

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-131288

(P2009-131288A)

(43) 公開日 平成21年6月18日(2009.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195	4 B O 6 3
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/106 (2006.01)	A 6 1 K 39/106	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 34 O L (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-66575 (P2009-66575)	(71) 出願人	596009674 アンステイテュ・パストゥール
(22) 出願日	平成21年3月18日 (2009.3.18)		フランス国、75724 パリ・セデクス
(62) 分割の表示	特願平8-175168の分割		15、リュ・ドゥ・ドクトゥール・ルー
原出願日	平成8年7月4日 (1996.7.4)		25-28
(31) 優先権主張番号	9508068	(71) 出願人	596005872
(32) 優先日	平成7年7月4日 (1995.7.4)		アンステイテュ・ナシオナル・デュ・ラ・
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		サンテ・エ・デュ・ラ・ルシエルシュ・メ
			ディカル
			フランス国、75654 パリ・セデクス
			13、リュ・デ・トルビヤック 101
		(74) 代理人	100058479
			弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 H. ピロリの f l b A 遺伝子のクローニング及び特徴づけ、並びに非鞭毛 (A f l a g e l l a t e) 株の産生

(57) 【要約】

【課題】本発明は、ヘリコバクター ピロリの鞭毛蛋白質の生合成制御に関わるヌクレオチド配列、該配列がコードする蛋白質、非鞭毛細菌株、及びH.ピロリによる感染を検出するための方法、またはそのような感染を予防するための方法を提供すること。

【解決手段】感染患者の血清による認識には影響を与えないが、特にカンピロバクター (Campylobacter) ファミリの細菌 (例としてはCampylobacter jejuni) に関する「偽陽性」型の反応を避けることが可能な、H.ピロリ株の修飾を行う。得られた修飾済み細菌を、免疫組成物または組成物を構築するにあたってワクチン接種に用いる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) の鞭毛タンパク質の生合成を調節すると共に、高厳密度の条件下において、下記の配列を有する二つのオリゴヌクレオチドを用いて増幅された H. ピロリ由来のヌクレオチドフラグメントに対応するプローブとハイブリダイズすることができるか、

O L F 1 b A - 1 : A T G C C T C G A G G T C G A A A A G C A A G A T G

O L F 1 b A - 2 : G A A A T C T T C A T A C T G G C A G C T C C A G T C

或いは、高厳密度の条件下において、これらのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列。

10

【請求項 2】

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) の鞭毛タンパク質の生合成を調節する f 1 b A 遺伝子のヌクレオチド配列であって、このヌクレオチド配列は、H. ピロリ株の染色体 DNA を含むゲノムライブラリーを、下記の配列を有する二つのオリゴヌクレオチドを用いて増幅された H. ピロリ由来のヌクレオチドフラグメントに対応するプローブか、

O L F 1 b A - 1 : A T G C C T C G A G G T C G A A A A G C A A G A T G

O L F 1 b A - 2 : G A A A T C T T C A T A C T G G C A G C T C C A G T C

或いは、高厳密度の条件下において、これらのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができるプローブを用いてスリーニングする工程と、前記プローブとハイブリダイズする DNA 配列を回収する工程と、得られた DNA 配列をプラスミドタイプの適切なベクター中にサブクローニングし、次いで、高厳密度の条件下において、オリゴヌクレオチド O L F 1 b A - 1 および O L F 1 b A - 2 を用いて増幅された H. ピロリ由来のヌクレオチドフラグメントに対応するプローブとハイブリダイズする修飾ベクターを選別する工程と、上記プローブとハイブリダイズするプラスミドベクター中に含まれている DNA フラグメントの配列決定を行い、これらフラグメントに含まれるオープンリーディングフレームを決定する工程とによって得られるヌクレオチド配列。

20

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のヌクレオチド配列であって、図 3、4 に示したヌクレオチド配列を有することを特徴とするヌクレオチド配列。

30

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列であって、図 3、4 に示したアミノ酸配列を有するタンパク質、または H. ピロリの鞭毛タンパク質の生合成に関して上記配列と同じ調節特性をもったアミノ酸配列を有するタンパク質をコードすることを特徴とするヌクレオチド配列。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列であって、該配列は、f 1 b A 遺伝子がもはや宿主細胞内で発現せず、または宿主細胞内での f 1 b A 遺伝子の発現が H. ピロリの鞭毛の生合成を可能としないように、また適切な場合には、H. ピロリのフックタンパク質の合成ができないように、欠失、置換または挿入によって修飾されているヌクレオチド配列。

40

【請求項 6】

f 1 b A 遺伝子のフラグメントに対応する請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列であって、f 1 b A 遺伝子に由来し、好ましくは f 1 b A 遺伝子の配列に存在する制限酵素部位で切断された、少なくとも 6 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 100 ヌクレオチドのフラグメントであることを特徴とするヌクレオチド配列。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項のヌクレオチド配列を含み、該配列はマーカー、例えば抗生物質に対する耐性遺伝子または重金属に対する耐性遺伝子を含むカセットの挿入によって修飾されていることを特徴とする組み換え核酸。

50

【請求項 8】

請求項 7 に記載の組み換え核酸であって、請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の前記ヌクレオチド配列が、カナマイシンに対する耐性カセットの挿入によって修飾されていることを特徴とする組み換え核酸。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の配列に対して特異的であることと、下記の配列の一つを有することとを特徴とするオリゴヌクレオチド。

O L F 1 b A - 1 : A T G C C T C G A G G T C G A A A A G C A A G A T G

O L F 1 b A - 2 : G A A A T C T T C A T A C T G G C A G C T C C A G T C

O L F 1 b A - 7 : C G G G A T C C G G G T T A C T A A T G G T T C T A C

O L F 1 b A - 8 : C G G G A T C C T C A T G G C C T C T T C A G A G A C
C

10

【請求項 10】

請求項 1 および 2 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列によってコードされることを特徴とする、H. ピロリの F 1 b A タンパク質のアミノ酸配列。

【請求項 11】

H. ピロリの F 1 b A タンパク質であり、図 3、4 に示した配列を有すること、または F 1 b A タンパク質に対する抗体によって認識される該蛋白質のフラグメントであることを特徴とするアミノ酸配列。

【請求項 12】

ヘリコバクター・ピロリ菌株であって、塩基またはヌクレオチドフラグメントの置換、付加および/または欠失によって、H. ピロリの鞭毛タンパク質の生合成の調節に關与する f 1 b A 遺伝子の請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列に生じた突然変異によってもたらされる、非鞭毛フェノタイプを有することを特徴とする菌株。

20

【請求項 13】

請求項 12 に記載の菌株であって、更に、H. ピロリのフックタンパク質が欠失していることを特徴とする菌株。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 に記載の組み換え菌株であって、N 6 株から得られたものであり、1992年6月26日に、NCIMB 受付番号第 40512 号で NCIMB に寄託されたものであることを特徴とする菌株。

30

【請求項 15】

請求項 12 または 14 に記載の組み換え菌株であって、N 6 f 1 b A - 株であり、1995年6月30日に、NCIMB 受付番号第 40747 号で NCIMB に寄託されたものであることを特徴とする菌株。

【請求項 16】

請求項 12 ~ 15 の何れか 1 項に記載の菌株であって、弱められたウレアーゼを産生するか、或いはもはやウレアーゼを産生しないように更に突然変異されており、この突然変異は、例えば ure A 遺伝子 ure B 遺伝子、ure C 遺伝子、ure D 遺伝子、ure E 遺伝子、ure F 遺伝子、ure G 遺伝子、ure H 遺伝子、および ure I 遺伝子の中から選択される一以上のヌクレオチドの突然変異からなることを特徴とする菌株。

40

【請求項 17】

請求項 12 ~ 15 の何れか 1 項に記載の菌株の抽出物であることを特徴とするバクテリア抽出物。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のバクテリア抽出物であって、n - オクチルグルコシドで抽出した後に得られることを特徴とするバクテリア抽出物。

【請求項 19】

請求項 17 に記載のバクテリア抽出物であって、PBS またはグリシンで抽出した後に得られるバクテリア抽出物。

50

【請求項 20】

患者由来の生物学的液体のサンプル（特に血清サンプル）におけるH. ピロリによる感染をインビトロで検出するための組成物であって、活性成分として、請求項12～15の何れか1項の菌株、または請求項17～19の何れか1項のバクテリア抽出物を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 21】

患者由来の生物学的液体のサンプル（特に血清サンプル）におけるH. ピロリによる感染をインビトロで検出するための方法であって、前記被検サンプルを、請求項12～15の何れか1項の菌株、または請求項17～19の何れか1項のバクテリア抽出物と接触させる工程と、前記菌株と、前記被検サンプル中に存在し且つH. ピロリに向けられる抗体との間の免疫反応を検出する工程とを具備する方法。

10

【請求項 22】

H. ピロリに対する抗体を得るための免疫原組成物であって、活性成分として、請求項12～16の何れか1項の菌株、または請求項17～19の何れか1項のバクテリア抽出物を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 23】

H. ピロリに対する抗体を得るための免疫原組成物であって、請求項10または11の何れか1項に記載のアミノ酸配列を含有する組成物。

【請求項 24】

H. ピロリによる感染に対する防護的抗体を得るためのワクチン接種組成物であって、活性成分として、請求項12～16の何れか1項の菌株、または請求項17～19の何れか1項のバクテリア抽出物を含有することを特徴とする組成物。

20

【請求項 25】

H. ピロリによる感染に対する抗体を得るためのワクチン接種組成物であって、活性成分として、ウレアーゼタイプである抗原またはH. ピロリのウレアーゼ活性に關与する抗原、特にureA遺伝子、ureB遺伝子、ureC遺伝子、またはureD遺伝子によってコードされる抗原と、請求項10または11の何れかのアミノ酸配列を有するタンパクとを含有することを特徴とする組成物。

【請求項 26】

請求項10または11の何れかに記載のアミノ酸配列に向けられる、モノクローナル抗体またはポリクローナル血清。

30

【請求項 27】

請求項12～15の何れか1項に記載のH. ピロリ株に向けられる、モノクローナル抗体またはポリクローナル血清。

【請求項 28】

生物学的サンプルにおけるH. ピロリによる感染をインビトロで検出するための組成物であって、活性成分として、請求項12～15の何れか1項の非鞭毛フェノタイプを有するH. ピロリに対して得られるモノクローナル抗体またはポリクローナル血清を含有する組成物。

【請求項 29】

H. ピロリに対する抗体取得に用いる免疫原組成物を調製するための、請求項1～9の何れか1項に記載のヌクレオチド配列の使用。

40

【請求項 30】

H. ピロリに感染した患者の抗体を診断するためのキットであって、請求項15～19の何れか1項に記載のバクテリア抽出物と、抗原/抗体タイプの反応を明示するために必要とされる試薬とを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の属する技術分野]

50

本発明は、現在までのところヒトの胃粘膜表面上に特異的に見られることがわかっている、グラム陰性細菌であるヘリコバクター・ピロリ（*H. ピロリ*とも命名されている）に関する。

【0002】

[従来技術]

多くの細菌と共通して、*H. ピロリ*もまた、酸性pHの培養液に対しては感受性であるが、生理学的濃度の尿素存在下においては、酸性度を許容することが可能である（Marshallら、1990、*Gastroenterol.* 99: 697-702）。尿素を加水分解して二酸化炭素とアンモニアにし、細菌の微小環境下に放出することで、*H. ピロリ*のウレアーゼは、胃の酸性環境下においても該細菌を生存させることを可能にする。動物モデルを使った最近の研究により、ウレアーゼは消化器官の粘膜でのコロニー形成における重要な因子であることが示唆された（Eatonら、1991、*Infect. Immun.* 59: 2470-2475）。該ウレアーゼはまた、直接的もしくは間接的に消化器粘膜に損傷を引き起こすことが疑われている。

10

【0003】

現在は、ヘリコバクター・ピロリ（*H. ピロリ*）はアントラル・ガストリテス（*antral gastritis*）の病因であると認識されていて、潰瘍の発達に必要な共因子の一つであることがわかっている。更に、胃癌の発達に、*H. ピロリ*の存在が関連している可能性があることがわかっている。

20

【0004】

[発明が解決しようとする課題]

ヘリコバクター・ピロリ種の細菌による試験管内感染を検出する感受性、特異的な新規の方法を開発するために、発明者らは当該細菌の移動性を制御するシステムに興味を有している。

【0005】

[課題を解決するための手段]

この目的を見据え、発明者らは、感染患者の血清による認識には影響を与えないが、特にカンピロバクター（*Campylobacter*）ファミリーの細菌（例としては*Campylobacter jejuni*）に関しての「偽陽性」型の反応を避けることが可能な、*H. ピロリ*株の異なる修飾に興味を持っている。

30

【0006】

更に発明者らは、必要ならば、免疫組成物または組成物を構築するにあたって、得られた修飾済み細菌をワクチン接種に用いることが可能であると述べている。

【0007】

[発明の実施の形態]

第一段階において発明者らは、*H. ピロリ*の鞭毛の生合成の制御、及びその結果として当該細菌の移動性の制御に関わる*flbA*遺伝子を同定し、単離した。鞭毛の生合成は、フラジェリンA及びBの合成と鞘（*sheath*）の生合成とを具備している。*flbA*遺伝子はフラジェリンA及びBの生合成、並びにフラジェリンを含む鞘の生合成の両方を制御する。発明者らは、*flbA*遺伝子が該細菌の固着蛋白質（「フック」とも呼ばれる）の生合成を制御する点においても重要であるということを確認している。

40

【0008】

故に本発明は、ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）の鞭毛タンパク質の生合成を調節すると共に、高厳密度の条件下において、下記の配列を有する二つのオリゴヌクレオチドを用いて増幅された*H. ピロリ*由来のヌクレオチドフラグメントに対応するプローブとハイブリダイズすることができるか、

OLF1bA - 1: ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG

OLF1bA - 2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC

或いは、高厳密度の条件下において、これらのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列に関する。

50

【0009】

上記の配列は、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)の鞭毛タンパク質の合成を調節する *f1bA* 遺伝子のヌクレオチド配列であって、このヌクレオチド配列は、H. ピロリ株の染色体DNAを含むゲノムライブラリーを、下記の配列を有する二つのオリゴヌクレオチドを用いて増幅されたH. ピロリ由来のヌクレオチドフラグメントに対応するプローブか、

OLF1bA-1: ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG

OLF1bA-2: GAAATCTTTCATACTGGCAGCTCCAGTC

或いは、高厳密度の条件下において、これらのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができるプローブを用いてスクリーニングする工程と、前記プローブとハイブリダイズするDNA配列を回収する工程と、得られたDNA配列をプラスミドタイプの適切なベクター中にサブクローニングし、次いで、高厳密度の条件下において、オリゴヌクレオチドOLF1bA-1およびOLF1bA-2を用いて増幅されたH. ピロリ由来のヌクレオチドフラグメントに対応するプローブとハイブリダイズする修飾ベクターを選別する工程と、上記プローブとハイブリダイズするプラスミドベクター中に含まれているDNAフラグメントの配列決定を行い、これらフラグメントに含まれるオープンリーディングフレームを決定する工程とによって得られる。

【0010】

有益には、これらのDNA断片を使って、約2169ヌクレオチドからなるオープンリーディングフレームに対応した、*f1bA* 遺伝子のコード配列が再構築される。

【0011】

H. ピロリの染色体DNAを含むゲノムライブラリーは、どんなH. ピロリの株からも得ることができる。コスミドライブラリーもまた、H. ピロリの染色体DNAから調製することが可能である。

【0012】

このライブラリーを構築するのに使う株の例は、N6株であり、これは1992年6月26日にNCIMB40512としてNCIMBに寄託された。

【0013】

H. ピロリDNAライブラリー中に存在する検索すべきのDNAに対してハイブリダイズさせる為の、プローブの調製に使った二つのオリゴヌクレオチドプライマは、Lcr D/F1bFファミリーの種々の蛋白質の保存領域から選択した。

【0014】

二つのオリゴヌクレオチドプライマOLFbA-1及びOLFbA-2は、プローブとして利用でき、以下の配列

ATG CCA GGA AAG CAA ATG GCG ATT GAT

GCG GAT TTA AAT TCA GGA CTT ATT GAT

GAT AAG GAA GCT AAA AAA CGG CGC GCC

GCT CTA AGC CAA GAA GCG GAT TTT TAT

GGT GCG ATG GAT GGC GCG TCT AAA TTT

を有する130塩基対の断片を増幅させることが可能である。

【0015】

上記した高厳密度の条件は以下のとおりである：ハイブリダイゼーションは42℃で、0.1% SDSを含んだ2X SSC緩衝液中の50%のホルムアミド(1X SSCは、0.15M NaClに15mMのクエン酸ナトリウムを加えたものでpHは7.0)の存在下で行った。洗浄は68℃で行い、例としては2X SSCプラス0.1% SDSを使って1時間の間に2回行った。

【0016】

本発明に関しての特に興味深いヌクレオチド配列は、図3、4に記載のヌクレオチド配列、または高厳密度において上記した配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列に対応した*f1bA* 遺伝子の配列である。

【 0 0 1 7 】

本発明の別の態様によると、本出願の主題である該ヌクレオチド配列は、図 3、4 に記載のヌクレオチド配列であって、図 3、4 に示したアミノ酸配列を有するタンパク質、または H. ピロリの鞭毛タンパク質の生合成に関して上記配列と同じ調節特性をもったアミノ酸配列を有するタンパク質をコードすることで特徴付けられる。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、ヌクレオチド配列であって、該配列は前述の定義に対応し、更に、f l b A 遺伝子がもはや宿主細胞内で発現せず、または宿主細胞内での f l b A 遺伝子の発現が H. ピロリの鞭毛の生合成を可能としないように、また適切な場合には、H. ピロリのフックタンパク質の合成ができないように、欠失、置換または挿入によって修飾されているヌクレオチド配列に関する。

10

【 0 0 1 9 】

本発明のヌクレオチド配列に対する修飾は、不可逆であって、特に、この配列がこのようにして修飾されたヌクレオチド配列で形質転換した細菌内に存在する、f l b A 遺伝子と組み換えを起こした時に、不可逆であるものでなくてはならない。この組み換えは例として、二重交差型である。好ましくはヌクレオチド配列の該修飾は、(この修飾配列によって、与えられた H. ピロリ株内のそれに対応した正常な f l b A 遺伝子の断片を置換した後に)隣り合う遺伝子群の機能に関して、実質的な修飾を起こさせるべきではない。

【 0 0 2 0 】

本発明の範囲に更に含まれるものとしては、上記した基準に合致した f l b A 遺伝子のフラグメントを構成するヌクレオチド配列がある。例としては、本発明の主題である断片は少なくとも 6 ヌクレオチド、好ましくは、100 ヌクレオチドではないにしろ、少なくとも 50 ヌクレオチドのフラグメントからなる。

20

【 0 0 2 1 】

このような断片が選択される理由は、例えばその f l b A 遺伝子の特異的な特徴のため、もしくは Lcr D / F l b F ファミリの蛋白質をコードしたいいくつかの遺伝子の保存領域に属するためである。

【 0 0 2 2 】

別の態様において本発明はまた、遺伝子中に存在する制限部位を境界として持つ f l b A 遺伝子断片に向けられている。これらの部位のうちいくつかを例として、図 2 で定義する。

30

【 0 0 2 3 】

本発明に記載の別の断片は、f l b A 遺伝子のどこかの領域に由来し、好ましくは制限部位を含むか、または制限部位を含むことができる、少なくとも 1000 塩基対の断片である。

【 0 0 2 4 】

本発明における他のヌクレオチド配列は例として、上記した様なヌクレオチド配列を含み、該配列はマーカー、例えば抗生物質に対する耐性遺伝子、または 1994 年 5 月 20 日に出願の FR 9 4 0 6 2 0 2 に記載された様な重金属に対する耐性遺伝子を含むカセットの挿入によって修飾されていることを特徴とする組み換え核酸がある。

40

【 0 0 2 5 】

それゆえに、カナマイシンに対する抵抗性用のカセットを挿入することが可能である。この状況においては、種々の技術を利用することが可能であり、参考文献として特に、Labigne A. ら (J. of Bacteriology, 170, 1988, 1704-1708) と、Labigne A. らの論文 (Res. Microbiol. 1992, 143, 15-26) を参照されたい。

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、前述で定義したヌクレオチド配列由来の特異的なオリゴヌクレオチドであって、以下の配列

O L F l b - 1: A T G C C T C G A G G T C G A A A A G C A A G A T G

O L F l b - 2: G A A A T C T T C A T A C T G G C A G C T C C A G T C

50

O L F 1 b - 7 : C G G G A T C C G T G G T T A C T A A T G G T T C T A C

O L F 1 b - 8 : C G G G A T C C T C A T G G C C T C T T C A G A G A C C

のうちどれか一つを有することで特徴付けられる特異的なヌクレオチド配列に関するものである。

【 0 0 2 7 】

別の態様において本発明は、前述のように定義された様なヌクレオチド配列によってコードされることを特徴とする、H. ピロリの F 1 b A 蛋白質のアミノ酸配列に関するものである。

【 0 0 2 8 】

H. ピロリの F 1 b A 蛋白質の特異的なアミノ酸配列は図 3、4 に記載されている。

10

【 0 0 2 9 】

それゆえに本発明の範囲内において、f 1 b A 遺伝子及びこの遺伝子により発現される蛋白質は、特にワクチン接種において利用する免疫学的組成物もしくは組成物にとって興味深い。

【 0 0 3 0 】

本発明はまた、ヘリコバクター・ピロリ菌株であって、塩基またはヌクレオチド断片の置換、付加および/または欠失によって、H. ピロリの鞭毛タンパク質の生合成の調節に関与する、上記の f 1 b A 遺伝子のヌクレオチド配列に生じた突然変異によってもたらされる、非鞭毛フェノタイプを有することを特徴とする菌株に向けられたものである。

【 0 0 3 1 】

f 1 b A 遺伝子の関するこの修飾は、非鞭毛フェノタイプの株を得ることを可能とし、すなわち該株は F 1 a A 蛋白質も F 1 a B 蛋白質も発現しなくなり、更に好ましくは鞘蛋白質も発現しなくなる。

20

【 0 0 3 2 】

この菌株に関する一つの態様において、得られた該株は更に H. ピロリのフック蛋白質を欠損している。

【 0 0 3 3 】

好ましくは、上記した基準に見合う菌株であって、N 6 株から得られたものであり、1992年6月26日に、NCIMB 受付番号第 40512 号で NCIMB に寄託されたものであることを特徴とする。

30

【 0 0 3 4 】

例として本発明は、H. ピロリの組み換え非鞭毛株であって、N 6 f 1 b A - と命名され、1995年6月30日に、NCIMB 受付番号第 40747 号で NCIMB に寄託された H. ピロリの非鞭毛株に関する。

【 0 0 3 5 】

このような H. ピロリの非鞭毛株は、血清学における利用と、その結果として試験管内での H. ピロリの感染の検出にとって特に興味深い。有益には、これらの株は組み換え型である。

【 0 0 3 6 】

特にこれらの株は、H. ピロリによる感染を特異的且つ感度の良い方法で検出するのに有利である。言い換えれば、本発明は有益なことに、例えばサルモネラ (Salmonella) またはカンピロバクタ (Campylobacter) 等の菌株による「偽陽性」の結果を避けながら、H. ピロリによる感染を特異的に検出せしめる。

40

【 0 0 3 7 】

このように定義された、非鞭毛型の H. ピロリ株が仮に、たとえばワクチン接種組成物の調製に使われる用に、他の適用が考えられるならば、組み換え体の非鞭毛菌株であって、例えば弱められたウレアーゼを産生するか、或いはもはやウレアーゼを産生しないように更に突然変異されており、この突然変異は、例えば ure A 遺伝子、ure B 遺伝子、ure C 遺伝子、ure D 遺伝子、ure E 遺伝子、ure F 遺伝子、ure G 遺伝子、ure H 遺伝子、および ure I 遺伝子の中から選択される一以上のヌクレオチドの突然

50

変異からなることを特徴とする、第二の修飾もしくは変異を有する菌株を調製することは興味深い。ウレアーゼの構造遺伝子群である、*ure A*、*ure B*、*ure C*、*ure D* は、論文に発表されている (Labigne ら、1991、J.of Bacteriol. 173: 1920 - 1931)。その他の遺伝子群は特許出願 EP 0610322 に記載されている。

【0038】

本発明の菌株はそのまま、もしくは抽出液として利用でき、更に本発明は特に、以前記載された株から得た細菌の全抽出物に関するものである。

【0039】

そのようなバクテリア抽出物は、*n*-オクチルグルコシドで抽出することができる。この場合に使う調製技術は、Lelwala-Guruge J. (Scan. J. Infectt.Dis. 1992、24: 457-465) によって記述されたものである。

【0040】

別のバクテリア抽出物も記述された技術により、PBS(Bazailou M.ら、Clin.Diagn. Lab. Immuno., 1994, 1: 310-317による方法)もしくはグリシン(Aguirre P.M., Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., 1992, 11: 634-639による方法)を使った抽出により得ることができる。

【0041】

本願の範囲において本発明は、患者由来の生物学的液体のサンプル(特に血清サンプル)における *H.ピロリ* による感染をインビトロで検出するための組成物であって、活性成分として本発明の菌株または、上記のバクテリア抽出物を含有したものに關する。

【0042】

用いる生物学的サンプルはどのようなタイプのものであってもよく、また特に、どのようなタイプの生物学的液体サンプルでもよく、例としては血清、唾液、尿があげられる。

【0043】

同様にして検出に用いる方法は、免疫学的な反応を含む、どのようなタイプのものでよく特に抗原/抗体タイプのものがよい。例としてはウェスタンブロットやELISAなどの技術を使った使用があげられる。

本発明はまた、患者由来の生物学的液体のサンプル(特に血清サンプル)における *H.ピロリ* による感染をインビトロで検出するための方法であって、前記被検サンプルを、本発明の菌株、または上記のバクテリア抽出物と接触させる工程と、前記菌株と、前記被検サンプル中に存在し且つ *H.ピロリ* に向けられる抗体との間の免疫反応を検出する工程とを具備する方法に關する。

【0044】

例としては、生物学的サンプルにおける *H.ピロリ* による感染のインビトロでの検出は、

天然の、もしくは組み換え体の蛋白質、非鞭毛株、またはバクテリア抽出物、特に *NOG* (*n*-オクチルグルコシド)を使った *N6f1bA* 株の抽出物(例としては、抽出物の量は $3\ \mu\text{g/ml}$ 、抗原の量は $2\ \mu\text{g/ml}$)などの検出に使う抗原でプレートを覆う工程と、ネガティブ及びポジティブのコントロールの範囲で使い(ポジティブコントロールは異なる希釈度で用いられる)、100分の1に希釈された患者の血清を平行して試験する(供せられる容量は、 $100\ \mu\text{l}$)工程と、インキュベーションの工程が例として、 37°C 、1時間で行われ、その後の洗浄を連続的に幾度か行い、次にインキュベーション(例としては 37°C で1時間)をモノクローナル接合体(conjugate)(ペルオキシダーゼでラベルしたヒト *IgG* タイプ)と行い、該接合体が異なる希釈度で用いられ(例としては抗原の場合は $1/32$, 000 で、菌抽出物の場合は $1/64$, 000)、供せられる容量が $100\ \mu\text{l}$ である工程と、モノクローナル接合体とのインキュベーション後にいくつかの異なる洗浄を行い(例えば例4)、酵素反応を「OPDと基質」を使い、30分間遮光して行わせることを満たすことで実行できる。次に酵素反応は、硫酸を加えて終了させて、光学濃度である *OD* を $492\ \text{nm}/620\ \text{nm}$ で読む。

【0045】

本発明は更に、H. ピロリに対する抗体を得るための免疫原組成物であって、活性成分として、本発明の菌株、または上記のバクテリア抽出物を含有することを特徴とする免疫原組成物に向けられている。

【0046】

本発明の一つの特異的な態様において、H. ピロリに対する抗体を得るための免疫原組成物は、FlbA蛋白質由来のアミノ酸配列を含んでいることを特徴とする。

【0047】

本発明の範囲に更に含まれるものとしては、H. ピロリによる感染に対して防御する抗体を得るためのワクチン接種組成物であって、活性成分として本発明の菌株または、上記のバクテリア抽出物を含有することを特徴とする組成物がある。

10

【0048】

H. ピロリによる感染に対して防御する抗体を得るための別のワクチン接種組成物は、活性成分としてウレアーゼタイプの抗原、特にureA、ureB、ureC、またはureD遺伝子によってコードされ、上記に定義したアミノ酸を有する蛋白質を有することを特徴とする。

【0049】

本発明は上記したアミノ酸配列に向けられるモノクローナル抗体またはポリクローナル血清に関する。この抗体は、それ自体は知られた方法によって得られ、特に、動物を選択した抗原で免疫し、次に抗体を合成し、合成された抗体を回収し、その中からH. ピロリを特異的に認識するものを選択するか、または前もって免疫しておいた動物の脾臓細胞をミエロマ細胞と融合させてハイブリドマを調製し、次にこのハイブリドマを培養して、選択したH. ピロリ抗原に対しての特異的認識をもとに選択したモノクローナル抗体を得ることにより得られる。

20

【0050】

本発明の他のモノクローナル抗体、またはポリクローナル血清は、上記したように非鞭毛性H. ピロリに向けられている。

【0051】

本発明は更に、生物学的サンプルにおけるH. ピロリによる感染をインビトロで検出するための組成物であって、活性成分として、本発明の非鞭毛性のフェノタイプのH. ピロリに対して得られるモノクローナル抗体、またはポリクローナル血清を含有する組成物に関する。

30

【0052】

本発明はまた、薬物の活性成分として、本発明によるアミノ酸配列をコードしたヌクレオチド配列であって、動物またはヒトで免疫学的反応を誘導することができるヌクレオチド配列に関する。薬物としてヌクレオチド配列を使用する技術は、Donneyら(1995; Nature Medic. 1(6), pp 583-587)に記載されている。

【0053】

例I

f1bA遺伝子の同定及び非鞭毛株の調製

細菌の移動度の発現を制御する機能を担うことが知られている蛋白質の中で興味のあるものは、最近同定されたLcrD/FlbFファミリに属する蛋白質であり、その中にはイェルシニア属の細菌のLcrD蛋白質(6)、サルモネラのInvA蛋白質(2)、シゲラのMxiA(1)、カウロバクター クレセンタスのFlbF(7)、及びカンピロバクター ジェジュニのLfbA(4)がある。LcrD、InvA、及びMxiA蛋白質は、該蛋白質を発現する細菌の病原性に関わる蛋白質の制御及び/または分泌に関わり、一方カウロバクター クレセンタスのFlbF蛋白質、及びカンピロバクター ジェジュニのFlbAは鞭毛の生合成の制御に関わり、それゆえに移動度に関わる。現在までに知られたLcrD/FlbAファミリの相同体は、特にこの蛋白質のN末端部分が非常によく保存された領域を有しており、それゆえにこの2つの保存領域(イェルシニアのLcrD蛋白質の151から156番目のアミノ酸であるMPGKQM、及びLcrDの189から19

40

50

5番目のアミノ酸であるMDGAMKF)を使って2つの縮退したオリゴヌクレオチド(LOLF1bA-1及びOLF1bA-2、表1)を限定することが可能であったが、該ヌクレオチドは、ヘリコバクター・ピロリの染色体DNA上で行う遺伝子増幅におけるヌクレオチドプライマとして合成されて使用される。このようにして、130塩基対(bp)の断片を増幅することが可能であり、そのヌクレオチド配列の決定により、該断片がLcrD/F1bFファミリーの蛋白質に非常に相同である蛋白質の一部をコードしていることが証明された。この増大された断片は次に、放射性のラベルがなされH.ピロリのコスミドベクタのスクリーニングに使われた。

【0054】

この断片は図3、4に示した配列の575から707の間のヌクレオチドに対応した配列である。

【0055】

ゲノムライブラリのコスミドのうちの一つは、H.ピロリのLcrD/F1bF相同体をコードしているものとして同定され、Sau3Aによる部分消化を行って、2から5(キロ塩基対)の大きさをもつ挿入断片を含む、ベクタpILL570中のコスミドのミニライブラリ(200サブクローン)を構築した。ベクタpILL570はLabinge A.らの論文(パスツール研究所/Elsevier Paris 1992. Res. Microbiol, 1992, 143, 15-26)に記載されている。このベクタの制限地図は、図1に示してある。上記の200クローンを130塩基対のプロンプにハイブリダイズすると、プラスミドpSUS39およびpSUS207をもつクローンが陽性を示した。これら二つの組み換えプラスミドの線形制限地図は、図2に示してあり、これらのクローンの挿入部がそれぞれ重なり合った配列をゆすることを示した。これらの二つの挿入部のヌクレオチド配列を決定して、これら導入部にはf1bA遺伝子があるまは含まれないことを明かにした。カンピロバクタ ジェジュニのF1bA遺伝子に対する相同体であるために、H.ピロリのf1bAと命名される当該遺伝子は、2196塩基対のオープンリーディングフレームに対応し、80.1キログルトンの計算上の分子量をもつ蛋白質をコードしている。f1bAのヌクレオチド配列及びF1bAのアミノ酸配列を図3、4に示してある。プロモータ及びターミネータに特徴のコンセンサス配列は、該オープンリーディングフレームの上流及び下流には検出されていない。

【0056】

F1bA蛋白質は、共に移動度に関わるカンピロバクタ ジェジュニのF1bA蛋白質及びカウロバクタ クレセントアスのF1bF蛋白質と類似点を呈しているが(それぞれ51.7%、40.4%)、この類似の割合は、移動度に関わらないLcrD/F1bF蛋白質ファミリーとの比較ではより低く、イェルシニアのLcrDとは32.8%の相同性、シゲラのMxiAとは30.5%の相同性、そしてサルモネラのInvAとは29.3%の相同性である。これらの蛋白質の、H.ピロリのF1bAに対するマルチプル整列(multiple alignment)を図5、6に示してある。LcrD/F1bFファミリーの相同体で最も保存された領域は蛋白質のN末端部分に位置している。

【0057】

移動度に関わる蛋白質(F1bA及びF1bF)の系統学的進化、及び病原性に関わる蛋白質の発現及び/または分泌の制御に関わる蛋白質の系統学的進化は、系統樹を使って示してある(図7)。二つの別個の分岐が見られる: H.ピロリのF1bAが、鞭毛の生合成に関わる制御蛋白質に対応する分岐に属することは、はっきりとしている。

【0058】

F1bA蛋白質の合成を欠損している、H.ピロリのアイソジェニック変異体の構築と特徴づけ

プラスミドpSUS39の1600塩基対の断片を、それぞれの5'末端にBamHI制限部を有するオリゴヌクレオチドOLF1bA-1及びOLF1bA-7を使って増幅した(表)。この断片の中央部には、ユニークなHindIII制限部位があり、この断片をpUC19の誘導体であってそのマルチプルクローニング部位のHindIII部位を取

10

20

30

40

50

り除いた、pSUS33へクローニングした。pSUS33を得るために、プラスミドpUC19をHindIIIで消化し、その結果得られる粘着末端をクレノー酵素及びT4DNAポリメラーゼで処理して平滑末端にし、その結果の断片をT4DNAポリメラーゼで再連結して、pSUS33を得るために大腸菌DH5へ挿入した。上記の1600塩基対の断片をpSUS33へ挿入して得た組み換えプラスミドをpSUS40と命名し、HindIIIで線状化し、その末端を平滑にして、プラスミドpILL600 (LabingeA.ら1988、J.Bact. 170, 1704-1708)由来のSmaIカナマイシンカセットをこのユニークな部位へクローニングして、プラスミドpSUS42を得た。プラスミドpSUS42を次に、電気穿孔法によりH.ピロリのN6株へ導入した。電気穿孔法は、Ferrero R.L.ら (Journal of Bacteriology, July, 1992, pp4212-4217, Vol174, No13) が記載の方法に添って行った。次にカナマイシン(25 µg/ml)を含んだ選択培地で選択した形質転換体に関して、遺伝型及び表現型の特徴づけを行った。図8は変異体作成にあたって従った手順を示している。遺伝子増幅及びサザンハイブリダイゼーションによるこれらの変異体の遺伝型分析により、カナマイシン抵抗性形質転換体のゲノムがflbA遺伝子の真ん中に、該抵抗性遺伝子を含んでいることと、それゆえに二重交差による、野生型のflbA遺伝子の不活型flbA-Kmへの対立遺伝子置換が、pSUS33ベクタのヌクレオチド配列の喪失を伴って起きたことが示された。H.ピロリのflbA変異体の表現型分析により、該変異体は移動度を有しないこと、更に電子顕微鏡による分析により、鞭毛要素の完全な欠失及び鞭毛の鞘の欠失があることを示した。H.ピロリの鞭毛全体の蛋白質に向けられた抗体を使ったイミュノプロット実験(ウェスタンプロット)(図9)は、鞭毛のサブユニットであるFlaA及びFlaBに対応したペプチドのバンドが欠失していることと、また同様に最近O'Tooleと共同研究者(5)によってフック蛋白質(もしくは固定蛋白質)または鞭毛と同定された蛋白質(5)で、見かけ分子量が90キロダルトンのポリペプチドに対応したバンドも欠失していることを示した。

10

20

【0059】

全体としてみると、これらの結果はH.ピロリのFlbA蛋白質は鞭毛の構造全体の合成に必須であり、この蛋白質をコードした遺伝子の不活化は、該構造の構成要素の輸送の阻害ではなくて、鞭毛形成にくわわるいかなる構造の合成をも完全に停止する結果となることを示唆している。

【0060】

30

【表1】

本研究で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド	位置	鎖	ヌクレオチド配列
OLFibA-1	AS 151-156(LcrD)	+	ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG
OLFibA-2	AS 189-195 (LcrD)	-	GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC
OLFibA-7	515-534	+	CGGGATCCGTGGTTACTAATGGTTCTAC
OLFibA-8	2092-2111	-	CGGGATCCCTCATGGCCTCTTCAGAGACC

40

例II

調べたH.ピロリの血清学モデル

1) HspAma1E: 47.5kDa (HspA=13kDa)の組み換え蛋白質保存されていた血清の、母集団Iと呼ばれるものにおいて41%の感受性、96%の特異性が得られた。

【0061】

2) N6flbA-: ヘリコバクター・ピロリ(non-flagellated)の非鞭毛株3種類の抽出法を行った(n-オクチルグルコシド、PBS、グリシン)。さしあたり、n-オクチルグルコシドによる抽出が最もよいことがわかった。

50

【 0 0 6 2 】

3) - N 6 : 野生型株に対応している。抽出はn-オクチルグルコシドで行った。

【 0 0 6 3 】

血清の第二の母集団も使った(母集団 I I)。この母集団は、臨床的、内視鏡的、組織学的、細菌学的、及び解剖病理学的(anatomopathological)見地からよく記録された数百の血清からなっている。本調査において異なるモデル系の出来栄えを調べるために使ったのが、この母集団 I Iであった。5つの異なる母集団を試験した。

【 0 0 6 4 】

試験した5つの血清は、

300の通常血清(FNTS)

WHITTAKER血清学で陽性であった18の血清(CBMS)

母集団 I I血清と名付けられた92の、よく記録された血清

細菌学的、解剖病理学的(anatomopathological)見地からよく記録され、また母集団 I と名付けられた、87の血清

以下の交差反応を示す23の血清

抗レジオネラ(Legionella)陽性の10の血清

抗クラミジア(Chlamydia)陽性の10の血清

抗カンピロバクタ(Campylobacter)陽性の3つの血清

文献で効果が認められている2つの競合するキットをパラレルに使って試験した。

【 0 0 6 5 】

2つの市販のキット

Cobas Core (ROCHE)

Pylori Stat (WHITTAKER)

結果

通常血清(FNTS)(図10から14、表2、3)

以下のモデルを通して得た300の血清

Hsp A male

N6 flBA

N6

疫学的な調査によると、フランスでは20から25%の血清陽性率(sero-prevalences)となっている。300人の血液提供者の血清の分布を調べ、CBMSライブラリを使って以前に定義された域値(WHITTAKER血清学)を確認する為に異なる域値に対する陽性の支配度を計算した。

【 0 0 6 6 】

この研究により、同じ血清陽性率を使って異なる試験を比較することができる。

【 0 0 6 7 】

最初の43の血清は、以下のモデルを通して得た

Cobas Core (Roche)

Pylori Stat (WHITTAKER)

JLF血清学として知られる血清学(数種類の水溶性バクテリア抽出物に基づくELISA試験)

結果は任意の単位に基づいて、異なる域値に対して表してある;陽性の結果は1、陰性の結果は0と表す。

【 0 0 6 8 】

異なる試験によって、これら43の血清を比較して、以下のことが判明する:非鞭毛株であるN6 flBA-及びCobas Core試験(Roche)では、20%のオーダーに匹敵する血清陽性率となる。

【 0 0 6 9 】

HspAでは、非常に低い血清陽性率(7%)となり、これは引き続く結果の観点からは、感受性の欠失を示唆している。

10

20

30

40

50

【表 3】

43FNSTS血清と以下のものとの比較

番号	HspA		C50+H		C30+H		C.Core		P.Stat	PBS		N6f1bA				JLF血清学		No			
	150	1	0	0	0	0	1	1		0.35	100	00	60	100	00	100	00	0.30	100	00	
22	1	0	0	0	0	0	1	0	0.43	13	0	0	40	0	0	0	0.05	21	0		
23	0	0	0	0	0	0	25	1	0.49	265	1	1	296	1	1	1	0.37	>928	1		
24	9	0	1	1	1	125	0	0.65	3390	1	1	3100	1	1	1	1.47	>928	1			
25	0	0	0	0	0	0	0	0.20	34	0	0	20	0	0	0	0.01	51	0			
26	0	0	0	0	0	2	0	0.29	97	0	1	60	0	0	0	0.04	105	1			
27	0	0	1	1	1	10	1	0.33	265	1	1	239	1	1	1	0.07	359	1			
28	0	0	1	1	1	7	0	0.21	26	0	0	14	0	0	0	0.05	27	0			
29	3	0	0	0	0	6	0	0.20	3	0	0	2	0	0	0	0.01	0	0			
30	1	0	0	0	0	2	0	0.23	3	0	0	3	0	0	0	0.01	4	0			
31	0	0	0	0	0	1	0	0.21	0	0	0	1	0	0	0	0.03	0	0			
32	0	0	0	0	0	2	0	0.31	24	0	0	15	0	0	0	0.05	30	0			
33	0	0	0	0	0	1	0	0.23	14	0	0	8	0	0	0	0.02	0	0			
34	0	0	0	0	0	3	0	0.23	0	0	0	1	0	0	0	0.00	2	0			
35	1293	1	1	1	1	170	1	0.84	463	1	1	3103	1	1	1	0.96	>928	1			
36	0	0	0	0	0	4	0	0.36	42	0	0	32	0	0	0	0.04	60	0			
37	0	0	0	0	0	5	0	0.22	110	1	1	109	1	1	1	0.02	227	1			
38	13	0	0	0	0	4	0	0.47	77	0	0	68	0	0	1	0.07	100	1			
39	1	0	0	0	0	4	0	0.34	23	0	0	13	0	0	0	0.05	34	0			
40	0	0	0	0	0	2	0	0.19	5	0	0	6	0	0	0	0.02	4	0			
41	0	0	0	0	0	0	0	0.24	46	0	0	23	0	0	0	0.05	66	0			
42	0	0	0	0	0	170	1	0.59	3388	1	1	3104	1	1	1	1.47	>928	1			
43	0	0	1	1	1	3	0	0.19	7	0	0	5	0	0	0	0.04	0	0			
mb de + % de +	1	6	14%	7	18%	8	19%	12	29%	8	10%	9	21%	9	21%	10	23%	9	21%	11	20%

10

20

30

40

WHITTAKER血清学で陽性の血清(CBMS)(表4)

Pylori Stat試験(Whittaker)で陽性であった血清はわずか3つであった。この3つの血清は、他の試験では確認できなかった。

【0073】

この結果は特異性の欠如によるものであると思われる。もし、現在の市場で最も良いCobas Core試験(Roche)を参照するならば、我々の異なるモデルをCobas Coreに対して比較することが可能である。

【0074】

非鞭毛N6f1bA-株はCobas Coreと完全に一致する。

50

【0075】

Cobas Coreで陰性であった上記の3つの血清は、N6flbA-でも陰性であった。

【0076】

Cobas Coreで陽性であった15の血清は、N6flbA-でも陽性であった。

【0077】

野生型N6株は非鞭毛株と同じ結果となった。

【0078】

9つのCobas Core血清がHspAで陰性であるので、HspAもまた感受性がない。

10

【0079】

Cobas Coreで陰性である上記の3つの血清は、HspAでも陰性である。

【0080】

【表4】

WHITTAKER血清学(Pylori Stat)で陽性の19CBMS血清

血清番号	DO	HspA	150	C. Core	8	N6flbA-					N6	
						PBS	80	NOG	60	GLY	NOG	100
1	1.8	0	D	33	1	130	1	289	1	494	830	1
2	2.41	607	1	>80	1	471	1	3257	1	6587	>928	1
3	2.9	675	1	30	1	472	1	3263	1	1183	>928	1
4	1.4	146	D	42	1	156	1	407	1	825	556	1
5	1	179	1	44	1	59	0	81	1	317	276	1
6	2.6	193	1	>80	1	472	1	3260	1	1054	>928	1
A	0.7	19	D	4	D	13	D	8	D	33	12	D
B	2.6	5	D	>80	1	471	1	3255	1	6600	>928	1
C	3.1	1352	1	>80	1	470	1	3246	1	6582	>928	1
D	1.3	3	D	18	1	121	1	506	1	448	>928	1
E	0.6	7	D	1	D	23	D	45	D	150	0	D
F	2.1	0	D	15	1	139	1	3258	1	260	>928	1
G	0.2	0	D	8	D	3	D	4	D	28	0	D
H	1.4	25	D	18	1	127	1	176	1	143	159	1
I	2.3	960	1	>80	1							
J	1.9	5	D	38	1	91	1	117	1	57	101	1
K	1.38	4	D	52	1	88	1	182	1	167	>928	1
L	2.98	855	1	>80	1	471	1	586	1	943	>928	1
M	2.86	0	D	51	1	471	1	3256	1	1200	>928	1

20

30

40

母集団IIの血清

92の血清を選択し、3つのグループへ分類した：

34：消化不良患者、内視鏡または組織学での潰瘍との診断（十二指腸、胃）、培養及び/または解剖病理学によりヘリコバクター・ピロリが存在すること、迅速な尿素試験も

50

実行、このグループは H p + / U + と命名。

【 0 0 8 1 】

27：消化不良患者、内視鏡または組織学での潰瘍との差動的診断（十二指腸、胃）、培養及び/または解剖病理学によりヘリコバクター・ピロリが存在すること、迅速な尿素試験も実行、このグループは H p + / U - と命名。

【 0 0 8 2 】

31：消化不良のまたは消化不良でない患者、内視鏡及び組織学では正常な胃十二指腸、培養及び/または解剖病理学によりヘリコバクター・ピロリが存在しないこと、迅速な尿素試験も実行、このグループは H p - と命名。

臨床、内視鏡、組織学、細菌学、及び解剖病理学な知見を、それぞれの患者に対して示した。

10

【 0 0 8 3 】

この良く記録された集団により、感受性及び特異性の基準の定義がなされる。

【 0 0 8 4 】

H p A：母集団 I に見られるように、実質的な感受性の欠如がいぜんとして見られる。

【 0 0 8 5 】

感受性は 59% で特異性は 100% である。

【 0 0 8 6 】

N 6 f l b A : n - オクチルグルコシド抽出物に対して 100% の感受性が確認でき、特異性は 90% である。

20

【 0 0 8 7 】

この結果は、R o c h e の C o b a s C o r e 試験の結果で得られたもの（感受性が 98% で特異性が 94% ）と匹敵する。

【 0 0 8 8 】

N 6：母集団 I I において、野生型株は非鞭毛株に完全に匹敵する。

【 0 0 8 9 】

陰性の 31 の血清は野生型に対しては陽性である。鞭毛による交差反応は、母集団 I I に関しては全く見られなかった。

【 0 0 9 0 】

【表 5】

母集団Ⅱの血清 Hp+/U+患者34人

番号	日付	年齢	性別	臨床	Endos.	UD/UG	Histo-A	HP		Ure	HP
								Giemsa	Cult		
9	19/07/91	33	1	消化不良	UD	1	G210	0	1	0	1
11	12/03/92	32	1	消化不良	UD	1	G313	1	1	1	1
13	19/05/92	26	1	消化不良	UG	1	G311	1	0	0	1
15	23/07/93	27	1	消化不良	UD	1	G222	1	1	1	1
16	10/12/91	37	1	消化不良	UD	1	G410	1	0	0	1
17	18/05/94	40	1	穿孔	UD	1	G230	1	0	1	1
18	16/12/92	22	1	消化不良	UD	1	G222	1	0	1	1
26	07/09/94	39	1	消化不良	UD	1	G220	1	1	1	1
27	05/02/92	47	0	消化不良	UD	1	G212	1	1	1	1
28	27/04/94	42	1	GDR-A.GU	GDN	1	G320	1	1	1	1
29	24/06/94	57	1	AU えん下障害	GDN-B	1	G222	0	1	0	1
33	04/11/91	60	1	消化不良	UD	1	G231	1	1	1	1
38	03/09/90	46	1	消化不良	UD	1	G331F	1	0	0	1
39	02/03/94	79	1	AEG 消化不良	UG	1	G212	1	1	1	1
43	13/01/94	67	0	AEG 消化不良	UD	1	G111	1	0	1	1
44	01/07/94	60	0	消化不良	UD	1	G321	1	1	1	1

10

20

【表 6】

母集団 II の血清 Hp+ / U+ 患者 34 人

番 号	HspA	非線毛		変異体 N6rBA-		N6 NOG	VS=100	C.COR	P STAT	VS=0.19/0.27		VS=0.30
		PBS VS=150	VS=80	NOG VS=60	VS=8					JLF		
9	6	0	168	1	305	>928	1	30	0.288	1	0.91	1
11	51	0	>484	1	1000	>928	1	55	0.359	1	1.03	1
13	1530	1	>484	1	1452	>928	1	>160	0.377	1	0.67	1
15	42	0	137	1	229	406	1	40	0.223	1	0.26	0
16	2135	1	>484	1	870	>928	1	80	0.399	1	1.14	1
17	14	0	>484	1	678	>928	1	62	0.302	1	1.12	1
18	16	0	>484	1	1124	>928	1	>160	0.373	1	0.74	1
26	11	0	82	1	64	403	1	10	0.209	1	0.74	1
27	12	0	58	0	104	398	1	18	0.245	1	0.23	0
28	7970	1	>484	1	2344	>928	1	>160	0.477	1	1.73	1
29	805	1	>484	1	2360	>928	1	>160	0.463	1	1.51	1
33	663	1	>484	1	2720	>928	1	>160	0.505	1	0.97	1
38	4680	1	>484	1	2676	>928	1	>160	0.419	1	1.34	1
39	422	1	240	1	436	>928	1	14	0.253	1	0.88	1
43	108	0	76	0	75	379	1	14	0.204	1	0.52	1
44	9	0	>484	1	2876	>928	1	>160	0.485	1	1.69	1

10

20

30

【表 7】

母集団Ⅱの血清 Hp+/U+患者34人

番号	日付	年齢	性別	臨床	Endos.	UD/UG	Histo-A	HP			
								Giemsa	Cult	Ure	HP
48	02/02/95	69	1	消化不良	UD	1	G120	1	1	0	1
52	26/10/94	45	1	AU消化不良	GDN	1	G221F	1	1	1	1
56	05/09/94	72	0	消化不良	UD	1	G233	1	0	1	1
60	19/06/91	40	1	消化不良	UG	1	G333	0	1	0	1
64	07/11/94	37	1	urt.消化不良	UD	1	G323	1	1	1	1
65	15/12/94	41	1	穿孔	UD	1	G211F	1	1	1	1
70	29/04/93	47	1	消化不良-メレナ	UD	1	G110	1	0	0	1
71	29/03/93	39	1	消化不良	UD	1	G221	1	0	1	1
76	09/06/93	36	1	消化不良	UD	1	G121*	1	0	0	1
78	12/05/93	49	0	AU消化不良	GDN	1	G220	1	0	1	1
81	08/06/94	29	1	ADU消化不良	GDN	1	G110	1	1	1	1
84	22/11/93	24	1	穿孔	UD	1	G223	1	0	1	1
88	17/06/93	36	1	消化不良	UD	1	G121	1	0	0	1
89	22/06/94	23	1	消化不良	UD	1	G222	1	1	1	1
90	25/05/94	41	1	消化不良	UD	1	G321	1	1	1	1
92	02/06/93	67	1	Ph消化不良-K	UG	1	G123	1	1	1	1
99	18/02/92	36	0	消化不良	UD	1	G321	1	0	1	1
100	13/05/92	38	1	消化不良	UD	1	G221	0	1	1	1

10

20

【表 8】

母集団Ⅱの血清 Hp+/U+患者34人

番 号	HspA	VS=150	非糞毛 変異体 N6/BA-		N6 NOO	VS=60	C.COR	VS=B	P.STAT	VS=0.19/0.27	JLF	VS=0.30		
			PBS	VS=80									NOO	VS=100
48	39	0	123	1	304	1	>928	1	100	1	0.274	1	1.50	1
52	6	0	164	1	368	1	595	1	16	1	0.257	1	0.22	0
56	1620	1	>464	1	1704	1	>928	1	65	1	0.389	1	1.21	1
60	3690	1	>464	1	3192	1	>928	1	>160	1	0.524	1	6.26	1
64	7	0	173	1	980	1	>928	1	40	1	0.362	1	0.39	1
65	3	0	100	1	310	1	>928	1	86	1	0.318	1	0.33	1
70	8	0	164	1	384	1	804	1	23	1	0.256	1	1.13	1
71	107	0	97	1	121	1	202	1	23	1	0.183	0	0.14	0
76	313	1	140	1	728	1	785	1	37	1	0.298	1	0.25	0
78	1335	1	>464	1	958	1	>928	1	>160	1	0.394	1	1.16	1
81	111	0	96	1	175	1	>820	1	36	1	0.262	1	0.72	1
84	74	0	>464	1	842	1	>928	1	68	1	0.316	1	0.80	1
88	250	1	>464	1	440	1	>928	1	43	1	0.200	1	0.89	1
89	18	0	175	1	712	1	>928	1	117	1	0.344	1	0.51	1
90	80	0	384	1	612	1	>828	1	97	1	0.349	1	0.78	1
92	21	0	230	1	177	1	125	1	61	1	0.168	0	0.17	0
99	21	0	294	1	370	1	>928	1	29	1	0.362	1	1.56	1
100	20	0	415	1	444	1	358	1	67	1	0.369	1	0.31	1

10

20

30

【表9】

母集団Ⅱ
Hp+ / U+患者27人

番号	日付	年齢	性別	臨床	Endos.	UD/UG	Histo-A	HP			HP
								Gleensa	Cult	Ure	
1	14/04/93	24	0	urt.消化不良	GDN	0	G221	1	1	1	1
2	29/06/94	45	1	An.消化不良	GDN	0	G311	1	1	0	1
3	08/04/92	44	1	消化不良	GDN	0	G313	1	1	1	1
4	01/12/94	28	0	消化不良	GDN	0	G321F	1	1	0	1
6	22/08/94	28	0	消化不良	GDN	0	G220	0	1	0	1
7	21/04/93	58	0	urt.消化不良	GDN	0	G320	1	1	1	1
12	04/11/92	48	0	消化不良-GDR	GDN	0	G210	1	1	1	1
23	07/12/94	28	0	消化不良	GDN	0	G312	1	1	0	1
24	21/04/93	39	1	urt.GDR	GDN	0	G321	1	0	1	1
25	09/11/94	78	0	An.消化不良	GDN	0	G121	1	1	0	1
31	21/07/93	53	1	消化不良	GDN	0	G333	1	0	0	1
32	09/12/92	53	0	alt.消化不良	GDN	0	G211	1	0	1	1
37	07/12/92	59	1	消化不良	erosions G	0	G211	1	0	0	1
42	26/12/94	29	1	消化不良	GDN	0	G321F	0	1	0	1
45	08/06/94	46	0	urt.消化不良	GDN	0	G310	1	1	1	1
49	12/05/93	43	1	urt.消化不良	GDN	0	G220	1	0	1	1
55	24/05/93	48	0	貧血性(?)消化不良	GDN	0	G333	1	0	1	1
58	19/12/94	56	0	An.消化不良	GDN	0	G310	1	0	0	1
59	06/05/93	20	0	GDR	GDN	0	G111	1	0	1	1
63	06/01/92	51	1	消化不良	GDN	0	G322	0	1	0	1
67	01/06/94	37	0	嘔吐	GDN	0	G222	0	1	1	1
69	23/09/92	29	0	urt.消化不良	GDN	0	G222	1	0	1	1
73	27/06/94	63	1	消化不良	GDN	0	G212	1	1	1	1
74	20/04/94	62	0	消化不良	GDN	0	G222	1	1	1	1
77	04/11/92	71	1	貧血性(?)消化不良	GDN	0	G211	1	0	0	1
85	21/11/94	51	1	GDR	GDN	0	G121F	1	1	1	1
93	07/12/94	42	0	GDR	GDN	0	G321	1	1	1	1

10

20

30

【表 10】

母集団 II
Hp+/U+患者27人

患者 ID	HspA		非難毛 変異体 N68DA-				H5		C.COR	VS=8	P.SIAT	VS=0.19/0.27	JLF	VS=0.30
	VS=150		PBS	VS=80	NOG	VS=60	NOG	VS=100						
1	218	1	>464	1	384	1	>928	1	42	1	0.293	1	0.43	1
2	32	G	>464	1	1896	1	>928	1	>160	1	0.377	1	0.50	1
3	63	G	394	1	450	1	480	1	22	1	0.198	1	0.05	0
4	28	G	>464	1	1788	1	>928	1	40	1	0.291	1	0.59	1
6	14	G	204	1	354	1	324	1	16	1	0.233	1	0.18	0
7	770	1	>464	1	2088	1	>928	1	77	1	0.323	1	0.42	1
12	341	1	251	1	908	1	>928	1	101	1	0.343	1	0.71	1
23	1550	1	460	1	452	1	>928	1	47	1	0.33	1	0.25	1
24	30	G	94	1	149	1	>928	1	37	1	0.237	1	0.15	0
25	3250	1	>464	1	1384	1	>928	1	>160	1	0.41	1	0.75	1
31	3820	1	>464	1	3480	1	>928	1	>160	1	0.493	1	0.89	1
32	51	G	455	1	956	1	>928	1	45	1	0.326	1	0.28	1
37	71	G	345	1	455	1	>928	1	72	1	0.3	1	0.92	1
42	423	1	>464	1	1692	1	>928	1	124	1	0.404	1	0.37	1
45	247	1	232	1	431	1	>928	1	104	1	0.325	1	1.07	1
49	37	G	47	G	51	1	251	1	28	1	0.179	0	0.25	0
55	2275	1	>464	1	786	1	>928	1	100	1	0.374	1	0.42	1
58	1615	1	>464	1	752	1	>928	1	91	1	0.323	1	0.33	1
59	0	G	63	G	134	1	254	1	8	G	0.183	0	0.44	1
63	22	G	>464	1	1028	1	>928	1	68	1	0.332	1	0.46	1
67	72	G	134	1	184	1	188	1	17	1	0.203	1	0.23	0
69	175	1	>464	1	461	1	696	1	35	1	0.278	1	0.35	1
73	812	1	158	1	309	1	>928	1	149	1	0.317	1	1.28	1
74	4850	1	319	1	2156	1	>928	1	>160	1	0.372	1	1.01	1
77	13	G	142	1	240	1	400	1	20	1	0.236	1	0.29	0
85	2	G	167	1	326	1	128	1	28	1	0.247	1	0.18	0
93	59	G	175	1	357	1	>928	1	123	1	0.281	1	1.54	1

10

20

30

【表 1 1】

母集団Ⅱ
Hp-患者31人

番号	日付	年齢	性別	臨床	Endos.	UD/UG	Histo-A	HP			
								Glensa	Cult	Ure	HP
8	29/07/92	44	1	GDR/urt.消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
14	02/06/93	34	1	urt.消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
19	17/06/93	43	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
20	23/11/94	72	1	コルチコイド	GDN	0	normale	0	0	0	0
21	15/03/93	65	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
22	16/11/94	39	1	urt.消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
30	25/01/95	39	0	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
34	13/01/94	74	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
35	14/11/94	88	0	GDR	GDN	0	normale	0	0	0	0
38	31/01/94	43	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
41	21/04/93	37	1	urt.消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
46	07/10/92	39	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
47	27/01/93	40	0	urt.消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
50	09/07/92	19	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
51	10/02/93	28	1	urt.消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
54	24/02/93	51	1	GDR	GDN	0	normale	0	0	0	0
57	06/09/91	60	1	GDR	GDN	0	normale	0	0	0	0
61	11/01/95	42	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
62	21/07/93	37	0	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
68	07/01/92	61	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
72	21/10/92	41	1	GDR	GDN	0	normale	0	0	0	0
79	07/04/93	48	0	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
80	03/02/93	41	0	urt.消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
82	24/11/93	42	1	GDR	GDN	0	normale	0	0	0	0
86	11/01/95	35	0	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
87	30/03/94	23	0	GDR	GDN	0	normale	0	0	0	0
91	13/07/94	17	0	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
94	13/02/92	35	0	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
95	21/03/90	33	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0
97	05/01/95	42	1	GDR	GDN	0	normale	0	0	0	0
98	22/05/92	54	1	消化不良	GDN	0	normale	0	0	0	0

10

20

30

40

【表 1 2】

母集団Ⅱ
Hp-患者31人

患者 番号	HspA VS=150		非特毛 変異体 N60BA-				N6		G.COR VS=20	P.STAT VS=0.19/0.27	JLF VS=0.30			
	PBS VS=80	NOG VS=60	NOG VS=100	NOG VS=60	NOG VS=100	NOG VS=100								
2	23	0	34	0	12	0	41	0	9	1	0.158	0	0.01	0
14	8	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0.1	0	0.03	0
19	16	0	15	0	5	0	31	0	8	0	0.173	0	0.13	0
20	7	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0.168	0	0.01	0
21	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.107	0	0.06	0
22	2	0	64	0	40	0	88	0	0	0	0.152	0	0.04	0
30	10	0	28	0	12	0	34	0	4	0	0.095	0	0.02	0
34	29	0	38	0	15	0	56	0	6	0	0.176	0	0.00	0
35	28	0	35	0	14	0	62	0	3	0	0.135	0	0.00	0
38	9	0	4	0	2	0	22	0	4	0	0.113	0	0.08	0
41	15	0	122	1	106	1	219	1	9	1	0.17	0	0.03	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0.133	0	0.00	0
47	7	0	114	1	99	1	199	1	6	0	0.153	0	0.03	0
50	4	0	11	0	5	0	13	0	0	0	0.13	0	0.01	0
51	14	0	7	0	2	0	7	0	4	0	0.119	0	0.00	0
54	8	0	24	0	11	0	29	0	3	0	0.143	0	0.00	0
57	32	0	61	0	66	1	436	1	8	0	0.227	1	0.38	1
61	9	0	10	0	2	0	11	0	0	0	0.082	0	0.00	0
62	4	0	8	0	3	0	8	0	1	0	0.115	0	0.01	0
68	6	0	70	0	33	0	89	0	6	0	0.17	0	0.07	0
72	13	0	1	0	3	0	3	0	5	0	0.189	0	0.09	0
79	3	0	12	0	21	0	32	0	4	0	0.124	0	0.03	0
80	3	0	11	0	8	0	27	0	7	0	0.2	1	0.06	0
82	3	0	25	0	13	0	25	0	4	0	0.139	0	0.00	0
86	2	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0.125	0	0.00	0
87	22	0	3	0	4	0	11	0	3	0	0.125	0	0.01	0
91	12	0	40	0	18	0	41	0	2	0	0.156	0	0.01	0
94	21	0	22	0	15	0	38	0	1	0	0.274	1	0.07	0
95	19	0	43	0	22	0	54	0	1	0	0.268	0	0.00	0
97	3	0	3	0	4	0	11	0	0	0	0.248	0	0.02	0
98	2	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0.122	0	0.00	0

10

20

30

【表 1 3】

母集団 II

Hp (培養及び/又は解剖病理学)の存在と潰瘍との関係

			感受性	特異性	
Hp ⁺ 及び DU/GU: すなわち 34Hp ⁺ /U ⁺ との関係	HspA malE	VS=100	44.1% (15/34)	100% (31/31)	
		VS=50	52.9% (18/34)	100% (31/31)	
		VS=20	64.7% (22/34)	73.8% (25/31)	
	N6flbA-	NOG	VS=100	94.1% (32/34)	96.8% (30/31)
			VS=80	94.1% (32/34)	93.6% (29/31)
			VS=60	100% (34/34)	90.3% (28/31)
		PBS	VS=100	82.4% (28/34)	93.6% (29/31)
			VS=80	94.1% (32/34)	93.6% (29/31)
			VS=60	97.1% (33/34)	83.9% (26/31)
	JLF 血清学		VS=0.30	82.4%(28/34)	96.8% (30/31)
	Pylori Stat			94.1% (32/34)	90.3% (28/31)
Cobas Core			100% (34/34)	93.6% (29/31)	

10

20

【表 1 4】

母集団 II

Hp (培養及び/又は解剖病理学)の存在との関係

			感受性	特異性	
Hp ⁺ (34 DU/GU, 27 GNU): すなわち 61Hp ⁺ , 31Hp ⁻ との関係	HspA malE	VS=100	45.9% (28/61)	100% (31/31)	
		VS=50	59% (36/61)	100% (31/31)	
		VS=20	80.7% (45/61)	73.8% (25/31)	
	N6flbA-	NOG	VS=100	95.1% (58/61)	96.8% (30/31)
			VS=80	95.1% (58/61)	93.6% (29/31)
			VS=60	100% (61/61)	90.3% (28/31)
		PBS	VS=100	85.3% (52/61)	93.6% (29/31)
			VS=80	93.4% (57/61)	93.6% (29/31)
			VS=60	96.7% (59/61)	83.9% (26/31)
	JLF 血清学		VS=0.30	78.7%(48/61)	96.8% (30/31)
	Pylori Stat			93.4% (57/61)	90.3% (28/31)
Cobas Core			93.3%(60/61)*	93.6% (29/31)	

* serum = VS

30

40

50

【表 15】

母集団 II

Hp(培養及び/又は解剖病理学)の存在と潰瘍の非存在との関係

			感受性	特異性	
Hp ⁺ 及びGNU: すなわち 27Hp ⁺ /U との関係	HspA malE	VS=100	48.2% (13/27)	100% (31/31)	
		VS=50	66.7% (18/27)	100% (31/31)	
		VS=20	85.2% (23/27)	73.8% (25/31)	
	NSflbA-	NOG	VS=100	96.3% (26/27)	96.8% (30/31)
			VS=80	93.6% (26/27)	93.6% (29/31)
			VS=60	100% (27/27)	90.3% (28/31)
		PBS	VS=100	88.9% (24/27)	93.6% (29/31)
			VS=80	92.6% (25/27)	93.6% (29/31)
			VS=60	96.3% (26/27)	83.9% (26/31)
	JLF 血清学		VS=0.30	74.1%(20/27)	96.8% (30/31)
Py:ori Stat			92.6% (25/27)	90.3% (28/31)	
Cobas Core			96.3%(26/27)	93.6% (29/31)	

10

20

血清学の位置づけ

血清学を2つのレベルで位置づけた。

【0091】

高感度血清学：心窩部痛をうたえる若年患者に存在する細菌を検出するためのもの。

【0092】

この血清学で陰性となった場合は、患者は内視鏡の検査または生検を受けることはなく、他の痛みの原因となるものを調べる。

【0093】

危険特異的血清学：これはヘリコバクター・ピロリによる感染での危険性、すなわち潰瘍、癌、または胃リンパ腫(MALTリンパ腫)を示すこと含む。

【0094】

疑いのある危険性に特異的な分子を使うか

または危険特異的な域値を使う(域値は危険のある患者では、危険のない患者よりも高い)。

【0095】

この特異的な血清学を使って、一般の母集団をスクリーニングにかけ、それによってヘリコバクター・ピロリに関わり、また症状がないために検出できない様な癌及びリンパ腫を検出する(痛みを訴えている患者のみが胃腸科にかかる。)

感受性の問題に対する応答は良い。

【0096】

30

40

【表 16】

3つの患者集団におけるA. U. の平均値及び標準偏差値

		Hp- (n=31)	Hp+/U- (n=27)	Hp+/U+ (n=34)
Hsp A	平均値	<u>10.61</u>	<u>775.72</u>	<u>770.32</u>
	標準偏差値	8.81	1312.56	1666.52
N6PBA- (NOG)	平均値	<u>17.16</u>	<u>895.50</u>	<u>944.85</u>
	標準偏差値	26.69	818.57	915.27

【表 17】

胃の組織学におけるA. U. の平均値及び標準偏差値

強度	萎縮				炎症				活性		
	Hsp A	NOG	P.Stat		Cag A	Hsp A	NOG	P.Stat	Hsp A	NOG	P.Stat
0									$\frac{977}{2052}$	$\frac{712}{800}$	$\frac{0.31}{0.08}$
1	$\frac{410}{1004}$	$\frac{412}{390}$	$\frac{0.25}{0.07}$		$\frac{93}{122}$	$\frac{437}{639}$	$\frac{577}{466}$	$\frac{0.30}{0.08}$	$\frac{479}{1117}$	$\frac{938}{876}$	$\frac{0.32}{0.09}$
2	$\frac{423}{964}$	$\frac{730}{707}$	$\frac{0.30}{0.08}$		$\frac{188}{200}$	$\frac{639}{1655}$	$\frac{878}{780}$	$\frac{0.31}{0.09}$	$\frac{733}{1382}$	$\frac{798}{753}$	$\frac{0.31}{0.07}$
3	$\frac{1321}{2059}$	$\frac{1403}{1012}$	$\frac{0.35}{0.08}$		$\frac{554}{607}$	$\frac{2409}{1742}$	$\frac{2173}{1132}$	$\frac{0.43}{0.08}$	$\frac{1302}{1629}$	$\frac{1402}{1174}$	$\frac{0.36}{0.12}$
	平均値 (標準偏差)										

10

20

30

【表 18】

61 Hp+

分布	萎縮	炎症	活性
0	0	0	15
1	10	21	25
2	28	33	12
3	22	7	9
4	1	0	0

40

50

胃炎の強度と抗体レベルとの間の相関関係

胃炎は3つの変数で定義される：

萎縮（Gの後の最初の数字で表現）；強度は1から4で表す。

【0097】

中性好性多核細胞及び単球の侵入に対応する全体の炎症（Gの後の二番目の数字で表現）；強度は1から3で表す。

【0098】

中性好性多核細胞の数に対応した活性（Gの後の三番目の数字で表現）；強度は0から3までで表す。る胞状のものはFと表現する。

【0099】

通常は、以下の相関関係が見られる：

活性はヘリコバクター・ピロリと非常に良く相関する。

【0100】

炎症はヘリコバクター・ピロリと相関する。

【0101】

それぞれのグループで見られる力価の平均は、故に上記の3つの変数とその強度とを使って計算される。

【0102】

結果の評価：

t 試験を使って2つのデータの平均が顕著に異なるか、または5%の危険度でそうでないかを証明することが可能となる。

【0103】

t 試験が基づく仮定が、変数の等価性であり、F 試験（F i s h e r 試験）で示されている。

【0104】

変数の中には等しくないものがあるので、よってそれぞれを全ての平均値と比較することはできない。

【0105】

可能であるならば平均を比較することで、異なるグループの間の差が顕著であるかそうでないかを示すことができる。

【0106】

顕著な差：H s p A に対する「2」及び「3」、と「炎症」グループのN O G との間の平均。

【0107】

顕著でない差：活性に関しては、異なる強度レベル間での顕著な差は見られなかった：

H s p A：0と2、0と3、1と2、1と3、及び2と3の間には顕著な差はない

N P G：0と1、0と2、1と2、1と3、及び2と3の間には顕著な差はない。

しかしながら、力価が胃炎の強度に依存して増大する傾向は見られる：

萎縮に関して：H s p A 及び非鞭毛株のN O G 抽出のは平均値は、レベルが1から2、及び2から3へ移ると、二倍になる。

【0108】

炎症に関して：レベルが2から3になると、平均が二倍になる。

【0109】

それぞれのグループにおける数は、統計的に顕著な差であると結論するには、相対的に少ない（それぞれ30より少ない）。

【0110】

10

20

30

40

【表 19】

胃の組織学におけるA. U. の平均値

強度	for Hp+/U+	萎縮				炎症				活性			
		Hsp A	NOG	P.Stat		Hsp A	NOG	P.Stat		Hsp A	NOG	P.Stat	
0	平均値 (標準偏差)												
1	平均値 (標準偏差)	121 116	326 218	0.25 0.05		438 759	611 451	0.30 0.06		699 1298	1016 1050	0.34 0.10	
2	平均値 (標準偏差)	304 507	793 784	0.32 0.09		586 1020	846 813	0.33 0.09		219 329	827 835	0.32 0.09	
3	平均値 (標準偏差)	2004 2858	1722 1080	0.41 0.07		2133 1989	2194 1006	0.43 0.09		911 1502	1316 1040	0.35 0.12	

10

20

30

【表 20】

34 Hp+/U+ :	分布	萎縮	炎症	活性
	0	0	0	9
	1	7	10	13
	2	17	19	6
	3	9	5	8
	4	1	0	0

40

50

2つのタイプの血清を用いた。

20の血清（10の抗-レジオネラ+、10の抗-クラミジア+）：これら3つの細菌はそれぞれが非常に似た熱ショック蛋白質を有しているため、HspAに対して交差反応することができる

3つの抗-クラミジア陽性抗体：非鞭毛株であるN6f1bAでは消出する、鞭毛株N6との交差反応性を示すため。抗-カンピロバクタ陽性血清を得ることは非常に難しい；これが、わずかに3つの血清しか得られない理由である。

【0111】

HspAは、10の抗-レジオネラ陽性抗体とも、10の抗-クラミジア陽性抗体とも、交差反応性を全く示さない。

【0112】

これらの血清のうちいくつかは、鞭毛株及び非鞭毛株の両方について、抗-ヘリコバクター・ピロリ抗体に関する陽性力価を有しているが、これらの血清の臨床的意義はわかっていない。

【0113】

【表 2 1】

交差反応性のある血清

Legionella +	力価	N6	VS=100	N6flBA-	VS=60	HspA	VS=100
A	P2 P3 =256	0	0	4	0	47	0
B	P4 P5 =64	>928	1	641	1	42	0
C	P2 P3 =128	212	1	87	1	68	0
D	P2 P3 =64	70	0	19	0	15	0
E	P1=256 /P2=512	>928	1	239	1	258	1
F	P2 P3 P4 P5 =128	322	1	121	1	41	0
G	P1=512 /P6=1024	>928	1	193	1	121	1
H	P4 P5 =64	>928	1	479	1	18	0
I	P2=128 /P3=64	33	0	17	0	25	0
J	P2=256 /P3=128	16	0	8	0	32	0

10

20

Chlamydia +	力価	N6	VS=100	N6flBA-	VS=60	HspA	VS=100
A	256	6	0	8	0	25	0
B	256	7	0	9	0	34	0
C	64	636	1	290	1	39	0
D	256	367	1	225	1	19	0
E	32	>928	1	855	1	19	0
F	128	>928	1	783	1	27	0
G	32	115	1	55	0	15	0
H Twar	16	19	0	10	0	14	0
I	32	>928	1	592	1	>928	1
J Twar	64	610	1	280	1	44	0

30

Campylobacter +		N6	VS=100	N6flBA-	VS=60	HspA	VS=100
A		35	0	28	0	17	0
B		13	0	4	0	27	0
C		50	0	68	1	89	0

40

結論

H s p A m a l E

感受性が欠損しているために、この分子自体を利用することはできないが、他の分子と結合しているならば興味深いであろう。

【 0 1 1 4 】

しかしながら、異なる細菌間で実質的に保存された熱ショック蛋白質による交差反応の危険性をはらんでいる。

【 0 1 1 5 】

50

N 6 f 1 b A -

この非鞭毛変異体は非常に興味深いことがわかってきている；母集団 I I で判明した感受性及び特異性は、非常に好ましい効果を示している。

【 0 1 1 6 】

N 6

さしあたっては、鞭毛株が興味深い。しかしながら鞭毛に関連した交差反応性に関してはわずかしが調べられていないが、これはカンピロバクタ血清学に関して良く考証されている血清を得ることが難しいためである。

【 0 1 1 7 】

J L F 試験

ヘリコバクター・ピロリの幾つかの株についての水溶性 (P B S) 抽出に基づいた血清学的試験を開発した。

【 0 1 1 8 】

非鞭毛株変異体の N O G 抽出を使って母集団 I の血清を試験した。

【 0 1 1 9 】

細菌学的及び解剖病理学的見地からのみ考証された 8 7 の血清を、非鞭毛細菌抽出を使って試験した。

【 0 1 2 0 】

培養が陽性であるか、または解剖病理学的試験及び迅速な尿素試験で陽性であれば、血清は陽性である。

【 0 1 2 1 】

3 つの試験 (培養、解剖病理学、及び迅速な尿素試験) で陰性であれば血清は陰性である。

【 0 1 2 2 】

感受性は 9 0 . 3 % (2 8 / 3 1) で、特異性は 7 1 . 4 % (4 0 / 5 6) であった。

【 0 1 2 3 】

はじめの試験であやまって陽性とされた 1 6 の血清のうち、9 つは J L F 血清学または J L F ウェスタンブロット、もしくはその両方により陽性であった。

【 0 1 2 4 】

はじめの試験であやまって陰性とされた 3 つの血清全ては、J L F 血清学または J L F ウェスタンブロットで陰性であり、一つは両方で陰性であった。

【 0 1 2 5 】

10

20

30

【表 2 2】

非鞭毛株の n-オクチルグルコシド抽出物で試験した
母集団 I の87の血清

血清番号	HspA	VS 150	JLF 血清学	VS 35	WB JLF	評価	WB Bioptim	Hp	N6fBA-	
									NOG	VS=60
572	35	0	21	0	2p	-	+	0	128	1
573	11	0	46	1	3p	-	-	1	229	1
574	11	0	3	0	1p	-	-	0	9	0
575	0	0	63	1	3p	+	-	0	166	1
576	121	0	19	0	3p	+	+	0	246	1
577	0	0	1	0	0	-	-	0	3	0
578	6	0	4	0	0	-	-	0	24	0
579	2630	1	114	1	3p	+	-	1	>464	1
580	721	1	125	1	4p	+	-	1	>464	1
581	0	0	2	0	0	-	-	0	2	0
582	0	0	2	0	1p	-	-	0	6	0
583	0	0	3	0	2p	-	-	0	27	0
584	36	0	1	0	2p	-	-	0	12	0
585	2114	1	125	1	4p	+	+	1	>464	1
587	19	0	2	0	2p	-	-	0	11	0
588	1388	1	58	1	3p	+	-	1	>464	1
589	323	1	3	0	4p	+	+	0	>464	1
591	4	0	4	0	2p	-	-	0	9	0
592	6	0	0	0	2p	-	+	0	9	0
593	44	0	28	0	3p	+	-	1	3	0
595	76	0	78	1	4p	+	+	1	>464	1
597	0	0	0	0	0	-	-	0	9	0
599	49	0	125	1	4p	+	+	1	>464	1
600	0	0	3	0	0	-	-	0	3	0
601	6	0	1	0	0	-	-	0	6	0
602	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
605	11	0	0	0	0	-	-	0	10	0
608	5	0	5	0	0	-	-	0	9	0
609	308	1	8	0	0	-	-	0	13	0
610	2370	1	111	1	4p	-	-	1	>464	1
612	477	1	34	0	4p	+	+	0	422	1
613	46	0	0	0	0	-	-	0	3	0
616	741	1	73	1	4p	+	+	1	>464	1
617	1725	1	125	1	4p	+	-	1	286	1
618	426	1	101	1	4p	+	+	1	>464	1
621	0	0	82	1	4p	+	+	1	>464	1
622	15	0	6	0	2p	-	-	0	25	0
624	411	1	110	1	4p	+	+	0	>464	1
626	46	0	11	0	1p	-	-	1	53	0
627	0	0	48	1	1p	-	-	1	27	0
629	6	0	2	0	0	-	-	0	2	0
631	31	0	21	0	2p	-	-	0	92	1
632	0	0	3	0	0	-	-	0	22	0
633	285	1	104	1	3p	+	+	1	>464	1
634	48	0	69	1	4p	+	-	1	>464	1
636	523	1	33	0	2p	-	-	1	71	1

10

20

30

40

【表 2 3】

非鞭毛株の n-オクチルグルコシド抽出物で試験した
母集団 I の 87 の血清

血清番号	HspA	VS 150	JLF		WB JLF	評価	WB Bioprim	Hp	N6f1BA-	
			血清学	VS 35					NOG	VS=60
638	922	1	36	1	3p	+	+	1	>464	1
641	0	0	6	0	1p	-	-	0	8	0
645	29	0	8	0	1p	-	-	0	29	0
647	0	0	2	0	1p	-	-	0	4	0
649	5	0	5	0	0	-	-	0	12	0
650	6	0	0	0	0	-	-	0	3	0
654	0	0	1	0	0	-	-	0	4	0
655	49	0	59	1	2p	-	-	1	229	1
656	0	0	3	0	0	-	-	0	8	0
657	363	1	105	1	4p	+	+	1	>464	1
658	0	0	8	0	1p	-	-	0	8	0
659	0	0	3	0	0	-	-	0	3	0
662	73	0	3	0	2p	-	-	0	40	0
663	25	0	21	0	2p	-	-	0	103	1
467	86	0	26	0	4p	+	-	0	96	1
468	32	0	68	1	4p	+	+	1	>464	1
469	265	1	118	1	3p	+	+	1	>464	1
470	734	1	77	1	2p	-/+	+	0	>464	1
471	214	1	100	1	4p	+	-	1	>464	1
472	4	0	5	0	0	-	-	0	0	0
473	1023	1	55	1	3p	+	-	1	>464	1
474	12	0	10	0	0	-	-	0	21	0
475	9	0	13	0	0	-	+	0	210	1
476	2611	1	74	1	4p	+	+	1	>464	1
478	0	0	0	0	0	-	-	0	1	0
479	175	1	9	0	4p	+	-	0	348	1
480	0	0	1	0	0	-	-	0	7	0
481	800	1	92	1	3p	+	+	1	425	1
482	0	0	1	0	0	-	-	0	8	0
483	0	0	39	1	3p	+	+	1	>464	1
484	0	0	3	0	0	-	-	0	20	0
485	0	0	1	0	0	-	-	0	11	0
486	0	0	2	0	0	-	-	0	6	0
725	0	0	7	0	0	-	-	0	198	1
730	190	1	45	1	1p	-	-	0	372	1
732	0	0	10	0	1p	-	-	0	145	1
735	0	0	30	0	2p	-	-	1	143	1
736	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
737	25	0	102	1	4p	+	-	1	155	1
738	2233	1	125	1	4p	+	-	1	>464	1
739	79	0	33	0	1p	-	+	0	274	1

技法

プレートは以下のものでコートした：

2 µg/ml の H s p A 抗原

3 µg/ml の、N f 1 b A 及び N 6 の N O G 抽出
範囲

5 つの範囲でのネガティブコントロール

ポジティブコントロールは 4 つの希釈度で使用
患者血清

1 / 1 0 0 希釈

容量：1 0 0 µ l

インキュベーション 37 1時間

3回洗浄

モノクローナル接合体 (I g G t o x o)

使用濃度

H s p A に対しては 1 / 3 2 0 0 0

N 6 f 1 b A - に対しては 1 / 6 4 0 0 0

N 6 に対しては 1 / 5 6 0 0 0

容量 1 0 0 μ l

接合体のインキュベーション : 3 7 、 1 時間

4 回の洗浄

O P D + 基質による酵素反応の進行

遮光で 3 0 分間

硫酸による酵素反応終結

4 9 2 nm / 6 2 0 nm での O D 測定

O D の、任意の単位 (A U) への変換

【表 2 4】

母集団 I の血清の記録
42のHp+血清

血清番号	性別	生年月日	解剖病理学		細菌学		Hp	JLF血清学	VS=0.3	NOG	VS=60
			Glemlsa	Histo	Gram	Urea					
952253	1	01/10/60	G, H	G	1	1	1	1	1	>464	1
236174	1	02/05/60	G	G	1	1	1	10.42	1	216	1
974107	2	15/02/32	G (mini)	G	1	1	1	1.39	1	272	1
34812	1	10/12/52	G, B	G	1	1	1	0.82	1	452	1
229712	2	11/08/53	G	G	1	1	1	0.11	0	148	1
46511	1	17/01/70	G	G	1*	0	1	1.26	1	213	1
180334	2	14/01/59	G	U	1	1	1	0.83	1	>464	1
189005	2	23/10/25	U	U	1	1	1	0.87	1	>464	1
49860	1	06/07/64	U	U	1	1	1	2	1	>464	1
168332	1	06/11/60	G	G	1	1	1	0.23	0	394	1
195282	1	11/06/46	G	G	1	0	1	0.91	1	180	1
176859	1	24/04/50	G	G	1	1	1	1.39	1	>464	1
987898	1	13/05/58	G	G	1	1	1	0.69	1	297	1
954498	2	01/12/45	G	G	1	1	1	1.12	1	>464	1
195175	2	01/09/08	G	G	0	0	1	2.7	1	>464	1
156007	2	27/09/56	G, B	G	1	1	1	1.68	1	437	1
18318	1	19/12/63	G, B	G	1	1	1	0.36	1	45	0
215979	2	04/05/19	H, G, B	G	1	1	1	1.2	1	>464	1
25322	2	12/02/16	G	G	1	1	1	2.5	1	>464	1
26555	1	09/11/65	U, H	G	1	1	1	2.4	1	>464	1
193295	1	24/01/16	ant. bu. U	G	1	1	1	2.5	1	>464	1
237220	1	01/06/65	bulb. U	G	1	0	1	0.14	0	328	1

G = 胃炎
H = 裂孔ヘルニア
U = 潰瘍 (DU = 十二指腸潰瘍)
D = 十二指腸炎
B/Bulb. = 尿道球炎
O = 食道炎
(GU = 胃潰瘍)

10

20

30

40

【表 2 5】

母集団 I の血清の記録
42のHp+血清

血清 番号	性別	生年月日	Endos.		解剖病理学		細菌学		Hp	JLF 血清学	VS=0.3	NOG	VS=60
			bulb. U	G, bulb U	Gleimsa	Histo	Gram	Urea Cult.					
237191	1	06/05/42	bulb. U		1	G	1	0	1	1.16	1	>464	1
238683	1	13/09/30	G, bulb U		1	G	1	1	1	1.73	1	>464	1
79163	1	06/07/72	G		1	G	1	1	1	0.46	1	312	1
87951	1	15/04/41	G		1	G	1	1	1	0.7	1	>464	1
93773	1	12/05/43	G		1	G	1	0	1	1.05	1	>464	1
97478	1	04/05/65	G		1	G	1	1	1	0.42	1	>464	1
96436	1	06/11/74	G		1	G	1	1	1	0.84	1	183	1
66502	1	02/10/45	G		1	G	1	1	1	0.78	1	>464	1
42230	2	12/08/58	G		1	G	1	1	1	0.81	1	>464	1
51105	2	12/08/45	G, DU		1	G	1	1	1	1.1	1	>464	1
58631	1	21/08/43	G		1	G	1	1	1	0.8	1	214	1
79105	2	28/01/61	G, DU		1	G	1	1	1	1.25	1	>464	1
.99121	1	28/10/59	G		1	G	1	1	1	0.9	1	449	1
216779	1	08/04/47	G, U		1	G/U	1	1	1	0.25	0	283	1
996070	1	29/01/47	G		1	preatroph. G	1	1	1	0.31	1	121	1
72420	1	15/05/55	G, DU		1	G, DU	1	1	1	1.2	1	>464	1
205110	1	10/06/61	DU		1	U	1	1	1	0.3	0	386	1
62720	1	18/10/56	GU.		1	U	1	1	1	0.68	1	>464	1
67767	2	01/10/44	GDU		1	U	1	1	1	1.2	1	>464	1
205855	1	09/07/38	G, U		1	DU	1	1	1	0.25	0	71	1

G = 胃炎
H = 裂孔ヘルニア
U = 潰瘍 (DU = 十二指腸潰瘍)
D = 十二指腸炎
B/Bulb. = 十二指腸炎 (GU = 胃潰瘍)
O = 尿道炎
食道炎

10

20

30

40

【表 2 6】

母集団 I の血清の記録

55のHp-血清

血清 番号	性別	生年月日	Endos.	解剖病理学		細菌学			Hp	JLF 血清学	VS=0.3	NOG	VS=60
				Giemsa	Histo	Gram	Urée	Cult.					
79476	1	23/06/31	G	0	潰瘍性腺腫	0	0	0	0	0.02	0	6	0
75439	2	14/05/32	G	0	G	0	0	0	0	1.19	1	>464	1
97286	2	03/01/37	G	0	G	0	0	0	0	0.45	1	66	1
68053	1	02/05/48	G	0	G	0	0	0	0	1.02	1	304	1
71300	2	14/10/63	G	0	G	0	0	0	0	0.89	1	>464	1
944990	1	01/10/54	G	0	G	0	0	0	0	0.04	0	4	0
967659	2	28/01/46	G	0	G	0	0	0	0	0.01	0	5	0
985409	2	26/07/20	min. U	0	G	0	0	0	0	0.21	0	69	1
985551	2	18/08/09	G, U, B	0	G	0	0	0	0	0.05	0	14	0
992025	1	22/03/32	G	0	G	0	0	0	0	0.07	0	65	1
998792	2	11/04/44	G	0	G	0	0	0	0	0.08	0	26	0
16479	1	13/07/93	RAS	0	G	1*	0	0	0	0.02	0	0	0
77183	2	24/08/14	G, U	0	G	0	0	0	0	0.03	0	9	0
77566	1	25/01/32	G	0	G	0	0	0	0	0.01	0	22	0
991337	1	24/10/60	G	0	G+過形成	0	0	0	0	0.07	0	26	0
78471	2	15/12/15	G	0	G+intest. metapl.	0	0	0	0	0.07	0	106	1
83356	1	10/07/21	ciact. U	0	min.G	0	0	0	0	0.37	1	>464	1
936515	2	05/06/81	RAS	0	min.G	0	0	0	0	0.02	0	0	0
991386	2	22/01/71	G	0	min.G	1*	0	0	0	0.17	0	3	0
6130	1	05/05/72	G	0	min.G	0	0	0	0	0.06	0	0	0
81415	1	23/08/31	G	0	min.G	0	0	0	0	0.03	0	5	0
82175	1	13/01/49	ciact. U	0	min.G	0	0	0	0	0.03	0	34	0
78652	1	01/08/18	G, U	0	gast. hypotrophy	0	0	0	0	0.04	0	10	0
89819	2	16/02/42	Normal	0	Normal	0	0	0	0	0.88	1	>464	1
942184	2	09/02/67	G	0	Normal	0	0	0	0	0.1	0	52	0
981000	2	10/10/47	G	0	Normal	0	0	0	0	0.06	0	19	0
1613	1	11/01/26	G, B, D	0	Normal	0	0	0	0	0.68	1	195	1

10

20

30

40

【表 27】

母集団 I の血清の記録

55のHp-血清

血清番号	性別	生年月日	Endos.	解剖病理学		細菌学			Hp	JLF 血清学	VS=0.3	NOG	VS=60
				Giemsa	Histo	Gram	Urea	Cult.					
984979	2	23/04/29	GU	0	Normal	0	0	0	0	0	3	0	
58767	2	19/12/93	RAS	0	Normal	0	0	0	0	0.08	0	0	
79861	2	26/07/63	G, O	0	Normal	0	0	0	0	0.06	16	0	
85290	2	26/04/63	RAS	0	Normal	0	0	0	0	0.01	2	0	
91423	1	13/02/39	RAS	0	Normal	0	0	0	0	0.03	0	0	
93252	2	26/08/85	RAS	0	Normal	0	0	0	0	0.09	10	0	
94430	1	06/04/62	RAS	0	Normal	0	0	0	0	0.13	>464	1	
990363	2	03/06/36	G, B	0	Normal +/-	0	0	0	0	0.18	42	0	
87467	1	07/10/50	GDU	0	U	0	0	0	0	0.02	60	0	
239085	1	05/02/45	bulb., GU	0	U	0	0	0	0	0.03	73	1	
3473	1	06/02/46	G, U	1	G	0	0	0	0	1.01	>464	1	
78605	1	14/05/83	bulb. U	1	G	0	0	0	0	0.56	>464	1	
83721	1	21/01/95	G	1	G	0	0	0	0	0.61	245	1	
90169	1	18/04/38	G, B	1	G	0	0	0	0	1.15	>464	1	
91081	2	08/01/45	G, D	1	G	0	0	0	0	1.8	>464	1	
43127	1	24/02/41	G	1	G	0	0	0	0	1.15	>464	1	
928133	2	25/03/71	G	1	G	0	0	0	0	0.03	3	0	
9128	1	08/03/77	G	1	G	0	0	0	0	0.01	0	0	
974895	1	11/05/38	B, G	1	G	0	0	0	0	0.08	2	0	
26697	1	23/08/44	H, O, U	1	G	0	0	0	0	0.21	8	0	
78414	1	06/02/21	G, B, U	1	G	0	0	0	0	0.02	5	0	
78451	1	26/11/45	G	1	G	0	0	0	0	0.02	19	0	
79500	1	01/03/50	Oesoph. U	1	G	0	0	0	0	0.01	3	0	
79880	1	02/01/74	UG, B	1	G	0	0	0	0	0.06	5	0	
416	1	18/02/71	O, G	1	min.G	0	0	0	0	0.03	1	0	
74548	1	25/02/45	GDU	1	U	0	0	0	0	0.38	371	1	
99538	1	02/04/58	bulb. U.	1	U	0	0	0	0	1.08	>464	1	
98953	2	19/12/16	U	1	U	0	0	0	0	0.62	>464	1	

10

20

30

40

【表 2 8】

母集団 I からの集団の記録
 55のHp-血清
 42のHp+血清

	感受性	特異性
JLF 血清学	85.7% (36/42)	70.9% (39/55)
NOG 60	97.6% (41/42)	61.8% (34/55)

10

【表 2 9】

非鞭毛性株の抽出方法

	グリシン抽出	n-オクチル グルコシド抽出	PBS 抽出
回収	PBS	0.01 M PBS	PBS pH 7.4
洗浄	PBS で 2 回 8,000 rpm/12 分	PBS で 2 回 8,000 rpm/12 分	
抽出	0.2M のグリシン-酸 緩衝液 (pH2.2) で 15分間、室温で おだやかに攪拌 100 mg (湿重量) /2.5 mg	1% n-オクチル グルコシド (Sigma Chemical Co.) を含む PBS (pH7.2) で 20分間、室温	1 分間ボルテックス
遠心	11,000 g で 15 分	23,500 g で 20 分	5,000 g で 10 分
中和	NaOH 1M		
透析	PBS (pH7.2) で 24 時間、4°C カットオフ: 10,000	PBS (pH7.2) で 24 時間、4°C カットオフ: 10,000	PBS (pH7.2) で 24 時間、4°C カットオフ: 10,000
保存	濃度の決定、 -20°C で保存	不溶画分の除去、 -20°C で保存	濃度の決定、 -20°C で保存

30

40

【表 30】

異なる非鞭毛性株 N6FLBA- の抽出物のSDS-PAGE

ウェル番号	試料のタイプ	濃度 ug/ml	試料容積/ 緩衝液容積	ロードした容量
1	標準分析マーカー		5 + 5 / 190	10
2	グリシン抽出物	202.9	60 / 60	60
3				
4	n-オクチルグルコシド抽出物	874	51 / 39	60
5				
6	PBS1 抽出物	539.2	60 / 20	60
7				
8	PBS2 抽出物	77.9	60 / 20	60
9				
10	標準分子量マーカー		5 + 5 / 190	10
11	グリシン抽出物の沈殿物	2778.7	20 / 20	20
12				
13	グリコシド抽出物の沈殿物	972.9	40 / 40	60
14				
15	グリシン抽出物(遠心後)	309.3	60 / 20	60
16				
17	HspA Mal E	3000	20 / 20	20
18				
19				
20	カラーマーカー			20

参考文献

1. Andrews, G. P., Maurelli, A. T.: *mxIA* of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens encodes a homolog of the low-calcium-response protein LcrD of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 60: 3287-3295 (1992). 30
2. Galan, J. E., Ginocchio, C., Costeas, P.: Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174: 4338-4349 (1992).
3. Leying, H., Suebaum, S., Geis, G., Haas, R.: Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* 6: 2563-2874 (1993). 40
4. O'Toole, P. W., Kostorzynska, M., Trust, T. J.: Non-mobile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. *Mol. Microbiol.* 14: 691-703 (1994).
5. Plano, G. V., Barve, S. S., Straley, S. C.: LcrD, a membrane-bound regulator of the Ye 50

rsinia pestis low-calcium response. *J. Bacteriol.* 173: 7293-7303(1991).

6. Ramakrishnaan, G., Zhao, J-L., Newton, A.: The cell cycle-regulated gene *flbF* of *Caulobacter crescentus* is homologous to a virulence locus of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 173: 7283-7292(1991).

7. Suerbaum, S., Josenhans, C., Labigne, A.: Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flb* flagellin genes and construction of *H. pylori* *fla*- and *flb*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.*, 175: 3278-3288(1993).

10

【図面の簡単な説明】

【0126】

【図1】プラスミド *pILL570*、およびカナマイシン抵抗性遺伝子カセットを含んだ小型トランスポゾン *Tn3* の制限地図。

【図2】組み換えプラスミド *pSUS39* 及び *pSUS207* の線形制限地図。表示の番号は制限断片の長さに対応している。H: *HindIII*、Bg: *BglII*。星印は、クローニング中に制限部位が修飾されて、対応していた制限酵素で認識されなくなったことを示す。

20

【図3】*H. pylori* の *flbA* のヌクレオチド配列及び、一文字表示による推定のアミノ酸配列。

【図4】*H. pylori* の *flbA* のヌクレオチド配列及び、一文字表示による推定のアミノ酸配列。

【図5】*H. pylori* の *FlbA* 蛋白質と、他の5つの *LcrD/FlbF* ファミリとのマルチプル整列 (multiple alignment)。Cj *FlbA*: カンピロバクタ ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) *FlbA*; Cc *FlbF*: カウロバクタ クレセントゥス (*Caulobacter crescentus*) *FlbF*; Yp *LcsD*: イエルシニア ペスティス (*Yersinia pestis*) *LcrD*; St *InvA*: サルモネラ ティフィムリウム (*Salmonera typhimurium*) *InvA*; Sf *MxiA*: シゲラフレクスネリ (*Shigella flexneri*) *MxiA*。星印は *LcrD/FlbF* ファミリの相同体全てにおいて保存されているアミノ酸の位置を示し、点は相同体6つのうち少なくとも5つにおいて保存されているアミノ酸の位置を示す; 縮退したオリゴヌクレオチドの合成に用いられた、保存アミノ酸配列には下線が引いてある。これらの相同体のN末端領域における保存の度合いにたいして注意すべきであり、これはC末端の疎水性領域の多様性の度合いと対照的である。

30

【図6】*H. pylori* の *FlbA* 蛋白質と、他の5つの *LcrD/FlbF* ファミリとのマルチプル整列 (multiple alignment)。Cj *FlbA*: カンピロバクタ ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) *FlbA*; Cc *FlbF*: カウロバクタ クレセントゥス (*Caulobacter crescentus*) *FlbF*; Yp *LcsD*: イエルシニア ペスティス (*Yersinia pestis*) *LcrD*; St *InvA*: サルモネラ ティフィムリウム (*Salmonera typhimurium*) *InvA*; Sf *MxiA*: シゲラフレクスネリ (*Shigella flexneri*) *MxiA*。星印は *LcrD/FlbF* ファミリの相同体全てにおいて保存されているアミノ酸の位置を示し、点は相同体6つのうち少なくとも5つにおいて保存されているアミノ酸の位置を示す; 縮退したオリゴヌクレオチドの合成に用いられた、保存アミノ酸配列には下線が引いてある。これらの相同体のN末端領域における保存の度合いにたいして注意すべきであり、これはC末端の疎水性領域の多様性の度合いと対照的である。

40

50

【図7】Lcr D/ Flb Fファミリに属する6つの蛋白質の系統樹を描いた図。移動度の発現制御に関わる蛋白質、すなわちH.ピロリのFlb A (Hp Flb A) 及びカンピロバクタ ジェジュニのFlb A (Cj Flb A)、並びにカウロバクタ クレセントゥス(Caulobacter crescentus) のFlb F (Cc Flb F) は、病原性蛋白質(サルモネラのInvA、シゲラのMxiA、及びイエルシニアのLcrD)の分泌に関わる蛋白質とはかけ離れたブランチを形成する。表示の番号は、相対的な進化の距離を表す。

【図8】H.ピロリと同質遺伝子的変異体株N6、すなわちFlb A蛋白質をコードした遺伝子が、カナマイシン抵抗性をコードした遺伝子の挿入によって不活化された変異体を構築する際に従った方法を描いた図。

【図9】H.ピロリから精製した鞭毛に対して特異的なAK 179抗血清(3)を使って行った、N6 flb A-変異体由来の蛋白質の免疫プロット(ウェスタンプロット); 1: N6- flb A変異体、2: fla A/ fla B二重変異体、3: fla B(8)変異体、4: fla A(8)変異体、5: 野生型N6株。

【図10】H.ピロリに対して行った血清学の結果比較。

【図11】H.ピロリに対して行った血清学の結果比較。

【図12】H.ピロリに対して行った血清学の結果比較。

【図13】H.ピロリに対して行った血清学の結果比較。

【図14】H.ピロリに対して行った血清学の結果比較。

【図15】非鞭毛株N6 flb A-を使った抽出: グリシン、PBS、またはNOGを使って行った抽出。いかのデータに基づいて曲線を描いた。

Net Abs	計算したSTD #	濃度	750.0	濃度
差	1	0.0000	0.0020	-0.008
		0.1660	0.0760	0.1721
		0.1400	0.3459	-0.016
		2390	0.6474	0.0176
		1.3336	-0.004	1.3300

係数: P2 = 2.0324, P1 = 2.2753, P0 = 0
平均: -1.0356E-07, 標準偏差: 0.0130

【図16】非鞭毛株N6 flb A-を使った抽出: グリシン、PBS、またはNOGを使って行った抽出。ミニメソッド(BioRad)の蛋白質アッセイ。グリシン: 1/2希釈、グルコシド: 1/10希釈、上清1: 1/4希釈、上清2: 希釈せず。以下のデータに基づいて曲線を描いた。

計算したSTD #	濃度	750.0	濃度	Net Abs	差
	0.0000	-0.003	1.5398	-1.540	2
	25.000	0.0600	21.861	3.1392	3
	50.000	0.1470	51.810	-1.810	4
	.00	0.2750	99.855	0.1454	5
	00	0.5090	199.94	0.0636	

係数: P2 = 144.63, P1 = 314.31, P0 = 2.4815

【図17】非鞭毛株N6 flb A-を使った抽出: グリシン、PBS、またはNOGを使って行った抽出。

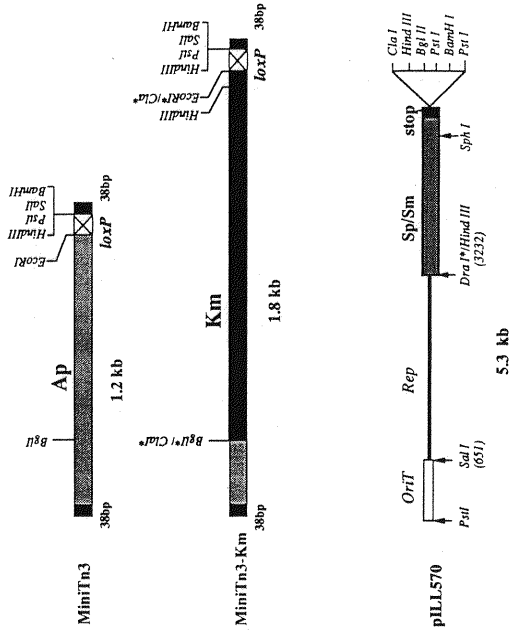
10

20

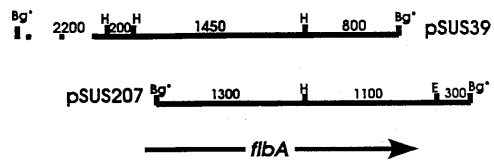
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

```

1 AGC TTT TTT GTG CCA TAC TTT TAA ACT TTA TAT TAT AAT AAG AGA CAA ACA CAC CTA CCA
61 AAA TTA AGG CAT TGA TTT TAG ATT ATG GCA AAC GAA CGC TCC AAA TTA GCT TTT AAA AAG
121 ACT TTC CCT GTC TTT AAA CGC TTC TTT CAA TCC AAA GAC TTA GCC CTT GTG GTC TTT GTG
181 I A I L A I I I V P L P P F V L D F L L
241 ACG ATT TCT ATC GCG CTA TCG GTG TTT ATT TTA ITC GGG CTT TAT ATT GAC AAA CCG
301 ACT GAT TTT AGC GCT TTC CCC ACT TTA TTA CTC ATT GTA ACC TTA TAC CCG TTG GCT TTA
361 AAT GTC GCC ACC ACT AGA ATT ATT TTA ACC CAA GGC TAT AAA GGG CCG AGC GCG GTG AGC
421 ATT ATT ATC ACG GCG TTT GGG GAA TTT AGC GTG AGC GGG AAT TAT GTG ATT GGG GCT ATT
481 ATC TTT AGT ATT TTA GTG CTG GTG AAT TTA TTA GTG GTT ACT AAT GGT TCT ACT AGG GTT
541 ACT GAA GTT AGG GCG CGA TTT GCC CTA GAC GCT ATG CCA GGA AAG CAA ATG GCG ATT GAT
601 GCG GAT TTA AAT TCA GGG CTT ATT GAT GAT AAG GAA GCT AAA AAA CCG GCG GCC CTT CTA
661 AGC CAA GAA GCG GAT TTT TAT GGT GCG ATG GAT GCG GCG TCT AAA TTT GTC AAA GCG GAT
721 GCG ATC GCT TCT ATC ATT ATC ACG CTT ATC AAT AAT AAT GGG GGT TTT TTA GTG GCG GTG
781 TTC CAA AGG GAT ATG AGC TTG AGC TTT AGT GCG AGC ACT TTC ACT ATC TTA ACC ATT GCG
841 GAT GGG CTT GTA GGG CAA ACT CCT GCC TTA ATC ATT GCG ACA CCG AGC GGT ATT GTG GCC
901 ACT GCG ACC ACG CAA AAC GAA GAA GAG GAT TTT GCT TCT AAG CTC ATC ACA CAG CTC ACC
961 AAT AAA AGC AAA ACT TTA GTG ATT GTG GGG GCG ATT TAT TGC TTT TGC ACC ATT OCT GGA
1021 CTC CCT ACC TTT TCT TTA GCG TTT GTA GGG GCT CTC TTT TTA TFC ATC GCA TCG CTG ATT
1081 AGC AGG GAG GCA AAG GCG GTG CTC ACT AAA TGA AAA AAT TAT TTS ACT CAA AAA TFC
1141 GCG TTG GAT TTG AGC GAA AAA CCC CAC AGC TCC AAA ATC AAA CCC CAC GCC CCC ACC CAA
1201 AGG GCT AAA ACC CAA GAA GAG ATT AAA AGA GAA GAA GAA CAA GCC ATT GAT GAA GTG TTA

```

【 図 4 】

```

1261 AAA ATT GAA TTT TTA GAA TTG GCT TTA GCG TAT CAG CTC TAC AGC TTA GCG GAC ATG AAA
1321 CAA GGG GCG GAT TTG TTA GAA AGG ATT AGG GGT ATT AGA AAA AAG ATA GCG AGC GAT TAT
1381 GGT TTT TTG ATG CCT CAA ATT AGG ATT AGG GAT AAT TTA CAA CTC CCC CCA AGC CAT TAT
1441 GAA ATC AAG CTT AAG GCG ATT GTG AAT GGT GAA GCG ATG GTG ATG CCG GAT AAG TTT TTA
1501 GCC ATG AAT ACC GGT TTT GTG AAT AAA GAA ATT GAA GCG ATT CCT ACT AAA GAG CCG GCT
1561 TTT GGA ATG GAC GCT TTA TGG ATT GAA ACT AAA AAT AAA GAA GAA GCC ATC ACT CAA GCG
1621 TAT ACC ATT ATT GAT CCA AGC ACC GCT ATT GCG AGC CAC ACC AGC GAA TTA GTG AAA AAA
1681 TAC GCT GAA GAT TTT ATC ACT AAA GAT GAA GTG AAA TCC CTT TTA GAG CCG TTG GCC AAA
1741/581 GAC TAT CCT ACG ATT GTA GAA GAG AGT AAA AAA ACT CCC ACC GGT GCG ACT CAA TCA GTC
1801 TTG CAA GCG TTG GTG GAT GAA AAA ATC CCC ATT AAA GAG ATG CTC ACT ATT TTA GAA ACG
1861 ATT ACC GAT ATT GCG CCA TTA GTT CAA AAG GAT GTG AAT ACT TTA ACC GAA CAA GTG AGG
1921 GCG AGG CTT TCT ACG GTG ATC ACT AAC GCT TTT AAA TCT GAA GAG GCG CGT TTG AAA TTT
1981 TTA ACC TTT TCT ACC GAT AGC GAA CAA TTT TTG CTT AAT AAA TTG CGA GAA AAT GCG ACT
2041 TCT AAG AGC CTA CTA CTC AAT GTG GCG GAA TTA AAA CTC ATT GAA GCG GTC TCT GAA
2101 GAG GCC ATG AAA GTC TTG CAA AAA GGG ATC GCT CCG GTG ATT TTG ATC GTA GAG CCT AAT
2161 TTA AGA AAA GCG CTT TCT AAT CAA ATG GAG GAG GCT AGG AIT GAT GTA ATC GTG CTA AGC
2221 CAT GCT GAA TTA GAT CTT AAC TCT AAT TTT GAA GCG TTA GCG AGC ATC CAT ATT AAC TTT
2281 TAA GGG ATA AAT AAT TGA TAA AAA AGG AGA ATG ATG CAA GTT TAT CAC CTT TCA CAC ATT
2341 GAT TTA GAC GCG TAT GCA TGC CAG CTT GTT TCA AAA CAA TTT TTT AAA AAT ATC CAA TGC
2401 TAT AAC GCT AAT TAC GGG CGT GAA GTC TCA GCG AGA ATT TAT GAT ATT TTA AAC GCG ATC
2461 GCT CAA TCT AAA GAG AGT GAA TTC CTT ATT TTG ATT AGC GA

```

【 図 5 】

```

1 MANERS- KLAFKKTFVFKRFLQSKDLAVVFIALAIIVPLPPVFLDFFLTSIALS HpFlba
1 MAJMKIVDLVFPPLGLIAPVLKAKSLTVGFLVLCILAIIVPLSPFLDFFLALSIALS CjFlba
1 MADAAAASMPASAKSLDGLMRGEMGLAVGVGIIVLLIIPVAPLDDVLLAISLTS CcFlbF
1 -----MHPDLEWLNRIKERDMLLAVVFMVPLPPLVLDLILAVNMTIS YpLcrD
1 -----MLLSLNSARLAPPELLLVMVMIISMVFPVLPVLDVFLIALNIVLA StInva
1 -----MVMITAMLIPLPTLVDFLIGLNVILA SfmXia

60 VLIIILGLVYKDFSAFPTLLIIVLRYLALAVATTRMILTQKFKSPASVSIITAFG HpFlba
61 VLIIILSIVYKPTLDTLPTLLIILVFRSLNITRMLSSQNGPEAVSEIIAAG CjFlba
61 VLIIIMTALIKKLEPFFSPTVLLVTLFRGLNIASTRLLSHGQEGTGAGAVIEAFG CcFlbF
62 VLIIIMTIVINSPLQSFAPVAVLITLFRALSVSTRMILLQ-----ADAGIIVTFG YpLcrD
49 ILVFMGSPYIDRLSFSPTAVLLITLFRALASISTSRLLIEA-----DAGEIATFG StInva
29 ILVFMGSPYIERILSFSPTVLLITLFRALASISTSRLLIVDADRK-----IITTFG SfmXia
.....

120 EFSVSGNYVIGAIIFSLVLVNLVTVNGSTRVTEVARFALDAMPKQMAIDADLNSGL HpFlba
121 EFPVGNMVGIVGIVCILLVNFVMTKSGRIAEVAARFTLDAMPKQMAIDADLNSGL CjFlba
121 HLMQGNFVIGVIFVILIVVNFVMTKSGRIAEVAARFTLDAMPKQMAIDADLNSGL CcFlbF
107 NFPVGNLIVGIVFVILIIIVVNFVMTKSGRIAEVAARFTLDAMPKQMSIDQMRAGV YpLcrD
104 QFVIGDSLAVGFVFSIVTVVQFVITKSERVAARFSLDMPKQMSIDADLKAGI StInva
84 QFVIGDSLAVGFVFSIVTVVQFVITKSERVAARFSLDMPKQMSIDADLKAGI SfmXia
.....

180 IDDEKAKKRAALSQADFYGAMDGASKFVKGDAIASIITLNIIGGFLVGFQDMSL HpFlba
181 IDEQTARARQEVIAEAFNYGAMDGSSKFIKGDVAGIITLNIIGGFLVGFQDMAL CjFlba
181 ISQDEAKIRKLEQESTFFGAMDGASKFVKGDAIAGLIITAINIIGGIIIGVQHKMPF CcFlbF
167 IDVNEARERRATIEKESQMGSMGAMKVFKGDAIAGLIITVFNIGGVITIGVQKGLAA YpLcrD
164 IDADAAERRRSVLERSQVYSGFDGAMKFIKGDVAGIITVFNIGGVISVGMTRHGMDL StInva
144 IDAAGAKERRSILERSQVYSGFDGAMKFIKGDVAGIITVFNIGGVISVGMTRHGMDL SfmXia
.....

240 SFSASTTILITDGLVQIPALIIATRGIVATRTTQNEEDFASKLITQLTNKSCTLV HpFlba
241 SDAASTYITLITDGLVQIPALIIATRGIVATRTTQNEEDFASKLITQLTNKSCTLV CjFlba
241 GDAASTYITLITDGLVQIPALIIATRGIVATRTTQNEEDFASKLITQLTNKSCTLV CcFlbF
227 AEALQVYSILVGDGMSQVFPAMALIIATAGIIVTRVSSSDLSGDIKQVVAQPKAML YpLcrD
224 SSALSTYITLITDGLVQIPALIIATISAGIIVTRVNGDDTN-MGRNIMSQIFGNFPVLV StInva
204 SGALSTYITLITDGLVQIPALIIATISAGIIVTRVNGDDTN-MGRNIMSQIFGNFPVLV SfmXia
.....

300 IVGAIYC- FCTIPGLPTFSLAVGALFPIAMLIISREGKDGLLTKLNYLSQKFGDLSE HpFlba
301 VGFVLEI- FALVPGILPTSLGFMALVFLSGLYITKQVKEGKI-----DITVKSQKPSAA CjFlba
301 SASSG- I-IALIPGMIFPFAAMALA-----AGALAY CcFlbF
287 IGGVLLLFGILPGPTFVTLTALVGGGMYLKRQKRSNDANQDLQSLTSGSGAPA YpLcrD
283 VTALITISMGTLPGFPLVFPVLLSVLVSFLVYKFEAKRSAAKPKTSKGEQPLSIEKE StInva
263 VTSALALAGMLPGFPFVFFLIVAVTLTALFYKVVKEKSLSESDSSGYTG----- SfmXia
.....

359 KPSSKIKPHAPTRAKTQEEIKREEQADIVLKIIEFLELALGYLQSLADMKQGGDLL HpFlba
355 VASQSGAGGTAAPAKKSEEEIKKEEKINDILKVEILELGLYGLIKLAE---NELT CjFlba
331 KRQVQAKKPKALDPALEAAAPSEPEEPIASLAIDDVKIELGGLLTLINDLGRKLT CcFlbF
347 ARTKAKTSGANKRGLGEOEAFAMTVFLIIDVDS-----SQOEALANALN YpLcrD
343 GSSLGLIGDLQVSTY-----TVPELLLVKSRREDELEKA StInva
316 -----TFDINTDSSLAMENLDRISSETVPELLLFAENKINANDME SfmXia

```

【 図 6 】

```

419 ERIRGIRKXIADSYGLMPQIRIDNQLQPTTYEIKLKGIVIGBMVMPDKFLANOTF HpFlba
411 ERIRSMRRSIAESLGFAMPKIRIDNQLKXNVEFKLKVLSASAEIYDKFLAMDSGF CjFlba
391 DQIRALRKLASEYFWPPFRIIDNQLRANQOYAIKEMAGAGEVRLGCLMCDMPRG CcFlbF
392 DELVFRVRRALYLDLGVFPFGIHLRFNBMGEGEYIISLQEVVARGELKNGYLVRESVS YpLcrD
378 QLAERLRSQFIDYGVRLPEVLLRDEGSDNDSIVLLINIEVQVTFYFD--LMRVVNY StInva
359 GLIERIRSOFFIDYGVRLPTILYRYSNELKVDIVLLINIEVRSADFIYFKVCITDENG SfmXia
.....

479 VNKEIEGIPTEKPAF--GMDALMIETKNKEEALIQGYTIIDPSTVIATHITSELVKXYAED HpFlba
471 ITEIEGIIATKEPAF--NSDALMIDANLKDREATLNGYVIDPASVISTHMSLIIKHAISE CjFlba
451 GQVELPGEHVREPAF--GLPATMIADDLREAEATFRGYTVVDPATVLTHTLLEKNMAD CcFlbF
452 QLELLGIPYEKGEHLLPDQEAFMVSVYEELREKSLQLEFFSHSOLVTHLHSHVLRSEYAE YpLcrD
436 SDEVSPGINPTIQGSSQYFVWTHEEGKLELQYVLRNALDELVHCLAVTVARNVNE StInva
419 DIDALGIPVSTVS--INERVISWVDVSYTENLNTIDAKIKSAQDEPHQLSQALLANINE SfmXia
.....

537 FITKDEVKSLERLAKDYPTIVIEESK-KI-PTGAIKRSVLAQLLHEKIPKXMDLTILETIT HpFlba
529 LLTRQEVQNLKDKVQNDYPIIVGEGAL-GVAPVSLIQKILKDLKHHIPKMDLTILESVS CjFlba
509 LLSYAEVQKLLKELPETHQKLLVDLLPGTVTATTVORVQLLREERSIRDLPLILEGCV CcFlbF
512 FIGIQTETYLLEQMEGQYGLKEVOR-IVPLQRTMELQRLQVGEDISIRNMRSLIEAMV YpLcrD
496 YFGIQTETKMDLQEAQFPDLLEKVRH-ATVQRISEVLQRLSERVSVRNKLMESLAE StInva
477 IFGIQETKMDLQFENRYPDLLEKVRHV-TIQRISEVLQRLGENTSVRNKLMESLAE SfmXia
.....

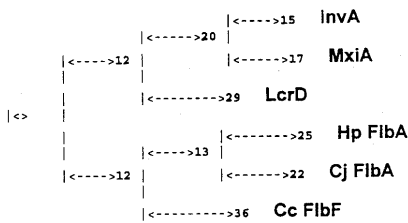
595 DIAPLVQNDVNIETQVRAKLSVITNAPKSEDRKLPFTSTSEQLFNKLRNENGTSK HpFlba
588 DIAE-VSKSFMIEHVRAKSLARMTNMYLDDKMDLPIITLDSASSAVLMENVPDRGYS CjFlba
569 EAAPHTA-SVTQLVEQVRAKLRARGLQWNRGDDGALPIITLSDMEQAFPAALIGPGDDK CcFlbF
571 EWGQK-EKDVVQLTEYIRSSLRKRYICVYANGNMLPAYLFDQEVKIRSGVRTSAGS YpLcrD
555 LWAPR-EKDVINLVEHVRGAMARYICHP-ANGGELAVMVAEVEKIRSGVRTSAGS StInva
536 LWAPR-EKDVITLVEHVRASLRYICSK-IAVSGEIKVVMLSGVIEDAIRKGRQTSGGS SfmXia
.....

655 SILLNVGELQKLEAVSEAMKVLQKGIAPVILIVFNLKRLKNSQEQARIDUVLSHA HpFlba
647 HPLPSVAQGTSLVDTLRAEVAANGRKIFKPLCVPEQLKFTADICYNFSINIVLVSFA CjFlba
628 QALPSPRLQDFIRGVRDSFERAALAGEAPVLL-TSPGVRFVRSVIRSERFNGQVMSQK CcFlbF
630 YLALPEAVTSELEQVKTIGDLQSQKSP-VLIVSMDIRRVKRIESEYGLPVLVSYQ YpLcrD
613 FLSLDPEASANLMDLITLKLDDLLIAH-KDLVLLTSVDRRFIKMIEGRFPDLEVSFG StInva
594 FLNMDIEVSEVEMTALAHREL-RNAKGNFVLLVSVDIRFPVKRLIDNRFKSLIVSYA SfmXia
.....

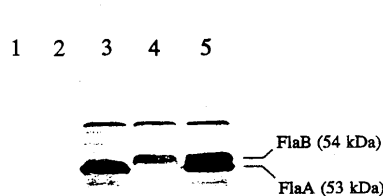
715 ELDPNNSPFLGTHINF HpFlba
707 EIAENTNFNTEGRIEEL CjFlba
687 EIHPRARLTVGMV--- CcFlbF
689 ELTQIQINIQIGRICL- YpLcrD
672 EIADSKSVNVIKTI--- StInva
653 EIDEAYTINVLTII--- SfmXia

```

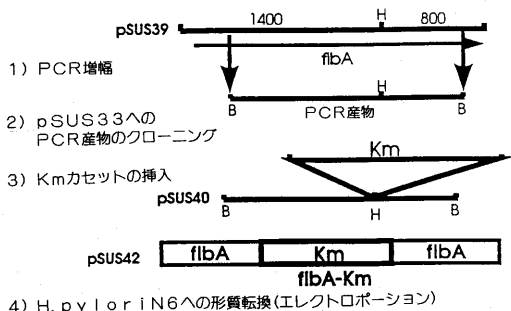
【 図 7 】



【 図 9 】

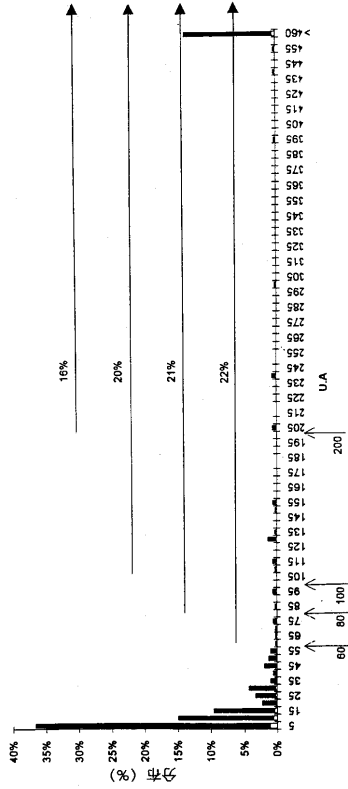


【 図 8 】



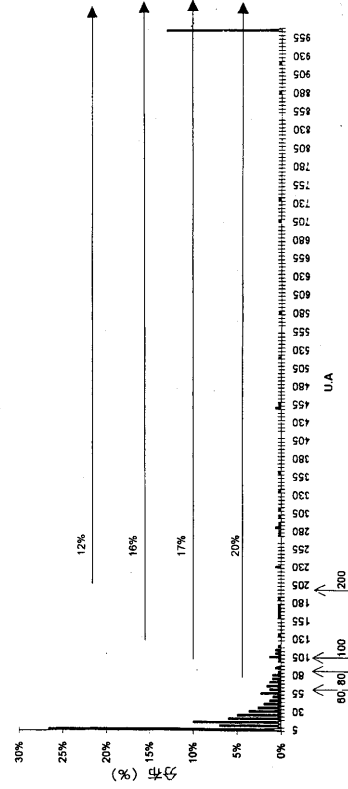
【図 1 0】

非糞毛株N6 f IBAのn-オクチルグルコシル抽出に関する
300のFNFS血清の分布

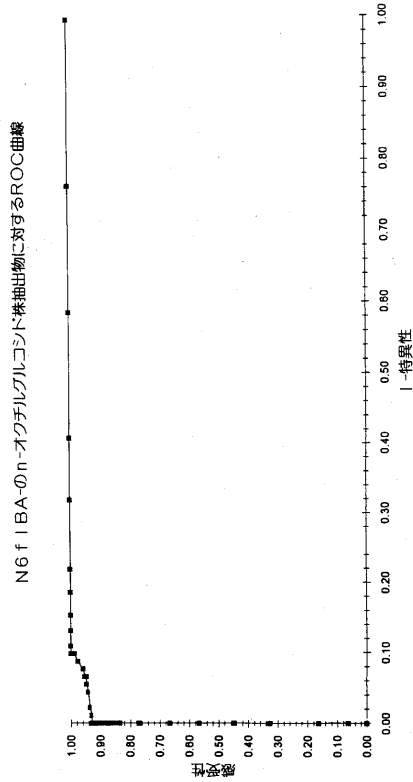


【図 1 1】

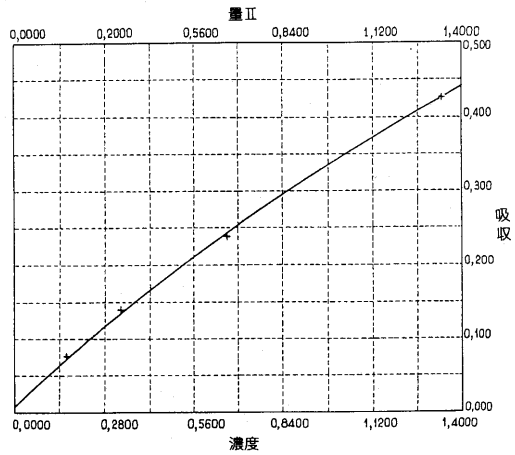
非糞毛株N6のn-オクチルグルコシル抽出に関する
300のFNFS血清の分布



【 図 1 4 】

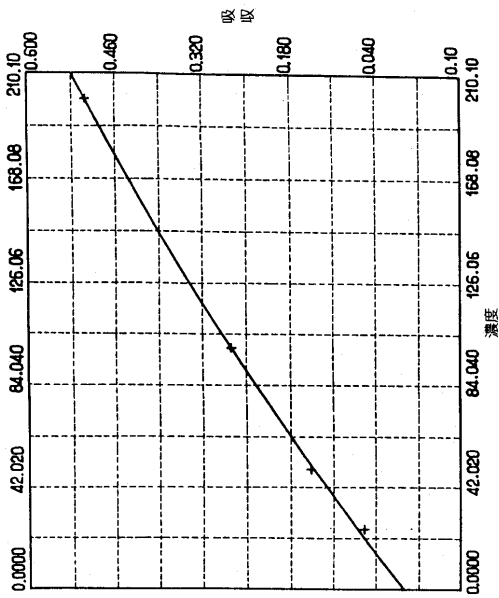


【 図 1 5 】



抽出のタイプ	750nmでのOD	濃度 (mg/ml)
グリシン (3000gで15分間遠心後)	0.028	0.284
n-オクチルグルコシド	0.087	1.004
上清1 (1回目のPBS洗浄後)	0.059	0.844
上清2 (2回目のPBS洗浄後)	0.015	0.1105

【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

抽出のタイプ	780nmでのOD	濃度 µg/ml
グリシン (3000gで15分間遠心後)	0.279	202.86
n-オクチルグルコシド	0.243	873.99
上清1 (1回目のPBS洗浄後)	0.361	539.2
上清2 (2回目のPBS洗浄後)	0.218	77.875

抽出のタイプ	780nmでのOD	濃度 µg/ml
グリシン沈殿 (3000gで15分間遠心後)	0.099	297.5
グリシン沈殿 抽出後	0.093	2778.7
n-オクチルグルコシド沈殿 抽出後	0.275	972.0

【手続補正書】

【提出日】平成21年4月16日(2009.4.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) の鞭毛タンパク質の生合成を調節すると共に、高厳密度の条件下において、下記の配列を有する二つのオリゴヌクレオチドを用いて増幅された *H. ピロリ* 由来のヌクレオチドフラグメントに対応するプローブとハイブリダイズすることができるか、

O L F 1 b A - 1 : A T G C C T C G A G G T C G A A A A G C A A G A T G

O L F 1 b A - 2 : G A A A T C T T C A T A C T G G C A G C T C C A G T

C

或いは、高厳密度の条件下において、これらのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができる *f 1 b A* 遺伝子のポリヌクレオチド。

【請求項2】

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) の鞭毛タンパク質の生合成を調節する *f 1 b A* 遺伝子のポリヌクレオチドであって、このポリヌクレオチドは、*H. ピロリ* 株の染色体 DNA を含むゲノムライブラリーを、下記の配列を有する二つのオリゴヌクレオチドを用いて増幅された *H. ピロリ* 由来のヌクレオチドフラグメントに対応するプローブか、

O L F 1 b A - 1 : A T G C C T C G A G G T C G A A A A G C A A G A T G

O L F 1 b A - 2 : G A A A T C T T C A T A C T G G C A G C T C C A G T

C

或いは、高厳密度の条件下において、これらのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができるプローブを用いてスリーニングする工程と、

前記プローブとハイブリダイズする DNA 配列を回収する工程と、

得られた DNA 配列をプラスミドタイプの適切なベクター中にサブクローニングし、次いで、高厳密度の条件下において、オリゴヌクレオチド O L F 1 b A - 1 および O L F 1 b A - 2 を用いて増幅された *H. ピロリ* 由来の DNA フラグメントに対応するプローブとハイブリダイズする修飾ベクターを選別する工程と、

上記プローブとハイブリダイズするプラスミドベクター中に含まれている DNA フラグメントの配列決定を行い、これらフラグメントに含まれるオープンリーディングフレームを決定する工程とによって得られるポリヌクレオチド。

【請求項3】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号6に示したヌクレオチド配列を有することを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項4】

請求項1～3の何れか1項に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号7に示したアミノ酸配列を有するタンパク質をコードすることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項5】

請求項1～4の何れか1項に記載のポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、宿主細胞内での *f 1 b A* 遺伝子の発現が *H. ピロリ* の鞭毛の生合成を可能としないように、また適切な場合には、*H. ピロリ* のフックタンパク質の合成ができないように、欠失、置換または挿入によって修飾されているポリヌクレオチド。

【請求項6】

f 1 b A 遺伝子のフラグメントに対応する請求項1～4の何れか1項に記載のポリヌク

レオチドであって、f l b A 遺伝子に由来する、少なくとも50ヌクレオチドのフラグメントであることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項7】

少なくとも100ヌクレオチドのフラグメントであることを特徴とするf l b A 遺伝子のフラグメントに対応する請求項1～4の何れか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】

f l b A 遺伝子の配列に存在する制限酵素部位で切断されたものであることを特徴とする請求項6または7に記載のf l b A 遺伝子のフラグメントであるポリヌクレオチド。

【請求項9】

請求項1～8の何れか1項に記載のポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドはマーカを含むカセットの挿入によって修飾されていることを特徴とする組み換え核酸。

【請求項10】

請求項9に記載の組み換え核酸であって、マーカが抗生物質に対する耐性遺伝子または重金属に対する耐性遺伝子であることを特徴とする組み換え核酸。

【請求項11】

請求項1～8の何れか1項に記載のポリヌクレオチドがカナマイシンに対する耐性カセットの挿入によって修飾されていることを特徴とする請求項10に記載の組み換え核酸。

【請求項12】

下記の配列の一つからなることを特徴とするオリゴヌクレオチド：

OLF1bA-1: ATCGTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG

OLF1bA-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC

OLF1bA-7: CGGGATCCGGGTTACTAATGGTTCTAC

OLF1bA-8: CGGGATCCCTCATGGCCTCTTCAGAGACC。

【請求項13】

請求項1および2の何れか1項に記載のポリヌクレオチドによってコードされることを特徴とする、H. ピロリのF l b A タンパク質のポリペプチド。

【請求項14】

配列番号7に示した配列を有するH. ピロリのF l b A タンパク質であり、またはF l b A タンパク質に対する抗体によって認識される該タンパク質のフラグメントであることを特徴とするポリペプチド。

【請求項15】

H. ピロリに対する抗体を得るための免疫原組成物であって、活性成分として、塩基またはヌクレオチドフラグメントの置換、付加および/または欠失によって、H. ピロリの鞭毛タンパク質の生合成の調節に關与するf l b A 遺伝子の請求項1～4の何れか1項に記載のポリヌクレオチドに生じた突然変異によってもたらされる、非鞭毛表現型を有することを特徴とするヘリコバクター・ピロリ菌株、または前記菌株から抽出したバクテリア抽出物を含有することを特徴とする組成物。

【請求項16】

請求項15に記載の免疫原組成物であって、前記菌株が、更に、H. ピロリのフックタンパク質が欠失していることを特徴とする組成物。

【請求項17】

請求項15または16に記載の免疫原組成物であって、前記菌株が、1992年6月26日にNCIMB受付番号第40512号でNCIMBに寄託された、N6株から得られたものであることを特徴とする組成物。

【請求項18】

請求項15または17に記載の免疫原組成物であって、前記菌株が、N6 f l b A - 株であり、1995年6月30日に、NCIMB受付番号第40747号でNCIMBに寄託されたものであることを特徴とする組成物。

【請求項19】

請求項15～18の何れか1項に記載の免疫原組成物であって、前記菌株が、弱められ

たウレアーゼを産生するか、或いはもはやウレアーゼを産生しないように更に突然変異されていることを特徴とする組成物。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の免疫原組成物であって、更なる突然変異が、ure A 遺伝子、ure B 遺伝子、ure C 遺伝子、ure D 遺伝子、ure E 遺伝子、ure F 遺伝子、ure G 遺伝子、ure H 遺伝子、または ure I 遺伝子の中から選択される一以上の遺伝子のポリヌクレオチドの突然変異からなることを特徴とする組成物。

【請求項 21】

請求項 15 ~ 20 の何れか一項に記載の免疫原組成物であって、前記バクテリア抽出物が、n - オクチルグルコシドで抽出した後に得られることを特徴とする組成物。

【請求項 22】

請求項 15 ~ 20 の何れか一項に記載の免疫原組成物であって、前記バクテリア抽出物が、PBS またはグリシンで抽出した後に得られる組成物。

【請求項 23】

H. ピロリに対する抗体を得るための免疫原組成物であって、請求項 13 または 14 の何れか 1 項に記載のポリペプチドを含有する組成物。

【請求項 24】

請求項 13 または 14 の何れかに記載のポリペプチドに対する、モノクローナル抗体。

【請求項 25】

塩基またはヌクレオチドフラグメントの置換、付加および/または欠失によって、H. ピロリの鞭毛タンパク質の生合成の調節に関する flb A 遺伝子の請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドに生じた突然変異によってもたらされる、非鞭毛表現型を有することを特徴とする H. ピロリ株に対する、モノクローナル抗体またはポリクローナル血清。

【請求項 26】

請求項 25 に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル血清であって、前記 H. ピロリ株が、更に、H. ピロリのフックタンパク質が欠失していることを特徴とするモノクローナル抗体またはポリクローナル血清。

【請求項 27】

請求項 25 または 26 に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル血清であって、前記 H. ピロリ株が、1992 年 6 月 26 日に NCIMB 受付番号第 40512 号で NCIMB に寄託された、N6 株から得られたものであることを特徴とするモノクローナル抗体またはポリクローナル血清。

【請求項 28】

請求項 25 または 27 に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル血清であって、前記 H. ピロリ株が、N6 flb A - 株であり、1995 年 6 月 30 日に、NCIMB 受付番号第 40747 号で NCIMB に寄託されたものであることを特徴とするモノクローナル抗体またはポリクローナル血清。

【請求項 29】

請求項 25 ~ 28 の何れか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル血清であって、前記 H. ピロリ株が、弱められたウレアーゼを産生するか、或いはもはやウレアーゼを産生しないように更に突然変異されていることを特徴とするモノクローナル抗体またはポリクローナル血清。

【請求項 30】

請求項 29 に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル血清であって、更なる突然変異が、ure A 遺伝子、ure B 遺伝子、ure C 遺伝子、ure D 遺伝子、ure E 遺伝子、ure F 遺伝子、ure G 遺伝子、ure H 遺伝子、または ure I 遺伝子の中から選択される一以上の遺伝子のポリヌクレオチドの突然変異からなることを特徴とするモノクローナル抗体またはポリクローナル血清。

【請求項 31】

生物学的サンプルにおけるH.ピロリによる感染をインビトロで検出するための組成物であって、活性成分として、請求項25～28の何れか1項に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル血清を含有する組成物。

【請求項32】

活性成分として、請求項25～28の何れか1項に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル血清を含有する組成物の、生物学的サンプルにおけるH.ピロリによる感染をインビトロで検出するための使用。

【請求項33】

H.ピロリに対する抗体取得に用いる免疫原組成物を調製するための、請求項1～12の何れか1項に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項34】

H.ピロリに対する抗体取得のための免疫原組成物を調製するための、請求項13または14の何れか1項に記載のポリペプチドの使用。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2009131288000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	H	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569	F	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/577	B	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	N	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08		

(74)代理人 100091351

弁理士 河野 哲

(74)代理人 100088683

弁理士 中村 誠

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 セバスティアン・スエルバウム

ドイツ連邦共和国、デー - 4 4 7 8 7 ポーフム、カナルシュトラッセ 6

(72)発明者 アニェース・ラビン

フランス国、9 1 4 4 0 ピュレ・スユール・イベット、アブニュ・ポーセジュール 4 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA50 BA61 CA04 CA09 DA05 EA04 GA14

4B063 QQ42 QR55 QS34

4B064 AG27 CA02 CC24 DA01

4B065 AA01X AA01Y AB01 AC14 BA03 CA25 CA44

4C085 AA03 AA13 AA14 AA19 BA20 CC07 CC21 DD23 DD62 EE01

EE03

4H045 AA11 BA10 CA11 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	幽门螺杆菌flbA基因的克隆和鉴定，以及Aflagellate菌株的产生		
公开(公告)号	JP2009131288A	公开(公告)日	2009-06-18
申请号	JP2009066575	申请日	2009-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 国立研究所杜Rasante等杜拉尔壳邦医疗		
申请(专利权)人(译)	法国巴斯德研究所 国立研究所杜拉拉桑特等杜拉拉RECHERCHE医疗		
[标]发明人	セバスティアンスエルバウム アニエースラビン		
发明人	セバスティアン・スエルバウム アニエース・ラビン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/195 C07K16/12 C12N1/21 A61K39/106 A61K39/00 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/53 C12Q1/68 C12P21/08 A61K48/00 A61K49/00 C07H21/04 C07K14/205 C07K14/41 C07K16/00 C12N15/31 C12R1/01 C12R1/91		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/105 A61K48/00 A61K2039/522 A61K2039/53 C07K14/205 C12R1/01 G01N33/56911 G01N33/56922 G01N2469/20 Y02A50/47 Y10S435/975		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/195 C07K16/12 C12N1/21 A61K39/106 A61K39/00.H G01N33/569.F G01N33/577.B G01N33/53.N C12Q1/68.A C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA50 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA14 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BA20 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
优先权	1995008068 1995-07-04 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测由幽门螺杆菌生物合成的生物合成控制中涉及的核苷酸序列感染的方法，该序列由鞭毛细菌菌株和幽门螺旋杆菌编码，提供预防感染的方法。解决方案：虽然它不影响感染患者的血清识别，但特别是可以避免对弯曲杆菌家族细菌（例如，空肠弯曲杆菌），H的“假阳性”类型反应修改幽门螺杆菌的菌株。所得的修饰细菌用于构建免疫组合物或组合物中的疫苗接种。【选择图】无