

(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2005-198657

(P2005-198657A)

(43) 公開日 平成17年7月28日(2005.7.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
// C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 6 3

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2005-32248 (P2005-32248)	(71) 出願人	000238201 扶桑薬品工業株式会社
(22) 出願日	平成17年2月8日(2005.2.8)		大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(62) 分割の表示	特願平8-194317の分割	(74) 代理人	100065868 弁理士 角田 嘉宏
原出願日	平成8年7月24日(1996.7.24)	(74) 代理人	100106242 弁理士 古川 安航
		(72) 発明者	芥子 宏行 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社研究開発センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘリコバクターピロリ菌検出用プローブHP-34

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヘリコバクター ピロリ (Helicobacter pylori) 菌を特異的かつ迅速に検出可能なプローブを提供する。

【解決手段】特定なる塩基配列からなり、かつヘリコバクター ピロリ菌が保有するDNAと特異的に反応するHP-34 プローブ。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2 に記載の塩基配列からなり、かつヘリコバクター ピロリ (*Helicobacter pylori*) 菌が保有する DNA と特異的に反応する、ことを特徴とするヘリコバクター ピロリ菌検出用プローブ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍などの消化器系疾患の起炎菌であるヘリコバクター ピロリ (*Helicobacter pylori*) 菌の検出および同定に有用なプローブに関する

10

【背景技術】

【0002】

ヘリコバクター ピロリ菌〔旧名：カンピロバクター ピロリ (*Campylobacter pylori*) 菌〕のヒトの胃粘膜での存在が報告 (Warren J. R. et al., "Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis", *Lancet* 1: pp.1273-1275 (1983))されて以来、その生化学的性質、特に、胃・十二指腸潰瘍などの消化器系疾患との関連について数々の研究が進められている。

【0003】

ヘリコバクター ピロリ菌は、胃炎や胃潰瘍患者の胃粘膜から高頻度に分離・検出され〔例えば、慢性胃炎、表層性胃炎、萎縮性胃炎、糜爛性胃炎などからは、50~80%の率で検出されたとの報告もある〕、また、然るべき薬剤を投与して除菌することで症状も改善することから、消化器系疾患との関連性が示唆されていた。ヘリコバクター ピロリ菌は、粘膜細胞内へ侵入する性質は無く、その定着・増殖部位は上皮粘膜面や細胞間隙であり、菌の増殖による胃粘膜の P A S (Periodic Acid-Schiff) 反応陽性層のひ薄化により、粘膜を保護しているムチンの効果が低下し、胃粘膜の防御因子が減退すると考えられている (伊藤武、「*Helicobacter pylori* に関する最近の知見」、*Medical Technology*, 19 (10), pp.892-893 (1991年9月))。

20

【0004】

そしてこれまでに、ヘリコバクター ピロリ菌が胃粘膜上皮に接して生息し、ヘリコバクター ピロリ菌が保有するウレアーゼによる胃内の尿素の分解を経て生成したアンモニアが直接胃粘膜障害を引き起こし、水素イオンの逆拡散などを発生せしめ、ひいては腫瘍の形成に至るとの作用機序も報告されている (Tsuji, M. et al., "Mechanism of gastric mucosal damage induced by ammonia", *Gastroenterology* 107: pp.1881-1888 (1992))

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

かようなヒトの消化器系疾患との関連が指摘されているヘリコバクター ピロリ菌の診断方法としては、(1)粘膜局所におけるヘリコバクター ピロリ菌の直接的な証明 (塗抹法、組織鏡検法、培養法)、(2)ウレアーゼ活性などのヘリコバクター ピロリ菌の特性を利用した方法、および(3)血清免疫診断法がある (白井孝之、他、「*Campylobacter pylori* の存在診断」、最新医学、44 (2)、pp.284-288 (1989))などに大別される。この内、胃粘膜の生検材料の微好気培養からヘリコバクター ピロリ菌を検出する方法 (培養法) が最も精度が高く、確実な方法であるが、培養時間が長いため、結果として検査に長時間を要することになる。

40

【0006】

また、ヘリコバクター ピロリ菌のウレアーゼ産生能力に鑑み、胃生検材料から直接ウレアーゼを検出する方法なども利用されている (伊藤武、「特殊な細菌感染症の診断法 / 4. *Campylobacter pylori*」、臨床医、15 (増刊号)、pp.367-369 (1989))。しかし、こ

50

れら方法はいずれも、内視鏡検査による生検材料を対象とした検査法であるため、その検査処置において患者に少なからずの苦痛を強いるものであった。

【0007】

さらに、ヘリコバクター ピロリ菌によって胃内の尿素がアンモニアと $^{14}\text{CO}_2$ に分解されることに着目し、この $^{14}\text{CO}_2$ をシンチレーションカウンターで測定する診断法もあるが、この方法では、放射性同位元素の取扱いという繁雑で熟練を要する検査処置を経なければならぬ。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、上記した技術背景に鑑みて、ヘリコバクター ピロリ菌を、内視鏡などの医療器具を患者体内に導入する必要が無く、より特異的かつ効率良く検出できる技術の確立を目指して完成されたものである。

【0009】

そして、その要旨とするところは、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍などの消化器系疾患の起炎菌/原因菌であるヘリコバクター ピロリ菌が保有するDNAまたはRNAと特異的な反応性を有するプローブ、および、当該プローブに含まれるヘリコバクター ピロリ菌が本質的に保有している遺伝子部分の塩基配列を解明することにある。

【0010】

すなわち、本発明のプローブにより、例えば、検出対象たる菌において維持されているDNAを、当該プローブとDNAとの間の特異性に基づいて有為に検出でき、これにより、菌を培養・増殖するといった手間をかけることなく、迅速かつ確実に菌を検出・同定できるのである。

【0011】

また、これらプローブの塩基配列情報を参照してプライマーをデザインすれば、ハイブリダイゼーションを行わなくとも、PCR法によるDNAの増幅の有無を検出・確認することで、原因菌を同定できる。

【0012】

さらに、ハイブリダイゼーションに用いるプローブを非放射性のもの、例えば、ビオチン化したプローブとすることで、放射性同位元素使用施設のない一般検査室でも菌の検出ができ、それにより、菌の同定検出作業が迅速、簡便に行えるのである。

【発明の効果】

【0013】

本発明のプローブを用いれば、例えば、内視鏡などの医療器具を患者体内に導入することに伴う患者の身体的負担を解消でき、また、ヘリコバクター ピロリ菌の増殖・培養を経ることなく迅速・正確に直接的に菌を検出および同定できる。すなわち、本発明のプローブを用いた診断では、検出率が飛躍的に向上するのみならず、1回分の検体で菌の同定まで行え、診断に要する時間も約1~2日程度と短くなる。それ故、早期の内に有効な治療方針が示され、実施に移すことができる。

【0014】

また、ヒトの消化器系疾患に深く関連するヘリコバクター ピロリ菌が保有するDNAに特異的に反応するプローブの塩基配列を明らかにしたことにより、これらプローブを人工的に調製することを可能とした。さらに、解析した塩基配列の情報の一部を利用して作製したプライマーを用いて、臨床検体に含まれる原因菌のDNAを、PCR法によって増幅して、原因菌の迅速な診断に役立てることができる。

【0015】

さらに、臨床検体に含まれるゲノミックDNAの塩基配列と本発明によって解析された塩基配列とを比較参照することにより、消化器系疾患原因菌の菌種の迅速な同定が行える。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

10

20

30

40

50

窒素、相対湿度90%)下で、37℃で、5日間培養して、ヘリコバクター ピロリ菌を分離および増殖した。

【0019】

培養終了後に、培養菌体を集菌して、プロテイナーゼK(メルク社製)-0.1% SDSを用いた核酸の単離を利用する Saito-Miura法 ("Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment", Biochem. Biophys. Acta. vol.72, pp.619-629 (1963))の変法に従って、そのゲノミックDNAを抽出した。抽出したDNAを、制限酵素HindIIIで完全消化し、ベクターpGEM-3Z(プロメガ製)にランダムクローニングした。

【0020】

得られたクローンから、ヘリコバクター ピロリ菌と特異的に反応するDNA断片を含む8種のプローブを選抜した。

10

【0021】

そして選抜された各プローブを、プローブHP-32、プローブHP-34、プローブHP-49、プローブHP-55(down)、プローブHP-55(up)、プローブHP-60、プローブHP-64、およびプローブHP-66と命名した。

【0022】

(2)ヘリコバクター ピロリ菌由来DNAプローブの種特異性の検討

前述のプローブの選抜において、各プローブと各種感染症原因菌株のDNAとの反応性を、以下の方法により検討した。

【0023】

まず、検討対象菌株として、下記表2に列挙した臨床単離株および寄託菌株を準備した。

20

【0024】

なお、表2中の、ヒト・ゲノミックDNAの入手源として1名の健康な成人男子(30才)から採取した白血球、ならびに対照試料の入手源としてプラスミドpGEM-3Z(生化学工業製)を含んだ Escherichia coli K-12, JM109 株をそれぞれ準備した。

【0025】

【表 2】

細菌 No.	細菌名	出所・由来	
1	<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 43629	
2	<i>Helicobacter pylori</i>	臨床分離株	
3	<i>Helicobacter cinaedi</i>	ATCC 35683	
4	<i>Helicobacter fennelliae</i>	ATCC 35684	
5	<i>Helicobacter mustelae</i>	ATCC 43772	10

6	<i>Campylobacter jejuni</i>	CIP 702	
7	<i>Campylobacter coli</i>	CIP 7080	
8	<i>Campylobacter fetus</i>	CIP 5396	
9	<i>Streptococcus aureus</i>	ATCC 25923	
10	<i>Streptococcus epidermidis</i>	臨床分離株	
11	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	臨床分離株	
13	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NYS DH DP-2	
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	臨床分離株	20
15	<i>Enterobacter cloacae</i>	臨床分離株	
16	<i>Haemophilis influenzae</i>	臨床分離株	
17	<i>Candida albicans</i>	ATCC 48130	
18	<i>Aspergillus fumigatus</i>	TIMM 0063	
19	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TIMM 0354	
20	<i>Mucor spinosus</i>	TIMM 1322	
21	<i>Absidia corymbifera</i>	TIMM 2435	
22	ヒト・ゲノミック DNA		
24	対 照		

凡例： ATCC ; American Type Culture Collection
(Maryland, U.S.A.)
 NYSDH ; New York State Department of Health
(Albany, New York, U.S.A.)
 CIP ; Collection of the Institute Pasteur
(Paris, FRANCE)
 TIMM ; 帝京大学医真菌研究センター

そして、表 2 中のヘリコバクター属に属する細菌は実施例 1 (1) に記載の方法、また、
 その他の細菌については、各種溶菌酵素〔リゾスタフィン (シグマ製)、リゾチーム (シグマ製)、アセチルムラミダーゼ S G (生化学工業製)〕を取り入れた Saito-Miura 法
 (前出) に従って、各菌株が保有する染色体 DNA を抽出した。抽出した DNA の一定
 量 (例えば、0.1 µg/5 µl) をナイロンフィルタ (ポールダイン製) にスポットし、アル
 カリ変性したものをドットプロットハイブリダイゼーションの試料とした。なお、ヒ
 ト・ゲノミック DNA 試料は、先に入手した白血球を Saito-Miura 法 (前出) に適用す
 ることで調製した。一方、対照試料は、後述する実施例 2 (1) に記載のプラスミド DNA
 の調製方法に、先に入手したプラスミド pGEM-3Z を含んだ *Escherichia coli* K-12, J
 M109 株を適用することで調製した。

【0026】

次いで、Digoxigenin-11-dUTP(ペーリンガー マンハイム社製) でラベルしたヘリコバクター ピロリ菌由来のDNAプローブを、マニアティスのマニュアル(T. Maniatis, et al., "Molecular Cloning (A Laboratory Manual)", Cold Spring Harbour Laboratory (1982))に従い、45%ホルムアミド(メルク社製)、5×SSC、42℃の条件下で、終夜ハイブリダイゼーションを実施した。

【0027】

終夜ハイブリダイゼーションを終えた試料を、55℃にて、0.1×SSC、0.1% SDSによる20分間の洗浄を2回行った後に、Anti-Dig-ALP conjugates(ペーリンガー・マンハイム社製)で検出・発色させ、ハイブリダイゼーションに関する特異性を確認した。

【0028】

各プローブと各臨床菌株のDNAとの反応性に関する実験結果を図2に示した。また、ウェルの位置と被検試料(プロットされた菌株DNA)との対応関係を図1に示した。すなわち、図1に示したウェルプレートの模式図に付したウェルの位置番号は、表2に列挙した試料(菌株)に付した番号と符合する関係にある。

10

【0029】

図2の反応結果から明らかなように、試験したいずれのプローブもヘリコバクター ピロリ菌に由来するDNAに対してのみ反応性を示し、ヘリコバクター属に属さない菌種に由来するDNAはもちろん、ヘリコバクター ピロリ菌以外のヘリコバクター属に属する他の菌種由来のDNAに対しても反応性(ハイブリッドの形成)が認められず、本願発明のプローブによる種特異性が確認された。

20

【0030】

実施例2：塩基配列の解析

実施例1にて種特異性が確認されたDNAプローブ(計8本)の塩基配列を下記の方法に従って決定した。

【0031】

(1)プラスミドDNAの調製

サブクローンされた(塩基配列を決定すべき)挿入断片をpGEM-3Z(プロメガ製)に含んだ *Escherichia coli* K-12, JM109株を、5mlのLuria-Bactani Medium (bacto-tryptone, 10g/1L; bacto-yeast extract, 5g/1L; NaCl, 10g/1L; 5 N NaOHでpH 7.0に調整)に植菌し、一晚培養した。

30

【0032】

培養液を遠心分離(5,000rpm, 5min.)して集菌した。沈澱物に2.5mg/mlの濃度でリゾチーム(シグマ製)を含む50mM グルコース/25mM Tris-HCl(pH8.0)/10mM EDTA溶液を100μl加え、室温で5分間放置した。得られた懸濁液に1%の濃度でドデシル硫酸ナトリウム(シグマ製)を含む0.2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて混合した。5M酢酸カリウム水溶液(pH4.8)150μlをさらに加えて混合し、15分間氷冷した。

【0033】

そして、遠心分離(15,000rpm, 15min.)して得た上清を、フェノール/クロロホルム($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$)₂処理し、この上清に2倍量のエタノールを加え、さらに遠心分離(12,000rpm, 5分間)して沈澱を得た。この沈澱物を、10mM Tris-HCl (pH7.5)/0.1mM EDTA溶液100μlに溶解し、10mg/ml RNaseA(シグマ製)溶液を加え、室温で15分間放置した。

40

【0034】

この調製物に0.1M酢酸ナトリウム水溶液(pH4.8)を300μl加え、フェノール/クロロホルム(CHCl_3)処理し、上清にエタノールを加えて沈澱を得た。この沈澱物を乾燥し、10μlの蒸留水に溶解したものをDNA試料とした。

【0035】

(2)塩基配列決定の前処理

塩基配列決定の前処理を、AutoRead(登録商標) Sequencing Kit (ファルマシア製)を用いて行った。

【0036】

50

すなわち、鋳型となるDNAが32 μ l 溶液中に5～10 μ gの濃度になるように調整した。

【0037】

1.5mlのミニチューブ(エッペンドルフ)に、鋳型DNA 32 μ l を移し、2 M水酸化ナトリウム水溶液を8 μ l 加えて穏やかに混合した。そして、軽く遠心した後、室温で10分間放置した。

【0038】

3 M酢酸ナトリウム(pH4.8) 7 μ l と蒸留水4 μ l を加え、さらにエタノールを120 μ l 加えて混合し、ドライアイス上で15分間放置した。そして、15分間遠心分離して沈澱したDNAを集め、注意しながら上清を除去した。得られた沈澱物を70%エタノールで洗浄し、10分間遠心分離した。そして、注意しながら再度上清を除去し、減圧条件下で沈澱物を乾燥した。

10

【0039】

沈澱物を蒸留水10 μ l に溶解し、蛍光性のプライマー〔Fluorescent Primer, M13 Universal Primer; 5'-Fluorescein-d[CGACGTTGTAAACGACGGCCAGT(配列番号:9)]-3'(1.6 μ mol/ μ l; 0.42 A₂₆₀ unit/ml); M13 Reverse Primer, 5'-Fluorescein-d[CAGGAAACAGCTATGAC(配列番号:10)]-3'(2.1 μ mol/ μ l; 0.42 A₂₆₀ unit/ml)〕2 μ l (0.42 A₂₆₀ unit/ml, 4～6 μ mol)と、アニーリング用緩衝液2 μ l とを加え穏やかに混合した。

【0040】

そして、軽く遠心した後、65 $^{\circ}$ Cで5分間熱処理を行い、素早く37 $^{\circ}$ C条件下に置き、そこで10分間保温した。保温後10分以上室温で放置し、軽く遠心した。そして、延長用緩衝液1 μ l とジメチルスルホキシド3 μ l を加えたものを試料とした。

20

【0041】

4本のミニチューブにA、C、GおよびTと記入し、それぞれのチューブにA Mix (ddATPをdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPと共に溶解したもの)、C Mix (ddCTPをdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPと共に溶解したもの)、G Mix (ddGTPをdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPと共に溶解したもの) およびT Mix(ddTTPをdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPと共に溶解したもの)を2.5 μ l ずつ分注した。なお、それぞれの溶液は使用時までには氷中で保存し、使用時には37 $^{\circ}$ Cで1分間以上保温してから使用した。

【0042】

希釈したT7DNAポリメラーゼ(ファルマシア製; 6～8 units/2 μ l)2 μ l をDNA試料に加え、ピペティングもしくは穏やかな混合により、完全に混合した。混合後すぐに、この混合液を4.5 μ l ずつ保温しておいた4種の溶液に分注した。なお、分注に際しては新しいチップを用いた。

30

【0043】

37 $^{\circ}$ Cで5分間保温し、前出のAutoRead(登録商標) Sequencing Kitに添付されていた反応停止溶液を5 μ l ずつそれぞれの反応液に加えた。この分注においても、新しいチップを用いた。90 $^{\circ}$ Cで、2～3分間保温し、すぐに氷中で冷却した。電気泳動には1レーンあたり4～6 μ l を泳動した。

【0044】

(3)塩基配列の決定

実施例1に記載のヘリコバクターピロリ菌が保有するDNAに対して特異性を有するプローブそれぞれの塩基配列を、泳動温度45 $^{\circ}$ C、泳動時間6時間として、A.L.F. DNA Sequencerシステム(ファルマシア製)を用いて決定した。

40

【0045】

その結果、プローブHP-32(配列番号:1)、プローブHP-34(配列番号:2)、プローブHP-49(配列番号:3)、プローブHP-55(down)(配列番号:4)、プローブHP-55(up)(配列番号:5)、プローブHP-60(配列番号:6)、プローブHP-64(配列番号:7)、およびプローブHP-66(配列番号:8)それぞれの塩基配列の全容が明らかとなった。

50

【産業上の利用可能性】

【0046】

このように、本発明は、所期の目的であった感染症診断用プローブを提供するのみならず、PCR用プライマー作製の指針として、また臨床検体に含まれるゲノミックDNAとの比較参照用に適した標準配列として優れた有用であり、さらには消化器系疾患の原因菌であるヘリコバクター ピロリ菌が保有するDNAに特異的に反応するプローブの今後の探究・開発における貴重な手がかりをもたらす。

【0047】

また、本願で開示した塩基配列は、臨床分離株のゲノミックDNAをランダムにクローニングして得られたものであり、それ故、本発明の塩基配列の有用性はその相補鎖にまで及ぶものである。

10

【0048】

さらに、野性株が保有するDNAに変異部分が存在することは当然考えられる。しかしながら、上記実施例の開示から明らかなように、当該DNA変異部分は、消化器系疾患診断のためのハイブリダイゼーションへ利用する際の本発明プローブの特異性、あるいは本願で開示した塩基配列情報を消化器系疾患の迅速診断を目的としたPCR用のプライマーをデザインするために利用できる等の本発明が奏する有用性には何ら影響を与えるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0049】

20

【図1】ウェルの位置と被験試料（プロットイングされた菌株DNA）との対応関係を示す図である。

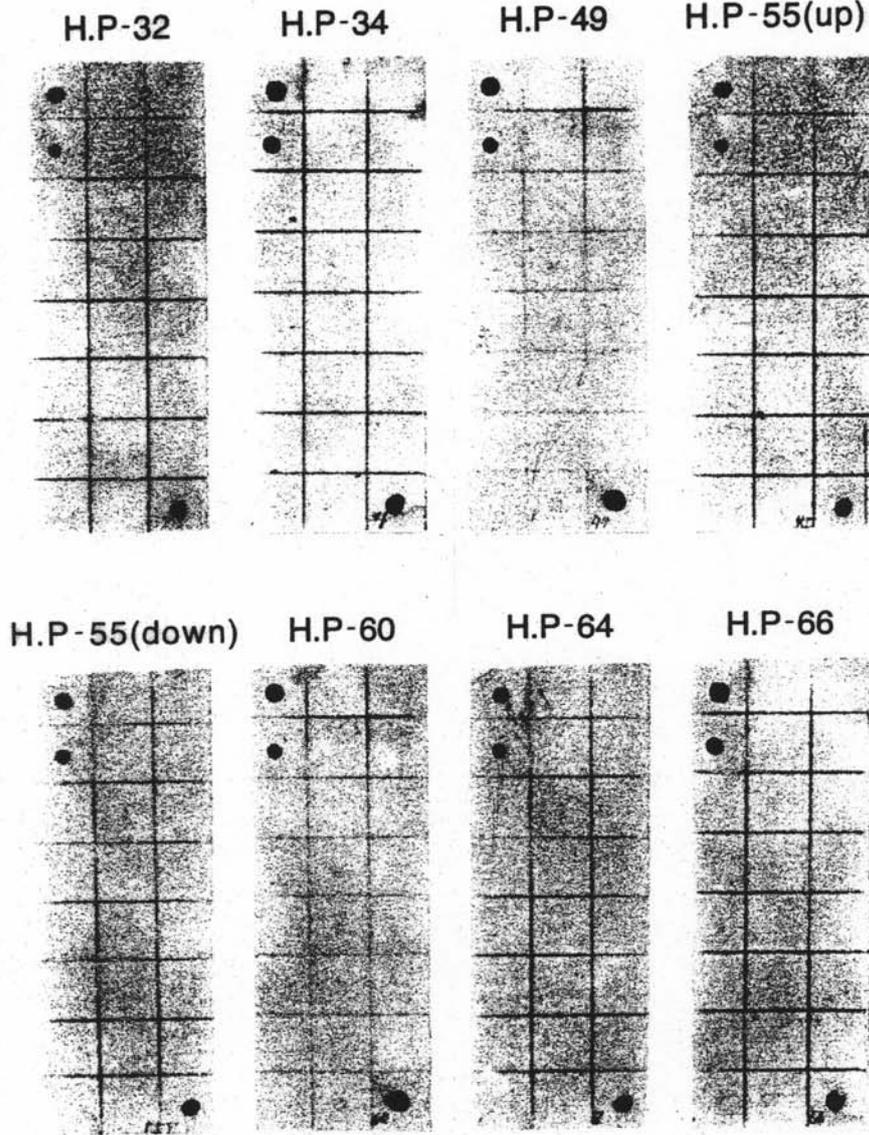
【図2】本発明のプローブと各種菌株由来のDNAとの反応性を示すドットハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

【図1】

プロットイングされた
菌株DNAの記号

1	9	17
2	10	18
3	11	19
4	12	20
5	13	21
6	14	22
7	15	23
8	16	24

【 図 2 】



【 配列表 】

2005198657000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 江田 宗司
大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社研究開発センター内
- (72)発明者 上原 啓嗣
大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社研究開発センター内
- (72)発明者 西田 圭吾
大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社研究開発センター内
- (72)発明者 松久 明生
大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社研究開発センター内
- Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA20 DA06 EA04 GA11 HA12
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ06 QQ42 QR32 QR55 QR62 QS25
QS32 QX02