



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07K 15/04, C12P 21/02 C12N 1/21, 15/51, 15/62 C12N 15/70, G01N 33/576 // (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/09634 (43) 国際公開日 1992年6月11日 (11.06.1992)														
(21) 国際出願番号 PCT/JP91/01662 (22) 国際出願日 1991年11月29日 (29. 11. 91) (30) 優先権データ <table border="0"> <tr> <td>特願平 2/325434</td> <td>1990年11月29日 (29. 11. 90)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平 2/325435</td> <td>1990年11月29日 (29. 11. 90)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平 3/70231</td> <td>1991年1月16日 (16. 01. 91)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平 3/179074</td> <td>1991年4月19日 (19. 04. 91)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平 3/232590</td> <td>1991年6月7日 (07. 06. 91)</td> <td>JP</td> </tr> </table> (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INCORPORATED) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (71) 出願人; および (72) 発明者 有馬暉勝 (ARIMA, Terukatsu) [JP/JP] 〒892 鹿児島県鹿児島市平之町5-1-403号 Kagoshima, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 佐藤 淳 (SATO, Atsushi) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市津西1-31-17 東レ社宅N-201 Kanagawa, (JP) 井田伸夫 (IDA, Nobuo) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市手広1111-202 Kanagawa, (JP)	特願平 2/325434	1990年11月29日 (29. 11. 90)	JP	特願平 2/325435	1990年11月29日 (29. 11. 90)	JP	特願平 3/70231	1991年1月16日 (16. 01. 91)	JP	特願平 3/179074	1991年4月19日 (19. 04. 91)	JP	特願平 3/232590	1991年6月7日 (07. 06. 91)	JP	(11) 国際公開番号 WO 92/09634 (43) 国際公開日 1992年6月11日 (11.06.1992) (74) 代理人 弁理士 斉藤武彦, 外 (SAITO, Takehiko et al.) 〒107 東京都港区赤坂1丁目1番18号 赤坂大成ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書
特願平 2/325434	1990年11月29日 (29. 11. 90)	JP														
特願平 2/325435	1990年11月29日 (29. 11. 90)	JP														
特願平 3/70231	1991年1月16日 (16. 01. 91)	JP														
特願平 3/179074	1991年4月19日 (19. 04. 91)	JP														
特願平 3/232590	1991年6月7日 (07. 06. 91)	JP														

(54) Title : NON-A NON-B HEPATITIS VIRUS ANTIGEN PROTEIN

(54) 発明の名称 非A非B型肝炎ウイルス抗原蛋白質

MSTNPKPQRK TKRNTSRRPQ DVKFPGGGQI
T064
VGGVYLLPRR GPRLGVRATR KTSERSQPRG
T069
RRQPIPKDRR STGKSWGKPG YP
T06A

S29のアミノ酸配列と合成ペプチドの設計

a ... Amino acid sequence of S29 and
synthetic peptide design

(57) Abstract

Novel non-A non-B hepatitis virus antigen proteins represented by S29 antigen obtained from the serum of a patient with chronic non-A non-B hepatitis. They can be prepared by the genetic recombination technology or chemical synthesis. As they specifically react with the serum of a patient with non-A non-B hepatitis, they can be used in the inspection of such hepatitis.

(57) 要約

非A非B型慢性肝炎患者由来の血清から取得した、S 2 9 抗原を初めとする新規な非A非B型肝炎ウイルス抗原蛋白質が提供される。該抗原蛋白質は遺伝子組換え技術又は化学合成法により得ることができる。該抗原蛋白質は、非A非B型肝炎患者血清と特異的に反応するので、非A非B型肝炎用検査薬として使用することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバードス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU ⁺	ソヴィエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

⁺SUの指定はロシア連邦の指定としての効力を有する。しかし、その指定が旧ソヴィエト連邦のロシア連邦以外の他の国で効力を有するかは不明である。

明 細 書

非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質

5 技術分野

本発明は、非 A 非 B 型肝炎ウイルス関連抗原及びその製造方法並びに非 A 非 B 型肝炎ウイルス関連抗原あるいはその同効物を利用した検査薬に関する。

10 本発明はまた非 A 非 B 型肝炎ウイルスゲノム RNA 並びにその cDNA にも関する。

背景技術

15 ウイルス肝炎のうち、経口感染する流行性肝炎である A 型肝炎、および、血液を介して感染する B 型肝炎ウイルスに関しては、原因ウイルスが分離され、その性質も明らかにされた。その結果、現在では両者とも診断法が確立され、感染の予防法が立てられている。

20 しかしながら、A 型でも B 型でもない非 A 非 B 型といわれる肝炎は、わが国の輸血後肝炎の約 90% を占めているとされており（日本臨床、35 巻、2724 頁（1977）；ジャーナル オブ バイオロジカル メディシン、49 巻、243 頁（1976））、厚生省がまとめた推計でも肝疾患の死亡者の 40% 近くを占める非 A 非 B 型肝炎の大多数は C 型肝炎が原因と見られている。
25 主要な感染ルートは輸血と血液製剤であり、これらは適切な検査方法が確立できれば感染を防止できるもの

であり、それだけに検査薬の開発への期待は大きい。

最近、米国のカイロン社は非A非B型肝炎患者の血清をチンパンジーに注射して、非A非B型肝炎を起したチンパンジーの血清に由来するRNAを出発材料として、
5 HCV（C型肝炎ウイルス）のcDNAをクローニングした（Q. L. クーラ、サイエンス、244巻、359頁（1989）：European Patent Application #88310922.5）。この配列を基にして種々の抗原が検討されているが、現在までのところHCV感染予防に有効とはいえない。
10

しかしながら、1990年の日本肝臓学会総会のシンポジウム「非A非B型肝炎研究の進歩－基礎と臨床」において発表されたレトロスペクティブ・スタディでは、現在使用されている検査薬が8年前に開発されていても
15 14人中10人の感染は防ぎ切れなかったとするものであり、感染性のウイルスが血液中にいるにもかかわらず検査結果に反映されないことを示していた。この原因としてはこの検査薬に使用されている抗原がウイルス粒子の核内蛋白に相当すると見られる部分を遺伝子光学的な手段で生産して使用していることが考えられ、HCV検査を確
20 実にを行うにはさらに複数種の抗原を開発する必要があると言える。

また、この目的のために多くの研究者がHCVゲノムのクローニングを試みているが、いずれもカイロン社の発表したHCVの塩基配列を基にしたPCR法を採用して
25 おり（Y. クボラ、ヌクレイック アシッズ リサー

チ、17巻、10367頁(1989); H. オカモト
ら、ジャパニジャーナルオブエキスペリメンタル
メディシン、60巻、167頁(1990)など)、P
CR法ではカイロン社のHCVと共通性の高いHCV配
列しかクローニング出来ないために、塩基配列の変化が
5 生じやすいHCVゲノムのクローニングとしては問題が
ある。また塩基配列の変化にともなってその配列がコード
するアミノ酸配列も変化するためウイルスの抗原性も
変化しやすく単独の抗原を用いた抗体診断薬では問題が
10 生じる。

そこで本発明者らは、より抗原性の高い蛋白をコード
したcDNAをクローニングすべく、複数の非A非B型
慢性肝炎患者由来の血清から分離したRNAを基にして
cDNAのクローニングを行い、複数種の抗原を見出し
15 た。これらの抗原性はそれぞれ異なっており将来的には
異なった複数の抗原を使用することで高感度な抗体検査
薬を設計することができる。また遺伝子工学的手法により
大量の抗原を調製することが可能となる。

20 発明の開示

すなわち本発明は、非A非B型肝炎患者の血清と特異
的に反応する抗原並びにその製造方法および特異抗原蛋
白質を組み合わせた抗体診断薬に関するものである。また、
本発明は、非A非B型肝炎患者の血清と特異的に反
25 応する抗原をコードするcDNAおよび単離された本来
のRNAゲノム配列にも関する。

図面の簡単な説明

第1図は、S29のアミノ酸配列と合成ペプチドの設計との関係を示す。

	A : A l a	N : M e t	W : T r p
5	D : A s p	N : A s n	Y : T y r
	E : G l u	P : P r o	
	F : P h e	Q : G l n	
	G : G l y	R : A r g	
	I : I l e	S : S e r	
10	K : L y s	T : T h r	
	L : L e u	V : V a l	

図2はT06Aを抗原とするELISAの結果を示す。

なお、表中横軸の番号は1～21までがC型肝炎サンプル、22が原発性胆汁性肝硬変サンプル、23～26
15 がB型肝炎サンプル、27～30は健常者サンプルである。

図3はT064を抗原とするELISAの結果を示す。

なお、表中横軸の番号は1～21までがC型肝炎サンプル、22が原発性胆汁性肝硬変サンプル、23～26
20 がB型肝炎サンプル、27～30は健常者サンプルである。

図4はT069を抗原とするELISAの結果を示す。

なお、表中横軸の番号は1～21までがC型肝炎サンプル、22が原発性胆汁性肝硬変サンプル、23～26
25 がB型肝炎サンプル、27～30は健常者サンプルである。

図 5 は P U E X S 4 の構築過程を示す。

図 6 は T 0 6 4 と S 4 を抗原とするマイクロプレート E L I S A の結果を示す。

1 ~ 2 1 までは C 型肝炎血清サンプル、2 2 は原発性胆汁性肝硬変サンプル、2 3 ~ 2 6 までは B 型肝炎血清サンプル、2 7 ~ 3 0 までは健常者サンプル、3 1 ~ 5 2 までは C 型肝炎サンプルで、3 1, 3 2 は C 型肝炎プール血清、3 3 ~ 3 7 までは C 型肝炎サンプルで、N 1 4 抗体 (+)、C 1 0 0 - 3 抗体 (+)、P C R (+) のサンプル、3 8 ~ 4 2 までは N 1 4 抗体 (+)、C 1 0 0 - 3 抗体 (-)、P C R (+) のサンプル、4 3 ~ 4 7 までは N 1 4 抗体 (-)、C 1 0 0 - 3 抗体 (+)、P C R (+) のサンプル、4 8 - 5 2 までは N 1 4 抗体 (-)、C 1 0 0 - 3 抗体 (-)、P C R (+) のサンプル

図 7 は T 0 6 4 と S 4 を抗原とするマイクロプレート E L I S A の結果を示す。

なお、横軸の番号 1 ~ 3 0 までは C 型肝炎サンプル 3 1 ~ 3 7 は健常人サンプル。

図 8 は T 0 6 4 と S 4 を別々に使用した抗原とするマイクロプレート E L I S A の結果を示す。

図 7 で示した 1 ~ 3 0 までの C 型肝炎サンプルについて T 0 6 4, S 4 に分けて反応性を調べた結果。

発明を実施するための最良の形態

本発明の抗原をコードする cDNA の配列は以下のよう
うにして入手した。

5 まず、複数の非 A 非 B 型慢性肝炎患者由来の血清から、
例えば、P. コミクエンツキーら、アナリティカル バ
イオケミストリー、162 巻、156 頁 (1987) に
示されるポリエチレングリコール沈殿法によってファ
ージ粒子を回収し、フェノール抽出、イソプロパノール沈
殿法で RNA を調製する。

10 調製した RNA から cDNA の合成は、Y. エビナら、
セル、40 巻、747 頁 (1980) の方法に従って、
市販品の cDNA 合成キット (例えば、BRL 社) とラ
ンダム・プライマー (宝酒造社) を用いて行うことがで
きる。

15 次に、合成した cDNA を市販品の λ gt11 クロー
ニング・キット (BRL 社) を用いて、 λ gt11 ファ
ージ・ベクターの EcoRI 部位に導入後、市販品のパ
ッケージング・キット (アマシャム社) を用いて、i n
v i t r o パッケージングを行って cDNA ライブラリ
20 ーを調製することが可能である。

かかる λ gt11 ファージ内に組み込まれた cDNA
は λ gt11 ファージ上の β -gal 遺伝子の中に組込
まれるので、ファージの大腸菌への感染後、IPTG
(イソプロピル- β -D-ガラクトピラノシド) などの
25 誘導物質による該ファージ上のラクトースオペロンのプ
ロモーターの誘導により β -ガラクトシダーゼとの融合

蛋白質として容易に発現が確認される。

この様にして、cDNAを組込んだλgt11ファージcDNAライブラリーから目的とする非A非B型慢性肝炎患者の血清特異的に反応する抗原をコードするcDNAをスクリーニングするには、(R. A. ヤングら、
5 プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U. S. A. 、80巻、1194頁(1983))
に示された方法に従って行うことができる。つまり、λgt11ファージを大腸菌に感染させ、IPTGを含む
10 培地で培養する。形成されたプラークを発現されたβ-ガラクトシダーゼとの融合蛋白質と共にニトロセルロースメンブレンに写しとり、非A非B型慢性肝炎患者由来の血清に含まれる抗体と反応させ、さらにHRP(西洋ワサビパーオキシダーゼ)で標識した抗ヒトIgG抗体
15 と反応させた後に発色させることによって、非A非B型慢性肝炎患者由来の血清に含まれる抗体と反応性のある融合蛋白質を発現しているプラークを選択することができる。

次に2次スクリーニングとして、こうして選択された
20 プラークの中から同様な方法で、非A非B型慢性肝炎患者由来の血清に含まれる抗体とは反応するが、B型肝炎患者由来の血清および正常人の血清とは反応しないプラークを選択する。

さらに、2次スクリーニングにパスしたλgt11組
25 換えファージの持つcDNAの塩基配列を決定することになるが、その方法は以下のようにする。まず、T.、

アニアテスら、モルキュラー クローニング、コールド
スプリング ハーバー ラボ. (1982) に示された
方法に従って、少量のファージDNAを調製し、このフ
アージDNAを制限酵素EcoRIで完全にあるいは部
5 分分解して得られるcDNAをpUC系統のプラスミド
・ベクターへサブクローニングする。そしてこのプラス
ミドDNAを調製して、例えば、デュポン社製のDNA
シーケンサーを用いて塩基配列を決定することができ
る。配列表の配列番号1から12に決定されたcDNA
10 の塩基配列とそれらがコードするアミノ酸配列を示した。
また配列表の配列番号13-24に決定されたcDNA
から推定されるウイルスゲノムRNAの配列を示した。
本発明において、配列表に示したcDNAと実質的に同
一機能を有する範囲において、修飾されたcDNA（即
15 ち、塩基配列が置換、欠失、挿入したもの）であっても
よい。もちろん、実質的に同一機能を有する限り、アミ
ノ酸配列が異なる程度に修飾されたものであってもよい。
また、ウイルスゲノムRNA配列の相補配列（アンチセ
ンスRNA）を機能配列として用いることも可能である。
20 以上のべた方法によって非A非B型慢性肝炎患者由来
の血清に由来するウイルスのcDNA配列が明らかにな
ったことによって、得られたcDNA配列から推定され
るアミノ酸配列を合成ペプチド機で合成したり、遺伝子
組換えによって発現させることによりcDNAにコード
25 されている抗原あるいはその一部を調製し血清診断法に
応用することができる。すなわち得られた抗原を用いて

この抗原に対する血清中の抗体を測定したり、あるいは、
抗原に対する抗体を予め調製し、この抗体に対する血清
中の抗原を測定し、感染を診断する方法である。なお、
5 予め調製される抗体のうちにはモノクローナル抗体が含まれていてよい。前者の方法についてその成績を確認するために複数の患者由来の検体について、本発明の抗原と既知の抗原との感度と特異性を比較した。また配列表 1 に示した S 2 9 に関しては親水性、疎水性を目安に合成ペプチドを設計し 3 種類の E L I S A を作製してその
10 うちの 1 種類を抗原として用いた。

以下に本発明の抗原を用いた血清診断薬について説明する。

まず本発明の抗原あるいはその一部の調製方法としては、遺伝子組み換え技術を利用して大腸菌、酵母、昆虫
15 細胞や動物細胞などで発現させる方法があげられる。発現方法としては本抗原をコードする c D N A あるいはその一部に必要な応じ蛋白合成の開始信号と終結信号を付加した後、公知の各種発現ベクターに結合させ、直接本発明の抗原あるいはその一部を発現させる方法があげられる。
20

例えば、大腸菌などでは、非 A 非 B 型特異抗原をコードする c D N A をプロモーターとして知られた配列、例えばトリプトファン合成酵素オペロン (T r p)、ラク
トースオペロン (l a c)、ラムダファージプロモーター (P_L, P_R など)、化学合成された t a c プロモ
25 ター (t r p と l a c から誘導)、t r c プロモーター

(trpとlacから誘導)などに連結したり、その他にリボゾーム結合配列、例えばシャインーダルガルノ配列(SD配列)、転写終結因子などを付加することができる。このリボゾーム結合配列としては、大腸菌などの配列を使用することも可能であるが、化学合成などにより作成されたコンセンサス配列を用いてもよい。

転写終結因子は発現の為には、必ずしも必要とされないが、目的とする蛋白が高発現している場合にはプラスミド自身を安定に保持させる為に付加することが望ましい。例えばリボゾームRNA遺伝子のターミネーター、trpオペロンターミネーターなどがあげられる。

また、発現方法としては他のペプチド(例えばマウスインターフェロン β やリポコルチン、インターロイキン2あるいは β ガラクトシダーゼやバキュロウイルスのポリヘドリンなど)との融合蛋白として微生物や昆虫細胞などで発現させる方法も挙げられる。もちろんペプチドの抗原性が保たれるなら、この発現生成物のうちの融合蛋白との間をプロテアーゼ(例えばリジンプロテアーゼや血液凝固因子であるFactor Xa)などで消化後、本発明の抗原部分のみを調製して使用することも可能である。

作製した発現ベクターを宿主へ導入して形質転換する方法としては、各種の知られた方法、例えばT. マニアティスら、モルキュラークローニング、コールド スプリング ハーバー ラボ(1989)などに記載の方法を用いることができる。また、大腸菌の場合、例えば、

//

モルキュラークローニング（１９８９）に記載の方法を用いることができる。

5 形質転換体を培養する方法としては、例えばモルキュラークローニング（１９８９）に記載の方法を用いることができる。

培養温度は通常 25 ～ 42℃で行われるが、実施例 8 に示した熱ショックにより発現の起こるプロモーターでは前培養に約 30℃、発現誘導を 42℃で行うのが望ましい。

10 発現した抗原あるいはその一部の精製や融合蛋白をプロテアーゼ消化後の抗原部分の調製には公知の手法が用いられ、それには例えば、塩分画、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、遠心分離などがある。例えば、メソッド イン エンザイモロジー（アカデミックプレス社 1980）の記載の方法が適用できる。本発明の抗原蛋白質の産生および精製の例を実施例 8 に示した。

20 さらに、本発明の抗原のエピトープ部分が明らかにされるならば、そのエピトープ部分を含むポリペプチドを人工的に合成して、そのままあるいは他の蛋白と結合させて抗原として使用することも可能である。このような結合を得るためには多くの方法が公知であり、ジスルフィド結合を利用する方法（もしこのペプチドがスルフヒドリル基を欠いていればシステイン残基を付加することによってこの方法を適用できる）、ジスルフィド／アミド結合を利用する方法が知られている。詳細は、例えば、

25

生化学実験法 11、エンザイムイムノアッセイ（東京化学同人 1989）を参照されたい。

次に、本発明の抗原あるいはその一部を主要な構成成分として含有する血清診断法の診断薬について述べるが、
5 採用する免疫学的検出方法に応じて種々の診断薬を設計することができる。例えば、検出方法としてオクタロニー法（MO）、免疫電気泳動法（IES、IEP）、補体結合反応法（CF）、免疫粘着血球凝集反応法（IAHA）、一元平板免疫拡散法（SRID）を利用する場合
10 合には、本発明の抗原あるいはその一部、人工的の合成したエピトープ部分を含む物質をそのまま使用して適当な形態に調製すればよい。一例として一元平板免疫拡散法を利用する場合を示せば、支持体として寒天、アガロース、デンプン、ポリアクリルアミドなどの中から適当
15 なものを選び、これを緩衝液に溶解し、次に本発明の物質を添加混合し、得られる溶液をガラス板上あるいはプラスチック容器内に流して固化し、固化ゲル平板に被検血清注入用の孔を開ければよい。この孔に被検血清を注入して拡散する抗体と抗原の反応を観察することによって
20 診断が可能である。

しかるに、検出方法として血球凝集反応法（PHA）を利用する場合には本発明の抗原あるいはその一部、人工的の合成したエピトープ部分を含む物質を微粒子に結合させる必要がある。微粒子としては哺乳類および鳥類
25 の血球が通常用いられるが、その他、ポリスチレンラテックス、ポリエステルラテックス、塩化ビニル、ベント

ナイト、ガラスビーズなどの約 $1 - 10 \mu$ の粒子も使用
することができる。本発明抗原と微粒子を結合させるに
は、例えば、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、
タンニン酸、ビスジアドダイズベンチジン、塩化クロム、
5 カルボジイミドなどを使用すればよく、本発明の抗原が
結合した微粒子と披検血清を混ぜた後、凝集反応を起こ
すか否かで診断を行うことができる。

また、本発明の抗原を放射性免疫測定法（R I A）や
酵素抗体法（E L I S A）などに利用する場合には、本
10 発明の抗原あるいはその一部、人工的に合成したエピト
ープ部分を含む物質を適当な固相に結合させ、さらに血
清中のヒト抗体と結合する2次抗体（抗ヒト抗体）を放
射能標識または酵素標識する必要がある。固相としては
マイクロプレート、チューブ、ビーズ、磁性ビーズなど
15 が使用でき、固相に結合した抗原と披検血清を反応させ
B/F分離を行なった後、抗原と結合した抗体を抗ヒト
抗体（2次抗体）で検出することによって血清中の抗体
量を検出することができる。2次抗体の放射能標識とし
てはヨウ素125やヨウ素131が利用でき、クロラミ
20 ンT法などで結合させることができる。また、2次抗体
の標識酵素としては、例えば、グルコースオキシダーゼ、
アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ベータガ
ラクトシダーゼなどを使用することができ、酵素と抗体
との結合法としては有機化学的方法、免疫学的標識法、
25 アビジン/ビオチン反応を介する方法、組合わせ架橋法
などが知られている。詳細は、例えば、生化学実験法11、

エンザイムイムノアッセイ（東京化学同人 1989）を参照されたい。さらに、特殊な酵素抗体法（E L I S A）として、本発明の抗原を結合させた固相に披検血清中の抗体を捕捉し、さらに抗体と酸素標識した抗原を反応させることによって抗体を検出することも可能である。
5 本発明のマイクロプレートを用いた酵素抗体法（E L I S A）の例を実施例 9 に示した。

本発明では、配列表 1 ～ 12 の抗原蛋白質の一部も同効物として使用できる。

10 以上血清診断法についてのべたが、用いる抗原は、本発明の配列表 1 ～ 12 の抗原蛋白質あるいはそのエピトープ領域を組み合わせて使用することも、感度の面で好ましい場合がある。さらに、競合法やサンドイッチ法として知られた手法も適用することができるし、蛍光標識
15 などの種々の標識も使用できる。また本発明の検査薬は上記の免疫学的検査薬としての使用の他に、DNAプローブとしても使用可能である。

以下実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。
実施例 1 .

20 ウイルスRNAの調製

カイロン社の C 1 0 0 - 3 抗体陽性の非 A 非 B 型慢性肝炎患者の血清 1.8 L にポリエチレングリコール 4000（ナカライ化学社）を 72 g 加え氷中に 1 時間放置してウイルスを沈殿させた。4℃、5 K r p m、20 分間の遠心でウイルス分画を遠沈後、変性溶液（6 M グアニジンチオシアネート、37.5 m M クエン酸ナトリウム p H
25

7.0、0.75%ザルコシル、1.05 ml 2-メルカプト
エタノール) 100 mlを加えてすばやく振とうした。
その後15 mlの2M酢酸テトリウム(pH 4.0)、
150 mlのフェノール(蒸留水で飽和)、30 mlの
5 クロロホルム/イソアミルアルコール(49:1)の順
に加えて混和した。遠心後、水層を別の容器に移して等
量のイソプロピルアルコールを加えて-20℃で2、3
日放置し、RNAを沈殿させた。再度、15 Krpmで
20分間室温で遠沈後、沈殿を1 mlの変性溶液に溶か
10 し、1 mlのイソプロパノールを加え-70℃に保存し
た。約10 µgのRNAが調製できた。

実施例 2.

cDNAライブラリーの作製

RNA保存液を遠沈後、沈澱を70%エタノールで洗
15 浄して、ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理し
た滅菌水20 µlに溶かし、DNA DIP STICK
K(インビトロジェン社)でRNAを定量した。

約0.5 µgのRNAを出発材料として、cDNA合成
システムおよびcDNAクローニングシステム(BRL
20 社)を用いてdDNAを合成し、λgt11にクローン
化した。今回cDNAを合成する際に、ウイルスRNA
がポリA鎖を持つことが明らかでなかったので、オリゴ
dTプライマーの変りにランダムプライマー(宝酒造)
を使用した。

25 その後、λDNAパッケージング・キット(アマシャ
ム社)を用いて、組換えλgt11をパッケージングし、

指示菌である Y 1 0 9 0 上にブランクを形成させた。なおブランク形成用の培地は、下層が 1.5 % アガー L 培地（1 % バクトトリプトン、0.5 % イーストエキストラクト、1 % 塩化ナトリウム）上層が 0.7 % アガロース L 培地を用いた。約 5×10^6 p f u の c D N A ライブラリーが作製できた。

実施例 3.

1 次スクリーニング

作製した c D N A ライブラリーは直径 1 5 0 m m のプレート（ベクトン デッキンソン社）上に約 1.0×10^4 p f u ブランクが出現するようにまき、4 3 ° C で 3 - 4 時間培養してブランクを形成させた。その後、あらかじめ 1 0 m M の 1 P T G（イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド）に浸してから風乾してあるニトロセルロースフィルター（ハイボンド C エキストラ アマシヤム社）をプレート上にのせ 3 7 ° C で 3 時間培養した。これによりクローン化された c D N A がコードしているアミノ酸配列がフィルター上に発現される。このフィルター上にプロットされた抗原に対して、大腸菌で吸収した数人分の非 A 非 B 型肝炎患者のプール血清を約 2 5 倍に希釈したものを 1 次抗体とし、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト 1 g G（カッペル社）を 2 次抗体として反応させ、発色した物を陽性クローンとした。合計 5 6 個の陽性クローンが得られた。その後フィルターとプレートの位置を合わせ、陽性クローンと思われる場所の寒天を滅菌したつまようじでかきとり、1 m l の S M バッファー (5.8

g NaCl、2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、6.05 g
トリス塩基、5 ml 2%ゼラチン/L H_2O)に懸
濁した。この液に10 μ lのクロロホルムを加えファ
ージ液として4℃に保存した。

5 実施例4.

2次スクリーニングおよび特異性試験

陽性クローンから得られたファージ液を適当にSMバ
ッファー希釈し、プレートあたり約300個のプラーク
10 が出現するようにファージ液をまき、実施例3と同様の
方法で陽性クローンを発色させた。陽性クローンを滅菌
したつまようじでかきとり、0.5 mlのSMバッファー
に懸濁した。この液に10 μ lのクロロホルムを加えシ
ングルプラークのファージ液として4℃に保存した。

2次スクリーニングで陽性を示したクローンについて、
15 健常人の血清2検体（カイロン社のC100-3に対し
て陰性）、B型肝炎患者血清1検体との反応性について
調べた。陽性クローンと λ gt11（cDNA配列を持
たないベクター）をプラーク数比が1:5になるように
混合して、指示菌であるY1090上にプラークを形成
20 させた。その後、実施例3と同様の方法でイムノプラ
ークアッセイを行って、陰性、陽性を判定した。

実施例5.

cDNAの塩基配列の決定

ファージDNAは以下の方法で抽出した。各ファージ液
25 の10 μ lをY1090の培養液0.5 mlと混ぜ、室温
で15分間静置してファージの感染を行い、5 mM塩化

カルシウムと $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む 5 ml L 培地を加えて 43°C で 4 時間培養した。培養液を遠心し、上清に等量の溶液 (20% ポリエチレングリコール 6000 、 50 mM トリス塩酸 ($\text{pH } 7.5$)、 2 M 塩化ナトリウム、 4 mM 硫酸マグネシウム、 2% ゼラチン) を加えて氷中で 1 時間放置した後、遠心してファージを沈殿させた。沈殿を 0.75 ml の L 培地に懸濁し、L 培地に懸濁した DE 52 を等量加えた。遠心後、上清に $17.5 \mu\text{l}$ の $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ プロテアーゼ K と $42.5 \mu\text{l}$ の 10% SDS 溶液を加え、ファージ粒子を破壊した。ファージ DNA は、イソプロパノールで沈殿回収後、 $40 \mu\text{l}$ の TE バッファーに溶解した。

以下に示す $\lambda \text{gt}11$ の EcoRI 部位を含む 30 塩基を DNA 合成機 (アプライドバイオシステム社) で合成して、この合成 DNA をプライマーとした PCR 反応を得られた DNA に対して行い、増幅した DNA 産物をアガロースゲル電気泳動法 (4% NUCLEVE GTG アガロース、宝酒造) で確認した。同時に得られた DNA を制限酵素 EcoRI で切断して cDNA 部分を pUC18 の EcoRI 部位にクローニングした。

cDNA 配列を持つ pUC18 DNA をアルカリ SDS 法 (T. マニアティスら、モルキュラー クローニング、コールド スプリング ハーバー ラボ. (1989) など) で少量調製後、DNA シークエンサー (デュポン社) を用いて塩基配列の決定を行った。

実施例 6

得られた抗原の評価

塩基配列を決定した 30 クロンのうち 9 クロンについては、実施例 3 に示した方法で非 A 非 B 型慢性肝炎患者、B 型肝炎患者、原発性胆汁性肝硬変、健常者の血清と反応させその成績を従来法と比較した。その成績を表 1 に示す。従来法及び既知のクローンとしてオーソ H C V A b E L I S A テスト（オーソ ダイアグノスティックシステムズ社）と有馬 N 1 4 クローン（メビオ 1 9 9 0 Vol.7 No.1 P 2 0 - メジカルビュー社）を使用した。

また表 1 中、クローン S 2 9 は、配列番号 1 に相当する抗原、クローン S 4 は、配列番号 2 に相当する抗原に対応する塩基配列を有している。さらにクローン S 1 2 は、配列番号 4、S 4 1 は配列番号 9、S 3 4 は配列番号 7、S 1 3 は配列番号 5、S 3 1 は配列番号 6、S 3 9 は配列番号 8 そして S 1 は配列番号 3 である。

CH : 慢性肝炎者 HBsAg : HBs 抗原

LC : 肝硬変者 + : 陽性

AH : 急性肝炎者 - : 陰性

PBC : 原発性胆汁性肝硬変者

NORMAL : 健常者

No 2 3 - 2 6 までは B 型肝炎者

No.	診断	輸血歴	HBSAg	ARIMA N14	CHIRON c100-3	TORAY CLONE S29 S4 S12 S41 S34 S13 S31 A39 S1
1	CH	+	-	+	+	+ + + + + + - -
2	CH	+	-	+	+	+ - - - + + + +
3	CH	+	-	+	+	+ + + + + - + +
4	CH	+	-	+	-	+ - - - - + - -
5	CH	+	-	+	+	+ + + + + - + +
6	CH	+	-	+	+	- + + - - - - -
7	CH	+	-	-	+	+ + + + - - + +
8	CH	+	-	-	+	+ + + + - - + -
9	LC	+	-	+	+	+ - - - + + + -
10	CH	-	-	-	-	+ - - + + - + +
11	CH	-	-	+	+	+ + + + + + + +
12	CH	-	-	+	+	+ + + + + + + +
13	CH	-	-	-	-	+ - - - + - - -
14	LC	-	-	+	+	+ + + + + - + +
15	CH	-	-	-	+	- + - - - - - -
16	LC	-	-	+	+	+ + + + - - + -
17	LC	-	-	+	+	+ + - + - + + +
18	LC	-	-	+	+	+ - - + + + + -
19	LC	-	-	+	-	+ + - - - + - -
20	AH	-	-	-	-	- - - - - - - -
21	AH	-	-	+	-	+ - - - - + + +
22	PBC	+	-	-	-	- - - - - - - -
23	CH	-	+	-	-	- - - - - - - -
24	CH	-	+	-	-	- - - - - - - -
25	CH	-	+	-	-	- - - - - - - -
26	CH	-	+	-	-	- - - - - - - -
27	NORMAL	-	-	-	-	- - - - - - - -
28	NORMAL	-	-	-	-	- - - - - - - -
29	NORMAL	-	-	-	-	- - - - - - - -
30	NORMAL	-	-	-	-	- - - - - - - -

実施例 7

S 2 9 のエピトープ領域の検討

実施例 6 で成績の良かったクローン S 2 9 に関しては親水性を目安に合成ペプチドを設計し、E L I S A 系を作製した。まず S 2 9 の塩基配列より推定されるアミノ酸配列の親水性の高い領域について 3 0 m e r 前後のペプチドを合成した (図 1)。合成したペプチドを 9 6 穴のマイクロプレートに固相化後、緩衝液 1 0 0 μ l およびサンプル血清 1 0 μ l 加え 3 7 $^{\circ}$ C で 6 0 分反応させた。プレート洗浄後 T 0 6 9 および T 0 6 A の系ではペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト 1 g G ポリクローナル抗体 (ザイメット社製)、T 0 6 4 の系ではペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト 1 g G モノクローナル抗体 (ザイメット社製) と 3 7 $^{\circ}$ C で 1 5 分反応させた。さらにプレートを洗浄後、基質液を加え 3 7 $^{\circ}$ C で 1 5 分反応させ 1 N 硫酸を加えて反応を停止した後 4 5 0 n m の吸光度を測定した。その結果を図 2、図 3、図 4 に示す。3 ペプチドとも C 型肝炎血清と特異的に反応したが、中でも T 0 6 4 の反応性が良かった。

20 実施例 8

S 4 抗原の大腸菌内での発現

実施例 6 で成績のよかったクローン S 4 に関しては、遺伝子組換え法により抗原を調製した。 λ ファージ c 1 8 5 7、P R プロモーターを有し、 β -ガラクトシダーゼをコードするプラスミド p U E X 1 (アマシャム社) の β -ガラクトシダーゼの C 末端側に血液凝固因子 F a

Factor Xaをコードする配列を含むようにS4遺伝子を挿入した。(図5) β -ガラクトシダーゼとS4の間にFactor Xaサイトが存在しているので蛋白発現後Factor Xaで消化することにより保護蛋白を含まないS4蛋白を得る事ができる。

まずはじめに β -ガラクトシダーゼのC末端側に存在するSma IサイトにKpn Iリンカー(5'-GGGTACCC-3' 宝酒造社製)を連結したプラスミドを作製した(pUのEXK-1)。

Factor Xa認識サイトを含むS4断片はS4のcDNA断片をEcoRIサイトに組み込んだDNA断片をあらかじめ調製しKpn I, BamHIサイトを利用してpUEXK-1のKpn I, BamHIサイトに連結した。(pUEXS4)

この作製したpUEXS4を大腸菌HB101に形質転換後、得られた株を5mlのLB培地(トリプトン1%、イーストエキストラクト0.5%、NaCl 0.5%アンピシリン100 μ g/ml)植菌した30℃で一晩前培養した。一晩培養後この培養した菌をアンピシリンを含む10mlのLB培地に200 μ l植え、30℃で2時間振盪培養した。その後培養温度を42℃に上げ2時間振盪培養した。蛋白の発現は1mlの培養液を遠心し集菌後1%SDSと2-メルカプトエタノールを加え溶菌させSDS-PAGEで確認した。S4と β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白は42℃で培養したときに特異的に観察されその蛋白量は全蛋白の15~20%に及

んだ。得られた融合蛋白は不溶性顆粒体を形成していたので、グアニジン溶液や 4 M 尿素で洗浄し、可溶性蛋白を取り除いた。その後 8 M 尿素で可溶化後 F a c t o r X a バッファー (20mMTris-HCl PH8, 100mMNaCl, 2mM CaCl_2) に透析した。また S 4 と β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白の抗原性については電気泳動後、蛋白質をニトロセルロースフィルターに転写し、C 型肝炎患者血清との反応性をしらべ、発現蛋白が健常人血清とは反応せず C 型肝炎患者血清とのみ特異的に反応することを確認した。さらに F a c t o r X a で消化後、得られた S 4 蛋白 (23 K d) についても同様に C 型肝炎患者血清との反応性をしらべ、発現蛋白が健常人血清とは反応せず C 型肝炎患者血清とのみ特異的に反応することを確認した。また精製したペプチドについては N 末端のアミノ酸配列を調べ、遺伝子配列から推定される配列と一致することを確認した。

実施例 9

S 2 9 および S 4 抗原を組み合わせたマイクロプレート E I A の作製

実施例 8 記載の組換え型抗原 S 4 をさらに精製し、実施例 7 記載の合成ペプチド T 0 6 4 と S 4 を抗原とするマイクロプレート E I A を作製した。合成したペプチド T 0 6 4 および精製組換え抗原 S 4 を 9 6 穴のマイクロプレートに固相化後、緩衝液 1 0 0 μ l およびサンプル血清 1 0 μ l 加え 3 7 $^{\circ}\text{C}$ で 6 0 分反応させた。プレート洗浄後、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト I g G モノ

クローナル抗体（ザイメット社製）と37℃で15分反応させた。さらにプレートを洗浄後、基質液を加え37℃で15分反応させ1N硫酸を加えて反応を停止した後450nmの吸光度を測定した。その結果を図6, 7, および8に示す。C型肝炎血清サンプル71例中70例を陽性と判定でき、B型肝炎4例、健常人11例、原発性胆汁性肝硬変1例とは反応しなかった。さらにこのC型肝炎血清サンプル71例中30例についてはS4、S29それぞれの抗原に対する反応性を調べた。その結果S4、S29ともに陽性を示したサンプルは22例、S4のみ陽性を示したサンプルは3例、S29のみに陽性を示したサンプルは4例、両者に反応しなかったサンプルは1例のみであり、S29とS4抗原に対する血清サンプルの反応性の違いが明確となり、2抗原を組み合わせる有用性が確認された。

産業上の利用可能性

本発明によって、非A非B型慢性肝炎患者由来の血清と反応性のある新規な抗原をコードするcDNA配列を入手することができ、本抗原は免疫学的検査薬の開発に適用できることが示された。また今回得られたS29由来の合成ペプチドT064および組換え型抗原を使用したELISAは非A非B型肝炎患者由来の血清を高感度で判定でき、血液スクリーニングなどに有用することが示された。

配列番号 : 1

配列の長さ : 263

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

起源 : 非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

CTCGTAGACCGTGCATC 17

ATG AGC ACA AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC AAA AGA AAC ACA AGC 65
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Ser
1 5 10 15

CGC CGC CCA CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC GTT GGC 113
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

GGA GTT TAC TTG CTG CCG CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGC GCG 161
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
35 40 45

ACA AGG AAG ACT TCC GAG CGA TCC CAG CCG CGT GGG AGA CGC CAG CCC 209
Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

26

ATC CCT AAA GAT CGG CGC TCC ACC GGC AAG TCC TGG GGA AAG CCA GGA 257
Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly
65 70 75 80

TAT CCT 263
Tyr Pro

配列番号： 2

配列の長さ： 651

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA to genomic RNA

起源： 非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

CT 2

ACG GGC GCC CCC ATT ACG TAC TCC ACC TAT GGT AAG TTC CTT GCC GAC 50
Thr Gly Ala Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp
1 5 10 15

GGT GGT TGC TCT GGG GGC GCC TAT GAC ATC ATA ATG TGC GAT GAG TGC 98
Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Met Cys Asp Glu Cys
20 25 30

CAC TCA ACT GAC TCG ACC TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACG GTC CTG GAC 146
His Ser Thr Asp Ser Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp
35 40 45

28

CAA GCG GAG ACG GCT GGA GCG CGA CTT GTC GTG CTC GCC ACC GCT ACC	194
Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr	
50 55 60	
CCT CCG GGA TCG GTC ACT GTA CCA CAT CCC AAT ATC GAG GAG GTG GCC	242
Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala	
65 70 75 80	
CTG TCC AAC ACT GGA GAG ATT CCC TTC TAT GGC AAA GCC ATC CCT ATC	290
Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Ile	
85 90 95	
GAG ACC ATC AAG GGG GGG AGG CAT CTC ATT TTT TGC CAC TCT AAG AAG	338
Glu Thr Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys	
100 105 110	
AAG TGT GAT GAG CTC GCC ACA AAG CTG TCG GCC CTC GGA CTC AAT GCT	386
Lys Cys Asp Glu Leu Ala Thr Lys Leu Ser Ala Leu Gly Leu Asn Ala	
115 120 125	
GTA GCG TAC TAC CGG GGC CTT GAT GTG TCC GTT ATA CCA ACA AGC GGA	434
Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly	
130 135 140	
GAC GTC GTT GTC GTG GCA ACA GAC GCT CTA ATG ACG GGC TAC ACC GGT	482
Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly	
145 150 155 160	

29

GAC TTT GAC TCA GTG ATC GAC TGT AAT ACA TGC GTC ACC CAG ACA GTC 530

Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val

165

170

175

GAT TTC AGC TTG GAC CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACG ACA ACC GTG CCT 578

Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr Val Pro

180

185

190

CAA GAC GCG GTG TCA CGC TCG CAG CGG CGA GGT AGG ACT GGT AGG GGC 626

Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly

195

200

205

AGG GGG GGC ATA TAC AGG TTT GTA G 651

Arg Gly Gly Ile Tyr Arg Phe Val

210

215

30

配列番号: 3

配列の長さ: 5 6 1

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源: 非A非B型肝炎ウイルス

配列

GAA TTC CAT TAC CTA CCG CCT ACT GTT GCA GGC TGT GCT CTC CCC CCC 48

Glu Phe His Tyr Leu Pro Pro Thr Val Ala Gly Cys Ala Leu Pro Pro

1

5

10

15

CCC AAG AAG ACC CCG ACG CCC CCC CCG AGG AGG CGC CGG ACA GTG GCC 96

Pro Lys Lys Thr Pro Thr Pro Pro Pro Arg Arg Arg Arg Thr Val Ala

20

25

30

TTG GAC GGG AGC ACC ATT GGA GAC GTC CTC CAG CAG TTG GCC GTC AAG 144

Leu Asp Gly Ser Thr Ile Gly Asp Val Leu Gln Gln Leu Ala Val Lys

35

40

45

ACC TTC GGC CAG CCC CCC CCG AGC GGC GAC TCG GGC CCC TCC ACG GGC 192

Thr Phe Gly Gln Pro Pro Pro Ser Gly Asp Ser Gly Pro Ser Thr Gly

50

55

60

GCG GAC GTC GTC GGC TCT GGT GGT CCG ACG CCC CCT GAT GAA TTG GCT 240

Ala Asp Val Val Gly Ser Gly Gly Arg Thr Pro Pro Asp Glu Leu Ala

65

70

75

80

CTC TCG GAG ACA GGT TCT GTC TCT TCC ATG CCC CCC CTC GAG GGG GAG 288
Leu Ser Glu Thr Gly Ser Val Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu

85

90

95

CCT GGG GAT CCG GAC CTA GAG CCT GAG CGG GTA GAG CTT CAG CCC CCC 336
Pro Gly Asp Pro Asp Leu Glu Pro Glu Arg Val Glu Leu Gln Pro Pro

100

105

110

CCC CAG GGG GGG GAG GAA GCT CCC GGC TCG GAC TCG GGG TCC TGG TCT 384
Pro Gln Gly Gly Glu Glu Ala Pro Gly Ser Asp Ser Gly Ser Trp Ser

115

120

125

ACT TGC TCC GAG GAG AGT GAC TCC GTC GTG TGC TGC TCC ATG TCT TAC 432
Thr Cys Ser Glu Glu Ser Asp Ser Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr

130

135

140

TCC TGG ACC GGG GCT CTA ATA ACT CCT TGT AGC CCT GAG GAG GAG AAG 480
Ser Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ser Pro Glu Glu Glu Lys

145

150

155

160

TTG CCA ATT AAC CCC TTG AGT AAC TCG CTG TTG CGA TAC CAC AAC AAG 528
Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg Tyr His Asn Lys

165

170

175

GTG TAT TGC ACT ACA ACA AGA AGC GCG GAA TTC 561
Val Tyr Cys Thr Thr Thr Arg Ser Ala Glu Phe

180

185

配列番号: 4

配列の長さ: 403

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源: 非A非B型肝炎ウイルス

配列

GAA TTC CTC GTC ACT AGT ACC TGG GTG CTA GTA GGC GGA GTC CTT GCA. 48

Glu Phe Leu Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala

1

5

10

15

GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTA ACA ACA GGC AGC GTG GTC ATT GTA GGT 96

Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val Ile Val Gly

20

25

30

AGG ATC ATC TTG TCC GGG AGG CCG GCT GTC ATT CCC GAT AGG GAG GTT 144

Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Val Ile Pro Asp Arg Glu Val

35

40

45

CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAA ATG GAA GAG TGC GCC TCA CAC CTC CCT 192

Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser His Leu Pro

50

55

60

TAC ATC GAA CAA GGG ATG CAG CTC GCC GAG CAA TTC AAA CAG AAG GCG 240

Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala

65

70

75

80

CTC GGG TTG CTG CAA ACA GCC GCC AAG CAA GCG GAG GTT GCT GCT CCC 288

Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ala Lys Gln Ala Glu Val Ala Ala Pro

85

90

95

GTG GTG GAA TCC AAG TGG CGA GCC CTC GAA GCC TTC TGG GCG AAG CAC 336

Val Val Glu Ser Lys Trp Arg Ala Leu Glu Ala Phe Trp Ala Lys His

100

105

110

ATG TGG AAT TTC ATC AGC GGG ATA CAG TAC TTA GCA GGC TTG TCC ACT 384

Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr

115

120

125

CTG CCT GGA AAC GGA ATT C

403

Leu Pro Gly Asn Gly Ile

130

配列番号: 5

配列の長さ: 132

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源: 非A非B肝炎ウイルス

配列

GAA TTC CGT GGG CCC GAG GAG GAG AAG TTG CCG ATC AAC CCT CTG AGT 48

Glu Phe Arg Gly Pro Glu Glu Glu Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser

1

5

10

15

AAC TCG CTC ATG CGG TTT CAT AAC AAG GTG TAC TCC ACA ACT TCG AGG 96

Asn Ser Leu Met Arg Phe His Asn Lys Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg

20

25

30

AGT GCC ACT CTG AGG GCA AAG AAG GTG ACG GAA TTC 132

Ser Ala Thr Leu Arg Ala Lys Lys Val Thr Glu Phe

35

40

配列番号: 6

配列の長さ: 964

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源: 非A非B型肝炎ウイルス

配列

GAA TTC CGA AAA ACC AAA CGT AAC ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC GTC 48

Glu Phe Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val

1

5

10

15

AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC GTT GGT GGA GTT TAC CTG TTG CCG 96

Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro

20

25

30

CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGC GCG ACT AGG AAG ACT TCC GAG 144

Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu

35

40

45

CGG TCG CAA CCT CGT GGA AGG CGA CAA CAT ATC CCC AAG GCT CGC CGG 192

Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln His Ile Pro Lys Ala Arg Arg

50

55

60

CCC GAG GGC AGG GCC TGG GCT CAG CCC GGG TAC CCT TGG CCC CTC TAT 240

Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr

65

70

75

80

GGC AAT GAG GGC TTG GGG TGG GCA GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGC GGC 288
Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly

85

90

95

TCC CGG CCT AGT TGG GGC CCT ACA GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT 336
Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn

100

105

110

TTG GGT AAG GTC ATC GAC ACC CTC ACA TGC GGC TTC GCC GAC CTC ATG 384
Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met

115

120

125

GGG TAC ATC CCG CTC GTC GGC GCC CCC CTG GGG GGC GCT GCC AGG GCC 432
Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala

130

135

140

CTG GCA CAT GGT GTC CGG GTT CTG GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA 480
Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr

145

150

155

160

GGG AAT CTG CCC GGT TGC TCT TTC TCT ATC TTC CTC CTG GCT CTG CTG 528
Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu

165

170

175

TCC TGT TTG ACC ATC CCA GCT TCC GCT TAT GAA GTG CGC AAC GTG TCC 576
Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser

180

185

190

GGG GCG TAC CAC GTC ACG AAC GAC TGC TCC AAC TCA AGC ATT GTG TAT 624

Gly Ala Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr

195

200

205

GAG GCA GCG GAC GTG ATC ATG CAC ACC CCC GGG TGC GTG CCC TGC GTT 672

Glu Ala Ala Asp Val Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val

210

215

220

CGG GAG AGC AAC TCC TCC CGT TGC TGG GTA GCG CTC ACC CCC ACG CTC 720

Arg Glu Ser Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu

225

230

235

240

GCG GCT AGA AAT ACC AGC ATC CCC ACT ACG ACA ATA CGA CGC CAT GTC 768

Ala Ala Arg Asn Thr Ser Ile Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val

245

250

255

GAC TTG CTC GTT GGG GCG GCT GCT TTC TGC TCC GCT ATG TAT GTA GGG 816

Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly

260

265

270

GAT CTC TGC GGA TCT GTT TTC CTT GTC TCT CAG CTG TTC ACC TTC TCG 864

Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser

275

280

285

CCT CGC CGG TAC CAG ACA GTA CAG GAC TGC AAT TGT TCA ATC TAT CCC 912

Pro Arg Arg Tyr Gln Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro

290

295

300

38

GGC CAC CTA TCA GGT CAC CGC ATG GCT TGG GAT ATG ATG ATG AAC GGA 960

Gly His Leu Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Gly

305

310

315

320

ATT C

964

Ile

配列番号: 7

配列の長さ: 1009

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源: 非A非B肝炎ウイルス

配列

GAA TTC TTC TCT TGG GTG GAC GGG GTG CAA ATA CAC CGA TTC GTC CCC 48
Glu Phe Phe Ser Trp Val Asp Gly Val Gln Ile His Arg Phe Val Pro
1 5 10 15

ACT CCG GGC CCC TTC TTT CGG GAT GAG GTA ACG TTC ACC GTA GGC CTC 96
Thr Pro Gly Pro Phe Phe Arg Asp Glu Val Thr Phe Thr Val Gly Leu
20 25 30

AAT TTC TTT GTG GTC GGC TCC CAG CTC CCT TGT GAC CCT GAG CCG GAC 144
Asn Phe Phe Val Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Asp Pro Glu Pro Asp
35 40 45

ACC GAG GCG CTA GCC TCC ATG CTG ACA GAC CCG TCC CAC ATT ACT GCG 192
Thr Glu Ala Leu Ala Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala
50 55 60

GAG ACG GCA GCC AGA CGA TTG GCC AGG GGA TCT CCC CCT TCA CAG GCC 240
Glu Thr Ala Ala Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Gln Ala
65 70 75 80

AGC TCT TCA GCG AGC CAG CTC TCC GCC CCG TCC TTG AAG GCT ACC TGC 288
Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys

85

90

95

ACC ACC CAT AAG ATG GCA TAT GAC TGT GAC ATG GTG GAT GCT AAC CTT 336
Thr Thr His Lys Met Ala Tyr Asp Cys Asp Met Val Asp Ala Asn Leu

100

105

110

TTC ATG GGA GGT GAT GTG ACC CGG ATT GAG TCC GAC TCC AAG GTA ATC 384
Phe Met Gly Gly Asp Val Thr Arg Ile Glu Ser Asp Ser Lys Val Ile

115

120

125

GTT CTC GAC TCC CTC GAC TCC ATG ACT GAG GTA GAG GAT GAA CGT GAG 432
Val Leu Asp Ser Leu Asp Ser Met Thr Glu Val Glu Asp Glu Arg Glu

130

135

140

CCT TCT GTA CCA TCA GAG TAC TTG ATC AGG AGG AGG AAG TTC CCA CCG 480
Pro Ser Val Pro Ser Glu Tyr Leu Ile Arg Arg Arg Lys Phe Pro Pro

145

150

155

160

GCA CTA CCT CCC TGG GCC CGT CCG GAC TAT AAC CCT CCT ACG ATC GAG 528
Ala Leu Pro Pro Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Thr Ile Glu

165

170

175

ATA TGG AAG AGG CCG GGC TAT GAA CCA CCT ACT GTC CTA GGC TGT GCC 576
Ile Trp Lys Arg Pro Gly Tyr Glu Pro Pro Thr Val Leu Gly Cys Ala

180

185

190

CTC CCC CCC ACG CCT CAA GCG CCA GTG CCC CCA CCC AGG AAG CGC CGC 624

Leu Pro Pro Thr Pro Gln Ala Pro Val Pro Pro Pro Arg Lys Arg Arg

200

205

210

GCC AAA GTC CTG ACT CAG GAC AAC GTG GAG GGG GTC CTT AGG GAG ATG 672

Ala Lys Val Leu Thr Gln Asp Asn Val Glu Gly Val Leu Arg Glu Met

215

220

225

GCG GAC AAG GTG CTC AGT CCT TCC CAA GAC CAC AAT GAC TCC GGT CAC 720

Ala Asp Lys Val Leu Ser Pro Ser Gln Asp His Asn Asp Ser Gly His

230

235

240

245

TCC ACC GGA GCG GAC ACC GGA GGA GAC AGC TTC CAG CAG CTC TTC GAC 768

Ser Thr Gly Ala Asp Thr Gly Gly Asp Ser Phe Gln Gln Leu Phe Asp

250

255

260

GAG ACT GCC GCT TCA GAA GCG GGA TCA CTG TCC TCC ATG CCT CCC CTT 816

Glu Thr Ala Ala Ser Glu Ala Gly Ser Leu Ser Ser Met Pro Pro Leu

265

270

275

GAG GGG GAG CCG GGG GAC CCT GAC CTG GAG TTT GAA CCA GCG GGA TCC 864

Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Glu Phe Glu Pro Ala Gly Ser

280

285

290

GGT CCC CCT TCT GAG GGG GAG TGC GAG GTC GTT GAT TCG GAC TCT AAG 912

Gly Pro Pro Ser Glu Gly Glu Cys Glu Val Val Asp Ser Asp Ser Lys

295

300

305

42

TCG TGG TCC ACA GTC TCG GAT CAG GAG GAT TCT GTT ATC TGC TGC TCC 960

Ser Trp Ser Thr Val Ser Asp Gln Glu Asp Ser Val Ile Cys Cys Ser

310

315

320

325

ATG TCA TAC TCC TGG ACA GGG GCC CTC ATA ACA CCA TGT GGG GGA ATT 1008

Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Gly Gly Ile

330

335

340

C

1009

配列番号: 8

配列の長さ: 608

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源: 非A非B肝炎ウイルス

配列

GAA TTC CCG CGG GGG TCA CCC CCG TCT GAG GCA AGT TCC TCA GCG AGC 48

Glu Phe Pro Arg Gly Ser Pro Pro Ser Glu Ala Ser Ser Ser Ala Ser

1

5

10

15

CAA CTA TCG GCA CCA TCG CTG CGA GCC ACC TGT ACC ACC CAC GGC AAG 96

Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Arg Ala Thr Cys Thr Thr His Gly Lys

20

25

30

ACC TAC GAT GTG GAC ATG GTG GAT GCT AAC CTG TTT ATG GGA GGC GAT 144

Thr Tyr Asp Val Asp Met Val Asp Ala Asn Leu Phe Met Gly Gly Asp

35

40

45

GTG ACT CGG ATA GAA TCT GAA TCC AAA GTG GTC GTT CTG GAC TCC CTC 192

Val Thr Arg Ile Glu Ser Glu Ser Lys Val Val Val Leu Asp Ser Leu

50

55

60

GAC CCA ATG GCC GAA GAA ATG AGC GAC CTC GAG CCT TCT ATA CCA TCG 240

Asp Pro Met Ala Glu Glu Met Ser Asp Leu Glu Pro Ser Ile Pro Ser

65

70

75

80

GAG TAT ATG CTC CCC AAA ACC AGG TTC CCA CCA GCC TTA CCG GCC TGG 288
Glu Tyr Met Leu Pro Lys Thr Arg Phe Pro Pro Ala Leu Pro Ala Trp

85

90

95

GCA CGG CCT GAC TAC AAC CCA CCG TTT GTG GAA CCA TGG AGG AGA CCA 336
Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Phe Val Glu Pro Trp Arg Arg Pro

100

105

110

GAC TAC CAA CCG CCC ACT GTT GCG GGC TGT GCT CTC CCC CCC CCC AAG 384
Asp Tyr Gln Pro Pro Thr Val Ala Gly Cys Ala Leu Pro Pro Pro Lys

115

120

125

AAG ACC CCG ACG CCC CCC CCA AGG AGA CGC CGG ACA GTG GGT CTG AGT 432
Lys Thr Pro Thr Pro Pro Pro Arg Arg Arg Arg Thr Val Gly Leu Ser

130

135

140

GAG AGC ACC ATA GGA GAT GTC CTC CAA CAG ATG GCC ATT AAG ACC TTT 480
Glu Ser Thr Ile Gly Asp Val Leu Gln Gln Met Ala Ile Lys Thr Phe

145

150

155

160

GGC CAG CCC CCC CCA AGC GGA GAT TCA GGC CTC TCT ACG GGG GCG GAC 528
Gly Gln Pro Pro Pro Ser Gly Asp Ser Gly Leu Ser Thr Gly Ala Asp

165

170

175

GCC GCC GAC TCT GGT AGT CGG ACG CCC CCC GAG GAG TTA GCT CTC TCG 576
Ala Ala Asp Ser Gly Ser Arg Thr Pro Pro Glu Glu Leu Ala Leu Ser

180

185

190

45

GAG ACA GGT TCT ACC TCC TCC ATG CGG AAT TC

608

Glu Thr Gly Ser Thr Ser Ser Met Arg Asn

195

200

配列番号: 7 9

配列の長さ: 8 9 7

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源: 非A非B肝炎ウイルス

配列

GAA TTC CGG CGG GGG GAC GGC ATC ATG CAA ACC ACC TGC CCA TGT GGA 48

Glu Phe Arg Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Pro Cys Gly

1

5

10

15

GCA CAG ATC ACC GGA CAT GTC AAA AAC GGT TCC ATG AGG ATT GTT GGG 96

Ala Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly

20

25

30

CCT AAA ACC TGT AGC AAC ACG TGG CAT GGA ACA TTC CCC ATC AAT GCA 144

Pro Lys Thr Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala

35

40

45

TAC ACC ACG GGC CCC TGC ACA CCC TCC CCA GCA CCA AAC TAT TCT AGG 192

Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg

50

55

60

GCG CTG TGG CGG GTG GCT GCT GAG GAG TAC GTG GAG GTT ACG CGG GTG 240

Ala Leu Trp Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val

65

70

75

80

GGG GAC TTC CAC TAC GTG ACG GGC ATG ACC ACT GAC AAC ATA AAG TGC 288

Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Ile Lys Cys

85

90

95

CCA TGC CAG GTT CCG GCC CCC GAG TTC TTC ACG GAG GTG GAT GGA GTG 336

Pro Cys Gln Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val

100

105

110

AGG TTG CAC AGG TAC GCT CCG GCA TGC AAA CCT CTC CTA CGG GAT GAG 384

Arg Leu His Arg Tyr Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Asp Glu

115

120

125

GTC ACA TTC CAG GTC GGG CTC AAC CAG TAC CTG GTA GGG TCA CAG CTC 432

Val Thr Phe Gln Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu

130

135

140

CCA TGT GAG CCC GAA CCG GAC GTA GCT GTG CTT ACT TCC ATG CTC ACC 480

Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr

145

150

155

160

GAT CCC TCC CAC ATT ACA GCA GAG ACG GCC AAG CGT AGG CTG GCC AGG 528

Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg

165

170

175

GGG TCT CCC CCC TCC TTG GCC AGC TCT TCA GCT AGC CAG TTG TCT GCG 576

Gly Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala

180

185

190

48

CCT TCC TTG AAG GCG ACA TGT ACT ACC CAT CAT GAC TCC CCG GAA GCT 624

Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Thr His His Asp Ser Pro Glu Ala

195

200

205

GAC CTC ATC GAG GCC AAC CTC CTG TGG CGG CAG GAG ATG GGC GGG AAC 672

Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn

210

215

220

ATC ACC CGC GTG GAG TCA GAA AAT AAG GTA GTA ATT CTG GAC TCT TTC 720

Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe

225

230

235

240

GAT CCG CTC CGG GCG GAG GAG GAT GAG AGG GAA ATG TCC ATT CCG GCG 768

Asp Pro Leu Arg Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Met Ser Ile Pro Ala

245

250

255

GAG ATC CTG CGG AAA CCC AGG AGG TTC CCC CCA GCA TTG CCC ATA TGG 816

Glu Ile Leu Arg Lys Pro Arg Arg Phe Pro Pro Ala Leu Pro Ile Trp

260

265

270

GCA CGT GCG GAT TAC AAC CCT CCA CTG ATA GAA CCC TGG AAG GAC CCG 864

Ala Arg Ala Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Ile Glu Pro Trp Lys Asp Pro

275

280

285

GAC TAC GTC CCT CCG GTG GTG CAC GGG GAA TTC

897

Asp Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly Glu Phe

290

295

配列番号 : 10

配列の長さ : 218

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

起源 : 非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

GAA TTC TTC TCT TGG GTG GAC GGG GTG CAA ATA CAC CGA TTC GCC CCC	48
Glu Phe Phe Ser Trp Val Asp Gly Val Gln Ile His Arg Phe Ala Pro	
1 5 10 15	
ACT CCA GGT CCC TTC TTT CGG GAT GAG GTA ACG TTC ACC GTG GGC CTC	96
Thr Pro Gly Pro Phe Phe Arg Asp Glu Val Thr Phe Thr Val Gly Leu	
20 25 30	
AAT TCC TTT GTG GTC GGC TCT CAG CTC CCC TGC GAC CCT GAG CCG GAC	144
Asn Ser Phe Val Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Asp Pro Glu Pro Asp	
35 40 45	
ACC GAG GTA TTA GCC TCC ATG TTG ACA GAC CCG TCC CAC ATC ACC GCG	192
Thr Glu Val Leu Ala Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala	
50 55 60	
GAG GCG GCA GCC AGG CGG TTG GCC AG	218
Glu Ala Ala Ala Arg Arg Leu Ala	
65 70	

配列番号 : 11

配列の長さ : 66

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

起源 : 非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

GC 2

CGC CCA CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC GTT GGT GGA 50

Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly

1 5 10 15

GTT TAC CTG TTG CCG C 66

Val Tyr Leu Leu Pro

20

配列番号 : 12

配列の長さ : 181

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

起源 : 非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

CGTGCACC 8

ATG AGC ACA AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC AAA AGA AAT ACT AAC 56

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn

1 5 10 15

CGT CGC CCA CAA GAC GTC AAG TTT CCG GGC GGC GGC CAG ATC GTT GGC 104

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly

20 25 30

GGA GTA TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGG TTG GGT GTG CGC ACG 152

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Thr

35 40 45

ACA AGG AAG ACT TCG GAG CGA TCC CAG CC 181

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln

50 55

配列番号： 13

配列の長さ： 561

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： Genomic RNA

起源： 非A非B肝炎ウイルス

配列

```
GAAUUGCAUU ACCUACCGCC UACUGUUGCA GGCUGUGCUC UCCCCCCCCC CAAGAAGACC 60
CCGACGCCCC CCCCAGGAG GCGCCGGACA GUGGCCUEGG ACGGGAGCAC CAUUGGAGAC 120
GUCCUCCAGC AGUUGGCCGU CAAGACCUUC GGCCAGCCCC CCCCAGCGG CGACUCGGGC 180
CCCUCCACGG GGGCGGACGU CGUCGGUCU GUGGUCGGA CGCCCCUGA UGAAUUGGCU 240
CUCUCGGAGA CAGGUUCUGU CUCUCCAUG CCCCCCUUG AGGGGGAGCC UGGGGAUCCG 300
GACCUAGAGC CUGAGCGGGU AGAGCUUCAG CCCCCCCCC AGGGGGGGGA GGAAGCUCCC 360
GGCUCGGACU CGGGGUCCUG GUCUACUUGC UCCGAGGAGA GUGACUCCGU CGUGUGCUGC 420
UCCAUGUCUU ACUCCUGGAC CGGGGCUCUA AUAACUCCUU GUAGCCCUGA GGAGGAGAAG 480
UUGCCAAUUA ACCCCUUGAG UAACUCGUG UUGCGAUACC ACAACAAGGU GUAUUGCACU 540
ACAACAAGAA GCGCGGAUU C
```

561

53

配列番号： 14

配列の長さ： 403

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic RNA

起源：非A非B肝炎ウイルス

配列

```
GAAUCCUCG UCACUAGUAC CUGGGUGCUA GUAGGCGGAG UCCUUGCAGC UUUGGCCGCG 60
UAUUGCCUAA CAACAGGCAG CGUGGUCAUU GUAGGUAGGA UCAUCUUGUC CGGGAGGCCG 120
GCUGUCAUUC CCGAUAGGGA GGUUCUCUAC CGAGAGUUCG AUGAAAUGGA AGAGUGCGCC 180
UCACACCUC CUAUCAUCGA ACAAGGGAUG CAGCUCGCCG AGCAAUUC AAACAGAGGC 240
CUCGGGUUGC UGCAAACAGC CGCCAAGCAA GCGGAGGUUG CUGCUCCCGU GGUGGAAUCC 300
AAGUGGCGAG CCCUCGAAGC CUUCUGGGCG AAGCACAUGU GGAAUUUCAU CAGCGGGUAU 360
CAGUACUUAG CAGGCUUGUC CACUCUGCCU GGAAACGGAA UUC 403
```

配列番号 : 15

配列の長さ : 132

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic RNA

起源 : 非A非B肝炎ウイルス

配列

```
GAAUCCGUG GGCCCGAGGA GGAGAAGUUG CCGAUCAACC CUCUGAGUAA CUCGCUCAUG 60
CGGUUUCAUA ACAAGGUGUA CUCCACAACU UCGAGGAGUG CCACUCUGAG GGCAAAGAAG 120
GUGACGGAAU UC 132
```

配列番号： 16

配列の長さ：964

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic RNA

起源：非A非B型肝炎ウイルス

配列

```
GAAUUCGAA AAACCAAACG UAACACCAAC CGCCGCCAC AGGACGUCAA GUUCCCGGGC 60
GGUGGUCAGA UCGUUGGUGG AGUUUACCUG UUGCCGCGCA GGGGCCCCAG GUUGGGUGUG 120
CGCGCGACUA GGAAGACUUC CGAGCGGUCG CAACCUCGUG GAAGGCGACA ACAUAUCCCC 180
AAGGCUCGCC GGGCCGAGGG CAGGGCCUGG GCUCAGCCCG GGUACCCUUG GCCCCUUAU 240
GGCAAUGAGG GCUUGGGGUG GGCAGGAUGG CUCCUGUCAC CCCGCGGCUC CCGGCCUAGU 300
UGGGGCCCCA CAGACCCCCG GCGUAGGUCG CGUAAUUUGG GUAAGGUCAU CGACACCUC 360
ACAUGCGGCU UCGCCGACCU CAUGGGGUAC AUCCCGCUCG UCGGCGCCCC CCUGGGGGGC 420
GCUGCCAGGG CCCUGGCACA UGGUGUCCGG GUUCUGGAGG ACGGCGUGAA CUAUGCAACA 480
GGGAUUCUGC CCGGUUGCUC UUUCUCUUAU UUCUCCUGG CUCUGCUGUC CUGUUUGACC 540
AUCCAGCUU CCGCUUAUGA AGUGCGCAAC GUGUCCGGG CGUACCACGU CACGAACGAC 600
UGCUGCAACU CAAGCAUUGU GUAUGAGGCA GCGGACGUGA UCAUGCACAC CCCCgggUGC 660
GUGCCUGCG UUCGGGAGAG CAACUCCUCC CGUUGCUGGG UAGCGCUCAC CCCCACGCU 720
GCGGCUAGAA AUACCAGCAU CCCACUACG ACAAUACGAC GCCAUGUCGA CUUGCUCGUU 780
GGGGCGGCUG CUUUCUGCUC CGCUAUGUUA GUAGGGGAUC UCUGCGGAUC UGUUUUCCUU 840
GUCUCUCAGC UGUUCACCUU CUCGCCUCGC CGGUACCAGA CAGUACAGGA CUGCAAUUGU 900
UCAAUUAUC CCGGCCACCU AUCAGGUCAC CGCAUGGCUU GGGAUUAUGAU GAUGAACGGA 960
AUUC
```

964

配列番号： 17

配列の長さ：1009

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic RNA

起源：非A非B型肝炎ウイルス

配列

```
GAAUUCUUCU CUUGGGUGGA CGGGGUGCAA AUACACCGAU UCGUCCCCAC UCCGGGCCCC 60
UUCUUUCGGG AUGAGGUAAC GUUCACCGUA GGCCUCAAUU UCUUGUGGU CGGCUCCCAG 120
CUCCCUUGUG ACCCUGAGCC GGACACCGAG GCGCUAGCCU CCAUGCUGAC AGACCCGUCC 180
CACAUUACUG CGGAGACGGC AGCCAGACGA UUGGCCAGGG GAUCUCCCCC UUCACAGGCC 240
AGCUCUUCAG CGAGCCAGCU CUCCGCCCCG UCCUUGAAGG CUACCUGCAC CACCCAUAG 300
AUGGCAUAUG ACUGUGACAU GGUGGAUGCU AACCUUUUA UGGGAGGUGA UGUGACCCGG 360
AUUGAGUCCG ACUCCAAGGU AAUCGUUCUC GACUCCUCG ACUCCAUGAC UGAGGUAGAG 420
GAUGAACGUG AGCCUUCUGU ACCAUCAGAG UACUUGAUA GGAGGAGGAA GUUCCCACCG 480
GCACUACCUC CCUGGGCCCCG UCCGGACUAU AACCUCUUA CGAUCGAGAU AUGGAAGAGG 540
CCGGGCUAUG AACCACCUAC UGUCCUAGGC UGUGCCUCC CCCCACGCC UCAAGCGCCA 600
GUGCCCCCAC CCAGGAAGCG CCGCGCCAAA GUCCUGACUC AGGACAACGU GGAGGGGGUC 660
CUUAGGGAGA UGGCGGACAA GGUGCUCAGU CCUUCCAAG ACCACAAUGA CUCCGGUCAC 720
UCCACCGGAG CGGACACCGG AGGAGACAGC UCCAGCAGC UCUUCGACGA GACUGCCGCU 780
UCAGAAGCGG GAUCACUGUC CUCCAUGCCU CCCCUGAGG GGGAGCCGGG GGACCCUGAC 840
CUGGAGUUG AACCAGCGGG AUCCGGUCCC CCUUCUGAGG GGGAGUGCGA GGUCGUUGAU 900
UCGACUUA AGUCGUGGUC CACAGUCUG GAUCAGGAGG AUUCUGUUAU CUGCUGUCC 960
AUGUACUACU CCUGGACAGG GGCCCUCAUA ACACCAUGUG GGGGAUUC 1009
```

配列番号 : 18

配列の長さ : 608

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic RNA

起源 : 非A非B肝炎ウイルス

配列

```
GAAUCCCCGC GGGGGUCACC CCCGUCUGAG GCAAGUCCU CAGCGAGCCA ACUAUCGGCA 60
CCAUCGCUGC GAGCCACCUG UACCACCCAC GGCAAGACCU ACGAUGUGGA CAUGGUGGAU 120
GCUAACCUGU UUAUGGGAGG CGAUGUGACU CGGAUAGAAU CUGAAUCCAA AGUGGUCGUU 180
CUGGACUCCC UCGACCCAAU GGCCGAAGAA AUGAGCGACC UCGAGCCUUC UAUACCAUCG 240
GAGUAUAUGC UCCCCAAAC CAGGUUCCCA CCAGCCUAC CGGCCUGGGC ACGGCCUGAC 300
UACAACCCAC CGUUGUGGA ACCAUGGAGG AGACCAGACU ACCAACCGCC CACUGUUGCG 360
GGCUGUGCUC UCCCCCCCC CAAGAAGACC CCGACGCCCC CCCCAGGAG ACGCCGGACA 420
GUGGGUCUGA GUGAGAGCAC CAUAGGAGAU GUCCUCCAAC AGAUGGCCAU UAAGACCUUU 480
GGCCAGCCCC CCCCAGCGG AGAUUCAGGC CUCUCUACGG GGGCGGACGC CGCCGACUCU 540
GGUAGUCGGA CGCCCCCGA GGAGUUAGCU CUCUCGGAGA CAGGUUCUAC CUCCUCCAUG 600
CGGAAUUC
```

608

58

配列番号 : 19

配列の長さ : 897

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic RNA

起源 : 非A非B肝炎ウイルス

配列

```
GAAUUCGGC GGGGGGACGG CAUCAUGCAA ACCACCUGCC CAUGUGGAGC ACAGAUCACC 60
GGACAUGUCA AAAACGGUUC CAUGAGGAUU GUUGGGCCUA AAACCUGUAG CAACACGUGG 120
CAUGGAACAU UCCCCAUCAA UGCAUACACC ACGGGCCCCU GCACACCUC CCCAGCACCA 180
AACUAUUCUA GGGCGCUGUG GCGGGUGGCU GCUGAGGAGU ACGUGGAGGU UACGCGGGUG 240
GGGGACUCC ACUACGUGAC GGGCAUGACC ACUGACAACA UAAAGUGCCC AUGCCAGGUU 300
CCGGCCCCCG AGUUCUUCAC GGAGGUGGAU GGAGUGAGGU UGCACAGGUA CGCUCCGGCA 360
UGCAAACCUC UCCUACGGGA UGAGGUCACA UCCAGGUCG GGCUCAACCA GUACCUGGUA 420
GGGUCACAGC UCCCAUGUGA GCCGAACCG GACGUAGCUG UGCUUACUUC CAUGCUCACC 480
GAUCCCUCCC ACAUACAGC AGAGACGGCC AAGCGUAGGC UGGCCAGGGG GUUCCCCCCC 540
UCCUUGGCCA GCUCUUCAGC UAGCCAGUUG UCUGCGCCUU CCUUGAAGGC GACAUGUACU 600
ACCAUCAUG ACUCCCCGGA AGCUGACCUC AUCGAGGCCA ACCUCCUGUG GCGGCAGGAG 660
AUGGGCGGGA ACAUCACCCG CGUGGAGUCA GAAAAUAAGG UAGUAAUUCU GGACUCUUUC 720
GAUCCGCUCC GGGCGGAGGA GGAUGAGAGG GAAAUGUCCA UCCGGCGGGA GAUCCUGCGG 780
AAACCCAGGA GGUCCCCCCC AGCAUUGCCC AUAUGGGCAC GUGCGGAUUA CAACCCUCCA 840
CUGAUAGAAC CCUGGAAGGA CCCGGACUAC GUCCCUCCGG UGGUGCACGG GGAUUC 897
```

配列番号 : 20

配列の長さ : 218

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic RNA

起源 : 非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

GAAUUCUUCU CUUGGGUGGA CGGGGUGCAA AUACACCGAU UCGCCCCAC UCCAGGUCCC	60
UUCUUUCGGG AUGAGGUAAC GUUCACCGUG GGCCUCAAUU CCUUUGUGGU CGGCUCUCAG	120
CUCCCCUGCG ACCCUGAGCC GGACACCGAG GUUUUAGCCU CCAUGUUGAC AGACCCGUCC	180
CACAUCACCG CGGAGGCGGC AGCCAGGCGG UUGGCCAG	218

配列番号 : 21

配列の長さ : 66

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic RNA

起源 : 非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

GCGGCCCCACA GGACGUCAAG UCCCCGGGCG GUGGUCAGAU CGUUGGUGGA GUUUACCUGU 60

UGCCGC 66

配列番号： 22

配列の長さ：181

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic RNA

起源：非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

```
CGUGCACCAU GAGCACAAAU CCUAAACCUC AAAGAAAAAC CAAAAGAAAU ACUAACCGUC   60
GCCACAAGA CGUCAAGUUU CCGGGCGGCG GCCAGAUCGU UGGCGGAGUA UACUUGUUGC  120
CGCGCAGGGG CCCUAGGUUG GGUGUGCGCA CGACAAGGAA GACUUCGGAG CGAUCCCAGC  180
C                                          181
```

配列番号： 23

配列の長さ：263

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic RNA

起源：非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

```
CUCGUAGACC GUGCAUCAUG AGCACAAAUC CUA AACCUCA AAGAAAAACC AAAAGAAACA    60
CAAGCCGCCG CCCACAGGAC GUCAAGUUC C GGGUGGCGG UCAGAUCGUU GCGGGAGUUU    120
ACUUGCUGCC GCGCAGGGGC CCCAGGUUGG GUGUGCGCGC GACAAGGAAG ACUUCGAGC    180
GAUCCCAGCC GCGUGGGAGA CGCCAGCCCA UCCCUAAAGA UCGGCGCUCC ACCGGCAAGU    240
CCUGGGGAAA GCCAGGAU AU CCU                                         263
```

配列番号 : 24

配列の長さ : 651

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic RNA

起源 : 非A 非B 型肝炎ウイルス

配列

CUACGGGGCG CCCCAUUACG UACUCCACCU AUGGUAAGUU CCUUGCCGAC GGUGGUUGCU	60
CUGGGGGGCG CUAUGACAUC AUAAGUGGCG AUGAGUGCCA CUCAACUGAC UCGACCUCCA	120
UCUUGGGCAU UGGCACGGUC CUGGACCAAG CGGAGACGGC UGGAGCGCGA CUUGUCGUGC	180
UCGCCACCGC UACCCCUCCG GGAUCGGUCA CUGUACCACA UCCCAUAUC GAGGAGGUGG	240
CCCUGUCCAA CACUGGAGAG AUUCCCUUCU AUGGCAAAGC CAUCCCUAUC GAGACCAUCA	300
AGGGGGGGAG GCAUCUCAU UUUGCCACU CUAAGAAGAA GUGUGAUGAG CUCGCCACAA	360
AGCUGUCGGC CCUCGGACUC AAUGCUGUAG CGUACUACCG GGGCCUUGAU GUGUCCGUUA	420
UACCAACAAG CGGAGACGUC GUUGUCGUGG CAACAGACGC UCUAAUGACG GGCUACACCG	480
GUGACUUUGA CUCAGUGAUC GACUGUAAUA CAUGCGUCAC CCAGACAGUC GAUUUCAGCU	540
UGGACCCUAC CUUCACCAU GAGACGACAA CCGUGCCUCA AGACGCGGUG UCACGCUCGC	600
AGCGGCGAGG UAGGACUGGU AGGGGCAGGG GGGGCAUUA CAGGUUUGUA G	651

請 求 の 範 囲

- 5 (1) 配列表の配列番号 1 から 12 に示したアミノ酸配列
のいずれかからなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質
またはその同効抗原蛋白質。
- (2) 配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列からなる
非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載
の抗原蛋白質。
- 10 (3) 配列表の配列番号 2 に示したアミノ酸配列からなる
非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載
の抗原蛋白質。
- (4) 配列表の配列番号 3 に示したアミノ酸配列からなる
非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載
の抗原蛋白質。
- 15 (5) 配列表の配列番号 4 に示したアミノ酸配列からなる
非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載
の抗原蛋白質。
- (6) 配列表の配列番号 5 に示したアミノ酸配列からなる
非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載
の抗原蛋白質。
- 20 (7) 配列表の配列番号 6 に示したアミノ酸配列からなる
非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載
の抗原蛋白質。
- (8) 配列表の配列番号 7 に示したアミノ酸配列からなる
25 非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載
の抗原蛋白質。

- (9) 配列表の配列番号 8 に示したアミノ酸配列からなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載の抗原蛋白質。
- 5 (10) 配列表の配列番号 9 に示したアミノ酸配列からなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載の抗原蛋白質。
- (11) 配列表の配列番号 10 に示したアミノ酸配列からなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載の抗原蛋白質。
- 10 (12) 配列表の配列番号 11 に示したアミノ酸配列からなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載の抗原蛋白質。
- (13) 配列表の配列番号 12 に示したアミノ酸配列からなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質である請求項(1)記載の抗原蛋白質。
- 15 (14) 非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質の同効抗原蛋白質が T 0 6 4、T 0 6 9 および T 0 6 A から選ばれたものである請求項(1)記載の抗原蛋白質。
- (15) 請求項(1)記載の抗原蛋白質またはその同効抗原蛋白質をコードする DNA。
- 20 (16) 請求項(2)記載の抗原蛋白質をコードする DNA。
- (17) 請求項(3)記載の抗原蛋白質をコードする DNA。
- (18) 請求項(7)記載の抗原蛋白質をコードする DNA。
- (19) 配列表の配列番号 13 から 24 に示した塩基配列またはそれから誘導された塩基配列のいずれかを有する非 A 非 B 型肝炎ウイルスゲノム RNA。
- 25

(20) 配列表の配列番号 1 から 12 までに示したアミノ酸配列のいずれかからなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質あるいはその同効物を主成分とする非 A 非 B 型肝炎用検査薬。

5 (21) 配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列からなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質あるいはその同効物を主成分とする請求項(20)記載の非 A 非 B 型肝炎用検査薬。

10 (22) 配列表の配列番号 2 に示したアミノ酸配列からなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質あるいはその同効物を主成分とする請求項(20)記載の非 A 非 B 型肝炎用検査薬。

15 (23) 配列表の配列番号 6 に示したアミノ酸配列からなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質あるいはその同効物を主成分とする請求項(20)記載の非 A 非 B 型肝炎用検査薬。

(24) 非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質の同効抗原蛋白質が T 0 6 4、T 0 6 9 および T 0 6 A から選ばれたものである請求項(20)記載の非 A 非 B 型肝炎用検査薬。

20 (25) 請求項(1)記載の抗原蛋白質あるいはその同効物のうち少なくとも 2 種の抗原蛋白質あるいはその同効物を組み合わせてなる非 A 非 B 型肝炎用検査薬。

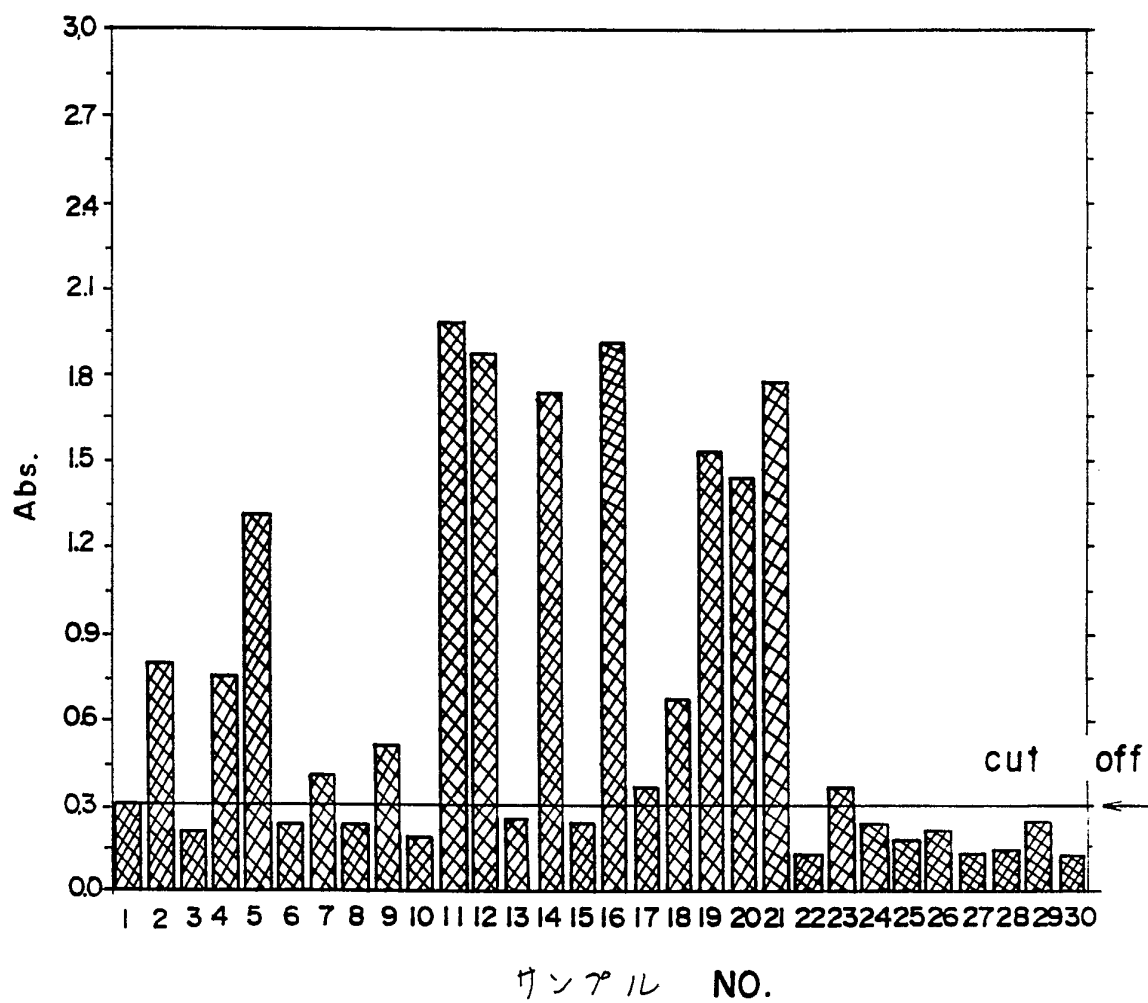
25 (26) 請求項(2)記載の抗原蛋白質あるいはその同効物および請求項(3)記載の抗原蛋白質あるいはその同効物を組み合わせてなる請求項(25)記載の非 A 非 B 型肝炎用検査薬。

- (27) 非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質をコードする c D N A を宿主細胞中で発現可能なプロモーターの下流に連結されており、宿主細胞中で発現させることの出来る発現ベクター。
- 5 (28) 該 c D N A が配列表の配列番号 1 から 1 2 に示したアミノ酸配列のいずれかからなる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質またはその同効抗原蛋白質をコードする c D N A である請求項(25)記載の発現ベクター。
- 10 (29) 請求項(27)記載の発現ベクターを保有する形質転換体。
- (30) 請求項(28)記載の発現ベクターを保有する形質転換体。
- (31) 宿主として大腸菌を用いて得られたものである請求項(27)記載の形質転換体。
- 15 (32) 請求項(29)記載の形質転換体を培養することを特徴とする非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原蛋白質の製造法。
- (33) 融合蛋白質として得られるものである請求項(32)記載の抗原蛋白質の製造法。

MSTNPKPQRK TKRNTSRRPQ DVKFPGGGQI
T064
VGGVYLLPRR GPRLGVRATR KTSEERSQPRG
T069
RRQPIPKDRR STGKSWGKPG YP
T06A

図1 S29のアミノ酸配列と合成ペプチドの設計

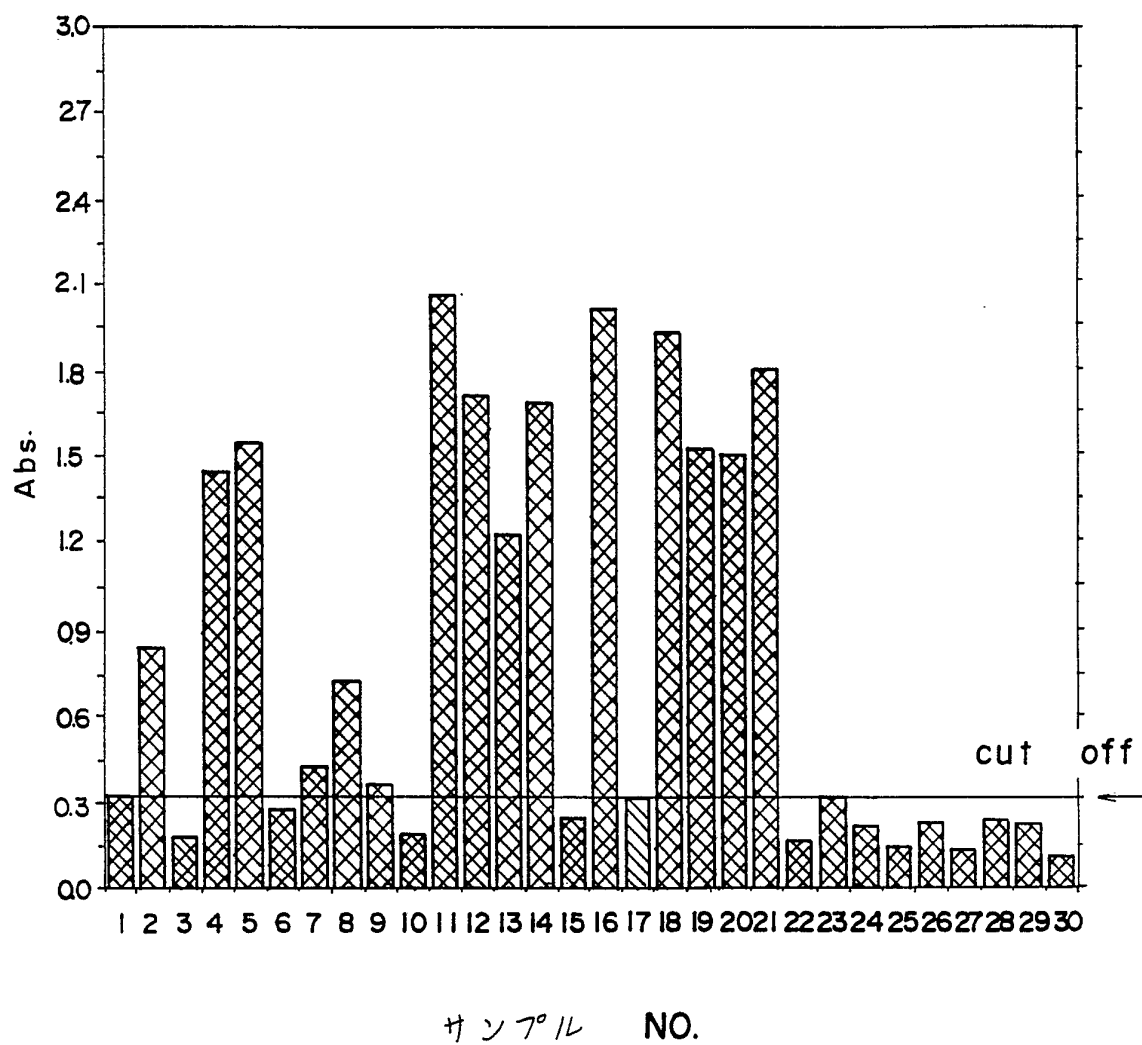
2 / 8



TO6Aを抗原とするELISAの成績

図 2

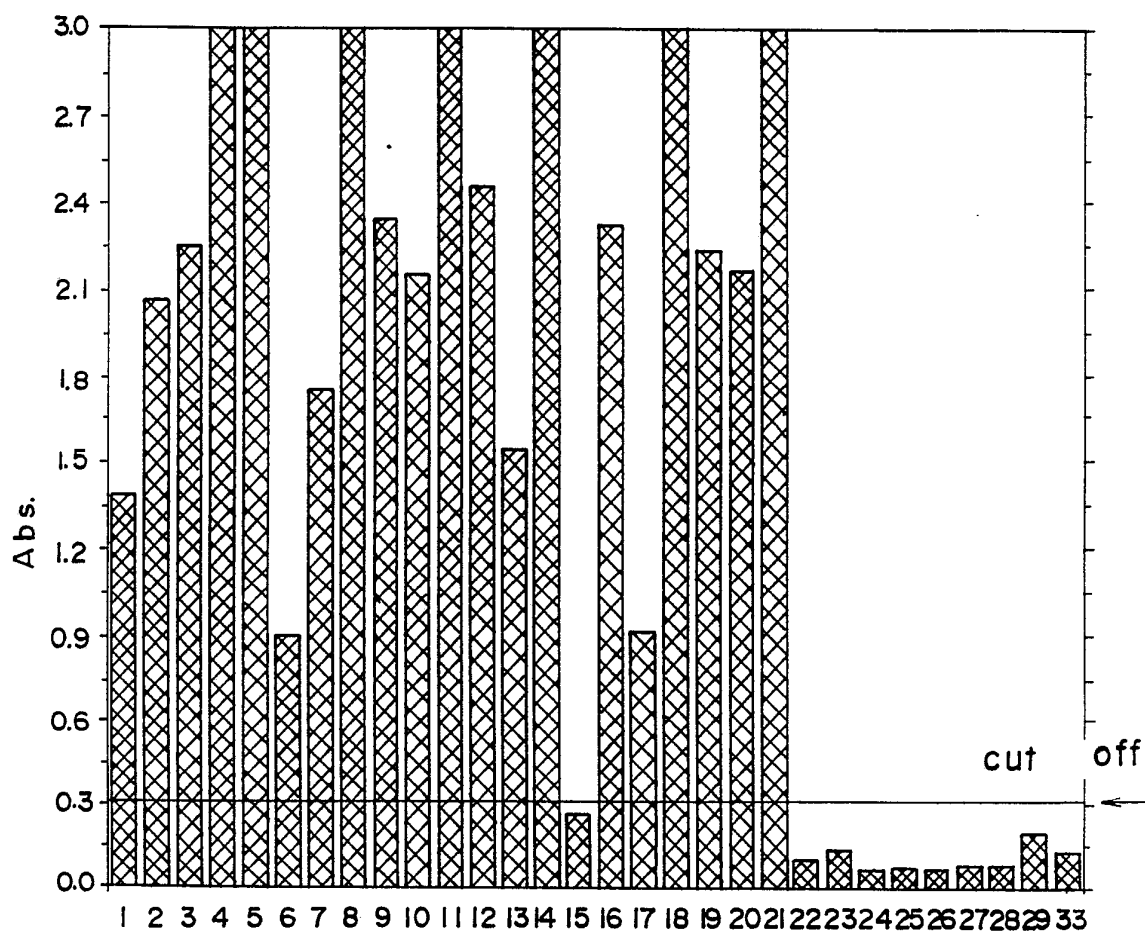
3 / 8



T O 6 9 を抗原とする E L I S A の成績

図 3

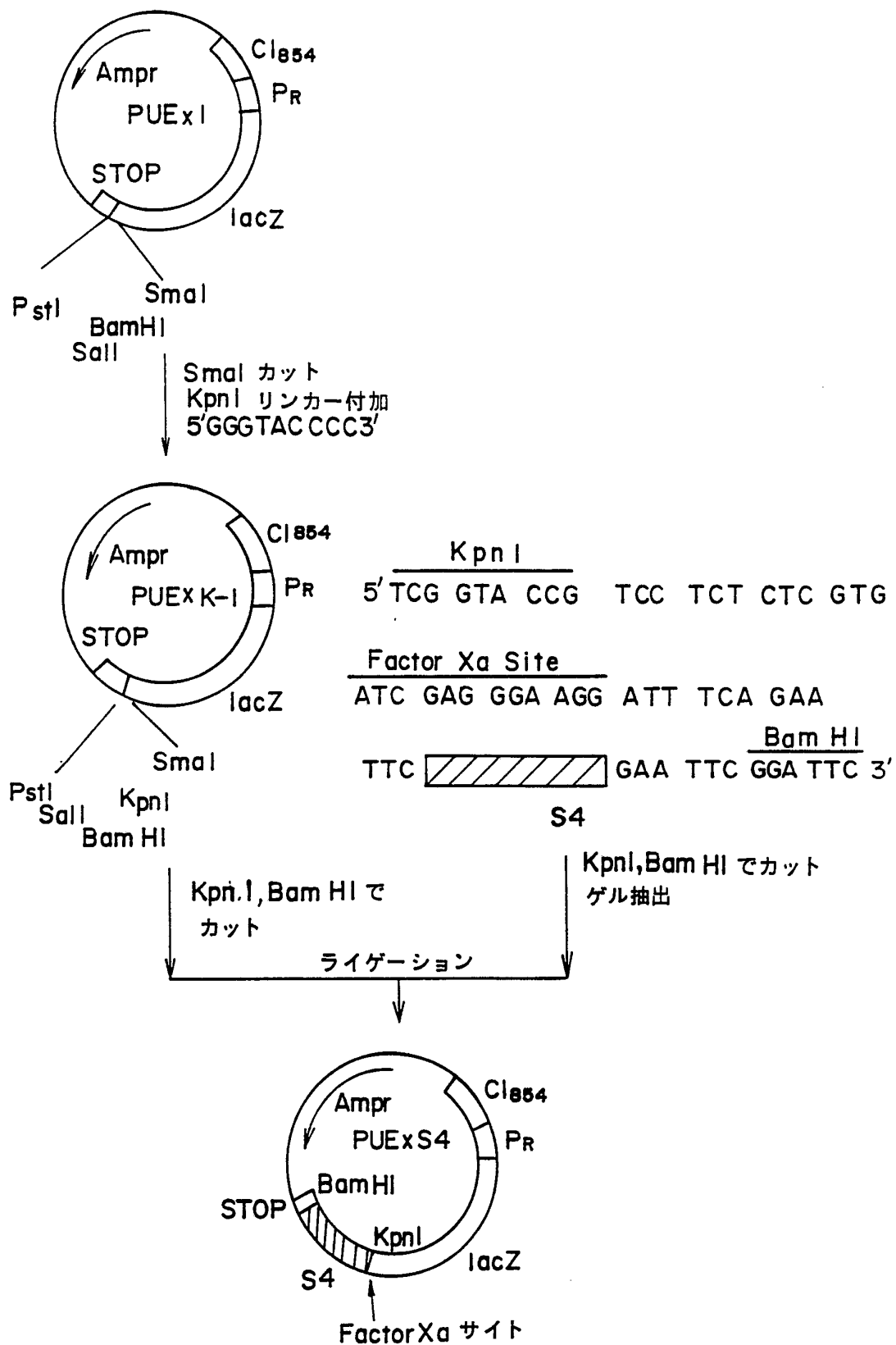
4 / 8



サンプル NO.

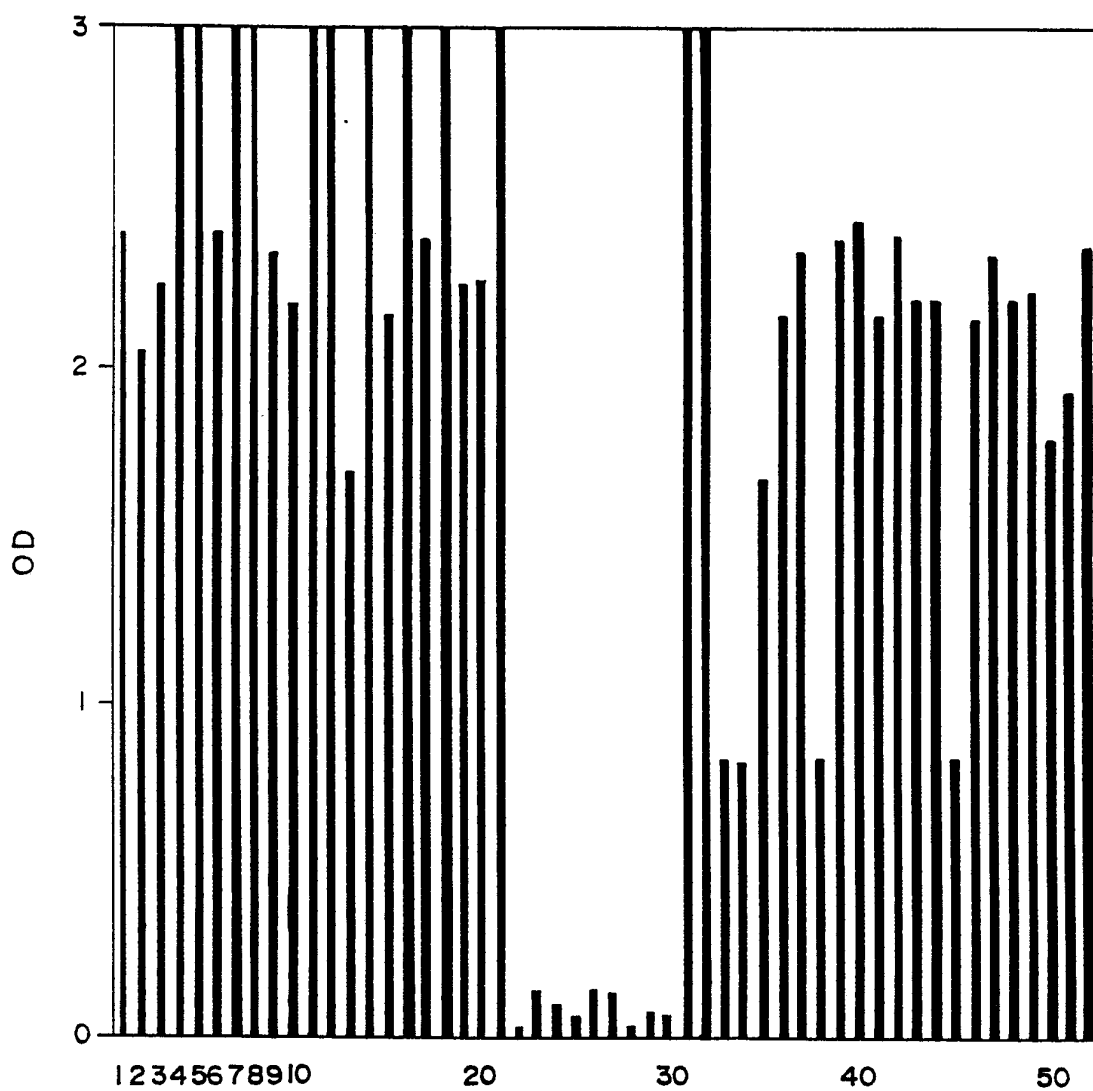
T O 6 9 を抗原とする E L I S A の成績

図 4



6 / 8

マイクロプレートELISAの結果
(合成ペプチドTO64+遺伝子組換え抗原S4使用)

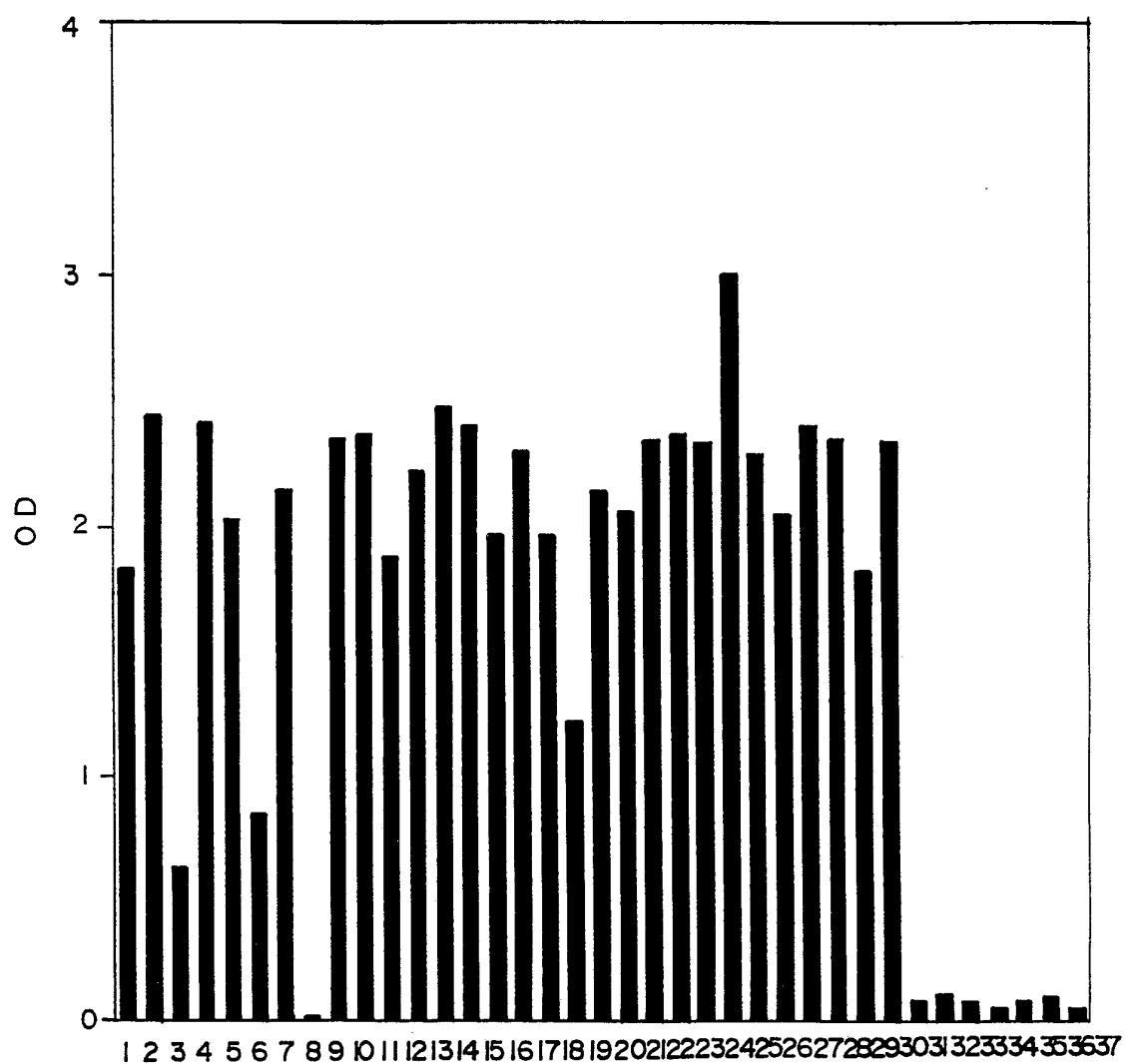


サンプル NO.

図 6

7 / 8

マイクロプレートELISAの結果
(合成ペプチドTO64+遺伝子組換え抗原S4使用)



サンプル NO.

図 7

図8 S4、S29 (T064) 抗原に対する反応 (ELISA)

検体サンプル	T 0 6 4	S 4	検体サンプル	T 0 6 4	S 4
1	+	+	16	-	+
2	+	+	17	-	+
3	+	-	18	+	-
4	+	+	19	+	+
5	+	+	20	+	+
6	-	+	21	+	+
7	+	+	22	+	+
8	-	-	23	+	+
9	+	-	24	+	+
10	+	+	25	+	+
11	+	+	26	+	+
12	+	+	27	+	+
13	+	+	28	+	+
14	+	+	29	+	-
15	+	+	30	+	+

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01662

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl ⁵ C07K15/04, C12P21/02, C12N1/21, 15/51, 15/62, 15/70, G01N33/576// (C12P21/02, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K15/04, C12P21/02, C12N1/21, 15/51, 15/62, G01N33/576	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
Chemical Abstracts Data Base (REGISTRY, CA)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X/A	JP, A, 2-500880 (Chiron Corporation), March 29, 1990 (29. 03. 90) & EP, A1, 318216 & WO, A1, 89/4669	1, 15, 20, 25-33/2-14, 16-19, 21-24
X/A	EP, A1, 388232 (Chiron Corporation), September 19, 1990 (19. 09. 90) & WO, A1, 90/11089	1, 15, 20, 25-33/2-14, 16-19, 21-24
P,X/A	WO, A1, 90/14436 (Chiron Corporation), November 29, 1990 (29. 11. 90) & EP, A2, 398748 & CA, A, 2017157	1, 15, 20, 25-33/2-14, 16-19, 21-24
P,X/A	WO, A1, 91/4262 (National Institute of Health of Japan), April 4, 1991 (04. 04. 91) & EP, A1, 419182	1, 15, 20, 25-33/2-14, 16-19, 21-24
P,X/A	GB, A, 2239245 (Wellcome Foundation Ltd.), June 26, 1991 (26. 06. 91) & DE, A1, 4040339 & FR, A1, 2655990 & CA, A, 2032381	1, 15, 20, 25-33/2-14, 16-19, 21-24
P,X/A	EP, A2, 442394 (United Biomedical, Inc.),	1, 20/2-19,
[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "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 "&" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
February 19, 1992 (19. 02. 92)	March 10, 1992 (10. 03. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

	August 21, 1991 (21. 08. 91) & CA, A, 2036463	21-33
P,X/A	EP, A2, 445423 (Abbott Laboratories), September 11, 1991 (11. 09. 91) & CA, A, 2032907	1, 15, 20, 25-33/2-14, 16-19, 21-24
P,X/A	Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., Vol. 87, No. 24, (1990), N. Kato et al. "Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis" p. 9524-9528	1, 15/2-14, 16-33

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers , because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

P,X/A	Journal of Virology, Vol. 65, No. 3, (1991), A. Takamizawa et al. "Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers" p. 1105-1113	1, 15/2-14, 16-33
P,X/A	Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., Vol. 88, No. 6, (1991), Q.-L. Choo et al. "Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus" p. 2451-2455	1, 15/2-14, 16-33

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers , because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC) Int. Cl.⁴ C07K15/04, C12P21/02, C12N1/21, 15/51, 15/62, 15/70, G01N33/576 // (C12P21/02, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)			
II. 国際調査を行った分野			
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料			
分 類 体 系	分 類 記 号		
IPC	C07K15/04, C12P21/02, C12N1/21, 15/51, 15/62, G01N33/576		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
Chemical Abstracts Data Base (REGISTRY, CA)			
III. 関連する技術に関する文献			
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	請求の範囲の番号	
X/A	JP, A, 2-500880 (チロン コーポレイション), 29. 3月. 1990 (29. 03. 90) &EP, A1, 318216 &WO, A1, 89/4669	1,15,20,25- 33/2-14,16- 19,21-24	
X/A	EP, A1, 388232 (Chiron Corporation), 19. 9月. 1990 (19. 09. 90) &WO, A1, 90/11089	1,15,20,25- 33/2-14,16- 19,21-24	
P,X/A	WO, A1, 90/14436 (Chiron Corporation), 29. 11月. 1990 (29. 11. 90) &EP, A2, 398748 &CA, A, 2017157	1,15,20,25- 33/2-14,16- 19,21-24	
P,X/A	WO, A1, 91/4262 (National Institute of Health of Japan), 4. 4月. 1991 (04. 04. 91) &EP, A1, 419182	1,15,20,25- 33/2-14,16- 19,21-24	
※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の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の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の文献			
IV. 認 証			
国際調査を完了した日 19. 02. 92		国際調査報告の発送日 10.03.92	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)		権限のある職員 特許庁審査官 内 田 俊 生	

第2ページから続く情報

(Ⅷ欄の続き)

PX/A GB, A, 2239245 (Wellcome Foundation Ltd.),
26. 6月. 1991 (26. 06. 91)
&DE, A1, 4040339 &FR, A1, 2655990
&CA, A, 2032381

1,15,20,25-
33/2-14,
16-19,21-24

PX/A EP, A2, 442394 (United Biomedical, Inc.),
21. 8月. 1991 (21. 08. 91)
&CA, A, 2036463

1,20/2-19,
21-33

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲でありかつ PCT 規則 6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。

Ⅲ. 関連する技術に関する文献 (第2ページからの続き)		
引用文献の カナゴリ	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	請求の範囲の番号
PX/A	EP, A2, 445423 (Abbott Laboratories), 11. 9月. 1991 (11. 09. 91) &CA, A, 2032907	1,15,20, 25-33/2-14, 16-19,21-24
PX/A	Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A., 第87巻, 第24号, (1990), N. Kato et al. "Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis" p. 9524-9528	1,15/2-14, 16-33
PX/A	Journal of Virology, 第65巻, 第3号, (1991), A. Takamizawa et al. "Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers" p. 1105-1113	1,15/2-14, 16-33
PX/A	Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 第88巻, 第6号, (1991), Q.-L. Choo et al. "Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus" p. 2451-2455	1,15/2-14, 16-33