

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5442917号
(P5442917)

(45) 発行日 平成26年3月19日(2014.3.19)

(24) 登録日 平成25年12月27日(2013.12.27)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R	1/92	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
			C 1 2 R 1:92

請求項の数 24 外国語出願 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2000-30237 (P2000-30237)	(73) 特許権者	594199337
(22) 出願日	平成12年2月2日(2000.2.2)		オルソークリニカル ダイアグノスティクス、インコーポレイティド
(65) 公開番号	特開2000-279198 (P2000-279198A)		アメリカ合衆国、ニューヨーク 14650、ロチェスター、インディゴ クリーク
(43) 公開日	平成12年10月10日(2000.10.10)		ドライブ 100
審査請求日	平成19年2月1日(2007.2.1)	(74) 代理人	100099759
審査番号	不服2011-3977 (P2011-3977/J1)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成23年2月23日(2011.2.23)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/118498		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成11年2月3日(1999.2.3)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス (HCV) およびヒト免疫不全ウイルス (HIV) の効率的な多重検出のためのオリゴヌクレオチドプライマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

C型肝炎ウイルス (HCV) DNA とヒト免疫不全ウイルス (HIV) DNA との共同増幅方法であって、

(A) HCV DNA, HIV DNA または HCV DNA と HIV DNA の組合せを含む疑いのある DNA 試料において、HCV の 5' 非コード領域に特異的な 1 または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対と HIV に特異的な 1 または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とを使ってポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、(a) HCV 特異的増幅生成物、(b) HIV 特異的増幅生成物または (c) (a) と (b) の組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ;

ここで HCV に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) [配列番号 1] と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) [配列番号 2] と

を含んで成り、

HIV-1 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) [配列番号 3]

を有する正プライマーと、配列:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6) [配列番号 4] および

(2) 5'-TGTTGCGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) [配列番号 5]

から成る群より選ばれた HIV-1 に特異的な逆プライマー

とを含んで成り、そして

H I V - 2 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) [配列番号 6]

を有する正プライマーと、配列

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) [配列番号 7]

を有する H I V - 2 に特異的な逆プライマー

とを含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項 2】

(B) 前記増幅生成物を検出する

という段階を更に含み、

ここで H C V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中の H C V D N A の存在を示し、H I V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中の H I V D N A の存在を示し、そして H C V 特異的増幅生成物と H I V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中の H C V D N A と H I V D N A の存在を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記検出がゲル電気泳動により前記増幅生成物を視覚化することを含んで成る、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記検出が、(a) 1 または複数の H C V 特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(b) 1 または複数の H I V 特異的オリゴヌクレオチドプローブ、または(c) (a) と(b) の組合せを含有する固体支持体上に前記増幅生成物を捕捉し、そして前記捕捉された生成物を比色アッセイを使って定量することを含んで成る、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 H C V 特異的プローブが 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) [配列番号 12] から成り、そして前記 H I V 特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3' (JBLTRpr3) [配列番号 13] ;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACTGCT-3' (JBLTRpr4) [配列番号 16] ; および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) [配列番号 14]

から成る群より選ばれる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記共同増幅が同時である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

内部陽性対照 (I P C) D N A 、 C 型肝炎ウイルス (H C V) D N A およびヒト免疫不全ウイルス (H I V) D N A の共同増幅方法であって、

(A) I P C D N A を含有しており且つ H C V D N A , H I V D N A または前記のいずれかの組合せを含む疑いのある D N A 試料において、I P C に特異的な 1 または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、H C V の 5' 非コード領域に特異的な 1 または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、および H I V に特異的な 1 または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対を使って、ポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、(a) I P C 増幅生成物、(b) I P C 増幅生成物と H C V 特異的増幅生成物、(c) I P C 増幅生成物と H I V 特異的増幅生成物または(d) (a), (b) および(c) の任意組合せを含んで成る増幅生成物を生成せしめ、

ここで前記 I P C に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

(i) 正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1) [配列番号 8] と

(ii) 逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1) [配列番号 9]

とを含んで成り、

前記 H C V に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) [配列番号 10] と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) [配列番号 11] と

を含んで成り、

10

20

30

40

50

H I V - 1 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列
5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) [配列番号 3]
を有する正プライマーと、配列

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6) [配列番号 4] および

(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) [配列番号 5]

から成る群より選ばれた H I V - 1 に特異的な逆プライマー
とを含んで成り、

H I V - 2 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列 :

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTrE) [配列番号 6]

を有する正プライマーと、配列 :

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) [配列番号 7]

を有する H I V - 2 に特異的な逆プライマー
とを含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項 8】

(B) 前記増幅生成物を検出する

という段階を更に含み、

ここで I P C 特異的増幅生成物の検出が前記試料中の I P C D N A の存在を示し、 H C V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中の H C V D N A の存在を示し、 H I V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中の H I V D N A の存在を示し、そして H C V 特異的増幅生成物と H I V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中の H C V D N A と H I V D N A の存在を示す、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出がゲル電気泳動により前記増幅生成物を視覚化することを含んで成る、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記検出が、(a) 1 または複数の I P C 特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(b) 1 または複数の H C V 特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(c) 1 または複数の H I V 特異的オリゴヌクレオチドプローブ、または(c)

前記のいずれかの任意組合せを含有する固体支持体上に前記増幅生成物を捕捉し、そして前記捕捉された生成物を比色アッセイを使って定量することを含んで成る、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 I P C 特異的プローブが5'-CTGCGTTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3' [配列番号17] から成り、前記 H C V 特異的プローブが5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) [配列番号12] から成り、そして前記 H I V 特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3) [配列番号13] ;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) [配列番号16] ; および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) [配列番号14]

から成る群より選ばれる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記共同検出が同時である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

生物学的試料中の H C V R N A と H I V R N A の共同検出のためのキットであって、

(a) (i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) [配列番号10] と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCCATCA-3' (C294R25) [配列番号11] とを含んで成る H C V の 5' 非コード領域に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー ;

(b) 配列 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) [配列番号 3] を有する

10

20

30

40

50

正プライマーと

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および

(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕

から成る群より選ばれたH I V - 1に特異的な逆プライマー

とを含んで成るH I V - 1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー；並びに

(c) 配列 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LRe)〔配列番号6〕を有する正プライマーと配列 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するH I V - 2に特異的な逆プライマー

とを含んで成るH I V - 2に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー

を含んで成ることを特徴とするキット。

10

【請求項14】

I P C に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを更に含んで成り、前記I P C に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対が、正プライマー 5'-CGCCAGCGTGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1)〔配列番号8〕と逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1)〔配列番号9〕を含んで成る、請求項13に記載のキット。

【請求項15】

1または複数のプローブを更に含む、請求項13に記載のキット。

【請求項16】

1または複数のプローブを更に含む、請求項14に記載のキット。

【請求項17】

前記プローブが

5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕、

5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕、

5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕および

5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕

から成る群より選ばれる、請求項15に記載のキット。

【請求項18】

前記I P C 特異的なプローブが5'-CTGCGTTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3' (IPC1P)〔配列番号17〕から成り、前記H C V 特異的なプローブが5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕から成り、そして前記H I V 特異的なプローブが

30

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕；

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕；および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕

から成る群より選ばれる、請求項16に記載のキット。

【請求項19】

D N A 試料中のH C V D N A とH I V D N A の共同増幅のためのキットであって、

(a) (i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGAA-3' (C131F25)〔配列番号10〕と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号11〕とを含んで成るH C V の5'非コード領域に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー；

40

(b) 配列 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと配列：

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および

(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕

から成る群より選ばれたH I V - 1に特異的な逆プライマー

とを含んで成るH I V - 1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー；および

配列 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LRe)〔配列番号6〕を有する正プライマーと

配列 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するH I V -

50

2 に特異的な逆プライマー

とを含んで成る H I V - 2 に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー
を含んで成るキット。

【請求項 2 0】

I P C に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを更に含んで成り、前記 I P C
に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対が、正プライマー 5'-CGCCAGCGTGACCATCAAG
TAGTAA-3' (IPCF1) [配列番号 8] と逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3'
(IPCR1) [配列番号 9] を含んで成る、請求項 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 1】

1 または複数のプローブを更に含む、請求項 1 9 に記載のキット。

10

【請求項 2 2】

1 または複数のプローブを更に含む、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記プローブが

5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) [配列番号12]、

5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3) [配列番号13]、

5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) [配列番号16] および

5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) [配列番号14]

から成る群より選ばれる、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 4】

20

前記 I P C 特異的プローブが5'-CTGCGTTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3' (IPC1P) [配列番
号17] から成り、前記 H C V 特異的プローブが5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C25
2-27-PRB) [配列番号12] から成り、そして前記 H I V 特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3) [配列番号13] ;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) [配列番号16] ; および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) [配列番号14]

から成る群より選ばれる、請求項 2 2 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【発明が属する技術分野】

【0 0 0 1】

30

本発明は、生物学的試料中の核酸配列、特に感染性微生物に由来する配列の改良検出方
法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ヒト免疫不全ウイルス (H I V) は世界中の何百万という人々に感染しており、従って
深刻な社会的健康問題の代表である。汚染された血液製剤を介した H I V 感染の伝播は、
患者試料中の少量の H I V R N A を検出することができるスクリーニング法が必要であ
ることを意味する。更に、H I V 感染の改善療法の入手可能性が増大してきていることは
、適当な療法介入を開始するために患者における乾癬の早期検出がきわめて重大であるこ
とを意味する。

40

【0 0 0 3】

C 型肝炎ウイルス (H C V) は、大部分の輸血後肝炎の症例とかなりの部分の世界的散
在性 (または地域社会獲得性) 肝炎の症例の原因である非経口的に伝染するウイルスであ
る。世界人口の 1 % 超が H C V に感染していると見積もられている。H C V 感染は急性肝
炎、慢性肝炎、肝硬変および後の肝細胞癌に関係がある。

【0 0 0 4】

H C V は現在フラビウイルス科 (Flaviviridae) の中の独自のヘパチウイルス属 (Hepa
civirus) として分類されている。そのゲノムは、約 3,000 アミノ酸のポリタンパク質前
駆体をコードする単一の大きな転写解読枠 (O R F) を有する約 9,500 ヌクレオチドの正
鎖 R N A 分子から成る。この大きな O R F の上流には、ゲノムの最も高度に保存された領

50

域である約340ヌクレオチドの5非コード(NC)領域がある。このORFの5領域は(53方向で)キャプシドタンパク質、2つのエンベローブ糖タンパク質(E1とE2)および未知の機能を有する小さなタンパク質(P7)をコードする。このORFの3領域は、プロテアーゼ、プロテアーゼ/ヘリカーゼ二機能性タンパク質、RNAポリメラーゼおよび調節タンパク質を包含する非構造タンパク質をコードする。

【0005】

世界中からのHCVコード配列の分析により、個々のウイルス分離株間で相当な配列変異が明らかになった。更に、個々の患者からのHCV配列の分析により、関連するが同一でない配列を含むいわゆる「準種 "quasi-species"」としてウイルスは流布することが示された。分離株間と個々の患者間で存在する変異は、ウイルスによりコードされるRNAに依存するRNAポリメラーゼが低い信頼度を有することの結果であると考えられる。HCVの遺伝的変異の程度は、感染の予防、診断および制御にとって重要な意味を持つ。

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

HCV感染の血清学的診断は、典型的には組換えHCVタンパク質またはペプチドを結合する抗体を検出する市販のエンザイムイムノアッセイ(EIA)により測定される。陽性EIA結果は組換え免疫ブロットアッセイ(RIBA)により確かめることができるが、EIAもRIBAアッセイも現在の感染と過去の感染を区別することはできない。循環しているウイルスは典型的には低いウイルス価であるために、ウイルスタンパク質についての直接アッセイの開発は成功していない。更に、抗体に依存するアッセイは、一般に暴露後2~3カ月間はHCV感染を検出することができない。

20

【0007】

従って、HIVとHCVの両方についての患者試料の同時スクリーニングを考慮に入れた改良アッセイが当該技術分野で必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、多重アッセイを使った、生物学的試料におけるC型肝炎ウイルス(HCV)RNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの存在の同時検出方法を提供する。

【0009】

一観点では、本発明は、生物学的試料中のC型肝炎ウイルス(HCV)RNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの共同検出方法に向けられる。この方法は

30

(A) 前記試料から誘導したRNAを鋳型として使用し、そしてHCV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーおよびHIV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーを使用して逆転写反応を実施することにより、(a) HCV特異的逆転写生成物、(b) HIV特異的逆転写生成物または(c) (a) と(b) の組合せを含んで成る逆転写生成物を生成させ;

(B) HCVの5非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とを使って前記逆転写生成物を増幅させることにより、(a) HCV特異的増幅生成物、(b) HIV特異的増幅生成物または(c) (a) と(b) の組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ、

40

ここで前記HCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) [配列番号1]と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) [配列番号2]と

を含んで成り、

HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) [配列番号3]

を有する正プライマーと、配列

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6) [配列番号4]および

(2) 5'-TGTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) [配列番号5]

から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマー

50

とを含んで成り、

H I V - 2 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列：

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe)〔配列番号6〕

を有する正プライマーと、配列：

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕

を有するH I V - 2 に特異的な逆プライマー

とを含んで成り；そして

(C) 前記増幅生成物を検出する

という各段階を含んで成り、

ここでH C V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中のH C V R N A の存在を示し、H I V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中のH I V R N A の存在を示し、そしてH C V 特異的増幅生成物とH I V 特異的増幅生成物の検出が前記試料中のH C V R N A とH I V R N A の存在を示すことを特徴とする。

10

【0010】

第二の面では、本発明は、C型肝炎ウイルス(H C V) D N A とヒト免疫不全ウイルス(H I V) D N A との共同増幅方法に向けられる。この方法は、

(A) H C V D N A , H I V D N A またはH C V D N A とH I V D N A の組合せを含む疑いのあるD N A 試料において、H C V の5 非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とH I V に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とを使ってポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、(a) H C V 特異的増幅生成物、(b) H I V 特異的増幅生成物または(c) (a) と(b) の組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ；

20

ここでH C V に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号1〕と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号2〕とを含んで成り、

H I V - 1 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕

を有する正プライマーと、配列：

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および

(2) 5'-TGTTGCGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕

30

から成る群より選ばれたH I V - 1 に特異的な逆プライマー

とを含んで成り、そして

H I V - 2 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が次の配列

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe)〔配列番号6〕

を有する正プライマーと、次の配列

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕

を有するH I V - 2 に特異的な逆プライマー

とを含んで成ることを特徴とする。

【0011】

40

第三の面では、本発明は、生物学的試料中のC型肝炎ウイルス(H C V) R N A とヒト免疫不全ウイルス(H I V) R N A の共同検出方法に向けられる。この方法は、

(A) 鋳型試料としての前記試料から誘導したR N A と内部陽性対照(I P C)、I P C R N A からD N A への逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマー、H C V R N A からD N A への逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマー、およびH I V R N A からD N A への逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーを使用して、逆転写反応を実施することにより、(a) I P C 特異的逆転写生成物、(b) H C V 特異的逆転写生成物、(c) H I V 特異的逆転写生成物または(c) 前記のいずれかの任意組合せを含んで成る逆転写生成物を生成させ；

(B) I P C に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、H C V の5

50

非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、およびHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対を使って、前記逆転写生成物を増幅させることにより、(a) IPC特異的増幅生成物、(b) IPC特異的増幅生成物とHCV特異的増幅生成物、(c) IPC特異的生成物とHIV特異的増幅生成物または(d)前記のいずれかの任意組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ、

ここで前記IPCに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

(1) 正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1)〔配列番号8〕と

(2) 逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1)〔配列番号9〕

とを含んで成り、

前記HCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号10〕と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCCATCA-3' (C294R25)〔配列番号11〕と

を含んで成り、

HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕

を有する正プライマーと、配列

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および

(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕

から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマー

とを含んで成り、

HIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列：

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe)〔配列番号6〕

を有する正プライマーと、配列：

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕

を有するHIV-2に特異的な逆プライマー

とを含んで成り；そして

(C) 前記増幅生成物を検出する

という各段階を含んで成り、

ここでIPC特異的増幅生成物の検出が前記試料中のIPC RNAの存在を示し、HCV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAの存在を示し、HIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHIV RNAの存在を示し、そしてHCV特異的増幅生成物とHIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAとHIV RNAの存在を示すことを特徴とする。

【0012】

第四の面では、本発明は、内部陽性対照(IPC)DNA、C型肝炎ウイルス(HCV)DNAおよびヒト免疫不全ウイルス(HIV)DNAの共同増幅方法に向けられる。この方法は、

(A) IPC DNAを含有しており且つHCV DNA, HIV DNAまたは前記のいずれかの組合せを含む疑いのあるDNA試料において、IPCに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、およびHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対を使って、ポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、(a) IPC増幅生成物、(b) IPC増幅生成物とHCV特異的増幅生成物、(c) IPC増幅生成物とHIV特異的増幅生成物または(d) (a), (b)および(c)の任意組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ、

ここで前記IPCに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

(i) 正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1)〔配列番号8〕と

(ii) 逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1)〔配列番号9〕

とを含んで成り、

前記HCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が

10

20

30

40

50

(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号10〕と
(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号11〕と
を含んで成り、

H I V - 1 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列
5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕
を有する正プライマーと、配列

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および

(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕

から成る群より選ばれたH I V - 1 に特異的な逆プライマー
とを含んで成り、

10

H I V - 2 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列：

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe)〔配列番号6〕

を有する正プライマーと、配列：

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕

を有するH I V - 2 に特異的な逆プライマー
とを含んで成ることを特徴とする。

【0013】

本発明の別の面では、逆転写反応がランダムオリゴヌクレオチドプライマーを使って行
われ；あるいは、1または複数のH C V 特異的逆転写プライマーと1または複数のH I V
特異的逆転写プライマー、即ち、H C V またはH I V RNA 中の配列に相当する配列を
有するオリゴヌクレオチド、を使ってもよい。

20

【0014】

増幅の検出方法としては、非限定的に、(a) 電気泳動および(b) I P C - , H C V - ま
たはH I V - 特異的プローブが取り付けられた固体支持体上への増幅生成物の捕捉に続き
、比色アッセイを使った結合した生成物の定量、が挙げられる。有用なI P C 特異的捕捉
プローブとしては、非限定的に、5'-CTGCGTTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3'〔配列番号17〕
が挙げられる。有用なH C V 特異的5' 捕捉プローブとしては、非限定的に、5'-CCTTTCG
CGACCAACACTACTCGGCT-3'〔配列番号12〕が挙げられる。有用なH I V - 1 特異的捕捉プ
ローブとしては、非限定的に、5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3'〔配列番号13〕が挙げられ
、そして有用なH I V - 2 特異的捕捉プローブとしては、非限定的に、5'-CCACGCTTGCTTG
CTTAAGACCTC-3'〔配列番号14〕が挙げられる。

30

【0015】

別の面では、本発明は、生物学的試料中のH C V RNA とH I V RNA の共同検出
のためのキットに向けられる。このキットは、

(a) (i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号10
〕と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C29R25)〔配列番号11〕
とを含んで成るH C V の5' 非コード領域に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマ
ー；

(b) 配列 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する
正プライマーと

40

(1) 5'-GGGTGTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および

(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕

から成る群より選ばれたH I V - 1 に特異的な逆プライマー
とを含んで成るH I V - 1 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー；並びに

(c) 配列 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe)〔配列番号6〕を有する正プライ
マーと配列 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するH I
V - 2 に特異的な逆プライマー

とを含んで成るH I V - 2 に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー
を含んで成る。

50

【 0 0 1 6 】

更に別の面では、本発明は、DNA試料中のHCV DNAとHIV DNAの共同増幅のためのキットに向けられる。このキットは、

(a) (i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) [配列番号10]と

(ii) 逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) [配列番号11]とを含んで成るHCVの5'非コード領域に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー；

(b) 配列 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) [配列番号3]を有する正プライマーと配列：

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6) [配列番号4]および

(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) [配列番号5]

から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマー

とを含んで成るHIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー；および

配列 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) [配列番号6]を有する正プライマーと

配列 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) [配列番号7]を有するHIV-2に特異的な逆プライマー

とを含んで成るHIV-2に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー

を含んで成る。

【 発明の実施態様 】

【 0 0 1 7 】

本発明者らは、多重アッセイにおいて、生物学的試料中の低レベルのC型肝炎ウイルス(HCV)RNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの同時検出が、(i) 前記試料から誘導されたRNAに対して逆転写反応を行い、そして(ii) HCV RNAとHIV RNA中に存在する一定の配列に相補的な配列を有する特定のオリゴヌクレオチド対を使って、逆転写生成物を増幅せしめることにより達成できることを発見した。従って、本発明は、同一試料において低コピーレベルのHCV RNAとHIV RNAを検出する、改善された、1回の、逆転写/増幅多重アッセイを提供する。

【 0 0 1 8 】

オリゴヌクレオチドプライマーは、配列保存、分子内または分子間相互作用、およびアンプリコンと周囲配列の推定二次構造に基づいて選択される。更に、プライマーとアッセイ方法は、HCVゲノムとHIVゲノムの多領域、多ウイルス種、および内部陽性対照(IPC)RNA(またはDNA)の共同増幅を可能にするようにデザインされる。ウイルスゲノムの多領域の同時増幅/検出はアッセイ感度を増加させ、そしてIPCの同時増幅はPCRの阻害による偽陽性結果の可能性を減少させる。

【 0 0 1 9 】

分子生物学、微生物学、組換えDNAおよびタンパク質生化学の多数の技術、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, 第I, IIおよびIII巻, 1997(F.M. Ausubel編); Sambrook他, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; DNA Cloning: A Practical Approach, 第IおよびII巻, 1985(D.N. Glover編); Oligonucleotide Synthesis, 1984(M.L. Gait編); Transcription and Translation, 1984(Hames & Higgins編); A Practical Guide to Molecular Cloning; 双書, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Protein Purification: Principles and Practice, 第2版(Springer-Verlag, N.Y.)中に説明された技術を、本発明を実施する際に使用する。

【 0 0 2 0 】

本明細書中で用いる「核酸」または「ポリヌクレオチド」とは、ポリリボヌクレオチドかポリデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのプリンおよびピリミジン含有ポリマーを言う。これには一本鎖および二本鎖分子、例えばDNA-DNA, DNA-

10

20

30

40

50

R N A および R N A - R N A ハイブリッド、並びにアミノ酸主鎖に塩基を結合することにより形成された「タンパク質核酸」(P N A) が含まれる。これには修飾塩基を含有する核酸も含まれる。

【 0 0 2 1 】

本明細書中で用いる核酸配列の「相補体」とは、元の配列と共にワトソン - クリック塩基対合に参加するアンチセンス配列を言う。

【 0 0 2 2 】

本明細書中で用いる「プライマー」は、着目の一本鎖核酸配列と共に二本鎖を形成しそして例えば逆転写酵素または D N A ポリメラーゼを使って相補鎖の重合を可能にする、長さ約 5 ~ 約 50 ヌクレオチド、好ましくは長さ約 6 ~ 約 25 ヌクレオチド、最も好ましくは約 6 ~ 約 18 ヌクレオチドの単離されたオリゴヌクレオチドである。

10

【 0 0 2 3 】

本明細書中で用いる「単離された」核酸とは、その元の環境(例えば、それが天然に存在する混合物であるならその天然の環境、それが合成物であるなら反応混合物)から分離されている成分を言う。単離された核酸は、典型的には、最初にそれと関連していた成分の約 50 % 未満、好ましくは約 75 % 未満、そして最も好ましくは約 90 % 未満を含有する。

【 0 0 2 4 】

指摘した配列「から誘導された」核酸配列とは、その指摘した配列の一領域に相当する配列を言う。これには、その配列に相同であるかまたは相補的である配列も含まれる。

20

【 0 0 2 5 】

内部陽性対照(= I P C) 標的核酸とは、典型的には制限エンドヌクレアーゼの作用により後で直鎖状にされるプラスミドベクター中にクローニングされた合成核酸配列を指して言う。I P C は、典型的には一般的なプローブ結合領域を取り囲む複数のプライマー結合配列を有し、そして核酸増幅反応において偽陽性結果に対する包括的な対照として働く。

【 0 0 2 6 】

好ましい内部陽性対照標的 D N A の配列は下記のものである :

5' -CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAATGAACGCACGGACGAGGACATCATAGAGATTACACCTTTATCCACAGTTCTCGGTCTAACGCAGCAGTCAGTGTATCAGCACCAGCATCCGTAGTGAGTCTTCAGTGTCTGCTCCAGGATCGTG-3' [配列番号 15] 。

30

【 0 0 2 7 】

本明細書中に開示するいずれかの配列またはその部分配列を含んで成る核酸は、常法により調製することができる。例えば、Matteucci 他, 1981, J. Am. Chem. Soc. 103:3185 のホスホロアミダイト固体支持体法、Yoo 他, 1989, J. Biol. Chem. 764:17078 の方法、または他の周知の方法を使って、D N A を化学合成することができる。当該技術分野で既知である多数の手段により核酸を修飾することもできる。そのような修飾の非限定例としては、メチル化、「キャップ付加」、類似体による 1 もしくは複数の天然ヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間修飾、例えば無電荷結合(例えばメチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど)もしくは荷電結合(例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)が挙げられる。核酸は 1 または複数の追加の共有結合した成分、例えば、タンパク質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ - L - リジンなど)、挿入剤(例えばアクリジン、ソラレンなど)、キレート化剤(例えば金属、放射性金属、鉄、酸化的金属など)およびアルキル化剤を含んでもよい。「核酸」なる用語には P N A も含まれる。核酸は、メチルもしくはエチルホスホトリエステルまたはアルキルホスホロアミデート結合の形成により誘導体にすることができる。更に、本発明の核酸配列は、直接または間接的に検出可能なシグナルを提供することができる標識により修飾されてもよい。典型的な標識としては、放射性同位体、蛍光分子、ビオチンなどが挙げられる。

40

【 0 0 2 8 】

50

本明細書中で用いる「増幅」とは、非限定的に、核酸がコピーされる相互作用工程を言う。適当な増幅方法としては、非限定的に、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、核酸一塩基増幅、および転写媒介増幅が挙げられる。

【0029】

本発明は、生物学的試料中のHCVとHIVの検出方法を提供する。この方法は、

(i) 試料中に含まれるかまたは試料から誘導されるRNAを鋳型として使って逆転写反応を行い；

(ii) もしあるなら、HCVのゲノム内の配列（好ましくはHCVの5'非コード領域）に相当する配列を有する少なくとも1つの増幅プライマー対、およびHIVのゲノム内の配列に相当する配列を有する少なくとも1つの増幅プライマー対を使って、逆転写生成物を増幅させることにより、HCV特異的増幅生成物とHIV特異的増幅生成物を生成させ；そして

(iii) 前記HCV特異的増幅生成物と前記HIV特異的増幅生成物を検出することにより実施される。HCV特異的またはHIV特異的増幅生成物の検出が、試料中のHCV RNAおよびHIV RNAそれぞれの存在を示す。

【0030】

本発明によれば、任意の常法により患者から生物学的試料が得られる。適当な生物学的試料としては、非限定的に、血液、血清、血漿、尿、母乳および脳脊髄液が挙げられる。好ましくは、血漿がウイルスRNAの入手源として使われる。

【0031】

生物学的試料は、試料中に含まれるRNA、特にウイルスRNAに対する逆転写試薬の接近を与えるようなやり方で処理する。生物学的試料に「から誘導された」RNAは、最初は試料中に存在していたもので且つ試料を処理することによってそのRNAへの接近が増大された任意のRNAである。好ましくは、当該技術分野で周知の方法、例えばチオシアン酸グアニジウムを使用する方法、またはGenra Systems, Inc. (Minneapolis MN) からのPureScriptのような市販の試薬と方法を使う方法を角いて、試料からRNAを抽出する。RNAアーゼからのRNA、別のタンパク質、および/または逆転写反応を妨害する可能性のある他の成分からの分離をもたらすいずれの抽出方法を使ってもよい。

【0032】

次いで、試料を(a) ランダムプライマー、例えばPharmacia Biotech, Piscataway, NJ から得られるランダムヘキサマープライマー、および/または(b) HCV RNAゲノム配列の5'もしくは3'非コード領域から誘導されたプライマーを使って逆転写反応にかける。逆転写は、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, 第I, IIおよびIII巻, 1997 (F.M. Ausubel編)；米国特許第5,322,770号明細書；Young他, J. Clin. Microbiol. 31(4):882 (1993)；Myers他, Biochemistry 30(3):7661 (1991)または同時係属米国特許出願第_____号，代理人書類番号2094/OE287中に記載されたような、常用手段を使って実施される。

【0033】

逆転写反応の後、生成物を増幅させる。任意の増幅方法を使ってもよく、増幅方法の非限定例としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応、鎖置換反応、転写媒介増幅または核酸一塩基増幅が挙げられる。好ましくはPCRが使われる。典型的には、PCRに必要な全ての成分を含む反応混合物に直接逆転写反応混合物を添加する。次いで、使用するプライマー対により特定される条件を使って増幅反応を実施する。

【0034】

本発明者らは、特定のHCV特異的およびHIV特異的増幅プライマー対を使って、患者試料中の低レベルのHCV RNAとHIV RNAの両方を同時に検出することができることを発見した。本発明を実施する上で使用できるプライマーの非限定例として、下の第1表に列挙されたプライマーが挙げられる。

【0035】

10

20

30

40

【表 1】

第 1 表			
I D	起源	配列	配列番号
JBLTR4	HIV-1 (s)	5'-CTG CTT AAG CCT CAA TAA AGC TTG CCT TGA-3'	3
JBLTR6	HIV-1 (as)	5'-GGG TCT GAG GGA TCT CTA GTT ACC AGA GT-3'	4
JBLTR8	HIV-1 (as)	5'-TGT TCG GGC GCC ACT GCT AGA GA -3'	5
2LTRe	HIV-2 (s)	5'-GGG AGG TTC TCT CCA GCA CTA GCA -3'	6
2LTR-R1	HIV-2 (as)	5'-GCG ACT AGG AGA GAT GGG AAC ACA CA-3'	7
C131F25	HCV5' (s)	5'-GGG AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3'	10
C294R25	HCV5' (as)	5'-CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC A-3'	11

(S)=センス鎖 ; (as)=アンチセンス鎖

【 0 0 3 6 】

増幅後、増幅生成物は、当該技術分野で周知の任意方法、例えば非限定的に、アガロースまたはアクリルアミドゲル中でのゲル電気泳動法；非同位体比色検出法、例えばOrtho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY から入手可能なSureCell系（例えば下記の実施例 1 を参照のこと）；E C i 検出法；化学発光法；および蛍光検出法を使って検出することができる。

【 0 0 3 7 】

ウイルス特異的増幅生成物の検出は、試料中にウイルスRNAが存在することを示す。ゲル電気泳動を用いた場合、ウイルス特異的増幅生成物は、反応に用いた増幅プライマーに相当する配列を有する各ウイルスRNAの位置により推定されるような、それらのサイズにより確認される。

【 0 0 3 8 】

本発明は、患者におけるHIVおよびHCV感染の診断において；抗ウイルス療法処置の効能についての試験において；並びにHCV感染およびHIV感染試料についての血液製剤のスクリーニングにおいて、利用することができる。

【実施例】

【 0 0 3 9 】

下記の実施例は非限定的に本発明を例証する。

実施例 1：生物学的試料中のHCVとHIVの多重検出

下記の実験は、本発明の方法に従ってHCVおよびHIVの多重検出の感度を測定するために行った。

【 0 0 4 0 】

A. 方法

1. 患者試料：

製造業者の指示に従ってRoche AmpliCor Assayを使って、HIV陽性患者の血漿とHCV陽性患者の血漿のウイルス価を定量した。まず、HIV含有血漿試料とHCV含有血漿

10

20

30

40

50

試料をそれぞれ1,000 コピー数/mlと10,000コピー数/mlに希釈した。次いでそれらを次のようにして混合した：PCR反応あたり25コピーのウイルスゲノムRNAを提供するために、50 LのHCV血漿と500 LのHIV血漿を450 Lの陰性血漿に添加した。PCR反応あたり5コピーを提供するために、10 LのHCV血漿と100 LのHIV血漿を890 Lの陰性血漿に添加した。

【0041】

2. 試料調製：

血漿試料から、PureScript™ RNA単離試薬 (Gentra Systems, Minneapolis MN) を使ってRNAを調製した。体液についての製造業者のプロトコルへの変更として、20 gではなく40 gのグリコーゲンをウイルスRNAの沈澱に役立つ担体として使用することを含んだ。更に、大部分において、RNAのイソプロピルアルコール沈澱とエタノールによるRNAペレットの洗浄の後に、製造業者により与えられたRNAハイブリダイゼーション溶液ではなく、RT緩衝液混合物中にRNAペレットを再懸濁した。

【0042】

3. 逆転写：

ジエチルピロカルボネート (DEPC) で処理した水の中に50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.4 mM 各dNTP (Pharmacia Biotech), 4 M のランダムヘキサマー (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) または特異的逆転写プライマーおよび20単位のRNasin (Promega, Madison, Wisconsin) を含有する溶液 50 L中の100 Uの組換えモロニー Maus 白血病ウイルス (M - MLV) 逆転写酵素 (RT) (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland) を添加することにより、RNAからのcDNAの合成を触媒した。42 °Cで30分間のインキュベーション後、RT反応液を100 °Cに5分間維持してRT活性を破壊した。各反応液を1分間冷却した後、16000 × gで4秒間超遠心した。

【0043】

4. PCR増幅：

PCRは、25 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0.725 mM EDTA, 54 mM KCl, 3.72 mM NaCl, 40 mM DTT, 108 g/mlのゼラチン (IV型), 9.5 %グリセロール, 0.02% Tween 20, 0.02% NP40, 子ウシ胸腺DNA (2 g), 1.2 mM の各dNTP, 0.4 M の各プライマー, 10コピーの線状化した内部陽性対照 (IPC) プラスミドDNAおよび16 UのTaq ポリメラーゼを含む溶液 100 L中でPE9600サーモサイクラー (Perkin-Elmer) 中で行った。Taq に対するモノクローナル抗体 TP1-12 とTP4-9 (それらの調製は米国特許第5,338,671号明細書に開示されている) をそれぞれ50 : 1と5 : 1のモル比で反応液に添加して、Taq ポリメラーゼに対する抗体のモル比55 : 1を提供した。96 °Cで3分間の最初の変性後、96 °Cで5秒と68 °Cで40秒から成る40サイクルの増幅を行った。サイクルの終了後、103 °Cで5分間の最終加熱段階を行ってTaq ポリメラーゼを失活させた。

【0044】

5. PCR生成物の検出：

PCR生成物は、4%アガロースゲル中での電気泳動に続いて臭化エチジウム染色により検出した。あるいは、増幅中に5'-ビオチン標識プライマー (センス鎖) を使用してPCR生成物をビオチン化した。フロースルー膜の表面上に付着させたラテックス粒子に共有結合せしめたオリゴヌクレオチドプローブへのハイブリダイゼーションにより、生成物を捕捉した (SureCell™試験)。HIV-1プローブは5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr) [配列番号13] および5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) [配列番号14] であり；HIV-2プローブは5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) [配列番号14] であり；そしてHCVプローブは5'-CCT TTC GCG ACC CAA CAC TAC TCG GCT-3' (C252-27P) [配列番号12] であった。生じたプローブ/生成物複合体を、色素前駆体から色素 (青色) への酸化的変換を触媒するストレプトアビジン (SA) - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 接合体で処理した。色の強度を色標準に比較することにより、青色の強度を目視により採点した (0 ~ 10)。目に見える色の得点 > 3 は、全て陽性結果であると見なした。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

B . 結果

ゲル電気泳動は次の増幅生成物を明らかにした：188 nt (H C V) , 160 nt (I P C) および150 nt (H I V L T R 長鎖生成物) 。 H I V と H C V の組合せアッセイは、 P C R 試験あたり25コピー (500 個のウイルス粒子 / ml 血漿) のレベルで H I V と H C V の混合試料を全て検出することができた。加えて、混合陽性試料の50% ~ 90% を、 P C R 試験あたり5コピー (100 個のウイルス粒子 / ml 血漿) のレベルで検出することができた。これらの結果を下記第2表に要約する。

【 0 0 4 6 】

【表2】

10

第2表		
PCR反応あたりの ウイルスRNAの コピー数	n = 8	n = 8
	HCVプローブ陽性	HIVプローブ陽性
0	0%	0%
5	88%	50%
25	100%	100%

20

フロントページの続き

- (74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (72)発明者 ケビン エム・ゴルマン
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14616, ロチェスター, コンラド ドライブ 204
- (72)発明者 デビット アール・パッターソン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92128, サン ディエゴ, ウインドクレスト レーン 1
1553, アpartment ナンバー245
- (72)発明者 ジェフリー エム・リネン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92129, サン ディエゴ, エリンハム ストリート 89
78
- (72)発明者 ケミン ソン
アメリカ合衆国, ミズーリ 63021, ボールウィン, アーバー グレン 379

合議体

審判長 鈴木 恵理子
審判官 高堀 栄二
審判官 植原 克典

- (56)参考文献 国際公開第97/46716(WO, A1)
欧州特許出願公開第887427(EP, A1)
J Virol Methods., 1991年, Vol. 35, pp. 297 - 304
TRANSFUSION, 1998年, Vol. 38, 71S(S261)
Infusion Therapy Transfusion Medicine, 1998年
, Vol. 25, pp. 164 - 169
CLINICAL CHEMISTRY, 1995年, Vol. 41, p. 1681(009)
J Clin Microbiol., 1996年, Vol. 34, pp. 261 - 264
J Med Microbiol., 1995年, Vol. 42, pp. 367 - 371
Proc Natl Acad Sci U S A., 1992年, Vol. 89, pp. 1
87 - 191

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90
C12Q1/68

专利名称(译)	用于有效多重检测丙型肝炎病毒 (HCV) 和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的寡核苷酸引物		
公开(公告)号	JP5442917B2	公开(公告)日	2014-03-19
申请号	JP2000030237	申请日	2000-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断, 雷法团去开球		
当前申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断, 雷法团去开球		
[标]发明人	ケビンエムゴルマン デビットアールパッターソン ジェフリーエムリネン ケミンソン		
发明人	ケビン エム.ゴルマン デビット アール.パッターソン ジェフリー エム.リネン ケミン ソン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12R1/92 C12M1/00 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/569 G01N37/00		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.ZNAA C12R1/92 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/FA01 4B024/HA12 4B024/HA19 4B063/QA01 4B063/QQ10 4B063/QQ52 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 中村弘 渡边洋一		
审查员(译)	铃木惠理子		
优先权	60/118498 1999-02-03 US		
其他公开文献	JP2000279198A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过使用来自生物样品的RNA作为模板进行逆转录，同时检测HCV和HIV，通过使用分别对HCV和HIV特异的引物扩增形成的逆转录产物，并检测扩增的材料。解决方案：通过使用源自生物样品的RNA作为模板进行逆转录反应，并且对丙型肝炎病毒 (HCV) RNA特异性且对人免疫缺陷病毒 (HIV) 特异的逆转录引物提供每个逆转录反应转录产物和转录产物通过使用对HCV的5'非编码区特异的寡核苷酸引物对和对HIV特异的寡核苷酸引物对来扩增，以提供每种扩增产物。检测扩增产物以检测人受试者的生物样品中的丙型肝炎病毒和人免疫缺陷病毒。

第 1 表

ID	起源	配列	配列番号
JBLTR4	HIV-1 (s)	5'-CTG CTT AAG CCT CAA TAA AGC TTG CCT TGA-3'	3
JBLTR6	HIV-1 (as)	5'-GGG TCT CAG GGA TCT CTA GTT ACC AGA GT-3'	4
JBLTR8	HIV-1 (as)	5'-TGT TCG GGC GCC ACT GCT AGA GA -3'	5
2LTRe	HIV-2 (s)	5'-GGG AGG TTC TCT CCA GCA CTA GCA -3'	6
2LTR-R1	HIV-2 (as)	5'-GCG ACT AGG AGA GAT GGG AAC ACA CA-3'	7
C131F25	HCV5' (s)	5'-GGG AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3'	10
C294R25	HCV5' (as)	5'-CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC A-3'	11