

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 71694

(P2002 - 71694A)

(43)公開日 平成14年3月12日(2002.3.12)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/569	F 4 B 0 6 3
33/53		33/53	N
33/543	545	33/543	545 D
// C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 数)

(21)出願番号 特願2000 - 254774(P2000 - 254774)

(22)出願日 平成12年8月25日(2000.8.25)

(71)出願人 000100492

わかもと製薬株式会社

東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号

(72)発明者 古賀 泰裕

神奈川県伊勢原市上粕屋246東海大学伊勢原
職員住宅307

(72)発明者 相場 勇志

東京都中央区日本橋室町1 - 5 - 3 わかもと
製薬株式会社内

(72)発明者 平田 晴久

東京都中央区日本橋室町1 - 5 - 3 わかもと
製薬株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 炎症性腸疾患の検査方法及び検査用キット

(57)【要約】

【目的】炎症性腸疾患を簡便かつ迅速に診断する検査方法及び検査用キットを提供する。

【構成】バクテロイデス・オバータスを用いて、血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出することを特徴とする炎症性腸疾患の検査方法ならびに該方法に使用する検査用キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出することを特徴とする炎症性腸疾患の検査方法。

【請求項2】免疫学的測定法により血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出することを特徴とする炎症性腸疾患の検査方法。

【請求項3】検体中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体を、支持体に含有させたバクテロイデス・オバータス菌体と反応せしめた後、上記抗体と反応する物質の標識化物を反応させ、反応生成物の標識量を測定する工程を含む免疫学的測定法により血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出することを特徴とする炎症性腸疾患の検査方法。

【請求項4】バクテロイデス・オバータスを認識する抗体は、バクテロイデス・オバータス菌体に含まれる分子量19500の物質と反応する抗体であることを特徴とする請求項1、2又は3記載の検査方法。

【請求項5】バクテロイデス・オバータスを含み、免疫学的測定法により血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出する炎症性腸疾患の検査用キット。

【請求項6】バクテロイデス・オバータスを含有させた支持体、酵素標識化抗ヒトIgG抗体、酵素標識化抗ヒトIgA抗体、酵素標識化プロテインA、酵素標識化プロテインG又は酵素標識化ジャッカリンの中のいずれか1種類の酵素標識化物、及び酵素活性測定用試薬を含み、免疫学的測定法により、血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出する炎症性腸疾患の検査用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血液中に存在するバクテロイデス・オバータス (*Bacteroides ovatus*) を認識する抗体の存在を検出することを特徴とする炎症性腸疾患の検査方法及び検査用キットに関する。詳しくは臨床検査分野において、簡便、迅速に実施できる炎症性腸疾患の検査方法及び検査用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患は、原因不明で特異性炎症性腸疾患として区分され、厚生省の難治性疾患として特定されている。診断は厚生省特定疾患難治性炎症性腸管調査研究班で作製された診断基準(案)に従い、便培養などで感染性腸炎を除外した後、臨床所見、消化管造影検査、内視鏡検査、組織検査を組み合わせで行われている。診断の中心となる消化管造影検査や内視鏡検査は、患者の肉体的・精神的な苦痛を伴うことが多く、熟練した医師が必要とされている。しかし、これらの方法によっても診断が困難な症例も見られる。このため炎症性腸疾患の診断のための簡

便で迅速かつ高精度で行える特異的な臨床検査法が世界的に求められている。

【0003】クローン病患者の血清には、抗小腸抗体 (Bagchi, S. et al.: Clin. Exp. Immunol., 55, 44~48, 1984) や抗パン酵母マンナン抗体 (Quinton, J. et al.: Gut, 42, 788~791, 1998) が、一方、潰瘍性大腸炎患者の血清には、抗好中球抗体 (Targan, S. et al.: Gastroenterology, 96, A505, 1989)、抗トロポミオシン抗体 (Das, K. et al.: J. Immunol., 150, 2487~2493, 1993) や抗カゼイン抗体 (Knoflach, P. et al.: Gastroenterology, 92, 479~485, 1987) あるいは抗ムチン抗体などの存在が報告されている。クローン病や潰瘍性大腸炎に特異的な抗体と報告されていても例数が少ないケース(小腸タンパク、トロポミオシン、ムチン)あるいは特異性が低い(好中球、パン酵母マンナン、カゼイン)など臨床検査に応用しうる程のデータに至っていないのが実情である (Nielsen, O. et al.: Am. J. Gastroenterol., 95, 359~367, 2000)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記現状に鑑み、特異的な血清抗体を応用して、炎症性腸疾患の診断が、簡便、迅速かつ高精度に実施できる臨床検査方法を提供することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、理想的な検査方法を求め、疫学的、免疫学的、生化学的研究を重ねた結果、炎症性腸疾患患者の血中に腸内菌の一種であるバクテロイデス・オバータスを認識する抗体が量的に有意に多く存在していることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、バクテロイデス・オバータスを用いて血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出することを特徴とする炎症性腸疾患の検査方法を提供する。バクテロイデス属細菌はヒト腸内の最優勢菌属であるため、従来、炎症性腸疾患との関連に関する研究は、数多くなされてきた。特に、最優勢菌種であるバクテロイデス・ブルガータス (*Bacteroides vulgatus*)、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) を用いて、これらの菌の病因としての可能性、これらの菌に対する血中抗体と疾患、病勢との関連性の研究が行われてきたが、明確な結論は出ていない (Bamba, T. et al.: J. Gastroenterol., 30, 45~47, 1995; Duchmann, R. et al.: Gut, 44, 8121~8, 1999; Matsuda, H. et al.: J. Gastroenterol. Hepatol., 15, 61~68, 2000)。従って血中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出することにより炎症性腸疾患の検査が可能となったことは到底予見し得なかったことである。

【0006】バクテロイデス・オバータスとしてはヒト由来の菌株であればいずれを用いてもよいが、基準菌株のバクテロイデス・オバータス JCM 5824 (理化学

研究所微生物系統保存施設より入手可能)が好適に用いられる。

【0007】バクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在の検出法としては、免疫学的測定法が好適に用いられる。免疫学的測定法としては、いずれの方法を用いてもよいが、酵素免疫測定法、イムノクロマトグラフィー法などが好ましい。いずれの方法も検体中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体を、支持体に含有させたバクテロイデス・オバータス菌体と反応せしめた後、上記抗体と反応する物質の標識化物を反応させ、反応生成物の標識量を測定する工程を含む。酵素免疫測定法は、酵素標識化物を用いて、反応生成物の標識量を酵素活性により測定する。イムノクロマトグラフィー法は、着色粒子標識化物を用いて、反応生成物の標識量を着色量により測定する。

【0008】本発明には反応生成物の標識量、すなわち検体中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在量を容易に数値化できる酵素免疫測定法が好適に用いられる。酵素免疫測定法には、検体中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体を、支持体に含有させたバクテロイデス・オバータス菌体と反応せしめた後、上記抗体と反応する物質、好ましくは抗ヒト免疫グロブリン抗体、プロテインA、プロテインG又はジャッカリンの酵素標識化物を反応させ、反応生成物の標識量を酵素活性により測定する工程を含む方法が適している。支持体としては、たとえば、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂などプラスチックやガラスが適している。この支持体へバクテロイデス・オバータスを含有させる方法は物理吸着であってもよいし、化学的結合であってもよい。標識用酵素としては、ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼが好適である。

【0009】本発明によって検出される血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体は、バクテロイデス・オバータス菌体に含まれる物質であればいずれの物質と反応する抗体であってもよい。本発明者らがウェスタンブロット法により血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体と反応するバクテロイデス・オバータス菌体に含まれる物質について解析した結果、炎症性腸疾患患者の血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体は、分子量19500の物質と主に反応することが判明した。

【0010】本発明は、さらに、バクテロイデス・オバータスを含み、免疫学的測定法により血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出する炎症性腸疾患の検査用キットを提供する。免疫学的測定法が酵素免疫測定法の場合、この検査用キットには、バクテロイデス・オバータス菌体を含有させた支持体、酵素標識化抗ヒトIgG抗体、酵素標識化抗ヒトIgA抗体、酵素標識化プロテインA、酵素標識化プロテインG

又は酵素標識化ジャッカリンの中のいずれか1種類の酵素標識化物、及び標識酵素活性測定用試薬を含む。次に、実施例を上げて詳細な説明をするが、これによって本発明が限定されるものではない。

【0011】

【実施例】

【実施例1】酵素免疫測定法による血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在の検出

1)バクテロイデス・オバータス菌体の調製
バクテロイデス・オバータスJCM5824をGAMブイヨン培地(日水製薬社製)10mLで37、18時間嫌気培養した。遠心分離により集菌後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した。洗浄菌体をPBS5mLに懸濁し、超音波破碎した。

【0012】2)バクテロイデス・オバータス菌体を含有させた支持体の調製

PBSにてタンパク質濃度10 μ g/mlとなるよう希釈したバクテロイデス・オバータス菌体の超音波破碎物を96穴マイクロプレート(コースター社製)の各々のウェルに0.2mLずつ加え、4で一晩放置した。各ウェルの液を除去した後、洗浄のためPBSを0.25mLずつ加え攪拌後、液を除去した。この洗浄操作を3回繰り返した後、マスキング試薬として0.1%スキムミルク加PBSを0.25mL加え、37、1時間インキュベートした。マスキングの後、各ウェル内の液を除去し、37で1~3時間乾燥した。

【0013】3)血中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在の検出

ヒト血清中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在の検出にはサンドイッチ酵素免疫測定法を用いた。すなわち、先に作製したバクテロイデス・オバータス含有支持体(96穴マイクロプレート)に、あらかじめ0.05%スキムミルク加PBSで300倍に希釈しておいた被検血清をウェルに0.2mLずつ加え、マイクロプレートミキサーにて約1分間攪拌の後、37、1時間反応させた。各ウェルの液を除去した後、0.05%Tween20加PBS0.25mLにより3回洗浄を行った。次に、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(カッセル社製)又はペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgA抗体(カッセル社製)を至適濃度に希釈し、各ウェルに0.2mLずつ加え、再び37、1時間反応させた。反応後、液を除去し再度洗浄を行い、各ウェル中の液を完全に除去した後、基質液(0.01%過酸化水素+1.5mg/ml o-フェニレンジアミン水溶液)を0.2mL加え室温にて10分間反応させた。4N硫酸を各ウェルに0.05ml添加することで反応を停止させた。マイクロプレート用比色計(和光純薬社製)で吸光値(492nmの吸光値-630nmの吸光値)を測定し、対照とした特定のクローン病患者血清の吸光値を1000U/mLとして、検体吸光値 \div 対照吸光値 \times 1000により抗体価を算出した。

【0014】潰瘍性大腸炎(30例)及びクローン病(12例)の炎症性腸疾患患者血清及び健常者血清(30例)についてバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在の検出を行った。結果を表1に示した。炎症性腸疾患患者の血清中にはバクテロイデス・オバータスを認識する抗体(IgG及びIgA)が有意に多く存在することが判明した。健常者の抗体価の平均値+2×標準偏差をカットオフ値とすると、バクテロイデス・オバ

表1

疾患(n)	抗体価(平均値±標準偏差 U/ml)	
	IgG	IgA
炎症性腸疾患(42)	951±610*	1182±736*
潰瘍性大腸炎(30)	850±557*	1146±777*
クローン病(12)	1203±687*	1230±567*
健常者(30)	422±261	527±250

Student's t検定*:p<0.001

【0016】

【比較例】酵素免疫測定法による血中のバクテロイデス・ブルガータスを認識する抗体の存在の検出
 実施例1と同様の方法により、バクテロイデス・オバータスの代わりに、ヒトの腸内菌の最優勢菌種であるバクテロイデス・ブルガータスJCM5826(理化学研究所微生物系統保存施設より入手可能)を用いて支持体を

表2

疾患(n)	抗体価 (平均値±標準偏差 U/ml)
炎症性腸疾患(42)	871±479
潰瘍性大腸炎(30)	868±484
クローン病(12)	878±488
健常者(30)	987±353

【0018】

【実施例2】バクテロイデス・オバータスを認識する抗体と反応する物質の分子量の測定
 ウェスタンブロット法により、炎症性腸疾患患者血清中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体と反応するバクテロイデス・オバータスの菌体に含まれる物質の分子量の測定を行った。実施例1の方法により培養したバクテロイデス・オバータスの菌体を可溶化してSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画した。泳動終了後、ウェスタンブロット法によりニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を5%スキムミルク加PBSによりマスキングした後、バクテロイデス・オバータスを認識する抗体価の高い炎症性腸疾患患者血清を2000倍希釈して室温、1時間反応させた。反応後、0.1%Tween20加PBSで洗浄した。至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体と室温、

*ータスを認識するIgG陽性の例数は炎症性腸疾患患者42例中18例、健常者30例中2例、IgA陽性の例数は炎症性腸疾患患者42例中20例、健常者30例中1例であった。これらの結果より、本測定法を炎症性腸疾患の診断に利用できることが示された。

【0015】

【表1】

調製し、血中のバクテロイデス・ブルガータスを認識する抗体(IgG)の存在の検出を行った。結果を表2に示した。血清中のバクテロイデス・ブルガータスを認識する抗体の存在量は、炎症性腸疾患患者と健常者との間で有意差は認められなかった。

【0017】

【表2】

1時間反応させた。反応後、再度洗浄を行い、基質液(ELウエスタンブロットング検出試薬、アマシャムファルマシアバイオテク社製)と室温にて10分間反応させた。その結果、バクテロイデス・オバータスを認識する抗体は、分子量19500の物質と主に反応することがわかった。

【0019】

【実施例3】ウェスタンブロット法による血中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体と反応する物質の解析
 炎症性腸疾患患者20例、健常者10例の血清について実施例2と同様の試験を行った。その結果、炎症性腸疾患では17例がバクテロイデス・オバータスの分子量19500の物質と反応した。一方、健常者では2例にとどまった。

【0020】

【実施例4】検査用キットの作製

以下の構成試薬からなる検査用キット(酵素免疫測定法)を作製した。

- 1) 実施例1で調製したバクテロイデス・オバータス菌体を含有させた支持体(96穴マイクロプレート)
- 2) 血液検体希釈液
- 3) 陽性コントロール血清
- 4) ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体液又はペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgA抗体液
- 5) 洗浄液
- 6) 酵素基質液(過酸化水素+テトラメチルベンチジン)

7) 反応停止液(1N硫酸)

【0021】

【発明の効果】本発明は、バクテロイデス・オバータスを用いて、免疫学的測定法により血液中のバクテロイデス・オバータスを認識する抗体の存在を検出することを特徴とする炎症性腸疾患の検査方法及び検査用キットを提供するものである。実施例から明らかなように、本発明の検査方法及び検査用キットを用いれば、臨床現場において簡便、迅速な炎症性腸疾患の診断が可能となる。

- 10 また、本検査方法及び検査用キットは炎症性腸疾患の病因解析等基礎研究にも広く利用できる。

专利名称(译)	测试炎性肠病的方法和测试试剂盒		
公开(公告)号	JP2002071694A	公开(公告)日	2002-03-12
申请号	JP2000254774	申请日	2000-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	若素制药株式会社		
申请(专利权)人(译)	わかもと製薬株式会社		
[标]发明人	古賀泰裕 相場勇志 平田晴久		
发明人	古賀 泰裕 相場 勇志 平田 晴久		
IPC分类号	G01N33/569 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/569.F G01N33/53.N G01N33/543.545.D C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ96 4B063/QR56 4B063/QR84 4B063/QS35 4B063/QX01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 要解决的问题：提供一种用于容易且快速诊断炎性肠病的检查方法和检查试剂盒。解决方案：用于炎症性肠道疾病的检查方法和用于该方法的检查试剂盒的特征在于，使用卵形拟杆菌检测血液中识别卵白色杆菌的抗体的存在。

表1

疾患(n)	抗体価(平均値±標準偏差 U/mL)	
	IgG	IgA
炎症性腸疾患(42)	951±610*	1182±736*
潰瘍性大腸炎(30)	850±557*	1146±777*
クローン病(12)	1203±687*	1230±567*
健常者(30)	422±261	527±250

Student's t検定*; p<0.001