衝水溶液(0.02 M, pH 7.0) 20 mLに加え、4~10 で24時間反応(2時間に1回転倒攪拌)した。その後、緩衝水溶液をアスピレーターで吸引除去し、20 mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(pH 7.2)でビーズを2回洗浄した後、10重量%のショ糖を含むリン酸緩衝液(pH 7.2)に30分間浸漬後、リン酸緩衝液をアスピレーターで除き、ビーズをろ紙上に撒き室温(約25)で風乾し、合成ポリペプチド結合ビーズ(PB1ビーズ)を調整し、乾燥剤(シリカゲル)を入れた密閉容器中で冷蔵保存した。

【0051】

2. 免疫反应用緩衝液の作成

0.02 Mのリン酸緩衝液(pH 8.0)に、カゼインを3 g/L及び塩化ナトリウムを8.5 g/Lの濃度になるように添加し、免疫反应用緩衝液を作成した。使用時まで冷蔵保存した。

【0052】

3. ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体の作成

抗ヒトイムノグロブリンポリクローナル抗体(ダコジャパン(株)製)及び西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(東洋紡(株)製)を用い、文献[エス・ヨシタケ、エム・イマガワ、イー・イシカワ、エトール; ジェイ・パイオケム, Vol. 92 (1982) 1413-1424]に記載の方法でペルオキシダーゼ標識抗 2-マイクログロブリンポリクローナル抗体を調製し、冷凍(-30)保存した。

【0053】

4. 酵素標識抗体液の作成

上記で作成した免疫反应用緩衝液及びペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いて次の通り酵素標識抗体液を作成した。すなわち、免疫反应用緩衝液100 mLにペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を蛋白量で100 µg添加し、攪拌混合し、これを酵素標識抗体液とした。

【0054】

5. 過酸化水素液の調製

200 µLの35%過酸化水素水を脱イオン水1リットルに溶解し、過酸化水素水とした。使用するまで冷蔵保存した。

【0055】

6. 基質液の調製

ルミノール(東京化成製)0.18 g及び4-(シアノメチルチオ)フェノール0.1 g(三新化学製)を0.1 M(モル/L)、pH 8.5のトリス/塩酸緩衝液1リットルに溶解した。使用するまで遮光、冷蔵保存した。

【0056】

<実施例2~18>

1. 合成ポリペプチド結合ビーズの作成

実施例1と同様にして、表2及び3に示した実施例2~18の合成ポリペプチド結合ビーズを調整し、乾燥剤(シリカゲル)を入れた密閉容器中で冷蔵保存した。

尚、複数の合成ポリペプチドを組み合わせて使用する場合(実施例12~18)、各合成ポリペプチドの量は同じとし、総量が2 µg/mLになるようにした。

【0057】

また、免疫反应用緩衝液、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体、酵素標識抗体液、過酸化水素液及び基質液は、実施例1で作成したものをを用いた。

【0058】

<比較例1> GST融合p53蛋白質の作製

特開平9-229933号公報に記載の方法に準じて、4種類の蛋白質、すなわち、p53遺伝子のN末端からのアミノ酸配列が1-112のペプチド、108-310ペプチド、306-393ペプチド、1-393ペプチドとGST(グルタチオンSトランスフェラーゼ)との各融合蛋白質を以下の通り作製した。

【0059】

1. p53遺伝子の調製

ヒト線維芽細胞WI-38のSV40トランスフォーマントであるWI-38VA13よりRNAを抽出した。抽出は、AGPC法を用いて、次のようにして行った。

【0060】

(AGPC法試薬の調製)

(1) 1Mクエン酸ナトリウム(pH7.0)の調製

クエン酸三ナトリウムの29.4gを蒸留水80mlに溶解した後、クエン酸を加えて、pH7.0にあわせた後、水を加えて100mlとした。そして、オートクレーブ(120、20分)してから使用した。

(2) D液の調製

GTC(グアニジウムチオシアネート)236.3g(4M)、ザルコシル 2.5g(0.8重量%)、1Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 12.5ml(25mM)及び蒸留水250mlを85で加温溶解した後、室温に戻し、水で496mlにあわせた。細孔径0.45µmボルトトップフィルターで濾過して保存した。使用時にこの保存溶液50mlに対して2-メルカプトエタノール360µl(0.1M)を加え、D液とした。

(3) 2M酢酸ナトリウム(pH4.0)の調製

酢酸ナトリウム トリハイドレート 27.2gを蒸留水10mlに溶解させた後、酢酸を用いてpH4.0にあわせ、蒸留水を加えて100mlとした。細孔径0.45µmボルトトップフィルターで濾過して使用した。

【0061】

(AGPC法の操作)

(1) チューブにD液0.5mlを加え、WI-38VA13細胞(大日本製薬株式会社より購入)を分散し、細胞を破壊した。

(2) さらに、2M酢酸ナトリウム 50µl、フェノール 0.5ml及びクロロホルム/イソアミルアルコール(体積比49/1) 100µlを順次加え、1種類いれるごとに、チューブを2~3回振り、混ぜた。

(3) 10秒間激しく混ぜた後、15分間氷冷した。

(4) 遠心加速度10,000Gで10、20分間遠心した後、下部に分離した水層を、DNAを含む中間層が混入しないように、別のチューブに分取した。

(5) 分取した水層に、イソプロパノール0.5mlを加え、-20で1時間冷やした。次に、10分間遠心(10,000G、0)し、RNAを沈殿させた。

(6) 沈殿したRNAを0.5mlのD液に再び溶解し、イソプロパノール0.5mlを加え、-20で1時間置く。

(7) 遠心してRNAを沈殿させ、沈殿を80重量%エタノール水溶液1mlで洗い、乾燥させた後、水に溶解する。

【0062】

このようにして抽出したmRNAから、次の反応条件にて、Reverse Transcriptase(RT)反応によりcDNAを作成した。RT反応は、GIBCO/BR LのReverse Transcriptase(商品名 Superscript)を使用した。反応組成は次のとおりである。50mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン/塩酸緩衝液(pH8.3)、75mM塩化カリウム水溶液、3mM塩化マグネシウム水溶液、10mM dNTP(デオキシリボヌクレオシド 5'-トリフォスフェート混合物)、7.5µg/mlのランダムノナー(シグマ社から購入)、RNAsi

n (プロメガ社、RNaseインヒビター)を1000U/ml、RNaseH- (リバーストランスクリプターゼ)を200,000U/ml。

【0063】

2. 組み換え遺伝子の作成及び発現

作成したcDNAを制限酵素BamHIの認識配列を5'末端に有するPCR primerにて増幅後、BamHIにて消化し、pGEX-5X-2ベクターのBamHI部位に組み込んだ。シーケンス法にてインサートが正しく組み込まれていることを確認した後、大腸菌BL21 (DE3), LysS (Novagen社)にトランスフォーム後、0.1mMのイソプロピルチオベータガラクトシド (IPTG)にて37、2時間あるいは25、6時間誘導をかけた。大腸菌の細胞ライゼイトより目的の融合蛋白質をグルタチオンセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィー法にて抽出、精製し、GST融合p53蛋白質 (GST1 [アミノ酸配列1-112を含む]、GST2 [アミノ酸配列108-310を含む]、GST3 [アミノ酸配列306-393を含む]、GST4 [アミノ酸配列1-393を含む])を得た。

【0064】

1. GST融合p53蛋白質結合ビーズ (GSTビーズ) の作成

実施例1のアビジン結合ビーズの作成に準じて作成した。すなわち、GST融合p53蛋白質GST1をpH9の0.1M炭酸緩衝液に20µg/mlの濃度で溶解した。直径3.2mmのポリスチレンビーズ (イムノケミカル社製) 1000個をこの溶液20mlに加え、2~10で48時間静置させて、ポリスチレンビーズにGST1を物理吸着させた。その後、溶液をアスピレーターで吸引除去し、20mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH7.2) でビーズを2回洗浄した後、20mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH7.2) に浸漬して24時間冷蔵で放置した。浸漬液をアスピレーターで吸引除去し、20mLの0.1重量%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH7.2) でビーズを2回洗浄した後、10重量%のショ糖を含むリン酸緩衝液に浸漬後、液をアスピレーターで除き、ビーズをろ紙上に撒き室温で風乾し、GST1結合ビーズ (GST1ビーズ) とし、乾燥剤 (シリカゲル) を入れた密閉容器中で冷蔵保存した。

【0065】

< 比較例2~5 >

1. GST融合p53蛋白質結合ビーズの作成

比較例1と同様にして、表3に示した比較例2~5のGST融合p53蛋白質結合ビーズを調整し、乾燥剤 (シリカゲル) を入れた密閉容器中で冷蔵保存した。

尚、複数のGST融合p53蛋白質を組み合わせて使用する場合 (比較例5)、各GSTの量は同じとし、総量が20µg/mlになるようにした。

2. その他試薬の作成

免疫反応用緩衝液、酵素標識抗体液、過酸化水素液及び基質液、は実施例1で作成したものをを用いた。

【0066】

< 実施例19 >

健常人プール血清及び癌患者血清を測定した例である。

1. 検体

当社ボランティア50名から採取した血清を各0.2mLずつ混合し、健常人プール血清10mLを作成し、又、癌患者から得た血清 (患者1~3) を各10mLを用意し検体として用いた。

【0067】

2. 免疫反応操作

12×75mm試験管中に、免疫測定用緩衝液300µL、検体 (健常人プール血清又は癌患者血清) 10µL、及びPBビーズ又GSTビーズ1個を加え、37で、10分間反応させた。反応液をアスピレーターで除去した後、生理食塩水2mLを加えてビーズを洗浄

し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水 2 mL を加え同様に洗浄した。次に、酵素標識抗体液 300 μ L を、洗浄後のビーズに加え 37 $^{\circ}$ C、10 分反応させた。反応液をアスピレーターで除去し、生理食塩水 2 mL を加えビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去した。さらに生理食塩水 2 mL を加え同様に 2 回洗浄した。洗浄後のビーズについて、酵素活性の測定を行った。

【0068】

3. 酵素活性測定操作

洗浄後のビーズが入った試験管 (12 \times 75 mm) をアロカ社製ルミネッセンスリーダー BLR-201 型のサンプルホルダーにセットし、基質液 200 μ L 及び過酸化水素水 200 μ L を加え化学発光反応を開始した。発光反応開始 40 秒後から 10 秒間の発光量を積算計測し、これを酵素活性を示す発光量とした。なお、表 2 及び 3 中の数値は、上段が発光量を示し、下段は健常人プール血清の発光量を 1.0 としたときの各発光量の相対値である。

【0069】

【表 2】

		合成ポリペプチド又は GST融合p53蛋白質	発光量 (cps)			
			健常人 プール 血清	患者1 血清	患者2 血清	患者3 血清
実	1	PB1	2345 1.0	8641 3.7	21670 9.2	30794 13.1
	2	PB2	2365 1.0	7642 3.2	18624 7.9	24367 10.3
	3	PB3	1867 1.0	2364 1.3	3246 1.7	9864 5.3
	4	PB4	2736 1.0	7597 2.8	3987 1.5	13678 5.0
	5	PB5	2104 1.0	2698 1.3	9760 4.6	16073 7.6
施 例	6	PB6	1967 1.0	3090 1.6	10347 5.3	14062 7.1
	7	PB7	1730 1.0	2980 1.7	15687 9.1	12068 7.0
	8	PB8	2439 1.0	6345 2.6	16781 6.9	3408 1.4
	9	PB9	2467 1.0	3601 1.5	3974 1.6	8634 3.5
	10	PB10	1971 1.0	9680 4.9	26341 13.4	28640 14.5
	11	PB11	1868 1.0	5607 3.0	19790 10.6	24674 13.2
	12	PB1,PB2,PB10,PB11	2261 1.0	18690 8.3	39645 17.5	56971 25.2

【表3】

		合成ポリペプチド又は GST融合p53蛋白質	発光量 (cps)			
			健常人 プール 血清	患者1 血清	患者2 血清	患者3 血清
実 施 例	13	PB1,PB2,PB10,PB11,PB3,PB4	2100 1.0	21067 10.0	40684 19.4	64394 30.7
	14	PB1,PB2,PB10,PB11,PB5	2468 1.0	17964 7.3	42063 17.0	73620 29.8
	15	PB1,PB2,PB10,PB11,PB6	2179 1.0	18304 8.4	44091 20.2	72694 33.4
	16	PB1,PB2,PB10,PB11,PB7,PB8	2069 1.0	21096 10.2	46803 22.6	70678 34.2
	17	PB1,PB2,PB10,PB11,PB9	2542 1.0	18063 7.1	40640 16.0	60117 23.6
	18	PB1,PB2,PB10,PB11,PB3,PB4, PB5,PB6,PB7,PB8,PB9	2406 1.0	26784 11.1	52310 21.7	89672 37.3
比 較 例	1	GST1	5863 1.0	17936 3.1	41367 7.1	61670 10.5
	2	GST2	7306 1.0	10631 1.5	24304 3.3	30973 4.2
	3	GST3	6431 1.0	18679 2.9	36219 5.6	43679 6.8
	4	GST4	8034 1.0	18634 2.3	40607 5.1	53724 6.7
	5	GST1,GST2,GST3	6246 1.0	19682 3.2	43064 6.9	63713 10.2

【0070】

4. 測定結果

結果を表2及び3に示した。実施例では比較例に比べ、健常人プール血清の発光量が低く、発光量比(表中下段の数値で、各測定発光量を健常人プール血清の測定発光量で除した値)が大きいことが判る。又、患者血清では個別のPBに対して反応性が低い場合があっても、複数のPBを組み合わせることにより感度が向上することが判る。

【0071】

<実施例20>

複数の健常人血清を測定して基準値を求め、カットオフ値を設定し、癌患者10名からの血清を測定し、p53遺伝子産物に対する自己抗体の有無を判断した例である。

【0072】

1. 検体の測定

実施例18で調整した合成ポリペプチド結合ビーズ(固相化PB1, PB2, PB10, PB11, PB3, PB4, PB5, PB6, PB7, PB8, PB9)及び比較例5で作成したGST融合p53蛋白質結合ビーズ(固相化GST1, GST2, GST3)を

用いて、実施例 19 の方法で、健常人ボランティア 120 名からの血清検体及び実施例 19 の健常人プール血清を測定した。

健常人ボランティア 120 名の測定値（発光量）の分布を図 1（実施例 18）及び 2（比較例 5）に示した。図 1 の通り実施例 18 の合成ポリペプチド結合ビーズでは発光量が低く、分布の範囲も狭いが、比較例 5 の GST 融合 p53 蛋白質結合ビーズ（図 2）では発光量が高く、分布の範囲も広いことが判った。なお、図の横軸は発光量（cps）であり、点は検体の分布（1 点が 1 検体に対応）を示す。

【0073】

2. カットオフ値の設定

健常人の測定値（発光量）を統計処理ソフト「STATFLEX v. 4.1」（アーテック社製）を用いて分布型を解析した結果、実施例 18 の合成ポリペプチド結合ビーズについての発光量分布は、歪度 1.49、尖度 4.90 であるのに対して、比較例 5 の GST 融合 p53 蛋白質結合ビーズについての発光量分布は、歪度 1.98、尖度 7.24 であった。なお、いずれの分布も正規分布していなかった。ノンパラメトリック法で 95% の信頼区間を求めたところ、実施例 18 の合成ポリペプチド結合ビーズについての基準値は、発光量 1245 ~ 9397 であったのに対して、比較例 5 の GST 融合 p53 蛋白質結合ビーズについての基準値は、発光量 3771 ~ 17530 であった。ここで上限発光量の 1.5 倍の発光量をカットオフ値と設定すると、実施例 18 について発光量 14095、比較例 5 について発光量 26294 であった。この時、実施例 18 についての健常人プール血清の発光量は 2406 であり、カットオフ値の $1/5.86$ であり、比較例 5 についての健常人プール血清の発光量は 6246 であり、カットオフ値の $1/4.21$ であった。従って、健常人プール血清を、陰性コントロールとして測定した場合、実施例 18 の合成ポリペプチド結合ビーズではカットオフ値 = 「健常人プール血清測定発光量」 $\times 5.86$ と設定され、一方、比較例 5 の GST 融合 p53 蛋白質結合ビーズではカットオフ値 = 「健常人プール血清測定発光量」 $\times 4.21$ と設定された。

【0074】

3. 検体の測定

表 4 記載の癌患者 10 名（患者 4 ~ 13）から採取した血清検体及び陰性コントロールとして実施例 19 で作成した健常人プール血清を測定した。測定は、実施例 18 の合成ポリペプチド結合ビーズ、及び比較例 5 の GST 融合 p53 蛋白質結合ビーズを用いて実施例 19 と同様に行った。

4. 判定結果

健常人プール血清を陰性コントロールとし、実施例 20 で設定し係数でカットオフ値（「健常人プール血清測定発光量」 \times 係数）を求めた。カットオフ値以上（カットオフ比 1.0 以上）の測定値を自己抗体陽性、カットオフ値未満（カットオフ比 1.0 未満）の測定値を自己抗体陰性と判断した。結果を表 4 に示した。

【0075】

【表 4】

検体	実施例18の合成ポリペプチド結合ビーズ			比較例5のGST融合p53蛋白質結合ビーズ		
	発光量 (cps)	カットオフ比	判定	発光量 (cps)	カットオフ比	判定
健常人プール血清	2540	—	—	6468	—	—
患者4	96342	6.5	陽性	64368	2.4	陽性
患者5	25342	1.7	陽性	23608	0.9	陰性
患者6	13480	0.9	陰性	16498	0.6	陰性
患者7	45370	3.0	陽性	51302	1.9	陽性
患者8	20677	1.4	陽性	21367	0.8	陰性
患者9	168037	11.3	陽性	263410	9.7	陽性
患者10	29067	2.0	陽性	25782	0.9	陰性
患者11	80734	5.4	陽性	94682	3.5	陽性
患者12	16386	1.1	陽性	31098	1.1	陽性
患者13	216347	14.5	陽性	187036	6.9	陽性
カットオフ値	14884	1.0	—	27230	1.0	—

表4から、比較例5のGST融合p53蛋白質結合ビーズではカットオフ値が高く、相対的に癌患者の発光量が低くなる（カットオフ比が小さくなる）ため、陰性と判定され頻度が高くなった。これは、健常人検体の測定値が、非特異吸着等の原因で、その分布が広いことに起因している。

これに対して、実施例18の合成ポリペプチド結合ビーズではカットオフ値と癌患者検体の発光量差が大きく（カットオフ比が大きく）、自己抗体陰性と判断される頻度が小さかった。

【0076】

【発明の効果】

本発明のp53遺伝子産物に対する自己抗体を検出するための免疫測定用試薬は、非特異的反応が少なく、感度及び特異性に極めて優れている。すなわち、自己抗体を保有しない健常人からの検体の測定値と自己抗体を保有する癌患者からの検体の測定値との差が十分に大きく（高感度）、また自己抗体を保有しない健常人の検体に対して非特異的反応が極めて少ないので高精度の測定ができる。従って、本発明の測定試薬、測定試薬キット及び測定法によると、癌の極めて正確な診断が可能となる。

【0077】

【配列表】

<110>三洋化成工業株式会社 ; SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

<120>抗癌遺伝子産物自己抗体測定用試薬

<160>62

<210>1

<211>50

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Ser	Asp	Pro	Ser	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr	Phe	Ser	Asp
1				5				10						15	
Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Asn	Val	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Ser
			20					25						30	
Gln	Ala	Met	Asp	Asp	Leu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Ile	Glu	Gln	Trp
		35					40						45		
Phe	Thr														
	50														

<210>2

<211>30

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>2

Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Trp	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser
1				5					10					15	
Val	Pro	Ser	Gln	Lys	Thr	Tyr	Gln	Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg		
			20					25					30		

<210>3

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>3

Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn
 1 5 10 15
 Lys Met Phe Cys
 20

<210>4

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>4

Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val
 1 5 10 15
 Val Val Pro Tyr
 20

<210>5

<211>45

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>5

Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg
 20 25 30
 Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg

35

40

45

<210>6

<211>25

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>6

Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro

1

5

10

15

Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn

20

25

<210>7

<211>43

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>7

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser

1

5

10

15

Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys

20

25

30

Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp

35

40

<210>8

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>8

Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser

1

5

10

<210>9

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>9

Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu

1

5

10

<210>10

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>10

Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu

1

5

10

<210>11

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>11

Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu
 1 5 10

<210>12

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>12

Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr
 1 5 10

<210>13

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>13

Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp
 1 5 10 15

Leu Trp Lys Leu
 20

<210>14

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>14

Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val
 1 5 10 15

Leu Ser Pro Leu

20

<210>15

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>15

Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp

1

5

10

15

Asp Leu Met Leu

20

<210>16

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>16

Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu

1

5

10

15

Gln Trp Phe Thr

20

<210>17

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>17

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu

1

5

10

15

<210>18

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>18

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile
1 5 10

<210>19

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>19

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser
1 5 10

<210>20

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>20

Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln
1 5 10

<210>21

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>21

Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg
 1 5 10

<210>22

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>22

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser
 1 5 10 15

<210>23

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>23

Ser Trp Pro Leu Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser
 1 5 10 15

Tyr Gly Phe Arg
 20

<210>24

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>24

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser
 1 5 10 15

<210>25

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>25

Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr

1 5 10

<210>26

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>26

Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr

1 5 10

<210>27

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>27

Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys

1 5 10

<210>28

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>28

Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
1 5 10

<210>29

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>29

Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys
1 5 10

<210>30

<211>8

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>30

Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr
1 5

<210>31

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>31

Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn
1 5 10

<210>32

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>32

Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr

1 5 10

<210>33

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>33

Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg

1 5 10

<210>34

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>34

Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr

1 5 10

<210>35

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>35

Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val

1 5 10

<210>36

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>36

Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly
1 5 10

<210>37

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>37

Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile
1 5 10

<210>38

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>38

Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu
1 5 10

<210>39

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>39

Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg
1 5 10 15

<210>40

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>40

Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro
1 5 10 15

<210>41

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>41

Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser
1 5 10 15

<210>42

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>42

Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu
1 5 10

<210>43

<211>12

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>43

Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg

1

5

10

<210>44

<211>20

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>44

Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile

1

5

10

15

Ile Thr Leu Glu

20

<210>45

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>45

Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro

1

5

10

<210>46

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>46

Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His

1 5 10

<210>47

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>47

His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn

1 5 10

<210>48

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>48

Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro

1 5 10

<210>49

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>49

Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly

1 5 10

<210>50

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>50

Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn

1

5

10

<210>51

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>51

Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser

1

5

10

<210>52

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>52

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly

1

5

10

<210>53

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>53

Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys
1 5 10

<210>54

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>54

Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His
1 5 10

<210>55

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>55

Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
1 5 10

<210>56

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>56

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala
1 5 10

<210>57

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>57

Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln

1 5 10

<210>58

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>58

Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe

1 5 10

<210>59

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>59

Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp

1 5 10

<210>60

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>60

Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His

1 5 10

<210>61

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>61

Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Leu	Met	Phe
1				5					10					15

<210>62

<211>393

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>62

Met	Glu	Glu	Pro	Gln	Ser	Asp	Pro	Ser	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln
1				5					10						15
Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Asn	Val	Leu
			20					25						30	
Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Gln	Ala	Met	Asp	Asp	Leu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp
		35					40					45			
Asp	Ile	Glu	Gln	Trp	Phe	Thr	Glu	Asp	Pro	Gly	Pro	Asp	Glu	Ala	Pro
	50					55					60				
Arg	Met	Pro	Glu	Ala	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro
65					70					75					80
Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Trp	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser
				85					90					95	
Val	Pro	Ser	Gln	Lys	Thr	Tyr	Gln	Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly
			100					105					110		
Phe	Leu	His	Ser	Gly	Thr	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro
			115					120					125		

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
 130 135 140
 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160
 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175
 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240
 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270
 His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300
 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320
 Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335
 Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350
 Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His

专利名称(译)	用于检测针对p53基因产物的自身抗体的免疫测定试剂		
公开(公告)号	JP2004231535A	公开(公告)日	2004-08-19
申请号	JP2003019760	申请日	2003-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
[标]发明人	國近誠		
发明人	國近 誠		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/00 C07K14/47 G01N33/564		
FI分类号	C07K14/47 G01N33/53.D G01N33/564.ZNA.Z C07K7/00 G01N33/564.ZZN.A		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/CA40 4H045/EA51		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于检测针对p53基因产物的自身抗体的免疫测定试剂，其灵敏度和特异性极佳。一种用于检测针对p53基因产物的自身抗体的免疫测定试剂，其包括Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr和其他氨基酸序列，其氨基酸序列为8至50 使用特征在于包含肽的免疫测定试剂。 [选择图]无

合成ポリペプチド	合成ポリペプチドを構成するアミノ酸配列
P 1	Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu (1 7)
P 2	Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile (1 8)
P 3	Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser (2 4)
P 4	Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr (2 5)
P 5	Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr (3 0)
P 6	Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val (3 5)
P 7	Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu (4 4)
P 8	Asn Ser Phe Glu Val His Val Cys Ala Cys Pro (4 5)
P 9	Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser (5 1)
P 1 0	Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His (6 0)
P 1 1	Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe (6 1)