

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4677525号
(P4677525)

(45) 発行日 平成23年4月27日 (2011.4.27)

(24) 登録日 平成23年2月10日 (2011.2.10)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 33/483	(2006.01)	GO 1 N 33/483	C
GO 1 N 21/78	(2006.01)	GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 21/77	(2006.01)	GO 1 N 21/77	D

請求項の数 14 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2005-241771 (P2005-241771)	(73) 特許権者	504205521
(22) 出願日	平成17年8月23日 (2005.8.23)		国立大学法人 長崎大学
(65) 公開番号	特開2007-57334 (P2007-57334A)		長崎県長崎市文教町1-14
(43) 公開日	平成19年3月8日 (2007.3.8)	(73) 特許権者	503303466
審査請求日	平成20年7月17日 (2008.7.17)		学校法人関西文理総合学園
			滋賀県長浜市田村町1266番地
特許法第30条第1項適用	平成17年2月25日 日本細菌学会発行の「日本細菌学雑誌 第60巻 第1号」に発表	(74) 代理人	100080791
			弁理士 高島 一
		(72) 発明者	和田 昭裕
			長崎県長崎市文教町1-14 長崎大学内
		(72) 発明者	平山 壽哉
			長崎県長崎市文教町1-14 長崎大学内
		(72) 発明者	長谷川 慎
			滋賀県長浜市田村町1266番地 長浜バイオ大学内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素の検出試薬および検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

GM1、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD3およびGT1bからなる群から構成される gangslioside およびそれらのリソ体の化学修飾体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含有してなるヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素 V a c A の検出試薬。

【請求項2】

前記 gangslioside が GM1 である請求項1記載の検出試薬。

【請求項3】

前記リソ体が GM1 のリソ体である請求項1記載の検出試薬。

【請求項4】

前記化学修飾が同位体標識、タンパク質標識、抗体標識、抗体エピトープタグ標識または蛍光標識である請求項1記載の検出試薬。

【請求項5】

担体表面に担持されている請求項1～4いずれか1項に記載の検出試薬。

【請求項6】

請求項1～5いずれか1項に記載の検出試薬と V a c A を含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、および前記調製工程で用いる検出試薬に対応する検出手段を用いて前記試料溶液からの信号を計測する工程を含む、試料中の V a c A を検出する方法。

【請求項 7】

請求項 4 に記載の蛍光標識された検出試薬と V a c A を含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、および
 蛍光検出系を用いて前記試料溶液の蛍光信号全体の強さ、蛍光信号の時間経過による変化または蛍光偏光の度合いを計測する工程
 を含む、試料中の V a c A を検出する方法。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の検出試薬と V a c A を含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、
 前記試料溶液から、検出試薬に結合した V a c A を担体とともに分離する工程、および
 前記分離された V a c A を計測する工程
 を含む、試料中の V a c A を検出する方法。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 いずれか 1 項に記載の検出試薬と V a c A を含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、
 前記調製工程で用いる検出試薬に対応する検出手段を用いて前記試料溶液からの信号を計測する工程、および
 前記計測工程で得られた信号を、V a c A を含まない試料における信号と比較し、検出対象の試料中に含まれる V a c A を検出する工程
 を含む、病原性を有するヘリコバクター・ピロリの検出方法。

20

【請求項 10】

請求項 4 に記載の蛍光標識された検出試薬と V a c A を含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、
 蛍光検出系を用いて前記試料溶液の蛍光信号全体の強さ、蛍光信号の時間経過による変化または蛍光偏光の度合いを計測する工程、および
 前記計測工程で得られた信号を、V a c A を含まない試料における信号と比較し、検出対象の試料中に含まれる V a c A を検出する工程
 を含む、病原性を有するヘリコバクター・ピロリの検出方法。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の検出試薬と V a c A を含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、
 前記試料溶液から、検出試薬に結合した V a c A を担体とともに分離する工程、
 前記分離された V a c A を請求項 1 ~ 5 いずれか 1 項に記載の検出試薬を用いて当該検出試薬に対応する検出手段を用いて計測する工程、および
 前記計測工程で得られた信号を、V a c A を含まない試料における信号と比較し、検出対象の試料中に含まれる V a c A を検出する工程
 を含む、病原性を有するヘリコバクター・ピロリの検出方法。

30

【請求項 12】

前記 V a c A を含む試料が、あらかじめヘリコバクター・ピロリの菌体の一部または全部を物理的または化学的に破砕する処理が施されている、請求項 6 ~ 11 いずれか 1 項に記載の検出方法。

40

【請求項 13】

前記試料溶液の調製工程の前に、試料中の V a c A の抽出および / または精製のための前処理工程をさらに含む、請求項 6 ~ 12 いずれか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 14】

前記病原性を有するヘリコバクター・ピロリが、胃炎、胃潰瘍または胃癌の病原菌である請求項 9 ~ 13 いずれか 1 項に記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素の検出試薬および検出方法に関する。詳しくは、ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素 V a c A の検出試薬を用いた胃炎、胃潰瘍または胃癌の診断の分野に関するものである。

【背景技術】

【0002】

グラム陰性桿菌であるヘリコバクター・ピロリは、世界人口の半数以上のヒトの胃粘膜に棲息している。感染者の大多数は無症候のまま経過するが、本菌の持続感染により胃炎からときとして消化性潰瘍を引き起こし、腸上皮化生、胃がん、M A L T リンパ腫などの関連が指摘されている。ヘリコバクター・ピロリの産生する空胞化毒素である V a c A は、標的細胞の細胞質内に空胞を形成させ、当該細胞を死滅させる毒素であり、本菌の病原性との関わりが指摘されている（非特許文献1）。現在までに、V a c A の宿主細胞への初期作用を理解するため、ヒト腎臓癌由来株化細胞 G 4 0 1 細胞またはヒト胃癌由来株化細胞 A Z - 5 2 1 細胞より V a c A 受容体が精製され、V a c A 受容体が2種の受容体型チロシンフォスファターゼ(R P T P)、R P T P と R P T P であることが明らかにされた（非特許文献2）。さらに、これら2種の R P T P のうち R P T P をノックアウトしたマウスでは V a c A 投与によって認められる胃炎や潰瘍を発症しないことが明らかにされている（非特許文献3）。V a c A の結合には R P T P の747-751残基に位置する Q T T Q P の配列の T h r に結合した O - リンクの糖鎖、さらにはその糖鎖の末端シアル酸が重要であることが報告されている（非特許文献4）。

10

【0003】

ヘリコバクター・ピロリを検出する手段として、従来法ではヘリコバクター・ピロリの産生するウレアーゼの活性を測定する方法（非特許文献5）、またはウレアーゼなどの抗原に対して特異的に結合する抗体を利用した免疫学的測定法に依っている（非特許文献6）。前記ウレアーゼ活性測定方法としては、例えば尿素呼気試験がよく用いられている。これは、¹³Cで標識した尿素がヘリコバクター・ピロリによってアンモニアと二酸化炭素に変わることを利用して、呼気中の¹³Cを測定する方法である。

20

【0004】

前記方法は、単純にヘリコバクター・ピロリの存在を検出するには簡便で優れた方法であるが、ヘリコバクター・ピロリの性質を判断することはできない。ヘリコバクター・ピロリが毒素を産生するか否かは菌株によって異なり、それぞれに悪性度が異なる。ヘリコバクター・ピロリの感染者が、すべて胃潰瘍や胃癌などを発症するわけではないし、一方、すべての感染者から除菌するのは予防医学の観点から考えても意義に乏しい。したがって、ヘリコバクター・ピロリの悪性度に応じた治療対応が求められている。

30

【0005】

また、V a c A を特異的に検出する従来法としては、V a c A に対する抗体を利用した E L I S A 法がある。この方法は、簡便で高感度であるが、洗浄等のステップが多く時間がかかること、抗体を調製するのに手間がかかることから、汎用試験としては大きなコストがかかるのが問題点として挙げられる。

【非特許文献1】Cover, T.L., Blake, S.R., Nat. Rev. Microbiol., 2005, 3, p.320-332

40

【非特許文献2】Wada, A., Yamasaki, E., Hirayama, T., J. Biochem., 2004, 136, p.741-746

【非特許文献3】Fujikawa, A., Shirasaka, D., Yamamoto, S., Ota, H., Yahiro, K., Fukada, M., Shintani, T., Wada, A., Aoyama, N., Hirayama, T., Fukamachi, H., Noda, M., Nat. Genet., 2003, 33, p.375-381

【非特許文献4】Yahiro K., Wada A., Yamasaki E., Nakayama M., Nishi Y., Hisatsune J., Morinaga N., Sap J., Noda M., Moss J., Hirayama T., J. Biol. Chem., 2004, 279, p.51013-51021

【非特許文献5】加藤元嗣、穂刈格、杉山敏郎、浅香正博：H.pylori感染症の診断と除菌判定，臨床医，2001，27，p.28-33

50

【非特許文献6】杉山敏郎：H.pylori血清診断法の現状と問題点，Prog. Med.，1995，15，p.515-520

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、ヘリコバクター・ピロリの悪性度に応じた治療対応が可能な当該菌の検出試薬および検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記問題点に鑑み、ヘリコバクター・ピロリの病原因子の中で、V a c Aに注目し、V a c Aに対して結合可能な物質により悪性度に関連したヘリコバクター・ピロリの検出が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

即ち、本願発明は、以下に示す通りである。

【0009】

〔1〕ガングリオシドおよびそれらのリソ体の化学修飾体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含有してなるヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素V a c Aの検出試薬。

〔2〕前記ガングリオシドがGM1、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD3およびGT1bからなる群から構成されるものである前記〔1〕記載の検出試薬。

〔3〕前記ガングリオシドがGM1である前記〔1〕記載の検出試薬。

〔4〕前記リソ体がGM1のリソ体である前記〔1〕記載の検出試薬。

〔5〕前記化学修飾が同位体標識、タンパク質標識、抗体標識、抗体エピトープタグ標識または蛍光標識である前記〔1〕記載の検出試薬。

〔6〕担体表面に担持されている前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の検出試薬。

〔7〕前記〔1〕～〔6〕いずれか1項に記載の検出試薬とV a c Aを含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、および前記調製工程で用いる検出試薬に対応する検出手段を用いて前記試料溶液からの信号を計測する工程

を含む、試料中のV a c Aを検出する方法。

〔8〕前記〔5〕に記載の蛍光標識された検出試薬とV a c Aを含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、および

蛍光検出系を用いて前記試料溶液の蛍光信号全体の強さ、蛍光信号の時間経過による変化または蛍光偏光の度合いを計測する工程

を含む、試料中のV a c Aを検出する方法。

〔9〕前記〔6〕に記載の検出試薬とV a c Aを含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、

前記試料溶液から、検出試薬に結合したV a c Aを担体とともに分離する工程、および前記分離されたV a c Aを計測する工程

を含む、試料中のV a c Aを検出する方法。

〔10〕前記V a c Aを含む試料が、あらかじめヘリコバクター・ピロリの菌体の一部または全部を物理的または化学的に破碎する処理が施されている、前記〔7〕～〔9〕いずれか1項に記載の検出方法。

〔11〕前記試料溶液の調製工程の前に、試料中のV a c Aの抽出および/または精製のための前処理工程をさらに含む、前記〔7〕～〔10〕いずれか1項に記載の検出方法。

〔12〕前記〔7〕～〔11〕いずれか1項に記載の検出方法を用いることを特徴とする、ヘリコバクター・ピロリが関与する疾患の診断方法。

〔13〕前記疾患が胃炎、胃潰瘍または胃癌である前記〔12〕に記載の診断方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明のV a c Aの検出試薬によると、基本構造となるガングリオシドまたはそれらの

10

20

30

40

50

リソ体に化学修飾した物質を含有し、ヘリコバクター・ピロリが産生するタンパク質の中でV a c Aに特異的に結合することから、ヘリコバクター・ピロリの病原性に基づいた検出が可能である。前記V a c A検出試薬は、比較的分子量で大量合成が容易であることから、蛍光物質の分子量変化を指標とする検出装置、例えば蛍光相関分光法や蛍光偏光法による検出が容易であり、V a c A抗体を用いた場合よりも迅速高感度かつ安価に検出手段を供することが可能である。かかる検出試薬を用いる本発明の検出方法によると、ヘリコバクター・ピロリの感染者の中から、病原性を有する保菌者を早期に選別することが可能となる。また、本発明の診断方法によると、本発明の検出試薬および検出方法を用いて病原性を有する保菌者を的確に診断することにより、治療薬の投与の要否や時期を的確に判断して抗生物質等の乱用を防ぎ、多剤耐性菌の発生を減少させることができ、ひいては医療費の削減に貢献することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明のV a c A検出試薬（以下、単に検出試薬と省略する場合がある）は、ガングリオシドおよびそれらのリソ体の化学修飾体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含有する。

【0012】

前記V a c Aとは、ヘリコバクター・ピロリが産生する毒素であって、上皮細胞の空胞変性を引き起こす作用を有するものである。かかる空胞変性は、顕微鏡による上皮細胞の形態観察または空胞のニュートラルレッドの取り込みを調べることにより確認することができる。ヘリコバクター・ピロリのゲノム配列は、Gene Bank Accession No.NC_000921およびNC_000915に開示されており、V a c Aをコードする塩基配列またはコードされるアミノ酸配列は、AY_737319、AB_190958、AB_190988などに開示されている。また、V a c Aは、単量体であっても多量体（例、六量体）であってもよいが、酸処理により活性化された単量体または多量体（例、六量体）が好ましい。

20

【0013】

前記ガングリオシドとは、シアル酸を含有する糖脂質をいい、天然物であっても化学合成されたものであってもよい。好ましいガングリオシドは、V a c Aとの結合性の観点から、GM1、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD3またはGT1bであり、より好ましくはGM1である。

30

【0014】

前記リソ体とは、前記ガングリオシドのセラミド部分から脂肪酸が遊離してアミノ基となったスフィンゴシンを含む構造をいう。好ましいリソ体は、V a c Aとの結合性の観点から、GM1、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD3またはT1bのリソ体であり、より好ましくはGM1のリソ体である。例えば、GM1およびそのリソ体は、図1に示す通りである。

【0015】

前記ガングリオシドまたはそれらのリソ体の化学修飾体とは、当該ガングリオシドまたはリソ体を基本構造として、V a c Aの検出に適するように化学的に修飾した化合物をいう。このような化学修飾としては、検出の容易さから、標識が好ましい。化学修飾の導入のしやすさという観点から、アミノ基を有するリソ体を基本構造とすることが好ましいが、これに限定されるものではない。

40

【0016】

前記標識としては、同位体標識、タンパク質標識、抗体標識、抗体エピトープタグ標識または蛍光標識が好適な例としてあげられる。同位体標識としては、例えば、²H、³H、¹³C、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵Iなどがあげられる。タンパク質標識としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、アビジン、ストレプトアビジン、マルトース結合タンパク質、グリーンフルオレセンスプロテイン（GFP）、GAL4タンパク質などがあげられる。抗体標識としては、例えば、抗グルタチオン-S-トランスフェラーゼ抗体、抗インフルエン

50

ザヘマグルチニン抗体、抗フラッグエピトープ抗体、抗マルトース結合タンパク質抗体、抗グリーンフルオレセンスプロテイン（GFP）抗体、抗GAL4タンパク質抗体などがあげられる。抗体エピトープタグ標識としては、例えば、ポリヒスチジン、インフルエンザヘマグルチニンエピトープ、フラッグエピトープなどがあげられる。蛍光標識としては、例えば、Alexa、ローダミン各種（ローダミン6G、ローダミングリーン、TMR、TAMRA）、Bodipy、Cy5、R6G、FAM、JOE、ROX、EDANS、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）などがあげられる。

【0017】

化学修飾の導入方法は、導入する修飾基に応じて公知の方法により行うことができる。

【0018】

本発明の検出試薬は、検出感度および検出の容易性から、蛍光標識された化学修飾体を含有することが好ましい。

【0019】

また、本発明の検出試薬は、検出方法での操作性の点から、担体表面に担持されていることが好ましい。

【0020】

前記担体としては、セファロース、アガロース、ポリアクリル酸誘導体、ポリスチレンなどがあげられ、これらは好ましくはビーズ状またはスティック状または平板状に加工されるが、これに限定されない。これら担体の表面に検出試薬、すなわち、VacA結合物質を固定化しておくことにより、遠心分離またはろ過さらには洗浄といった操作で当該試薬に結合したVacAとともに試料溶液から分離することが容易となり、多様な検出手段を提供することが可能となる。

【0021】

本発明の検出試薬は、前記化学修飾体を少なくとも1種含有していればよいが、本発明の目的を達成する限り、2種以上の化学修飾体を含有していてもよい。

【0022】

本発明の検出試薬は、前記化学修飾体そのままであってもよく、公知の添加剤などを含んでもよい。前記添加剤としては、例えば、アジ化ナトリウム、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、水、生理食塩水、緩衝液等の希釈剤、メタノール、エタノール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、グリセロール等の有機溶媒などが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0023】

前記化学修飾体の含有量は、所望の検出効果を奏することができる範囲で適宜設定することができるが、通常、0.01～100重量%であり、好ましくは0.1～99.9重量%、より好ましくは0.5～99.5重量%である。

【0024】

本発明の検出試薬は、ヘリコバクター・ピロリが産生するタンパク質の中でVacAに特異的に結合することから、ヘリコバクター・ピロリの病原性を指標とした検出方法に好適に使用することができる。

【0025】

本発明は、本発明のVacA検出試薬を用いることを特徴とする、ヘリコバクター・ピロリのVacAを検出する方法を提供する。当該検出方法は、前記検出試薬とVacAを含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、および前記調製工程で用いる検出試薬に対応する検出手段を用いて、前記試料溶液からの信号を計測する工程を含む。

【0026】

1) 前記検出試薬とVacAを含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程

VacAを含む試料とは、試料中にVacAが存在する可能性がある限り、いかなる試

10

20

30

40

50

料であってもよい。

【0027】

前記検出試薬とV a c Aを含む試料とを混合する方法は、用いる検出試薬に適した溶液中で、当該試薬とV a c Aとが接触できるような条件下で行えばよい。例えば、検出試薬とV a c Aとが溶解可能な溶媒中で、約0～40程度の温度で数分～1日程度混合させることができる。前記混合には、機械的に混合する手段の他、静置させる手段も含まれる。調製された試料溶液は、下記計測工程に供される。

【0028】

2) 前記調製工程で用いる検出試薬に対応する検出手段を用いて、前記試料溶液からの信号を計測する工程

検出手段は、用いる検出試薬に対応するものであり、公知の方法により行うことができる。例えば、同位体標識された検出試薬を用いた場合、同位体に応じた放射線の検出装置を用いて信号を計測することができる。酵素タンパク質標識された検出試薬を用いる場合、酵素基質を添加し、当該基質を分解することにより発せられる信号を計測することができる。タンパク質または抗体標識された検出試薬を用いる場合、当該タンパク質または抗体を認識する二次抗体および/または抗原等を用いて免疫染色などにより染色の程度を計測することができる。抗体エピトープタグ標識された検出試薬を用いる場合、当該タグを認識する抗体等を用いて免疫染色などにより染色の程度を計測することができる。蛍光標識された検出試薬を用いる場合、当該蛍光標識に応じた励起光を照射して蛍光検出器等により蛍光の強度を計測することができる。

【0029】

本発明においては、検出の感度を上げるため、あるいは計測工程を容易にするためなどを目的として、前記V a c Aを含む試料がヘリコバクター・ピロリの菌体をも含んでいる場合、あらかじめ当該菌体の一部または全部を物理的または化学的に破碎する処理を施すことが好ましい。このような処理としては、試料の凍結融解、試料の超音波処理、試料中に界面活性剤等を添加する菌体の溶菌、酸やアルカリによる処理、加熱処理などがあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0030】

また、本発明においては、検出の感度を上げるため、あるいは計測工程を容易にするためなどを目的として、試料中のV a c Aの抽出または精製およびその両方のための前処理工程をさらに含むことが好ましい。このような前処理工程としては、通常の溶液中のタンパク質の抽出および精製方法が限定なく用いられうる。例えば、前記菌体の破碎工程の後に、破碎液を遠心分離、硫酸沈殿、透析等の処理を行う方法があげられるが、これらに限定されるものではない。

【0031】

前記計測工程により得られた信号は、V a c Aを含まない試料における信号と比較し、場合によっては一定の濃度のV a c Aを含む試料における信号と対比させ、検出対象の試料中に含まれるV a c Aを定性的または定量的に検出することができる。また、計測対象物がV a c Aとそれ以外の物質を含んでいる可能性がある場合、計測対象物の分子量の相違に基づいて両者を判別可能である。あるいは、親和性の異なる複数のガングリオシド等の化学修飾体を含む検出試薬を用いることにより、V a c Aとそれ以外の物質の複数の化学修飾体に対する結合力の相違を比較することにより両者を判別可能である。

【0032】

本発明においては、検出の容易性および感度の観点から、蛍光標識された検出試薬を用いることが好ましい。この場合、本発明の検出方法は、V a c Aを含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、および蛍光検出系を用いて前記試料溶液の蛍光信号全体の強さ、蛍光信号の時間経過による変化または蛍光偏光の度合いを計測する工程を含む。

【0033】

10

20

30

40

50

1) 試料溶液の調製工程は、前記した通りである。

【0034】

2') 蛍光検出系を用いて前記試料溶液の蛍光信号全体の強さ、蛍光信号の時間経過による変化または蛍光偏光の度合いを計測する工程

本発明において、好適な蛍光検出系としては、蛍光偏光法による検出系、蛍光相関分光法による検出系などがあげられる。蛍光偏光法とは、溶液中に偏光した励起光を照射して、分子の回転による偏光の解消を調べることにより、蛍光物質の分子サイズの変化を測定する方法である (Kakehi, K., Oda, Y., and Kinoshita, M. Anal. Biochem., 2001, 297, 2, p.111-116)。蛍光相関分光法とは、微小空間中の分子の動きを蛍光強度の経時的ゆらぎの程度を調べることにより、蛍光物質の分子サイズの変化を測定する方法である (Eigen, M. and Rigler, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, p.5740-5747)。

10

【0035】

前記蛍光検出系において、蛍光信号全体の強さ、蛍光信号の時間経過による変化または蛍光偏光の度合いを定性的または定量的に計測することができる。例えば、蛍光偏光法の場合、蛍光検出試薬に結合する分子の質量に応じて偏光の解消度が異なることから、VacAの定量のみならず、結合した分子量の相違も検出することができる。よって、結合したVacAが単量体であるかまたは六量体等の多量体であるかも調べることができる。

【0036】

前記計測工程により得られた信号は、VacAを含まない試料における信号と比較し、場合によっては一定の濃度のVacAを含む試料における信号と対比させ、検出対象の試料中に含まれるVacAを定性的または定量的に検出することができる。

20

【0037】

本発明においては、検出の容易性および感度の観点から、担体に担持された検出試薬を用いることが好ましい。この場合、本発明の検出方法は、担体に担持された検出試薬とVacAを含む試料とを混合して試料溶液を調製する工程、前記試料溶液から、検出試薬に結合したVacAを担体とともに分離する工程、および前記分離されたVacAを計測する工程を含む。

【0038】

試料溶液の調製工程は、前記した通りである。

30

【0039】

前記分離工程は、検出試薬に結合したVacAを担体とともに遠心分離または濾過により行うことができる。分離されたVacAをさらに洗浄することにより、試料溶液からのVacAの分離がより良好になる。

【0040】

VacAを計測する工程は、前記した通りである。

【0041】

本発明は、前記検出方法を用いることにより、ヘリコバクター・ピロリが関与する疾患の診断方法を提供する。

【0042】

診断対象となる前記疾患は、ヘリコバクター・ピロリが関与する疾患である限り特に限定されるものではないが、胃炎、胃潰瘍または胃癌であることが好ましく、特にVacAとの関連が示唆されている、胃炎または胃潰瘍がより好ましい。

40

【0043】

診断対象となる動物は、ヒトおよびヒト以外の哺乳動物であり、ヒト以外の哺乳動物としてはサル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスターおよびモルモットなどがあげられる。

【0044】

本診断方法において、VacAを含む試料としては、前記動物由来の生体試料が好ましく、特に、ヘリコバクター・ピロリが生息している胃由来の試料が好ましく、胃液、胃粘

50

膜、胃の生検試料などが好適に例示される。

【0045】

本診断方法において、前記計測工程により得られた信号は、V a c A を含まない試料における信号と比較し、場合によっては一定の濃度の V a c A を含む試料における信号と比較させ、検出対象の試料中に含まれる V a c A を定性的、好ましくは定量的に検出することができる。V a c A が検出された場合、当該対象は、病原性を有するヘリコバクター・ピロリを保菌しており、疾患の発症前または発症後において、除菌または症状の低減を目的とした薬物の投与を的確に受けることができる。また、治療の予後の判断、例えば、除菌が成功したか否かの診断の指標ともなりうる。

【実施例】

【0046】

以下、実施例等により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなんら制限されるものではない。

【0047】

実施例1：V a c A の担体に結合したガングリオシドへの結合

ガングリオシドの1種であるリソ (Lyso) - G M 1 を樹脂に結合させ、この樹脂に V a c A が結合するかどうか調べることにより、V a c A のガングリオシドへの結合能を評価した。Lyso-GM1-Sepharose またはコントロールのSepharose と、ヘリコバクター・ピロリの培養上清を硫酸沈澱させ透析したサンプルとを4 でインキュベートした。遠心分離後 (2 0 m i n , 1 5 0 0 0 g) 、沈澱したSepharose を洗った。このLyso-GM1-Sepharose またはコントロールのSepharose に結合した蛋白質を S D S - P A G E により解析をおこない、Lyso-GM1 に特異的に結合している蛋白質を解析した。また、常法により V a c A タンパク質をウサギに免疫して作製した抗 V a c A 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、V a c A が特異的にLyso-GM1 に結合しているかどうか確認した。その結果、Lyso-GM1-Sepharose に特異的に結合するタンパク質は、V a c A であることが明らかになった。

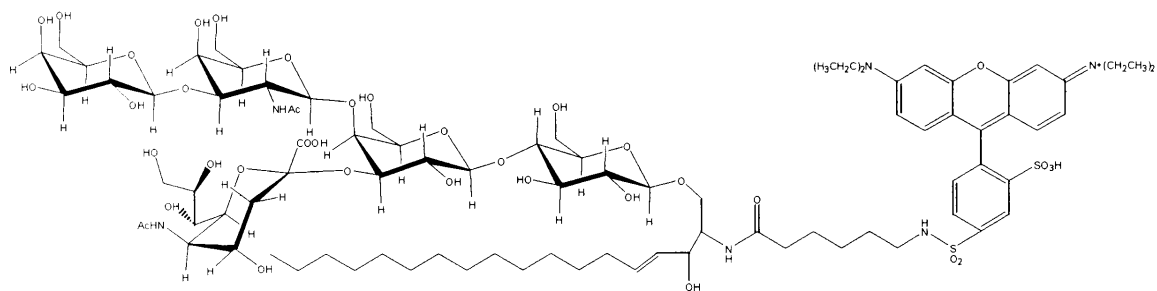
【0048】

実施例2：ローダミン標識Lyso-GM1の合成

Lyso-GM1 (タカラバイオ社製) 2.5 mM とローダミン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) (モリキュラープローブ社製) 2.5 mM を 0.1% トリエチルアミンを含む DMF 中で室温で16時間反応させた。DMF を減圧留去したのち、逆相 HPLC (ギルソン社 HPLC システム、東ソー TSK gel ODS-120A カラム 4.6 x 150 mm) によりアセトニトリル (0.05% トリフルオロ酢酸含む) 濃度グラジエントにより反応液を分離したところ、570 nm の光吸収を有するアセトニトリル濃度 66% に溶出される画分を得た。NMR 測定を行い、下記化学式で示される目的物の分子構造であることを確認した。

【0049】

【化1】



【0050】

10

20

30

40

50

実施例 3 : ローダミン標識Lyso-G M 1 を用いた蛍光偏光法による V a c A の検出

精製した V a c A を各濃度に希釈し、終濃度 1 0 0 n m o l / l のローダミン標識Lyso-G M 1 と混合した P B S 溶液 1 5 0 μ l を、蛍光測定用 9 6 穴プレート (ヌンク社製) に分注した。パーキンエルマー社製多機能プレートリーダー・フュージョンアルファ F P により、偏光励起光フィルター 5 3 5 n m 、偏光蛍光フィルター 5 8 0 n m を用いて、これらの溶液の蛍光偏光を測定した (図 2) 。その結果、V a c A の濃度が 0 . 1 n m o l / l より蛍光偏光度の上昇が認められ、V a c A 1 0 n m o l / l において基準値より 2 0 0 m P の上昇が認められた。

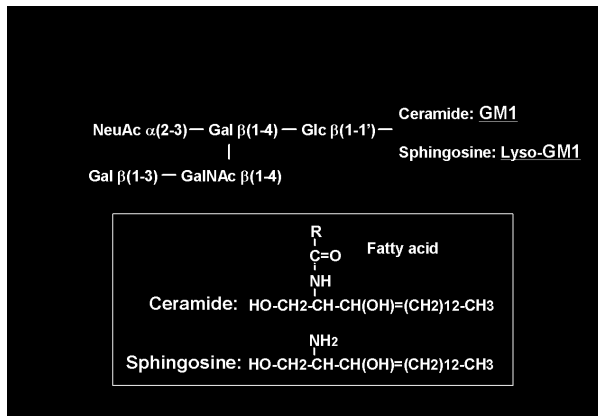
【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 1 】

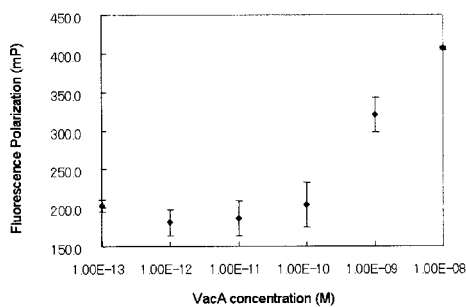
【 図 1 】 図 1 は、ガングリオシド G M 1 およびそのリソ体の構造を示す。

【 図 2 】 図 2 は、ローダミン標識Lyso-G M 1 を用いた V a c A の蛍光偏光シグナルを示すグラフである。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 山崎 栄樹
長崎県長崎市文教町1-14 長崎大学内

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特表2003-517015(JP,A)
特開平10-045602(JP,A)
特表2001-507447(JP,A)
特表2006-511497(JP,A)
特開2001-002704(JP,A)
Wada, A., et al., Direct binding of gangliosides to Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin (VacA) neutralizes its toxin activity., Glycobiology, 2010年, Vol.20(6), p.668-78

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

G01N 21/77

G01N 21/78

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed