



(51) 国際特許分類6 C12N 15/51, 7/02, C07K 14/18, 16/10, A61K 39/29, G01N 33/576	A1	(11) 国際公開番号 WO99/05282 (43) 国際公開日 1999年2月4日(04.02.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03340 (22) 国際出願日 1998年7月27日(27.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/233246 1997年7月25日(25.07.97) JP 特願平9/314196 1997年10月9日(09.10.97) JP 特願平10/82962 1998年3月13日(13.03.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 田村良二(TAMURA, Ryoji)[JP/JP] 〒340-0203 埼玉県北葛飾郡鷺宮町桜田3丁目1番1-3-106 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 岡本宏明(OKAMOTO, Hiroaki)[JP/JP] 〒329-0414 栃木県下都賀郡国分寺町小金井1丁目16-18 Tochigi, (JP) 西澤 勉(NISHIZAWA, Tsutomu)[JP/JP] 〒630-8043 奈良県奈良市六条三丁目7-7 Nara, (JP)		(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, NZ, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: NON-B NON-C NON-G HEPATITIS VIRUS GENE, POLYNUCLEOTIDE, POLYPEPTIDE, VIRION, METHOD FOR SEPARATING VIRION, AND METHOD FOR DETECTING VIRUS (54)発明の名称 非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ウイルス粒子、ウイルス粒子分離法およびウイルス検出法 (57) Abstract A gene usable in diagnosis and therapy which is obtained by separating a novel hepatitis virus gene and specifying the gene sequence thereof. This gene is a non-B non-C non-G hepatitis virus gene having a base sequence involving a sequence consisting of about 3,500 to 4,000 bases which can be amplified by PCR by using as primers an oligonucleotide having the base sequence represented by SEQ ID NO:57 and another oligonucleotide having the base sequence represented by SEQ ID NO:60, or PCR by using as primers the oligonucleotide having the base sequence represented by SEQ ID NO:57 and another oligonucleotide having the base sequence represented by SEQ ID NO:61. Based on the base sequence of this gene, polypeptides, etc. are provided.		

(57)要約

未知である新規肝炎ウイルスの遺伝子を分離し、その遺伝子配列を特定することによって、診断、治療に利用可能な遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ウイルス粒子分離法、ウイルス粒子、抗ウイルス抗体を提供し、さらにウイルスの検出法を提供する。配列番号57に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号60に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR、または配列番号57に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号61に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRによって、およそ3500塩基からおよそ4000塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子。この遺伝子の塩基配列に基づき、ポリペプチド等が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ウイルス粒子、ウイルス粒子分離法およびウイルス検出法

技術分野

本発明は従来の診断法では原因を特定できなかった血液伝播性肝炎の未知の原因ウイルスを発見したことによって利用可能となった遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、抗原、これらを利用したウイルス遺伝子、抗体、抗原の生産・検出・測定方法、ウイルス粒子およびウイルス粒子の分離法に関する。

背景技術

現在、血液伝播性肝炎の原因ウイルスとしてB型肝炎ウイルス（以下「HBV」と略記する）とC型肝炎ウイルス（以下「HCV」と略記する）が発見されている。両ウイルスに対しては診断法が確立しており、我が国においては早くから輸血用血液のスクリーニングに導入された結果、両肝炎ウイルスについては受血者における新規感染をほとんど皆無にすることができるようになった。

しかしながら、HBVおよびHCVに対する診断法が確立された後も原因不明のウイルス性肝炎と疑われる例が肝炎全体の5～10％に認められている。これらの例については非血液伝播性の肝炎ウイルスであるA型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、そしてインドでのみ報告されその存在に疑問が残るF型肝炎ウイルスおよび欠損型肝炎ウイルスであるD型肝炎ウイルスも原因ではないと考えられており、未知の肝炎ウイルスが存在する可能性が示唆されていた。

1995年に米国アボット社（Abbott）から、続いて1996年に米国ジーンラプス社（Genelabs Technologies）から相次いでこれら肝炎の原因因子と考えられるウイルスの遺伝子配列が発表され各々GBV-C、HGVと別箇に命名された。しかし、その後配列の比較から、今日では両者は同一のウイルスであると考えられるに至っている（以下「GBV-C/HGV」と略記する）。我が国でも原因不明のウイルス性肝炎に対するGBV-C/HGVの関与について精力的

な研究が行われている。その結果、現在までのところGBV-C/HGVは血液伝播によって感染するものの、感染例での肝炎症状の発現は軽微であり、少なくともこれまで原因不明であった非B非C型肝炎の原因の全てではないこと、したがって原因未解明の肝炎には未知のウイルスが存在していると考えられるに至っている。

上記のように、血液伝播性肝炎の原因となる未知の肝炎ウイルスの存在が示唆されており、この未知の肝炎ウイルスの発見、さらにその遺伝子的、分子生物学的、疫学的特徴の解明が待望されている。それによって、肝炎に対するより完全な予防法、診断法、および治療法の実現が期待されている。

すなわち、未解明のウイルス性肝炎の診断法および治療法の開発には、該ウイルスの遺伝子情報を解明し、ウイルス特異的な遺伝子配列およびアミノ酸配列の決定、またエピトープ位置の特定、エピトープを含む生物材料の製造法の確立、抗ウイルス抗体に特異的に反応する抗原の製造法の確立、ウイルスに対する特異的抗体の提供、さらにウイルス粒子の分離回収法の確立、またその生物活性を無力化しつつ免疫活性を保持する処理法の確立、このようにして得たウイルス由来の生物材料を利用した遺伝子検査法、抗体検査法、抗原検査法、中和抗体誘導ワクチンの製造法の開発が待望されている。

発明の開示

本発明の目的は、現在まで原因ウイルスが特定できず、したがって診断、予防および治療手段も解明されていない未知のウイルス性肝炎に対する診断法、治療法を新たに確立することにある。

また、未知である新規肝炎ウイルスの遺伝子を分離し、その遺伝子配列を特定することによって、診断、治療に利用可能な遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ウイルス粒子分離法、ウイルス粒子、ウイルス抗原、抗ウイルス抗体を提供し、さらにウイルスの検出法を提供することにある。

本発明者らは既存の肝炎ウイルス診断法では原因が究明できなかった肝炎患者例の血液中には、肝炎の原因となる未知の肝炎ウイルス粒子あるいはその一部が存在していると推定した。これにもとづき血液中からウイルスの遺伝子を単離す

ることを試みた。具体的には、該ウイルス遺伝子は肝炎患者の血液中には存在するが、ヒトゲノム中には存在せず、また多くの正常人の血液中にも存在しない、あるいは肝炎発症前には存在しないが発症後には存在するとの仮説を立て、この仮説に基づいて肝炎患者の血液中に候補となる遺伝子を探求し、これを分離した。こうして得られた候補遺伝子について更に次の諸点を検討し、以下の基準に全部に該当した遺伝子を最終的に新規ウイルス遺伝子と判断した。すなわち、

- (1) 複数の原因不明肝炎患者の血液中に存在していること、
 - (2) 輸血前には血液中に該遺伝子が存在しなかったにもかかわらず、該遺伝子陽性血液を輸血したことによって、受血者が該遺伝子陽性となり、かつ輸血後に肝炎を発症した例があること、
 - (3) 得られた遺伝子配列が既知の肝炎ウイルスおよび他のウイルスの遺伝子配列に相同でないこと、
 - (4) ウイルス粒子分離回収法として広く用いられている密度勾配遠心分離法で遺伝子陽性血液を分析した際に、遺伝子陽性分画が一般的なウイルス粒子分画に見つかること、
- である。

既知の肝炎ウイルス感染例についても無症候性キャリアー、すなわちウイルスが陽性であっても肝炎症状を示さず健康と見られる感染例が知られており、同様のことが該ウイルス感染例でも成立することが十分ありうると判断した。この理由から「正常人に該遺伝子が見つからないこと」は判断基準に加えなかった。

以上の判定基準に従い本発明の遺伝子を分離し、分離した遺伝子の配列を決定し、PCRのプライマーとして利用可能なオリゴヌクレオチド配列を検索した。

得られたプライマーを利用して遺伝子検出法を確立した。さらに遺伝子配列内に存在するオープンリーディングフレームを特定し、アミノ酸配列を特定した。また密度勾配遠心分離法により密度を決定するとともにウイルス回収法を確立し本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、配列番号57に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号60に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR、または配列番号57に記載の塩基配列を有するオリゴ

ヌクレオチドおよび配列番号 61 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR によって、およそ 3500 塩基からおよそ 4000 塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子（以下、本発明遺伝子ともいう）を提供する。

本発明遺伝子は、好ましくは、前記 PCR によって、およそ 3600 塩基からおよそ 3900 塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する。

また、本発明遺伝子は、前記 PCR によって増幅される断片の 5' 端および 3' 端の塩基配列が、配列番号 1 に記載の塩基配列の塩基番号 3～300 および塩基番号 2402～3739 の塩基配列に対し、それぞれ、70%以上の相同性を有する。さらに好ましくは、前記相同性が 80%以上である。

本発明は、また、下記の(a)及び(b)の非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子を提供する。

(a)配列番号 6 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 8 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR によって、およそ 200 塩基からおよそ 350 塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子。

(b)配列番号 7 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 8 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR によって、およそ 200 塩基からおよそ 350 塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子。

本発明遺伝子は好ましくは、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子またはその同種変異体遺伝子である。このような遺伝子として具体的には、配列番号 45 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子（遺伝子型 1）、配列番号 46 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子（遺伝子型 2）、配列番号 47 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子（遺伝子型 3）、配列番号 48 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子（遺伝子型 4）、配列番号 49 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子（遺伝子型 5）、配列番号 50 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子（遺伝子型

6)、配列番号5 1記載の塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子(遺伝子型7)、配列番号5 2記載の塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子(遺伝子型8)、配列番号5 3記載の塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子(遺伝子型9)、および、配列番号5 4記載の塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子(遺伝子型10)が挙げられる。

本発明は、本発明遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドも提供する。

本発明は、また、本発明遺伝子の塩基配列内に認められる、前記遺伝子に特異的な塩基配列またはそれに相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(以下、本発明オリゴヌクレオチドともいう)を提供する。このようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、配列番号2記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(RD037)、配列番号3記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(RD038)、配列番号4記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(RD051)、配列番号5記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(RD052)、配列番号6記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(NG059)、配列番号7記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(NG061)、配列番号8記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(NG063)が挙げられる。

本発明は、さらに、本発明オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子検出法を提供する。

本検出方法として具体的には、配列番号2に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号3に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、または、配列番号4に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号5に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子検出法(第1検出法)、ならびに、配列番号6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、または、配列番号7に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子検出法(第2検出法)が挙げられる。

また、本発明は、1の検体に関し上記の第1検出法および第2検出法の両方を実施し、両遺伝子検出法により得られた結果を比較することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子型判別法、ならびに、遺伝子型1～6の遺伝子にある各遺伝子型特異的配列を有するオリゴヌクレオチドを用いてハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子型判別法を提供する。

さらに、本発明は、本発明遺伝子の塩基配列に認められるオープンリーディングフレーム内にコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、本発明ポリペプチドともいう）を提供する。

本発明ポリペプチドとして具体的には、配列番号9記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、および、配列番号10記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。本発明ペプチドは、配列番号9または10記載のアミノ酸配列内に認められる非B非C非G型肝炎ウイルス特異的なアミノ酸配列からなるポリペプチドを包含する。本発明ポリペプチドは、好ましくは、非B非C非G型肝炎ウイルス特異的エピトープを含むものである。

さらに、また、本発明は、非B非C非G型肝炎ウイルス粒子が有する密度に基づいて、前記粒子を分離することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス粒子の分離法、この方法により分離されたウイルス粒子、および、このウイルス粒子より得られる非B非C非G型肝炎ウイルスペプチドを提供する。

加えて、配列番号9または10記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部の配列を組み込んだ組換え遺伝子発現ベクター、配列番号9または10記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部の配列を保持する形質転換細胞、この形質転換細胞により発現される非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドまたはその断片、この形質転換細胞を、非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドが発現する条件で培養し、発現させた前記ペプチドを採取することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドの生産方法を提供する。

さらに、本発明は、本発明ポリペプチド（ウイルス粒子より得られるものを含む）または上記ウイルス粒子を抗原として用いる非B非C非G型肝炎ウイルス抗

体の免疫学的検出方法、本発明ポリペプチド（ウイルス粒子より得られるものを含む）または上記ウイルス粒子を免疫原として、動物を免疫することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス抗体の作成方法、この作成方法によって得られる抗体、および、この抗体を用いる非B非C非G型肝炎ウイルス抗原の免疫学的検出方法を提供する。

さらに、また、本発明は、配列番号1記載の塩基配列にあるオープンリーディングフレームにコードされるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、非B非C非G型肝炎ウイルス中和抗体のエピトープ配列を含むポリペプチドを含むワクチン、及び、上記ウイルス粒子を含むワクチンを提供する。

また、本発明遺伝子は、好ましくは、配列番号62に記載に記載の塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子またはその同種変異体遺伝子である。

この遺伝子についても、本発明遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、本発明遺伝子の塩基配列内に認められる、前記遺伝子に特異的な塩基配列またはそれに相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、このオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子検出法、本発明遺伝子の塩基配列に認められるオープンリーディングフレーム内にコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、組換え遺伝子発現ベクター、形質転換細胞、この形質転換細胞により発現される非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドまたはその断片、非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドの生産方法、非B非C非G型肝炎ウイルス抗体の免疫学的検出方法、非B非C非G型肝炎ウイルス抗体の作成方法、抗体、非B非C非G型肝炎ウイルス抗原の免疫学的検出方法、および、ワクチンが提供される。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、既知の全てのウイルスとは異なる未知のウイルスに関する発明である。本発明の「非B非C非G型肝炎ウイルス」とは、血液による伝播によって感染し肝炎症状を示す原因ウイルスを意味しており、同じ血液伝播性ウイルスであるB型、C型、G型肝炎ウイルスとは異なる未知のウイルスである。また、非血液伝播性の肝炎ウイルスであるA型肝炎、E型肝炎、F型肝炎および欠損型ウイルスであるD型肝炎ウイルスとも異なるから、結局非A非B非C非D非E非F非

G型肝炎ウイルスと同義である。

肝炎症状とは肝機能値の異常、黄疸の出現等一般に肝炎を示す症状を意味する。

本発明においては、本発明ウイルスの発見の由来に基づき本発明ウイルスを肝炎ウイルスの一つと位置づけているが、本発明ウイルスにより引き起こされる主たる疾病が肝炎であることをかならずしも意味しない。

本発明者らは、本発明の遺伝子のうち、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子およびその同種変異体と認められる遺伝子を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルスを「HNT 2 2 ウイルス」と命名した（以下、これを「HNT 2 2」と略記する）。HNT 2 2 は、下記の(a)及び(b)の非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルスと定義することもできる。

(a)配列番号 6 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 8 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR によって、およそ 200 塩基からおよそ 350 塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子。

(b)配列番号 7 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 8 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR によって、およそ 200 塩基からおよそ 350 塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子。

また、上記遺伝子に含まれない遺伝子、すなわち、配列番号 6 2 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子およびその同種変異体と認められる遺伝子を「TUS 0 1 ウイルス」と命名した（以下、これを「TUS 0 1」と略記する）。

すなわち、HNT 2 2 および TUS 0 1 は、非 A 非 B 非 C 非 D 非 E 非 F 非 G 型肝炎ウイルス肝炎患者より分離された未知のウイルスであり、従来原因不明とされていた肝炎患者より分離され、既知の全てのウイルスとはウイルス学的あるいは分子生物学的に相同でないウイルスである。

HNT 2 2 および TUS 0 1 は、まとめて、5' 端側に配列番号 1 に記載の塩基配列の塩基番号 3 ～ 300 の塩基配列またはそれに高い相同性を有する塩基配

列を有し、3' 端側に配列番号 1 に記載の塩基配列の塩基番号 2 9 0 2 ~ 3 7 3 8 の塩基配列またはそれに高い相同性を有する塩基配列を有し、当該 5' 端塩基配列および 3' 端塩基配列を含めた長さがおおよそ 3 5 0 0 塩基からおおよそ 4 0 0 0 塩基、好ましくはおおよそ 3 6 0 0 塩基からおおよそ 3 9 0 0 塩基である遺伝子と定義できる。

本発明では H N T 2 2 が陽性である肝炎を「H N T 2 2 型肝炎」という。また、T U S 0 1 が陽性である肝炎を「T U S 0 1 型肝炎」という。

ウイルスは一般に他の高等生物に比べ変異を生じ易く、かつこれが遺伝子内に固定され易いことが知られている。従って、同一種内に多くの株（同種変異体）が存在し、またおおむねの遺伝子配列が共通する遺伝子型が存在する。本発明における H N T 2 2 または T U S 0 1 の用語はこれら多数の株および遺伝子型を含むウイルスの総称として用いられている。

上記したようにウイルスでは変異の頻度が高く、またその変異が遺伝子内に固定される頻度が高いことが知られているから、ウイルスをその遺伝子配列あるいはアミノ酸配列により規定する場合には、当該ウイルスには、例示された配列のものだけでなく、実質上相同な範囲の遺伝子配列およびアミノ酸配列を有するものも含まれるものと認められる。実質上相同の範囲は当該ウイルスに遺伝子配列あるいはアミノ酸配列を他のウイルスと比較した場合に明確に区別できる配列の相同性の割合をもって判断することができる。また、実質上相同の範囲は、既知の同種のウイルスにおいて知られている種内における配列の多様性を参考にして定めることができる。

上記の基準に従い、本明細書に具体的に開示した H N T 2 2 遺伝子または T U S 0 1 遺伝子の塩基配列に 5 5 % 以上、好ましくは 6 0 % 以上、さらに好ましくは 7 0 % 以上、より好ましくは 8 0 % 以上の相同性を有する塩基配列をもつ遺伝子は本発明の遺伝子と実質的に相同であり、本発明に含まれるものと認められる。

実際に本発明の H N T 2 2 遺伝子内の遺伝子の保存性および他ウイルス遺伝子との相同性を検索したところ、H N T 2 2 遺伝子内の相同性（保存性）は 5 5 % 以上であり、また最も高い相同性を示した他ウイルス例との相同性は 6 0 % 未満であった。

なお、本明細書において、相同性とは、塩基配列およびアミノ酸配列についての相同性を意味しており、具体的には比較する配列同士を、必要により欠損を設けることを含めて最も一致する様に並べたときに、比較する全体の塩基数またはアミノ酸数中の一致した塩基数またはアミノ酸数の割合を%で表示したものをいう。

さらに、本発明のウイルスと同様に血液伝播性肝炎の原因となるC型肝炎ウイルス（HCV）では、種内の遺伝子配列は60%以上の相同性を示していた。また、HCVのうちで同一遺伝子型を示すものとされるものでは一部の高変異領域を除き遺伝子配列で80%以上の相同性を持つと報告されていた。これらの事実から上記相同性をもって本発明に含まれる遺伝子の範囲を定めることは適切なものと考えられる。

同様に、コードされるアミノ酸配列では、通常には65%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上相同である例は本発明のウイルスと実質的に相同であり、これに含まれる。

HNT22遺伝子に存在する遺伝子型については、種々の分類が考えられるが、配列番号1の1939～2160位(以下nt1939-2160と表記する)に基づけば、配列番号45記載の塩基配列を有するHNT22遺伝子(遺伝子型1)、配列番号46記載の塩基配列を有するHNT22遺伝子(遺伝子型2)、配列番号47記載の塩基配列を有するHNT22遺伝子(遺伝子型3)、配列番号48記載の塩基配列を有するHNT22遺伝子(遺伝子型4)、配列番号49記載の塩基配列を有するHNT22遺伝子(遺伝子型5)、配列番号50記載の塩基配列を有するHNT22遺伝子(遺伝子型6)、および、配列番号51記載の塩基配列を有するHNT22遺伝子(遺伝子型7)を挙げることができる。

このような塩基配列を利用することで、特定の遺伝子型のHNT22ウイルスを検出もしくは区別することができる。区別するための方法としては、後記実施例に記載した方法により増幅し、配列決定をする方法だけでなく、各遺伝子型に特異的な配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、当該遺伝子配列のみを増幅する方法、または、このオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて当該遺伝子配列を選択的に検出する方法、または、これらの方法を組み合

わせたものを挙げることができる。これらの方法に利用できるオリゴヌクレオチドの選択、反応条件の設定は当業者に公知に方法によって実施できる。例えば、当該各遺伝子型配列を相互に比較することによって各遺伝子型に特徴的な配列部分（以下、遺伝子型特異的配列と称する）を選び出すことは容易である。遺伝子型特異的配列またはその相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドであって、他のHNT22遺伝子型にはハイブリダイズし得ないものを選択し、または当該遺伝子型特異的配列を有するオリゴヌクレオチドが他の遺伝子型配列と実質的にハイブリダイズし得ない条件を選択することは当業者には容易である（蛋白核酸酵素PCR法最前線 1996、共立出版）。この様に選択したオリゴヌクレオチドをプライマーまたはプローブとして利用してHNT22遺伝子型特異的な増幅または検出をすることができる。

上記のようなHNT22遺伝子は、配列番号6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（NG059）および配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（NG063）をプライマーとして用いるPCR、および／または、配列番号7に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（NG061）および配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（NG063）をプライマーとして用いるPCRによって増幅可能な塩基配列を有するものとして検出することが可能である。

特に、配列番号1の塩基配列をもつHNT22遺伝子は、配列番号2に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（RD037）および配列番号3に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（RD038）をプライマーとして用いるPCR、および／または、配列番号4に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（RD051）および配列番号5に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（RD052）をプライマーとして用いるPCRによって増幅可能な塩基配列を有するものとして検出することが可能である。

なお、本発明のHNT22遺伝子は、本発明者らにより次のような手順によって得られたものである。

従来知られている肝炎ウイルスマーカーのいずれもが陰性でありながら、明らかな肝炎の症状を呈している例があることが知られていた。かかる症例は従来は

知られていない未解明の肝炎ウイルスを原因とする感染例である可能性がある。

他方、健康人には該ウイルスが原則的には存在しないと考えられる。しかし、肝炎ウイルス感染患者の中には肝機能にも異常を示さず、一見健康に見えながら無症候性キャリアーである可能性も否定できない。

このことから、本発明者は未知の肝炎ウイルスを探索するために、原因不明の肝炎症例中に存在し、健常人あるいは肝炎発症前の患者には存在しない遺伝子のスクリーニングを試みた。このように比較群の一方のみに存在する遺伝子を検出する方法として、公知のレプレゼンテーション・ディファレンス分析(Representational Difference Analysis) (Science 259, 946-950, 1993。以下「RDA法」と略記する)を採用した。

RDA法により得られた候補遺伝子についてその配列を解析し、本発明者らは、その配列が従来既知のウイルスの配列と相同でないことを確認した。

つぎに、該遺伝子配列の一部を構成するオリゴヌクレオチドプライマーを利用した遺伝子検出系を構築し、他の原因未解明の肝炎症例中にも本遺伝子が検出されることを確認した。

また、多数の当該遺伝子陽性例の配列を解析・比較することにより、当該ウイルスに遺伝子型が存在することを明らかにし、その遺伝子型に特異性を有する配列を用いた遺伝子型判別方法を構築した。

さらに当該遺伝子が健康人の多くには見いだされないことを確認した。また該遺伝子陽性症例の中に、輸血前には該遺伝子が陰性でありながら、該遺伝子陽性血を輸血されたことで感染し、以後持続陽性である例があることも確認した。

また、当該遺伝子が宿主由来の遺伝子でないことも証明した。

密度勾配遠心分離法を利用した解析から、当該遺伝子陽性分画が他のウイルス粒子に観察されるように特定の密度に局在することを確認した。

また、逆転写酵素反応工程の有無による解析、DNA分解酵素を用いた解析、制限酵素処理実験より1本鎖のDNAウイルスであることを証明した。

上記全てを検討した結果、該遺伝子が輸血により感染して持続すること、感染例中に肝炎症状が見られること、健常人では陽性者が多くないこと、さらに遺伝子の配列が従来既知のウイルス遺伝子配列と相同でないことを確認した。以上、

全てを総合して検討した結果、発明者は、本発明のウイルスが未知の肝炎ウイルス遺伝子であるとの結論を得た。

上記遺伝子は、その構造からウイルス遺伝子の一部であることが推測された。本発明者は該遺伝子配列を手がかりに公知のジーン・ウォーキング(Gene Walking)法により、本発明の遺伝子を得た。

以下、HNT22 遺伝子を例にとって本発明の態様を説明するが、TUS01 遺伝子も同様に使用できることは容易に理解される。

本発明は、HNT22 遺伝子に特異的な配列を有し、またHNT22 遺伝子に、ストリンジェントな条件で相補的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを提供する。これらオリゴヌクレオチド／ポリヌクレオチドはその特性により、HNT22 遺伝子の増幅に用いられるプライマー、あるいは被検体中のHNT22 遺伝子を捕捉し、あるいは検出するためにプローブとして有効に使用することができる。

本明細書において「特異的な配列」とは、問題の遺伝子の塩基配列または当該塩基配列から演繹されるアミノ酸配列の中で、問題の配列以外の配列と区別する特徴的な配列部分を意味する。特徴的な配列であるか否かは、配列の相同性をもって判定することができる。具体的には、その配列を、それと同一長の当該問題遺伝子の配列以外の公知配列とデータベース等の公知技術を利用して検索、比較したときに、当該公知の配列との相同性がおよそ10%以下となる長さの配列を意味する。あるいは、その配列を利用して問題の遺伝子を、検出、同定、増幅できるかによっても判定できる。具体的には、塩基配列においては、その配列を有するオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドまたはその相補的配列を有するオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドをプローブもしくはプライマーとして当業者公知の遺伝子検出法や遺伝子増幅法に利用した場合に、問題の遺伝子を、他の遺伝子と比べ統計的に区別して検出、同定、または増幅する配列を問題の遺伝子に特異的であると判定する。アミノ酸配列においても、同様に配列の相同性をもって特異的配列か否かを判定できる。具体的には、公知配列と比較したときに、相同性がおよそ10%以下となる長さのアミノ酸配列である。あるいは、問題遺伝子にコードされるアミノ酸配列から成る、またはそのアミノ酸配

列を含むペプチドを抗原として作製した、当該アミノ酸配列に結合することが証明された抗体が、問題遺伝子由来ではない他の抗原と結合しない場合、もしくはその結合が統計的に有意に弱い場合には、当該アミノ酸配列は問題遺伝子に特的な配列とすることができる。

本発明で使用される「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」の用語は任意の長さを持ったヌクレオチドポリマーを意味し、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを含む、一本鎖DNA、二本鎖DNA、ならびに一本鎖および二本鎖のRNAが含まれる。本用語には未修飾のポリヌクレオチドだけでなくメチル化やキャッピングあるいは酵素標識、蛍光標識等修飾されたポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドが含まれる。

本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドには、ゲノムDNA由来のものだけでなく、公知の方法により合成、複製、転写し、あるいは増幅して得るポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドが含まれる。

本発明におけるポリヌクレオチドには、例示された配列、これに実質上相同な配列、これらに相補的配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。

本発明のオリゴヌクレオチド／ポリヌクレオチドはPCRによるHNT22遺伝子増幅のプライマーとして使用することができる。この方法では当該プライマーに挟まれるHNT22遺伝子部分を増幅することが可能であり、これによって被検体中にHNT22遺伝子部分が存在すること、すなわちHNT22が存在する事を確認することができる。

本発明はまた、ハイブリダイゼーションによって、HNT22遺伝子を捕捉し、またこれを検出するために有用なオリゴヌクレオチドプローブあるいはポリヌクレオチドプローブを提供する。

遺伝子配列中より捕捉あるいは検出に用いる好適なプローブを選択することは上記プライマー選択と同様の方法で行うことができ、選択したプローブに標識体を結合させる方法も公知の方法を用いることができる。前記のプライマーを利用した増幅遺伝子を、上記のプローブにて捕捉することで遺伝子を検出することも可能であり、特に遺伝子型特異的配列からなるプローブを利用することで、HNT遺伝子型を判別することが可能となる。

本発明のオリゴヌクレオチドは、通常には、ポリヌクレオチド中に連続する比較的短い配列をもつヌクレオチドであり、相同性および相補性ポリヌクレオチド中の配列をもつものを含む。その長さは、通常には、6～50ヌクレオチド、好ましくは10～30ヌクレオチド、さらに好ましくは15～20ヌクレオチドである。

上述のようにHNT22遺伝子は多様性を示すので、ウイルス株間で塩基配列が比較的保存されている領域内の塩基配列が遺伝子に特異的な塩基配列となり得る。本明細書に記載された塩基配列に基づいて、このような塩基配列を選択することは当業者であれば容易である。このようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、配列番号2記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(RD037)、配列番号3記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(RD038)、配列番号4記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(RD051)、配列番号5記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(RD052)、配列番号6記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(NG059)、配列番号7記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(NG061)、配列番号8記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド(NG063)が挙げられる。

本発明は、さらに、本発明オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とするHNT22遺伝子検出法を提供する。

本検出方法として具体的には、配列番号2に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(RD037)および配列番号3に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(RD038)、または、配列番号4に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(RD051)および配列番号5に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(RD052)をプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とするHNT22遺伝子検出法(第1検出法)、ならびに、配列番号6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(NG059)および配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(NG063)、または、配列番号7に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(NG061)および配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(NG063)をプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とするHNT22遺伝子検出法(第2検出法)が挙

げられる。

P C Rに用いる試料は、検体から採取された血漿または血清などの生物学的試料から公知の方法により核酸またはD N Aを抽出することによって調製される。この調製は市販の抽出キットを用いて行うことができる。

P C Rの条件は、耐熱性D N Aポリメラーゼを用いる公知のP C R方法に従って適宜選択される。

P C Rによって生じた増幅産物は、電気泳動法などの公知の方法により検出することができ、増幅産物の有無に基づいてH N T 2 2 遺伝子を検出することができる。

また、本発明は、1の検体に関し上記の第1検出法および第2検出法の両方を実施し、両遺伝子検出法により得られた結果を比較することを特徴とするH N T 2 2 遺伝子型判別法、ならびに、遺伝子型1～6の遺伝子にある各遺伝子型特異的配列を有するオリゴヌクレオチドを用いてハイブリダイゼーションを行うことを特徴とするH N T 2 2 遺伝子型判別法を提供する。

各遺伝子型に特異的な配列は、当業者であれば、本明細書に記載の塩基配列、あるいは、上記の遺伝子検出法に基づいて検出された遺伝子の塩基配列に基づいて選ぶことができる。ハイブリダイゼーションは公知の方法に従って行うことができる。具体的には、生物学的試料から核酸を調製し、調製した核酸とオリゴヌクレオチドをストリンジェントな条件でハイブリダイズさせ、オリゴヌクレオチドを含むハイブリダイズした産物を検出する。

上記に挙げた具体的オリゴヌクレオチドは、もとより実施例の一つであり、明細書中に開示されたH N T 2 2 遺伝子の塩基配列と当業者公知の技術とを組み合わせることにより、上記と同じ目的を達成するオリゴヌクレオチドを選択することは容易である。また、明細書中に開示されたH N T 2 2 遺伝子の塩基配列とT U S 0 1 遺伝子の塩基配列と当業者公知の技術とを組み合わせることにより、両遺伝子を検出するのに利用できるオリゴヌクレオチドを選択することは容易である。例えば、配列番号57に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（N G 0 5 4）および配列番号60に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（N G 0 6 5）、または、配列番号57に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド

(NG054) および配列番号61に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(NG021)を挙げることができ、これらをプライマーとして用いてPCRを行うことによりHNT22遺伝子およびTUS01遺伝子を検出できる。さらに、同様の観点よりHNT22遺伝子のみ、あるいはTUS01遺伝子のみを検出するのに利用できるオリゴヌクレオチドの選択も当業者には容易に実施できる。

さらに、本発明は、本発明遺伝子の塩基配列に認められるオープンリーディングフレーム内にコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド(以下、本発明ポリペプチドともいう)を提供する。

本明細書において「ポリペプチド」の用語はアミノ酸の鎖状連合体を意味しており、長さについては規定しない。従って、本発明ポリペプチドには通常言われるオリゴペプチド、蛋白質、ペプチドが含まれ、その由来も自然に存在するものだけでなく、その断片あるいは化学的合成法や組換え発現等の各種手段により調製されるポリペプチドが包含される。配列については、先述したようにウイルスでは同一種内でも遺伝子配列に差異があり、その結果アミノ酸配列にも同様の差異が生ずることが知られている。したがって、本発明のウイルスのものと判断されるアミノ酸配列の相同性は65%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上である。

本発明における「オープンリーディングフレーム」(以下「ORF」と略記する)はポリペプチドをコードするヌクレオチド配列領域あるいはその一部を意味する。この配列は適当な調節配列の制御下に置くことで転写され、ポリペプチドに翻訳される。コード配列の境界は5'端の開始コドンと3'端の終止コドンである。

遺伝子配列から、コードされるアミノ酸配列を解明することは当該技術分野では公知であるが、重要な点は遺伝子配列中のORFを確定することである。ORFの確定は次のようにして行うことができる。

得られた遺伝子配列中にアミノ酸への翻訳が開始する開始コドンとなる3塩基配列を見いだす。この位置を開始コドンと仮定し、翻訳を開始した時に適当な長さまで翻訳終止のコドンが現われず、ある程度の大きさのポリペプチドをコードするORFを求める。このようにして得られるアミノ酸配列の例は、配列番号9

および 10 に記載のアミノ酸配列である。

本発明ポリペプチドは、好ましくは、HNT22 に特異的なアミノ酸配列からなる。HNT22 に特異的なアミノ酸配列は、当業者であれば、本明細書に記載の塩基配列にコードされるアミノ酸配列、あるいは、上記の遺伝子検出法に基づいて検出された遺伝子の塩基配列にコードされるアミノ酸配列に基づいて選ぶことができる。

本発明ポリペプチドは、さらに好ましくは、HNT22 特異的エピトープを含む。

本発明における「エピトープ」は、抗原決定基を意味する。抗原決定基は抗原分子内にあって抗体と直接結合する部位であり、立体構造の中の少なくとも 3 個のアミノ酸より構成され、一般的に 5 ～ 10 個のアミノ酸から構成されている。エピトープ位置の確定方法およびペプチドの立体構造内での配置の決定法は当該技術分野では公知であり、通常の技術を有するものが実施できる。したがって本発明における「HNT22 特異的エピトープ」とは、HNT22 に特異的な抗原決定基を意味しており、HNT22 特有のアミノ酸配列から構成されるエピトープである。このエピトープは、通常には、連続する 8 個以上のアミノ酸から構成される。

本発明における「エピトープを含む」は、上記に定義されたエピトープ配列をその一部として含むことを意味しており、エピトープを含むポリペプチドは、具体的にはエピトープ配列にキャリアーペプチドあるいはリンカーペプチドを結合させたものを含む。

本発明ポリペプチドは抗体検査の抗原あるいは抗ウイルス抗体を作成するための免疫原として有効に用いることができる。ウイルスポリペプチドの中には該ウイルスに特異的なアミノ酸配列を有しておらず、この部分を抗原として使用した場合には非特異的抗体反応を示す原因となる配列があることが予想される。したがって、本発明においてもアミノ酸の全配列中の抗体検査用として好適な配列を特定することが重要である。かかる特異配列、すなわちエピトープ配列を見いだす方法としては、配列全域をカバーする様に一定長のペプチドを合成し、それぞれのペプチドの抗ウイルス抗体、すなわち該ウイルスに感染した患者血清との反

応の有無および強弱を利用する方法がある。また上記合成法の代わりに、 λ gt11を用いたファージライブラリーを作成し、患者血清によりスクリーニングする方法がある。

本発明は、また、非B非C非G型肝炎ウイルス粒子が有する密度に基づいて、前記粒子を分離することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス粒子の分離法、この方法により分離されたウイルス粒子、および、このウイルス粒子より得られる非B非C非G型肝炎ウイルスペプチドを提供する。

本発明における「ウイルス粒子」は、通常のウイルス粒子分離法として用いられる密度勾配遠心分離法により特定の密度分画に回収される、本発明遺伝子陽性の分画を意味しており、形態学的に粒子構造を持つもの、あるいは感染性の粒子に限定されない。

ウイルスはその粒子構造に応じた密度を有しており、その密度を利用することで他の共存物を分離することができる。密度を利用したウイルス粒子分離法として最も一般的な方法は密度勾配遠心分離法を用いる方法である。これはショ糖等の物質を用いて段階的な密度担体層を遠心管内に作り、ウイルス含有分画を上層に重層したのち超遠心分離を実施する方法である。この解析法は、遠心力で遠心力方向に移動したウイルスがウイルスと同一の密度層に達すると、遠心力と浮力が平衡状態に達し移動を止め、そのためにその分画に集中する現象を利用したものである。

上記方法により得られたウイルス粒子からのポリペプチドの取得は、公知の方法によって行うことができる。例えば、変性剤によりウイルス粒子を処理し、ポリペプチドを他の成分と分離する。

本発明は、またHNT22遺伝子あるいはその一部の配列を組み込んだ遺伝子発現ベクターを提供する。本明細書における「組換え発現ベクター」の用語は外因性のポリヌクレオチドを宿主細胞遺伝子に発現可能な状態で挿入するベクターを意味する。具体的には該ポリヌクレオチドを組み込むことが可能な制御配列を有するベクターである。また、「一部」の用語は、抗原性を示すのに十分なペプチドをコードする部分を意味する。

この発現ベクターは免疫活性あるいは生物活性を有するウイルスペプチドを得

るのに有効に用いることができる。現在、発現を所望する遺伝子を組み込むベクターについては様々なものが知られており、さらにベクターを用いて遺伝子を組み込み最終的にペプチドを発現させる宿主細胞についても様々なものが知られている。

本発明で提供する遺伝子発現ベクターは、HNT22ゲノムあるいはそのORFを有する組換え発現ベクターであって、該ORFが所望の宿主と適合し得る制御配列に対して作動可能なように連結されている組換え発現ベクターである。この発現ベクターを用いて組換え遺伝子発現系を構成することができる。

本明細書における「形質転換細胞」の用語は、本発明遺伝子の全部または一部が遺伝子内に組み込まれ、かつ該発明遺伝子にコードされたポリペプチドの全部または一部を発現することが可能な細胞を意味する。

本発明で提供する形質転換細胞は、本発明遺伝子の全部または一部を含むポリヌクレオチドを直接に導入して、または、このポリヌクレオチドを組み込んだ上記組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して、宿主細胞を形質転換することによって得ることができる。本発明では、公知のトランスファーベクター、宿主細胞を使用することができる。

該形質転換細胞により生産されるポリペプチド（HNT22ウイルス抗原ペプチド）は、該形質転換細胞を、HNT22ウイルス抗原ペプチドが発現する条件で培養し、発現させたポリペプチドを採取することによって得ることができる。

本発明は、HNT22粒子、HNT22ポリペプチド、HNT22エпитープ、HNT22エпитープを含むポリペプチドを抗原とするHNT22抗体の免疫学的検出方法を提供する。ペプチド抗原を使用した抗体検出方法としては免疫比濁法、酵素免疫測定法、ラジオメトリック免疫測定法、凝集法等があり、これらの方法を本発明でも使用することができる。

本発明は、また精製あるいは部分的に精製されたHNT22粒子、HNT22ポリペプチド、HNT22エпитープ、あるいはHNT22エпитープを含むポリペプチドを免疫原とするHNT22抗体作成法ならびにHNT22抗体を提供する。精製された、あるいは部分的に精製されたウイルス粒子あるいはポリペプチドを用いた抗体作成方法としては公知の方法を使用できる。

本発明は、H N T 2 2 に特異的に結合する抗体を用いたH N T 2 2 抗原の免疫学的測定法およびキットを提供する。抗体を用いて抗原を測定する方法の一例としては、

(1) H N T 2 2 に結合する抗体を固相に結合させた反応容器、あるいは反応担体に試料を作用させ、抗原抗体反応により試料中の抗原を固相に結合した抗体に捕捉させる工程、

(2) 適当な洗浄工程を加えた後に捕捉された抗原に対し、さらにH N T 2 2 と結合しうる適当な標識を施したH N T 2 2 に特異性を有する抗体を作用させる工程、

(3) 適当な洗浄工程を加えた後に標識体の作用を利用して結合抗原を検出する工程、

からなる方法がある。

また、別の測定の方法としては、

(1) 測定を所望する試料と一定濃度のH N T 2 2 エピトープを有する適当に標識されたポリペプチドを一定時間反応させる工程、

(2) (1)の工程を経た試料をH N T 2 2 抗体を固相に結合した反応容器、または反応担体に作用させ、試料中の抗原を固相抗体に十分結合させる工程、

(3) 反応容器あるいは反応担体に結合した標識と未結合の標識を分離後、結合標識あるいは未結合標識を測定する工程、

からなる方法がある。

その他のウイルス抗原を測定する方法として使用されている方法、即ち凝集法、逆受身凝集法、酵素免疫測定法、ラジオメトリック免疫測定法、蛍光偏光測定法なども本発明の実施に利用することができる。

本発明は、精製したH N T 2 2 粒子、精製ウイルス粒子から得た中和抗体エピトープを包含するポリペプチド、組換え体発現を用いて得たH N T 2 2 粒子ならびに中和抗体エピトープを包含するポリペプチド、これら発現ウイルス粒子あるいは発現ポリペプチドより得た精製ポリペプチドならびに中和抗体エピトープを包含する断片、該ウイルスの遺伝子配列に基づく化学的に合成した中和抗体エピトープを包含するポリペプチドよりなるワクチンを提供する。

本発明のワクチンの調製には、本明細書に開示された遺伝子を基にH N T 2 2

の抗原的に活性な領域をコードする蛋白質を前記の合成法あるいは組換え体発現法により得て、これを用いることができる。従来の例ではエンベロープ抗原のエピトープを含有するペプチド抗原あるいは組換え体抗原が当該活性を有する。また、他の構造蛋白質抗原も単独あるいは他の抗原との組み合わせで当該活性を有する。具体的にはエンベロープ抗原のエピトープを含有するペプチド抗原あるいは組換え抗原が当該エピトープを含有する。他の構造蛋白質抗原も単独あるいは他の抗原との組み合わせで中和抗体エピトープを含有する。

本発明の遺伝子を利用し発現させた抗原あるいは本発明の分離法により精製されたHNT22粒子を用いることによって、複数の中和抗体エピトープを含有する多価のワクチンを得ることができる。分離精製粒子を利用する場合には当該ウイルスを不活性化する必要があるが、例えばホルマリン処理法等の公知の方法によってこれが可能である。

活性成分として免疫原性のポリペプチドを含有するワクチンの調製法についても公知の方法を利用できる。すなわち、注射液として液体あるいは懸濁液として、もしくは注射前に液体に溶解、懸濁するのに適当な固形形態として調製される。この免疫活性成分は適当な賦形剤と混合される。賦形剤としては水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどがある。さらに必要に応じて少量の補助物質が含有され得る。この含有剤としては保湿剤、乳化剤、pH緩衝剤、あるいはアジュバントがある。アジュバントの例としては水酸化アルミニウム、N-アセチル-L-アラニン-L-スレオニン-D-イソグルタミン、N-アセチル-L-アラニン-L-アラニン-D-イソグルタミンなどがある。

これらワクチンについては、その効果が得られる投薬処方が適宜定められる。一般的には1回の投与量は抗原量として5 μ gから250 μ gであり、その量は投与される個体の体重、免疫的反応能、および所望される抗体誘導の強さにより決まる。投与の回数についても同様の基準により選定される。

図面の簡単な説明

図1～5は、HNT22陽性75検体から得られた遺伝子の、NG001（配列番号40）とRD052（配列番号5）に相補的な配列とに挟まれる396塩

基長の配列（配列番号1のnt1862-2257に相当）の比較を示す。

検体配列の最上列に#22（配列番号11）の該領域（nt78-299）の全配列を示し、以下検体1～75について#22と異なる塩基箇所を塩基を示すアルファベットで示す。同一塩基の箇所はドット（・）で示す。配列（配列番号1においてnt1939-2160、配列番号11においてnt78-299位に相当）の相同性より、検体1～49までの群（遺伝子型Iと名付けた）、50～73（遺伝子型IIと名付けた）の群、検体74および検体75の4群に分類できる。

最上列には実施例2および3で使用するプライマーの位置を示した。遺伝子型II並びに検体74および75ではRD037（配列番号2）およびRD051（配列番号4）のプライマーの3'端側にミスマッチが共通して存在することが分かる。

図6は、ジーン・ウォーキング(Gene Walking)法を用いた#22クローン配列の延長（実施例4）を示す。

図7は、輸血によるHNT22感染例（実施例7）における

- (1) 輸血血液中のHNT22遺伝子配列（配列番号11）
- (2) 輸血後2週間目の患者由来HNT22遺伝子配列
- (3) 輸血後4週間目の患者由来HNT22遺伝子配列

の比較を示す。比較した配列は完全に一致している。

図8は、HNT22遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の検索結果（実施例10）を示す。

上3フレーム：配列番号1の塩基配列の鎖における開始コドンと終止コドンの候補位置。短い縦線が開始コドンを、長い縦線が終止コドンを表す。各フレームは読みとり枠を1塩基づつずらした場合について示している。1番目のフレームと2番目のフレームに長いORFが認められた。

下3フレーム：配列番号1の塩基配列に相補的な配列の鎖における3つのフレームについての開始コドンと終止コドンの候補位置。いずれのフレームにおいても長いORFは認められなかった。

図9は、読みとり枠1および2にコードされるアミノ酸配列に基づくポリペプチドの親水性／疎水性スコアを示す。

図10は、実施例12で得られたHNT22陽性例からの遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹を示す。

図11および12は、実施例12で得られたHNT22陽性例からの遺伝子の塩基配列の比較を示す。

図13は、TUS01遺伝子の全長の配列決定に使用したプライマーおよびクローンの位置関係を示す。四角内に配列決定したクローン名を示す。四角の左右上に増幅に使用したプライマー名を、括弧内には、5'末端先頭の塩基を1としたときの塩基番号を示す。

図14は、TUS01遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)の検索結果を示す。

図15は、HNT22遺伝子とTUS01遺伝子の5'端領域配列の比較を示す。

図16は、HNT22遺伝子とTUS01遺伝子の3'端領域配列の比較を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、もとより本発明がこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1 クローン#22の分離

臨床的に非A非B非C非D非G型の輸血後肝炎であることが確定した3症例(症例1ないし3)について、輸血後肝炎発症時あるいはその後の血液と、輸血前または発症前の同一患者血液とをサンプルとして、RDA法を利用して輸血後肝炎発症以降の患者の血液サンプルにのみ存在する遺伝子を検索した(サブトラクション)。RDA法は、前記したように比較群の一方のみに存在する遺伝子を検出する方法であって、被試験体であるテスターと対照体であるドライバーの間で異なる遺伝子を効率的に探し出す方法である。

本件では臨床的に原因不明の輸血後肝炎例とされた上記3例中の症例2(詳しくは実施例6参照)の肝炎発症後検体をテスター(A)とし、同症例の輸血後の

肝炎発症前の検体（B 1）および別患者由来の急性B型肝炎患者検体（B 2）をドライバーとして輸血後肝炎発症後に初めて患者血液に見られた遺伝子を見いだした。

以下、手順を詳細に説明する。

（1）核酸の抽出

上記輸血後肝炎例（症例2）は、既知肝炎ウイルスマーカーのいずれもが陰性であった。その血清（症例2の輸血後8週および10週目の血清それぞれ50 μ lを混合したもの）を未知肝炎ウイルス陽性テスター（A）とした。

対照とする未知ウイルス陰性例としては（A）を得た同一患者の肝炎発症前（輸血後2週目）（B 1）と別患者である急性B型肝炎患者の血清（B 2）をドライバーとした。まずテスターおよびドライバーの血清それぞれ100 μ lから市販の核酸抽出キット（ISOGEN-LS、日本ジーン社製）を用いて核酸を抽出した。即ち、血清100 μ lと核酸抽出液300 μ lを1.5 mlのエッペンドルフチューブに取り、1分間攪拌混合した後、5分間室温に放置した。さらに遠心分離により壁面に残った液を落とした後、クロロフォルム80 μ lを添加し1分間攪拌し、5分間室温に放置した。反応終了後12000回転/分で15分間の遠心分離を行い上清を得た。上清210 μ lを別のエッペンドルフチューブに取り、これに20 mg/mlのグリコーゲン1 μ l（ベーリンガーマンハイム社製）とイソプロパノール（和光純薬社製）200 μ lを添加、混合した。10分間室温に放置して反応させた後、12000回転/分の冷却遠心分離（4℃）を10分間行い沈殿を得、70%エタノール（和光純薬社製）で洗浄した後風乾した。

（2）cDNAの合成

上記操作により得られた核酸の沈殿をDEPC-水（ジエチルピロカーボネート（シグマ社製）で処理した脱イオン水）10 μ lを用いて溶解した。この溶解液にランダムヘキサマー（50 ng/ μ l）1 μ lを添加し、70℃で5分間加温し、その後直ちに氷冷した。冷却後、溶解液に5倍濃度の第1鎖（1st strand）バッファーを4 μ l、0.1 MのDTTを2 μ l、10 mMのdNTPを1 μ l、RNA分解酵素阻害剤40 U/ μ l（RNasin, PROMEGA社製）を1 μ l、逆転写酵素200 U/ μ l（SuperScript II, GIBCO-BRL社製）を1 μ

1 加え 37℃で 60 分間反応させ第 1 鎖の cDNA 合成を行った。次に、この cDNA が入ったチューブに DEPC-水 を 91 μ l、5 倍濃度の第 2 鎖 (2nd strand) バッファー 30 μ l、10 mM の dNTP を 3 μ l、大腸菌 DNA ライゲース (10 U/ μ l) を 1 μ l、大腸菌 DNA ポリメラーゼ (10 U/ μ l) を 4 μ l、大腸菌 RNase H (20 U/ μ l) を 1 μ l 添加混合し、16℃で 2 時間反応させた。その後さらに T4 DNA ポリメラーゼ (5 U/ μ l) 2 μ l を反応液に加え 16℃で 5 分間反応し第 2 鎖 cDNA を合成した。反応は 0.5 M の EDTA を 5 μ l 添加して停止した。その後チューブにフェノール：クロロホルム (1 : 1) 混合液を 150 μ l 添加、混合し室温で 15000 回転/分、5 分間の遠心分離を行い蛋白質を沈殿として分離した。得られた上清 (156 μ l) にグリコーゲン (20 mg/ml) 1 μ l、7.5 M 酢酸アンモニウム (和光純薬社製) を 78 μ l、冷エタノール (和光純薬社製) を 562 μ l 加え、直ちに室温で 15000 回転/分で 20 分間遠心分離し、核酸を沈殿分画として得た。沈殿を冷 70% エタノール 600 μ l で洗浄、風乾した後 50 μ l の TE バッファー (10 mM Tris-HCl、pH 7.5 - 1 mM EDTA) で溶解した。さらにこの溶解液を Microspin S-400 HR Column (ファルマシア製) を用いゲル濾過した。得られた溶出液 (50 μ l) に 1/10 容積の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と 2.5 倍容積のエタノールを添加し -80℃で 20 分間静置の後、4℃で 15000 回転/分の遠心分離を 20 分間行い、cDNA/DNA 分画を沈殿として回収した。

(3) Sau3AI 消化

上記操作で回収した cDNA/DNA 分画を 45 μ l の水に溶解した後に、10 倍濃度の H バッファー (制限酵素 Sau3AI 付属緩衝液) (宝酒造社製) 5 μ l、Sau3AI (宝酒造社製) (12 U/ μ l) 4 μ l を添加、混合し 37℃で 1.5 時間反応させた。反応終了後、反応液にフェノール：クロロホルム (1 : 1) 混合液 40 μ l を加え、攪拌し、室温、15000 回転/分の遠心分離を 15 分間行った。上清 (60 μ l) に 1/10 容積の 3 M 酢酸アンモニウム、pH 5.2 と 2.5 倍容積のエタノールを添加後、-80℃で 20 分間静置し、その後 4℃で 15000 回転/分の遠心分離を 20 分間行い核酸を沈殿として回

収した。

(4) アダプターの接続

次に制限酵素 *Sau3AI* の切断点の塩基配列に適合したアダプター *R-Bam24* および *R-Bam12* を結合させ、断片両端にアダプターを導入した。即ち上記の操作で得られた核酸分画沈殿を $16.1\mu\text{l}$ の水に溶解し、これに 10 倍濃度の *T4* ライゲースバッファー (*NEB* 社製) $3\mu\text{l}$ とアダプター *R-Bam24* ($100\text{OD}/\text{ml}$) $6.0\mu\text{l}$ 、アダプター *R-Bam12* ($100\text{OD}/\text{ml}$) $3.0\mu\text{l}$ を添加してから環境温度を 50°C から 10°C へ 1 時間かけて下げ、その後 *T4* ライゲース ($400\text{U}/\mu\text{l}$) (*NEB* 社製) を $1.5\mu\text{l}$ 加え 16°C で一晩反応させた。

(5) PCR 増幅

次にこの遺伝子断片に *DNA* ポリメラーゼを作用させ、全長に亘り完全な 2 本鎖である遺伝子断片を得、さらにこの遺伝子断片について *R-Bam24* をプライマーとした *PCR* を行い、この遺伝子断片を増幅した。即ち、上記作業によりアダプターが導入された核酸分画液を 70°C で 15 分間加温し反応液中の *T4* ライゲースを失活させた。その後 10 倍濃度の *TaKaRa EX Taq Polymerase* バッファー (*宝酒造* 社製) $20\mu\text{l}$ と 2.5mM の *dNTP* $24\mu\text{l}$ 、水 $149.3\mu\text{l}$ 、*R-Bam24* ($100\text{OD}/\text{ml}$) $5.2\mu\text{l}$ を加えて 70°C で 3 分間反応させ、その後 *TaKaRa EX Taq Polymerase* $1\mu\text{l}$ を添加して次の条件で *PCR* を実施した。 72°C 、 5 分間処置後、 95°C 1 分間— 72°C 3 分間を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル実施し、ついで 72°C 7 分間処置した後に 4°C まで冷却した。反応終了後前記の方法と同様にして核酸をフェノール、クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿させた。さらにこの *PCR* 産物 8 本分の沈殿を一つにして $100\mu\text{l}$ の *TE* バッファーに溶解し、前述同様の方法でゲル濾過し溶出液を得て、これをエタノール沈殿させた。

(6) アダプターの除去

ゲル濾過後エタノールで沈殿させた *PCR* 産物に $90\mu\text{l}$ の水を加えて溶解した。この溶解液に 10 倍濃度の *H* バッファーを $10\mu\text{l}$ 加え、更に *Sau3AI* を $7\mu\text{l}$ 加え 37°C で 15 分間反応させた。その後前記同様の方法で核酸を沈殿

として回収してから、前記同様にMicroSpin S-400 HR Columnを用いてゲル濾過し、エタノールで沈殿回収した。その後再溶解し260nmの吸光度を測定し、収量を確認した。

(7) テスターへのアダプター (J-Bam24/J-Bam12) の接続

次にテスターの増幅遺伝子断片にのみSau3AI配列に適合したアダプターJ-Bam24とJ-Bam12を接続した。即ち、上記作業によりR-Bam24/R-Bam12テスターが外された増幅産物のうち、テスター由来のものについて10倍濃度のT4ライゲースバッファーをPCR産物1.0μgに対し3μl加え、更にアダプターJ-Bam24 13.2μlとJ-Bam12 6.6μlおよび水4.9μlを加えて環境温度を50℃から10℃へ1時間かけて下げアニーリングさせた。この反応液にT4DNAライゲース(400U/μl)(NEB社製)1.0μlを加え16℃で一晩反応させSau3AI切断端にアダプターを接続した。その後70℃で10分間反応させライゲースを失活させた。

(8) 作成したアダプター付きテスター増幅遺伝子断片と、アダプターを外したままのドライバー増幅遺伝子断片のハイブリダイゼーション

上記作業でアダプターが接続されたテスター由来の増幅産物と、その前の作業でアダプターを取り除いたままにしておいたドライバー由来の増幅産物を熱変性させ、全て1本鎖DNAとした後に再会合させた。即ち、まず反応液にフェノール：クロロホルム混合液(1:1)30μlを加え、蛋白質を除いた。得られた上清17μlにアダプターを除去したドライバー遺伝子増幅産物40μgを添加し、エタノール沈殿させた。この沈殿に3倍濃度のEEバッファー4μlを加えて溶解し、さらに30μlのミネラルオイル(シグマ社製)を重層した後、98℃で10分間反応させてDNAを変性させた。変性後直ちに氷冷し、5Mの塩化ナトリウム(和光純薬製)1μlを添加した。ついで67℃で約22時間反応させハイブリダイゼーションを行った。

上記の作業で、ヒトに由来する遺伝子の様な、テスターとドライバーの双方に共通して存在する遺伝子については、本来の組み合わせ、即ちテスター由来のDNA同士、あるいはドライバー由来のDNA同士が再会合した2本鎖DNA(ホモ2本鎖DNA)と、テスターとドライバーの遺伝子を1本ずつ持つ2本鎖DN

A（ヘテロ 2 本鎖 DNA）が形成される。他方、テスターにのみ存在する DNA（外来の遺伝子と考えられる）は、対応する同種遺伝子がドライバーには存在しないため、ヘテロ 2 本鎖 DNA は形成されずテスター由来のホモ 2 本鎖 DNA だけが形成される。またテスター由来の遺伝子鎖を持つ 2 本鎖 DNA のみがアダプター配列を両鎖に有している。

（9）増幅

上記の作業でハイブリダイゼーションした試料に $15\mu\text{l}$ の水を加えてから前記の方法に従って核酸をエタノール沈殿した。この沈殿に $1/2$ の TE バッファー（ 5mM Tris-HCl、 $\text{pH} 7.5-0.5\text{mM}$ EDTA） $20\mu\text{l}$ を加えて溶解した。さらにこの溶液 $2\mu\text{l}$ に対し、 10 倍濃度の Ex Taq Polymerase バッファー $20\mu\text{l}$ 、 2.5mM dNTP $240\mu\text{l}$ 、水 $147.7\mu\text{l}$ 、TaKaRa EX Taq polymerase $1\mu\text{l}$ を添加し 72°C で 5 分間反応させた。この反応で上記作業で形成された 2 本鎖 DNA の中で 1 本鎖のままになっていた部分について DNA 合成が行われ末端は平滑端となる。この試料に J-Bam-24（ $10\text{OD}/\text{ml}$ ）をプライマーとして $5.3\mu\text{l}$ 加え、 95°C 、 1 分— 70°C 、 3 分を 1 サイクルとする反応を 10 サイクル繰り返し、その後 70°C に 7 分おいてから 4°C に放置する条件で PCR を行った。増幅された試料から先述の方法と同様にしてフェノール：クロロフォルム混合液を用いて核酸を抽出し、その後グリコーゲンを共沈剤として使用してエタノール沈殿した。この条件では、J-Bam24 がアダプターとして接続されていたテスター由来の遺伝子のみが、加えられた J-Bam24 をプライマーとして利用し増幅可能である。その結果、テスター特異的遺伝子由来のホモ 2 本鎖 DNA に由来する DNA は共に増幅可能なので、対数的に増幅できる。一方、テスター／ドライバーに共通する遺伝子より構成されるヘテロ 2 本鎖 DNA に由来する DNA は、テスターを鋳型とするドライバー遺伝子配列を有する DNA 鎖だけが倍数的に増加するに過ぎない。ドライバー遺伝子だけから構成されるホモ 2 本鎖 DNA に由来する DNA 鎖は加えられたプライマーがハイブリダイズできないため増幅することができない。このような結果として、増幅後の反応液中にはテスター特異的遺伝子配列を有するホモ 2 本鎖 DNA が多数を占めるようになる。

(10) ムング・ビーン・ヌクレアーゼ(Mung Bean Nuclease)処理

反応液中に存在する1本鎖のドライバー遺伝子配列DNAを除いてテスター特異的遺伝子のみを得るため(正確には少数のドライバー由来の2本鎖DNAが残る)にムング・ビーン・ヌクレアーゼ(以下「MBN」と略記する)処理を行った。即ちテスターAとドライバーB1あるいはテスターAとドライバーB2でハイブリダイゼーションさせた試料から沈殿させて得た核酸分画に、それぞれ10 μ lの1/2濃度のTEバッファーを加え溶解した。それぞれの溶解液から5 μ lを取り、これに10倍濃度のMBNバッファー2 μ l、水13 μ l、MBN(300 U/ μ l)(宝酒造社製)0.5 μ lを加え37℃で30分間反応させた。反応終了後50 mM Tris-HCl(pH 8.9)80 μ lを加え、95℃で5分間反応させヌクレアーゼを失活させた。上記反応液から5 μ lおよび10 μ lをとり、更にヌクレアーゼ処理を加えなかった上記のハイブリダイゼーション試料1 μ lにそれぞれ10倍濃度のEx Taq Polymeraseバッファー20 μ l、2.5 mM dNTP 24 μ l、プライマーJ-Bam24とTaKaRa Ex Taq DNA Polymerase 1 μ lを加え、さらに水を加えて総量を200 μ lとして次の条件でPCRを実施した。即ち、95℃、1分間-70℃、3分間からなる反応サイクルを20回繰り返し、さらに70℃、7分間の反応を行った後に4℃まで反応温度を下げた。このPCR産物から10 μ lを取り、2.5% NuSieve 3:1 アガロース(FMC BioProducts, USA)のゲル電気泳動(1 $\times$ TBEバッファー)を行った。得られた結果はAとB1の組み合わせのものとAとB2の組み合わせのものとで同一であったので、以後はAとB1の組み合わせについてのみ述べる。

残った増幅産物から先述のフェノール:クロロホルム混合液を用いた抽出法を用いて核酸を抽出、エタノールで沈殿させ回収した。この沈殿にTEバッファー45 μ lを加え溶解した。この溶液を先述のMicroSpin S-400 HR Columnを用いてゲル濾過し、その溶出液をエタノール沈殿させた。

(11) アダプターの除去

上記で得た沈殿を63 μ lの水に溶解し、10倍濃度のHバッファー7 μ lとSau3AI(12 U/ μ l)6 μ lを加え、37℃で1.5時間反応させJ-Bam24/J-Bam12アダプター部分を切断した。この反応液から先述のフェノール:クロロフ

ホルム混合液を用いて蛋白質を除去した後、核酸をエタノールで沈殿させた。この沈殿を $90\ \mu\text{l}$ の TE バッファーで溶解後、MicroSpin S-400 HR Column を用いてゲル濾過して切断されたアダプターを除去し、アダプター除去増幅産物である溶出液をエタノール沈殿してから $10\ \mu\text{l}$ の $1/2$ 濃度の TE バッファー ($5\ \text{mM Tris-HCl}$, $\text{pH } 7.5$ - $0.5\ \text{mM EDTA}$) で溶解した。この溶解液の $260\ \text{nm}$ の吸光度を測定して収量を求めた。この分画にはテスター特異的遺伝子が含まれていると考えられる。

(12) 再サブトラクション

上記の作業で得たテスター特異的遺伝子の候補 DNA 分画 $1\ \mu\text{g}$ について 10 倍濃度の T4 DNA ライゲースバッファー $3\ \mu\text{l}$ とアダプター N-Bam24 $13.2\ \mu\text{l}$ 、N-Bam12 $6.6\ \mu\text{l}$ を加え、更に水で総量を $28.5\ \mu\text{l}$ としてから温度を 50°C から 10°C まで 1 時間かけて低下させた。次に T4 DNA ライゲース ($400\ \text{U}/\mu\text{l}$) を $1.5\ \mu\text{l}$ 添加し 16°C で一晩反応させアダプターを接続した。その後 70°C で 10 分間反応させて T4 DNA ライゲースを失活させ、さらに常法に従いフェノール：クロロホルム混合液で蛋白質を除去後、エタノールで沈殿させた。この上清 $17\ \mu\text{l}$ (DNA 量として約 $0.5\ \mu\text{g}$) にドライバー B1 DNA を $40\ \mu\text{g}$ 添加し、混合後エタノールで沈殿させた。この沈殿に 3 倍濃度の TE バッファーを $4\ \mu\text{l}$ 加え溶解し、さらに $30\ \mu\text{l}$ のミネラルオイル (シグマ社製) を重層した後、 98°C で 1 分間加熱処理して DNA を熱変性させた。変性後直ちに氷冷し、 $5\ \text{M}$ の塩化ナトリウム (和光純薬社製) を $1\ \mu\text{l}$ 添加し、 67°C で約 21 時間反応させハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションして得た試料から先述同様の方法で核酸をエタノール沈殿させた。この沈殿に $1/2$ 濃度の TE バッファー $20\ \mu\text{l}$ を加えて溶解し、さらにこの溶液 $2\ \mu\text{l}$ に対して 10 倍濃度の EX Taq DNA polymerase バッファー $20\ \mu\text{l}$ 、 $2.5\ \text{mM dNTP}$ $240\ \mu\text{l}$ 、水 $147\ \mu\text{l}$ 、TaKaRa Ex Taq DNA polymerase $1\ \mu\text{l}$ を添加し 72°C で 5 分間反応させ平滑末端化した。この試料に N-Bam24 ($100\ \text{OD}/\text{ml}$) をプライマーとして $5.3\ \mu\text{l}$ 加え、 95°C 、3 分 - 70°C 、3 分を 1 サイクルとする反応を 10 サイクル繰り返し、その後 70°C に 7 分おいてから 4°C に放置する条件で PCR を行った。増幅された試料から先述の方法と

同様にしてフェノール：クロロホルム混合液を用いて核酸を抽出し、その後グリコーゲン添加してからエタノールで核酸を沈殿させた。この核酸分画に10 μ lの1/2濃度のTEバッファーを加えて溶解した。溶解液から1 μ lを取り、これに10倍濃度のTaKaRa Ex Taq DNA polymerase 1 μ lを加えて次の条件でPCRを実施した。即ち、95℃、1分間－70℃、3分間からなる反応サイクルを20回繰り返し、さらに70℃、7分間の反応を行った後に4℃まで反応温度を下げた。上記作業によりテスター特異的遺伝子が更にスクリーニングされた。今回の作業で回収されたDNA分画からアダプターを再度外し、さらにJ-Bam24/J-Bam12をアダプターとして利用して同一作業をもう一度繰り返し最終的なテスター特異的遺伝子クローン#22の候補を得た。

(13) クローン#22の分離

上記作業で得たテスター特異的遺伝子候補について以下の方法でその塩基配列を決定し、新規ウイルス遺伝子クローン#22を分離した。すなわち、#22はいずれも両端にSau3AI切断配列を有している。この配列を利用してpT7BlueTベクター（Navagen社製）にクローン化した。このクローンを大腸菌TG-1にトランスフェクションし、形質転換細胞をスクリーニングした。さらに得られた形質転換細胞のプラスミドDNAの解析を行った。即ち合計60のクローンについて、プラスミドDNAを調製し、それぞれのDNAについてThermo Sequencer Fluorescent-labelled primer cycle sequencing kit(Amersham International plc. Buckinghamshire, England)を用いて正逆両方向の塩基配列を決定した。この塩基配列に基づいてクローンを分類した。その結果、同一の塩基配列を有するクローンは13個得られた。このクローンの配列をアラインメントし、共通配列を探索した結果、配列番号11記載の配列が得られた。本配列を有するクローンをクローン#22と命名した。クローン#22の全長は500塩基長であった。

実施例2 HNT22遺伝子検出法(1)

実施例1で得られたHNT22クローン#22の塩基配列を構成する20塩基長のオリゴヌクレオチドを複数作成し、遺伝子増幅用のプライマーとしての有用性について様々な組み合わせについて検討を行った。即ち、当該遺伝子を分離し

た、該遺伝子陽性であるサンプルを対象にPCRを実施して当該遺伝子を効率よく増幅する配列とその組合わせを検索した。その結果配列番号2（プライマー名：RD037）および配列番号3（プライマー名：RD038）、さらに配列番号4（プライマー名：RD051）および配列番号5（プライマー名：RD052）に示す配列を有するオリゴヌクレオチドが遺伝子増幅用プライマーとして効率的に利用できることが判明した。RD037およびRD051はセンスプライマーであり、RD038とRD052はアンチセンスプライマーである。増幅はセンスプライマーとアンチセンスプライマーを一組として実施する。

遺伝子を検出した方法の詳細は以下の通りである。

核酸は、血清あるいは血漿100 μ lから市販の核酸抽出キット（EX R&D、住友金属工業製）を用いて抽出した。後述するようにHNT22ウイルスはDNAウイルスであることが判明していることから（実施例8）、本作業はウイルス遺伝子をDNAとして取り扱っている。抽出したDNAをTE緩衝液10 μ lに溶解し、その全量を試料とした。PCR専用チューブに10倍濃度のAmpliTaq DNA polymeraseバッファー（Perkin Elmer社製）5.0 μ l、10mM dNTP 1.0 μ l、プライマーRD037およびRD038をそれぞれ0.5 μ l（100OD/m l）、耐熱性DNAポリメラーゼ（AmpliTaq DNA Polymerase:Perkin Elmer社製）0.25 μ lを加え、更に蒸留水を加え全量を50 μ lとした。本反応液は用事調製とした。

この反応液の入ったチューブに上述の抽出DNA試料10 μ lを加え、更に50 μ lのミネラルオイルを重層し攪拌後、冷却遠心分離装置で6000rpm、30秒間遠心した。遠心後、チューブをサーマルサイクラーに装着し、PCRを行った。PCRの条件は95 $^{\circ}$ C、2分30秒の処置をまず行った後に、94 $^{\circ}$ C、30秒－55 $^{\circ}$ C、30秒－72 $^{\circ}$ C、45秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C、7分の反応を行い終了した。

さらに増幅を行う場合には、別のPCR専用チューブに10倍濃度のAmpliTaq DNA polymeraseバッファー（Perkin Elmer社製）5.0 μ l、10mM dNTP 1.0 μ l、先述のプライマーRD037とRD038より内側の塩基配列より選別したプライマーRD051とRD052をそれぞれ0.5 μ l（10

OD/ml)、耐熱性DNAポリメラーゼ (AmpliTaq DNA Polymerase:Perkin Elmer社製) 0.25 μ lを加え、更に蒸留水37.5 μ lを加え全量を約45 μ lとした。これに上記増幅産物5 μ lを加えて反応液とした。本反応液は用事調製とした。

反応液調製後、50 μ lのミネラルオイルを重層して攪拌し、冷却遠心分離装置で6000 rpm、30秒間遠心した後、チューブをサーマルサイクラーに装着し、PCRを行った。PCRの条件は、94℃、30秒-55℃、30秒-72℃、30秒のサイクルを25回繰り返し、最後に72℃、7分の反応を行うものであった。

増幅した遺伝子の検出は電気泳動法により行った。即ち、上記条件で増幅して得た増幅産物より10 μ lを取り、アガロース (2.5% NuSieve:アガロースEP=3:1) 電気泳動を実施した。泳動後アガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線下で増幅産物の有無を確認した。増幅産物はプライマーRD037/RD038のみを用いた場合には270 bpの位置のバンドとして、さらにプライマーRD051/RD052を用いて単独、あるいは追加の増幅を行った場合には197 bpの位置のバンドとして検出できる。

実施例3 HNT22遺伝子検出法(2)

実施例2のHNT22遺伝子検出法により日本人におけるHNT22ウイルス感染例を十分に検出することができたが、その後該増幅域の保存性を検討する目的で、多数の検体について該領域を含む範囲の配列を、後述の実施例7記載のプライマーNG001/RD038 (1st PCR) とNG001/RD052 (2nd PCR) を用いる方法で増幅し検討したところ、HNT22ウイルスには主要な2つの遺伝子型IおよびII (後述の実施例12に記載したように本発明者らによって名付けられた名称) を含む複数の遺伝子型が存在していることが判明した。さらにそのうちの遺伝子型IIと名付けた遺伝子型では、実施例2で利用したプライマーRD037およびRD051の配列内にミスマッチが散在し、特に3'側に存在することが判明した (図1~図5)。このミスマッチ配列を避けることにより、より特異的で高感度の遺伝子検出法が開発できると考え、より

保存性の高い配列を検索し、配列番号6（プライマー名：NG059）、配列番号7（NG061）、配列番号8（NG063）の配列を有するオリゴヌクレオチド（図1～図5）が遺伝子増幅用のプライマーとして利用できることを見だし、これを利用した新しいHNT22遺伝子検出法を完成させた。

遺伝子を検出する方法の詳細は以下の通りである。

実施例2と同様にして血清あるいは血漿50 μ lからDNAを抽出した。抽出したDNAを20 μ lの蒸留水に溶解した後、95 $^{\circ}$ Cで15分間処理し、その後直ちに水中で2分間冷して測定用の試料を調製した。PCR専用チューブに10倍濃度のAmpliTaq DNA Polymeraseバッファー(Perkin Elmer社製) 5.0 μ l、2.5mMのdNTP 4 μ l、プライマーNG059およびNG063をそれぞれ0.5 μ l（10OD/ml）ずつ、耐熱性DNAポリメラーゼ（AmpliTaq DNA Polymerase: Perkin Elmer社製）0.25 μ lを加え、さらに蒸留水29.75 μ lを加え全量を40 μ lとした。これに上記調製した試料のうちの10 μ lを加え、50 μ lのミネラルオイルを重層し攪拌、冷却遠心分離装置で6000rpm、30秒間遠心してから、チューブをサーマルサイクラーに装着しPCRを行った。PCRの条件は94 $^{\circ}$ C、30秒－60 $^{\circ}$ C、45秒－72 $^{\circ}$ C、45秒からなるサイクルを35回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C、7分間の反応を行い終了した。

さらに増幅を行う場合は、別のPCR専用チューブに10倍濃度のAmpliTaq DNA Polymeraseバッファー(Perkin Elmer社製) 5.0 μ l、2.5mMのdNTPを4 μ l、プライマーNG061およびNG063をそれぞれ0.5 μ l（10OD/ml）ずつ、耐熱性DNAポリメラーゼ（AmpliTaq DNA Polymerase: Perkin Elmer社製）0.25 μ lを加え、さらに蒸留水37.75 μ lを加え全量を48 μ lとした。これに上記増幅した試料のうちの2 μ lを加え、50 μ lのミネラルオイルを重層し攪拌、冷却遠心分離装置で6000rpm、30秒間遠心してから、チューブをサーマルサイクラーに装着しPCRを行った。PCRの条件は94 $^{\circ}$ C、30秒－60 $^{\circ}$ C、45秒－72 $^{\circ}$ C、45秒からなるサイクルを25回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C、7分間の反応を行い終了した。増幅した遺伝子は実施例2記載のアガロース電気泳動方法と同様にして検出した。ただし、本例

では最初のプライマーNG059とNG063を用いたPCRにて増幅するHNT22遺伝子は286bpの位置のバンドとして、さらにプライマーNG061とNG063を用いたPCRでは271bpの位置のバンドとして検出できる。

尚、言うまでもなく本例で実施した2段階PCRを構成する各PCRは、それぞれ単独で実施してもかまわない。

さらに、実施例3の遺伝子検出法では遺伝子型IおよびIIを含む多くの異なった遺伝子のHNT22遺伝子の増幅に利用できること、実施例2記載の遺伝子増幅法が遺伝子型1に特異性を有する増幅が可能であることから、同一の検体について実施例2および3記載の遺伝子検出を試み、その検出のパターンより遺伝子型を分類することができる(図1～図5)。

実施例4 解明遺伝子の配列の延長

クローン#22を基に解明遺伝子配列を延長した。即ち、実施例2および3で確立した、RD037とRD038をプライマーのペアとするPCRと、RD051とRD052をプライマーのペアとするPCRとを組み合わせた2段階のPCR、および、NG059とNG063をプライマーのペアとするPCRと、NG061とNG063のプライマーをペアとするPCRとを組み合わせた2段階のPCRでHNT22ウイルスタイターを測定して高力価(10^{4-5} 倍に希釈してもHNT22遺伝子が検出可能なもの)を示す、肝機能異常を示した供血者(34歳、男性、ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)値106国際単位)の検体(血漿)を用いて、ウォーキング法により#22配列をさらに5'方向および3'方向に延長した。なお、得られた塩基配列(配列番号1)を有するウイルス株をT278と名付けた。

本例で実施したウォーキング法の実際は以下の通りである(図6)。

(1)クローンT4およびT6の配列の決定

クローン#22の塩基配列に特異的なセンスおよびアンチセンスプライマーおよび配列番号12から15記載の41塩基長の塩基配列をもつ非特異的プライマー(SSP-G、SSP-A、SSP-TおよびSSP-C)を用いて2段階のシングル・サイデド(single-sided)PCRを行った。

5' 方向の延長には特異的アンチセンスプライマーRD038あるいはRD052と上記非特異的プライマーのいずれかの1つと組合わせによる2段階のシングル・サイデッドPCRを行った。1段階目のPCR (1st PCR) は94℃、30秒-42℃、45秒-72℃、2分からなる反応サイクルを5回繰り返し、その反応産物をSizeSep-400 Column (Pharmacia Biotechnology社製) で精製した後、さらに94℃、30秒-55℃、45秒-72℃、2分からなる反応サイクルを35回繰り返し増幅した。2段階目のPCR (2nd PCR) は1st PCR産物の1/10量を用いて、94℃、30秒-55℃、30秒-72℃、2分からなる反応サイクルを30回繰り返して実施した。PCRはTaKaRa Ex Taq DNA Polymerase (宝酒造社製) を使用して実施した。実施例1記載の方法と同様にしてpT7BlueTベクターにクローン化し、3クローン以上のクローンについて両鎖の塩基配列を決定し、配列番号16記載の(配列番号1のnt1455-2257に相当する) 配列(クローンT4)、および配列番号17記載の(配列番号1のnt2061-3265に相当する) 配列(クローンT6)を得た。配列番号16記載の配列はプライマーSSP-AとRD052を組み合わせたPCR増幅の産物より、配列番号17記載の配列はプライマーRD051とSSP-Cの組み合わせの増幅産物より得た。

(2) クローンT7, T9, T11, T13の配列の決定

新たに判明したクローンT6およびT4を用いて、さらにクローンT4より5'側の配列、およびクローンT6より3'側の塩基配列について上記(1)と同様の方法を用いて解明した。即ち5'側の配列については、クローンT4の5'端側に特異的な配列を有する配列番号18と19記載の塩基配列をもつ特異的アンチセンスプライマー(NG012とNG013)ならびに配列番号12から15および20記載の塩基配列をもつ非特異的プライマーを用いた2段階のシングル・サイデッドPCRを実施してその増幅産物をクローン化し実施例1記載の方法にてその配列を決定した。具体的には、アンチセンスプライマーNG012と上記非特異的プライマーのいずれか一つの組み合わせによる第一段階目のPCRを実施した。PCR条件は94℃、30秒-55℃、30秒-72℃、2分からなる反応サイクルを5回繰り返し、その反応産物をSizeSep-400 Column (Pharmaci

a Biotechnology社製)で精製した後、さらに94℃、30秒-55℃、45秒-72℃、2分からなる反応サイクルを35回繰り返した。2段階目の増幅は、上記1段階目の増幅産物の1/10量を用いて、特異的アンチセンスプライマーにNG013を用いて94℃、30秒-55℃、30秒-72℃、2分からなる反応サイクルを30回繰り返し実施した。増幅産物を実施例1記載の方法と同様にしてpT7BlueTベクターにクローン化し、3クローン以上について両鎖の配列を決定して配列番号21記載の(配列番号1のnt945-1575に相当する)配列(クローンT9)を決定した(図6)。

3'側の配列については、クローンT6の3'端側に特異的な配列を有する配列番号22と23の特異的センスプライマーNG006ならびにNG010と配列番号12から15および20記載の非特異的プライマーを用いた前記同様の2段階のシングル・サイデッドPCRを用いた配列増幅、pT7blueTベクターへのクローニング、ならびに配列解析によって、配列番号24記載の(配列番号1のnt3126-3739に相当する)配列(クローンT7)を決定した(図6)。

さらに5'側の配列については、上記のクローンT9の配列を用いて同様の操作を繰り返し、配列番号25記載の(配列番号1のnt723-1024に相当する)配列(クローンT11)を、さらにクローンT11の配列を用いて配列番号26記載の(配列番号1のnt1-831に相当する)配列(クローンT13)を得た。これらの各クローンの配列をアラインメントし配列番号1記載のHNT22の配列を得た。クローンT11を得るために配列番号27記載の塩基配列をもつオリゴヌクレオチド(プライマー名:NG031)を第1段階目のシングル・サイデッドPCRのアンチセンスプライマーとして、配列番号28記載の塩基配列をもつオリゴヌクレオチド(プライマー名:NG032)を第2段階目のシングル・サイデッドPCRのアンチセンスプライマーとして使用した。クローンT13を得るためには、配列番号29記載の塩基配列をもつオリゴヌクレオチド(プライマー名:NG045)を第1段階目のシングル・サイデッドPCRのアンチセンスプライマーとして、そして配列番号30記載のオリゴヌクレオチド(プライマー名:NG039)を第2段階目のシングル・サイデッドPCRのアンチセンスプライマーとして使用した。非特異的プライマーには、上記同様、配列番号12から15および

配列番号 20 記載のオリゴヌクレオチドを使用した (図 6)。

配列を確定するために、上記作業で解明された配列内の nt1109-1575 (配列番号 31 : クローン T10)、nt12-759 (配列番号 32 : クローン T14)、ならびに nt3119-3315 (配列番号 33 : クローン T8) に相当する配列については、それぞれ配列番号 34 (プライマー名 : NG013) および 35 記載 (プライマー名 : NG025) の塩基配列をもつオリゴヌクレオチド、配列番号 36 (プライマー名 : NG040) および 37 (プライマー名 : NG046) 記載の塩基配列をもつオリゴヌクレオチド、配列番号 38 (プライマー名 : RD057) および 39 (プライマー名 : RD058) 記載の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドをプライマーペアとして増幅し、増幅産物を上記同様にクローニング後、配列を分析した (図 6)。

得られた各クローンの配列を結合して配列番号 1 記載の全長 3739bp の配列を得た。なお、配列を構築するにあたって、クローン間で重複する配列において変異が認められる (クローン間で異なる) 場合には、出現頻度の多い塩基を優先した。

得られた配列の内の、nt1455-3054 の配列についてデータベース (DDBJ、国立遺伝学研究所、検索プログラム : BLAST および FASTA) を用いて既知遺伝子配列との相同性検索を実施した。相同率が高い上位 20 位の遺伝子の内、ウイルスに由来するものは Simian cytomegalovirus major immediate early transcription unit IE94 のみで、その相同性は最も高い相同率を示した 383 塩基長の断片についてでも 50.7% に過ぎなかった。

このことから、本発明に開示する遺伝子配列と全長に涉り高い相同性を示すウイルス遺伝子は知られていないこと、本発明によって見いだされた遺伝子が新規な配列を有するものであることが確認された。

実施例 5 非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルスマーカー陰性のアラニンアミノトランスフェラーゼ値異常供血者および慢性肝炎患者例からの HNT22 遺伝子の検出

日本人の供血者に見いだされた既知肝炎ウイルスマーカーが陰性でアラニントランスフェラーゼ (ALT) の活性が 100 国際単位 (IU/l) 以上であった 207 名および γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ-GTP) の活性が 5

0.0 IU/l以上であった26名、ならびに非B非C型慢性肝炎の症例15名について、実施例2記載の遺伝子検出法を用いてHNT22遺伝子の有無を調べた。

対照として肝機能が正常な供血者88名とC型慢性肝炎患者例22名についても調べた。

その結果、ALT異常高値の供血者207名中16名(7.7%)、 γ -GTP異常高値の供血者26名中4名(15.4%)、非B非C型慢性肝炎例15名中3名(20%)にHNT22遺伝子が認められた。

他方、肝機能正常の供血者例では、88名中3名(3.4%)、慢性C型肝炎例では22名中2名(9.1%)にHNT22遺伝子が認められた。

実施例6 輸血後肝炎例からのHNT22遺伝子の検出

既知肝炎ウイルスマーカーが陰性であった輸血後肝炎例について、輸血前、輸血後肝炎発症前、肝炎発症後の患者血液、および(可能な場合には)輸血血液の各々について実施例2の方法を用いてHNT22遺伝子の存在および出現時期を調べた。

(1) 症例1

63歳の男性の輸血後肝炎例。

HBV、HCVおよびGBV-C/HGVのマーカーは本検討期間を通じていずれの時点も陰性であった。肝機能マーカーであるALTは輸血前に正常値を示していたが輸血後8週目、9週目に異常値を示した。この症例の輸血前(輸血後0週と表示)、輸血後6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 24週目の患者血液についてHNT22遺伝子を測定した。その結果、輸血前にもHNT22遺伝子が患者血清から検出された(表1)。本例に輸血された血液は4単位であった。この輸血血液についてHNT22遺伝子の有無を確認したところ、その内の1単位からHNT22遺伝子が検出された。

表 1

採血 (週)	A L T (I U / L)	H C V 抗体	GBV-C/HGV R N A	H N T 2 2 遺伝子 1stPCR	2ndPCR
0	1 1	—	—	+	+
6	6 2	—	—	N T	N T
8	1 0 9	—	—	N T	N T
9	4 4 3	—	—	+	+
1 0	1 4 8	—	—	+	+
1 1	4 1	—	—	—	+
1 2	2 0	—	—	—	+
1 5	3 3	—	—	+	+
2 4	1 9	—	—	—	+

N T : 未試験

(2) 症例 2

5 8 歳の男性の輸血後肝炎例。

H B V、H C V および G B V - C / H G V のマーカーは本検討期間を通じていずれも陰性であった。肝機能マーカーである A L T は輸血前に正常値を示していたが輸血後 1 0 週前後に異常値を示した。この症例の輸血後 2, 6, 8, 1 0 週目の患者血液について H N T 2 2 遺伝子を測定した。その結果、1 段階増幅の 1 s t P C R では輸血後 6 週および 8 週および 1 0 週目の血液から H N T 2 2 遺伝子が検出された (表 2)。それに対し 2 週目では力価 (titer) が低く 2 n d P C R で検出されるに過ぎなかった。本例については輸血した血液は保存されておらず、したがって、輸血血液について H N T 2 2 遺伝子の有無の確認はできなかった。

なお、本例は H N T 2 2 のクローン # 2 2 を分離した症例である。分離においてドライバーとして使用した 2 週目の血液にも本ウイルスが存在していたことが判明したが、高感度の 2 段階増幅時でのみ検出できたことから、この時点でのウイルス量は極めて少なく、そのため実質的にドライバーとして機能したと考えられる。

表 2

採血 (週)	A L T (I U / L)	H C V 抗体	GBV-C/HGV R N A	H N T 2 2 遺伝子 1stPCR	2ndPCR
2	3 6	—	—	—	+
6	3 7	—	—	+	+
8	5 5	—	—	++	+
1 0	1 8 0	—	—	++	+

(3) 症例 3

5 6 歳の男性輸血後肝炎例。

本例も H B V、H C V および G B V - C / H G V のマーカーは本検討期間を通じていずれも陰性であった。肝機能マーカーである A L T は輸血前には正常値を示していたが輸血後 6 週目前後に異常値を示した。この症例の輸血前（輸血後 0 週と表示）、輸血後 2，4，6，8、12、13 週目、4 ヶ月目および 5 ヶ月目の患者血液について実施例 2 記載の方法を用いて 2 段階の増幅を行う P C R を行い、H N T 2 2 遺伝子の有無を確認した。また、検体を 1 0 倍ずつ希釈した系列を作成し同様に測定して、検出される最高希釈倍率からウイルス遺伝子の力価（ウイルス量と考えられる）も求めた。その結果、輸血後 2 週目では陰性であったが、輸血後 6 週目から 4 ヶ月の各点の血液から H N T 2 2 遺伝子が検出された（表 3）。一方、肝機能異常は輸血後 6 週目から顕著となり、その後漸次軽快化した。その変化はウイルスの消長とよく一致した。本例については輸血した血液は保存されておらず、したがって、輸血血液についての H N T 2 2 遺伝子の有無の確認はできなかった。

表 3

採血 (週)	A L T (I U / L)	H C V 抗体	GBV-C/HGV R N A	H N T 2 2 遺伝子 1stPCR	2ndPCR
0	1 7	—	—	—	—
2	3 6	—	—	—	—
4	3 4	—	—	—	+
6	1 9 2	—	—	—	+
8	1 7 2	—	—	—	+

(4) 症例 4

70歳の女性の輸血後肝炎の例。

本例もHBV、HCVおよびGBV-C/HGVのマーカ―は本検討期間を通じていずれも陰性であった。肝機能マーカ―であるALTは輸血前には正常値を示していたが輸血後6週目前後に異常値を示した。この症例の輸血後4、6、8、11、12、15、16、17、および21週目の患者血液について実施例2および3の方法を用いた2段階の増幅を行うPCRを実施し、症例3同様にHNT 22遺伝子の有無とウイルス遺伝子の力価も求めた（実施例2および3の方法のいずれとも同様の結果が得られた）。その結果、輸血後4週目では陰性であったが、輸血後6週目から増加し、肝機能異常が最も顕著であった11週に最も高い力価を示し、その後ウイルスが消失するのと平行して肝機能も正常に復帰し、ウイルスの消長と肝機能異常の消長が良く一致した（表4）。本例については輸血した血液は保存されておらず、したがって、輸血血液についてのHNT 22遺伝子の有無の確認はできなかった。また、HNT抗体の有無を実施例13に記載の方法により測定したところ、発症後は陽性であった。

表 4

採血 (週)	A L T (I U / L)	HCV抗体	GBV-C/HGV R N A	H N T 2 2 遺伝子 1stPCR 2ndPCR	H N T 抗体
4	1 4	—	—	—	—
6	1 5	—	—	—	+
8	1 0	—	—	+	+
1 1	1 4 0	—	—	++	+
1 2	3 6	—	—	—	+
1 5	1 6	—	—	—	—
1 6	7	—	—	—	—
1 7	4	—	—	—	—
2 1	7	—	—	—	—

N T : 試験未実施

実施例 7 輸血感染例の検討

実施例 6 で既知肝炎マーカーが陰性で原因が不明であった輸血後肝炎例より本発明の H N T 2 2 遺伝子が検出され、また肝機能マーカー異常値の推移とウイルスの消長が良く一致したことから、H N T 2 2 が該肝炎の原因であることが強く示唆された。本例は、H N T 2 2 が輸血により感染することを一層明確に証することを目的に実施した。即ち、輸血歴があり、且つ輸血後の血液より H N T 2 2 遺伝子が検出された例で、輸血された血液パイロットが全例確保されているケースについて、輸血後の血液と輸血血液パイロットのすべてについて後述する方法により遺伝子測定を行い、感染源と考えられる遺伝子陽性輸血パイロットを特定し、さらに患者血液から得られた遺伝子とパイロットの遺伝子の配列を決定、比較し、配列の相同性を調べた。

実施例 2 記載の方法で輸血後 H N T 2 2 遺伝子陽性となった症例について、輸血前と、使用された輸血血液パイロットについて、H N T 2 2 遺伝子が検出されるか否かを調べた。その結果、輸血前の検体からは H N T 2 2 遺伝子は検出されなかったが、輸血後 2 週目以降の検体からは全て H N T 2 2 遺伝子が検出され輸血により感染したことが強く示唆された。

さらに、使用した血液パイロットの 1 0 本全てについて H N T 2 2 遺伝子測定

を実施したところその内の1本からHNT22遺伝子が検出された。HNT22陽性となった検体全てから、実施例2記載の方法に従い核酸を抽出した。ついで第1段階の増幅は実施例2の1st PCRのセンスプライマーRD037を配列番号40記載の塩基配列をもつプライマーNG001に変更し、PCR条件を94℃、30秒-55℃、30秒-72℃、1分の反応サイクルに変更し35回繰り返した。本条件で増幅すると陽性例では415bpのDNA断片が得られる。実施例2で第2段階の増幅に使用したセンスプライマーRD051をNG001に変更し、PCR条件を94℃、30秒-55℃、30秒-72℃、1分からなる反応サイクルを25回繰り返す条件にして実施した。本条件で増幅すると陽性例では396bpのDNA断片が得られる。この396bpの増幅産物を実施例1と同様にプラスミドベクターに挿入し、クローン化した後、それぞれの増幅例について3クローンについて塩基配列を決定、比較して相同性を検討した。

その結果、HNT22陽性輸血血液パイロットより得たクローンの配列は、同パイロットから輸血された患者より得られたHNT22遺伝子配列と完全に一致した(図7)。このことから、HNT22ウイルスが輸血により感染し、その後持続化することが示された。なお、この遺伝子配列をクローン#22の配列と比べると、両端のプライマー由来配列以外の356塩基中3塩基が異なっていた。

実施例8 本発明ウイルスがDNAウイルスであることの証明

肝炎ウイルスにはHBVのようにDNAウイルスであるものと、HCVのようにRNAウイルスであるものが存在する。本発明のウイルスがいずれの種類のウイルスであるかを以下の作業より確かめた。

(1) 逆転写反応の工程を省略したPCR

実施例1に示す様に本ウイルス遺伝子を分離した試料は核酸抽出後に逆転写反応の工程を経ている。従って、逆転写反応後の試料中にはもともと存在していたDNAと、反応前はRNAとして存在していたが、逆転写反応によりDNAとなったものが混在している。したがって、もしも、本発明のウイルスがRNAウイルスであるならば、逆転写反応を省略することによりウイルスの遺伝子の検出が不可能または極めて困難になる。

このことから、本発明者らは、逆転写反応を省略した実施例 2 に基づく P C R を実施し、上記の可能性について検討した。その結果、逆転写反応を省略しても H N T 2 2 遺伝子を同等のレベルで検出可能であることが確認された。

このことから、H N T 2 2 は D N A ウイルスであると判定された。

(2) D N A 分解酵素処理による証明

本発明者らは上記 (1) の検討に加えて、実施例 2 の方法で H N T 2 2 遺伝子の存在が確認されている試料より抽出した核酸分画を D N A 分解酵素で処理し、これに逆転写反応を行い、得られた D N A をサンプルとして H N T 2 2 遺伝子測定を実施例 2 の方法で実施した。

具体的には実施例 2 と同じ市販のキット (E X R & D, 住友金属製) を用いて抽出した核酸分画を D N a s e I (宝酒造社製) で 3 7 ° C、3 0 分間処理した後、D N a s e I の活性を阻害した。そのサンプルを用いて実施例 1 記載の条件と同一条件で逆転写反応以降の操作を行い、H N T 2 2 遺伝子の検出を試みた。その結果、D N a s e I で処理すると H N T 2 2 遺伝子が検出されなくなることが判明した。

上記 (1) および (2) の結果より、本発明の H N T 2 2 ウイルスは D N A ウイルスであることが示された。

実施例 9 1 本鎖 D N A ウイルスであることの証明

(1) 制限酵素を用いた証明

D N A ウイルスには、遺伝子構造の異なる、即ち D N A 鎖が 1 本鎖のものと 2 本鎖のものの 2 種類が存在することが知られている。本発明者らは H N T 2 2 ウイルスの実体を知るうえで該特徴を明らかにすることが重要と考え、以下の実験を行った。

即ち、H N T 2 2 ウイルス遺伝子が自然界には 2 本鎖で存在すると仮定すると、その配列中には幾箇所かに制限酵素特異的な構造が認められる。しかし、もし該ウイルス遺伝子が 1 本鎖であれば、この制限酵素特異的配列は存在しないことになる。逆に、抽出された遺伝子が上記配列に特異性を持つ制限酵素に感受性である (切断される) ならば、本ウイルスの遺伝子は 2 本鎖構造を取っていると考え

られる。

本発明者らは上記の考えに立ち、HNT 22 遺伝子を2本鎖と仮定したときに配列内に特異配列が認められる制限酵素EcoRIと、対照として特異配列が認められない制限酵素BglIIについて切断の有無を調べた。

すでに実施例2および3記載の方法でHNT 22 ウイルス陽性であることが確認されている患者より得た血漿800 μ lより、実施例1記載の方法を用いてDNAを得た(90 μ l)。その内より各15 μ lをとり、それぞれについてEcoRI(宝酒造社製)またはBglII(宝酒造社製)を2 μ l加え37 $^{\circ}$ Cで2.5時間処理した。また、同時に制限酵素のかわりにリン酸緩衝液を加え同様の反応も行った。制限酵素処理の後、各サンプルより3 μ lを取り、10倍、100倍の希釈サンプルを作成し、それぞれについてEcoRI制限酵素特異配列がその内側に存在するプライマーNG001とRD038を用いて、EcoRI制限酵素特異配列を含むHNT 22 遺伝子領域を増幅した。その結果、いずれのサンプルでも制限酵素による切断は認められなかった。

(2) ムング・ビーン・ヌクレアーゼ(Mung Bean Nuclease)処理による証明

ムング・ビーン・ヌクレアーゼは1本鎖のDNAを特異的に切断することが知られている。従って、HNT 22 が1本鎖で存在しているのであれば、ムング・ビーン・ヌクレアーゼに感受性であると考えられる。

本発明者らは上記の考えに立ち、前記の制限酵素処理実験に用いたのと同じ患者より同様にDNAを得てムング・ビーン・ヌクレアーゼで処理した。また対照として実施例2の方法で増幅されるHNT 22 の一部領域をM13ファージに組み込み、2本鎖の状態のものと1本鎖の状態のものを作成し、それぞれについてムング・ビーン・ヌクレアーゼ処理を行った後に実施例2の方法に従いHNT 22 遺伝子の増幅を行った。その結果、HNT 22 陽性患者より得たDNAと1本鎖のファージ由来DNAでは増幅がかからず、ムング・ビーン・ヌクレアーゼに対し感受性であった。

上記(1)および(2)の結果よりHNT 22 遺伝子は1本鎖DNAとして存在しており、HNT 22 ウイルスは1本鎖DNAウイルスであることが判明した。

実施例 10 HNT 22 遺伝子にコードされるアミノ酸配列

実施例 4 にて解明された HNT 22 遺伝子配列に基づいて HNT 22 遺伝子にコードされるアミノ酸配列を解析した。得られた塩基配列中に開始コドン配列と終止コドン配列を探し、どの組み合わせの場合に通常考えられる大きさのオープンリーディングフレーム (ORF) が得られるかを判断基準として HNT 22 遺伝子の ORF を検索した。その結果、2 つの ORF (ORF 1 : nt589-nt2898 (770 アミノ酸残基) と、ORF 2 : nt107-nt712 (202 アミノ酸残基)) が存在することが判明した (図 6 および図 8)。このことから HNT 22 遺伝子は配列番号 9 および 10 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードしていることが推定される。

このアミノ酸配列に基づき、コードされるポリペプチドの疎水性／親水性特性を公知の方法で調べた (図 9)。

実施例 11 ウイルス粒子の分離

実施例 2 の方法で HNT 22 遺伝子が陽性であることが判明している血液をシヨ糖密度勾配遠心分離法を用いて分画し、HNT 22 遺伝子の密度分布を分析し、それからウイルス粒子としての可否を検討した。

(1) HNT 22 遺伝子陽性の血液 250 μ l と、対照となる HBV 陽性の血漿 5 μ l を混合し、微量冷却遠心分離装置を用いて 15000 回転／分で 5 分間遠心分離し、不純物を沈殿させ、取り除いた。

(2) 上記 (1) の操作で得た上清 0.2 ml を、ベックマン SW60 ローター用の遠心管内に底から 60% (0.7 ml)、50%、40%、30%、20% および 10% (いずれも 0.2 ml) の順番で各重量濃度のシヨ糖液を重層して作成した密度勾配担体の上に添加し、さらにその上に 2.3 ml の TEN 緩衝液 (10 mM Tris-HCl、pH 8.0、1 mM EDTA、0.5 M NaCl) を重層した。

(3) 40000 回転／分、10℃で 45 時間遠心分離した後、チューブの底から 300 μ l ずつ回収し、それぞれについて屈折計を用いて密度測定を行った。

(4) 各密度分画より 100 μ l を取り、プロテナーゼ K (ベーリンガー・マンハ

イム社製)とドデシル硫酸ナトリウム(SDS、和光純薬社製)を含む抽出試薬 300 μ l (Okamoto H. et al., J. Virol. 64: 1298-1303, 1990) と混合し、70°Cで3時間反応させた。その後フェノールを加え核酸分画を抽出し、さらにフェノール/クロロホルムによる抽出を行った。最後にエタノールを加えて核酸を沈殿させ回収した後、TE緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0、1.0 mM EDTA)にて適当濃度になるよう溶解した。

(5) 得られたDNAをサンプルとしてHNT22遺伝子を実施例2の方法で増幅し、HBV遺伝子は以下の方法で増幅し検出した。

DNAサンプル5 μ lを、HBVの表面抗原遺伝子領域内の配列から選択した配列番号41記載の塩基配列をもつプライマーS2-1と配列番号42記載の塩基配列をもつプライマーS1-2を0.5 μ l (10 OD/ml) ずつと、2.5 mM dNTP 4 μ l、10倍濃度の耐熱性DNAポリメラーゼ用緩衝液(AmpliTaq DNA Polymerase 付属: Perkin Elmer 社製) 5 μ l、耐熱性DNA polymerase (AmpliTaq DNA Polymerase: Perkin Elmer 社製) 0.25 μ l、蒸留水34.75 μ lを含む増幅反応液の入ったPCR用チューブに加えた後、50 μ lのミネラルオイルを重層し、攪拌、さらに5000 rpmで30秒遠心分離してからサーマルサイクラーに装着しPCRを実施した。PCR反応条件は94°C、30秒-55°C、30秒-72°C、75秒で、このサイクルを35回実施した。この方法ではHBV遺伝子は電気泳動のゲル内では250 bpの長さのバンドとして検出できる。更に高感度の検出が必要な場合には、上記増幅産物の一部を用いて次の条件で第2段階のPCRを行った。即ち、増幅産物5 μ lを、使用するプライマーを配列番号43記載の塩基配列をもつプライマー\$088と配列番号44記載の塩基配列をもつプライマーS2-2に変更した以外は上記と同一の条件の反応溶液に加え、同様の操作をおこなった後にPCRを実施した。PCR反応条件は94°C、30秒-55°C、30秒-72°C、60秒で、このサイクルを25回繰り返した。第2段階目のPCRにより得られる増幅産物は228 bpのバンドとして電気泳動ゲル内に検出される。

上記分析の結果、HNT22遺伝子はシヨ糖密度54.5%、密度1.26 g

／ cm^3 にピークをもって存在し、他方コントロールとしてのHBVは従来の報告と同様、密度 $1.26 \sim 1.20 \text{ g/cm}^3$ にピークをもって存在することが判明した（表5）。この密度分析はHNT22遺伝子がウイルス粒子分画に存在していることを示しており、密度勾配遠心法にて上記密度分画に分離回収できることが示された。

表5 HNT22遺伝子のショ糖密度勾配遠心分画の分布

ショ糖密度 (%)	密 度 g/ml	HNT22-DNA		HBV-DNA	
		1stPCR	2ndPCR	1stPCR	2ndPCR
60.7	1.29	+	+	-	+
54.5	1.26	++	+	+++	+
45.2	1.20	±	+	+++	+
30.9	1.13	±	+	++	+
19.5	1.08	-	+	+	+
12.0	1.05	-	-	+	+

- : 陰性 ± : 弱陽性 + : 陽性 ++ : 中陽性 +++ : 強陽性

実施例12 HNT22遺伝子型配列

実施例3で記載の如く、HNT22には遺伝子型が存在することが示唆されたことから、本発明者らは実施例3記載の遺伝子検出法により陽性となったHNT22陽性例について、その増幅遺伝子を解析し、その遺伝子配列に基づいて分子系統樹を作成し、HNT22の遺伝子型を検索した。

発明者は、日本人、米国人、フランス人を対象として実施例3記載の方法によりHNT22遺伝子の有無を調べ、その結果合計で199例（日本人187例、米国人8例、フランス人4例）の陽性例を得た。これら陽性例について、増幅した遺伝子を実施例1記載の方法に従いクローニングし、それぞれ少なくとも3クローンについて塩基配列を決定し、市販ソフトを用いて分子系統樹を作成した（図10。各配列は図11～12に示す）。その結果、HNT22遺伝子は配列番号45から54記載の配列（配列番号1のnt1939-2160に相当）を有する10の型に分類された。本発明者らはそれぞれ遺伝子型1、2、3、4、5、6、7、

8、9および10と名付けた。

実施例13 分離HNT22ウイルス粒子を利用した免疫沈降法による抗HNT22抗体検出法

実施例11記載の方法によりHNT22粒子が分離回収できることがしめされた。本発明者はこれを利用した免疫沈降法による抗体の検出について検討した。

まず、血液中にHNT22遺伝子が存在していることが判明している5名のHNT感染患者より便を採取し、これを適当な液に懸濁して試料調製した後、実施例3記載の方法に従い便中のHNT22遺伝子の有無を調べた。その結果、便中にもHNT22遺伝子が存在すること、その浮上密度が 1.35 g/cm^3 であること、そしてその遺伝子配列が同一患者の血液より得たHNT22の遺伝子配列に同一であることが判明した。これより、HNT22粒子は便より回収することとした。

患者より得た便に蒸留水を加え15%（重量濃度）の懸濁液を作成した。この懸濁液を冷却遠心分離器（日立製）を用いて3000rpm、30分間遠心分離し、上清を得た。微量冷却遠心分離器（High Apeed Micro Refrigerated Centrifuge：トミー精工製）を用いてこの上清を更に10000rpm、5分間遠心分離した。その上清を集めてHNT22粒子液とした。粒子液のDNA力価は $10^5/\text{ml}$ であった。

血清ないし血漿 $50\mu\text{l}$ に上記HNT22粒子液 $10\mu\text{l}$ を加え、 37°C で24時間反応させた。反応後、二次抗体としてヤギ抗ヒトIgG（#46340，Cappel社製）を原液のまま $50\mu\text{l}$ 加え 37°C で1時間反応させた。反応終了後、微量冷却遠心分離器（High Apeed Micro Refrigerated Centrifuge：トミー精工製）を用いて10000rpm、5分間の遠心分離を行い、上清と沈殿に分離した。上清を別のエッペンドルフチューブに移し、市販の核酸抽出キット（EX R&D、住友金属社製）を利用してDNAを抽出した。一方、沈殿に $110\mu\text{l}$ の生理食塩水を静かに加え、10000rpmで5分間遠心分離を行い、上清を捨て、さらに生理食塩水 $110\mu\text{l}$ を滴下して懸濁した。この懸濁液から同様にDNAを抽出した。得られたDNA分画を $20\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解し、

9 5 °Cで5 分間処理し、その半量をH N T 2 2 遺伝子検出試料として用いた。H N T 2 2 遺伝子の検出は実施例 3 と同様にして実施した。同一血清ないし血漿にH N T 2 2 粒子液を添加せず同一作業を行ったもの、およびH N T 2 2 陰性の血清ないし血漿を用いて同一作業を行ったものを対照とした。

その結果、粒子液を加えたH N T 2 2 遺伝子陽性血清ないし血漿では、沈殿分画にH N T 2 2 遺伝子が認められたが、粒子液を加えない場合およびH N T 陰性血清ないし血漿を用いた場合には沈殿分画にH N T 2 2 遺伝子を認めなかった。このことから、H N T 2 2 抗体が存在するときのみ、H N T 2 2 粒子がこの抗体と抗ヒト I g G 抗体を介して集合し沈殿分画を形成すると考えられ、逆に上記作業により沈殿分画にH N T 遺伝子が認められる例では抗H N T 抗体が存在すると考えられる。

実施例 1 4 H N T 粒子液を用いた抗H N T 2 2 抗体検出法による輸血後肝炎例と劇症肝炎例における抗H N T 2 2 抗体の測定

発明者らは実施例 1 3 の方法を用いて、輸血後に一過性にH N T 2 2 に感染し肝機能異常を示した実施例 6 の症例 4 と、既知の肝炎ウイルス感染が否定された非 A - G 型散発性劇症肝炎例の回復期について抗H N T 2 2 抗体の消長を調べた（表 4 と 6 ）。

その結果、両例について抗H N T 2 2 抗体がウイルスの消失後に出現することが示され、ウイルス感染に於ける中和抗体の消長に類似した消長パターンを示すことが示された。

表6 非A-G型散発性劇症肝炎の回復期におけるHNT 2 2遺伝子と抗HNT 2 2抗体の消長

採血 (日)	ALT (IU/L)	HCV抗体	GBV-C/HGV RNA	HNT 2 2 遺伝子		HNT 抗体
				1stPCR	2ndPCR	
0	2568	—	—	+	—	—
2	523	—	—	+	+	NT
7	152	—	—	++	+	NT
18	28	—	—	+	+	NT
31	16	—	—	—	+	NT
38	9	—	—	—	—	+

NT：試験未実施

入院後	ALT	HCV	GBV-C/HGV
採血日	(IU/l)	抗体	RNA

実施例15 HNT 2 2 遺伝子の亜種の検出および配列決定

HNT 2 2 ウイルスには複数の遺伝子型が存在することが示されたこと（実施例12）、B型肝炎やC型肝炎などの他のウイルスでは地域的に遺伝子型の偏りがあること、から米国での主要なHNT 2 2 遺伝子型が日本での主要な型と異なる可能性があるため、米国人より得たHNT 2 2 陽性検体について検討を行った。

実施例3に記載の検出方法によりHNT 2 2 ウイルス陽性であることが確認されている米国人由来血清（それぞれUM3-17、UM3-34、UM3-56、UM3-73と称する）のそれぞれ100 μ lから、市販の拡散抽出キット（ベーリンガー・マンハイム社製、High Pure Viral Nucleic Acid Kit）を用い、使用説明書に従い核酸を抽出しサンプルとした。

これまでに判明しているHNT 2 2 ウイルスの配列に基づいて選択した配列番号55記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（NG055）および配列番号8記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（NG063）をプライマーとして用い、上記サンプルを鋳型として、下記の条件にてPCRを行った。用いたプライマーの位置関係を図13に示す。

P C R 条件

(1) 反応液組成

鋳型核酸溶液	1 0 μ l	
1 0 $\times$ Ex. Taq 緩衝液	5 μ l	
2.5 mM dNTP	4 μ l	
プライマー(NG055: 10 OD/ml)	1 μ l	(280nmにおけるOD、以下同じ)
プライマー(NG063: 10 OD/ml)	1 μ l	
蒸留水	2 9 . 5 μ l	
Ex. Taq DNAポリメラーゼ	1 μ l	

合計	5 0 μ l
----	-------------

(2) 反応条件

9 5 $^{\circ}$ C	2 分	
9 5 $^{\circ}$ C	4 5 秒	} 3 5 サイクル
5 5 $^{\circ}$ C	3 0 秒	
7 2 $^{\circ}$ C	9 0 秒	
7 2 $^{\circ}$ C	7 分	

その結果、全てのサンプルで遺伝子増幅が認められた。各サンプルについて複数の増幅断片を実施例 1 と同様にして T ベクターにクローニングし、遺伝子配列を決定した。その結果、UM 3 - 1 7 と UM 3 - 7 3 からは、これまでに判明している塩基配列に相同性の高い配列を有するクローンに加え、この塩基配列とは相同性の低い配列を有するクローンが得られた（以下、それぞれ、U 1 7 - 2 および U 7 3 - 2 と称する）。いずれも、これまでに判明している塩基配列の相当する領域の塩基配列との相同性は 3 0 % であった。UM 3 - 5 6 と UM 3 - 3 4 からは、これまでに判明している塩基配列と高い相同性を有するクローンしか得られなかった。

上記により得た U 1 7 - 2 クローンと、これまでに判明している H N T 2 2 ウイルスとの間で塩基配列を比較し、保存性の高い領域を選び、上記クローンのさらに 5' 側の塩基配列を増幅するためのプライマーとして、配列番号 5 6 記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (N T 0 1) を作成した。このオリゴヌクレオチド N T 0 1 と、これまでに判明している H N T 2 2 ウイルスの配列に基づいて作製した配列番号 5 7 記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (N G 0 5 4) とをプライマーとして、UM 3 - 1 7 由来の核酸を鋳型として用いて下記

の条件でPCRを行い、得られた増幅断片について上記同様の方法で配列決定を行った。プライマーの位置関係は図13に示す。

PCR条件

(1) 反応液組成

鋳型核酸溶液	10 μ l
10 $\times$ Ex. Taq緩衝液	5 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
プライマー(NT01: 10 OD/ml)	1 μ l
プライマー(NG054: 10 OD/ml)	1 μ l
蒸留水	29.5 μ l
Ex. Taq DNAポリメラーゼ	1 μ l

合計	50 μ l
----	------------

(2) 反応条件

95 $^{\circ}$ C	2分	
95 $^{\circ}$ C	45秒	} 35サイクル
55 $^{\circ}$ C	30秒	
72 $^{\circ}$ C	90秒	
72 $^{\circ}$ C	7分	

一方、同様にしてU17-2の3'側の塩基配列と、これまでに判明しているHNT22ウイルスの塩基配列に基づいて、上記クローンのさらに3'側の配列を増幅するためのプライマーとして、配列番号58および59記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（それぞれ、プライマーNT03およびNT04）を作製し、また、これまでに判明しているHNT22ウイルスの塩基配列の3'側末端部付近の塩基配列に基づいて、増幅のためのプライマーとして、配列番号60および61記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（それぞれ、プライマーNG065およびNG021）を作製した。まず、NT03とNG065を用いて3'側の遺伝子を増幅し、さらに得られた増幅断片の一部をNT04とNG065またはNG021を用いて増幅した。プライマーの位置関係は図13に示す。増幅は、鋳型として、UM3-17由来の核酸を用いて下記の条件で行った。増幅断片は、前記と同様の方法でその塩基配列を決定した。

P C R条件

第1段階P C R

(1) 反応液組成

鋳型核酸溶液	1 0 μ l
1 0 $\times$ Ex. Taq緩衝液	5 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
プライマー(NT03: 10 OD/ml)	1 μ l
プライマー(NG065: 10 OD/ml)	1 μ l
蒸留水	2 9 . 5 μ l
Ex. Taq DNAポリメラーゼ	1 μ l

合計	5 0 μ l
----	-------------

(2) 反応条件

9 5 °C	2 分	
9 5 °C	4 5 秒	} 3 5 サイクル
5 5 °C	3 0 秒	
7 2 °C	9 0 秒	
7 2 °C	7 分	

第二段階P C R

(1) 反応液組成

鋳型核酸溶液	5 μ l
1 0 $\times$ Ex. Taq緩衝液	5 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
プライマー(Nt04: 10 OD/ml)	0 . 5 μ l
プライマー(NG065: 10 OD/ml)または	
プライマー(NG021: 10 OD/ml)	0 . 5 μ l
蒸留水	3 4 . 5 μ l
Ex. Taq DNAポリメラーゼ	0 . 5 μ l

合計	5 0 μ l
----	-------------

(2) 反応条件

9 5 °C	2 分	
9 5 °C	4 5 秒	} 2 0 サイクル
5 5 °C	3 0 秒	
7 2 °C	9 0 秒	
7 2 °C	7 分	

上記のようにして、U 1 7 - 2 の 5' 側配列クローンとして 1 - 1、1 - 9 お

よび 1-10 を得、さらに 3' 側配列クローンとして 2A-3 (第二段階 P C R のプライマーが NT04/NG065 の組み合わせ)、ならびに、2B-1 および 2B-3 (第二段階 P C R のプライマーが NT04/NG021 の組み合わせ) を得た。これらのクローンについて上記と同様に塩基配列を決定して、これらを連結することにより米国人由来血清から検出されたウイルス遺伝子の塩基配列を得た (配列番号 62)。

本配列を H N T 2 2 遺伝子の塩基配列と比較すると、5' 側と 3' 側の領域で極めて高い相同性を認めるものの、それ以外の領域の配列についての相同性は 30% 程度と低く、また実施例 2 および 3 の検出方法ではこの配列を検出できないことが判明した。この遺伝子を有するウイルスは、T U S 0 1 と名付けた。

T U S 0 1 遺伝子の塩基配列について、実施例 10 と同様にして O R F を検索した。その結果、二つの O R F (O R F 1 : nt590-nt2872 (761 アミノ酸残基) と、O R F 2 : nt258-nt725 (156 アミノ酸残基)) が存在することが判明した (図 15)。これらは、H N T 2 2 遺伝子の塩基配列における O R F 1 および O R F 2 に相当する位置に存在した。

表 7 に各領域の相同性をまとめてしめす。

表 7 H N T 2 2 遺伝子と T U S 0 1 遺伝子の相同性

	H N T 2 2 ²⁾	T U S 0 1	配列相同性
全長	3 7 3 9 n t	3 7 2 2 n t	6 3 . 7 %
5' 非翻訳領域	2 6 2 n t	2 5 7 n t	9 0 . 3 %
翻訳領域	2 6 3 6 n t	2 6 1 5 n t	5 4 . 7 %
O R F 1	2 3 1 0 n t	2 2 8 3 n t	5 4 . 8 %
(アミノ酸配列)	7 7 0 a a	7 6 1 a a	3 7 . 0 %
O R F 2 ¹⁾	4 5 0 n t	4 6 8 n t	5 5 . 5 %
(アミノ酸配列)	1 5 0 a a	1 5 6 a a	3 8 . 8 %
3' 非翻訳領域	8 4 1 n t	8 5 0 n t	8 4 . 2 %

1) O R F 2 については、T U S 0 1 に合わせて比較するため、H N T 2 2 については第 2 番目の A T G コドンからのフレームを採用した。

2) H N T 2 2 として用いた配列は T A 2 7 8 のものである。

相同性の高い5'非翻訳領域(5'端領域)および3'非翻訳領域(3'端領域)の塩基配列を比較した結果を図15および16に示す。

TUS01遺伝子の塩基配列について既知配列との相同性をFASTおよびBLASTを利用して実施例4と同様に検索したところ、高い相同性を示したものは全てHNT22遺伝子の塩基配列であった。

以上の性質からみて、TUS01ウイルスは、HNT22ウイルスの亜種と推定される。

実施例16 HNT22遺伝子およびTUS01の同時検出

実施例2および3の検出方法では、検出し得ないTUS01遺伝子も同時に検出できる方法を検討した。

両方の配列を比較し、共通する配列を有し、PCRのプライマーとして適切と思われるオリゴヌクレオチドとしてNG054とNG065を選択した。血清100 μ lから実施例2に記載の方法に従い核酸を抽出した。抽出した核酸を蒸留水10 μ lに溶解した。NG054およびNG065(共に100D/ml)の溶液1 μ l、10倍濃度のEx. Taq緩衝液(TaKaRa社製)5 μ l、2.5mMdNTP4 μ l、蒸留水29.5 μ lの入ったPCR専用チューブに溶解した核酸10 μ lを加え、すぐに耐熱性DNAポリメラーゼ(Ex. Taq Polymerase: TaKaRa)を加え、95℃2分の処置をした後、95℃45秒、55℃30秒、72℃120秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃7分の反応を加えて、増幅した。増幅産物をアガロース電気泳動を用いて分離し、塩基配列より予測される長さのバンドの存在を確認した。バンドが確認できた増幅産物について、その配列を決定した。その結果、本法により、HNT22遺伝子およびTUS01遺伝子を同時に検出できることが判明した。

産業上の利用可能性

本発明は、従来原因が不明であった血液伝播性肝炎について、未知の原因ウイルスを特定した。これによって、遺伝子測定、抗原測定、抗体測定法を確立し、該肝炎検査のためのキット、予防のためのワクチンを提供できる。

請求の範囲

1. 配列番号57に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号60に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR、または配列番号57に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号61に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRによって、およそ3500塩基からおよそ4000塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子。

2. 前記PCRによって、およそ3600塩基からおよそ3900塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する請求項1記載のウイルス遺伝子。

3. 前記PCRによって増幅される断片の5'端および3'端の塩基配列が、配列番号1記載の塩基配列の塩基番号3～300および塩基番号2402～3739の塩基配列に対し、それぞれ、70%以上の相同性を有する請求項1または2記載のウイルス遺伝子。

4. 前記相同性が80%以上である請求項3記載のウイルス遺伝子。

5. 配列番号6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRによって、およそ200塩基からおよそ350塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子。

6. 配列番号7に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRによって、およそ200塩基からおよそ350塩基の長さの配列が増幅可能な塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子。

7. 配列番号1に記載の塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子またはその同種変異体遺伝子。

8. 配列番号45に記載の塩基配列、配列番号46に記載の塩基配列、配列番号47に記載の塩基配列、配列番号48に記載の塩基配列、配列番号49に記載の塩基配列、配列番号50に記載の塩基配列、配列番号51に記載の塩基配列、配列番号52に記載の塩基配列、配列番号53に記載の塩基配列、および、配列番号54に記載の塩基配列からなる群から選ばれる塩基配列を有する請求項5～

7のいずれか1項に記載のウイルス遺伝子。

9. 配列番号1に記載の塩基配列を有する非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子。

10. 請求項1～9のいずれか1項に記載の遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

11. 請求項1～9のいずれか1項に記載の遺伝子の塩基配列内に認められる、前記遺伝子に特異的な塩基配列またはそれに相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

12. 配列番号2記載の塩基配列、配列番号3記載の塩基配列、配列番号4記載の塩基配列、配列番号5記載の塩基配列、配列番号6記載の塩基配列、配列番号7記載の塩基配列および配列番号8記載の塩基配列から選ばれる塩基配列を有する請求項11に記載のオリゴヌクレオチド。

13. 請求項11記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子検出法。

14. 配列番号2に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号3に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、または、配列番号4に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号5に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子検出法。

15. 配列番号6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、または、配列番号7に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子検出法。

16. 1の検体に関し請求項14および15に記載の遺伝子検出法の両方を実施し、両遺伝子検出法により得られた結果を比較することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子型判別法。

17. 請求項8に記載の遺伝子にある各遺伝子型特異的配列を有するオリゴヌクレオチドを用いてハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする非B非C

非G型肝炎ウイルス遺伝子型判別法。

18. 請求項1～9のいずれか1項に記載の遺伝子の塩基配列に認められるオープンリーディングフレーム内にコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

19. 配列番号1記載の塩基配列に認められるオープンリーディングフレーム内にコードされるアミノ酸配列を有する請求項18記載のポリペプチド。

20. 配列番号9記載のアミノ酸配列を有する請求項18記載のポリペプチド。

21. 配列番号10記載のアミノ酸配列を有する請求項18記載のポリペプチド。

22. 配列番号9または10記載のアミノ酸配列内に認められる非B非C非G型肝炎ウイルス特異的なアミノ酸配列からなるポリペプチド。

23. 非B非C非G型肝炎ウイルス特異的エピトープを含む、請求項18に記載のポリペプチド。

24. 非B非C非G型肝炎ウイルス粒子が有する密度に基づいて、前記粒子を分離することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス粒子の分離法。

25. 請求項24記載の方法により分離されたウイルス粒子。

26. 請求項25記載のウイルス粒子より得られる非B非C非G型肝炎ウイルスポリペプチド。

27. 配列番号9または10記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部の配列を組み込んだ組換え遺伝子発現ベクター。

28. 配列番号9または10記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部の配列を保持する形質転換細胞。

29. 請求項28記載の形質転換細胞により発現される非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドまたはその断片。

30. 請求項28記載の形質転換細胞を、非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドが発現する条件で培養し、発現させた前記ペプチドを採取することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドの生産方法。

31. 請求項18～23および26のいずれか1項に記載のポリペプチドま

たは請求項 25 記載のウイルス粒子を抗原として用いる非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス抗体の免疫学的検出方法。

32. 請求項 18～23 および 26 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求項 25 記載のウイルス粒子を免疫原として、動物を免疫することの特徴とする非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス抗体の作成方法。

33. 請求項 32 に記載の作成方法によって得られる抗体。

34. 請求項 33 記載の抗体を用いる非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス抗原の免疫学的検出方法。

35. 配列番号 1 記載の塩基配列にあるオープンリーディングフレームにコードされるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス中和抗体のエピトープ配列を含むポリペプチドを含むワクチン。

36. 請求項 25 記載のウイルス粒子を含むワクチン。

37. 配列番号 62 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子またはその同種変異体遺伝子。

38. 配列番号 62 に記載の塩基配列を有する非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子。

39. 請求項 37 または 38 に記載の遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチド。

40. 請求項 37 または 38 に記載の遺伝子の塩基配列内に認められる、前記遺伝子に特異的な塩基配列またはそれに相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

41. 配列番号 57 記載の塩基配列、配列番号 60 記載の塩基配列および配列番号 61 記載の塩基配列から選ばれる塩基配列を有する請求項 40 に記載のオリゴヌクレオチド。

42. 請求項 41 記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて PCR を行うことを特徴とする非 B 非 C 非 G 型肝炎ウイルス遺伝子検出法。

43. 配列番号 57 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 60 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、または、配列番号 57 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 61 に記載の塩基

配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子検出法。

44. 請求項37または38に記載の遺伝子の塩基配列に認められるオープンリーディングフレーム内にコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

45. 配列番号62に記載の塩基配列に認められるオープンリーディングフレーム内にコードされるアミノ酸配列を有する請求項44記載のポリペプチド。

46. 配列番号63記載のアミノ酸配列を有する請求項44記載のポリペプチド。

47. 配列番号64記載のアミノ酸配列を有する請求項44記載のポリペプチド。

48. 配列番号63または64記載のアミノ酸配列内に認められる非B非C非G型肝炎ウイルス特異的なアミノ酸配列からなるポリペプチド。

49. 非B非C非G型肝炎ウイルス特異的エピトープを含む、請求項44に記載のポリペプチド。

50. 配列番号63または64記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部の配列を組み込んだ組換え遺伝子発現ベクター。

51. 配列番号63または64記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部の配列を保持する形質転換細胞。

52. 請求項51記載の形質転換細胞により発現される非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドまたはその断片。

53. 請求項51記載の形質転換細胞を、非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドが発現する条件で培養し、発現させた前記ペプチドを採取することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス抗原ペプチドの生産方法。

54. 請求項44～49のいずれか1項に記載のポリペプチドを抗原として用いる非B非C非G型肝炎ウイルス抗体の免疫学的検出方法。

55. 請求項44～49のいずれか1項に記載のポリペプチドを免疫原として、動物を免疫することを特徴とする非B非C非G型肝炎ウイルス抗体の作成方法。

56. 請求項55に記載の作成方法によって得られる抗体。

57. 請求項56記載の抗体を用いる非B非C非G型肝炎ウイルス抗原の免疫学的検出方法。

58. 配列番号62記載の塩基配列にあるオープンリーディングフレームにコードされるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸配列を有し、非B非C非G型肝炎ウイルス中和抗体のエピトープ配列を含むポリペプチドを含むワクチン。

1 / 16

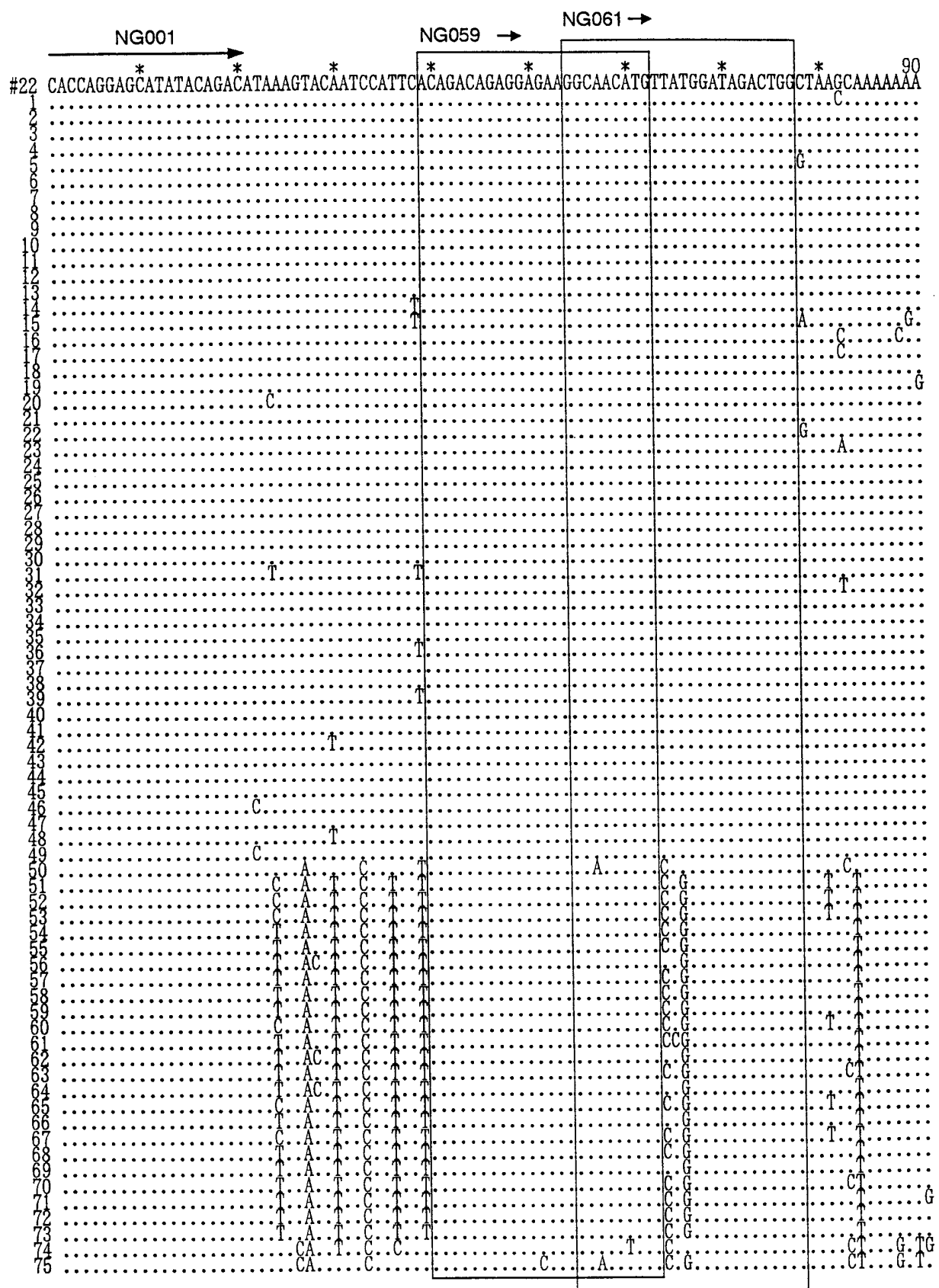


図 1

差替え用紙 (規則26)

5 / 16

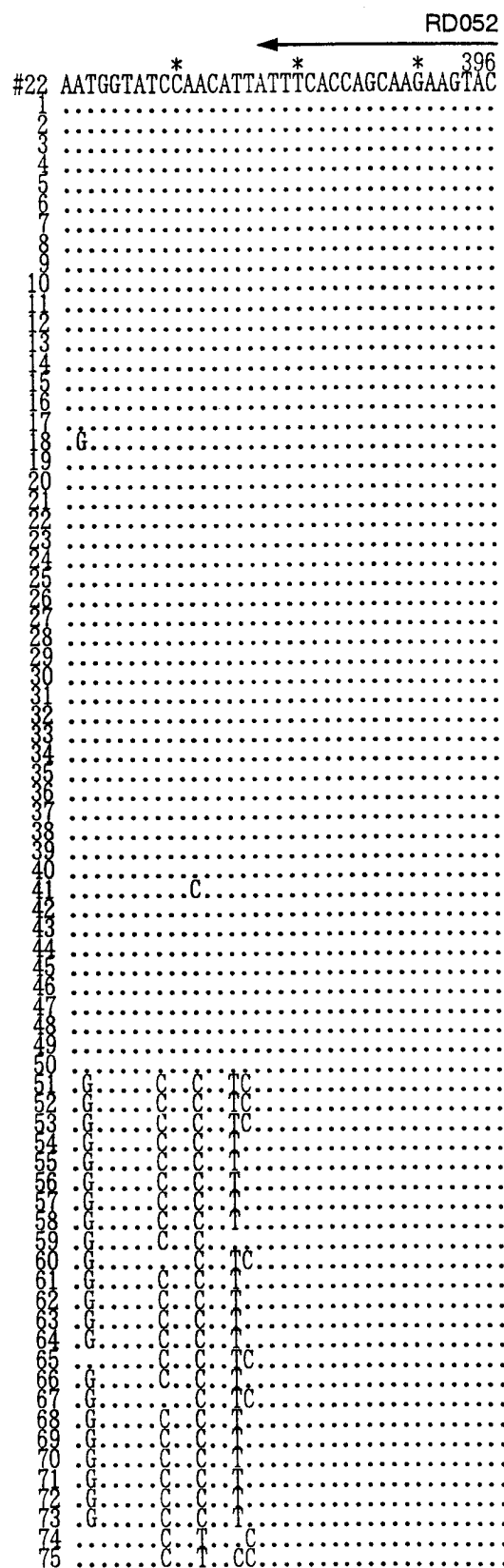
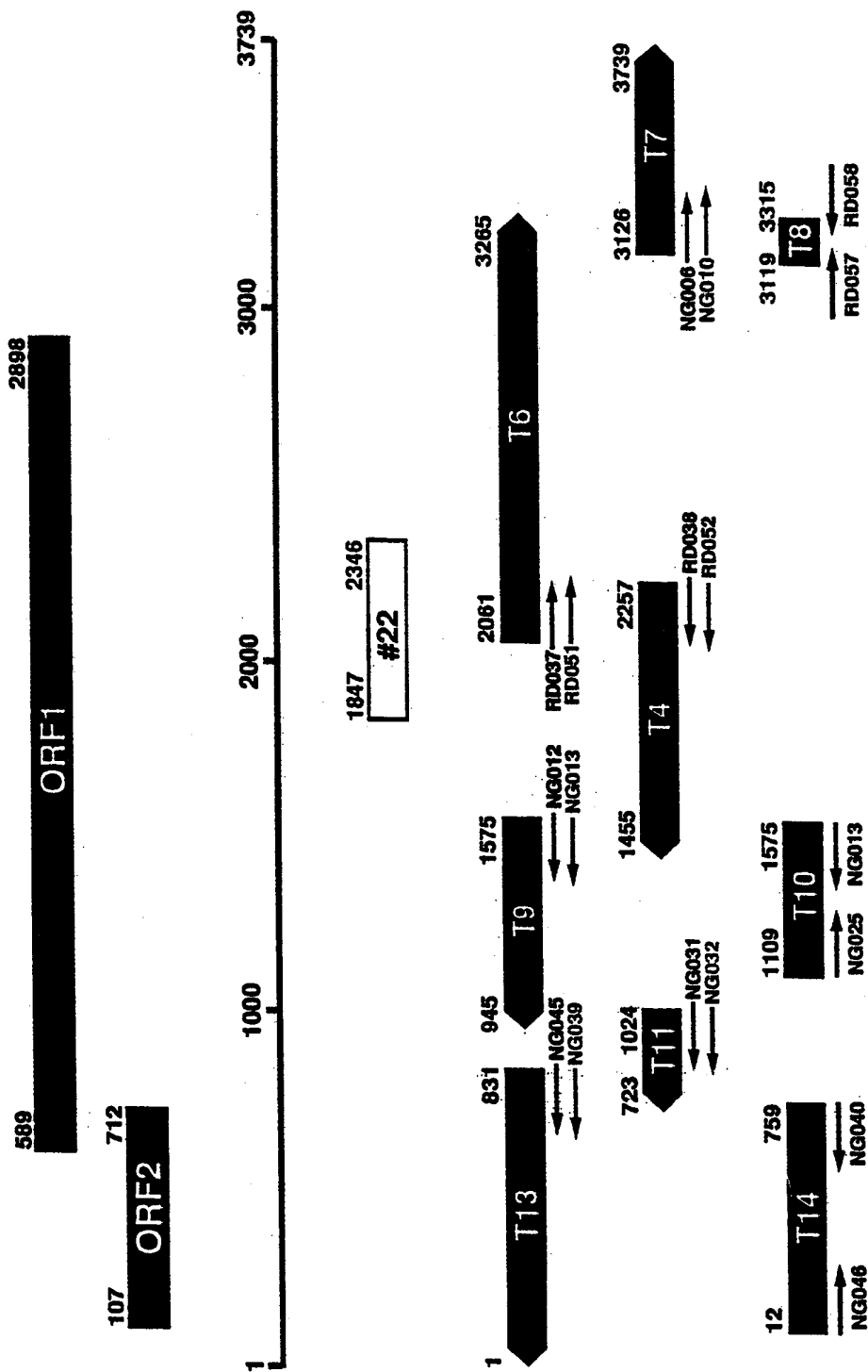


図 5



1) CACCAGGAGCATATACAGACATAAAGTACAATCCATTTCACAGACAGAGGGAAGGCAACA 60
2)
3)
1) TGTTATGGATAGACTGGCTAAGCAAAAAAACAATGAACTATGACAAAGTACAAAAGTAAAT 120
2)
3)
1) GCTTAATATCAGACCTACCTCTATGGGCAGCAGCATATGGATATGTAGAAATTTGTGCAA 180
2)
3)
1) AAAGTACAGGAGACCAGAACATACACATGAATGCCAGGCTACTAATAAGAAAGTCCCTTTA 240
2)
3)
1) CAGACCCACAACCTACTAGTACACACAGACCCACAAAAGGCTTTGTCCTTACTCTTTAA 300
2)
3)
1) ACTTTGGAAATGGTAAAAATGCCAGGAGGTAGTAGTAATGTGCCTATTAGAAATGAGAGCTA 360
2)
3)
1) AATGGTATCCAACATTATTTCCACCAGCAAGAAGTAC 396
2)
3)

- 1) 輸血血液のパイロット
- 2) 患者：輸血後2週目
- 3) 患者：輸血後4週目

8/16

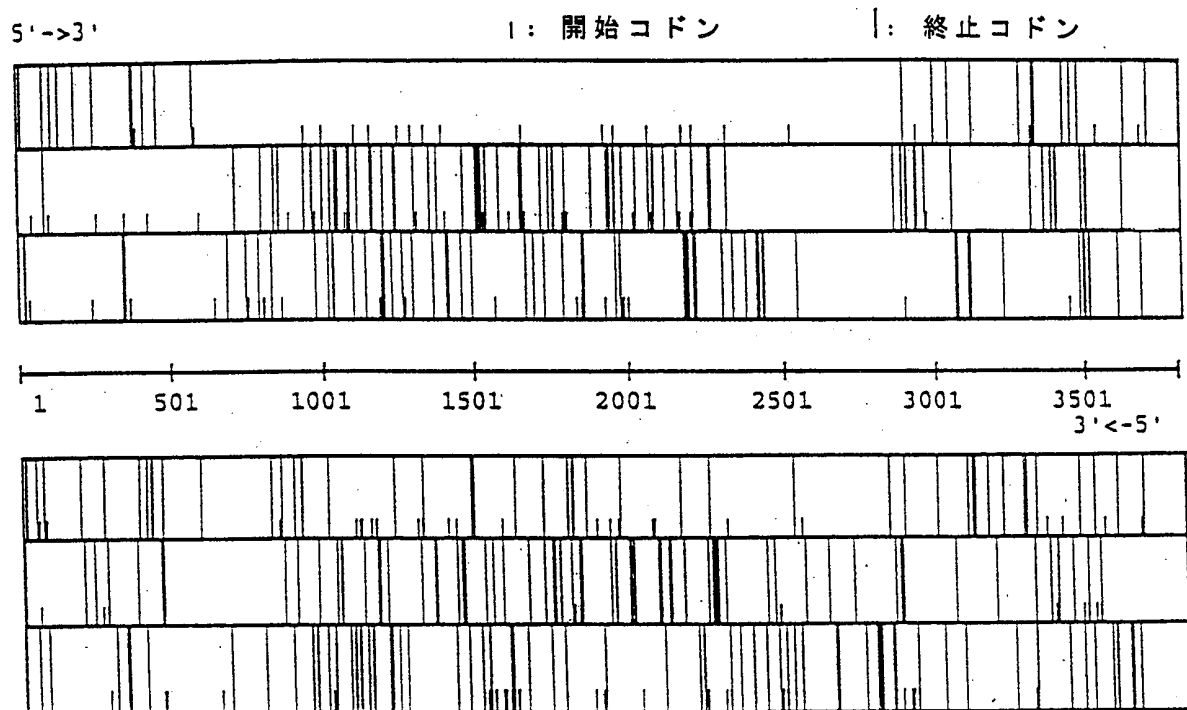


図 8

9 / 16

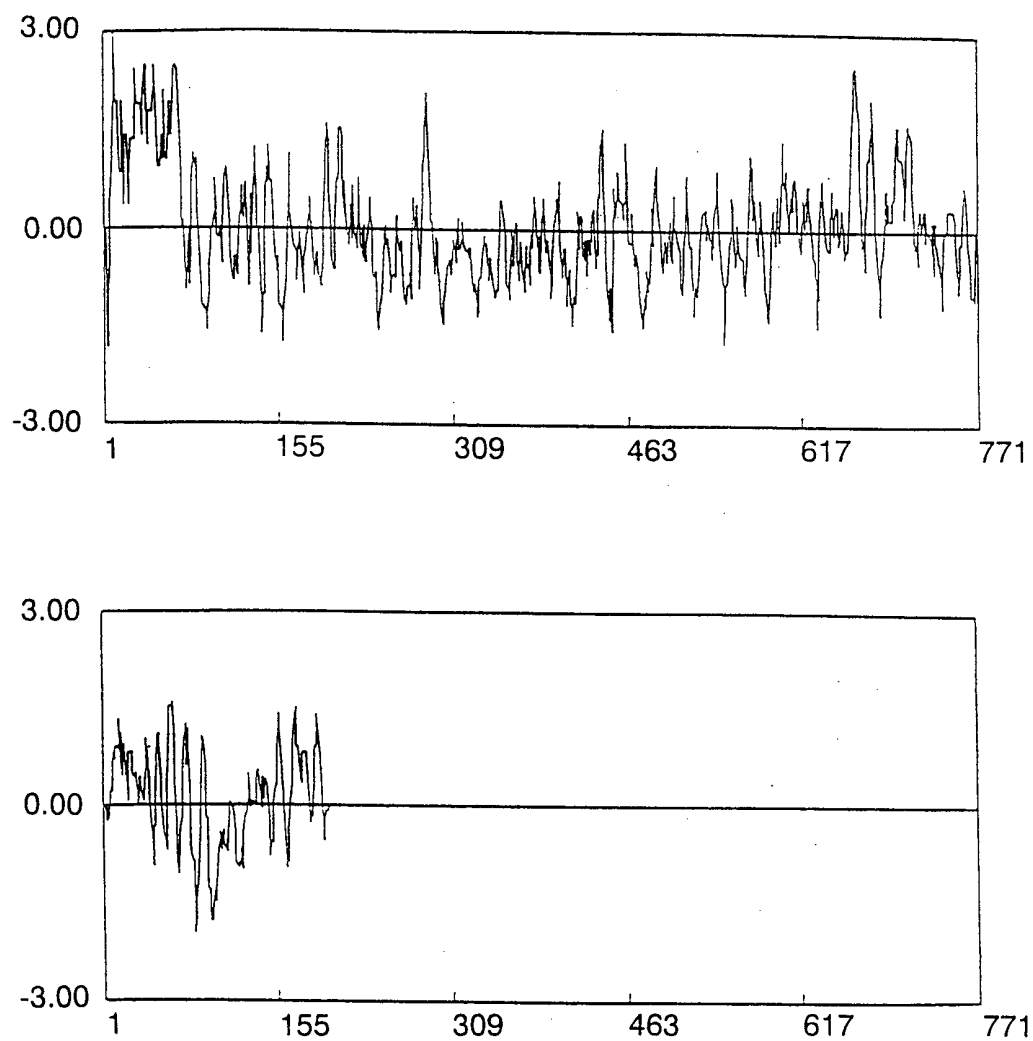


図 9

10/16

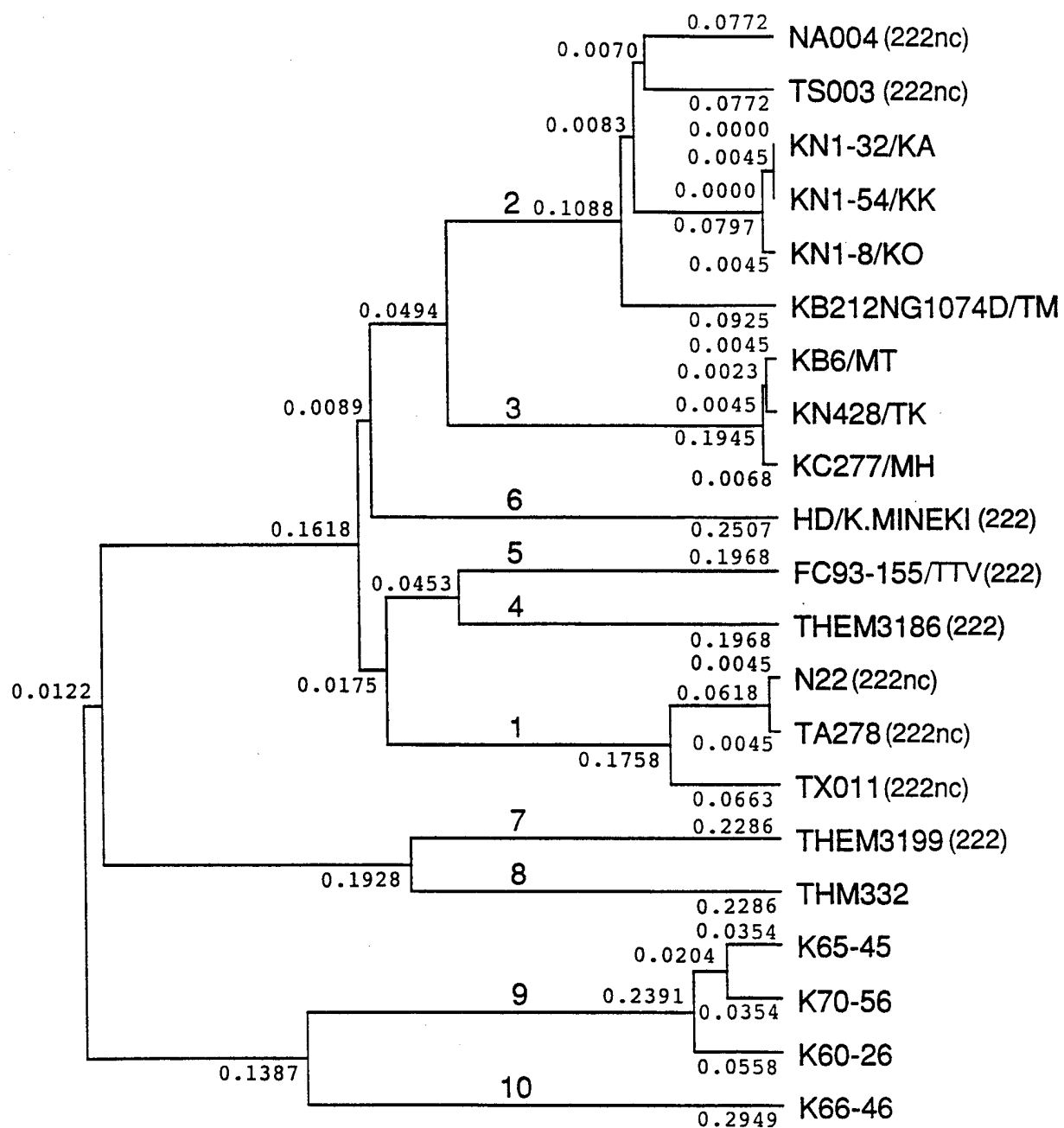


図 10

12/16

 12

N22(222nc) 161: CTTTACAGACCCCAACTACTAGTACACACAGACCCCAACAAAGGCTTTGTTCCTTACTCTGTA 222
 TA278(222nc) 161: C..G..A.....T.....A..C..T...T.. 222
 TX011(222nc) 161: ...A...TA..T..G..G...AC...ACA..AG..CTT..GG..A..AC..A..C...AGCA.. 222
 TS003(222nc) 161: ...AC...TG.....GT...AT.....ACA.....CTC..GG..A..AC..G..C...AG..T..T 222
 NA004(222nc) 161: ...AC...TA.....G..GT...AC...ACA..T...CTC..G...A..AC..A..G...AGCT..T 222
 KN1-32/KA 161: ...AC...TA.....G..GT...AC...ACA..T...CTC..G...A..AC..A..G...AGCT..T 222
 KN1-54/KK 161: ...AC...TA.....G..GT...AC...ACA..T...CTC..G...A..AC..A..G...AGCT..T 222
 KN1-8/KO 161: ...A...TA.....GT...AC...ACA.....CTT..G...T..A.....A..TAG..T..C 222
 KB212NG1074D/TM 161: ...AC..TACA..T...A..GA...ACAC..AC.....TCT..G.....A..AGTA...AGCT..T 222
 KB6/MT 161: ...AC..TACA..T...A..GA...ACAC..AC.....TCT..G.....A..AGTA...AGCT..T 222
 KC277/MH 161: ...AC..TACA..T...A..GA...ACAC..AC.....TCT..G.....A..AGTA...AGCT..T 222
 KN428/TK 161: ...A..AC...T...CATG...G...AC...T..A..GA..CT..C.....A..TG...AGCAA.. 222
 THEM3186(222) 161: ...AC...G...G...AAC...ACA...T..TC..G..G..C..GTT.....CTAC 222
 FC93-155/TTV(222) 161: ...G..AC...T...T..G..TA..AA.....ACA..TGA..ACTGG.....C..C..TAGC..A.. 222
 HD/K.MINEKI(222) 161: ...A..AC...A...C...GACCTCGA..AGACA...ACT..TG..A..CA..A..A..TGACTAT 222
 THEM3199(222) 161: ...AC...T..C..CC..CTAT..ACA..AGACA..A..AGAC..TG...ACC..A.....TGACTAC 222
 THM332 161: ...AC..TC..A..G..CCA..GTACAA...CTGGCA..GGTACA..CT...AC...TTC..TGACACT 225
 K65-45 161: ...AC..TC..G...CCA..GTACAAG..CTGGCAGATACA..T...AC...TTC..TGACACT 225
 K70-56 161: ...AC..TC..G..G..CCA..GTACAAG..CAGGCA..GTACA..T...A...TTC..TGACACT 225
 K60-26 161: ...T..AC...T...G...C..CCA..GTAT..ACA..G..TA...A..AC..GT...AC..AG..A..TGACAC.. 225
 K66-46 161: ...T..AC...T...G...C..CCA..GTAT..ACA..G..TA...A..AC..GT...AC..AG..A..TGACAC.. 225

13 / 16

NC054(1) NT01(795)

1-1/1-9/1-10

NC055(692) NC063(2223)

U17-11/-12/-13

NT04(2094) NC021(3738)

NT03(2143) NC065(3700)

2A-3/2B-1/2B-3

13

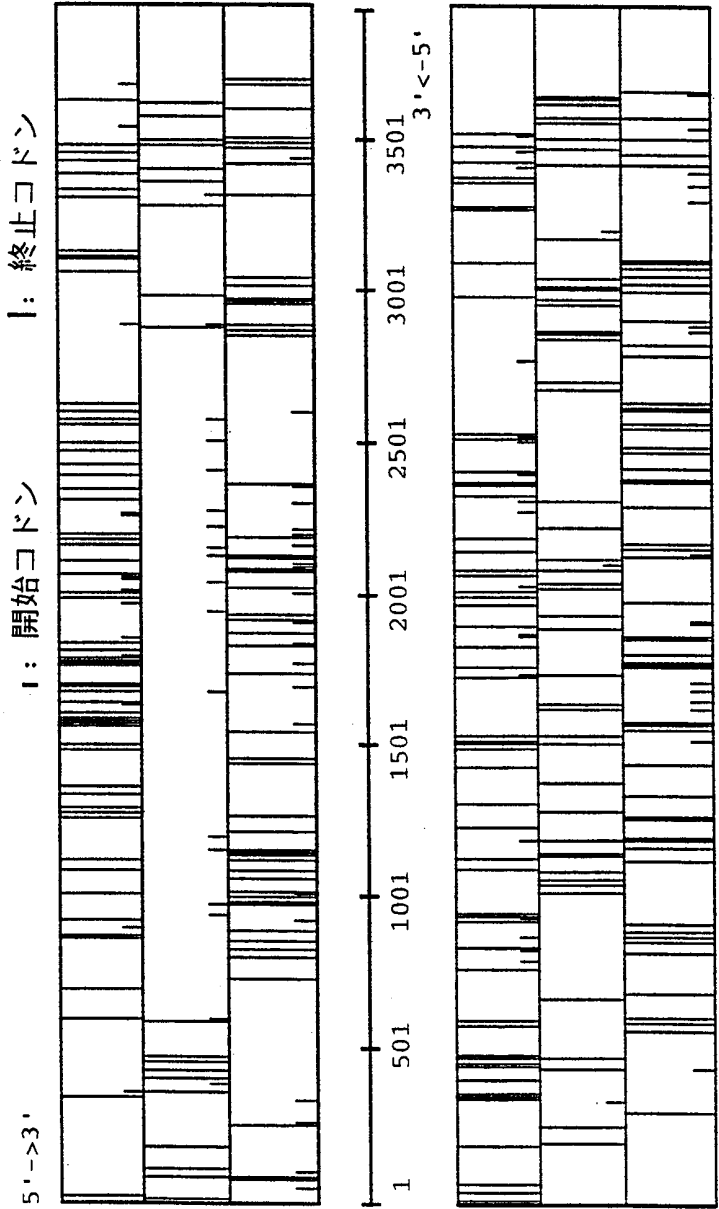


図 14

HNT22 (1:) と TSU01 配列 (2:) の 5' 端領域配列の比較

1: A T T T G C T A C	G T C A C T A A C C	A C G T G A C A C C	C A C A G G C C A A	C C G A A T G C T A	T G T C A T C C A T	60
2: T T T G C T A C	G T C A C T A A C C	A C G T G A C T C C	C G C A G G C C A A	C C G A G T A C T A	T G T C G T C C A C	60
1: T T C C T G G G C C	G G G T C T A C G T	C C T C A T A T A A	G T A A G T G C A C	T T C C G A A T G G	C T G A G T T T T C	120
2: T T C C T G G G A C	G A G T C T A C G T	C C T G A T A T A A	G T A A G T G C A C	T T C C G A A T G G	C T G A G T T T T C	120
1: C A C G C C C G T C	C G C A G C G G T G	A A G C C A C G G	A G G G A G A T C	T C C G C G T C C	C G A G G C G G G	180
2: C A C G C C C G T C	C G C A G C G A G	A A C G C C A C G G	A G G G A G T C	C C G C G C T C C	C G A G G C G G G	180
1: T G C C G A A G G T	G A G T T T A C A C	A C C G A A G T C A	A G G G C A A T T	C G G G C T C G G G	A C T G G C C G G G	240
2: T G C C G A G G T	G A G T T T A C A C	A C C G C A G T C A	A G G G C A A T T	C G G G C T C G G G	A C T G G C C G G G	240
1: C T A T G G G C A A	G G C T C T G A A A	A A A G C A T G T	T T A T T G G C A G	G C A T T A C A G A	A A G A A A A G G G	300
2: C C C C G G G C A A	G G C T C T T A A A	A A A T G C A C T	T T C G G C A G	A A G T G C G A	G C G A A A A G G A	300

1/27

配列表
Sequence Listings

<110> 田村 良二(TAMURA, Ryoji)

<120> 非B非C非G型肝炎ウイルス遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、
ウイルス粒子、ウイルス粒子分離法およびウイルス検出法

<130> OP763-PCT

<150> JP 10-82962

<151> 1998-03-13

<150> JP 9-314196

<151> 1997-10-09

<150> JP 9-233246

<151> 1997-07-25

<160> 64

<210> 1

<211> 3739

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<220>

<221> CDS

<222> 589..2898

<220>

<221> CDS

<222> 107..712

<400> 1

at tt t t g c t a c	g t c a c t a a c c	a c g t g a c a c c	c a c a g g c c a a	c c g a a t g c t a	t g t c a t c c a t	60
t t c c t g g g c c	g g g t c t a c g t	c c t c a t a t a a	g t a a g t g c a c	t t c c g a a t g g	c t g a g t t t t c	120
c a c g c c c g t c	c g c a g c g g t g	a a g c c a c g g a	g g g a g a t c t c	c g c g t c c c g a	g g g c g g g t g c	180
c g a a g g t g a g	t t t a c a c a c c	g a a g t c a a g g	g g c a a t t c g g	g c t c g g g a c t	g g c c g g g c t a	240
t g g g c a a g g c	t c t g a a a a a a	g c a t g t t t a t	t g g c a g g c a t	t a c a g a a a g a	a a a g g g c g c t	300
g t c a c t g t g t	g c t g t g c g a a	c a a c a a a g a a	g g c t t g c a a a	c t a c t a a t a g	t a a t g t g g a c	360
c c c a c c t c g c	a a t g a t c a a c	a c t a c c t t a a	c t g g c a a t g g	t a c t c a a g t a	t a c t t a g c t c	420
c c a c g c t g c t	a t g t g c g g g t	g t c c c g a c g c	t g t c g t c a t	t t t a a t c a t c	t t g c t t c t g t	480
g c t t c g t g c c	c c g c a a a a c c	c a c c c c c t c c	c g g t c c c c a g	c g a a a c c t g c	c c c t c c g a c g	540
g c t g c c g g c t	c t c c c g g c t g	c g c c a g a g g c	g c c c g g a g a t	a g a g c a c c a t	g g c c t a t g g c	600
t g g t g g c g c c	g a a g g a g a a g	a c g g t g g c g c	a g g t g g a g a c	g c a g a c c a t g	g a g g c g c c g c	660
t g g a g g a c c c	g a a g a c g c a g	a c c t g c t a g a	c g c c g t g g c c	g c c g c a g a a a	c g t a a g g a g a	720
c g c c g c a g a g	g a g g g a g g t g	g a g g a g g a g a	t a t a g g a g a t	g g a a a a g a a a	g g g c a g g c g c	780
a g a a a a a a a g	c t a a a a t a a t	a a t a a g a c a a	t g g c a a c c a a	a c t a c a g a a g	g a g a t g t a a c	840
a t a g t a g g c t	a c a t c c c t g t	a c t a a t a t g t	g g c g a a a a t a	c t g t c a g c a g	a a a c t a t g c c	900
a c a c a c t c a g	a c g a t a c c a a	c t a c c c a g g a	c c c t t t g g g g	g g g g t a t g a c	t a c a g a c a a a	960

tttactttta	gaattctgta	tgacgagtac	aaaaggttta	tgaactactg	gacagcatct	1020
aacgaagacc	tagacctttg	tagatatcta	ggagtaaacc	tgtacttttt	cagacaccca	1080
gatgtagatt	ttatcataaa	aattaatacc	atgcctcctt	ttctagacac	agaactcaca	1140
gcccttagca	tacaccagc	catgctagcc	ctagacaaaa	gagcaagatg	gatacctagc	1200
ttaaaatcta	gaccgggaaa	aaaacactat	attaaaataa	gagtaggggc	accaagaatg	1260
ttcactgata	aatgggtacc	ccaaacagat	ctttgtgaca	tggtgcttct	aactgtctat	1320
gcaaccgcag	cggatatgca	atatccgttc	ggctcaccac	taactgactc	tgtggttgtg	1380
aacttccagg	ttctgcaatc	catgtatgat	aaaacaatta	gcatattacc	agacgaaaaa	1440
tcacaaagag	aaattctact	taacaagata	gcaagttaca	ttccctttta	taataaccaca	1500
caaactatag	cccaattaaa	gccatttata	gatgcaggca	atgtaacatc	aggcgcaaca	1560
gcaacaacat	gggcatcata	cataaacaca	accaaattta	ctacagcaac	cacaacaact	1620
tatgcatatc	caggcaccaa	cagaccccca	gtaactatgt	taacctgtaa	tgactcctgg	1680
tacagaggaa	cagtatataa	cacacaaatt	caacagttac	caataaaagc	agctaaatta	1740
tacttagagg	caacaaaaac	cttgctagga	aacaccttca	caaagttagga	ctacacacta	1800
gaatatcatg	gaggactgta	cagctcaata	tggctatccc	ctggtagatc	ttactttgaa	1860
acaacaggag	catatacaga	cataaagtac	aatccattca	cagacagagg	agaaggcaac	1920
atgttatgga	tagactggct	aagcaaaaaa	aacatgaact	atgacaaagt	acaaagtaaa	1980
tgcttaatat	cagacctacc	tctatgggca	gcagcatatg	gatatgtaga	attttgtgca	2040
aaaagtacag	gagaccaaaa	catacacatg	aatgccaggc	tactaataag	aagtcctttt	2100
acagaccac	aactactagt	acacacagac	cccacaaaag	gctttgttcc	ttactcttta	2160
aactttggaa	atggtaaaat	gccaggaggt	agtagtaatg	tgcctattag	aatgagagct	2220
aaatgggtatc	caacattatt	tcaccagcaa	gaagtactag	aggccttagc	acagtcaggc	2280
ccctttgcat	accactcaga	cattaaaaaa	gtatctcttg	gtatgaaata	ccgttttaag	2340
tggatctggg	gtggaaaccc	cgttcgccaa	caggttggtta	gaaatccctg	caaagaaacc	2400
cactcctcgg	gcaatagagt	ccctagaagc	ttacaaatcg	ttgaccggaa	atacaactca	2460
ccggaactca	cattccatac	ctgggacttc	agacgtggcc	tctttggccc	gaaagctatt	2520
cagagaatgc	aacaacaacc	aacaactact	gacatttttt	cagcaggccg	caagagaccc	2580
aggagggaca	ccgaggtgta	ccactccagc	caagaagggg	agcaaaaaga	aagcttactt	2640
ttccccccag	tcaagctcct	cagacgagtc	cccccgtagg	aagactcgca	gcaggaggaa	2700
agcgggtcgc	aaagctcaga	ggaagagacg	cagaccgtct	cccagcagct	caagcagcag	2760
ctgcagcaac	agcgaatcct	gggagtcaaa	ctcagactcc	tgttcaacca	agtccaaaaa	2820
atccaacaaa	atcaagatat	caaccctacc	ttgttaccaa	ggggggggga	tctagcatcc	2880
ttattttcaa	tagcaccata	aacatgtttg	gtgaccccaa	accttacaac	ccttccagta	2940
atgactggaa	agaggagtac	gaggcctgta	gaatatggga	cagaccccc	agaggcaacc	3000
taagagatac	ccctttctac	ccctgggccc	ccaaggaaaa	ccagtaccgt	gtaaacttta	3060
aacttggatt	ccaataaagc	taggccgtgg	gactttcact	tgtcggtgtc	tgcttataaa	3120
agtaactaag	cactccgagc	gaagcgagga	gtgcgaccct	tgggggctca	acgccttcgg	3180
agccgcgcgc	tacgccttcg	gctgcgcgcg	gcacctcaga	ccccgcctcg	tgtgacacgc	3240
ctcgcgcgtg	tcagaccact	tcgggctcgc	gggggtcggg	aaatttacta	aacagactcc	3300
gagttgccat	tggactcagg	agctatgaat	cagtaacgaa	agtgagtggg	gccagacttc	3360
gccataaggc	ctttatcttc	ttgccatttg	tcagtaacag	gggtcgccat	agacttcggc	3420
ctccacttta	ccttgtaaaa	actaccaaaa	tggccgttcc	agtgacgtca	cagccgccat	3480
tttaagtagc	tgacgtcaag	gattgacgta	aaggttaaaag	gtcatcctcg	gcggaagcta	3540

3/27

cacaaaatgg tggacaacat cttccgggtc aaaggttgtg cgtacgtcac aagtcacgtg	3600
gaggggaccc gctgtaaccc ggaagtaggc cccgtcacgt gacttaccac gtgtgtacac	3660
gtcaccgccg ccattttgtt ttacaaaatg gctgacttcc ttcctctttt ttgaaaaaag	3720
gcgccaaaaa accgtcggc	3739

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

gcagcagcat atggatatgt	20
-----------------------	----

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

tgactgtgct aaagcctcta	20
-----------------------	----

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

catacacatg aatgccaggc	20
-----------------------	----

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

4/27

gtacttcttg ctggtgaaat 20

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

acagacagag gagaaggcaa catg 24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

ggcaacatgy trtggataga ctgg 24

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

ctggcatttt accatttcca aagtt 25

<210> 9

<211> 770

<212> PRT

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 9

Met Ala Tyr Gly Trp Trp Arg Arg Arg Arg Arg Arg Trp Arg Arg

1 5 10 15

Trp Arg Arg Arg Pro Trp Arg Arg Arg Trp Arg Thr Arg Arg Arg

20 25 30

Arg Pro Ala Arg Arg Arg Gly Arg Arg Arg Asn Val Arg Arg Arg

5/27

				35					40					45
Arg	Arg	Gly	Gly	Arg	Trp	Arg	Arg	Arg	Tyr	Arg	Arg	Trp	Lys	Arg
				50					55					60
Lys	Gly	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Ala	Lys	Ile	Ile	Ile	Arg	Gln	Trp
				65					70					75
Gln	Pro	Asn	Tyr	Arg	Arg	Arg	Cys	Asn	Ile	Val	Gly	Tyr	Ile	Pro
				80					85					90
Val	Leu	Ile	Cys	Gly	Glu	Asn	Thr	Val	Ser	Arg	Asn	Tyr	Ala	Thr
				95					100					105
His	Ser	Asp	Asp	Thr	Asn	Tyr	Pro	Gly	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Met
				110					115					120
Thr	Thr	Asp	Lys	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	Leu	Tyr	Asp	Glu	Tyr	Lys
				125					130					135
Arg	Phe	Met	Asn	Tyr	Trp	Thr	Ala	Ser	Asn	Glu	Asp	Leu	Asp	Leu
				140					145					150
Cys	Arg	Tyr	Leu	Gly	Val	Asn	Leu	Tyr	Phe	Phe	Arg	His	Pro	Asp
				155					160					165
Val	Asp	Phe	Ile	Ile	Lys	Ile	Asn	Thr	Met	Pro	Pro	Phe	Leu	Asp
				170					175					180
Thr	Glu	Leu	Thr	Ala	Pro	Ser	Ile	His	Pro	Gly	Met	Leu	Ala	Leu
				185					190					195
Asp	Lys	Arg	Ala	Arg	Trp	Ile	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Pro	Gly
				200					205					210
Lys	Lys	His	Tyr	Ile	Lys	Ile	Arg	Val	Gly	Ala	Pro	Arg	Met	Phe
				215					220					225
Thr	Asp	Lys	Trp	Tyr	Pro	Gln	Thr	Asp	Leu	Cys	Asp	Met	Val	Leu
				230					235					240
Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	Met	Gln	Tyr	Pro	Phe	Gly
				245					250					255
Ser	Pro	Leu	Thr	Asp	Ser	Val	Val	Val	Asn	Phe	Gln	Val	Leu	Gln
				260					265					270
Ser	Met	Tyr	Asp	Lys	Thr	Ile	Ser	Ile	Leu	Pro	Asp	Glu	Lys	Ser
				275					280					285
Gln	Arg	Glu	Ile	Leu	Leu	Asn	Lys	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ile	Pro	Phe
				290					295					300
Tyr	Asn	Thr	Thr	Gln	Thr	Ile	Ala	Gln	Leu	Lys	Pro	Phe	Ile	Asp
				305					310					315
Ala	Gly	Asn	Val	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Trp	Ala	Ser
				320					325					330
Tyr	Ile	Asn	Thr	Thr	Lys	Phe	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Tyr
				335					340					345
Ala	Tyr	Pro	Gly	Thr	Asn	Arg	Pro	Pro	Val	Thr	Met	Leu	Thr	Cys
				350					355					360

6/27

Asn Asp Ser Trp Tyr Arg Gly Thr Val Tyr Asn Thr Gln Ile Gln	365	370	375
Gln Leu Pro Ile Lys Ala Ala Lys Leu Tyr Leu Glu Ala Thr Lys	380	385	390
Thr Leu Leu Gly Asn Thr Phe Thr Asn Glu Asp Tyr Thr Leu Glu	395	400	405
Tyr His Gly Gly Leu Tyr Ser Ser Ile Trp Leu Ser Pro Gly Arg	410	415	420
Ser Tyr Phe Glu Thr Thr Gly Ala Tyr Thr Asp Ile Lys Tyr Asn	425	430	435
Pro Phe Thr Asp Arg Gly Glu Gly Asn Met Leu Trp Ile Asp Trp	440	445	450
Leu Ser Lys Lys Asn Met Asn Tyr Asp Lys Val Gln Ser Lys Cys	455	460	465
Leu Ile Ser Asp Leu Pro Leu Trp Ala Ala Ala Tyr Gly Tyr Val	470	475	480
Glu Phe Cys Ala Lys Ser Thr Gly Asp Gln Asn Ile His Met Asn	485	490	495
Ala Arg Leu Leu Ile Arg Ser Pro Phe Thr Asp Pro Gln Leu Leu	500	505	510
Val His Thr Asp Pro Thr Lys Gly Phe Val Pro Tyr Ser Leu Asn	515	520	525
Phe Gly Asn Gly Lys Met Pro Gly Gly Ser Ser Asn Val Pro Ile	530	535	540
Arg Met Arg Ala Lys Trp Tyr Pro Thr Leu Phe His Gln Gln Glu	545	550	555
Val Leu Glu Ala Leu Ala Gln Ser Gly Pro Phe Ala Tyr His Ser	560	565	570
Asp Ile Lys Lys Val Ser Leu Gly Met Lys Tyr Arg Phe Lys Trp	575	580	585
Ile Trp Gly Gly Asn Pro Val Arg Gln Gln Val Val Arg Asn Pro	590	595	600
Cys Lys Glu Thr His Ser Ser Gly Asn Arg Val Pro Arg Ser Leu	605	610	615
Gln Ile Val Asp Pro Lys Tyr Asn Ser Pro Glu Leu Thr Phe His	620	625	630
Thr Trp Asp Phe Arg Arg Gly Leu Phe Gly Pro Lys Ala Ile Gln	635	640	645
Arg Met Gln Gln Gln Pro Thr Thr Thr Asp Ile Phe Ser Ala Gly	650	655	660
Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Thr Glu Val Tyr His Ser Ser Gln	665	670	675
Glu Gly Glu Gln Lys Glu Ser Leu Leu Phe Pro Pro Val Lys Leu			

7/27

	680		685		690
Leu Arg Arg Val	Pro Pro Trp Glu Asp	Ser Gln Gln Glu Glu Ser			
	695		700		705
Gly Ser Gln Ser	Ser Glu Glu Glu Thr	Gln Thr Val Ser Gln Gln			
	710		715		720
Leu Lys Gln Gln	Leu Gln Gln Gln Arg	Ile Leu Gly Val Lys Leu			
	725		730		735
Arg Leu Leu Phe	Asn Gln Val Gln Lys	Ile Gln Gln Asn Gln Asp			
	740		745		750
Ile Asn Pro Thr	Leu Leu Pro Arg Gly	Gly Asp Leu Ala Ser Leu			
	755		760		765
Phe Gln Ile Ala	Pro				
	770				

<210> 10

<211> 202

<212> PRT

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 10

Met Ala Glu Phe	Ser Thr Pro Val Arg	Ser Gly Glu Ala Thr Glu			
1	5	10			15
Gly Asp Leu Arg	Val Pro Arg Ala Gly	Ala Glu Gly Glu Phe Thr			
	20	25			30
His Arg Ser Gln	Gly Ala Ile Arg Ala	Arg Asp Trp Pro Gly Tyr			
	35	40			45
Gly Gln Gly Ser	Glu Lys Ser Met Phe	Ile Gly Arg His Tyr Arg			
	50	55			60
Lys Lys Arg Ala	Leu Ser Leu Cys Ala	Val Arg Thr Thr Lys Lys			
	65	70			75
Ala Cys Lys Leu	Leu Ile Val Met Trp	Thr Pro Pro Arg Asn Asp			
	80	85			90
Gln His Tyr Leu	Asn Trp Gln Trp Tyr	Ser Ser Ile Leu Ser Ser			
	95	100			105
His Ala Ala Met	Cys Gly Cys Pro Asp	Ala Val Ala His Phe Asn			
	110	115			120
His Leu Ala Ser	Val Leu Arg Ala Pro	Gln Asn Pro Pro Pro Pro			
	125	130			135
Gly Pro Gln Arg	Asn Leu Pro Leu Arg	Arg Leu Pro Ala Leu Pro			
	140	145			150
Ala Ala Pro Glu	Ala Pro Gly Asp Arg	Ala Pro Trp Pro Met Ala			
	155	160			165
Gly Gly Ala Glu	Gly Glu Asp Gly Gly	Ala Gly Gly Asp Ala Asp			

8/27

	170		175		180
His Gly Gly Ala Ala Gly Gly Pro Glu Asp Ala Asp Leu Leu Asp					
	185		190		195
Ala Val Ala Ala Ala Glu Thr					
	200				

<210> 11

<211> 500

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 11

gatcttactt tgaaacaaca ggagcatata cagacataaa gtacaatcca ttcacagaca	60
gaggagaagg caacatgtta tggatagact ggctaagcaa aaaaaacatg aactatgaca	120
aagtacaaag taaatgctta atatcagacc tacctctatg ggcagcagca tatggatatg	180
tagaattttg tgcaaaaagt acaggagacc aaaacataca catgaatgcc aggctactaa	240
taagaagtc ctttacagac ccacaactac tagtacacac agaccccaca aaaggctttg	300
ttccttactc tttaaacttt ggaaatggta aaatgccagg aggtagtagt aatgtgccta	360
ttagaatgag agctaaatgg tattecaacat tatttcacca gcaagaagta ctagaggcct	420
tagcacagtc aggccccctt gcataccact cagacattaa aaaagtatct ctgggtatga	480
aataccgttt taagtggatc	500

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

aagatccgt cgacatcgat aatacggggg gggggggggg g	41
--	----

<210> 13

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

aagatccgt cgacatcgat aatacga aaa aaaaaaaa a	41
---	----

<210> 14

9/27

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

aaggatccgt cgacatcgat aatacgtttt tttttttttt t 41

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

aaggatccgt cgacatcgat aatacgtccc ccccccccc c 41

<210> 16

<211> 803

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 16

cctacttgag aatataacaa gttacattcc cttttataat accacacaaa ctatagccca	60
attaaagcca tttatagatg caggcaatgt aacatcaggc gcaacagcaa caacatgggc	120
atcatacata aacacaacca aatttactac agcaaccaca acaacttatg catatccagg	180
caccaacaga cccccagtaa ctatgttaac ctgtaatgac tcctggtaca gaggaacagt	240
atataacaca caaattcaac agttaccaat aaaagcagct aaattatact tagaggcaac	300
aaaaaccttg ctaggaaaca ccttcacaaa tgaggactac aactagaat atcatggagg	360
actgtacagc tcaatatggc tateccctgg tagatcttac tttgaaacaa caggagcata	420
tacagacata aagtacaatc cattcacaga cagaggagaa ggcaacatgt tatggataga	480
ctggctaagc aaaaaaaaca tgaactatga caaagtacaa agtaaatgct taatatcaga	540
cctaccteta tgggcagcag catatggata tgtagaattt tgtgcaaaaa gtacaggaga	600
ccaaaacata cacatgaatg ccaggctact aataagaagt ccctttacag acccacaact	660
actagtacac acagacccca caaaaggctt tgttccttac tctttaaact ttggaaatgg	720
taaaatgcca ggaggtagta gtaatgtgcc tattagaatg agagctaaat ggtatccaac	780
attatttcac cagcaagaag tac	803

<210> 17

<211> 1205

<212> DNA

10/27

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 17

catacacatg aatgccaggc tactaataag aagtcctttt acagacccac aactactagt	60
acacacagac cccacaaaag gctttgttcc ttactcttta aactttggaa atggtaaaat	120
gccaggaggt agtagtaatg tgcctattag aatgagagct aaatggatc caacattatt	180
tcaccagcaa gaagtactag aggccttagc acagtcaggc ccctttgcat accactcaga	240
cattaaaaaa gtatctctgg gtatgaaata ccgttttaag tggatctggg gtggaaaccc	300
cgttcgccaa caggttgta gaaatccctg caaagaaacc cactcctcgg gcaatagagt	360
ccctagaagc ttacaaatcg ttgaccgaa atacaactca ccggaactca cattccatac	420
ctgggacttc agacgtggcc tctttggccc gaaagctatt cagagaatgc aacaacaacc	480
aacaactact gacatttttt cagcaggccg caagagaccc aggagggaca ccgaggtgta	540
ccactccagc caagaagggg agcaaaaaga aagcttactt ttccccccag tcaagtcct	600
cagacgagtc ccccggtggg aagactcgca gcaggaggaa agcgggtcgc aaagctcaga	660
ggaagagacg cagaccgtct cccagcagct caagcagcag ctgcagcaac agcgaatcct	720
gggagtcaaa ctcagactcc tgttcaacca agtccaaaaa atccaacaaa atcaagatat	780
caaccctacc ttgttaccaa ggggggggga tctagcatcc ttatttcaaa tagcaccata	840
aacatgtttg gtgacccaa acettacaac ctttcagta atgactggaa agaggagtac	900
gaggcctgta gaatatggga cagacccccc agaggcaacc taagagatac ccctttctac	960
ccctgggccc ccaaggaaaa ccagtaccgt gtaaaacttta aacttggatt ccaataaagc	1020
taggccgtgg gactttcact tgctcgtgtc tgcttataaa agtaactaag cactccgagc	1080
gaagcgagga gtgcgacct tgggggctca acgccttcgg agcgcgcgc tacgccttcg	1140
gctgcgcgcg gcacctcaga ccccgctcg tgctgacacg ctgcgcgctg tcagaccact	1200
tcggg	1205

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

ggtgcctgga tatgcataag

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

11/27

tgcccatggtt gttgctgttg 20

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<220>

<221> misc_difference

<222> 27..31

<223> n=a, t, g or c

<400> 20

aaggatccgt cgacatcgat aatacgnnnn ng 32

<210> 21

<211> 631

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 21

tatgactaca gacaaattta ctttaagaat tctgtatgac gagtacaaaa ggtttatgaa	60
ctactggaca gcatctaacg aagacctaga cctttgtaga tatctaggag taaacctgta	120
ctttttcaga caccgatg tagattttat cataaaaatt aataccatgc ctccttttct	180
agacacagaa ctcacagccc ctagcataca ccagggcatg ctagccctag acaaaagagc	240
aagatggata cctagcttaa aatctagacc gggaaaaaaa cactatatta aaataagagt	300
aggggcacca agaattgtca ctgataaatg gtacccccaa acagatcttt gtgacatggt	360
gcttctaact gtctatgcaa ccgcagcgga tatgcaatat ccgttcggct caccactaac	420
tgactctgtg gttgtgaact tccaggttct gcaatccatg tatgataaaa caattagcat	480
attaccagac gaaaaatcac aaagagaaat tctacttaac aagatagcaa gttacattcc	540
cttttataat accacacaaa ctatagccca attaaagcca tttatagatg caggcaataa	600
accatcaggc acaacagcaa caacatgggc a	631

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

tcacttgctg gtgtctgctt 20

12/27

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA

<400> 23
 ctaagcactc cgagcgtagc 20

<210> 24
 <211> 614
 <212> DNA
 <213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 24
 ctaagcactc cgagcgtagc gaggagtgcg acccttgggg gctcaacgcc ttcggagcca 60
 cgcgctacgc cttcggtgc gcgcggcacc tcagaccccc gctcgtctg acacgctcgc 120
 gcgtgtcaga ccacttcggg ctcgcggggg tcgggaaatt tactaaacag actccgagtt 180
 gccattggac tcaggagcta tgaatcagta acgaaagtga gtggggccag acttcgccat 240
 aaggccttta tcttcttgcc atttgctcagt aacaggggtc gccatagact tcggcctcca 300
 ctttaccttg taaaaactac caaatggcc gttccagtga cgtcacagcc gccattttaa 360
 gtagctgacg tcaaggattg acgtaaaggt taaaggtcat cctcggcgga agctacacaa 420
 aatggtggac aacatcttcc ggggtcaaagg ttgtgcgtac gtcacaagtc acgtggaggg 480
 gaccgctgt aaccgggaag taggccccgt cacgtgactt accacgtgtg tacacgtcac 540
 cgccgccatt ttgttttaca aaatggtgta cttecttctt cttttttgaa aaaaggcgcc 600
 aaaaaaccgt cggc 614

<210> 25
 <211> 302
 <212> DNA
 <213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 25
 ccgcagagga gggaggtgga ggaggagata taggagatgg aaaagaaagggcaggcgag 60
 aaaaaaagct aaaataataa taagacaatg gcaaccaaac tacagaagga gatgtaacat 120
 agtaggttac atccctgtac taatatgttg cgaaaatact gtcagcagaa actatgccac 180
 acactcagac gataccaact acccaggacc ctttgggggg ggtatgacta cagacaaatt 240
 tactttaaga attctgtatg acgagtacaa aaggtttatg aactactgga cagcatctaa 300
 cg 302

<210> 26

13/27

<211> 831

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 26

```

attttgctac gtcactaacc acgtgacacc cacaggccaa ccgaatgcta tgtcatccat      60
ttcctgggcc ggggtctacgt cctcatataa gtaagtgcac ttccgaatgg ctgagttttc    120
cacgcccgtc cgcagcgggtg aagccacgga gggagatctc cgcgtcccca gggcgggtgc    180
cgaaggtgag tttacacacc gaagtcaagg ggcaattcgg gctcgggact ggccgggcta    240
tgggcaaggc tctgaaaaaa gcatgtttat tggcaggcat tacagaaaga aaagggcgct    300
gtcactgtgt gctgtgcgaa caacaaagaa ggcttgcaaa ctactaatag taatgtggac    360
cccacctgcg aatgatcaac actaccttaa ctggcaatgg tactcaagta tacttagctc    420
ccacgtgtgt atgtgcgggt gtccecgacgc tgtegtctcat tttaatcate ttgcttctgt    480
gcttcgtgcc cgcmetaacc cccccctcc cgggtcccccag cgaaacctgc cctccgacg    540
gctgcgggtc ctcccggctg cgccagagge gcccgagat agagcaccat ggcctatggc    600
tggtggcgcc gaaggagaag acggtggcgc aggtggagac gcagaccatg gaggcgcgcg    660
tggaggaccc gaagacgcag acctgctaga cgcgtggccc gccgcagaaa cgtaaggaga    720
cgccgcagag gagggaggtg gaggaggaga tataggagat ggaaaagaaa gggcaggcgc    780
agaaaaaaag ctaaaataat aataagacaa tggcaaccaa actacagaag g              831

```

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 27

```

atctacatct ggggtgtctga                                             20

```

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 28

```

cgttagatgc tgtccagtag

```

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

14/27

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 29

cgccacatat tagtacaggg

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

ccttctgtag ttggttgcc

20

<210> 31

<211> 467

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 31

ccatgcctcc ttttctagac acagaactca cagcccctag catacaccca ggcattgctag	60
ccctagacaa aagagcaaga tggataccta gcttaaaatc tagaccggga aaaaaacact	120
atattaaaaat aagagtaggg gcaccaaaaa tgttactga taaatggtac ccccaaacag	180
atctttgtga catggtgctt ctaactgtct atgcaaccgc agcggatatg caatatecgt	240
tgggtcacc actaactgac tctgtggttg tgaacttcca ggttctgcaa tccatgtatg	300
ataaaacaat tagcatatta ccagacgaaa aagaagaaag agcaaactta cttaagcaga	360
taacaagtta cattcccttt tataatacca cacaactat agcccaatta aagccattta	420
tagatgcagg caatgtaaca tcaagcaca cagcaacaac atgggca	467

<210> 32

<211> 748

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 32

tcactaacca cgtgacacce acaggccaac cgaatgctat gtcateccatt tcctgggcgcg	60
ggtctacgtc ctcatataag taagtgcact tccgaatggc tgagttttcc acgcccgtcc	120
gcagcgggta agccacggag ggagatctcc gcgtcccgag ggcgggtgcc gaaggtgagt	180
ttacacaccg aagtcaaggg gcaattcggg ctcgggactg gccgggctat gggcaaggct	240
ctgaaaaaag catgtttatt ggcaggcatt acagaaagaa aagggcgctg tcactgtgtg	300

15/27

ctgtgcgaac aacaaagaag gcttgcaaac tactaatagt aatgtggacc ccacctcgca	360
atgatcaaca ctaccttaac tggcaatggt actcaagtat acttagctcc cacgctgcta	420
tgtgcgggtg tcccgcgct gtcgctcatt ttaatcatct tgcttctgtg cttcgtgccc	480
cgcaaaaccc accccctccc ggtccccagc gaaacctgcc cctccgacgg ctgccgctc	540
tccggctgc gccagaggcg cccggagata gagcaccatg gcctatggct ggtggcgccg	600
aaggagaaga cggtaggcga ggtggagacg cagaccatgg aggcgccgct ggaggacccg	660
aagacgcaga cctgctagac gccgtggccg ccgcagaaac gtaaggagac gccgcagagg	720
agggaggtgg aggaggagat ataggaga	748

<210> 33

<211> 197

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 33

aaagtaacta agcactccga gcgaagcgag gagtgcgacc cttgggggct caacgccttc	60
ggagccgcgc gctacgcctt cggtgcgcg cggcacctca gacccccgt cgtgctgaca	120
cgctgcgcg tgctcagacca cttcgggctc gcgggggtcg ggaaatttac taaacagact	180
ccgagttgcc attggac	197

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

tgcccatgtt gttgctgttg	20
-----------------------	----

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 35

ccatgcctcc ttttctagac	20
-----------------------	----

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

16/27

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 36

tctcctatat ctctctctcc

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 37

tcactaacca cgtgacaccc

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 38

aaagtaacta agcactccga

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 39

gtccaatggc aactcggagt

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

17/27

<400> 40
caccaggagc atatacagac 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 41
caaggtatgt tgcccgtttg 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 42
cgaaccacgt aacaaatggc 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 43
tgttgcccggt ttgtcctcta 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 44
ggcactagta aactgagcca 20

18/27

<210> 45
<211> 222
<212> DNA
<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 45
ctaagyaaaa aaaacatgaa vtatgacaaa strcaaagta artgcytart akcagaccta 60
ccwctrtrggg cagcagcata tggwtatgta gaattytgyg cwaaaagyac aggagacvva 120
aacagacaca tgaatgccag rctactaata agaagtccyt ttacagaccc vcarctavta 180
gtacacacag accccacwaa aggcctttgtw ccytaytctk ta 222

<210> 46
<211> 222
<212> DNA
<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 46
ctaacyaaar atrvctcasw rtaydvvaar vvacaragya aatgtctvat asvdracwtg 60
ccyytrtrgrg cctcwgtrta yggatwywcv gaatactgca gyaaagtwac aggagacwca 120
aacagagarc acaactgyag atgtgthaty agaagccct ayacagtrec wcarctgyta 180
gaycacaaca ayvscetyag rggwtaygtd ccvtayagya th 222

<210> 47
<211> 222
<212> DNA
<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 47
ctagtaaaga cagactctag atatgacaag acacgcagca aatgccttat agaaaaacta 60
ccyctatggg cttcagtata cggktacgca gartactgcg ccaaggccac aggagactct 120
aacagagaca tgaacgccag agtagttata aggagccct acactacacc tcaaatgata 180
gaycacaaca ayvscctcag rggwtaygtd ccvtayagyt th 222

<210> 48
<211> 222
<212> DNA
<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 48
ctatcaaaat cagacgccct ttacacaaa ggacaaagca aatgtgaaat atttgactta 60
cccctctggg ccgccctaaa tggctacaca gaattctgct ccaaaagcac aggagacaca 120
gcaggacacc taaatgccag actagtata agatgcccat acacataccc catgctagta 180

19/27

gaccactcaa acgacctaac aggcctttgta ctgtacagca aa 222

<210> 49

<211> 222

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 49

ctaagcaaat cagatgcagt atactctgaa aaacaaagca aatgtgctat atttgaccta 60
ccactatggg cctccttctt tggatacgca gaattctgct ctaaaagcac aggagacaca 120
gccagagcat acaacgccag agtatgtgtt agatgtccct acacagagcc acagctgcta 180
aaccacaaca acccctctca ggggttcgtg ttttactcct ac 222

<210> 50

<211> 222

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 50

ctgagcaaac cagacagcat atacgacccc tetaagagca aatgcctact aaaagacttt 60
cccctgtggt gcatggtata cgggtacgca gactactgca gaaaggcac aggagactca 120
gccagactac tagactgcag agtatgtgtt agatgcccg acacataccc tcagcttata 180
aaacacaaca atgacaactg gggctttgtc ccctatagcg aa 222

<210> 51

<211> 222

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 51

tgtcttaaaa acgataccac gttcaaagac acaccatcca gactaccgct aaaagacata 60
cccctatggg cctgtttcat gggataccag gactactgct cgaaacactt tcatgacgaa 120
ggcagaaaaca aagaggccag agtcacaata atatcccat acacagaacc accactgacc 180
tcgaaagaca accactcaat gggattcata ccatatgact at 222

<210> 52

<211> 222

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 52

tgcactaaaa atgacacaca attcagagat gtccccggca gactcaccat atcagacgtc 60
cccctgtacg cggccctcct gggctacgag gactactgta tcaaatacta ccacgacaaa 120

20/27

ggcctaccta aagaagtcag ggtcaccata cagtgtccat acacagatcc cccctctat 180
 gacaaagaca acacagacat gggctaccta ccttatgact ac 222

<210> 53

<211> 225

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 53

ctcacwaaac caracacasa gtttgaccck gtacagtga aatgygtmwt astagacatw 60
 ccmvtgtggg ccgccttytt yggctacceca gactacatag aragccarct aggcccytty 120
 cargaycag aractgtkkg catagtgttc gtgtgytgcc cctacactea rccrcccatg 180
 tacaarccwg gcarvrtaca aamtggctay gttttctatg acact 225

<210> 54

<211> 225

<212> DNA

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 54

cacagcaaag taaacacaga cctcagagac agaggcatct actgcctact agaagacatg 60
 cccctgtggg ccatgacctt tggatacagt gactatgtga gcacacaact aggcccaaac 120
 gtggaccacg agactcaagg cctggtatgc agatctagtc cttacactga gccccccatg 180
 tatgacaaga ctaacccaaa cagtggctac gtagcatatg acaca 225

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 55

tggtggcgcc gaaggagaag acg 23

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 56

gctcttatgt acctcctgcg 20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 57
tttgctacgt cactaaccac 20

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 58
gtagaccatg aaacagcagg 20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 59
tcaaccacct atgtatgaca 20

<210> 60
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 60
gccgacgggt ttttggcgcc ttttttc 27

<210> 61

22/27

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA

<400> 61
 aaagaggaag gaagtcagcc

20

<210> 62
 <211> 3722
 <212> DNA
 <213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus
 <220>
 <221> CDS
 <222> 590..2872
 <220>
 <221> CDS
 <222> 258..725

<400> 62
 tttgctacgt cactaaccac gtgactcccg caggccaacc cagtactatg tcgtccactt 60
 cctgggacga gtctacgtcc tgatataagt aagtgcactt ccgaatggct gagttttcca 120
 cgcccgctcg cagcgagAAC gccacggagg ggagtcgcgc cgtcccgagg gcgggtgccg 180
 gaggtgagtt tacacaccgc agtcaagggg caattcgggc tcgggactgg ccgggccccg 240
 ggcaaggctc ttaaaaaatg cactttcgca gagtgcgagc gaaaaggaaa ctgctactgc 300
 aagctgtgcg agctccaccg aaggcacctg ccatgagctt caccacacct actattaatg 360
 ccgggatccg agagcagcaa tggttcgagt ccacccttag atcccaccac tcgttctgtg 420
 gctgtgggtga tcccggtgctt ctttttacta accttgctac tcgctttaac tatctgctg 480
 ctacctcttc gcctctggac cctcccggcc cagcgccgcg aggcggcccg gcgctccgcc 540
 gcctcccggc actcccttca gccccgcga ccccttctag agaactagca tggcctactg 600
 gttcagaagg tggggctgga ggccgaggcg ccggtggaga aggtggcgcc gccgtcgaag 660
 gagactaccg agaagaagaa ctagacgagc tgttcgcggc cttggaagaa gacgcaaacc 720
 aagggttaag aggcgcgcga gaactcgagc acgtacctac agacgggggt ggagacgcag 780
 gaggtacata agacgggggc gacgcaaaaa gaaactcata ctgactcagt ggaacccggc 840
 aatagttaag aggtgcaaca ttaagggcgg acttccaata attatatgcg gagagcccag 900
 ggcagccttt aactatggct accacatgga ggactacact cctcaacctt tccccttcgg 960
 agggggaatg agcagctga ctttctctct gaaagccttg tatgaccagt acctaaaaca 1020
 ccaaaacagg tggactttct caaacgacca gctagacctc gccagataca ggggctgtaa 1080
 actaaggctt tacagaagcc ccgtctgtga ctttatagta cactacaacc taatacctcc 1140
 actaaaaatg aaccagttca caagtcccaa cagcaccgcg ggactactca tgctcagcaa 1200
 acacaagata ataattccca gctttcaaac aagacctggg ggcagacgct ttgttaaaat 1260
 aagacttaat ccccccaaac tatttgaaga caagtggtag actcagaag acctgtgcaa 1320

23/27

```

ggttccgctc gttagtatta cagcaactgc ggctgacttg cggatatccgt tctgctcacc 1380
acaaacgaac aacccttgca ccaccttcca ggtactgcgc aagaactaca atacagttat 1440
aggaacttcc gtaaaagacc aagagtccac acaagacttt gaaaattggc ttataaaaac 1500
agactcacac tatcaaacat ttgccacaga ggctcaacta ggcagaatte ctgcatttaa 1560
tcctgatggc actaaaaaca ctaaacagca gtcgtggcaa gataactgga gcaaaaaaaaa 1620
ttcaccatgg acaggttaact caggtacata cccacaaaca accagtgaat tgtacaaaat 1680
tccatatgac agtaacttcg gctttccac atacagagcc caaaaagact acattttaga 1740
aagaagacag tgcaacttta actatgaagt taataatcca gttagcaaaa aagtatggcc 1800
acaacctagt acaacaacac ccacagtaga ctactatgaa taccactgtg gatggttcag 1860
caacatattc ataggcccca acagatacaa cctacagttt caaacagcat atgtagacac 1920
cacatacaac ccactaatgg acaagggcaa aggcaacaaa atatggtttc aatatctgtc 1980
taaaaagggc acagactaca atgaaaaaca atgctactgc accctagaag acatgccct 2040
atgggcaata tgctttggat acactgacta tgtagagact caactaggac ccaatgtgga 2100
ccatgaaaca gcaggttaa taattatgat ctgtccatac actcaaccac ctatgtatga 2160
caaaaacaga cctaactggg gatacgtagt ctatgacaca aactttggca atggaaaaat 2220
gccctcagga agtggccaag tcccagtata ctggcaatgc cgatggaggc ccatgctgtg 2280
gttccaacaa caagtactca atgacatctc aaagactgga ccgtacgcct acagagacga 2340
atataaaaat gtacaactga ctctctacta caactttatt tttaactggg ggggcgacat 2400
gtattaccca caggtcgtta aaaaccctg tggagactcc ggaatcgttc cgggttcgg 2460
tagattcact cgagaagtac aagtcgttag cccgctttcc atgggaccgg cctacatctt 2520
ccactacttc gactccagac gcgggttctt tagtgaaaaa gctcttaaaa gaatgcaaca 2580
acaacaagaa tttgatgaat cttttacatt caaacctaag agacccaaac ttctacagc 2640
agccgcagaa atcctccagc tcgaagaaga ctgcacttca ggggaaggaa aatcgccact 2700
acagcaagaa gagaaaagaa tcgaagtcc ccaaagccg acagtacagc tccagctcca 2760
gcgaaacatc caggagcagc tcgcaatcaa gcagcagctc caattcctct tgcctcaact 2820
cctcaaaacc caatccaatt tgcatttaaa cccacaattt ttaagccctt cataaaatat 2880
gacatgtttg gggacccctt tctcaccct ccaacagccg aagagtggga aacagagtac 2940
cagtgtgtga aggcctttaa cagaccacct agaaccaacc taaaagacac ccccttctac 3000
ccctgggtac ctaaactaa acctcaatte cgtgtatctt ttaaacttgg ttttcaataa 3060
acaagccgt gggagtttca cttgtcgtg tcaacctctt aaggtcacta agcactccga 3120
gcgtaagcga ggagtgcgac cctccccctt ggggcaactc cctcgaagtc cggcgctacg 3180
cgcttcgcgc tgcgccggac atctcgacc cccctccac ccgaaacgt tgcgcgttct 3240
ggaccttcgg cgtcgggggg gtcgggggct ttactaaaca gactccgagg tgccattgga 3300
cactgagggg atgaacagca acgaaagtga gtggggccag acttcgcat aaggccttta 3360
tcttcttgc atttgtcagt atagagggtc gccataggt tcggcctcca ttttaacctc 3420
taaaaactac caaatggcc gttccagtga cgtcacagcc gccatttta gtagctgacg 3480
tcaaggattg acgtgaaggt taaaggtcat cctcgcgga agctacacaa aatggtggac 3540
aacatcttcc gggtc aaagg tcgtgcacac gtcataagtc acgtggtggg gaccgcgtgt 3600
aaccggaag taggccccgt cacgtgattt gtcacgtgtg tacacgtcac aaccgccatt 3660
ttgttttaca aaatggctga ctctcttct ctttttgaaa aaaggcgcca aaaaaccgtc 3720
gg 3722

```

24/27

<211> 761

<212> PRT

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 63

Met	Ala	Tyr	Trp	Phe	Arg	Arg	Trp	Gly	Trp	Arg	Pro	Arg	Arg	Arg
1				5					10					15
Trp	Arg	Arg	Trp	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Arg	Arg
				20					25					30
Thr	Arg	Arg	Ala	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Arg	Arg	Arg	Lys	Pro	Arg
				35					40					45
Val	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Arg	Arg	Arg	Thr	Tyr	Arg	Arg	Gly
				50					55					60
Trp	Arg	Arg	Arg	Arg	Tyr	Ile	Arg	Arg	Gly	Arg	Arg	Lys	Lys	Lys
				65					70					75
Leu	Ile	Leu	Thr	Gln	Trp	Asn	Pro	Ala	Ile	Val	Lys	Arg	Cys	Asn
				80					85					90
Ile	Lys	Gly	Gly	Leu	Pro	Ile	Ile	Ile	Cys	Gly	Glu	Pro	Arg	Ala
				95					100					105
Ala	Phe	Asn	Tyr	Gly	Tyr	His	Met	Glu	Asp	Tyr	Thr	Pro	Gln	Pro
				110					115					120
Phe	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Met	Ser	Thr	Val	Thr	Phe	Ser	Leu	Lys
				125					130					135
Ala	Leu	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Leu	Lys	His	Gln	Asn	Arg	Trp	Thr	Phe
				140					145					150
Ser	Asn	Asp	Gln	Leu	Asp	Leu	Ala	Arg	Tyr	Arg	Gly	Cys	Lys	Leu
				155					160					165
Arg	Phe	Tyr	Arg	Ser	Pro	Val	Cys	Asp	Phe	Ile	Val	His	Tyr	Asn
				170					175					180
Leu	Ile	Pro	Pro	Leu	Lys	Met	Asn	Gln	Phe	Thr	Ser	Pro	Asn	Thr
				185					190					195
His	Pro	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Ser	Lys	His	Lys	Ile	Ile	Ile	Pro
				200					205					210
Ser	Phe	Gln	Thr	Arg	Pro	Gly	Gly	Arg	Arg	Phe	Val	Lys	Ile	Arg
				215					220					225
Leu	Asn	Pro	Pro	Lys	Leu	Phe	Glu	Asp	Lys	Trp	Tyr	Thr	Gln	Gln
				230					235					240
Asp	Leu	Cys	Lys	Val	Pro	Leu	Val	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala
				245					250					255
Asp	Leu	Arg	Tyr	Pro	Phe	Cys	Ser	Pro	Gln	Thr	Asn	Asn	Pro	Cys
				260					265					270
Thr	Thr	Phe	Gln	Val	Leu	Arg	Lys	Asn	Tyr	Asn	Thr	Val	Ile	Gly
				275					280					285

25/27

Thr Ser Val Lys Asp Gln Glu Ser Thr Gln Asp Phe Glu Asn Trp	290	295	300
Leu Tyr Lys Thr Asp Ser His Tyr Gln Thr Phe Ala Thr Glu Ala	305	310	315
Gln Leu Gly Arg Ile Pro Ala Phe Asn Pro Asp Gly Thr Lys Asn	320	325	330
Thr Lys Gln Gln Ser Trp Gln Asp Asn Trp Ser Lys Lys Asn Ser	335	340	345
Pro Trp Thr Gly Asn Ser Gly Thr Tyr Pro Gln Thr Thr Ser Glu	350	355	360
Met Tyr Lys Ile Pro Tyr Asp Ser Asn Phe Gly Phe Pro Thr Tyr	365	370	375
Arg Ala Gln Lys Asp Tyr Ile Leu Glu Arg Arg Gln Cys Asn Phe	380	385	390
Asn Tyr Glu Val Asn Asn Pro Val Ser Lys Lys Val Trp Pro Gln	395	400	405
Pro Ser Thr Thr Thr Pro Thr Val Asp Tyr Tyr Glu Tyr His Cys	410	415	420
Gly Trp Phe Ser Asn Ile Phe Ile Gly Pro Asn Arg Tyr Asn Leu	425	430	435
Gln Phe Gln Thr Ala Tyr Val Asp Thr Thr Tyr Asn Pro Leu Met	440	445	450
Asp Lys Gly Lys Gly Asn Lys Ile Trp Phe Gln Tyr Leu Ser Lys	455	460	465
Lys Gly Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Gln Cys Tyr Cys Thr Leu Glu	470	475	480
Asp Met Pro Leu Trp Ala Ile Cys Phe Gly Tyr Thr Asp Tyr Val	485	490	495
Glu Thr Gln Leu Gly Pro Asn Val Asp His Glu Thr Ala Gly Leu	500	505	510
Ile Ile Met Ile Cys Pro Tyr Thr Gln Pro Pro Met Tyr Asp Lys	515	520	525
Asn Arg Pro Asn Trp Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr Asn Phe Gly	530	535	540
Asn Gly Lys Met Pro Ser Gly Ser Gly Gln Val Pro Val Tyr Trp	545	550	555
Gln Cys Arg Trp Arg Pro Met Leu Trp Phe Gln Gln Gln Val Leu	560	565	570
Asn Asp Ile Ser Lys Thr Gly Pro Tyr Ala Tyr Arg Asp Glu Tyr	575	580	585
Lys Asn Val Gln Leu Thr Leu Tyr Tyr Asn Phe Ile Phe Asn Trp	590	595	600
Gly Gly Asp Met Tyr Tyr Pro Gln Val Val Lys Asn Pro Cys Gly			

26/27

	605	610	615
Asp Ser Gly Ile	Val Pro Gly Ser Gly Arg Phe Thr Arg Glu Val		
	620	625	630
Gln Val Val Ser	Pro Leu Ser Met Gly Pro Ala Tyr Ile Phe His		
	635	640	645
Tyr Phe Asp Ser	Arg Arg Gly Phe Phe Ser Glu Lys Ala Leu Lys		
	650	655	660
Arg Met Gln Gln	Gln Gln Glu Phe Asp Glu Ser Phe Thr Phe Lys		
	665	670	675
Pro Lys Arg Pro	Lys Leu Ser Thr Ala Ala Ala Glu Ile Leu Gln		
	680	685	690
Leu Glu Glu Asp	Ser Thr Ser Gly Glu Gly Lys Ser Pro Leu Gln		
	695	700	705
Gln Glu Glu Lys	Glu Val Glu Val Leu Gln Thr Pro Thr Val Gln		
	710	715	720
Leu Gln Leu Gln	Arg Asn Ile Gln Glu Gln Leu Ala Ile Lys Gln		
	725	730	735
Gln Leu Gln Phe	Leu Leu Leu Gln Leu Leu Lys Thr Gln Ser Asn		
	740	745	750
Leu His Leu Asn	Pro Gln Phe Leu Ser Pro Ser		
	755	760	

<210> 64

<211> 165

<212> PRT

<213> non-B, non-C, non-G hepatitis virus

<400> 64

Met His Phe Arg Arg Val Arg Ala Lys Arg Lys Leu Leu Leu Gln		
1	5	10
Ala Val Arg Ala Pro Pro Lys Ala Pro Ala Met Ser Phe Thr Thr		
	20	25
Pro Thr Ile Asn Ala Gly Ile Arg Glu Gln Gln Trp Phe Glu Ser		
	35	40
Thr Leu Arg Ser His His Ser Phe Cys Gly Cys Gly Asp Pro Val		
	50	55
Leu His Phe Thr Asn Leu Ala Thr Arg Phe Asn Tyr Leu Pro Ala		
	65	70
Thr Ser Ser Pro Leu Asp Pro Pro Gly Pro Ala Pro Arg Gly Arg		
	80	85
Pro Ala Leu Arg Arg Leu Pro Ala Leu Pro Ser Ala Pro Ala Thr		
	95	100
Pro Ser Arg Glu Leu Ala Trp Pro Thr Gly Ser Glu Gly Gly Ala		

[illegible]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/51, C12N7/02, C07K14/18, C07K16/10, A61K39/29, G01N33/576

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/51, C12N7/02, C07K14/18, C07K16/10, A61K39/29, G01N33/576

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL (geneseq), REGISTRY (STN),
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 241 (18. 12. 1997) T. Nishizawa et al., ; "A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology", p.92-97	1-58
P, A	Lancet, Vol. 352 (18. 07. 1998) P. Simmonds et al., ; "Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products", p.191-195	1-58
P, X	Hepatol. Res., Vol. 10 (1998) H. Okamoto et al., ; "Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology", p.1-16	1-58
P, X	Hepatol. Res., Vol. 10 (1998) K. Takahashi et al., ; "Partial -2.4kb sequence of TT virus (TTV) genome from 8 Japanese isolates: diagnostic and phylogenetic implications", p.111-120	1-58

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 October, 1998 (19. 10. 98)

Date of mailing of the international search report
27 October, 1998 (27. 10. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03340

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	J. Med. Virol., Vol. 56 (1998) Okamoto H. et al., ; "Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis", p.128-132	1-58
P, X	JP, 9-299078, A (Yugen Kaisha Niakku), 25 November, 1997 (25. 11. 97) (Family: none)	1-58
A	JP, 1-279844, A (Denka Seiken K.K.), 10 November, 1989 (10. 11. 89) & EP, 339668, A2	24-26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁶ C12N15/51, C12N7/02, C07K14/18, C07K16/10, A61K39/29, G01N33/576		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁶ C12N15/51, C12N7/02, C07K14/18, C07K16/10, A61K39/29, G01N33/576		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GenBank/EMBL(geneseq), REGISTRY(STN), CA(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 241(18. 12. 1997) T. Nishizawa et al.; "A novel DNA virus(TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology", p. 92-97	1-58
P, A	Lancet, Vol. 352(18. 07. 1998) P. Simmonds et al.; "Detection of a novel DNA virus(TTV) in blood donors and blood products", p. 191-195	1-58
P, X	Hepatol. Res., Vol. 10(1998) H. Okamoto et al.; "Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus(TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology", p. 1-16	1-58
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19. 10. 98	国際調査報告の発送日 27.10.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 滝本 晶子 電話番号 03-3581-1101 内線 3449	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Hepatol. Res., Vol. 10 (1998) K. Takahashi et al. ; "Partial -2.4kb sequence of TT virus (TTV) genome from 8 japanese isolates: diagnostic and phylogenetic implications", p. 111-120	1 - 5 8
P, X	J. Med. Virol., Vol. 56 (1998) Okamoto H. et al. ; "Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis", p. 128-132	1 - 5 8
P, X	J P, 9 - 2 9 9 0 7 8, A ((有)ニアック) 25. 11月. 1997 (25. 11. 97) (ファミリーなし)	1 - 5 8
A	J P, 1 - 2 7 9 8 4 4, A (デンカ生研(株)) 10. 11月. 1989 (10. 11. 89) & E P, 3 3 9 6 6 8, A 2	2 4 - 2 6