

(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2004-49235

(P2004-49235A)

(43) 公開日 平成16年2月19日(2004.2.19)

| | | |
|----------------------------|----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 5/10 | C 1 2 N 5/00 Z N A B | 4 B O 2 4 |
| // C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 A | 4 B O 6 5 |

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 34 頁)

| | | | |
|--------------------|-----------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2003-180211 (P2003-180211) | (71) 出願人 | 591076811 カイロン コーポレーション |
| (22) 出願日 | 平成15年6月24日 (2003.6.24) | | アメリカ合衆国、カリフォルニア 946 |
| (62) 分割の表示 | 特願2001-75114 (P2001-75114) の分割 | | 08, エミリービル, ホートン ストリー ト 4560 |
| 原出願日 | 平成2年8月22日 (1990.8.22) | (74) 代理人 | 100078282 弁理士 山本 秀策 |
| (31) 優先権主張番号 | 398,667 | (74) 代理人 | 100062409 弁理士 安村 高明 |
| (32) 優先日 | 平成1年8月25日 (1989.8.25) | (74) 代理人 | 100113413 弁理士 森下 夏樹 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (72) 発明者 | エイミー ジェイ. ワイナー アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 11 オークランド, インディアン ウ エイ 1766 |
| (特許庁注: 以下のものは登録商標) | | | 最終頁に続く |
| WINDOWS | | | |

(54) 【発明の名称】 真核細胞でのHCV培養法

(57) 【要約】

【課題】 N A N B H 伝染の予防に有効なワクチンおよび免疫治療用の治療剤を開発に利用可能なスクリーニング系を提供すること、および、N A N B H を起こす病原体に感染した培養細胞を提供すること。培養中でH C V を増殖するのに使用される細胞、およびそのような培養物により産生されるウイルス抗原、および、例えば診断薬のような、そのような抗原の使用を提供すること。

【解決手段】 H C V に感染した細胞株。H C V に感染しているインピトロの細胞からの抗原を含有する抗H C V 抗体検出用の組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

HCVに感染した細胞株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はウイルス複製のためのインビトロの細胞系に関する。特に、非A非B肝炎(NANBH)の病原体、C型肝炎ウイルス(HCV)がその中で複製する細胞株に関する。

本出願書に引用される参考文献

ATCC CATALOG OF CELL LINES & HYBRIDOMAS, 10
6th edition, 1988 (American Type Culture Collection, Rockville, Md.).

BASIC & CLINICAL IMMUNOLOGY, 6th edition (Stites, Stobo, および Wells, 編., Appleton and Lange, Norwalk Conn/Los Altos, Ca, 1987).

Boggs および Winkelstein, WHITE CELL MANUAL, edition 4 (F.A. Davis Co., Phila., 1983.

Chooら. (1989), Science 244:359

Diggs, Sturm, および Bell (1985), THE MORPHOLOGY OF HUMAN BLOOD CELLS (Abbott Laboratories, Abbott Park, Il.) 20

DNA CLONING, VOLUMES I AND II (D.N Glover 編. 1985).

Freshney (1987), CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE (Alan R. Liss, Inc., N.Y.).

GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.H. Miller および M.P. Calos 編. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory).

Houghtonら., 米国特許出願 No. 355,002 (1989年5月18日出願) 30
)、およびその優先権を主張している出願。

【0002】

Houghtonら., ヨーロッパ特許庁公開 No. 0 318 216 (1989年5月31日)

HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D.M. Weir および C.C. Blackwell 編 1986)

Hellingsら., J. Virol. Meth. (1985), 10:321-326.

Hunt (1987), in LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus, 編., IRL Press Ltd., Washington D.C.), pp. 1-32. 40

IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986).

Kuo 編. (1989), Science 244:362.

Laemmli (1970), Nature 227:680.

LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus, 編., 1987, IRL Press, LTD., Washington, D.C.)

LYMPHOKINES AND INTERFERONS: A PRACTICAL 50

APPROACH (Clemens, Morris, および Gearing, 編., 1987, IRL Press, Ltd. Washington D. C.).
 Maniatis, Fitsch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982).
 Mayer および Walker, 編. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London).
 Mckeehan 氏. (1978), Biochem. Biophys. Res. Comm. 80:1013.
 METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.);
 さらに、
 Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (各々、Wu および Grossman, および Wu, 編.,)
 NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B. D. Hames & S. J. Higgins 編. 1984).
 OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M. J. Gait 編, 1984).
 Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984).
 Saiki 氏. (1986), Nature 324:163.
 Seto 氏., National Technical Information Service Report No. PAT-APPL-7-234 641 (1988).
 Scopes, (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y.).
 VIROLOGY: A PRACTICAL APPROACH (Mahy, 編., 1985, IRL Press, Ltd., Washington, D.C.)

【0003】

【従来の技術】

非A非B肝炎(NANBH)は、ウイルスに引き起こされると考えられる伝染性疾患あるいは家族性疾患であり、他のウイルスが関与する肝臓疾患と区別し得る。他のウイルスが関与する肝臓疾患には、既知の肝炎ウイルス、すなわちA型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)およびデルタ肝炎ウイルス(HDV)、ならびにサイトメガロウイルス(CMV)あるいはエプスタイン・バーウイルス(EBV)に引き起こされるものが含まれる。NANBHは輸血を受けた個人で最初に同定された。ヒトからチンパンジーへの伝染およびチンパンジーでの連続継代によって、NANBHが、伝染性の、1つあるいは複数の病原体によって起こることの証拠が提供された。HCVウイルスは、NANBHの病原体として同定された。

【0004】

NANBVのキャリアーおよびNANBVに汚染した血液あるいは血液製剤を同定するための感度が高く、特異的なスクリーニング方法の必要性は重大である。輸血後肝炎(PTH)は、輸血患者の約10%に起こり、これらのケースの90%までがNANBHである。この疾患の主な問題は、慢性の肝臓障害への進行(25-55%)である。

【0005】

患者の看護および、血液および血液製剤あるいは親密な個人間の接触によるNANBH伝染の予防には、NANBVに関連する核酸、抗原および抗体を検出する、信頼性の高い診断用および予後診断用の手段を必要とする。さらに、有効なワクチンおよび、この疾患の予防および/あるいは治療のための免疫治療用の治療剤が必要である。

【0006】

NANBHを起こす病原体に感染した培養細胞は、免疫アッセイおよび/あるいはワクチンに使用し得るウイルスポリペプチドの原料を提供する。さらに、この疾患の治療用抗ウイルス剤を開発するための薬物スクリーニングプログラムにも有用である。

【0007】

肝由来の不死化したヒトあるいは非ヒト霊長類細胞株で、NANBHの原因である病原体に意図的に感染させたものは、1987年4月1日出願、1987年10月8日公開のWO/87/05930に報告されている。報告によると、これらの細胞株は非リンパ細胞の性質を有する。さらに、これらの細胞中で複製する物質がこの疾患の原因となることは、証明されていない。

10

【0008】

さらに、NANBH患者から分離した、意図的に主にリンパ球からなる単核白血球が、感受性のあるチンパンジーに注入した際にNANBHを起こしたことが報告されている。Hellingら、(1985)を参照のこと。しかし、NANBH感染の証拠は、意図的に感染させたチンパンジーにおける形態的变化および組織学的変化であり、間接的である。さらに、この血球を注入された2匹のチンパンジーのうちの1匹しか意図的に感染させられていない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

NANBHを起こす病原体に感染した培養細胞を提供することである。

20

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明は、培養中でHCVを増殖するのに使用される細胞に向けられる。本発明はさらに、そのような培養物により産生されるウイルス抗原、および、例えば診断薬のような、そのような抗原の使用に向けられる。

【0011】

従って、本発明の1つの観点は、HCVに感染している細胞株である。

【0012】

本発明の他の観点は、HCVに感染しているインビトロの細胞からの抗原を含有する、抗HCV抗体検出用の組成物である。この組成物では、この抗原は固体基質に付着しており、そして前記抗HCV抗体に免疫学的に反応性がある。

30

【0013】

さらに本発明の別の観点は、HCV抗原に対する抗体を検出するための免疫アッセイであり、これは、以下の工程を包含する：

(a) 抗HCV抗体を含む疑いのあるサンプルを、抗体-抗原複合体を形成させる条件下で、インビトロの細胞株で生産したHCV抗原とともにインキュベートする工程；および
(b) HCV抗原を有する抗体-抗原複合体を検出する工程。

【0014】

本発明の他の観点は、HCVを抑制/阻害する物質をスクリーニングする方法である。

【0015】

さらに本発明の他の観点は、HCV感染細胞培養中で増殖させることを包含する、ウイルスの増殖法である。

40

【0016】

【発明の実施の形態】

定義

用語「C型肝炎ウイルス」は、これまで未知であったNANBHの病原体に対して、この分野に従事する者によって使用されてきた。従って、本願で使用されるように、「C型肝炎ウイルス」(HCV)とはNANBHの原因である物質のことであり以前にNANBVおよび/あるいはBB-NANBVと呼ばれていたものである。HCV、NANBVおよびBB-NANBVという用語は、本願では、互換的に使用される。この語法の延長とし

50

て、以前にNANBH肝炎(NANBH)と呼ばれていた、HCVによって起こる疾患はC型肝炎と呼ばれる。本願では、NANBHおよびC型肝炎という用語は互換的に使用され得る。

【0017】

本願で使用されるように、「HCV」という用語は、その病原性株がNANBHを起こすウイルス種、およびそれに由来する弱毒株あるいは欠陥干渉粒子を意味する。HCVのゲノムは、RNAからなる。RNAを含有するウイルスは、比較的高い割合で自然に変異することが知られている。すなわち、報告によると、組み込まれたヌクレオチド当り10⁻³から10⁻⁴の確率で起こる(FieldsおよびKnipe(1986))。従って、HCV種には多数の株が存在し、それらは病原性あるいは非病原性であり得る。HCVは、フラビ様ウイルスと考えられている。フラビウイルス粒子の形態および組成は知られており、Brintonに記載されている(1986)。概して、形態に関しては、フラビウイルスは、2層の脂質に囲まれたヌクレオキャプシドを中心に有する。ビリオンは球状であり、直径は約40-50nmである。それらのコアは直径が約25-30nmである。ビリオンエンベロープの外側の表面には、先端に直径約2nmのノブを有する約5-10nmの長さの突起がある。

10

【0018】

HCV1と呼ばれるHCV株のゲノムに対するcDNAは、本願譲受人が共有する、本願1989年5月18日出願の米国特許出願番号第355,002号(代理人整理番号2300-0063.28)に記載されており、それをすべて本願に参考文献として引用する。また、本願に参考文献として引用する、EPO公開NO.0318216およびPCT出願NO. US88/04125を参照のこと。HCV cDNAセンスストランドを構成する配列を図1に示す。HCVの異なる株あるいは分離株は、HCV1と比較して、アミノ酸および核酸レベルに多様性を有すると考えられる。多くの分離株が、HCV1と比較して、総アミノ酸配列に高い相同性(すなわち、約40%より高い)を有すると考えられる。しかし、他の相同性の低いHCV分離株も、種々の基準に従ってHCV株として定義されることが有り得る。その基準とは、例えば、HCV1のそれとサイズが類似するポリタンパク質をコードするORF、HCV1のそれと類似の疎水性および抗原性の特徴を有するポリタンパク質およびHCV1にも保存されている共直線性(co-linear)のペプチド配列の存在などである。

20

30

【0019】

HCVは、少なくとも1つの、HCV1のゲノムにコードされているエピトープと免疫学的に同一とみなし得るエピトープをコードする。他の既知のフラビウイルスと比較して、このエピトープはHCVにユニークである。エピトープの特異性は、その抗HCV抗体との免疫反応性および他のフラビウイルス種に対する抗体との免疫反応性の欠如によって同定し得る。免疫反応性を決定する方法は当該分野で公知であり、例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISAアッセイ、および凝集反応がある。HCVエピトープの免疫反応性を決定する適切な方法は、本願の譲受人が共有する米国特許出願番号第07/341,334、Chooら、(1989)およびKuora、(1989)に記載されている。

【0020】

上記に加えて、次に示す核酸相同性およびアミノ酸相同性のパラメーターが、単独あるいは組み合わせて、株あるいは分離株をHCVとして同定するのに適用され得る。HCV株および分離株は、進化的に関連しているため、ヌクレオチドレベルでのゲノムの全体的相同性は、おそらく約40%あるいはそれより高く、たぶん約60%あるいはそれより高く、そして、よりおそらく約80%あるいはそれより高いと考えられる。そして、さらに、少なくとも約13個のヌクレオチドからなる連続した配列に対応する配列がある。推定上のHCV株ゲノム配列とHCV1 cDNA配列との間の対応性は、当該分野に公知の方法で調べ得る。例えば、推定上のHCV由来のポリヌクレオチドの配列情報を直接、本願に記載のHCV cDNAと比較して調べ得る。さらに、例えば、相同性のある領域(例えば、S1消化前に使用する領域)間を、安定した2重鎖ポリヌクレオチドを形成する条件

40

50

下でハイブリダイズさせ、次いで1本鎖特異的ヌクレアーゼで消化し、その後消化されたフラグメントのサイズを決定することにより、決定し得る。

【0021】

HCVの株あるいは分離株間は進化的に関連しているので、推定上のHCV株あるいは分離株は、それらのポリヌクレオチドレベルにおける相同性によって、同定可能である。概して、HCV株あるいは分離株は、ポリペプチドレベルで約40%より高い相同性を有し、おそらくは約70%より高い相同性を有し、そしてよりおそらくは、約80%より高い相同性を有する。そして、あるものは約90%より高い相同性を有し得る。アミノ酸配列の相同性を決める方法は当該分野で公知である。例えば、アミノ酸配列は直接決定し得、本願が提供する配列と比較し得る。または、推定上のHCVのゲノム物質のヌクレオチド配列を、決定し(通常はcDNA中間体を経て)、そこにコードされるアミノ酸配列を決定し、そして対応する領域を比較し得る。

10

【0022】

本願で使用するように、特定のポリヌクレオチド配列「から派生する(に由来する)」ポリヌクレオチドとは、この特定のヌクレオチド配列の領域に対応する、少なくとも約6個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約8個、より好ましくは少なくとも約10-12ヌクレオチド、そしてさらに好ましくは少なくとも約15-20個のヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド配列を意味する。「対応する」とは、特定の配列に相同性があるか、あるいは相補的であることを意味する。好ましくは、それからポリヌクレオチドが派生する領域の配列は、

20

HCVゲノムに特有な配列に相同性あるいは相補性がある。配列がHCVにゲノムに特有であるかどうかは、当業者に公知の方法で調べ得る。例えば、その配列が感染していない宿主あるいは他の生物に存在するかどうかをジーンバンクのようなデータバンクの配列と比較し得る。また、配列は、他のウイルス体の既知の配列と比較し得る。これらには、例えば、HAV、HBVおよびHDVのような肝炎を起こすことが知られているもの、および他のフラビウイルス科に属するものが含まれる。派生した配列の、他の配列との対応性あるいは非対応性はまた、適切なストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションによって決定し得る。核酸配列の相補性を調べるためのハイブリダイゼーション法は、当該分野で公知であり、後述する。例えばManiatisら、(1982)を参照のこと。さらに、ハイブリダイゼーションで形成された2重鎖ポリヌクレオチドのミスマッチは、例えば、2重鎖ポリヌクレオチド中の1本鎖の部分の特異的に消化するS1のようなヌクレアーゼでの消化を含む、既知の方法で決定し得る。典型的なDNA配列を「派生する」領域には、例えば、特異的エピトープをコードする領域、および非転写領域および/あるいは非翻訳領域が含まれ得るが、これらに限定されない。

30

【0023】

派生したポリヌクレオチドは、示されたヌクレオチド配列から必ずしも自然に由来するわけではなく、いかなる様式でも生成し得、これには例えば、化学合成あるいはDNA複製あるいは逆転写あるいは転写が含まれる。さらに、特定の配列の領域に対応する領域の組み合わせは、意図する用途に適切のように、当該分野で公知の方法で改変し得る。

【0024】

本願で использоватьсяように、「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチドあるいはデオキシポリヌクレオチドの、任意の長さのヌクレオチド重合体をいう。この用語は、その分子の一次構造のみを意味する。従ってこの用語には、2本鎖および1本鎖DNAおよび2本鎖および1本鎖RNAが含まれる。さらにこの用語には、修飾された形態および修飾されていない形態のポリヌクレオチドが含まれる。この修飾には、例えば、メチル化キャッピングおよび/あるいは、1つ以上の天然のヌクレオチド基をアナログに置換することを含む、当該分野で公知の他の修飾が含まれる。

40

【0025】

「精製したウイルスポリヌクレオチド」という用語は、ウイルスポリヌクレオチドに天然に付随するポリペプチドが実質的に混じっていない、ウイルスゲノムあるいはそのフラグ

50

メントを意味する。すなわち、ウイルスペプチドに天然に付随するポリペプチドを約50%より少なく、好ましくは約70%より少なく、そしてより好ましくは約90%より少なく、含む。ウイルスポリヌクレオチドをウイルス粒子から精製する方法は、当該分野で公知であり、例えば、カオトロピックな物質での粒子の破壊、分画抽出および、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび密度沈降によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの分離が含まれる。

【0026】

「オープンリーディングフレーム(ORF)」とは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の領域である。この領域は、コード配列の一部あるいは全コード領域を表し得る。

10

【0027】

「コード配列」とは、それが適切な調節配列の制御下に配置された場合にmRNAに転写される配列および/あるいはポリペプチドに翻訳される配列である。コード配列の境界は、5'末端の翻訳開始コドンおよび3'末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列には、mRNA、cDNAおよび組み換えポリヌクレオチド配列が含まれるが、これらに限定されない。

【0028】

「~と/~として、免疫学的に同一とみなし得る」とは、通常はHCVタンパク質である、特定の(複数の)ポリペプチドに存在する(複数の)エピトープおよび(複数の)ポリペプチドが存在することをいう。免疫学的同一性は、抗体の結合および/あるいは結合における抗体との競合によって決定し得る。これらの方法は、平均的な当業者には公知であり、また、後記で説明する。

20

【0029】

本願で使用されるように、「エピトープ」とは、ポリペプチドの抗原決定基をいう。エピトープは、エピトープにユニークな空間構造中の3個以上のアミノ酸を含有し得る。概して、エピトープは少なくとも5個のそのようなアミノ酸からなり、より一般的には、少なくとも8-10個のそのようなアミノ酸からなる。アミノ酸の空間的構造を決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶構造解析および2次元核磁気共鳴が含まれる。

【0030】

ポリペプチドは、ポリペプチド内に含まれる特異的エピトープを抗体が認識することによって抗体と結合する場合に、「免疫反応性」である。免疫反応性は、抗体の結合によって、特に、抗体結合の速度論によって、および/あるいは、抗体が認識するエピトープを有する既知の(複数の)ポリペプチドを(複数の)競合物として使用する、結合に対する競合によって決定し得る。ポリペプチドが抗体に対して免疫反応性であるかどうかを調べる方法は、当該分野に公知である。

30

【0031】

本願で使用されるように、「免疫原性ポリペプチド」という用語は、アジュバントの存在あるいは非存在下で、単独あるいは担体に結合している状態で、細胞性および液性応答を誘起するポリペプチドをいう。

40

【0032】

「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸の重合体を意味し、生成物の長さを特定しない。従って、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が、ポリペプチドの定義に含まれる。この用語はさらに、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化などのようなポリペプチドの発現後の修飾を意味しないが、除外もしない。

【0033】

本願で使用されるように、「個体」とは、脊椎動物、特に哺乳類動物種をいい、家畜、競技用動物および、ヒトを含む霊長類が含まれるが、これらに限定されない。

【0034】

本願で使用されるように、核酸の「センスストランド」あるいは「プラスストランド」は

50

、その mRNA に配列相同性のある配列を有する。「アンチセンスストランド」あるいは「マイナスストランド」は、「センスストランド」あるいは「プラスストランド」の配列に相補的な配列を有する。

【0035】

本願で使用されるように、ウイルスの「ポジティブストランドゲノム」とは、RNA あるいは DNA である、ゲノムが 1 本鎖であり、そして（複数の）ウイルスポリペプチドをコードするゲノムをいう。ポジティブストランド RNA ウイルスの例には、トガウイルス科、コロナウイルス科、レトロウイルス科、ピコルナウイルス科、およびカリシウイルス科が含まれる。以前はトガウイルス科に分類されていたフラビウイルス科もこれに含まれる。Fields および Knipe (1986) を参照のこと。

10

【0036】

本願で使用されるように、HCV ゲノムの「複製型中間体」は、RNA ストランドあるいはそのフラグメントを意味し、それはウイルスゲノムに相補的であり、ウイルス複製過程の間に合成される。複製型中間体は、ポジティブ RNA ストランド合成の鋳型として機能する。

【0037】

本願で使用されるように、「精製 HCV」とは、ウイルスが通常付随している細胞成分および感染組織中に存在し得る他の型のウイルスから単離された HCV 調製物をいう。ウイルスを単離する方法は、当業者には公知であり、例えば、遠心分離およびアフィニティークロマトグラフィーが含まれる。精製 HCV の調製法は後述する。

20

【0038】

本願で使用されるように、「生物試料」とは、個体から分離された組織あるいは体液をいい、例えば以下のものが含まれるが、それらに制限されない。すなわち、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、外部皮膚切片、呼吸器道、消化管および尿生殖器道、涙、唾液、乳汁、血球、腫瘍、器官、さらに、インビトロ細胞培養物の成分（細胞培養液中での細胞生育により得られるを馴化培地、ウイルスに感染していると推定される細胞、組換え細胞および細胞成分が含まれるが、これらに限定されない）である。

【0039】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、本願で使用されるように、検出されるべきプライマー、プローブ、オリゴマーフラグメント、オリゴマーコントロールおよびラベルされていないブロック用オリゴマーをいい、3 個以上のデオキシリボヌクレオチドあるいはリボヌクレオチドを有する分子として定義される。典型的には 4 個より多く、典型的には最高約 100 個のヌクレオチドを有する。その正確なサイズは多くの因子によって決まり、それはすなわち、オリゴヌクレオチドの最終的機能あるいは使用によって決まる。

30

【0040】

「プライマー」という用語は、本願で使用されるように、ポリヌクレオチドに相補的な、プライマーからの延長産物の合成を触媒する条件下に置かれた場合に、相補的ストランドにそったポリペプチド合成の開始点として作用し得るオリゴヌクレオチドをいう。そのような条件には、4 種の異なるヌクレオチド 3 リン酸あるいはヌクレオシドアナログの存在および、適切なバッファー（「バッファー」には、コファクターである置換基あるいは、pH、イオン強度などに影響する置換基が含まれる）中の DNA ポリメラーゼあるいは逆転写酵素および適切な温度が含まれる。

40

【0041】

本願で使用されるように、「標的領域」とは、増幅されるべき、および/あるいは検出されるべき核酸の領域をいう。

【0042】

本願で使用されるように、「プローブ」という用語は、標的領域中の配列に相補的な、プローブ中の少なくとも 1 つの配列と、ハイブリッドを形成するポリヌクレオチドあるいはオリゴヌクレオチドをいう。しかし、好ましくは、プローブは、ポリメラーゼチェーンリアクションを開始させるのに使用される（複数の）配列に相補的な配列は含まれない。

50

【0043】

本願に使用されるように、「耐熱性ヌクレオチドポリメラーゼ」という用語は、*E. coli*のヌクレオチドポリメラーゼに比較して熱に対して比較的安定である、ヌクレオチドの重合を触媒する酵素をいう。一般にこの酵素は、標的配列の3'末端で、プライマーを使用して合成を開始し、合成が終了するまで5'方向に鋳型にそって進む。*Thermus aquaticus* (Taq)から単離された代表的な耐熱性酵素およびその使用法は、Saijiら、(1988)に記載されている。

【0044】

本願に使用されるように、HCV RNAを含む「ウイルスRNA」という用語は、ウイルスゲノムのRNA、そのフラグメント、それらの転写物およびそれらに由来する変異した配列をいう。

【0045】

本願で使用されるように、「細胞株」とは、最初の継代培養後増殖された培養細胞をいい、従って種々の実施態様があり、これには、細胞株と呼ばれる細胞の個々の細胞、回収された細胞、細胞を含有する培養物が含まれる。「派生する」とは、後代あるいは排出物を意味する。さらに当該分野では、自然な変化あるいは誘導された変化が、保存あるいは移動の間に核型に起こることが知られている。従って、細胞株と呼ばれるものに由来する細胞が、祖先の細胞あるいは培養物と全く同一でないことも有り得、従って細胞株と呼ばれるものには、そのような変異体も含まれる。「細胞株」という用語には、不死化した細胞も含まれる。好ましくは、細胞株には、例えばトリオームのような3つのタイプの細胞の融合に由来する細胞は入らない。

【0046】

本願に使用されるように、「インビトロ」の細胞系とは、インビトロで複製した細胞をいい、従って、初代培養および細胞株が含まれる。

【0047】

本願に使用されるように、「血球」という用語は、循環血、組織、あるいは骨髄にある細胞をいい、これには骨髄系、単球系、巨核球系、赤血球系、リンパ球系および形質細胞系の細胞が含まれる。これらの細胞を区別し得る形態は、THE MORPHOLOGY OF HUMAN BLOOD CELLS (1985)に記載されている。

【0048】

本願に使用されるように、「末梢血細胞」という用語は、循環血中にある細胞をいい、一般に好酸球、好中球(桿状および分葉の両方)、好塩基球、単球、血小板、赤血球、リンパ球および形質細胞をいう。

【0049】

本願に使用されるように、「白血球」という用語は、赤血球および血小板を除く、不均一なタイプの血球の集団をいう。

【0050】

本願で使用されるように、「リンパ球」という用語は、免疫応答に関与する、直径6 - 12 μ mの球形の細胞であり、大きくて丸い、濃染色される核と非常に少ない細胞質を有する。リンパ球には、Bリンパ球およびTリンパ球が含まれる。

【0051】

本願で使用されるように、「Bリンパ球」は、脊椎動物の白血球であり、成熟すると、抗体産生に関与する。成熟処女Bリンパ球(すなわち、抗原にまだ出会っていないもの)は、次の表面マーカーの存在によって同定される; すなわち、抗原に対する単量体IgMレセプター、IgGに対するFcレセプターおよび補体の活性化C3b成分に対するレセプターである。

【0052】

B前駆リンパ球は免疫グロブリン産物を欠くが、特異的モノクローナル抗体によって同定し得る他の特徴的な分子を発現し得る。これらの細胞は分裂し、そして急速に移行して、細胞質内に μ ヘビーチェーンを有するが、ライトチェーンを有しない大きなリンパ芽球に

10

20

30

40

50

なる。プレB細胞のフェノタイプ（細胞質内 μ チェーン+、ライトチェーン-、表面Ig-）は、活発にDNA合成を行っているリンパ芽球に先ず、発現され得る。ヒトのプレB細胞は、HLA-DR分子をその表面に発現し、さらに補体フラグメントC3bに対するレセプターを発現し得る。しかし、それらはIgGに対するFcレセプターを欠き、C3d/EBVレセプターをほとんど持たない。B前駆リンパ球はまた、ピーナッツアグルチニンへの結合能により、認められる。

【0053】

成熟Bリンパ球は、活性化しているか、あるいは静止状態にある。活性化B細胞は、静止B細胞には検出されないいくつかのタイプの分子を発現する。これらのマーカー分子は当業者に公知であり、これには例えば、インターロイキン-2（IL-2）レセプターおよびトランスフェリンレセプターが含まれる（後者はすべての種類の細胞に発現している）。B細胞の活性化は膜IgDの消失を引き起こし、そしてFc およびC3bに対するレセプターの両方が外膜から消えるが、C3d/エプスタイン・バーウイルス（EB）Vに対するレセプターは有意に影響されない。

10

【0054】

抗原あるいはマイトジェンによる刺激後、Bリンパ球は、2つの分化経路のいずれかにそって進み得る。Bリンパ球は、プラズマ細胞に分化し得るか、あるいは分裂し、そしてメモリーB細胞となって静止状態に戻る。メモリーB細胞は、活性化の間にIgDを消失する。この分子は、メモリー細胞プールに入った細胞では再合成されない。

【0055】

「プラズマ細胞」は、終末まで分化したB細胞である。これらの細胞は、卵形で、車輪のスポークのような変わった核および非常に好塩基性の細胞質を有する。免疫グロブリンの決定基に対する蛍光色素でラベルした抗体で染色すると、固定したプラズマ細胞は、細胞質全体に強い蛍光を示す。膜に結合している（膜結合）免疫グロブリンおよびDR分子は乏しく、Fc、C3b、C3dあるいはEBVに対するレセプターは、一般に検出できない。

20

【0056】

「プラズマ芽球」は形態的にも機能的にも、活性化リンパ球（Bリンパ芽球とも呼ばれる）段階とプラズマ細胞段階と間にある。細胞は大きく、プラズマ細胞より大きい割合の核：細胞質を有する。膜結合免疫グロブリンおよびFcレセプターは存在する。

30

【0057】

本願で使用されるように、「Tリンパ球」は、種々の細胞媒介性免疫応答に関与し得る胸腺由来の細胞である。種々のタイプのT細胞があり、それらはその機能および細胞表面マーカーによって区別し得る。T「ヘルパー」およびT「サプレッサー」タイプのクラスを含む、Tリンパ球のクラスを区別する方法は当該分野で公知である。例えば、モノクローナル抗体は、CD（分化クラスター、Cluster of differentiation）抗原を含む細胞の表面抗原を検出するのに使用し得る。CD抗原でマークされるT細胞のタイプおよび特異抗原を検出する抗体を表1に示す。

【0058】

【表1】

40

| マ-クされる細胞のタイプ | CD 名称 | 抗体の名称 | コメント | |
|-----------------|-------|-----------------------------|--|----|
| 皮膚胸腺細胞 | CD1 | Leu 6 OKT 6 | ランゲルハンス細胞にも存在する初期T細胞抗原。未梢T細胞上には存在しないβ ₂ -ミクログロブリンと親和している。 | |
| Eロゼット形成細胞 | CD2 | Leu 5 OKT 11 T11 | T細胞上の汎T細胞抗原SRBCレセプター- | |
| 成熟T細胞 | CD3 | Leu 4 | さらにT細胞ALLおよび皮膚T細胞リンパ腫上に存在する。 | |
| ヘルパー/インデューサーT細胞 | CD4 | Leu 3 OKT 4 T4 | さらにヘルパーおよびインデューサーのサブセットに分類し得る。 | |
| 汎-TおよびB細胞重集団 | CD5 | Leu 1 T1 T101 OKT1 | B細胞CLL、骨髄移植後のB細胞 | |
| 成熟TおよびB細胞重集団 | CD6 | T12 | 悪性T細胞 | |
| 汎-T細胞、胸腺細胞 | CD7 | Leu 9 JA1 | T細胞白血病 | |
| サブセット/細胞障害性T細胞 | CD8 | Leu 2 OHT 8 T8 | さらに、細胞障害性およびサブセットのサブセットに分類し得る。 | 10 |

10

20

30

40

本願で使用するように、「大型顆粒リンパ球」(LGL)またはナチュラルキラー(NK)細胞と呼ばれる細胞は、別のタイプのリンパ球である。これらの細胞には孤立する大型リンパ球集団が含まれ、例えばそれらの細胞質内にある特徴的なアズール親和性顆粒によって、形態的に区別し得る。さらに、LGLは、特異的モノクローナル抗体を使用する方法によっても同定し得る。これらの細胞上に存在するFcレセプター(Leu 11)あるいは特異的分化抗原(Leu 7、HNK-1、NKH-1、NKH-2)のいずれかを

50

検出する、いくつかのモノクローナル抗体が入手可能である。ある種のLGL細胞はさらに、CD2T細胞ファミリーの抗原を発現する。さらに機能性試験の方法は当該分野で公知であり、それらは、これらの非免疫細胞の、例えば赤白血症細胞株K562のような特定の標的細胞を死滅させる能力に基づいている。細胞障害性を測定する方法は当該分野に公知であり、これには例えば、51Cr放出アッセイが含まれる。

【0059】

本願に使用されるように、「単球」は、食作用を有する大型の無顆粒性白血球である。ヒトでは、これらの細胞は直径が約10 - 12 μm であり、卵形の核を有する。組織にある単球は、マクロファージとして知られている。単球/マクロファージは、それらの形態によって同定し得る。それらは、顆粒球およびほとんどのリンパ球より大きい。それらは、明染色される細かい顆粒を有する、丸形あるいは腎臓のような形の核を有する。それらは、非特異的エステラーゼあるいは - ナフトールエステラーゼを染色することで検出し得る。特異的分化抗原に対するモノクローナル抗体も入手可能であり、これには例えばLeu M3およびOKT M1が含まれる。「単球」という用語には、単芽球および前単球が含まれる。単核食細胞系の細胞およびそれらの分布を表2に示す。細胞のタイプを区別する方法は、BASIC & CLINICAL IMMUNOLOGY, 6th editionに記載されている。

10

【0060】

【表2】

単核食細胞系の細胞*

| 細胞 | 分布 | |
|--|---------------------------|----|
| 幹細胞 (前駆、committed) | 骨髄 | |
| 単芽球 | 骨髄 | |
| 前単球 | 骨髄 | |
| 単球 | 骨髄 | 10 |
| マクロファージ | 組織 | |
| 正常の状態、遊離 | | |
| 組織球 (Histocytes) | 結合組織 | |
| 肺胞マクロファージ | 肺 | |
| 胸腔および腹腔マクロファージ | 漿液性腔 | |
| 正常の状態、常在 (fixed) | | |
| クップファー細胞 | 肝臓 | 20 |
| 破骨細胞 | 骨 | |
| 小グリア細胞 | 神経系 | |
| 滑膜タイプA細胞 | 関節 | |
| 組織に常在するマクロファージ | 脾臓、リンパ節 骨髄、および他の 組織 | |
| 炎症 | | |
| 滲出液マクロファージ | 全組織 | 30 |
| 活性化マクロファージ | 全組織 | |
| 誘導 (induced) マクロファージ | 全組織 | |
| 上皮様細胞 | 全組織 | |
| 多核巨細胞 (ランゲルハNSTタイプ および異物タイプ) | 全細胞 | |
| * Van Furth R (編集者) : <u>Mononuclear Phagocytes: Functional Aspects</u> , Martinus Nijhoff, 1980より転載 | | |
| | | 40 |

本願で使用されるように、「顆粒球」という用語は、多くの細胞質内顆粒および分葉した核を有する多型核白血球をいう。顆粒球には、好中球、好酸球および好塩基球が含まれる。好中球は、アメーバ様の形で、食作用を有し、そして塩基性および酸性色素で染色される。好酸球および好塩基球はそれぞれ、酸性色素および塩基性色素で染色される顆粒を細胞質内に有する。

【0061】

「骨髄細胞」には、初代骨髄組織および霊長類およびヒトのような哺乳類由来の骨髄細胞 50

株の両方が含まれる。初代骨髄細胞のインビトロ培養法およびIM-9、KG-1およびKG-1aのような骨髄細胞株の培養法は公知である。例えば、ATCC CATALOG (前出)の361を参照のこと。初代骨髄細胞は、本願に記載の白血球およびリンパ球に加えて、多分化能性幹細胞のような始原細胞 (progenitor cell) を含み得る。例えば、Civin 米国特許No. 4,714,680を参照のこと。

II. 発明の開示

本願に記載の発明は、細胞株中でのHCVの複製を可能にする。本発明の方法では、複製するウイルスに感染した末梢血細胞が検出される。好ましくは、検出は、HCV感染細胞を含有する調製物中にウイルスゲノムの複製型中間体を同定することによりなされる。または、ビリオンはHCV感染細胞集団を検出するイムノアッセイを用いて検出し得る。HCVに感染した細胞株が調製される。これらの細胞株は通常、血球あるいはそれらの前駆細胞、より通常には、単核球あるいはそれらの前駆細胞に由来する。感染した細胞株の調製は、種々の方法によってなされ得る。これらの方法には、次のものが含まれる。1つの選択は、ウイルスを複製している細胞の短期初代培養から採取した培養液の濃縮液で感受性の細胞を培養する方法である。他の選択では、感受性の細胞を直接単離したHCV粒子に感染させる方法である。さらに別の選択では、感受性の細胞を、HCV感染細胞と接触させて生育させる方法である。感受性の細胞は、確立した細胞株あるいは初代培養から得られる。または、HCVを有する個体からの感染細胞を、細胞株からの確立された細胞と融合して永久細胞株を作製する。さらに別の方法では、個体から単離されたHCV感染血球を不死化し得る。HCV感染細胞株によって産生されるビリオンは、抗HCV抗体検出用のイムノアッセイに有用であり、またHCV治療用ワクチンの生産用基質として有用である。

【0062】

本発明の実施には、特に示されない限り、従来分子生物学、微生物学、血液学、細胞および器官培養、組換えDNAおよび免疫学の、当該分野内の技術を用いる。そのような技術は、文献に詳細に記載されている。例えば、ATCC CATALOG OF CELL LINES & HYBRIDOMAS, 6th edition, 1988 (アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, Md.); BASIC & CLINICAL IMMUNOLOGY, 6th edition (Stites, StoboおよびWeil編、Appleton and Lange, Norwalk Conn/Los Altos, Ca, 1987); BoggsおよびWinkelstein、WHITE CELL MANUAL, edition 4 (F.A. Davis Co., Phila., 1983); Diggs, SturmおよびBeil (1985)、THE MORPHOLOGY OF HUMAN BLOOD CELLS (アポットラボラトリーズ、Abbott Park, Ill.); Freshney (1987)、CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE (Alan R. Liss, Inc., N.Y.); Maniatis, FritschおよびSambrook、MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982); DNA CLONING, VOLUMES I AND II (D.N. Glover編1985); LYMPHOKINES AND INTERFERONS: A PRACTICAL APPROACH (Clemens, MorrisおよびGearing編、1987); LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus編、1987); VIROLOGY; A PRACTICAL APPROACH (Mahy編、1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M.J. Gait編、1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B.D. HamesおよびS.J. Higgins編、1984); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984)

10

20

30

40

50

; METHODS IN ENZYMOLOGYのシリーズ (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. H. MillerおよびM. P. Calos編、1987、コールドスプリングハーバーラボラトリー); Methods in Enzymology Vol. 154およびVol. 155 (それぞれWuおよびGrossman編、およびWu編); MayerおよびWalker編、(1987); IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London)、Scopes (1987); PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Second Edition (Springer-Verlag, N. Y.); およびHANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、1986)を参照のこと。前出および後出の本願に記載の全ての特許、特許出願書および出版物を、参考文献として本願に引用する。

A. 個体からのHCV感染細胞の検出および単離

生物試料中のHCV感染細胞をHCVポリペプチドあるいはHCVポリヌクレオチドの存在についてスクリーニングした。通常この生物試料は、血液サンプルである。このサンプルから、例えば、フィコールパック (Pharmacia Corp.) 溶液による沈降法のような、当該分野で公知の方法を用いて、HCVに感染している、および/あるいはHCVを複製している細胞が単離され、そして部分精製される。

【0063】

ウイルスの物質を検出するのに用いられるスクリーニング法は、非常に限られた量を検出するのに十分な感度でなければならない。例えば、ビリオンの存在は、イムノアッセイによって、(複数あるいは単数の)ビリオンポリペプチドに対する抗体を用いて、検出され得る。適当な抗体は、1989年5月18日に出願された、米国特許出願No. 355,002 (代理人整理番号2300-0063.28)に記載されている。イムノアッセイの方法およびシグナル増強の方法は、当該分野で知られている。

【0064】

HCVゲノム物質およびその複製型中間体もまた、核酸ハイブリダイゼーションによって検出され得る。通常この系は、ハイブリダイゼーションアッセイでの増幅法を含む。このような方法は、当該分野で知られている。例えば、Enzo Biochemical Corporationのバイオブリッジ (Bio-Bridge) システムでは、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼを用いて、未修飾の3'-ポリ-dT-テールをDNAプローブに加える。このポリdTテールを加えたプローブは、標的のヌクレオチド配列にハイブリダイズし、次にピオチン修飾したポリAにハイブリダイズする。PCT出願第84/03520号およびEPA第124221号には、以下のDNAハイブリダイゼーションアッセイが記載されている。その中で、(1)分析物は、酵素ラベルしているオリゴヌクレオチドに相補的な一本鎖DNAプローブにアニールし;そして(2)得られたテールを有する二重鎖は、酵素ラベルしたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする。EPA204510号には、分析物のDNAが、ポリdTテールのようなテールを有するプローブ、ポリA配列のようにプローブのテールとハイブリダイズする配列を有するアンプリファイヤー鎖と接触する、DNAハイブリダイゼーションアッセイが記載されている。このアンプリファイヤー鎖は、複数のラベルした鎖と結合し得る。とくに望ましい方法では、まず、血清中の標的HCV配列を、その配列が検出し得るレベルになるまで増幅させる。このことは、例えば、Saikiら(1986)、Mullis、米国特許第4,683,195号、およびMullisらの米国特許第4,683,202号に記載のポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法によってなされる。次に増幅した複数の配列を、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて検出し得る。これは、1987年10月15日に提出された、同時係属中の米国特許出願第109,282号 (代理人整理番号2300-0171)、米国特許出願第185,201号 (1988年4月22日に

出願)、および米国特許出願第252,638号(1988年9月30日に出願)に記載されている。これらは本出願の譲受人に譲渡されており、本明細書に参考として援用されている。10⁶/mlのレベルで配列を検出しなければならないこれらのハイブリダイゼーションアッセイでは、一本鎖の核酸分析物、およびさらに複数のラベルした一本鎖オリゴヌクレオチドと結合する、核酸多量体を用いる。ラベルしたポリヌクレオチドプローブを用いて使用し得る、適当な液相サンドイッチアッセイ、およびプローブの調製法は、1987年6月16日に公表された、EPO225,807号に記載されている。これは、本出願の譲受人に譲渡されており、そして本明細書に参考として援用されている。

【0065】

HCVゲノムの配列を検出する好ましい方法は、実施例に記載してある。この方法は、1989年5月18日に出願の米国特許出願(代理人整理番号2300-0063.27)に記載のHCV/cPCR法に基づいている。これは本出願と同一の譲受人が、所有しており、そして本願に参考として援用されている。この方法では、HCVゲノムの一部のcDNAレプリカのファミリーに基づいたプライマーおよびプローブを用いる。このcDNAファミリー由来のcDNAのプラスストランドの構成配列を図1に示す。この方法の第一の工程は、逆転写酵素を用いて、HCVゲノムあるいはその複製型中間体に対するcDNAを合成することである。複製型中間体が発見される場合、プライマーは、HCV RNAのネガティブストランド(すなわち、複製型中間体のストランド)のみに相補的である。HCV cDNAの合成の後、増幅の前に、サンプル中のRNAは、例えば、アルカリ変性、あるいはRNA特異的RNaseなどによる、当該分野で知られている方法によって分解される。

【0066】

HCVの変異株が、様々な個体の感染細胞中に存在することが予想される。従って、検出法は、HCVのゲノムの配列のコンスタントなエピトープに向けられるものでなければならない。

【0067】

HCV/cPCR法を、フィコールパークで分離した血球画分のスクリーニングに用いて、末梢血液由来の細胞の部分的に精製された組成物中に、HCVゲノムの複製型中間体が発見された(以下の実施例を参照のこと)。この組成物はリンパ球、単球/マクロファージ、血小板および少量の他の白血球細胞型を含む。フィコールパークによる沈降法で、密度の高い赤血球および顆粒球から、この中間面に集まるこれらの細胞が分画される。

【0068】

例えば、血球の様々な型を区別するイムノアッセイなどの当該分野で公知の方法を用いて、感染細胞の型をさらに同定し得る。様々なリンパ球、および単球/マクロファージ上の表面エピトープに対するモノクローナル抗体が当該分野で知られている。従って、HCV感染細胞は、特異的細胞表面抗原に対する免疫学的結合によって、単離されそして同定され得る。

B. インビトロの感染細胞系の調製

様々な方法を用いて、HCVに感染した、インビトロの細胞(細胞株を含めた)を調製し得る。インビトロでの感染および増殖のための候補の細胞は、例えばリンパ球あるいは骨髓細胞の様な上記の任意の細胞型から得られる。HCVゲノムの複製型中間体が発見されたヒトの末梢血液の白血球中に存在するという発見により、インビトロのウイルスの複製を支持し得る細胞の型が示唆される。すなわち、フィコールパークによって沈降した白血球懸濁液の中間面に集まる、白血球群の中の少なくとも1つの細胞型、すなわち、単核球である。(一般的に、この方法で、末梢血液サンプルの正常な赤血球および顆粒球が除去される)。さらに単核球の異なる型を分離するのに分画法が用いられ、これらの細胞型に付随するHCV複製型中間体および/あるいはHCV抗原の存在を決定し得る。例えば、様々な型のリンパ球およびマクロファージなどの異なる型の単球を分離する方法が当該分野で知られている。例えば、LYMPHOCTES: A PRACTICAL APPROACH(Klaus編)を参照のこと。これらの方法では、特定の細胞型に対するモ

ノクローナル抗体が用いられ得る。モノクローナル抗体は、例えばウェル付プレート、あるいは磁気ビーズのような固体の基質に固定され得る。あるいは、セルソーター機器による、分別法が用いられ得る。選別によって、単核球の集団中の所望の細胞を積極的あるいは消極的に富化および/あるいは選択し得る。リンパ球およびマクロファージを単球の集団から単離する分画実験に基づいて、複製に好ましい細胞型は、リンパ球および/あるいはマクロファージ/単球で有り得ることが示唆される。

【0069】

HCVの複製は、インビボでは単核球中で起こることから、感染した細胞株は、これらの型の既知の確立された細胞株由来であり得ることが予想される。このうちの多くは、アメリカンタイプカルチャーコレクションから入手可能であり、その中には、例えばB細胞株 (例えば、B95-8、DAKIKI、LTR228、Mo-B、SC-1、WIL2-NSのようなEBV形質転換B細胞由来の株；Ia2、BL-3、UC729-6、Namalwa、U-937、Ramos(RA-1)、BCL₁クローン5B₁b、MC/CAR、IA2、YB2/0、CA3-F4、SHM-D33、CW13.20-3B3、BC9-E%、WM-115、WM266-4、WEHI-231、WEHI-279、NFS-1.0C-1のようなB細胞株)；単球株(例えば、THP-1、WEHI-274.1)、マウスリンパ腫株(例えば2pk-3)、プロ-Bリンパ芽球(例えば、NFS-70C-10)、プレ-Bリンパ芽球(例えばNFS-25C-3)、T細胞由来株(例えば、CTLL-2HuT102、D10.G4.1、LBRM-33クローン4A2、HuT78、Cl.Ly1⁺2⁻/9、UCD-MLA-144、6T-CEM20、6T-CEM、CCRF-CEM、H9/HTLV-IIIB、CCRF-SB；CCRF-HSB-2、CEM-CM3、Mo、MOLT-3、MOLT-4、BW5147.3、BW5147.G.1.4、C1498、RAW8.1、CTLL-2、およびBW5147.G.1.4.OUA^R.1)が含まれる。さらに関連の別のヒト白血球細胞株には、K562およびARH-77が含まれる。これらの細胞のインビトロの培養の条件は、ATCC CATALOG OF CELL LINES AND HYBRIDOMAS第6版(1988)に記載されている。

【0070】

HCVがインビトロで複製し得る別の型の細胞系は、インビボでHCVに感染した細胞型の初代培養物である。本明細書での初代培養物とは、個体の細胞あるいは組織から直接得られた細胞の培養物およびこれらの細胞の継代により得られた細胞をいい、不死化細胞のことではない。特に単核球の初代培養物を調製する方法およびそのインビトロでの生育の条件は、当該分野で知られている(例えば、LYMPHO CYTES: A PRACTICAL APPROACH(Klaus編)、特にHunt(1987)；およびFreshney(1987)を参照のこと)。一般的に、正常の成熟マクロファージは、増殖しない；しかし、マクロファージの増殖前駆細胞は当該分野で既知の方法によって培養され得る。例えばFreshney(1987)、pp.284-287を参照のこと。

【0071】

さらに別の型のHCVが複製され得る細胞系は、単核球の初代培養物由来の不死化細胞株中にある。単核球型的不死化細胞株の型を得る方法は、当該分野で知られている。例えば、培養中のB細胞、T細胞、およびマクロファージを生育させる方法および不死化させる方法が、LYMPHO CYTES: A PRACTICAL APPROACH(Klaus編)；LYMPHO KINES AND INTERFERONS(Clemens、Morris、およびGearing編)、およびFreshney(1987)に記載されている。例えば、B細胞株は、しばしばエプスタイン・バーウイルス(EBV)による感染によって不死化される。これは、感染細胞由来の単核球を、例えばATCC CRL1612細胞(B95-8)のようなEBVを常に放出するEBV感染細胞からの上清とインキュベートすることによりなされ得る。

【0072】

培養中の単核球の生育には、しばしば培養培地中に刺激タンパク因子(サイトカインとも

呼ばれる)の存在が要求される。これらの因子は通常、他の型の細胞により産生される。サイトカインの供給は、馴化培地、すなわち、所望の因子を産生する細胞からの細胞培養上清になされ得る。あるいは、支持細胞によって供給され得る。精製したサイトカインの供給によってもこの要求は満たされ得る。サイトカインには、例えば以下が含まれる。すなわち、インターロイキン1 および (リンパ球活性化因子、表皮細胞由来胸線細胞活性化因子、およびヘモポイエチンH1とも呼ばれる)である。このようなリンホカインは、単球、リンパ球、およびケラチノサイトを含む、様々な細胞から誘導される。インターロイキン1 - および は、インターロイキン2産生を刺激すること、および造血活性を含めた複数の作用を有する。インターロイキン2 (T細胞増殖因子とも呼ばれる)は、T-リンパ球から誘導され、T細胞およびB細胞の増殖および分化、マクロファージ活性化、およびナチュラルキラー細胞の活性化を刺激する。インターロイキン3 (マルチ-CSFとも呼ばれる)は、Tリンパ球から誘導され、増殖および分化に多能性の影響を有し、肥満細胞の増殖を刺激する。インターロイキン4 (B細胞増殖因子1とも呼ばれる)は、Tリンパ球から誘導され、そしてT細胞およびB細胞の増殖および分化を刺激する。インターロイキン5 (B細胞増殖因子IIとも呼ばれる)は、Tリンパ球から誘導され、好酸球分化を刺激する(そしてマウスの系では、B細胞増殖因子として作用する)。低分子量のB細胞増殖因子は、Tリンパ球から誘導され、B細胞増殖を刺激する。B細胞刺激因子2 (インターフェロン - 2とも呼ばれる)は、Tリンパ球から誘導され、B細胞分化を刺激する。インターフェロン (免疫インターフェロンとも呼ばれる)は、Tリンパ球によって産生され、マクロファージを活性化する。顆粒球コロニー刺激因子は、数多くの細胞型から誘導され、顆粒球の増殖および分化を刺激する。マクロファージコロニー刺激因子(CSF1)は、数多くの細胞型から誘導され、単球/マクロファージの増殖および分化を刺激する。顆粒球マクロファージコロニー刺激因子は、数多くの細胞型から誘導され、単球/顆粒球の増殖および分化を刺激する。

10

20

30

40

50

【0073】

感受性の細胞株のHCVによる感染は、特に、RNAウイルス、そしてより特定的にはフラビウイルスであるウイルスで細胞を感染させるのに当該分野で使用されている、数種類の方法のうちの任意の1つによってなされ得る。一般的に、ウイルス粒子は、生理的温度で培養細胞に吸着する。ウイルスは、侵入し、脱外皮し、核あるいは細胞質で核酸を複製し、そして転写および翻訳の後、子孫のビリオンを組立て、それが細胞の溶解あるいは出芽によって放出される。1つの細胞から放出される子孫ウイルス粒子の数は、バーストサイズとして表される。ウイルスの力価は、段階10倍希釈物を細胞に吸着させ、そして許容温度で適当にインキュベーションした後、生じたプラークを数えて計測する。

【0074】

感受性細胞のウイルスの感染は、感受性細胞とHCV感染細胞の同時培養によって達成され得る。HCV感染細胞は、初代培養物に由来し得る。通常HCV感染細胞および初代培養細胞のほぼ同数を、適当な細胞培養培地で一緒にインキュベートする。培地は、ポリブレン、あるいは機能的に類似の物質を適当な濃度で含み得る。インキュベーションは、HCV感染細胞由来の新しく複製されたウイルスが感受性細胞に付着し取り込まれるのに十分な時間と適切な温度でなされる。

【0075】

さらに感受性細胞の感染は、HCV感染細胞の細胞を含まない上清を含むウイルスを用いても達成され得る。一般的に感受性細胞は、適当な濃度のポリブレン(あるいは機能的に類似の物質)で前処理され、次に、感染した個体由来の初代培養HCV感染細胞の短時間培養物から回収され、濃縮された培養液に曝される。

【0076】

感受性の細胞はまた、HCV含有生物試料から単離されたウイルスで感染され得る。ウイルス、特にRNAを含むウイルス、およびより特定的にはトガウイルスおよびフラビウイルスを単離する適当な方法は、当該分野で知られている。例えば、VIRROLOGY: A PRACTICAL APPROACH (Mahy 編)を参照のこと。さらに、この

本には、感染に適切な細胞およびこれらの細胞の増殖条件が記載されている。

【0077】

インビトロでのHCV感染細胞の他の調製法は、HCV感染単核細胞と感受性細胞との融合であり得る。体細胞の融合法および融合細胞の選別法は当該分野で知られている。例えば、融合は、融合を誘導するようなウイルス（例えば、EBV、センダイウイルスなど）の存在、あるいは化学物質（例えば、ポリエチレングリコール）の存在によって媒介され得る。感受性の細胞は、選択培地での細胞の増殖を妨げるマーカーを有し得る。例えば、細胞は、チミジンキナーゼネガティブの表現型で有り得る。次にチミジンキナーゼ要求培地、例えばHAT培地中で選択される。この方法は、感染した個体から単離されるHCV感染単核細胞が、インビトロで増殖しない場合、特に適切である。HCVを複製し得る融合細胞の調製に適切な方法は、トリオーマを形成するのに用いられる組織特異的細胞（報告では肝細胞）がHCV感染単核球に置き換えられた以外は、W087/05930に記載されている。

10

【0078】

さらに他のHCV感染細胞株を調製する方法は、HCV感染個体から単離した感染細胞を不死化することによる。一般的に、単核細胞は、末梢血から単離される。もし所望ならば、単核細胞集団は、さらに分画され得る。次に細胞を初代培養で増殖させる。不死化は、細胞を細胞危機期間を通して増殖させ、継代していくことで達成し得る。この期間に培養細胞の大部分は死に、結果として残った細胞は不死化している。不死化T細胞、B細胞、およびマクロファージを産生する他の方法は、前出に記載の通りである。

20

【0079】

前出に記載のように調製したHCV感染細胞株中でのHCV複製は、様々なアッセイによって検出され得る。例えば、ウイルスアッセイは、ウイルスの細胞変性の性質あるいは形質転換の性質に依存し得る。細胞変性ウイルスは、マイクロタイタープレートでの抗代謝効果により、あるいは適当な単層感受性宿主細胞中の特徴的なプラーク形成によってアッセイされ得る。ウイルスの懸濁物は、段階希釈され、そして、単層培養プレートに加えられる。限界希釈で形成されたプラークの数が、培地上清中の感染性粒子の数と等しいと考えられ、出発のサンプル中のウイルスの濃度を計算できる。ウイルスの特徴付けは、前出に記載のように、特異的抗血清によって、ウイルスの細胞変性効果を測定して、イムノアッセイによって、あるいはHCV RNAのcPCR/HCVアッセイによってなされ得る。

30

【0080】

形質転換ウイルスは、例えば、浮遊形質転換クローンの選択的増殖、あるいは単層培養の形質転換コロニー（foci）の検索によって、アッセイされ得る。

【0081】

目的のウイルスが検出し得る細胞変性効果も形質転換効果も示さない場合、ウイルスは、感染細胞調製物あるいは感染細胞の溶解物中で多くの方法によって、検出され得る。この中には例えば、ウイルスに特異的なラベルした（複数の）抗体を用いたイムノアッセイ、抗HCV抗体を用いた、複製中にラベルしたポリペプチドのイムノアッセイ、および、富化したウイルスのポジティブストランドに相補的なネガティブストランドの集団、あるいはインビトロのウイルス合成期間中にラベルしたウイルス核酸のようなウイルス核酸の検出が含まれる。

40

C. HCV感染細胞由来の抗原を用いるイムノアッセイ

HCV抗体を含有する血清と免疫学的に反応するHCV感染細胞由来の抗原は、生物試料中のHCV抗体の存在を検知するイムノアッセイに有用である。HCV抗原は種々の形態を取り得、とりわけ、精製されたあるいは部分的に精製されたウイルス粒子もしくはウイルスポリペプチド、粉碎されたウイルスあるいは感染細胞またはこれらの細胞の溶解液の形を取り得る。組織培養物からの種々の形態のウイルス抗原が生産されることは当業者に公知である。イムノアッセイのデザインには非常に多様性があり、それらの多様性は当業者に公知である。たとえば、イムノアッセイは、同一または異なるウイルスのポリペプチ

50

ドに由来するウイルスエピトープの組合せを使用し得る。たとえば、HCVに感染した細胞からあるいは単離したHCVから、1つまたはそれ以上のウイルス抗原を使用することができる。別の方法では、ウイルスエピトープが内部であるいは外部で発現している場合は、培養液から直接固定した細胞を用い得る。あるいはまた別の方法として、細胞の溶解液を使用し得る。さらに、また、例えば粉碎したビリオン全体を使用し得る。粉碎したビリオンを調製する一般的な方法は当業者によく知られている。

【0082】

イムノアッセイプロトコールは種々替わり得る。プロトコールは、例えば、競合的な、あるいは直接的な反応またはサンドイッチタイプアッセイに基づき得る。プロトコールは、また例えば、固形の支持体を使用し得、あるいは免疫沈降でもあり得る。ほとんどのアッセイが、ラベルした抗体あるいはポリペプチドの使用を包含し得る。ラベルは、例えば蛍光、化学発光、放射能、あるいは染料分子であり得る。プローブからの信号を増幅するアッセイもまた公知である。これらの例は、ビオチンおよびアビジンを使用するアッセイ、酵素-ラベルおよび酵素が介在するイムノアッセイ、たとえばELISAアッセイである。

10

【0083】

適切なイムノアッセイでは、粉碎したビリオンをELISAの形態で用い得る。酵素に連結した免疫吸着アッセイ(ELISA)方法は、抗原あるいは抗体のいずれかに結合した酵素に依るもので、結合した酵素活性を定量的なラベルとして使用する。抗体の測定には、公知の抗原を固相(例えば、マイクロプレートあるいはプラスチックカップ)に固定し、酵素でラベルした抗-イムノグロブリンとともにインキュベートし、再び洗浄する。ラベルに適した酵素は当業者に公知であり、例えば、西洋ワサビのパーオキシダーゼが含まれる。固相に結合した酵素活性は、特異性のある基質を添加して測定し、生成物あるいは基質の使用を比色定量的に測定する。結合した酵素の活性は結合した抗体の量の直接的な関数である。

20

【0084】

抗体の測定には、既知の特異的抗体を固相に固定し、抗原を含有する試験物質を添加してインキュベートした後、固相を洗浄し、第2の酵素ラベルした抗体を加える。洗浄後、基質を添加して、酵素活性を比色定量的に算出し、抗体濃度に相関させる。

【0085】

このように例えば、ELISA方式を用いて抗-HCV抗体を検知するためには、適当なマイクロタイプレートにコートするのに、たとえば界面活性剤等で溶解した、単離したHCVを使用し得る。ウイルス抗原が結合した後、さらに別のタンパク質を、プレートをコートするために使用して抗体の非特異的な結合を防ぐ。抗HCV抗体をテストする生物学的サンプルをプレートに添加し、そしてHCV抗体-HCV抗原複合体の形成を検出する。

30

【0086】

他の適当なイムノアッセイとして、HCV溶解液のゲル電気泳動を使用し得、その後、抗HCV-抗体のテストをする生物学的サンプルでウエスタンブロットを行う。HCV抗体-HCV抗原複合体の形成を公知の技術で検出する。

40

【0087】

免疫診断用に好適で、ラベルされた適切な試薬を含有するキットは、適当な物質をパッケージして構成し、これには、HCV感染細胞由来の抗原を、その他のアッセイを実施するのに必要な試薬および物質、並びに、適切なアッセイの説明書のセットとともに適当な容器に入れたものを包含する。

D. 抗ウイルス剤のスクリーニングにおける感染可能な細胞の使用

HCVの複製が可能である、本明細書に記載する細胞は、HCVの複製を阻害する抗ウイルス剤、特に、優先的に細胞の生育および増殖をさせるがウイルスの複製を阻害する抗ウイルス剤のスクリーニングに使用し得る。使用し得るスクリーニング法は、推定上の抗ウイルス剤の存在下、ウイルス複製の阻害を試験する方法である。一般的に、抗ウイルス剤

50

は、種々の濃度で、ウイルスの複製を助ける細胞培養系におけるウイルス複製の阻害効果をテストし、次に、動物モデル系における感染阻害あるいはウイルスの病原性（および低レベルの毒性）阻害の試験をテストする。

【0088】

抗ウイルス剤には、ウイルス感染をブロックする抗体（中和抗体）が含まれる。抗-HCV抗体が、インビトロで、細胞への感染を妨げる能力は、推定上の抗-HCV抗体の存在下、ウイルス複製が阻害されるか否かを決定する、本明細書に記載されたアッセイを用いて、決定され得る。さらに例えば、感染細胞で産生されるウイルスが、抗原源として用いられ得、抗体がHCVに特異的か否かが決定される。

【0089】

【実施例】

A. NANBHを有する個体からの単核球におけるHCV RNAの検出

慢性NANBHを有する個体の血液の単核球におけるHCV RNAの検出は、実質的には、米国特許出願番号07/355,961に記載のcPCR/HCVアッセイを用いて行った。

【0090】

慢性NANBHを有する5つの個体から得られ、HCV-C100抗原イムノアッセイで抗-HCV抗体陽性である血液、および5つのコントロール個体（NANBHがないと報告され、イムノアッセイ陰性）の血液について、単核球画分中のHCV RNAの存在を調べた。サンプルからの単核球画分は、製造者の説明書に従って、フィコールパック（Pharmacia）による沈降で得た。

【0091】

これらの研究に使用されたcPCR/HCVアッセイは、以下の方法を用いて行われる。すなわち、RNAの調製、RNAのcDNAへの逆転写、cDNAの特定のセグメントのPCRによる増幅、およびPCR生産物の分析である。

【0092】

全RNA画分は、単核球画分から単離した。PCR反応の鋳型として用いるcDNAは、対応するcDNAの調製用と指定されたサンプルを用いて調製した。それぞれのRNAサンプル（血液10 μ l中の細胞に相当する）を25 μ lの反応液中でインキュベートした。反応液は、それぞれのプライマー1 μ M、それぞれのデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）1mM、50mM トリス塩酸、pH8.3、5mM MgCl₂、5mM ジチオスレイトール（DTT）、73mM KCl、RNase阻害剤40ユニット（RNAsin）、およびAMV逆転写酵素5ユニットを含有する。インキュベートは、37 $^{\circ}$ C、60分間行った。cDNA合成後、反応液を脱イオン水（DIW）50 μ lで希釈し、10分間煮沸して、氷冷した。

【0093】

HCV cDNAのセグメントの増幅は、2つの16-merの合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて行った。これらの配列はHCV cDNAクローン36（アンチセンス）および37b（センス）由来のものである。クローン36からのプライマーの配列は；

5' GCA TGT CAT GAT GTA T 3' であつた。クローン37bからのプライマーの配列は；

5' ACA ATA CGT GTG TCA C 3' であつた。プライマーは、それぞれ最終濃度1 μ Mを使用した。プライマーによっては含まれたHCV cDNAのセグメントを増幅するために、製造者の説明書に従って、cDNAサンプルを0.1 μ gのRNase Aおよび、Perkin Elmer Cetus PCR kit（N801-0043あるいはN801-0055）のPCR反応液とインキュベートした。PCR反応は、Perkin Elmer Cetus DNA thermal cyclerを用いて、30サイクルもしくは60サイクルを行った。それぞれのサイクルは、94 $^{\circ}$ C、1分の変性ステップ、37 $^{\circ}$ C、2分のアニーリングステップ、および72 $^{\circ}$ C、

10

20

30

40

50

3分の伸長ステップからなる。しかし、最終サイクル(30あるいは60)の伸長ステップは、3分ではなく7分行った。増幅後、サンプルを等量のフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、ついで、等量のクロロホルムで抽出した後、サンプルを0.2M酢酸ナトリウムを含有するエタノールで沈澱させた。

【0094】

cPCR生成物は、以下のように分析した:生成物をMurakawaら(1988)の方法にしたがって、1.8%アルカリ性アガロースゲル電気泳動にかけ、0.4M NaOH中、ゼータプローブペーパー(BioRad Corp.)上にゲルを一晩プロットさせて、移した。プロットは、2xSSC(1xSSCは0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウムを含む)で中和し、0.3M NaCl、15mM リン酸ナトリウムバッファー、pH 6.8、15mM EDTA、1.0% SDS、0.5%脱脂乳(Carnation Co.)および0.5mg/mlの超音波処理した変性サケ精子DNA中で、プレハイブリダイズした。HCV cDNAフラグメントについて分析されるプロットを、³²P-ラベルされたプローブとハイブリダイズさせた。このプローブは、図2に示されるクローン35中のHCV cDNA挿入配列をニックトランスレーションして作成した。ハイブリダイズした後、プロットを0.1xSSC(1xSSCは0.15M NaCl, 0.01M クエン酸ナトリウムを含む)で、65℃で洗浄し、乾燥後、オートラジオグラフィーにかけた。予想した生成物のサイズは、586ヌクレオチドの長さであり、プローブとハイブリダイズし、ゲル中でこのサイズ範囲に移動した生成物は、ウイルスRNA陽性として記録した。

10

20

【0095】

コントロールとして、1-アンチトリプシンmRNAを増幅するようにデザインされたcPCRプライマーを、解析したそれぞれのサンプル中にRNAが存在することの証明のために使用した。1-アンチトリプシン遺伝子のコード領域は、Rosenbergら(1984)に記載されている。1-アンチトリプシン遺伝子のコード領域の365ヌクレオチドフラグメントを増幅するようにデザインした16-merの合成オリゴヌクレオチドプライマーは、ヌクレオチド22-37(センス)およびヌクレオチド372-387(アンチセンス)由来のものである。PCR生成物は³²P-ニックトランスレートしたプローブで検出した。このプローブは、cDNA/PCRプライマー配列の間において、この配列を含むものではない。

30

【0096】

PCR反応が非常に鋭敏であることから、すべてのサンプルは最低3回実験した。以下の事前の注意を払うとすべての偽陽性のシグナルは除かれた。1)ゴムのO-リングシールのついたスクリーキャップを用いてエアロゾル(aerosols)を除くこと;2)使い捨てのピストン/キャピラリーを備えたRanin Microman positive displacement pipettorsを用いて、ピペッティングすること;3)cDNAおよびPCRプライマーに対するオリゴヌクレオチド配列を2つの隣接しないcDNAクローンから選択すること。

【0097】

その結果は、5つのHCV抗-C100抗体陽性サンプルのうちの5つから得た単核球が、cPCR/HCVアッセイにおいてHCV RNAに対して陽性であったことを示した。すべてのコントロールは、同じアッセイで陰性であった。B.HCV感染個体からの単核細胞におけるHCV RNAマイナスストランドの検出
末梢血単核球のマイナスストランドの検出は、実質的にセクションIII.A.に記載したcPCR/HCVアッセイを使用して行われたが、cDNAの合成に、セクションIII.A.に記載したHCV RNAのプラスストランドを開始するためのクローン36からの16-merプライマー(即ち、プライマー36/16A)、あるいはネガティブストランドを開始するための、その16-merの相補体(即ち、プライマー36/16B)を使用した点で異なる。連続的なPCR反応と行うために、cDNA反応混合物を煮沸し、第2のプライマー添加前にRNaseで処理した。

40

50

【0098】

cPCR/HCVアッセイの結果、5つのHCV抗-C100抗体サンプルはHCVのネガティブストランドRNAに対して陽性であったことを示した；これら5つのサンプルのうち、2つはHCV RNAネガティブストランドが高レベルであることを示した。5つのこれらのサンプルすべてがHCV RNAのプラスストランドに対して、ほぼ同等に陽性であった。5つのコントロールサンプルはすべて、HCV RNAのプラスおよびマイナスストランドの両方に陰性であった。

【0099】

追加のコントロールとしての3つのHCV陽性個体からの血漿サンプルを分析した。ポジティブストランドから得られたシグナルは、ネガティブストランドから得られたシグナルの少なくとも5から10倍強かった。このように、血漿サンプルはプラスストランドに対しては強い陽性を示したのに対し、マイナスストランドに対しては、ほんの弱い陽性か、あるいは陰性を示した。

10

【0100】

フラビ様のHCVにおいては、ウイルスゲノムはポジティブストランドRNAである。単球におけるHCV RNAのネガティブストランドが血漿中におけるそれよりもはるかに多いという発見は、ウイルスゲノムの複製型中間体が、これらの細胞中に存在することを示唆する。

商業的有用性

HCV感染細胞株を含む、インビトロで感染および/または複製するHCVに感染した細胞系は、HCV抗体の検出に有用であり、従って、HCVの診断およびHCVに対する生物学的物質（血液を含む）のスクリーニングに有用なウイルス抗原の供給源となる。これらの抗原はウイルス感染処置（予防および/または治療）用のワクチンの調製にも使用され得る。さらに、これらの細胞系は、感染を中和することができる、あるいは抗体依存性細胞障害性（ADCC）を仲介する抗体を包含する、HCVの複製を阻止するための抗ウイルス剤のスクリーニングに有用である。

20

【0101】

本発明を、上記のように例示して説明したが、本発明はそれらに限定されるものではなく、本発明の範囲は添付した請求の範囲およびその同等範囲で決定されるべきである。上記した文献は、参考文献として本発明に引用する。

30

【0102】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHIRON CORPORATION

<120> METHODS FOR CULTURING HCV IN EUKARYOTIC CELLS

<130> 223002008846

10

<140> PCT/US90/04766

<141> 1990-08-22

<150> US 07/398,667

<151> 1989-08-25

20

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

30

<213> Homo sapiens

<400> 1

gcatgtcatg atgtat

16

<210> 2

<211> 16

40

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

acaatacgtg tgtcac 16

<210> 3

<211> 9185

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

| | | |
|--|------|----|
| cactccacca tgaatcactc cctgtgagg aactactgtc ttcacgcaga aagcgtctag | 60 | |
| ccaigggcgt agtaigagt tctgtcagcc tccaggacce cccctcccgg gagagccata | 120 | |
| gtggctctcg gaaccgggtg gtacaccgga attgccagga cgaccgggtc ctttcttggg | 180 | 10 |
| icaaccgcct caatgcctgg agattgggc gtgccccgc aagactgcta gccgagtgt | 240 | |
| gttgggtcgc gaaaggcctt gtggtactgc ctgatagggt gcttgcgagt gccccgggag | 300 | |
| gtctcgtaga ccgtgcacca tgagcacgaa tcctaaacct caaaaaaaaa acaaacgtaa | 360 | |
| caccaaccgt cgtccacagg acgtcaagtt cccgggtggc ggtcagatcg ttgggtggagt | 420 | |
| ttactigtig ccgctcaggg gccctagatt ggggtgtcgc gctcagagaa agacttccga | 480 | |
| gcggctcgtc cctcagagta gacgtcagcc tatccccaa gctcgtcggc ccgagggcag | 540 | |
| gacctgggct cagcccgggt acccttggcc cctctatggc aatgagggct gcgggtgggc | 600 | 30 |
| gggatggctc ctgtctccc gtggctctcg gcctagctgg ggccccacag acccccggcg | 660 | |
| taggtcgcgc aatttgggta aggtcatcga tacccttac tgcggcttcg ccgacctcat | 720 | |
| gggtacata ccgtctctcg gcgccccct tggaggcgt gccagggccc tggcgcattg | 780 | |
| cgtccgggtt ctggaagac gcgtgaacta tgcaacaggg aaccttctg gttgctcttt | 840 | |
| ctctatctt cttctggccc tctctcttg cttagctgt cccgcttcgg cctaccaagt | 900 | |
| gcgcaactcc acggggcttt accacgtcac caatgattgc cctaactcga gtattgtgta | 960 | |
| cgaggcggcc gatgccatcc tgcacactcc ggggtgcgtc ccttgcgtc gtgagggcaa | 1020 | 40 |
| cgctcagagg tgttgggtgg cgatgacccc tacggtggcc accagggatg gcaaactccc | 1080 | |

cgcgacgcag cticgacgtc acatcgatct gcttgtcggg agcgcacacc tctgttcggc 1140
 cctctacgtg ggggacctat gcgggtctgt ctttcttgtc ggccaactgt tcaccttctc 1200
 tcccaggcgc cacitggacga cgcaagggtg caatigtctt atctatcccg gccatataac 1260
 gggtcaccgc atggcatggg atatgatgat gaactggtec cctacgacgg cgttggtaat 1320
 ggctcagctg ctccggatcc cacaagccat ctiggacatg atcgcitggg ctcactgggg 1380
 agtccitggcg ggcatagcgt atttctccat ggtggggaac tgggcgaagg tccitggtagt 1440
 gctgctgcta ttigccggcg tcgacgcgga aaccacgtc accgggggaa gtgccggcca 1500
 cactgtgtct ggatttgta gctctctcgc accaggcgc aagcagaacg tccagctgat 1560
 caacaccaac ggcatgtggc acctcaatag cacggccctg aactgcaatg atagcctcaa 1620
 caccggctgg ttggcagggc tttctatca ccacaagtc aactcttcag gctgtcctga 1680
 gaggctagcc agctgccgac ccttaccga tttgaccag ggcitggggc ctatcagtta 1740
 tgccaacgga agcggccccg accagcgcgc ctactgtctg cactacccc caaaacctg 1800
 cggtatigtg cccgcgaaga gtgtgtgtgg tccggtatat tgcctcactc ccagccccgt 1860
 ggtggitggga acgaccgaca ggtcgggcgc gccacctac agctgggggtg aaaatgatac 1920
 ggacgtctc gtcttaaca ataccaggc accgctgggc aattgggtcg gttgtacctg 1980
 gatgaactca actggattca ccaaagtgtg cggagcgcct ccttgtgtca tcggaggggc 2040
 gggcaacaac acctgcact gcccactga ttgcctccgc aagcatccgg acgccacata 2100
 ctctcggctg ggctccggtc cctggatcac acccaggtgc ctggctgact acccgtatag 2160
 gcttggcat tatcttgta ccatcaacta caccatattt aaaatcagga tgtacgtggg 2220
 agggctcga cacaggctgg aagctgctg caactggacg cggggcgaac gttgcgatct 2280
 ggaagacagg gacaggctcg agctcagccc gtactgtctg accactacac agtggcaggt 2340
 cctcccgtgt tcttcacaa cctaccagc ctigtccacc ggctctatcc acctccacca 2400
 gaacattgtg gacgtgcagt actgtacgg ggtggggtca agcatcgcgt cctgggcat 2460
 taagtggag tacgtcttc tctgttctt tctgcttga gacgcgcgcg tctgtctctg 2520
 ctigtggatg atgtactca tatccaagc ggaggcggct itggagaacc tcgtaatact 2580
 taatgcagca tcccggccg ggacgcacgg tcttgtatcc ttctctgtgt tcttctgctt 2640
 tgcattggtat ttgaagggtg agtgggtgcc cggagcggtc tacacctct acgggatgtg 2700
 gcctctctc ctgctctgt tggcgttgcc ccagcgggcg tacgcctgg acacggaggt 2760
 ggccgcgtcg tgtggcggtg ttgttctgt cgggttgatg gcctgactc tgtcaccata 2820

10

20

30

40

ttacaagcgc tataacagct ggtgcttgtg gtggcttcag tattttctga ccagagtggg 2880
 agcgcgaactg cacgtgtgga ttececect caacgtccga ggggggcgcg acgccgtcat 2940
 ctactcaig tigtctgtac acccgactct ggtatttgac atcaccaaat tgcigtggc 3000
 cgtcttcgga cccctttgga ttcttcaagc cagtittgctt aaagtaccct actttgtgcg 3060
 cgtccaaggc ctctccggt tctgcgcgtt agcgcggaag atgacggag gccattacgt 3120
 gcaaatggtc atcattaagt tagggcgcct tactggcacc tatgtttata accatctcac 3180
 tctcttcgg gactgggcgc acaacggctt gcgagatctg gccgtggctg tagagccagt 3240
 cgtctctcc caaatggaga ccaagctcat cacgtggggg gcagataccg ccgcgtgceg 3300
 igacatcatc aacggcttgc ctgttccgc ccgcaggggc cgggagatac tgcctgggcc 3360
 agccgatgga atggctccca aggggtggag gtigtctggcg cccatcacgg cgtacgcccc 3420
 gcagacaagg ggctcctag ggtgcataat caccagccta actggccggg acaaaaacca 3480
 agtggagggt gaggctcaga ttgtgtcaac tgcctccca accctccctgg caacgtgcat 3540
 caatggggig tgcctggactg tctaccacgg ggccggaacg aggaccatcg cgtcacccaa 3600
 ggtctctgtc atccagatgt ataccaatgt agaccaagac ctigtgggct ggcccctcc 3660
 gcaaggtagc cgtcatgta cacctgcac ttgcggctcc tggaccitt accigtctac 3720
 gaggcacgcc gatgtcattc ccgtgcgccg gcggggtgat agcaggggca gccctgctgtc 3780
 gccccggccc atttctact taaaaggctc ctccgggggt ccgctgttgt gccccgcccc 3840
 gcacgccgtg ggcatattta gggccgcggt gtgcaccctg ggagtggcta aggcgggtgga 3900
 cttatccct gttgagaacc tagagacaac catgaggctc ccggtgttca cggataactc 3960
 ctctccacca gtagtgcccc agagcttcca ggtggctcac ctccatgctc ccacaggcag 4020
 cggcaaaagc accaaggctc cggctgcata tgcagctcag ggctataagg tctagtact 4080
 caacccctct gttgctgcaa cactgggctt tggctcttac atgtccaagg ctcatgggat 4140
 cgatcctaac atcaggaccg gggtgagaac aattaccact ggcagcccc aacgtactc 4200
 cacctacggc aagtctcttg ccgacggcgg gtgctcgggg ggcgcttatg acataataat 4260
 ttgtgacgag tgcactcca cggatgccac atccatctg ggcatcggca ctgtcttga 4320
 ccaagcagag actgcggggg cgagactggt tgtgctcgc accgccacc ctccgggctc 4380
 cgtcactgtg ccccatccca acatcgagga ggttgcctctg tccaccacc gagagatccc 4440
 tttttacggc aaggctatcc cctcgaagt aatcaagggg gggagacatc tcatctctg 4500
 tcattcaaag aagaagtgcg acgaactcgc cgcaaagctg gtcgcatigg gcatcaatgc 4560

10

20

30

40

cgiggcciac taccgcggtc ttgacgtgtc cgtcatccc accagcggcg atgttgtcgt 4620
 cgiggcaacc gatgcectea tgaccggeta taccggcgac ttcgactcgg tgatagactg 4680
 caatacgigt gtcaccaga cagtcgatt cagccttgac cctacctica ccattgagac 4740
 aatcacgctc ccccaggatg ctgtctccc cactcaacgt cggggcagga ctggcagggg 4800
 gaagccaggc atctacagat ttgtggcacc gggggagcgc cctccggca tgttcgactc 4860
 gtccgtctc ttgtagtgt atgacgcagg ctgtgcttgg tatgagctca cgcccgcga 4920
 gactacagtt aggctacgag cgtacaigaa cccccgggg ctcccgtgt gccaggacca 4980
 tcttgaattt tgggagggcg tctttacagg cctcactcat atagatgccc actttctatc 5040
 ccagacaaag cagagtgggg agaaccitcc ttacctggtg gcgtaccaag ccaccgtgtg 5100
 cgctagggct caagccctc ccccatcgtg ggaccagatg tggagtggtt tgattcgctt 5160
 caagcccacc ctccatgggc caacaccct gctatacaga ctgggcgctg ttcagaatga 5220
 aatcaccctg acgcaccag tcaccaata catcatgaca tgcattgtcgg ccgacctgga 5280
 ggctgtcac agcaccitgg ttctcgttgg cggcgtctg gctgcttgg ccgctattg 5340
 cctgtcaaca ggctgtcgtg tcatagtggg cagggctcgtc ttgtccggga agccggcaat 5400
 catacctgac agggaggtc tctaccgaga gttcgatgag atggaagagt gctctcagca 5460
 cttaccgtac atcgagcaag ggatgatgt ctccgagcag ttcaagcaga aggccctcgg 5520
 cctccctgag accgcgtccc gtcaggcaga ggttatcgc cctgctgtcc agaccaactg 5580
 gcaaaaactc gagaccitct gggcgaagca tatgtggaac ttcatcagtg ggatacaata 5640
 ctiggcgggc ttgtcaacgc tgccgtgtaa ccccgccatt gcttcattga tggcttttac 5700
 agctgtctc accagcccac taaccactag ccaaacctc ctcttcaaca tattgggggg 5760
 ggggtggct gccagctcg ccgccccgg tgcgctact gcctttgtgg gcgctggctt 5820
 agctggcgc gccatcggca gtgttggact ggggaaggct ctcatagaca tccittgcagg 5880
 gtatggcgc ggctggcgg gagctctgt ggcaittcaag atcatgagcg gtgaggtccc 5940
 ctccacggag gacctggtea atctactgcc cgcatectc tcgcccggag cctctgtagt 6000
 cggcgtggc ttgtcagcaa tactgcgcc gcacgttggc ccgggcgagg gggcagtga 6060
 gtggatgaac cggctgatag ccttcgctc ccgggggaac catgtttccc ccacgcacta 6120
 cgtcccggag agcgatgcag ctgcccggt cactgccata ctcagcagcc tcactgtaac 6180
 ccagctctg aggcgactgc accagtggat aagctcggag tgtaccactc catgctccgg 6240
 ttctggcta agggacatct gggactggat atgcgaggtg ttgagcact ttaagacctg 6300

10

20

30

40

| | | |
|--|------|----|
| gctaaaagct aagctcatgc cacagctgcc tgggatcccc tttgtgtcct gccagcgcgg | 6360 | |
| gtataagggg gtcitggcgag tggacggcat catgcacact cgctgccact gtggagctga | 6420 | |
| gatcactgga caigtcaaaa acgggacgat gaggatcgtc ggtcctagga cctgcaggaa | 6480 | |
| catgtggagt gggaccttcc ccattaatgc ctacaccacg ggccccctgta ccccccttcc | 6540 | |
| tgccccaac tacacgttcg cgctatggag ggtgtctgca gaggaatatg tggagataag | 6600 | |
| gcaggtaggg gacttccact acgtgacggg tatgactact gacaatctca aatgcccgig | 6660 | |
| ccaggiccca tcgcccgaat ttttcacaga attggacggg gtgcgcctac ataggtttgc | 6720 | 10 |
| gccccctgc aagccccctgc tgcgggagga ggtatcattc agagtaggac tccacgaata | 6780 | |
| cccggtaggg tcgcaattac ctitgcgagcc cgaaccggac gtggccgigt tgacgtccat | 6840 | |
| gctcactgat ccttcccata taacagcaga ggcggccggg cgaaggttgg cgaggggac | 6900 | |
| acccccctc tgggccagct cctcggctag ccagctatcc gctccatctc tcaaggcaac | 6960 | |
| ttgcaccgt aacctgact cccctgatgc tgagctcata gaggccaacc tccatggag | 7020 | |
| gcaggagatg ggcggcaaca tcaccagggt tgagtcagaa aacaaagttg tgattctgga | 7080 | |
| ctccttcgat ccgcttgtgg cggaggagga cgagcgggag atctccgtac ccgcagaaat | 7140 | 20 |
| ccigccgaag tctcggagat tcgcccaggc cctgccggti tgggcgcggc cggactataa | 7200 | |
| ccccccgcta gtggagacgt ggaaaaagcc cgactacgaa ccacctgtgg tccatggctg | 7260 | |
| tcgcttcca cctccaaagt cccctcctgt gcttccgctt cggagaagc ggacggttgt | 7320 | |
| cctcactgaa tcaacctat ctactgcctt ggccgagctc gccaccagaa gctttggcag | 7380 | |
| ctctcaact tccggcatta cgggcgacaa tacgacaaca tctctgagc ccgccccctc | 7440 | |
| tggctgcccc cccgactccg acgtgagtc ctattctctc atgccccccc tggaggggga | 7500 | |
| gccitgggat ccgcatctta gcgacgggtc atggtaacg gtcagtatg aggccaacgc | 7560 | 30 |
| ggaggatgtc gtgtgtctgt caatgtctta ctcttggaca ggcgcactcg tcacccccgtg | 7620 | |
| cgcccgga gaacagaaac tgcccatcaa tgcactaagc aactcgttgc tacgtacca | 7680 | |
| caatttggtg tattccacca cctcacgcag tgccttgc aaaggcagaaga aagtcacatt | 7740 | |
| tgacagactg caagttctgg acagccatta ccaggacgta ctcaaggagg ttaaagcagc | 7800 | |
| ggcgtcaaaa gtgaaggcta acttgcctatc cgtagaggaa gcttgcagcc tgacgcccc | 7860 | |
| acactcagcc aaatccaagt ttggttatgg ggcaaaagac gtccgttgc atgccagaaa | 7920 | |
| ggccgtaacc cacatcaact ccgtgtggaa agacctctg gaagacaatg taacaccaat | 7980 | 40 |
| agacactacc atcatggcta agaacgaggt tttctgcgtt cagcctgaga aggggggtcg | 8040 | |

taagccagct cgctcatcg tgtccccga tctgggcgtg cgcgtgtgcg aaaagatggc 8100
 ttgtacgac gtggttacaa agctccccct ggccgtgatg ggaagctcct acggattcca 8160
 atactacca ggacagcggg ttgaattcct cgtgcaagcg tggaaagtcca agaaaacccc 8220
 aatgggggtc tcgtatgata cccgctgctt tgactccaca gtcactgaga gcgacatccg 8280
 tacggaggag gcaatctacc aatgttgtga cctcgacccc caagcccgcg tggccatcaa 8340
 gtccctcacc gagagcttt atgttggggg cctcttacc aattcaaggg gggagaactg 8400
 cggctatcg caggigccgcg cgagcggcgt actgacaact agctgtggta acaccctcac 8460
 ttgctacatc aaggccccggg cagcctgtcg agccgcaggg ctccaggact gcaccatgct 8520
 cgigigiggg gacgacttag tcgttatctg tgaagcgcg ggggtccagg aggacgcggc 8580
 gagcctgaga gccctcacgg aggctatgac caggtactcc gccccccctg gggaccccc 8640
 acaaccagaa tacgacttgg agctcatac atcatgctc tccaacgigt cagtcgccc 8700
 cgacggcgt ggaaagaggg tctactacct caccctgac ctacaaccc cctcgcgag 8760
 agctgcgigg gagacagcaa gacacactc agtcaattc tggctaggca acataatcat 8820
 gtttcccc acactgtggg cgaggatgat actgatgacc cattcttta gcgtccttat 8880
 agccaggac cagctigaac aggccctcga ttgcgagatc tacggggcct gctactccat 8940
 agaaccactt gatctacct caatcattca aagactccat ggcctcagcg cattttcact 9000
 ccacagttac tctccaggtg aaattaatag ggtggccgca tgcctcagaa aacttggggt 9060
 accgcccctg cgagcttggg gacaccgggc ccggagcgtc cgcgctaggc ttctggccag 9120
 aggaggcagg gctgccatat gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa gaacaaagct 9180
 caaac 9185

10

20

30

<210> 4

<211> 160

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Ile Glu Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln

1

5

10

15

40

Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val
 20 25 30
 Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys
 35 40 45
 Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu
 50 55 60
 Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val
 65 70 75 80
 Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr
 85 90 95
 His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn
 100 105 110
 Leu Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Tyr Val Cys Ala Arg Ala Gln
 115 120 125
 Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu
 130 135 140
 Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala
 145 150 155 160

10

20

<210> 5

<211> 480

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tccattgaga caatcacgct cccccaggat gctgtctccc gcactcaacg tcggggcagg 60
 actggcaggg ggaagccagg catctacaga ttgtggcac cgggggagcg cccctccggc 120
 atgttcgact cgtcctcct ctgtgagtgc tatgacgcag gctgtgcttg gtatgagctc 180
 acgcccggc agactacagt taggctacga gcgtacatga acacccggg gcttcccgtg 240

30

40

igccaggacc atcttgaatt ttgggagggc gtccttacag gcctcactca tatagatgcc 300
 cactttctat cccagacaaa gcagagtggg gagaaccttc cttacctggt agcgtaccaa 360
 gccaccgigt gcgctagggc tcaagcccct ccccatcgt gggaccagat gtggaagtgt 420
 ttgattcgcc tcaagcccac cctccatggg ccaacacccc tgctatacag actgggcgct 480

<210> 6

<211> 480

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 6

aggtaactct gttagtgcga ggggtccta cgacagaggg cgtgagtgc agccccgtcc 60
 igaccgtccc ccttcggtec gtagatgtct aaacaccgtg gccccctcgc ggggaggccg 120
 tacaagctga gcaggcagga gacactcag atactgcgtc cgacacgaac catactcgag 180
 igcggcggc tctgatgtea atccgatgtc cgcaigtact igtggggccc cgaagggcac 240
 acggtcctgg tagaacttaa aacctcccg cagaaatgtc cggagtgagt atatctacgg 300
 gtgaaagata gggctctgtt cgtctcacc cctctggaag gaatggacca tcgcatggtt 360
 cggtaggcaca cgcgatccc agttcgggga ggggtagca ccctgggteta caccttcaca 420
 aactaagcgg agttcgggtg ggaggtacc ggttgtgggg acgataatgtc tgaccgcga 480

20

【図面の簡単な説明】

【図1】HCVのHCV1株に由来するHCV cDNAセンスストランドを構成する配列を示す。

【図2】HCV cDNAクローン35のヌクレオチド配列、およびそこにコードされるアミノ酸を示す。

30

フロントページの続き

(72)発明者 キャサリン エス. シュタイマー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94510 ベニシア, ウエスト “アイ” ストリート
649

(72)発明者 マイケル ホートン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94526, ダンビル, ローズメッド コート 53

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA33 CA04 HA14

4B065 AA90X AA96Y AB01 BA02 CA44 CA45 CA46

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 真核细胞中hcv的培养方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004049235A | 公开(公告)日 | 2004-02-19 |
| 申请号 | JP2003180211 | 申请日 | 2003-06-24 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 希龙公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Chiron公司 | | |
| [标]发明人 | エイミー・ジェイ・ワイナー キャサリン・エス・シュタイマー マイケル・ホートン | | |
| 发明人 | エイミー・ジェイ・ワイナー キャサリン・エス・シュタイマー マイケル・ホートン | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 A61K39/00 C07K14/18 C12N5/10 C12N7/00 C12Q1/18 C12Q1/70 C12R1/93 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/576 | | |
| CPC分类号 | C07K14/005 A61K39/00 C12N7/00 C12N2770/24221 C12N2770/24222 | | |
| FI分类号 | C12N5/00.ZNA.B C12N15/00.A C12N5/00.BZN.A C12N5/00.102 C12N5/10 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA33 4B024/CA04 4B024/HA14 4B065/AA90X 4B065/AA96Y 4B065 /AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 | | |
| 代理人(译) | 夏木森下 | | |
| 优先权 | 07/398667 1989-08-25 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

解决的问题：提供一种可用于开发有效预防NANBH传播的疫苗和免疫治疗剂的筛选系统，并提供一种感染引起NANBH的病原体的培养细胞。提供用于在培养物中培养HCV的细胞，以及由这种培养物产生的病毒抗原，以及此类抗原的用途，例如诊断剂。被HCV感染的细胞系。一种用于检测抗HCV抗体的组合物，所述抗HCV抗体包含来自被HCV感染的体外细胞的抗原。[选择图]无

| 分類 | 名称 | 種別 | 備考 |
|----|--------|-----|---------------|
| 01 | 真核細胞系 | 細胞系 | 肝臓癌細胞系 HCC-T2 |
| 02 | 肝臓癌細胞系 | 細胞系 | HCC-T2 |
| 03 | 免疫系細胞 | 細胞系 | 免疫系細胞系 |
| 04 | 免疫系細胞 | 細胞系 | 免疫系細胞系 |
| 05 | 免疫系細胞 | 細胞系 | 免疫系細胞系 |
| 06 | 免疫系細胞 | 細胞系 | 免疫系細胞系 |
| 07 | 免疫系細胞 | 細胞系 | 免疫系細胞系 |
| 08 | 免疫系細胞 | 細胞系 | 免疫系細胞系 |