

(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2012-143185
(P2012-143185A)

(43) 公開日 平成24年8月2日(2012.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 M	

審査請求 未請求 請求項の数 27 O L (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2011-3740 (P2011-3740)
(22) 出願日 平成23年1月12日 (2011.1.12)

(71) 出願人 504224153
国立大学法人 宮崎大学
宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
(74) 代理人 240000039
弁護士 弁護士法人 衛藤法律特許事務所
(72) 発明者 山崎 渉
宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
国立大学法人 宮崎大学内
(72) 発明者 三澤 尚明
宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
国立大学法人 宮崎大学内
Fターム(参考) 4B024 AA14 BA32 CA01 CA09 CA11
DA02 HA12
4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ10 QQ52
QQ58 QR08 QR32 QR55 QR62
QS25

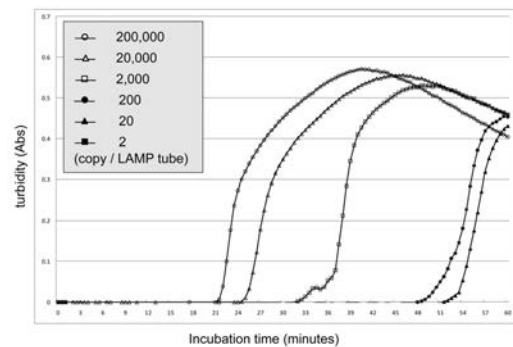
(54) 【発明の名称】 口蹄疫ウィルスの包括的検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】多様な口蹄疫ウィルスを迅速かつ高感度な検出が可能な口蹄疫ウィルスの検出方法、特に、東アジアおよび東南アジアで発生があり日本への侵入が危惧される、O型、A型、C型、Asia-1型の4タイプを少なくとも検出可能な口蹄疫ウィルスの検出方法の提供。

【解決手段】O型、A型、C型、Asia-1型の4タイプの口蹄疫ウィルスを迅速かつ高感度で検出しうるオリゴヌクレオチドプライマー、および該プライマーを用いて口蹄疫ウィルスの遺伝子を増幅させることにより、口蹄疫ウィルスの検出が可能とする方法。さらに、該プライマーを単独もしくは組み合わせてLAMP法に用いることにより、口蹄疫ウィルスを迅速かつ高感度で検出することが可能となるオリゴヌクレオチドプライマーセット。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記プライマーセットのいずれか又は複数を含む口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅するためのプライマーセットであって、

プライマーセット 1 は、

5'-ACA AGT CCT CCT CAA GCG ACG ATT CGC CTA GTT TTG CCC GT-3' (配列番号 10) 又は

5'-GTC CCA TTT CTC CTG AAA ACG GGA TGA ACC TTC ACC CGG AAG-3' (配列番号 11)

のいずれか又は両方と、

5'-CAA CCA CAA GAA TTG CCT TC-3' (配列番号 6) と、

5'-GAC TTG TAC AAA CAC GAT CTA CTC AGG CAC CCC TCT AGA CCT GGA A-3' (配列番号

12) と、

5'-GTG GAG TCA AGC ACA GTA CA-3' (配列番号 9) とからなり、

プライマーセット 2 は、

5'-GCC ACG GAG ATC AAC TTC TCC TCT TGA GGC TAT CCT CTC CTT-3' (配列番号 24)

と、

5'-GTG ATG GCC TCA AAG ACC-3' (配列番号 20) と、

5'-GAC GAG TAC CGG CGT CTC TTC GCA GGT AAA GTG ATC TGT-3' (配列番号 25) と、

5'-ATT ATG CGT CAC CAC ACA C-3' (配列番号 23) とからなり、

プライマーセット 3 は、

5'-GTC ACG TGC TTT GAG TTG TTT CTC CGC CTC GAG TTT CTT CCG-3' (配列番号 36)

と、

5'-ATT CTG TTG GCC GGG TTG-3' (配列番号 32) と、

5'-TCA AGA ACG GCG AGT GGC TTC TCT TCT GAG GCG ATC CA-3' (配列番号 37) と、

5'-GGT CTG TCA TGG TGA CAA AC-3' (配列番号 35) とからなり、

プライマーセット 4 は、

5'-ACA GGT TTG TAA AAC CCA GTT CCA CAC TCC ATT GCC GAT GTC AC-3' (配列番号 47)

と、

5'-TGA CAA AAG CGA CAA AGG TT-3' (配列番号 43) と、

5'-ATG GCT TCG AAG ACC CTC GAA CGG AGA TCA ACT TCT CCT GTA-3' (配列番号 48)

と、

5'-TGG ACT GCG AGT CCT GC-3' (配列番号 46) とからなる、

ことを特徴とするプライマーセット。

【請求項 2】

下記プライマーセットのいずれか又は複数を含む口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅するためのプライマーセットであって、

プライマーセット 1 は、

5'-ACA AGT CCT CCT CAA GCG ACG ATT CGC CTA GTT TTG CCC GT-3' (配列番号 10) 又は

5'-GTC CCA TTT CTC CTG AAA ACG GGA TGA ACC TTC ACC CGG AAG-3' (配列番号 11)

のいずれか又は両方と、

5'-CAA CCA CAA GAA TTG CCT TC-3' (配列番号 6) と、

5'-GAC TTG TAC AAA CAC GAT CTA CTC AGG CAC CCC TCT AGA CCT GGA A-3' (配列番号

12) と、

5'-GTG GAG TCA AGC ACA GTA CA-3' (配列番号 9) とを含み、

さらに、5'-TTT CGT GCG CAG ACG TCC C-3' (配列番号 13)、5'-ACT AGG CGA ATT TG C CGT TTT A-3' (配列番号 14)、5'-GCA ACT TGA AAC TCC GCC T-3' (配列番号 15)、5'-CCG ACA CAA ACC GTG CAA-3' (配列番号 16) のいずれか又は複数を含み、

プライマーセット 2 は、

5'-GCC ACG GAG ATC AAC TTC TCC TCT TGA GGC TAT CCT CTC CTT-3' (配列番号 24)

と、

5'-GTG ATG GCC TCA AAG ACC-3' (配列番号 20) と、

と、

と、

と、

と、

10

20

30

40

50

5'-GAC GAG TAC CGG CGT CTC TTC GCA GGT AAA GTG ATC TGT-3' (配列番号 25) と、
5'-ATT ATG CGT CAC CAC ACA C-3' (配列番号 23) とからなり、

さらに、5'-CCA CGG CGT GCA AAG GA-3' (配列番号 26)、5'-GAG CCC TTC CAG GGC C
TC TT-3' (配列番号 27)、5'-GCC TCT TTG AGA TCC CAA GCT-3' (配列番号 28) のい
ずれか又は複数を含み、

プライマーセット 3 は、

5'-GTC ACG TGC TTT GAG TTG TTT CTC CGC CTC GAG TTT CTT CCG-3' (配列番号 36)
と、

5'-ATT CTG TTG GCC GGG TTG-3' (配列番号 32) と、

5'-TCA AGA ACG GCG AGT GGC TTC TCT TCT GAG GCG ATC CA-3' (配列番号 37) と、

5'-GGT CTG TCA TGG TGA CAA AC-3' (配列番号 35) とからなり、

さらに、5'-GCT CTC TCA AGG TCT TCG GG-3' (配列番号 38)、5'-CTT GCC ATC CGC G
AC TGG A-3' (配列番号 39) のいずれか又はすべてを含み、

プライマーセット 4 は、

5'-ACA GGT TTG TAA AAC CCA GTT CCA CAC TCC ATT GCC GAT GTC AC-3' (配列番号 47)
と、

5'-TGA CAA AAG CGA CAA AGG TT-3' (配列番号 43) と、

5'-ATG GCT TCG AAG ACC CTC GAA CGG AGA TCA ACT TCT CCT GTA-3' (配列番号 48)
と、

5'-TGG ACT GCG AGT CCT GC-3' (配列番号 46) とからなり、

さらに、5'-GGA AGT GTC TTT TGA GGA A-3' (配列番号 49)、5'-TTT GCA CGC CGT GGG
AC-3' (配列番号 50) のいずれか又はすべてを含む

ことを特徴とするプライマーセット。

【請求項 3】

配列番号 1 で示される口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列の、121番～351番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、又はそれらと相補的な塩基配列を基に設計されたオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 4】

口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列を基に設計された配列番号 2～12で示される塩基配列又はそれらと相補的な塩基配列から選ばれた、少なくとも連続する15塩基を含む請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 5】

口蹄疫ウイルスの標的核酸上の3'末端側からF3c、F2c、F1cという塩基配列領域を、5'末端側からB3、B2、B1という塩基配列領域を選択し、それぞれの相補的な塩基配列をF3、F2、F1、そしてB3c、B2c、B1cとしたときに、以下の(a)～(d)から選ばれた少なくとも1種の塩基配列からなることを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(a) 標的核酸のF2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のF1c領域を有する塩基配列。

(b) 標的核酸のF3領域を有する塩基配列。

(c) 標的核酸のB2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のB1c領域を有する塩基配列。

(d) 標的核酸のB3領域を有する塩基配列。

【請求項 6】

口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅でき、5'末端から3'末端に向かい以下の(e)～(g)から選ばれた塩基配列から成ることを特徴とする請求項 3 ないし 5 に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(e) 5'-(配列番号 2 の塩基配列に相補的な塩基配列)-(塩基数 0～50の任意の塩基配列)-(配列番号 3 の塩基配列)-3'

(f) 5'-(配列番号 4 の塩基配列に相補的な塩基配列)-(塩基数 0～50の任意の塩

10

20

30

40

50

基配列) - (配列番号5の塩基配列) -3'

(g) 5' - (配列番号7の塩基配列) - (塩基数0 ~ 50の任意の塩基配列) - (配列番号8の塩基配列に相補的な塩基配列) -3'

【請求項7】

配列番号17で示される口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列の、7883番 ~ 8092番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、又はそれらと相補的な塩基配列を基に設計されたオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項8】

口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列を基に設計された配列番号18 ~ 25で示される塩基配列又はそれらと相補的な塩基配列から選ばれた、少なくとも連続する15塩基を含む請求項7に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

10

【請求項9】

口蹄疫ウイルスの標的核酸上の3'末端側からF3c, F2c, F1cという塩基配列領域を、5'末端側からB3, B2, B1という塩基配列領域を選択し、それぞれの相補的な塩基配列をF3, F2, F1, そしてB3c, B2c, B1cとしたときに、以下の(a) ~ (d)から選ばれた少なくとも1種の塩基配列からなることを特徴とする請求項7又は8に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(a) 標的核酸のF2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のF1c領域を有する塩基配列。

(b) 標的核酸のF3領域を有する塩基配列。

20

(c) 標的核酸のB2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のB1c領域を有する塩基配列。

(d) 標的核酸のB3領域を有する塩基配列。

【請求項10】

口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅でき、5'末端から3'末端に向かい以下の(e) ~ (f)から選ばれた塩基配列から成ることを特徴とする請求項7ないし9に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(e) 5' - (配列番号18の塩基配列に相補的な塩基配列) - (塩基数0 ~ 50の任意の塩基配列) - (配列番号19の塩基配列) -3'

(f) 5' - (配列番号21の塩基配列) - (塩基数0 ~ 50の任意の塩基配列) - (配列番号22の塩基配列に相補的な塩基配列) -3'

30

【請求項11】

配列番号29で示される口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列の、4326番 ~ 4542番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、又はそれらと相補的な塩基配列を基に設計されたオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項12】

口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列を基に設計された配列番号30 ~ 37で示される塩基配列又はそれらと相補的な塩基配列から選ばれた、少なくとも連続する15塩基を含む請求項11に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項13】

口蹄疫ウイルスの標的核酸上の3'末端側からF3c, F2c, F1cという塩基配列領域を、5'末端側からB3, B2, B1という塩基配列領域を選択し、それぞれの相補的な塩基配列をF3, F2, F1, そしてB3c, B2c, B1cとしたときに、以下の(a) ~ (d)から選ばれた少なくとも1種の塩基配列からなることを特徴とする請求項11又は12に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

40

(a) 標的核酸のF2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のF1c領域を有する塩基配列。

(b) 標的核酸のF3領域を有する塩基配列。

(c) 標的核酸のB2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のB1c領域を有する塩基配列。

50

(d) 標的核酸のB3領域を有する塩基配列。

【請求項14】

口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅でき、5'末端から3'末端に向かい以下の(e)~(f)から選ばれた塩基配列から成ることを特徴とする請求項1ないし13に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(e) 5'-(配列番号30の塩基配列に相補的な塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号31の塩基配列)-3'

(f) 5'-(配列番号33の塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号34の塩基配列に相補的な塩基配列)-3'

【請求項15】

配列番号40で示される口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列の、7767番~7964番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、又はそれらと相補的な塩基配列を基に設計されたオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項16】

口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列を基に設計された配列番号41~48で示される塩基配列又はそれらと相補的な塩基配列から選ばれた、少なくとも連続する15塩基を含む請求項15に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項17】

口蹄疫ウイルスの標的核酸上の3'末端側からF3c、F2c、F1cという塩基配列領域を、5'末端側からB3、B2、B1という塩基配列領域を選択し、それぞれの相補的な塩基配列をF3、F2、F1、そしてB3c、B2c、B1cとしたときに、以下の(a)~(d)から選ばれた少なくとも1種の塩基配列からなることを特徴とする請求項15又は16に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(a) 標的核酸のF2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のF1c領域を有する塩基配列。

(b) 標的核酸のF3領域を有する塩基配列。

(c) 標的核酸のB2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のB1c領域を有する塩基配列。

(d) 標的核酸のB3領域を有する塩基配列。

【請求項18】

口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅でき、5'末端から3'末端に向かい以下の(e)~(h)から選ばれた塩基配列から成ることを特徴とする請求項15ないし17に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(e) 5'-(配列番号41の塩基配列に相補的な塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号42の塩基配列)-3'

(f) 5'-(配列番号44の塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号45の塩基配列に相補的な塩基配列)-3'

【請求項19】

請求項1又は2に記載のプライマーセットを用いて、口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅反応を行うことを特徴とする口蹄疫ウイルスの検出方法。

【請求項20】

請求項3ないし18に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅反応を行うことを特徴とする口蹄疫ウイルスの検出方法。

【請求項21】

請求項3ないし18に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせる1本、2本あるいは3本の反応チューブ内で用いて、4タイプの口蹄疫ウイルス遺伝子の標的核酸領域の増幅反応を行うことを特徴とする包括的な口蹄疫ウイルスの検出方法。

【請求項22】

口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅反応がLAMP法であることを特徴とする請求項19ないし21に記載の口蹄疫ウイルスの検出方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 3】

請求項 1 ないし 2 に記載のプライマーセットを用いて、口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅を検出することにより、口蹄疫ウイルス感染の有無を診断することを特徴とする口蹄疫ウイルス感染症の診断方法。

【請求項 2 4】

請求項 3 ないし 1 8 に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅を検出することにより、口蹄疫ウイルス感染の有無を診断することを特徴とする口蹄疫ウイルス感染症の診断方法。

【請求項 2 5】

請求項 3 ないし 1 8 に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせる 1 本、2 本あるいは 3 本の反応チューブ内で用いて、4 タイプの口蹄疫ウイルス遺伝子の標的核酸領域の増幅を検出することにより、口蹄疫ウイルス感染の有無を診断することを特徴とする口蹄疫ウイルス感染症の診断方法。

10

【請求項 2 6】

口蹄疫ウイルス検出もしくは口蹄疫診断のためのキットであって、請求項 1 又は 2 のプライマーセットを含むことを特徴とするキット。

【請求項 2 7】

口蹄疫ウイルス検出もしくは口蹄疫診断のためのキットであって、請求項 3 ないし 1 8 に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを含むことを特徴とするキット。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、口蹄疫ウイルスの包括的検出方法に関する。さらに詳しくは、口蹄疫ウイルスを検出するためのプライマー、プライマーセット、それらを用いた口蹄疫ウイルスの包括的検出方法および口蹄疫の診断方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

口蹄疫ウイルス (foot-and-mouth disease virus) は、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) アフトウイルス属 (Aphthovirus) に属する 1 本鎖 RNA ウィルスである。口蹄疫ウイルスは、O 型、A 型、C 型、Asia-1 型、SAT-1 型、SAT-2 型、SAT-3 型の 7 タイプに分類され、口蹄疫の原因ウイルスとして知られている。

30

【0003】

口蹄疫は、牛や豚などの偶蹄類動物に高い伝播性を持つ家畜の伝染病である。口蹄疫の主な臨床症状は、発熱、元気消失、多量のよだれ、舌や口中、蹄の付け根などの水疱形成であり、その結果、罹患した動物の生産性の低下や幼獣での高い致死率を引き起こしてしまう。そのため、日本をはじめとする口蹄疫清浄国において口蹄疫の感染が確認された場合、感染していない家畜への感染拡大を防ぐために、罹患した家畜 (患畜) は、発見され次第殺処分される。これら殺処分などを含め、口蹄疫被害にかかる経済的損失は甚大なものになってしまう。これらの事情を背景として、日本において口蹄疫は、家畜伝染病予防法により法定伝染病に指定されており、口蹄疫ウイルスの防疫や海外からの侵入時の迅速診断ならびに摘発淘汰は最重要課題となっている。

40

【0004】

口蹄疫の診断方法としては、口蹄疫の感染個体の血液・糞便・口腔内拭い液などの検体試料を用いて、抗体測定法、培養細胞を用いたウィルス分離法、分子生物学的試験法である PCR 法による診断が行われている。しかしながら、抗体測定法では、感染した個体内で口蹄疫ウイルスに対する抗体が形成される必要があり、抗体形成前や抗体形成量が少ない感染初期の個体を摘発することは出来ない。また、ウィルス分離法では、診断可能となる量のウィルスを培養するまで、通常、数日を要するため、迅速に診断ができないという問題を有する。

50

一方、PCR法は、抗体測定法やウイルス分離法と比較すると迅速に結果を得ることが出来る利点を有することから、口蹄疫において主たる診断法として用いられている。しかしながら、PCR法であっても検体試料入手から診断まで約5時間を必要としてしまう。さらには、検出感度を下回るウイルス量しか有さない検体試料の場合、偽陰性を示すことが問題となっている。実際、口蹄疫の被害拡大を抑制するためには、口蹄疫特有の臨床症状を示す前の感染初期の個体を迅速かつ高感度で診断し、摘発淘汰することが重要であるが、PCR法では、必ずしも迅速かつ高感度な診断が出来ているとはいえないのが現状といえる。事実、2010年に宮崎県において発生した口蹄疫では、口蹄疫にみられる典型的な症状を示さない個体が見られ、これら個体についてもPCR法による診断が行われてきた。しかしながら感染拡大を十分に防ぐことはできず、結果として、約29万頭にも及ぶ家畜の殺処分という大規模なものとなってしまった。

10

このことから分かるように、現在用いられている口蹄疫の診断方法は、迅速性および感度の点において必ずしも十分なものとは言えないため、新たな診断法の開発が望まれている。

【0005】

口蹄疫の新たな診断法として、LAMP法(Loop-Mediated Isothermal Amplification)を用いた口蹄疫の診断法が注目されている。LAMP法は、PCR法と同様、遺伝子などの核酸を増幅して診断する方法ではあるが、PCR法で不可欠とされる温度制御が不要な新しい核酸増幅法である(特許文献1)。そのため、LAMP法は、PCR法よりも簡易迅速かつ高感度な検査法といえる。

20

現在、LAMP法を用いて、様々な病原体を検出するプライマーセットが多数論文報告されており(非特許文献1から7)、口蹄疫ウイルスを検出するためのLAMP法についても、いくつかの報告がなされている(非特許文献8から10)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第00/28082号パンフレット

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Yamazaki, W., M.Taguchi and N. Misawa. 2010. Development of a loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Microbiol Immunol*.54:398-404

30

【非特許文献2】Yamazaki, W., Y.Kumeda, N. Misawa, Y. Nakaguchi and M. Nishibuchi. 2010. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes of *Vibriopara*haemolyticus and related *Vibrio* species. *Appl Environ Microbiol* 76:820-828.

【非特許文献3】Yamazaki, W., M.Taguchi, T. Kawai, K. Kawatsu, J. Sakata, K. Inoue and N. Misawa. 2009. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* innaturally contaminated chicken meat samples. *Appl Environ Microbiol* 75:1597-1603.

40

【非特許文献4】Yamazaki, W., M.Taguchi, M. Ishibashi, M. Nukina, N. Misawa and K. Inoue. 2009. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Campylobacter fetus*. *Vet Microbiol* 136:393-396.

【非特許文献5】Yamazaki, W., M.Taguchi, M. Ishibashi, M. Kitazato, M. Nukina, N. Misawa and K. Inoue. 2008. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol* 57:444-451.

【非特許文献6】Yamazaki, W., K. Seto, M. Taguchi, M. Ishibashi and K. Inoue. 2008. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using

50

a loop-mediated isothermal amplification. BMC Microbiol 8:94 (1-7).

【非特許文献7】Yamazaki, W., M.Ishibashi, R. Kawahara and K. Inoue. 2008. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. BMC Microbiol 8:163 (1-7).

【非特許文献8】Jun-Jun Shao, Hui-Yun Chang, Guang-Qing Zhou, Guo-Zheng Cong, Jun-Zheng Du, Tong Lin, Shan-Dian Gao, Ji-Jun He, Xiang-Tao Liu, Ji-Xing Liu and Jin-Liang Gao. 2010. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Intern J Appl Res Vet Med. 8:133-142.

【非特許文献9】Dukes, J.P., King, D.P. and Alexandersen, S. 2006. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. Arch Virol 151:1093-1106.

【非特許文献10】Li, J., Chen, Q., Xiong, W. and Fang, X.E. 2009. Establishment of RT-LAMP for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. Bing Du Xue Bao 25:137-142.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

非特許文献8から10では、LAMP法を用いた口蹄疫の診断方法が開示されている。

しかしながら非特許文献8では、中国国内で限定された期間に収集された59検体のうち、2%にあたる1検体は検出が出来ず、偽陰性を示している。また、非特許文献9では、世界各国で分離された口蹄疫ウイルス93株のうち、18%にあたる17株は検出が出来ず偽陰性を示している。

【0009】

発明者らは、これら非特許文献8から10に開示された技術の検証実験を行った。すなわち、発明者らは、特に東アジアおよび東南アジアで発生があり日本への侵入も危惧される、O型、A型、C型、Asia-1型の4タイプの口蹄疫ウイルスに着目し、非特許文献8から10の技術が、これら4タイプの口蹄疫ウイルスを十分に検出が可能かどうかについて検討を行った。これら4タイプの口蹄疫ウイルスは、サブタイプを含めて217検体が既存の塩基配列情報として知られている。これら217検体に対する非特許文献8から10記載のLAMP法プライマーの特異性を検証したところ、LAMP法において発明者らが重要な領域と考える核酸増幅反応で用いられる各プライマーの反応拠点側から5塩基の領域（以下、「反応重要領域」という）ならびにそれ以外の領域に極めて多くのミスマッチを有することを発明者らは見出した。加えて、発明者らは、非特許文献8および10記載のLAMP法プライマーは、中国国内の限定された期間に入手可能であった検体を使用して設計されたものであり、それを用いて口蹄疫の特異性を検証しているにすぎず、そのため、非特許文献8および10記載のLAMP法プライマーは、口蹄疫ウイルスの極めて多様な塩基配列に対応しきれていないことにも着目した。検証実験の結果、これら非特許文献8から10に見られるLAMP法プライマーでは、多様な口蹄疫ウイルスを十分に検出が可能とはいえないことを発明者らは確認した。

【0010】

上記事情を背景として、本発明では、多様な口蹄疫ウイルスを迅速かつ高感度に検出することが可能な口蹄疫ウイルスの検出方法の開発を課題とする。特に、東アジアおよび東南アジアで発生があり日本への侵入が危惧される、O型、A型、C型、Asia-1型の少なくとも4タイプの検出を目的とした口蹄疫ウイルスの検出方法の開発を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明者らは、鋭意研究の結果、O型、A型、C型、Asia-1型の4タイプの口蹄疫ウイルスを迅速かつ高感度で検出するオリゴヌクレオチドプライマーを見出した。すなわち、これらのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて口蹄疫ウイルスの遺伝子を増幅させること

により、口蹄疫ウイルスの検出が可能となる。加えて、発明者らは、オリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせたプライマーセットをも見出し、それらプライマーセットを単独もしくは組み合わせてLAMP法に用いることにより、口蹄疫ウイルスを迅速かつ高感度で検出することが可能となり、本発明を完成させた。

【 0 0 1 2 】

本発明は以下の構成からなる。

(1) 下記プライマーセットのいずれか又は複数を含む口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅するためのプライマーセットであって、

プライマーセット 1 は、

O-IPF-1 : 5'-ACA AGT CCT CCT CAA GCG ACG ATT CGC CTA GTT TTG CCC GT-3' (配列番号 1 0)

又はO-IPF-2 : 5'-GTC CCA TTT CTC CTG AAA ACG GGA TGA ACC TTC ACC CGG AAG-3' (配列番号 1 1) のいずれか又は両方と、

O-OPF : 5'-CAA CCA CAA GAA TTG CCT TC-3' (配列番号 6) と、

O-IPB : 5'-GAC TTG TAC AAA CAC GAT CTA CTC AGG CAC CCC TCT AGA CCT GGA A-3' (配列番号 1 2) と、

O-OPB : 5'-GTG GAG TCA AGC ACA GTA CA-3' (配列番号 9) とからなり、

プライマーセット 2 は、

A-IPF : 5'-GCC ACG GAG ATC AAC TTC TCC TCT TGA GGC TAT CCT CTC CTT-3' (配列番号 2 4) と、

A-OPF : 5'-GTG ATG GCC TCA AAG ACC-3' (配列番号 2 0) と、

A-IPB : 5'-GAC GAG TAC CGG CGT CTC TTC GCA GGT AAA GTG ATC TGT-3' (配列番号 2 5) と、

A-OPB : 5'-ATT ATG CGT CAC CAC ACA C-3' (配列番号 2 3) とからなり、

プライマーセット 3 は、

C-IPF : 5'-GTC ACG TGC TTT GAG TTG TTT CTC CGC CTC GAG TTT CTT CCG-3' (配列番号 3 6) と、

C-OPF : 5'-ATT CTG TTG GCC GGG TTG-3' (配列番号 3 2) と、

C-IPB : 5'-TCA AGA ACG GCG AGT GGC TTC TCT TCT GAG GCG ATC CA-3' (配列番号 3 7) と、

C-OPB : 5'-GGT CTG TCA TGG TGA CAA AC-3' (配列番号 3 5) とからなり、

プライマーセット 4 は、

Asia-1-IPF : 5'-ACA GGT TTG TAA AAC CCA GTT CCA CAC TCC ATT GCC GAT GTC AC-3' (配列番号 4 7) と、

Asia-1-OPF : 5'-TGA CAA AAG CGA CAA AGG TT-3' (配列番号 4 3) と、

Asia-1-IPB : 5'-ATG GCT TCG AAG ACC CTC GAA CGG AGA TCA ACT TCT CCT GTA-3' (配列番号 4 8) と、

Asia-1-OPB : 5'-TGG ACT GCG AGT CCT GC-3' (配列番号 4 6) とからなる、

ことを特徴とするプライマーセット。

(2) 下記プライマーセットのいずれか又は複数を含む口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅するためのプライマーセットであって、

プライマーセット 1 は、

O-IPF-1 : 5'-ACA AGT CCT CCT CAA GCG ACG ATT CGC CTA GTT TTG CCC GT-3' (配列番号 1 0)

又はO-IPF-2 : 5'-GTC CCA TTT CTC CTG AAA ACG GGA TGA ACC TTC ACC CGG AAG-3' (配列番号 1 1) のいずれか又は両方と、

O-OPF : 5'-CAA CCA CAA GAA TTG CCT TC-3' (配列番号 6) と、

O-IPB : 5'-GAC TTG TAC AAA CAC GAT CTA CTC AGG CAC CCC TCT AGA CCT GGA A-3' (配列番号 1 2) と、

O-OPB : 5'-GTG GAG TCA AGC ACA GTA CA-3' (配列番号 9) とを含み、

さらに、O-LPF-1 : 5'-TTT CGT GCG CAG ACG TCC C-3' (配列番号 13) ,
 O-LPF-2 : 5'-ACT AGG CGA ATT TGC CGT TTT A-3' (配列番号 14) ,
 O-LPB-1 : 5'-GCA ACT TGA AAC TCC GCC T-3' (配列番号 15) ,
 O-LPB-2 : 5'-CCG ACA CAA ACC GTG CAA-3' (配列番号 16) のいずれか又は複数を含み

プライマーセット 2 は、

A-IPF : 5'-GCC ACG GAG ATC AAC TTC TCC TCT TGA GGC TAT CCT CTC CTT-3' (配列番号 24) と、

A-OPF : 5'-GTG ATG GCC TCA AAG ACC-3' (配列番号 20) と、

A-IPB : 5'-GAC GAG TAC CGG CGT CTC TTC GCA GGT AAA GTG ATC TGT-3' (配列番号 25) と、

A-OPB : 5'-ATT ATG CGT CAC CAC ACA C-3' (配列番号 23) とからなり、

さらに、A-LPF : 5'-CCA CGG CGT GCA AAG GA-3' (配列番号 26) ,

A-LPB-1 : 5'-GAG CCC TTC CAG GGC CTC TT-3' (配列番号 27) ,

A-LPB-2 : 5'-GCC TCT TTG AGA TCC CAA GCT-3' (配列番号 28) のいずれか又は複数を含み、

プライマーセット 3 は、

C-IPF : 5'-GTC ACG TGC TTT GAG TTG TTT CTC CGC CTC GAG TTT CTT CCG-3' (配列番号 36) と、

C-OPF : 5'-ATT CTG TTG GCC GGG TTG-3' (配列番号 32) と、

C-IPB : 5'-TCA AGA ACG GCG AGT GGC TTC TCT TCT GAG GCG ATC CA-3' (配列番号 37) と、

C-OPB : 5'-GGT CTG TCA TGG TGA CAA AC-3' (配列番号 35) とからなり、

さらに、C-LPF : 5'-GCT CTC TCA AGG TCT TCG GG-3' (配列番号 38) ,

C-LPB : 5'-CTT GCC ATC CGC GAC TGG A-3' (配列番号 39) のいずれか又はすべてを含み、

プライマーセット 4 は、

Asia-1-IPF : 5'-ACA GGT TTG TAA AAC CCA GTT CCA CAC TCC ATT GCC GAT GTC AC-3' (配列番号 47) と、

Asia-1-OPF : 5'-TGA CAA AAG CGA CAA AGG TT-3' (配列番号 43) と、

Asia-1-IPB : 5'-ATG GCT TCG AAG ACC CTC GAA CGG AGA TCA ACT TCT CCT GTA-3' (配列番号 48) と、

Asia-1-OPB : 5'-TGG ACT GCG AGT CCT GC-3' (配列番号 46) とからなり、

さらに、Asia-1-LPF : 5'-GGA AGT GTC TTT TGA GGA A-3' (配列番号 49) ,

Asia-1-LPB : 5'-TTT GCA CGC CGT GGG AC-3' (配列番号 50) のいずれか又はすべてを含む、

ことを特徴とするプライマーセット。

【 0 0 1 3 】

(3) 配列番号 1 で示される口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列 (GenBank accession No. AB079061) の、121番~351番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、又はそれらと相補的な塩基配列を基に設計されたオリゴヌクレオチドプライマー。

(4) 口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列を基に設計された配列番号 2 ~ 12 で示される塩基配列又はそれらと相補的な塩基配列から選ばれた、少なくとも連続する 15 塩基を含む (3) に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(5) 口蹄疫ウイルスの標的核酸上の 3' 末端側から F3c, F2c, F1c という塩基配列領域を、5' 末端側から B3, B2, B1 という塩基配列領域を選択し、それぞれの相補的塩基配列を F3, F2, F1, そして B3c, B2c, B1c としたときに、以下の (a) ~ (d) から選ばれた少なくとも 1 種の塩基配列からなることを特徴とする (3) 又は (4) に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(a) 標的核酸の F2 領域を 3' 末端側に有し、5' 末端側に標的核酸の F1c 領域を有する

10

20

30

40

50

塩基配列。

(b) 標的核酸のF3領域を有する塩基配列。

(c) 標的核酸のB2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のB1c領域を有する塩基配列。

(d) 標的核酸のB3領域を有する塩基配列。

(6) 口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅でき、5'末端から3'末端に向かい以下の(e)~(g)から選ばれた塩基配列から成ることを特徴とする(3)~(5)に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(e) 5'-(配列番号2の塩基配列に相補的な塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号3の塩基配列)-3'

(f) 5'-(配列番号4の塩基配列に相補的な塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号5の塩基配列)-3'

(g) 5'-(配列番号7の塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号8の塩基配列に相補的な塩基配列)-3'

【0014】

(7) 配列番号17で示される口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列(GenBank accession No. AY593802)の、7883番~8092番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、又はそれらと相補的な塩基配列を基に設計されたオリゴヌクレオチドプライマー。

(8) 口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列を基に設計された配列番号18~25で示される塩基配列又はそれらと相補的な塩基配列から選ばれた、少なくとも連続する15塩基を含む(7)に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(9) 口蹄疫ウイルスの標的核酸上の3'末端側からF3c、F2c、F1cという塩基配列領域を、5'末端側からB3、B2、B1という塩基配列領域を選択し、それぞれの相補的な塩基配列をF3、F2、F1、そしてB3c、B2c、B1cとしたときに、以下の(a)~(d)から選ばれた少なくとも1種の塩基配列からなることを特徴とする(7)又は(8)に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(a) 標的核酸のF2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のF1c領域を有する塩基配列。

(b) 標的核酸のF3領域を有する塩基配列。

(c) 標的核酸のB2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のB1c領域を有する塩基配列。

(d) 標的核酸のB3領域を有する塩基配列。

(10) 口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅でき、5'末端から3'末端に向かい以下の(e)~(f)から選ばれた塩基配列から成ることを特徴とする(7)~(9)に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(e) 5'-(配列番号18の塩基配列に相補的な塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号19の塩基配列)-3'

(f) 5'-(配列番号21の塩基配列)-(塩基数0~50の任意の塩基配列)-(配列番号22の塩基配列に相補的な塩基配列)-3'

【0015】

(11) 配列番号29で示される口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列(GenBank accession No. AY593809)の、4326番~4542番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、又はそれらと相補的な塩基配列を基に設計されたオリゴヌクレオチドプライマー。

(12) 口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列を基に設計された配列番号30~37で示される塩基配列又はそれらと相補的な塩基配列から選ばれた、少なくとも連続する15塩基を含む(11)に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(13) 口蹄疫ウイルスの標的核酸上の3'末端側からF3c、F2c、F1cという塩基配列領域を、5'末端側からB3、B2、B1という塩基配列領域を選択し、それぞれの相補的な塩基配列をF3、F2、F1、そしてB3c、B2c、B1cとしたときに、以下の(a)~(d)から選ばれた少なくとも1種の塩基配列からなることを特徴とする(11)又は(12)に記載のオリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドプライマー。

(a) 標的核酸のF2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のF1c領域を有する塩基配列。

(b) 標的核酸のF3領域を有する塩基配列。

(c) 標的核酸のB2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のB1c領域を有する塩基配列。

(d) 標的核酸のB3領域を有する塩基配列。

(14) 口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅でき、5'末端から3'末端に向かい以下の(e) ~ (f) から選ばれた塩基配列から成ることを特徴とする(11) ~ (13) に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(e) 5' - (配列番号30の塩基配列に相補的な塩基配列) - (塩基数0 ~ 50の任意の塩基配列) - (配列番号31の塩基配列) - 3'

(f) 5' - (配列番号33の塩基配列) - (塩基数0 ~ 50の任意の塩基配列) - (配列番号34の塩基配列に相補的な塩基配列) - 3'

【 0016 】

(15) 配列番号40で示される口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列(GenBank accession No. AY593795) の、7767番 ~ 7964番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、又はそれらと相補的な塩基配列を基に設計されたオリゴヌクレオチドプライマー。

(16) 口蹄疫ウイルス遺伝子の塩基配列を基に設計された配列番号41 ~ 48で示される塩基配列又はそれらと相補的な塩基配列から選ばれた、少なくとも連続する15塩基を含む(15) に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(17) 口蹄疫ウイルスの標的核酸上の3'末端側からF3c、F2c、F1cという塩基配列領域を、5'末端側からB3、B2、B1という塩基配列領域を選択し、それぞれの相補的な塩基配列をF3、F2、F1、そしてB3c、B2c、B1cとしたときに、以下の(a) ~ (d) から選ばれた少なくとも1種の塩基配列からなることを特徴とする(15) 又は(16) に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(a) 標的核酸のF2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のF1c領域を有する塩基配列。

(b) 標的核酸のF3領域を有する塩基配列。

(c) 標的核酸のB2領域を3'末端側に有し、5'末端側に標的核酸のB1c領域を有する塩基配列。

(d) 標的核酸のB3領域を有する塩基配列。

(18) 口蹄疫ウイルスに特異的な塩基配列を増幅でき、5'末端から3'末端に向かい以下の(e) ~ (h) から選ばれた塩基配列から成ることを特徴とする(15) ~ (17) に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(e) 5' - (配列番号41の塩基配列に相補的な塩基配列) - (塩基数0 ~ 50の任意の塩基配列) - (配列番号42の塩基配列) - 3'

(f) 5' - (配列番号44の塩基配列) - (塩基数0 ~ 50の任意の塩基配列) - (配列番号45の塩基配列に相補的な塩基配列) - 3'

【 0017 】

(19) (1) 又は(2) に記載のプライマーセットを用いて、口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅反応を行うことを特徴とする口蹄疫ウイルスの検出方法。

(20) (3) ~ (18) に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅反応を行うことを特徴とする口蹄疫ウイルスの検出方法。

(21) (3) ~ (18) に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせて1本、2本あるいは3本の反応チューブ内で用いて、4タイプの口蹄疫ウイルス遺伝子の標的核酸領域の増幅反応を行うことを特徴とする包括的な口蹄疫ウイルスの検出方法。

(22) 口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅反応がLAMP法であることを特徴とする(19) ~ (21) に記載の口蹄疫ウイルスの検出方法。

(23) (1) 又は(2) に記載のプライマーセットを用いて、口蹄疫ウイルスの標的核酸

10

20

30

40

50

酸領域の増幅を検出することにより、口蹄疫ウイルス感染の有無を診断することを特徴とする口蹄疫ウイルス感染症の診断方法。

(24)(3)～(18)記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて口蹄疫ウイルスの標的核酸領域の増幅を検出することにより、口蹄疫ウイルス感染の有無を診断することを特徴とする口蹄疫ウイルス感染症の診断方法。

(25)(3)～(18)記載のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせて1本、2本あるいは3本の反応チューブ内で用いて、4タイプの口蹄疫ウイルス遺伝子の標的核酸領域の増幅を検出することにより、口蹄疫ウイルス感染の有無を診断することを特徴とする口蹄疫ウイルス感染症の診断方法。

(26)口蹄疫ウイルス検出もしくは口蹄疫診断のためのキットであって、(1)又は(2)のプライマーセットを含むことを特徴とするキット。

(27)口蹄疫ウイルス検出もしくは口蹄疫診断のためのキットであって、(3)～(18)に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを含むことを特徴とするキット。

【0018】

本明細書において、プライマーとは、特に限定しない限り、複数の塩基配列を有する核酸断片をいい、DNAポリメラーゼによるDNA合成の際用いることができるものをいう。

また、プライマーセットとは、複数個のプライマーの組合せのみならず、そのようなプライマーの組合せを複数個含むものも合わせてプライマーセットというものとする。

さらに、LAMP法(Loop-Mediated Isothermal Amplification)とは、鑄型となるヌクレオチドに自身の3'末端をアニールさせて相補鎖合成の起点とするとともに、このとき形成されるループにアニールするプライマーを組み合わせることにより、等温での相補鎖合成反応を可能とした核酸増幅法として定義される。

【発明の効果】

【0019】

本発明により、従来法よりも高感度で迅速かつ簡易に口蹄疫ウイルスを検出することが可能となった。特に、日本への侵入が危惧される4タイプの口蹄疫ウイルスを、特異的、高感度かつ迅速に検出することが可能となり、日本を含めたアジア地域での口蹄疫ウイルスに対する防疫に貢献することが期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】配列番号51の人工塩基配列とプライマーセット1を用いてLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図2】配列番号52の人工塩基配列とプライマーセット2を用いてLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図3】配列番号53の人工塩基配列とプライマーセット3を用いてLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図4】配列番号54の人工塩基配列とプライマーセット4を用いてLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図5】配列番号51の人工塩基配列とプライマーセット1、プライマーセット2を混合してLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図6】配列番号52の人工塩基配列とプライマーセット1、プライマーセット2を混合してLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図7】配列番号53の人工塩基配列とプライマーセット3、プライマーセット4を混合してLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図8】配列番号54の人工塩基配列とプライマーセット3、プライマーセット4を混合してLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図9】配列番号51の人工塩基配列とプライマーセット1、プライマーセット2、プライマーセット3、プライマーセット4を混合してLAMP法を行った場合の、反応溶液中の濁

10

20

30

40

50

度の経時変化を示した図

【図10】配列番号52の人工塩基配列とプライマーセット1，プライマーセット2，プライマーセット3，プライマーセット4を混合してLAMP法を行った場合の，反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図11】配列番号53の人工塩基配列とプライマーセット1，プライマーセット2，プライマーセット3，プライマーセット4を混合してLAMP法を行った場合の，反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図12】配列番号54の人工塩基配列とプライマーセット1，プライマーセット2，プライマーセット3，プライマーセット4を混合してLAMP法を行った場合の，反応溶液中の濁度の経時変化を示した図

【図13】電気泳動法によるPCR法の検出感度を示した図

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下，下記のプライマーセットを用いたLAMP法による口蹄疫ウイルス検出法を一例として説明する。これら1から4に例示するプライマーセットは，プライマーセット1がO型，プライマーセット2がA型，プライマーセット3がC型，プライマーセット4がAsia-1型の口蹄疫ウイルスを主な検出対象とするプライマーのセットである。これらプライマーセットは，主な検出対象である口蹄疫ウイルスのタイプを高率で検出することが可能であるが，主な検出対象の型の口蹄疫ウイルスのみの検出に限定する意図ではなく，その他の型の口蹄疫ウイルスの検出に用いてもかまわない。例えば，プライマーセット1を用いて，A型やC型の口蹄疫ウイルスを検出するなどである。通常，口蹄疫ウイルスを検出する場合，対象となる型が分からないことも多い。その場合などには種々のプライマーセットを複合的に用いることにより，より正確な口蹄疫ウイルス検出や診断が可能となることが期待できるからである。

なお，詳細は後述するが，IPFはインナープライマーF，OPFはアウタープライマーF，IPBがインナープライマーB，OPBがアウタープライマーB，LPFがループプライマーF，LPBがループプライマーBの略である。

1. プライマーセット1

O-IPF-1: 5'-ACA AGT CCT CCT CAA GCG ACG ATT CGC CTA GTT TTG CCC GT-3' (配列番号10)

O-IPF-2: 5'-GTC CCA TTT CTC CTG AAA ACG GGA TGA ACC TTC ACC CGG AAG-3' (配列番号11)

O-OPF: 5'-CAA CCA CAA GAA TTG CCT TC-3' (配列番号6)

O-IPB: 5'-GAC TTG TAC AAA CAC GAT CTA CTC AGG CAC CCC TCT AGA CCT GGA A-3' (配列番号12)

O-OPB: 5'-GTG GAG TCA AGC ACA GTA CA-3' (配列番号9)

O-LPF-1: 5'-TTT CGT GCG CAG ACG TCC C-3' (配列番号13)

O-LPF-2: 5'-ACT AGG CGA ATT TGC CGT TTT A-3' (配列番号14)

O-LPB-1: 5'-GCA ACT TGA AAC TCC GCC T-3' (配列番号15)

O-LPB-2: 5'-CCG ACA CAA ACC GTG CAA-3' (配列番号16)

2. プライマーセット2

A-IPF: 5'-GCC ACG GAG ATC AAC TTC TCC TCT TGA GGC TAT CCT CTC CTT-3' (配列番号24)

A-OPF: 5'-GTG ATG GCC TCA AAG ACC-3' (配列番号20)

A-IPB: 5'-GAC GAG TAC CGG CGT CTC TTC GCA GGT AAA GTG ATC TGT-3' (配列番号25)

A-OPB: 5'-ATT ATG CGT CAC CAC ACA C-3' (配列番号23)

A-LPF: 5'-CCA CGG CGT GCA AAG GA-3' (配列番号26)

10

20

30

40

50

A-LPB-1 : 5'-GAG CCC TTC CAG GGC CTC TT-3' (配列番号 2 7)

A-LPB-2 : 5'-GCC TCT TTG AGA TCC CAA GCT-3' (配列番号 2 8)

3 . プライマーセット 3

C-IPF : 5'-GTC ACG TGC TTT GAG TTG TTT CTC CGC CTC GAG TTT CTT CCG-3' (配列番号 3 6)

C-OPF : 5'-ATT CTG TTG GCC GGG TTG-3' (配列番号 3 2)

C-IPB : 5'-TCA AGA ACG GCG AGT GGC TTC TCT TCT GAG GCG ATC CA-3' (配列番号 3 7)

C-OPB : 5'-GGT CTG TCA TGG TGA CAA AC-3' (配列番号 3 5)

10

C-LPF : 5'-GCT CTC TCA AGG TCT TCG GG-3' (配列番号 3 8)

C-LPB : 5'-CTT GCC ATC CGC GAC TGG A-3' (配列番号 3 9)

4 . プライマーセット 4

Asia-1-IPF : 5'-ACA GGT TTG TAA AAC CCA GTT CCA CAC TCC ATT GCC GAT GTC AC-3' (配列番号 4 7)

Asia-1-OPF : 5'-TGA CAA AAG CGA CAA AGG TT-3' (配列番号 4 3)

Asia-1-IPB : 5'-ATG GCT TCG AAG ACC CTC GAA CGG AGA TCA ACT TCT CCT GTA-3' (配列番号 4 8)

Asia-1-OPB : 5'-TGG ACT GCG AGT CCT GC-3' (配列番号 4 6)

20

Asia-1-LPF : 5'-GGA AGT GTC TTT TGA GGA A-3' (配列番号 4 9)

Asia-1-LPB : 5'-TTT GCA CGC CGT GGG AC-3' (配列番号 5 0)

【 0 0 2 2 】

まず、本明細書におけるLAMP法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification) について説明する。本明細書においてLAMP法とは、鋳型となるヌクレオチドに自身の3'末端をアニールさせて相補鎖合成の起点とするとともに、このとき形成されるループにアニールするプライマーを組み合わせるにより、等温での相補鎖合成反応を可能とした核酸増幅法として定義される。LAMP法では、プライマーの3'末端が常に試料に由来する領域に対してアニールするために、塩基配列の相補的結合によるチェック機構が繰り返し機能する。この結果として、LAMP法は、高感度かつ特異性の高い核酸増幅反応が可能であるという特徴を有する。

30

【 0 0 2 3 】

LAMP法の核酸増幅で用いられるオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸の塩基配列の計6領域、すなわち3'末端側からF3c、F2c、F1cという領域と、5'末端側からB3、B2、B1という領域の塩基配列を認識する少なくとも4種類のプライマーであって、各インナープライマー-F及びB、アウタープライマー-F及びBと呼ばれる。また、F1c、F2c、F3cの相補的な塩基配列はF1、F2、F3と、B1、B2、B3の相補的な塩基配列はB1c、B2c、B3cとそれぞれ呼ばれる。

【 0 0 2 4 】

40

本明細書においてインナープライマーとは、標的塩基配列上の「ある特定のヌクレオチド配列領域」を認識し、かつ合成起点を与える塩基配列を3'末端に有し、同時にこのプライマーを起点とする核酸合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を5'末端に有するオリゴヌクレオチドとして定義される。ここで、「F2より選ばれた塩基配列」及び「F1cより選ばれた塩基配列」を含むプライマーをインナープライマー-F (IPF)、そして「B2より選ばれた塩基配列」と「B1cより選ばれた塩基配列」を含むプライマーをインナープライマー-B (IPB) と呼ぶ。インナープライマーは、「F2より選ばれた塩基配列」と「F1cより選ばれた塩基配列」の間、あるいは「B2より選ばれた塩基配列」と「B1cより選ばれた塩基配列」の間に、塩基数0~50の任意の塩基配列を持って良い。

【 0 0 2 5 】

50

一方、本明細書においてアウタープライマーとは、標的塩基配列上の「ある特定のヌクレオチド配列領域の3'末端側に存在するある特定のヌクレオチド配列領域」を認識かつ合成起点を与える塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとして定義される。ここで、「F3より選ばれた塩基配列」を含むプライマーをアウタープライマー-F(以下OPF)、「B3より選ばれた塩基配列」を含むプライマーをアウタープライマー-B(以下OPB)と呼ぶ。

【0026】

ここで、各プライマーにおけるFとは、標的塩基配列のセンス鎖と相補的に結合し、合成起点を提供するプライマー表示であり、一方Bとは、標的塩基配列のアンチセンス鎖と相補的に結合し、合成起点を提供するプライマー表示である。ここで、プライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドの長さは、10塩基以上、好ましくは15塩基以上で、化学合成あるいは天然のどちらでも良く、各プライマーは単一のオリゴヌクレオチドであってもよく、複数のオリゴヌクレオチドの混合物であってもよい。また、各プライマーは1種類でも2種類でも良い。

10

【0027】

このようにLAMP法の核酸増幅においては、それぞれFとBに対応するインナープライマーとアウタープライマーの少なくとも4種類が必須の構成プライマーとなる。前述のプライマーセットでいうと、プライマーセット1では、IPFとして配列番号10ないし11、IPBとして配列番号12、OPFとして配列番号6、OPBとして配列番号9のプライマーが役割を果たすこととなる。同様に、プライマーセット2では、IPFとして配列番号24、IPBとして配列番号25、OPFとして配列番号20、OPBとして配列番号23、プライマーセット3では、IPFとして配列番号36、IPBとして配列番号37、OPFとして配列番号32、OPBとして配列番号35、プライマーセット4では、IPFとして配列番号47、IPBとして配列番号48、OPFとして配列番号43、OPBとして配列番号46のプライマーがそれぞれ役割を果たすこととなる。

20

【0028】

続いてLAMP法の一連の流れについて説明を行う。

LAMP法による口蹄疫ウイルス検出のためには、検体試料が必要である。この検体試料としては、通常用いられるあらゆる検体試料を用いることが可能であり、例えば、ウイルス、ウイルスを含む培養細胞ならびに培養液、牛などの家畜由来の検体などが挙げられる。この場合、家畜由来の検体を検体試料として用いることがより好ましく、例えば血液、血清、体液、組織抽出液、あるいは組織拭い液ならびに組織拭き取り検体を検体試料として用いることができる。これにより、迅速な口蹄疫ウイルス検出が可能となるという効果を有する。

30

口蹄疫ウイルス検出のための検体試料については、通常用いられる前処理を行い後述するLAMP法に用いる際の試料とすることができる。例えば、タンパク質分解酵素等による組織細胞由来タンパク質を分解後、フェノール及びクロロホルムを用いて核酸抽出や精製を行ったり、市販されている抽出キット(例えばキアゲン社のRNeasy Mini Kit)を用いて得られた核酸を抽出したりするなどである。

【0029】

検体試料の準備ができたら、前述のプライマーセットを用いて、核酸増幅のための操作を行う。この核酸増幅の際の操作として、例えば、反応Buffer中、少なくとも4種類のプライマー(IPF、IPB、OPF、OPB)、鋳型依存性核酸合成酵素、デオキシヌクレオチド3リン酸などの基質を、60から65℃で15分から1時間程度インキュベートすればよい。この場合、口蹄疫ウイルスはRNAウイルスであるため、鋳型がDNAの場合の反応液に逆転写酵素を添加する事で、同様に核酸増幅反応を進めることができる(RT-LAMP法)。また、上述の通り、ループプライマーをさらに用いることもできる。

40

【0030】

鋳型依存性核酸合成酵素は、通常用いられるあらゆる鋳型依存性核酸合成酵素を用いることができる。このような酵素として、例えば、Bst DNAポリメラーゼ(ラージフラグメント)、Bca(exo-)DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント

50

等が挙げられ、好ましくはBst DNAポリメラーゼ（ラージフラグメント）が挙げられる。

RT-LAMP法に用いる逆転写酵素としては、通常用いられるあらゆる逆転写酵素を用いることができる。このような酵素として、例えばAMVやMMLVの逆転写酵素、SuperscriptII、ReverTraAce、Thermoscriptなどが挙げられ、より好ましくは、AMV逆転写酵素が挙げられる。またBca DNAポリメラーゼのように、逆転写酵素活性とDNAポリメラーゼ活性の両活性を有する酵素があり、このような酵素を用いると、RT-LAMP反応を1つの酵素で行う事ができるという利点を有する。

【0031】

プライマーセットは、単独のプライマーセットを用いて核酸増幅操作を行うこともできるし、複数を組み合わせて核酸増幅操作を行うこともできる。複数のプライマーセットを組み合わせて核酸増幅操作を行うことにより、少ないサンプルで同時に複数のタイプの口蹄疫ウイルス検出が可能となるため、簡便性と迅速性の観点から有用である。加えてプライマーセットは、口蹄疫ウイルスの多様性に対応するため、1種類のプライマーに対して複数用いることも可能である。1つのプライマーセットでIPFを複数用いるなどがこれに該当し、例えば、前述のプライマーセット1で、配列番号10と11の二つのIPFを用いていることがこれに該当する。さらに、プライマーセットでは、感度を向上させるために、ループプライマーを用いることができ、このループプライマーについても同種のものを複数用いることが可能である。例えば、前述のプライマーセット1で、配列番号13と14のLBFを用いていることがこれに該当する。

10

【0032】

これらプライマーセットは、少なくとも4種類のプライマーから構成される。

O型を検出するプライマーセットの場合、配列番号1（GenBank accession No. AB079061）で示される、121番から351番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、もしくはそれらと相補的な塩基配列を基に設計することができる。同様に、A型を検出するプライマーセットの場合は配列番号17（GenBank accession No. AY593802）で示される7883番～8092番、C型を検出するプライマーセットの場合は配列番号29（GenBank accession No. AY593809）で示される4326番～4542番、Asia-1型を検出するプライマーセットの場合は配列番号40（GenBank accession No. AY593795）で示される7767番～7964番の塩基配列から選ばれた任意の塩基配列、もしくはそれらと相補的な塩基配列を基に設計することができる。これにより、反応重要領域においてミスマッチの少ないプライマーの設計が可能となり、LAMP法における感度、特異度を高めることが可能となる。この場合の塩基配列の長さとしては、核酸増幅効率の観点から、少なくとも10、好ましくは15以上の塩基配列を有することが好ましい。加えて、IPFとしてのプライマーを選択する場合は40塩基程度、IPBとしてのプライマーを選択する場合は40塩基程度、OPFとしてのプライマーを選択する場合は20塩基程度、OPBとしてのプライマーを選択する場合は20塩基程度を有することが好ましい。

20

30

【0033】

このようにプライマー設計に必要とされる反応重要領域でのミスマッチを少なくすることによりLAMP法における感度、特異度を高めるという観点に加え、一定のGC含量を有しプライマーとしての安定性を高め、かつ、口蹄疫ウイルスの多様な塩基配列に対応できるインナープライマー部分として、配列番号1の塩基配列を基に配列番号2から5、7と8を用いることができる。これらのプライマー部分は、主にO型の口蹄疫ウイルスを検出する目的で、配列番号2がIPFのプライマーの一部、配列番号3がIPFのプライマーの一部、配列番号4がIPFのプライマーの一部、配列番号5がIPFのプライマーの一部、配列番号7がIPBのプライマーの一部、配列番号8がIPBのプライマーの一部として用いることができる。これらのプライマー部分もしくはプライマー部分と相補的な塩基配列を組み合わせることで、適切なインナープライマー設計を行うことができる。例えば、配列番号2は、5'-cgt cgc ttg agg agg act tgt-3'、配列番号3は5'-att cgc cta gtt ttg ccc gt-3'の塩基配列を有するが、配列番号2と相補的な塩基配列5'-aca agt cct cct caa gcg acg-3'と配列番号3を組み合わせることにより、5'-aca agt cct cct caa gcg acg at

40

50

t cgc cta gtt ttg ccc gt-3' (配列番号 10) とすることができる。この場合、核酸増幅機能を損なわないことから、配列番号 2 に相補的な塩基配列と配列番号 3 の間に 0 から 50 の塩基配列を挿入しても構わない。同様に、配列番号 4 と相補的な塩基配列と配列番号 5 により配列番号 11 の塩基配列、配列番号 7 と配列番号 8 と相補的な塩基配列で配列番号 12 の塩基配列とすることができ、それぞれの塩基配列の間に 0 から 50 の塩基配列を挿入しても構わない。

また、同様のプライマー設計コンセプトにより、アウタープライマーとして配列番号 6 (OPF)、配列番号 9 (OPB) の塩基配列とすることができる。

【0034】

その他、A型やC型、Asia-1型の口蹄疫ウイルスに関するプライマーについても、0型と同様のプライマー設計コンセプトを用いることができる。この場合、主にA型の口蹄疫ウイルスを検出する目的で、配列番号 18 がIPFのプライマーの一部、配列番号 19 がIPFのプライマーの一部、配列番号 20 がOPF、配列番号 21 がIPBのプライマーの一部、配列番号 22 がIPBのプライマーの一部、配列番号 23 がOPB、配列番号 24 がIPF (配列番号 18 に相補的な塩基配列と、配列番号 19 の組合せ)、配列番号 25 がIPB (配列番号 21 と、配列番号 22 に相補的な塩基配列の組合せ) のプライマーとして用いることができる。加えて、主にC型の口蹄疫ウイルスを検出する目的で、配列番号 30 がIPFのプライマーの一部、配列番号 31 がIPFのプライマーの一部、配列番号 32 がOPF、配列番号 33 がIPBのプライマーの一部、配列番号 34 がIPBのプライマーの一部、配列番号 35 がOPB、配列番号 36 がIPF (配列番号 30 に相補的な塩基配列と、配列番号 31 の組合せ)、配列番号 37 がIPB (配列番号 33 と、配列番号 34 に相補的な塩基配列の組合せ) のプライマーとして用いることができる。さらに、主にAsia-1型の口蹄疫ウイルスを検出する目的で、配列番号 41 がIPFのプライマーの一部、配列番号 42 がIPFのプライマーの一部、配列番号 43 がOPF、配列番号 44 がIPBのプライマーの一部、配列番号 45 がIPBのプライマーの一部、配列番号 46 がOPB、配列番号 47 がIPF (配列番号 41 に相補的な塩基配列と配列番号 42 の組合せ)、配列番号 48 がIPB (配列番号 44 と、配列番号 45 に相補的な塩基配列の組合せ) のプライマーとして用いることができる。

【0035】

核酸増幅反応操作が終了したら、核酸増幅産物の検出を行う。核酸増幅産物の検出には、通常用いられるあらゆる検出方法を用いることができる。例えば、増幅された塩基配列を特異的に認識する標識オリゴヌクレオチドを用いた検出や蛍光性インターカレーター法、アガロースゲル電気泳動法による検出などである。アガロースゲル電気泳動法においてLAMP増幅産物は、塩基長の異なる多数のバンドがラダー(はしご)状に検出される。

加えて、LAMP法では目視による検出ができる場合があり、迅速な口蹄疫ウイルス検出が必要な場合に好ましい。すなわち、LAMP法では、核酸の合成により基質が大量に消費され、副産物であるピロリン酸が、共存するマグネシウムと反応してピロリン酸マグネシウムとなり、反応液が肉眼で確認できる程度に白濁することから口蹄疫ウイルスの検出が可能である。この場合、反応中の濁度上昇経過や反応終了後の濁度を光学的に観察できる分光光度計等の測定機器を用いて、口蹄疫ウイルスの検出を確認することも可能である。

【0036】

本発明のプライマーやプライマーセットを用いて核酸増幅の検出を行う際に必要な各種の試薬類は、あらかじめパッケージングしてキット化することができる。例えば、本発明のプライマーあるいはループプライマーとして必要な各種のオリゴヌクレオチド、核酸合成の基質となる4種類のdNTP、鎖置換活性を有する鋳型依存性核酸合成酵素、逆転写活性を持つ酵素、酵素反応に好適な条件を与える緩衝液や塩類、酵素や鋳型を安定化する保護剤、さらに必要に応じて反応生成物の検出に必要な試薬類がキットとして提供される。

【実施例】

【0037】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【 0 0 3 8 】

< < 実験 1 , 検出感度の確認 > >

本発明におけるプライマーを用いた場合のLAMP法による検出感度について、PCR法と比較として実験を行った。

【 0 0 3 9 】

< 陽性コントロール試料の調製 >

ファスマック社製の人工塩基配列（配列番号 5 1 ~ 5 4）をTE緩衝液で溶解し、10倍ずつTE緩衝液で段階的に希釈を行い、コピー数を算出した上で、鋳型DNAとして用いた。

なお、配列番号 5 1 が口蹄疫ウイルスO型、配列番号 5 2 が口蹄疫ウイルスA型、配列番号 5 3 が口蹄疫ウイルスC型、配列番号 5 4 が口蹄疫ウイルスAsia-1型の陽性コントロールとして用いた。

【 0 0 4 0 】

< 実施例 , LAMP法に使用したプライマー >

下記のプライマーセットを用いた。

(実施例 1) プライマーセット 1

O-IPF-1 : 5' -ACA AGT CCT CCT CAA GCG ACG ATT CGC CTA GTT TTG CCC GT-3' (配列番号 1 0)

O-IPF-2 : 5' -GTC CCA TTT CTC CTG AAA ACG GGA TGA ACC TTC ACC CGG AAG-3' (配列番号 1 1)

O-OPF : 5' -CAA CCA CAA GAA TTG CCT TC-3' (配列番号 6)

O-IPB : 5' -GAC TTG TAC AAA CAC GAT CTA CTC AGG CAC CCC TCT AGA CCT GGA A-3' (配列番号 1 2)

O-OPB : 5' -GTG GAG TCA AGC ACA GTA CA-3' (配列番号 9)

O-LPF-1 : 5' -TTT CGT GCG CAG ACG TCC C-3' (配列番号 1 3)

O-LPF-2 : 5' -ACT AGG CGA ATT TGC CGT TTT A-3' (配列番号 1 4)

O-LPB-1 : 5' -GCA ACT TGA AAC TCC GCC T-3' (配列番号 1 5)

O-LPB-2 : 5' -CCG ACA CAA ACC GTG CAA-3' (配列番号 1 6)

(実施例 2) プライマーセット 2

A-IPF : 5' -GCC ACG GAG ATC AAC TTC TCC TCT TGA GGC TAT CCT CTC CTT-3' (配列番号 2 4)

A-OPF : 5' -GTG ATG GCC TCA AAG ACC-3' (配列番号 2 0)

A-IPB : 5' -GAC GAG TAC CGG CGT CTC TTC GCA GGT AAA GTG ATC TGT-3' (配列番号 2 5)

A-OPB : 5' -ATT ATG CGT CAC CAC ACA C-3' (配列番号 2 3)

A-LPF : 5' -CCA CGG CGT GCA AAG GA-3' (配列番号 2 6)

A-LPB-1 : 5' -GAG CCC TTC CAG GGC CTC TT-3' (配列番号 2 7)

A-LPB-2 : 5' -GCC TCT TTG AGA TCC CAA GCT-3' (配列番号 2 8)

(実施例 3) プライマーセット 3

C-IPF : 5' -GTC ACG TGC TTT GAG TTG TTT CTC CGC CTC GAG TTT CTT CCG-3' (配列番号 3 6)

C-OPF : 5' -ATT CTG TTG GCC GGG TTG-3' (配列番号 3 2)

C-IPB : 5' -TCA AGA ACG GCG AGT GGC TTC TCT TCT GAG GCG ATC CA-3' (配列番号 3 7)

)

C-OPB : 5' -GGT CTG TCA TGG TGA CAA AC-3' (配列番号 3 5)

C-LPF : 5' -GCT CTC TCA AGG TCT TCG GG-3' (配列番号 3 8)

C-LPB : 5' -CTT GCC ATC CGC GAC TGG A-3' (配列番号 3 9)

(実施例 4) プライマーセット 4

Asia-1-IPF : 5' -ACA GGT TTG TAA AAC CCA GTT CCA CAC TCC ATT GCC GAT GTC AC-3' (配列番号 4 7)

Asia-1-OPF : 5' -TGA CAA AAG CGA CAA AGG TT-3' (配列番号 4 3)

Asia-1-IPB : 5' -ATG GCT TCG AAG ACC CTC GAA CGG AGA TCA ACT TCT CCT GTA-3' (配列番号 4 8)

Asia-1-OPB : 5' -TGG ACT GCG AGT CCT GC-3' (配列番号 4 6)

Asia-1-LPF : 5' -GGA AGT GTC TTT TGA GGA A-3' (配列番号 4 9)

Asia-1-LPB : 5' -TTT GCA CGC CGT GGG AC-3' (配列番号 5 0)

10

【 0 0 4 1 】

< 比較法 , PCR法に使用したプライマー >

PCR法で使用するプライマーとして , Reidらの報告 (Reid, S.M., Ferris, N.P., Hutchings, G.H., Samuel, A.R. and Knowles, N.J. 2000. Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. J Virol Methods 89:167-176.) に記載の5' UTR流域を認識するプライマー1F (GCCTGGTCTTTCCAGGTCT) とプライマー1R (CCAAGTCCCCTTCTCAGATC) の組み合わせ , A-OPF (配列番号 2 0) とA-OPB (配列番号 2 3) の組み合わせ , C-OPF (配列番号 3 2) とC-OPB (配列番号 3 5) の組み合わせならびにAsia-1-OPF (配列番号 4 3) とAsia-1-OPB (配列番号 4 6) の組み合わせをそれぞれ用いた。

20

【 0 0 4 2 】

< 核酸増幅法による反応 >

1 . LAMP法による反応

LAMP法による増幅のため , 最終反応溶液 2 5 μ L中の各試薬濃度が下記になるよう調製した。なお , プライマーの合成は北海道システムサイエンス社に依頼し , 簡易カラム精製したものを使用した。

30

(1) 反応溶液組成

20mM Tris-HCl pH8.8

10mM KCl

8mM MgSO₄

1.4mM dNTPs (GE Healthcare社製)

10mM(NH₄)₂SO₄

0.8M Betaine (和光純薬社製)

0.1% Tween20

1.6 μ M IPF1.6 μ M IPB0.4 μ M OPF0.4 μ M OPB0.8 μ M LPF0.8 μ M LPB

8U Bst DNA polymerase (New England Biolabs社製)

40

(2) 方法

50

LAMP反応は上記試薬 24 μL に、各濃度の試料溶液 1 μL を加え、最終反応溶液 25 μL として、0.2 mLの専用チューブ内で63～60分間、リアルタイム濁度測定装置 LA-200（栄研化学）を用いて、リアルタイムに反応を検出した。4組のプライマーセットを組み合わせて1本のチューブ内で反応させた場合の反応条件のみ63～90分間とした。リアルタイム濁度測定装置 LA-200に接続したパーソナルコンピュータ画面のグラフで反応結果をリアルタイムに視認した。所定時間内に濁度が0.1を超えた検体を陽性と判定した。

【0043】

2. PCR法による反応

10

PCR反応は、以下の方法により行った。鋳型DNAは人工合成塩基配列（ファスマック社製）を使用した。

(1) PCRの反応溶液組成及び反応条件

1 反応あたり各試薬が下記になるよう調製した。

- ・PCR buffer $\times 10$ （Qiagen社製） 2.5 μL
- ・2mM dNTPs（Qiagen社製） 2 μL
- ・dDW（滅菌超純水） 20.98 μL
- ・100pmol/ μL OPF（前述の Reidらの報告によるプライマー1F，配列番号20，配列番号32もしくは配列番号43） 0.16 μL
- ・100pmol/ μL OPB（前述の Reidらの報告によるプライマー1R，配列番号23，配列番号35，もしくは配列番号46） 0.16 μL
- ・5U/ μL Taq Polymerase（Qiagen社製） 0.1 μL

20

(2) 方法

反応溶液に各希釈段階の鋳型DNA 1.0 μL を加え、最終反応液量 25.0 μL として各PCR反応を行った。PCR反応の温度サイクル条件は、94～5分静置後、熱変性94～1分、アニーリング55～1分、ポリメラーゼ伸長反応72～2分を1サイクルとして計30サイクル行い、最後に72～7分間静置後、反応を終了した。所要時間は約3時間であった。

30

反応終了後の反応溶液 3 μL を2%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色した。

【0044】

3. 実験結果

(1) 実験結果のまとめを下記の表1に示す。

【0045】

【表 1】

人工合成塩基配列 の配列番号	プライマー セット	LAMP反応チューブあたりの検出感度					PCR
		使用したLAMPプライマーセット				PCR	
		単独	1と2混合	3と4混合	4組混合		
51	1	20	20	実施せず	20	200	
52	2	20	20	実施せず	200	200	
53	3	50	実施せず	50	500	5,000	
54	4	700	実施せず	700	7,000	7,000	

10

【 0 0 4 6 】

(2) 図 1 から図 1 3 にそれぞれの実験結果を示す。図中、横軸は核酸増幅反応を行った時間(分)を示し、縦軸は濁度(Abs)を示す。核酸が増幅されればされるほど反応溶液中の濁度が上昇することとなり、結果、対象となるウィルスの存在を検出することが可能となる。

20

また、図中グレーで示した枠内は、単位チューブあたりの人工塩基配列のコピー数を示す。すなわち、コピー数が多いほど、核酸増幅反応数が容易に進むとともに濁度の上昇が早く検出できる。逆にコピー数が少ないほど、核酸増幅反応は進みにくくなるため濁度の上昇が遅くなり、検出に時間がかかることとなる。

(3) 図 1 から図 4 においてそれぞれのプライマーセット単独で行った場合、プライマーセット 1 が 20 コピー、プライマーセット 2 が 20 コピー、プライマーセット 3 が 50 コピー、プライマーセット 4 が 700 コピーまでの検出が可能であった。それぞれPCR法の検出感度と比較すると、プライマーセット 1 が10倍、プライマーセット 2 が10倍、プライマーセット 3 が100倍、プライマーセット 4 が10倍の感度であった。

30

(4) 図 5 から図 8 において2組のプライマーセットを組み合わせて用いた場合、プライマーセット単独での検出感度と比較して変化はなかった。また、濁度の上昇時間を比較しても、大きな変化はなく、2組のプライマーセットの組合せは、検出感度および検出時間の点で大きな影響を与えないことが分かった。

(5) 図 9 から図 1 2 において4組のプライマーセットを組み合わせて用いた場合、プライマーセット単独での検出感度と比較して、配列番号 5 1 を除き、約10倍の検出感度の低下にとどまった。この場合であっても、PCRと同等以上の検出感度を有していることが確認された。

40

(6) 図 1 3 に示すように、PCR法では、LAMP反応チューブあたり 7,000 ~ 200 copy まで希釈したもので検出可能であった。

(7) 以上をまとめると、4組のプライマーセットをそれぞれ単独で使用した場合と2組のプライマーセットを組み合わせて1本のチューブ内で反応を実施した場合の検出感度は、いずれもLAMP法がPCR法よりも10倍優れていた。4組のプライマーセットを組み合わせて1本のチューブ内で反応を実施した際の検出感度は、LAMP法がPCR法よりも10倍優れているか、あるいは同等であった。反応所要時間はPCR法では約3時間の増幅反応と約30分の電気泳動分析を必要としたのに対し、LAMP法では60分から90分であり、LAMP法のほうが迅速であった。

50

【 0 0 4 7 】

< < 実験 2 , プライマーセットの定性確認 > >

実験 1 で用いた人工塩基配列とは異なる塩基配列 (配列番号 5 5 から 5 8) を用いて、各プライマーセットがこれらの塩基配列を検出できるかについて定性的に調べた。なお、各配列番号については口蹄疫ウイルスの一部を抜き出した形で陽性コントロールとして用いており、配列番号 5 5 が口蹄疫ウイルス 0 型 (GenBank accession No. AY593812) , 配列番号 5 6 が口蹄疫ウイルス 0 型 (GenBank accession No. AY593821) , 配列番号 5 7 が口蹄疫ウイルス 0 型 (GenBank accession No. AY593830) , 配列番号 5 8 が口蹄疫ウイルス A 型 (GenBank accession No. AY593782) の陽性コントロールである。

10

1 . 使用したプライマーセット

プライマーセット 1 , プライマーセット 2 , プライマーセット 1 と 2 の混合したものを用了。

2 . 実験方法

実験 1 の L A M P 法の手法により行った。なお、各人工塩基配列のコピー数は、1 チューブあたり約 10,000,000 コピーで行った。

【 0 0 4 8 】

3 . 結果

結果を表 2 に示す。検出が可能だった場合を " 陽性 " と、検出ができなかった場合を " 陰性 " として示す。検出が可能であった場合は、検出にかかった時間も合わせて表に示す。

20

【 0 0 4 9 】

【 表 2 】

サンプル名	プライマー セット 1	プライマー セット 2	プライマー セット 1 & 2
配列番号 55 (AY593812 の陽性コントロール)	陽性 (19 分 00 秒)	陰性	陽性 (20 分 06 秒)
配列番号 56 (AY593821 の陽性コントロール)	陽性 (20 分 30 秒)	陰性	陽性 (23 分 00 秒)
配列番号 57 (AY593830 の陽性コントロール)	陽性 (20 分 48 秒)	陰性	陽性 (22 分 48 秒)
配列番号 58 (AY593782 の陽性コントロール)	陰性	陽性 (14 分 48 秒)	陽性 (18 分 00 秒)

30

40

【 0 0 5 0 】

(1) プライマーセット 1 は、0 型の陽性コントロール配列である配列番号 5 5 , 5 6 , 5 7 のいずれも検出が可能であった。

(2) プライマーセット 2 は、A 型の陽性コントロール配列である配列番号 5 8 の検出が可能であった。

(3) プライマーセット 1 と 2 を組み合わせた場合であっても、いずれの配列番号についても検出が可能であった。また、検出までの時間についても大きな変化はなかった。

(4) 以上のことから、プライマーセット 1 が 0 型の口蹄疫ウイルスについて、プライマーセット 2 が A 型の口蹄疫ウイルスについて検出が可能であることが確認された。加えて、プライマーセットを組み合わせて検出を行った場合であっても、検出が可能であり、検出

50

時間についても大きな影響を及ぼさないことが確認できた。

【符号の説明】

【0051】

レーンM：DNAサイズマーカー

レーン1：2,000 copy

レーン2：200 copy

レーン3：20 copy

レーン4：2,000 copy

レーン5：200 copy

レーン6：20 copy

レーン7：5,000 copy

レーン8：500 copy

レーン9：50 copy

レーン10：7,000 copy

レーン11：700 copy

レーン12：70 copy

bp：base pair（塩基対）

レーン1～3は配列番号51の人工合成塩基配列と主にO型を検出するプライマーセットを使用。

レーン4～6は配列番号52の人工合成塩基配列と主にA型を検出するプライマーセットを使用。

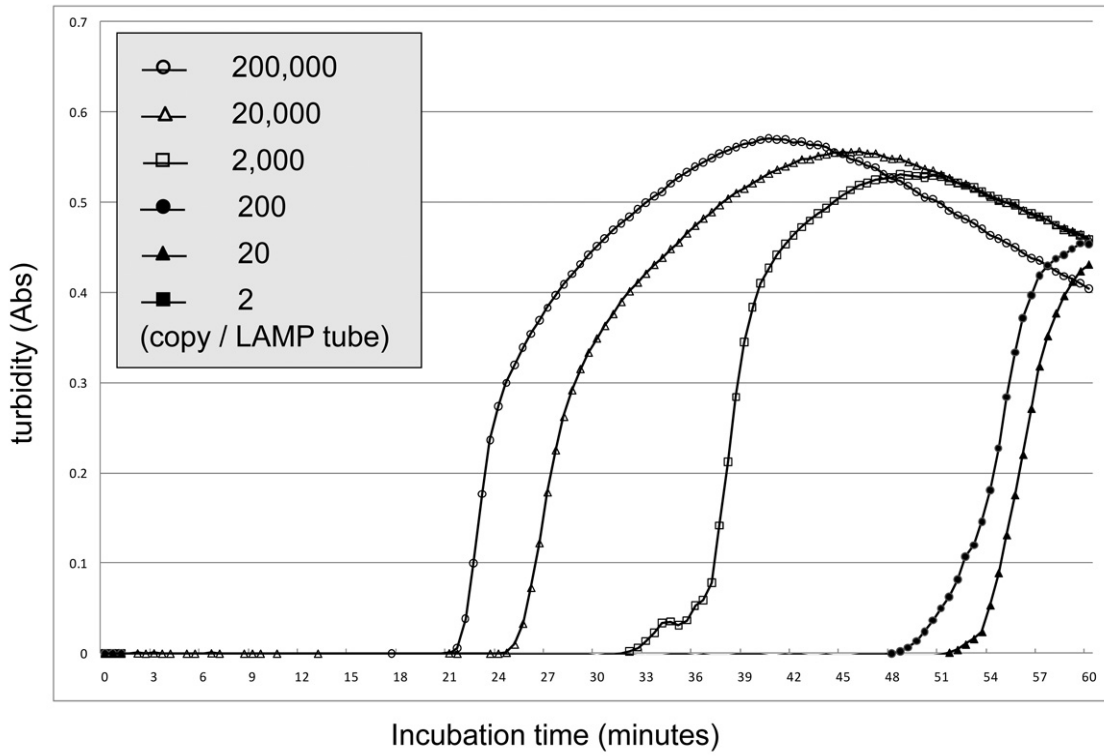
レーン7～9は配列番号53の人工合成塩基配列と主にC型を検出するプライマーセットを使用。

レーン10～12は配列番号54の人工合成塩基配列と主にAsia-1型を検出するプライマーセットを使用。

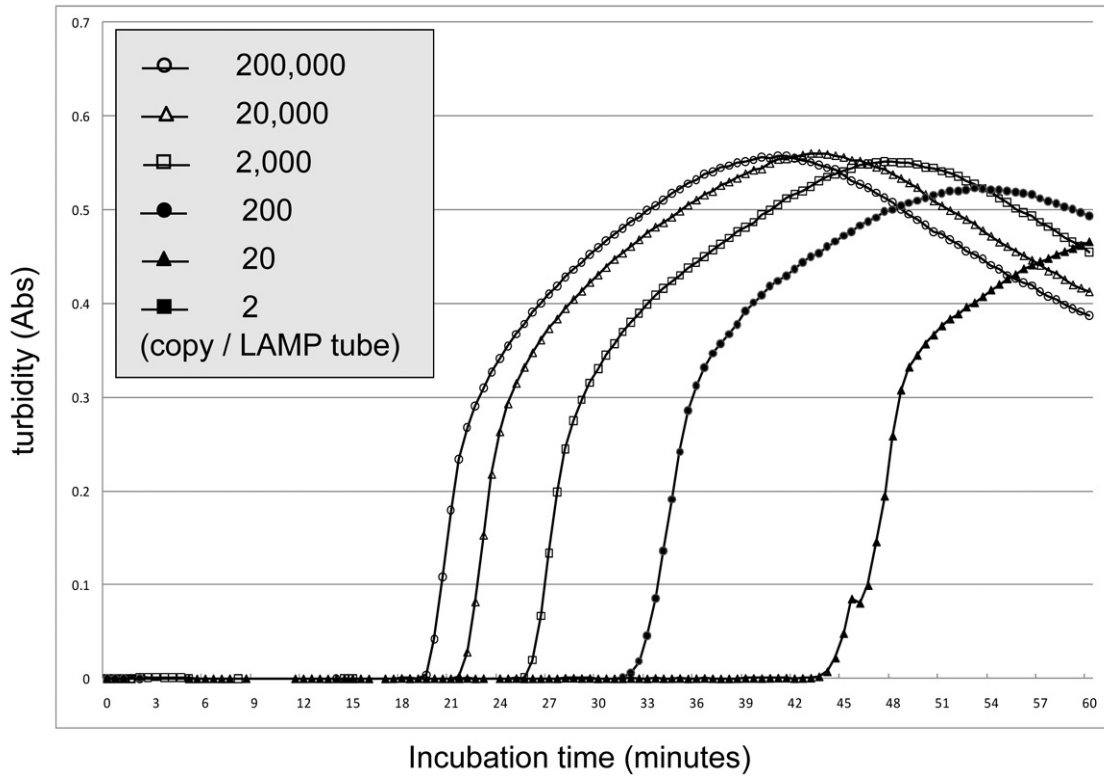
10

20

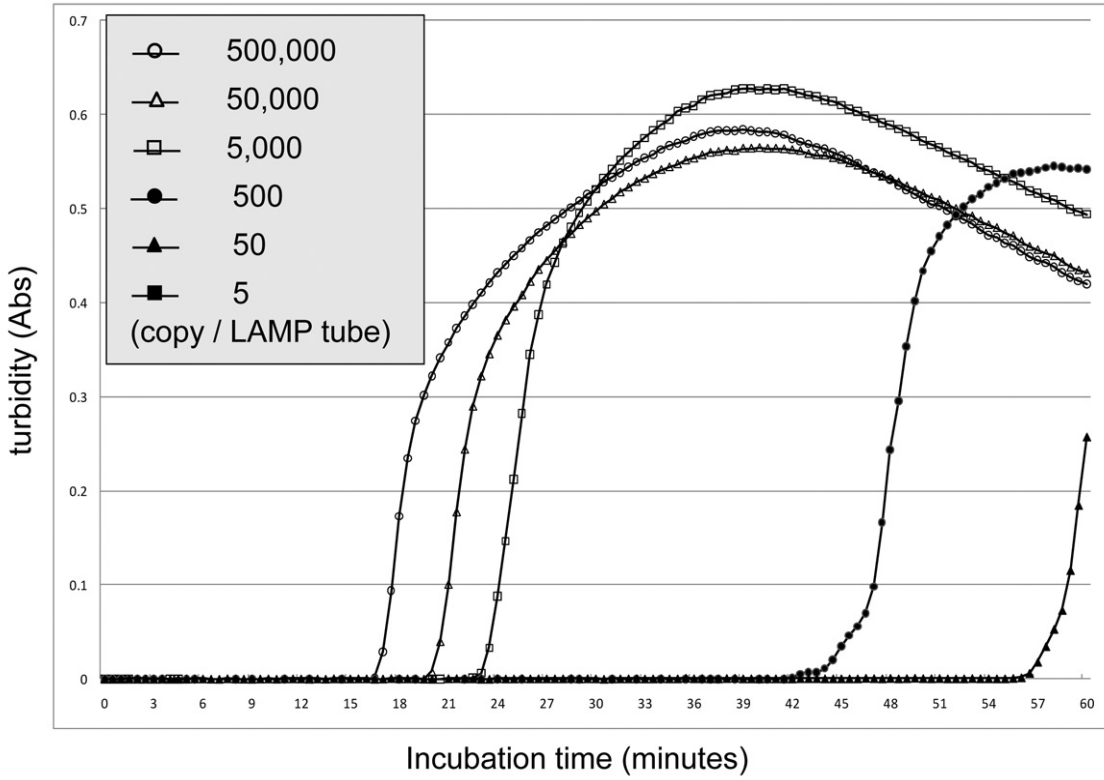
【 図 1 】



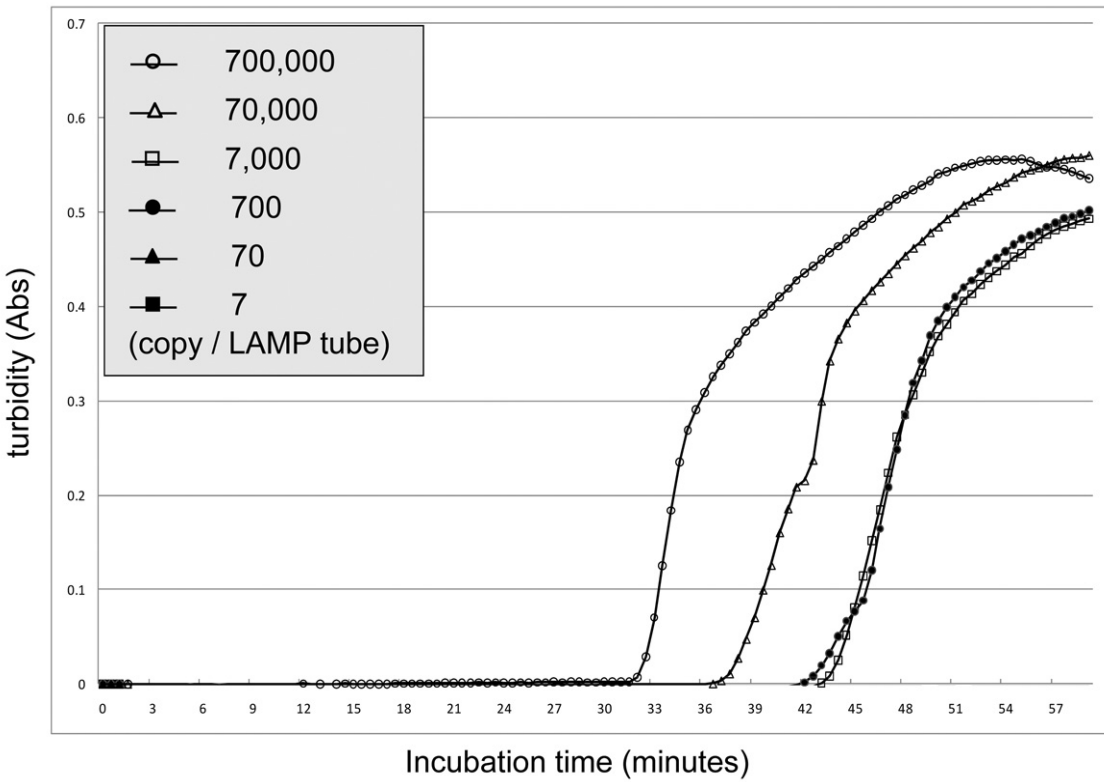
【 図 2 】



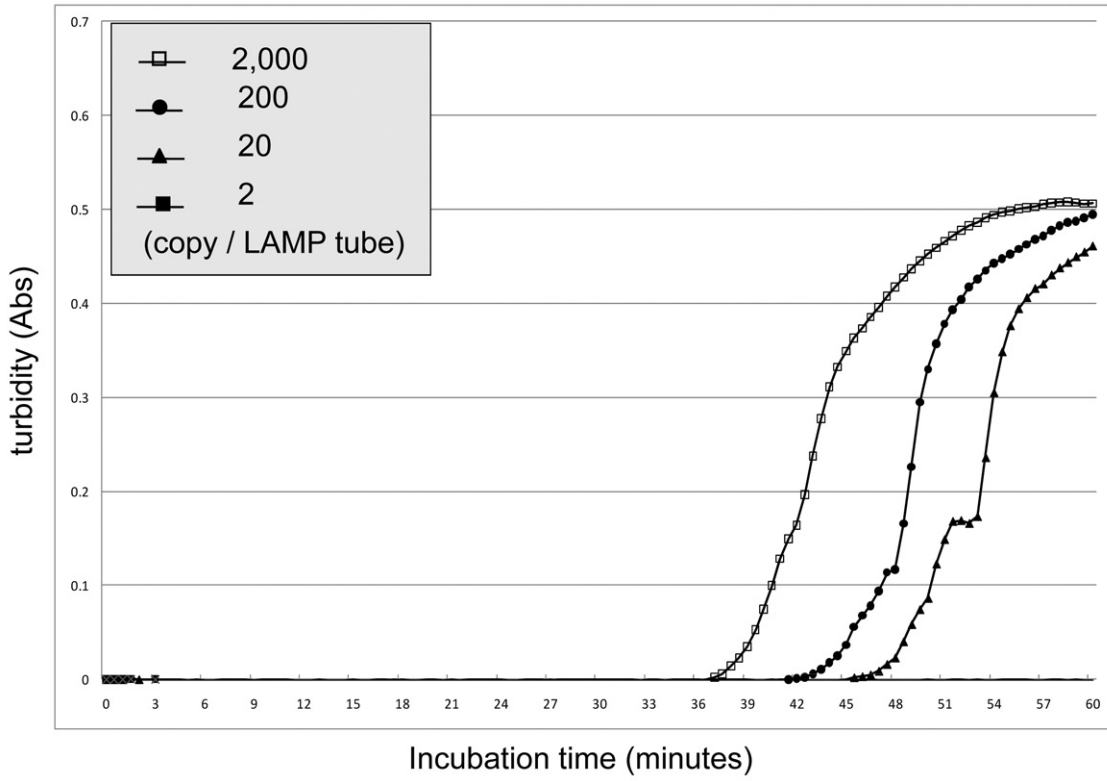
【 図 3 】



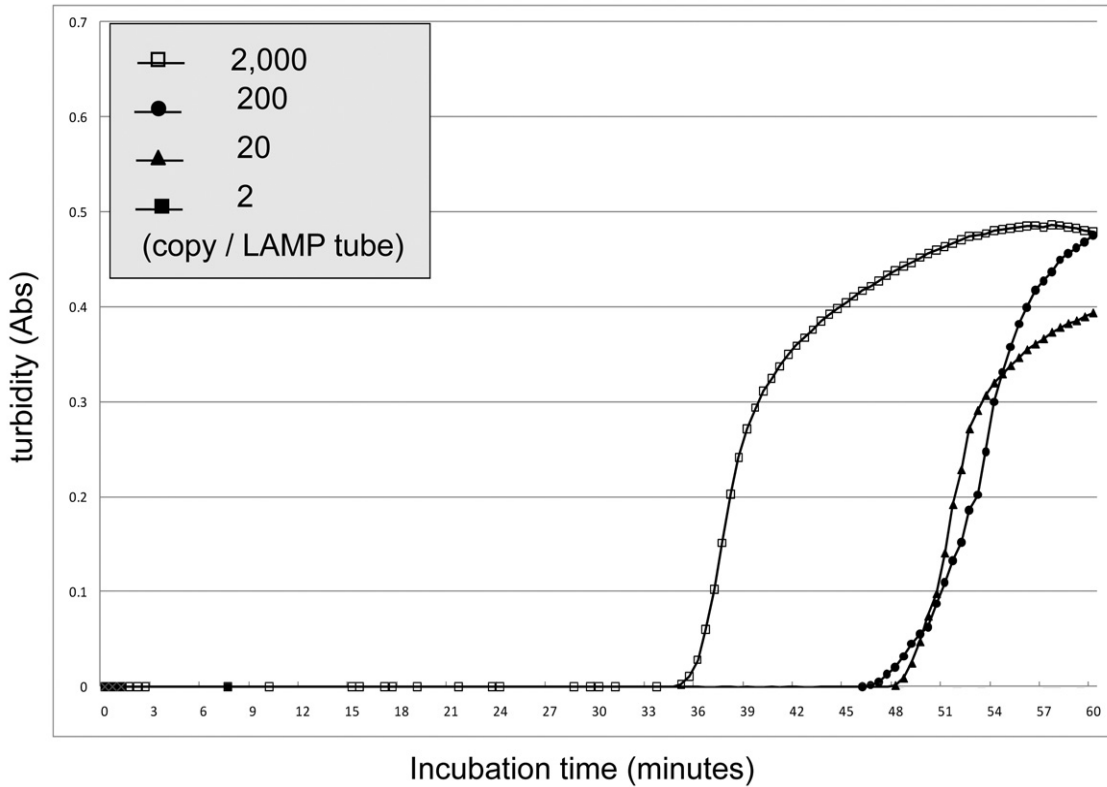
【 図 4 】



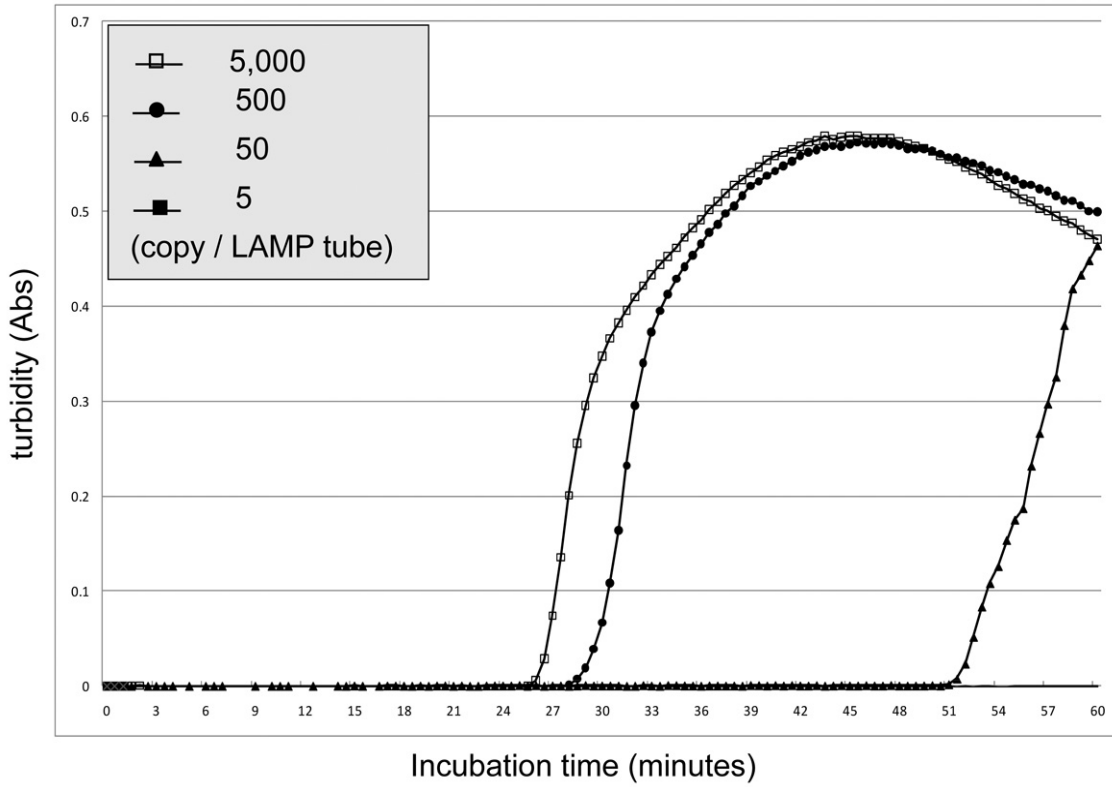
【 図 5 】



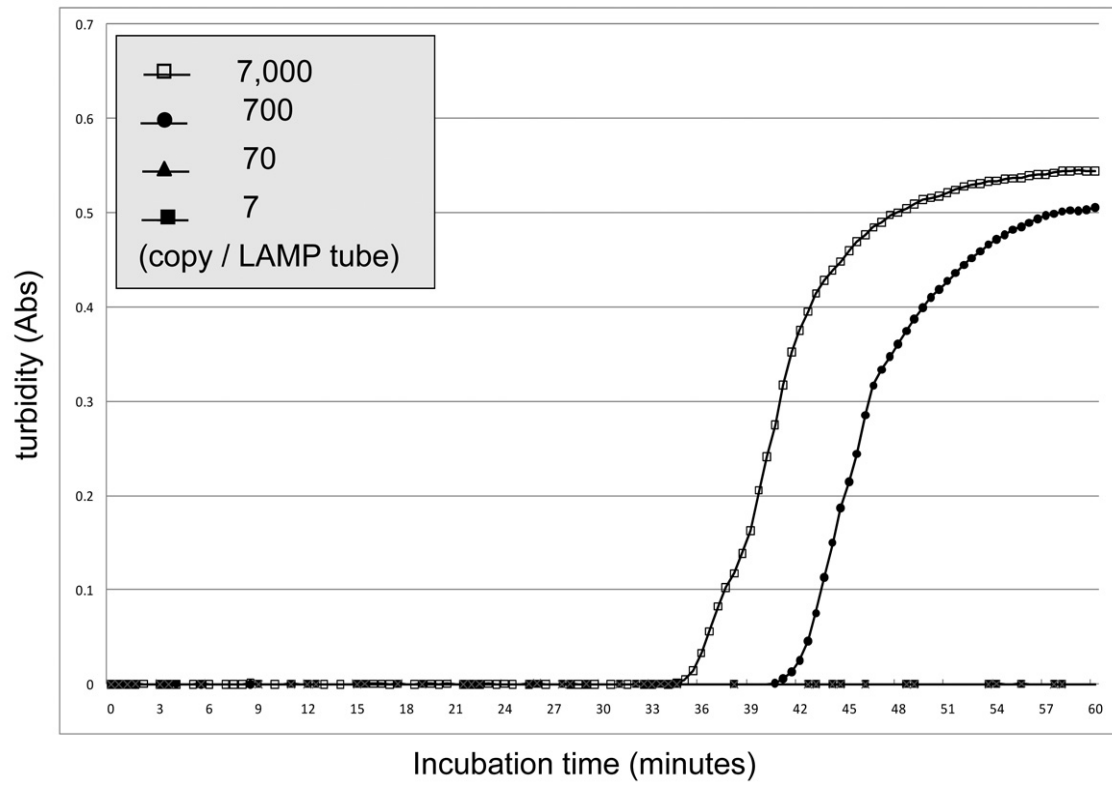
【 図 6 】



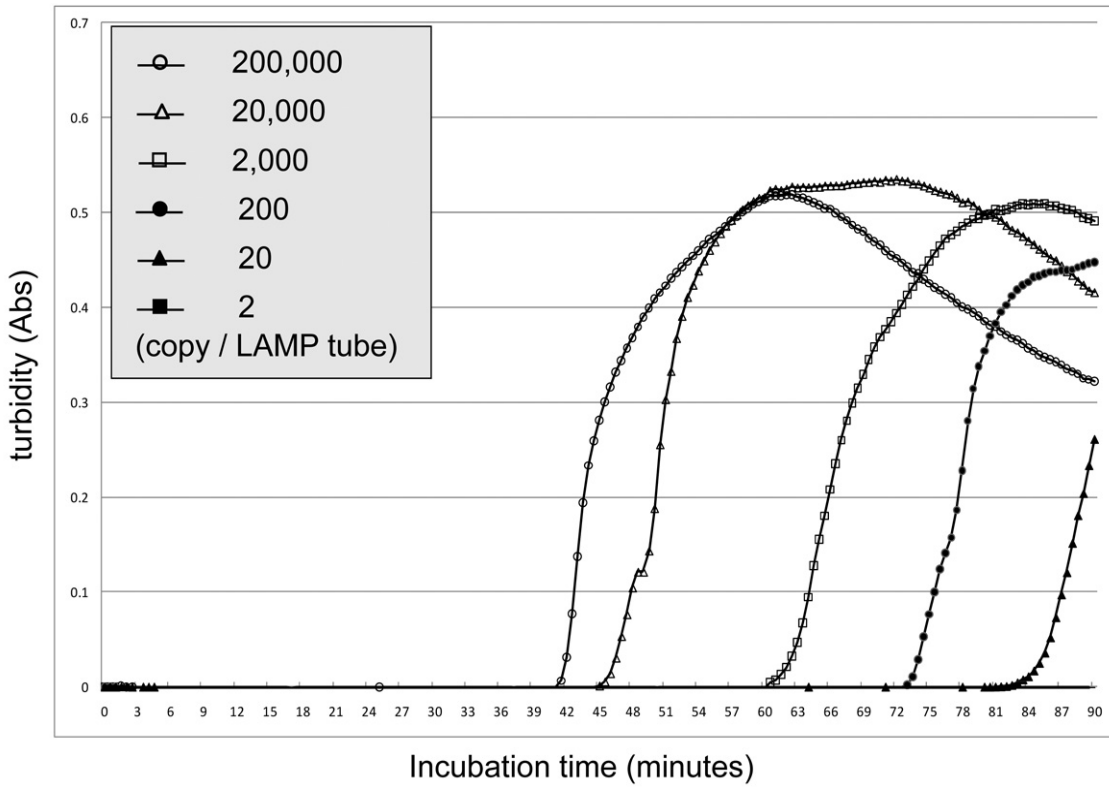
【 図 7 】



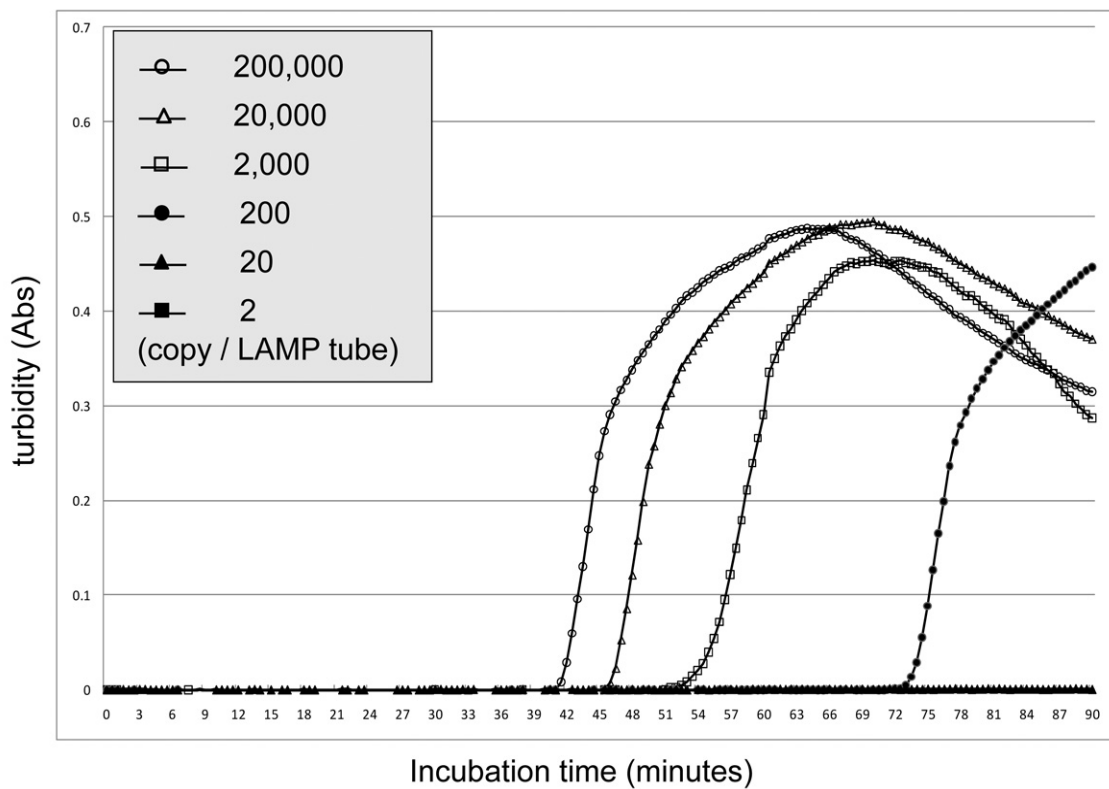
【 図 8 】



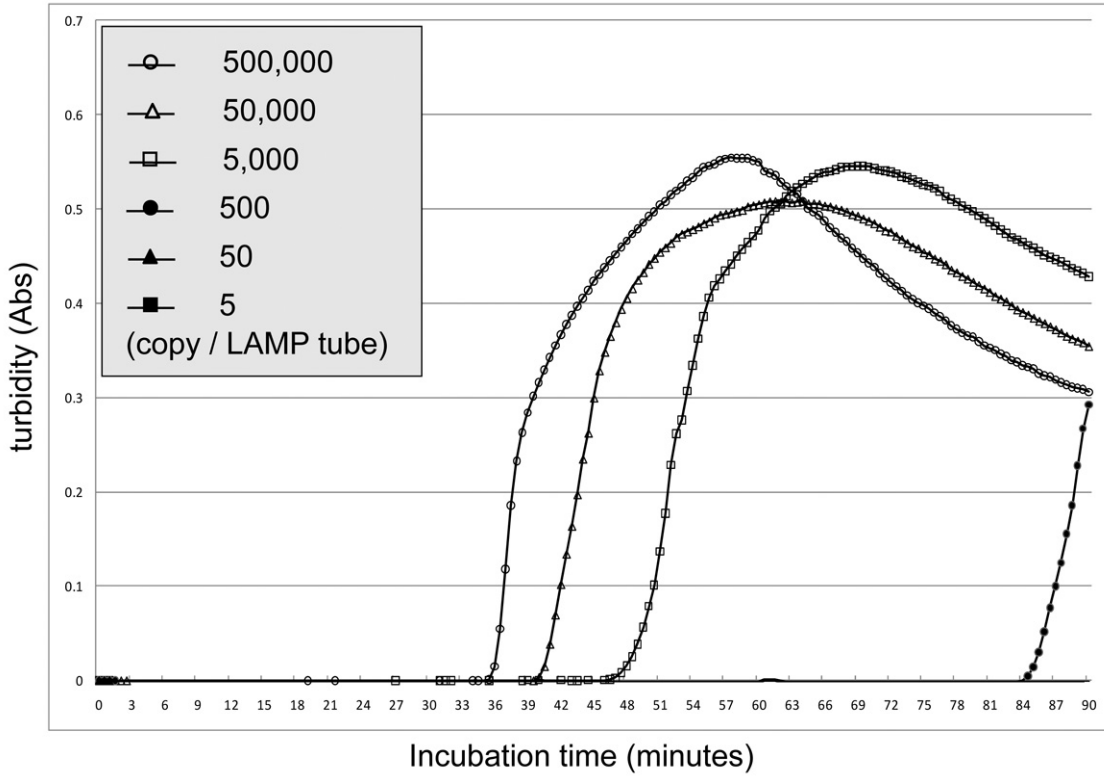
【 図 9 】



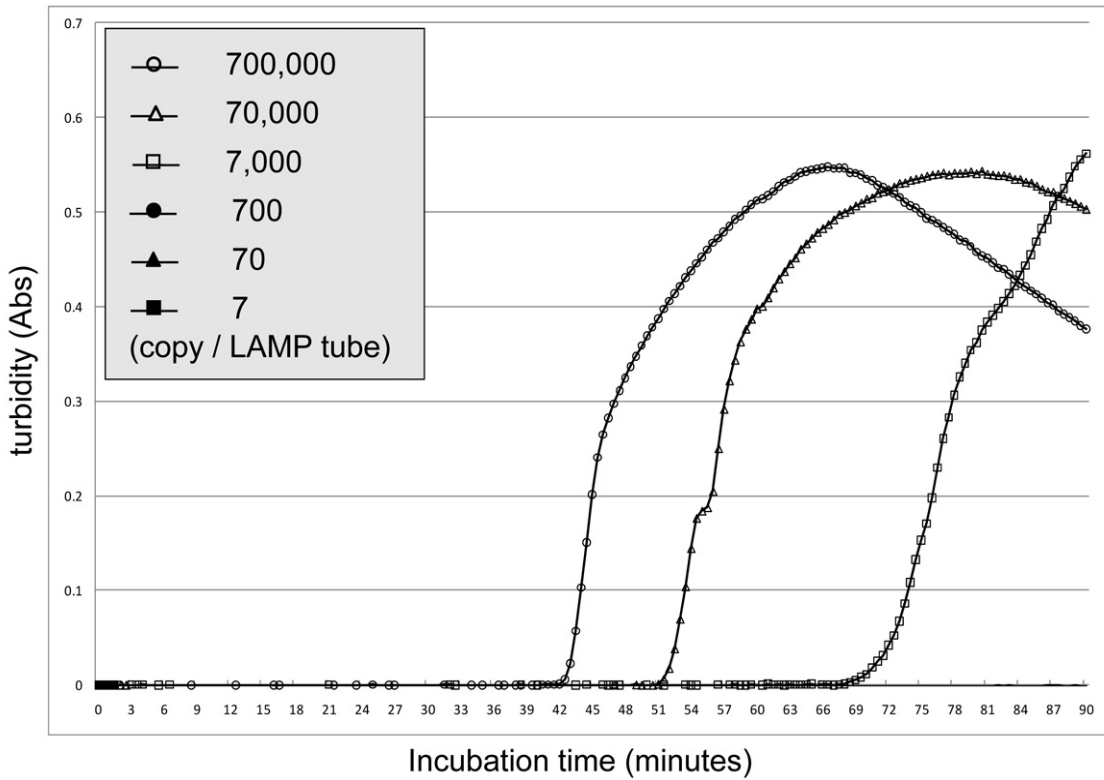
【 図 10 】



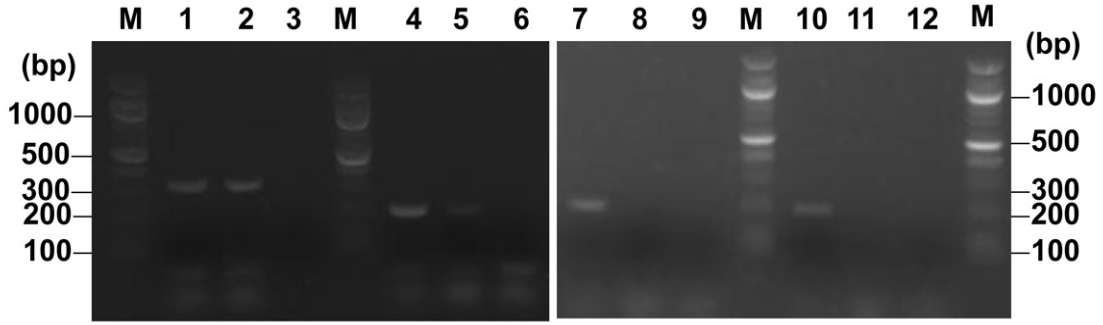
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 配 列 表 】

2012143185000001.app