

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7419552号
(P7419552)

(45)発行日 令和6年1月22日(2024.1.22)

(24)登録日 令和6年1月12日(2024.1.12)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 Q	1/6888(2018.01)	C 1 2 Q	1/6888	Z
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z Z N A
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/70 (2006.01)	C 1 2 Q	1/70	

請求項の数 4 (全25頁)

(21)出願番号	特願2022-549743(P2022-549743)	(73)特許権者	519124327 ゲノミックツリー インコーポレイテッド GENOMIC TREE, INC. 大韓民国, 34027, テジョン, ユソ ン-グ, テクノ 10-ロ, 44-6
(86)(22)出願日	令和3年3月5日(2021.3.5)	(74)代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
(65)公表番号	特表2023-516568(P2023-516568 A)	(72)発明者	アン ソンファン 大韓民国, 34125, テジョン, ユソ ン-グ, エクスボ-ロ 123ボン ギ ル, 46-15, 501-2001
(43)公表日	令和5年4月20日(2023.4.20)	(72)発明者	キム ミョンスン 大韓民国, 34049, テジョン, ユソ ン-グ, エクスボ-ロ, 448, 404 -1502
(86)国際出願番号	PCT/KR2021/002735		
(87)国際公開番号	WO2021/177773		
(87)国際公開日	令和3年9月10日(2021.9.10)		
審査請求日	令和4年9月8日(2022.9.8)		
(31)優先権主張番号	10-2020-0028155		
(32)優先日	令和2年3月6日(2020.3.6)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 SARS - COV - 2 診断用組成物、キット及びこれを用いた SARS - COV - 2 の診断方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 10 の配列を含むコロナウイルス (SARS - CoV - 2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) リーダ (leader) を特異的に増幅できる配列番号 1 の配列を含む正方向プライマー及び配列番号 2 の配列を含む逆方向プライマーを含み、増幅されたコロナウイルスリーダに相補的に混成化できる配列番号 3 の配列を含むプローブを含む、コロナウイルス診断用組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物を含む、コロナウイルス診断用キット。

【請求項 3】

配列番号 10 の配列を含むコロナウイルス (SARS - CoV - 2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) リーダ (leader) を特異的に増幅可能な配列番号 1 の配列を含む正方向プライマー及び配列番号 2 の配列を含む逆方向プライマー、並びに、増幅されたコロナウイルスリーダに相補的に混成化できる配列番号 3 の配列を含むプローブをサンプルに処理する段階を含む、コロナウイルス診断のための情報提供方法。

【請求項 4】

前記増幅は、RT - qPCR (Quantitative reverse transcription PCR) によって行われることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)感染の有無を診断するための組成物、該組成物を含むキット及びこれを用いて新型コロナウイルス感染の有無を診断する方法に関する。具体的に、本発明は、新型コロナウイルスに感染された細胞において最も豊富に存在するリーダ(leader)配列をターゲットにして特異的に増幅できる核酸オリゴマーを含む新型コロナウイルス感染の有無を診断するための組成物、該組成物を含むキット及びこれを用いて新型コロナウイルス感染の有無を診断する方法

10

【背景技術】

【0002】

コロナウイルス(Coronavirus)は、約27~32kb程度の一本鎖陽方向鎖RNAゲノム(+)strand RNA genome)で構成されたウイルスであり、人と他の哺乳動物に分布する。コロナウイルスは、複製及び転写過程を経て、ゲノムRNA(genome-RNA)、及び6~8個の3'末端に共通のmRNAを有するサブゲノムRNA(subgenomic RNA)を生産すると知られている(Imbert I et al.; A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS Coronavirus. The EMBO Journal. 2006, 25: 4933-4942)。

20

【0003】

大部分の人にとってコロナウイルス感染は軽い症状で済むが、感染力が高いため、去る20余年間10,000名以上の人々にSARS(重症呼吸器症候群、致死率10%)コロナウイルス及びMERS(中東呼吸器症候群、致死率37%)コロナウイルスが感染された(Chaolin Huang, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu et al.; Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020)。

30

【0004】

ただし、最近に発見された新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染症は、2019年12月1日に中国で発見(Chaolin Huang, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu et al.; Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020)され、2019年12月12日に初報告された急性呼吸器症候群であり、発熱と咳、呼吸困難、非定型肺炎などの症状を示す。

【0005】

2020年1月からは中国以外の国にも広範囲に伝播され、中国内の春節連休を前後にして急速な伝染によって感染者が急増し、武漢市の都市機能全般が麻痺するなど、憂慮すべき事態に進んだ。

40

【0006】

一般に、ウイルスのゲノム分析には、SSP-PCR(Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction)、実時間PCR、PCR-RFLP(PCR-restriction fragment length polymorphism analysis)及びシーケンシングなどの方法が用いられている。SARS-CoV-2感染の有無の診断は、まず、パンコロナウイルス検査によってコロナウイルス検出の有無を確認し、次に、実時間PCRとシーケンシング方法を組み合わせた方法を用いている。このため、感染有無の診断に24時間以上もかかる問題

50

があった。

【0007】

近年、米国疾病管理本部とWHOでは、検査時間を短縮するためにRT-実時間PCR (reverse transcription-real time PCR) 法を開発して供給している (Real time RT-PCR Panel for detection 2019-Novel Coronavirus, Centers for Disease Control and Prevention, Respiratory Viruses Branch, Division of Viral Diseases)。米国疾病管理本部が開発した検査法は、SARS-CoV-2のヌcleoカプシド (nucleocapsid) タンパク質を作るN遺伝子の3つの部位を増幅する方法である。WHOが開発した方法は、スクリーニング確診が同時に可能な単一段階実時間PCR (One-step real time PCR) 方法であって、既存SARS関連ウイルスと配列一致度が高いE遺伝子部位を、スクリーニングのための目的で使用し、SARS-CoV-2感染有無の確診のためにSARS-CoV-2を特異的に検出できるRdRP (RNA dependent RNA polymerase) 遺伝子を増幅する方式である (図1)。

10

【0008】

しかしながら、E遺伝子及びRdRP遺伝子は、ウイルス感染細胞内で存在量が低いため、実験的エラーや検体のRNA安全性によって検出が不可能な場合があり得る。

【0009】

また、米国疾病管理本部とWHOでは、RNA検体適合性判定のための内部対照群遺伝子としてヒトRNase P遺伝子を使用したし、RNase P cDNAを増幅するためのプライマー及びプローブ配列を公開したことがある。しかし、本出願発明者は、公開されたプライマー及びプローブ配列はRNAスプライシングを考慮しないで一番目のエクソン内部をターゲットするプライマーであり、ゲノムDNAに適用時に偽陽性増幅が発生し得ること確認した。検査現場では検体からRNA抽出時にゲノムDNAが完全に除去されない場合が頻繁であるため、検体適合性判定にエラーが発生し得る。

20

【0010】

このような技術的背景の下に、本出願の発明者らは、SARS-CoV-2感染の有無を診断するために、初期感染細胞内に最も豊富に存在するリーダ配列をターゲットとする新しい検出方法を開発した。また、ゲノムDNA由来偽陽性増幅が発生しないように、RNAスプライシングを考慮して内部対照群RNase P遺伝子に対するプライマーを製作した。

30

【0011】

本背景技術の部分に記載された上記の情報は、本発明の背景に関する理解を向上させるためのものに過ぎず、よって、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者にとって既に知られた先行技術に関する情報は含まなくてもよい。

【発明の概要】

【0012】

本発明の目的は、上述した従来技術の問題点を認識し、正確ながらも偽陽性の発生無しでSARS-CoV-2感染の有無を診断できる組成物、キット及びこれを用いた診断方法を提供することである。

40

【0013】

上記の目的を達成するために、本発明は、配列番号10の配列を含むコロナウイルス (SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) リーダ (leader) を特異的に増幅できる核酸オリゴマーを含むコロナウイルス診断用組成物に関する。

【0014】

本発明は、また、前記組成物を含むコロナウイルス診断用キットに関する。

【0015】

50

本発明は、さらに、配列番号10の配列を含むコロナウイルス(SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)リーダ(leader)を特異的に増幅できる核酸オリゴマーをサンプルに処理する段階を含むコロナウイルス診断のための情報提供方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】WHO勧告による新型コロナウイルス診断のための遺伝子を示すものである。

【図2】コロナウイルスサブゲノムRNA(sub-genomic RNA)が発現する機序を示すものである。

【図3】本発明の一実施例によってSARS-CoV-2リーダRNA配列をRT-qPCRを行って検出した結果を示すものである。

10

【図4】本発明の一実施例によってSARS-CoV-2 RNAからリーダ配列をRT-qPCRを行って増幅した結果を示すものである。

【図5A】RNase P遺伝子構造及び本発明の核酸オリゴマーが増幅する部位を示すものである。

【図5B】RNase P遺伝子をRT-qPCRを行って増幅した結果を示すものである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

特に断りのない限り、本明細書で使われる技術的及び科学的用語はいずれも、本発明の属する技術の分野における熟練した専門家によって通常理解されるのと同じ意味を有する。一般に、本明細書における命名法は、本技術分野でよく知られており、通常使われるものである。

20

【0018】

本出願の発明者らは、SARS-CoV-2感染有無の診断のために初期感染細胞内に最も豊富に存在するリーダ配列をターゲットとする新しい検出方法によって新型コロナウイルス感染の有無を迅速且つ正確に診断できることを確認した。

【0019】

このような観点で、本発明は、配列番号10の配列を含むコロナウイルス(SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)リーダ(leader)を特異的に増幅できる核酸オリゴマーを含むコロナウイルス診断用組成物に関する。

30

【0020】

また、本発明は、配列番号10の配列を含むコロナウイルス(SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)リーダ(leader)を特異的に増幅できる核酸オリゴマーをサンプルに処理する段階を含むコロナウイルス診断のための情報提供方法に関する。

【0021】

前記リーダ配列と関連して、コロナウイルスのうちゲノムRNA及び転写発現したサブゲノムmRNA(sub-genomic mRNA)は、5'末端に、約72~77bpで構成されたリーダ配列を共通に有しており、これがコロナウイルスの独特の特徴であり、ウイルス配列のうち感染細胞において最も豊富に存在するターゲットである。これは、コロナウイルスの全てのサブゲノムRNAは、ゲノムRNAの5'末端から誘導された約72bpに該当するリーダ配列(leader RNA)が、各サブゲノムRNAの5'末端に結合するリーダジョイニング(leader joining)現象を示すためである。

40

【0022】

したがって、リーダ配列は、細胞内でウイルス遺伝子のうち最も複製数が高く、Nタンパク質をコードするサブゲノムRNAの複製数とその次に高い。したがって、軽微な症状の初期感染において低い量で存在するコロナウイルスの効果的な検出のためには、リーダ配列を検出の標的として用いることが最も効果的であるといえる。

50

【0023】

本明細書において、核酸オリゴマーは、核酸を単量体にして重合して生成される2個以上のヌクレオチドを含む物質を意味できる。前記核酸オリゴマーは、プライマー又はプローブとして働くことができる。

【0024】

本明細書において「プライマー」は、適切な温度及び緩衝液中で適切な条件（すなわち、4種の異なるヌクレオシドトリホスフェート及び重合反応酵素）下で鋳型-指示DNA合成の開始点として作用し得る一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。前記プライマーは、増幅される遺伝子ローカスの各鎖と“たいてい”相補性を有するように作製されてよい。これは、重合反応を行う条件においてプライマーが対応の核酸手順とハイブリダイゼーションされるに十分な相補性を有することを意味する。

10

【0025】

一実施例において、配列番号10の配列を含むコロナウイルス(SARS-CoV-2)リーダを特異的に増幅できる核酸オリゴマーは、例えば、配列番号1又は配列番号2の配列を含むプライマーであってよい。

【0026】

前記プライマーは、例えば、PCRのために正方向及び逆方向プライマーを対にして同時に使用することができる。配列番号10の配列を含むSARS-CoV-2リーダ配列を特異的に増幅する正方向プライマーとして、例えば、配列番号1の配列を含むことができる。前記逆方向プライマーとして、例えば、配列番号2の配列を含むことができる。

20

【0027】

また、RNAスプライシングを考慮して内部対照群RNase P遺伝子に対するプライマーを作製し、ゲノムDNA由来偽陽性増幅が発生しないことを確認した。

【0028】

内部対照群遺伝子は、RNA検体適合性の判定のためのオリゴヌクレオチドであり、標的遺伝子と相補性がなくてよい。本発明の具体的実施例において、従来の内部対照群遺伝子としてヒトRNase P遺伝子を使用した。

【0029】

CDCによって公開されたRNase P cDNAを増幅するためのプライマー及びプローブ配列は、RNAスプライシングを考慮しないで一番目のエクソン内部をターゲットするプライマーであり、ゲノムDNAに適用時に偽陽性増幅が発生し得ることを確認した。検査現場では検体からRNA抽出時にゲノムDNAが完全に除去されない場合が頻繁であるため、検体適合性の判定にエラーが発生し得る。

30

【0030】

一実施例において、配列番号11の配列を含むRNase Pを特異的に増幅できる核酸オリゴマーをさらに含むことができる。

【0031】

前記核酸オリゴマーは、例えば、配列番号7又は配列番号9の配列を含むプライマーであってよい。本願発明に係るプライマーは、一番目のエクソンの5'部位に相補的な配列をターゲットにし、ゲノムDNAに適用時に偽陽性増幅が発生しないことを確認した。

40

【0032】

前記プライマーは、例えば、PCRのために正方向及び逆方向プライマーを対にして同時に使用することができる。配列番号11の配列を含むRNase Pを特異的に増幅する正方向プライマーとして、例えば、配列番号7の配列を含むことができる。前記逆方向プライマーとして、例えば、配列番号8の配列を含むことができる。

【0033】

本発明は、核酸オリゴマーによって特異的に増幅されたコロナウイルスリーダ又はRNase P産物に相補的に混成化できるプローブをさらに含むことができる。

【0034】

前記プローブと関連して、これは特定条件で増幅産物と混成化可能なオリゴヌクレオチ

50

ドを意味する。

【0035】

混成化反応において、厳格な特定レベルを達成するために用いられる条件は、混成化される核酸の性質によって様々である。例えば、混成化される核酸部位の長さ、相同性程度、ヌクレオチド配列組成（例えば、GC/AT組成比）及び核酸タイプ（例えば、RNA、DNA）などが混成化条件を選択する上で考慮される。追加の考慮条件は、核酸が例えばフィルターなどに固定化しているか否かである。

【0036】

非常に厳格に進行される条件の例を挙げると、次の通りである：室温での2X SSC / 0.1% SDS（混成化条件）；室温での0.2X SSC / 0.1% SDS（厳格性が低い条件）；42 °Cでの0.2X SSC / 0.1% SDS（普通の厳格性を有する条件）；68 °Cでの0.1X SSC（高い厳格性を有する条件）。洗浄過程は、これらのいずれか一条件を用いて行うことができ、例えば、高い厳格性を有する条件、又は前記条件のそれぞれを用いることができ、前記記載された順にそれぞれ10～15分ずつ、前記記載された条件を全部又は一部反復して行うことができる。ただし、上述した通り、最適条件は、含まれた特別な混成化反応によって様々であり、実験によって決定できる。一般に、重要なプローブの混成化には、高い厳格性を有する条件が用いられる。

10

【0037】

一実施例において、前記増幅されたコロナウイルスリーダに相補的に混成化できるプローブは、例えば、配列番号3の配列を含むことができる。

20

【0038】

一実施例において、内部対照群として用いられた前記増幅されたRNase P産物に相補的に混成化できるプローブは、配列番号9の配列を含むことができる。

【0039】

場合によって、プローブは、検出可能に標識され、例えば、放射線同位元素、蛍光化合物、バイオ発光化合物、化学発光化合物、金属キレート又は酵素で標識されてよい。上記のようなプローブを適当に標識することは、当該分野で広く知られた技術であり、通常の方法によって行うことができる。

【0040】

前記増幅産物の量は、蛍光信号によって検出されてよい。プローブが結合した増幅産物の二重螺旋DNAに結合して蛍光を示す試薬（intercalator）を使用するインターカレーティング（Intercalating）法、5'末端は蛍光物質、3'末端は消光子（quencher）で標識されたオリゴヌクレオチドを使用する方法などがある。

30

【0041】

本願発明に係る増幅は、逆転写酵素（Reverse transcriptase）を用いて実時間定量増幅、例えば実時間重合酵素連鎖反応（Real-Time PCR）によって行われてよく、実時間重合酵素連鎖反応においてPCR増幅産物の量は蛍光信号によって検出できる。実時間重合酵素連鎖反応が進行しながら増加するポリヌクレオチド量によって蛍光信号の強度が増加し、増幅サイクル回数による蛍光信号強度を示す増幅プロファイル（amplification profile）曲線が得られる。

40

【0042】

増幅プロファイル曲線は、一般に、実質的なポリヌクレオチド量が反映されていない背景の蛍光信号が見られるベースライン（baseline）領域、ポリヌクレオチド生成物量の増加による蛍光信号の増加が見られる指数領域（exponential region）、及びPCR反応が飽和状態に達し、蛍光信号強度の増加が見られない停滞状態領域（plateau region）に分けられる。

【0043】

通常、ベースライン領域から指数領域に移る地点、すなわち、PCR増幅産物量が蛍光で検出可能な量に到達した時の蛍光信号強度を臨界値（threshold）といい、

50

増幅プロファイル曲線において臨界値に対応する増幅サイクル回数を臨界サイクル (*t h r e s h o l d c y c l e : C t*) 値という。

【0044】

前記 *C t* 値を測定し、標準物質に対する *C t* (*t h r e s h o l d c y c l e*) 値に基づいて濃度が決定された標準曲線を分析して、増幅された遺伝子の濃度を確認することにより、メチル化特異的の感度及び/又は特異度を決定することができる。

【0045】

一実施例において、前記検体は、疑いのある患者又は診断対象個人又は個人由来の体液、細胞株、組織培養などから得られる広範囲なあらゆる生物学的体液を含むことができ、例えば、下気道の痰、上気道の口腔咽頭スワブ及び/又は鼻咽頭スワブ、培養検体、組織検体又は血液などでよいが、これに制限されるものではない。

10

【0046】

前記検体から核酸を抽出する段階をさらに含むことができ、核酸の抽出は、例えば、商業化して供給されている様々なキット又は抽出試薬を用いて行われてよい。

【0047】

本発明は、他の観点において、前記組成物を含むキットに関する。

【0048】

一実施例において、前記キットは、サンプルを入れる区画したキャリア手段、試薬を含有する容器、核酸オリゴマーを含有する容器を含むことができる。場合によって、遺伝子増幅産物のそれぞれを検出するためのプローブを含有する容器をさらに含むことができる。

20

【0049】

前記キャリア手段は、瓶、チューブのような一つ以上の容器を収容するのに適し、各容器は、本発明の方法に用いられる独立的構成要素を含有する。本発明の明細書において、当該分野における通常の知識を有する者は、容器中に必要な製剤を容易に分配することができる。

【0050】

本発明に係るキットは、場合によって、重合酵素、バッファー、デオキシリボヌクレオチド - 5 - トリホスフェートのような核酸増幅 *P C R* 反応を実施するのに必要な試薬を選択的に含むことができる。本発明に係るキットは、また、様々なポリヌクレオチド分子、様々なバッファー及び試薬をさらに含むことができる。

30

【0051】

前記キットにおいて特定反応のために用いられる試薬、バッファー又は反応物の最適量は当業者によって決定されてよく、先に言及されたプライマー又はプローブをそれぞれ含む別個の包装又はコンパートメント (*c o m p a r t m e n t*) として制作されてよい。

【実施例】

【0052】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。これらの実施例は単に本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されるものと解釈されないことは、当業界における通常の知識を有する者にとって明らかであろう。

【0053】

40

実施例 1 : *S A R S - C o V - 2* 検出及び内部対照遺伝子検出用プライマー及びプローブ設計

【0054】

S A R S - C o V - 2 (*G e n B a n k N o . M N 9 8 8 6 6 8 . 1* : 配列番号 1 2) のリーダ配列 *c D N A* (配列番号 1 0) 及び内部対照遺伝子 *R N a s e P* (配列番号 1 1) の増幅のためのプライマー及びプローブは、*Primer 3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) プログラムを用いて設計した (表 1) 。

【0055】

50

【表 1】

プライマー及びプローブ配列

Name		Sequence (5' →3')	配列番号	増幅産物 サイズ
リーダ	正方向 プライマー	ATTA AAG GTT TAT ACC TTC CCA GG	1	72
	逆方向 プライマー	CGT TTA GAG AAC AGA TCT ACA AG	2	
	プローブ	FAM-TAA CAA ACC AAC CAA C TTT CGA TCT-BHQ1	3	
RNase P (米国 CDC勧告)	正方向 プライマー	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	4	65
	逆方向 プライマー	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	5	
	プローブ	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	6	
RNase P	正方向 プライマー	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	7	92
	逆方向 プライマー	TGA TAG CAA CAA CTG AAT AGC	8	
	プローブ	FAM-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ1	9	
リーダ配列		ATTAAGGTT TATACCTTCC CAGGTAACAA ACCAACCAAC TTTCGATCTC TTGTAGATCT GTCTCTAAA CG	10	
RNase P 配列		TGTTTCAGA TTGGACCTG CGAGCGGGT CTGACCTGAA GGCTCTGCGC GGACTTGTGG AGACAGCCGC TCACCTTGGC TATTCAGTTG TTGCTATCAA TCATATCGTT GACTTTAAGG AAAAGAAACA GGAAATTGAA AAACCAGTAG CTGTTTCTGA ACTCTTCACA ACTTTGCCAA TTGTACAGGG AAAATCAAGA	11	

【 0 0 5 6 】

実施例 2 : SARS - CoV - 2リーダ及びRNase P 遺伝子RNA合成

【 0 0 5 7 】

SARS - CoV - 2のリーダ配列に該当するRNAを合成するために、SARS - CoV - 2のうちリーダ配列72bp(配列番号10)を含む110bp(配列番号13)に該当するDNAを合成した(NeoProbe, 韓国)。RNase P遺伝子(GenBank No. NC_000010.11:配列番号14)のRNAを合成するために、RNase P配列に該当する180bp DNA(配列番号2)を合成した。各合成されたDNAの5'末端にはT7プロモーター配列を連結してin vitro転写(transcription)方法でRNAを作製した。

【 0 0 5 8 】

(1) In vitro転写(IVT)

【 0 0 5 9 】

2個の鋳型PCR産物を50ngずつ使用してMEGAScript™ T7転写キット, Invitrogen)を用いてメーカー指針に従って下記のように行った。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

【表 2】

成分	使用量	反応条件
リーダ, RNase P PCR産物	50 ng	37℃で2時間
ATP (10 mM)	2 μ l	
GTP (10 mM)	2 μ l	
CTP (10 mM)	2 μ l	
UTP (10 mM)	2 μ l	
10X Buffer	2 μ l	
T7 Enzyme	2 μ l	
Total volume	20 μ l	

10

【0061】

2時間の反応が終わった後、残余DNA除去のためにDNase 4 μ lを添加し、37℃で15分間反応させた。合成されたリーダ及びRNase P RNAは、QIAamp RNasyミニキット(Qiagen)を用いてメーカー指針に従って精製した。最終的に合成されたRNAは、50 μ l RNase-free DWで溶出した。

20

【0062】

実施例3：逆転写重合酵素実時間SARS-CoV-2リーダcDNA及びRNase P cDNA検出

【0063】

RT-qPCRは、次のような方法で行った。反応液の組成は下表の通りであり、RT-qPCR反応は、AB 7500 Fast (ThermoFisher, USA) 装置を用いた。一番目の逆転写段階(Reverse transcription; RT)でRNAに相補的なcDNAを作り、二番目の実時間PCR(qPCR)段階でcDNAを増幅した。

30

【0064】

【表 3】

RT-qPCR反応液組成

試薬	濃度	体積(μ L)
RNA sample	-	5
Master mix*	4X	5
Forward primer	10 pmole/ μ L	1
Reverse primer	10 pmole/ μ L	1
Probe	5 pmole/ μ L	1
RNase free water	-	8
Total	-	20

40

*TOPreal One-step RT-qPCR kit (enzymomics, 韓国)

【0065】

50

【表 4】

RT-qPCR条件

段階	Stage	Cycles	温度	時間
Reverse transcription	1	1	50℃	30 min
RT-Inactivation/Initial denaturation	2	1	95℃	10 min
Amplification	3	40	95℃	15 sec
			60℃	60 sec

10

【0066】

(1) SARS-CoV-2リーダRNA配列検出結果

【0067】

SARS-CoV-2リーダRNA配列に相補的なcDNA検出を確認するためにリーダRNA (10⁴コピー)、In vitro転写に使用したリーダDNA (10⁴コピー)、ヒトゲノムDNA (human genomic DNA) (10 ng) 及びヒト全RNA (human total RNA) (10 ng) を使用して単一段階RT-qPCR (One-step RT-qPCR) を行った (図3)。その結果、リーダcDNA及びリーダDNAにおいてのみ増幅が確認され、残りの鑄型における非特異的な増幅はないことを確認した (表5)。

20

【0068】

【表 5】

SARS-CoV-2リーダRNA検出結果

サンプル	増幅係数 (Cycle Threshold; C _T)
リーダRNA (10 ⁴ コピー)	28.6
	28.5
リーダDNA (10 ⁴ コピー)	30.0
	29.1
ヒトゲノムDNA (10 ng)	不検出
	不検出
ヒト全RNA (10 ng)	不検出
	不検出
D.W	不検出
	不検出

30

40

【0069】

実際のSARS-CoV-2リーダRNAの増幅の有無を確認するために、韓国国家病原体資源銀行で韓国人から分離したSARS-CoV-2を培養して分離したRNAを使

50

用した。単一段階 R T - q P C R は上記と同じ方法で行った。試験の結果、S A R S - C o V - 2 のリーダ R N A が正常に増幅されることを確認した（図 4、表 6）

【 0 0 7 0 】

【表 6】

S A R S - C o V - 2 R N A からリーダ R N A 検出結果

サンプル	増幅係数 (Cycle Threshold; C _T)
SARS-CoV-2 RNA (5 ng)	18.2
リーダRNA (10 ⁴ コピー)	29.4
リーダDNA	31.3
D.W	不検出

10

【 0 0 7 1 】

(2) R N a s e P R N A 検出結果

【 0 0 7 2 】

R N A 検体適合性判定のための内部対照群遺伝子は、ヒト R N a s e P 遺伝子を使用した。R N a s e P R N A を増幅するためのプライマー及びプローブは、米国疾病管理本部が公開した配列があるが、本出願の発明者が確認した結果、R N A スプライシングを考慮しないで一番目のエクソン内部でプライマーが作製され、ゲノム D N A において偽陽性増幅が発生した。

20

【 0 0 7 3 】

これは、検体から R N A 抽出時にゲノム D N A が完全に除去されない場合が頻繁であるため、検体適合性判定にエラーが発生することがあり、よって、本発明者らはこのような問題を解決するために、R N A スプライシングを考慮してゲノム D N A 由来偽陽性増幅が発生しないように新規逆方向プライマーを作製した。

【 0 0 7 4 】

図 5 A に示すように、R N a s e P 遺伝子は、総 3 6 . 6 k b 程度の配列で構成された遺伝子であり、総 1 1 個のエクソンで構成されている。

30

【 0 0 7 5 】

米国疾病管理本部が提供する R N a s e P 遺伝子配列に該当するプライマー及びプローブはいずれも R N A スプライシングを考慮しないで一番目のエクソンに該当する部位において作製され、ヒトゲノム D N A を対象に増幅した時に、偽陽性増幅が起きた（図 5 B の (a) ）。これに対し、本発明者らが開発した逆方向プライマーを使用した場合には、ヒトゲノム D N A から偽陽性増幅が発生しなかった（図 5 B の (b) ）。

【 0 0 7 6 】

したがって、本発明者は、約 2 . 8 k b 離れている二番目のエクソンの 5 ' 部位に相補的な部位に対する逆方向プライマーを新規に作製することにより、ゲノム D N A による偽陽性増幅問題を解決した。I V T した R N a s e P R N A とヒト全 R N A を対象に増幅した結果、正常の増幅が起きることを確認した（表 7）。

40

【 0 0 7 7 】

50

【表 7】

RNase P 遺伝子増幅結果

サンプル	増幅係数 (Cycle Threshold: C _T)
RNase P RNA (10 pg)	14.5
ヒト全 RNA (10 ng)	26.6
D.W	不検出

10

【0078】

実施例 4：リーダ配列を用いた SARS-CoV-2 診断能力評価

【0079】

配列番号 10 のリーダ配列を用いた SARS-CoV-2 の診断能力を評価するために、ヨンナム大学病院 (IRB No. YUMC 2020-07-001) に保管中の既に SARS-CoV-2 診断結果を知っている上気道検体 (陰性 180 例、陽性 76 例) から QIAamp Viral RNA ミニキット (Qiagen, Cat. No: 52904 or 52906) を用いてメーカーのプロトコルに従って RNA を抽出した。RNase P 遺伝子を内部対照群として用いた (表 8 の ICCT 値参照)。

【0080】

SARS-CoV-2 感染の有無を診断するために、RT-qPCR は実施例 3 に記述の方法で行った (表 8)。

20

【0081】

30

40

50

【表 8】

リーダ配列を用いたSARS-CoV-2 RT-qPCR結果

登録番号	診断結果	リーダ配列を用いた診断結果		
		リーダCT	IC CT	診断結果
R001	陰性	ND	26.6	陰性
R002	陰性	ND	28.38	陰性
R003	陰性	ND	24.29	陰性
R004	陰性	ND	25.91	陰性
R005	陰性	ND	25.87	陰性
R006	陰性	ND	23.5	陰性
R007	陰性	ND	26.93	陰性
R008	陰性	ND	25.21	陰性
R009	陰性	ND	25.94	陰性
R010	陰性	ND	27.27	陰性
R011	陰性	ND	26	陰性
R012	陰性	ND	28.51	陰性
R013	陰性	ND	24.01	陰性
R014	陰性	ND	23.96	陰性
R015	陰性	ND	28.24	陰性
R016	陰性	ND	27.07	陰性
R017	陰性	ND	25.33	陰性
R018	陰性	ND	26.9	陰性
R019	陰性	ND	25.13	陰性
R020	陰性	ND	26.34	陰性
R021	陰性	ND	27.14	陰性
R022	陰性	ND	27.48	陰性
R023	陰性	ND	25.6	陰性
R024	陰性	ND	25.65	陰性
R025	陰性	ND	25.59	陰性

10

20

30

【 0 0 8 2 】

40

50

R026	陰性	ND	27.62	陰性
R027	陰性	ND	29	陰性
R028	陰性	ND	24.87	陰性
R029	陰性	ND	27.73	陰性
R030	陰性	ND	27.02	陰性
R031	陰性	ND	26.83	陰性
R032	陰性	ND	25.82	陰性
R033	陰性	ND	26.37	陰性
R034	陰性	ND	27.66	陰性
R035	陰性	ND	27.17	陰性
R036	陰性	ND	25.01	陰性
R037	陰性	ND	23.79	陰性
R038	陰性	ND	29.59	陰性
R039	陰性	ND	24.02	陰性
R040	陰性	ND	28.06	陰性
R041	陰性	ND	21.95	陰性
R042	陰性	ND	24.04	陰性
R043	陰性	ND	26.61	陰性
R044	陰性	ND	25.9	陰性
R045	陰性	ND	25.08	陰性
R046	陰性	ND	23.81	陰性
R047	陰性	ND	24.37	陰性
R048	陰性	ND	24.17	陰性
R049	陰性	ND	29.86	陰性
R050	陰性	ND	26.25	陰性
R051	陰性	ND	27.9	陰性
R052	陰性	ND	27.35	陰性
R053	陰性	ND	25.89	陰性

10

20

30

40

【 0 0 8 3 】

50

R054	陰性	ND	27.4	陰性
R055	陰性	ND	24.25	陰性
R056	陰性	ND	27.25	陰性
R057	陰性	ND	25.26	陰性
R058	陰性	ND	24.2	陰性
R059	陰性	ND	28.34	陰性
R060	陰性	ND	26.49	陰性
R061	陰性	ND	22.59	陰性
R062	陰性	ND	24.98	陰性
R063	陰性	ND	25.13	陰性
R064	陰性	ND	25.73	陰性
R065	陰性	ND	29.11	陰性
R066	陰性	ND	27.97	陰性
R067	陰性	ND	25.16	陰性
R068	陰性	ND	26.24	陰性
R069	陰性	ND	25.03	陰性
R070	陰性	ND	25.79	陰性
R071	陰性	ND	23.83	陰性
R072	陰性	ND	24.51	陰性
R073	陰性	ND	25.32	陰性
R074	陰性	ND	24.65	陰性
R075	陰性	ND	29.24	陰性
R076	陰性	ND	22.25	陰性
R077	陰性	ND	23.34	陰性
R078	陰性	ND	24.36	陰性
R079	陰性	ND	22.93	陰性
R080	陰性	ND	20.96	陰性
R081	陰性	ND	25.95	陰性

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

50

R082	陰性	ND	28.71	陰性
R083	陰性	ND	25.68	陰性
R084	陰性	ND	28.28	陰性
R085	陰性	ND	27.91	陰性
R086	陰性	ND	27.89	陰性
R087	陰性	ND	30.47	陰性
R088	陰性	ND	26.24	陰性
R089	陰性	ND	27.64	陰性
R090	陰性	ND	26.04	陰性
R091	陰性	ND	26.55	陰性
R092	陰性	ND	27.4	陰性
R093	陰性	ND	26.83	陰性
R094	陰性	ND	28.07	陰性
R095	陰性	ND	25.92	陰性
R096	陰性	ND	22.33	陰性
R097	陰性	ND	26.18	陰性
R098	陰性	ND	26.38	陰性
R099	陰性	ND	27.58	陰性
R100	陰性	ND	26.81	陰性
R101	陰性	ND	24.08	陰性
R102	陰性	ND	27.34	陰性
R103	陰性	ND	27.97	陰性
R104	陰性	ND	26.03	陰性
R105	陰性	ND	28.27	陰性
R106	陰性	ND	25.36	陰性
R107	陰性	ND	24.23	陰性
R108	陰性	ND	27.33	陰性
R109	陰性	ND	25.48	陰性

10

20

30

40

【 0 0 8 5 】

50

R110	陰性	ND	28.53	陰性
R111	陰性	ND	24.97	陰性
R112	陰性	ND	28.09	陰性
R113	陰性	ND	24.64	陰性
R114	陰性	ND	24.02	陰性
R115	陰性	ND	24.97	陰性
R116	陰性	ND	25.91	陰性
R117	陰性	ND	22.33	陰性
R118	陰性	ND	25.56	陰性
R119	陰性	ND	23.95	陰性
R120	陰性	ND	25.59	陰性
R121	陰性	ND	24.63	陰性
R122	陰性	ND	25.28	陰性
R123	陰性	ND	24.96	陰性
R124	陰性	ND	21.72	陰性
R125	陰性	ND	23.01	陰性
R126	陰性	ND	23.88	陰性
R127	陰性	ND	22.66	陰性
R128	陰性	ND	25.04	陰性
R129	陰性	ND	26.42	陰性
R130	陰性	ND	25.93	陰性
R131	陰性	ND	30.15	陰性
R132	陰性	ND	27.59	陰性
R133	陰性	ND	27.36	陰性
R134	陰性	ND	24.31	陰性
R135	陰性	ND	26.59	陰性
R136	陰性	ND	26.55	陰性
R137	陰性	ND	24.53	陰性

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

50

R138	陰性	ND	24.56	陰性
R139	陰性	ND	25.42	陰性
R140	陰性	ND	24.22	陰性
R141	陰性	ND	24.7	陰性
R142	陰性	ND	27.19	陰性
R143	陰性	ND	24.59	陰性
R144	陰性	ND	28.67	陰性
R145	陰性	ND	27.58	陰性
R146	陰性	ND	27.21	陰性
R147	陰性	ND	27.7	陰性
R148	陰性	ND	24.85	陰性
R149	陰性	ND	25.44	陰性
R150	陰性	ND	25.13	陰性
R151	陰性	ND	28.13	陰性
R152	陰性	ND	28.61	陰性
R153	陰性	ND	28.67	陰性
R154	陰性	ND	28.59	陰性
R155	陰性	ND	27.42	陰性
R156	陰性	ND	27.96	陰性
R157	陰性	ND	29.43	陰性
R158	陰性	ND	27.37	陰性
R159	陰性	ND	25.77	陰性
R160	陰性	ND	26.92	陰性
R161	陰性	ND	25.88	陰性
R162	陰性	ND	26.77	陰性
R163	陰性	ND	26.09	陰性
R164	陰性	ND	24.66	陰性
R165	陰性	ND	24.1	陰性

10

20

30

40

【 0 0 8 7 】

50

R166	陰性	ND	24.45	陰性
R167	陰性	ND	30.2	陰性
R168	陰性	ND	23.26	陰性
R169	陰性	ND	23.81	陰性
R170	陰性	ND	25.79	陰性
R171	陰性	ND	27.42	陰性
R172	陰性	ND	25.4	陰性
R173	陰性	ND	28.27	陰性
R174	陰性	ND	24.02	陰性
R175	陰性	ND	26.58	陰性
R176	陰性	ND	25.87	陰性
R177	陰性	ND	23.54	陰性
R178	陰性	ND	26.46	陰性
R179	陰性	ND	27.93	陰性
R180	陰性	ND	24.93	陰性
R181	陽性	15.89	29.1	陽性
R182	陽性	17.51	24.48	陽性
R183	陽性	24.65	26.08	陽性
R184	陽性	30.43	26.78	陽性
R185	陽性	25.29	23.49	陽性
R186	陽性	15.79	33.8	陽性
R187	陽性	18.96	30.92	陽性
R188	陽性	17.8	26.92	陽性
R189	陽性	23.24	22.15	陽性
R191	陽性	17.58	24.51	陽性
R192	陽性	18.6	22.82	陽性
R193	陽性	17.43	25.46	陽性
R194	陽性	13.93	30.9	陽性

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

50

R195	陽性	30.01	24.01	陽性
R196	陽性	26.91	26.21	陽性
R197	陽性	22.91	25.95	陽性
R198	陽性	18.54	28.18	陽性
R199	陽性	25.64	24.18	陽性
R200	陽性	16.22	25.53	陽性
R201	陽性	29.71	24.5	陽性
R202	陽性	15.93	25.56	陽性
R203	陽性	22.19	24.07	陽性
R204	陽性	23.73	23.03	陽性
R205	陽性	23.13	22.97	陽性
R206	陽性	23.84	23.44	陽性
R207	陽性	21.63	24.55	陽性
R208	陽性	17.07	31.71	陽性
R209	陽性	30.1	26.43	陽性
R210	陽性	30.04	25.76	陽性
R211	陽性	23.63	24.32	陽性
R212	陽性	20.47	25.35	陽性
R213	陽性	16.1	31.59	陽性
R214	陽性	22.93	23.94	陽性
R215	陽性	20.87	24.92	陽性
R216	陽性	22.26	25.59	陽性
R217	陽性	23.36	23.59	陽性
R218	陽性	22.04	24.35	陽性
R219	陽性	27.45	24.91	陽性
R220	陽性	30.93	27.3	陽性
R221	陽性	25.13	24.84	陽性
R222	陽性	24.68	23.88	陽性

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

50

R223	陽性	23.54	23.72	陽性
R224	陽性	24.18	25.31	陽性
R225	陽性	15.54	21.19	陽性
R226	陽性	28.36	25.1	陽性
R227	陽性	22.45	24.56	陽性
R228	陽性	28.09	25.5	陽性
R229	陽性	30.9	23.31	陽性
R230	陽性	26.27	26.84	陽性
R231	陽性	27.06	29.85	陽性
R232	陽性	31.67	30.33	陽性
R233	陽性	25.96	28.19	陽性
R234	陽性	31.34	25.67	陽性
R235	陽性	26.93	26.12	陽性
R236	陽性	28.01	24.88	陽性
R237	陽性	26.1	26.13	陽性
R238	陽性	18.26	24.35	陽性
R239	陽性	15.31	23.62	陽性
R240	陽性	21.89	22.6	陽性
R241	陽性	26.76	20.97	陽性
R242	陽性	26.95	24.8	陽性
R243	陽性	21.65	23.8	陽性
R244	陽性	28.88	24.01	陽性
R245	陽性	31.38	25.43	陽性
R246	陽性	31.93	29.09	陽性
R247	陽性	28.36	25.58	陽性
R248	陽性	28.93	23.44	陽性
R249	陽性	20.91	23.07	陽性
R250	陽性	14.19	ND	陽性

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

50

R251	陽性	19.31	23.99	陽性
R252	陽性	20.19	28.99	陽性
R253	陽性	12.24	36.99	陽性
R254	陽性	22.39	27.87	陽性
R255	陽性	21.85	24.74	陽性
R256	陽性	23.42	24.13	陽性
R257	陽性	19.99	23.32	陽性

10

【0091】

リーダ配列を用いたSARS-CoV-2診断の結果、敏感度は100% (76/76) として特異度は100% (180/180) と優れていることを確認した(表9)。したがって、リーダ配列を用いたSARS-CoV-2診断の有効性があることを確認した。

【0092】

【表9】

リーダ配列を用いたSARS-CoV-2試験医療機器の敏感度及び特異度

敏感度(%)	特異度(%)	敏感度95%信頼区間	特異度95%信頼区間
100	100	95.3 - 100	97.9 - 100

20

【産業上の利用可能性】

【0093】

本発明によれば、短時間で結果確認が可能なので、新型コロナウイルス感染の有無を迅速に診断でき、偽陽性が発生しないようにすることにより、正確な診断が可能である。

【0094】

以上、本発明の内容の特定の部分を詳細に記述したところ、当業界における通常の知識を有する者にとって、このような具体的記述は単に好ましい実施の態様に過ぎず、これによって本発明の範囲が制限されるものでない点は明らかであろう。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付する請求項とそれらの等価物によって定義されるといえよう。

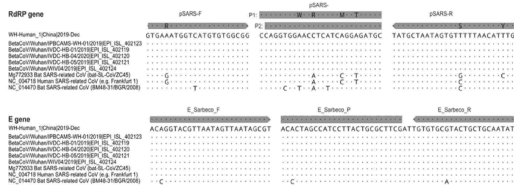
30

40

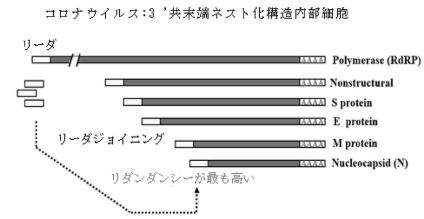
50

【図面】

【図 1】



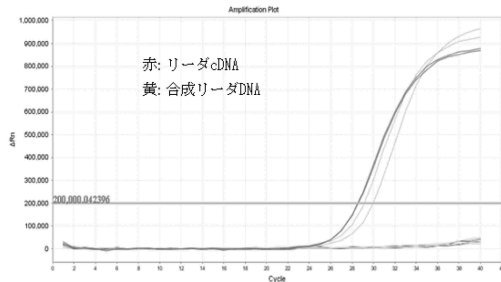
【図 2】



10

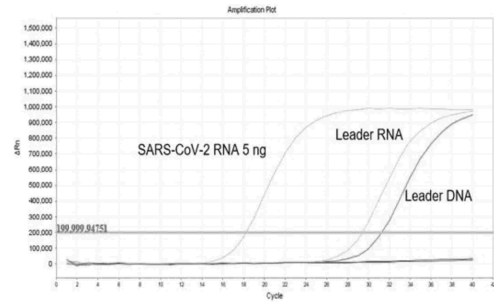
【図 3】

RT-qPCR 結果



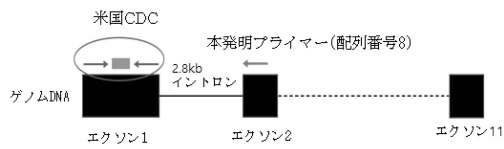
【図 4】

RT-qPCR 結果

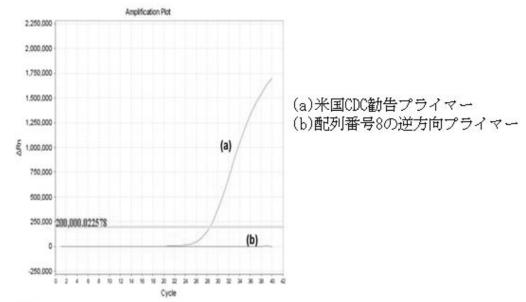


20

【図 5 A】



【図 5 B】



30

40

50

【配列表】

0007419552000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

審査官 牧野 晃久

- (56)参考文献 韓国公開特許第10 - 2006 - 0017212 (KR, A)
特表2006 - 523460 (JP, A)
国際公開第2016 / 179509 (WO, A1)
Journal of Clinical Microbiology, 2015年, Vol. 53, No. 8, pp. 2722-2726, doi: 10.1128/JCM.01224-15
Nature, 2020年02月03日, Vol. 579, pp. 265-269, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome, GenBank [online], 2020年01月17日, [2023年8月7日検索], インターネット URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1798172431?sat=47&satkey=151862762>, Accession No. MN908947.3
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00 - 1/70
Caplus / REGISTRY (STN)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq