

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5250812号
(P5250812)

(45) 発行日 平成25年7月31日(2013.7.31)

(24) 登録日 平成25年4月26日(2013.4.26)

| | | | | |
|-----------------------|------------------|----------------|---------|--|
| (51) Int.Cl. | | F I | | |
| C O 7 K 14/195 | (2006.01) | C O 7 K 14/195 | Z N A | |
| G O 1 N 33/53 | (2006.01) | G O 1 N 33/53 | D | |
| G O 1 N 30/88 | (2006.01) | G O 1 N 30/88 | J | |
| G O 1 N 27/447 | (2006.01) | G O 1 N 27/26 | 3 1 5 H | |

請求項の数 2 (全 10 頁)

| | | | |
|--------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2007-74807 (P2007-74807) | (73) 特許権者 | 305060567 |
| (22) 出願日 | 平成19年3月22日 (2007.3.22) | | 国立大学法人富山大学 |
| (65) 公開番号 | 特開2008-189648 (P2008-189648A) | | 富山県富山市五福3190 |
| (43) 公開日 | 平成20年8月21日 (2008.8.21) | (74) 代理人 | 100114074 |
| 審査請求日 | 平成22年1月21日 (2010.1.21) | | 弁理士 大谷 嘉一 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2006-122758 (P2006-122758) | (72) 発明者 | 杉山 敏郎 |
| (32) 優先日 | 平成18年4月27日 (2006.4.27) | | 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | キャンパス内 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2006-124576 (P2006-124576) | 審査官 | 佐久 敬 |
| (32) 優先日 | 平成18年4月28日 (2006.4.28) | | |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2007-4109 (P2007-4109) | | |
| (32) 優先日 | 平成19年1月12日 (2007.1.12) | | |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘリコバクター・ピロリ菌由来の新規抗原、抗原組成物およびピロリ菌抗体の検出方法。

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

日本人から分離した複数のヘリコバクター・ピロリ菌を培養及び増殖したヘリコバクター・ピロリ菌増殖体を、アルキルグルコシド系界面活性剤を含有する緩衝液で処理することで可溶化された抽出物から、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて得られた高分子画分を濃縮・脱塩して得られる抗原組成物であって、以下の(a)~(d)の特性を有する抗原組成物。

(a) SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で約100kDaの分子量(MW)を示し、等電点電気泳動装置にてタンパク質を分離し次にSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動による二次元電気泳動でpIが約5.9~6.9において3つ以上のMWに分離される。

(b) ウレアーゼ活性を示さない。

(c) 細胞毒素関連蛋白(CagA)の一部である。

(d) 日本人の血清中のピロリ抗体の検出を行うと米国人の血清中のピロリ抗体の検出より偽陰性の出現率が減少する。

【請求項2】

日本人から分離した複数のヘリコバクター・ピロリ菌を培養及び増殖したヘリコバクター・ピロリ菌増殖体を、アルキルグルコシド系界面活性剤を含有する緩衝液で処理することで可溶化された抽出物から、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて得られた高分子画分を濃縮・脱塩して得られる抗原組成物であって、以下の(a)~(d)の特性を有する抗

原組成物の、日本人の血清中のヘリコバクター・ピロリ菌抗体を検出するための使用。

(a) SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で約 100 kDa の分子量 (MW) を示し、等電点電気泳動装置にてタンパク質を分離し次に SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動による二次元電気泳動で pI が約 5.9 ~ 6.9 において 3 つ以上の MW に分離される。

(b) ウレアーゼ活性を示さない。

(c) 細胞毒素関連蛋白 (CagA) の一部である。

(d) 日本人の血清中のピロリ抗体の検出を行うと米国人の血清中のピロリ抗体の検出より偽陰性の出現率が減少する。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヘリコバクター感染症の血清抗体診断法に用いるヘリコバクター・ピロリ菌由来の抗原蛋白質およびその蛋白質を含有する抗原組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*、以下、ピロリ菌と称する) は、胃炎や胃潰瘍・十二指腸潰瘍など関連性の高い菌であり、その感染者は世界人口の約 40-50% に達するものと考えられている。

ピロリ菌の検出法には培養法、ウレアーゼテスト、呼気テスト、組織学的検査、血清学的方法がある。特に血清学的方法は血清中の抗ピロリ菌抗体を検出する方法であり、非侵襲的で大量の検体を処理できる点で優れている。血清中の抗ピロリ菌抗体は多様であるため、抗体測定に用いる抗原の調製方法や、種類により、その測定感度や、特異性が異なり、その結果、抗ピロリ菌抗体を測定することの臨床的意義も多種多様である。

20

ピロリ菌由来の抗原として、例えば、ピロリ菌の膜外層に由来する分子量 300 kDa ~ 700 kDa、等電点 (pI) 5.9 ~ 6.9 でウレアーゼ活性をもつもの (特許文献 1)、ピロリ菌をリゾチーム処理、次いで N - アセチルグルコサミダーゼ処理して得られる電気泳動で 65 ~ 70 kDa、75 ~ 86 kDa、約 132 kDa または約 140 kDa であるもの (特許文献 2)、ピロリ菌の膜破砕物から得られる分子量 10 ~ 100 kDa のもの (特許文献 3)、CP2 抗原と称される分子量約 60 kDa のもの (特許文献 4)、ピロリ菌の細胞付着タンパク由来の SDS 電気泳動で分子量約 16 ~ 200 kDa でウレアーゼ枯渇活性をもつもの (特許文献 5) などが知られている。

30

一方、ピロリ菌株のゲノム解析から、ピロリ菌はアジア株、ヨーロッパ株、アフリカ株といったグループに分けられること、また、ピロリ菌の細胞空胞化毒素関連蛋白 (CagA) 多型の研究から東アジア型、アジア型、欧米型といったグループに分けられることが知られている (非特許文献 1)。

HM - CAP と称される米国人に由来するピロリ菌株から得られた抗原に比して、日本人に由来するピロリ株から得られた抗原 (JHM - CAP) で、日本人の血清中のピロリ抗体の検出を行うと偽陰性が減少することが報告されている (非特許文献 2 および 3)。

【0003】

40

【特許文献 1】特表平 3 - 504412

【特許文献 2】特開 2000 - 2706

【特許文献 3】特開平 10 - 264553

【特許文献 4】特開平 9 - 322772

【特許文献 5】特開平 5 - 264553

【非特許文献 1】化学療法の領域, Vol.2, No.7, 928-934, 2005

【非特許文献 2】J. Clin. Microbiol., Vol.41, No.4, 1480-1485, 2003

【非特許文献 3】Helicobacter Research, vol.9, no.3, 183-185, 2005

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0004】

日本人に由来するピロリ株から得られた抗原(JHM-CAP)で、日本人の血清中のピロリ抗体の検出を行うと偽陰性が減少することが報告されているものの、抗原の詳細については不明である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の抗原組成物は、複数の異なる疾患の日本人から分離したピロリ菌株から得られた高分子蛋白質、具体的には、(A)ヘリコバクター・ピロリ菌から抽出され、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で約100kDaの分子量(MW)を示す、細胞毒素関連蛋白(CagA)の一部である蛋白質、(B)SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で約100kDaの分子量を示し、等電点及び分子量に基づく二次元電気泳動で81kDa~125kDa間に3つ以上に分離され、ウレアーゼ活性を示さない蛋白質、(C)さらに、(A)の蛋白質がアミノ酸配列のN末端から990番目以降のアミノ酸が欠落した細胞毒素関連蛋白(CagA)であること、このCagAの一部は、抗原組成物の製造工程で生成することを見出し、本発明を完成した。

以下、詳細に本発明を説明する。

【0006】

本発明に使用されるピロリ菌は、胃炎、胃潰瘍・十二指腸潰瘍を患っている日本人患者の胃液または胃粘膜から分離した菌(以下、分離菌と称する。)である。

本発明の組成物(以下、JHM-CAPと称する。)は、培養液から分離したピロリ菌を、アルキルグルコシド系界面活性剤を含有する緩衝液で処理し、可溶化された抽出物を、ゲル濾過クロマトグラフィーに供し、高分子画分を得、該画分を濃縮・脱塩して得られるものである。

アルキルグルコシド系界面活性剤として、n-オクチル-D-グルコピラノシド、n-オクチル-D-グルコピラノシド、n-オクチル-D-チオグルコピラノシド、n-ヘプチル-D-チオグルコシドなどが挙げられるが、n-オクチル-D-グルコピラノシドが好ましい。アルキルグルコシド系界面活性剤含有緩衝液におけるアルキルグルコシド系界面活性剤の濃度は、0.5~1.5%(V/V)、好ましくは1%である。

緩衝液として、膜タンパク質可溶化に使用されるものであれば、特に限定されないが、例えば、リン酸緩衝食塩液が挙げられる。

ゲル濾過クロマトグラフィーのゲルとして、デキストリンゲル、アガロースゲルなどが挙げられるが、アガロースゲルが好ましい。

濃縮・脱塩は、タンパク質の精製に用いられる方法であれば特に限定されないが、具体的には、硫酸アンモニウムを使用した塩析法とセロファンを使用した透析法を組み合わせればよい。

【0007】

分離菌の培養は個別に行っても複数の分離菌を混合してもよいが、個別に培養した場合には、集菌したものを混ぜ合わせて、可溶化処理を行ってもよく、また、濃縮・脱塩して得られたものを混合してもよい。

分離菌の培養は、通常、ピロリ菌の培養に使用される方法、例えば、寒天平板、液体培地のいずれでも使用することができる。具体的には、ブレインハートインフュージョン(BHI)と馬血液とで作られる血液寒天平板に分離菌を接種し、37℃、炭酸ガス下で数日培養した後、HPを平板から集菌する。あるいは、馬血清、ウサギヘモグロビン、酵母エキスを含むBHIからなる液体培地で、血液寒天平板と同様の条件で培養すればよい。

【0008】

上記のようにして得られた本発明の抗原組成物は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で約100kDaの分子量を示し、等電点及び分子量に基づく二次元電気泳動で81kDa~125kDa間に3つ以上に分離される蛋白質を含んでいる。また、本発明の抗原組成物はウレアーゼ活性を示さない。さらに本発明の抗原組成物は、細胞毒素関連蛋白(CagA)の一部である。より具体的には、例えば、配列番号1で示されるCagAで

は、990番目以降のアミノ酸が欠落したCagAある。また、このアミノ酸欠落CagAは、日本人由来のピロリ菌をアルキルグルコシド系界面活性剤を含有する緩衝液で処理し、可溶化された抽出物を、ゲル濾過クロマトグラフィーに供して作製される工程でのみ生成する(図4)。アメリカ人由来のピロリ菌を原料として同様の工程で作製される抗原組成物(HM-CAP)では、アミノ酸欠落のない約120kDaのCagAが存在する(図5)。

【0009】

本発明の抗原組成物を用いて、ピロリ菌の抗体を検出・定量するには、例えば、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、補体結合、ラテックス粒子凝集法、イムノプロット法、受動的免疫凝集法などを用いて行えばよい。好ましい方法としてELISAが挙げられる。この方法は固相支持体にJHM-CAP抗原を固定化することを含んでいる。具体的にはJHM-CAP抗原を固定化した後、検査すべき血清試料を固定化したJHM-CAP抗原と結合させ、それらを一定時間室温で湿潤な条件でインキュベートし、抗原-抗体結合体を形成させる。次いで酵素標識抗ヒトIgGを固相支持体上の抗原-抗体結合体に加え反応させ、抗原-抗体-酵素標識抗ヒトIgG複合体を形成させる。次いで、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を加え、反応性生成物の検出・定量することにより血清中に存在する抗体を検出・定量することができる。

【発明の効果】

【0010】

本発明の抗原組成物により、日本人の血清中のHP抗体を測定した場合、アメリカ人由来の分離菌から得られる抗原組成物での測定に比して、高感度で特異性の高い検出が可能となり偽陰性を減少させることができる。

次に、実施例で本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【実施例】

【0011】

実施例

(1)ピロリ菌の培養

北海道大学において分離された日本人由来の4種類の分離菌(159A株、193C株、198C株、225株)を直径10cmの血液寒天平板(トリプチケースソイ5%ヒツジ血液寒天培地、日本ベクトン・ディッキンソン社)で、5%酸素、10%炭酸ガス、85%窒素の雰囲気下、37℃、湿度100%で48-72時間培養した。

平板上で増殖した分離菌を集菌し、リン酸緩衝生理食塩液で2回洗浄した後、細菌タンパク質抽出キット(B-PER、ピース(Pierce)社)で粗抽出物を得た。

【0012】

(2)抗原の作製

粗抽出物を1%-n-オクチル-D-グルコピラノシドを含有したリン酸緩衝食塩液に溶解させ、緩衝食塩液に対し透析および遠心分離して可溶性蛋白質を得た。次いで、可溶性蛋白質を、0.05Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したアガロースA-5カラムに通した後、硫酸アンモニウムで沈殿させ、透析して、高分子量蛋白質のJHM-CAP(蛋白質濃度:7.2mg/ml)を得た。同様にして、アメリカ人由来の分離菌(197SR-US)からHM-CAP(蛋白質濃度:11.2mg/ml)を得た。

【0013】

(3)SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

JHM-CAPおよびHM-CAPを適宜希釈し、5~20%グラジュエントゲルを使用しSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、蛋白質をニトロセルロース膜に転写し、イムノプロテイングを行った。イムノプロテイングは、500倍希釈の小児血清、リン酸緩衝食塩液で1000倍に希釈したパーオキサイド標識抗ヒトグロブリンGヒツジ抗体(American Qualex International Inc.)を使用し、化学ルミネセンスにより検出した。その結果を図1に示した。

【0014】

(4) 二次元電気泳動

精製蛋白 (HM-CAPまたはJHM-CAP) を溶解液 (8 M尿素、2 % CHAPS、50 mM DTT、0.2 % Bio-Lyte R3/10、0.001 % BPB) に溶解し、この溶液で固定化 pH 勾配プレキャストゲル [IPG Ready Strip R、17 cm、pH 3-10 (バイオ・ラッド ラボラトリーズ社)] を膨潤させる。等電点電気泳動装置 [プロティアン IEFセル (バイオ・ラッド ラボラトリーズ社)] にゲルを置き、次の条件で電圧をかける。ステップ 1: 0 ~ 250 V、15 分。ステップ 2: 250 V ~ 10000 V、2 時間。ステップ 3: 10000 V、50000 V hour。終了後、ゲルを平衡化液 1 [6 M尿素、0.375 M トリス緩衝液 (pH 8.8)、2 % SDS、20 % グリセロール、2 % DTT] で 20 分間、次いで平衡化液 2 [6 M尿素、0.375 M トリス緩衝液 (pH 8.8)、2 % SDS、20 % グリセロール、2.5 % ヨードアセトアミド] で 10 分間、平衡化する。アクリルアミドゲル (18.3 × 19.3 × 0.1 cm、7.5 %) に平衡化したゲルをセットし、SDS 電気泳動した後、ゲルを銀染色した。その結果を図 2 および 3 に示した。

【0015】

(5) マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 - 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) 解析

JHM-CAP を、5 ~ 20 % グラジエントゲルを使用し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。次いで、Silver Staining Kit Protein (GEヘルスケア・バイオサイエンス (GE Healthcare Bio-science) 社製) で銀染色を行い、ゲルから約 100 kDa のバンドを切り出した。

得られたゲル切片を、Gharahdaghiらの方法 (Electrophoresis, 20:601-605, 1999) に準じてトリプシンで処理した。

ペプチド混合物に、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸を飽和させた33%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸溶液を1:1で混合し、この溶液1 μ l をMALDI-TOF/MSのサンプルプレートにのせ、解析した。

【0016】

(6) ペプチドマスフィンガープリント

タンパク質の同定は、Mascotプログラム (マトリックス・サイエンス (Matrix Science) 社) によるペプチドマスフィンガープリントで行った。データベースは、ピロリ菌の No. 26695 株および J99 株のアミノ酸配列データをもつ米国立生物工学情報センター (NCBI) の NCBI nr を使用した。結果を表 1 に示す。

【0017】

【表 1】

| Mowse score | NCBI-gi | protein | peptides matched |
|-------------|----------|---------|------------------|
| 94 | 52697380 | CagA | 13 |
| 82 | 46091352 | CagA | 12 |
| 82 | 52693804 | CagA | 12 |
| 82 | 12225014 | CagA | 12 |
| 81 | 22335393 | CagA | 12 |

【0018】

(7) JHM-CAP および HM-CAP の性能

抗原として JHM-CAP および HM-CAP を使用し、通常の免疫測定法により日本人

10

20

30

40

50

小児血清中のピロリ抗体の検出を行った。その結果を表2に示す。

【0019】

【表2】

| グループ&パラメーター | JHM-CAP | HM-CAP |
|-------------|--------------|--------------|
| 全体 | | |
| 感度(%)*1 | 93.0 (40/43) | 67.4 (29/43) |
| 特異性(%)*2 | 95.4 (84/88) | 93.2 (82/88) |
| 精度(%) | 94.7 | 84.7 |
| 10才以下 | | |
| 感度(%) | 90.9 (30/33) | 57.6 (19/33) |
| 特異性(%) | 97.3 (72/74) | 94.6 (70/74) |
| 精度(%) | 95.3 | 83.1 |
| 5才以下 | | |
| 感度(%) | 100 (14/14) | 57.1 (8/14) |
| 特異性(%) | 98.0 (51/52) | 94.0 (49/52) |
| 精度(%) | 98.5 | 86.4 |

*1: 便中 H.pylori 抗原検出法で陽性となった子供数に対する、JHM-CAP または HM-CAP を使用した酵素免疫測定法で陽性となった子供数の百分率。

*2: 便中 H.pylori 抗原検出法で陰性となった子供数に対する、JHM-CAP または HM-CAP を使用した酵素免疫測定法で陰性となった子供数の百分率。

【産業上の利用可能性】

【0020】

本発明の抗原組成物を使用して、日本人の血清中のピロリ菌抗体を測定した場合、高感度で特異性の高い検出が可能となり偽陰性を減少させることができ、ピロリ菌感染症の診断、特に日本人を含めた東アジア人のピロリ菌感染症の診断に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】 SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動の写真である。Case 1 および 8 は JHM - CAP 陽性・HM - CAP 陰性の血清、Case 2 3 は陽性対照血清、Case 2 6 は陰性対照血清である。縦軸の数値は分子量 (KDa) を示す。

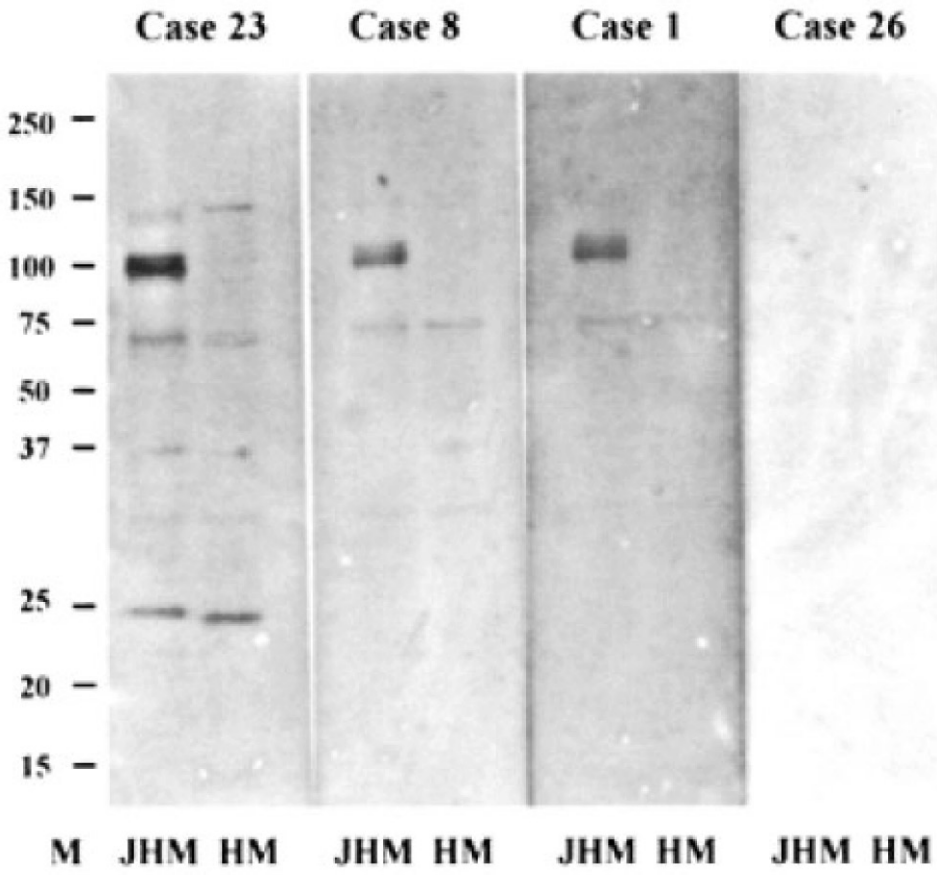
【図2】 JHM - CAP の二次元電気泳動の写真である。四角の枠は、本発明の抗原組成物の泳動位置を見やすくしたものである。

【図3】 HM - CAP の二次元電気泳動の写真である。

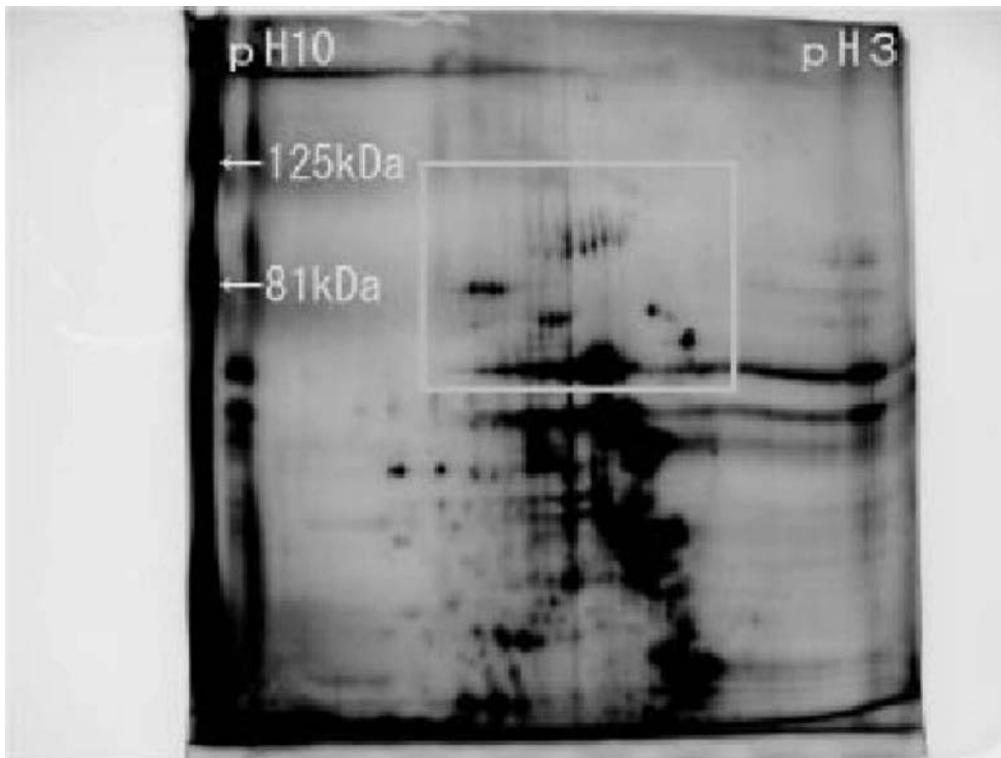
【図4】 分離菌の粗抽出物と JHM - CAP を SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ウサギ抗 CagA 抗体で免疫染色した写真である。

【図5】 JHM - CAP と HM - CAP を SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ウサギ抗 CagA 抗体で免疫染色した写真である。

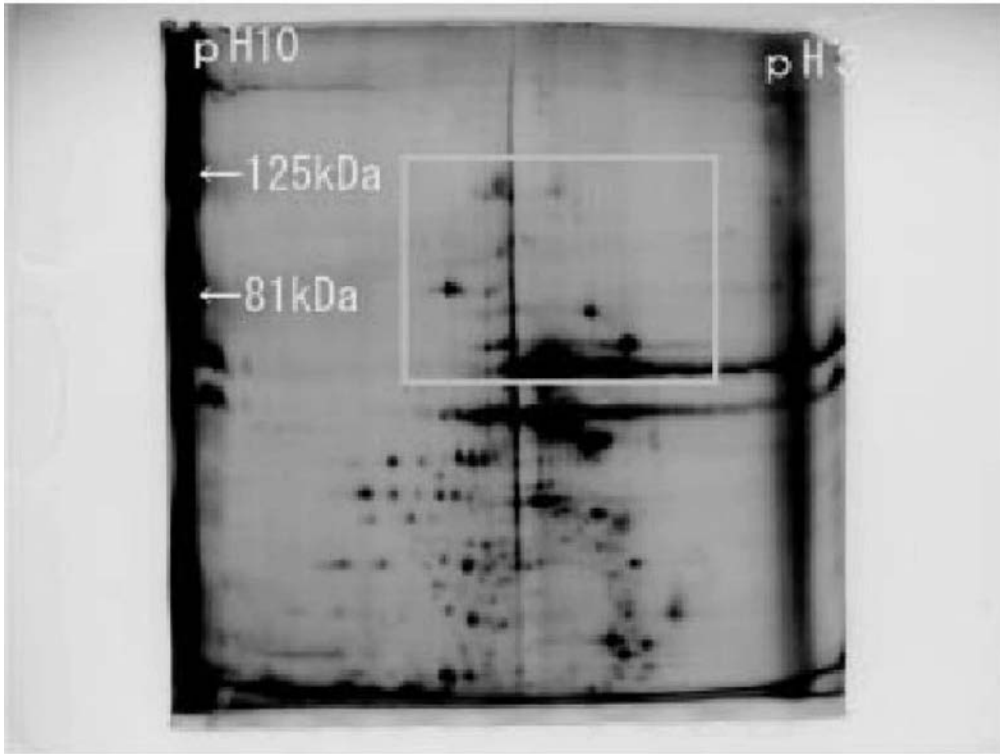
【 図 1 】



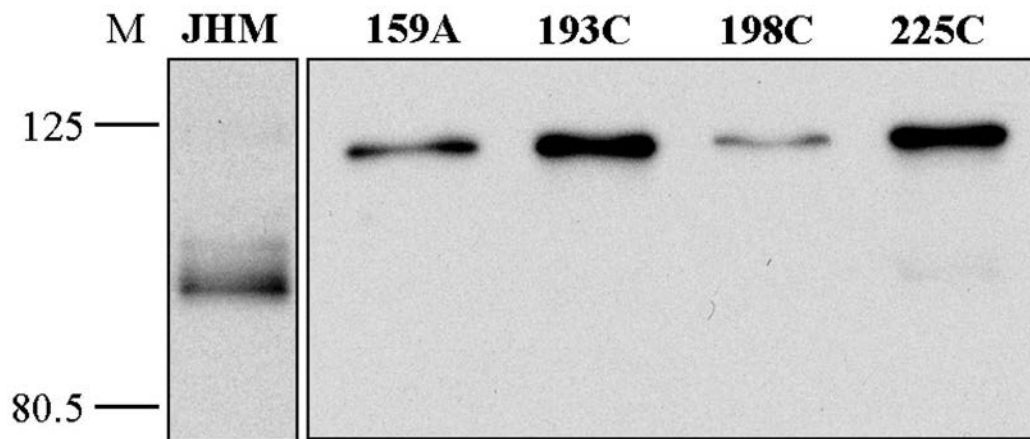
【 図 2 】



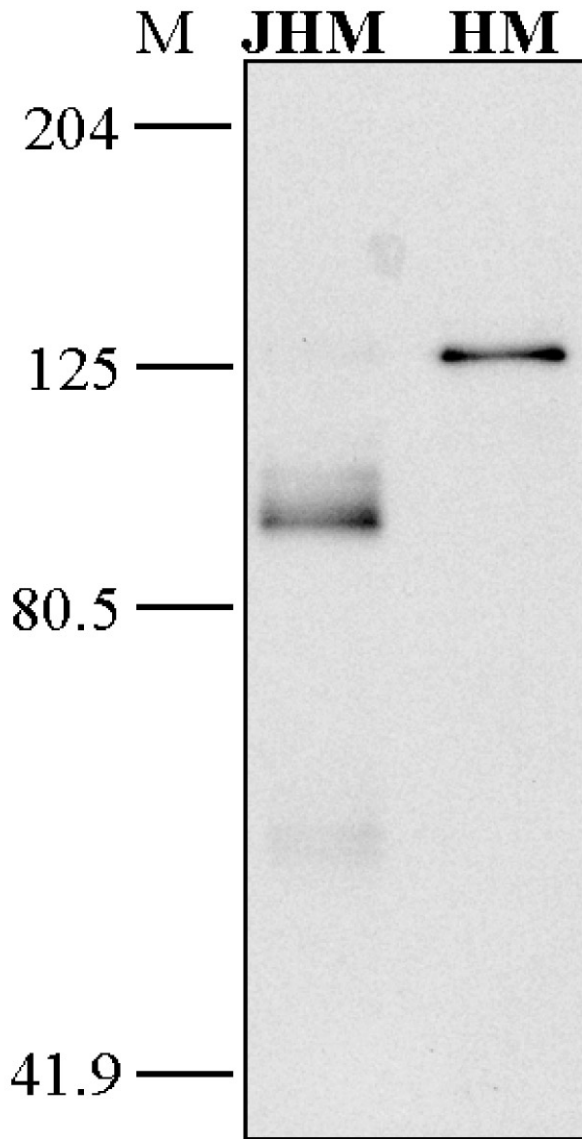
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

[0005250812000001.app](#)

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2001-523954(JP,A)
特表2001-503637(JP,A)
特表平11-504206(JP,A)
特開2004-123737(JP,A)
国際公開第2003/018054(WO,A1)
特表平11-505267(JP,A)
特表平10-511116(JP,A)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA,(1993), vol.90, p.5791-5795
MOESE,S. et al , Identification of a tyrosine-phosphorylated 35 kDa carboxy-terminal fragment (p35CagA) of the Helicobacter pylori CagA protein in phagocytic cells: processing or breakage?, Proteomics , 2001年, Vol.1, No.4, p.618-629
BACKERT,S. et al , Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the Helicobacter pylori CagA protein after translocation into gastric epithelial cells , Proteomics , 2001年, Vol.1, No.4, p.608-617
畠山昌則 , ヘリコバクター・ピロリ病原因子CagAと胃がん , 月刊血液・腫瘍科 , 2004年 , Vol.48(2) , p.235-242

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C07K 1/00 - 19/00
C12Q 1/00 - 3/00
C12N 15/00 - 15/90
G01N 33/53
CAPlus / BIOSIS / MEDLINE (STN)
JSTPlus / JMEDPlus (JDreamII)