

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-85961  
(P2018-85961A)

(43) 公開日 平成30年6月7日(2018.6.7)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 Z N A A	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q</b> 1/68 (2018.01)		C 1 2 Q	1/68 A	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2016-231375 (P2016-231375)	(71) 出願人	304028726 国立大学法人 大分大学 大分県大分市大字旦野原700番地
(22) 出願日	平成28年11月29日 (2016.11.29)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
		(72) 発明者	河野 利恵 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 国立大学法人大分大学医学部内
		(72) 発明者	白尾 国昭 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 国立大学法人大分大学医学部内
		(72) 発明者	緒方 正男 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 国立大学法人大分大学医学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトヘルペスウイルス6型のタイプA及び/又はタイプBを検出するためのプローブ

(57) 【要約】

【課題】効率的にHHV6のタイプAとタイプBを識別する手段を提供すること。

【解決手段】下記の構造(B)：

(B) : 5' -Q-gacgGcac-F-3'

(ここで、Qはクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、Fは蛍光色素である)

を有する、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV6) タイプBを検出するためのプローブ。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記の構造 ( B ) :

( B ) : 5' -Q-gacgGcac-F-3'

(ここで、Qはクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、Fは蛍光色素である)

を有する、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV6) タイプ B を検出するためのプローブ。

## 【請求項 2】

配列番号 1 の塩基配列を有するプライマー及び配列番号 2 の塩基配列を有するプライマーからなるプライマー対と共に用いられることを特徴とする、請求項 1 に記載のプローブ。

10

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載のプローブ、及び下記の構造 ( A - 1 ) ~ ( A - 3 ) のいずれかを有する HHV6 タイプ A を検出するためのプローブ

( A - 1 ) : 5' -Q-gtgtgAcgt-F-3'

( A - 2 ) : 5' -Q-ggtgtgAcg-F-3'

( A - 3 ) : 5' -Q-gtgtgAcg-F-3'

(ここで、Qはクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、Fは蛍光色素である)

を含む、HHV6の遺伝子型を識別するためのキット。

## 【請求項 4】

更に、RNaseを含む、請求項 3 に記載のキット。

20

## 【請求項 5】

HHV6タイプ B を検出するためのプローブが有する蛍光色素とHHV6タイプ A を検出するためのプローブが有する蛍光色素の種類が互いに異なる、請求項 3 又は 4 に記載のキット。

## 【請求項 6】

請求項 1 のプローブを用いてHHV6タイプ B を検出する方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 のプローブの存在下で、HHV6のゲノムDNAを鋳型として配列番号 1 の塩基配列を有するプライマー及び配列番号 2 の塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行う工程 ( 1 )、及び

30

該プローブが有する蛍光色素が発する蛍光を検出する工程 ( 2 )

を含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 8】

下記の工程 ( 1 ) 及び工程 ( 2 ) を含むHHV6の遺伝子型を識別する方法 :

工程 ( 1 ) ; 請求項 1 のプローブ ( プローブ B ) 及び下記の構造 ( A - 1 ) ~ ( A - 3 ) のいずれかを有するHHV6タイプ A を検出するためのプローブ ( プローブ A ) の存在下で、HHV6のゲノムDNAを鋳型として配列番号 1 の塩基配列を有するプライマー及び配列番号 2 の塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行う工程

( A - 1 ) : 5' -Q-gtgtgAcgt-F-3'

( A - 2 ) : 5' -Q-ggtgtgAcg-F-3'

( A - 3 ) : 5' -Q-gtgtgAcg-F-3'

40

(ここで、Qはクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、Fは蛍光色素であり、プローブ A が有する蛍光色素とプローブ B が有する蛍光色素の種類は互いに異なる)

工程 ( 2 ) ; プローブ A 及び / 又はプローブ B が有する蛍光色素が発する蛍光を検出する工程。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV6) のタイプ A 及び / 又はタイプ B を検出するためのプ

50

ローブ、並びにそれを用いた遺伝子型の検出 / 識別方法が開示される。

【背景技術】

【0002】

HHV6は、突発性発疹の原因ウイルスであり、多くのヒトに潜伏感染している。造血幹細胞移植後のように免疫能が低下した患者ではヒトヘルペスウイルスの増殖による脳炎がしばしば発症し、ときには致死性的結末に至る。脳炎の予防には、ヒトヘルペスウイルス量のモニタリングと早期の抗ウイルス薬の投与が必須である。

【0003】

HHV6にはタイプAとタイプBが存在する。両ウイルス遺伝子は高い相同性を有するが、その病原性に顕著な違いがあり、脳炎を起こすのはタイプBである。よって、HHV6のタイプAとタイプBを区別することは重要である。従来タイプAとタイプBを識別する方法はシーケンシングを要し、必ずしも効率的ではなかった。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Ogata et al., Clin. Infect. Dis., 2013 Sep;57(5):671-681

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上述のような現状の下、効率的にHHV6のタイプAとタイプBを識別する手段を提供することが1つの課題である。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

かかる課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、特定の構造を有するプローブを用いること、及び / 又はそれと特定のプライマーとを組み合わせることにより、シーケンシングを行うことなく効率的にHHV6のタイプAとタイプBとを識別できることを見出した。斯かる知見をもとにさらなる研究を重ね、下記に代表される発明を提供するに至った。

【0007】

項1 .

下記の構造 ( B ) :

30

( B ) : 5' -Q-gacgGcac-F-3'

(ここで、Qはクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、Fは蛍光色素である)

を有する、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV6) タイプBを検出するためのプローブ。

項2 .

配列番号1の塩基配列を有するプライマー及び配列番号2の塩基配列を有するプライマーからなるプライマー対と共に用いられることを特徴とする、項1に記載のプローブ。

項3 .

項1に記載のプローブ、及び下記の構造 ( A - 1 ) ~ ( A - 3 ) のいずれかを有するHHV6タイプAを検出するためのプローブ

40

( A - 1 ) : 5' -Q-gtgtgAcgt-F-3'

( A - 2 ) : 5' -Q-ggtgtgAcg-F-3'

( A - 3 ) : 5' -Q-gtgtgAcg-F-3'

(ここで、Qはクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、Fは蛍光色素である)

を含む、HHV6の遺伝子型を識別するためのキット。

項4 .

更に、RNaseを含む、項3に記載のキット。

項5 .

HHV6タイプBを検出するためのプローブが有する蛍光色素がHHV6タイプAを検出するため

50

のプローブが有する蛍光色素と異なる、項3又は4に記載のキット。

項6 .

項1のプローブを用いてHHV6タイプBを検出する方法。

項7 .

項1のプローブの存在下で、HHV6のゲノムDNAを鋳型として配列番号1の塩基配列を有するプライマー及び配列番号2の塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行う工程(1)、及び

該プローブが有する蛍光色素が発する蛍光を検出する工程(2)を含む、項6に記載の方法。

項8 .

下記の工程(1)及び工程(2)を含むHHV6の遺伝子型を識別する方法：

工程(1)；項1のプローブ(プローブB)及び下記の構造(A-1)~(A-3)のいずれかを有するHHV6タイプAを検出するためのプローブ(プローブA)の存在下で、HHV6のゲノムDNAを鋳型として配列番号1の塩基配列を有するプライマー及び配列番号2の塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行う工程

(A-1)：5'-Q-gtgtgAcgt-F-3'

(A-2)：5'-Q-ggtgtgAcg-F-3'

(A-3)：5'-Q-gtgtgAcg-F-3'

(ここで、Qはクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、Fは蛍光色素であり、プローブAが有する蛍光色素はプローブBが有する蛍光色素と異なる)

工程(2)；プローブA及び/又はプローブBが有する蛍光色素が発する蛍光を検出する工程。

【発明の効果】

【0008】

HHV6の遺伝子型を効率的に(例えば、HHV6のDNAをシーケンシングすることなく)識別することができる。

【発明を実施するための形態】

【0009】

HHV6の遺伝子型を効率的に識別するためには、下記の構造(B)を有するプローブ(以下、「プローブB」と称する場合もある)を用いることが好ましい。

(B)：5'-Q-gacgGcac-F-3'

(ここで、「Q」はクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、「F」は蛍光色素であり、「5'」はプローブの5'末端を意味し、「3'」はプローブの3'末端を意味する)

【0010】

構造(B)のような構造を有するプローブは、TaqManプローブの一態様であるサイクリングプローブとして知られている。構造Bを構成する塩基配列(gacgGcac)は、HHV6タイプBのゲノムDNA(Accesssion No (NCBI) AF157706.1)の103978番目~103985番目の塩基配列に相補的であり、RNA分子であることを示す大文字で示されたGは、タイプBに特異的に存在する塩基に対応する。

【0011】

クエンチャーとしては、種々のものが市販されており、蛍光色素からの蛍光をクエンチできるものであれば特に制限されない。クエンチャーには蛍光色素と非蛍光色素があり、いずれでもよいが、検出の精度の観点から、非蛍光色素が好ましい。具体的なクエンチャーとしては、6-カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、Eclipse Dark Quencher、minor groove binder(MGB)、及び非蛍光クエンチャー(NFQ)等を挙げることができる。

【0012】

蛍光色素は、TaqManプローブに使用できるものであれば特に制限されず、適宜選択する

10

20

30

40

50

ことができる。具体的な蛍光色素としては、6-FAM、TE、HEX、Quasar 670、Quasar 570、Quasar 705、Pulsar 650、TET、HEX、VIC、JOE、CAL Fluor Orange、CAL Fluor Gold、CAL Fluor Red、Texas Red、Cy、Cy5等を挙げるができる。

【 0 0 1 3 】

プローブ B は、HHV6タイプ B のゲノムDNAとのみ完全に相補的であり、当該DNAにハイブリダイズするとRNaseの働きにより切断され、結果として蛍光色素が発する蛍光が検出可能となる。RNaseとしては、サイクリングプローブ法に用いることができるRNaseであれば特に制限されない。そのようなRNaseとしては、例えば、DNA/RNAハイブリッド二本鎖を形成しているRNAを切断し、一本鎖DNAを生じるRNase Hを挙げるができる。

【 0 0 1 4 】

プローブ B は、サイクリーブ ( cycleave ) PCR法において用いることが好ましく、配列番号 1 の塩基配列を有するプライマー及び配列番号 2 の塩基配列を有するプライマーからなるプライマー対と共に用いることが好ましい。このプライマー対は、後述する実施例に示すように、HHV6タイプ B のゲノムDNA ( Accesssion No (NCBI) AF157706.1 ) の103908番目の塩基 ~ 104040番目の塩基で構成される領域を増幅するように設計されている。プローブ B とこのプライマー対とを組み合わせる使用することにより高感度にHHV6タイプ B を検出することができる。

【 0 0 1 5 】

HHV6のタイプ A を検出する場合は、下記の構造 ( A - 1 ) ~ ( A - 3 ) のいずれかを有するHHV6タイプ A を検出するためのプローブ ( 以下、「プローブ A 」と称する場合もある ) をもちいることが好ましい。

( A - 1 ) : 5' -Q-gtgtgAcgt-F-3'

( A - 2 ) : 5' -Q-ggtgtgAcg-F-3'

( A - 3 ) : 5' -Q-gtgtgAcg-F-3'

(ここで、Qはクエンチャーであり、小文字アルファベットはDNA分子であり、大文字アルファベットはRNA分子であり、Fは蛍光色素であり、「5'」はプローブの5'末端を意味し、「3'」はプローブの3'末端を意味する)

【 0 0 1 6 】

プローブ ( A - 1 ) は、HHV6タイプ A のゲノムDNAの103976番目 ~ 103984番目の塩基配列に相補的であり、プローブ ( A - 2 ) は、HHV6タイプ A のゲノムDNAの103975番目 ~ 103983番目の塩基配列に相補的であり、プローブ ( A - 3 ) は、HHV6タイプ A のゲノムDNAの103976番目 ~ 103983番目の塩基配列に相補的である。いずれのプローブにおいても、大文字で示された A はタイプ A に特異的に存在する塩基に対応する。

【 0 0 1 7 】

プローブ A を用いたHHV6のタイプ A を検出する場合も、上述の配列番号 1 の塩基配列を有するプライマー及び配列番号 2 の塩基配列を有するプライマーからなるプライマー対を用いることが好ましい。

【 0 0 1 8 】

一実施形態において、プローブ A とプローブ B とを組み合わせる使用することが好ましい。例えば、遺伝子型が未知であるヘルペスウイルスに感染している ( 又はそれが疑われる ) 被検体から取得したサンプルとしてプローブ A 及びプローブ B の存在下でリアルタイム PCR を行うことにより、被検体がHHV6のタイプ A 又は B に感染しているか否かを効率的に識別することができる。プローブ A とプローブ B とを組み合わせる使用する場合、プローブ A の蛍光色素とプローブ B の蛍光色素は異なる種類であることが好ましい。そうすることにより、検出した光が、遺伝子型 A 及び B のいずれに対応するのか判別可能となる。

【 0 0 1 9 】

HHV6の遺伝子型を検出するためのキットは、プローブ A 及び / 又はプローブ B を含むことが好ましく、プローブ A 及び B を含むことがより好ましい。当該キットは、更に上述する配列番号 1 の塩基配列を有するプライマー及び配列番号 2 の塩基配列を有するプライマーからなるプライマー対を含むことが好ましい。上記キットは、その他、任意の成分、試

10

20

30

40

50

薬、又は説明書等を含見える。試薬としては、例えばRNase H、dNTPミックス、DNAポリメラーゼ、等を挙げることができる。キットに含まれる各成分は、別個の容器に收容されていてもよく、同一の容器に混合状態で收容されていても良い。また、各成分は、乾燥形態で容器に收容されていてもよく、適当な溶媒中に溶解した形態で容器に收容されていてもよい。

【0020】

PCR及び蛍光の検出は、サイクリングPCR法に適した市販される装置を用いて行うことができる。本発明で用いられるポリヌクレオチドは、いずれも通常のDNA自動合成機（例えばアプライドバイオシステム社製）を用いて、公知のDNA合成法（例えばホスホアミダイド法）によって調製することができる。プローブとして用いるDNA/RNAキメラポリヌクレオチドもまた、公知の通常の方法で調製することができる。

10

【0021】

PCR法における各条件（反応液の濃度及び量、並びに、変性、アニーリング、伸長の各段階の温度、時間、サイクル数等）は当業者が適宜決定することができる。好ましい条件としては以下のものが挙げられる。PCR法に供する反応液には、各プライマー及びプローブがそれぞれ50-500nMの濃度で含まれていることが好ましい。反応液の全量は好ましくは10~50µlである。PCR条件の好ましい条件としては、例えば、90~100℃・10秒~2分間（より好ましくは95℃・30秒間）のインキュベーション後、90~100℃・2秒~1分間（より好ましくは95℃・5秒間）、50~60℃・5秒~1分間（より好ましくは55℃・10秒間）、70~80℃・5~60秒（75℃・20秒）の反応を30~60サイクル（より好ましくは45サイクル）行うという条件が挙げられる。

20

【0022】

PCRの鑄型に用いるDNAは、HHV6のゲノムDNAである限り特に制限されない。一実施形態において、HHV6のDNAは、HHV6に罹患した被験者又はそれが疑われる被験者由来であることが好ましい。HHV6に罹患した被験者又はそれが疑われる被験者から取得する検体の種類は特に制限されず、例えば、血液（全血、血清、又は血漿を含む）を挙げることができる。

【実施例】

【0023】

以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

30

【0024】

実施例1

下記表1に示す構造を有するHHV6のタイプA及びタイプBを検出するためのDNA-RNAキメラプローブを作製した。

【0025】

【表1】

プローブ名	構造	結合領域
Type B プローブ1	5'-(Eclipse)gacg(G)cac(FAM)-3'	103985-103978
Type B プローブ2	5'-(Eclipse)agacg(G)cac(FAM)-3'	103986-103978
Type B プローブ3	5'-(Eclipse)cagacg(G)ca(FAM)-3'	103987-103979
Type B プローブ4	5'-(Eclipse)gacg(G)cac(FAM)-3'	103985-103978
Type A プローブ1	5'-(Eclipse)gtgtg(A)cgt(FAM)-3'	103976-103984
Type A プローブ2	5'-(Eclipse)ggtgtg(A)cg(FAM)-3'	103975-103983
Type A プローブ3	5'-(Eclipse)gtgtg(A)cg(FAM)-3'	103976-103983

40

【0026】

表1において、括弧内に大文字で示される塩基はRNAであり、その他の小文字で示される塩基はDNAである。EclipseとはEclipse Dark Quencherである。結合領域は、HHV6の全遺伝子配列（Accession No (NCBI) AF157706.1）において各プローブが結合する領域

50

を示す。

【 0 0 2 7 】

また、下記表 2 に示す構造を有する、HHV6 の遺伝子のうち 103982 位を含む領域を増幅するための 7 種類のプライマー対を作製した。

【 0 0 2 8 】

【表 2】

プライマー対 No		塩基配列	配列番号	結合領域
1	F	CGCTAGGTTGAGGATGATCGA	1	103908-103928
	R	CAAAGCCAAATTATCCAGAGCG	2	104040-104019
2	F	TTGTGTCGAGCGTTATTCC	3	103952-103970
	R	ACTTCGTCTTATCGAGCATCA	4	104194-104174
3	F	GAGCGCTAGGTTGAGAATG	5	103905-103923
	R	CAACTTGTTGATCTTGAGTCC	6	104122-10412
4	F	CTAGGTTGAGAATGATCGAA	7	103910-103929
	R	CGTTCTGTAGCAAATACGTTT	8	104095-104075
5	F	CTAGGTTGAGAATGATCGAA	9	103910-103929
	R	CGAAACGTTCTGTAGCAAATA	10	104100-104080
6	F	CAGGTACGTAGCATGGAG	11	103771-103788
	R	GGCATCGATATTTAACTTTG	12	104019-103400
7	F	CTAGGTTGAGAATGATCGAA	13	103910-103929
	R	AAATACGTTCTAGCCATCTTC	14	104084-104064

10

20

【 0 0 2 9 】

表 1 のプローブ及び表 2 のプライマー対を下記表 3 に示す組み合わせで用い、HHV6 のタイプ A 又はタイプ B の遺伝子配列を有するプラスミド DNA (ユーロフィンジェノミクス社製) を鋳型として PCR を行い、各組み合わせによる遺伝子型の検出を試みた。プラスミドのコピー数を  $10^0 \sim 10^6$  copies/ml までの段階希釈し、Ct 値に関する検量線の作成を試みた。PCR には、TaKaRa Cycleve PCR Starter Kit (Cycleve PCR Reaction Mix)、及び ABI StepOne Plus Real-Time PCR system を使用した。PCR は、Takara Cycleve マニュアルに従い下記の表 4 に示す条件で実施した。

30

【 0 0 3 0 】

【表 3】

試験 No.	プローブ名	プライマー対 No.	結果
1	Type B プローブ 1	1	Type B を高感度で検出
2	Type B プローブ 2	1	Type A に反応するため使用不可
3	Type B プローブ 3	1	Type A に反応するため使用不可
4	Type B プローブ 1	2	検出不可
5	Type B プローブ 2	3	検出不可
6	Type B プローブ 3	4	検出不可
7	Type A プローブ 1	1	Type A を高感度で検出
8	Type A プローブ 2	1	Type A を高感度で検出
9	Type A プローブ 3	1	Type A を高感度で検出
10	Type A プローブ 1	5	Type B に反応するため使用不可
11	Type A プローブ 2	6	Type B に反応するため使用不可
12	Type A プローブ 3	7	Type B に反応するため使用不可

10

20

【 0 0 3 1 】

【表 4】

試薬	使用量 ( $\mu\text{l}$ )	最終濃度 ( $\mu\text{M}$ )
Cycleave PCR Reaction Mix (2 x conc.)	10	1x
PCR Forward Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.4	0.2
PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.4	0.2
サイクリングプローブ (5 $\mu\text{M}$ )	0.8	0.2
ROX Reference Dye (50 x conc.)	0.4	1x
Template	5.0	
dH <sub>2</sub> O	2.0	
Total	20	

30

【 0 0 3 2 】

PCRサイクルの温度及び回数は下記の通りである。

Step PCR標準プロトコール。

Hold Cycle:1 95 30秒

Step PCR Cycle:45 95 5秒  
55 10秒  
72 20秒

40

Cooling Cycle:1 40 1分

【 0 0 3 3 】

各試験の結果は表 3 に示すとおりである。タイプBの検出は、タイプB プローブ1とプライマー対 1 の組み合わせでのみ従来のシーケンシングを用いた試験と同等に高い感度で検出可能であった(試験No.1)。同じプライマー対 1 を用いてもプローブの構造が僅かに異なるだけでType Bの検出はできないことが判明した(試験No.2及び3)。また、Type B プローブ1を用いた場合も、異なるプライマー対2~4ではType Bを検出できないことが判明した。Type Aの検出については、プローブの構造にある程度のバリエーションは許容されたが(試験No.1~3)、プライマー対5~7を用いた場合には検出できないことが判明し

50



た。

【 0 0 3 4 】

#### 実施例 2

ヘルペスウイルス 6 型に罹患した患者検体 1 及び 2 の血漿分離をした。血漿を 0.22  $\mu$  m (メルク社) のフィルターに通し、不純物を除去した。QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen 社) を使用し血漿 200  $\mu$  l から 100  $\mu$  l の DNA 溶液を回収した。従来シーケンス法を用いた測定により、患者検体 1 及び 2 のいずれについても Type B であることを確認した。尚、患者検体 1 のウイルス量は 19048.2 copies /ml であり、患者検体 2 のウイルス量は 9261.28 copies /ml であった。その後、一旦 DNA を凍結保存し、凍結した DNA を再解凍 (そのためウイルス量の若干の低下が予測される) して、実施例 1 と同様に異なるプローブ及びプライマー対の組み合わせで Type A 及び B の検出を試みた。その結果、Type B プローブ 1 とプライマー対 1 の組み合わせでのみ検出が確認された。

10

【配列表】

2018085961000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA08 QA18 QQ10 QQ42 QQ52 QR14 QR32 QR35 QR55 QR66  
QS34 QX02