

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6165238号
(P6165238)

(45) 発行日 平成29年7月19日(2017.7.19)

(24) 登録日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 33/569 (2006.01)

G O 1 N 33/569 F

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53 D

G O 1 N 33/543 (2006.01)

G O 1 N 33/53 N

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G O 1 N 33/543 5 4 5 A

C O 7 K 16/12 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z

請求項の数 7 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-511712 (P2015-511712)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月9日(2013.5.9)
 (65) 公表番号 特表2015-517658 (P2015-517658A)
 (43) 公表日 平成27年6月22日(2015.6.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/040399
 (87) 国際公開番号 W02013/170065
 (87) 国際公開日 平成25年11月14日(2013.11.14)
 審査請求日 平成27年8月7日(2015.8.7)
 (31) 優先権主張番号 61/645,964
 (32) 優先日 平成24年5月11日(2012.5.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/889,670
 (32) 優先日 平成25年5月8日(2013.5.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513273030
 テックラブ、インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国バージニア州24060、
 ブラックスバーグ、クラフト・ドライブ
 2001
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100187540
 弁理士 國枝 由紀子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) ・リボタイプ
 O27の診断マーカーとしての細胞壁タンパク質CwpV (CDO514)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

重症C・ディフィシル感染と関連付けられているリボタイプO27 C・ディフィシル
 (C・difficile) 株に感染した患者におけるC・ディフィシルを区別する方
 法であって：患者から糞便試料を得て；そして患者がリボタイプO27 C・ディフィシ
 ル株感染を有するかどうかを決定するために、糞便試料において、CwpV抗原に対する
 イムノアッセイを用いてリボタイプO27特異的CwpV抗体の存在を決定する、前記方
 法。

【請求項2】

イムノアッセイが、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、膜上での免疫化学反応
 または側方流動アッセイである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

イムノアッセイが、捕捉抗体として、モノクローナル、ポリクローナルまたは組換え抗
 リボタイプO27特異的CwpV抗体の1またはそれより多くを利用する、請求項1又は
 2に記載の方法。

【請求項4】

イムノアッセイが、検出抗体として、HRP-コンジュゲート化ポリクローナルまたは
 モノクローナル抗リボタイプO27特異的CwpV抗体を利用する、請求項1～3のいづ
 れか1項に記載の方法。

【請求項5】

10

20

イムノアッセイが、*C.ディフィシル*によって産生される天然 *CwpV* または大腸菌 (*E. coli*) における組換え *DNA* 発現によって得られる *CwpV* に対して作製される、*CwpV* に対する 1 またはそれより多い抗体を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

リボタイプ 027 *C.ディフィシル* の存在を決定する工程が、核酸増幅アッセイを用いて、リボタイプ 027 特異的 *CwpV* をコードする *DNA* 断片の存在を同定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

糞便試料を希釈して希釈糞便試料を作製し；そして該希釈糞便試料を *CwpV* 抗原に対するイムノアッセイにおいて使用する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) (*C.ディフィシル*) は、米国において、院内下痢の最も一般的な既知の原因であり、そして年間約 300 万例の下痢の主要因である。*C.ディフィシル* 感染 (*CDI*) のリスク要因には、抗生物質への曝露、高齢、および病院または長期ケア施設における居住が含まれる。*CDI* の症状は、軽度の下痢から、偽膜性大腸炎および中毒性巨大結腸の範囲に渡る。治療の平均コストは、症例あたり約 1 万ドルである。*CDI* の死亡率は、非常に病原性である (*hypervirulent*) 大流行株の出現によって、1999 年の 100 万人人口あたり 5.7 人の死亡から、2004 年の 100 万人人口あたり 23.7 人の死亡に増加した。リボタイプ 027 株は、*CDI* 発生率増加に有意に寄与した。大流行株リボタイプ 027 を *C.ディフィシル* の他の株と正確に区別すると、治療オプションに関する意志決定が容易になりうる。

【図面の簡単な説明】

【0002】

本発明の例示的な態様を、付随する図に関連して以下に詳細に記載する：

【図 1】図 1 は、本発明の態様にしたがった、抗 *CwpV* ELISA および PCR リボタイプ決定法の間の比較を示す；

【図 2】図 2 は、本発明の態様にしたがって、*CwpV* の 027 特異的領域に対して生成された抗体が、*C.ディフィシル*・リボタイプ 027 しか認識しないことを示す；

【図 3】図 3 は、抗 *CwpV* QUIK CHECK (登録商標) の結果の解釈を示す；そして

【図 4】図 4 は、本発明の態様にしたがった、抗 *CwpV* QUIK CHECK (登録商標) および PCR リボタイプ決定法の間の比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【0003】

本発明の態様は、リボタイプ特異的新規抗原マーカー、細胞壁タンパク質 *V* (*CwpV*) の存在に基づいて、患者における *C.ディフィシル* 株を区別するための試験法に関する。リボタイプ特異的 *CwpV* を、*C.ディフィシル*・リボタイプ、特に大流行株 027 の検出のためのイムノアッセイにおいて用いてもよい。態様において、抗株特異的 *CwpV* 抗体を、*C.ディフィシル* 株 027 の高感度同定のためのイムノアッセイにおいて用いる。

【0004】

C.ディフィシル 株間の遺伝的関連性、ならびに *C.ディフィシル* 株および疾患重症度の間の関連を研究するため、いくつかのタイプ決定法が開発されてきている。これらの方法には、血清型決定、毒素型決定 (*toxino typing*)、パルスフィールド電気泳動 (*PFGE*) および PCR リボタイプ決定が含まれる。PCR リボタイプ決定は、実

10

20

30

40

50

行が比較的容易であり、再現性があり、そしてC．ディフィシル株を区別する最も特徴的な方法の1つである。

【0005】

90年代後半に始まって、CDIの5倍の増加が観察されてきており、そして非常に病原性である株の蔓延が大流行に寄与していることが推測されている。この大流行株は、毒性型III、北米パルスフィールドゲル電気泳動型1(NAP1)、制限エンドヌクレアーゼ分析群I(BI)およびPCRリボタイプ027として特徴付けられた。リボタイプ027のいくつかの特性は、リボタイプ027株の病原性増進に寄与する。毒素AおよびBに加えて、027株は、さらなる二成分毒素を発現し、これが疾患の重症度に寄与している可能性もある。027株はまた、毒素産生のリプレッサーであるtcdC遺伝子において、18塩基対欠失およびフレームシフト突然変異も含有する。該フレームシフト突然変異は、毒素産生増加を引き起こしうる。1988年、フランスで単離された歴史的な027株は、フルオロキノロンおよびエリスロマイシンに感受性であったが、最近の大流行におけるリボタイプ027は、gyrA/Bおよび23s RNA遺伝子における突然変異によって、どちらの抗生物質に対しても耐性になった。ヒト腸上皮細胞に対するより高いアフィニティを持つように改変された表面タンパク質もまた、病原性増進に寄与している可能性もある。

10

【0006】

027株感染は、いくつかの研究において、より重症の転帰と関連付けられた。027株による腸微生物叢の劇的な改変は、その高い病原性に寄与している可能性が高い。しかし、他の研究は、感染株のリボタイプおよび患者転帰の間には相関がないことを示した。この論争は、研究した集団および統計分析に用いた方法から生じている可能性もある。

20

【0007】

CDI治療のために選択される伝統的な抗生物質は、メトロニダゾールおよびバンコマイシンである。軽度から中程度のCDI患者に関しては、メトロニダゾールおよびバンコマイシンは同等に有効である。非027株によって引き起こされる重症CDIの患者に関しては、バンコマイシンがより優れた転帰を生じた。メトロニダゾールまたはバンコマイシンのいずれかで治療された患者において、高い再発率が観察された。2010年5月、フィダキソマイシン(ディフィシド; Optimer Pharmaceuticals)と称される新規薬剤が、成人におけるC．ディフィシル関連下痢の治療のため、米国医薬品局によって認可された。フィダキソマイシンは、グラム陽性嫌気性菌に対する、狭域性抗生物質である。バクテロイデス属(Bacteroides)種、好気性および通性グラム陰性桿菌ならびに嫌気性グラム陰性桿菌において、フィダキソマイシンに対する耐性が見出された。フィダキソマイシンは、C．ディフィシルの027および非027株に対して同等に有効である。広域性抗生物質の使用は、腸フローラを乱し、これはC．ディフィシル感染の再発に寄与する可能性もある。最近の研究によって、フィダキソマイシン治療は、バンコマイシン治療に比較して、非027株に感染した患者において、再発率低下を生じたことが示されている。したがって、027および非027株の間の区別は、治療オプションに関して医師の意志決定を容易にする可能性もある。

30

【0008】

PCRリボタイプ決定法は、C．ディフィシル・コロニーの単離、純粋なコロニーから生じる培養からのDNA単離、PCRによるDNA増幅およびゲル電気泳動を必要とする。複雑で、そして時間が掛かる方法は、臨床実験室では現実的でない。商業的に入手可能な分子試験は、tcdC遺伝子における配列変動を利用する。PCRに基づく試験は高価であり、そしてtcdC遺伝子における突然変異は他のリボタイプにもまた存在するため、非特異的である。抗体に基づく試験、例えば酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)および側方流動アッセイは、病原体特異的抗原の検出のための、迅速であり、そして費用効率的な試験法である。態様において、イムノアッセイにおける027株の検出のため、027株特異的抗原(単数または複数)を診断マーカー(単数または複数)として用いる。

40

50

【0009】

C．ディフィシル細胞は、ペプチドグリカン層の外側に表面層（S層）を所持する。S層は、栄養細胞およびC．ディフィシル胞子の両方に存在する。S層内のタンパク質は、宿主－病原体相互作用を仲介する。いくつかのC．ディフィシル表面タンパク質は、胃腸組織に結合し、そして潜在的なコロニー形成因子である。S層に関連するタンパク質は、2つのドメイン：保存された細胞壁結合ドメイン、およびその特定のタンパク質の機能を特定する可変ドメインを含有する。配列決定された株630のゲノムにおいて、28の細胞壁タンパク質（CWP）が予測されている。特定のCWPの可変ドメインは、C．ディフィシル株同定のための潜在的な抗原マーカーと見なされる。

【0010】

CwpV（CD0514）は、CWPのメンバーであり、そして推定上の細胞壁結合ドメインを含むN末端領域、および凝集を促進しうるC末端ドメインからなる。CwpVは、多様な027株によって培地内に分泌される。CwpVのC末端ドメインは、C．ディフィシル・リボタイプ間で非常に可変である。リボタイプ027において、CwpVタンパク質中に見られるC末端反復の特異的アミノ酸配列は、今日まで、いかなる他の配列決定された株のゲノムにも示されていない。態様において、CwpVのリボタイプ特異的領域は、027株の診断マーカーとして使用可能である。

【0011】

以下は、本発明の態様にしたがって、好ましいアッセイを確立するために利用されてきている方法の例である。以下の例は単に例示であり、そして限定のために提示されていない。

【実施例】

【0012】

実施例1

組換えDNA技術を用いて、CwpVのリボタイプ027特異的C末端ペプチドを大腸菌（E．coli）において発現させた。組換えCwpVに対するポリクローナル抗体をヤギ（goat）において生成した。捕捉抗体としてポリクローナル抗CwpV抗体を、そして検出抗体として西洋ワサビ（horseradish）・ペルオキシダーゼ（HRP）・コンジュゲート化ポリクローナル抗CwpV抗体を用いて、ELISAを発展させた。

【0013】

この抗CwpV ELISAを用いて、C．ディフィシルに関して陽性である72の臨床的ヒト糞便試料を試験した。代表的な判断基準としてPCRリボタイプ決定法を用いて、C．ディフィシル027株の検出のための抗CwpV ELISAの感受性および特異性を計算した。このELISAのカットオフは、二重波長（OD450/620nm）上での0.080読み取り値の吸光度に設定された。

【0014】

結果

図1に関連して、72のヒト糞便試料に関する抗CwpV ELISAの結果を、PCRリボタイプ決定法の結果と比較した。抗CwpV ELISAは、PCRリボタイプ決定法によって決定された35の027陽性試料のうち、30において、C．ディフィシル027株の存在を検出した。抗CwpV ELISAの感受性および特異性は、各々86%である。

【0015】

実施例2

CwpVのリボタイプ027特異的C末端ペプチドを大腸菌において発現させた。組換えCwpVに対するポリクローナル抗体をヤギにおいて生成した。捕捉抗体としてポリクローナル抗CwpV抗体を、そして検出抗体として西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ（HRP）・コンジュゲート化ポリクローナル抗CwpV抗体を用いて、ELISAを発展させた。

【0016】

34のC．ディフィシル株を脳心臓注入ブロス（BHI； Oxoid）内に接種した。嫌気性条件下で、培養を37℃で一晩増殖させた。BHI培養中のC．ディフィシル株を、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で1：20に希釈し、そして上述のELISA上で試験した。

【0017】

結果

図2に示すように、34の異なるリボタイプに相当するC．ディフィシル培養を、抗027特異的抗体を用いた抗CwpV ELISA上で試験した。リボタイプ027株は、このELISA上で検出された唯一のリボタイプであった。33の非027C．ディフィシル培養は、このELISAによっては検出されなかった。このELISAのカットオフは、二重波長（OD450 / 620 nm）上での0.080読み取り値の吸光度に設定された。

10

【0018】

実施例3

CwpVのリボタイプ027特異的C末端ペプチドを大腸菌において発現させた。組換えCwpVに対するポリクローナル抗体をヤギにおいて生成した。捕捉抗体としてマイクロファイバーガラス膜上に試験ラインとして固定されたポリクローナル抗CwpV抗体、および検出抗体として西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ（HRP）・コンジュゲート化ポリクローナル抗CwpV抗体を用いて、QUIK CHEK（登録商標）デバイスを発展させた。ウサギ（rabbit）抗HRPポリクローナル抗体をマイクロファイバーガラス膜上に固定して、陽性対照ラインを形成した。

20

【0019】

この抗CwpV QUIK CHEK（登録商標）を用いて、195の試料を試験した。臨床的糞便試料を試料希釈剤中で希釈し、HRPコンジュゲート化ポリクローナル抗CwpV抗体と混合し、そして試料ウェルを通じて、固定された捕捉抗体を含むマイクロファイバーガラス膜に適用した。毛細管現象を通じて、試料 - コンジュゲート混合物を、マイクロファイバーガラス膜を渡って流動させた。デバイスを室温で15分間インキュベーションして、試料中のCwpV抗原が、試験ライン上に固定された抗CwpV抗体によって捕捉されることを可能にした。過剰なHRPコンジュゲート化ポリクローナル抗CwpV抗体は、対照ライン上に固定されたウサギ抗HRP抗体によって捕捉された。膜を簡単に洗浄し、そして反応ウィンドウを通じてHRP基質を添加した後、結果を記録する前に、デバイスを室温で10分間インキュベーションした。

30

【0020】

図3に関連して、2つの青いライン：対照ライン（「C」）および試験ライン（「T」）によって、抗CwpV QUIK CHEK（登録商標）上に陽性結果が示される。抗CwpV QUIK CHEK（登録商標）上の陰性結果は、反応ウィンドウの対照（「C」）側上に1つの青いラインがあり、反応ウィンドウの「T」側に試験ラインが見えないことによって示される。対照ライン（「C」）が見えない場合、結果は無効と解釈される。

40

【0021】

結果

抗CwpV QUIK CHEK（登録商標）、組織培養細胞傷害性アッセイ上で、195の糞便試料を試験し、そして毒素産生性C．ディフィシルを含有する試料から単離したC．ディフィシルのリボタイプを、PCRリボタイプ決定法によって決定した。図4に示すように、試験した195の糞便試料の中で、173の試料が、組織培養細胞傷害性アッセイによって、毒素産生性C．ディフィシルを含有しないと決定された。組織培養法によって陰性であった試料はすべて、抗CwpV QUIK CHEK（登録商標）上で陰性であった。組織培養細胞傷害性法によってC．ディフィシルを含有すると決定された22の試料の中で、12は、PCRリボタイプ決定によってリボタイプ027と同定された

50

。12の試料のうち10は、抗CwpV QUIK CHECK（登録商標）上では陽性反応を示した。抗CwpV QUIK CHECK（登録商標）によっては、非027 C.ディフィシル試料はまったく検出されなかった。代表的な判断基準としてPCRリボタイプ決定法を用いると、抗CwpV QUIK CHECK（登録商標）の感受性および特異性は、それぞれ、83%および100%と計算された。

【0022】

要約すると、本発明の態様は、糞便試料において、そして培養において、C.ディフィシル・リボタイプ027を検出するための診断マーカーとして、CwpVを提供する。本発明は特定の態様に関連して記載され、これは、あらゆる点で、制限的であるよりも例示的であることを意図される。別の態様は、本発明の範囲から逸脱することなく、本発明が

10

【0023】

前述から、本発明が、明らかであり、そして方法に本質的である他の利点とともに、本明細書に上述するすべての目的および目標を達成するためによく適合したものであることがわかるであろう。本発明の特定の特徴およびサブコンビネーションは実用的であり、そして他の特徴およびサブコンビネーションと関係なく、使用可能であることが理解されるであろう。これは請求項によって予期され、そして請求項の範囲内にある。

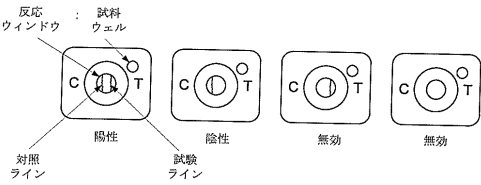
【図1】

| PCR リボタイプ決定 | | | |
|-------------|------|-----|-------|
| | N=72 | 027 | 非 027 |
| 抗CwpV | + | 30 | 5 |
| ELISA | - | 5 | 32 |

【図2】

| リボタイプ | 抗CwpV ELISA上での反応 |
|-------|------------------|
| 001 | - |
| 002 | - |
| 003 | - |
| 005 | - |
| 009 | - |
| 010 | - |
| 012 | - |
| 014 | - |
| 015 | - |
| 017 | - |
| 018 | - |
| 019 | - |
| 027 | + |
| 031 | - |
| 032 | - |
| 038 | - |
| 039 | - |
| 043 | - |
| 046 | - |
| 050 | - |
| 051 | - |
| 053 | - |
| 054 | - |
| 056 | - |
| 057 | - |
| 078 | - |
| 081 | - |
| 085 | - |
| 103 | - |
| 106 | - |
| 126 | - |
| 137 | - |
| 251 | - |
| 379 | - |

【図 3】



【図 4】

| N=195 #Copy/ QUTK CHECK上で+ | 組織培養 + | | 組織培養 |
|-------------------------------|--------------|---------------|------|
| | リボタイプ決定によるQT | リボタイプ決定による非QT | |
| #Copy/ QUTK CHECK上で+ | 10 | 0 | 0 |
| #Copy/ QUTK CHECK上で- | 2 | 10 | 173 |

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/12

- (72)発明者 デイビス, マンリ・ワイ
アメリカ合衆国バージニア州 2 4 0 7 3 , クリスチャンズバーグ, スリーピー・ホロー・ロード
1 6 5 0
- (72)発明者 ウィリアムズ, クリスタ・エイ
アメリカ合衆国バージニア州 2 4 0 6 0 , ブラックスバーグ, ウェークフィールド・ドライブ 3
0 0 7
- (72)発明者 ブラウニング, ジョスリン・エヌ
アメリカ合衆国バージニア州 2 4 0 6 0 , ブラックスバーグ, トライアングル・ストリート 7 7
7 , アパートメント 3 1 6
- (72)発明者 リヤリー, デヴィッド・エム
アメリカ合衆国バージニア州 2 4 1 4 2 , ラドフォード, マック・アーサー・アベニュー 2 0 4

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 2 0 8 4 5 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 1 1 / 0 1 2 0 9 8 (W O , A 1)
特表 2 0 1 3 - 5 0 0 4 7 9 (J P , A)
特表 2 0 0 8 - 5 2 2 1 6 5 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 0 / 1 1 6 2 9 0 (W O , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 6 5 5 7 9 (U S , A 1)
特表 2 0 0 2 - 5 1 0 3 8 5 (J P , A)
特表 2 0 1 1 - 5 1 2 8 1 7 (J P , A)
Reynolds CB、外 4 名, The Clostridium difficile cell wall protein CwpV is antigenically
variable between strains, but exhibits conserved aggregation-promoting function. , PLo
S Pathog. , 2 0 1 1 年 4 月 2 1 日, Vol.7, No.4 , Page.1-14

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)