

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7360752号

(P7360752)

(45)発行日 令和5年10月13日(2023.10.13)

(24)登録日 令和5年10月4日(2023.10.4)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z

C 1 2 Q 1/6888(2018.01)

C 1 2 Q 1/6888

Z Z N A

C 1 2 Q 1/6806(2018.01)

C 1 2 Q 1/6806

Z

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/686

Z

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

P

請求項の数 7 (全27頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-513876(P2022-513876)

(86)(22)出願日 令和2年7月24日(2020.7.24)

(65)公表番号 特表2022-546507(P2022-546507
A)

(43)公表日 令和4年11月4日(2022.11.4)

(86)国際出願番号 PCT/KR2020/009829

(87)国際公開番号 WO2021/040245

(87)国際公開日 令和3年3月4日(2021.3.4)

審査請求日 令和4年4月27日(2022.4.27)

(31)優先権主張番号 10-2019-0106466

(32)優先日 令和1年8月29日(2019.8.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者 515140130

インダストリー - アカデミック、コーオ
ペレーション、ファウンデーション、チ
ョスン、ユニバーシティINDUSTRY - ACADEMIC
COOPERATION FOUNDA
TION, CHOSUN UNIVER
SITY大韓民国クァンジュ、トン - グ、ピルム
ン - デロ、3 0 9

(74)代理人 110001416

弁理士法人信栄事務所

(72)発明者 キム, ドン ミン

大韓民国、6 1 7 0 4 クァンジュ ナム
- グ ボンソンジュンアン - ロ、6、4
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 重症熱性血小板減少症候群ウイルス遺伝子検出用組成物及びこれを用いた重症熱性血小板減少症候群の診断方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 及び配列番号 3 のプライマー対；及び配列番号 4 のプローブ；を含む、重症熱性血小板減少症候群 (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) ウイルス遺伝子検出用組成物。

【請求項 2】

上記配列番号 2 及び配列番号 3 のプライマー対；及び配列番号 4 のプローブ；は、配列番号 1 からなる重症熱性血小板減少症候群 (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome) ウイルスの S セグメント (Small segment; S segment) に特異的に結合することを特徴とする、請求項 1 に記載の重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス遺伝子検出用組成物。

【請求項 3】

請求項 1 の組成物を含む、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 診断用キット。

【請求項 4】

(1) 重症熱性血小板減少症候群の感染が疑われる患者より分離された試料からウイルス性 RNA を分離する段階；

(2) 上記 RNA から cDNA を合成する段階；

(3) 上記段階 (2) で合成した cDNA を鋳型とし、請求項 3 のキットを用いてリアルタイム RT - PCR 増幅を遂行する段階；及び

(4) 上記段階 (3) を通して重症熱性血小板減少症候群ウイルスの遺伝子を確認する

10

20

段階；を含む、

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）感染診断のための情報提供方法。

【請求項 5】

上記段階（1）の試料は、哺乳動物から収得した血液、組織、細胞、血清、血漿、唾液、喀痰又は尿；又はマダニ；であることを特徴とする、請求項 4 に記載の重症熱性血小板減少症候群（SFTS）感染診断のための情報提供方法。

【請求項 6】

上記段階（3）で重症熱性血小板減少症候群ウイルス遺伝子の確認は、キャピラリー電気泳動、DNA チップ、ゲル電気泳動、放射性測定、蛍光測定及びりん光測定からなる群から選択されるいずれか一つ以上の方法で遂行することを特徴とする、請求項 4 に記載の重症熱性血小板減少症候群（SFTS）感染診断のための情報提供方法。

10

【請求項 7】

上記段階（3）で重症熱性血小板減少症候群ウイルスの遺伝子は、配列番号 1 からなる重症熱性血小板減少症候群ウイルスの S セグメント（Small segment；S segment）であることを特徴とする、請求項 4 に記載の重症熱性血小板減少症候群（SFTS）感染診断のための情報提供方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、重症熱性血小板減少症候群ウイルス遺伝子検出用組成物及びこれを用いた重症熱性血小板減少症候群の診断方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

重症熱性血小板減少症候群（Severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS）は、SFTS ウイルスによって発生する急性発熱性疾患で、白血球、血小板数値減少、肝機能数値上昇、タンパク尿などの症状を特徴とする。SFTS ウイルスに感染したダニが人のかんで組織液を吸い込むことにより感染し、媒介体として *Haemaphysalis longicornis*（フタトゲチマダニ）、*Amblyomma testudinarium*（タカサゴキラマダニ）、*Ixodes nipponensis*（タネガタマダニ）などがある。

30

【0003】

韓国全国的に SFTS 患者の発生が増加傾向にあり、死亡率は SFTS 認知度の増加によって 2013 年から 2016 年まで 47.6%、29.1%、26.6%、11.5% と減少傾向であったが、2017 年に死亡患者数が急激に増加し 22.3% と前年比 10.8% 増であった。したがって、地球温暖化によるダニ個体数の増加により SFTS 患者は増加し続けると予想されるため、SFTS 感染に対する迅速で且つ正確な診断が患者の予後改善のために必須とされる。

【0004】

現在、重症熱性血小板減少症候群の診断は、患者の血液を用いてウイルスを分離する方法、患者の血清を用いて IFA や ELISA 分析により抗体価の上昇を確認する方法、患者の血清や血漿を用いてリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（real time RT-PCR）や nested RT-PCR で患者の血液内の SFTS ウイルス RNA を増幅させて検査する方法がある。

40

【0005】

このうちウイルスを培養して診断する方法は、BSL3 施設が必要で、培養に多少時間がかかる場合があり一般病院では施行が困難であるため、診断に主に使用されている検査方法は、血清学的検査である間接免疫蛍光抗体法、免疫酵素法である。しかし、このような方法も他の病原体との交差反応による偽陽性反応があり、症状発生から抗体形成まで数日かかるため、疾病の早期に来院して検査を施行する場合、感度が低く、確定診断のためには追跡検査が必要であるとの短所がある。

50

【0006】

特に、SFTSウイルスを疾病初期に迅速に診断するために患者の血液からウイルスの特異遺伝子を検出するPCR法には、伝統的な方法によるconventional RT-PCRと、これを変形してconventional RT-PCRよりも100倍敏感なnested RT-PCR方法とがあり、また、PCRの進行中に結果をリアルタイムで確認できるリアルタイム(real time) RT-PCR方法などがある。重症熱性血小板減少症候群ウイルスは、一本鎖RNAウイルスで、Bunyaviridaeと、phlebovirus属に属し、ウイルスゲノムは、Large(L)、Medium(M)、Small(S)セグメント(segment)から構成されている。SFTSウイルスを検出するためのRT-PCR診断方法として、これら3つのセグメント(L、M、S segment)をターゲットとしてリアルタイムRT-PCR及びnested RT-PCR法が主に用いられているが、nested RT-PCRの場合、2回のPCR施行で感度が上昇するが、2回のPCR遂行により必要以上の人力及び時間がかかり、潜在的な汚染可能性がより高いことから、たった一回でも感度の優れた新たな診断法の開発が非常に切実であるのが実情である。

10

【0007】

一方、SFTSウイルスの3つのセグメントは、RNA-dependent RNA polymerase、RdRpをコードするLセグメント、ウイルス膜タンパク質の構成成分であるglycoprotein(GnとGc)をコードするMセグメント、ウイルス核タンパク質でSFTSウイルス由来のタンパク質のうち発現量が多く感染宿主をして細胞性免疫反応を誘発するnucleocapsid protein(NP)と免疫回避機能をするnonstructural protein(NSs)をコードするSセグメントから構成されている。SFTSは、韓国、中国、日本が主に流行地域で、SFTSウイルスのMセグメントとSセグメントの塩基配列を基に系統分析するとき、各国別に発生するウイルスの遺伝子配列が相異なりJapanese(J) clade、Chinese(C) clade、及びKorean(K) cladeに分類可能である。

20

【0008】

よって、SFTS感染に対する迅速且つ正確な診断及び治療のために、Japanese(J) clade、Chinese(c) clade及びKorean(K) cladeのSFTSウイルス遺伝子を疾病初期に迅速に全て診断することができる感度及び特異度の優れた診断方法の開発が何よりも必要である。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、本発明では、このような点を勘案して、SFTSウイルス遺伝子検出用組成物を提供し、これによりSFTSウイルスの確認及び重症熱性血小板減少症候群の診断方法を提供することを目的とする。

【0010】

本発明の他の目的は、本発明のSFTSウイルス遺伝子検出用組成物を含む、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)診断用キットを提供することにある。

40

【0011】

本発明のまた他の目的は、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)感染診断のための情報提供方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記のような目的を達成するために、本発明は、配列番号2及び配列番号3のプライマー対；及び配列番号4のプロープ；を含む、重症熱性血小板減少症候群(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome；SFTS)ウイルス遺伝子検出用組成物を提供する。

【0013】

50

本発明の一実施例において、配列番号 2 及び配列番号 3 のプライマー対；及び配列番号 4 のプローブ；は、配列番号 1 (S F T S V S セグメントの塩基配列) からなる重症熱性血小板減少症候群 (S e v e r e F e v e r w i t h T h r o m b o c y t o p e n i a S y n d r o m e) ウイルスの S セグメント (S m a l l s e g m e n t ; S s e g m e n t) に特異的に結合するものであってもよい。

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、本発明の S F T S ウイルス遺伝子検出用組成物を含む、重症熱性血小板減少症候群 (S F T S) 診断用キットを提供する。

【 0 0 1 5 】

また、本発明は、(1) 重症熱性血小板減少症候群の感染が疑われる患者より分離された試料からウイルス性 RNA を分離する段階；(2) 上記 RNA から c DNA を合成する段階；(3) 上記段階 (2) で合成した c DNA を鋳型にし、請求項 3 のキットを用いてリアルタイム R T - P C R 増幅を遂行する段階；及び (4) 上記段階 (3) を通して重症熱性血小板減少症候群ウイルスの遺伝子を確認する段階；を含む、重症熱性血小板減少症候群 (S F T S) 感染診断のための情報提供方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明の一実施例において、上記段階 (1) の試料は、哺乳動物から収得した血液、組織、細胞、血清、血漿、唾液、喀痰又は尿；又はマダニ；であってもよい。

【 0 0 1 7 】

本発明の一実施例において、上記段階 (2) で上記 RNA から c DNA を合成することは、S F T S ウイルスの RNA ゲノムから逆転写酵素 (r e v e r s e t r a n s c r i p t a s e) の作用を通した逆転写 (r e v e r s e t r a n s c r i p t i o n) 反応を別途遂行して相補的 DNA (c DNA) を合成することであってもよい。

【 0 0 1 8 】

本発明の一実施例において、上記段階 (4) で重症熱性血小板減少症候群ウイルス遺伝子の確認は、キャピラリー電気泳動、DNA チップ、ゲル電気泳動、放射性測定、蛍光測定及びりん光測定からなる群から選択されるいずれか一つ以上の方法で遂行することであってもよい。

【 0 0 1 9 】

本発明の一実施例において、上記段階 (4) で重症熱性血小板減少症候群ウイルスの遺伝子は、配列番号 1 からなる重症熱性血小板減少症候群ウイルスの S セグメント (S m a l l s e g m e n t ; S s e g m e n t) であってもよい。

【発明の効果】

【 0 0 2 0 】

本発明による重症熱性血小板減少症候群 (S F T S) ウイルス遺伝子検出用組成物及びこれを用いた S F T S 診断方法は、S F T S ウイルスの S セグメント遺伝子の特異的に検出することができ、既に知られている検出方法に比べて正確度及び感度が優れているばかりか短時間で S F T S ウイルスの検出が可能であるため、重症熱性血小板減少症候群を迅速且つ正確に診断することができる効果がある。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】本発明で考案した S F T S ウイルス遺伝子検出用プライマー及びプローブを用いた S F T S ウイルス検出限界を確認するためにリアルタイム R T - P C R を行った後、ロッドスコアを測定した結果を示したものである。

【図 2】本発明の一実施例で S F T S 疑い患者の入院当日に収得した検体を対象として本発明の S F T S ウイルス遺伝子検出用プライマー及びプローブを用いた S F T S 検出感度及び特異度分析結果を示したものである。

【図 3】本発明の一実施例で S F T S 疑い患者の入院期間中に患者から収得した検体を対象として本発明の S F T S ウイルス遺伝子検出用プライマー及びプローブを用いた S F T S 検出感度及び特異度分析結果を示したものである。

10

20

30

40

50

【図4】本発明の一実施例で本発明の方法によるSFTS検出特異度分析のために陰性対照群として使用した細菌とウイルスを記載したリストである。

【図5】本発明の一実施例で分析した各患者試料のSFTSウイルスのMセグメント塩基配列を基に製作したSFTSVの系統樹としてSFTSウイルスがウイルス遺伝子塩基配列によってKorea clade (K1~K4)、Japan clade (J1~J3)及びChina clade (C1~C4)に分類されることが確認できる。

【図6】ダニを用いた実験で、6Aは、マダニ試料を対象として本発明のプライマー及びプローブを用いたリアルタイムRT-PCR分析によりSFTSV検出が可能であることを確認した結果であり、6Bは、RT-PCR分析結果を示したものである。

【発明を実施するための形態】

10

【0022】

本発明は、重症熱性血小板減少症候群 (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) ウイルス遺伝子を迅速且つ正確に検出することができる新たな検出用組成物を提供することに特徴がある。

【0023】

本発明者等は、SFTS感染に対する正確且つ迅速な診断及び治療のためにSFTSウイルス特異遺伝子を検出することができる方法を研究していたところ、同定されたSFTSウイルスのSセグメント (Small segment; S segment) に特異的に結合してSFTSウイルスを高い感度と正確度で検出することができるプライマー及びプローブを発見した。

20

【0024】

一方、先に従来技術でも記述したように、重症熱性血小板減少症候群 (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) ウイルスは、一本鎖RNAウイルスで、Bunyaviridaeと、phlebovirus属に属し、ウイルスゲノムは3つのセグメント (segment) から構成されている。SFTSウイルスの3つのセグメントは、RNA-dependent RNA polymerase、RdRpをコードするLセグメント (Large segment, L segment)、ウイルス膜タンパク質の構成成分であるglycoprotein (GnとGc) をコードするMセグメント (Medium segment, M segment)、ウイルス核タンパク質でSFTSウイルス由来のタンパク質のうち発現量が多く感染宿主をして細胞性免疫反応を誘発するnucleocapsid protein (NP) と免疫回避機能をするnonstructural S protein (NSs) をコードするSセグメント (Small segment, S segment) から構成されている。報告によると、BunyavirusesのSセグメント内でnonstructural S protein (NSs) は、ウイルスがヒトの先天的な抗ウイルス防御に対抗するようにすることから、NSタンパク質はウイルス感染において主な毒性決定因子の一つとしてよく知られている。

30

【0025】

本発明では、韓国の患者及び媒介体より分離されたSFTSウイルス遺伝子の3つのセグメントのうち、Sセグメント (Small segment, S segment) 内でnonstructural S protein (NSs) 遺伝子を特異的に検出することができるプライマー及びプローブを発掘するための実験を行い、各々異なる塩基配列で構成された多くのプライマー及びプローブの中でSFTSウイルス遺伝子に対して感度及び特異度が著しく優秀なプライマー及びプローブを発掘し、発掘されたプライマーをSFTS-S583Fプライマー (5-AGAGGMATGAGCTTGAAC-3; 配列番号2) 及びSFTS-S653Rプライマー (5-TCCCAACAGTCTAAYAGA-3; 配列番号3) と命名し、上記プローブは、SFTS-S602Pプローブ (5-ACCACCTTATTCACTTCTTCTCCTCATTTGC-3; 配列番号4) と命名した。

40

【0026】

50

ここで、上記MはA又はC塩基であってもよく、上記YはC又はT塩基であってもよい。
【0027】

したがって、本発明は、配列番号2及び配列番号3の塩基配列からなるプライマー対；及び配列番号4の塩基配列からなるプローブ；を含む、重症熱性血小板減少症候群（Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome；SFTS）ウイルス遺伝子検出用組成物を提供することに特徴がある。

【0028】

また、本発明で、上記プライマー及びプローブは、重症熱性血小板減少症候群（Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome）ウイルスのSセグメント（Small segment；S segment）のnon structural protein（NSs）遺伝子に特異的に結合することができ、上記Sセグメントは配列番号1からなる塩基配列を有する。

【0029】

また、本発明の実施例1では、SFTSウイルス遺伝子検出又は診断のために新たなプライマーとプローブをデザインした。実施例2では、実施例1でSFTSウイルス遺伝子検出又は診断のためにデザインしたプライマーとプローブを用いてリアルタイムRT-PCRを遂行し最適のプライマーとプローブを選別した。本発明で発掘した配列番号2及び配列番号3のプライマー対及び配列番号4のプローブを用いてリアルタイムRT-PCRを遂行しSFTSウイルスの検出能を分析した結果、他の塩基配列で構成されたプライマー及びプローブに比べて本発明のプライマー及びプローブを用いた場合、感度及び特異度が最も優れており、ひいては、従来使用されているSFTSウイルス検出法に比べてもより優れた感度及び特異度を示すことにより、本発明が従来方法に比べてSFTSウイルス遺伝子をより高い正確度と感度で検出できることが分かった。

【0030】

本発明の実施例2では、配列番号2及び配列番号3のプライマー対及び配列番号4のプローブを用いたリアルタイムRT-PCRを通して、71bpの大きさを有する配列番号5の塩基配列からなるSFTSウイルスのSセグメントの増幅産物を確認することができ、具体的に上記71bpの塩基配列は、agaggaaatgagcttgaaaccacacacttatctcacttccttcattgctgaagccctctattagacctgttgga（配列番号5）である。

【0031】

また、本発明による上記SFTSウイルス遺伝子検出用組成物は、SFTSウイルスのSセグメントを特異的に高い感度及び正確度で検出することができる本発明のプライマー及びプローブを含む組成物であり、分析しようとする試料にSFTSウイルスの存否に対する分析だけでなく重症熱性血小板減少症候群（Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome；SFTS）の診断のための診断用組成物としても使用可能である。

【0032】

よって、本発明は、配列番号2及び配列番号3のプライマー対；及び配列番号4のプローブ；を含む、重症熱性血小板減少症候群（Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome；SFTS）診断用組成物を提供することができる。

【0033】

上記本発明の検出用又は診断用組成物は、上で言及した本発明によるプライマー対及びプローブ以外にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に使用可能な成分、例えば、反応用緩衝溶液、dNTP、Mg²⁺イオン、DNAポリメラーゼを含むことができる。

【0034】

上記反応用緩衝溶液は、1～10mM TrisHCl、10～40mM KCl（pH 9.0）を使用することができ、上記dNTPは、dATP、dTTP、dGTP、dCTPのうち選択されたいずれか一つ以上を使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

また、上記組成物は、実験上の便宜、安定化及び反応性の向上のために安定化剤及び／又は非反応性染料などを含むことができる。

【 0 0 3 6 】

上記非反応性染料物質とは、ポリメラーゼ連鎖反応に影響を及ぼさない物質から選択されなければならない、ポリメラーゼ連鎖反応産物を用いた分析や識別のために使用されることを目的とする。このような条件を満たす物質としては、ローダミン、TAMRA、Lax、プロモフェノールブルー、キシレンシアノール、プロモクレゾールレッド、クレゾールレッドなどの水溶性染料が使用可能である。

【 0 0 3 7 】

上記組成物は、液状形態で提供されることができ、安定性、保管の簡便性及び長期保管性の向上のために乾燥した状態であることが望ましい。上記乾燥は、一般的な常温乾燥、加温乾燥、凍結乾燥、減圧乾燥のような公知の乾燥方法によって遂行されることができ、組成物の成分が損失されない限り、任意の乾燥方法は全て使用可能である。上記のような乾燥方法は、使用される酵素の種類及び量により相異なって適用されることができ、

【 0 0 3 8 】

上記組成物は、一つの反応チューブ内で混合してから凍結または乾燥させて安定化された状態で製造し使用することにより、ポリメラーゼ連鎖反応中に別途の混合過程が必要ではないため、反応中の混合によるエラーを防止することができ、安定性、反応性及び保管性を向上させることができる。

【 0 0 3 9 】

上記の組成物は、プライマー対及びプローブを除いた残りの成分である反应用緩衝溶液、dNTP、Mg²⁺イオン、DNAポリメラーゼが既に含有された市場販売製品を使用することができる。

【 0 0 4 0 】

また、本発明は、上記本発明の組成物を含む、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）診断用キットを提供することができる。

【 0 0 4 1 】

本発明による上記診断用キットには配列番号2及び配列番号3のプライマー対；及び配列番号4のプローブ；を含んでいて重症熱性血小板減少症候群（SFTS）を非常に高い正確度で診断することができる。

【 0 0 4 2 】

上記診断は、分析しようとする検体試料にSFTSウイルスが含まれているか否かを判別するためにポリメラーゼ連鎖反応法（polymerase chain reaction, PCR）を使用することができ、上記ポリメラーゼ連鎖反応は、一般的なポリメラーゼ連鎖反応、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR）及びリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（real-time polymerase chain reaction, real-time PCR）などを含む。

【 0 0 4 3 】

本発明の診断キットは、本発明のプライマー対及びプローブ以外にも、逆転写酵素、ポリメラーゼ、ポリメラーゼ連鎖反応のための鋳型DNA（template DNA）として相補的DNA（cDNA）、及びバッファーなどの反応試薬をさらに含むことができる。

【 0 0 4 4 】

また、本発明の診断キットは、上記キットの使用方法を指示するマニュアルを含むことができる。

【 0 0 4 5 】

本発明の一実施例によれば、本発明の診断キットは、一般的なポリメラーゼ連鎖反応又はリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応などに使用可能であるが、この場合、SFTSウイルスのRNAゲノムから逆転写酵素（reverse transcriptase）の作

10

20

30

40

50

用を通した逆転写 (reverse transcription) 反応を別途遂行して相補的 DNA (cDNA) を合成し、これをポリメラーゼ連鎖反応の鋳型 DNA として使用することができる。

【0046】

ポリメラーゼ連鎖反応の結果物は、アガロースゲル電気泳動 (agarose gel electrophoresis) 又はキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis) などの方法で分離することができ、使用されたプライマー対によって重合された DNA に該当する長さを有する DNA の存在を確認して重症熱性血小板減少症候群を診断することができる。

【0047】

また、本発明では、SFTS ウイルス遺伝子に特異的に結合することができる配列番号 4 のプローブ (probe) を使用したが、上記プローブは各末端に蛍光物質及びクエンチャー (quencher) を結合させて使用することができる。具体的に、上記プローブの 5' 末端には蛍光物質が結合され、3' 末端にはクエンチャーが結合されたものであってよく、プローブの 5' 末端には赤色、緑色、青色など特定波長を放出する蛍光物質が結合され、3' 末端にはブラックホールクエンチャー (black hole quencher, BHQ) が結合されてもよい。蛍光物質とクエンチャーがプローブに結合されている状態ではクエンチャーが蛍光物質が放出する光を吸収するため蛍光信号が検出されない。その反面、DNA の合成及び伸長過程で DNA ポリメラーゼの exonuclease activity によって結合されていた蛍光物質が分離されれば、蛍光信号を検出することができる。ポリメラーゼ連鎖反応が進行する間、このような蛍光信号をリアルタイムで測定することができ、増加した蛍光信号を基にウイルス遺伝子存否を判別することができる。このようなプローブの使用は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応に有用に使用可能である。

【0048】

さらに、本発明は、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 感染診断方法を提供することができる、SFTS 感染診断のための情報提供方法を提供することができる。

【0049】

望ましくは、上記重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 感染診断のための情報提供方法は、(1) 重症熱性血小板減少症候群の感染が疑われる患者より分離された試料からウイルス性 RNA を分離する段階；(2) 上記 RNA から cDNA を合成する段階；(3) 上記段階 (2) で合成した cDNA を鋳型として、実施例 3 で使用されたキットを用いてリアルタイム RT-PCR 増幅を遂行する段階；及び(4) 上記段階 (3) を通して重症熱性血小板減少症候群ウイルスの遺伝子を確認する段階；を含む。

【0050】

上記試料はこれに制限されないが、哺乳動物から収得した血液、組織、細胞、血清、血漿、唾液、喀痰又は尿；又はマダニ；であってもよい。

【0051】

また、上記方法で重症熱性血小板減少症候群ウイルス遺伝子の確認は、キャピラリー電気泳動、DNA チップ、ゲル電気泳動、放射性測定、蛍光測定及びりん光測定からなる群から選択されるいずれか一つ以上の方法を通して遂行することができる。

【0052】

また、本発明の方法において、上記 SFTS は、SFTS ウイルスに感染して誘発される疾病を称する。

【0053】

以上、本発明で考案した SFTS ウイルスの S セグメントに特異的に結合する配列番号 2 及び 3 のプライマー対及び配列番号 4 のプローブを利用する場合、SFTS ウイルスを高い感度と正確度で迅速に検出可能であるとの長所があり、下記本発明の実施例を通して実際に SFTS と疑われる患者の試料を対象として本発明のプライマー及びプローブを用いたリアルタイム RT-PCR 分析法を遂行した結果、来院当時の患者の試料を対象とし

10

20

30

40

50

た分析で 97% の高い感度と 100% の特異度で迅速な診断が可能であることを確認しただけでなく、SFTS 患者の病院来院が遅延した場合の感度を予測することができる SFTS 疑い患者の入院全体期間中の採血検体を対象とした分析でも 88% の高い感度と 100% の特異度で正確度の優れた診断が可能であることを確認した。

【0054】

また、本発明の方法による上記のような診断正確度は、従来使用されていた診断方法を遂行した場合と他の種類のプライマーとプローブを用いた場合に比べて、著しく優れていることが分かった。

【0055】

よって、本発明で考案した SFTS 検出用組成物を用いた SFTS 感染診断方法及び感染診断のための情報提供方法は、SFTS を早期に迅速且つ正確に診断することができ、リアルタイムで SFTS ウイルスの検出が可能であるため、発病から時間が相当経過した時点でも高い正確度で診断することができ、他疾患と SFTS の疾病を高い特異度で区別することができる。

【0056】

以下、実施例を通して本発明をより詳しく説明する。これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例に限定されるものではない。

【0057】

< 実施例 1 >

SFTS ウイルス遺伝子検出又は診断のためのプライマー及びプローブ製作

【0058】

本発明者等は、SFTS ウイルスの S セグメント配列を対象として、重症熱性血小板減少症候群を迅速且つ正確に高い感度で検出することができる新たな診断用プライマー及びプローブを下記表 2 のようにデザインした。

【0059】

また、下記表 2 のプライマー及びプローブのデザインのために、下記表 1 A ~ 表 1 C に記載の SFTS ウイルスの S セグメント配列を参考とした。

【0060】

表 1 A ~ 表 1 C : 韓国、中国及び日本の患者から同定された SFTS ウイルスの S セグメント (segment) に関する情報

【0061】

10

20

30

40

50

【表 1 A】

S セグメントのジェンバ ンクアセッションナンバ ー	株／分離株	分離源	国
AB817995	YG1	人間	日本
AB817996	SPL003A	人間	日本
AB817999	SPL010A	人間	日本
AB818002	SPL035A	人間	日本
AB985526	SPL057A	人間	日本
AB985529	SPL066A	人間	日本
AB985532	SPL070A	人間	日本
AB985541	SPL087A	人間	日本
AB985544	SPL097A	人間	日本
AB985545	SPL100A	人間	日本
AB985551	SPL112A	人間	日本

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 B】

AB985554	SPL120A	人間	日本
AB985557	SPL125A	人間	日本
AB985559	SPL129A	人間	日本
HM745932	HB29	人間	中国
HM802204	SD4	人間	中国
HM802205	SD24	人間	中国
HQ141591	AH12=AH12/中国/2010	人間	中国
HQ141606	JS4	人間	中国
HQ171192	HGX	人間	中国
HQ171193	HZM	人間	中国
HQ171194	WWG	人間	中国
HQ419239	2010-WSQ	NA	中国
HQ830168	JS26	人間	中国
JQ670932	AHL/中国/2011	人間	中国
JQ693002	SDLZSheep01/2011	羊	中国
JQ733562	HB154/中国/2011	人間	中国
JQ733565	HB155/中国/2011	人間	中国
JQ733568	HB156/中国/2011	人間	中国
KC505137	JS2011-062	人間	中国
KF358693	Gangwon/韓国/2012	人間	韓国
KF374683	Zhao	人間	中国
KF711897	2011YPQ11	人間	中国
KF791948	HL/Injected	人間	中国
KF887435	LN2012-58	人間	中国
KJ597823	Zhejiang/01/2011	人間	中国
KP202165	HB29	ペロ細胞	中国
KP663733	KASJH	人間	韓国
KP663736	KAGWH3	人間	韓国
KP663739	KAGBH5	人間	韓国
KP663742	KAGBH6	人間	韓国

【 0 0 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 C】

KP663745	KACNH3	人間	韓国
KR017811	AH-YTY/中国/05/2012	人間	中国
KR017821	ZJZHSF-FDE/中国/06/2012	人間	中国
KR017825	ZJZHSF-LWL/中国/08/2014	人間	中国
KR017826	ZJZHSF-WRF/中国/08/2014	人間	中国
KR612072	AP01	人間	韓国
KR612073	CP01	人間	韓国
KR612076	JP01	人間	韓国
KR706565	QD7	人間	中国
KU507553	KADGH	人間	韓国
KU507555	KAGNH	人間	韓国
KU507556	KAGNH4	人間	韓国
KU507557	KAJNH2	人間	韓国
KU507577	KAUSH2	人間	韓国
KY789439	CB1	人間	韓国
KY789440	CB2	人間	韓国
KY789441	CB3	人間	韓国
NC_018137	HB29	人間	中国

【 0 0 6 4 】

表 2 : S F T S ウイルス遺伝子検出のためにデザインしたプライマー及びプローブ

【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 2】

No.	プライマー／プローブ名	配列 (5' → 3')	長さ	プロダクト長さ (bp)
1	SFTS-S 583F	AGAGGMATGAGCTTGAAC	18	71
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 602P	ACCACTTATTCACCTTCTCCTCATTGC	27	
2	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 602P	ACCACTTATTCACCTTCTCCTCATTGC	27	
3	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 603P	CCACTTATTCACCTTCTCCTCATTGCG	27	
4	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 598P	AACCACCACTTATTCACCTTCTCCTCA	27	
5	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 599P	ACCACCACTTATTCACCTTCTCCTCA	26	
6	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 604P	CACTTATTCACCTTCTCCTCATTGCGT	27	
7	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 602P	ACCACTTATTCACCTTCTCCTCATTGC	27	
8	SFTS-S 583F	AGAGGMATGAGCTTGAAC	18	71
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 603P	CCACTTATTCACCTTCTCCTCATTGCG	27	
9	SFTS-S 583F	AGAGGMATGAGCTTGAAC	18	71
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 604P	CACTTATTCACCTTCTCCTCATTGCGT	27	

【 0 0 6 6 】

上記表で M は A 又は C 塩基であってもよく、上記 Y は C 又は T 塩基であってもよい。

【 0 0 6 7 】

< 実施例 2 >

SFTS ウイルス遺伝子検出又は診断のための最適のプライマーとプローブ選別

【 0 0 6 8 】

上記実施例 1 でデザインした SFTS ウイルス遺伝子検出又は診断のためのプライマーとプローブを対象としてリアルタイム RT-PCR を遂行し、感度及び特異度検査を遂行した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

その結果、図 1 に示したように、プラスミド DNA (S F T S ウイルスの S s e g m e n t がクローニングされた組み換えベクター DNA) を用いて検出限界 (L i m i t o f D e t e c t i o n , L O D) を確認したとき、上記表 2 のプライマー及びプローブのうち、No. 1 のプライマー及びプローブを使用した場合、他のプライマー及びプローブを使用した群に比べてより優れた感度及び特異度を示し、また、既存の S F T S ウイルス検出のための検査法に比べてもより優れた感度及び特異度を示した。具体的に、No. 1 のプライマー及びプローブを使用した場合、リアルタイム R T - P C R 分析の結果、95% 検出 (L O D 95%) が $39.739 \text{ copy / test (ct } 40.3)$ と確認され、既存の S F T S ウイルス検出用検査法遂行時には、 $96.332 \text{ copy / test (ct } 38.9)$ であり、本発明で考案したプライマー及びプローブを使用した場合、リアルタイム R T - P C R の感度がより高いことから、S F T S ウイルス遺伝子の検出及び診断のために時間とコストをいずれも節約することができ、検出効果が優れていることが分かった。

10

【 0 0 7 0 】

< 実施例 3 >

患者から取得した試料を対象として本発明の S F T S ウイルス遺伝子検出又は診断用プライマーとプローブを用いた S F T S 検出能分析

【 0 0 7 1 】

本発明者等は、本発明で考案した S F T S ウイルス遺伝子検出又は診断用プライマーとプローブ (上記表 1 の No. 1 のプライマー (S F T S - S 583 F , 653 R プライマー) 及びプローブ (S F T S - S 602 P プローブ)) が実際に S F T S 感染を診断するのに使用可能か確認するために、次のような実験を遂行した。

20

【 0 0 7 2 】

このために実験に使用した試料は下記 3 つを満たす患者から取得した試料を対象として分析した。

【 0 0 7 3 】

1. 満 19 歳以上の者
2. S F T S 感染と考慮される者

症状発生後から研究参加評価時点まで S F T S 症状が客観的に確認された者であり、下記に該当する者

30

- 発熱 (腋窩温 > 37.8)
 - 血小板減少症 ($\text{platelet} < 100 \times 10^9 / \text{L}$)
 - 白血球減少症 ($\text{WBC} < 5 \times 10^9 / \text{L}$)
3. 感染内科医によって S F T S が疑われる場合

【 0 0 7 4 】

上の 3 つを満たす患者を対象として S F T S R T - P C R 検査を施行し、S F T S の確定診断は、I F A 4 倍以上上昇またはウイルス分離と定義して各々の P C R 法を遂行し、正確度を評価した。

【 0 0 7 5 】

40

また、感度確認検体は 2018 年度 S F T S 患者を対象として進められ、患者 36 人から 119 個の血液検体を収集して使用し、特異度確認のための検体は 2008 年から 2018 年の間に収集された検体で S F T S ではない他疾患と確定診断された患者 50 人を対象として進められた。参考として、特異度検査のために陰性対照群として使用した病原体とウイルスのリストは、図 4 に示した。

【 0 0 7 6 】

感度及び特異度の比較のために他の P C R を施行したが、患者の p l a s m a 、W B (w h o l e b l o o d) からウイルス RNA を抽出し、上記抽出はウイルス Gene - s p i n T M ウイルス DNA / RNA 抽出キット (i n t r o n) を用いて遂行した。以後、上記 RNA から S u p e r S c r i p t V I L O M a s t e r M i x (I n v i t r

50

ogen)を用いてcDNAを合成し鋳型DNAとして使用し、リアルタイムRT-PCRが次のように進められた。

【0077】

SFTSウイルスのSセグメントをターゲットとするリアルタイムRT-PCRは、本発明で考案したプライマー及びプローブを用いた方法と下記表3の従来開示された方法のPCRで各々進行し、Sセグメントをターゲットとするnested RT-PCR及びMセグメントをターゲットとするRT-PCRを遂行した。リアルタイムRT-PCRは、LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics, Indianapolis)を使用し、96 Excyler (Bioneer) 機器でPCRを遂行した。RT-PCRとnested RT-PCRは、Accupower PCR premix (Bioneer)とcDNAを用いてPCRを遂行した。遂行された各々のPCRの情報は、下記表4に示した通りである。

【0078】

表3：PCRに使用したプライマー、プローブ情報

【0079】

【表3】

PCR	遺伝子	プライマー	配列
リアルタイム RT-PCR (reference)	S-seg	SFTS-SQ-F	5'-ACCTCTTTGACCGTGAGTTWGACA-3'
		SFTS-SQ-R	5'-CTGAAGGAGACAGGTGGAGATGA-3'
		SFTS-SQ-P	5'-TGCCTTGACGATCTTA-3'
リアルタイム RT-PCR (本発明)	S-seg	SFTS-S 583F	5'-AGAGGMATGAGCTTGAAC-3'
		SFTS-S 653R	5'-TCCCAACAGTCTAAYAGA-3'
		SFTS-S 602P	5'-ACCACTTATTCACCTTCTCCTCATTGC-3'
RT-PCR	M-seg	SFTS-F (=MF3)	5'-GATGAGATGGTCCATGCTGATTCT-3'
		SFTS-R (=MR2)	5'-CTCATGGGGTGAATGTCCTCAC-3'
Nested RT-PCR	S-seg	SFTS-S-NP-2F	5'-CATCATTGTCTTTGCCCTGA-3'
		SFTS-S-NP-2R	5'-AGAAGACAGAGTTCACAGCA-3'
		SFTS-S-N2F	5'-AAYAAGATCGTCAAGGCATCA-3'
		SFTS-S-N2R	5'-TAGTCTTGGTGAAGGCATCTT-3'

【0080】

表4：PCR遂行条件

【0081】

10

20

30

40

50

【表 4】

PCR	段階	機能	実験条件 (1 次)		実験条件 (2 次)	
			温度	時間 (hh:mm:ss)	温度	時間 (hh:mm:ss)
リアルタイム RT-PCR (S-segment, reference)	1	培養	95	00:05:00		
	2	培養	95	00:00:05		
	3	培養	55	00:00:05		
	4	スキャン	FAM			
	5	GOTO	Step2	45 cycle		
	6	培養	25	00:01:00		
リアルタイム RT-PCR (S-segment, design) (本発明)	1	培養	95	00:05:00		
	2	培養	95	00:00:05		
	3	培養	51	00:00:05		
	4	スキャン	CY5			
	5	GOTO	Step2	45 cycle		
	6	培養	25	00:01:00		
RT-PCR (M-segment)	1	培養	95	00:10:00		
	2	培養	95	00:00:20		
	3	培養	58	00:00:40		
	4	培養	72	00:00:30		
	5	GOTO	Step2	35 cycle		
	6	培養	72	00:02:00		
Nested RT-PCR (S-segment)	1	培養	95	00:10:00	94	00:10:00
	2	培養	94	00:00:20	94	00:00:20
	3	培養	53	00:00:20	57	00:00:20
	4	培養	72	00:00:30	72	00:00:30
	5	GOTO	Step2	35 cycle	Step2	30 cycle
	6	培養	72	00:02:00	72	00:02:00

【 0 0 8 2 】

表 5 : 感度及び特異度結果

【 0 0 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 5】

PCR 遂行条件	感度 (Sensitivity)		特異度 (specificity)	所要時間
	入院当時及び 追跡検体含む (n=119)	入院当時の検 体 (n=36)		
リアルタイム RT-PCR (S-segment, reference) cutoff=39	70.6%	88.9%	98%	1-2h
リアルタイム RT-PCR (S-segment, design) cutoff=40 (本発明)	88.2%	97.2%	100%	1-2h
RT-PCR (M-segment)	48.7%	61.1%	100%	2-3h
Nested RT-PCR (S-segment)	78.2%	91.7%	100%	4-5h

10

20

【0084】

分析の結果、上記表 5 に示したように、他の PCR 方法に比べて本発明で考案したプライマー及びプローブを用いて遂行したリアルタイム RT-PCR 分析結果が感度及び特異度分析で最も優れた値を示したことから、検出効果が最も優れていることが分かり、既存の他の方法に比べて 1～2 時間の短い時間で SFTS ウイルスを正確に診断及び検出できることが示されている。

【0085】

<実施例 4>

本発明の SFTS ウイルス遺伝子検出又は診断用プライマーとプローブを用いた SFTS 検出正確度検証

30

【0086】

<4-1> 来院当時の検体を用いた PCR 診断法の正確度

来院当時の患者検体（血液）を対象として本発明で考案した SFTS ウイルス遺伝子検出用プライマー及びプローブを用いた PCR 分析法で SFTS 検出に対する感度及び特異度検証分析を遂行した。

【0087】

表 6：来院当時の検体を用いた PCR 診断法の正確度

【0088】

40

50

【表 6】

1st	SFTS 陽性 = 36 / 陰性 = 50 患者対象							
	SQ ref (cut off=39)		SQ design (cut off=40)		RT-PCR (M seg)		Nested RT-PCR (S seg)	
	結果 (+)	結果 (-)	結果 (+)	結果 (-)	結果 (+)	結果 (-)	結果 (+)	結果 (-)
SFTS 陽性	32	4	35	1	22	14	33	3
SFTS 陰性	1	49	0	50	0	50	0	50
計	86		86		86		86	
感度 %(95% CI)	88.89% (73.9 - 96.9)		97.22% (85.5 - 99.9)		61.1% (43.5 - 76.9)		91.67% (77.5 - 98.2)	
特異度 %(95% CI)	98% (89.4 - 99.9)		100% (92.9 - 100.0)		100% (92.9 - 100.0)		100% (92.9 - 100.0)	
PPV, %	97.00%		100%		100%		100%	
NPV, %	92.45%		98.04%		78.13%		94.34%	
AUC	0.934 (0.860 - 0.977)		0.986 (0.933 - 0.999)		0.806 (0.706 - 0.883)		0.958 (0.892 - 0.990)	

- S Q r e f、リアルタイム R T - P C R (S - s e g m e n t , r e f e r e n c e) ; S Q d e s i g n、リアルタイム R T - P C R (S - s e g m e n t , d e s i g n , 本発明)

【 0 0 8 9 】

表 7 : 来院当時の検体を用いた P C R 診断法の正確度の比較

【 0 0 9 0 】

【表 7】

	エリア間の差	95% CI	z スコア	p 値
SQ ref, cut off=39 - SQ design, cut off=40	0.052	0.002 - 0.101	2.033	0.004
SQ design, cut off=40 - RT-PCR, M seg	0.181	0.101 - 0.260	4.448	<0.001
SQ ref, cut off=39 - RT-PCR, M seg	0.129	0.052 - 0.206	3.292	0.001
SQ ref, cut off=39 - Nested RT-PCR, S seg	0.024	-0.028 - 0.075	0.91	0.363
RT-PCR, M seg - Nested RT-PCR, S seg	0.153	0.077 - 0.229	3.924	<0.001

- S Q r e f、リアルタイム R T - P C R (S - s e g m e n t , r e f e r e n c e) ; S Q d e s i g n、リアルタイム R T - P C R (S - s e g m e n t , d e s i g n

、本願発明)

【0091】

その結果、上記表6及び図2に示したように、SFTSのSセグメントをターゲットとしたリアルタイムRT-PCR分析の結果、本発明で考案したプライマー及びプローブを使用した群が他の種類のプライマー及びプローブを使用した群に比べて最も優れた感度及び特異度を示し、具体的に、感度97.2%及び特異度100%の結果を確認することができた。一方、Sセグメントをターゲットとしたnested RT-PCR分析では91.67%の感度結果を示したが、nested RT-PCRは二回のPCRを遂行しなければならない手間があり、これによるPCR汚染可能性がより高いことを考慮するとき、本発明のプライマー及びプローブを使用する方がより正確で優れた検査結果を導出できることが分かった。

10

【0092】

また、上記のような結果に対して、AUCを用いた各感度及び特異度の比較分析で、本発明で考案したプライマー及びプローブを用いたリアルタイムRT-PCR法がMセグメントをターゲットとしたconventional RT-PCRより統計的にも有意に正確度が高いことが確認された(表7参照)。

【0093】

<4-2> SFTS疑い患者の入院期間中に採血した検体を対象として本発明のSFTSウイルス遺伝子検出又は診断用プライマーとプローブを用いたPCR診断法の正確度評価

【0094】

20

さらに、本発明者等は、本発明で考案したプライマー及びプローブを用いてSFTS疑い患者の入院期間中に患者から取得した血液検体を対象としてSFTS検出に対する感度及び特異度分析を遂行した。具体的に、SFTSの確定診断は、IFA4倍以上上昇またはウイルス分離及び確認と定義し、SFTS患者と確定診断された患者36人から119個の血液検体及び他疾患と確定診断された患者50人を対象として上記実施例<4-1>のような方法で正確度検査を遂行した。

【0095】

また、SFTS疑い患者の入院期間中に採血した検体を対象として分析を遂行したのは、普通、患者が症状は発生したが初期に来院せず遅く来院する場合は頻繁にあり、他の疾患と疑われて治療している途中にSFTSが疑われて入院期間中にSFTS PCR検査法を依頼する場合も多いが、このような場合、診断の感度が低くなる問題点があることから、入院期間中や又は遅く来院した患者の試料を対象としても高い感度と特異度でSFTSの診断が可能であることを確認するためである。

30

【0096】

表8：入院期間中の検体を用いたPCR診断法の正確度

【0097】

40

50

【表 8】

ALL	SFTS 陽性 = 119 / 陰性 = 50							
	SQ ref (cut off=39)		SQ design (cut off=40)		RT-PCR (M seg)		Nested RT-PCR (S seg)	
	結果 (+)	結果 (-)	結果 (+)	結果 (-)	結果 (+)	結果 (-)	結果 (+)	結果 (-)
SFTS 陽性	83	36	105	14	58	61	93	26
SFTS 陰性	1	49	0	50	0	50	0	50
計	169		169		169		169	
感度 %(95% CI)	69.75% (60.7 - 77.8)		88.24% (81.0 - 93.4)		48.74% (39.5 - 58.1)		78.15% (69.6 - 85.2)	
特異度 %(95% CI)	96.0% (86.3 - 99.5)		100.0% (92.9-100.0)		100.0% (92.9-100.0)		100.0% (92.9-100.0)	
PPV, %	98.81%		100.00%		100.00%		100.00%	
NPV, %	57.65%		78.13%		45.05%		65.79%	
AUC	0.822 (0.756 - 0.876)		0.941 (0.894 - 0.972)		0.744 (0.671 - 0.808)		0.891 (0.834 - 0.933)	

- S Q r e f、リアルタイム R T - P C R (S - s e g m e n t , r e f e r e n c e) ; S Q d e s i g n、リアルタイム R T - P C R (S - s e g m e n t , d e s i g n , 本発明)

【 0 0 9 8 】

表 9：入院期間中の検体を用いた P C R 診断法の正確度の比較

【 0 0 9 9 】

【表 9】

	エリア間の差	95% CI	z スコア	p 値
SQ ref, cut off=39 - SQ design, cut off=40	0.119	0.068 - 0.171	4.547	<0.001
SQ ref, cut off=39 - RT-PCR, M seg	0.078	0.022 - 0.135	2.706	0.007
SQ ref, cut off=39 - Nested RT-PCR, S seg	0.069	0.017 - 0.121	2.582	0.010
SQ design, cut off=40 - RT-PCR, M seg	0.197	0.153 - 0.242	8.777	<0.001
SQ design, cut off=40 - Nested RT-PCR, S seg	0.050	0.017 - 0.084	2.916	0.004
RT-PCR, M seg - Nested RT-PCR, S seg	0.147	0.104 - 0.190	6.744	<0.001

- S Q r e f、リアルタイム R T - P C R (S - s e g m e n t , r e f e r e n c e) ; S Q d e s i g n、リアルタイム R T - P C R (S - s e g m e n t , d e s i g n , 本発明)

【0100】

その結果、表8～表9及び図3に示したように、S F T S の S セグメントをターゲットとし、本発明のプライマー及びプローブを用いて遂行したリアルタイム R T - P C R (本発明の方法) が既存の r e a l t i m e R T - P C R 法や n e s t e d R T - P C R 法に比べて統計的に有意に正確度がより高いことが示されており、他のプライマー及びプローブを使用した場合に比べてもより優れた感度を示している。

【0101】

< 4 - 3 > 多様な病原体とウイルスを対象として本発明の S F T S ウイルス遺伝子検出又は診断用プライマーとプローブを用いた P C R 診断法の正確度分析

【0102】

本発明で考案したプライマー及びプローブを用いて図4のバクテリア及びウイルスを対象として特異度を分析した。

【0103】

その結果、多様な疾病の原因であるバクテリアではいずれも陰性と確認され、また、S F T S V ではない他のウイルスを対象とした場合、検出されず、デングウイルス、インフルエンザウイルス、A 型肝炎ウイルス及びハンターンウイルス (H a n t a a n v i r u s) に感染した患者の検体でいずれも検出されないことを確認した。

【0104】

したがって、このような結果を通して、本発明で考案したプライマー及びプローブは、S F T S ウイルスに対して優れた特異度を示すことが分かり、他のバクテリア菌株及びウイルスに対しては増幅産物が検出されず、S F T S ウイルスを特異的に検出できることが分かった。

【0105】

< 実施例 5 >

韓国、日本及び中国系統群の S F T S ウイルス検出可能性分析

【0106】

最近の研究結果によれば、各国別に発生する重症熱性血小板減少症候群の原因となる S F T S ウイルスの遺伝子配列が互いに異なることが確認された。一方、未だ多様な系統群 (c l a d e) の S F T S ウイルスを同時に検出することができる検出技術が開発されていないが、本発明者等は本発明で考案したプライマー及びプローブを用いる場合、各々多様な系統群の S F T S ウイルスをいずれも検出できるかを確認するために次のような実験を遂行した。

【0107】

具体的に、S F T S ウイルスは、ウイルス遺伝子塩基配列によって系統群分析するとき、K o r e a 、J a p a n 、C h i n a c l a d e に分類されるが、韓国の S F T S 患者は 3 ケ国 c l a d e がいずれも確認されている。よって、下記表 1 0 A ～表 1 0 B のように各々異なる系統群の S F T S V に感染した患者の試料を対象として本発明のプライマー及びプローブを用いて上述された実施例で遂行されたリアルタイム R T - P C R を行った。また、本発明で使用した S F T S V の系統群及び各試料に対する分類は、図 5 に示した。

【0108】

表 1 0 A ～表 1 0 B : 韓国、日本及び中国系統群の S F T S ウイルス検出可能性分析

【0109】

10

20

30

40

50

【表 1 0 A】

Lab No.	検体	ウイルス系統群	Ct (SQ-design)	log10 (コピー)
2018-HY-36	WB	C2	28.34	5.12
2018-JN12	WB	C3	34.16	3.39
2018-KM23	WB	J1	36.41	2.72
2018-980	WB	J1	27.63	5.34
2018-DA02	WB	J1	27.65	5.33
2018-HY-13	WB	J1	33.15	3.69
2018-km03	WB	J1	32.12	4.00
2018-AJ27	WB	J1	34.79	3.21

【 0 1 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 0 B】

2018-YN22	WB	J1	35.61	2.96
2018-KM12	WB	J1	32.68	3.83
2018-AJ28	WB	J1	34.06	3.42
2018-YN10	WB	J1	24.96	6.13
2018-WJ18	WB	J1	30.99	4.34
2018-YN05	WB	J1	37.66	2.35
2018-AJ29	WB	J1	33.36	3.63
2018-WJ06	WB	J1	31.09	4.31
2018-638	WB	J3	29.20	4.87
2018-JN44	WB	J3	33.98	3.45
2018-JN38	WB	J3	26.81	5.58
2018-CB01	WB	J3	37.89	2.28
2018-JN42	WB	J3	31.23	4.26
2018-JN17	WB	J3	30.62	4.45
2018-913	WB	K1	35.86	2.89
2018-YN03	WB	K1	26.83	5.57
2018-YN01	WB	K1	35.37	3.03
2018-JN50	WB	K1	34.09	3.41
2018-WJ01	Serum	K2	31.12	4.30
2018-HY01	WB	K3	27.41	5.40
2018-HY22	WB	K4	31.36	4.23
2018-HY-35	WB	K4	21.16	7.26
2018-HY24	WB	K4	27.5	5.37
2018-HY17	WB	K4	26.2	5.76
2018-HY06	WB	K4	29.22	4.86
2018-AJ17	WB	K4	28.21	5.16
2018-HY-29	WB	K4	31.65	4.14
2018-HY-31	WB	K4	26.8	5.58

- C , Chinese clade ; J , Japanese clade ; K , Korean clade ; SQ design、リアルタイム RT - PCR (S - segment , design , 本発明)

【 0 1 1 1 】

分析の結果、上記表 1 0 に示したように、3ヶ国 clade に感染したすべての S F T S 患者の試料で本発明のプライマー及びプローブを使用する場合、すべての増幅物を確認することができ、このような結果を通して本発明者等は、本発明で考案した方法が韓国、日本及び中国系統群の S F T S ウイルスをいずれも検出できることが分かった。

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

< 実施例 6 >

ダニ試料を対象として本発明の S F T S ウイルス遺伝子検出又は診断用プライマーとプローブを用いた S F T S の検出

【 0 1 1 3 】

ダニにかまれて病院に来院した患者からマダニ 5 5 個を採取し、これらを対象として本発明のプライマー（配列番号 2、3）とプローブ（配列番号 4）を用いて S F T S V に対する R T - P C R を遂行した結果、5 4 個のダニ試料からは陰性と確認され、1 個のダニ試料からは陽性と確認された。N e s t e d R T - P C R 検査においても同様に 5 4 個のダニ試料からは陰性と確認され、1 個のダニについてのみ陽性と確認され、本発明のリアルタイム R T - P C R を施行した結果においても同様に陽性と確認され、塩基配列分析の結果、S F T S ウイルスと確認された（図 6 参照）。 10

【 0 1 1 4 】

したがって、このような結果を通して本発明者等は、本発明で考案したプライマー及びプローブは、ヒト由来の試料だけではなくダニ試料を対象としても S F T S V 検出が可能であることが分かり（S F T S S Q - P C R (r e f) C t 3 0 . 2 5 値を示し、S F T S S Q - P C R (d e s i g n) C t 2 7 . 9 8 値を示した）（図 6 参照）、このような結果は、本発明のプライマー及びプローブを用いた R T - P C R 分析結果を通して S F T S V 検出が可能であることが分かった（図 6 参照）。

【 0 1 1 5 】

以上の結果を通して、本発明者等は、重症熱性血小板減少症候群の原因ウイルスである S F T S ウイルスの S セグメント内で n o n s t r u c t u r a l S p r o t e i n (N S s) 遺伝子の塩基配列を検出及び増幅させることができる本発明で考案されたプライマー及びプローブを用いてリアルタイム R T - P C R を遂行する場合、韓国だけでなく中国及び日本で流行する遺伝型のウイルスによって発生する重症熱性血小板減少症候群も正確且つ迅速に検出でき、優れた正確度で診断できることが分かった。 20

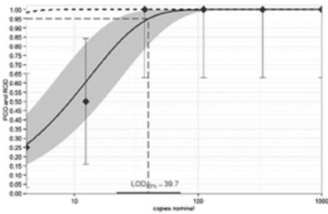
【 0 1 1 6 】

以上、本発明についてその望ましい実施例を中心に考察した。本発明の属する技術分野において通常の知識を有する者は、本発明が本発明の本質的な特性から逸脱しない範囲で変形された形態で具現され得ることを理解できるはずである。よって、開示されている実施例は、限定的な観点ではなく説明的な観点で考慮されなければならない。本発明の範囲は、上述の説明ではなく特許請求の範囲に示されており、それと同等な範囲内にある全ての差異点は本発明に含まれているものと解釈されなければならないと言える。 30

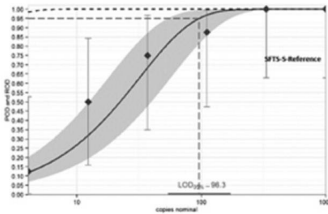
【図面】

【図 1】

本発明及び参考文献のSFTSウイルス遺伝子検出用プライマー及びプローブを用いたSFTSウイルス検出限界分析



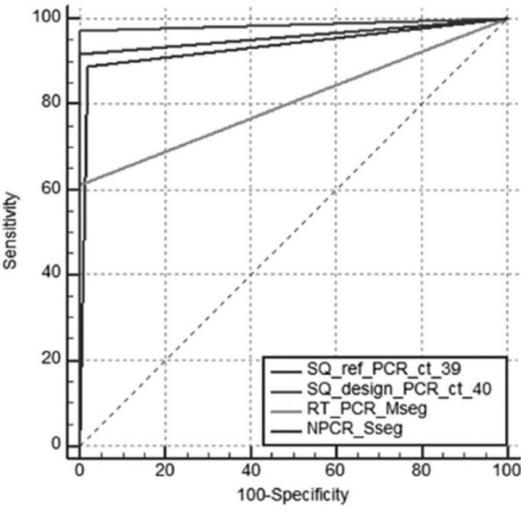
本発明のプライマー及びプローブを用いたSFTS感度分析



他の配列からなるプライマー及びプローブを用いたSFTS感度分析

【図 2】

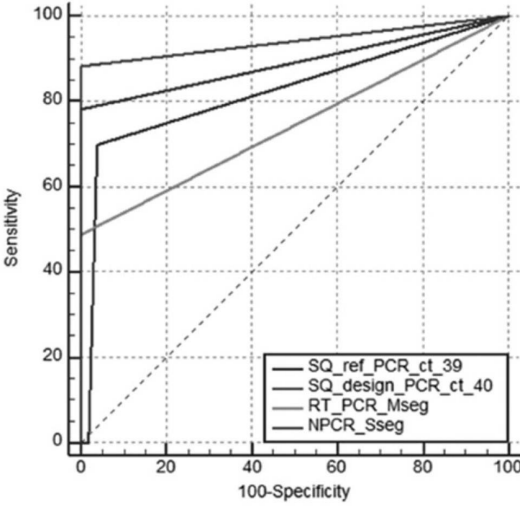
SFTS疑い患者の入院当日に取得した検体を対象としたSFTS検出感度及び特異度分析 (AUC, Area under the curve)



10

【図 3】

SFTS疑い患者の入院期間中に取得した検体を対象としたSFTS検出感度及び特異度分析 (AUC, Area under the curve)



【図 4】

SFTS検出特異度分析のために陰性対照群として使用した細菌とウイルス

Bacteria	Virus
<i>Acinetobacter baumannii</i> (genomic species 2)	Dengue Virus Type 1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	Dengue Virus Type 2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Dengue Virus Type 3
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Dengue Virus Type 4
<i>Enterococcus faecalis</i>	Yellow Fever virus
<i>Escherichia coli</i>	Zika virus
<i>Morganella morganell</i> subsp. <i>morganii</i>	Tick-borne Encephalitic virus
<i>Salmonella enterica</i>	Japanese Encephalitic virus
<i>Serratia marcescens</i>	Hantaan virus
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> (MRSA)	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Vibrio cholerae</i>	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>Vibrio vulnificus</i>	
<i>Streptococcus mutans</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Shigella sonnei</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Staphylococcus mild</i>	
<i>Staphylococcus sanguinis</i>	
<i>Streptococcus sobrinus</i>	
<i>Orientia tsutsugamushi</i> Boryong	
<i>Orientia tsutsugamushi</i> Karp	
<i>Orientia tsutsugamushi</i> Kato	
<i>Orientia tsutsugamushi</i> Gilliam	
<i>Rickettsia akari</i>	
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	
<i>Ehrlichia canis</i>	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	
<i>Anaplasma ovis</i>	
<i>Anaplasma marginale</i> Theiler	
<i>Bartonella henselae</i>	
<i>Bartonella elizabethae</i>	
<i>Bartonella quintana</i>	
<i>Leptospira broomii</i>	
<i>Leptospira fainei</i>	
<i>Leptospira hovindhougenii</i>	
<i>Leptospira interrogans</i>	
<i>Leptospira kirschneri</i>	
<i>Leptospira kmetyi</i>	
<i>Leptospira ictericae</i>	
<i>Leptospira meyeri</i>	
<i>Leptospira noguchii</i>	
<i>Leptospira wolbachii</i>	
<i>Leptospira wolffi</i>	
<i>Leptospira biflexa</i>	

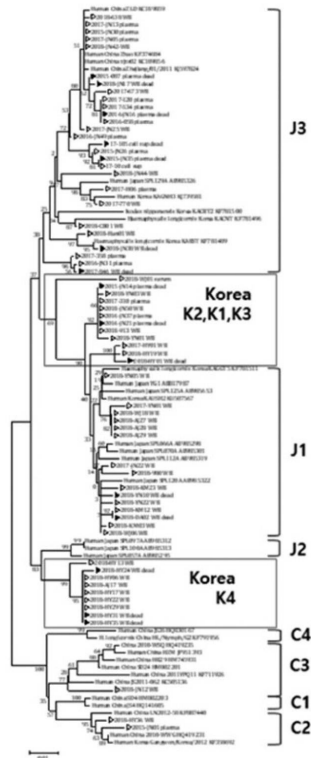
30

40

50

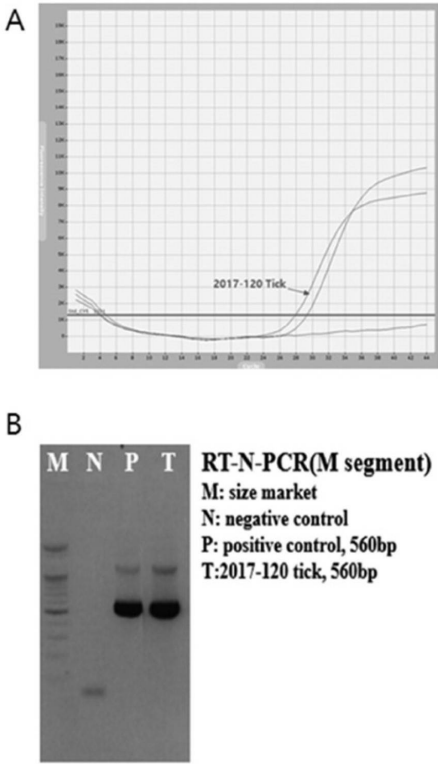
【図 5】

SFTSウイルスのMセグメント塩基配列を基に製作したSFTSVの系統樹
Korea clade (K1~K4)、Japan clade (J1~J3) 及び
China clade (C1~C4) に分類



【図 6】

6 Aは、マダニ試料を対象として本発明のプライマー及びプローブを用いたリアルタイムRT-PCR分析であり、6 Bは、RT-PCR分析結果である。



【配列表】

0007360752000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/40 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/40

0 2 - オ , 1 0 1 - ドン

(72)発明者

リ , ユウ ミ

大韓民国、6 1 7 3 6 クァンジュ ナム - グ ソムン - デロ 6 6 3 ボナン - ギル , 2 , 1 2 0 8

- オ , 1 0 2 - ドン

(72)発明者

キム , チョン ミー

大韓民国、6 1 4 1 4 クァンジュ トン - グ キェリム - ロ 3 0 ボン - ギル , 1 5 , 1 2 0 1 -

オ , 2 0 4 - ドン

審査官

松井 一泰

(56)参考文献

中国特許出願公開第 1 0 6 1 9 1 3 0 7 (C N , A)

中国特許第 1 0 2 6 1 8 6 6 9 (C N , B)

特開 2 0 2 0 - 0 6 5 4 8 8 (J P , A)

特開 2 0 2 0 - 0 2 6 9 5 3 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q