

(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2016-10331
(P2016-10331A)

(43) 公開日 平成28年1月21日(2016.1.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4 B O 6 3
C07K 14/195 (2006.01)	C07K 14/195	4 H O 4 5
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-132772 (P2014-132772)
(22) 出願日 平成26年6月27日 (2014.6.27)

(71) 出願人 598041566
学校法人北里研究所
東京都港区白金5丁目9番1号
(74) 代理人 100110973
弁理士 長谷川 洋
(74) 代理人 100120293
弁理士 中谷 智子
(72) 発明者 宮本 真浩
神奈川県横浜市金沢区大川5-1 JNC
株式会社 横浜研究所内
(72) 発明者 松井 英則
東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人
北里研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘリコバクター・スイス特異的配列、及び当該配列及び当該配列にコードされているタンパク質を標的とした診断方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 H.ピロリと同様に胃内に生息し、胃炎、胃潰瘍、胃癌、リンパ腫等を引き起すとされている未だ測定(検出)/診断方法が確立されていないH.スイスの存在を判定する方法、及び、H.スイス感染の診断方法、並びに当該方法に用いるための薬剤又はキットの提供。

【解決手段】 被験者由来のサンプルにおける、(i)特定の配列に記載の塩基配列若しくはその一部を有する核酸、(ii)特定の配列に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、及び、(iii)(ii)のタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体からなる群から選択される少なくとも一つを測定することを備える、前記サンプル中のH.スイスの存在を判定する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者由来のサンプルにおける、(i) 配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列若しくはその一部を有する核酸、(i i) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、及び、(i i i) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体からなる群から選択される少なくとも一つを測定することを備える、前記サンプル中の H . スイスの存在を判定する方法。

【請求項 2】

被験者が、鳥肌胃炎患者である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

サンプルが、胃バイオブシーサンプル又は便、あるいは、血液又は尿である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

H . スイスの存在を判定する方法に用いるための、配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチド。

【請求項 5】

H . スイスの存在を判定する方法に用いるための、配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸コンストラクト。

20

【請求項 6】

H . スイスの存在を判定する方法に用いるための、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド。

【請求項 7】

H . スイスの存在を判定する方法に用いるための、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体若しくはその免疫反応性断片。

【請求項 8】

以下の群から選択される少なくとも一つを含有する、H . スイス検出薬：

- (a) 請求項 5 に記載の核酸コンストラクト；
- (b) 請求項 6 に記載のタンパク質若しくはペプチド；及び、
- (c) 請求項 7 に記載の抗体若しくはその免疫反応性断片。

30

【請求項 9】

請求項 8 に記載の検出薬を備える、H . スイス検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、未だ純粋培養法が確立されていないヒトより分離されたヘリコバクター・スuis (*Helicobacter suis*、以下、「H . スイス」という) 特異的な塩基配列及びアミノ酸配列、当該配列を標的とした H . スイスの存在を判定する方法又は H . スイス感染の診断方法、及び該方法に用いるための薬剤又はキット等の分野に関する。

40

【背景技術】

【0002】

1983年にマーシャル (Marshall B , J ,) らによって初めて慢性胃炎患者よりヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*、以下、「H . ピロリ」という) の分離培養が成功した。本発見以降、胃炎、胃潰瘍の一部は H . ピロリの感染によって起こることが明らかとなった (非特許文献 1)。H . ピロリは、経口からヒトに感染すると考えられている。開発途上国では小児期に既に 70 - 80 % 以上の高い感染率を示す。一方、先進国では途上国より感染率は低い。疫学的調査の結果から、1

50

994年に世界保健機構(WHO)によりH.ピロリが発がん性物質であると認定され、胃癌との関係が注目されるようになった(非特許文献2)。一方、H.ピロリ陰性にもかかわらず、胃炎や胃潰瘍となる症例も報告されたため、H.ピロリ菌以外の類縁の感染菌の動態についても種々の検討が行なわれてきた。ヘリコバクター属細菌は30種類以上にも分類されるが、1994年には、それらのうちヘリコバクター・ハイルマニー(以下、「H.ハイルマニー」という)が動物の胃内から感染菌として検出された(非特許文献3)。その後、胃のリンパ球の複合組織(MALT)リンパ腫(以下、「胃MALTリンパ腫」という)とH.ハイルマニーとの関連を示す研究結果が発表され、H.ピロリ以外にも胃疾患の原因菌としてH.ハイルマニーが明らかとなった(非特許文献4)。

【0003】

H.ハイルマニーは、ヒト、イヌ、ネコ、ブタ、サルなどの胃に感染し、胃疾患を誘発する人獣共通感染症の病原体である。16Sリボソーム遺伝子の塩基配列を基にした分類学上、ヒトから分離されるH.ハイルマニーは、H.スイスに再分類されたが(非特許文献5)、2008年のInt. J. Syst. Evol. Microbiol. 誌において、ブタより分離されたH.スイスHS1株とHS5株のゲノム塩基配列が発表されたため、H.スイスに菌名が統一された(非特許文献6)。従って、2008年以前の報告のヒトに感染するH.ハイルマニーは、それ以降の報告のH.スイスと同じ菌である(以降、本明細書においては、「H.スイス」との表現で統一する)。

【0004】

H.スイスは、ヒトをはじめ多くの哺乳動物の胃内に生息が確認されており、動物からヒトへの感染が疑われている。H.スイスは、H.ピロリと同様に胃炎、胃潰瘍、胃癌、リンパ腫などを引き起こし(非特許文献5)、胃MALTリンパ腫の主要な原因菌の可能性が示唆されている(非特許文献7)。H.スイスは、グラム陰性螺旋型桿菌で、5~7巻の螺旋を有する。両極に10~20本の鞭毛を有しており運動性が高い(非特許文献5)。H.ピロリがウレアーゼ陽性であるのに対し、H.スイスは、ウレアーゼ陽性の株と陰性の株があり、特に動物からの分離菌株はウレアーゼ陽性であるにもかかわらず、ヒトからの分離菌株はウレアーゼ陰性であることが報告されている(非特許文献8)。

【0005】

また、ヒトから分離されたH.スイスの分離培養法は未だ確立されておらず、実験用マウスの胃で継代されている(非特許文献8)。H.スイスの分離培養について試みたものの、発育が認められなかったという報告もある(非特許文献9)。また、H.ハイルマニー様菌株(Helicobacter heilmannii'-like organisms: HHL0)のPCRによるスクリーニング方法が公表されている(非特許文献10)が、H.スイス特異的なものではなく、検出感度にも問題があった。

【0006】

従って、H.スイス感染と胃疾患との関連性が非常に高いことが示されていながら、現状では、H.ピロリの診断に用いられる培養法やウレアーゼ活性を指標とした尿素呼吸試験(UBT)などが適用出来ず、有効な診断法が確立されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Marshall, B. J. & Warren, J. R., Lancet, 1, 1273-1275, 1984.

【非特許文献2】NIH Consensus Statement, 12 (1) 1-23, 1994.

【非特許文献3】Stole, M. et al., Scand. J. Gastroenterol., 29, 1061-1064, 1994.

【非特許文献4】Matsui, H. et al., Curr. Trends Microbiol., 6, 27-34, 2010.

【非特許文献5】Priestnall, S. L. et al., J. Clin

10

20

30

40

50

. Microbiol., 42, 2144-2151, 2004.

【非特許文献6】Baele, M. et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, 1350-1358, 2008.

【非特許文献7】Mongner, A. et al., Gastroenterology 118, 821-828, 2000.

【非特許文献8】Matsui, et al., Helicobacter, 2014年3月28日PubMed公開 doi:10.1111/hel.12127.

【非特許文献9】第37回関東甲信越地区医学検査学会2000.10.14-15, 「Helicobacter heilmanniiの分離培養への試み」

【非特許文献10】Chisholm, S.A. & Owen, R.J. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 46, 1-7, 2003.

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、未だ測定（検出）/診断方法が確立されていないH.スイスの存在を判定する方法、及び、H.スイス感染の診断方法、並びに当該方法に用いるための薬剤又はキットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

20

本発明者らは、H.スイスの測定（検出）及び診断を可能とするため、カニクイサルより分離されたH.スイス及びヒトより分離されたH.スイスの全ゲノム塩基配列解析と比較ゲノム解析を行った。より具体的には、これらのH.スイス感染マウスの胃の粘膜懸濁液からゲノムDNAを調製し、全ゲノム塩基配列を決定した後、決定された全ゲノム配列と、EMBL/GenBank/DDBJデータベース上に公開されている関連のカンピロバクター（Campylobacter）属11菌株及びヘリコバクター属20菌株の全ゲノム塩基配列とを、RECOG（Research Environment for Comparative Genomics）を用いて比較ゲノム解析することにより、H.スイス特異的塩基配列を2種類同定した。そして、本発明者らは、同定した2種類の塩基配列を標的としたPCRプライマーを考案し、胃パイオプシーから調製したDNA中からH.スイス特異的塩基配列をPCR法にて測定（検出）できることを見出した。

30

【0010】

更に、本発明者らは、同定した塩基配列のうち一方がタンパク質をコードしている可能性があることから、同配列の発現産物を組換えタンパク質として大腸菌にて発現させ、この組換えタンパク質をウェスタンブロッティング法により確認することにより、確かにタンパク質として発現していることを確認した。また、本発明者らは、このタンパク質がこれまでに報告されているタンパク質とは異なることを確認し、新たにF2R2タンパク質と命名した。更に、本発明者らは、H.スイス感染マウス由来の血液サンプル中にF2R2タンパク質を抗原として認識する抗体が存在することを見出し、本発明を完成させた。

40

【0011】

よって、本発明は、配列番号1（若しくは図2）又は配列番号2（若しくは図3）に記載の塩基配列又は配列番号3に記載のアミノ酸配列を測定（検出）することによるH.スイス感染の存在を判定する方法又は診断方法に関する。また、本発明は、前記方法に用いるための、配列番号1又は配列番号2に記載の塩基配列と特異的に結合する核酸、又は配列番号3に記載のアミノ酸配列と特異的に結合する物質（抗体及びアプタマー等）、並びに、これらを含むH.スイス検出薬又はH.スイス感染の診断（検査）薬、並びに、これらを含むH.スイス検出キット又はH.スイス感染の診断（検査）キットに関する。より具体的には、本発明は、以下の発明に関する：

(1) 被験者由来のサンプルにおける、(i)配列番号1若しくは配列番号2に記載の

50

塩基配列若しくはその一部を有する核酸、(ii)配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、及び、(iii)配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体からなる群から選択される少なくとも一つを測定(検出)することを備える、前記サンプル中のH.スイスの存在を判定する方法。

(2) 被験者が、鳥肌胃炎患者である、(1)に記載の方法。

(3) サンプルが、胃バイオブシーサンプル又は便、あるいは、血液又は尿である、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) H.スイスの存在を判定する方法に用いるための、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチド。

10

(5) H.スイスの存在を判定する方法に用いるための、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸コンストラクト。

(6) H.スイスの存在を判定する方法に用いるための、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド。

(7) H.スイスの存在を判定する方法に用いるための、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体若しくはその免疫反応性断片。

(8) 以下の群から選択される少なくとも一つを含有する、H.スイス検出薬：

20

(a) (5)に記載の核酸コンストラクト；

(b) (6)に記載のタンパク質若しくはペプチド；及び、

(c) (7)に記載の抗体若しくはその免疫反応性断片。

(9) 前記(8)に記載の検出薬を備える、H.スイス感染判定用キット。

【0012】

(H.スイス)

本明細書において、「H.スイス」とは、H.ハイルマニー様菌株(*Helicobacter heilmannii*'-like organisms: HHL0)、非H.ピロリヘリコバクター種(NHPS)、又は、H.*heilimannii sensu lato*と呼ばれるヘリコバクター分類(以下、「H.*heilimannii sensu lato*」という)に含まれる、H.ハイルマニータイプ1に属する菌株を意味し、同じく、H.*heilimannii sensu lato*に分類される他の菌株、即ち、H.*heilimannii sensu stricto*や、H.ハイルマニータイプ2に属する菌株は含まない。ヘリコバクター分類の系統図を図1に示す。H.スイスは、ヒト以外にイヌ、ネコ、ブタ、サルなどの胃に感染することが知られているが、本明細書におけるH.スイスが感染する哺乳動物は特に限定されるものではない。例えば、本明細書におけるH.スイスが感染する哺乳動物は、ヒト又はサルであってもよい。

30

【0013】

(H.スイス特異的塩基配列を有するポリヌクレオチド)

本明細書において、「配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチド」とは、配列番号1又は配列番号2に記載の塩基配列の全てを含むポリヌクレオチドであってもよいし、その一部を含むポリヌクレオチドであってもよい。ここで、「配列番号1に記載の塩基配列」とは、配列番号1に記載された塩基配列(H.スイスTKY株から得られた非翻訳領域のH.スイス特異的配列)と完全に一致する配列の他、配列番号1に記載の塩基配列において、1~100個(又は、1~80個、1~60個、1~50個、1~40個、1~30個、1~20個、1~10個、1~5個、1~3個)の核酸が欠失、置換、挿入又は付加された配列(又は、配列番号1に記載の塩基配列と60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%のホモロジーを有する配列、又は、配列番号1に記載された塩基配列と相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列)を含み、例えば、図2に列挙されたいずれかの

40

50

塩基配列、あるいは、配列番号16(H.スイス SNTW101株から得られた非翻訳領域のH.スイス特異塩基的配列)、配列番号17(H.スイス SH8株から得られた非翻訳領域のH.スイス特異的塩基配列)、又は配列番号18(H.スイス SH10株から得られた非翻訳領域のH.スイス特異的塩基配列)に記載の塩基配列であってもよい。

【0014】

同じく、「配列番号2に記載の塩基配列」とは、配列番号2に記載された塩基配列(H.スイス HS1株、又は、H.スイス HS5株から得られた翻訳領域のH.スイス特異的配列:F2R2遺伝子配列)の他、配列番号2に記載の塩基配列において、1~100個(又は、1~80個、1~60個、1~50個、1~40個、1~30個、1~20個、1~10個、1~5個、1~3個)の核酸が欠失、置換、挿入又は付加された配列(又は、配列番号2に記載の塩基配列と60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%のホモロジーを有する配列、又は、配列番号2に記載された塩基配列と相補的な配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズする配列)を含み、例えば、図3に列挙されたいずれかの塩基配列、あるいは、配列番号19(H.スイス TKY株から得られた翻訳領域のH.スイス特異的塩基配列)、配列番号20(H.スイス SNTW101株から得られた翻訳領域のH.スイス特異的塩基配列)、配列番号21(H.スイス SH8株から得られた翻訳領域のH.スイス特異的塩基配列)又は配列番号22(H.スイス SH10株から得られた翻訳領域のH.スイス特異的塩基配列)に記載の塩基配列であってもよい。

10

20

【0015】

本明細書における、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列の一部を有するポリヌクレオチドは、H.スイス特異的でなければならない。ここで、「H.スイス特異的」とは、H.スイス以外のいかなる種においても当該塩基配列と相同性の高い塩基配列を有するポリヌクレオチドが確認されないことを意味し、好ましくは、H.スイス以外のいかなる種においても当該塩基配列と90%以上(又は、95%以上、98%以上、99%以上、100%)の相同性を有するポリヌクレオチドが確認されないことを意味する。候補部分配列がH.スイス特異的であるか否かは、GenBank等のデータベース検索及び配列比較を行うことにより、適宜確認することができる。好ましくは、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列の一部を有するポリヌクレオチドは、オリジナルのポリヌクレオチド(それぞれ、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド)の50%以上の核酸を有するポリヌクレオチドであり、より好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の塩基配列を有するポリヌクレオチドである。

30

【0016】

本明細書において、「ストリンジентな条件下でハイブリダイズ」とは、当業者に通常用いられるハイブリダイゼーション条件でハイブリダイズすることを意味する。例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)記載の方法によりハイブリダイズするか否かを決定することができる。例えば、ハイブリダイズの条件は、6×SSC(0.9M NaCl, 0.09M クエン酸三ナトリウム)又は6×SSPE(3M NaCl, 0.2M NaH₂PO₄, 20mM EDTA・2Na, pH7.4)中42℃でハイブリダイズさせ、その後42℃で0.5×SSCで洗浄する条件であってもよい。また、本明細書に記載された塩基配列及びアミノ酸配列のホモロジーは、例えば、BLASTX、BLAST、FASTA等の公知のプログラムを用いて決定することができる。

40

【0017】

別の態様において、本発明は、上述の配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸コンストラクトに関する。本発明の核酸コンストラクトは、必要に応じて標識化されていてもよい。また、本

50

発明の核酸コンストラクトは、上述の配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列を測定（検出）するためのPCRプライマー、又はプローブ等であってもよい。例えば、本発明の核酸コンストラクトの長さは、10～400bp、15～200bp、20～100bpであってもよい。好ましくは、本発明の核酸コンストラクトは、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと相補的な配列を有する。また、前記相補的な配列は、当該核酸コンストラクトが前記ポリヌクレオチドと特異的に結合する機能を保持する限り、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと相補的な配列において1～3個の核酸が置換、欠失、付加、又は挿入された配列であってもよい。

【0018】

本明細書において、核酸の「標識化」とは、当該核酸の存在を測定（検出）可能とするための修飾を意味し、例えば、放射性標識（ ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C など）、蛍光標識（FAM及びVICなど）、酵素標識（ビオチンなど）、抗原標識（ジゴキシゲニン（DIG）など）等の当業者に周知の方法を用いることができる。

【0019】

（F2R2タンパク質又はその部分ペプチド）

更に別の態様において、本発明は、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドに関する。ここで、「配列番号3に記載のアミノ酸配列」とは、配列番号3に記載されたアミノ酸配列と完全に一致する配列の他、配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加された配列、又は、配列番号3に記載のアミノ酸配列と60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上のホモロジーを有する配列、あるいは、配列番号3に記載されたアミノ酸配列をコードするポリペプチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリペプチドによりコードされたアミノ酸配列を含み、例えば、図3に列挙されたいずれかの塩基配列によりコードされるアミノ酸配列であってもよい。本明細書における、配列番号3に記載のアミノ酸配列の一部を有するペプチドは、H・スイ斯特異的でなければならない。ここで、「H・スイ斯特異的」とは、H・スイス以外のいかなる種においても当該アミノ酸配列と相同性の高いポリペプチドが確認されないことを意味し、好ましくは、H・スイス以外のいかなる種においても当該アミノ酸配列と90%以上（又は、95%以上、98%以上、99%以上、100%）の相同性を有するポリペプチドが確認されないことを意味する。候補部分配列がH・スイ斯特異的であるか否かは、GenBank等のデータベース検索及び配列比較を行うことにより、適宜確認することができる。好ましくは、配列番号3に記載のアミノ酸配列の一部を有するペプチドは、オリジナルのタンパク質（配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質）の50%以上のアミノ酸を有するペプチドであり、より好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上のアミノ酸配列を有するペプチドである。

【0020】

例えば、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドとして好ましくは、抗体により認識される（抗原性を有する）タンパク質又はペプチドであり、最も好ましくはF2R2タンパク質である。候補タンパク質又はペプチドが抗体により認識されるか否かは、例えば、既に得られている抗体又は抗体を含有するサンプルと当該候補タンパク質又はペプチドとを接触させ、抗体への当該候補タンパク質又はペプチドの結合を測定（検出）し、結合する場合には候補タンパク質又はペプチドが抗体により認識されると判定することにより決定することができる。

【0021】

本発明の配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドは、必要に応じて標識化されていてもよい。当該標識としては、放射能標識、酵素、蛍光標識、生物発光標識、化学発光標識金属等の検出可能な標識を用いることができる。このような標識としては、これに限定されるものではないが例として、 ^{32}p ^3H

10

20

30

40

50

、¹²⁵I、¹⁴C等の放射能標識；ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミノオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ等の酵素；FAD、FMN、ATP、ピオチン、ヘム等の補酵素又は補欠分子族；フルオレセイン誘導体（フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フルオレセインチオフルバミル等）、ローダミン誘導体（テトラメチルローダミン、トリメチルローダミン（RITC）、テキサスレッド、ローダミン110等）、Cy色素（Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7）、Cy-クロム、スペクトラムグリーン、スペクトラムオレンジ、プロビジウムイオダイド、アロフィコシアニン（APC）、R-フィコエリスリン（R-PE）等の蛍光標識；ルシフェラーゼ等の生物発光標識；あるいは、ルミノール、イソルミノール、N-（4-アミノブチル）-N-エチルイソルミノースエステル等のルミノール誘導体、N-メチルアクリジニウムエステル、N-メチルアクリジニウムアシルスルホンアミドエステル等のアクリジニウム誘導体、ルシゲニン、アダマンチルジオキセタン、インドキシル誘導体、ルテニウム錯体等の化学発光標識；金コロイド等の金属等の検出可能な標識を挙げることができる。

10

【0022】

（抗体又はその断片）

他の態様において、本発明は、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体若しくはその免疫反応性断片に関する。「抗体の免疫反応性断片」とは、抗体の一部分（部分断片）または抗体の一部分を含むペプチドであって、抗体の抗原への結合作用を保持するものを意味する。このような抗体の断片としては、例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、一本鎖Fv（以下、「scFv」という）、ジスルフィド結合Fv（以下、「dsFv」という）若しくはこれらの重合体、二量体化V領域（以下、「Diabody」という）、またはCDRを含むペプチドを挙げることができる。好ましくは、本発明の抗体若しくはその免疫反応性断片は、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド特異的に認識する。

20

【0023】

本明細書全体に亘って、「特異的に認識する」又は、「特異的に結合する」とは、目的の物質と結合するが、その他の物質とは結合しないことを意味する。候補物質が目的の物質と結合するか否か、及び/又は、その他の物質と結合しないか否かは、サザンハイブリダイゼーション、PCR、ウェスタンブロッティング、及びELISAのいずれの方法により確認されるものであってもよい。ウェスタンブロッティングにより確認する場合、例えば、F2R2タンパク質を、2% SDS、10% グリセロール、50mM Tris-HCl（pH 6.8）、100mM ジチオスレイトール溶液中に溶解し、煮沸して抗His抗体及び被検抗体によりウェスタンブロット分析を行うことにより確認することができる。サザンハイブリダイゼーション、PCR、又はELISAにより確認する場合、後述の方法を利用して確認することができる。ここで、「結合しない」又は「認識しない」とは、目的の物質への結合との比較において、結合しない（又は認識しない）とされる核酸、タンパク質又はペプチドへの被検物質の結合が充分区別可能な程度低い場合を含む。例えば、目的の物質と比較した、その他の物質との交差反応率が、1%以下、0.5%以下、0.3%以下、0.1%以下、0.05%以下、0.03%以下であってもよい。交差反応性は、{（比較対象となるその他の物質への結合に関する実測値（濃度））/（比較対象となるその他の物質の添加サンプル濃度）×100%}として計算して得ることができる。

30

40

【0024】

本発明の抗体は、F2R2タンパク質を特異的に認識することができる限り、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。ここで、「モノクローナル抗体」は、単一クローンに由来する抗体であることを意味する。本発明の抗体は、完全抗体の他、抗原との結合活性を保持する限り、バイスペシフ

50

ック抗体、及び一本鎖抗体を含む。完全抗体は、非ヒト動物の抗体、非ヒト動物の抗体のアミノ酸配列とヒト由来の抗体のアミノ酸配列を有する抗体、及び、ヒト抗体を包含する。非ヒト動物の抗体としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどの抗体を挙げることができ、好ましくは、ハイブリドーマを作製することができる動物の抗体であり、より好ましくはマウスの抗体である。非ヒト動物の抗体のアミノ酸配列とヒト由来の抗体のアミノ酸配列を有する抗体としては、ヒト抗体に動物由来のモノクローナル抗体の抗原結合ドメインFvを入れ替えたヒト型キメラ抗体、動物由来抗体モノクローナル抗体の抗原結合に直接関わるFvドメイン上の配列であるCDRをヒト抗体のフレームに組み込んだヒト化抗体を挙げることができる。また、ヒト抗体とは、完全にヒト由来の抗体遺伝子の発現産物であるヒト抗体のことである。また、本発明の抗体のイムノグロブリンクラスは特に限定されるものではなく、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD、IgYのいずれのイムノグロブリンクラスであってもよく、好ましくはIgGである。また、本発明の抗体はいずれのアイソタイプの抗体をも包含するものである。

10

20

30

40

50

【0025】

(検出薬)

本発明は、前記核酸コンストラクト、前記タンパク質若しくはペプチド、又は、前記抗体又はその免疫反応性断片を含有する、H・スイス検出薬に関する。言い換えれば、本発明は、H・スイスの検出に使用するための前記核酸コンストラクト、前記タンパク質若しくはペプチド、又は、前記抗体又はその免疫反応性断片に関する。あるいは、本発明は、H・スイスの検出薬を製造するための、前記核酸コンストラクト、前記タンパク質若しくはペプチド、又は、前記抗体又はその免疫反応性断片の使用に関する。

【0026】

(キット)

別の態様において、本発明は、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸コンストラクト、あるいは、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、又は、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体若しくはその免疫反応性断片を含有する、H・スイス感染の判定用キット、又はH・スイス感染症の診断用キットに関する。本発明のキットは、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸コンストラクト、あるいは、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、又は、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体若しくはその免疫反応性断片に加えて、好ましくは、固相、ハプテン、及び不溶性担体からなる群より選択される担体を含む。

【0027】

配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸コンストラクトを含有する測定(検出)キットは、核酸を用いた公知の方法に基づくことができる。このような方法としては、例えばハイブリダイゼーションを利用した方法;PCRを利用した方法;並びに、インベダー(登録商標)法として知られる方法(例えば、Kwiatkowski, R.W.ら、Mol. Diagn. (1999) 4: 353-364参照)を挙げることができる。

【0028】

例えば、本発明のキットは、標識化された配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと特異的に結合する核酸コンストラクトが固定化した固相又はハプテンを含むキットとすることができる。また、本発明のキットがハプテンを含む場合、更にハプテンと特異的に結合する物質が固定化した固相をさらに含んでいてもよい。

【0029】

または、本発明のキットは、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくは

その一部を有するポリヌクレオチドと特異的に結合するプライマー（又はプライマーペア）を含んでいてもよい。

【0030】

あるいは、本発明のキットは、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと相補的な配列及び消光プローブの一部と相補的な配列（フラップ）を備えるアレル特異的プローブ、配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドと相補的な配列を備えるインバーダープローブ、三重鎖特異的DNA分解酵素、及び、消光プローブを備える蛍光標識ユニバーサルプローブを備えることができる。上記フラップは、各アレル特異的プローブ間で異なっていることが好ましい。上記蛍光標識は、当業者周知のプローブを適宜選択することができ、各蛍光標識ユニバーサルプローブ間で異なっていることが好ましい。例えば、蛍光標識として、FAM及びVICを使用することができる。

10

【0031】

配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、又は、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体若しくはその免疫反応性断片を含有する測定（検出）キットは、抗体分子を用いた公知の方法に基づくことができる。このような方法としては、例えば、標識化免疫測定法；イムノプロットイング法；イムノクロマト法；クロマトグラフィ法；比濁法（TIA法）；比ろう法（NIA法）；比色法；ラテックス凝集法（LIA法）；粒子計数法（CIA法）；化学発光測定法（CLIA法、CLEIA法）；沈降反応法；表面プラズモン共鳴法（SPR法）；レゾナントミラーディテクター法（RMD法）；比較干渉法等を挙げることができる。本発明のキットが、所望の測定を実施することが可能であるか否かは、当該サンプル又は当該濃度のサンプルを用いて、各測定法を当業者周知の方法により実施することにより、検出可能であるか否かを測定することにより確認することができる。

20

【0032】

例えば、本発明のキットは、(i)配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、あるいは、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドと（特異的に）結合する抗体若しくはその免疫反応性断片が固定化した固相又はハプテン、及び(ii)標識化された第二抗体を含む免疫化学測定のキットとすることができる。また、本発明のキットがハプテンを含む場合、更にハプテンと特異的に結合する物質が固定化した固相をさらに含んでいてもよい。

30

【0033】

あるいは、本発明のキットは、(i)標識化された第一抗体が固定化した固相、及び、(ii)配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、あるいは、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドと（特異的に）結合する第二抗体若しくはその免疫反応性断片が固定化したハプテンを含む免疫化学測定のキットとすることができる。また、当該キットは更に、ハプテンと特異的に結合する、標識された物質を含んでいてもよい。

40

【0034】

本発明のキットにおいて、固相は免疫化学測定に使用できる固相であれば特に限定されないが、例えば、ニトロセルロース、セファロース、ナイロン、ビニロン、ポリエステル、アクリル、ポリオレフィン、ポリウレタン、レーヨン、ポリノジック、キュブラ、リヨセル、アセテート、ポリビニリデンジフルオリド、シリコンラバー、ラテックス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、フッ素加工樹脂、ABS樹脂、AS樹脂、アクリル樹脂、ポリマーアロイ、ガラス繊維、炭素繊維、ガラス、ゼラチン、ポリアミノ酸及び/又は磁気感受性素材等を含有する、プレート、チューブ、チップ（例えば、プロテインチップ、ラボチップ等）、ビーズ、膜、吸収体及び/又は粒子等を挙げることができ、好ましくは、プ

50

レート及び磁気ビーズである。本明細書において不溶性担体とは、ビーズ等の懸濁可能な不溶性の固相を意味し、例えば、ラテックスビーズや磁気ビーズを挙げることができる。

【0035】

本発明のキットは、必要に応じて、発色試薬、反応停止用試薬、標準抗原試薬、サンプル前処理用試薬、ブロッキング試薬等を含んでもよい。また、本発明のキットが標識化された抗体を含む場合、更に標識と反応する基質を含んでもよい。更に、本発明のキットは、添付文書、説明書、及びキットを格納する容器等を適宜含んでもよい。

【発明の効果】

【0036】

本発明に係るH. スイス特異的塩基配列と、その塩基配列を標的としたPCR診断法を用いることにより、従来のH. ピロリの診断法で検出されないH. スイス感染を迅速かつ確実な診断が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】ヘリコバクター属の系統図を示す。

【図2】非翻訳領域（約590塩基対）のH. スイス特異的塩基配列を示す。

【図3】翻訳領域（約550塩基対）H. スイス特異的塩基配列（F2R2遺伝子領域）を示す。

【図4】H. スイス特異的な2箇所の配列を標的としたPCRプライマー、及びH. ピロリのvacA遺伝子を標的としたプライマーを用いて行ったPCR産物をアガロースゲル電気泳動を行った写真である。各レーンで用いたサンプルは、以下のとおりである。レーンM：100-塩基対 DNA マーカー；レーン1：非感染マウスからのDNA（100ng）；レーン2：H. スイス TKY感染マウスからのDNA（100ng）；レーン3：H. スイス SNTW101感染マウスからのDNA（100ng）；レーン4：H. スイス SH8感染マウスからのDNA（100ng）；レーン5：H. スイス SH10感染マウスからのDNA（100ng）；レーン6：H. スイス HS5のDNA（10ng）；レーン7：H. ハイルマイers. s. ASB1.4からのDNA（10ng）；レーン8：H. フェリス ATCC49179からのDNA（10ng）；レーン9：H. バクリフォルミス M50からのDNA（10ng）；レーン10：H. ビゾゼロニー R1051からのDNA（10ng）；レーン11：H. シノガストリクス JK M4からのDNA（10ng）；レーン12：H. ムステーレ NCTC12032からのDNA（10ng）；レーン13：H. サルモニス R1053からのDNA（10ng）；レーン14：H. ピロリ SS1からの（10ng）；レーン15：H. ピロリ TN2GF4からのDNA（10ng）；レーン16：H. ピロリ NCTC11637からのDNA（10ng）；レーン17：H. ピロリ ATCC43579からのDNA（10ng）；レーン18：H. ピロリ RC-1からのDNA（10ng）。また、写真右側の矢印は、以下のバンドを示す。「418bp」：VAC3624/VAC4041Rプライマーペアにより増幅されたバンド（H. ピロリのvacA遺伝子）；「348bp」：HH-F5/HH-R4プライマーペアにより増幅されたバンド（H. スイスの非翻訳領域）；「220bp」：HH-F2/HH-R2プライマーペアにより増幅されたバンド（H. スイスのF2R2遺伝子）。

【図5】HH. スイス特異的な2箇所の配列を標的としたPCRプライマー、及びH. ピロリのvacA遺伝子を標的としたプライマーを用いて行ったPCR産物をアガロースゲル電気泳動を行った写真である。各レーンで用いたサンプルは、以下のとおりである。レーンM：100-塩基対 DNA マーカー；レーン1：H. ピロリ SS1からのDNA（10ng）；レーン2：H. スイス TKY感染マウスからのDNA（100ng）；レーン3、4、5及び16：UBT陰性患者の胃バイオブシーからのDNA（100ng）；レーン6、7、8、9、10、11、12、13、14及び15：UBT陽性患者の胃バイオブシーからのDNA（100ng）。また、写真右側の矢印は、以下のバンドを示す。「418bp」：VAC3624/VAC4041Rプライマーペアにより増幅

10

20

30

40

50

されたバンド（H．ピロリのvacA遺伝子）；「220bp」：HH-F2/HH-R2プライマーペアにより増幅されたバンド（H．スイスのF2R2遺伝子）。

【図6】F2R2配列にコードされているタンパク質の電気泳動分析の写真である。各レーンで用いたサンプルは、以下のとおりである。レーンM：分子量マーカー；レーン1、2：形質転換体1；レーン3、4：形質転換体2；レーン5、6：形質転換体3；レーン1、3、5：IPTGによる発現誘導なし；2、4、6：IPTGによる発現誘導あり。矢印はF2R2タンパク質のバンドを示す。

【図7】H．スイス感染マウス血清を用いたウエスタンブロッティング分析の写真である。各レーンで用いたサンプルは、以下のとおりである。レーンM：分子量マーカー；レーン1、2：分泌タンパク質；レーン3、4、5、6：菌体タンパク質；レーン1、3、5：IPTGによる発現誘導なし；2、4、6：IPTGによる発現誘導あり。矢印はF2R2タンパク質のバンドを示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明のポリヌクレオチド、核酸コンストラクト、タンパク質若しくはペプチド、及び、抗体若しくはその免疫反応性断片は当業者周知の方法により適宜調製することができる。また、本発明の検出薬及び検出用キットは、当該技術分野周知の方法により、適宜製造することができる。

【0039】

本発明におけるH．スイスの存在を判定する方法は、被験者由来のサンプルにおける、(i)配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチド、(ii)配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチド、及び、(iii)配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体からなる群から選択される少なくとも一つを測定（検出）することを備える。

【0040】

(i)配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドを測定（検出）することを備える、H．スイスの存在を判定する方法

ポリヌクレオチドを測定（検出）することによる、H．スイスの検出は、ハイブリダイゼーションを利用した方法；PCRを利用した方法；並びに、インベダー（登録商標）法として知られる方法（例えば、Kwiatkowski, R.W.ら、Mol. Diagn. (1999) 4: 353-364参照）により行うことができる。

【0041】

ハイブリダイゼーションを利用した方法としては、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、DNAマイクロアレイ、ASO法等の方法を挙げることができる。例えば、本発明におけるH．スイスの存在を判定する方法は、以下のステップを備えていてもよい：

(a)少なくとも1つの配列番号1若しくは配列番号2に記載の塩基配列若しくはその一部と結合する核酸コンストラクトと被験者由来のサンプルを接触させるステップ；

(b)前記サンプル中のポリヌクレオチドへの該核酸コンストラクトの結合を測定（検出）するステップ；及び、

(c)該核酸コンストラクトが結合するポリヌクレオチドが測定（検出）されたサンプルを、H．スイスが存在するサンプルとして決定し、かつ、該核酸コンストラクトが結合するポリヌクレオチドが測定（検出）されなかったサンプルを、H．スイスが存在しないサンプルとして決定することにより、H．スイスの存在を判定するステップ。

【0042】

また、PCRを利用した方法としては、ARMS (Amplification Refractory Mutation System)法、RT-PCR (Reverse transcriptase-PCR)法、Nested PCR法等の方法を挙げ

10

20

30

40

50

ることができる。例えば、本発明における H . スイスの存在を判定する方法は、以下のステップを備えていてもよい：

(a) 配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列若しくはその一部を有する核酸を増幅させるステップ；

(b) 前記核酸の増幅量を検出し、配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列若しくはその一部を有する核酸の存在を測定（検出）するステップ；並びに、

(c) 該核酸の増幅が測定（検出）されたサンプルを、H . スイスが存在するサンプルとして決定し、かつ、該核酸の増幅が測定（検出）されなかったサンプルを、H . スイスが存在しないサンプルとして決定することにより、H . スイスの存在を判定するステップ。

【 0 0 4 3 】

増幅された核酸は、ドット・プロット・ハイブリダイゼーション法、表面プラズモン共鳴法（SPR法）、PCR-RFLP法、In situ RT-PCR法、PCR-SSO（sequence specific Oligonucleotide）法、PCR-SSP法、AMPFLP（Amplifiable fragment length polymorphism）法、MVR-PCR法、PCR-SSCP（single strand conformation polymorphism）法を挙げることができる。

【 0 0 4 4 】

インベーター（登録商標）法として知られる方法を用いて行う場合、例えば、本発明の配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列若しくはその一部を有するポリヌクレオチドを測定（検出）することを備える H . スイスの存在を判定する方法は、以下のステップを備えていてもよい：

(a) 以下の (i) 及び (i i) に記載の核酸に該試料を接触させて、アレルプローブと相補的な DNA に三重鎖を形成させるステップ；

(i) 配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列の一部と相補的な配列及び消光プローブの一部と相補的な配列（フラップ）を備えるアレル特異的プローブ、及び/又は、配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列の一部と相補的な配列及び消光プローブの一部と相補的な配列（フラップ）を備えるアレル特異的プローブ、

(i i) 配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列の一部と相補的な配列を備えるインベータープローブ；

(b) (a) により得られた核酸試料に、三重鎖特異的 DNA 分解酵素を接触させて三重鎖を形成した核酸からフラップを遊離させるステップ；

(c) 遊離されたフラップを、それぞれ当該フラップと相補的な配列及び消光プローブを備える蛍光標識ユニバーサルプローブと接触させるステップ；

(d) (c) により得られた核酸試料に、三重鎖特異的 DNA 分解酵素を接触させて蛍光標識を遊離させ、蛍光を発色させるステップ；

(e) 発色した蛍光を検出することにより、配列番号 1 若しくは配列番号 2 に記載の塩基配列を有するポリペプチドを測定（検出）するステップ；ここで、蛍光発色が検出されたサンプルを、H . スイスが存在するサンプルとして決定し、かつ、蛍光発色が検出されなかったサンプルを、H . スイスが存在しないサンプルとして決定することにより、H . スイスの存在を判定するステップ。

【 0 0 4 5 】

(i i) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを測定（検出）することを備える、H . スイスの存在を判定する方法

タンパク質若しくはペプチドを測定（検出）することによる、H . スイスの検出は、酵素免疫測定法（EIA法）、簡易EIA法、酵素結合イムノソルベントアッセイ法（ELISA法）、ラジオイムノアッセイ法（RIA法）、蛍光免疫測定法（FIA法）等の標識化免疫測定法；ウェスタンブロッティング法等のイムノブロッティング法；金コロイド凝集法等のイムノクロマト法；イオン交換クロマトグラフィ法、アフィニティクロマトグラフィ法等のクロマトグラフィ法；比濁法（TIA法）；比ろう法（NIA法）；比色法

10

20

30

40

50

；ラテックス凝集法（L I A法）；粒子計数法（C I A法）；化学発光測定法（C L I A法、C L E I A法）；沈降反応法；表面プラズモン共鳴法（S P R法）；レゾナントミラーディテクター法（R M D法）；比較干渉法等により行うことができる。

【0046】

よって、本発明の方法は、以下のステップを備えていてもよい：

（a）少なくとも1つの配列番号3に記載のアミノ酸配列又はその一部を認識する抗体若しくはその免疫反応性断片（第1抗体）に被験者由来のサンプルを接触させるステップ；

（b）必要に応じて、更に、前記抗体若しくはその免疫反応性断片とは異なる、配列番号3に記載のアミノ酸配列又はその一部を認識する抗体若しくはその免疫反応性断片（第2抗体）を（a）のステップにより得られたサンプルに接触させるステップ；

（c）（標識を利用して）配列番号3に記載のアミノ酸配列又はその一部を有するタンパク質若しくはペプチドの前記抗体若しくはその免疫反応性断片への結合を測定（検出）するステップ；

（c）該抗体若しくはその免疫反応性断片へのタンパク質又はペプチドの結合が測定（検出）されたサンプルを、H．スイスが存在するサンプルとして決定し、かつ、該抗体若しくはその免疫反応性断片へのタンパク質又はペプチドの結合が測定（検出）されなかったサンプルを、H．スイスが存在しないサンプルとして決定することにより、H．スイスの存在を判定するステップ。

前記方法において、必要に応じて、第1抗体及び/又は第2抗体は標識化されていてもよい。

【0047】

（i i i）配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドを認識する抗体を測定（検出）することを備える、H．スイスの存在を判定する方法

F 2 R 2を認識する抗体を測定（検出）することによる、H．スイスの検出は、酵素免疫測定法（E I A法）、簡易E I A法、酵素結合イムノソルベントアッセイ法（E L I S A法）、ラジオイムノアッセイ法（R I A法）、蛍光免疫測定法（F I A法）等の標識化免疫測定法；ウェスタンブロッティング法等のイムノブロッティング法；金コロイド凝集法等のイムノクロマト法；イオン交換クロマトグラフィ法、アフィニティクロマトグラフィ法等のクロマトグラフィ法；比濁法（T I A法）；比ろう法（N I A法）；比色法；ラテックス凝集法（L I A法）；粒子計数法（C I A法）；化学発光測定法（C L I A法、C L E I A法）；沈降反応法；表面プラズモン共鳴法（S P R法）；レゾナントミラーディテクター法（R M D法）；比較干渉法等により行うことができる。

【0048】

より具体的には、本発明の方法は、以下のステップを備えていてもよい：

（a）少なくとも1つの配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはその一部を有するタンパク質若しくはペプチドに被験者由来のサンプルを接触させるステップ、

（b）配列番号3に記載のアミノ酸配列又はその一部を有するタンパク質若しくはペプチドへの被験者由来サンプル中の抗体の結合を検出するステップ；

（c）配列番号3に記載のアミノ酸配列又はその一部を有するタンパク質若しくはペプチドへの該抗体の結合が測定（検出）されたサンプルを、H．スイスが存在するサンプルとして決定し、かつ、配列番号3に記載のアミノ酸配列又はその一部を有するタンパク質若しくはペプチドへの該抗体の結合が測定（検出）されなかったサンプルを、H．スイスが存在しないサンプルとして決定することにより、H．スイスの存在を判定するステップ。

【0049】

配列番号3に記載のアミノ酸配列又はその一部を有するタンパク質若しくはペプチドへの被験者由来サンプル中の抗体の結合の測定（検出）は、例えば、標識化抗I g G抗体、又は抗F c抗体等とサンプルを接触させて、当該標識を利用して測定することにより行う

ことができる。

【0050】

抗体又はその断片の標識化は当分野において一般的な方法により行うことができる。例えば、タンパク質又はペプチドを蛍光標識する場合、タンパク質又はペプチドをリン酸緩衝液で洗浄した後、DMSO、緩衝液等で調整した色素を加え、混合した後室温で10分間静置することにより結合させることができる。また、市販の標識キットとして、ビオチン標識キット(Biotin Labeling Kit - NH₂、Biotin Labeling Kit - SH: 株式会社同仁化学研究所)、アルカリフォスファターゼ標識用キット(Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH₂、Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH: 株式会社同仁化学研究所)、ペルオキシダーゼ標識キット(Peroxidase Labeling Kit - NH₂、Peroxidase Labeling Kit - NH₂: 株式会社同仁化学研究所)、フィコビリプロテイン標識キット(Allophycocyanin Labeling Kit - NH₂、Allophycocyanin Labeling Kit - SH、B-Phycocerythrin Labeling Kit - NH₂、B-Phycocerythrin Labeling Kit - SH、R-Phycocerythrin Labeling Kit - NH₂、R-Phycocerythrin Labeling Kit - SH: 株式会社同仁化学研究所)、蛍光標識キット(Fluorescein Labeling Kit - NH₂、HiLyte Fluor (登録商標) 555 Labeling Kit - NH₂、HiLyte Fluor (登録商標) 647 Labeling Kit - NH₂: 株式会社同仁化学研究所)、DyLight 547、DyLight 647 (テクノケミカル株式会社)、Zenon (登録商標) Alexa Fluor (登録商標) 抗体標識キット、Qdot (登録商標) 抗体標識キット(インビトロゲン社)、EZ-Label Protein Labeling Kit (フナコシ株式会社)等を用いて標識することもできる。また、標識した抗体又はその断片の検出は、適宜標識に適した機器を使用することにより行うことができる。

【0051】

H. スイスは広く哺乳動物に感染することから、本明細書記載のH. スイス存在を判定する方法における被験者は、ヒト、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及びウマ等の哺乳動物とすることができ、好ましくは、ヒトであり、より好ましくは、ヒトの鳥肌胃炎患者である。また、本発明の方法は、定性的、定量的または半定量的に行うことができる。

【0052】

本明細書記載のH. スイス存在を判定する方法において用いるサンプルとしては、例えば、生検として被験者から採取した組織試料または被験者から採取した液体を使用することができる。サンプルは、本発明の方法の対象となるものであれば特に限定はなく、例えば、組織、血液、血漿、血清、リンパ液、尿、便、漿液、髄液、関節液、眼房水、涙液、唾液またはそれらの分画物若しくは処理物を挙げることができる。本明細書記載のH. スイス存在を判定する方法において核酸を検出対象とする場合には、サンプルとして好ましくは組織(特に胃組織(胃バイオプシーサンプル))又は便である。本明細書記載のH. スイス存在を判定する方法において抗体を検出対象とする場合には、サンプルとして好ましくは、血液、血漿、血清、リンパ液である。

【0053】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。

【実施例】

【0054】

(実施例1) H. スイスの塩基配列の決定

1. 塩基配列決定用のH. スイスの調製

カニクイサルから分離されたH. スイス TKY株、及び、女性の鳥肌胃炎患者の胃バイオプシーから分離されたH. スイス SNTW101株、並びに、参照用として胃MALリンパ腫の男性患者から分離されたH. スイス SH8株、及び、慢性胃炎の男性患者から分離されたH. スイス SH10株を、それぞれ別の雌C57BL/6Jマウスの胃で経代した。経代は、感染マウスの胃粘膜を0.01%のゼラチンを含む燐酸緩衝生理食塩水(BSG、pH 7.4)で懸濁し、4週齢の非感染C57BL/6Jマウスへ経口感染させることにより行った。1匹の感染マウスから3匹の非感染マウスへ経代し、3~6ヶ月の間隔で経代を繰り返した。

【0055】

2. マウス胃粘膜懸濁液からのH. スイスのゲノムDNAの調製

感染マウスの胃粘膜の懸濁液からH. スイス以外に胃粘膜と共存する腸内細菌からH. スイスを抽出した後にゲノムDNAを調製し、次世代DNAシーケンサー(SOLID、ライフテクノロジー社)を用いて調製したDNAの全塩基配列を決定した。具体的には、H. スイスを感染させたマウス胃粘膜をガラススライドで削り取り、0.05%(vol/vol) Tween 20を含有する氷冷リン酸緩衝液(PBS; pH 7.4)で、二つのガラススライドを用いてホモジナイズさせた。粘膜ホモジネートをセルストレーナー(40µm、ナイロン; BD フアルコン、ファランクリンレイクス、NJ、米国)でフィルター濾過することにより細胞塊を除去した。非特異的吸着を避けるため、フィルター濾過したものを非免疫ウサギIgG被覆磁気ビーズ(Sepa-Max Hp; 和光純薬)で処理した。非吸着上清をウサギ抗H. ピロリ抗体被覆磁気ビーズ(Sepa-Max Hp; 和光純薬)で処理して、ヘリコバクター菌を分離した。得られた細菌細胞を蒸留水に懸濁させ、加熱処理(95、5分間)及び遠心(10,000g、5分間)した後、上清をRNase A処理(10µg/mL、37、1時間)して、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によりH. スイスのゲノムDNAを調製した。DNA純度は、iQ SYBRグリーンスーパーミックス(Bio-Rad)、及び、以下のプライマーペアを用いて、CFX96リアルタイムPCR検出システム(Bio-Rad、ヘルクレス、CA、米国)による量的リアルタイムPCRで確認した。

【0056】

【表1】

表1. 量的リアルタイムPCRで用いたプライマーペア

プライマーペア	検出遺伝子
341F/519R	腸内細菌の16S rRNA 遺伝子
Hei1F/Hei1R	H. スイスの16S rRNA 遺伝子
MactinF/MactinR	マウスβアクトリン遺伝子

【0057】

また、各プライマーの配列を以下の表2に示す。

【0058】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. 量的リアルタイムPCRで用いたプライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列	配列番号
341F	ctacgggaggcagcagtg	4
519R	attaccgcgckgctg	5
HeilF	aagtcgaacgatgaagccta	6
HeilR	atttggtattaatcaccatttc	7
MactinF	ggcaccacacyttctacaatg	8
MactinR	ggggtgttgaaggtctcaaac	9

10

【0059】

CFX96リアルタイムPCRは、以下のプロトコルで実施した：編成及び熱開始酵素活性化プログラム（95、3分間）、増幅及び定量プログラム（95、10分間、及び60、15分間、単一蛍光測定）を50回反復、及び溶融曲線プログラム（65~95、0.5 / 秒の加熱速度、及び、連続的蛍光測定）。標準段階希釈液を各実験プレートにおいて用い、16S RNAの半定量及びアクチン遺伝子の正規化は、平均値に基づき行った。標的遺伝子の量は、分離された*Streptococcus pyogenes* GAS472株の染色体DNAを用いて作製した。細菌ゲノムDNA（H. スイスを含む）の収量は、H. スイスTKY株又はH. スイスSNTW101株を感染させた1匹のマウスから1µgであり、H. スイスのDNAの純度は30~60%であった。

20

【0060】

3. ゲノム配列決定

全ゲノム配列決定は、SOLiDシーケンサー（Life Technologies、カールスバッド、CA、米国）を用いて、サイクルライゲーション配列決定法（cycled ligation sequencing）により行った。約3~5µgの精製細菌ゲノムDNAを、120µLの10mmol/L TEバッファーを含むCovarisマイクロチューブ中、Covaris S2システム（Covaris Inc.、ウォバーン、MA、米国）を用いて、Duty Cycle 20%、Intensity 5、Cycles per Burst 200、5で60秒間粉碎することにより、100~150bpに切断した。得られたDNA断片は、SOLiDフラグメントライブラリー構築キット（Life Technologies）を用いてSOLiDのバーコードが付与されたフラグメントライブラリーに配置した。DNA断片ライブラリーを、ライブラリー濃度0.5pmol/LでエマルジョンPCR（ePCR）により増幅した。鋳型濃縮ビーズの3'末端を修飾し、SOLiDシーケンサースライド上にデポジットした。スライドをSOLiD4シーケンサー上にロードし、ペアードエンド50+35塩基で200億塩基（20Gb）以上の情報を得た。

30

【0061】

4. 配列アセンブリ

SOLiDシーケンサーから得られた色データを、SOLiDデノボアクセサリーツールv.2.0（Denovo2）を用いてアセンブルした。これは、内部で、エラー修正、ギャップ充填、及び色データから塩基データへの翻訳を含む前後のプロセスと組み合わされた、アセンブリエンジンとしてのVelvetを利用している。デフォルトパラメーターセットでのアセンブリでは、非常に短いコンティグしか得られなかった（H. スイスTKY株 2.12Mb、H. スイスSNTW101株 1.62Mb）。そこで、いくつかのアセンブリパラメーターを試みることで、最も長い全コンティグサイズを生じる一つの配列を選択した。この配列に用いたパラメーターセットは、hsize=23、covcutoff=0.3、maxcov=1000、及びmin_pair_count=3であった。

40

50

【 0 0 6 2 】

(実施例 2) H. スイス特異的配列の探索

1. H. スイスゲノム配列の比較分析

アセンブル解析により得られた多数のコンティグ配列と、EMBL/GenBank/DDDBJデータベース上に登録されているH. スイス HS1株、及びH. スイス HS5株(両株ともブタからの分離株)のゲノム塩基配列とを、FASTAを用いて塩基配列のアライメントを行った。EMBL/GenBank/DDDBJデータベース上に登録されているH. スイスのコンティグ塩基配列は以下の通りである。

HS1株 GenBank accession No. ADGY00000000

HS5株 GenBank accession No. ADHO00000000

10

【 0 0 6 3 】

また、アセンブル解析により得られた多数のコンティグ配列について、EMBL/GenBank/DDDBJデータベースでBLASTX検索を行った。その結果、89.9%のケースで、H. スイス、他のヘリコバクター種、及び、カンピロバクター種がトップヒット配列であった。よって、EMBL/GenBank/DDDBJデータベース上に公開されているカンピロバクター(Campylobacter)属11菌種、及び、ヘリコバクター属20菌種(表3)の全ゲノム塩基配列について、RECOG(Research Environment for Comparative Genomics; <http://mbgd.genome.ad.jp/RECOG/>)を用いて比較ゲノム解析を行った。

20

【 0 0 6 4 】

【表 3】

表3. 比較解析を行ったEMBL/GenBank/DDDBJ登録のカンピロバクター属11株及びヘリコバクター属20の株名及びアクセッション番号

株名	株数	GenBank アクセッション番号
カンピロバクター属		
<i>C. jejuni</i> (C. ジェジュニ)	6株	M1221、269.97、81-176、NCTC 11828、NCTC 11168、ICDCCJ07001
<i>C. concisus</i> (C. コンシサス)	1株	13826
<i>C. curvus</i> (クルブス)	1株	525.92
<i>C. fetus</i> (C. フェタス)	1株	82-40
<i>C. hominis</i> (C. ホミニス)	1株	ATCC BAA-381
<i>C. lari</i> (C. ラリ)	1株	RM2100
ヘリコバクター属		
<i>H. pylori</i> (H. ピロリ)	10株	26695、B38、B8、G27、HPAG1、J99、P12、PeCan4、SJM180、Shi470
<i>H. suis</i> (H. スイス)	4株	HS1、HS5、TKY、SNTW101
<i>H. acinonychis</i> (H. アシニキス)	1株	SHeeba
<i>H. felis</i> (H. フェリス)	1株	ATCC 49179
<i>H. hepaticus</i> (H. ヘパティカス)	1株	ATCC 51449
<i>H. mustelae</i> (H. ムステレー)	1株	12198
<i>H. bialaoaeronii</i> (H. ビゾゼロニー)	1株	CIII-1
<i>H. heilmannii</i> s. s. (H. ハイルマニー s. s.)	1株	ASB1.4

30

40

50

【 0 0 6 5 】

その結果、H. スイスに共通して存在し、かつ、類縁のカンピロバクター属、ヘリコバクター属及び腸内細菌属に存在しない、2箇所のH. スイス特異的塩基配列を見出した(図2: 配列番号1、及び図3: 配列番号2)。このうち一つの配列(図2: 配列番号1)は、オープンリーディングフレームをコードしない配列であったが、もう一方の配列(図3、配列番号2)はタンパク質をコードする遺伝子を含んでおり、この配列はH. スイス以外の他のヘリコバクター種の染色体には存在しない配列であった。この配列に近い配列をデータベース上で検索したが、H. スイス以外の主に由来する配列で、50%以上のホモロジーを与える配列は存在しなかった。最も近い配列としては、*Azospirillum brasiliense*の*carR*遺伝子の配列と44%が一致したが、この菌は炭素固定により、植物の成長を助ける土壌にいる細菌であり、*carR*遺伝子は、炭素固定に係わる遺伝子の発現の調節遺伝子であった。H. スイスは炭素固定機能は持たないと考えられることから、本実験により見出されたタンパク質は*carR*とは異なるタンパク質であると考えられる。よって、本発明者らは、本塩基配列によりコードされる遺伝子をF2R2と命名した。

10

【 0 0 6 6 】

【表4】

表4. 図2に示すヘリコバクター属6株の説明及び配列のアクセッション番号

株名	説明	GenBank アクセッション番号
H. スイス TKY	カクイザルから分離株	AB849018
H. スイス SNTW101	鳥肌胃炎の患者からの分離株	AB849019
H. スイス SH8	胃 MALT リンパ腫の患者からの分離株	AB849020
H. スイス SH10	慢性胃炎の患者からの分離株	AB849021
H. スイス HS1	ブタからの分離株	ADGY01000090. 1
H. スイス HS5	ブタからの分離株	ADH0010000292. 1
H. フェリス	ATCC49179	FQ670179. 2
H. ビゾセロニ-	CIII-1	FR871757

20

30

【 0 0 6 7 】

【表5】

表5. 図3に示すヘリコバクター属6株の配列のアクセッション番号

株名	GenBank アクセッション番号
H. スイス TKY	AB849014
H. スイス SNTW101	AB849015
H. スイス SH8	AB849016
H. スイス SH10	AB849017
H. スイス HS1	ADGY01000086. 1
H. スイス HS5	ADH0010000186. 1

40

【 0 0 6 8 】

(実施例3) PCRによるH. スイスの検出

上述の実施例2において得られた2箇所の配列を標的としたPCRプライマーを構築し、H. スイス5菌株、H. ピロリ5菌株、その他のヘリコバクター7菌株から調製したDNAを鋳型としてPCRを行うことにより、これらの2箇所の標的配列がH. スイス特異

50

的であることを確認した。

【0069】

1. PCRの鋳型DNAの調製

DNeasy Blood & Tissueキット (Qiagen、デュッセルドルフ、ドイツ)を用いて、製造者のプロトコルに従って、以下の表6に記載の菌株及び14人の鳥肌胃炎患者の胃バイオプシーサンプルからDNAを抽出してPCR用の鋳型DNAを調製した。表6に記載の菌株のうち、調製方法が「培養」とあるものは、培養可能な株であることから、それぞれ後述の方法により培養して鋳型サンプルを調製した。また、表6に記載の菌株のうち、調製方法が「マウス胃粘膜」とあるものは、培養できない株であることから、感染マウスの胃粘膜から実施例1に記載の方法に準じて鋳型サンプルを調製した。

10

【0070】

【表6】

表6. PCRに用いたヘリコバクター属の菌株リスト

種	株数	株名	調製
H.ピロリ	5株	SS1, TN2GF4, NCTC 11637, ATCC 43579, RC-1	培養
H.スイス	1株	HS5	培養
H.ハイルマニー s. s	1株	ASB1.4	培養
H.フェリス	1株	ATCC 49179	培養
H.バクリフォルミス	1株	M50	培養
H.ピゾゼロニー	1株	R1051	培養
H.シノガストリクス	1株	JKM4	培養
H.ムステーレ	1株	NCTC 1203	培養
H.サルモニス	1株	R1053	培養
H.スイス	4株	TKY, SNTW101, SH8, SH10	マウス胃 粘膜

20

30

【0071】

培養可能な菌株の培養方法は以下のとおりである。

H.フェリス ATCC 49179株、H.ムステーレ NCTC 1203 2株、H.ピロリ SS1株、H.ピロリ TN2GF4株、H.ピロリ NCTC 11637株、H.ピロリ ATCC 43579株、及び、H.ピロリ RC-1株は、7% (vol/vol) 不活化子牛血清 (FCS) を含むブルセラ (Oxoid Ltd.、ハンブシャー、英国) 寒天平板に植菌し、5% O₂、10% CO₂、85% N₂ の混合ガス内で、37℃ 湿度100%の条件下で3日間培養した。生じたコロニーを釣菌して液体培地で更に3日間振とう培養を行った。

H.スイス HS5株 (ブタより分離)、H.ハイルマニー s. s. ASB1.4株 (ネコから分離)、H.バクリフォルミス M50株、H.ピゾゼロニー R1051株、H.シノガストリクス JKM4株、及び、H.サルモニス R1053株は、これまで報告された培養条件に従って培養した (Baele Mら、Int J Syst Evol Microbiol (2008) 58: 1350-8; Vermoote Mら、Vet Res (2011) 42: 51; Joosten Mら、Vet Res (2013) 44: 65; Baele Mら、Int J Syst Evol Microbiol (2008) 58: 357-64; Baele Mら、Baele Mら、j Clin Microbiol (2004) 42: 1115-22; Van den Bulck Kら、Int J Syst Evol Microbiol (2006) 56: 1559-64 参照)。

40

50

【0072】

2. PCR反応

1 × PCR 反応液 (全量 25 μL) は以下の組成とした。

200 μM dNTP ミックス

1.5 mM MgCl₂

0.2 μM プライマーペア

10 ng 培養菌株から調製した DNA、

又は、100 ng マウス胃粘膜から調製した DNA

1 ユニット Tfi DNA ポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

プライマーペアは、VAC3624F / VAC4041R (H. ピロリの vacA 遺伝子検出用)、HH-F5 / HH-R4 (H. スイスの非翻訳領域: 図2及び配列番号1) 検出用)、F2R22F / F2R22R (H. スイスの F2R2 遺伝子検出用: 図3及び配列番号2) の組み合わせを使用した。各プライマーの配列を表7に示す。

【0073】

【表7】

表7. H. ピロリ とH. スイス検出用PCR のプライマー

プライマー名	配列 (5' → 3')	配列番号	標的領域 (遺伝子)	増幅長さ
VAC3624F	gagcgagctatggttatgac	10	vacA	418 塩基対
VAC4041R	cattcctaaattggaagcgaa	11	H.ピロリ	非特許文献10
HH-F5	tgctctaccatgggcttag	12	非翻訳領域	348 塩基対
HH-R4	ggccaacccaaaccttcagc	13	H.スイス	
HH-F2	tagctctagggtagcaggaata	14	F2R2 遺伝子	220 塩基対
HH-R2	ctcaccacacctgctaglatittt	15	H.スイス	

【0074】

PCR 反応は、Mastercycler ep (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) を用いて以下の手順で行った。変性及びホットスタートを 94 で1分間行った後、94 で15秒間、57 で30秒間、72 で1分間増幅プログラムを35回繰り返した。その後、最終伸長として72 で10分間反応させた。得られた PCR 反応液 5 μL に 1 μL の 6 × ローディングバッファーを加え、2.0% (wt/vol) アガロースゲル電気泳動で分離し、得られた DNA バンドをエキジウムプロミドで染色して検出した。

【0075】

結果を図4に示す。実施例2において見出された2箇所のH. スイス特異的配列はH. スイスの全ての株 (TKY株、SNTW101株、SH8株、及びSH10株) で増幅したが、H. ピロリ及びその他のヘリコバクター7菌株では増幅していなかった。一方、H. ピロリの vacA 遺伝子は、H. ピロリサンプルのみで増幅していた。よって、実施例2において見出された2箇所のH. スイス特異的配列が、H. スイスが共通して有する配列であること、及び、H. スイスに特異的であることが確認された。

【0076】

(実施例4) ヒト胃バイオブシーのPCRによる診断

1. ヒト胃バイオブシーサンプルの調製

14人の鳥肌胃炎患者のヒト胃バイオブシーサンプルを生理食塩水で懸濁後、DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen; Dusseldorf, Germany) を用いて、添付の説明書に従ってPCR用の鋳型DNAを調製した。

【0077】

10

20

30

40

50

2. PCR法によるH. スイス感染の診断

反応溶液（全量25 μ L）は以下のように作成した。

1 \times PCR 反応液
 200 μ M dNTPミックス
 1.5mM MgCl₂
 0.2 μ M プライマーペア - (VAC3624F / VAC4041RとHH - F2 / HH - R2を使用)
 10ng 培養菌株から調製したDNA、
 又は、100ng マウス胃粘膜から調製したDNA、
 又は、100ng ヒト胃バイオブシーから調製のDNA
 1ユニットTfi DNAポリメラーゼ (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)

10

【0078】

PCR反応は、Mastercycler ep (Eppendorf AG、Hamburg、German)を用いて以下の手順で行った。変性及びホットスタートを94 $^{\circ}$ Cで1分間行った後、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、57 $^{\circ}$ Cで30秒間、72 $^{\circ}$ Cで1分間増幅プログラムを35回繰り返した。その後、最終伸長として72 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。得られたPCR反応液5 μ Lに1 μ Lの6 \times ローディングバッファーを加え、2.0% (wt/vol) アガロースゲル電気泳動で分離し、得られたDNAバンドをエキジウムプロミドで染色して検出した。

20

【0079】

結果を図5に示す。14人の鳥肌胃炎患者の胃バイオブシーから、H.ピロリ又はH.スイスの感染を検出することができた。UBT陽性患者は、全てH.ピロリの感染が認められ、UBT陰性患者1例(レーン16)にH.スイスの感染が確認された。よって、本発明の方法は、UBT陰性患者におけるH.スイスの感染を検出できることが示された。

【0080】

(実施例5) F2R2遺伝子の発現確認

上述の実施例2において見出されたH.スイス特異的配列のうち、一方の配列(図3、配列番号2)はタンパク質をコードする遺伝子を含んでいることから、このF2R2遺伝子が実際に発現産物としてタンパク質を生成するか否かを確認した。

30

F2R2配列をpETite N-Hisにクローニングし、大腸菌BL21(DE3)で形質転換した。形質転換体を3個選り1mM(培地の濃度)のisopropyl-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)を含むLennox培地で、37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養を行い、リコンビナントF2R2タンパク質を調製した。12%濃度のポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とクーマシーブルー染色でタンパク質を分析した。培養中に菌体から分泌されるタンパク質と菌体内タンパク質(それぞれ20 μ g)を別々にSDS-PAGEで分析した。

【0081】

結果を図6に示す。いずれの大腸菌においても、IPTG刺激により菌体内タンパク質としてF2R2を発現していた。よって、F2R2が確かにタンパク質レベルで発現する遺伝子であることが確認された。

40

【0082】

(実施例6) H.スイス感染マウス血中の抗F2R2抗体の検出

図6の形質転換体1の分泌タンパク質と菌体タンパク質(20 μ g)を別々にSDS-PAGEで分離した後に、PVDF膜に転写し、200倍希釈したH.スイス感染1年のマウスから調製した抗血清あるいは非感染マウスから調製した対照血清で反応させ、更に1万倍希釈した二次抗体(Peroxidase-conjugated affinity pure donkey anti-mouse IgG)と反応させた。最後に化学発光検出試薬を用い、抗体が特異的に認識するタンパク質バンドを検出した。

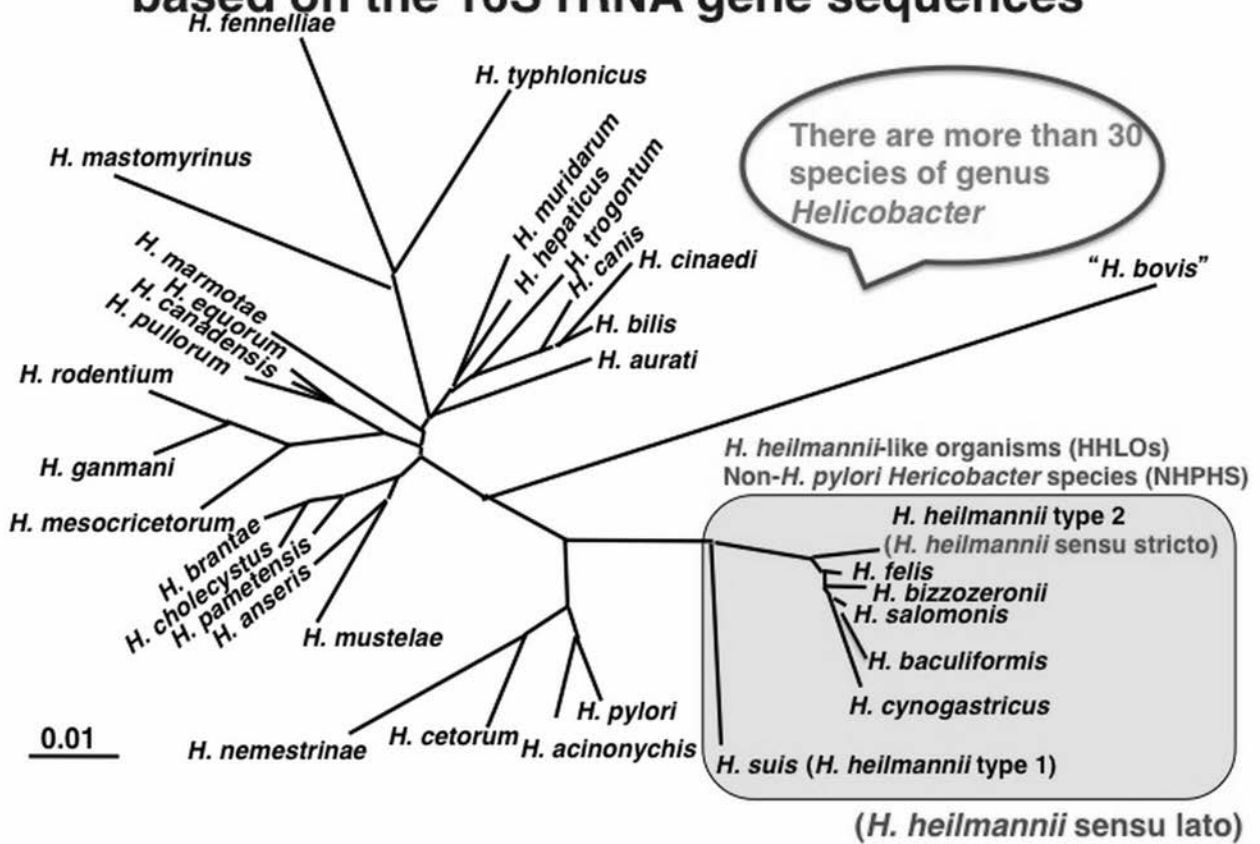
【0083】

50

結果を図7に示す。H．スイス感染マウス血清中に、I P T G 誘導した菌体中のタンパク質（F 2 R 2 タンパク質）と反応する抗体が存在していた。すなわち、H．スイス感染動物の血液中（血清中）に、H．スイス特異的タンパク質であるF 2 R 2 を認識する抗体が含まれていることが確認された。よって、被験者の血液（血清）をサンプルとして、当該サンプル内の抗F 2 R 2 抗体を測定／検出することにより、H．スイス感染の検査／診断／判定を行うことができることが示された。

【 図 1 】

Cluster analysis of the genus *Helicobacter* based on the 16S rRNA gene sequences



【 図 2 】

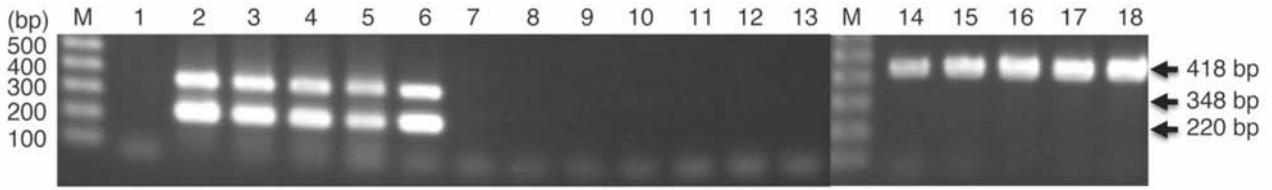
H_subTKY	1	CCCGTTGGGAATCACTATGTTTCAGCCAGAAATGCTACCTATGACTCAGTGGTTTGTTTA
H_sub3NTVM01	1	CCCGTTGGGAATCACTATGTTTCAGCCAGAAATGCTACCTATGACTCAGTGGTTTGTTTA
H_sub3H8	1	CCCGTTGGGAATCACTATGTTTCAGCCAGAAATGCTACCTATGACTCAGTGGTTTGTTTA
H_sub3H10	1	CCCGTTGGGAATCACTATGTTTCAGCCAGAAATGCTACCTATGACTCAGTGGTTTGTTTA
H_sub3H31	1	CCCGTTGGGAATCACTATGTTTCAGCCAGAAATGCTACCTATGACTCAGTGGTTTGTTTA
H_sub3H35	1	CCCGTTGGGAATCACTATGTTTCAGCCAGAAATGCTACCTATGACTCAGTGGTTTGTTTA
H_hibATCC-0172	1	CATTTTCAGAAATATTTTC--CCCAATGCTACCTATGACTCAGTGGTTTGTTTA
H_hloxson01C#-1	1	CCCGTTGGGAATCACTATGTTTCAGCCAGAAATGCTACCTATGACTCAGTGGTTTGTTTA
H_subTKY	61	CCGAGCATGTCAGAGCAGATTTCTTAAACATTTGGATTTCCCAATTCTAAGGTACATG
H_sub3NTVM01	61	CCGAGCATGTCAGAGCAGATTTCTTAAACATTTGGATTTCCCAATTCTAAGGTACATG
H_sub3H8	61	CCGAGCATGTCAGAGCAGATTTCTTAAACATTTGGATTTCCCAATTCTAAGGTACATG
H_sub3H10	61	CCGAGCATGTCAGAGCAGATTTCTTAAACATTTGGATTTCCCAATTCTAAGGTACATG
H_sub3H31	61	CCGAGCATGTCAGAGCAGATTTCTTAAACATTTGGATTTCCCAATTCTAAGGTACATG
H_sub3H35	61	CCGAGCATGTCAGAGCAGATTTCTTAAACATTTGGATTTCCCAATTCTAAGGTACATG
H_hibATCC-0172	59	CCGAGCATGTCAGAGCAGATTTCTTAAACATTTGGATTTCCCAATTCTAAGGTACATG
H_hloxson01C#-1	61	CCGAGCATGTCAGAGCAGATTTCTTAAACATTTGGATTTCCCAATTCTAAGGTACATG
H_subTKY	121	FCATCTACCATGGGCTTAGAGATTATAAAGATACCTCTCTGCAATCTACACCTTATC
H_sub3NTVM01	121	FCATCTACCATGGGCTTAGAGATTATAAAGATACCTCTCTGCAATCTACACCTTATC
H_sub3H8	121	FCATCTACCATGGGCTTAGAGATTATAAAGATACCTCTCTGCAATCTACACCTTATC
H_sub3H10	121	FCATCTACCATGGGCTTAGAGATTATAAAGATACCTCTCTGCAATCTACACCTTATC
H_sub3H31	121	FCATCTACCATGGGCTTAGAGATTATAAAGATACCTCTCTGCAATCTACACCTTATC
H_sub3H35	121	FCATCTACCATGGGCTTAGAGATTATAAAGATACCTCTCTGCAATCTACACCTTATC
H_hibATCC-0172	119	FCATCTACCATGGGCTTAGAGATTATAAAGATACCTCTCTGCAATCTACACCTTATC
H_hloxson01C#-1	121	FCATCTACCATGGGCTTAGAGATTATAAAGATACCTCTCTGCAATCTACACCTTATC
H_subTKY	181	FAGGAGGTTTTATTTAGCAGTTGGTCTGGATCAGCAGCAAGAAATGGAAGACTAG
H_sub3NTVM01	181	FAGGAGGTTTTATTTAGCAGTTGGTCTGGATCAGCAGCAAGAAATGGAAGACTAG
H_sub3H8	181	FAGGAGGTTTTATTTAGCAGTTGGTCTGGATCAGCAGCAAGAAATGGAAGACTAG
H_sub3H10	181	FAGGAGGTTTTATTTAGCAGTTGGTCTGGATCAGCAGCAAGAAATGGAAGACTAG
H_sub3H31	181	FAGGAGGTTTTATTTAGCAGTTGGTCTGGATCAGCAGCAAGAAATGGAAGACTAG
H_sub3H35	181	FAGGAGGTTTTATTTAGCAGTTGGTCTGGATCAGCAGCAAGAAATGGAAGACTAG
H_hibATCC-0172	179	FAGGAGGTTTTATTTAGCAGTTGGTCTGGATCAGCAGCAAGAAATGGAAGACTAG
H_hloxson01C#-1	178	FAGGAGGTTTTATTTAGCAGTTGGTCTGGATCAGCAGCAAGAAATGGAAGACTAG
H_subTKY	241	FAGAAGCGTTTCCAAATTTATGCCACAGGAAATACAGCAGCGCTATAAAGTGGTTCACAG
H_sub3NTVM01	241	FAGAAGCGTTTCCAAATTTATGCCACAGGAAATACAGCAGCGCTATAAAGTGGTTCACAG
H_sub3H8	241	FAGAAGCGTTTCCAAATTTATGCCACAGGAAATACAGCAGCGCTATAAAGTGGTTCACAG
H_sub3H10	241	FAGAAGCGTTTCCAAATTTATGCCACAGGAAATACAGCAGCGCTATAAAGTGGTTCACAG
H_sub3H31	241	FAGAAGCGTTTCCAAATTTATGCCACAGGAAATACAGCAGCGCTATAAAGTGGTTCACAG
H_sub3H35	241	FAGAAGCGTTTCCAAATTTATGCCACAGGAAATACAGCAGCGCTATAAAGTGGTTCACAG
H_hibATCC-0172	239	FAGAAGCGTTTCCAAATTTATGCCACAGGAAATACAGCAGCGCTATAAAGTGGTTCACAG
H_hloxson01C#-1	238	FAGAAGCGTTTCCAAATTTATGCCACAGGAAATACAGCAGCGCTATAAAGTGGTTCACAG
H_subTKY	301	SACCCGGCATAAAAGCAGGATCATGTGTGGGATAGAGCATTGTGGGATAAAACACATA
H_sub3NTVM01	301	SACCCGGCATAAAAGCAGGATCATGTGTGGGATAGAGCATTGTGGGATAAAACACATA
H_sub3H8	301	SACCCGGCATAAAAGCAGGATCATGTGTGGGATAGAGCATTGTGGGATAAAACACATA
H_sub3H10	301	SACCCGGCATAAAAGCAGGATCATGTGTGGGATAGAGCATTGTGGGATAAAACACATA
H_sub3H31	301	SACCCGGCATAAAAGCAGGATCATGTGTGGGATAGAGCATTGTGGGATAAAACACATA
H_sub3H35	301	SACCCGGCATAAAAGCAGGATCATGTGTGGGATAGAGCATTGTGGGATAAAACACATA
H_hibATCC-0172	299	SACCCGGCATAAAAGCAGGATCATGTGTGGGATAGAGCATTGTGGGATAAAACACATA
H_hloxson01C#-1	298	SACCCGGCATAAAAGCAGGATCATGTGTGGGATAGAGCATTGTGGGATAAAACACATA
H_subTKY	361	GTTTTATCATTAGTCTAGGTTACGTTCTCTGATTCTTTGTTGGCACTCTTTATGCCATG
H_sub3NTVM01	361	GTTTTATCATTAGTCTAGGTTACGTTCTCTGATTCTTTGTTGGCACTCTTTATGCCATG
H_sub3H8	361	GTTTTATCATTAGTCTAGGTTACGTTCTCTGATTCTTTGTTGGCACTCTTTATGCCATG
H_sub3H10	361	GTTTTATCATTAGTCTAGGTTACGTTCTCTGATTCTTTGTTGGCACTCTTTATGCCATG
H_sub3H31	361	GTTTTATCATTAGTCTAGGTTACGTTCTCTGATTCTTTGTTGGCACTCTTTATGCCATG
H_sub3H35	361	GTTTTATCATTAGTCTAGGTTACGTTCTCTGATTCTTTGTTGGCACTCTTTATGCCATG
H_hibATCC-0172	352	GTTTTATCATTAGTCTAGGTTACGTTCTCTGATTCTTTGTTGGCACTCTTTATGCCATG
H_hloxson01C#-1	348	GTTTTATCATTAGTCTAGGTTACGTTCTCTGATTCTTTGTTGGCACTCTTTATGCCATG
H_subTKY	421	CCCGTGTGTTTGTGGTGGGAAAGTCTGGCTGAAGGTTTTGGTTGGCCTATGCTAGAGGCCA
H_sub3NTVM01	421	CCCGTGTGTTTGTGGTGGGAAAGTCTGGCTGAAGGTTTTGGTTGGCCTATGCTAGAGGCCA
H_sub3H8	421	CCCGTGTGTTTGTGGTGGGAAAGTCTGGCTGAAGGTTTTGGTTGGCCTATGCTAGAGGCCA
H_sub3H10	421	CCCGTGTGTTTGTGGTGGGAAAGTCTGGCTGAAGGTTTTGGTTGGCCTATGCTAGAGGCCA
H_sub3H31	421	CCCGTGTGTTTGTGGTGGGAAAGTCTGGCTGAAGGTTTTGGTTGGCCTATGCTAGAGGCCA
H_sub3H35	421	CCCGTGTGTTTGTGGTGGGAAAGTCTGGCTGAAGGTTTTGGTTGGCCTATGCTAGAGGCCA
H_hibATCC-0172	418	CCCGTGTGTTTGTGGTGGGAAAGTCTGGCTGAAGGTTTTGGTTGGCCTATGCTAGAGGCCA
H_hloxson01C#-1	400	CCCGTGTGTTTGTGGTGGGAAAGTCTGGCTGAAGGTTTTGGTTGGCCTATGCTAGAGGCCA
H_subTKY	481	FCGAGGCTGGGTCGGTGTGGCTAGCAATGTCTCTTGCATGCCAGAAATCTAGGGG
H_sub3NTVM01	481	FCGAGGCTGGGTCGGTGTGGCTAGCAATGTCTCTTGCATGCCAGAAATCTAGGGG
H_sub3H8	481	FCGAGGCTGGGTCGGTGTGGCTAGCAATGTCTCTTGCATGCCAGAAATCTAGGGG
H_sub3H10	481	FCGAGGCTGGGTCGGTGTGGCTAGCAATGTCTCTTGCATGCCAGAAATCTAGGGG
H_sub3H31	481	FCGAGGCTGGGTCGGTGTGGCTAGCAATGTCTCTTGCATGCCAGAAATCTAGGGG
H_sub3H35	481	FCGAGGCTGGGTCGGTGTGGCTAGCAATGTCTCTTGCATGCCAGAAATCTAGGGG
H_hibATCC-0172	478	FCGAGGCTGGGTCGGTGTGGCTAGCAATGTCTCTTGCATGCCAGAAATCTAGGGG
H_hloxson01C#-1	460	FCGAGGCTGGGTCGGTGTGGCTAGCAATGTCTCTTGCATGCCAGAAATCTAGGGG
H_subTKY	541	ATGCAGGGGTTTACTGCGATCCTTATAATGTCCAAGACATGCAAAAGCA-----
H_sub3NTVM01	541	ATGCAGGGGTTTACTGCGATCCTTATAATGTCCAAGACATGCAAAAGCA-----
H_sub3H8	541	ATGCAGGGGTTTACTGCGATCCTTATAATGTCCAAGACATGCAAAAGCA-----
H_sub3H10	541	ATGCAGGGGTTTACTGCGATCCTTATAATGTCCAAGACATGCAAAAGCA-----
H_sub3H31	541	ATGCAGGGGTTTACTGCGATCCTTATAATGTCCAAGACATGCAAAAGCA-----
H_sub3H35	541	ATGCAGGGGTTTACTGCGATCCTTATAATGTCCAAGACATGCAAAAGCA-----
H_hibATCC-0172	530	ATGCAGGGGTTTACTGCGATCCTTATAATGTCCAAGACATGCAAAAGCA-----
H_hloxson01C#-1	520	ATGCAGGGGTTTACTGCGATCCTTATAATGTCCAAGACATGCAAAAGCA-----

【 図 3 】

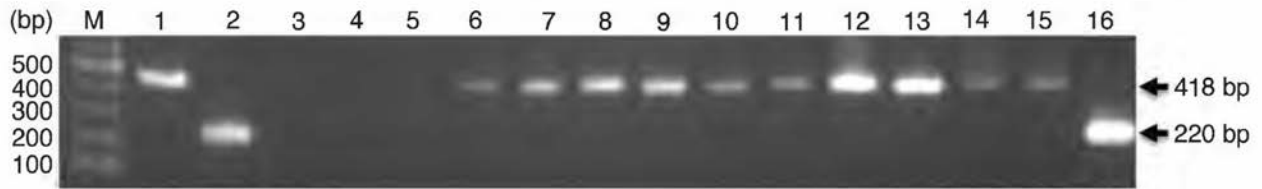
<i>H. suis</i> TKY	1	AAGGATTGCC	ACTTTAATAGCCTTGATTGCTCTAAAACTTT	GCATAAAATCAT	TAT
<i>H. suis</i> SNTW101	1	AAGGATTGCC	ACTTTAATAGCCTTGATTGCTCTAAAACTTT	GCATAAAATCAT	TAT
<i>H. suis</i> SH8	1	AAGGATTGCC	ACTTTAATAGCCTTGATTGCTCTAAAACTTT	GCATAAAATCAT	TAT
<i>H. suis</i> SH10	1	AAGGATTGCC	ACTTTAATAGCCTTGATTGCTCTAAAACTTT	GCATAAAATCAT	TAT
<i>H. suis</i> HS1	1				
<i>H. suis</i> HS5	1				

		start			
<i>H. suis</i> TKY	60	AGATTTT	TTTCATGTACAAGCGCTCTTGAGGGGCAAGTACACACCTC	CGCTTGGTTAAAAG	
<i>H. suis</i> SNTW101	61	AGATTTT	TTTCATGTACAAGCGCTCTTGAGGGGCAAGTACACACCTC	CGCTTGGTTAAAAG	
<i>H. suis</i> SH8	60	AGATTTT	TTTCATGTACAAGCGCTCTTGAGGGGCAAGTACACACCTC	CGCTTGGTTAAAAG	
<i>H. suis</i> SH10	60	AGATTTT	TTTCATGTACAAGCGCTCTTGAGGGGCAAGTACACACCTC	CGCTTGGTTAAAAG	
<i>H. suis</i> HS1	1	--ATT	TTTTCATGTACAAGCGCTCTTGAGGGGCAAGTACACACCTC	CGCTTGGTTAAAAG	
<i>H. suis</i> HS5	1	--ATT	TTTTCATGTACAAGCGCTCTTGAGGGGCAAGTACACACCTC	CGCTTGGTTAAAAG	
<i>H. suis</i> TKY	120	CAAAAAGC	CAAAACCTCAATGGCTTTATCCAAAAACGAACTTTCATGCTCGCAAATAT		
<i>H. suis</i> SNTW101	121	CAAAAAGC	CAAAACCTCAATGGCTTTATCCAAAAACGCGTCTTCGTGTTGCGCAAATAT		
<i>H. suis</i> SH8	120	CAAAAAGC	CAAAACCTCAATGGCTTTATCCAAAAACGCGTCTTCGTGTTGCGCAAATAT		
<i>H. suis</i> SH10	120	CAAAAAGC	CAAAACCTCAATGGCTTTATCCAAAAACGCGTCTTCGTGTTGCGCAAATAT		
<i>H. suis</i> HS1	59	CAAAAAGC	CAAAACCTCAATGGCTTTATCCAAAAACGCGTCTTCGTGTTGCGCAAATAT		
<i>H. suis</i> HS5	59	CAAAAAGC	CAAAACCTCAATGGCTTTATCCAAAAACGCGTCTTCGTGTTGCGCAAATAT		
<i>H. suis</i> TKY	180	CAGGAAAG	AAAAATATTAGGGCTCTTGCCCTCTAGCTCTAGGGTGCAGGGAATAATATTTT		
<i>H. suis</i> SNTW101	181	CAGGAAAG	AAAAATATTAGGGCTCTTGCCCTCTAGCTCTAGGGTGCAGGGAATAATATTTT		
<i>H. suis</i> SH8	180	CAGGAAAG	AAAAATATTAGGGCTCTTGCCCTCTAGCTCTAGGGTGCAGGGAATAATATTTT		
<i>H. suis</i> SH10	180	CAGGAAAG	AAAAATATTAGGGCTCTTGCCCTCTAGCTCTAGGGTGCAGGGAATAATATTTT		
<i>H. suis</i> HS1	119	CAGGAAAG	AAAAATATTAGGGCTCTTGCCCTCTAGCTCTAGGGTGCAGGGAATAATATTTT		
<i>H. suis</i> HS5	119	CAGGAAAG	AAAAATATTAGGGCTCTTGCCCTCTAGCTCTAGGGTGCAGGGAATAATATTTT		
<i>H. suis</i> TKY	240	CTGTTGCA	AATTGCATGATTTGCTTCTACCCTGTTGATCCGGTAAAGGCCACTTTAG		
<i>H. suis</i> SNTW101	241	CTGTTGCA	AATTGCATGATTTGCTTCTACCCTGTTGATCCGGTAAAGGCCACTTTAG		
<i>H. suis</i> SH8	240	CTGTTGCA	AATTGCATGATTTGCTTCTACCCTGTTGATCCGGTAAAGGCCACTTTAG		
<i>H. suis</i> SH10	240	CTGTTGCA	AATTGCATGATTTGCTTCTACCCTGTTGATCCGGTAAAGGCCACTTTAG		
<i>H. suis</i> HS1	179	CTGTTGCA	AATTGCATGATTTGCTTCTACCCTGTTGATCCGGTAAAGGCCACTTTAG		
<i>H. suis</i> HS5	179	CTGTTGCA	AATTGCATGATTTGCTTCTACCCTGTTGATCCGGTAAAGGCCACTTTAG		
<i>H. suis</i> TKY	300	CAATTTT	AGGGCTTGTGGCTAGATGTTTGCCAAATTTGCCGCAATTGCCATTGACAATAT		
<i>H. suis</i> SNTW101	301	CAATTTT	AGGGCTTGTGGCTAGATGTTTGCCAAATTTGCCGCAATTGCCATTGACAATAT		
<i>H. suis</i> SH8	300	CAATTTT	AGGGCTTGTGGCTAGATGTTTGCCAAATTTGCCGCAATTGCCATTGACAATAT		
<i>H. suis</i> SH10	300	CAATTTT	AGGGCTTGTGGCTAGATGTTTGCCAAATTTGCCGCAATTGCCATTGACAATAT		
<i>H. suis</i> HS1	239	CAATTTT	AGGGCTTGTGGCTAGATGTTTGCCAAATTTGCCGCAATTGCCATTGACAATAT		
<i>H. suis</i> HS5	239	CAATTTT	AGGGCTTGTGGCTAGATGTTTGCCAAATTTGCCGCAATTGCCATTGACAATAT		
<i>H. suis</i> TKY	360	TGACCACG	CCTGCAGGCAACAAATCCCCGATAATCTCAAAGAGTACCAAATACTAGCAG		
<i>H. suis</i> SNTW101	361	TGACCACG	CCTGCAGGCAACAAATCCCCGATAATCTCAAAGAGTACCAAATACTAGCAG		
<i>H. suis</i> SH8	360	TGACCACG	CCTGCAGGCAACAAATCCCCGATAATCTCAAAGAGTACCAAATACTAGCAG		
<i>H. suis</i> SH10	360	TGACCACG	CCTGCAGGCAACAAATCCCCGATAATCTCAAAGAGTACCAAATACTAGCAG		
<i>H. suis</i> HS1	299	TGACCACG	CCTGCAGGCAACAAATCCCCGATAATCTCAAAGAGTACCAAATACTAGCAG		
<i>H. suis</i> HS5	299	TGACCACG	CCTGCAGGCAACAAATCCCCGATAATCTCAAAGAGTACCAAATACTAGCAG		
<i>H. suis</i> TKY	420	GTGTGGG	TGAGGCGGGTTTAAAGAACACAGCAATGCTGCAGCCAAAGCGGGAGCTAGTT		
<i>H. suis</i> SNTW101	421	GTGTGGG	TGAGGCGGGTTGATAACAACAGCGTTGCTGCAGCCAAAGCGGGAGCTAGTT		
<i>H. suis</i> SH8	420	GTGTGGG	TGAGGCGGGTTGATAACAACAGCGTTGCTGCAGCCAAAGCGGGAGCTAGTT		
<i>H. suis</i> SH10	420	GTGTGGG	TGAGGCGGGTTGATAACAACAGCGTTGCTGCAGCCAAAGCGGGAGCTAGTT		
<i>H. suis</i> HS1	359	GTGTGGG	TGAGGCGGGTTGATAACAACAGCGTTGCTGCAGCCAAAGCGGGAGCTAGTT		
<i>H. suis</i> HS5	359	GTGTGGG	TGAGGCGGGTTGATAACAACAGCGTTGCTGCAGCCAAAGCGGGAGCTAGTT		
<i>H. suis</i> TKY	480	TCCAAGC	AGCCATCAAAATAGGGAAATTTCAAGGAATGATCTGGCCTACCACCCCTAAAG		
<i>H. suis</i> SNTW101	481	TCCAAGC	AGCCATCAAAATAGGGAAATTTCAAGGAATGATCTGGCCTACCACCCCTAAAG		
<i>H. suis</i> SH8	480	TCCAAGC	AGCCATCAAAATAGGGAAATTTCAAGGAATGATCTGGCCTACCACCCCTAAAG		
<i>H. suis</i> SH10	480	TCCAAGC	AGCCATCAAAATAGGGAAATTTCAAGGAATGATCTGGCCTACCACCCCTAAAG		
<i>H. suis</i> HS1	419	TCCAAGC	AGCCATCAAAATAGGGAAATTTCAAGGAATGATCTGGCCTACCACCCCTAAAG		
<i>H. suis</i> HS5	419	TCCAAGC	AGCCATCAAAATAGGGAAATTTCAAGGAATGATCTGGCCTACCACCCCTAAAG		
<i>H. suis</i> TKY	540	GTTCCG	GGAAATG	stop	
<i>H. suis</i> SNTW101	541	GTTCCG	GGAAATG	---	
<i>H. suis</i> SH8	540	GTTCCG	GGAAATG	---	
<i>H. suis</i> SH10	540	GTTCCG	GGAAATG	---	
<i>H. suis</i> HS1	479	GTTCCG	GGAAATG	GTAG	
<i>H. suis</i> HS5	479	GTTCCG	GGAAATG	GTAG	

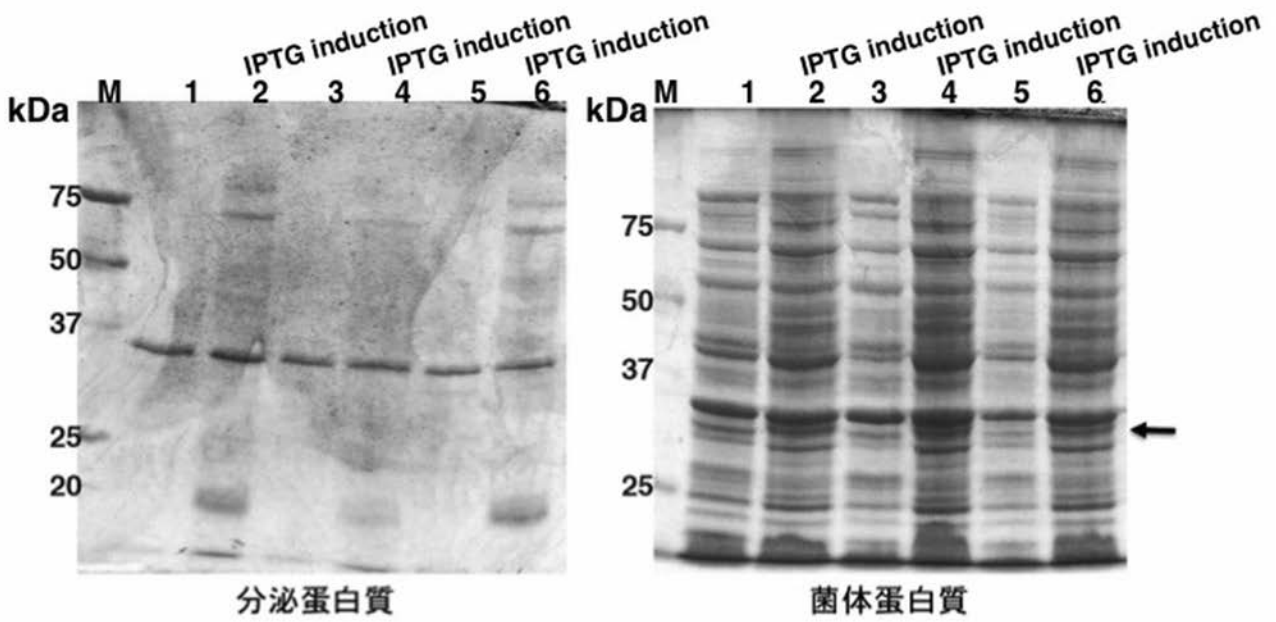
【 図 4 】



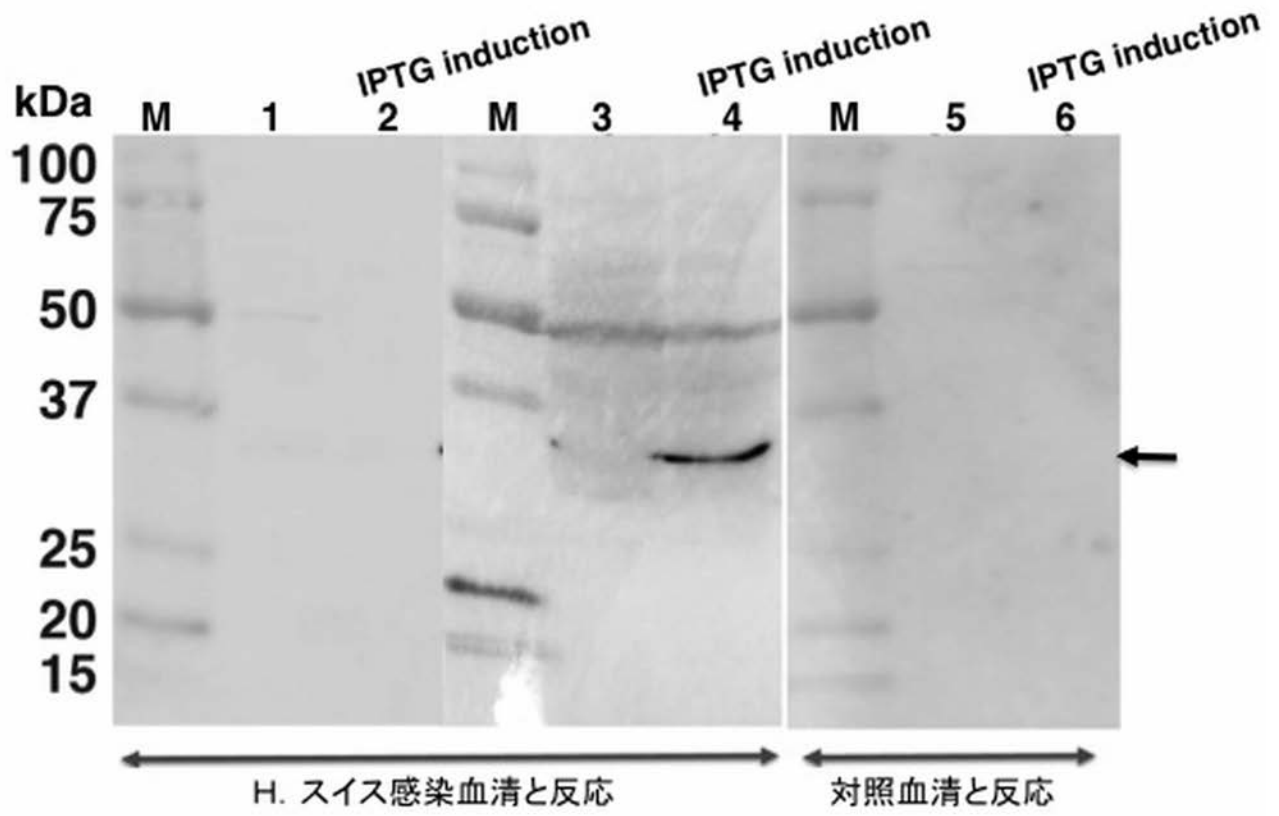
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

[2016010331000001.app](#)

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569		F
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)		C 1 2 Q 1/04		

(72)発明者 中村 正彦
 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内

(72)発明者 高橋 哲史
 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA13 CA01 CA09 CA20 DA06 EA04 GA11 HA01 HA08 HA11
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ03 QQ08 QQ42 QQ44 QQ52 QS25 QS33
 QX01 QX02
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 DA75 EA50 FA74

专利名称(译)	Helicobacter-Swiss特异性序列，靶向序列的诊断方法和序列编码的蛋白质		
公开(公告)号	JP2016010331A	公开(公告)日	2016-01-21
申请号	JP2014132772	申请日	2014-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所		
申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所		
[标]发明人	宫本真浩 松井英則 中村正彦 高橋哲史		
发明人	宫本 真浩 松井 英則 中村 正彦 高橋 哲史		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C07K14/195 C07K16/12 G01N33/53 G01N33/569 C12Q1/04		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C07K14/195 C07K16/12 G01N33/53.D G01N33/569.F C12Q1/04 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6851.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6876.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ44 4B063/QQ52 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QX01 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	长谷川 洋 中谷智子		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(21) 出願番号	特願2014-132772 (P2014-132772)	(71) 出願人	598041566
	(22) 出願日	平成26年6月27日 (2014. 6. 27)		学校法人北里研究所 東京都港区白金5丁目9番1号
<p>实况在胃以及幽门螺旋杆菌，判定胃炎，胃溃疡，胃癌，H.瑞士的存在还测量（检测）/诊断方法的原因淋巴瘤等尚未确立以及用于诊断H. Swiss感染的方法，以及用于该方法药物或试剂盒。溶液：在来自受试者的样品中，样品含有（i）具有特定序列或其部分中描述的核苷酸序列的核酸，（ii）具有特定序列或其部分中描述的氨基酸序列的蛋白质或肽，（iii）识别（ii）的蛋白质或肽的抗体。一种确定所述样品中瑞士H. 的存在的方法。</p>			(74) 代理人	100110973 弁理士 長谷川 洋
				(74) 代理人
			(72) 発明者	宮本 真浩 神奈川県横浜市金沢区大川5-1 JNC 株式会社 横浜研究所内
			(72) 発明者	松井 英則 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人 北里研究所内