

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7678483号
(P7678483)

(45)発行日 令和7年5月16日(2025.5.16)

(24)登録日 令和7年5月8日(2025.5.8)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	27/62	(2021.01)	G 0 1 N	27/62	V
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 Q	1/6876	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q	1/34	

請求項の数 15 (全16頁)

(21)出願番号	特願2023-505611(P2023-505611)	(73)特許権者	504159235 国立大学法人 熊本大学 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目3 9 番 1 号
(86)(22)出願日	令和4年3月9日(2022.3.9)	(73)特許権者	000001993 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1 番地
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/010333	(73)特許権者	309027296 株式会社アイスティサイエンス 和歌山県和歌山市有本1 8 - 3
(87)国際公開番号	WO2022/191244	(74)代理人	110001069 弁理士法人京都国際特許事務所
(87)国際公開日	令和4年9月15日(2022.9.15)	(72)発明者	富澤 一仁 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目3 9 番 1 号 国立大学法人熊本大学内
審査請求日	令和5年9月4日(2023.9.4)		
(31)優先権主張番号	特願2021-38698(P2021-38698)		
(32)優先日	令和3年3月10日(2021.3.10)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
(31)優先権主張番号	特願2021-92199(P2021-92199)		
(32)優先日	令和3年6月1日(2021.6.1)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
特許法第3 0 条第2 項適用 東北大学加齢医学研究所 最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 コロナウイルス感染を検出する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳類である対象がC O V I D - 1 9 に罹患している恐れがあるかまたは罹患しているかを判定するための方法であって、対象由来の試料中における、6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および/または2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) である修飾ヌクレオシドの量を検出する工程と、前記判定のために、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を提供する工程とを含む方法。

【請求項2】

さらに、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を、当該修飾ヌクレオシドの量が多いとC O V I D - 1 9 に罹患している恐れがあるかまたは罹患しており、当該修飾ヌクレオシドの量が少ないとC O V I D - 1 9 に罹患していないと判定するための第1基準値と比較する工程を含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

さらに、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を、当該修飾ヌクレオシドの量が多いとC O V I D - 1 9 の罹患の程度が重く、当該修飾ヌクレオシドの量が少ないとC O V I D - 1 9 の罹患の程度が軽いと評価するための第2基準値と比較する工程を含む請求項1に記載の方法。

【請求項4】

対象について検出された前記修飾ヌクレオシドの量が前記第1基準値よりも多く、且つ該対象が軽症であるとき、

さらに、前記対象について検出された前記修飾ヌクレオシドの量が、対象のその後の病態の変化として、当該修飾ヌクレオシドの量が多いと重症化または死亡し、当該修飾ヌクレオシドの量が少ないと増悪なく回復すると予測するための第3基準値と比較する工程を含む請求項2に記載の方法。

【請求項5】

COVID-19に罹患した哺乳類における治療効果を評価するための方法であって、対象由来の試料中における、6-スレオニルカルバモイルアデノシン(t^6A)および/または2-チオメチル, 6-スレオニルカルバモイルアデノシン(ms^2t^6A)である修飾ヌクレオシドの量を検出する工程と、前記評価のために、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を提供する工程とを含む方法。

10

【請求項6】

前記試料は、血漿、血清、または尿である請求項1または請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記修飾ヌクレオシドの量の検出は、タンデム質量分析(MS/MS)法により行う請求項1または請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記試料は、除タンパク処理および脱塩処理がなされた試料である請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記試料は血漿または血清であって、前記修飾ヌクレオシドの量を検出する工程は測定結果を血漿または血清中のアデノシンの量で補正する工程を含む請求項7に記載の方法。

20

【請求項10】

前記試料は尿であって、前記修飾ヌクレオシドの量を検出する工程は測定結果を尿中のクレアチニン、尿素窒素、尿酸、アデノシン、および3-アミノ-3-カルボキシプロピルウリジンからなる群より選ばれる少なくとも一つの物質の量で補正する工程を含む請求項7に記載の方法。

【請求項11】

前記修飾ヌクレオシドの量の検出は、ELISA法により行う請求項1または請求項5に記載の方法。

【請求項12】

前記対象はヒトである請求項1または請求項5に記載の方法。

30

【請求項13】

前記対象は発熱患者である請求項12に記載の方法。

【請求項14】

哺乳類である対象がCOVID-19の治療対象であるかを判定するための方法であって、対象由来の試料中における、6-スレオニルカルバモイルアデノシン(t^6A)および/または2-チオメチル, 6-スレオニルカルバモイルアデノシン(ms^2t^6A)である修飾ヌクレオシドの量を検出する工程と、前記判定のために、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を提供する工程とを含む方法。

【請求項15】

6-スレオニルカルバモイルアデノシン(t^6A)および/または2-チオメチル, 6-スレオニルカルバモイルアデノシン(ms^2t^6A)からなるCOVID-19の重症化マーカーまたは重症化予測マーカー。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、COVID-19に罹患している恐れがある対象または罹患している対象を検出する方法に関する。より具体的には、本発明は、修飾ヌクレオシドを標的として用いることにより、COVID-19に罹患している恐れがある対象または罹患している対象を検出する方法に関する。

50

【背景技術】

【0002】

2019年12月に中華人民共和国湖北省武漢市で報告された原因不明の肺炎は、SARS-CoV2と呼ばれる新規病原ウイルスによる感染症でありCOVID-19と名付けられた。その後世界中に感染は拡大し、多くの死者を出すのみならず社会活動および経済活動に対して甚大な影響をもたらしている。現在、同疾患の診断にはPCR検査や抗原検査が用いられている。ただ抗原検査は精度が低いため、確定診断には、殆どの場合にPCR検査が用いられている。PCR検査は精度が高いが、鼻咽頭ぬぐい液、喀痰、あるいは唾液を検体として用いられるため、医療従事者や検査技師に感染リスクがあり、作業を行う者に精神的および肉体的負担を強いる。また検査結果が判るまでに時間がかかること

10

【0003】

発明者は、これまでに、リボ核酸(RNA)における化学修飾の哺乳動物における生理的意義を明らかにし、報告してきた。その過程の中で、一度修飾された核酸は、ヌクレオシドにまで分解され、細胞外に排泄されることを見出し、血液や尿の中の修飾ヌクレオシドを網羅的に解析する手法を確立した(非特許文献1)。これらの修飾ヌクレオシドは生物種によらず共通しているものと生物種に特異的なものが存在することが知られている。

20

【0004】

tRNAは4つの塩基により書き込まれたDNAの遺伝情報をタンパク質のアミノ酸配列へと変換するアダプター分子である。tRNAにはさまざまな転写後修飾が施されており、これらの修飾はtRNAのフォールディングや安定性に必要なだけでなく、遺伝暗号の解読を正確かつ効率よく行うため重要な役割を担っている。

【0005】

N^6 -スレオニルカルバモイルアデノシン(t^6A)は、アデノシンの誘導体であり、 N^6 位にカルボニル基を介してスレオニンの結合した化学構造をもつ。 t^6A は、ANNコドンを読み取るtRNAの37位に存在する修飾塩基で、ほぼすべての生物に保存されており多くの生物の生育にとって必須の修飾ヌクレオシドである。 t^6A は、tRNAのアミノアシル化、転座反応、コドンの正確な認識、読み枠の維持など、タンパク質合成のさまざまな段階において重要な役割を担うことが知られている。

30

【0006】

2-チオメチル, 6-スレオニルカルバモイルアデノシン(ms^2t^6A)は、 t^6A のアデニンの2位がチオメチル化した化学構造をもつ。 ms^2t^6A は、アンチコドンがUUUであるtRNAの37位に存在する修飾塩基であり、メチルチオトランスフェラーゼであるCdkal1により t^6A から生合成されることが本発明者により報告されている(非特許文献2)。

【0007】

また、修飾ヌクレオシドは、疾患との関連も報告されている。 ms^2t^6A は、本発明者により、2型糖尿病との関連が報告されている(非特許文献2)。しかしながら、これらの修飾ヌクレオシドと、COVID-19を初めとする感染性ウイルスとの関連は何ら報告がない。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】Ogawaら、Molecular Cell 81, 659-674, 2021

【文献】Weiら、J Clin Invest. 2011; 121(9):3598-3608

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 9 】

本発明は、一つの態様において、C O V I D - 1 9 に罹患している恐れがある対象または罹患している対象を検出する方法を提供することを目的とする。本発明は、別の態様において、C O V I D - 1 9 に罹患している患者の重症化を予測する方法を提供することを目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

発明者らは、C O V I D - 1 9 患者と健常人の血液および尿中の修飾ヌクレオシドを質量分析機器で網羅的に解析した。その結果、6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および 2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) の量が、C O V I D - 1 9 患者で有意に多いことを見だし、本発明を完成した。本発明者らはさらに、各種発熱患者の血漿および尿中の $t^6 A$ および $m s^2 t^6 A$ の量について分析を行い、それらの修飾ヌクレオシドが、他の発熱患者に比べ、C O V I D - 1 9 患者で特異的に多いことを明らかにした。また、本発明者らは、患者における $t^6 A$ および $m s^2 t^6 A$ の量が、その後の患者の病態の変化と関連することを見いだした。

【 0 0 1 1 】

本発明は以下の態様を含むものである。

[1] 哺乳類である対象がC O V I D - 1 9 に罹患している恐れがあるかまたは罹患しているかを判定するための方法であって、対象由来の試料中における、6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および / または 2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) である修飾ヌクレオシドの量を検出する工程と、前記判定のために、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を提供する工程とを含む方法。

[2] さらに、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を、予め定めた基準値と比較することにより、対象がC O V I D - 1 9 に罹患している恐れがあるかまたは罹患しているかを判定する工程を含む上記 [1] に記載の方法。

[3] さらに、検出した前記修飾ヌクレオシドの量に基づき対象の重症度 (C O V I D - 1 9 の罹患の程度、例えば、軽症、中等症 (中等症 I、中等症 II)、重症) を評価する工程を含む上記 [1] に記載の方法。

[4] さらに、検出した前記修飾ヌクレオシドの量に基づき、対象のその後の病態の変化を予測する工程を含む上記 [2] に記載の方法。

[5] C O V I D - 1 9 に罹患した哺乳類における治療効果を評価するための方法であって、対象由来の試料中における、6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および / または 2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) である修飾ヌクレオシドの量を検出する工程と、前記評価のために、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を提供する工程とを含む方法。

[6] 前記対象由来の試料は、血漿、血清、または尿である上記 [1] ~ [5] のいずれか一つに記載の方法。

[7] 前記修飾ヌクレオシドの量の検出は、質量分析法 (好ましくは、タンデム質量分析 (M S / M S) 法) により行う上記 [1] ~ [6] のいずれか一つに記載の方法。

[8] 前記試料は、除タンパク処理および脱塩処理がなされた試料である上記 [7] に記載の方法。

[9] 前記試料は血漿または血清であって、前記修飾ヌクレオシドの量を検出する工程は、測定結果を血漿または血清中のアデノシンの量で補正する工程を含む上記 [7] または [8] に記載の方法。

[1 0] 前記試料は尿であって、前記修飾ヌクレオシドの量を検出する工程は、測定結果を尿中のクレアチニン、尿素窒素、尿酸、アデノシン、および 3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピルウリジン (a c p 3 U) からなる群より選ばれる少なくとも一つの物質の量で補正する工程を含む上記 [7] または [8] に記載の方法。

[1 1] 前記修飾ヌクレオシドの量の検出は、E L I S A 法により行う上記 [1] ~ [6] のいずれか一つに記載の方法。

10

20

30

40

50

[1 2] 前記対象はヒトである上記 [1] ~ [1 1] のいずれか一つに記載の方法。

[1 3] 前記対象は発熱患者である上記 [1 2] に記載の方法。

[1 4] 哺乳類である対象が C O V I D - 1 9 の治療対象であるかを判定するための方法であって、対象由来の試料中における、6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および / または 2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) である修飾ヌクレオシドの量を検出する工程と、前記判定のために、検出された前記修飾ヌクレオシドの量を提供する工程とを含む方法。

[1 5] 前記対象由来の試料は、血漿、血清、または尿である上記 [1 4] に記載の方法。

[1 6] 前記対象はヒトである上記 [1 4] または [1 5] に記載の方法。

[1 7] 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および / または 2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) からなる C O V I D - 1 9 の重症化マーカーまたは重症化予測マーカー。

10

[1 8] 哺乳類である対象由来の試料中に検出される 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および / または 2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) である修飾ヌクレオシドの C O V I D - 1 9 の重症化マーカーまたは重症化予測マーカーとしての使用。

[1 9] 前記対象はヒトであり、前記試料は、血漿、血清、または尿である上記 [1 8] に記載の使用。

【 0 0 1 2 】

本発明はまた、上記 [1] ~ [1 3] のいずれか一つに記載の方法により検出された修飾ヌクレオシドの結果にもとづいて、対象が C O V I D - 1 9 に罹患しているか否かを診断する方法でもある。よって本発明はまた、以下の工程を含む診断方法でもある。

20

(a) 患者由来の試料 (好ましくは、血漿、血清、または尿であり、より好ましくは、除タンパク処理および脱塩処理がなされた血漿、血清、または尿) 中における、6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および / または 2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) である修飾ヌクレオシド (好ましくは、 $t^6 A$ および $m s^2 t^6 A$) の量を検出する工程、および

(b) 工程 a で検出された修飾ヌクレオシドの量に基づいて、患者が C O V I D - 1 9 に罹患しているかを診断する工程。

上記工程 (a) における修飾ヌクレオシドの量の検出は、質量分析法 (好ましくは、タンデム質量分析 (M S / M S) 法) または E L I S A 法により行うことができる。

30

上記工程 (a) は、試料が血漿または血清である場合は、検出された修飾ヌクレオシドの量を血漿または血清中のアデノシンの量で補正することにより、より精度良く検出することができ、また、試料が尿である場合は、検出された修飾ヌクレオシドの量を、クレアチニン、尿素窒素、尿酸、アデノシン、および 3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピルウリジン (a c p 3 U) からなる群より選ばれる少なくとも一つの物質の量で補正することにより、より精度良く検出することができる。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明の方法により、対象が C O V I D - 1 9 に罹患している恐れがあるかまたは罹患しているかを判定することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 左図は 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) の構造を示し、右図は 2 - チオメチル, 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン ($m s^2 t^6 A$) の構造を示している。

【 図 2 】 S A R S - C o V 2 に感染させた A C E 2 過剰発現 H E K 2 9 3 細胞の R N A 中の修飾ヌクレオシドを解析した結果である。

【 図 3 】 左図は血清中の $t^6 A$ 量 (血清アデノシン補正後) を示し、右図は血清中の $m s^2 t^6 A$ 量 (血清アデノシン補正後) を示す。

50

【図4】COVID-19患者とその他発熱患者の尿中 t^6A 量（尿中 acp^3U 補正後）の比較結果を示す。

【図5】 acp^3U で補正した t^6A 量のROC曲線を示している。

【図6】COVID-19患者とその他発熱患者の尿中 ms^2t^6A 量（尿中 acp^3U 補正後）の比較結果を示す。

【図7】 acp^3U で補正した ms^2t^6A 量のROC曲線を示している。

【図8】COVID-19感染患者と健常人における修飾核酸（ t^6A および ms^2t^6A ）の検出の比較結果を示す。但し、内部標準を用いた補正は行わなかった。データは平均値 \pm SEMを表す。*は、 $P < 0.05$ 、**は、 $P < 0.01$ 、***は、 $P < 0.001$ である。

【図9】COVID-19感染患者と健常人における修飾核酸（ t^6A および ms^2t^6A ）の検出における、対象試料の比較結果を示す。尿試料は acp^3U 補正を行い、血清試料はアデノシン補正を行った。データは平均値 \pm SEMを表し、ポイントは個々の対象を示す。****は、 $P < 0.0001$ 。

【図10】COVID-19感染の無症状・軽症患者と重症患者における修飾核酸（ t^6A および ms^2t^6A ）の検出の比較結果を示す。

【図11】COVID-19感染患者の入院時の修飾核酸（ ms^2t^6A ）の検出結果と、患者のその後の病態の変化を示した結果である。データは平均値 \pm SEMを表す。*は、 $P < 0.0035$ 。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を、例示的な実施態様を例として詳細に説明するが、本発明は以下に記載の実施態様に限定されるものではない。

なお、文中で特に断らない限り、本明細書で用いるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味をもつ。また、本明細書に記載されたものと同様又は同様の任意の材料および方法は、本発明の実施において同様に使用することができる。また、本明細書に記載された発明に関連して本明細書中で引用されるすべての刊行物および特許は、例えば、本発明で使用できる方法や材料その他を示すものとして、本明細書の一部を構成するものである。

【0016】

本明細書において、数値範囲を示す「A～B」の記載は、端点であるAおよびBを含む数値範囲を意味する。また、「AないしB」についても同様である。

【0017】

COVID-19は、2019年12月に発生した原因不明の肺炎であり、世界的なパンデミックを引き起こした疾患につけられた名前である。一方、SARS-CoV-2は、その原因となるウイルス名である。本明細書において、疾患を表す場合にCOVID-19を用い、一方、ウイルスを表す場合にSARS-CoV-2という表現を用いるが、いずれの名称を用いた場合でも、文脈において疾患またはウイルスのいずれを表すか明らかな場合は、その意味に解するものとする。

【0018】

本発明で「対象」または「患者」とは、何れかの哺乳類を示し、限定されないが、ヒト；チンパンジー、他の類人猿およびサル種などの非ヒト霊長類を含めたヒト以外の霊長類；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマなどの家畜；イヌおよびネコなどの家畜哺乳類；ならびに、マウス、ラットおよびモルモットなどの齧歯動物を含む小動物または実験用動物を含み、好ましくはヒトである。また、「対象」または「患者」には、成人、幼児、および新生児も含まれる。

【0019】

本発明で「試料」とは、修飾ヌクレオシドを含み得る任意の対象由来の試料を意味する。特に限定されるものではないが、試料としては、対象由来の体液試料が好ましく用いられる。「体液試料」とは、個体の体から単離できる任意の液体の試料を意味し、これに限

10

20

30

40

50

定されないが、例としては、血液、血漿、血清、唾液、尿、涙、汗、などが挙げられる。好ましくは、体液は、血漿、血清、または尿である。一つの態様において、本発明において用いる試料は、ヒト由来である。

【0020】

本発明において、COVID-19に罹患しているとは、哺乳類である対象が、その原因ウイルスであるSARS-CoV2に感染し、COVID-19と判定できることを意味する。本発明において、COVID-19に罹患している恐れがあるとは、哺乳類である対象が、その原因ウイルスであるSARS-CoV2に感染していることが疑われていることを意味する。

【0021】

本発明の方法によりCOVID-19に罹患しているまたは罹患している恐れがあると判定された対象は、他のCOVID-19の検出方法と組み合わせて、対象がCOVID-19であると診断することもできる。他の検出方法は、これに限定されないが、PCR検査、抗原検査を挙げることができ、好ましくはPCR検査である。

【0022】

本発明において、対象がCOVID-19の治療対象であるとは、本発明の検出方法を行う対象が、その原因ウイルスであるSARS-CoV2に感染し、COVID-19に罹患しており治療が必要とされていると判定できることを意味する。

【0023】

COVID-19の重症度は、例えば、厚生労働省が発行している「新型コロナウイルス感染症 診療の手引き」を参照して、軽症、中等症（中等症I、中等症II）、および重症に分類される。その他、WHOの診療ガイドライン、米国国立衛生研究所や各国が発表しているガイドライン等を参照することができる。

【0024】

検出対象とする修飾ヌクレオシドとは、6-スレオニルカルバモイルアデノシン ($t^6 A$) および/または2-チオメチル, 6-スレオニルカルバモイルアデノシン ($ms^2 t^6 A$) である。 $t^6 A$ および/または $ms^2 t^6 A$ の検出は、それらの修飾ヌクレオシドが検出できる方法であれば特に制限がないが、好ましくは、質量分析法またはELISA法により検出される。

【0025】

「質量分析法」または「MS」とは、その質量によって化合物を特定するための分析技術であって、分析したい試料に高電圧などのエネルギーを与えることでイオン化させ、イオンの質量対電荷比 (m/z) に基づいてイオンをフィルタリング、検出および/または測定する方法である。質量分析計には、試料のイオン化方法や、検出方法によって多くの種類があり、 $t^6 A$ および/または $ms^2 t^6 A$ の検出に用いることができれば特に制限なく用いることができる。MS、およびその改良型であるTOF-MSやMALDI-TOF-MSなど各種質量分析計が市販されており、本発明において適宜用いることができる。

【0026】

質量分析法を用いる場合は、1台の質量分析計でも検出できるが、好ましくは質量分析計をタンデムに2台つないだタンデム質量分析計（タンデムMS/MS）が用いられる。タンデムMS/MSは、質量分析計（MS）が2台直列に結合され、その間に衝突活性化室を持つ装置であり、まず1台目のMSで試料をイオン化させた後、特定の質量数のイオンのみを選択して衝突活性化室に導き、Xe（キセノン）などの不活性ガスと衝突させ、その後、1台目のMSで選択したイオンから生じた2次的なイオン（プロダクトイオン）を2台目のMSで検出する。

【0027】

イオン化の方法としては、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）、大気圧化学イオン化法（APCI）、大気圧光イオン化法（APPI）、電子イオン化法（EI）、高速電子衝撃（FAB）/液体二次イオン化法（LSIMS）、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）、フィールドイオン化法、フィールド脱離法、熱スプレー/ブ

10

20

30

40

50

ラズマスプレーイオン化法およびパーティクルビーム・イオン化法などが挙げられる。当業者であれば、測定する分析物、試料の種類、検出器の種類、正イオンモードまたは負イオンモードの選択等に基づいて、イオン化法を適宜選択することができる。 $t^6 A$ および/または $m s^2 t^6 A$ が検出され得る限り特に限定されず、上記の方法を適宜用いることができる。

【0028】

タンデムMS/MSは、通常、選択反応モニタリング(SRM)を用いて行われる。選択反応モニタリングとは、2以上の段数の多段階質量分析において、生成物イオンスペクトルを取得する代わりに、分析対象化合物から生じる特定の生成物イオンの信号量のみを連続的に検出するように質量分析計を動作させることを指す。SRMにおいて、タンデム質量分析は空間的であっても、時間的であってもよい。

10

【0029】

質量分析法を用いる場合は、好ましくは、質量分析計(MSまたはMS/MS)の前に液体クロマトグラフィー(LC)やGC(ガスクロマトグラフィー)、より好ましくはLCを結合し、LCやGCで試料を分離した後に質量分析計に導入し分析する方法が用いられる。質量分析計の前にLCやGCを結合することにより、例えば、血液試料や尿試料を用いた場合でも、良好に分析を行うことができる。

【0030】

LCに用いることのできるクロマトグラフィーの種類としては、分配クロマトグラフィー、順相液体クロマトグラフィー(NPLC)、置換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー(RPLC)、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを挙げるることができる。

20

【0031】

一般に、質量分析計は、試料導入部、イオン化部(イオン源)、質量分離部(アナライザー)、検出部(検出器)、真空排気部(真空ポンプ)、装置制御部・データ処理部(データシステム)等から成る。

【0032】

質量分析計に用いるアナライザーの例としては、トリプル四重極アナライザー、イオントラップアナライザーおよび飛行時間型アナライザーなどが挙げられ、トリプル四重極アナライザーまたは四重極飛行時間型(QTOF)アナライザーが好ましい。SRMアクセスのために有利な市販の機器プラットフォームは、多くの場合、トリプル四重極アナライザーを用いているという観点から、本発明の検出方法においても、トリプル四重極アナライザーを用いてタンデムMS/MSを行うことがより好ましい。ここでいう「トリプル四重極」は、当業者が通常理解するように、四重極のみならず、四重極の代わりに多重極や積層電極を用いる場合も含む意味である。また、本発明の検出において、質量分析は、負イオンモードで行ってもよいし、正イオンモードで行ってもよい。

30

【0033】

本発明の方法において、 $t^6 A$ および/または $m s^2 t^6 A$ の検出には、好ましくは、質量分析計の前にLCを結合した、トリプル四重極型LC/MS/MSが用いられる。

【0034】

本発明の方法において、質量分析法を用いて $t^6 A$ および/または $m s^2 t^6 A$ を検出する場合は、試料を予め除タンパク処理および/または脱塩処理するのが好ましい。これらの前処理により、感度よく、正確に目的物質を検出できる。

40

【0035】

除タンパク処理の方法としては、一般に、タンパク質の変性による不溶化(過塩素酸、トリクロロ酢酸、メタリン酸などの酸の添加、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノールなどの、水と混和可能な有機溶媒の添加、加熱・冷却)、並びに物理的な除去(メンブランフィルター(遠心ろ過デバイスなど)による限外ろ過、透析チューブによる透析、超遠心)などが挙げられる。また、内面逆相充填剤、ハイブリッド型充填剤、親水性ポリマー充填剤などの浸透制限充填剤を用いることにより、除タンパク処理を行うこと

50

もできる。t⁶Aおよび/またはms²t⁶Aを検出に支障がない限り限定されるものではないが、好ましい除タンパク処理の方法の一例としては、水と混和可能な有機溶媒によるタンパク質変性による不溶化法を用いて除タンパク処理することが挙げられ、例えば、メタノールを用いて除タンパク処理することが挙げられる。除タンパク処理の方法は公知であり、定法に従って行うことができる。特に限定されるものではないが、例えば、除タンパク処理は、試料（好ましくは、体液試料）に対して、該試料の0.2～20倍量、好ましくは1～5倍量のエタノール又はメタノールを添加し、タンパク質変性に十分な時間（例えば、15分間）反応させた後、変性したタンパク質を沈殿させるのに十分な条件下（例えば、12,000×gで15分間）で遠心分離を行い、上清（有機溶媒層）を回収することにより、除タンパク処理された試料を得ることができる。除タンパク処理を行った試料はそのまま、あるいは遠心エバポレーターなどにより乾燥し、蒸留水などの適当な溶媒に溶解させて、LCに用いることができる。

10

【0036】

脱塩処理の方法としては、分析において用いられている公知の脱塩方法を適宜使用できる。また上記した除タンパク処理方法を用いることにより、脱塩処理を兼ねることも可能である。

【0037】

本発明の方法の一つの態様においては、質量分析計を用いて計測した結果をもとに、試料中のt⁶Aおよび/またはms²t⁶Aの量を検出する。t⁶Aおよび/またはms²t⁶Aの量の検出は、内部標準を用いた補正を行っても行わなくとも良いが、内部標準を用いることにより、より精度良く検出できる。内部標準としては、これに限定されないが、試料が血液試料、例えば血漿や血清の場合は、血漿または血清中のアデノシンを挙げることができ、試料が尿の場合は、尿中の、クレアチニン、尿素窒素、尿酸、アデノシン、および3-アミノ-3-カルボキシプロピルウリジン（acp³U）を挙げることができる。これらの内部標準物質の測定値を用い、測定されたt⁶Aおよび/またはms²t⁶Aの量を補正することにより、より精度良く目的物質を検出できる。t⁶Aおよび/またはms²t⁶Aの量の検出は、また、予め作成した検量線を用いて行ってもよい。

20

【0038】

血液試料、例えば血漿や血清を用い、内部標準として血清アデノシンを用いて補正した場合、血液試料中のt⁶Aの量は、血清アデノシンに対し、少なくとも3倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍を超える場合は、血液試料が由来する対象がCOVID-19に罹患しているかまたは罹患している恐れがあると判定できる。また、血液試料中のms²t⁶Aの量は、血清アデノシンに対し、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは5倍を超える場合は、血液試料が由来する対象がCOVID-19に罹患しているかまたは罹患している恐れがあると判定できる。

30

【0039】

尿試料を用い、内部標準として、3-アミノ-3-カルボキシプロピルウリジン（acp³U）を用いて補正した場合、尿試料中のt⁶Aの量は、acp³Uに対し、少なくとも50倍、好ましくは80倍、より好ましくは100倍を超える場合は、尿試料が由来する対象がCOVID-19に罹患しているかまたは罹患している恐れがあると判定できる。また、尿試料中のms²t⁶Aの量は、acp³Uに対し、少なくとも5倍、好ましくは8倍、より好ましくは10倍を超える場合は、血液試料が由来する対象がCOVID-19に罹患しているかまたは罹患している恐れがあると判定できる。

40

【0040】

本発明の方法は、t⁶Aおよび/またはms²t⁶Aの量を検出する際に補正（例えば、内部標準を用いた補正）を行わなくともよい。かかる場合は、COVID-19に罹患していない対象（例えば、健常人）におけるt⁶Aの量やt⁶Aの量の平均値を予め設定しておき、その数値に対して対象由来の試料中の量が多い場合に、COVID-19に罹患しているかまたは罹患している恐れがあると判定できる。本発明の方法においてms²t⁶Aの量の検出を行う場合も同様である。

50

【0041】

本発明の方法の一つの態様において、試料中の t^6A および/または ms^2t^6A の量の検出はELISA法を用いても行うことができる。ELISA法は、試料中に含まれる標的の抗原に特異抗体を結合させ、酵素反応を利用して検出・定量する方法である。本発明の方法においては、 t^6A に対する抗体および/または ms^2t^6A に対する抗体を用いて、検出を行うことができる。修飾ヌクレオシドに対する抗体は、常法に従い作製した抗体を用いることができ、また、委託して作製した抗体や市販の抗体を用いることもできる。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、好ましくはモノクローナル抗体である。

【0042】

本発明の方法において、ELISA法を用いて t^6A および/または ms^2t^6A の量の検出する場合は、常法に従い行うことができる。例えば、直接法、間接法、サンドイッチ法、競合法のいずれを用いることもできるが、好ましくはサンドイッチ法である。

【0043】

本発明の一つの態様において、本発明の判定方法は、対象がCOVID-19に罹患しているまたは罹患している恐れがあると判定するために用いることができる。本発明の判定方法の一つの態様においては、対象の試料において測定された t^6A および/または ms^2t^6A の量を、予め定めた基準値と比較することにより、対象がCOVID-19に罹患している恐れがあるかまたは罹患しているかを判定することができる。予め定めた基準値は、これに限定されないが、例えば、健康な対象（健常人）において検出される t^6A および/または ms^2t^6A の値、またはその数値に擬陽性を効果的に排除できる程度の数値を加味した値を挙げることができる。カットオフ値（基準値）に対し、対象における t^6A および/または ms^2t^6A の量が有意に上昇していた場合、対象がCOVID-19に罹患しているまたは罹患している恐れがあると判定することができる。有意に上昇しているかは、検出方法に求められる感度に応じて適宜判断すればよいが、例えば、健常人の平均値の2倍、3倍、5倍、10倍などに設定すればよい。

カットオフ値は、感度、特異度、罹患（感染）陽性的中率、罹患（感染）陰性的中率などの観点から、当業者が適宜設定することができる。例えば、ROC曲線解析に基づいて、設定することが挙げられる。その他、公知の他のCOVID-19の検出方法（例えば、PCR法）を用いて検出対象の陽性、陰性を判定し、その結果と、本発明の方法を用いた同じ対象を測定した場合のデータを対比し、その結果から、本発明の方法のカットオフ値を決定することもできる。

【0044】

本発明の別の一つの態様において、 t^6A および/または ms^2t^6A の検出は、対象がCOVID-19に罹患しているとの判定に加え、対象の重症度の判定をするために用いることができる。対象の重症度は、これに限定されないが、例えば、軽症、中等症、または重症であるかを判定できる。本発明の判定方法の一つの態様においては、対象の試料において測定された t^6A および/または ms^2t^6A の量を、予め定めた重症度のそれぞれの基準値と比較することにより、対象の重症度を判定することができる。

【0045】

本発明の別の一つの態様において、 t^6A および/または ms^2t^6A の検出は、COVID-19に罹患した対象における治療効果を評価するために用いることができる。対象における治療効果の評価は、例えば、対象の試料において測定された t^6A および/または ms^2t^6A の量を、治療の前後で比較することにより行うことができる。また、その結果に基づいて、対象における治療方針や投薬のレジメンを決定または変更することができる。

【0046】

本発明の他の一つの態様において、 t^6A および/または ms^2t^6A の検出結果は、COVID-19に罹患した対象の病態変化または予後予測の判定をするために用いることができる。より具体的には、COVID-19に罹患した対象が軽症または中等症I、好

10

20

30

40

50

ましくは軽症である場合に、対象の試料において測定された $t^6 A$ および / または $m s^2 t^6 A$ の値に基づいて、対象が重症化するかどうかを予測することができる。例えば、測定された数値が大きいほど、その対象が重症化するリスクが高いと判定することができる。あるいは、予め定めたカットオフ値（基準値）に対し、対象における $t^6 A$ および / または $m s^2 t^6 A$ の量が有意に上昇していた場合、対象が重症化するリスクが高いと判定することができる。有意に上昇しているかは、検出方法に求められる感度に応じて適宜判断すればよい。カットオフ値は、感度、特異度、重症化予測的中率などの観点から、当業者が適宜設定することができる。

【0047】

例えば、ROC 曲線解析に基づいて、設定することが挙げられる。その他、検出対象の病態変化または予後をモニターし、その結果と、本発明の方法を用い同じ対象を測定した場合のデータを対比し、その結果から、今回の手法のカットオフ値を決定することもできる。また、その結果に基づいて、対象における治療方針や投薬のレジメンを決定または変更することができる。薬剤のレジメンは、例えば、厚生労働省の「新型コロナウイルス感染症 診療の手引き」、WHO の診療ガイドライン、米国国立衛生研究所や各国が発表している診療ガイドライン等を参照して変更すればよく、これらのガイドライン等は、改訂版を含めて、本明細書に組み込まれる。

10

【0048】

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

20

【実施例】

【0049】

(実施例1) SARS-CoV-2 感染細胞中の修飾ヌクレオシドの網羅的解析

以下のようにして、SARS-CoV-2 に感染した哺乳動物細胞中の修飾ヌクレオシドを分析した。

ACE2 過剰発現 HEK293 細胞を含む細胞培養液 (3×10^5 cells) に SARS-CoV2 溶液 (6×10^6 VP/mL) を $50 \mu\text{L}$ 加えて感染させ、感染 18 時間後および 24 時間後に細胞の RNA を Trizol で抽出した。分光光度計 (NanoDrop ND-1000) を用いて RNA 濃度を $1,000 \text{ ng} / \mu\text{L}$ に調整した。その後、RNA 分解酵素を用いてヌクレオシドまで分解し、試料の $2 \mu\text{L}$ を超高速トリプル四重極型質量分析計 (島津製作所 LCMS-8050) を用いて修飾ヌクレオシドを網羅的に解析した。その結果、SARS-CoV2 感染に伴い、 $t^6 A$ および $m s^2 t^6 A$ の上昇を認めた。それぞれの構造を図 1 に示す。 $t^6 A$ は感染に伴い 6 - 10 倍に上昇しており、 $m s^2 t^6 A$ は 3 - 5 倍に上昇していた。結果を図 2 に示す。

30

【0050】

(実施例2) COVID-19 感染患者における修飾核酸の検出

以下に従い、COVID-19 感染患者における修飾核酸を分析した。

COVID-19 と診断された患者 30 名から、COVID-19 指定医療機関入院時に血清および尿サンプルを採取し、 -30°C の冷凍庫で保存した。その後、常温で融解し $100 \mu\text{L}$ をカラム (NanoSep with 3K Omega) を用いて除タンパクおよび脱塩を行なった。その試料の $2 \mu\text{L}$ を超高速トリプル四重極型質量分析計 (島津製作所 LCMS-8050) を用いて修飾ヌクレオシドを網羅的に解析した。また同様の方法で健常人の血清・尿および細菌感染症患者、インフルエンザウイルス感染患者、外科手術後発熱患者の尿に対しても解析を行なった。また、血清での測定結果は血清アデノシン値で補正を行い、尿での測定結果は尿中 3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピルウリジン (acp3U) で補正を行なった。血清を用いた結果を、図 3 に示す。COVID-19 患者血清中の $t^6 A$ 量および $m s^2 t^6 A$ 量は、健常人より有意に多かった。

40

【0051】

COVID-19 感染患者および各発熱患者の尿中の $t^6 A$ 量について比較検討したところ、細菌感染症患者 (Bacterial infection patients)、インフルエンザなどの COV

50

COVID-19以外のウイルス感染患者（Other viral infection patients）、術後発熱など感染症以外の発熱患者（Others）では、健常人（Control）と同等であったが、COVID-19患者では有意に上昇していた。結果を図4に示す。

【0052】

COVID-19患者について尿中の t^6A 量のROC曲線を描写し、感度、特異性などについて検討した。カットオフ値を52.57にした場合、感度：100%、特異度：96.43%、尤度比：28であった。結果を図5に示す。

【0053】

次に、COVID-19感染患者および各発熱患者の尿中の ms^2t^6A 量について比較検討したところ、 t^6A 同様に細菌感染症患者、インフルエンザなどのCOVID-19以外のウイルス感染患者、術後発熱など感染症以外の発熱患者では、健常人と同等であったが、COVID-19患者では有意に上昇していた。結果を図6に示す。

【0054】

COVID-19患者について尿中の ms^2t^6A 量のROC曲線を描写し、感度、特異性などについて検討した。カットオフ値を9.269に設定した場合、感度：99.3%、特異度：93.33%、尤度比：14.9であった。結果を図7に示す。

【0055】

（実施例3）COVID-19感染患者および健常人における修飾核酸の検出（1）

実施例2と同様にして、COVID-19感染患者（17人）および健常人（14人）の試料を用いて、血清および尿中の t^6A 量および ms^2t^6A 量を測定した。結果を図8に示す。但し、内部標準を用いた補正は行わなかった。補正を行わない場合でも、対象のCOVID-19の感染を有意に検出できた。

【0056】

（実施例4）COVID-19感染患者および健常人における修飾核酸の検出（2）

実施例2と同様にして、COVID-19感染患者（28人）および健常人（21人）の試料を用いて、血清および尿中の t^6A 量および ms^2t^6A 量を測定し、尿と血清における感度を比較した。血清での測定結果は血清アデノシン値で補正を行い、尿での測定結果は尿中3-アミノ-3-カルボキシプロピルウリジン（ acp^3U ）で補正を行なった。結果を図9に示す。尿および血清のいずれの試料においても、 t^6A 量および ms^2t^6A 量のいずれでも、対象のCOVID-19の感染を有意に検出できたが、尿試料を用いた場合に、検出感度が優れていた。

【0057】

（実施例5）COVID-19感染重症患者における修飾核酸の検出

実施例2と同様にして、COVID-19感染の無症状・軽症患者（58人）および重症患者（6人）の試料を用いて、血清中の t^6A 量および ms^2t^6A 量を測定した。但し、内部標準を用いた補正は行わなかった。結果を図10に示す。いずれの修飾ヌクレオシドの量も、無症状患者・軽症患者に比べ重症患者において有意に増加していた。本発明の判定方法は、重症患者の確認にも利用できることが判った。

【0058】

（実施例6）COVID-19感染患者における病態変化の予測

実施例2と同様にして、軽症と診断されたCOVID-19感染患者（21人）の試料を用いて、入院時の血清中の ms^2t^6A 量を測定した。但し、内部標準を用いた補正は行わなかった。その後、治療を受けた各患者の病態変化を追ったところ、入院時に ms^2t^6A 値が低かった15名は増悪なく退院したが、一方、入院時に ms^2t^6A 値が高かった6名は重症化または死亡した。増悪なく退院した患者（Recovered）、重症化または死亡した患者（Severed/Death）の入院時の血清中の ms^2t^6A 量の測定結果を図11に示す。この結果は、本発明のマーカーおよび判定方法により、COVID-19感染患者の予後予測を行えることを示している。

【産業上の利用可能性】

【0059】

10

20

30

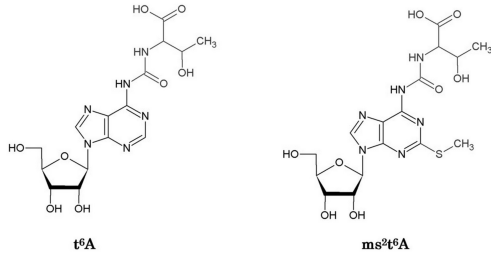
40

50

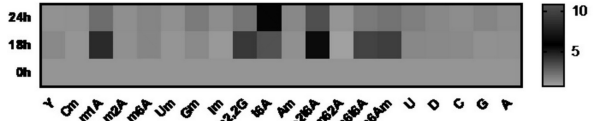
本発明によれば、血清や尿などの容易に取得できる試料を用いて、該試料中の修飾ヌクレオシドを検出することにより、試料が由来する対象がCOVID-19に罹患している恐れがあるまたは罹患しているかを判定できる。それにより、COVID-19の診断がより簡便で容易となる。本発明の方法はまた、COVID-19の重症度の判定および予後予測にも利用できる。

【図面】

【図 1】

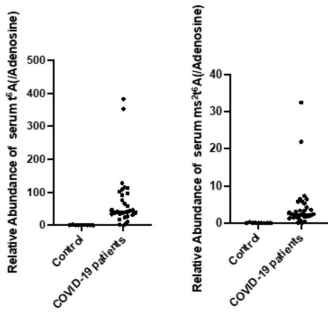


【図 2】

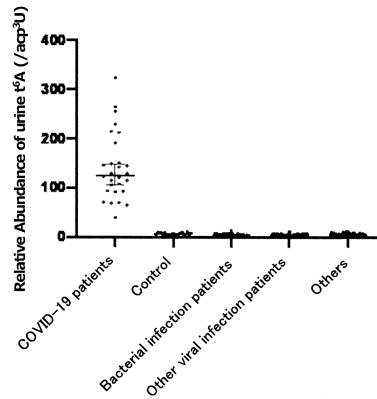


10

【図 3】



【図 4】



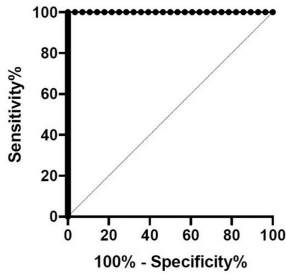
20

30

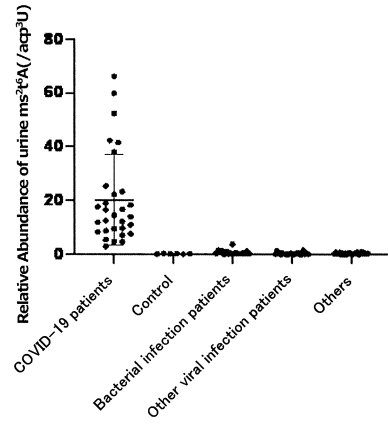
40

50

【 図 5 】

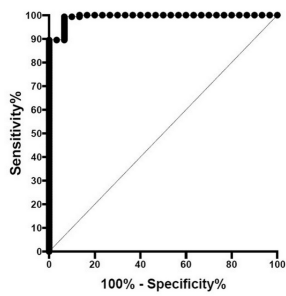


【 図 6 】

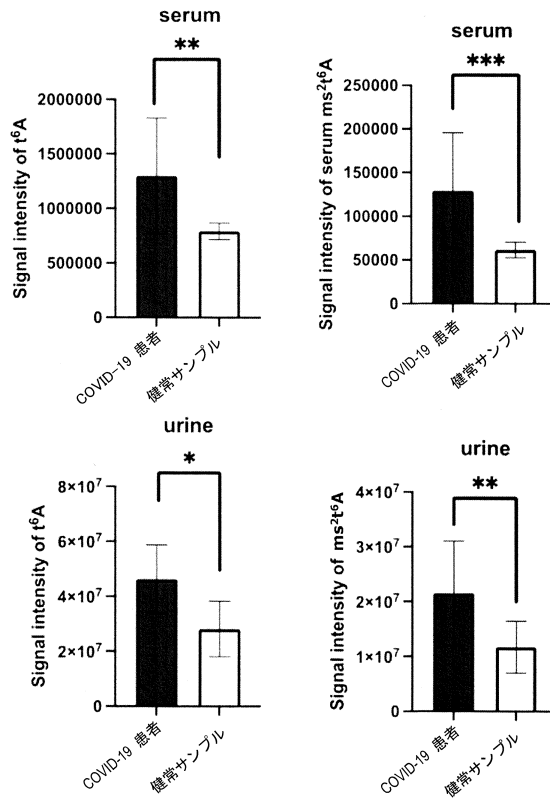


10

【 図 7 】



【 図 8 】



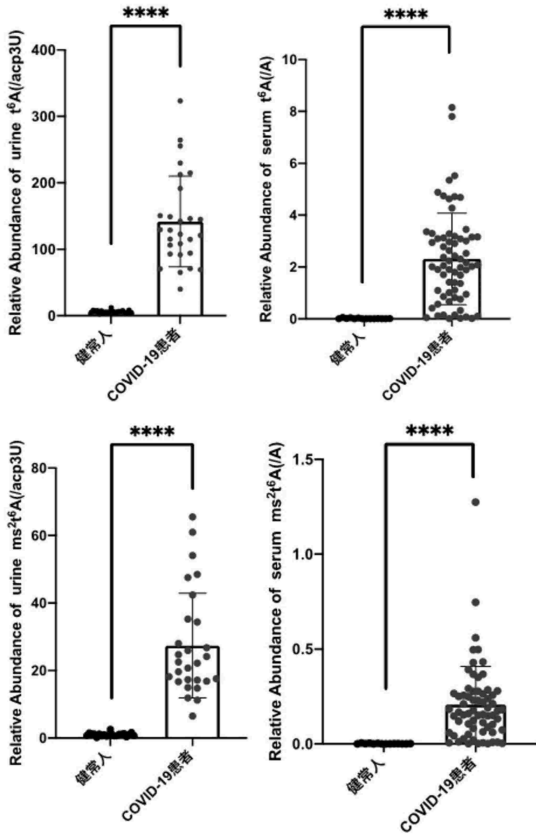
20

30

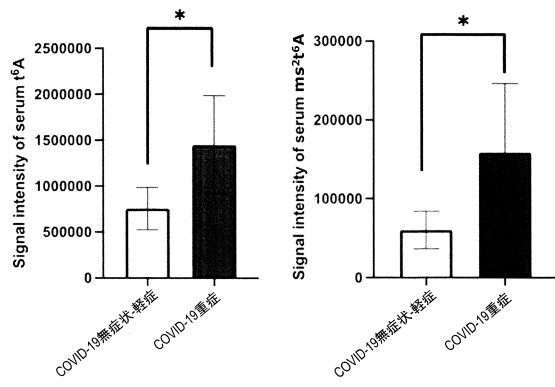
40

50

【 図 9 】



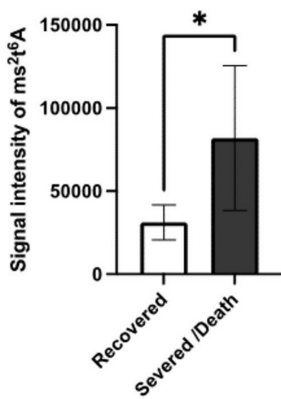
【 図 10 】



10

20

【 図 11 】



30

40

50

フロントページの続き

新型コロナウイルス感染症対策 共同研究・共同利用 第1回シンポジウム、令和2年10月26日 [刊行物等]
国立大学法人熊本大学記者会見開催案内プレスリリース、令和3年3月19日 [刊行物等] 国立大学法人熊本大学における記者会見、令和3年3月23日 [刊行物等] <https://www.kumamoto-u.ac.jp/>、<https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20210323-2>、<https://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2020-file/release210319.pdf>、令和3年3月23日 [刊行物等] 株式会社島津製作所における記者会見、令和3年3月29日 [刊行物等] <https://www.shimadzu.co.jp/>、<https://www.shimadzu.co.jp/news/press/x227x605oz4325i2.html>、令和3年3月29日 [刊行物等] <https://kumamoto-physiology.jp/>、<https://kumamoto-physiology.jp/2021/03/29/pl1003/>、令和3年3月29日

(72)発明者 永芳 友

熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 国際公開第2014/138670(WO, A1)

国際公開第2018/124235(WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G01N 33/50

G01N 27/62

G01N 33/53

C12Q 1/6876

C12Q 1/34

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)