

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/094395

発行日 平成21年7月9日 (2009.7.9)

(43) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23)

|                                     |                    |             |
|-------------------------------------|--------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                       | F I                | テーマコード (参考) |
| <b>C12N 15/09 (2006.01)</b>         | C12N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4   |
| <b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>          | C12Q 1/02          | 4 B O 6 3   |
| <b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>          | C12Q 1/68 Z        |             |
| <b>C12Q 1/70 (2006.01)</b>          | C12Q 1/70          |             |
| <b>GO1N 33/531 (2006.01)</b>        | GO1N 33/531 B      |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く |                    |             |

出願番号 特願2008-500540 (P2008-500540)  
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2007/052699  
 (22) 国際出願日 平成19年2月15日 (2007.2.15)  
 (31) 優先権主張番号 特願2006-38076 (P2006-38076)  
 (32) 優先日 平成18年2月15日 (2006.2.15)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 304026696  
 国立大学法人三重大学  
 三重県津市栗真町屋町1577  
 (74) 代理人 100097582  
 弁理士 水野 昭宣  
 (72) 発明者 吉村 哲郎  
 三重県津市栗真町屋町1577 国立大学  
 法人三重大学内  
 (72) 発明者 湊元 幹太  
 三重県津市栗真町屋町1577 国立大学  
 法人三重大学内  
 (72) 発明者 今村 幸治  
 愛知県名古屋市中区丸の内三丁目5番10  
 号 住友商事丸の内ビル5階 株式会社医  
 学生物学研究所内

最終頁に続く

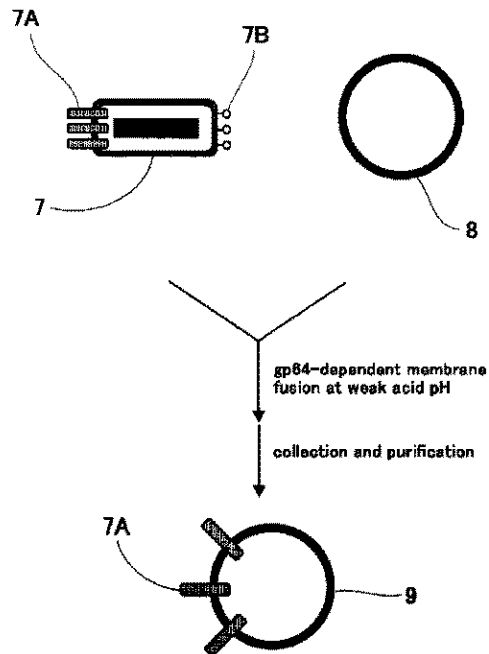
(54) 【発明の名称】 診断用組換えプロテオリポソームの作製法

(57) 【要約】

【課題】 診断用に適した組換えプロテオリポソームを作製する方法、組換えプロテオリポソームをコートした検出用プレート、及び検出用キット等を提供すること。

【解決手段】 エンベロープ上に目的とする膜受容体（例えば、自己抗体関連疾患に関与するヒト甲状腺刺激ホルモン受容体、アセチルコリン受容体、インスリン受容体、1-アドレナリン受容体、アシアログリコпротеイン受容体など）を発現させた組換えバキュロウイルス出芽ウイルスと、リポソームとを融合させた組換えプロテオリポソームを調製する。このプロテオリポソームは、組換えバキュロウイルスに比べて、自己抗体に対する結合性能が向上しているため、容易に検出用キットを製造することができる。

【選択図】 図2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下(1)～(3)のステップを含むことを特徴とするプロオリポソーム製造法、

(1)組換えバキュロウイルスの出芽ウイルスエンベロープ上に膜受容体を発現させるステップ、

(2)膜受容体を発現した組換えバキュロウイルス出芽ウイルスを調製するステップ、

(3)出芽ウイルスとリポソームとを融合させて組換えプロテオリポソームを製造するステップ。

**【請求項 2】**

前記膜受容体が、自己抗体関連疾患に關与するものであることを特徴とする請求項 1 に記載の組換えプロテオリポソーム製造法。

10

**【請求項 3】**

前記膜受容体が、ヒト甲状腺刺激ホルモン受容体、アセチルコリン受容体、リアノジン受容体、インスリン受容体、 $\alpha$ 1アドレナリン受容体、M2ムスカリン受容体、アシアログリコプロテイン受容体からなる群のうちのいずれか一つであることを特徴とする請求項 2 に記載の組換えプロテオリポソーム製造法。

**【請求項 4】**

前記膜受容体が、膜貫通型のものであることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の組換えプロテオリポソーム製造法。

**【請求項 5】**

前記リポソームが、多重層リポソームであることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の組換えプロテオリポソーム製造法。

20

**【請求項 6】**

前記リポソームが、一枚膜リポソームであることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の組換えプロテオリポソーム製造法。

**【請求項 7】**

エンベロープ上に目的とする膜受容体を発現させた組換えバキュロウイルス出芽ウイルスとリポソームとを融合させた組換えプロテオリポソームをコートしたことを特徴とする検出用プレート。

**【請求項 8】**

前記組換えプロテオリポソームは、リンカー含有物質を介して、前記検出用プレートにコートされていることを特徴とする請求項 7 に記載の検出用プレート。

30

**【請求項 9】**

前記リンカーは、ポリエチレングリコール(PEG)であることを特徴とする請求項 8 に記載の検出用プレート。

**【請求項 10】**

請求項 7～9 のいずれかに記載の検出用プレートと、自己抗体の有無を評価する血清を希釈する希釈用緩衝液と、洗浄用緩衝液と、前記自己抗体を認識すると共に標識された二次抗体とを備えたことを特徴とする検出用キット。

**【請求項 11】**

前記検出用キットにおいて、前記希釈用緩衝液と共に用いられる抗体除去用リポソームを備えることを特徴とする請求項 10 に記載の検出用キット。

40

**【請求項 12】**

甲状腺疾患またはバセドウ病、重症筋無力症、拡張性心筋症、持続性心房細動、インスリン抵抗性糖尿病、自己免疫性肝炎、重症筋無力症のなかの胸腺腫合併症からなる疾患群のいずれかの疾患患者の血清を、請求項 7～9 のいずれかに記載の検出用プレートまたは請求項 10 若しくは 11 に記載の検出用キットを用いて測定し、疾患治療剤の治療効果をモニタリングする方法。

**【請求項 13】**

ヒト血清を請求項 7～9 のいずれかに記載の検出用プレートまたは請求項 10 若しくは 1

50

2に記載の検出用キットを用いて測定することにより、甲状腺疾患またはバセドウ病、重症筋無力症、拡張性心筋症、持続性心房細動、インスリン抵抗性糖尿病、自己免疫性肝炎、重症筋無力症のなかの胸腺腫合併症からなる疾患群のいずれかの疾患の有無についてスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断用組換えプロテオリポソームに関する。

【背景技術】

【0002】

バキュロウイルスDNAと、外来遺伝子を導入したトランスファーベクターとを昆虫細胞にコトランスフェクションさせることにより、外来遺伝子とその昆虫細胞内でバキュロウイルスDNAに取り込まれる。その結果、外来遺伝子がコードするタンパク質が、組換えバキュロウイルスの出芽ウイルスエンベロープ上に発現される（例えば、特許文献1）。特許文献1には、Gタンパク質共役型受容体を発現する組換えバキュロウイルス出芽ウイルスを調製し、このウイルスエンベロープ上の受容体がホルモンとの結合活性を示すことが報告されている。

【0003】

【特許文献1】特開2003-52370号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、発現された受容体の構造は、十分な天然構造とはいえないので、受容体と各種結合物との結合活性は、診断用に用いるためには十分なものではなかった。このため、特許文献1には、更なる改良を行う余地があった。

本発明は、上記課題に鑑みてなされたものであり、診断用に適した組換えプロテオリポソームを作製する方法等を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、鋭意検討の結果、リポソームと、膜受容体を発現した組換えバキュロウイルス出芽ウイルスとを融合させて、組換えプロテオリポソームを製造することにより、膜受容体と目的物質との結合能が格段に向上することを見出した。こうして、基本的には本発明を完成させるに至った。結合能が向上した理由は必ずしも明確ではないが、我々は、組換えバキュロウイルスのエンベロープ上に発現された膜受容体が、バキュロウイルスとリポソームとが融合されることにより、細胞膜類似の環境となり、構造的に天然の状態を取りやすくなった結果、目的物質の特異的結合能が増加したのではないかと考える。

上記課題を解決するための第1の発明に係る組換えプロテオリポソーム製造法は、以下(1)～(3)のステップを含むことを特徴とする。

(1)組換えバキュロウイルスの出芽ウイルスエンベロープ上に膜受容体を発現させるステップ、

(2)膜受容体を発現した組換えバキュロウイルス出芽ウイルスを調製するステップ、

(3)出芽ウイルスとリポソームとを融合させてプロテオリポソームを製造するステップ。

【0006】

「プロテオリポソーム」とは、一般的には、目的とするタンパク質を発現させ、リポソームに再構成したものを意味する。本発明では、目的とするタンパク質は、エンベロープ上に発現される膜受容体である。このため、「組換えプロテオリポソーム」とは、組換えタンパク質である膜受容体をリポソームの膜上に備えたプロテオリポソームのことを意味する。

バキュロウイルスは、環状二本鎖DNAを遺伝子としてもつ昆虫の病原ウイルスである。

10

20

30

40

50

具体的には、Nucleopolyhedrovirus(NPVs)とGeaulovirus(GVs)の2種類に加えて、non occluded virusesが知られている。このうち、NPV(核多角体病ウイルス)は、感染した細胞の核内に核多角体と呼ばれる封入体を全細胞タンパク質の40~50%に達するほど大量につくるので、バイオテクノロジーに多用されている。以下、特にことわらない限り、バキュロウイルスは、NPVを意味する。

バキュロウイルスの感染は、多角体に包埋されたウイルス粒子が幼虫に取込まれることによって開始する。その後、異なった性状を示す包埋ウイルス(Occluded virus; OV)、又は出芽ウイルス(Budded virus; BV)による二段階の融合過程を経て、感染細胞内で多角体が形成され、最終的に感染細胞は死に至る。NPVは、経口感染により広がるといわれている。NPVの多角体は、昆虫の体内に取り込まれた後、中腸内のアルカリ性の消化液とプロテアーゼの働きにより溶ける。ここで、多角体に包埋されていたOVが放出される。その後、OVは中腸微絨毛膜と融合し、中腸基底膜から出芽することにより体液中に放出される。次に、放出されたBVは血球細胞や脂肪細胞を含む細胞に融合後に増殖する。感染末期になると、多角体に包埋されたOVが細胞内に大量に形成され、細胞が死ぬと同時に体外に放出されて別の個体に感染する。

これまでの研究の結果、BVはエンドサイトーシスにより細胞内に侵入する。この細胞内侵入過程には、BVに特異的な膜融合誘起能をもつ膜糖タンパク質gp64が必須であり、エンドソーム内の低pH環境において活性化したgp64がエンドソーム膜との融合を誘起することが示されている。

#### 【0007】

バキュロウイルスのエンベロープ上に膜受容体を発現させるには、例えば、目的とする膜受容体を発現するためのトランスファーベクターと、バキュロウイルスDNAとを適当な細胞(例えば、昆虫培養細胞(Sf9))にコトランスフェクションさせることにより実施することができる。

この細胞から出芽してきた組換えバキュロウイルスを再度別の細胞に感染させると、その感染細胞から出芽してきたウイルスのエンベロープ上には、膜受容体が発現されている。この出芽ウイルスを調製する。出芽ウイルスは、培養上清中に含まれているので、その培養上清をそのまま用いることもできる。但し、培養上清から出芽ウイルスを含む画分を精製することが好ましい。精製方法としては、例えば超遠心法、ゲル濾過法などが用いられる。

出芽ウイルスとリポソームとの融合は、リポソーム溶液のモル浸透圧を調整し、出芽ウイルス懸濁液と適当な融合条件溶液中で、攪拌し混和させることで行える。

#### 【0008】

「膜受容体」とは、脂質膜を貫通する部位を備えた受容体を意味する。膜受容体は、種々のリガンドを受容する。リガンドとしては、例えば、低分子の有機化合物、ステロイド、アミノ酸やその誘導体、ペプチド、タンパク質などがある。受容体がすべてタンパク質であるのに対して、リガンドの多様性は、きわめて対照的である。膜受容体としては、例えば1回膜貫通型受容体、4回膜貫通型受容体、7回膜貫通型受容体がある。

1回膜貫通型受容体の例としては、1型サイトカイン受容体、細胞質側で酵素活性を持つ酵素共役型受容体が挙げられる。このタイプの受容体では、リガンドの結合によって受容体のリン酸化の程度が変化し、キナーゼ活性やホスファターゼ活性などの酵素活性の作用が発現する。チロシンキナーゼ、セリン・スレオニンキナーゼ活性を持つ受容体がある。

4回膜貫通型受容体の例としては、サブユニット構造を形成し、イオンチャンネルとしての機能をもつものが挙げられる。イオンチャンネル型受容体は、リガンドが結合すると、イオンチャンネルが開き、イオンの流入や流出が起こって、特有の効果が発現する。

#### 【0009】

7回膜貫通型受容体の例としては、各種Gタンパク質と共役して作用を発現するものが挙げられる。Gタンパク質共役型レセプター(GPCR)は、ドーパミンやセロトニンなどの生体アミン、プロスタグランジンなどの脂質誘導体、アデノシンなどの核酸、GABAなどのアミノ酸、生理活性ペプチド類(例えば、アンジオテンシンII、ブラジキニン、コレシスト

10

20

30

40

50

キニンなど)をリガンドとするレセプターファミリーを形成している。さらに、GPCRは光、味覚、臭覚に関連する生体外情報伝達物質のレセプターともなっている。GPCRは、情報伝達の中核を担う重要な膜タンパク質である。ヒトゲノム配列を解析することにより、GPCRに属するオーファンレセプターが多く見出されるものと期待されている。このようなGPCRに対応するリガンドの発見によって、有効な医薬品開発が可能になると考えられている。

#### 【0010】

7回膜貫通型受容体の具体例としては、ムスカリン性アセチルコリン受容体、 $\alpha$ 1アドレナリン受容体、ドーパミン受容体、セロトニン受容体、ヒスタミン受容体、グループI代謝調節型グルタミン酸受容体(mGluR1/5)、GABAB受容体、ATP受容体、ロイコトリエン受容体、血小板活性化因子(PAF)受容体、オピオイド受容体、オレキシン受容体、エンドセリン受容体、ニューロペプチドPACAP受容体、CRH受容体、ケモカイン受容体、非神経性ムスカリン受容体、アドレナリン受容体、 $\alpha$ 3アドレナリン受容体、プロスタノイド受容体、プロスタグランジンE受容体、プロスタグランジンE2受容体、ノシセプチン受容体、アンジオテンシンII受容体、カルシトニン受容体、ブラジキニン受容体、グルカゴンファミリーペプチドホルモン受容体、その他のオーファン7回膜貫通型受容体がある。

上記の膜受容体のうち、特に7回膜貫通型受容体は、多種なりガンドに結合し、疾患や医薬品への関与が深いことから、本発明を好適に利用することができる。

#### 【0011】

また、本発明においては、膜受容体が、自己抗体関連疾患に関与するものであることが好ましい。「自己抗体関連疾患」とは、特定の疾患の発症原因或いは結果として、自己抗体が認められる疾患を意味する。そのような疾患として、例えばバセドウ病、重症筋無力症、拡張性心筋症、持続性心房細動、インスリン抵抗性糖尿病、自己免疫性肝炎、重症筋無力症のなかの胸腺腫合併患者などが挙げられる。

バセドウ病は、ヒト甲状腺刺激ホルモン受容体(Thyroid Stimulating Hormone Receptor: TSHR)に対する自己抗体が関与する疾患である。TSHRは、甲状腺細胞膜上に存在する甲状腺刺激ホルモン(TSH)の受容体である。脳下垂体から分泌されるTSHが、甲状腺の細胞膜にあるTSHRに結合すると、甲状腺は代謝機能の調節ホルモンである $T_3$ および $T_4$ を分泌する。TSHRは、分子量87000の7回膜貫通型レセプターで、細胞外ドメインの分子量は約45000である。

#### 【0012】

バセドウ病では、甲状腺成分に対する自己抗体が出現し、これが甲状腺ホルモンの生成、分泌を引き起こし、最終的に甲状腺組織崩壊に至ることが明らかになっている。バセドウ病に代表される甲状腺自己免疫疾患診断用の抗原としては、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、サイログロブリン(Tg)、TSHR等がある。これらの抗原に対する自己抗体をマーカーとしたバセドウ病の診断が行われている。特に、抗TSHR自己抗体はバセドウ病に伴う甲状腺機能の異常を最も強く反映することが知られているので、TSHRを抗原として検出できる抗TSHR自己抗体のマーカーとしての重要性が注目されている。抗TSHR自己抗体の測定法として、スミスらによって開発された方法が知られている(Methods in Enzymology, 74, 405-420, 1981、またはEndocr.Rev., 9, 106-120, 1988)。この方法は、TBII測定法(Thyrotropinbinding inhibition immunoglobulin)と呼ばれており、TBII測定キットとして試薬キットが市販されている(商品名:TRAB「コスミック」II、株式会社コスミックコーポレーション製)。この方法は、TSHとTSHRの反応を利用したラジオレセプターアッセイ法に基づいている。可溶化ブタ甲状腺細胞膜画分TSHRと $^{125}$ I標識ウシTSHと被検血清を加えて反応させ、TSHRと $^{125}$ I標識TSHの結合反応物をポリエチレングリコールで沈殿させ、その放射エネルギー(cpm)を測定する。被検血清中に抗TSHR自己抗体が存在すると、TSHとTSHRとの結合反応が阻害され、沈殿物中の放射エネルギーが低下する。この放射エネルギーの低下の度合いを $^{125}$ I-TSHのTSHRへの結合阻害率(TBII値)という。TBII値は、抗TSHR自己抗体の値を反映すると考えられている。

#### 【0013】

10

20

30

40

50

市販されている抗TSHR自己抗体測定用の試薬では、放射性同位元素が標識物質として使用されているので、保存条件や実施条件等が厳しく規定されている。このため、試薬の取扱いが面倒である、測定後の廃液まで厳密に管理しなければならない等の問題点がある。また、市販の試薬では、ブタの甲状腺膜画分中のTSHRを必須の成分とするため、工業的な量産が困難であるという問題もある。更に、ブタの甲状腺膜画分中のTSHRと測定対象物であるヒトの抗TSHR自己抗体との反応性が、ヒトのTSHRとヒトの抗TSHR自己抗体との反応性と同一ではないことから、測定系に掛からない自己抗体が存在するという問題もある。さらに、従来のTBII法では、患者が持っている自己抗体のTSHR認識部位と、RIAに用いる抗体の認識部位とが競合していない場合には、データがポジティブとならず、パセドウ病以外の甲状腺疾患をスクリーニングする検査としては使用できなかった。

10

これらの問題を解決するための技術として、特開平11-106397号公報、特開2000-232880がある。しかし、未だに完全な測定系は開発されていない。

#### 【0014】

重症筋無力症は、アセチルコリン受容体に対する抗体が関与することが知られている。アセチルコリン受容体には、4種類5個の4回膜貫通型サブユニット(2、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )からなるチャンネル型のニコチン性受容体と、7回膜貫通型のムスカリン性受容体とが存在する。このうち、ニコチン性受容体は、骨格筋の神経筋接合部のシナプス後膜に存在するアセチルコリン受容体(AChR)である。このレセプターに対する自己抗体ができると、神経から筋肉への指令伝達が円滑に行われず、アセチルコリン(ACh)が十分に作用できず筋収縮がうまくいなくなる。筋力が弱くなり、著しく疲れ易くなるほか、特に同じ動作を繰り返すと力がなくなる症状をもつ重症筋無力症(myasthenia gravis, MG)となる。重症筋無力症の有病率は、日本人では人口10万あたり5人程度であり、男女比は1:2である。この患者の85%に抗AChR抗体が確認されている。抗AChR抗体の測定には、AChRと神経毒との結合を阻害する活性に基づいて抗AChR抗体を検出する方法(阻害型)と、AChR神経毒複合物に結合するタイプの抗AChR抗体を測定する方法(非阻害型)がある。前者ではConcanavalin A sepharose法(ConA法)、後者ではimmunoprecipitation法(IP法:抗ヒトIgG法)が一般的である。このうち、最も汎用されているのはIP法である。IP法は $^{125}\text{I}$  B ungarotoxinと結合させたAChR(AChR $^{125}\text{I}$  BuTx複合物)に、MG患者血清を作用させ、その後抗ヒトIgG血清と反応させ、免疫沈降物中の $^{125}\text{I}$ の放射活性を測定する。抗AChR自己抗体測定用の試薬では、放射性同位元素が標識物質として使用されているため、保存条件や実施条件等、試薬の取扱いが面倒であり、測定後の廃液まで厳密に管理しなければならない等の問題点があった。このため、未だに完全な測定系は開発されていなかった。

20

30

また、重症筋無力症のなかの胸腺腫合併患者には、リアノジン受容体に対する自己抗体が認められる。この自己抗体を測定する適当な測定系は開発されていない。

#### 【0015】

インスリン抵抗性糖尿病には、インスリン受容体に対する自己抗体が関与することが知られている。この疾患では、ホルモン受容体の鎖に自己抗体が結合することで、インスリンの受容体への結合が阻害されたり、受容体の減少を招いたりする。インスリンが作用しないと、血糖値が下がらず糖尿病となる。この症例は黒人に多いが、日本人にも比較的多いとされる。男性よりも女性に多く、年齢には特徴がない。空腹時血糖値と耐糖能は、正常範囲から糖尿病とされる値まで広がっている。血中インスリン値は、正常の5倍~100倍と幅広い。但し、血中インスリン値は、低い者でも正常値の5倍以上(50 $\mu\text{U/ml}$ )を示し、半数が100 $\mu\text{U/ml}$ 以上の高値となる。診断基準は、黒色皮膚腫や自己免疫疾患に伴う諸症状や検査所見が陽性を示し、かつ高度の高インスリン血症を伴う高血糖を認めた場合に本疾患を疑い、抗インスリン受容体抗体が検出されたときに確定する。治療には、大量のインスリンを必要とする場合が多い。日本人の患者では、2~3年で自然寛解することも多いとされる。但し、合併症により予後不良となる場合もある。この疾患に対して、容易に自己抗体を測定できる測定系が望まれていた。

40

#### 【0016】

拡張型心筋症では、 $\alpha$ 1アドレナリン受容体に結合する自己抗体が表れることが知られ

50

ている。心臓におけるアドレナリン受容体の70%～80%は 1受容体である。拡張型心筋症患者血清中には、高頻度(31%)に 1受容体のセカンド細胞外ループに対する自己抗体が検出される。この自己抗体が心筋刺激作用を有し、心毒性作用を発揮することが報告されているので、自己抗体が拡張型心筋症による心不全の病態に關与している可能性が指摘されている。拡張型心筋症以外の慢性心不全患者においても、頻度は少ないものの、抗心筋自己抗体が認められている。また、拡張型心筋症患者血清中に、高頻度(38%)にM2受容体のセカンド細胞外ループに対する自己抗体が検出される。非持続性心室頻拍は、抗 1アドレナリン受容体抗体や抗Na K ATPase抗体と關連している。持続性心房細動は、抗M2ムスカリン受容体抗体と關連している。拡張性心筋症を治療しない場合には、心臓のポンプ能力が低下して心臓能力を大いに減退させる。加えて、自己抗体の浸潤による心筋組織の膨張を生じる。しかし、疾患の初期段階で透析によって患者の血液から自己抗体を除去すると、1年以内に心筋が再生し、心筋能力が劇的に向上し、正常値にほぼ回復する。この疾患に対する簡易な自己抗体測定系が開発されることが望まれている。

10

#### 【0017】

自己免疫性肝炎は、アシアログリコプロテイン受容体 (AGPR) に対する自己抗体による疾患であると考えられている。この疾患の年間推定患者数は1,400症例とされている。近年には、症例数が増加傾向を示している。発症年齢は50歳を中心とする一峰性を示す。多くの患者は、中年以降に発症する。近年には、発症年齢の高齢化が認められる。疾患の男女比は、約1:7で女性の患者が多い。AGPRは、肝実質細胞特異的に発現する膜タンパク質であり、血清中のアシアロ糖タンパク質を肝臓に於いて分解するために取り込む機能を有している。肝硬変、肝癌、再生肝などの肝臓病態に応じて、AGPRの発現が減少することが報告されている (Stadnik et al., J.Nucl.Med. 26: 1233 1242, 1985)。また、一部の血清中に、AGPR自体が存在していることが報告されている (勝木等、アルコール代謝と肝: 第12巻p65～p68,1992)。自己抗体を測定する方法として、抗アシアロ糖タンパク質受容体抗体(ASGPR)を発現したヒト培養細胞株を使用する方法、大腸菌組換え抗原を用いる方法などが試みられているものの、未だに良好な測定系は確立されていない。

20

本発明は、上記に例示した疾患に限られず、その他の膜受容体に関する自己抗体関連疾患に応用することができる。

#### 【0018】

「リポソーム」とは、リン脂質 (PL, phospholipid) を含有する脂質二重層を含み、内部に水相を備えた閉鎖小胞を意味する。リポソームの形態としては、脂質二重層が二層以上の複数に渡ってタマネギ状に重なった多重層リポソーム (MLV, multilamellar vesicle) と、脂質二重層が一層のリポソーム (UV, unilamellar vesicle) とに分けられる。UVは、粒子径によって、小さな一枚膜リポソーム (SUV, small unilamellar vesicle) と、大きな一枚膜リポソーム (LUV, large unilamellar vesicle) とに分類される。本発明の方法では、MLVまたはUVのいずれを用いることもできる。

30

LUVを用いると、組換えプロテオリポソームを調製したときに、膜受容体がプロテオリポソームの全体に良好に配置されることから、後のデータのバラツキが少なくなるので好ましい。UVは超音波処理やエクストルーダーを用いて調製することが多い一方、MLVは調製方法が簡易であるので、プロテオリポソームの調製法に掛かる手間が少なくて済むという利点があることから好ましい。

40

#### 【0019】

リン脂質とは、リン酸と脂質とを含む物質を意味する。構成成分に応じて、グリセロール骨格を有するグリセロリン脂質と、スフィンゴシン骨格を有するスフィンゴリン脂質とに分類される。グリセロリン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ジホスファチジルグリセロール (カルジオリピン)、ホスファチジン酸 (PA) 等を例示できる。また、スフィンゴリン脂質としては、例えばスフィンゴミエリンを例示できる。

#### 【0020】

50

本発明に用いるリポソームは、上記各種リン脂質成分を任意の比で混合したものをを用いることができる。例えば、PCを主たる成分（例えば、リン脂質全体の約40%～約100%の割合）とすることができる。PCに加えて、PSを添加することが好ましい。PSは、バキュロウイルスのgp64のレセプターであるため、バキュロウイルスとリポソームとの膜融合が円滑に行われる。この場合に、PSの混合割合としては、PCの1質量部に対して、約0.1質量部～約1質量部（好ましくは約0.2質量部～約18質量部）とする。本発明のリポソームを調製するに当たっては、構成脂質に適当なアンカー用物質（例えば、ビオチン）を結合しておくことが好ましい。そのようにすれば、アンカー用物質に結合する結合物質（例えば、アビジン）を用いることにより、プロテオリポソームを検出用プレートに結合する処理を行い易いからである。

10

#### 【0021】

上記方法によって調製された組換えプロテオリポソームは、検出用プレートにコートすることにより、組換えプロテオリポソームの膜表面上に発現された膜受容体に対する自己抗体の有無を検出するためのシステムに用いることができる。プレート上に組換えプロテオリポソームをコートするには、リポソームとプレート表面との間を結合できる物質（リポソームとプレート表面には、同一物質を用いても良いし、別々の物質を用いても良い。このような物質として、例えばアビジン-ビオチン系を例示できる。本発明においては、これらの物質には限定されずに、各種のものを使用できる）を配置しておくことが好ましい。例えば、リポソームを構成する脂質をビオチン化しておき、プレート表面にアビジンをコートしておくことにより、組換えプロテオリポソームをプレート表面に円滑に固定することができる。また、このとき組換えプロテオリポソームは、リンカー含有物質を介して、検出用プレートにコートすることが好ましい。リンカーは、脂質とビオチンとの間に配置される。そのようなリンカーとして、例えばポリエチレングリコール(PEG)を用いることができる。リポソームの表面を親水性高分子ポリエチレングリコール(PEG)で覆ったリポソームは血中蛋白質などの生体成分の非特異的吸着を抑制する構造になる。そのため、リンカーとしてPEGを用いたビオチン化PEGリン脂質が含まれると単なるPEGリン脂質として作用する可能性があり、ELISA系を構築したときに、非特異的な発色が抑えられて、S/N比が向上し、ELISA系の特異性が更に向上する。

20

また、上記検出用プレートと、自己抗体の有無を評価する血清を希釈する希釈用緩衝液と、洗浄用緩衝液と、前記自己抗体を認識すると共に標識された二次抗体とを備えることにより検出用キットを提供することができる。検出用キットには、血清を希釈した希釈用緩衝液と共に、プレートのウェルに滴下或いは希釈用緩衝液に混合するための抗体除去用リポソームを備えることが好ましい。そのようなリポソームは、固相化されたリポソームと同じ成分を備え、かつ膜受容体を発現していないものを用いることが好ましい。血清中に抗リポソーム抗体或いはリポソームに非特異的に吸着する抗体が存在する場合には、その抗体に結合して測定系から取り除く。このため、データのベースラインを低下させ、S/N比を向上させる。

30

#### 【0022】

検出用プレートとしては、8穴、48穴、96穴、または384穴などのマイクロタイタープレートが使用できる。その検出法としては、例えば、酵素免疫（ELISA：Enzyme linked immunosorbent assay）測定、ラジオイムノアッセイ、ラジオレセプターアッセイ、蛍光免疫測定、化学発光アッセイが挙げられる。本発明の利点に鑑みれば、非放射性的の標識系を用いる測定法、例えば、EILSA測定、蛍光免疫測定が好ましい。

40

ELISA測定法は、抗体を酵素で標識し、その抗体と結合する物質（抗原）を検出する方法である。抗原タンパク質の検出方法として、抗原抗体反応を利用して検体中の抗原タンパク質、或いは特定の抗原タンパク質に結合する抗体を検出する分析方法として広く用いられる。測定対象とする抗原と反応する抗体（自己抗体、または一次抗体）をそのまま酵素標識することもできる。通常は、標識のない一次抗体を検査プレートにコートした抗原に対し作用させ、その一次抗体に対する二次抗体を作用させる。二次抗体は、予めペルオキシダーゼやガラクトシダーゼ等の酵素を化学的に結合させている。一次抗体に結合した

50

二次抗体の酵素活性に基づき、その酵素反応によって発色等する基質を加えることで、目的とする抗原の有無や量を検出する。

#### 【0023】

ヒトにおける自己抗体の検査用ELISA法キットの場合には、一般的に目的とする血清を希釈用緩衝液で希釈し検出用プレートに作用させる。このとき、希釈された血清中の自己抗体が一次抗体となる。洗浄用緩衝液で検出用プレートを洗浄した後、標識された抗ヒト抗体を二次抗体として検出用プレートに作用させ、再度洗浄用緩衝液で洗浄した後、酵素活性検出を比色等により検出する。

ELISA法の標識酵素としては、特に限定はない。例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどの酵素を用いることができる。

二次抗体を蛍光で検出する蛍光免疫測定の場合には、例えば、Cy3、Cy5、フルオレセイン（FITCなど）のような蛍光物質で二次抗体を標識したものが使用できる。

本発明において、疾患治療剤の治療効果をモニタリングする方法は、甲状腺疾患またはバセドウ病、重症筋無力症、拡張性心筋症、持続性心房細動、インスリン抵抗性糖尿病、自己免疫性肝炎、重症筋無力症のなかの胸腺腫合併症からなる疾患群のいずれかの疾患患者の血清を、上記の検出用プレートまたは検出用キットを用いて測定することを特徴とする。

本発明に係る甲状腺疾患またはバセドウ病、重症筋無力症、拡張性心筋症、持続性心房細動、インスリン抵抗性糖尿病、自己免疫性肝炎、重症筋無力症のなかの胸腺腫合併症からなる疾患群のいずれかの疾患の有無についてスクリーニングする方法は、ヒト血清を上記の検出用プレートまたは検出用キットを用いて測定することを特徴とする。

#### 【発明の効果】

#### 【0024】

本発明によれば、放射能を用いることなく、膜受容体に対する結合物質（例えば、自己抗体）の有無を定性的・定量的に評価可能な診断用組換えプロテオリポソームを提供することができる。このプロテオリポソームを用いることにより、検出用プレート及び検出用キットを調製することができる。この検出用プレートは、自己抗体の存在の有無に用いることができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0025】

本発明の実施形態について、図面を参照しつつ詳細に説明する。本発明の技術的範囲は、下記実施形態によって限定されるものではなく、その要旨を変更することなく、様々に変更して実施することができる。本発明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及ぶ。

#### 【0026】

図1～図3には、本実施形態の診断用組換えプロテオリポソームの作製法、及びそのプロテオリポソームを用いたELISA（Enzyme linked immunosorbent assay）系の調製法の概要を示した。

本実施形態に関するプロテオリポソームを用いたELISA系を調製するには、大きく3つのステップに分けられる。すなわち、（1）対象とする受容体をコードする遺伝子を持つバキュロウイルスを調製するステップ（図1を参照）、（2）このバキュロウイルスとリポソームとを融合させて組換えプロテオリポソームを調製するステップ（図2を参照）、及び（3）その組換えプロテオリポソームをELISAに応用するステップ（図3を参照）である。これらのステップについて、順に説明する。

#### 【0027】

まず、図1に示すように、対象とする膜受容体をコードする遺伝子を調製する。多くの場合には、目的とする遺伝子は、cDNAライブラリー1から膜受容体をコードする遺伝子をクローニングすることにより得られる。その場合には、例えば、適当なプライマーを用いたPCR法を利用できる。得られた遺伝子をトランスファーベクターに組み込み2、バキュロウイルスDNA3と共に、昆虫培養細胞（例えば、Sf9細胞）4にコトランスフェクション

10

20

30

40

50

する。対象とする遺伝子をトランスファーベクターに組み込む際には、後の精製に都合がよいように、適当なタグ（例えば、His Tag）を付加しておくことが好ましい。この昆虫培養細胞から出芽した組換えウイルス5を再度培養細胞6に感染させる。トランスファーベクターとバキュロウイルスDNAは、昆虫細胞内で相同組換えを起こすので、対象となる遺伝子をもつ組換えバキュロウイルスの出芽ウイルス7が上清に出現する。そこで、培養上清中に発芽したバキュロウイルスを精製する。精製されたウイルス7のエンベロープ上には、目的とする膜受容体7Aが発現されている。得られた組換えバキュロウイルス7は、必要に応じて再度昆虫培養細胞に感染させ純化・増幅を行い、次のステップに供する。

#### 【0028】

次に、図2に示すように、この出芽バキュロウイルス7とリポソーム8とを融合させて、組換えプロテオリポソーム9を調製する。ウイルス7とリポソーム8の融合は、バキュロウイルスエンベロープ上の膜融合タンパク質gp64 7Bを介して、pH4程度の酸性pHで起こる。リポソームは、SUV、LUV、またはMLVのいずれを用いても良い。但し、調製が容易なMLVを用いることが好ましい。また、リポソームを構成する物質のいずれかをビオチン化しておく、プレートに固相化する際に好ましい実施形態となる。出芽バキュロウイルス7とリポソーム8とを融合させた後には、そのまま用いることもできる。但し、超遠心・ゲル濾過法等の周知の方法により、組換えプロテオリポソーム9を精製・回収して用いることが好ましい。

次に、図3に示すように、プレート10のウェル11表面上に組換えプロテオリポソーム9をコートする。このとき、リポソーム9にビオチン13が含まれている場合には、ウェル11の表面に予めstreptavidin12を固定しておく。この場合に、市販のstreptavidin・コート・マイクロプレートを使用することができる。ビオチン化プロテオリポソーム9をstreptavidinコートプレートに固定するには、ビオチン化プロテオリポソームを含む溶液を数時間、好ましくは1晩の間、プレート10のウェル11内に接触させておく。溶液中のプロテオリポソーム濃度は、タンパク質濃度として0.01µg/ml以上であり、好ましくは0.5µg/ml~20µg/mlである。こうして、組換えプロテオリポソーム9を固相化したELISAプレート18を用いて、血清中の自己抗体14の有無を容易に評価するELISAシステムを構築できる。このELISAシステムは、患者のスクリーニング用検査に用いられる。図中の符号は、15が二次抗体であり、16が発色前の物質、17が酵素15Aによって発色した物質である。

さらに、自己免疫性疾患においては、自己抗体の濃度が病状及び治療効果などとも関連する場合があるので、血清中の自己抗体濃度を測定することにより、治療剤の治療効果或いは改善状態のモニタリングにも使用できる。

次に、実施例を説明することにより、本発明を更に詳細に説明する。

#### 【実施例】

#### 【0029】

<野生型AcNPVプロテオリポソームの試験方法>

実施例1 野生型AcNPVの感染及び出芽ウイルス(BV)の回収

Sf 900II SFM培地 11mlを加えたT 75培養フラスコに、継代していたSf9細胞溶液1mlを加え、その後野生型AcNPVをMOI(感染多重度)=1で感染させた。感染120時間後の細胞培養液を遠心(1,000×g、5min、4 )し、培養上清を細胞沈殿から分離回収した。次に、培養上清を超遠心機(Beckman L 70:ローターとしてSW28を用いた)を用いて、超遠心(35,000×g、60min、15 )した。得られたBV粒子を含む沈殿に、リン酸緩衝塩類溶液(PBS) [1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、10.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140mM NaCl、40mM KCl (pH6.2)]を加えて懸濁し、シヨ糖密度勾配[10%,15%,20%,25%,30% sucrose (w/v in PBS pH6.2)]に重層して超遠心(13,000×g、30min、15 )した。このようにして得られたバンド(核酸を含まずウイルスの膜タンパク質のみを含むウイルスエンベロープ)を回収した。このバンドをPBS (pH6.2)で希釈後、超遠心(35,000×g、60min、15 )を行い、得られた沈殿を10mM Tris HCl/10mM NaCl (pH7.5)に懸濁し、氷中に保存した。

#### 【0030】

10

20

30

40

50

## 実施例 2 タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はBradford法により決定した。回収したウイルス溶液の10  $\mu$ l、及び40  $\mu$ lに、10mM Tris HCl/10mM NaCl (pH7.5)を加えて全体の体積を1.3mlに調製し、プロテインアッセイ試薬 (BIO RAD) を0.2ml加え、ボルテックスした。室温にて5分間静置した後、吸光度を595nmで測定し、タンパク質の濃度を決定した。コントロールとして、2mg/mlのBSA溶液の 2、4、6、8  $\mu$ lを用い、上記と同様の操作を行った。

## 実施例 3 Octadecyl Rhodamine B Chloride (R18) 標識法

R18 (Molecular Probes) を溶かしたクロロホルム/メタノール (1:1) 溶液にアルゴンガスを吹き付け、R18を乾固させた。ここに、R18濃度が4mMになるようにエタノールを加えた。次に、R18のエタノール溶液をBVのタンパク量1mgあたり40nmolのR18量になるように、BVを加え、ボルテックス処理した。この溶液を室温で1時間遮光した状態で静置した後、10mM Tris HCl/10mM NaCl (pH7.5, 4 )で平衡化したSephadex G 50カラム (Amersham Biosciences) にアプライし、上記と同じ緩衝液で溶出し、分画した。溶出速度は5分あたり1mlに設定した。R18標識BVを含む画分は、遮光し氷中に保存した。

【 0 0 3 1 】

## 実施例 4 リポソームの調製

リポソームを調製するために使用した脂質は、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine, PC)、ホスファチジルセリン (phosphatidylserine, PS)、ホスファチジルグリセロール (phosphatidylglycerol, PG)、ホスファチジン酸 (phosphatidic acid, PA)、及びホスファチジリンイノシトール (phosphatidylinositol, PI)であった。これらの脂質は、Avanti Polar Lipidsから購入した。

LUV (large unilamellar vesicle) の調製には、逆相蒸発法を用いた (Maezawa, S., Yoshimura, T., Hong, K., Duzgunes, N., and Papahadjopoulos, D. (1989) Mechanism of protein induced membrane fusion: fusion of phospholipid vesicles by clathrin associated with its membrane binding and conformational change. Biochemistry 28:1422-1428)。

リン脂質を溶かしたクロロホルムをロータリーエバポレーターで減圧還流により除去した。薄膜状になったリン脂質にジエチルエーテルを10  $\mu$  mol/ml加え、リン脂質を完全に溶解した。リン脂質とジエチルエーテルとの比が1:3となるように、10mM Tris HCl/10mM NaCl (pH7.5)を加えた後、アルゴンガスを封入し、浴槽型ソニケーターで2分間超音波処理をしてw/oエマルジョンを得た。次に、ロータリーエバポレーターでジエチルエーテルを除去した。ゲル状になったリン脂質をボルテックス処理で破砕した後、ロータリーエバポレーターで残留ジエチルエーテルを除去した。リン脂質濃度が10  $\mu$  mol/mlとなるように、上記と同じ緩衝液を加え、ロータリーエバポレーターで完全にジエチルエーテルを除去した。調製したリポソームを0.4  $\mu$  m、0.2  $\mu$  m、0.1  $\mu$  mの順にポリカルボネートメンブレンフィルターで加圧濾過し、リポソームの直径を0.1  $\mu$  mに揃えた。調製したLUVは、アルゴンガスを充填し4 で保存した。

【 0 0 3 2 】

MLV (multi lamellar vesicle) は、次の方法で調製した。リン脂質を溶かしたクロロホルムをロータリーエバポレーターで減圧還流により除去し、薄膜状になったリン脂質に10mM Tris HCl/10mM NaCl (pH7.5)を1ml加え、ボルテックスを30秒行った。調製したリポソームを0.4  $\mu$  mのポリカルボネートメンブレンフィルターで加圧濾過した。MLV以外のリポソームを除去するために、遠心 (6,000  $\times$  g、20min、4 )を行った。

遠心で得られた沈殿物を緩衝液に懸濁し、得られた上清とその懸濁溶液を再度上記と同じ条件で遠心した。得られた沈殿物を緩衝液に懸濁し、上記と同じ条件で遠心した。一方、懸濁溶液の遠心で得られた上清と先の上清の遠心で得られた沈殿物とを混合し、上記と同じ条件で遠心した。同様の操作を数回繰り返して、MLV以外のリポソームを除去した。調製したMLVは、アルゴンガスを充填し4 で保存した。

【 0 0 3 3 】

## 実施例 5 リポソーム濃度の決定

10

20

30

40

50

リボソームの濃度は、リン脂質濃度で表示した。リン脂質濃度は、リン脂質を過酸化水素と硫酸により湿式分解し、得られた分解液中の無機リンをFiske Subbarow試薬により発色させることで測定した。まず、サンプルと、コントロールとして使用したKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液とのそれぞれに、4mmolのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加え、170℃で30分以上加熱し、空冷した。その後、過酸化水素を6%となるように加え、170℃で30分間加熱した。次に、空冷したサンプル及びコントロールに、0.25N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>に溶解した0.22% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>・4H<sub>2</sub>Oをモリブデン酸アンモニウムの最終濃度が0.044%となるように加え、ボルテックスを行い、発色試薬(30mg ANS A(1 アミノ 2 ナフトール 4 スルホン酸)、1mg Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)を加えてボルテックスを行った後、沸騰水中で10分間加熱した。空冷したサンプル及びコントロールとして使用したKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>の吸光度を830nmで測定し、サンプル中のリン含量を決定した。

10

## 【0034】

実施例6 膜融合測定(R18 dequenching assay)

融合用緩衝液は、pHに応じて各種のものを用いた。すなわち、pH3.0では10mM CH<sub>3</sub>COOH HCl/10mM NaCl、pH4.0 - 5.0では10mM CH<sub>3</sub>COOH CH<sub>3</sub>COONa/10mM NaCl、pH6.5では10mM MES NaOH/10mM NaCl、pH7.5では10mM Tris HCl/10mM NaClの緩衝液を用いた。全ての緩衝液の浸透圧は、適量のスクロースを加えて10mM Tris HCl/10mM NaCl (pH7.5)の浸透圧に揃えた。このとき、浸透圧測定装置オズモスタット™(ARKRAY)を使用した。

R18は標識膜中では自己消光し、消光度は膜中における存在比に比例する。R18で標識されたサンプルと非標識のサンプルとが融合すると、膜中でのR18の存在比が低下するため、蛍光の回復が観察される。まず、R18で標識されたBVを緩衝液で10倍に希釈し、蛍光セルに入れ、攪拌しながら蛍光光度計(HITACHI F 2500)を使用して蛍光強度を測定した(励起波長560nm、蛍光波長580nm)。次に、非標識のリボソームを蛍光セル中に加え、攪拌しながら50秒間、蛍光強度を測定した。さらに、ポリオキシエチレンラウリルエーテルを最終濃度が1%になるように加え、攪拌しながら室温で放置し、蛍光強度を測定した。膜の融合率(%)は、次式に従って算出した。

20

$$\text{融合率}(\%) = 100 \times (F_3 - F_2) / (F_1 - F_2)$$

ここで、F<sub>3</sub>はリボソームを加えた後の蛍光強度、F<sub>2</sub>はR18標識BVのみの蛍光強度、F<sub>1</sub>はポリオキシエチレンラウリルエーテルを加えた後の蛍光強度である。

## 【0035】

<組換えAcNPVプロテオリボソームの試験方法>

組換えAcNPVプロテオリボソームの試験については、特にことわらない限り、野生型AcNPVプロテオリボソームの試験で用いた方法と同じ方法を用いて、タンパク質、リン脂質等を測定した。

30

実施例7 AChR組換えバキュロウイルスAcNPVの調製

Clontech社のヒト骨格筋cDNAライブラリーを用い、2本のPCRプライマーを用いてAChR鎖翻訳領域のクローニングをpfu polymeraseを用いたPCR法により行った。PCR法には、プライマー1(配列番号1: gtagc~~at~~atgagccctggcctctcct)と、プライマー2(配列番号2: ttctc~~at~~gagtccttgctgattcaatgag)とを用いた。配列のうち、下線部分は付加した制限酵素部位(NdeI及びXhoI)を意味する。

得られた1.4kbpのDNA断片をプライマーに付加したNdeI、XhoI制限酵素部位で消化し、Novagen社PET 30a(+)のマルチクローニングサイトのNde I、Xho Iにライゲーションした。得られたクローン(PET/AChR)をDNAシーケンサーにより塩基配列を決定し、Acc.No. Y00762として登録されているAChR遺伝子翻訳領域と一致した配列のDNA断片が得られたことを確認した。

40

## 【0036】

PET/AChRをテンプレートとしてバキュロウイルストランスファーベクターを作製するために、次のプライマーによりTaKaRa Ex Taqを用いてPCR法を行った。プライマーとして、プライマー3(配列番号3: cgg~~a~~atcggatggagccctggcctctc)及びプライマー4(配列番号4: gctc~~t~~atagccttggtagcagccggatc)を用いた。両プライマーの5'末端側には、それぞれ制限酵素EcoR I及びXba Iの認識部位(下線部分)を付加した。これらのプライ

50

マーを用いることにより、PET 30a(+)由来のHis TagがAChR のC末端に融合されるので、抗His Tag抗体によりAChR の発現確認が容易となる。

得られたDNA断片をEcoR I、Xba Iで消化し、BD Biosciences社バキュロウイルストランスファーベクターpVL1392のマルチクローニングサイトのEcoR I、Xba I部位にライゲーションした。ライゲーション産物をコンピテントセルに形質転換し、プラスミドDNAを得た。得られたクローン(pVL/AChR )は、DNAシーケンサーによりAChR 翻訳領域およびHis Tag配列がpVL1392ベクターに組み換えられていることを確認した。

#### 【 0 0 3 7 】

AChR 組換えトランスファーベクターとバキュロウイルスDNAを、CELLFECTIN Reagent (Invitrogen社) を用いてSf9細胞にコトランスフェクションし、Sf9細胞内での相同組換えによりAChR 組換えバキュロウイルス(AChR 組換えAcNPV)を作製した。得られたAChR 組換えAcNPVを含む培養上清を用いて、新たにSf9細胞に感染させ、抗His Tag抗体により検出したところ、Sf9細胞とAChR 組換えAcNPV出芽ウイルスにAChR が発現していた。得られたAChR 組換えバキュロウイルスは、ブランク法により純化し、組換えリポソーム作製用に供した。

10

#### 【 0 0 3 8 】

##### 実施例 8 TSHR組換えバキュロウイルスの調製

Clontech社ヒト甲状腺cDNAより以下のPCRプライマーを用いてTSHR 翻訳領域のクローニングをpfu polymeraseを用いたPCR法により行った。PCR法には、プライマー5 (配列番号5 : agtcggatccaccatgagccggcggacttgct) と、プライマー6 (配列番号6 : tgttctcgaacaaccgtttgcatatactctt) とを用いた。配列の下線部分は、付加した制限酵素部位 (BamH I及びXho I) を意味する。

20

得られた2.3kbpのDNA断片をプライマーに付加したBamH I、Xho I 制限酵素部位で消化し、Novagen社PET 28a(+) のマルチクローニングサイトのBamH I、Xho I にライゲーションした。得られたクローン(PET/TSHR)をDNAシーケンサーにより塩基配列を決定し、Acc.No.A34990として登録されているTSHR遺伝子翻訳領域と一致した配列のDNA断片が得られたことを確認した。

#### 【 0 0 3 9 】

PET/TSHRをテンプレートとしてバキュロウイルストランスファーベクターを作製するために、次のプライマーによりpfu polymeraseを用いたPCR法を行った。プライマーとして、プライマー7 (配列番号7 : agtcggatccaccatgagccggcggacttgct) 、及びプライマー8 (配列番号8 : ttcggaattcgttagcagccggatctcagt) を用いた。両プライマーの5'末端側には、それぞれ制限酵素BamH I及びEcoR Iの認識部位(下線部分)を付加した。これらのプライマーを用いることにより、PET 28a(+)由来のHis Tag がTSHRのC末端に融合されるので、抗His Tag抗体によりTSHRの発現確認が容易となる。

30

#### 【 0 0 4 0 】

得られたDNA断片をBamH I、EcoR I で消化し、BD Biosciences社バキュロウイルストランスファーベクターpVL1393のマルチクローニングサイト、BamH I、EcoR I部位にライゲーションした。得られたクローン(pVL/TSHR)は、DNAシーケンサーによりTSHR翻訳領域およびHis Tag 配列がpVL1393ベクターに組み換えられている事を確認した。

40

TSHR組換えトランスファーベクターとバキュロウイルスDNAとの両者をSf9細胞にリン酸カルシウム法によりコトランスフェクションし、Sf9細胞内での相同組換えによりTSHR組換えバキュロウイルス(TSHR組換えAcNPV)を作製した。得られたTSHR組換えAcNPVをHigh Five 細胞に感染して、抗His Tag 抗体にて検出したところ、High Five 細胞にてTSHRが発現していることを確認した。

#### 【 0 0 4 1 】

##### 実施例 9 ブランク純化及びウイルス力価の測定

TSHR組換えAcNPVとAChR組換えAcNPVのブランク純化及びウイルス力価の測定は、以下のように行った。6穴プレートの各ウェルに $1.0 \times 10^6$ 個のSf9細胞をまき、細胞が底面に附着するのを待って培地を取り除いた。ウイルス液をCarlson液[0.12M NaCl, 1.4mM CaCl<sub>2</sub> 1

50

.7mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7mM KCl, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1.4mM NaHCO<sub>3</sub>, 8g/l Glucose, 5 μg/ml Gentamycin] (または Sf 900II SFM培地) で段階希釈し、このウイルス液を各ウェルに500 μl 加え、15分毎にロッキングし、1時間感染させた。感染後、ウイルス希釈液を除去し、0.5%のSeaPlaque agarose (FMC Bioproducts社) を含む Sf 900II SFM培地を加え、培地が固化するまで室温に静置した。培地の固化後、27 °C で数日間培養した。ウイルス感染細胞が形成するプラークをパスツールピペットにより寒天培地ごと抜き取り、1mlのCarlson液または Sf 900II SFM培地中でピペティングすることにより、寒天培地中のウイルスを液中に放出させた。得られた単一プラーク由来のウイルス液を Sf9細胞に感染させて増殖させた。力価が低い場合には、感染を繰り返して、力価を増幅できる。その後、感染細胞の培養液を回収し、遠心分離 (1,700 × g, 10min) し、上清を0.2 μmフィルターにより濾過して得られた濾液を、組換えバキュロウイルスストック液として組換えプロテオリポソーム調製用組換えバキュロウイルス出芽ウイルス調製に供した。ウイルスストック液は、適当に分注し、-80 °C で保存した。

10

分注したストック一本について解凍し、組換えウイルスの力価 (Titer) を、上記のウイルス純化と同様の方法でプラーク法を行い、感染後1週間目に形成したプラークを計数することで求めた。

#### 【0042】

##### 実施例10 SDS PAGE電気泳動

タンパク質サンプルに等量のサンプル緩衝液[114mM Tris HCl (pH6.8)、3.64% SDS、25.4% glycerol、9% mercaptoethanol、0.02% bromophenol blue]を加え、5分間煮沸して変性させた。次に、12%分離用ゲル [12% acrylamide、0.41% bisacrylamide、0.1% SDS、375mM Tris HCl (pH8.8)、0.01% APS、0.001% TEMED]と濃縮用ゲル [3.89% acrylamide、0.11% bisacrylamide、0.1% SDS、125mM Tris HCl (pH6.8)、0.01% APS、0.001% TEMED]からなるミニスラブゲルと電気泳動用緩衝液 (Running buffer) [0.1% SDS、25mM Tris、52mM glycine (pH8.3)]を泳動槽 (ATTO) にセットし、サンプルを濃縮ゲルの注入孔に注入後、ゲル1枚につき30mAの定電流で約60分間通電し、電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをBio Safe Coomassie (BIO RAD) に1時間浸漬し、分離されたタンパク質を染色した。

20

次に述べる銀染色及びウエスタンプロット分析には、染色前のゲルを用いた。

#### 【0043】

##### 実施例11 銀染色

銀染色には、銀染色IIキットワコー (Wako) を用いた。まず、SDS PAGE後 (染色前) のゲルを固定液 1に浸漬し、10分間振盪した。次に、固定液 1を捨て、ゲルを固定液 2に浸漬し、10分間振盪した。その後、固定液 2を捨て、ゲルを増感液に浸漬し、10分間振盪した。増感液を捨て、ゲルを脱イオン水で5分間振盪した後、発色液で15分間振盪し、タンパク質を検出した。

30

##### 実施例12 ウエスタンプロット分析

まず、SDS PAGE後 (染色前) のゲルを転写バッファー (48mM Tris、39mM glycine、20% methanol) に20分間浸漬し平衡化した。トランスプロットSDセル (BIO RAD) の電極板の間に、転写バッファーに浸漬した濾紙、メタノールに浸漬したpolyvinylidene difluoride (PVDF) 膜、ゲル、濾紙の順に陰極から陽極に向かって重ね合わせた。20Vの定電圧で90分間通電し、ゲル中のタンパク質をPVDF膜に転写した。転写後、1%ゼラチンを含むリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) [20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、140mM NaCl、(pH7.2)]にPVDF膜を浸漬し、室温で2時間ブロッキングを行った。次に、PVDF膜をPBST [PBS (pH7.2) +0.05% Triton X 100] 溶液で洗浄 (5分間 × 3回) し、1次抗体液中に1時間浸漬させた。その後、PVDF膜をPBST溶液で洗浄 (5分間 × 3回) し、2次抗体液中に1時間浸漬させた。再度PVDF膜をPBST溶液で洗浄 (5分間 × 3回) し、コニカイムノステインHRP 1000キット (生化学工業) を用いて、膜上に転写されたタンパク質を抗体に結合したペルオキシダーゼによる発色反応で検出した。1次抗体液として、PBS (pH7.2) で1000倍に希釈した抗His Tag抗体 (rabbit Anti His Tag; MBL) 液を用いた。2次抗体液には、PBS (pH7.2) で1000倍に希釈し

40

50

た西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギIgG抗体 (goat Anti Rabbit IgG(H+L chain) Peroxidase; MBL) 液を用いた。

【 0 0 4 4 】

実施例 1 3 組換えプロテオリポソーム調製用組換えバキュロウイルスAcNPV出芽ウイルスの調製

組換えプロテオリポソームの作製に用いるTSHR組換えバキュロウイルス(TSHR組換えAcNPV)およびAChR 組換えバキュロウイルス (AChR 組換えAcNPV) の出芽ウイルスは、ともに次の手順により調製した。

Sf 900II SFM培地 (Invitrogen社) 11 mlを加えたT 75培養フラスコ10個に、継代培養していたSf9細胞懸濁液を各1 ml加えた後、TSHR組換えAcNPVあるいはAChR組換えAcNPVを感染多重度 (MOI) が1となるように感染させた。感染72時間後の細胞培養液を遠心 (1,000 × g、15分間、4 ) し、培養上清を細胞沈殿から分離回収した。次に、培養上清を超遠心機 (Beckman LP 70: ローターはSW28)を用いて超遠心 (40,000 × g、30分間、15 ) し、上清を捨て、得られた出芽ウイルスの沈殿にPBS (pH 6.2) を加えて懸濁した。その懸濁液を、遠心 (1,000 × g、15 分間、4 ) して不用物である沈殿を除去後、超遠心 (40,000 × g、30分間、15 ) し、得られた出芽ウイルス沈殿をPBS (pH 6.2) に懸濁した。

出芽ウイルス懸濁液のタンパク質濃度をプロテインアッセイ(Bradford法)によりBSAを標準サンプルとして定量した。懸濁液は、氷中に保存し、適宜、組換えプロテオリポソーム調製に供した。

【 0 0 4 5 】

実施例 1 4 組換えプロテオリポソーム調製用ビオチン標識多重層リポソーム (MLV) の調製

リン脂質の混合物として、ホスファチジルコリン (PC ) / ホスファチジルセリン (PS ) / ビオチン - ホスファチジルエタノールアミン (Biotin PE ) = 1:1:0.066 (リン脂質総量10.33 mol)、Biotin PEとしてここではN (biotinoyl) 1,2 dihexadecanoyl sn glycerol 3 phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Biotin PE, Molecular Probes社製)を用いた。このリン脂質の混合物を溶かしたクロロホルム溶液 (約2 ml) を、キャップを外したガラス製スクリュウキャップ試験管に入れ、その試験管を熱媒体としてグリセリンを加えたガラス製受器に移し、ロータリーエバポレーターに接続し、680 700mmHg程度まで適当に減圧して固定した。ウォーターバスに受器が浸るように位置を決め、ロータリーエバポレーターを回転させ、窒素ガス (1 kg/cm<sup>2</sup>) を送り込みながら溶媒のクロロホルムを減圧除去した。減圧は、マニュアル操作により、700 mmHg から500 mmHgまで、1 2分毎に、約100 mmHgずつ下げ、次に、500 mmHgから100 mmHgまでは、約50 mmHgずつ下げていき、更に100 mmHgから25 mmHgずつ下げ、最後に10 20 mmHgとした。クロロホルムが除去され薄膜を形成した後、更に30分程度、減圧下に置き、十分にクロロホルムを除去した。減圧を停止し、窒素ガスを送り込み、大気圧まで昇圧した後に、受器を取り外し、内壁と底面にリン脂質薄膜が形成されたスクリュウキャップ試験管を取り出した。

【 0 0 4 6 】

リポソーム調製用バッファー [10 mM Tris HCl 10 mM NaCl (pH 7.5)] を1 ml加え、アルゴンガス (不活性ガス) で置換した後、スクリュウキャップをしっかりと閉め、ボルテックスミキサー (強度最大) で30秒から1分程度、薄膜が完全に剥がれるまで、ボルテックスし、乳白色のMLV懸濁液 (リン脂質濃度約10 μmol/ml) を得た。加圧濾過器にポリカーボネートメンブレン (孔径0.4 μm) を装着し、MLV懸濁液をアルゴンガスにより加圧濾過した。

MLVを含む濾液に、次のように複数回遠心操作を施し、MLVを精製した。濾液をエッペンドルフチューブに移し、小型冷却遠心機で遠心した (10,000rpm、20分間、4 ) 。得られた遠心上清を別のエッペンドルフチューブに移し、MLV沈殿物は1 mlバッファーを加え再懸濁し、上清と沈殿物の両者に対して同様の遠心操作を行った。次に、上清の再遠心により得られた沈殿物に沈殿物再懸濁液の遠心上清を加えて懸濁し、沈殿物再懸濁液の遠心沈殿物には新たにバッファーを1 ml加えて再々懸濁した。この操作を更に一度行い、得られ

た各沈殿物にバッファー0.5 mlを加え、それぞれ懸濁し、両者を併せ1 mlのMLV懸濁液を得た。

リポソーム濃度をリン脂質濃度で表すため、懸濁液に過酸化水素と硫酸により湿式分解した分解液中の無機リンをFiske Subbarow法で定量した。こうして調製したMLV懸濁液を、組換えプロテオリポソーム調製に供した。MLV懸濁は、アルゴンガスを充填し、4℃で保存した。

#### 【0047】

実施例15 組換えAcNPV出芽ウイルスとMLVの融合による組換えプロテオリポソームの調製

融合バッファーとして、10 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$ /10mM NaCl pH4.0にスクロースを添加して浸透圧を調整し、リポソーム調製用バッファーのモル浸透圧(約35mosmol/l)に合わせたものを用いた。

容器に融合バッファーとTSHR組換えAcNPV(またはAChR 組換えAcNPV)の出芽ウイルス懸濁液を加え混合した後、MLV懸濁液を入れ、撹拌子により室温にて10分間撹拌した。この混合液1mlに対して、最終濃度が、出芽ウイルス量はタンパク質量で10  $\mu\text{g}$ 、MLVはリン量で200 nmolとなるように、それぞれを加えた。混合液の全量が1 mlとなるように融合バッファー容量を調整した。

#### 【0048】

撹拌後の混合液には、組換えAcNPV出芽ウイルスとMLVとが融合した組換えプロテオリポソームが含まれている。この混合液を小型冷却遠心機で遠心(5,000rpm、20分間、4℃)し、遠心上清を除き組換えプロテオリポソームを含む遠心沈殿物に10倍に希釈したPBS(0.1×PBS、pH 7.2)を加え懸濁した。得られた組換えリポソーム懸濁液は、抗体測定(ELISA)に供するまで4℃で保存した。融合後の組換えプロテオリポソーム沈殿物には、当初のウイルス量の50%が取り込まれるものと仮定した。

#### 【0049】

実施例16 組換えウイルス-MLV融合リポソームにおける銀染色

実施例14中の操作において、ピオチン-ホスファチジルエタノールアミンを含まない組成で調製したMLVを用い、実施例15の操作手順に従って、組換えプロテオリポソームを調製した。但し、最終のサンプルは実施例15における遠心分離後の沈殿物を、融合処理時と同様のpH4.0あるいはpH7.5の緩衝液で懸濁した。これらを用いて、実施例11に記載の方法で銀染色した。

#### 【0050】

実施例17 抗AChR 抗体測定系の開発

AChR 組換えプロテオリポソームをPBST[0.05% Triton X 100,PBS (pH7.2)]で1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように希釈し、ストレプトアビジン・コート・マイクロプレート(Streptavidin Coated Microplates)(Thermo ELECTRON CORPORATION)に100  $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ入れ、4℃で一晩静置し、プレートに吸着させた。サンプルを除去し、吸着していないプロテオリポソームを除去するために、PBSTで3回プレートを洗浄した後、次に、ブロッキングバッファー(1% BSA, 5% Sucrose, PBS (pH7.2))を200  $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、室温にて2時間静置してブロッキングを行った。その後、PBSTでプレートを3回洗浄し、反应用緩衝液[10mM リン酸二ナトリウム, 0.2M NaCl, 0.15% Tween 20, 1%加水分解カゼイン pH7.4]で101倍希釈したヒト血清を100  $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、25℃で1時間反応させた。PBSTで3回洗浄した後に、酵素標識抗体液[20mM HEPES, 1% BSA, 0.135M NaCl]で5000倍希釈したHRP標識抗ヒトIgG(鎖)(MBL code:208)を100  $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、25℃で1時間反応させた。更にPBSTで3回洗浄した後に、100  $\mu\text{l}$  3,3',5,5' Tetramethylbenzidine/ $\text{H}_2\text{O}$ : solutionを加え、25℃で1時間発色させて、1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ で発色を停止した。発色した各ウエルの値はマイクロプレートリーダーで $A_{450}$ と $A_{620}$ を測定することで求めた。

コントロールとして、レセプターを発現していないリポソームのみ、及びTSHR組換えプロテオリポソームを用い、上記AChR 組換えプロテオリポソームと同様の手順を行い、ウエルの発色を確認した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 1 】

また、上記で使用したヒト血清について、抗AchR抗体が観察されるか否かを確認した。ヒト血清をPBSにて40倍に希釈した溶液40 $\mu$ lを、サル由来筋肉のスライドの各ウエルに載せた。25、20分静置した後、ヒト血清を除去し、スライドグラスを500mlのPBSで5分間洗浄した。SCIMEDX社IFA用希釈済みFITC抗ヒトIgG抗体を40 $\mu$ l/well加え、25で20分間反応させた。抗体を除去した後、スライドグラスを500mlのPBSで5分間洗浄した後に、マウント液（SCIMEDX社）を載せ、カバーグラスをかけて、倍率100倍にて、蛍光顕微鏡で蛍光が認められるか否かを観察した。

## 【 0 0 5 2 】

## 実施例 1 8 抗TSHR抗体測定系の開発 1

TSHR組換えプロテオリポソームをPBST[0.05% Triton X 100,PBS]で0.5 $\mu$ g/mlに希釈し、Streptavidin Coated Microplate ( Thermo ELECTRON CORPORATION ) に100 $\mu$ l/well にて4で一晚感作した。感作したプレートから吸着していないプロテオリポソームを除去するためにPBSTで3回プレートを洗浄した後、[1% BSA, 5% Sucrose, PBS] を200 $\mu$ l/well に加え、室温で2時間静置させてブロッキングを行った。その後PBSTで3回プレートを洗浄し、反作用緩衝液[10mM リン酸二ナトリウム, 0.2M NaCl, 0.15% Tween 20, 1%加水分解カゼイン pH7.4]で101倍希釈したヒト血清を100 $\mu$ l/well加え、25で1時間反応させた。PBSTで3回洗浄した後に、酵素標識抗体液[20mM HEPES,1% BSA, 0.135M NaCl] で5000倍希釈したHRP標識抗ヒトIgG ( 鎖 ) ( MBL code:208 ) を100 $\mu$ l/well加え、25で1時間反応させた。更にPBSTで3回洗浄した後に、100 $\mu$ l 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>solutionを加え、25で1時間発色させて、1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で発色を停止した。発色した各ウエルの値はマイクロプレートリーダーでA<sub>491</sub>を測定することで求めた。

## 【 0 0 5 3 】

実施例 1 9 組換えAcNPV出芽ウイルスとリンカー付ピオチン標識多重層リポソーム ( M LV ) の融合によるPEG含有組換えプロテオリポソームの調製

リポソームをピオチン化するに際し、ピオチンと脂質との間にリンカーとしてPEGを用いたものを評価した。

## (1)リポソームの調製

プロテオリポソームの調製に先立ち、リンカーのないリポソーム ( 以下、PEG( )リポソームという ) と、リンカーとしてのPEGを用いたリポソーム ( 以下、PEG(+ )リポソームという ) とを調製した。

PEG( )リポソームを構成するリン脂質の混合物として、ジオレオイルホスファチジルコリン ( DOPC:COATSOME MC 8181, 日本油脂製 ) / ジオレオイルホスファチジルセリン - ナトリウム ( DOPS Na:COATSOME MS 8181LS, 日本油脂製 ) / ピオチン - ホスファチジルエタノールアミン ( 18:1 Biotin PE ) = 1:1:0.066 ( リン脂質総量206.6  $\mu$ mol)を用いた。18:1 Biotin PEには、1,2 Dioleoyl sn Glycerol 3 Phosphoethanolamine N Biotinyl ( Sodium Salt) ( Avanti Polar Lipids社製 ) を用いた。

## 【 0 0 5 4 】

一方、PEG(+ )リポソームを構成するリン脂質の混合物として、ジオレオイルホスファチジルコリン ( DOPC:COATSOME MC 8181, 日本油脂製 ) / ジオレオイルホスファチジルセリン - ナトリウム ( DOPS Na:COATSOME MS 8181LS, 日本油脂製 ) / ピオチン - PEG ( 2000 ) - ホスファチジルエタノールアミン ( DSPE PEG(2000)Biotin ) = 1:1:0.066 ( リン脂質総量206.6  $\mu$ mol)を用いた。DSPE PEG(2000)Biotinには、1,2 Disearoyl sn Glycerol 3 Phosphoethanolamine N [Biotinyl(Polyethylene Glycol) 2000] ( Ammonium Salt) ( Avanti Polar Lipids社製 ) を用いた。このリポソームでは、ピオチンがPEGを介して結合されている。このため、PEG(+ )組換えプロテオリポソームは、PEG( )組換えプロテオリポソームに比べると、プレート表面よりも離れた位置に結合された状態となる。

## 【 0 0 5 5 】

上記リン脂質のそれぞれをクロロホルムに溶解した。各クロロホルム溶液 ( 約5 ml ) を、キャップを外したガラス製スクリーキャップ試験管に入れ、その試験管を熱媒体とし

てグリセリンを加えたガラス製受器に移し、ロータリーエバポレーターに接続し、680 700 mmHg程度まで適当に減圧して固定した。ウォーターバスに受器が浸るように位置を決め、ロータリーエバポレーターを回転させ、窒素ガス(1 kg/cm<sup>2</sup>)を送り込みながら溶媒のクロロホルムを減圧除去した。減圧は、マニュアル操作により、700 mmHg から500 mmHgまで、12分毎に、約100 mmHgずつ下げ、次に、500 mmHgから100 mmHgまでは、約50 mmHgずつ下げていき、更に100 mmHgから25 mmHgずつ下げ、最後に10 20 mmHgとした。クロロホルムが除去され薄膜を形成した後、更に30分程度、減圧下に置き、十分にクロロホルムを除去した。減圧を停止し、窒素ガスを送り込み、大気圧まで昇圧した後に、受器を取り外し、内壁と底面にリン脂質薄膜が形成されたスクリュウキャップ試験管を取り出した。

#### 【0056】

リポソーム調製用バッファー[10 mM Tris HCl 10 mM NaCl (pH 7.5)]を10 ml加え、アルゴンガス(不活性ガス)で置換した後、スクリュウキャップをしっかりと閉め、ボルテックスミキサー(強度最大)で30秒から1分程度、薄膜が完全に剥がれるまで、ボルテックスし、乳白色のMLV懸濁液(リン脂質濃度約20 μmol/ml)を得た。

MLVを含む濾液に、次のように複数回遠心操作を施し、MLVを精製した。濾液を10本のエッペンドルフチューブに移し、小型冷却遠心機で遠心した(12,000 x g、20分間、4 )。得られた遠心上清を別のエッペンドルフチューブに移し、MLV沈殿物は1 mlバッファーを加え再懸濁し、上清と沈殿物の両者に対して同様の遠心操作を行った。次に、上清の再遠心により得られた沈殿物に沈殿物再懸濁液の遠心上清を加えて懸濁し、沈殿物再懸濁液の遠心沈殿物には新たにバッファーを1 ml加えて再々懸濁した。この操作を更に一度行い、得られた各沈殿物にバッファー0.5 mlを加え、それぞれ懸濁し、両者を併せ1 mlのMLV懸濁液を得た。加圧濾過器にポリカーボネートメンブレン(孔径0.4 μm)を装着し、MLV懸濁液をアルゴンガスにより加圧濾過した。すべてのエッペンドルフチューブから得られたものを混合し、バッファーにより全量を10mlとした。

#### 【0057】

リポソーム濃度をリン脂質濃度で表すため、懸濁液に過酸化水素と硫酸により湿式分解した分解液中の無機リンをFiske Subbarow法で定量した。こうして調製したMLV懸濁液を、組換えプロテオリポソーム調製に供した。MLV懸濁液は、アルゴンガスを充填し、4 で保存した。

こうして、PEG( )リポソーム、及びPEG(+)リポソームを調製した。

また、リポソームに結合する抗体を除去するための抗体除去用リポソームを調製した。抗体除去用リポソームを構成するリン脂質の混合物として、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC:COATSOME MC 8181, 日本油脂製) / ジオレオイルホスファチジルセリン - ナトリウム(DOPS Na:COATSOME MS 8181LS, 日本油脂製) = 1:1 を用いた。このリン脂質を上記と同様の手順に従って操作し、抗体除去用リポソーム(17.3mM)を得た。

#### (2)PEG含有組換えプロテオリポソームの調製

上記PEG( )リポソームまたはPEG(+)リポソームと、TSHR組換えAcNPVとを用い、実施例15に従って、PEG( )TSHR組換えプロテオリポソームと、PEG(+)TSHR組換えプロテオリポソームとを調製した。

#### 【0058】

##### 実施例20 抗TSHR抗体測定系の開発2 (PEGを使用した測定系)

ストレプトアビジンコートマイクロプレートに感作するPEG( )またはPEG(+)TSHR組換えプロテオリポソームの濃度を0.5 μg/mlから1.0 μg/mlにした以外は、実施例18に従って、ヒト血清中の抗TSHR抗体の測定を行った。

対照として、何も感作しないプレート(BSA)と、TSHR組換えバキュロウイルスを感作したプレートを上記と同様の操作で調製した。

#### 【0059】

##### 試験結果

##### <野生型AcNPV - リポソーム膜融合条件の検討>

本発明者らは、BmNPVのBVを用いてウイルスとリポソームとの間の融合を試みた結果、B

10

20

30

40

50

Vとリポソームとが融合することを確認した。また、膜タンパク質であるGPIアンカー型膜結合酵素AchEがBV上にディスプレイされることを見出した。さらに、BVとリポソームとの融合を行った結果、AchEが再構成された組換えプロテオリポソームの作製に成功した。このバキュロウイルスを用いた組換えプロテオリポソームの作製過程は図2に示す通りである。

次いで、AcNPVを用いた組換えプロテオリポソーム作製法の開発の検討を行った。最初の段階として、野生型AcNPVのBVを用いてリポソーム膜との融合条件の検討を行った。組換えAcNPVの組換えタンパク質の遺伝子はポリヘドリン遺伝子と置換したものであり、ポリヘドリンは膜への感染やウイルスの増殖には必須ではないため、BVの融合能に変化はなく、野生型AcNPVのBVとリポソームとの融合条件と組換えAcNPVのBVとリポソームとの融合条件に差異はないであろうと考えたためである。

#### 【0060】

野生型AcNPVのBVとLUVリポソームとの融合の挙動を明らかにするため、(1)BV - LUV間融合のpH依存性、(2) LUVの脂質組成による比較、及び(3) BV - LUV間融合のリポソーム濃度依存性に関してR18 dequenching assayを行った。

##### (1) BV - LUV間融合のpH依存性

バキュロウイルスエンベロープに存在するgp64は、弱酸性のpHで細胞との融合を誘起することが報告されている (Blissard, G.W. and Wenz, J.R. (1992) Baculovirus gp64 envelope Glycoprotein is sufficient to mediate pH dependent membrane fusion. *J. Virol* 66:6829-6835)。そこで、AcNPVのBVとリポソームの融合時のpHによって融合率に変化があるかを調べるために、PC/PS(1:1)の脂質組成のLUVを作製し、融合緩衝液のpHをpH3.0、pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH6.5、pH7.5とした場合のBVとLUVとの融合率を測定した。

結果を図4に示した。図より明らかなように、pH5.0以上では融合率は低かったが、pH4.0以下では非常に高い融合率が示され、pHが4程度の比較的穏やかな条件下でウイルスと効率良く融合することが判った。これは、pH5付近を転移点として融合率の変化が起こっており、gp64を介してリポソームとの融合が誘起されたと考えられた。

#### 【0061】

##### (2) LUVの脂質組成による比較

gp64は昆虫細胞のエンドソーム膜との融合を誘起することが示されている。エンドソーム膜を構成する脂質である酸性リン脂質のPSが、融合時のgp64の主なレセプターとなっている可能性が示唆されている (Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T., and Matsuura, Y. (2001) Characterization of cell surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* 279:343-53)。そこで、他の酸性リン脂質がPSの代用となり得るかを調べるために、中性リン脂質であるPCと、酸性リン脂質であるPS、PG、PAあるいはPIを用いて、PC/PS(1:1)、PC/PG(1:1)、PC/PA(1:1)、PC/PI(1:1)という脂質組成のLUVを作製し、これらのLUVにおけるBVとの融合率の比較を行った。

結果を図5に示した。図より明らかなように、pH7.5の場合、PC/PS組成のLUVが僅かに融合率が高かったが、4種類全ての脂質組成のLUVにおいて融合率は低かった。一方、pH4.0の場合、PC/PS組成のLUVが最も融合率が高く、PC/PG(1:1)、PC/PA(1:1)、PC/PI(1:1)組成の順に融合率は減少した。したがって、やはりPSがgp64に対するレセプター因子としての働きをし、他の脂質組成のLUVでは融合の効率が下がると考えられた。

#### 【0062】

##### (3) BV - LUV間融合のリポソーム濃度依存性

次に、PCとPSを用いてPC/PS(1:1)の脂質組成のLUVを作製し、融合緩衝液のpHを4.0、BV量を一定として、融合させるLUVの濃度を变化させた場合の融合率を測定した。その結果、LUV濃度を5  $\mu$ Mから100  $\mu$ Mまで变化させた場合、融合率の急激な増加が観察されたが、それ以上の濃度では融合率はほぼ一定となり、飽和状態となったと考えられた。

LUVは物質封入率が高く、生体膜のもつ性質を保有し、リポソームを利用しようとする様々な研究目的に適しているといえる。しかし、LUVは、調製や精製が繁雑である。これに対して、MLVは、脂質薄膜に機械的振動を与えるだけで調製できる上、低速遠心により

10

20

30

40

50

簡単に分離可能であり調製や精製も容易であるため、汎用性が高く実用化を試みる際には好ましい。したがって、MLVがLUVの代わりに使用できるか検討した。

#### 【 0 0 6 3 】

野生型BVとMLVとの融合条件に関して、野生型BVとLUVとの融合測定と同様に、上記検討法(1)、(2)、(3)においてR18 dequenching assayを行った。

##### (1) BV - MLV間融合のpH依存性

PC/PS(1:1)の脂質組成のMLVを作製し、融合緩衝液のpHをpH3.0、pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH6.5とした場合のBVとMLVとの融合率を測定した。図4に示す通り、pH5.0以上では融合率は低かったが、pH4.0以下では非常に高い融合率が示され、pHが4程度の比較的穏やかな条件下でウイルスと効率良く融合することが判った。

10

##### (2) MLVの脂質組成による比較

中性リン脂質であるPCと、酸性リン脂質であるPSあるいはPGを用いて、PC/PS(1:1)、PC/PG(1:1)という脂質組成のMLVを作製し、これらのMLVにおけるBVとの融合率の比較を行った。結果を図6に示した。図より明らかなように、pH6.5の場合、PC/PS組成とPC/PG組成共に融合率は低かった。一方、pH4.0の場合、PC/PS組成とPC/PG組成共に高い融合率を示した。

#### 【 0 0 6 4 】

##### (3) BV - MLV間融合のリボソーム濃度依存性

PC/PS(1:1)の脂質組成のMLVを作製し、融合緩衝液のpHを4.0、BV量を一定として、融合させるMLVの濃度を変化させた場合の融合率を測定した。その結果、MLV濃度を5 $\mu$ Mから10 $\mu$ Mまで変化させた場合、融合率の増加が観察されたが、それ以上の濃度では融合率はほぼ一定となった。

20

以上の結果より、R18の蛍光の増大が見られたことから、野生型AcNPVのBVとリボソームとの融合が誘起されたことが示された。また、野生型AcNPVのBVとMLVとの融合率と、野生型AcNPVのBVとLUVとの融合率は、BV - リボソーム間融合のリボソーム濃度依存性、BV - リボソーム間融合のpH依存性、及びリボソームの脂質組成において、同様の傾向が示され、PSを含むリボソームと低pH領域で融合率が高くなることが確認された。LUVの結果とMLVの結果を比較すると、図7に示すとおり、両者の融合率にはほとんど差が認められなかった。したがって、組換えプロテオリボソーム作製にMLVを用いたとしても、性状に変わりはないと考えた。

30

#### 【 0 0 6 5 】

##### < 組換えAcNPV感染Sf9細胞発現膜タンパク質の解析 >

ヒトAChRは 2 の5個のサブユニットから成る五量体で、それらが環状に配置してカチオン選択性のイオンチャンネルを形成している、分子量約290kDaの糖タンパク質である。図8 (Unwin, N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* 346: 967-989.) に示すように、各サブユニットは1サブユニットあたり4本の  $\alpha$ ヘリックスが細胞膜を貫通している。これらのサブユニットの中の  $\beta$ サブユニットは分子量約50kDaであり、この  $\beta$ サブユニットが抗AChR抗体との結合部位であると考えられている。

図9 (Ando, T., Latif, R., Daniel, S., Eguchi, K., and Davies, T. F. (2004) Distinguishing linear and conformational epitopes on the native thyrotropin receptor. *Endocrinology* 145: 5185-5193.) には、ヒトTSHRの立体構造を膜断面から見たときの模式図を示した。ヒトTSHRはシングルポリペプチドの7回膜貫通タンパク質として合成された後、N末端が細胞外ドメインである  $\beta$ サブユニット30と膜貫通及び細胞質ドメインである  $\alpha$ サブユニット40の2個のサブユニットとの間の開裂領域50で開裂されレセプターを形成する。分子量は約87kDaである。  $\alpha$ サブユニット30に存在するロイシンに富んだ繰返し構造 (leucine rich repeats) 60が抗TSHR抗体との反応部位ではないかと考えられている。

40

#### 【 0 0 6 6 】

AChR組換えAcNPV感染細胞及び出芽ウイルスエンベロープの膜タンパク質分析

50

AChR組換えAcNPVを感染させたSf9細胞の細胞培養液から回収した細胞画分及びBV画分において、SDS PAGE後に銀染色及び抗His Tag抗体によるウエスタンブロットを行った。細胞にAChRが発現され、さらに出芽ウイルスエンベロープ上にもAChRがディスプレイされていれば、AChRに付加された6×His Tagと特異的に結合する抗His Tag抗体を用いたウエスタンブロットによって、AChRが検出される。

銀染色の結果、図10に示すように、AChR組換えBV画分において、野生型BV画分には見られないバンドが検出され、それはAChRの分子量約50kDaに相当する位置であった。従って、出芽ウイルスエンベロープ上にAChRがディスプレイされたことが判った。

さらに、ウエスタンブロットを行った結果、図11に示すように、BV画分においてAChRの分子量に相当する位置にバンドが検出され、AChRが出芽ウイルスエンベロープ上にディスプレイされることが判明した。細胞画分において、AChRの分子量約に相当する位置にバンドが検出されたが、それ以外の場所にもマルチバンドとして検出された。これは、細胞膜上に発現したAChRが細胞デブリと凝集したものや断片化したものが泳動されたためと考えられる。これに対して、BV画分ではAChRの分子量約に相当する位置にシングルバンドとして検出され、出芽ウイルスエンベロープ上にAChRが断片化されたものはなく、全長を保持したAChRのみがディスプレイされていた。

#### 【0067】

##### AChR組換えウイルス - MLV融合リポソームにおける銀染色

AChR組換えAcNPVのBVとMLVとを融合させたりポソームを用いて銀染色を行った結果、図12に示すように、リポソーム沈殿画分においてAChRの分子量に相当する位置に、野生型AcNPVのBV画分には見られないバンドが観察された。融合時に行った遠心分離操作では、BV粒子単体は沈殿しないので、AChRをディスプレイしているBVがリポソームと融合したことが判った。また、融合用緩衝液がpH4.0の場合とpH7.5の場合の上清画分において、pH7.5の上清画分はタンパク質が濃く検出されたのに対してpH4.0の上清画分はタンパク質が薄く検出されたため、pH4.0におけるリポソーム沈殿画分にタンパク質成分のほとんどが取り込まれていることが判った。これらの結果より、野生型AcNPV - リポソーム膜融合条件の検討で示された結果と同様に、組換え膜タンパク質でもこの融合条件が最も適切であると見なされた。

#### 【0068】

##### TSHR組換えAcNPV感染細胞及び出芽ウイルスエンベロープの膜タンパク質分析

TSHR組換えAcNPVを感染させたSf9細胞の細胞培養液から回収した細胞画分及びBV画分において、SDS PAGE後にBio Safe Coomassie染色及び抗His Tag抗体によるウエスタンブロットを行った。細胞にTSHRが発現され、さらに出芽ウイルスエンベロープ上にもTSHRがディスプレイされていれば、Bio Safe Coomassie染色及びTSHRに付加された6×His Tagと特異的に結合する抗His Tag抗体を用いたウエスタンブロットによって、TSHRが検出される。

Bio Safe Coomassie染色の結果、図13に示すように、野生型BV画分において、gp64とウイルスキャプシドタンパク質であるvp39のバンドが検出された。一方、TSHR組換えBV画分において、gp64とvp39のバンド以外にgp64よりも高い分子量の位置にバンドが検出された。これらのデータより、出芽ウイルスエンベロープ上にTSHRがディスプレイされたことが判った。

#### 【0069】

さらに、ウエスタンブロットを行った結果、図14に示すように、TSHR組換えBV画分においてTSHRの分子量約87kDaに相当する位置にバンドが検出され、TSHRが出芽ウイルスエンベロープ上にディスプレイされることが判明した。一方、細胞画分において、TSHRの分子量より高い位置にバンドが検出された。この理由として、細胞画分では細胞膜上に発現したTSHRが細胞膜等の細胞デブリと凝集を起こし、電気泳動を行った際、アクリルアミド濃度が高い分離用ゲル、すなわち孔が小さいゲルを移動し難かったためと考えた。これに対して、BV画分では細胞デブリを含んでいないTSHRがBV上にディスプレイされたためと考えた。ヒトTSHRは甲状腺細胞膜上に発現された後、2個のサブユニットに開裂するが、異

10

20

30

40

50

種細胞において発現させた場合、開裂は起こらず単量体のままであることが知られており、上記の結果と一致する。

#### 【 0 0 7 0 】

##### 抗AChR 抗体測定系の開発

図 1 5 には、リポソームのみ、TSHR組換えプロテオリポソーム、及びAChR 組換えプロテオリポソームを固相化したマイクロプレートを用いて、10名の重症筋無力症患者(MG 01 10)と5名の健常者(NHS24,29,51,58,59)のヒト血清を測定した結果を示した。図 1 6 には、これらのデータに基づき、シグナルとなる値(AChR TSHR、またはAChRプロテオリポソーム リポソーム)を示した。全体として、患者血清において、抗AChR 抗体の値(AChR TSHRまたはAChRプロテオリポソーム リポソーム)が高い傾向が認められた。

10

図 1 7 には、上記 1 5 名のヒト血清中に、抗AChR抗体が観察されるか否かを確認した蛍光顕微鏡写真図である。抗AChR 抗体の値と、蛍光顕微鏡写真中の蛍光の程度とは、適当な相関を示しているように見られた。

これらの結果は、本実施形態による測定系に基づいて、抗AChR 抗体を良好に測定可能であり、この測定系がMGの診断に使用できることを示唆している。

#### 【 0 0 7 1 】

##### 抗TSHR抗体測定系の開発 1

図 1 8 には、TSHR組換えプロテオリポソーム、又はTSHR組換えAcNPV出芽ウイルス(リポソームと融合させていないもの)を吸着させたストレプトアビジン・コート・マイクロプレートにヒト血清(バセドウ病患者及び健常人)を反応させたときのELISA系の結果を示した。グラフの横軸には、各ヒト血清サンプルのID番号を示し、縦軸には、 $A_{450}$ を測定した結果を示した。ヒト血清サンプルは、頭文字がB又はTで始まるもの(左端から39サンプル分)は、甲状腺疾患の血清であり、このうち頭文字がBで始まるものがRIA法によってバセドウ病と診断された患者血清である。頭文字がNで始まるもの(Tの隣から19サンプル分)は、健常人の血清である。また、右端は緩衝液(Buffer)である。58個のサンプルについて、それぞれTSHR組換えプロテオリポソームコートELISA法(白抜き長方形)、及びTSHR組換えAcNPV出芽ウイルスコートELISA法(黒塗り長方形)によって測定を行った。また、バセドウ病患者については、現行のRIA法(黒塗り三角形)によって測定した結果を示した。

20

#### 【 0 0 7 2 】

RIA法では、39例の甲状腺疾患患者の血清について、ポジティブデータが得られたもの(頭文字がBで始まる20例)と、ポジティブデータが得られなかったもの(頭文字がTで始まる19例)とに分かれた。RIA法は競合法であることから、患者が持っている自己抗体のTSHR認識部位と、RIA法に用いる抗体の認識部位とが競合していなければ、データがポジティブとならないと考えられる。このため、頭文字がTで始まる19例の甲状腺疾患患者については、RIA法でポジティブデータが得られず、本法ではTSHリガンドと非競合的な自己抗体の保有者もポジティブデータとして得られたため、スクリーニングできたものと思われた。

30

#### 【 0 0 7 3 】

一方、TSHR組換えプロテオリポソーム、又はTSHR組換えAcNPV出芽ウイルスをコートしたELISA系においては、RIA法ではポジティブとならなかった血清(頭文字Tの系列)についても、いずれも甲状腺疾患患者血清に対してポジティブデータが得られたことから、TSHR自己抗体を良好に認識できることが分ると共に、現在のRIA法では測定不能なTSHR自己抗体が存在することも明らかとすることが出来た。

40

更に、TSHR組換えプロテオリポソームをコートしたELISA系では、TSHR組換えAcNPV出芽ウイルスをコートしたELISA系に比べても、甲状腺疾患患者血清に対して、高い反応が認められた。このことから、TSHR組換えプロテオリポソームをコートしたELISA系は、TSHRが構造的に天然の状態を取りやすくなったため、従来うまく検出できなかった甲状腺疾患患者の自己抗体のTSHR特異的結合能が回復すると共に、バセドウ病の患者群の自己抗体検出に関してもS/N比が高くなっていた。

50

これらのデータより、本実施形態の測定系は、バセドウ病以外の甲状腺疾患も含めた新規な甲状腺疾患スクリーニング用検査キットの提供も可能であり、非常に有効なアッセイ系であることが分かった。

#### 【 0 0 7 4 】

##### 抗TSHR抗体測定系の開発 2

図 1 9 には、バセドウ病患者血清 ( B33 )、健常人血清 ( NHS58,NHS59 )、及びコントロール ( Buffer ) を各種の固相化プレートを用いて測定したときの結果を示した。TSHR組換えバキュロウイルスを固定したプレートでは、患者血清において、コントロールのプレート ( BSA ) に比較して、十分に高い値を示した。但し、一部の健常人血清においては、高い測定値を示すものが認められた。

10

図中のTSHR組換えプロテオリポソームは、実施例 1 5 で調製したものである。このリポソームは、天然物から抽出して得られたリン脂質から構成されている一方、PEG ( )TSHR組換えプロテオリポソームは、合成リン脂質から構成されている。いずれのリポソームにおいても、データに大きな相違は認められなかった。

PEG ( )TSHR組換えプロテオリポソーム及びPEG(+ )TSHR組換えプロテオリポソームを固定したプレートでは、いずれも患者血清において高い値を示し、健常人血清では低値を示した。更に、PEG(+ )TSHR組換えプロテオリポソームを固定したプレートでは、PEG ( )TSHR組換えプロテオリポソームを固定したプレートに比較して、健常人血清のデータが低下し、S / N比が良好となった。

#### 【 0 0 7 5 】

20

図 2 0 には、各ウエルにヒト血清を添加する際に溶液中に、抗体除去用リポソーム ( 17 .3mM ) を 0 ~ 64  $\mu$ l 添加して測定したときの結果を示した。これは、血清中のPEG ( )リポソームと結合する抗体を除去することで、バックグラウンドデータを減少させることが可能か否かを評価した実験である。リポソーム抗体を吸収すると、PEG ( )及びPEG(+ )TSHR組換えプロテオリポソームのいずれにおいても、バセドウ病患者血清 ( B22 ) のデータは約0.2程度に、健常人血清 ( NHS58 ) のデータは約0.05程度となった。このとき、PEG ( )TSHR組換えプロテオリポソームを用いると、データが定常値に至るためにより多くのPEG ( )リポソームが必要であるのに対し、PEG(+ )TSHR組換えプロテオリポソームを用いると、より少量のPEG ( )リポソームでデータが定常値に至ることが判った。

#### 【 0 0 7 6 】

30

図 2 1 には、PEG ( )TSHR組換えプロテオリポソームを吸着させたストレプト・アビジン・コート・マイクロプレート、又はPEG(+ )TSHR組換えプロテオリポソームを吸着させたストレプトアビジン・コート・マイクロプレートにヒト血清 ( バセドウ病患者、橋本病患者及び健常人 ) を反応させたときのELISA系の結果を示した。グラフの横軸には、各ヒト血清サンプルのID番号を示し、縦軸には、 $A_{450}$ を測定した結果を示した。ヒト血清サンプルの頭文字の意味は、「抗TSHR抗体測定系の開発 1」と同じであるため省略する ( 但し、図 1 5 に示す者とは異なる者のデータが含まれている )。

#### 【 0 0 7 7 】

健常人血清の発色の平均 + 3SDでカットオフラインを作ったところ、PEG ( )TSHR組換えプロテオリポソームの場合には、カットオフライン付近の発色しか示さなかった患者血清 ( T 4 ) が、PEG(+ )TSHR組換えプロテオリポソームの場合には、明らかな陽性となった。また、PEG ( )TSHR組換えプロテオリポソームの場合には、カットオフライン付近まで発色していた健常人血清 ( NHS61 ) が、PEG(+ )TSHR組換えプロテオリポソームの場合には、明らかな陰性となった。このように、PEG(+ )TSHR組換えプロテオリポソームを用いると、ELISA系の特異性が更に向上することが判った。

40

このように本実施形態によれば、放射能を用いることなく、膜受容体に対する結合物質 ( 例えば、自己抗体 ) の有無を定性的・定量的に評価可能な診断用組換えプロテオリポソームを提供することができる。このプロテオリポソームを用いることにより、容易にELISAプレート及びELISAキットを調製することができる。このELISAプレートは、自己抗体の存在の有無に用いることができる。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】本実施形態のELISAシステムを調製するための方法を示す工程図(1)である。

【図2】本実施形態のELISAシステムを調製するための方法を示す工程図(2)である。

【図3】本実施形態のELISAシステムを調製するための方法を示す工程図(3)である。

【図4】野生型AcNPV BV - リポソームの膜融合に及ぼすpHの影響を確認したときの結果を示すグラフである。

【図5】LUV濃度200  $\mu$  MにおけるBVとの融合率(% Fusion)に対して、脂質組成及びpHが与える影響を確認したときの結果を示すグラフである。

【図6】MLV濃度200  $\mu$  MにおけるBVとの融合率に対して、脂質組成及びpHが与える影響を確認した結果を示すグラフである。

10

【図7】LUV及びMLVのBVとの融合率を比較するグラフである。

【図8】ヒトAChRの立体構造を模式的に示す図である(左側は膜上方から見た図、右側は膜断面から見た図である)。

【図9】ヒトTSHRの立体構造を膜断面から見たときの模式図である。

【図10】AChR組換えBVについてSDS PAGEを行った後にゲルを銀染色したときのゲル写真図である。

【図11】AChR組換えAcNPV感染細胞及びBVについてウエスタンブロットを行ったときの写真図である。

【図12】AChR BV MLV融合リポソームについてSDS PAGEを行った後にゲルを銀染色したときのゲル写真図である。

20

【図13】TSHR組換えAcNPV感染細胞及びBVについてSDS PAGEを行った後にゲルをCoomassie染色したときのゲル写真図である。

【図14】TSHR組換えAcNPV感染細胞及びBVについてウエスタンブロットを行ったときの写真図である。

【図15】AChR 組換えプロテオリポソームを吸着させたストレプトアビジン・コート・マイクロプレートに10名の重症筋無力症患者(MG01~MG10)のヒト血清と、5名の健常人(NHS24,29,51,58,59)のヒト血清を反応させたときのELISA系の結果を示すグラフである。グラフは、(A)「リポソーム」がレセプターを発現していないリポソームを感作したマイクロプレートで試験したデータを、(B)「TSHRプロテオリポソーム」がTSHR組換えプロテオリポソームを感作したマイクロプレートで試験したデータを、(C)「AChRプロテオリポソーム」がAChR 組換えプロテオリポソームを感作したマイクロプレートで試験したデータを、それぞれ示している。「AChRプロテオリポソーム - リポソーム」は(C) (A)の値を、「AChR TSHR」は(C) (B)の値を、それぞれ示している。

30

【図16】図15に示したデータのうち、(C) (B)のデータ「AChR TSHR」と、(C) (A)のデータ「AChRプロテオリポソーム - リポソーム」を示したグラフである。

【図17】10名の重症筋無力症患者(MG01~MG10)のヒト血清と、5名の健常人(NHS24,29,51,58,59)のヒト血清とについて、抗AChR抗体が観察されることを確認した蛍光顕微鏡写真図である。

【図18】バセドウ病患者血清及び健常人血清について、TSHR組換えプロテオリポソームを吸着させたELISAプレートに反応させたときのELISA系の結果を示すグラフである。

40

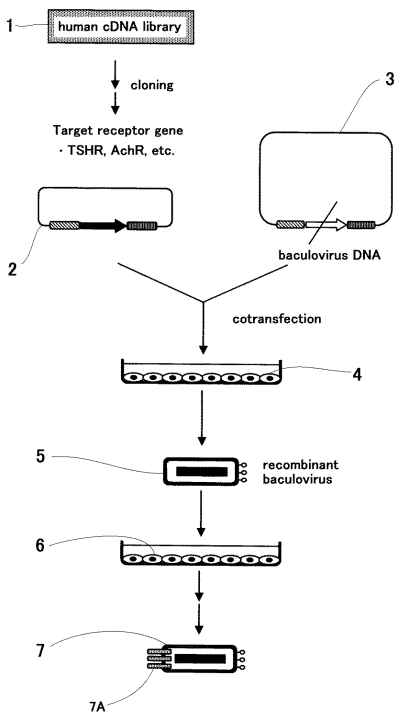
【図19】バセドウ病患者血清(B33)、健常人血清(NHS58,NHS59)、及びコントロール(Buffer)を各種の固相化プレートを用いて測定したときの結果を示すグラフである。

【図20】ヒト血清と共に抗体除去用リポソームを添加したときの測定結果を示すグラフである。

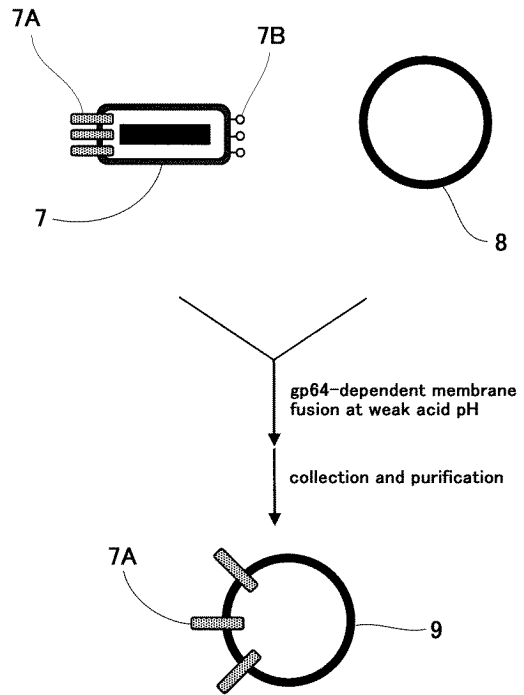
【図21】バセドウ病患者血清、橋本病患者血清、及び健常人血清について、PEG(-)TSHR組換えプロテオリポソーム、又はPEG(+)TSHR組換えプロテオリポソームを吸着させたELISAプレートに反応させたときのELISA系の結果を示すグラフである。グラフ中の横線のうち、実線はPEG(-)TSHR組換えプロテオリポソームを用いた系でのカットオフラインを、点線はPEG(+)TSHR組換えプロテオリポソームを用いた系でのカットオフラインを示す。

50

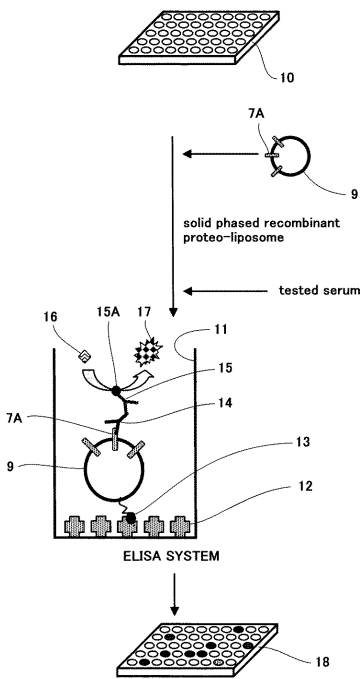
【 図 1 】



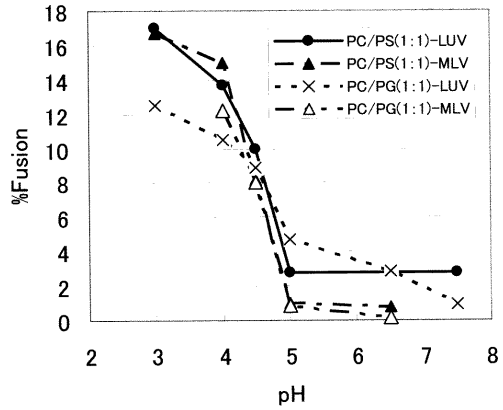
【 図 2 】



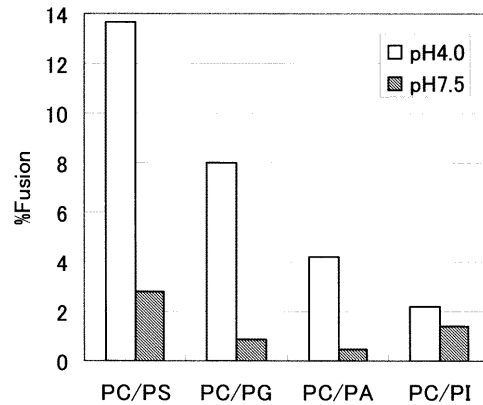
【 図 3 】



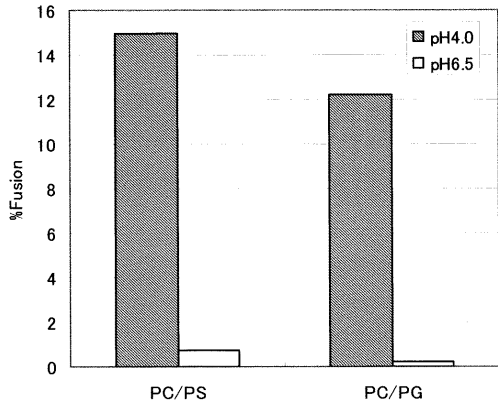
【 図 4 】



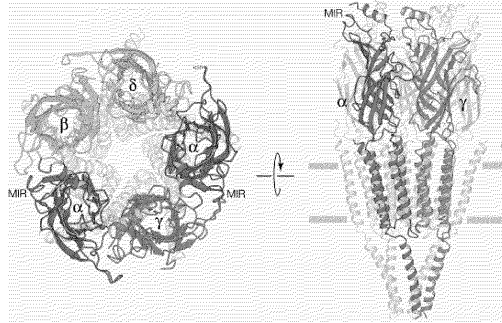
【 図 5 】



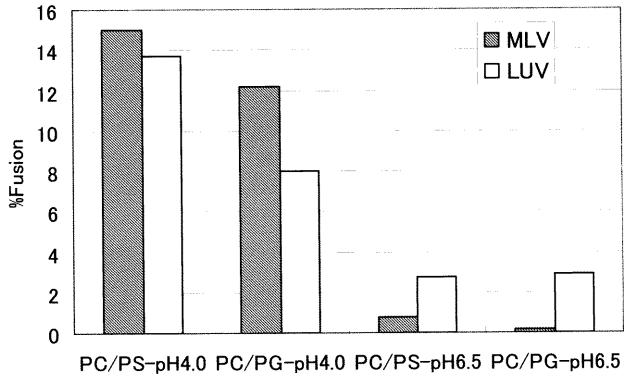
【 図 6 】



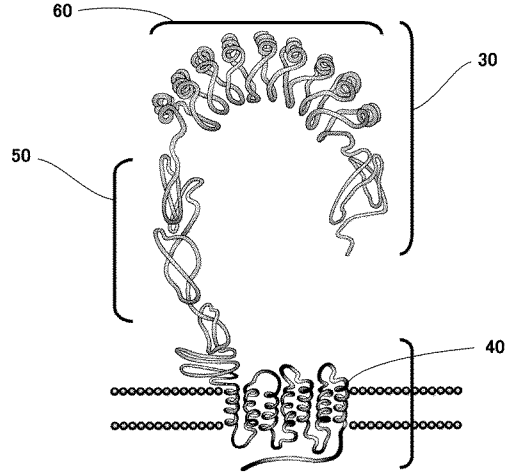
【 図 8 】



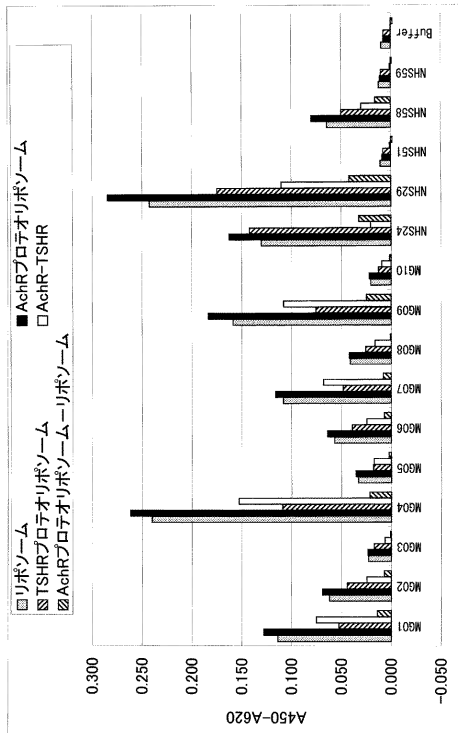
【 図 7 】



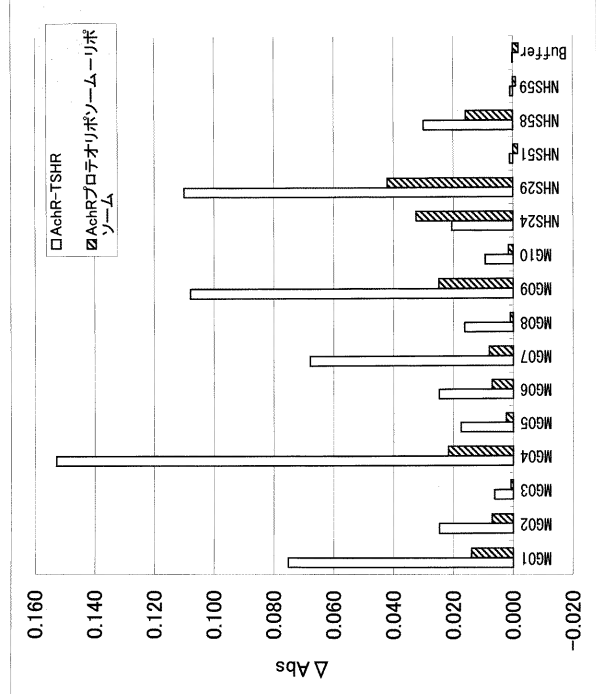
【 図 9 】



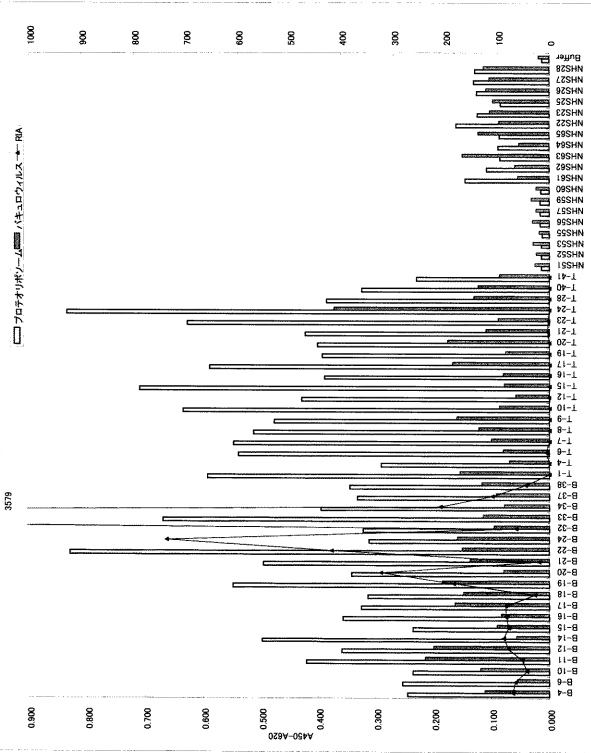
【 図 15 】



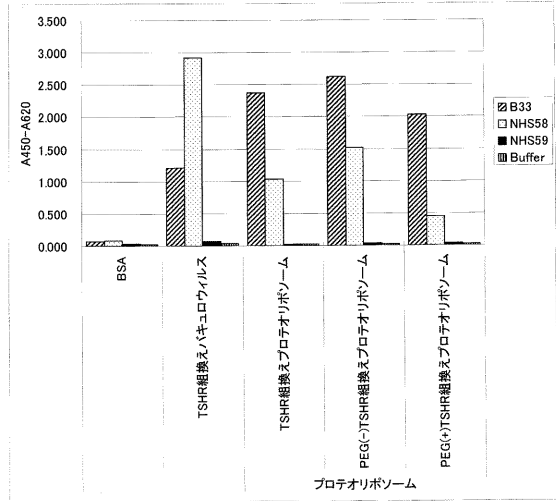
【 図 16 】



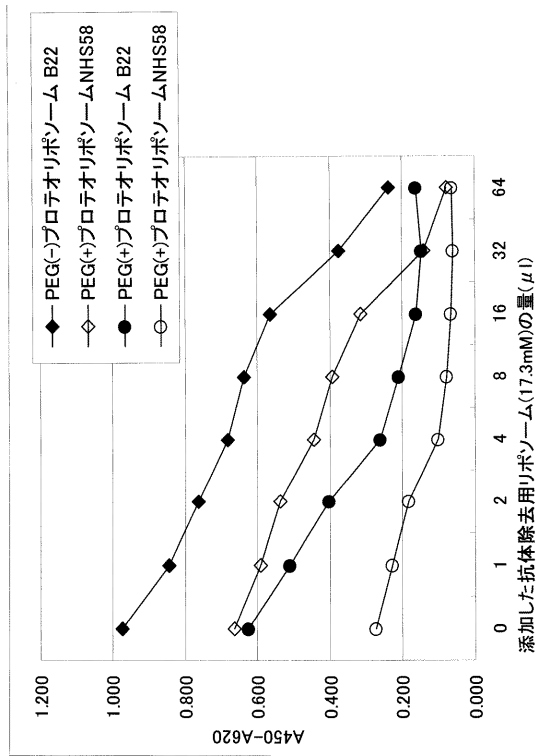
【 図 18 】



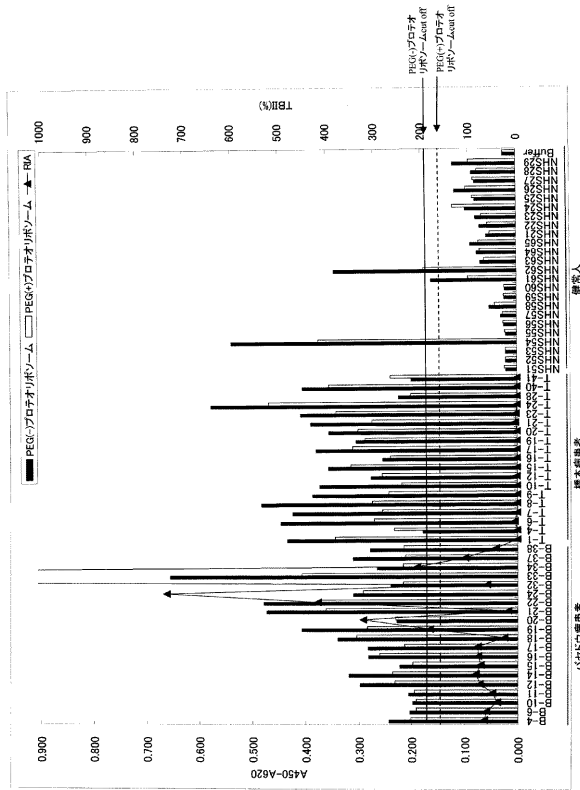
【 図 19 】



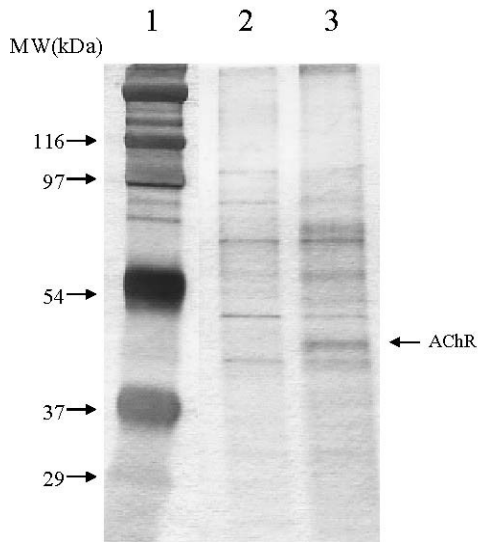
【 図 20 】



【 図 21 】



【 図 1 0 】

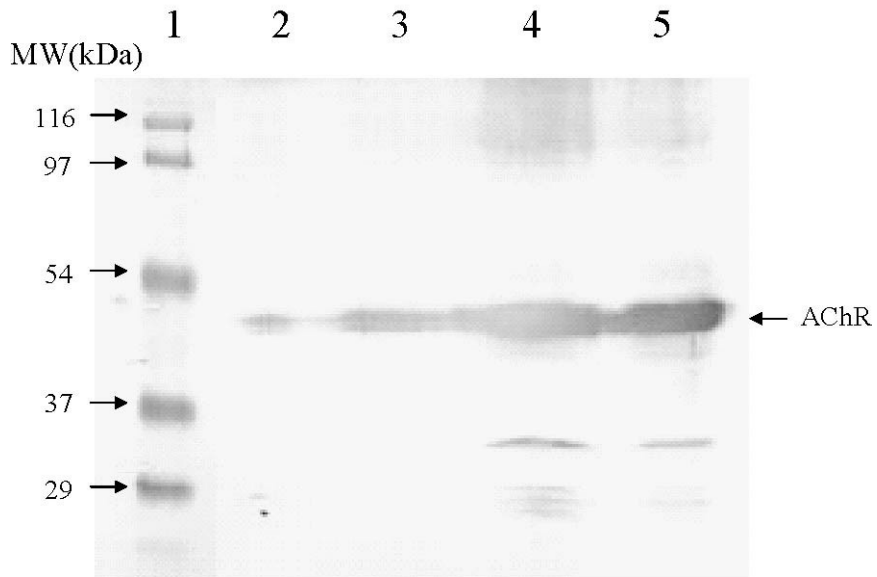


lane1 : 分子量マーカー

lane2 : 野生型 BV

lane3 : AChR BV

【 図 1 1 】

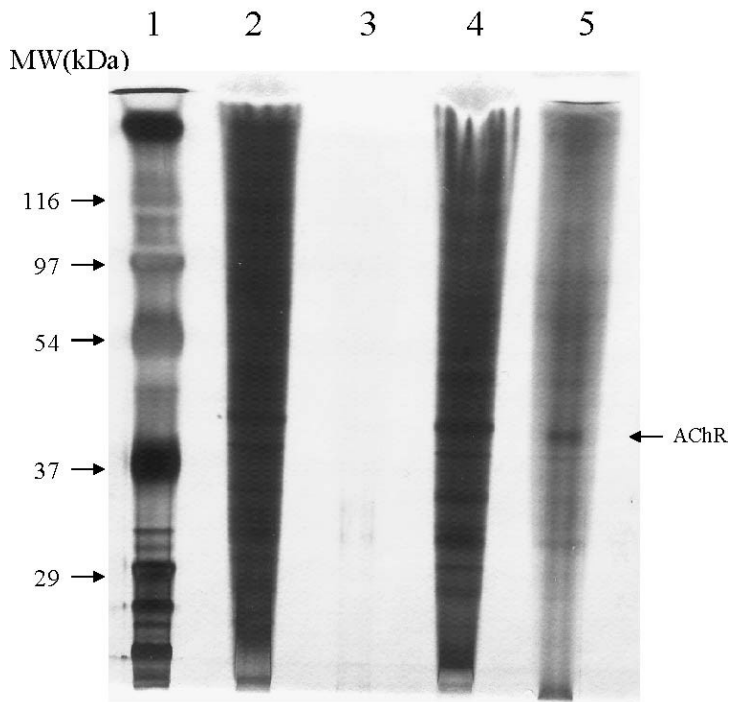


lane1 : 分子量マーカー

lane2,3 : AChR BV

lane4,5 : AChR/Sf9細胞

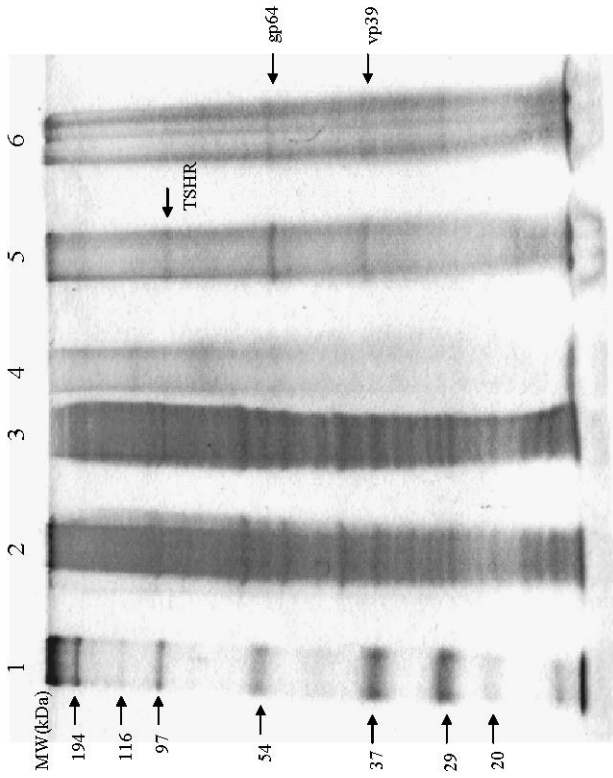
【 図 1 2 】



- lane1 : 分子量マーカー
- lane2 : pH 4.0 融合 沈殿
- lane3 : pH 4.0 融合 上清
- lane4 : pH 7.5 融合 沈殿
- lane5 : pH 7.5 融合 上清

【 図 1 3 】

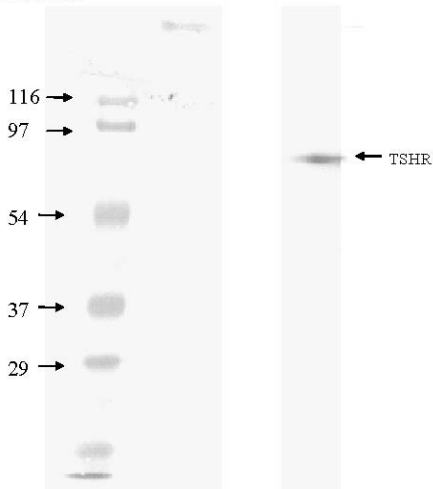
lane1:分子量マーカー  
lane2, lane3: TSHR/Sf9細胞  
lane4: TSHR/Sf9培養上清  
lane5: TSHR BV  
lane6: 野生型 BV



【 図 1 4 】

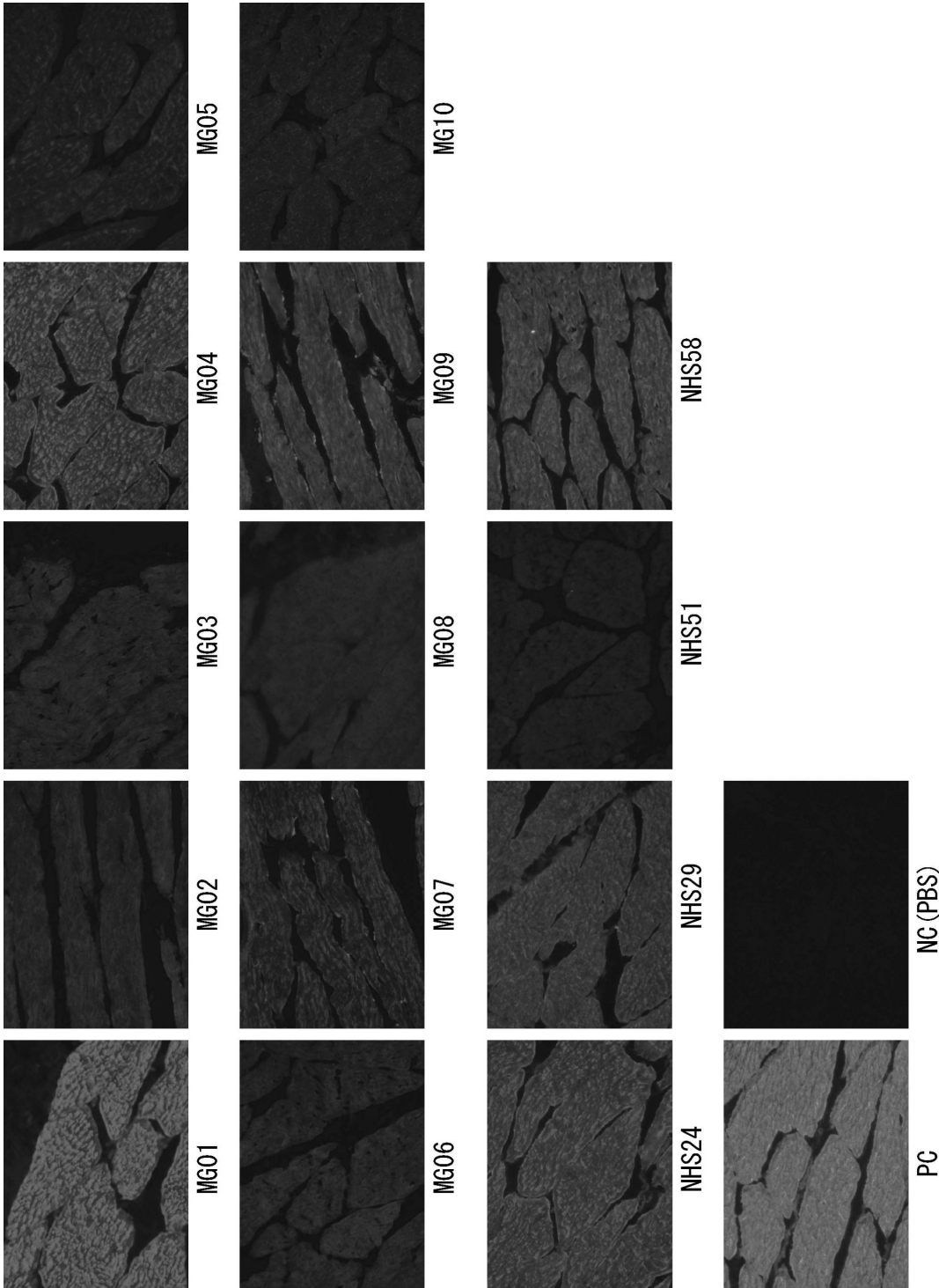
1 2 3 4

MW(kDa)



lane1: 分子量マーカー  
lane2: TSHR/Sf9細胞  
lane3: TSHR/Sf9培養上清  
lane4: TSHR BV

【 図 17 】



【 配列表 】

2007094395000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052699

|  |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>C12N15/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/549(2006.01)i, G01N33/564(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |                       |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12N15/00, C12M1/00, C12N15/09, G01N33/549, G01N33/564, G01N33/58, G01N33/68<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007<br>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAplus (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2) |  |                       |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT   |  |                       |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X<br>Y   | Tatsuo NOZAKI et al., "(P) Idenshi Kumikae Gijutsu o Riyo shita Atarashii Proteoliposome Sakuseiho no Kaihatsu", Dai 75 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai Happyo Shorokushu, 25 August, 2002 (25.08.02), page 783, 2P-474              | 1, 4-6<br>1-9         |
| Y  | JP 3-137932 A (Canon Inc.),<br>12 June, 1991 (12.06.91),<br>Claims; page 3, upper right column, line 12<br>to lower left column, line 9<br>& US 5374715 A1 & EP 355845 A2<br>& DE 68905264 D   | 1-9                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.   |  |                       |
| * Special categories of cited documents:   |  |                       |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance   | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |                       |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |                       |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |                       |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means   | "&" document member of the same patent family  |                       |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed   |  |                       |
| Date of the actual completion of the international search<br>09 March, 2007 (09.03.07)   | Date of mailing of the international search report<br>20 March, 2007 (20.03.07)  |                       |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office   | Authorized officer   |                       |
| Facsimile No.  | Telephone No.  |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052699

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|---|---|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| Y   | WO 2004/035610 A (M-PHASYS GMBH),<br>29 April, 2004 (29.04.04),<br>Patentanspruche, page 9, lines 5 to 9<br>& JP 2006-517515 A & US 2005/0255556 A1<br>& EP 1549665 A & DE 10248123 A<br>& CA 2501836 A | 1-9                   |
| Y   | JP 5-64739 A (Canon Inc.),<br>19 March, 1993 (19.03.93),<br>Par. No. [0003]<br>(Family: none)   | 5, 6                  |
| Y   | JP 5-226637 A (Oki Electric Industry Co.,<br>Ltd.),<br>03 September, 1993 (03.09.93),<br>Claims; Fig. 9<br>& EP 529775 A1   | 7-9                   |
| Y   | JP 5-325570 A (Oki Electric Industry Co.,<br>Ltd.),<br>10 December, 1993 (10.12.93),<br>Claims; Par. No. [0001]; Fig. 4<br>(Family: none)   | 7-9                   |
| P, Y  | JP 2007-024705 A (Dainippon Sumitomo Pharma<br>Co., Ltd.),<br>01 February, 2007 (01.02.07),<br>Claims; Par. No. [0016]<br>(Family: none)  | 1-9                   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052699

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Although the matter common to the inventions as set forth in claims 1 to 13 resides in a recombinant proteoliposome wherein a budding virus particle of a recombinant baculovirus expressing a membrane receptor on the envelope has been fused with a liposome, it is recognized that a recombinant proteoliposome wherein a budding virus particle of a recombinant baculovirus expressing a membrane protein on the envelope has been fused with a liposome had been publicly known prior to the application of the present case (see, if needed, Tatsuo NOZAKI et al., "(P) Idenshi Kumikae Gijutsu o Riyo shita Atarashii Proteoliposome Sakuseiho no Kaihatsu", Dai 75 Kai The Japanese (Continued to the extra sheet.)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/052699

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Biochemical Society Taikai Happyo Shorokushu, 25 August, 2002, page 783, 2P-474). Since the term "membrane protein" used in the above document reminds a person skilled in the art of a membrane receptor, it is recognized that this document also indicates the common matter as described above. Such being the case, the inventions according to claims 1 to 13 are divided into a group of inventions having a special technical feature in "a membrane receptor participating in an autoantibody-related disease" and another group of inventions having a special technical feature in a plate for detection coated with the recombinant liposome.

| 国際調査報告  |  | 国際出願番号 PCT/JP2007/052699   |         |
|---|--|--|---------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/549(2006.01)i, G01N33/564(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i |  |  |         |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. C12N15/00, C12M1/00, C12N15/09, G01N33/549, G01N33/564, G01N33/58, G01N33/68   |  |  |         |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの<br>日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2007年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2007年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2007年  |  |  |         |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)<br>BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CApplus (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)  |  |  |         |
| C. 関連すると認められる文献   |  |  |         |
| 引用文献の<br>カテゴリー*   | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号   |         |
| X<br>Y  | 野崎達男他, (P) 遺伝子組換え技術を利用した新しいプロテオリポソーム作製法の開発, 第75回日本生化学会大会発表抄録集, 2002.08.25, 783頁、2P-474                       | 1, 4-6<br>1-9  |         |
| Y   | JP 3-137932 A(キヤノン株式会社)1991.06.12, 特許請求の範囲, 3頁右上欄12行~左下欄9行<br>& US 5374715 A1 & EP 355845 A2 & DE 68905264 D | 1-9  |         |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。   |  |  |         |
| * 引用文献のカテゴリー  |  | の日の後に公表された文献   |         |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの   |  | 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの     |         |
| 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの   |  | 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                     |         |
| 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)   |  | 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |         |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  |  | 「&」同一パテントファミリー文献   |         |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願   |  |  |         |
| 国際調査を完了した日<br>09.03.2007  |  | 国際調査報告の発送日<br>20.03.2007   |         |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JJP)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号   |  | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>田中 晴絵  | 4N 9739 |
|   |  | 電話番号 03-3581-1101 内線   | 3488    |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 2 6 9 9

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | WO 2004/035610 A (M-PHASYG GMBH) 2004. 04. 29, Patentanspruche, 9<br>頁 5 行～ 9 行<br>& JP 2006-517515 A & US 2005/0255556 A1 & EP 1549665 A<br>& DE 10248123 A & CA 2501836 A | 1-9              |
| Y                     | JP 5-64739 A (キヤノン株式会社) 1993. 03. 19, 0003 段落<br>(ファミリーなし)  | 5, 6             |
| Y                     | JP 5-226637 A (沖電気工業株式会社) 1993. 09. 03, 特許請求の範囲、<br>図 9 & EP 529775 A1  | 7-9              |
| Y                     | JP 5-325570 A (沖電気工業株式会社) 1993. 12. 10, 特許請求の範囲、<br>0001 段落、図 4 (ファミリーなし)   | 7-9              |
| P Y                   | JP 2007-024705 A (大日本住友製薬株式会社) 2007. 02. 01, 特許請求の<br>範囲、0016 段落 (ファミリーなし)  | 1-9              |

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/052699

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1～13に記載される発明に共通する事項は、エンベロープ上に膜受容体を発現させた組換えバキュロウイルス出芽ウイルストリポソームとを融合させた組換えプロテオリポソームであるが、本出願前に、エンベロープ上に膜タンパク質を発現させた組換えバキュロウイルス出芽ウイルストリポソームとを融合させた組換えプロテオリポソームは公知であったと認められる(要すれば、文献：野崎達男他、(P) 遺伝子組換え技術を利用した新しいプロテオリポソーム作製法の開発、第75回日本生化学会大会発表抄録集、2002.08.25, 783頁、2P-474参照)。そして、上記文献の膜タンパク質という記載から、当業者は膜受容体を想起することから、文献には、上記の共通する事項についても記載されているに等しいと認められる。してみれば、請求の範囲1～13には、「膜受容体が自己抗体関連疾患に関与するもの」に特別な技術的特徴を有する発明群と、組換えトリポソームをコートしてなる検出用プレートに特別な技術的特徴を有する発明群とに区分される。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.              | F I            |   | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|---|------------|
| G 0 1 N 33/544 (2006.01) | G 0 1 N 33/544 | A |            |
| G 0 1 N 33/547 (2006.01) | G 0 1 N 33/547 |   |            |
| G 0 1 N 33/564 (2006.01) | G 0 1 N 33/564 | Z |            |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 森野 和彦

愛知県名古屋市中区丸の内三丁目 5 番 1 0 号 住友商事丸の内ビル 5 階 株式会社医学生物学研究  
所内

(72)発明者 小林 淳

山口県山口市黒川 1 2 9 4 番地の 2 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA63 CA02 CA07 DA02 DA20 EA02 GA11  
GA18 GA25 GA27 GA30 HA11 HA20  
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ79 QR51 QR54 QR79 QR80 QR84  
QS33 QS39 QX02

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于诊断的重组脂蛋白体的制备方法   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JPWO2007094395A1</a>   | 公开(公告)日 | 2009-07-09 |
| 申请号            | JP2008500540   | 申请日     | 2007-02-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国立大学法人三重大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 国立大学法人三重大学   |         |            |
| [标]发明人         | 吉村哲郎<br>湊元幹太<br>今村幸治<br>森野和彦<br>小林淳  |         |            |
| 发明人            | 吉村 哲郎<br>湊元 幹太<br>今村 幸治<br>森野 和彦<br>小林 淳   |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/531 G01N33/544 G01N33/547 G01N33/564   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/5432 C12N15/86 C12N15/88 C12N2710/14143 C12N2810/855 G01N33/564 G01N33/56983 G01N2333/01 G01N2469/20  |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A C12Q1/02 C12Q1/68.Z C12Q1/70 G01N33/531.B G01N33/544.A G01N33/547 G01N33/564.Z   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA20 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA25 4B024/GA27 4B024/GA30 4B024/HA11 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR51 4B063/QR54 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX02 |         |            |
| 优先权            | 2006038076 2006-02-15 JP   |         |            |
| 其他公开文献         | JP5266459B2  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于生产适于诊断的重组蛋白脂质体的方法，涂覆有该重组蛋白脂质体的检测板，检测试剂盒等。解决方案：包膜上的靶膜受体（例如，涉及自身抗体相关疾病的人甲状腺刺激激素受体，乙酰胆碱受体，胰岛素受体，β1-肾上腺素能受体，去唾液酸糖蛋白受体等）通过融合表达重组杆状病毒的芽孢病毒和脂质体来制备重组蛋白脂质体。与重组杆状病毒相比，由于这种蛋白脂质体与自身抗体的结合能力提高，因此可以容易地制造检测试剂盒。[选择图]图2

