

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年8月3日(03.08.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/145789 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/002330

(22) 国際出願日: 2023年1月25日(25.01.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-009397 2022年1月25日(25.01.2022) JP

(71) 出願人: 学校法人北里研究所(**THE KITASATO INSTITUTE**) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo (JP). 国立感染症研究所長が代表する日本国(**JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES**) [JP/JP]; 〒1628640 東京都新宿区戸山一丁目23番1号 Tokyo (JP). デンカ株式会社(**DENKA COMPANY LIMITED**) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 松井 英 則 (**MATSUI Hidenori**); 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 林原 絵美子 (**RIMBARA Emiko**); 〒2080011 東京都武蔵村山市学園4丁目7-1 国立感染症研究所 細菌第二部内 Tokyo (JP). 鈴木 仁人 (**SUZUKI Masato**); 〒1890002 東京都東村山市青葉町四丁目2番1号 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター内 Tokyo (JP). 高橋 崇道(**TAKAHASHI Takamichi**); 〒9591695 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デンカ株式会社 五泉事業所 鏡田工場内 Niigata (JP). 石井 明(**ISHII Akira**); 〒9591695 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デンカ株式会社 五泉事業所 鏡田工場内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー32階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING HELICOBACTER SUIIS ANTIBODY USING WHOLE BACTERIAL CELL

(54) 発明の名称: 全菌体を用いた、ヘリコバクター・スイス抗体の検出法

(57) **Abstract:** Provided are a measuring reagent and a measuring method for a *Helicobacter suis* antibody using a whole bacterial cell of *H. suis*. The reagent contains at least an *H. suis* whole bacterial cell and an anti-Ig antibody, and detects an antibody that binds with *H. suis* whole bacterial cell of a subject-derived sample.

(57) 要約: *H. suis* の全菌体を用いたヘリコバクター・スイスの抗体の測定方法および測定試薬の提供。少なくとも *H. suis* 全菌体および抗 Ig 抗体を含む、被験体由来の検体の *H. suis* 全菌体と結合する抗体を検出する試薬。



WO 2023/145789 A1

明 細 書

発明の名称：

全菌体を用いた、ヘリコバクター・スイス抗体の検出法

技術分野

[0001] 本発明は、H. スイスの全菌体を用いたヘリコバクター・スイスの抗体の測定方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、慢性胃炎、胃潰瘍や十二指腸潰瘍、胃癌、胃Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫などに、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*、ヒトの胃に寄生する微好気性のグラム陰性螺旋菌、以下、「H. ピロリ」という) による感染が関与することが知られている。H. ピロリの感染検査方法として、分離培養法や尿素呼気試験 (UBT)、血清や尿中のH. ピロリ抗体価の測定 (ELISAとラテックス凝集法)、便中のH. ピロリ抗原測定 (イムノクロマト法)、胃生検体の迅速ウレアーゼ試験 (RUT) が主に採用されている。

[0003] しかし、近年、H. ピロリの診断や除菌の普及によるH. ピロリの感染率の低下に伴い、H. ピロリ以外のヒトに重篤な胃疾患を誘発するヘリコバクターとして、NHPH (Non-*Helicobacter pylori* *helicobacters*; H. ピロリ以外のヘリコバクター) が問題となってきた。NHPHには、ヘリコバクター・スイス (以下、H. スイス)、*H. bizzozeronii*、*H. felis*、*H. salmonis*、*H. ailurogastricus*、*H. cynogasticus*、*H. baculiformis*、*H. mustelae*、*H. acinonychis*、*H. cetorum*および*H. heilmannii*が含まれ、このうちヒトの胃から見つかる大部分は、H. スイスである。

[0004] H. ピロリは霊長類にしか感染せず、乳幼児期においてのみ近親者からの

感染が想定されるが、H. スイスは年齢に関係なく、豚、猿などの動物から感染する。

[0005] H. スイスは約10万年前には、サルの胃に寄生していた。その後1.5万年前にブタにも感染するようになった。ブタの家畜化に伴い感染が爆発的に広まり、ヒトにも感染するようになった（非特許文献1）。世界各地から分離された181株のH. スイス遺伝子のMLST（Multi Locus Sequencing Typing）解析を行ったところ、感染宿主動物により独立のクラスターを形成したが、ヒトから分離した株は、独立のクラスターを形成せず、ブタのクラスターに含まれることから、ヒトへの感染源はブタと判定された（非特許文献2）。そこで、ブタとヒトにおいて感染診断と除菌剤が必要となる。

[0006] H. スイスの感染検査方法として、血清中のH. スイス抗体価の測定（ELISAとラテックス凝集法）が報告されている（特許文献1、2）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2016-10331号公報

特許文献2：国際公開WO2019/225639号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Flahou et al., ISM J., Jan; 12 (1) : 77-86. doi:10.1038/ismej.2017.145

非特許文献2：E. Rimbara et al., Proc Natl Acad Sci USA 2021 Vol. 118 Issue 13 e2026337118. doi:10.1073/pnas.2026337118.

非特許文献3：Haesebrouck F. et al., Helicobacter, 16 (4), 339-340, 2011 doi:10.1111/j.1523-5378.2011.00849.x

非特許文献4: A. D. Augustin, et al., Front. Med., 2019, 6, 188, doi:10.3389/fmed.2019.00188 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31555648>)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、H. スイスの全菌体を用いたヘリコバクター・スイスの抗体の測定方法および測定試薬の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 特許文献1にはH. スイスのF2R2蛋白をプレートに固相して血清中の抗体を測定することが開示されている。そして、特許文献2にはF2R2蛋白より抗体価が高いとされるHsvA蛋白をプレートに固相して血清中の抗体を測定することが開示されている。

[0011] しかしながら、従来方法より感度と特異性の高い方法が求められていた。

今回、本発明者らは、H. スイスの全菌体を用いることで、感染者の体内の抗H. スイス抗体の測定感度と特異性を高めることを新規に発見し、新しい測定法を見出した。

[0012] より具体的には、本発明は、以下の発明に関する：

[1] 少なくともH. スイス全菌体および抗Ig抗体を含む、被験体由来の検体のH. スイス全菌体と結合する抗体を検出する試薬。

[2] 被験体が哺乳動物であることを特徴とする、[1]の試薬。

[3] 検体が血液由来であることを特徴とする、[1]または[2]の試薬。

[4] さらに、H. ピロリの菌体成分またはH. ピロリ菌体成分に対する抗体を含む、被験体由来の検体のH. ピロリと結合する抗体またはH. ピロリ菌体成分の抗原も検出することを特徴とする、[1]～[3]のいずれかの試薬。

[5] ELISAまたはイムノクロマト用試薬である、[1]～[4]のいずれ

かの試薬。

[6] 以下の工程を含む、被験体由来の検体の抗H. スイス全菌体と結合する抗体を検出することを特徴とする方法：

- (a) 被験体由来の検体をH. スイス全菌体と接触させる工程、および
- (b) H. スイス全菌体と結合した、前記検体中の抗体を検出する工程。

[7] 被験体が哺乳動物であることを特徴とする、[6]の方法。

[8] 検体が血液由来であることを特徴とする、[6]または[7]の方法。

[9] さらに、以下の工程を含む、被験体由来の検体のH. ピロリと結合する抗体も検出することを特徴とする[6]～[8]のいずれかの方法：

- (a) 被験体由来の検体をH. ピロリ菌体成分と接触させる工程、および
- (b) H. ピロリ菌体成分と結合した、前記検体中の抗体を検出する工程。

[10] さらに、以下の工程を含む、被験体由来の検体のH. ピロリ菌体成分の抗原も検出することを特徴とする、[6]～[8]のいずれかの方法：

(a) 被験体由来の検体をH. ピロリ菌体成分に対する抗体と接触させる工程、および

(b) H. ピロリ菌体成分に対する抗体と結合した、前記検体中のH. ピロリ菌体成分の抗原を検出する工程。

[11] [1]～[5]のいずれかの試薬を用いた測定および／または[6]～[10]のいずれかの方法により抗体が検出された被験体をH. スイスに感染していると判定する、H. スイスの感染の検出方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2022-009397号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0013] H. スイス全菌体を用いることで、感染者の体内の抗H. スイス抗体を高感度に測定することができる。H. スイス全菌体は、H. スイス感染診断対象体由来血液中の抗H. スイス抗体の有無、または抗体価を測定するために使用することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]検体としてヒト血清を用い、抗原としてH. スイス全菌体およびH s v A抗原ペプチドを用いたE L I S Aの結果を測定値で示す図である。

[図2]検体としてヒト血清を用い、抗原としてH. スイス全菌体およびH s v A抗原ペプチドを用いたE L I S Aの結果をグラフで示す図である。

[図3]検体としてヒト血清（3 6 0 0倍希釈）を用い、抗原としてH. ピロリ全菌体またはH. スイス全菌体を用いたE L I S Aの結果を測定値で示す図である。

[図4]検体としてヒト血清（3 6 0 0倍希釈）を用い、抗原としてH. ピロリ全菌体（図4 A）またはH. スイス全菌体（図4 B）を用いたE L I S Aの結果をグラフで示す図である。

[図5-1]検体としてヒト血清（3 6 0 0倍希釈）を用い、抗原としてH. スイス全菌体またはH. スイスのH s V Aの部分ペプチド（配列番号1～5）を用いたE L I S Aの結果を測定値で示す図である。

[図5-2]検体としてヒト血清（3 6 0 0倍希釈）を用い、抗原としてH. スイス全菌体またはH. スイスのH s V Aの部分ペプチド（配列番号6～11）を用いたE L I S Aの結果を測定値で示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の方法について説明する。

本発明は、被験体の生体試料中のH. スイスの全菌体に対する抗体を検出する方法、および該抗体を検出する試薬である。本発明は、被験体におけるH. スイスの存在を判定する方法、または被験体のH. スイスの感染の検出方法でもある。あるいは、被験体のH. スイス感染症を診断するための補助的データを取得する方法である。

[0016] (H. スイス: *Helicobacter suis*)

本明細書において、「H. スイス」とは、50種類以上報告されているヘリコバクター属細菌の中で、NHPH (*Non-Helicobacter pylori helicobacters*; H. ピロリ以外のヘリコバクター)あるいは、*Helicobacter heilmannii sensu*

Lat o（広義のヘリコバクター・ハイルマニイ）に含まれるH. スイスの菌種を意味する（非特許文献3）。H. スイスは、ヒト以外にブタ、サル、イノシシ、ネコ、イヌなどの胃に感染することが知られている。本明細書におけるH. スイスが単離された感染哺乳動物は特に限定されるものではなく、例えば、ヒト、サル、イノシシ、またはブタであってよい。

[0017] （H. スイス全菌体）

本明細書において、「H. スイス全菌体」とは、H. スイスの全菌体の成分であり、例えばH. スイスを超音波破碎することで得られる。H. スイス全菌体画分とも呼ぶ。超音波破碎は、H. スイス菌体を緩衝液に懸濁させ超音波破碎機を用いて行うことができる。超音波破碎機としてサンプル密閉型超音波破壊装置B i o r u p t o r（ビーエム機器）が挙げられる。超音波破碎により、H. スイス菌体は破壊され、全菌体成分を含む破碎物が得られる。

[0018] （H. スイス全菌体に対する抗体を検出する方法および試薬）

H. スイス全菌体に対する抗体は、H. スイス全菌体に含まれる蛋白質、糖等の抗原等の成分、すなわちH. スイス全菌体成分に対する抗体をいい、種々の物質に対する複数の抗体が含まれ得る。本発明において、H. スイス全菌体に含まれる蛋白質、糖等の抗原のうち少なくともいずれかの抗原に対する抗体をH. スイス全菌体に対する抗体という。実際には、H. スイスが感染した被験体において、体内でH. スイス菌体が分解された結果、被験体中でH. スイス全菌体に対する抗体が産生される。

[0019] なお、抗体がH. スイス全菌体に含まれる抗原と結合することを、抗体がスイス全菌体と結合するという。

[0020] H. スイス全菌体に対する抗体を検出する試薬は、公知の方法に適用し得る試薬として作製することができる。公知の方法としては、例えば、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；イムノブロットング法；イムノク

ロマト法；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）；比較干渉法等を挙げることができる。本発明の試薬が、所望の測定法に適用することが可能であるか否かは、H. スイス全菌体に対する抗体を含む検体または該検体と同じ濃度のH. スイス全菌体に対する抗体を含むサンプルを用いて、各測定法を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で確認することができる。

[0021] H. スイス全菌体に対する抗体をH. スイス感染のマーカーとして用いることができる。

[0022] すなわち、被験体がH. スイスに感染しているか否かは、被験体自身の免疫系が生み出したH. スイス全菌体に対する抗体の存在を確認することにより決定することができる。これらの抗体の存在は、H. スイス全菌体を利用した抗原抗体反応により検出し確認することができる。H. スイス全菌体を利用した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；ウェスタンブロットティング法等のイムノブロットティング法；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）；比較干渉法等の免疫測定法により行うことができる。

[0023] 一態様において、本発明は、以下の工程を含むH. スイス感染の判定方法に関する：

（a）被験体由来の検体をH. スイス全菌体と接触させる工程、

(b) H. スイス全菌体と結合した、前記検体中の抗体を検出する工程、及び

(c) H. スイス全菌体と結合した抗体が検出された被験体をH. スイスに感染していると判定し、一方、H. スイス全菌体と結合した抗体が検出されなかった被験体を、H. スイスに感染していないと判定する工程。

[0024] 他の態様において、本発明は、以下の工程を含むH. スイス感染の判定方法に関する：

(a) 被験体由来の検体を、本発明のH. スイス全菌体と接触させる工程、

(b) H. スイス全菌体と結合した、前記検体中の抗体のレベルを測定する工程、及び

(c) 測定された抗体のレベルが、同様の方法により陰性対照について測定された抗体のレベルよりも高い場合、該被験体をH. スイスに感染していると判定し、一方、測定された抗体のレベルが、同様の方法により陰性対照について測定された抗体のレベルと同等か低い場合、該被験体を、H. スイスに感染していないと判定する工程。ここで、陰性対象とは、H. スイスに感染していない被験体由来の検体をいう。抗体のレベルとは、抗体の定量値、すなわち抗体価をいい、例えば、検体中の濃度で表される。また、抗体のレベルの測定は、抗体の検出に含まれる。

[0025] H. スイス全菌体と被験体由来の検体中の抗体が結合したか否かは、以下に例示される方法で確認すればよい。例えば、被験体由来の検体を、本発明のH. スイス全菌体と接触させた後に、反応系を洗浄して非結合の抗体を除去する。この結果、反応系には、H. スイス全菌体と被験体由来の検体中の抗体が結合した複合体が存在する。その後、標識化した抗Ig抗体と接触させてH. スイス全菌体と結合した被験体由来の抗体と該標識抗Ig抗体とを結合させた後に、反応系を洗浄して非結合の標識抗Ig抗体を除去して、残った標識抗Ig抗体の標識を検出し、該標識抗Ig抗体の標識が検出された場合にH. スイス全菌体と被験体由来の検体中の抗体が結合したと判断することができる。該標識抗Ig抗体の標識レベルを測定することで、H. ス

イス全菌体と被験者由来の検体中の抗体とのレベルを測定することもできる。抗Ig抗体は、抗IgG抗体でも、抗IgM抗体等でもよいが、好ましくは抗IgG抗体である。また、抗IgG抗体は好ましくはモノクローナル抗体を用いる。また、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、VHHシングルドメイン抗体(ナノボディ)、dsFv、diabody、minibodyなどの特異的な抗原結合性を有する断片(抗原結合性断片)を用いることもできる。このような方法の代表例として、ELISA等やイムノクロマト法を挙げることができる。抗Ig抗体の標識には、アルカリフォスファターゼや西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素、金コロイドのような金属コロイド、シリカ粒子、セルロース粒子、磁性粒子、蛍光粒子、着色ポリスチレン粒子および着色ラテックス粒子等が用いられることが多い。金属コロイド粒子、着色ポリスチレン粒子や着色ラテックス粒子等の着色粒子を用いる場合には、これらの標識試薬が凝集することによって着色が生じるので、この着色を測定する。結合レベルを指標として利用する場合、予め存在量が判明している標準溶液を用いて標準曲線を作成することにより、測定値から抗体量を計算することができる。あるいは、表面プラズモン共鳴センサーを用いて、H. スイス全菌体と被験体由来の検体中の抗体の結合を検出、または測定することもできる。

[0026] 上記の免疫測定法の中でも、サンドイッチ法が好ましい。サンドイッチ法自体は免疫測定分野において周知であり、例えばラテラルフロー式に免疫測定を行うイムノクロマト法やELISA法により行うことができる。これらのサンドイッチ法自体はいずれも周知であり、本発明の方法は周知のサンドイッチ法により行うことができる。以下、ELISA法について説明する。

[0027] ELISA用プレートに、H. スイス全菌体成分(抗原)を固相化し、該固相化担体にH. スイス全菌体に対する抗体を含む可能性がある検体を添加して接触させ、固相化担体上で抗原と抗体の複合体を形成させる。さらに、ヒト抗体に対する特異的抗体(抗Ig抗体)であって酵素で標識した抗体を添

加して接触させ、固相化担体上の抗原と抗体の複合体に抗 1 g 抗体を結合させる。次いで、酵素に対する基質を添加し、酵素反応を行わせ、発色を吸光度の測定により測定しプレート上の抗原と抗体のサンドイッチ複合体を検出すればよい。

[0028] 抗原抗体反応は 4℃～45℃、好ましくは 20℃～40℃、さらに好ましくは 25℃～38℃で行うことができ、また、それぞれの結合反応の反応時間は、10分～18時間、より好ましくは 10分～3時間、さらに好ましくは 30分～2時間程度である。

[0029] H. スイス全菌体成分(抗原)の担体への結合は、物理的吸着、官能基を利用した共有結合等、公知の方法で行うことができる。固相化量は、特に限定されないが担体が 96 ウェルマイクロタイタープレートの場合、1 ウェル当たり数 ng から数十 μ g が望ましい。固相化は固相化すべき H. スイス全菌体成分(抗原)の溶液を担体と接触させることにより行うことができる。例えば、H. スイス全菌体成分(抗原)の溶液をマイクロタイタープレートのウェルに分注し一定時間置くことにより固相化することができる。H. スイス全菌体成分(抗原)を固相化した後は、アッセイ中の非特異的結合を防ぐためにウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、卵白アルブミン等を含んだブロッキング溶液を用いてブロッキングを行うことが好ましい。

[0030] H. スイスは広く哺乳動物に感染することから、本発明の H. スイスの存在を判定する方法及び H. スイスへの感染を判定する方法における被験体は、ヒト、サル、ブタ、ネコ、イノシシ、イヌ、ウサギ、ネズミ及びヒツジ等の哺乳動物とすることができ、好ましくは、ヒトである。また、好ましくは、胃炎、慢性胃炎、鳥肌胃炎、A 型胃炎、胃 MALT リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、胃癌、胃・十二指腸潰瘍、特発性血小板減少紫斑病、機能性ディスぺプシア、またはパーキンソン病に罹患しているヒト患者である。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(非特許文献 4)。

- [0031] 本発明のH. スイス存在を判定する方法において用いる検体としては、例えば、生検として被験体から採取した組織試料または被験体から採取した液体試料を使用することができる。検体は、本発明の方法の対象として用い得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。本発明のH. スイスの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、好ましい検体は、血液、血漿、血清、リンパ液、及び尿である。
- [0032] 本発明のH. スイス全菌体は、本明細書の開示を参照して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、本発明の試薬は、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。
- [0033] 一態様において、本発明は、検体中の、H. スイス全菌体に対する抗体を検出する方法を含む、当該検体を採取した被験体におけるH. スイスの存在を判定する方法に関する。特に、本発明は、H. スイス全菌体に対する抗体を検出することを含む、被験体におけるH. スイスの感染を判定する方法に関する。本方法において、H. スイス全菌体に対する抗体が検出された検体を採取した被験体は、H. スイスが存在する、またはH. スイスに感染していると判定される。
- [0034] 本発明の方法が、前記検体中の抗体と、被検試薬との結合を測定することにより行われる場合、判定において「検出された」か否かは、絶対的な検出の有無である必要はなく、他の検体との比較において決定してもよい。すなわち、土の検出結果に基づくものではなく、測定値から検出の有無を決定してもよい。すなわち、本発明の方法において、「検出する」工程は、必要に応じて「測定する」と置き換えることができ、「検出された」か否かは、対象物質の測定値に基づき陰性対象との比較において決定してもよい。例えば、陰性対象、即ち、H. スイスを含まない検体、またはH. スイスに感染していないことが明らかな被験体由来の検体等において目的の物質が検出される場合、検被体の測定値が当該陰性対象の測定値と同等であれば、微量なが

ら検出されていても、本発明の方法においては「検出されなかった」として H. スイスが存在しない、または H. スイスに感染していないと判定される。一方で、陰性対象の測定値と比較して、被験体の測定値が高い場合には、「検出された」として H. スイスが存在する、または H. スイスに感染していると判定される。よって、本発明の方法において、陰性である対象についてわずかな測定値が認められることは、本発明が予め許容する範囲内である。

[0035] 本発明の方法においては、H. スイス感染者と H. スイス非感染者の検体中の抗体の抗体価を測定し、カットオフ値を設定することができる。カットオフ値以上であれば、H. スイスが存在する、または H. スイスに感染していると判定することが可能である。

[0036] カットオフ値は、例えば、ROC (receiver operating characteristic curve: 受信者動作特性曲線) 解析により定めることができる。また、ROC 解析により本発明の方法による診断精度 (感度及び特異度) を決定することができる。ROC 解析は、H. スイス感染者から採取した検体と H. スイス非感染者から採取した検体について抗 H. スイス抗体を測定し、各カットオフ値での感度及び偽陽性率 (1 - 特異度) を算出し、横軸を (1 - 特異度) とし、縦軸を感度とした座標上にプロットする。ROC 解析により診断精度を解析した場合の感度は 80% 以上、好ましくは 85% 以上、さらに好ましくは 90% 以上であり、特異度は 75% 以上、好ましくは 80% 以上であることが良い。

[0037] (H. ピロリ (H. pylori) に対する抗体の検出)

本発明は同一の被験体において H. スイス全菌体、または全菌体に含まれる蛋白質と結合する抗体と H. ピロリに対する抗体を検出する方法および该方法に用いる試薬も包含する。ここで、H. ピロリに対する抗体は、H. ピロリの全菌体のいずれかの構成成分、すなわち菌体成分に対する抗体をいう。例えば H. ピロリの検査で陰性だが胃疾患の症状が示される場合は、H. スイスの感染が原因の可能性が考えられる。同一の被検体から H. スイス全

菌体と結合する抗体とH. ピロリに対する抗体を検出することで、H. ピロリの感染の有無だけではなく、これまでH. ピロリ陰性で見逃されていた被験体に対してもH. スイス感染の確認をすることができる。早期に感染を確認することで、適切な治療方針を定めることができる。同一の被験体由来の検体はH. ピロリとH. スイスで同じであっても、異なってもよい。すなわち、H. スイス全菌体と結合する抗体の検出とH. ピロリに対する抗体の検出は、同じ検体を用いて同時に行ってもよいし、別の時に採取された異なる検体を用いて別途行ってもよい。H. ピロリに対する抗体の検出は、H. スイス全菌体に対する抗体の検出と同様の方法で行えばよい。

[0038] H. ピロリの判定においても「検出された」か否かは、絶対的な検出の有無である必要はなく、他の検体との比較において決定してもよい。すなわち、土の検出結果に基づくものではなく、測定値から検出の有無を決定してもよい。すなわち、本発明の方法において、「検出する」工程は、必要に応じて「測定する」と置き換えることができ、「検出された」か否かは、対象物質の測定値に基づき陰性対象との比較において決定してもよい。例えば、陰性対象、即ち、H. ピロリを含まない検体またはH. ピロリに感染していないことが明らかな被験体由来の検体等において目的の物質が検出される場合、被験体の測定値が当該陰性対象の測定値と同等であれば、微量ながら検出されていても、本発明の方法においては「検出されなかった」としてH. ピロリが存在しない、またはH. ピロリに感染していないと判定される。一方で、陰性対象の測定値と比較して、被験体の測定値が高い場合には、「検出された」としてH. ピロリが存在する、またはH. ピロリに感染していると判定される。よって、本発明の方法において、陰性である対象についてわずかな測定値が認められることは、本発明が予め許容する範囲内である。

実施例

[0039] 以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに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。

[0040] (実施例1) ヒト検体の測定

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay ; 酵素免疫測定法) を用いた感染者 (ヒト) の抗H. スイス抗体価の測定

H. スイス培地の組成

ブルセラブロス (BD BBL)	2.8 g	
寒天粉末 (BD BBL)	1.5 g	寒天培地作製の場合に加えるピルビン酸 (Sigma)
	0.1 g	
Skirrow Supplement (2 mL/vial, Oxoid)		0.4 mL
Vitox Supplement (10 mL/vial, Oxoid)		2 mL
Amphotericin B (0.25 mg/mL)		2 mL
濃塩酸	0.135 mL	により pH を 5 に調整
非働化牛胎児血清 (FBS)		20 mL
蒸留水を加えて、全量を 100 mL とした。		

[0041] 75 cm² のフラスコに、寒天培地を 9 mL 加え斜面培地を作製し、-80℃ 保存の鳥肌胃炎の患者から分離した H. スイス SNTW101c 株 (非特許文献 2) を植菌し、液体培地を 12 mL 加え、温度 37℃、湿度 100%、微好気条件 (5% O₂, 12% CO₂, 83% N₂) で、振とう培養を 1 週間行った。その後、培養液を遠心分離 (13,420 G × 10 分間) により菌体を集めた。菌体は PBS (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4) で 2 回洗浄後、蒸留水に懸濁し、氷冷条件下で 5 分間の超音波破碎処理を行った (Bioruptor II 超音波細胞破壊装置 (設定 High) で、30 秒間の音波処理と 30 秒間の休止を 5 回繰り返す)。破壊液を「H. スイス全菌体懸濁液」とした。蛋白質の定量には、BSA を標準蛋白質として Bio-Rad Protein Assay キットを用いた。

[0042] HsvA 抗原ペプチド No. 16 は、特許文献 2 で開示されている HsvA (H. スイスにのみ特異的に存在する外膜蛋白質で、約 3000 アミノ酸

残基で構成される)の一部である14アミノ酸残基(配列番号6)を示し、このNo. 16ペプチドに交差する抗体検査が、H. スイス感染検査において、感度と特異性に優れていることから、No. 16ペプチドは、H. スイス特異的な抗体産生に関与していると考えられる。

[0043] 0.1 M炭酸-重炭酸緩衝液(pH 9.4)に溶解したH. スイス全菌体懸濁液(4 μ g/mL) 100 μ L/wellを96-well NUNC Immunoplate #439454へ滴下し、4℃に一晩置いた。翌日菌体溶液を廃棄し、PBS-T (0.05% (V/V) Tween 20を含むPBS) 200 μ L/wellで3回洗浄した。Blocker BSA (ウシ血清アルブミン) 10X in PBS (Thermo Scientific) より調製したブロッキング溶液(1% (V/V) BSA、PBS系pH 7.4)を200 μ L/well滴下し、37℃に1時間置いた。ブロッキング溶液を廃棄し、PBS-T 200 μ L/wellで3回洗浄した。H. ピロリ感染者(既存の検査法(尿素呼気試験や抗体検査、抗原検査など)で判定)、およびH. スイス感染者(被検者の胃生検体からDNAを調製し、特許文献2に記載のリアルタイムPCR法あるいは胃生検体からの培養によりH. スイス感染を判定)から血清をそれぞれ採取した。また対照として、いずれの菌にも感染していない健常人からの血清を採取した(非感染)。ブロッキング溶液を用いて希釈したヒト血清を50 μ L/well滴下し、37℃に1時間置いた。血清溶液を廃棄し、PBS-T 200 μ L/wellで3回洗浄した。ブロッキング溶液を用いて100,000倍希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体(Goat anti-Human IgA+IgG+IgM (H+L), Jackson ImmunoResearch, Inc.)を50 μ L/well滴下し、37℃で1時間置いた。二次抗体溶液を廃棄し、PBS-T 200 μ L/wellで3回洗浄した。SuperBlue TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component), Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (KPL)を50 μ L/well滴下し青

く発色後に、1 N塩酸を50 μ L/well滴下し黄色へ変色させた。プレートリーダーを用いて450 nm（リファレンス波長：620 nm～630 nm）の吸光度を測定した。

[0044] ヒト血清を用いたELISAの結果を図1および図2に示す。H. スイス全菌体では、1800倍及び3600倍希釈ヒト血清（H. スイス陽性3検体（患者A、B、C）；H. ピロリ陽性3検体（患者D、E、F）；非感染3検体（患者G、H、I））について、吸光度1.0以上を陽性、以下を陰性として区別することができた。一方HsvA抗原ペプチドNo. 16では、200倍、800倍及び3200倍希釈ヒト血清（H. スイス陽性3検体（患者A、B、C）；H. ピロリ陽性3検体（患者D、E、F）；非感染3検体（患者G、H、I））について、陽性と陰性を区別することができなかった。このことから、H. スイス全菌体は、HsvA抗原ペプチドNo. 16よりも、H. スイスに対する抗体に極めて高感度且つ特異的であることが示された。よってH. スイス全菌体は、血清中の抗体を利用した特異的な感染診断に有用である。

[0045] （実施例2）ヒト検体の測定

ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay ;酵素免疫測定法)を用いた感染者（ヒト）の抗H. ピロリ抗体価の測定および抗H. スイス抗体価の測定

（1）ELISA用H. ピロリ抗原（H. ピロリ全菌体）の調製

H. ピロリ TN2GF4株（非特許文献2）は、10%（V/V）牛胎児血清（FCS）を含むブルセラブロスで温度37℃、湿度100%、微好気条件（5%O₂、10%CO₂、85%N₂）で48時間振とう培養を行った後で、培養液を遠心分離（13,420 G x 10分間）により菌体を集めた。菌体はPBSリン酸緩衝生理食塩水、pH7.4）で2回洗浄後、蒸留水に懸濁し、氷冷条件下で5分間の超音波破碎処理を行った（Bioruptor II超音波細胞破壊装置（設定High）で、30秒間の音波処理と30秒間の休止を5回繰り返す）。破壊液を「H. ピロリ全菌体懸濁液」とした

。蛋白質の定量には、BSAを標準蛋白質としてBio-Rad Protein Assayキットを用いた。

[0046] (2) ELISA用H. スイス抗原 (H. スイス全菌体) の調製

H. スイス培地の組成

ブルセラブロス(BD BBL)	2.8 g	
寒天粉末(BD BBL)	1.5 g	寒天培地作製の場合に加えるピルビン酸(Sigma)
	0.1 g	
Skirrow Supplement(2 mL/vial, Oxoid)		0.4 mL
Vitox Supplement(10 mL/vial, Oxoid)		2 mL
Amphotericin B(0.25 mg/mL)		2 mL
濃塩酸	0.135 mL	によりpHを5に調整
非働化牛胎児血清 (FBS)		20 mL

蒸留水を加えて、全量を100 mLとした。

[0047] 75 cm²のフラスコに、寒天培地を9 mL加え斜面培地を作製し、-80℃保存の鳥肌胃炎の患者から分離したH. スイス SNTW101c株（非特許文献2）を植菌し、液体培地を12 mL加え、温度37℃、湿度100%，微好気条件（5%O₂，12%CO₂，83%N₂）で、振とう培養振を1週間行った。その後、培養液を遠心分離（13,420 G x 10分間）により菌体を集めた。菌体はPBSリン酸緩衝生理食塩水、pH7.4）で2回洗浄後、蒸留水に懸濁し、氷冷条件下で5分間の超音波破碎処理を行った（Bioruptor II超音波細胞破壊装置（設定High）で、30秒間の音波処理と30秒間の休止を5回繰り返す）。破壊液を「H. スイス全菌体懸濁液」とした。蛋白質の定量には、BSAを標準蛋白質としてBio-Rad Protein Assayキットを用いた。

[0048] 0.05 M炭酸-重炭酸緩衝液（pH9.6）に溶解したH. ピロリ全菌体懸濁液およびH. スイス全菌体懸濁液（4 μg/mL）100 μL/wellを96-well NUNC ImmunoPlate #468667へ滴下し

、4℃に一晩置いた。翌日菌体溶液を廃棄し、PBS-T (0.05% (V/V) Tween 20を含むPBS) 250 μ L/wellで3回洗浄した。ブロッキング溶液 (1% (V/V) BSA、PBS系pH7.0) を200 μ L/well滴下し、37℃に1時間置いた。ブロッキング溶液を廃棄し、PBS-T 250 μ L/wellで3回洗浄した。胃疾患の症状を有するH.ピロリ感染者 (既存の検査法 (尿素呼気試験や抗体検査、抗原検査など) で判定)、および胃疾患の症状を有するH. スイス感染者 (被検者の胃生検体からDNAを調製し、特許文献2に記載のリアルタイムPCR法あるいは胃生検体からの培養によりH. スイス感染を判定) から血清をそれぞれ採取した。また対照として、いずれの菌にも感染していない健常人からの血清を採取した (非感染)。検体希釈液 (0.5% (V/V) BSA、PBS系pH7.0) を用いて希釈したヒト血清を50 μ L/well滴下し、37℃に1時間置いた。血清溶液を廃棄し、PBS-T 250 μ L/wellで3回洗浄した。二次抗体希釈液 (1.0% (V/V) BSA、PBS系pH7.0) を用いて20,000倍希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Goat anti-Human IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, Inc.) を50 μ L/well滴下し、37℃で1時間置いた。二次抗体溶液を廃棄し、PBS-T 250 μ L/wellで3回洗浄した。TMB One Component HRP Microwell Substrate, (Surmodics, Inc.) を50 μ L/well滴下し青く発色後に、0.17M硫酸を50 μ L/well滴下し黄色へ変色させた。プレートリーダーを用いて450nm (リファレンス波長: 620nm~630nm) の吸光度を測定した。

[0049] ヒト血清 (3,600倍希釈) を用いたELISAの結果を図3および図4に示す。H.ピロリ全菌体では、H.ピロリ感染群 (胃疾患-A、B、C、D) の吸光度がH. スイス感染群 (胃疾患-E、F、G、H) または非感染群 (健常者-A、B、C、D) よりも優位に高い結果が得られた (H.ピロリ感染群 vs. H. スイス感染群 or 非感染群: $P=0.0209$)。

また、H. スイス全菌体では、H. スイス感染群（胃疾患 - E、F、G、H）の吸光度がH. ピロリ感染群（胃疾患 - A、B、C、D）または非感染群（健常者 - A、B、C、D）よりも優位に高い結果が得られた（H. スイス感染群 v s. H. ピロリ感染群 o r 非感染群：P = 0. 0209）。このことより、同一の被検体に対し抗H. ピロリ抗体と抗H. スイス抗体の両方の検査をすることで、H. ピロリ感染の有無だけではなく、今までH. ピロリ陰性で見逃されていた対象についても、H. スイス感染と診断できることが明らかとなった。

[0050] （実施例3）ヒト検体の測定

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay ; 酵素免疫測定法) を用いた感染者（ヒト）の抗H. スイス抗体価の測定

H. スイス培地の組成

ブルセラブロス (BD BBL)	2.8 g	
寒天粉末 (BD BBL)	1.5 g	寒天培地作製の場合に加えるピルビン酸 (Sigma)
	0.1 g	
Skirrow Supplement (2 mL/vial, Oxoid)		0.4 mL
Vitox Supplement (10 mL/vial, Oxoid)		2 mL
Amphotericin B (0.25 mg/mL)		2 mL
濃塩酸	0.135 mL	により pH を 5 に調整
非働化牛胎児血清 (FBS)		20 mL
蒸留水を加えて、全量を 100 mL とした。		

[0051] 75 cm² のフラスコに、寒天培地を 9 mL 加え斜面培地を作製し、-80℃保存の鳥肌胃炎の患者から分離したH. スイス SNTW101c 株（国際公開WO2019/225639号）を植菌し、液体培地を 12 mL 加え、温度 37℃、湿度 100%、微好気条件（5% O₂, 12% CO₂, 83% N₂）

）で、振とう培養振を1週間行った。その後、培養液を遠心分離（13, 420 G x 10分間）により菌体を集めた。菌体はPBSリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4）で2回洗浄後、蒸留水に懸濁し、氷冷条件下で5分間の超音波破碎処理を行った（Bioruptor II超音波細胞破壊装置（設定High）で、30秒間の音波処理と30秒間の休止を5回繰り返す）。破壊液を「H. スイス全菌体懸濁液」とした。蛋白質の定量には、BSAを標準蛋白質としてBio-Rad Protein Assayキットを用いた。

[0052] HsvA抗原ペプチド（11種）は、国際公開WO2019/225639号で開示されているHsvA（H. スイスにのみ特異的に存在する外膜蛋白質で、約3000アミノ酸残基で構成される）の一部である14アミノ酸残基を示す。

EKKAVQQMENSNPD（ペプチドNo. 11：配列番号1）、

EKKAVEQMENSNDP（ペプチドNo. 11（TKY）：配列番号2）、

EKDAVTSLKNSNSG（ペプチドNo. 11（SH8）：配列番号3）、

EKDAVTSLENSNSG（ペプチドNo. 11（SH10）：配列番号4）、

NQGTFLEFLSNDVST（ペプチドNo. 19（TKY）：配列番号5）、

TNGQEVSA SIDYNK（ペプチドNo. 16：配列番号6）、

AKLSNFASNDALPD（ペプチドNo. 23：配列番号7）、

PTTSSGASPDSSNP（ペプチドNo. 10：配列番号8）、

NVDN ILNMPSTTSG（ペプチドNo. 20：配列番号9）、

TLTLEGTETFAQNS（ペプチドNo. 81：配列番号10）、及び

ADIQSSQTTFANSV（ペプチドNo. 61：配列番号11）。

[0053] 0.05 M炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解したH. ピロリ全菌体懸濁液およびHsvA抗原ペプチド (各4 $\mu\text{g/mL}$) 100 $\mu\text{L/well}$ を96-well NUNC ImmunoPlate #468667へ滴下し、4℃に一晩置いた。翌日菌体溶液を廃棄し、PBS-T (0.05% (V/V) Tween 20を含むPBS) 250 $\mu\text{L/well}$ で3回洗浄した。ブロッキング溶液 (1% (V/V) BSA、PBS系pH 7.0) を200 $\mu\text{L/well}$ 滴下し、37℃に1時間置いた。ブロッキング溶液を廃棄し、PBS-T 250 $\mu\text{L/well}$ で3回洗浄した。H.ピロリ感染者 (既存の検査法 (尿素呼気試験や抗体検査、抗原検査など) で判定)、およびH. スイス感染者 (被検者の胃生検体からDNAを調製し、特許文献2に記載のリアルタイムPCR法あるいは胃生検体からの培養によりH. スイス感染を判定) から血清をそれぞれ採取した。また対照として、いずれの菌にも感染していない健常人からの血清を採取した (非感染)。検体希釈液 (0.5% (V/V) BSA、PBS系pH 7.0) を用いて希釈したヒト血清を50 $\mu\text{L/well}$ 滴下し、37℃に1時間置いた。血清溶液を廃棄し、PBS-T 250 $\mu\text{L/well}$ で3回洗浄した。二次抗体希釈液 (1.0% (V/V) BSA、PBS系pH 7.0) を用いて20,000倍希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Goat anti-Human IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, Inc.) を50 $\mu\text{L/well}$ 滴下し、37℃で1時間置いた。二次抗体溶液を廃棄し、PBS-T 250 $\mu\text{L/well}$ で3回洗浄した。TMB One Component HRP Microwell Substrate, (Surmodics, Inc.) を50 $\mu\text{L/well}$ 滴下し青く発色後に、0.17 M硫酸を50 $\mu\text{L/well}$ 滴下し黄色へ変色させた。プレートリーダーを用いて450 nm (リファレンス波長: 620 nm~630 nm) の吸光度を測定した。

[0054] ヒト血清 (3,600倍希釈) を用いたELISAの結果を図5-1および5-2に示す。H. スイス全菌体ではH. スイス感染者に対して吸光度が

最小であった検体でも 1.391 (Abs. 450nm~630nm) と高い吸光度が得られ、H. スイスに感染していないH. ピロリ感染者および非感染者に対しては吸光度が最大であった検体でも 0.591 (Abs. 450nm~630nm) に止まり、H. スイス感染者と非感染者とを明確に区別することができた。一方H s v A抗原ペプチドではいずれの配列ペプチドにおいてもH. スイス感染者に対して高い吸光度が得られず、H. スイスに感染していないH. ピロリ感染者や非感染者に対する吸光度と明確に区別することができなかった。このことから、H. スイス全菌体を用いることにより、H s v A抗原ペプチドを用いた検出系よりも、感度・特異度ともに優れたH. スイスの診断ができることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0055] 本発明の方法により、H. ピロリ感染と区別してH. スイス感染の高感度な診断が可能となる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

配列表フリーテキスト

[0056] 配列番号 1 ~ 11 : 合成

請求の範囲

- [請求項1] 少なくともH. スイス全菌体および抗Ig抗体を含む、被験体由来の検体のH. スイス全菌体と結合する抗体を検出する試薬。
- [請求項2] 被験体が哺乳動物であることを特徴とする、請求項1記載の試薬。
- [請求項3] 検体が血液由来であることを特徴とする、請求項1または2に記載の試薬。
- [請求項4] さらに、H. ピロリの菌体成分またはH. ピロリ菌体成分に対する抗体を含む、被験体由来の検体のH. ピロリと結合する抗体またはH. ピロリ菌体成分の抗原も検出することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の試薬。
- [請求項5] ELISAまたはイムノクロマト用試薬である、請求項1～4のいずれか1項に記載の試薬。
- [請求項6] 以下の工程を含む、被験体由来の検体の抗H. スイス全菌体と結合する抗体を検出することを特徴とする方法：
 （a）被験体由来の検体をH. スイス全菌体と接触させる工程、および
 （b）H. スイス全菌体と結合した、前記検体中の抗体を検出する工程。
- [請求項7] 被験体が哺乳動物であることを特徴とする、請求項6記載の方法。
- [請求項8] 検体が血液由来であることを特徴とする、請求項6または7に記載の方法。
- [請求項9] さらに、以下の工程を含む、被験体由来の検体のH. ピロリと結合する抗体も検出することを特徴とする、請求項6～8のいずれか1項に記載の方法：
 （a）被験体由来の検体をH. ピロリ菌体成分と接触させる工程、および
 （b）H. ピロリ菌体成分と結合した、前記検体中の抗体を検出する工程。

[請求項10] さらに、以下の工程を含む、被験体由来の検体のH. ピロリ菌体成分の抗原も検出することを特徴とする、請求項6～8のいずれか1項に記載の方法：

(a) 被験体由来の検体をH. ピロリ菌体成分に対する抗体と接触させる工程、および

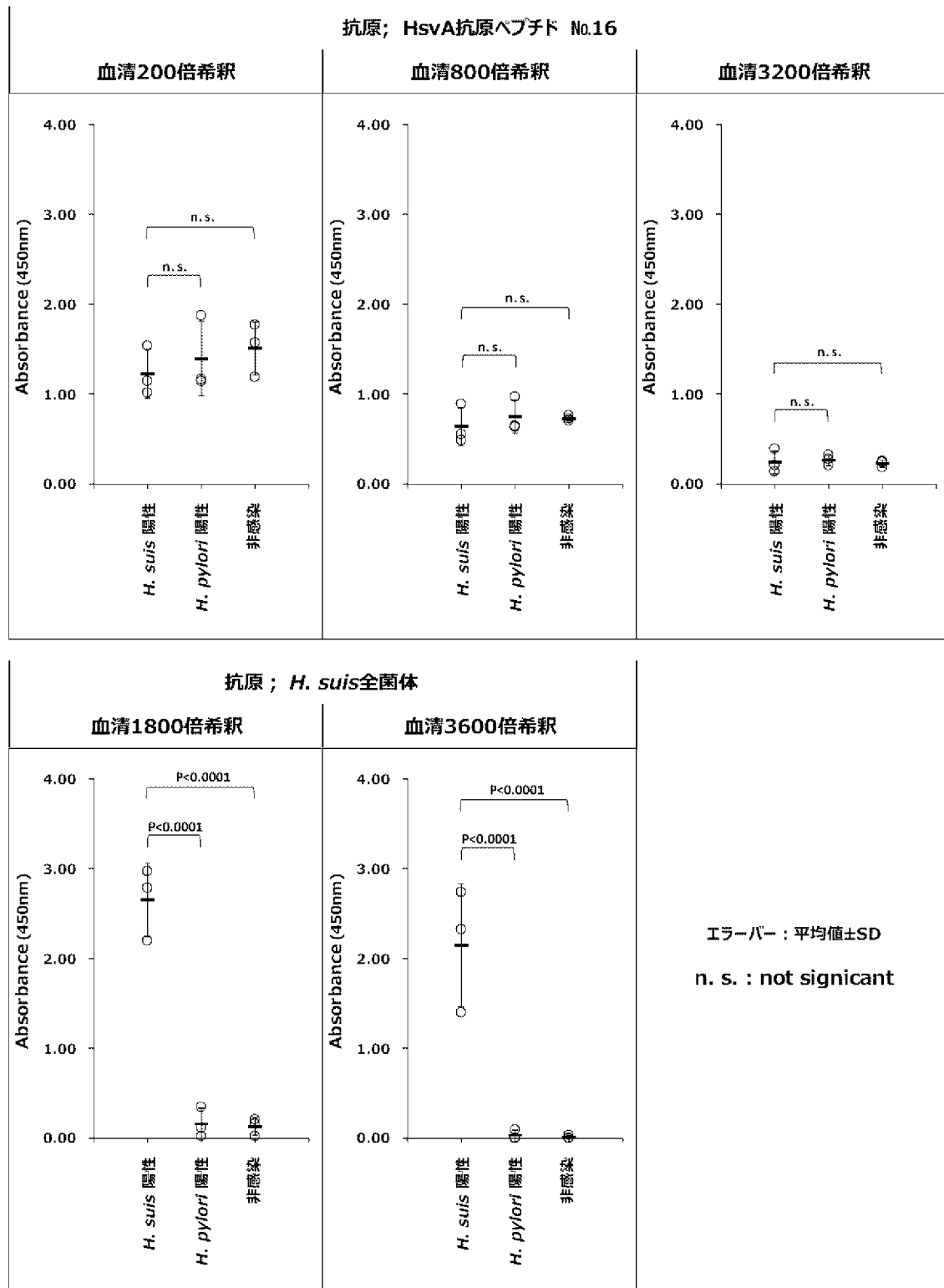
(b) H. ピロリ菌体成分に対する抗体と結合した、前記検体中のH. ピロリ菌体成分の抗原を検出する工程。

[請求項11] 請求項1～5のいずれか1項に記載の試薬を用いた測定および／または請求項6～10のいずれか1項に記載の方法により抗体が検出された被験体をH. スイスに感染していると判定する、H. スイスの感染の検出方法。

[図1]

固相抗原 血清希釈倍数		HsvA抗原ヘプチドNo.16			H. suis i全菌懸濁液	
		200倍希釈	800倍希釈	3200倍希釈	1800倍希釈	3600倍希釈
測定対象		Abs.450nm	Abs.450nm	Abs.451nm	Abs.450nm	Abs.451nm
H. suis感染者血清	H. suis 陽性-A	1.532	0.886	0.384	2.197	1.397
	H. suis 陽性-B	1.142	0.481	0.204	2.785	2.319
	H. suis 陽性-C	1.009	0.556	0.135	2.976	2.736
	平均値	1.228	0.641	0.241	2.653	2.151
H. pylori感染者血清	H. pylori 陽性-D	1.146	0.643	0.198	0.015	0.000
	H. pylori 陽性-E	1.169	0.631	0.318	0.116	0.000
	H. pylori 陽性-F	1.876	0.962	0.275	0.348	0.091
	平均値	1.397	0.745	0.264	0.160	0.030
非感染者血清	非感染-G	1.772	0.707	0.177	0.016	0.000
	非感染-H	1.190	0.759	0.236	0.160	0.000
	非感染-I	1.572	0.722	0.250	0.206	0.033
	平均値	1.511	0.729	0.221	0.127	0.011

[図2]

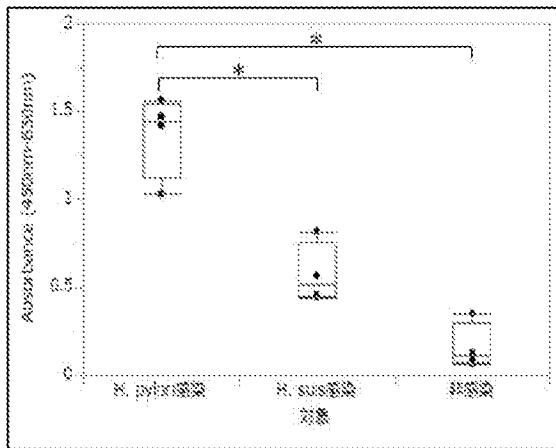


H.スイス感染群 vs 非感染群 or H.ピロリ感染群
P<0.0001(ANOVA多重比較検定)

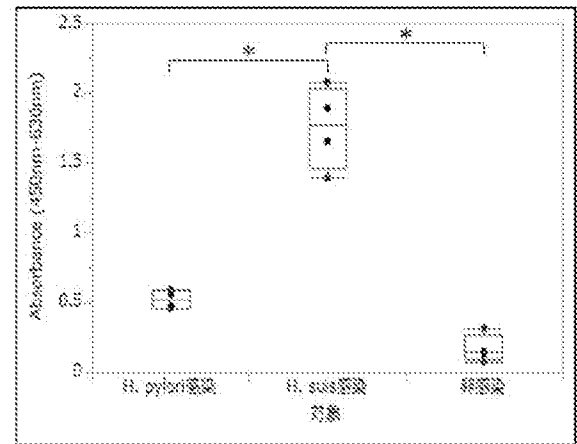
[図3]

測定対象		感染診断 結果	抗原固相ELISA結果(血清3600倍希釈)			
			抗原： <i>H. pylori</i> 全菌体		抗原： <i>H. suis</i> 全菌体	
			Abs.450nm -630nm	中央値	Abs.450nm -630nm	中央値
胃疾患患者 血清	胃疾患 -A	<i>H. pylori</i> 感染	1.030	1.445	0.477	0.519
	胃疾患 -B	<i>H. pylori</i> 感染	1.562		0.591	
	胃疾患 -C	<i>H. pylori</i> 感染	1.470		0.459	
	胃疾患 -D	<i>H. pylori</i> 感染	1.420		0.560	
	胃疾患 -E	<i>H. suis</i> 感染	0.460	0.515	2.078	1.773
	胃疾患 -F	<i>H. suis</i> 感染	0.817		1.654	
	胃疾患 -G	<i>H. suis</i> 感染	0.445		1.391	
	胃疾患 -H	<i>H. suis</i> 感染	0.569		1.891	
健常者血清	健常者-A	非感染	0.098	0.114	0.152	0.142
	健常者-B	非感染	0.129		0.131	
	健常者-C	非感染	0.070		0.077	
	健常者-D	非感染	0.354		0.313	

[図4]

A 抗原: *H. pylori* 全菌体

水準	対象		
	<i>H. pylori</i> 感染	<i>H. suis</i> 感染	非感染
最小値	1.030	0.445	0.070
0.10	1.030	0.445	0.070
0.25	1.128	0.449	0.077
中央値	1.445	0.515	0.114
0.75	1.539	0.755	0.298
0.90	1.562	0.817	0.354
最大値	1.562	0.817	0.354

H. pylori 感染群 vs. *H. suis* 感染群 $P = 0.0209$ (Wilcoxonの順位和検定)*H. pylori* 感染群 vs. 非感染群 $P = 0.0209$ (Wilcoxonの順位和検定)B 抗原: *H. suis* 全菌体

水準	対象		
	<i>H. pylori</i> 感染	<i>H. suis</i> 感染	非感染
最小値	0.459	1.391	0.077
0.10	0.459	1.391	0.077
0.25	0.464	1.457	0.091
中央値	0.519	1.773	0.142
0.75	0.583	2.031	0.273
0.90	0.591	2.078	0.313
最大値	0.591	2.078	0.313

H. suis 感染群 vs. *H. pylori* 感染群 $P = 0.0209$ (Wilcoxonの順位和検定)*H. suis* 感染群 vs. 非感染群 $P = 0.0209$ (Wilcoxonの順位和検定)

[図5-1]

対象	<i>H. suis</i> 全菌体	HsvA抗原ペプチド / 配列番号				
		1	2	3	4	5
<i>H. suis</i> 感染-A	2.078	0.019	0.019	0.015	0.020	0.021
<i>H. suis</i> 感染-B	1.654	0.012	0.011	0.010	0.088	0.014
<i>H. suis</i> 感染-C	1.391	0.010	0.010	0.010	0.028	0.013
<i>H. suis</i> 感染-D	1.891	0.015	0.013	0.011	0.015	0.016
<i>H. pylori</i> 感染-A	0.477	0.011	0.011	0.010	0.013	0.017
<i>H. pylori</i> 感染-B	0.591	0.009	0.009	0.010	0.010	0.017
<i>H. pylori</i> 感染-C	0.459	0.010	0.010	0.011	0.011	0.015
<i>H. pylori</i> 感染-D	0.560	0.008	0.009	0.007	0.007	0.020
非感染-A	0.152	0.008	0.007	0.008	0.009	0.013
非感染-B	0.131	0.011	0.009	0.010	0.009	0.016
非感染-C	0.077	0.008	0.008	0.008	0.007	0.015
非感染-D	0.313	0.012	0.010	0.009	0.009	0.014
<i>H. suis</i> 感染<最小値>	1.391	0.010	0.010	0.010	0.015	0.013
<i>H. suis</i> 感染以外<最大値>	0.591	0.012	0.011	0.011	0.013	0.020
<差>	0.800	-0.002	-0.001	-0.001	0.002	-0.007

[単位：Abs.450nm-630nm]

[図5-2]

対象	HsvA抗原ペプチド / 配列番号					
	6	7	8	9	10	11
<i>H. suis</i> 感染-A	0.015	0.012	0.112	0.014	0.017	0.052
<i>H. suis</i> 感染-B	0.006	0.010	0.008	0.010	0.009	0.037
<i>H. suis</i> 感染-C	0.008	0.010	0.011	0.008	0.009	0.023
<i>H. suis</i> 感染-D	0.010	0.010	0.014	0.015	0.010	0.021
<i>H. pylori</i> 感染-A	0.010	0.010	0.011	0.010	0.008	0.012
<i>H. pylori</i> 感染-B	0.009	0.007	0.008	0.008	0.008	0.030
<i>H. pylori</i> 感染-C	0.010	0.008	0.007	0.009	0.009	0.026
<i>H. pylori</i> 感染-D	0.008	0.007	0.006	0.006	0.007	0.031
非感染-A	0.008	0.007	0.007	0.008	0.008	0.012
非感染-B	0.011	0.010	0.009	0.012	0.009	0.023
非感染-C	0.009	0.009	0.008	0.008	0.007	0.097
非感染-D	0.009	0.013	0.011	0.011	0.009	0.031
<i>H. suis</i> 感染<最小値>	0.006	0.010	0.008	0.008	0.009	0.021
<i>H. suis</i> 感染以外<最大値>	0.011	0.013	0.011	0.012	0.009	0.097
<差>	-0.005	-0.003	-0.003	-0.004	0.000	-0.076

[単位：Abs.450nm-630nm]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/002330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/53(2006.01)i; **G01N 33/543**(2006.01)i; **G01N 33/569**(2006.01)i
 FI: G01N33/53 N; G01N33/543 521; G01N33/543 545A; G01N33/569 F

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/53; G01N33/543; G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/225639 A1 (THE KITASATO INSTITUTE) 28 November 2019 (2019-11-28) paragraphs [0087]-[0098], [0101]-[0103], [0107]	1-11
Y		1-11
Y	松井 英則 ほか, ヘリコバクター・スイス感染の迅速診断法の開発, 日本ヘリコバクター学会誌, 2020, ヘリコバクター・スイス感染の迅速診断法の開発, vol. 21, no. 2, pp. 121-127, (MATSUI, Hidenori et al. Development of the rapid diagnostic methods of Helicobacter suis infection. Japanese Journal of Helicobacter Research.) p. 123, right column, lines 35-42, fig. 4, 5	1-11
Y	JP 2006-284567 A (PHARMA FOODS INTERNATIONAL COMPANY, LIMITED) 19 October 2006 (2006-10-19) paragraph [0028]	1-11
Y	JP 2007-524366 A (INTERCELL AKTIENGESELLSCHAFT) 30 August 2007 (2007-08-30) paragraph [0210]	1-11
Y	JP 05-264553 A (QUIDEL CORPORATION) 12 October 1993 (1993-10-12) paragraph [0005]	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 February 2023

Date of mailing of the international search report

07 March 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/002330**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0285856 A1 (UNIVERSITEIT GENT) 19 November 2009 (2009-11-19) claims	1-11
A	RIMBARA, Emiko et al. Isolation and characterization of Helicobacter suis from human stomach. Pnas. vol. 118, no. 13, e2026337118, doi.org/10.1073/pnas.2026337118 entire text, all drawings	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/002330

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“The form of Annex C/ST.25 text file” above shall read as “the form of ST.26.”.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/002330

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2019/225639	A1	28 November 2019	US 2021/0292375 A1 examples 2-5, 7, 10 EP 3798309 A1	
JP	2006-284567	A	19 October 2006	(Family: none)	
JP	2007-524366	A	30 August 2007	US 2006/0193866 A1 paragraph [0244] WO 2004/094467 A2	
JP	05-264553	A	12 October 1993	US 5814455 A column 1	
US	2009/0285856	A1	19 November 2009	WO 2008/058727 A1 claims CN 101558150 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i FI: G01N33/53 N; G01N33/543 521; G01N33/543 545A; G01N33/569 F										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） G01N33/53; G01N33/543; G01N33/569										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2023年	日本国実用新案登録公報	1996-2023年	日本国登録実用新案公報	1994-2023年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2023年									
日本国実用新案登録公報	1996-2023年									
日本国登録実用新案公報	1994-2023年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	WO 2019/225639 A1 (学校法人北里研究所) 28.11.2019 (2019-11-28) [0087]-[0098], [0101]-[0103], [0107]	1-11								
Y		1-11								
Y	松井 英則 ほか, ヘリコバクター・スライス感染の迅速診断法の開発, 日本ヘリコバクター学会誌, 2020, ヘリコバクター・スライス感染の迅速診断法の開発, Vol.21, No.2, pp.121-127 123頁右欄35-42行, 図4-5	1-11								
Y	JP 2006-284567 A (株式会社ファーマフーズ) 19.10.2006 (2006-10-19) [0028]	1-11								
Y	JP 2007-524366 A (インターツェル・アクチエンゲゼルシャフト) 30.08.2007 (2007-08-30) [0210]	1-11								
Y	JP 05-264553 A (クイデル コーポレイション) 12.10.1993 (1993-10-12) [0005]	1-11								
A	US 2009/0285856 A1 (UNIVERSITEIT GENT) 19.11.2009 (2009-11-19) claims	1-11								
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 20.02.2023		国際調査報告の発送日 07.03.2023								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 大瀧 真理 2J 9812 電話番号 03-3581-1101 内線 3252								

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	RIMBARA ,Emiko et al., Isolation and characterization of Helicobacter suis from human stomach, PNAS, Vol.118, No.13, e2026337118, doi.org/10.1073/ pnas.2026337118 全文,全図	1-11

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/002330

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2019/225639	A1	28.11.2019	US 2021/0292375 A1 Examples 2-5, Example 7, Example 10 EP 3798309 A1	
JP	2006-284567	A	19.10.2006	(ファミリーなし)	
JP	2007-524366	A	30.08.2007	US 2006/0193866 A1 [0244]	
				WO 2004/094467 A2	
JP	05-264553	A	12.10.1993	US 5814455 A column 1	
US	2009/0285856	A1	19.11.2009	WO 2008/058727 A1 claims	
				CN 101558150 A	