(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5911861号
(P5911861)

(45)発行日　平成28年4月27日(2016.4.27)　(24)登録日　平成28年4月8日(2016.4.8)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	S
G01N 33/531	(2006.01)	G01N	33/531	B
G01N 33/569	(2006.01)	G01N	33/569	G
G01N 1/04	(2006.01)	G01N	1/04	G
C12Q 1/24	(2006.01)	G01N	1/04	H

請求項の数 24　(全 17 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-520836(P2013-520836)
(86)(22)出願日　平成23年7月20日(2011.7.20)
(65)公表番号　特表2013-533487(P2013-533487A)
(43)公表日　平成25年8月22日(2013.8.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/044674
(87)国際公開番号　WO2012/012527
(87)国際公開日　平成24年1月26日(2012.1.26)
審査請求日　平成26年7月14日(2014.7.14)
(31)優先権主張番号　61/366,076
(32)優先日　平成22年7月20日(2010.7.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　595117091
ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
BECTON, DICKINSON AND COMPANY
アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 07417－1880 フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY 07417－1880, UNITED STATES OF AMERICA
(74)代理人　110001243
特許業務法人 谷・阿部特許事務所
最終頁に続く

(54)【発明の名称】医療現場における迅速検査結果を試験所ベースの方法と関連づける方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
医療現場（ＰＯＣ）検査および試験所検査の両方のために、試料の原料として医療現場（ＰＯＣ）で収集される単一の試料を使用するための方法であって、
（ａ）　前記ＰＯＣ検査のために、目的微生物が含有されることが疑われる試料を収集する工程と、
（ｂ）　収集した試料を、ＰＯＣ検査での使用のために設計されたＰＯＣ検査の処理試薬と組み合わせることによって、前記ＰＯＣ検査のための前記試料を処理する工程と、
（ｃ）　処理された試料の第１の部分のみを、前記ＰＯＣ検査に用い、残部を残す工程と、
（ｄ）　処理された試料の残部の少なくとも一部を、試験所検査に用いる工程と
を含むことを特徴とする方法。
【請求項２】
前記試料を収集するために器具を用い、前記器具は、スクレーパーおよびスワブからなる群から選択されることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ＰＯＣ検査の場所が医師の診療室であることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記ＰＯＣ検査が免疫検定であることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項５】

前記ＰＯＣ検査の処理試薬は、緩和な溶解試薬であることを特徴とする請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記ＰＯＣ検査の処理試薬は、少なくとも１種の塩、少なくとも１種の緩衝剤、および少なくとも１種の洗剤を含むことを特徴とする請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記ＰＯＣ検査における使用のために前記処理された試料の一部を取り出した後に、移送容器の中で、前記処理された試料の残部の少なくとも一部を、試験所検査への移送中の試料安定化のための安定化移送希釈剤と組み合わせることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記安定化移送希釈剤は、処理された試料中の核酸を安定化し、および少なくとも１種の緩衝剤および少なくとも１種の塩を含むことを特徴とする請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記ＰＯＣ検査における使用のために前記処理された試料の一部を取り出した後に、移送容器の中で、前記処理された試料の残部の少なくとも一部を、試験所検査への移送中の試料安定化のための安定化移送希釈剤と組み合わせないことを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記試験所検査は核酸検定に基づく亜型の特定であることを特徴とする請求項８に記載の方法。
【請求項１１】
前記試験所検査はリフレックス検査であることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記試験所検査は核酸検定であることを特徴とする請求項８に記載の方法。
【請求項１３】
前記核酸検定はＰＣＲであることを特徴とする請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記安定化移送希釈剤は、前記処理された試料の残部の少なくとも一部を収容する容器に添加されることを特徴とする請求項７に記載の方法。
【請求項１５】
前記処理された試料の残部の少なくとも一部は、前記安定化移送希釈剤を収容する容器に添加されることを特徴とする請求項７に記載の方法。
【請求項１６】
目的微生物を含有することが疑われる前記試料は、生物学的試料および環境的試料からなる群から選択されることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
医療現場（ＰＯＣ）検査の免疫検定およびＰＯＣにおいて実施されない試験所検査の両方のために、ＰＯＣにおいて最初に収集される目的微生物が含有されることが疑われる単一の試料を使用するための方法であって、
（ａ）　ＰＯＣ検査のための試料を収集する工程と、
（ｂ）　収集した試料を、緩衝剤、塩および洗剤を含むＰＯＣ検査の処理試薬と組み合わせることによって、前記ＰＯＣ検査のための前記試料を処理する工程と、
（ｃ）　前記ＰＯＣ検査を選択する工程と、
（ｄ）　前記処理された試料の一部のみを前記ＰＯＣ検査に用い、前記処理された試料の残部を残す工程と、
（ｅ）　前記処理された試料の残部の少なくとも一部を、安定化移送希釈剤と容器中で組み合わせる工程であって、前記安定化移送希釈剤は、前記安定化移送希釈剤と組み合わせられた前記処理された試料の一部の中の少なくとも核酸を安定化する工程と、
（ｆ）　前記処理された試料の残部と安定化移送希釈剤との組み合わせを収容する前記容

器を、試験所検査のためのＰＯＣではない試験所に輸送する工程と、
（ｇ）　リフレックス検査またはＰＣＲを用いる亜型の特定のために、前記処理された試料の残部と安定化移送希釈剤との組み合わせを用いる工程と
を含むことを特徴とする方法。
【請求項１８】
前記試料を収集するために器具を用い、前記器具は、スクレーパーおよびスワブからなる群から選択されることを特徴とする請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記ＰＯＣ検査の場所が医師の診療室であることを特徴とする請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
前記ＰＯＣ検査の処理試薬は、緩和な溶解試薬であることを特徴とする請求項１７に記載の方法。
【請求項２１】
前記ＰＯＣ検査の処理試薬は、少なくとも１種の塩、少なくとも１種の緩衝剤、および少なくとも１種の洗剤を含むことを特徴とする請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記安定化移送希釈剤は、処理された試料中の核酸を安定化し、および少なくとも１種の緩衝剤および少なくとも１種の塩を含むことを特徴とする請求項１７に記載の方法。
【請求項２３】
目的微生物を含有することが疑われる前記試料は、生物学的試料および環境的試料からなる群から選択されることを特徴とする請求項１７に記載の方法。
【請求項２４】
医療現場（ＰＯＣ）検査および試験所検査の両方のために、医療現場（ＰＯＣ）で収集される単一の試料を使用するための方法であって、前記試験所はＰＯＣではなく、前記試験所検査は前記試料中の微生物の存在または不在を示し、前記方法は、
（ａ）　前記ＰＯＣ検査のために、生物学的試料または環境的試料を収集する工程と、
（ｂ）　収集した試料を、前記ＰＯＣ検査での使用のために設計されたＰＯＣ検査の処理試薬と組み合わせることによって、前記ＰＯＣ検査のための前記試料を処理する工程と、
（ｃ）　処理された試料の一部を、前記ＰＯＣ検査に用いる工程と、
（ｄ）　処理された試料の残部の少なくとも一部を、前記試験所検査に用いる工程と
を含むことを特徴とする方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
(関連出願の相互参照)
本願は、２０１０年７月２０日に出願された米国特許仮出願第６１／３６６，０７６号の出願日の利益を主張し、当該仮出願の開示内容は参照により本明細書の一部をなすものとする。
【０００２】
（背景技術）
医療現場（ＰＯＣ）における迅速検査と試験所ベースの検査との関連づけは、典型的には、培養に基づく試験所の試験方法をサポートする試料の保存によって対処されてきている。現在、ＰＯＣの現場で収集された試料は、処理されて迅速検査に直接用いられるか（迅速検査に用いられなかった処理済み試料は廃棄される）または、液体の輸送媒体中に希釈されて、迅速免疫検定法、培養、および／またはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）のような試験所ベースの検査への移送を可能にされるかのいずれかである。多くの場合、ＰＯＣ検査において陰性の結果を生じた標本はリフレックス試験(reflex testing)に付され、ＰＣＲのような試験所ベースの試験方法によって陰性の結果を確認される。加えて、陽性のＰＯＣ検査結果を生じた標本は、しばしば、亜型の特定（subtyping）または他の疫学

的情報のような追加のキャラクタリゼーションを試験される。

【０００３】

図１を参照すると、医師の診療室のＰＯＣ現場（および、患者と面談するか、または迅速検査の試料が収集される、他の非試験所の現場）において、迅速検査１２０の溶液１１０中に試料を加えるために、ほぼ専ら、スワブ標本１００が用いられる。医師の診療室および試験所以外の他の試料収集現場における処理および検査は、確認および／またはリフレックス検査のような試験所ベースの検査、または試験所ベースの分析を必要とする他の検査の手段を意図していない。現在の方法を用いては、医師（または他のＰＯＣ迅速検査の管理者）は、当該現場（たとえば、医師の診療室）において収集された試料を用いてＰＯＣ迅速検査と試験所ベースの検査の両方を実施することができない。したがって、当該試料を用いて試験所ベースの検査を実施する機会が失われる。病院または医院内のＰＯＣ現場で収集されたスワブ試料１３０は、ほぼ専ら、リモート検査のための試験試験所へ移送するための液体輸送媒体１４０内に入れられる。希釈された試料１５０を迅速検査１７０のための溶液１６０に添加することによって、当該希釈された試料１５０をさらに処理してもよい。しかしながら、多くの場合、この方法は５～１０倍またはそれ以上に希釈されたＰＯＣ試料をもたらし、それは、試料希釈効果のために迅速検査の性能を低下させる。

【０００４】

ＰＯＣ現場における第２のスワブの収集および移送を用いて、試験所ベースの検査の必要性に対処することができる。しかしながら、これは明らかに診療の標準ではないし、採取すべき試料の数を２倍にする。加えて、同一の患者から収集されたとしても、収集方法、生物担持量（organism load）などの変動が、２つの独立的に収集されたスワブ標本間の検査結果を比較する際の誤差をもたらす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

したがって、これらの問題点に対処するためのシステムおよび方法が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本発明の種々の実施形態が、収集され、かつＰＯＣにて迅速検査にかけられる単一の試料の使用により、ＰＯＣ迅速検査（たとえばインフルエンザウイルスの検査のような免疫検定法）と試験所ベースの検査（確認検査、または診断検査および同定検査のような他の試験所検査）との間の関連づけを可能にする。試料（目的微生物を含有することが疑われる任意の試料である）は、収集され、用いられる特定のＰＯＣ検査のための最適条件下でア処理され、ＰＯＣ検査（本明細書中で、迅速検査とも呼ばれる）の実現可能な最高の臨床性能を保証する。試料は、患者から収集される生物学的試料であることができ、血液、尿、唾液、および患者から掻き取られるた組織または患者からぬぐい取られた組織を含むが、それらに限定されるものではない任意の生物学的液体または組織試料を含むことができる．同様に、汚染微生物を有することが疑われる表面の拭き取りまたはぬぐい取りの慣用的手法により収集された環境的試料を含む。同様に、環境的試料は、土試料、空気試料，水試料、食品試料などを含むことができる。典型的には、試料を迅速検査と適合性のある処理試薬と組み合わせることによって、試料を処理する。これまでは、迅速検査に用いられなかった試料の一部は典型的には廃棄されていた。本発明の１つの実施形態によれば、処理済み試料の残部は保存されて、核酸に基づく検査のような確認検査を実施できる試験所ベースの検査環境への移送を可能にする。別の実施形態において、残部はさらなる希釈を受けないが、それでもなお試験所検査にかけられる。本発明の目的において、試料収集および迅速検査の現場はローカルまたはＰＯＣと呼ばれ、試験所ベースの検査のための現場をリモートと呼ぶ。本発明の状況において、リモートは、単に、試料収集および迅速検査の現場から離れていること意味する。リモートは、同一の建物内の異なる位置のように非常に近い距離から、遙かに長い距離まで変化することができる。

【０００７】
本明細書に記載される方法は、臨床処理の決定をもたらす迅速診断のためにＰＯＣで用いられる迅速免疫検定法に適用することができる。ＰＯＣ現場で用いるための迅速免疫検定法は、よく知られており、かつ商業的に利用可能である。それらは、本明細書中に詳細には記載しない。たとえば、迅速免疫検定法は患者の試料から広範囲の感染症を検出することが知られており、それら検定法は、インフルエンザ検査（たとえば、Ｈ１Ｎ１）、ＲＳＶ検査、トラコーマクラミジア検査、淋菌検査などを含むが、それらに限定されるものではない。
【０００８】
別の実施形態において、試料は収集され、最初に、迅速免疫検定法における使用のために直接的に処理される。処理工程は、迅速検査処理試薬を用い、用いられる特定の免疫検定法の最大の臨床性能をもたらすために最適化される。典型的には、これは、種々の塩および洗剤の存在下での比較的緩和な溶解（lysis）処理を含む。そのような溶解試薬は、よく知られており、商業的に利用可能な迅速免疫検定法と組み合わせて用いられており、本明細書において詳細には記載しない。当業者であれば、迅速検査処理試薬を選択して、試料を分解せず、かつ試料を意図する試験所検査に不適当なものとしないことの必要性を認識している。
【０００９】
次に、処理された試料の一部は、ＰＯＣ検査に送られ、迅速診断検査結果をもたらす。試料の残部（またはその一部）は、分子診断法を用いる確認検査のような検査のために試験所ベースの検査環境への移送のために保存される。１つの実施形態において、分子診断検査は核酸に基づくものである。好ましい実施形態において、核酸に基づく診断検査はＰＣＲである。
【００１０】
本発明の別の実施形態において、異なる安定化移送希釈剤を用いて、試料の安定性を増大させる。種々の配合が可能であり、用いることができる構成要素は、緩衝剤、塩、キレート剤、酵素阻害剤、核酸結合タンパク、カオトロープなどを含むが、それらに限定されるものではない。当業者であれば、特定の用途のための安定化移送希釈剤の適当な構成要素および条件（たとえば、ｐＨ）を認識している。たとえば、試料中の目的とする微生物がカオトロープによる分解を受けやすい場合、当業者は、安定化移送希釈剤中にカオトロープを含まないことを知るであろう。本発明のある実施形態において、迅速検査に用いされなかった処理済み試料の残部を、安定化移送希釈剤に添加してもよい。１つの実施形態において、安定化移送希釈剤は、ＰＯＣ検査に用いられる迅速検査処理試薬中に既に存在してもよい。別の実施形態において、試料の一部を取り出して迅速免疫検定法のために用いた後に、安定化移送希釈剤を処理済みの試料の残部に添加してもよい。好ましい実施形態において、安定化移送希釈剤は、試料中の核酸を安定化させる。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１Ａ】ＰＯＣおよび試験所ベースの検査のための標準プロトコルのための従来技術の方法を示す図である。
【図１Ｂ】本発明のＰＯＣおよび試験所ベースの検査のための方法を示す図である。
【図２Ａ】種々の希釈条件の下でのＰＯＣ検査のために処理されたサンプルのインフルエンザＡのＲＴ－ＰＣＲの結果を示す図である。
【図２Ｂ】種々の希釈条件の下でのＰＯＣ検査のために処理されたサンプルのインフルエンザＡのＲＴ－ＰＣＲの結果を示す図である。
【図３】本発明の方法を用い、２つの異種の迅速検査処理試薬および種々の保管条件を用いるＰＯＣ検査のために処理されたサンプルのインフルエンザＡのＲＴ－ＰＣＲの結果を示す図である。
【図４】本発明の方法を用い、ＰＯＣ検査のために処理され、次いで２つの異種の安定化移送希釈剤と混合され、種々の条件で保管されたサンプルのインフルエンザＡのＲＴ－Ｐ

ＣＲの結果を示す図である。
【図５】本発明の方法を用い、ＰＯＣ検査のために処理され、次いで安定化移送希釈剤と混合され、種々の条件で保管されたサンプルのインフルエンザＡのＲＴ－ＰＣＲの結果を示す図である。
【図６Ａ】本発明の方法を用い、種々の保管条件の下、インフルエンザＡの２種の株およびインフルエンザＢの１種の株のＲＴ－ＰＣＲの結果を示す図である。
【図６Ｂ】本発明の方法を用い、種々の保管条件の下、インフルエンザＡの２種の株およびインフルエンザＢの１種の株のＲＴ－ＰＣＲの結果を示す図である。
【図６Ｃ】本発明の方法を用い、種々の保管条件の下、インフルエンザＡの２種の株およびインフルエンザＢの１種の株のＲＴ－ＰＣＲの結果を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
図１Ａは、ＰＯＣおよび試験所ベースの検査のための現在の標準プロトコルを示す。たとえば、スワブ１００を用いて、標本１０５を収集する。生物学的試料を収集するための別の慣用の器具は、本発明における使用を考慮される。スクレーパーまたはスパチュラのようなそのような器具は本明細書中に詳述しないが、当業者によく知られている。次いで、試料１０５の付着したスワブ１００をＰＯＣ迅速検査１２０のための溶液１１０中に入れることによって、標本１０５を直接的に処理する。この状況において、残存する試料は廃棄され、確認検査またはリフレックス検査のような追加の試験所ベースの検査のために、新たな試料を収集しなければならない。別の標準プロトコルにおいて、スワブ１３０上の標本１０５は、最初に移送媒体１４０中で希釈される。標本１０５を含有する希釈された移送媒体１４０の一部を、ＰＯＣ検査１７０用の溶液１６０でさらに処理する。この状況において、処理された標本１０５は、以下の実施例１で例示されるように、ＰＯＣ検査の結果を消失させる濃度まで希釈される。希釈剤の残部は、亜型の特定またはリフレックス検査のような試験所検査１５０に用いられる。
【００１３】
図１Ｂは、本発明のＰＯＣ検査および試験所検査のための方法の１つの実施形態を例示する。スワブ２００上に収集された標本２０５は、特定の免疫検定法の最大の臨床性能をもたらすために最適化された迅速検査処理試薬２１０で直接的に処理される。スワブ２００は取り出され、迅速検査容器２１５は、ディスペンサー蓋２１６で閉じられる。ディスペンサー蓋２１６で蓋をされた試験容器２１５を用いて、迅速検査ストリップ２２０の上に処理された試料２２０の一部を分配する。迅速検査処理試薬中で処理された標本２１１の一部を用いて、迅速ＰＯＣ検査２２０を実施する。ＰＯＣ検査後の処理された試料の残部２１２を、試験所検査４００のために臨床試験所に移送する（３００）。別の実施形態において、ＰＯＣ検査後の処理された試料の残部２１２を、安定化移送希釈剤２４０を収容する移送用バイアル２３０に添加する。安定化移送希釈剤は、試料の完全な状態を維持することを補助するように設計される。この点において、目的とする微生物、意図される試験所検査の種類、および迅速検査試薬の成分を含む種々の要因に依存して、種々の配合物が可能である。これらの要因を考慮して、当業者は、安定化移送希釈剤の条件（たとえば、最適ｐＨ条件）および成分（たとえば、緩衝剤の種類、塩、キレート剤、酵素阻害剤、核酸結合タンパク、カオトロープなど）を選択するであろう。次いで、安定化された試料は、確認検査または他の試験所検査４００のために臨床試験所３００へ移送される。この実施形態は、ＰＯＣ検査および試験所ベースの検査の両方のために、１つの試料（標本２０５）がＰＯＣの現場でどのように処理することができるかを例示する。また、この実施形態は、ＰＯＣ検査に最適な条件で処理された試料を、試験所ベースの検査に用いることができることを説明する。
【００１４】
現時点で商業的に利用可能な種々の迅速検査が存在する。そのような迅速検査は本明細書中に詳述しないが、本件特許出願人、Alere。Quidel、Meridian、Genzyme等を含む種々の入手先から入手可能である。本発明は、特定の迅速検査の使用に限定されるものではな

い。

【実施例】

【００１５】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態を説明するが、添付の特許請求の範囲と整合する方法によるものを除いて、本発明を限定することを意味するものではない。

【００１６】

（実施例１）

ＰＯＣ迅速免疫検定法における使用のために処理された試料中のインフルエンザウイルスＲＮＡを検出する能力を、陽性のインフルエンザ(flu)の症状を示す個体から上鼻腔スワブによって収集したＨ１Ｎ１陽性臨床標本を用いて示した。スワブを、３ｍｌの商業的に入手可能な移送媒体（本件特許出願人から入手可能なBD（商標）Universal Viral Transport Media）中に配置し、試料がＨ１Ｎ１について陽性であると検査された確認を得た。検査のために、その標本のいくつかの５０μｌアリコートを得た。１つのアリコートは、免疫検定法のための迅速検査処理試薬と直接混合し、他のアリコートは、迅速検査処理試薬と混合する前に、安定化移送希釈剤でさらに希釈した（５倍、２５倍、１２５倍、または６２５倍）。試料の５０μｌのアリコートのそれぞれを、２５μｌの迅速検査処理試薬と組み合わせた。迅速検査処理試薬（トリス緩衝液、ＮａＣｌ、６％洗剤、および８．０に調整されたｐＨ）は、迅速免疫検定法の目標抗原であるインフルエンザ核タンパク質を放出および保存するのに最適化された。種々の試料希釈物における免疫検定検査結果を第１表に示す。

【００１７】

【表１】

第１表：免疫検定結果

Ｈ１Ｎ１臨床試料	**迅速免疫検定結果**
未希釈	**インフルエンザA陽性／インフルエンザB陰性**
１：５希釈	**インフルエンザA陽性／インフルエンザB陰性**
１：２５希釈	**インフルエンザA陰性／インフルエンザB陰性**
１：１２５希釈	**インフルエンザA陰性／インフルエンザB陰性**
１：６２５希釈	**インフルエンザA陰性／インフルエンザB陰性**

【００１８】

第１表中の免疫検定の結果は、迅速検査性能に対する標本希釈の効果を説明する。１：５より大きく希釈された試料は、陰性の免疫検定検査結果をもたらす。したがって、最適なＰＯＣ臨床性能を提供するためには、標本希釈を最小限にするか、あるいは回避するべきである。１：５より大きな標本の希釈（溶液中への試料の初期配置を除く）は、迅速免疫検定検査における検出の機会を消失させる。ＰＯＣ環境での直接スワブ処理の使用は、迅速免疫検定の臨床性能を向上させる。しかし、前述のように、直接スワブ試料を用いる標準的ＰＯＣ検査方法は、試験所ベースの検査を可能にしない。これは、移送希釈剤中への試料の初期投入のためである。

【００１９】

（実施例２）

実施例１で調製したそれぞれの希釈物のアリコート（５０μｌ）を、２５μｌの迅速検査処理試薬と混合した。処理された試料の１組を、製造者の指示に従うQuiagen Viral RNAミニプレップキットを用いるＲＮＡ抽出の前に、５分間にわたって室温（ＲＴ）にて保管した。処理された試料のさらなる組を、ＲＮＡ抽出の前に、４時間にわたって４℃またはＲＴにて保管した。次いで、抽出されたＲＮＡ試料の５μｌを、インフルエンザＡウィルスのマトリックス遺伝子に特異的なプライマーを用いる逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）のターゲットとして用いた。ＲＴ－ＰＣＲの結果を図２Ａおよび図２Ｂに示す。第２表および第３表は、図２Ａおよび図２Ｂに示すＲＴ－ＰＣＲ結果のアガロースゲルのそれぞれのレーンに対応する処理条件を示す。

【００２０】
【表２】
第２表：図２Ａのアガロースゲルのレーン

処理方法	アガロースゲルのレーン
分子量マーカー	Ｍ
１：５で希釈され、迅速試験のために処理され、直ちにＲＮＡ抽出された試料	１
１：５で希釈され、迅速試験のために処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって４℃で保管された試料	２
１：５で希釈され、迅速試験のために処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって室温で保管された試料	３
１：２５で希釈され、迅速試験のために処理され、直ちにＲＮＡ抽出された試料	４
１：２５で希釈され、迅速試験のために処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって４℃で保管された試料	５
１：２５で希釈され、迅速試験のために処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって室温で保管された試料	６
１：５で希釈され、直ちにＲＮＡ抽出された試料（迅速検査なし／迅速検査試薬なし）	７
１：２５で希釈され、直ちにＲＮＡ抽出された試料（迅速検査なし／迅速検査試薬なし）	８
１：１２５で希釈され、直ちにＲＮＡ抽出された試料（迅速検査なし／迅速検査試薬なし）	９
１：６２５で希釈され、直ちにＲＮＡ抽出された試料（迅速検査なし／迅速検査試薬なし）	１０

【００２１】

【表３】

第３表：図２Ｂのアガロースゲルのレーン

処理方法	アガロースゲルのレーン
分子量マーカー	Ｍ
１：１２５で希釈され、迅速試験のために処理され、直ちにＲＮＡ抽出された試料	１１
１：１２５で希釈され、迅速試験のために処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって４℃で保管された試料	１２
１：１２５で希釈され、迅速試験のために処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって室温で保管された試料	１３
１：６２５で希釈され、迅速試験のために処理され、直ちにＲＮＡ抽出された試料	１４
１：６２５で希釈され、迅速試験のために処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって４℃で保管された試料	１５
１：６２５で希釈され、迅速試験のために処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって室温で保管された試料	１６
１：５で希釈され、直ちにＲＮＡ抽出された試料（迅速検査なし／迅速検査試薬なし）	１７
１：２５で希釈され、直ちにＲＮＡ抽出された試料（迅速検査なし／迅速検査試薬なし）	１８
１：１２５で希釈され、直ちにＲＮＡ抽出された試料（迅速検査なし／迅速検査試薬なし）	１９
１：６２５で希釈され、直ちにＲＮＡ抽出された試料（迅速検査なし／迅速検査試薬なし）	２０

【００２２】

図２Ａおよび図２Ｂは、迅速免疫検定法のために処理された試料を、ＲＮＡ抽出のためにも使用することができ、それが試験所ベースのＰＣＲ検査を実施できるようにすることを示す。ＲＮＡは、迅速検査の検出限界以下まで希釈された試料から抽出され、このことは、少量のウィルスＲＮＡが処理された試料中で安定のままであることを示す。また、ＲＮＡ抽出前の４時間までの４℃または室温における処理された試料の保管は、処理後のウィルス核酸が安定のままであることを示す。試料希釈物から直接抽出されるＲＮＡ（レーン７～１０、１７～２０）に対する、処理された試料から単離されるＲＮＡを用いるＰＣＲ検査結果の比較は、迅速検査のための処理工程において、ウィルスＲＮＡの完全な状態は最小限の影響しか受けないことを示した。

【００２３】

（実施例３）

インフルエンザＡ／Ｂの迅速免疫検定法における使用に最適化された２種の異なる迅速検査処理試薬を用いて、処理された試料中のウィルスＲＮＡの安定性を試験した。迅速免疫検定法のための試料処理は、典型的には、種々の塩および洗剤を含有する試薬によって実現される比較的緩和な溶解処理の使用を伴う。迅速検査処理試薬のための２種の異なる配合物を、記載される方法との適合性について試験した。配合物Ａは、７．８のｐＨにおいて、トリス緩衝液、ＮａＣｌ、１６％の洗剤を含んだ。配合物Ｂは、８．０のｐＨにお

いて、トリス緩衝液、ＮａＣｌ、６％の洗剤を含んだ。実施例１に記載されるＨ１Ｎ１陽性の臨床標本のアリコートを両方の配合物で処理し、処理した試料をQiagen Viral RNAミニプレップキットを用いるＲＮＡ抽出に直ちに用いたか、あるいは、ＲＮＡ抽出の前に２４時間までにわたってＲＴおよび４℃で保管した。次いで、抽出されたＲＮＡ試料を、インフルエンザＡウィルスのマトリクス遺伝子に特異的なプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲのターゲットとして用いた。ＲＴ－ＰＣＲの結果を図３に示す。第４表は、図３に示されるＲＴ－ＰＣＲ結果のアガロースゲルのそれぞれのレーンに対応する処理条件を示す。

【００２４】

【表４】

第４表：図３のアガロースゲルのレーン

処理方法	アガロースゲルのレーン
分子量マーカー	Ｍ
迅速検査処理試薬Ａで処理され、直ちにＲＮＡ抽出された試料	１
迅速検査処理試薬Ａで処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって４℃で保管された試料	２
迅速検査処理試薬Ａで処理され、ＲＮＡ抽出の前に２４時間にわたって４℃で保管された試料	３
迅速検査処理試薬Ｂで処理され、直ちにＲＮＡ抽出された試料	４
迅速検査処理試薬Ｂで処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって４℃で保管された試料	５
迅速検査処理試薬Ｂで処理され、ＲＮＡ抽出の前に２４時間にわたって４℃で保管された試料	６
迅速検査処理試薬Ａで処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって室温で保管された試料	７
迅速検査処理試薬Ａで処理され、ＲＮＡ抽出の前に２４時間にわたって室温で保管された試料	８
迅速検査処理試薬Ｂで処理され、ＲＮＡ抽出の前に４時間にわたって室温で保管された試料	９
迅速検査処理試薬Ｂで処理され、ＲＮＡ抽出の前に２４時間にわたって室温で保管された試料	１０

【００２５】

図３は、配合物Ａおよび配合物Ｂの両方が、ＲＮＡ抽出およびＰＣＲ検査のために処理された試料の使用に対して適合性であることを示す。ＲＮＡ抽出前の２４時間までの４℃における保管は、いずれの配合物で処理された試料においてウィルスＲＮＡの分解がほとんど起こらないことを示唆する。しかしながら、おそらく時間経過によるウィルスＲＮＡの分解に起因して、抽出した試料のＲＴにおける長期間の保管が、低下したＰＣＲ性能を示した（レーン８、１０）。

【００２６】

（実施例４）

ＰＯＣ検査のために処理される試料中のウィルスＤＮＡの安定性を増大させる試みにおいて、２種の可能性のある安定化移送希釈剤を試験した。安定化移送希釈剤は、試料中の核酸の完全性を維持することを補助するように設計された。最適なｐＨ条件、緩衝剤の種類、塩、キレート剤、酵素阻害剤、核酸結合タンパク質、カオトロープなどを用いることができる、種々の配合物に可能性がある。安定化移送希釈剤Ａは、QiagenウィルスＲＮＡ

溶解（lysis）／結合緩衝剤を含有した。安定化移送希釈剤Ｂは、６Ｍのグアニジンチオシアネート＋２０ｍＭのＥＤＴＡを含有した。Ｈ１Ｎ１陽性の臨床標本のアリコートを、迅速検査処理試薬Ｂを用いて処理した。処理された試料を直ちにＲＮＡ抽出に用いるか、または、２種の異なる安定化移送希釈剤の一方と混合し、そしてＲＮＡ抽出の前に６日までにわたって４℃で保管した。次いで、抽出されたＲＮＡ試料の一部を、インフルエンザＡウィルスのマトリクス遺伝子に特異的なプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲのターゲットとして用いた。ＲＴ－ＰＣＲの結果を図４に示す。第５表は、図４に示すＲＴ－ＰＣＲのアガロースゲルのそれぞれのレーンに対応する処理条件を示す。

【００２７】

【表５】

第５表：図４のアガロースゲルのレーン

処理方法	アガロースゲルのレーン
分子量マーカー	M
迅速検査のために処理され、直ちにＲＮＡ抽出された試料	1
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ａと混合され、ＲＮＡ抽出の前に３日間にわたって４℃で保管された試料	2
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ｂと混合され、ＲＮＡ抽出の前に３日間にわたって４℃で保管された試料	3
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ａと混合され、ＲＮＡ抽出の前に６日間にわたって４℃で保管された試料	4
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ｂと混合され、ＲＮＡ抽出の前に６日間にわたって４℃で保管された試料	5

【００２８】

安定化移送希釈剤のいずれの配合物を用いても、６日間までにわたって４℃において保管されたＰＯＣ検査用処理済試料から、完全なウィルスＤＮＡが抽出された。処理後直ちに抽出したＲＮＡを用いて得られた結果（レーン１）と保管された試料のＰＣＲ結果（レーン２～５）の比較は、いずれの安定化移送希釈剤で処置された処理された試料においても、時間経過によるウィルスＤＮＡの分解は（たとえ起きたとしても）ほとんど起こらないことを示唆する。

【００２９】

（実施例５）

ＰＯＣ検査のために処理された試料中のウィルスＤＮＡの安定性を増大させる試みにおいて、特に試料を室温において長期間にわたって保管する際に、安定化移送希釈剤を用いた。Ｈ１Ｎ１陽性の臨床標本のアリコートを、実施例３に記載の迅速検査処理試薬Ｂを用いて処理した。処理された試料を直ちにＲＮＡ抽出に用いるか、または、安定化移送希釈剤Ａと混合し、そしてＲＮＡ抽出の前に７日までにわたってＲＴおよび４℃で保管した。次いで、抽出されたＲＮＡ試料の一部を、インフルエンザＡウィルスのマトリクス遺伝子に特異的なプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲのターゲットとして用いた。ＲＴ－ＰＣＲの結果を図５に示す。第６表は、図５に示すＲＴ－ＰＣＲのアガロースゲルのそれぞれのレーンに対応する処理条件を示す。

【００３０】

【表６】

第６表：図５のアガロースゲルのレーン

処理方法	アガロースゲルのレーン
分子量マーカー	Ｍ
迅速検査のために処理され、 直ちにＲＮＡ抽出された試料	１
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に３日間にわたって４℃で保管された試料	２
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に４日間にわたって４℃で保管された試料	３
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に５日間にわたって４℃で保管された試料	４
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に６日間にわたって４℃で保管された試料	５
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に７日間にわたって４℃で保管された試料	６
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に１日間にわたって室温で保管された試料	７
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に２日間にわたって室温で保管された試料	８
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に３日間にわたって室温で保管された試料	９
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤と混合され、 ＲＮＡ抽出の前に４日間にわたって室温で保管された試料	１０

【００３１】

処理された試料の安定化移送希釈剤との混合は、ウィルス核酸の安定性を増大させ、処理された試料の種々の温度における長期保管および移送を可能にした。図５は、４℃において７日間まで、または室温において４日間までの試料の保管の後に、安定化移送希釈剤と混合された処理済試料から完全なウィルスＲＮＡを抽出できることを示す。

【００３２】

（実施例６）

安定化移送希釈剤Ｂを用いて、異なるインフルエンザ株にわたる安定化特性を試験した。インフルエンザ株は、Ａ：インフルエンザＡ株Ａ／ソロモン諸島／０３／０６（Ｈ１Ｎ１）；Ｂ：インフルエンザＡ株Ａ／ウィスコンシン／６７／２００５（Ｈ３Ｎ２）；およびＣ：インフルエンザＢ株Ｂ／江蘇省／１０／２００３であった。インフルエンザの症状を示している患者の鼻腔スワブからウィルスを導入した培養物の細胞培養上澄みのアリコート（５０μｌ）を得た。これらのアリコートを、迅速検査処理試薬Ｂ（２５μｌ）と組み合わせた。処理された試料を、直ちにＲＮＡ抽出に用いたか、あるいは、安定化移送希釈剤（７５μｌ）を混合し、そしてＲＮＡ抽出の前に１４日までにわたって４℃または－２０℃で保管した。次いで、抽出されたＲＮＡ試料の一部を、インフルエンザＡウィルスのマトリクス遺伝子またはインフルエンザＢの核タンパク質遺伝子に特異的なプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲのターゲットとして用いた。ＲＴ－ＰＣＲの結果を図６Ａ～Ｃに示す。第７表は、図６Ａ～Ｃに示すＲＴ－ＰＣＲのアガロースゲルのそれぞれのレーンに対応する処理条件を示す。

【００３３】

【表７】

第７表：図６Ａ～Ｃのアガロースゲルのレーン

処理方法	アガロースゲルのレーン
迅速検査のために処理され、直ちにＲＮＡ抽出された試料	１
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ｂと混合され、ＲＮＡ抽出の前に２日間にわたって４℃で保管された試料	２
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ｂと混合され、ＲＮＡ抽出の前に７日間にわたって４℃で保管された試料	３
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ｂと混合され、ＲＮＡ抽出の前に１０日間にわたって４℃で保管された試料	４
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ｂと混合され、ＲＮＡ抽出の前に１４日間にわたって４℃で保管された試料	５
迅速検査のために処理され、安定化移送希釈剤Ｂと混合され、ＲＮＡ抽出の前に７日間にわたって－２０℃で保管された試料	６

【００３４】

処理された試料の安定化移送希釈剤との混合は、４℃において１４日まで、または－２０℃において７日までにわたって、インフルエンザの３種の株全てのウィルス核酸の安定性を増大させた。図６Ａ～Ｃは、４℃において１４日間まで、または－２０℃におい７４日間までの試料の保管の後に、安定化移送希釈剤と混合された処理された試料から完全なウィルスＲＮＡを抽出できることを示す。Ａ株およびＢ株の両方に関して、全ての条件下での保管の後に、完全なウィルスＲＮＡが抽出された。

【００３５】

（実施例７）

図１Ｂに例示される本発明の方法の１つの実施形態の有用性を、２０１０～２０１１インフルエンザシーズン中に実施された臨床試験において示す。鼻咽頭スワブ（ＮＰＳ）の対または上鼻腔スワブ（ＮＳ）の対を、ＰＯＣインフルエンザ研究に志願した患者から収集した。一方のスワブを、ＰＯＣ現場における研究中の迅速免疫検定における使用のために直接的に処理し、次いで、残存する試料の一部（３～５滴）を安定化移送希釈剤Ｂ（２００μｌ）と混合し、ＰＣＲ分析のために試験所に送られる前に、５日間までにわたって２～８℃、あるいは２週間までにわたって－２０℃のいずれかにおいて保管した。第２のスワブは、３ｍｌのウィルス移送媒体中に入れ、ＰＣＲ検査のために臨床試験所に直接的に送付した。

【００３６】

全てのＰＣＲ検査を、GenProbe, Inc. (San Diego, CA)から入手可能なProdesse ProFlu+検定を用いて実施した。Prodesse ProFlu+試験はＦＤＡに許可されており、呼吸器の標本中のインフルエンザＡ、インフルエンザＢおよびＲＳＶを検出および区別することができる。移送媒体中のスワブの標本に関して、Prodesse ProFlu+パッケージの挿入物にしたがって、NucliSENS easyMAG System (bioMerieux)を用いてＲＮＡを抽出した。安定化移送希釈剤中のＰＯＣ処理されたサンプルに関して、製造者にしたがってQiagen Viral RNA ミニプレップキットを用いてＲＮＡを抽出した。５マイクロリットルの抽出されたＲＮＡを、Prodesse ProFlu+パッケージの挿入物に記載された検定手順にしたがってCepheid SmartCycler II装置を用いるＰＣＲ増幅に用いた。Prodesse ProFlu+パッケージの挿入物に概略が説明されているプロトコルにしたがって、Cepheid SmartCycler Dxソフトウェアを用いて、標本および対照標準のＰＣＲ結果の解釈を決定した。ＰＯＣ安定化試料（ＰＯＣ ＰＣＲ）から得られた結果と、移送媒体中のスワブの標本（参照ＰＣＲ）から得られた結果との間の陽性パーセント符合率(agreement)および陰性パーセント符合率を、以下の

第７表に示す。

【００３７】

【表８】

第７表：参照ＰＣＲと比較した、ＰＯＣ処理された試料のＰＣＲ結果の比較

インフルエンザＡ

	参照PCR		
POC PCR	P	N	
P	150	22	172
N	5	335	340
	155	357	512

参照方法：
移送媒体中のスワブからのＰＣＲ
陽性パーセント符合率：
９６．８％
陰性パーセント符合率：
９３．８％

インフルエンザＢ

	参照PCR		
POC PCR	P	N	
P	91	12	103
N	8	401	409
	99	413	512

参照方法：
移送媒体中のスワブからのＰＣＲ
陽性パーセント符合率：
９１．９％
陰性パーセント符合率：
９７．１％

ＲＳＶ

	参照PCR		
POC PCR	P	N	
P	18	2	20
N	1	491	492
	19	493	512

参照方法：
移送媒体中のスワブからのＰＣＲ
陽性パーセント符合率：
９４．７％
陰性パーセント符合率：
９９．６％

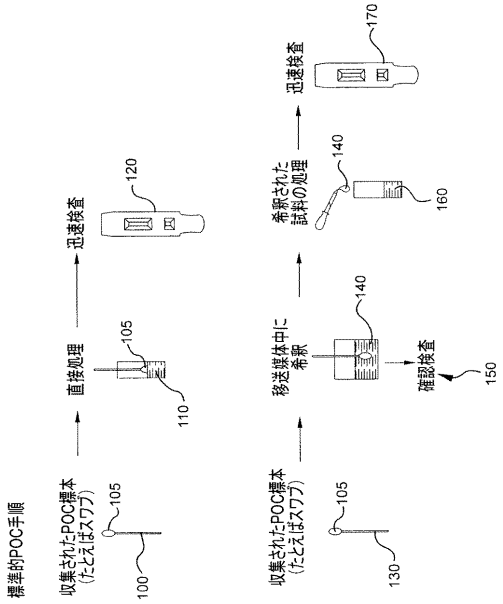
【００３８】

第７表は、試料を迅速ＰＯＣ検査のために処理することができ、および、処理された試料の一部をＰＣＲのような試験所ベースの検査に用いることができることを示す。最初に迅速ＰＯＣ検査に最適な条件下で処理され、引き続いてＰＣＲのために処理された試料に対して、ＰＣＲのために直接処理された試料を比較した際に、種々のウィルス株において９１．９％より高い符合率が得られた。

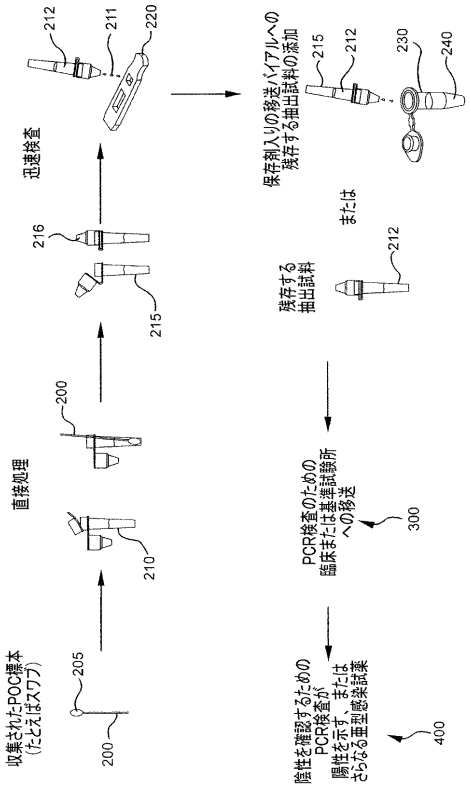
【００３９】

本明細書中の発明は特定の実施形態に関して記載されているが、これらの実施形態は、本発明の原理および応用の例示に過ぎないと理解すべきである。したがって、例示された実施形態に対して多くの修正を実施してもよいこと、および添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の真意および範囲から乖離することなしに、他の実施形態を考案してもよいことを理解すべきである。

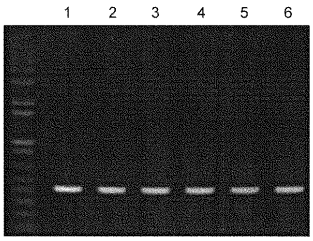
【図１Ａ】



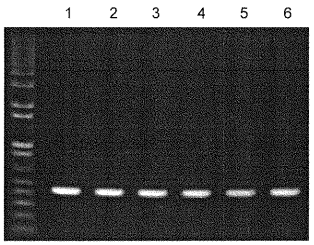
【図１Ｂ】



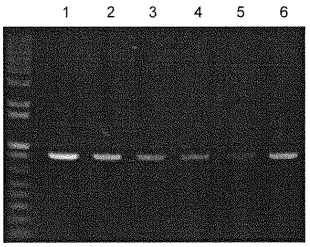
【図６Ａ】



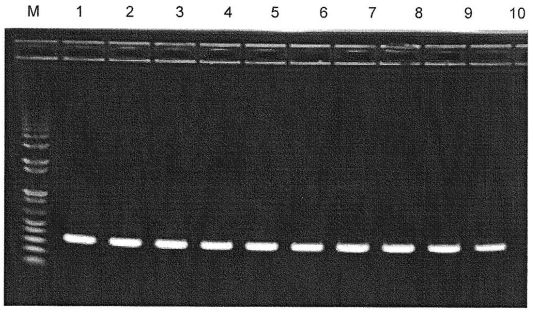
【図６Ｂ】



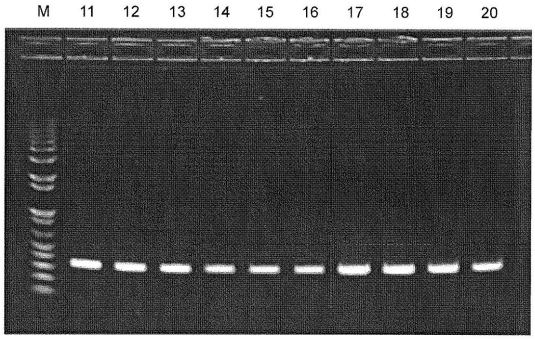
【図６Ｃ】



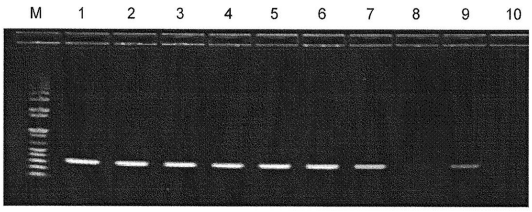
【図２Ａ】



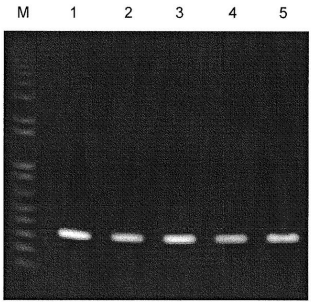
【図２Ｂ】


M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

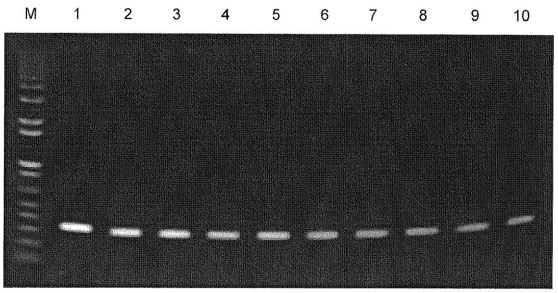
【図３】


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

【図４】


M 1 2 3 4 5

【図５】


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/24
C12Q 1/68 A

(72)発明者 ジョン ジェイ. カリーノ
アメリカ合衆国 ９２１３０ カリフォルニア州 サン ディエゴ シー ノール コート １３１２９
(72)発明者 ジェームス ファン
アメリカ合衆国 ９２０１０ カリフォルニア州 カールスバッド ノールウッド ドライブ ３５５０

審査官 藤田 都志行

(56)参考文献 特開２００６－０８４３５１（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５３４７３１（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－１６４４０３（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５２３４５８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１０／０６４６２８（WO，Ａ１）
H. Foo, et al., "Laboratory test performance in young adults during influenza outbreaks at World Youth Day 2008", Journal of Clinical Virology, Elsevier B.V., ２００９年１２月, Vol. 46, No. 4, p. 384-386

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ３３／４８
Ｇ０１Ｎ ３３／５３１
Ｇ０１Ｎ ３３／５６９
Ｇ０１Ｎ １／０４
Ｃ１２Ｑ １／２４
Ｃ１２Ｑ １／６８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣｉＮｉｉ