

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7065976号

(P7065976)

(45)発行日 令和4年5月12日(2022.5.12)

(24)登録日 令和4年4月28日(2022.4.28)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/686

Z

C 1 2 Q 1/689(2018.01)

C 1 2 Q 1/689

Z

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z Z N A

請求項の数 7 (全15頁)

(21)出願番号 特願2020-537467(P2020-537467)

(86)(22)出願日 平成30年10月26日(2018.10.26)

(65)公表番号 特表2021-516039(P2021-516039
A)

(43)公表日 令和3年7月1日(2021.7.1)

(86)国際出願番号 PCT/KR2018/012785

(87)国際公開番号 WO2019/135477

(87)国際公開日 令和1年7月11日(2019.7.11)

審査請求日 令和2年7月6日(2020.7.6)

(31)優先権主張番号 10-2018-0002282

(32)優先日 平成30年1月8日(2018.1.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者 515121092

インダストリー - アカデミック コーポ
レーション ファウンデーション, チョ
ソン ユニバーシティINDUSTRY - ACADEMIC
COOPERATION FOUNDA
TION, CHOSUN UNIVER
SITY大韓民国 6 1 4 5 2 クワンジュ トン
- グ ビルムン - デロ, (ソソク - ドン
) 3 0 9

(74)代理人 100124431

弁理士 田中 順也

(74)代理人 100174160

弁理士 水谷 馨也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マルチコピー遺伝子を用いたツツガムシ病の診断方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者から得られた試料中のオリエンティア・ツツガムシのマルチコピー遺伝子を、前記マルチコピー遺伝子の塩基配列を増幅させることのできるプライマー対を用いて検出する、ツツガムシ病の診断のためにオリエンティア・ツツガムシのマルチコピー遺伝子を検出する方法であって、

前記プライマー対が、マルチコピー遺伝子 t c h A に関する、配列番号 1 ~ 2 の対、配列番号 3 ~ 4 の対、配列番号 5 ~ 6 の対、配列番号 7 ~ 8 の対、配列番号 9 ~ 1 0 の対、及び配列番号 1 1 ~ 1 2 の対の塩基配列からなる群から選択されたいずれか一以上の対の塩基配列を含む、方法。

【請求項 2】

前記プライマー対が、さらに、マルチコピー遺伝子 t r a B、t r a E、及び / 又は t r b C に関する、配列番号 1 3 ~ 1 4 の対、配列番号 1 5 ~ 1 6 の対、配列番号 1 7 ~ 1 8 の対、配列番号 1 9 ~ 2 0 の対、配列番号 2 1 ~ 2 2 の対、配列番号 2 3 ~ 2 4 の対、配列番号 2 5 ~ 2 6 の対、配列番号 2 7 ~ 2 8 の対、配列番号 2 9 ~ 3 0 の対、配列番号 3 1 ~ 3 2 の対、配列番号 3 3 ~ 3 4 の対、及び配列番号 3 5 ~ 3 6 の対の塩基配列からなる群から選択されたいずれか一以上の対の塩基配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

マルチコピー遺伝子 t c h A に関する、配列番号 1 ~ 2 の対、配列番号 3 ~ 4 の対、配列番号 5 ~ 6 の対、配列番号 7 ~ 8 の対、配列番号 9 ~ 1 0 の対、及び配列番号 1 1 ~ 1 2

の対の塩基配列を含むことを特徴とする、ツツガムシ病の診断用プライマー対。

【請求項 4】

さらに、マルチコピー遺伝子 *t r a B*、*t r a E*、及び *t r b C* に関する、配列番号 13 ~ 14 の対、配列番号 15 ~ 16 の対、配列番号 17 ~ 18 の対、配列番号 19 ~ 20 の対、配列番号 21 ~ 22 の対、配列番号 23 ~ 24 の対、配列番号 25 ~ 26 の対、配列番号 27 ~ 28 の対、配列番号 29 ~ 30 の対、配列番号 31 ~ 32 の対、配列番号 33 ~ 34 の対、及び配列番号 35 ~ 36 の対の塩基配列を含むことを特徴とする、請求項 3 に記載のツツガムシ病の診断用プライマー対。

【請求項 5】

(a) 患者から得られた試料から DNA を分離する段階；

10

(b) 前記分離された DNA を鋳型として、マルチコピー遺伝子 *t c h A* に関する、配列番号 1 ~ 2 の対、配列番号 3 ~ 4 の対、配列番号 5 ~ 6 の対、配列番号 7 ~ 8 の対、配列番号 9 ~ 10 の対、及び配列番号 11 ~ 12 の対の塩基配列を含むプライマー対を用いて PCR を行う段階；及び

(c) 前記 PCR 産物を分離する段階を含むことを特徴とする、ツツガムシ病の診断のためにオリエンティア・ツツガムシのマルチコピー遺伝子を検出する方法。

【請求項 6】

前記プライマー対が、さらに、マルチコピー遺伝子 *t r a B*、*t r a E*、及び *t r b C* に関する、配列番号 13 ~ 14 の対、配列番号 15 ~ 16 の対、配列番号 17 ~ 18 の対、配列番号 19 ~ 20 の対、配列番号 21 ~ 22 の対、配列番号 23 ~ 24 の対、配列番号 25 ~ 26 の対、配列番号 27 ~ 28 の対、配列番号 29 ~ 30 の対、配列番号 31 ~ 32 の対、配列番号 33 ~ 34 の対、及び配列番号 35 ~ 36 の対の塩基配列を含む、請求項 5 に記載のツツガムシ病の診断のためにオリエンティア・ツツガムシのマルチコピー遺伝子を検出する方法。

20

【請求項 7】

マルチコピー遺伝子 *t c h A* に関する、配列番号 1 ~ 2 の対、配列番号 3 ~ 4 の対、配列番号 5 ~ 6 の対、配列番号 7 ~ 8 の対、配列番号 9 ~ 10 の対、及び配列番号 11 ~ 12 の対の塩基配列を含むプライマー対を含むことを特徴とする、ツツガムシ病の診断用 PCR キット。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、マルチコピー遺伝子を用いたツツガムシ病の診断方法に関するものであって、好ましくはツツガムシ病の原因菌であるオリエンティア・ツツガムシ (*O r i e n t i a t s u t s u g a m u s h i*) 菌のマルチコピー遺伝子の塩基配列を増幅させることのできるプライマー及びこれを用いたツツガムシ病を診断する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ツツガムシ病は、急性発熱性疾患としてオリエンティア・ツツガムシによって感染した毛ダニの幼虫に刺されて感染し、全身の血管炎による特徴的な臨床症状を呈する。主な宿主はげっ歯類であり、ダニは宿主であり媒介体である。主要な秋の劣性疾患として、韓国では 1951 年に初めて報告されて以来、韓国全域で 9 月から 11 月の間に発生しており、特に、韓国の秋に発生する患者の 30 % がツツガムシ病と診断されるほど一般的な病気である。

40

【0003】

症状は、感染した毛ダニの幼虫に刺された後、1 ~ 3 週間の潜伏期間を経た後、初期症状として発熱、悪寒、頭痛、筋肉痛を伴うこともあり、紅斑性の斑点や丘疹性の発疹が胸、腹、胴或いは上下肢及び珍しい場合は顔や手のひら、足の裏に現れる。毛ダニに刺されたところには発症から数日以内に黒いかさぶたで覆われる痂皮 (*e s c h a r*) が生じ、ほとんどの場合、痛みやかゆみなどの症状はなく、痂皮の確認は迅速な診断に有用である。

50

【 0 0 0 4 】

だいたい症状の経過が重くなく、抗生物質の治療によく反応するが、診断が遅れる場合、肺炎、急性腎不全、髄膜炎、脳炎、上部胃腸管出血、多器官機能不全、さらには心筋梗塞や中風の形で現れることがあり、これらの合併症により一部の患者においては死に至ることがある。

【 0 0 0 5 】

それ故、迅速且つ正確な診断が患者の予後を改善するために不可欠である。

【 0 0 0 6 】

ツツガムシ病の診断は、患者の血液からオリエンティア・ツツガムシを培養、分離して確認する方法、患者の血清中からオリエンティア・ツツガムシに対する抗体を検出する方法がある。但し、菌体を培養して病気を診断する方法は、培養に必要な時間が数週以上要求されており、実際の患者の診断目的としてふさわしくない。

10

【 0 0 0 7 】

主に診断に使用される検査方法は、間接免疫蛍光抗体法 (I F A)、受身赤血球凝集法 (P H A) 及び免疫クロマトグラフィー (I m m u n o c h r o m a t o g r a p h y) が最も一般的に使用されている。

【 0 0 0 8 】

これらの抗体を用いた診断法は、症状の発生 1 ~ 2 週間以後に検出される場合が多く、敏感度が非常に低く、偽陽性が多く、診断にあまり役立たない欠点がある。

【 0 0 0 9 】

例えば、図 1 を参照すると、疾病管理本部に開示されているツツガムシ病を診断する方法のうち間接免疫蛍光抗体法 (I F A) を用いた診断は I F A I g G 抗体が 1 : 2 5 6 以上になると、ツツガムシ病確定と判定する。

20

【 0 0 1 0 】

しかし、抗体が上昇して診断されるのに数週がかかることがあり敏感度も 4 6 . 7 % と比較的 low、症状の発生から 1 週間で来院した場合、全体の患者の 4 2 . 1 % だけがツツガムシ病と診断されることができ、より迅速且つ判定が容易な新たな診断法が求められている。

【 0 0 1 1 】

代替診断法として P C R (P o l y m e r a s e C h a i n r e a c t i o n) に基づいた検出法が提案されている。P C R は、DNA の望む部分のコピー (c o p y) の数を幾何級数的に増幅させることのできる分子生物学的方法である。DNA のどの部分でも、その配列さえ分かれば P C R により増幅することができる。

30

【 0 0 1 2 】

P C R 法は、従来の方法によって行われるコンベンショナル (c o n v e n t i o n a l) P C R と、これを変形してコンベンショナル P C R 法より 1 0 0 倍さらに敏感なネステッド (n e s t e d) P C R 法、P C R 反応のリアルタイムモニタリング (m o n i t o r i n g) が可能で、2 時間以内に結果を速成で確認できるリアルタイム (r e a l t i m e) P C R 法などがある。

【 0 0 1 3 】

従来はツツガムシ病の P C R 診断方法において、4 6 k D a、5 7 k D a、g r o E L など、多様な標的タンパク遺伝子 (t a r g e t p r o t e i n g e n e) を用いた P C R が試みられており、コンベンショナル P C R よりはネステッド P C R 及びリアルタイム P C R が主に用いられていた。ツツガムシ病の診断においてコンベンショナル P C R を行う場合、敏感度が 1 0 % 以内で非常に低いという欠点があり、ネステッド P C R の場合、P C R を 2 回行って敏感度を向上させることができるが、他の P C R に比べて検査時間がさらにかかる欠点と P C R を 2 回行うので遺伝子の汚染 (c o n t a m i n a t i o n) により偽陽性率が高くなる欠点がある。

40

【 0 0 1 4 】

但し、P C R 反応のリアルタイムでモニタリングするリアルタイム P C R を行って検査を

50

速成で診断する方法があるが、検査装置が非常に高価であるため、医療機関で普遍的に使用されるには難しいのが実情である。

【 0 0 1 5 】

したがって、高い敏感度と特異度を示しながら、一般に検査方法が簡単且つコストが低い診断方法の開発が切実である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 6 】

本発明は、上記のような問題点を解決するために案出されたものであって、本発明は、オリエンティア・ツツガムシ菌のマルチコピー遺伝子を用いてツツガムシ病を診断する方法

10

【 0 0 1 7 】

好ましくは、マルチコピー遺伝子の塩基配列を増幅することのできるプライマー対を用いてツツガムシ病を診断する方法を提供することを目的とする。

【 0 0 1 8 】

また、本発明の第二の目的は、特定の塩基配列を含むプライマー対を提供することを目的とする。

【 0 0 1 9 】

また、本発明の第三の目的は、特定の塩基配列からなるプライマー対を含む P C R 診断キットを提供することを目的とする。

20

【 0 0 2 0 】

好ましくは、本発明は、敏感度と特異度が優れた特定の塩基配列からなるプライマー対を提供することにより、ツツガムシ菌を迅速に診断することのできる P C T 診断キット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 2 1 】

上述した第一の目的を達成するために、本発明は、オリエンティア・ツツガムシ菌のマルチコピー遺伝子の塩基配列を増幅することのできる特定の塩基配列を含むプライマーを開示する。本発明のプライマーは配列番号 1 ~ 配列番号 3 6 の塩基配列からなる群の中から選ばれた 1 種以上の塩基配列を含む。

30

【 0 0 2 2 】

好ましくは、本発明のプライマー対は、配列番号 1 ~ 配列番号 3 6 の塩基配列からなる群の中から選ばれた 2 種以上の塩基配列を含む。

【 0 0 2 3 】

さらに好ましくは、前記プライマー対は、配列番号 1 及び配列番号 2 の塩基配列を含むことができる。

【 0 0 2 4 】

本発明の第二の目的を達成するために、本発明のツツガムシ病の診断方法は、マルチコピー遺伝子 (m u l t i c o p y g e n e) の塩基配列を増幅させることのできるプライマー対を用いて検出することができる。

40

【 0 0 2 5 】

上記の診断方法は、(a) 試料から D N A を分離する段階、(b) 前記分離された D N A を鋳型として配列番号 1 ~ 配列番号 3 6 のプライマー対を用いて P C R を行う段階、及び(c) 前記 P C R 産物を分離する段階を含むことができる。

【 0 0 2 6 】

本発明の第三の目的を達成するために、ツツガムシ診断用 P C R キットは、配列番号 1 ~ 配列番号 3 6 の塩基配列からなる群から選択されたプライマー対を含むことができる。

【発明の効果】

【 0 0 2 7 】

本発明に係る特定の塩基配列を含むプライマー対は、マルチコピー遺伝子に対する高い特

50

異性を有する。

【 0 0 2 8 】

また、本発明に係るツツガムシ病の診断方法は、特定の塩基配列を含むプライマー対を用いてPCR反応によって高い敏感度和特異性で検出することができるので、高い信頼性により迅速且つ容易に臨床診断することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 9 】

【図1】図1は、間接免疫蛍光抗体法を用いた診断方法による検出敏感度のグラフである。

【図2】図2は、本発明に係るPCR検出方法を用いたツツガムシ病の診断方法を示すフローチャートである。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 0 】

以下では、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 3 1 】

本発明のツツガムシ病の診断方法は、オリエンティア・ツツガムシ菌のマルチコピー遺伝子の塩基配列を増幅させることのできるプライマー対を用いて検出することができる。

【 0 0 3 2 】

前記マルチコピー遺伝子 (m u l t i c o p y g e n e) は、オリエンティア・ツツガムシ遺伝子内の複数の位置に繰り返し存在する遺伝子をいい、好ましくは14種のT r a - l i n k e d 遺伝子の塩基配列を含むことができ、さらに好ましくはt r a B、t r a E、t r a C及びT c h A 遺伝子の塩基配列を含むことができる。

20

【 0 0 3 3 】

また、前記マルチコピー遺伝子は、PCRの標的遺伝子 (T a r g e t g e n e) である。

【 0 0 3 4 】

従来の診断方法で用いられていた47kDa、56kDa、g r o E 1 - S T G などの標的タンパク遺伝子は、全体の遺伝子の内部のある位置にのみ存在するのに比べて、マルチコピー遺伝子は、様々な位置に繰り返し存在するため、PCRを行って塩基配列を増幅時にPCR効率が高くなるので、ツツガムシ病の診断の精度を高めることができる。

【 0 0 3 5 】

30

本発明のツツガムシ診断用プライマーは配列番号1～配列番号36の塩基配列からなる群の中から選ばれた1種以上の塩基配列を含む。

【 0 0 3 6 】

また、本発明のツツガムシ診断用のプライマー対は、配列番号1～配列番号36の塩基配列からなる群の中から選ばれた2種以上の塩基配列を含む。

【 0 0 3 7 】

前記プライマー対は、配列番号1及び配列番号2の塩基配列を含むことができる。

【 0 0 3 8 】

通常、前記プライマー対は、互いに相補的な塩基配列を持たない2つのプライマー (p r i m e r) をいう。

40

【 0 0 3 9 】

プライマーは、特定の遺伝子配列に対して相補的な短い単線の遺伝子配列 (o l i g o n u c l e o t i d e) でDNA合成の起点となり、PCR検査、DNAシーケンシング (D N A s e q u e n c i n g) などに用いられる。また、プライマーは、PCR検査の最も重要な要素であり、精度を決定する。前記プライマーはオリエンティア・ツツガムシ (O r i e n t i a t s u t s u g a m u s h i) 保寧 (B o r y o n g) 菌株に感染した患者の血液から増幅した保寧 (B o r y o n g) 菌株のマルチコピー遺伝子の塩基配列に基づいて設計し、マルチコピー遺伝子と相補的な塩基配列を有する。

【 0 0 4 0 】

また、前記ツツガムシ病の診断方法は、(a) 試料からDNAを分離する段階、(b) 前

50

記分離されたDNAを鋳型として配列番号1～配列番号36のプライマー対を用いてPCRを行う段階、及び(c)前記PCR産物を分離する段階を含むことができる。

【0041】

前記(a)段階でのDNA抽出は、当業界で通常使用される方法によって行われることができ、商業的に販売されているDNA抽出キットを用いて行うことができる。

【0042】

前記(b)段階でPCRは、分離されたDNAを鋳型とし、本発明のプライマー対がDNA重合酵素を用いて相補的DNA鎖(DNA strand)を合成してPCR反応を行うことができる。

【0043】

また、前記(b)段階で一对のプライマーで増幅される産物内の塩基配列に基づいてプローブ(Probe)をさらに含んでリアルタイムPCR反応を行うことができる。

【0044】

前記プローブとは、塩基配列と特異的に結合することのできる数個乃至数百個の塩基からなる核酸断片を意味し、ラベリングされており、特定の核酸が存在するかどうかを確認することができる。プローブは、好ましくは、5'-末端及び3'-末端にそれぞれ蛍光物質が標識されることができる。

【0045】

また、さらに好ましくは、前記5'-末端に標識された蛍光物質は、6-カルボキシフルオレセイン(6-carboxyfluorescein、FAM)、ヘキサクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(hexachloro-6-carboxyfluorescein、HEX)、テトラクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(tetrachloro-6-carboxyfluorescein)、及びCyanine-5(Cy5)、6-カルボキシ-4,5-ジクロロ-2,7-ジメトキシフルオレセイン(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein、6-JOE)、テトラクロロフルオレセイン(tetrachlorofluorescein、TET)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(terttramethylrhodamine isothiocyanate、Texas Red)、5-カルボキシ-x-ローダミン(5-carboxy-X-rhodamine、ROX)、6-カルボキシテトラメチル-ローダミン(6-carboxytetramethyl-rhodamine、TAMRA)からなる群から選ばれ、前記3'-末端に標識された蛍光物質は、6-カルボキシテトラメチル-ローダミン(6-carboxytetramethyl-rhodamine、TAMRA)またはblack hole quencher-1,2,3(BHQ-1,2,3)であることができ、これに限定されるものではない。

【0046】

前記PCRは、重合酵素連鎖重合反応(polymerase chain reaction)の略語であって、DNAまたはRNAの特定領域を試験管内で大量に増幅する技術であり、当業界で公知の複数の成分を含むPCR反応混合液を用いて行われることができる。前記PCR反応混合液には、本発明で提供されるPCRプライマー対以外に、適量のDNA重合酵素、dNTP、PCR緩衝溶液及び水(dH₂O)を含むことができる。

【0047】

また、PCR緩衝溶液は、トリス-HCl(tris-HCl)、MgCl₂、KCl等を含むことができる。

【0048】

PCRは、通常、3つの反応段階からなっている。第一番目はDNAの変性段階で、二本鎖のDNAを、温度を加えて一本鎖のDNAに分離させる段階であり、第二番目はプライマーの結合段階で、一本鎖に変性したDNAとプライマーを共存させた後、温度を下げるとプライマー対がそれぞれ相補的な一本鎖の鋳型DNAに結合される段階であり、第三番目は伸長反応で4種類の基質(dNTP)が共存する状態でDNA重合酵素を作用させて

10

20

30

40

50

プライマーを伸長させる段階からなっている。

【0049】

前記PCRは、通常のPCR反応を用いることができ、好ましくは、最も一般的なコンベンショナル(Conventional)PCR、2回のPCRを同時にまたは連続して行うデュプレックス(duplex)PCR及びネスティッド(nested)PCR、リアルタイムで結果を確認することのできる高価なリアルタイム(Real time)PCRのいずれをも用いることができ、最も好ましくはコンベンショナルPCRまたはリアルタイムPCRを用いることができる。

【0050】

前記リアルタイム(Real time)PCRは、PCR増幅産物の増加をリアルタイムでモニタリングして確認することができるので、追加的な電気泳動分析方法を用いなくてもよく、エンドポイント(End point)でPCR増幅産物を確認する既存のPCR法に比べて、迅速且つ容易にPCRを解析することができ、汚染の危険性が少ない。

【0051】

リアルタイムPCR増幅産物の検出方法は、標的配列(target sequence)に特異的であり、蛍光染料(dye)が結合されたプローブ(Probe)を用い、検出特異性が高く、似た配列までも区別して検出することができる。

【0052】

また、前記(c)段階では、当業界で広く公知された方法によってPCR産物を分離することができる。好ましくは、アガロースゲル(agarose gel)またはポリアクリルアミドゲル(polyacrylamide gel)電気泳動または蛍光分析装置(ABI prism 3100 genetic analyzer - electropherogram)によって確認することができる。電気泳動後、エチジウムブロマイド(ethidium bromide)染色で電気泳動の結果を分析することができる。

【0053】

本発明のツツガムシ病の診断用PCRキットは、配列番号1～配列番号36の塩基配列からなる群から選択されたプライマー対を含むことができる。

【0054】

また、前記検出用PCRキットには、前記マルチコピー遺伝子の塩基配列を増幅することのできるプライマー対以外にも、重合酵素連鎖重合反応に関与する酵素、dNTP、緩衝溶液を含むことができ、PCR産物の増幅かどうかを確認することのできる電気泳動の実行に必要な構成成分であるミネラルオイル、標準マーカー、染色試薬であるプロモフェノールブルーまたはキシレンFFなどのPCR用の材料を含むことができる。

【0055】

以下、本発明を次の実施例によって菌の検出、診断方法についてより具体的に説明する。

【0056】

次の実施例は単に本発明を詳細に説明するためのもので、これらによって本発明の内容及び範囲が実施例によって限定されるものではないことは、当業界で通常の知識を有する者にとって自明である。

【0057】

<実施例>

1. プライマーの作製

韓国で一般的なツツガムシ保寧(Boryong)菌株に感染した患者の血液から増幅されたマルチコピー遺伝子(multicopy gene)に基づいて設計された。

【0058】

さらに好ましくは、前記プライマーはGenbank Accession No. AM494475.1: O. tsutsugamushi Boryong complete genome thcA gene (conserved hypothetical protein) に対して正方向のプライマー(position 14 - 34)と逆方向のプライマー(position 171 - 151)で作製し、それぞれ配列番号1～配列番

10

20

30

40

50

号 3 6 で表記した。

【 0 0 5 9 】

また、プローブ (p r o b e) は、Taqman probe (p o s i t i o n 5 8 - 7 8) で作製し、配列番号 3 7 と 3 8 で表記した。

【 0 0 6 0 】

本発明の実施例によって作製されたプライマー及びプローブを下記の表 1 に示した。

【 0 0 6 1 】

【表 1】

配列番号	配列
1	tttttgcctaaaagccttg
2	ggcctagcctttatggttg
3	atcctaattggagctggcaat
4	tggagtagctccaggaattgt
5	tggagctggcaataaacctt
6	gcattgacgaatggggagta
7	cctccaaccataaaggctagg
8	catgctacaattgaggctgaag
9	agagcaattcctccaaccat
10	cattatcgaggcgttgaag
11	tttagcatgcctgctgttttag
12	tgtacaattgaggctgaagg
13	tgtataagggaatatggccagtta
14	tcaattgattatgcgtgggtta
15	tcacaggaacaacatcaatttta
16	ttttcaatgagtgatgaggcttt
17	cgaagctaataccaagctcca
18	tcattttcaatgagtgatgagg
19	tggccagttaatttcttgggtt
20	ctgaatctcaaaaggctggag
21	tggctgcaattaccaaaagaa
22	gatgccactttcatgtctgc
23	tgggcaatttatgtgacgaa
24	tcacctcaaccttcttttgaa
25	gcagacatgaaagtggcatc
26	cgctaaaccagtagcgaagc
27	ttccaaagaagggtgaggtga
28	cgccagttaacaacaaaagg
29	gtctctctaacttttgtgattgg
30	agcccagtcgttcttattgc
31	tgttgcttcttcttgtgtctc
32	attggagatgcgcttcagtc
33	cctgacgcaataagaacgact
34	gctggaggtcatcaacaaca
35	gcgcactctcaatctgaaac
36	ggtgaagatggacgttcttg
37	cggcctcgataatgccaaca
38	cttcaacggcctcgataatgcc

【 0 0 6 2 】

前記プライマーはマルチコピー遺伝子である t c h A、t r a B、t r a E、t r b C と

相補的な塩基配列を有することができる。

【 0 0 6 3 】

また、前記プライマーの配列の長さはそれぞれ 1 9 n t ~ 3 0 n t、G C 含量は 2 0 ~ 6 0 % であり、T m 値は 5 0 ~ 7 0 となるように作製した。

【 0 0 6 4 】

2. 検体の準備

2 0 0 7 年から 2 0 0 8 年の間に、朝鮮大学校病院に来院した患者を対象に、当時痲皮または半球真性発疹などがあり、頭痛、全身脆弱感、筋肉痛、咳、吐き気、腹痛などの 2 種類以上の臨床症状を持っている患者の血液サンプルを採取し、遺伝子を抽出して検査に用いた。

10

【 0 0 6 5 】

血液検体において間接免疫蛍光検査法 (I F A) でオリエンティア・ツツガムシに対する I g G 抗体が 4 倍以上上昇した場合をツツガムシ病の確定診断と定義し、ツツガムシ病と確定診断された患者 5 2 人の血液を陽性対照群とし、ツツガムシではない他の疾患と診断された患者 2 0 人の血液を陰性対照群として使用した。

【 0 0 6 6 】

3. オリエンティア・ツツガムシの検出

作製したプライマー及び診断方法の有効性を確認するために準備した陽性対照群と陰性対照群の検体を対象として D N A を検出して、図 2 に示すように P C R を行った。

【 0 0 6 7 】

20

患者から全血を採取し、白血球軟層を分離した後、Q I A a m p D N A ミニキット (Q i a g e n、G e r m a n y) を用いて D N A を分離した。分離方法は、キットに同梱されたマニュアル (m a n u a l) により実施し、分離した D N A はオリエンティア・ツツガムシ菌の検出のための鋳型 (t e m p l a t e) として使用した。

【 0 0 6 8 】

抽出された D N A を鋳型としてコンベンショナル P C R、ネスティッド P C R 及びリアルタイム P C R を行った。

【 0 0 6 9 】

このとき、実験に使用したプライマーとしては、本発明の配列番号 1 ~ 配列番号 3 6 の塩基配列を持つプライマーと配列番号 3 7 及び 3 8 の塩基配列を持つプローブを用いた。

30

【 0 0 7 0 】

コンベンショナル P C R 及びネスティッド P C R は A c c u P o w e r T M P C R P r e M i x (1 U T o p p o l y m e r a s e、2 5 0 μ m d N T P、1 0 m M T r i s - H C l (p H 9 . 0 ; B i o n e e r) に 2 μ l 鋳型 D N A、それぞれ 1 μ l ずつ 1 0 p m o l e / μ l 正方向プライマー及び逆方向プライマー、1 6 μ l の滅菌 3 次蒸留水を添加して総 2 0 μ l の反応液を調製した後、チューブをよく混合して B i o s y s t e m s V e r i t i T M 9 6 - w e l l T h e r m a l c y c l e (A p p l i e d B i o s y s t e m s) にセットした後、P C R を行った。

【 0 0 7 1 】

また、リアルタイム P C R は、1 μ l の 2 p m o l e / μ l プローブを含んで上記と同様の方法で反応液を調製した後、チューブをよく混合して B I O N E E R E x i c y c l e r T M 9 6 R e a l - T i m e Q u a n t i t a t i v e T h e r m a l B l o c k (A p p l i e d B I O N N E R) にセットした後、P C R を行い、プローブの 5 ' と 3 ' - 末端に F A M (6 - c a r b o x y F l u o - r e s c e i n) と B H Q - 1 (B l a c k H o l e Q u e n c h e r - 1) で標識して使用した。

40

【 0 0 7 2 】

P C R 実行条件は、表 2 に示した。

【 0 0 7 3 】

P C R 終了後、0 . 5 n g / m l E t B r (e t h i d i u m b r o m i d e、B i o n e e r) を入れた 1 . 5 % a g a r o s e g e l (S e a k e m L E a g a r o

50

se、Cambrex Bio Science)をバイオニア電気泳動装置(Bioneer)にロードし、100V(1X TEA、Bioneer)の条件で40分間PCR増幅産物を電気泳動を行い、その結果を観察した。

【0074】

PCR検査の結果、陰性対照群に対するPCR増幅産物は、電気泳動させた時にどこにもバンドが観察されなかった。また、本発明のプライマー対によるPCR増幅産物の大きさは表3に示されており、その大きさのバンドを確認することにより、オリエンティア・ツツガムシが検出されるかどうかを確認することとし、PCR増幅産物は、間接免疫蛍光検査法と一致する結果が導出されることが確認できた。

【0075】

【表2】

PCR反応条件			
予備変性(predenaturation)	94℃	10分	35 cycles
変性(denaturation)	94℃	30秒	
結合(annealing)	63℃	30秒	
伸長(extension)	72℃	1分	
追加伸長(extra-extension)	72℃	7分	

【0076】

10

20

30

40

50

【表 3】

遺伝子	プライマー対の 番号	配列	プライマーの 配列番号	増幅産物の サイズ(bp)
tchA	1	tttttgcceaaaagccttg	1	149
		ggcctagccttttatggttgg	2	
	2	atcctaattggagctggcaat	3	176
		tggagtagctccaggaattgt	4	
	3	tggagctggcaataaacctt	5	197
		gcattgacgaatggggagta	6	
	4	cctccaaccataaaggctagg	7	186
		catgctacaattgaggctgaag	8	
	5	agagcaattcctccaacat	9	142
		cattatcgaggccgttgaag	10	
	6	tttagcatgcctgctgtttag	11	158
		tgctacaattgaggctgaagg	12	
traC	1	tgctaaaggaatatggccagtta	13	193
		tcaattgattatgcgtgggtta	14	
	2	tcacaggaacaacatcaatttta	15	190
		ttttcaatgagtgatgaggcttt	16	
	3	cgaagctaataccaagctcca	17	142
		tcatlttcaatgagtgatgagg	18	
	4	tggccagttaatttcttgggtt	19	202
		ctgaatctcaaaaggctggag	20	
traE	1	tggtgcaattaccaagaa	21	190
		gatgccactttcatgtctgc	22	
	2	tgggcaatttatgtgacgaa	23	184
		tcacctcaaccttctttggaa	24	
	3	gcagacatgaaagtggcatc	25	169
		cgctaaaccagtagcgaagc	26	
	4	ttccaaagaaggttgaggatga	27	150
		cgccagttaacaacaaaagg	28	
traB	1	gctcctctaacttttgtgattgg	29	172
		agcccagtcgttcttattgc	30	
	2	tgtggcttcttcttgtgtctc	31	182
		attggagatgcgcttcagtc	32	
	3	cctgacgcaataagaacgact	33	149
		gctggaggtcatcaacaaca	34	
	4	gcgcattctccaatctgaaac	35	199
		ggtgaagatggacgttcttg	36	

【 0 0 7 7 】

< 比較例 >

1. 従来の方法によるオリエンティア・ツツガムシの検出

本発明のプライマー及び診断方法の有効性を比較するために下記のように比較実験を行った。

【 0 0 7 8 】

鋳型 DNA は、前記血液検体から分離したものを同様に使用し、それぞれの実験は、ツツガムシ菌の検出に一般的に使用される標的タンパク遺伝子である 56 kDa、47 kDa に対するコンベンショナル PCR とネスティッド PCR を行っており、その結果を表 4 に示す。

【 0 0 7 9 】

それぞれのPCRに使用したプライマー対は、参考文献に基づいて作製するか、直接デザインして使用し、実施例3と同様の方法でPCRを実施した。

【0080】

47kDa遺伝子を増幅させるためのプライマー対は、参考文献(Jiang J、Chan TC、Temenak JJ、Dasch GA、Ching WM、Richards AL. Development of a quantitative real time polymerase chain reaction assay specific for Orientia tsutsugamushi. Am J Trop Med Hyg. 2004 Apr; 70(4): 351-6.)を参照して作製した。

【0081】

また、56kDa遺伝子を増幅させるためのプライマー対は、参考文献(Kim DM、Yun NR、Yang TY、Lee JH、Yang JT、Shim SK、et al. Usefulness of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus in clinical practice: A prospective study. Am J Trop Med Hyg. 2006 Sep; 75(3): 542-5.)を参照して作製した。

【0082】

【表4】

遺伝子/PCR	プライマーの名称	配列	増幅産物のサイズ (bp)
47kDa/C-PCR	OtsuFP630	AACTGATTTTATTCAACTAATG CTGCT	118
	OtsuRP747	TATGCCTGAGTAAGATACRTG AATRGAATT	
47kDa/N-PCR (External Primer)	OtsuFP555	TCCTTTCGGTTTAAGAGGAACA	238
	OtsuRP771	GCATTCAACTGCTTCAAGTACA	
47kDa/N-PCR (Internal Primer)	OtsuFP630	AACTGATTTTATTCAACTAATG CTGCT	118
	OtsuRP747	TATGCCTGAGTAAGATACRTG AATRGAATT	
56kDa/C-PCR	P10	GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAAT GCC	438
	P11	CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTA GGC	
56kDa/N-PCR (External Primer)	P34	TCAAGCTTATTGCTAGATCTGC	1003
	P55	AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGC G	
56kDa/N-PCR (Internal Primer)	P10	GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAAT GCC	438
	P11	CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTA GGC	

【0083】

<結果> ツツガムシ病の診断方法の有効性確認

本発明のプライマーを用いた実施例3と比較例のオリエンティア・ツツガムシの検出方法において、オリエンティア・ツツガムシの検出感度(sensitivity)、特異

度 (s p e c i f i c i t y) 及び検出時間を測定した結果を表 5 に示す。

【 0 0 8 4 】

表 5 から分かるように、実施例 3 の T r a B 遺伝子を標的としてコンベンショナル (C) - P C R を行った場合、比較例 1 の 5 6 k D a 、 4 7 k D a 遺伝子を標的としたネスティッド (N) - P C R に比べて少ない時間が所要された。

【 0 0 8 5 】

また、実施例 3 の T r a B 1 、 T r a B 2 遺伝子を標的としてコンベンショナル (C) - P C R を行った場合、それぞれ 8 2 . 7 % と 8 8 . 5 % の感度を示した。

【 0 0 8 6 】

特に、T c h 遺伝子を標的として用いる場合には、コンベンショナル P C R (C - P C R) を行った場合、9 0 . 4 % の感度を示し、リアルタイム P C R (Q - P C R) を行った場合、検出時間が 1 ~ 2 時間に過ぎないにも関わらず感度が 9 8 . 1 % を示した。

【 0 0 8 7 】

よって、下記表 5 に示すように、本発明のプライマー対は、本発明が達成しようとした目的及び効果を達成した。

【 0 0 8 8 】

上記の結果によれば、本発明に係るプライマー対を用いた P C R 検出方法は、オリエンテニア・ツツガムシの感染の有無を確認するのに十分な感度を提供できることが確認できる。

【 0 0 8 9 】

【表 5】

	遺伝子/PCR	感度	特異度	検出時間
実施例3	TchA6/C-PCR	90.4%	100%	3-4h
	TchA6/Q-PCR	98.1%	100%	1-2h
	TrbC1/C-PCR	63.5%	100%	3-4h
	TrbC4/C-PCR	57.7%	100%	3-4h
	TraE1/C-PCR	62.5%	100%	3-4h
	TraE3/C-PCR	62.5%	100%	3-4h
	TraB1/C-PCR	82.7%	100%	3-4h
	TraB2/C-PCR	88.5%	100%	3-4h
比較例1	56kDa/C-PCR	1.9%	100%	3-4h
	56kDa/N-PCR	84.6%	100%	6-7h
	47kDa/C-PCR	1.9%	100%	3-4h
	47kDa/N-PCR	84.6%	100%	6-7h

【 0 0 9 0 】

以上により、本発明の内容の特定の部分を詳細に記述しており、当業界の通常の知識を有する者にとって、このような具体的な記述は、単に正確な実施の例示であるだけで、これにより本発明の範囲が制限されるものではなく、本発明の実質的な範囲は、添付された請求項によって定義されるといえる。

10

20

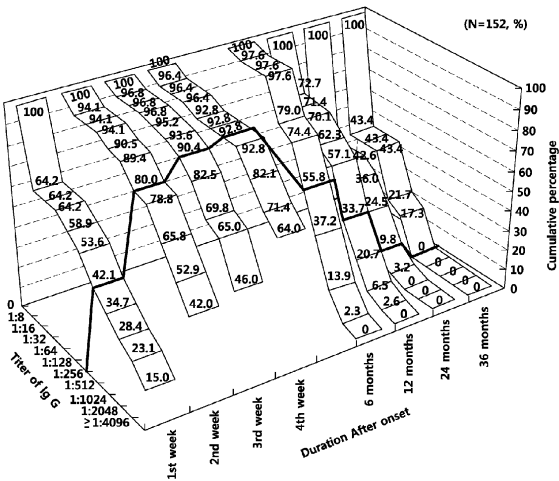
30

40

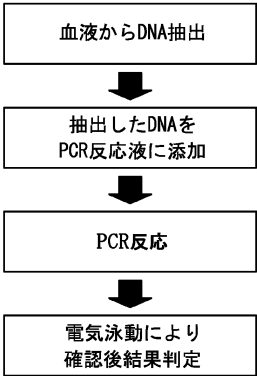
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

【配列表】

0007065976000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100175651
弁理士 迫田 恭子
- (72)発明者 キム ドン ミン
大韓民国 6 1 7 0 4 クワンジュ ナム - グ ボンソンジュンアン - ロ 8 1 0 1 - 4 0 2 (ボン
ソン - ドン)
- 審査官 佐久 敬
- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 6 6 2 8 7 (W O , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 8 4 4 6 0 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 1 1 / 1 6 2 4 4 1 (W O , A 1)
韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 1 - 0 0 2 8 6 8 9 (K R , A)
PLOS (2014), Vol.8, No.8, e3064(p.1-15)
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 Q
C 1 2 N
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (J DreamIII)
CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)