

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3799410号
(P3799410)

(45) 発行日 平成18年7月19日(2006.7.19)

(24) 登録日 平成18年5月12日(2006.5.12)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/571 (2006.01)	GO 1 N 33/571	
CO 7 K 7/06 (2006.01)	CO 7 K 7/06	
CO 7 K 14/20 (2006.01)	CO 7 K 14/20	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B

請求項の数 10 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2002-145225 (P2002-145225)	(73) 特許権者	000131474
(22) 出願日	平成14年5月20日(2002.5.20)		株式会社シノテスト
(65) 公開番号	特開2003-337134 (P2003-337134A)		東京都千代田区神田神保町一丁目56番地
(43) 公開日	平成15年11月28日(2003.11.28)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成15年7月4日(2003.7.4)		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100101904
			弁理士 島村 直己
		(72) 発明者	東 義則
			神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社 シノテスト 相模原事業所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非特異反応抑制ペプチド、並びにこれを用いた非特異反応抑制方法及び抗体測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)又は(b)のペプチド:

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の欠失、付加、置換又は修飾を有するアミノ酸配列からなるペプチドであって、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有し、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質の抗原性を示さないペプチド。

【請求項2】

以下の(a)又は(b)のペプチド:

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の欠失、付加、置換又は修飾を有するアミノ酸配列からなるペプチドであって、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有し、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質の抗原性を示さないペプチド。

【請求項3】

トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において使用するための、請求項1又は2に記載のペプチドを含

む非特異反応抑制剤。

【請求項 4】

トレポネーマ・パリダム 47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において使用するための、請求項 1 又は 2 に記載のペプチドを含む抗トレポネーマ・パリダム抗体測定試薬。

【請求項 5】

トレポネーマ・パリダム 47Kダルトン抗原タンパク質をさらに含む、請求項 4 に記載の試薬。

【請求項 6】

トレポネーマ・パリダム 47Kダルトン抗原タンパク質が遺伝子組み換え技術を用いて 10
産生される、請求項 5 に記載の試薬。

【請求項 7】

トレポネーマ・パリダム 47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において、請求項 1 又は 2 に記載のペプチドを試料と接触させて非特異反応を抑制する方法。

【請求項 8】

トレポネーマ・パリダム 47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法であって、請求項 1 又は 2 に記載のペプチドを試料と接触させることを含む免疫測定方法。

【請求項 9】

20
トレポネーマ・パリダム 47Kダルトン抗原タンパク質が遺伝子組み換え技術を用いて産生される、請求項 8 に記載の免疫測定方法。

【請求項 10】

請求項 1 又は 2 に記載のペプチド及びトレポネーマ・パリダム 47Kダルトン抗原タンパク質を固定化した担体を含む抗トレポネーマ・パリダム抗体測定用の免疫測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、トレポネーマ・パリダム (*Treponema Pallidum*; 以下 TP
と略すこともある) 抗原を使用した抗 TP 抗体の測定において非特異反応を抑制する物質 30
、該物質を用いる非特異反応抑制方法、該物質を含む抗 TP 抗体測定試薬及びこれらを用いる抗 TP 抗体測定方法に関する。

本発明は、臨床検査、免疫学及び医学などの生命科学分野、分析化学などの化学分野、食品衛生分野、並びに環境衛生分野等において有用なものである。

【0002】

【従来の技術】

梅毒は、トレポネーマ・パリダムにより引き起こされる感染症であり、梅毒に感染しているか否かは、主に梅毒血清反応による梅毒抗体の検出により判断されている。この梅毒血清反応には、カルジオリピン又はレシチン等のリン脂質を抗原として用いる抗脂質抗体測定方法 (*serological test for syphilis*; 以下 STS 法と略すこともある) 及び TP 菌体又は菌体成分を抗原として用いる抗 TP 抗体測定方法がある 40

【0003】

STS 法としては、ガラス板法、RPR 法等が、抗 TP 抗体測定方法としては、蛍光抗体法 (*fluorescent treponema antibody absorption test*; FTA-ABS 法)、受身赤血球凝集反応 (*TP hemagglutination test*; TPHA 法)、粒子凝集法 (*Treponema Pallidum Particle Agglutination*; TPPA 法)、酵素免疫測定方法 (*enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA 法)、ラテックス凝集法 (*TP latex agglutination*; TPLA 法) 及び 50

イムノクロマトグラフィー法等が日常検査に利用されている。特に T P 抗原を用いる抗 T P 抗体測定方法は梅毒に対する特異性が高く、日常検査に広く利用されている。

【 0 0 0 4 】

この抗 T P 抗体測定方法に使用される T P 抗原は、従来より T P 菌体から精製されたものが用いられている。例えば、T P 抗原の表面抗原タンパク質を抗原として用いることができる。このような表面抗原タンパク質としては、15 Kダルトン抗原タンパク質、17 Kダルトン抗原タンパク質及び47 Kダルトン抗原タンパク質等の存在が知られており、これらを使用することができる。

【 0 0 0 5 】

また、近年では遺伝子組み換え技術を用いて、T P 抗原を大腸菌等の宿主細胞に産生させることも行われている。これら表面抗原タンパク質のアミノ酸配列やその遺伝子の塩基配列は既に報告されているので(15 Kダルトン抗原タンパク質: Molecular Microbiology 4巻、1371~1379頁、1990年; 17 Kダルトン抗原タンパク質: Infection and Immunity 61巻、1202~1210頁、1993年; 47 Kダルトン抗原タンパク質: Infection and Immunity 60巻、1568~1576頁、1992年)、遺伝子組み換え技術を用いてこれらの表面抗原タンパク質を産生することが可能となっている。

10

【 0 0 0 6 】

しかしながら、これらの T P 抗原を使用した抗 T P 抗体測定方法においては、測定する試料によっては、試料中に抗 T P 抗体が存在しないにも関わらず非特異反応により偽陽性を示すことがあり、患者などの疾病の診断を誤らせる危険性があった。この現象は、検体中に含まれる抗体以外の成分が抗原等に反応することによって引き起こされるものと考えられる。

20

【 0 0 0 7 】

この非特異反応を抑制する方法として、種々の方法が提供されている。例えば、特開昭58-144748号公報には、非特異反応を抑制するために試薬中にウシ血清アルブミンやウマ血清アルブミン等を添加する技術が示されており、特開平8-105897号公報には、非特異反応を抑制するために塩化ナトリウムを添加する技術が示されている。特開平8-176195号公報には、非特異反応を抑制するために化学修飾した還元アルブミンをブロッキング剤として使用する方法が示されている。また、特公平3-59382号公報には、非特異反応を抑制するために遺伝子組み換えに用いたものと同種であるが遺伝子組み換え操作が行われていない宿主細菌成分を用いる技術が示されている。更に、特許第3206311号公報には、抗原をコードする遺伝子を含まない、抗原産生に用いたものと同種のベクターを組み込んだ培養細胞成分を用いる技術が示されている。しかし、これらの技術は、非特異反応を抑制するには必ずしも十分なものとはいえなかった。

30

【 0 0 0 8 】

【 発明が解決しようとする課題 】

前記したように、T P 抗原を使用した抗 T P 抗体の測定においては、測定する試料によっては、試料中に抗 T P 抗体が存在しないにも関わらず、非特異反応により、偽陽性を示すことがあるという問題があった。

40

従って、本発明の課題は、T P 抗原を使用した抗 T P 抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制し、梅毒の診断の場において正確な測定を行うことにより、診断を誤ることを防止する手段を提供することである。

【 0 0 0 9 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、T P 抗原タンパク質の抗原性を示さないが非特異反応抑制効果を有している T P 抗原タンパク質の断片を非特異反応抑制剤として用いることにより、前記課題が解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

50

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 配列番号4～36のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチドであって、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有するペプチド。

【0011】

(2) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなり配列番号1における少なくとも5個の連続したアミノ酸配列を含むペプチド、又は該ペプチドを含み、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有するペプチド。

【0012】

(3) 配列番号2に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなり配列番号2における少なくとも5個の連続したアミノ酸配列を含むペプチド、又は該ペプチドを含み、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有するペプチド。

【0013】

(4) 配列番号1に記載のアミノ酸配列又はその一部からなるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の欠失、付加、置換又は修飾を有するアミノ酸配列からなるペプチドであって、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有するペプチド。

【0014】

(5) 配列番号2に記載のアミノ酸配列又はその一部からなるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の欠失、付加、置換又は修飾を有するアミノ酸配列からなるペプチドであって、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有するペプチド。

【0015】

(6) トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質の抗原性を示さない、(1)～(5)のいずれかに記載のペプチド。

(7) トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において使用するための、(1)～(6)のいずれかに記載のペプチドを含む非特異反応抑制剤。

【0016】

(8) トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において使用するための、(1)～(6)のいずれかに記載のペプチドを含む抗トレポネーマ・パリダム抗体測定試薬。

(9) トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質をさらに含む、(8)に記載の試薬。

【0017】

(10) トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質が遺伝子組み換え技術を用いて産生される、(9)に記載の試薬。

(11) トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において、(1)～(6)のいずれかに記載のペプチドを試料と接触させて非特異反応を抑制する方法。

【0018】

(12) トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法であって、(1)～(6)のいずれかに記載のペプチドを試料と接触させることを含む免疫測定方法。

(13) トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質が遺伝子組み換え技術を用いて産生される、(12)に記載の免疫測定方法。

10

20

30

40

50

(14)(1)~(6)のいずれかに記載のペプチド及びトレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を固定化した担体を含む抗トレポネーマ・パリダム抗体測定用の免疫測定キット。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明のペプチドは、トレポネーマ・パリダム抗原タンパク質を用いて試料中の抗TP抗体を測定する免疫測定方法において、非特異反応を抑制する活性を有する。本発明のペプチドを使用できる免疫測定方法は、トレポネーマ・パリダムの47Kダルトン抗原タンパク質の使用を含む方法であれば特に限定されない。本発明において免疫測定方法とは、当技術分野における通常の意味を有し、抗原と抗体との抗原抗体反応を利用して、試料中の抗TP抗体の検出を行う免疫測定方法を意味する。

10

【0020】

このような免疫測定方法としては、例えば、ラテックス比濁法；ラテックス凝集反応測定法などの間接凝集反応測定法；酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法若しくは発光免疫測定法などの標識物質を用いる標識免疫測定法；ウエスタンブロット法；ELISA法(enzyme-linked ligandsorbent assay)〔Dahlbeackら、Thromb. Haemost., 79巻、767~772頁、1998年；WO98/23963号公報〕；イムノクロマトグラフィ法；又は特開平9-229936号公報及び特開平10-132819号公報等に記載された、被検物質に対する特異的結合物質が固定化され被覆された面を有する担体並びに被検物質に対する特異的結合物質が固定化された粒子を用い、該粒子が担体における上記面に集まるか否かにより測定を行う方法等を挙げることができる。標識免疫測定法を用いる場合は、サンドイッチ法、競合法又は均一系法(ホモジニアス系法)等のいずれの方法においても本発明を適用することができる。本発明では、ラテックス比濁法、又は特開平9-229936号公報及び特開平10-132819号公報等に記載された、被検物質に対する特異的結合物質が固定化され被覆された面を有する担体並びに被検物質に対する特異的結合物質が固定化された粒子を用い、該粒子が担体における上記面に集まるか否かにより測定を行う方法を用いるのが好ましい。

20

【0021】

測定は、用手法によって行ってもよいし、分析装置等の装置を用いて行ってもよい。測定は、1ステップ法(1試薬法)により実施してもよいし、又は2ステップ法(2試薬法)等の複数の操作ステップを含む方法によって実施してもよい。

30

【0022】

本発明において、上記のような抗TP抗体の免疫測定方法において使用するTP抗原は、少なくともTP47Kダルトン抗原タンパク質が含まれているものであれば特に限定されない。TP47Kダルトン抗原タンパク質に加えて、その他の抗原タンパク質を含んでもよい。トレポネーマ・パリダムの表面抗原タンパク質、例えば、TP15Kダルトン抗原タンパク質又はTP17Kダルトン抗原タンパク質を含むのが好ましい。抗原として用いる抗原タンパク質は、TP47Kダルトン抗原タンパク質1種類でも又は数種類の抗原タンパク質の混合物でもよいが、数種類の抗原タンパク質の混合物を使用するのが好ましい。これらの抗原タンパク質が複数結合した状態のものを用いてもよい。これらの抗原タンパク質は、トレポネーマ・パリダム菌体から精製したものであってもよいし、遺伝子組み換え技術を用いて得られたものであってもよい。TP47Kダルトン抗原タンパク質は、均質なものが継続的かつ安価に調製できることから、遺伝子組み換え技術を用いて得られたものを使用するのが好ましい。

40

【0023】

遺伝子組み換え技術を用いて抗原タンパク質を産生する場合には、当技術分野で通常用いられている方法を用いることができる。例えば、抗原タンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、得られた遺伝子をプラスミド等の発現ベクターへ組み込み、この発現ベクターを大腸菌等の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培養することにより目的のタ

50

ンパク質を発現させることができる。遺伝子をクローニングする方法としては、例えば、PCR法、リコンビナントPCR法、ライゲーション法又はリンカーライゲーション法等を挙げることができる。

【0024】

そして、この遺伝子組み換え技術により人為的に調製したTP47Kダルトン抗原タンパク質は、他のタンパク質と融合しているものであってもよい。融合させる他のタンパク質としては、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースバインディングプロテイン(MBP)、チオレドキシン、 α -ガラクトシダーゼ、ラクターゼ、ビオチン化タンパク質、プロテインA又はジーン10等を挙げることができる。

【0025】

トレポネマ・パリダム菌体から抗原タンパク質を精製する場合は、界面活性剤や超音波破碎等で菌体から抽出することによって得ることができる。更に、菌体から抽出した抗原タンパク質をゲルろ過、イオン交換、又はハイドロキシアパタイト等で精製することによって得ることもできる。

【0026】

本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を含むアミノ酸数3以上、好ましくは3~200、より好ましくは50~200のペプチドであって、TP47Kダルトン抗原タンパク質を用いる抗トレポネマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有し、TP抗原タンパク質の抗原性を有しないペプチドに関する。ここで配列番号1に記載のアミノ酸配列は、トレポネマ・パリダムの47Kダルトン抗原タンパク質のアミノ酸配列における126~295番目に相当するアミノ酸配列である。このようなペプチドとしては、以下の配列番号4~36に記載のアミノ酸配列を含むペプチドを挙げることができる。

(1) EGAVALLADRA (配列番号4)

(2) LADRASSFMV (配列番号5)

(3) SSFMVDSE EY (配列番号6)

(4) DSE EYKITNV (配列番号7)

(5) KITNVKVHGM (配列番号8)

(6) KVHGMKFVPV (配列番号9)

(7) KFVPVAVPHE (配列番号10)

(8) AVPHELKGLIA (配列番号11)

(9) LKGLIAKEKFH (配列番号12)

(10) KEKFHFVEDS (配列番号13)

(11) FVEDSRVTEN (配列番号14)

(12) RVTENTNGLK (配列番号15)

(13) TNLKTMLTE (配列番号16)

(14) TMLTEDS FSA (配列番号17)

(15) DSFSARKVSS (配列番号18)

(16) RKVSSMESPH (配列番号19)

(17) MESPHDLVVD (配列番号20)

(18) DLVVDTVGTG (配列番号21)

(19) TVGTGYHSRF (配列番号22)

(20) YHSRFGSDAE (配列番号23)

(21) GSDAEASVML (配列番号24)

(22) ASVMLKRADG (配列番号25)

(23) KRADGSEL SH (配列番号26)

(24) SEL SHREFID (配列番号27)

(25) REFIDYVMNF (配列番号28)

(26) YVMNFNTVRY (配列番号29)

(27) NTVRYDY YGD (配列番号30)

10

20

30

40

50

(28) D Y Y G D D A S Y T (配列番号31)
 (29) D A S Y T N L M A S (配列番号32)
 (30) N L M A S Y G T K H (配列番号33)
 (31) Y G T K H S A D S W (配列番号34)
 (32) S A D S W W K T G R (配列番号35)
 (33) W K T G R V P R I S (配列番号36)

【0027】

上記のペプチドのうち、トレポネーマ・パリダムの47Kダルトン抗原タンパク質のアミノ酸配列における165～244番目に相当する配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むペプチドが好ましく。配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むペプチドがより好ましい。本発明のペプチドには、配列番号1又は2に記載のアミノ酸配列又はその一部からなるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の欠失、付加、置換又は修飾を有するアミノ酸配列からなるペプチドであって、トレポネーマ・パリダム47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原を用いる抗トレポネーマ・パリダム抗体の免疫測定方法において非特異反応を抑制する活性を有し、TP47Kダルトン抗原タンパク質の抗原性を有しないペプチドも包含される。ここで数個とは1～10個、好ましくは1～5個を意味する。これらのペプチドの長さは、特に限定されないが、アミノ酸数3以上、好ましくはアミノ酸数3～200、より好ましくはアミノ酸数50～200である。

10

本発明においてペプチドとは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合により結合したものを意味し、オリゴペプチド、ポリペプチド及びタンパク質を包含する。

20

【0028】

更に、本発明に使用されるペプチドは、非特異反応抑制効果が維持され、かつ融合体自体が非特異反応を起こさないものであれば、他のタンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質残基又はアミノ酸等が結合しているものであってもよい。ここで、他のタンパク質としては、本発明のペプチドを効率よく発現又は精製等させるためのタンパク質、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースバインディングプロテイン(MBP)、チオレドキシン、 β -ガラクトシダーゼ、ラクターゼ、ビオチン化タンパク、プロテインA又はジーン10等を挙げることができる。

【0029】

上記のような本発明のペプチドは、当技術分野で通常用いられる方法で調製することができる。このような方法としては特に限定されないが、例えば、化学合成法、遺伝子組み換え技術等の方法を用いることができる。

30

遺伝子組み換え技術を用いる場合は、例えば、まず目的とするペプチドをコードする遺伝子をクローニングし、得られた遺伝子をプラスミド等の発現ベクターへ組み込む。この発現ベクターを大腸菌等の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培養することにより目的のペプチドを発現させることができる。

【0030】

遺伝子をクローニングする方法としては、例えば、PCR法、リコンビナントPCR法、ライゲーション法又はリンカーライゲーション法等を挙げることができる。例えば、PCR法を用いる場合には、目的とする塩基配列をプライマーを用いて増幅させることができる。

40

【0031】

例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列の全体からなるペプチドを発現させるためには、まず、PCR法を用いてTP47Kダルトン抗原タンパク質のアミノ酸配列中における配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子の塩基配列を、プライマーを用いて増幅することにより得る。このようにして得られた遺伝子の塩基配列をライゲーション法等により発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを大腸菌に導入し、得られた形質転換体を培養することにより、配列番号1に記載のアミノ酸配列の全体に一致するアミノ酸配列からなるペプチドを発現させることができる。

【0032】

50

本発明のペプチドを用いて抗体測定における非特異反応を抑制する場合の、該ペプチドの使用方法は、測定しようとする試料と本発明の非特異反応抑制ペプチドを接触させることができれば特に限定されない。例えば、緩衝液等に含有させた本発明のペプチドを、抗体測定反応の前に試料と接触させ、あらかじめ非特異反応を抑制させる方法が挙げられる。又は、TP47Kダルトン抗原タンパク質を含む抗原が存在する試薬中に本発明のペプチドを含有させ、この試薬と試料を接触させて抗体測定反応を行い、試料中の抗TP抗体と抗原との反応の際に本発明のペプチドを共存させる方法でもよい。あるいは、これらの2つの方法を組み合わせさせた方法でもよい。

【0033】

本発明において試料とは、抗TP抗体が存在する可能性があり、かつ抗TP抗体の存在の有無又は含有量(濃度)の測定を行う対象を意味し、例えば、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿、唾液等の体液等を挙げることができる。

使用するペプチドの量は、抗TP抗体測定時に生じる非特異反応の強さに応じて変更ことができ、非特異反応を吸収するのに十分な濃度を適宜設定すればよい。例えば、抗体測定時に存在する本発明のペプチドの濃度が、好ましくは0.0001%(w/v)以上、より好ましくは0.0001~1%(w/v)、さらに好ましくは0.01~1%(w/v)の濃度となるような量で使用するのが好ましい。

【0034】

本発明のペプチドを含有させる上記緩衝液は、特に限定されないが、例えば、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液、リン酸緩衝液若しくはリン酸緩衝生理食塩水などの各種緩衝液等を挙げることができる。緩衝液中に反応促進剤及び安定剤等の添加剤をさらに含有させてもよい。従来技術において使用されているような別の非特異反応抑制物質等と共に使用することもできる。

【0035】

例えば、抗TP抗体測定方法としてラテックス比濁法を使用して2ステップ法により測定を行う場合は、緩衝液からなる第1試薬に本発明のペプチドを含有させ、これをあらかじめ試料と接触させることにより、抗TP抗体の測定を行う前に非特異反応を抑制させ、その後これをTP抗原が固定化されたラテックス粒子が存在する第2試薬と接触させることができる。また、TP抗原が固定化されたラテックス粒子が存在する第2試薬中に本発明のペプチドを含有させ、この第2試薬を、試料と第1試薬との混合物に接触させて抗体測定反応を行い、抗TP抗体の測定反応時に本発明のペプチドを共存させてもよい。あるいは、これらの2つの方法を組み合わせ使用してもよい。

抗体測定方法として担体を用いる測定方法を使用する場合、使用する担体の種類や形状は特に限定されず、当技術分野で通常使用されるものを用いることができる。

【0036】

ラテックス比濁法に使用可能な担体としては、特に限定されないが、例えば、ポリスチレン・ラテックス粒子、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体・ラテックス粒子、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体・ラテックス粒子、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体・ラテックス粒子、酢酸ビニル-アクリル酸共重合体・ラテックス粒子、ポリアクリロイン・ラテックス粒子、スチレン-メタクリル酸共重合体・ラテックス粒子、スチレン-グリシジル(メタ)アクリル酸共重合体・ラテックス粒子、メタクリル酸重合体・ラテックス粒子、又はアクリル酸重合体・ラテックス粒子などの合成高分子粒子を均一に懸濁させたラテックス粒子等を挙げることができる。

【0037】

粒子凝集反応測定法又はラテックス凝集反応測定法などの間接凝集反応測定法において使用可能な担体としては、特に限定されないが、例えば、ポリスチレン、リポソーム、ラテックス、ゼラチン、ポリアクリルアミド、マイクロカプセル若しくはエマルジョン等の有機高分子物質よりなる粒子、ガラス、シリカゲル、カーボン若しくはペントナイト等の無機高分子物質よりなる粒子又はその他の人工担体等を挙げることができる。

【0038】

10

20

30

40

50

上記の担体粒子は、色素を被覆するか又は色素を粒子中に分散若しくは封入させることにより着色したものでよい。担体粒子の粒径については、特に限定されないが、その平均粒子径が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲内にあることが好ましく、 $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲内にあることがより好ましい。また、これらの粒子の比重は、 $1 \sim 10$ の範囲内にあることが好ましく、 $1 \sim 2$ の範囲内にあることがより好ましい。

【0039】

また、間接凝集反応測定法においては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリメタクリレートなどからなる試験管、マイクロプレート（マイクロタイタープレート）又はトレイ等の容器を担体として使用することもできる。このような容器の溶液収容部分、すなわち、マイクロプレートのウェル等の底面の形状は、特に限定されないが、U型、V型又はUV型のように底面中央から周辺にかけて傾斜をもつ形状であることが好ましい。

10

【0040】

また、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法若しくは発光免疫測定法などの標識物質を用いる標識免疫測定法において使用できる担体としては、特に限定されないが、例えば、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ラテックス、リポソーム、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース若しくはガラス等の材質よりなる粒子、マイクロカプセル、ビーズ、マイクロプレート（マイクロタイタープレート）、試験管、スティック又は試験片等を挙げることができる。

20

【0041】

また、特開平9-229936号公報及び特開平10-132819号公報などに記載された、被検物質（被検物質）に対する特異的結合物質が固定化され被覆された面を有する担体並びに被検物質（被検物質）に対する特異的結合物質が固定化された粒子を用いる測定法において使用できる担体としては、特に限定されないが、例えば、ポリスチレン、ガラス、ポリ塩化ビニル、ポリアクリレート、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリメタクリレート等の非吸水性の材料からなる担体が挙げられる。本発明においては、上記の担体を強磁性体で被覆するか又は担体成型時に強磁性体を含ませて調製した磁性担体等を用いることもできる。

【0042】

標識免疫測定法において使用される標識は、当技術分野で通常用いられるものであれば、特に限定されないが、酵素標識を用いるのが好ましい。酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、ウレアーゼ、リゾチーム、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、リボヌクレアーゼ等が挙げられる。

30

【0043】

本発明において抗TP抗体測定試薬とは、前記した抗TP抗体の免疫測定方法において使用するための試薬を意味する。抗TP抗体測定試薬としては、本発明のペプチドを含む試薬、さらにTP47Kダルトン抗原タンパク質を含む試薬が挙げられる。抗原タンパク質は担体に固定化されていてもよい。抗TP抗体測定試薬は、その他の抗原タンパク質などのさらなる成分を含んでいてもよい。抗TP抗体測定試薬に含まれる本発明のペプチドの量は、抗TP抗体の測定における反応を阻害せず、非特異反応抑制効果を有するのであれば特に限定されないが、好ましくは $0.0001 \sim 1\%$ （w/v）、より好ましくは $0.01 \sim 1\%$ （w/v）である。

40

【0044】

本発明の抗TP抗体測定試薬は、特にこれらに限定するものではないが、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）、カゼイン若しくはその塩などのタンパク質；各種塩類；各種糖類；脱脂粉乳；正常ウサギ血清などの各種動物血清；アジ化ナトリウム若しくは抗生物質などの各種防腐剤；活性化物質；反応促進物質；ポリエチレングリコールなどの感度増加物質；非特異的反応抑制物質等の1種又は2種以上を適

50

宜含有していてもよい。これらの成分の抗 T P 抗体測定試薬における濃度は特に限定されるものではないが、0.001 ~ 10% (w/v) が好ましく、特に 0.01 ~ 5% (w/v) が好ましい。

【0045】

本発明の抗 T P 抗体測定試薬の製造においては、その溶媒として各種の水系溶媒を用いることができる。水系溶媒としては、特に限定されないが、例えば、精製水、生理食塩水、又はトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液、リン酸緩衝液若しくはリン酸緩衝生理食塩水などの各種緩衝液等を挙げることができる。

【0046】

抗 T P 抗体測定試薬の pH については、適宜適当な pH を選択して用いればよく、特に制限はないものの、通常は、pH 3 ~ 12 の範囲内の pH が選択される。本発明においては、アルカリ性領域の pH を用いるのが好ましい。pH が pH 7.3 以上、例えば、pH 8 ~ 10 であるとより好ましい。

10

【0047】

本発明の抗 T P 抗体測定試薬は、そのもの単独でも又はその他の試薬と組み合わせて使用してもよい。他の試薬としては、例えば、緩衝液、試料希釈液、試薬希釈液、標識物質を含有する試薬、発色などのシグナルを生成する物質を含有する試薬又はキャリブレーションを行うための物質を含有する試薬等を挙げることができる。

本発明における抗 T P 抗体測定試薬を用いて、試料中の抗 T P 抗体の測定を行うには、使用する免疫測定方法の測定原理に基づく操作法に従って操作を行えばよい。

20

【0048】

本発明はまた、抗 T P 抗体測定試薬、上記の他の試薬及び担体等を、使用する測定法の原理に基づいて適宜組み合わせた免疫測定用のキットを包含する。このようなキットとしては、例えば、標識免疫測定法で使用する場合は、抗 T P 抗体測定試薬と標識抗原及び抗体希釈液等を含むものが好ましく、間接凝集反応測定法で使用する場合は、抗 T P 抗体測定試薬と粒子分散液等を含むものが好ましい。

以下、本発明を実施例により更に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0049】

【実施例】

30

〔実施例 1〕

非特異反応を抑制する活性を有するペプチドの調製

トレポネーマ・パリダムを継代培養したウサギ睾丸の破砕物より、トレポネーマ・パリダム菌体を抽出し、遺伝子を抽出した。TP 47 K ダルトン抗原タンパク質の塩基配列は、既述のように既に知られており、その全アミノ酸配列は配列番号 3 に示すとおりである。このアミノ酸配列を下記に示す 5 つの領域に分け、各々の TP 47 K ダルトン抗原タンパク質断片を以下の方法により調製した。

実施例 1 : 配列番号 3 の 126 ~ 295 番目の配列からなるペプチド

比較例 1 : 配列番号 3 の 1 ~ 164 番目の配列からなるペプチド

比較例 2 : 配列番号 3 の 244 ~ 415 番目の配列からなるペプチド

40

比較例 3 : 配列番号 3 の 1 ~ 295 番目の配列からなるペプチド

比較例 4 : 配列番号 3 の 126 ~ 415 番目の配列からなるペプチド

【0050】

まず、TP 47 K ダルトン抗原タンパク質断片をコードする塩基配列の両端の 20 塩基程度のオリゴヌクレオチドを各々プライマーとして合成した。ここで 5 つの領域に分けた前記の塩基配列を鋳型とし、上記のプライマーを用いて、PCR 法により 5 種類の TP 47 K ダルトン抗原タンパク質断片をコードする塩基配列を増幅した。次に、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) をコードする塩基配列を含むベクター (ファルマシア社製; pGEX 4 T3) に、得られた 5 種類の塩基配列を各々挿入した。このベクターを大腸菌に導入し、菌体の培養を行った。その後、TP 47 K ダルトン抗原タンパク質の断

50

片が十分に発現した大腸菌を超音波処理により破碎し、これを遠心分離しその沈殿を8 M 尿素で可溶化し、その後透析して尿素を除去した。これをさらに遠心分離し、その上清を回収することによって純度50%以上のTP47Kダルトン抗原タンパク質の断片5種類を得た。

【0051】

〔実施例2〕

トレポネーマ・パリダムに対する抗体(抗TP抗体)の測定における、上記ペプチド断片の非特異反応抑制効果を、ELISA法を用いて確認した。

(1) TP47Kダルトン抗原タンパク質固定化プレートの調製

1 洗浄液の調製

0.02%(w/v) Tween20を含むリン酸緩衝生理食塩水を調製し、洗浄液とした。

2 ブロッキング液の調製

0.5%(w/v) カゼインナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を調製し、ブロッキング液とした。

3 TP47Kダルトン抗原タンパク質固定化プレートの調製

【0052】

トレポネーマ・パリダムの47Kダルトン抗原タンパク質を、L. Weigel, M. Norgardらの方法(Infec^tion and Immunity、60巻、1568~1576頁、1992年)に従い、遺伝子組み換え技術により調製した。このTP47Kダルトン抗原タンパク質を、2μg/mLとなるように、リン酸緩衝生理食塩水に加えた。これを96穴マイクロタイタープレート(ヌンク社製)のウェルに各50μLずつ分注し、その後4で一晩放置して、TP47Kダルトン抗原タンパク質を各ウェルの内壁に固定化させた。

【0053】

次に、この96穴プレートの各ウェル内の液を除き、前記1の洗浄液で2回洗浄した。その後、各ウェルに前記2のブロッキング液を200μLずつ分注して、各ウェルのブロッキングを行った。そして、このプレートの各ウェル内の液を除き、前記洗浄液で2回洗浄を行った。以上の操作により調製したものを、TP47Kダルトン抗原タンパク質固定化プレートとした。

【0054】

(2) ペルオキシダーゼ(POD)標識抗体の調製

POD標識ウサギ抗ヒトIgG抗体溶液(ダコ社製; P0406)を0.5%(w/v) カゼインナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水で1000倍に希釈した。

【0055】

(3) 試料希釈液の調製

0.5%(w/v) カゼインナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を調製し、これに実施例1で調製した実施例1及び比較例1~4のペプチド断片を終濃度で0.02%(w/v)となるように添加した。また、いずれのペプチドも添加しないものを対照例とした。

【0056】

(4) 抗TP抗体測定における非特異反応抑制効果

(3)で調製した試料希釈液で200倍希釈した偽陽性血清(1試料)又は抗TP抗体陽性血清(14試料)50μLずつを、前記(1)で調製したTP47Kダルトン抗原タンパク質固定化プレートの各ウェルに添加し、37で4時間反応させた。その後、このプレートのウェル内の血清液を除き、前記洗浄液で洗浄した。

更に、前記(2)で調製したPOD標識ウサギ抗ヒトIgG抗体溶液を各ウェルに50μLずつ添加し、室温で4時間反応させた。次いで、各ウェルを前記洗浄液にて洗浄した。

【0057】

この後、発色液(4mM - フェニレンジアミン、103mMリン酸水素二ナトリウム、49mMクエン酸を含む緩衝液1mLに対して33μLの0.3%過酸化水素を使用直

10

20

30

40

50

前に添加したもの) 100 μ L を各ウェルに添加し、室温で 20 分間反応させた後、4 N 硫酸水溶液 50 μ L を各ウェルに添加し、反応を停止させた。

その後、マイクロプレートリーダー(バイオラッド社製; 3550 型)を用いて各ウェルの 490 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度を、表 1 に示す。

【0058】

【表 1】

試料		TP47Kダルトン抗原タンパク質の断片					
		対照例	実施例1	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4
偽陽性試料	1	0.751 (100)	0.153 20.4%	0.649 86.4%	0.645 85.9%	0.267 35.6%	0.109 14.5%
抗TP抗体 陽性試料	1	1.967 (100)	1.909 97.1%	1.847 93.9%	1.63 82.9%	1.825 92.8%	1.16 59.0%
	2	1.938 (100)	1.651 85.2%	1.589 82.0%	1.587 81.9%	1.547 79.8%	1.322 68.2%
	3	1.8 (100)	1.599 88.8%	1.537 85.4%	1.584 88.0%	1.501 83.4%	1.285 71.4%
	4	1.69 (100)	1.397 82.7%	1.249 73.9%	1.504 89.0%	1.176 69.6%	1.118 66.2%
	5	1.466 (100)	1.271 86.7%	0.961 65.6%	1.361 92.8%	0.83 56.6%	1.025 69.9%
	6	1.387 (100)	1.211 87.3%	1.085 78.2%	0.973 70.2%	1.032 74.4%	0.641 46.2%
	7	1.261 (100)	1.234 97.9%	1.114 88.3%	0.729 57.8%	1.114 88.3%	0.614 48.7%
	8	1.165 (100)	1.045 89.7%	1.041 89.4%	0.457 39.2%	1.046 89.8%	0.28 24.0%
	9	0.786 (100)	0.631 80.3%	0.568 72.3%	0.462 58.8%	0.52 66.2%	0.193 24.6%
	10	0.762 (100)	0.608 79.8%	0.41 53.8%	0.541 71.0%	0.387 50.8%	0.372 48.8%
	11	0.741 (100)	0.612 82.6%	0.45 60.7%	0.603 81.4%	0.463 62.5%	0.484 65.3%
	12	0.715 (100)	0.676 94.5%	0.523 73.1%	0.454 63.5%	0.559 78.2%	0.357 49.9%
	13	0.409 (100)	0.39 95.4%	0.261 63.8%	0.292 71.4%	0.287 70.2%	0.307 75.1%
	14	1.409 (100)	1.178 83.6%	1.07 75.9%	1.132 80.3%	1.024 72.7%	0.794 56.4%

上段: 490nmにおける吸光度

下段: 対照例の測定値(吸光度)を100%とした場合の百分率

【0059】

(5) 考察

表 1 より、比較例 1 及び比較例 2 のペプチドを使用した場合には、偽陽性試料を測定した場合の試料との反応性は、対照例を 100%とした場合に、比較例 1 では、86.4%、比較例 2 では、85.9%となっており、非特異反応を抑制できていないことが分かる。更に、陽性試料を測定した場合には、試料によっては、陽性試料に含まれていた抗 TP 抗体を吸収してしまっているために、対照例と比較して吸光度が減少してしまっている。すなわち比較例 1 及び比較例 2 のペプチドは、非特異反応を抑制する活性がなく、しかも、TP47Kダルトン抗原タンパク質としての抗原性が残っているために感度の低下を引き起こし、正確な測定ができていないことが分かる。

【0060】

また、比較例 3 及び比較例 4 のペプチドを使用した場合には、偽陽性試料を測定した場合の試料との反応性は、対照例を 100%とした場合に、比較例 3 では、35.6%、比較例 4 では、14.5%となっており、非特異反応を抑制できているが、陽性試料を測定した場合には、試料によっては、陽性試料に含まれていた抗 TP 抗体を吸収してしまっているために、対照例と比較して吸光度が減少してしまっている。すなわち比較例 3 及び比較例 4 のペプチドには、TP47Kダルトン抗原タンパク質としての抗原性が残っており、このために感度の低下を引き起こし、正確な測定ができていないことが分かる。

【0061】

これに対して、実施例 1 のペプチドを使用した場合には、偽陽性試料を測定した場合の試料との反応性は、対照例を 100%とした場合に、20.4%となっており、非特異反応を抑制できていることが分かる。更に、陽性試料を測定した場合にも、試料によるばらつきはあるものの、陽性試料との反応性が維持されており、本発明のペプチドには TP47Kダルトン抗原タンパク質としての抗原性は殆ど残っていないことが分かる。

10

【0062】

従って、本発明のペプチドを使用することにより、非特異反応を抑制することができ、かつ試料に含まれている抗 TP 抗体を吸収してしまうことがなく感度を高く保つことができるので、試料中の抗 TP 抗体を正確に測定できることが確かめられた。

【0063】

また、本発明、比較例 1 及び比較例 2 の結果から、本発明のペプチドのアミノ酸配列のうち、比較例 1 及び比較例 2 の TP47Kダルトン抗原タンパク質断片のアミノ酸配列に含まれない 165 ~ 244 番目に相当する配列が、非特異反応の抑制に関与していると考えられる。

20

【0064】

〔実施例 3〕

特開平 9 - 229936 号公報及び特開平 10 - 132819 号公報等に記載された測定方法を用い、トレポネーマ・パリダムに対する抗体（抗 TP 抗体）測定における本発明のペプチドの非特異反応抑制効果を確認した。

【0065】

(1) ペプチドの調製

実施例 1 と同様にして、本発明のペプチド（実施例 1）を調製した。

30

(2) 抗 TP 抗体測定器具の作製

アクリル樹脂押出板 1（幅 10mm、奥行き 38mm、厚さ 1mm）〔アクリサンデー社製〕の手前の端から 15mm より 18mm の部分（図 1 の 3 の位置）に、実施例 2 の（1）の 3 と同じ方法で遺伝子組み換えにより調製した TP47Kダルトン抗原タンパク質 2µg/mL をピペットを用いて載せ、37℃ で 3 時間静置することにより抗原の固定化を行った。

【0066】

次いで、溶液をピペットで吸引除去後、0.5%（w/v）カゼインを含むリン酸緩衝液（pH 7.5, 50mM）（以下、これを希釈液 A という）0.3mL をここに加えて、4℃ で一晩放置し、これをピペットで吸引除去することによりマスキングを行い、判定部 3 とした。

40

【0067】

次に、図 1 の A に示すように、中央に 2 本の枠 4（奥行き 16mm、高さ 0.5mm、枠間の間隔 5mm）を形成した透明板よりなるカバー 2（幅 12mm、奥行き 40mm、厚さ 2.5mm）及び試料吸収部 8（ベルクリン E 2、鐘紡社製、厚さ 2mm のものを幅 4mm、奥行き 5mm に裁断したものを）、前記のアクリル樹脂押出板 1 の上に、図 2 の A に示すように組み合わせることにより、図 2 の A に示すアクリル樹脂押出板 1 とカバー 2 で囲まれた高さ 0.5mm、奥行き 16mm、幅 5mm の空間を有する通路 6 を設けた。そして、カバー 2 に設けられた開口部 5（幅 5mm、奥行き 2mm、厚さ 2.5mm）が試料供給部 5 となる。なお、図 1 の B はカバー 2 の横断面図、図 1 の C はカバー 2 を裏側

50

から見た図である。

【0068】

更に、図1のAに示すように、中央部に前記試料供給部と同じ大きさの穴を有し、かつ、この穴の片側面が上部にかけて広がるように成型した透明な障害物7（幅7mm、奥行き8mm、高さ1mm）を、前記試料供給部5の上にアクリル接着剤で張り付けた。これを抗TP抗体測定器具とした。図2のBは抗TP抗体測定器具の縦断面図である。

【0069】

(3) TP47Kダルトン抗原タンパク質固定化粒子の調製

粒子（磁性粒子）〔Dynabeads M-450 uncoated、ダイナル社製、粒径：4.5 μ m、粒径のC.V.5%以下、比重1.5、濃度6%（w/v）〕と実施例2の(1)の3と同じ方法で調製したTP47Kダルトン抗原タンパク質（pH7.0の10mMリン酸緩衝液に濃度100 μ g/mLで溶解したもの）1mLを混合し、37で1時間反応させた。これに0.5%（w/v）カゼインを含むリン酸緩衝液（pH7.5、50mM）を約20倍量加えてマスキングを行い、得られた粒子を希釈液Aにて洗浄した。この粒子を濃度が約0.2%（w/v）となるようにグリシン緩衝液（pH9.5、50mM）に再分散させた。このようにして、TP47Kダルトン抗原タンパク質固定化粒子分散液を調製した。

10

【0070】

(4) 抗TP抗体測定におけるペプチドの非特異反応抑制効果

前記(3)で調製したTP47Kダルトン抗原タンパク質固定化粒子分散液に前記(1)で調製したペプチドを終濃度で0.2%（w/v）となるように添加した。また、ペプチドを添加しないものを、対照例とした。

20

偽陽性血清（3試料）又は抗TP抗体陽性血清（1試料）50 μ Lずつを、上記(2)で作製した抗TP抗体測定器具の各試料供給部5にピペットを用いて載せることにより、判定部3に接触させた。

【0071】

これにより試料は、前記測定器具の通路6内を移動して判定部3に接触した後、試料吸収部8に吸収される。

この判定部3に接触させた偽陽性試料又は陽性試料が試料吸収部8に吸収除去された後、上記(3)で作製したTP47Kダルトン抗原タンパク質固定化粒子分散液を、この抗TP抗体測定器具の各試料供給部5にピペットを用いて載せることにより、判定部3に接触させた。

30

【0072】

その後、この抗TP抗体測定器具の判定部3が形成された側面方向に磁石を配置することにより、TP47Kダルトン抗原タンパク質固定化粒子が移動するよう、試料供給部5から試料吸収部8の方向に磁束密度40~60ガウスの磁場を発生させた。

【0073】

磁場を発生させてから1分後の判定結果を表2に示す。なお、+は判定部3に粒子の像が認められた場合、+Wは判定部3に粒子の弱い像が認められた場合、-は判定部3に粒子の像が認められなかった場合を示している。

40

【0074】

【表2】

	判定結果			
	偽陽性試料			陽性試料
	1	2	3	4
本発明のペプチド	-	-	-	+
対照例	+	+W	+W	+

【 0 0 7 5 】

10

(5) 考察

表 2 に示したとおり、対照例では、偽陽性試料 1 の判定結果は + (判定部 3 に粒子の像が認められた) を示し、偽陽性試料 2 及び 3 の判定結果は + W (判定部 3 に粒子の弱い像が認められた) を示しており、非特異反応を抑制できていないことが確かめられた。

【 0 0 7 6 】

これに対して、本発明のペプチドを用いた場合は、偽陽性試料 1 ~ 3 の全ての判定結果が - (判定部 3 に粒子の像が認められなかった) を示しており、非特異反応を抑制できていることが確かめられた。更に、陽性試料を測定した場合の判定結果も + を示しており、本発明の非特異反応抑制ペプチドには T P 4 7 K ダルトン抗原タンパク質としての抗原性は残っていないことが分かる。

20

【 0 0 7 7 】

従って、本発明のペプチドを使用することにより、非特異反応を抑制することができ、かつ試料に含まれていた抗 T P 抗体を吸収してしまうことなく感度を高く保つことができるので、試料中の抗 T P 抗体を正確に測定できることが確かめられた。

【 0 0 7 8 】

〔 実施例 4 〕

トレポネーマ・パリダムに対する抗体 (抗 T P 抗体) 測定における、本発明のペプチドの非特異反応抑制効果をラテックス凝集法を用いて確認した。

(1) 第 1 試薬の調製

試料の希釈液として、下記の第 1 試薬を調製した。

30

4 % (w / v) B S A、0 . 2 % (w / v) ポリエチレングリコール及び 1 5 m M アジ化ナトリウムを含有する 5 0 m M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン - 塩酸緩衝液 (p H 8 . 5) に実施例 1 で調製した本発明のペプチドを各々終濃度で 0 . 0 0 8 % (w / v) 又は 0 . 0 8 % (w / v) となるように添加した。また、ペプチドを添加しないものを、対照例とした。

【 0 0 7 9 】

(2) 第 2 試薬の調製

1 トレポネーマ・パリダムの 4 7 K ダルトン抗原タンパク質を、L . W e i g e l , M . N o r g a r d らの方法 (I n f e c t i o n a n d I m m u n i t y 6 0 巻、1 5 6 8 ~ 1 5 7 6 頁、1 9 9 2 年) に従い、遺伝子組み換え技術により調製した。

40

2 前記 1 にて調製したトレポネーマ・パリダムの 4 7 K ダルトン抗原タンパク質を、最終濃度が 5 0 μ g / m L となるように、5 0 m M グリシン緩衝液 (p H 9 . 0) に添加し、溶解させた。

【 0 0 8 0 】

3 ラテックス粒子 [積水化学社製、平均粒径 0 . 4 μ m、ポリスチレン] を、0 . 5 % (w / v) となるように、5 0 m M グリシン緩衝液 (p H 9 . 0) に添加し、懸濁させた。

4 前記 2 のトレポネーマ・パリダムの 4 7 K ダルトン抗原タンパク質の溶液の 0 . 2 m L と、前記 3 のラテックス粒子の懸濁液の 0 . 2 m L を混合した。

その後、3 7 で 3 時間静置して、前記トレポネーマ・パリダムの 4 7 K ダルトン抗原タ

50

ンパク質の前記ラテックス粒子への固定化を行った。

【0081】

5 前記 4 のトレポネーマ・パリダムの47Kダルトン抗原タンパク質を固定化したラテックス粒子の懸濁液に、1% (w/v) BSAを含有する50mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液(pH7.2)の1mLを添加し、37で2時間静置して、担体であるラテックス粒子の表面のブロッキング処理(マスキング処理)を行った。

【0082】

6 前記 5 のブロッキング処理(マスキング処理)の後、回転数14,000rpmで、10にて20分間遠心分離を行った。

遠心分離後、デカンテーションにより上清を除き、沈殿物であるラテックス粒子(トレポネーマ・パリダムの47Kダルトン抗原タンパク質を固定化したラテックス粒子)を得た。

7 0.25% (w/v)の前記 6 で調製したラテックス粒子を含む、300mM塩化ナトリウム、1% (w/v) BSA及び15mMアジ化ナトリウムを含有する50mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液(pH7.2)を調製し、第2試薬とした。

【0083】

(3) 抗TP抗体測定におけるペプチドの非特異反応抑制効果

1 96穴マイクロタイタープレート(ヌンク社製)のウェルに前記の第1試薬の87.5μLを添加し、次にこれに偽陽性血清(2試料)又は抗TP抗体陽性血清(1試料)10μLずつを加え混合した。

2 このウェルに更に、前記の第2試薬の12.5μLを添加し、混合した後、直ちに、このウェル内の混合液の吸光度(主波長:490nm、副波長:655nm)をマイクロプレートリーダー(3350型、バイオラッド社製)で測定した。

【0084】

3 前記の吸光度の測定の後、直ぐに前記マイクロタイタープレートを37で静置した。

4 前記 2 における吸光度の測定から10分後に、前記のウェル内の反応混合液の吸光度を前記 2 の場合と同様にして測定した。

5 前記 4 において測定した吸光度から前記 2 において測定した吸光度を差し引き、吸光度差を得た。この吸光度差は試料に含まれる抗TP抗体の量(濃度)に比例することとなる。

【0085】

(4) 測定結果

前記(3)において、試料中の抗TP抗体の測定を行って得られた吸光度差を、表3に示す。

【0086】

【表3】

	吸光度差(主波長490nm、副波長655nm)		
	偽陽性試料		陽性試料
	1	2	3
本発明のペプチド(0.008%含有)	0.0001	0.0044	0.0032
本発明のペプチド(0.08%含有)	-0.0001	0.0006	0.0034
対照例	0.0021	0.0069	0.0030

【0087】

(5) 考察

表3に示したとおり、対照例では、吸光度差が偽陽性試料1では0.0021、偽陽性試料2では0.0069を示し、非特異反応を抑制できていないことが確かめられた。

【0088】

これに対して、本発明のペプチドを用いた場合は、偽陽性試料1では、本発明のペプチドの濃度が0.008%の場合には吸光度差が0.0001、濃度が0.08%の場合には吸光度差が-0.0001を示しており、非特異反応を抑制できていることが確かめられた。また、偽陽性試料2では、本発明のペプチドの濃度が0.008%の場合には吸光度差が0.0044であるが、濃度を0.08%に増加した場合には吸光度差が0.0006を示しており、非特異反応を抑制できていることが確かめられた。更に、陽性試料を測定した場合は、本発明のペプチドの濃度が0.008%の場合には吸光度差が0.0032であり、濃度が0.08%の場合も0.0034を示している。これは、本発明のペプチドを含有しない対照例での吸光度差(0.0030)とほぼ同じ値であり、本発明の非特異反応抑制剤にはTP47Kダルトン抗原タンパク質としての抗原性は残っていないことが分かる。

10

【0089】

従って、本発明の非特異反応抑制剤を使用することにより、非特異反応を抑制することができ、かつ試料に含まれていた抗TP抗体を吸収してしまうことがなく感度を高く保つことができるので、試料中の抗TP抗体を正確に測定できることが確かめられた。

【0090】

【発明の効果】

本発明により、抗TP抗体の測定において非特異反応を抑制することができ、さらに、測定において抗TP抗体を吸収して免疫反応を阻害することもないため、疾患の診断等の場において正確な測定を行うことができる。

20

【0091】

【配列表】

Phe His Phe Val Glu Asp Ser Arg Val Thr Glu Asn Thr Asn Gly Leu
 50 55 60

Lys Thr Met Leu Thr Glu Asp Ser Phe Ser Ala Arg Lys Val Ser Ser
 65 70 75 80

Met Glu Ser Pro His Asp Leu Val Val Asp Thr Val Gly Thr Gly Tyr
 85 90 95

10

His Ser Arg Phe Gly Ser Asp Ala Glu Ala Ser Val Met Leu Lys Arg
 100 105 110

Ala Asp Gly Ser Glu Leu Ser His Arg Glu Phe Ile Asp Tyr Val Met
 115 120 125

20

Asn Phe Asn Thr Val Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Asp Asp Ala Ser Tyr
 130 135 140

Thr Asn Leu Met Ala Ser Tyr Gly Thr Lys His Ser Ala Asp Ser Trp
 145 150 155 160

30

Trp Lys Thr Gly Arg Val Pro Arg Ile Ser
 165 170

<210> 2

<211> 80

<212> PRT

40

<213> *Treponema pallidum*

Leu Ala Gly Asn Ala Glu Ala Asp Arg Ala Gly Asp Leu Asp Ala Gly
 35 40 45

Met Phe Asp Ala Val Ser Arg Ala Thr His Gly His Gly Ala Phe Arg
 50 55 60

Gln Gln Phe Gln Tyr Ala Val Glu Val Leu Gly Glu Lys Val Leu Ser
 65 70 75 80

Lys Gln Glu Thr Glu Asp Ser Arg Gly Arg Lys Lys Trp Glu Tyr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Ser Val Thr Lys Met Val Arg Ala Ser Ala Ser Phe Gln
 100 105 110

Asp Leu Gly Glu Asp Gly Glu Ile Lys Phe Glu Ala Val Glu Gly Ala
 115 120 125

Val Ala Leu Ala Asp Arg Ala Ser Ser Phe Met Val Asp Ser Glu Glu
 130 135 140

Tyr Lys Ile Thr Asn Val Lys Val His Gly Met Lys Phe Val Pro Val
 145 150 155 160

Ala Val Pro His Glu Leu Lys Gly Ile Ala Lys Glu Lys Phe His Phe
 165 170 175

Val Glu Asp Ser Arg Val Thr Glu Asn Thr Asn Gly Leu Lys Thr Met

10

20

30

40

	180		185		190	
Leu Thr Glu Asp Ser Phe Ser Ala Arg Lys Val Ser Ser Met Glu Ser						
	195		200		205	
Pro His Asp Leu Val Val Asp Thr Val Gly Thr Gly Tyr His Ser Arg						10
	210		215		220	
Phe Gly Ser Asp Ala Glu Ala Ser Val Met Leu Lys Arg Ala Asp Gly						
	225		230		235	240
Ser Glu Leu Ser His Arg Glu Phe Ile Asp Tyr Val Met Asn Phe Asn						
		245		250		255
						20
Thr Val Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Asp Asp Ala Ser Tyr Thr Asn Leu						
	260		265		270	
Met Ala Ser Tyr Gly Thr Lys His Ser Ala Asp Ser Trp Trp Lys Thr						
	275		280		285	
Gly Arg Val Pro Arg Ile Ser Cys Gly Ile Asn Tyr Gly Phe Asp Arg						30
	290		295		300	
Phe Lys Gly Ser Gly Pro Gly Tyr Tyr Arg Leu Thr Leu Ile Ala Asn						
	305		310		315	320
Gly Tyr Arg Asp Val Val Ala Asp Val Arg Phe Leu Pro Lys Tyr Glu						
		325		330		335
						40

Gly Asn Ile Asp Ile Gly Leu Lys Gly Lys Val Leu Thr Ile Gly Gly
 340 345 350

Ala Asp Ala Glu Thr Leu Met Asp Ala Ala Val Asp Val Phe Ala Asp
 355 360 365

Gly Gln Pro Lys Leu Val Ser Asp Gln Ala Val Ser Leu Gly Gln Asn 10
 370 375 380

Val Leu Ser Ala Asp Phe Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Val Glu Val
 385 390 395 400

Arg Phe Lys Glu Phe Gly Ser Val Arg Ala Lys Val Val Ala Gln
 405 410 415 20

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

30

<400> 4

Glu Gly Ala Val Ala Leu Ala Asp Arg Ala
 1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

40

<213> *Treponema pallidum*

<400> 5

Leu Ala Asp Arg Ala Ser Ser Phe Met Val

1 5 10

10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 6

Ser Ser Phe Met Val Asp Ser Glu Glu Tyr

1 5 10

20

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

30

<400> 7

Asp Ser Glu Glu Tyr Lys Ile Thr Asn Val

1 5 10

<210> 8

<211> 10

40

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 8

Lys	Ile	Thr	Asn	Val	Lys	Val	His	Gly	Met
1				5					10

10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 9

Lys	Val	His	Gly	Met	Lys	Phe	Val	Pro	Val
1				5					10

20

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

30

<400> 10

Lys	Phe	Val	Pro	Val	Ala	Val	Pro	His	Glu
1				5					10

40

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 11

Ala Val Pro His Glu Leu Lys Gly Ile Ala

1 5 10

10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

20

<400> 12

Leu Lys Gly Ile Ala Lys Glu Lys Phe His

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

30

<400> 13

Lys Glu Lys Phe His Phe Val Glu Asp Ser

1 5 10

40

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 14

Phe Val Glu Asp Ser Arg Val Thr Glu Asn

1 5 10

10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

20

<400> 15

Arg Val Thr Glu Asn Thr Asn Gly Leu Lys

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

30

<400> 16

Thr Asn Gly Leu Lys Thr Met Leu Thr Glu

1 5 10

40

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 17

10

Thr Met Leu Thr Glu Asp Ser Phe Ser Ala

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

20

<213> *Treponema pallidum*

<400> 18

Asp Ser Phe Ser Ala Arg Lys Val Ser Ser

1 5 10

30

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 19

Arg Lys Val Ser Ser Met Glu Ser Pro His

1 5 10

40

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

10

<400> 20

Met Glu Ser Pro His Asp Leu Val Val Asp

1 5 10

<210> 21

<211> 10

20

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 21

Asp Leu Val Val Asp Thr Val Gly Thr Gly

1 5 10

30

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 22

40

Thr Val Gly Thr Gly Tyr His Ser Arg Phe

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

10

<400> 23

Tyr His Ser Arg Phe Gly Ser Asp Ala Glu

1 5 10

<210> 24

20

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 24

Gly Ser Asp Ala Glu Ala Ser Val Met Leu

1 5 10

30

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

40

<400> 25

Ala Ser Val Met Leu Lys Arg Ala Asp Gly
 1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

10

<400> 26

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

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

20

<400> 27

Ser Glu Leu Ser His Arg Glu Phe Ile Asp
 1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

30

40

<400> 28

Arg	Glu	Phe	Ile	Asp	Tyr	Val	Met	Asn	Phe
1				5					10

<210> 29

<211> 10

10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 29

Tyr	Val	Met	Asn	Phe	Asn	Thr	Val	Arg	Tyr
1				5					10

20

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 30

30

Asn	Thr	Val	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Asp
1				5					10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

40

<213> *Treponema pallidum*

<400> 31

Asp Tyr Tyr Gly Asp Asp Ala Ser Tyr Thr
 1 5 10

<210> 32

10

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 32

Asp Ala Ser Tyr Thr Asn Leu Met Ala Ser
 1 5 10

20

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

30

<400> 33

Asn Leu Met Ala Ser Tyr Gly Thr Lys His
 1 5 10

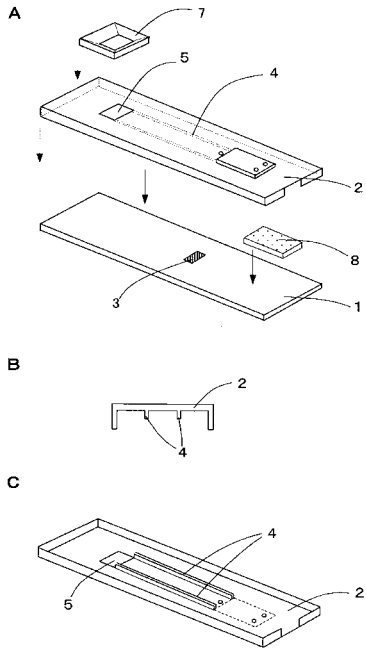
<210> 34

<211> 10

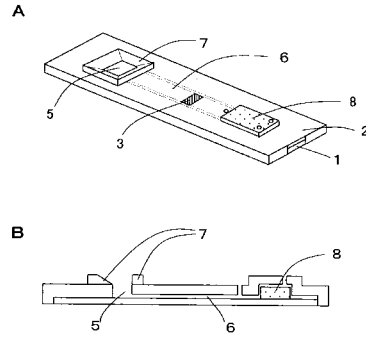
40

<212> PRT

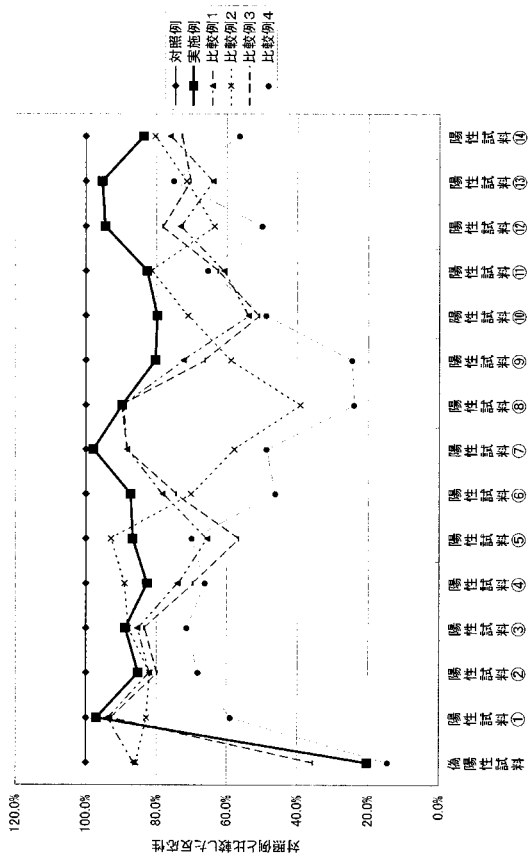
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 千葉 奈穂

神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社 シノテスト 相模原事業所内

(72)発明者 中村 雄樹

神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社 シノテスト 相模原事業所内

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平11-023573(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/571

G01N 33/53

PubMed

专利名称(译)	非特异性反应抑制肽，非特异性反应抑制方法和使用其的抗体测量方法		
公开(公告)号	JP3799410B2	公开(公告)日	2006-07-19
申请号	JP2002145225	申请日	2002-05-20
申请(专利权)人(译)	株式会社シノテスト		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社シノテスト		
[标]发明人	東義則 千葉奈穂 中村雄樹		
发明人	東 義則 千葉 奈穂 中村 雄樹		
IPC分类号	G01N33/571 C07K7/06 C07K14/20 G01N33/53 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/571 C07K7/06 C07K14/20 G01N33/53.D G01N33/531.B		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/CA11 4H045/EA52 4H045/FA74		
其他公开文献	JP2003337134A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过抑制非特异性反应来预防诊断错误的方法，并且在使用梅毒螺旋体抗原的免疫学测量方法中准确测量梅毒抗体的抗梅毒螺旋体抗体。解决方案：肽包含序列号1中描述的全部或部分氨基酸序列，并且包括序列号1中的至少五个连续氨基酸序列。或肽包括肽并具有抑制非特异性反应的活性在使用包括梅毒螺旋体47K道尔顿抗原蛋白的抗原的抗梅毒螺旋体抗体的免疫学测量方法中。Ž

試料		TP47Kダルトン抗原タンパク質の断片					
		対照例	実施例1	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4
偽陽性試料	1	0.751 (100)	0.153 20.4%	0.649 86.4%	0.645 85.9%	0.267 35.6%	0.109 14.5%
	1	1.967 (100)	1.909 97.1%	1.847 93.9%	1.63 82.9%	1.825 92.8%	1.16 59.0%
	2	1.938 (100)	1.651 85.2%	1.589 82.0%	1.587 81.9%	1.547 79.8%	1.322 68.2%
	3	1.8 (100)	1.599 88.8%	1.537 85.4%	1.584 88.0%	1.501 83.4%	1.285 71.4%
	4	1.69 (100)	1.397 82.7%	1.249 73.9%	1.504 89.0%	1.176 69.6%	1.118 66.2%
	5	1.466 (100)	1.271 86.7%	0.961 65.6%	1.361 92.8%	0.83 56.6%	1.025 69.9%
	6	1.387 (100)	1.211 87.3%	1.085 78.2%	0.973 70.2%	1.032 74.4%	0.641 46.2%
	7	1.261 (100)	1.234 97.9%	1.114 88.3%	0.729 57.8%	1.114 88.3%	0.614 48.7%
	8	1.165 (100)	1.045 89.7%	1.041 89.4%	0.457 39.2%	1.046 89.8%	0.28 24.0%
	9	0.786 (100)	0.631 80.3%	0.568 72.3%	0.462 58.8%	0.52 66.2%	0.193 24.6%
	10	0.762 (100)	0.608 79.8%	0.41 53.8%	0.541 71.0%	0.387 50.8%	0.372 48.5%
	11	0.741 (100)	0.612 82.6%	0.45 60.7%	0.603 81.4%	0.463 62.5%	0.464 65.3%
	12	0.715 (100)	0.676 94.5%	0.523 73.1%	0.454 63.5%	0.559 78.2%	0.357 49.9%
	13	0.409 (100)	0.39 95.4%	0.261 63.8%	0.292 71.4%	0.287 70.2%	0.307 75.1%
14	1.409 (100)	1.178 83.6%	1.07 75.9%	1.132 80.3%	1.024 72.7%	0.794 56.4%	