



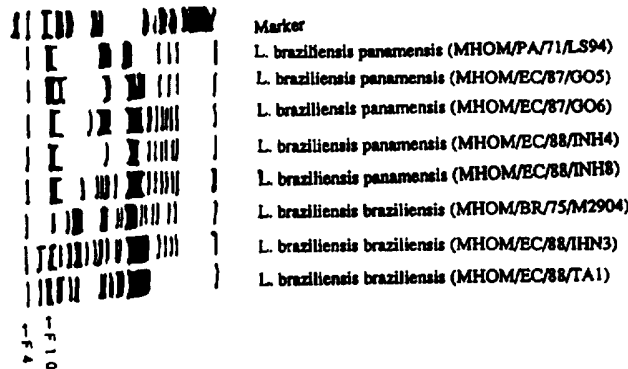
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 15/00, C07H 21/04, G01N 33/50</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO96/31623</p> <p>(43) 国際公開日 1996年10月10日(10.10.96)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00893 (22) 国際出願日 1996年4月2日(02.04.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/79087 1995年4月4日(04.04.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 佐谷秀行(SAYA, Hideyuki)(JP/JP) 三森龍之(MIMORI, Tatsuyuki)(JP/JP) 佐々木治一郎(SASAKI, Jiichiro)(JP/JP) 〒860 熊本県熊本市本荘二丁目2-1 熊本大学医学部腫瘍医学講座内 Kumamoto, (JP) 中田元巳(NAKATA, Motomi)(JP/JP) 〒244 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title : POLYNUCLEOTIDES FOR DETECTING LEISHMANIAS AND METHOD OF DETECTION OF LEISHMANIAL PROTOZOA

(54) 発明の名称 リーシュマニアの検出用ポリヌクレオチド及びリーシュマニア原虫の検出方法



(57) Abstract

Polynucleotides with which DNAs specific respectively for various leishmanias can be detected, isolated and sequenced. A method which makes it possible to accurately detect leishmanial protozoa in specimens and is thus applicable to diagnostic reagents, diagnostic kits, etc. for leishmanial infection. This method further makes it possible to distinguish *Leishmania braziliensis* from *L. mexicana* and is therefore applicable to the development of remedies etc. to be used upon discovery of leishmanial infection. It furthermore enables the development of reagents, diagnostic kits, etc. for the rapid diagnosis of mass infection by which a large number of specimens can be easily examined within a short period of time at once in an area under epidemic infection with leishmanias.

(57) 要約

本発明により、各種のリーシュマニアに特異的なDNAを検索し、単離し、塩基配列を同定することが可能とする。

従って、リーシュマニア原虫を検体から正確に検出可能となり、リーシュマニア原虫の感染を診断するための診断試薬、診断キット等への応用が可能となる。さらには、リーシュマニアのブラジル型とメキシコ型の区別が可能となることから、リーシュマニア感染が判明した後の治療薬の開発等に応用可能となる。またリーシュマニア流行地域での大規模な集団検診が短時間で簡単に一度に大量の検体を診断するための迅速集団診断用の試薬、診断キット等の応用開発をも可能とするものである。

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をパンフレット第一頁にPCT加盟国を固定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GG	ギブラルター	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MD	モルドバ共和国	SN	セネガル
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	TU	トルクメニスタン
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
						VN	ベトナム

明細書

リーシュマニアの検出用ポリヌクレオチド及びリーシュマニア原虫の検出方法

技術分野

本発明はリーシュマニア原虫に特異的なDNA及び該DNAを利用してリーシュマニア原虫を検索する方法に関するものである。

背景技術

リーシュマニア症は、Leishmania 属の原虫の感染によって引き起こされる疾患であり（例えば、医科学大辞典 49、ENCYCLOPEDIA OF MEDICAL SCIENCES, 1993, 4月発行、講談社を参照）、世界で1,200万人以上の患者がいると推定されており、WHOの重要指定疾患の1つに挙げられている。このリーシュマニア原虫は形態的には、アマスティゴート型とプロマスティゴート型の2型をとるが、これらの原虫は適当な培地に移植されるとすべてプロマスティゴート型となって増殖することが知られている。

さらにヒトに感染する種類は従来からドノバンリーシュマニア、熱帯リーシュマニアおよびブラジルリーシュマニアの3種が知られている。

しかしながら、これら3種は形態的にはまったく区別がつけられなかったが、近年免疫学、生化学的手法によりこれらの種には亜種や変種が存在することが明らかとなってきた。

この病原体の検出方法としては、直接原虫を検出する方法と、免疫反応その他により間接的に原虫の感染を推定する方法等が行われている。

このうち、直接検出する方法は確実ではあるが、時間および操作の煩雑さなどから短時間で大規模に実施することは困難である。

また間接的な検出方法としては、Chopra のアンチモン反応、Napierのアルデ

ヒド反応、Branchari のユーグロブリン反応等が知られている。

さらに免疫学的方法としては、補体結合反応、間接赤血球凝集反応、間接免疫蛍光法が知られている。

また、最終的な種の同定には、免疫反応とともに、培養原虫を用いて Adler's test, キネトプラストDNAの Buoyant-Densityの測定、各種アイソザイム isozymeの分析などによって行われている。

発明の開示

以上説明したように従来のリーシュマニア原虫のいくつかの検出方法は、精度、感度、作業性等の点で実用的ではなく、そのためリーシュマニア感染を防ぐ有力な手段である集団検診等に使用する診断薬、診断キットの開発へ応用できないという問題点があった。

さらに最終的な種の同定は、特に感染後の治療法の選択または確立にとって重要であるにもかかわらず、実用的に使用可能な同定方法はいまだ確立されていないという問題があった。

本発明の目的は以上の問題点に鑑み、リーシュマニア感染の有無および種の同定が、確実に、迅速に、かつ大規模に判定可能となる方法を提供し、リーシュマニア感染を防ぐ有力な手段である集団検診等に使用する診断薬、診断キット開発等への応用を可能とすることにある。

図面の簡単な説明

第1A図は、LS-3プライマを用いたPCR法により増幅されたDNAを示す電気泳動パターンを示す図である。

第1B図は、LS-3プライマを用いたPCR法により増幅されたDNAを示す電気泳動パターンを示す図である。

第2A図は、F4検出用プライマー（配列表5、6）を用いた場合、リーシュマ

ニアすべての種類で F 4 バンドの DNA の増幅が認められることを示す図である。第 2 B 図は、F 4 検出用プライマー（配列表 5、6）を用いた場合、リーシュマニアすべての種類で F 4 バンドの DNA の増幅が認められることを示す図である。第 3 A 図は、F 1 0 検出用のプライマー（配列表 2、3）を用いた場合、リーシュマニアブラジル型のみ F 1 0 バンドの DNA の増幅が認められることを示す図である。

第 3 B 図は、F 1 0 検出用のプライマー（配列表 2、3）を用いた場合、リーシュマニアブラジル型のみ F 1 0 バンドの DNA の増幅が認められることを示す図である。

第 4 図は、類縁の寄生虫であるトリパノゾーマについて、F 4 バンド検出用および F 1 0 バンド検出用プライマーを用いても増幅される DNA が存在しないことを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明をより詳細に説述するために、添付の図を用いてこれを説明する。

本発明は、各種のリーシュマニアに特異的な DNA を検索して単離し、塩基配列を同定し、さらに該 DNA を遺伝子増幅可能とする検出用プローブを用いることで、被検体中のリーシュマニア感染の有無、および種類を判断する手法を提供するものである。

さらに詳しくは、本発明は、分子中に少なくとも、

```
CTGTGTTAAT CTCAGTCGTC CTTCTCTTCT CTTCTGACTG GCTCGGCGCT CGGTACCGCT
TCTCGTTTCG CTTTGAACGG GAGAGCGGAG GAGAACGAGG AGGTGGGCGT ATCTGCTGAT
GAGAGCGGTC GGATCTGCAT GCATCACCGG TCCCTCGGAT GCACACACAT ACACACACAC
TCGGCCCGCA GTCCTCGCT TTGTGCCGCC TTTTTTCTTG TCTTGCCTTA CGCCATGTAC
TGCGACCACC CACACACACA CAC
```

の塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチドに関するものである。

また、本発明は、分子中に少なくとも、上記の塩基配列であるポリヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチドに係るものである。

さらに、本発明は、分子中に少なくとも、上記塩基配列と相補的な塩基配列であるポリヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチドに関するものである。

また、本発明は、上記3種類の塩基配列から選ばれる連続した少なくとも15の塩基からなるポリヌクレオチドまたは相補的ポリヌクレオチドに係るものである。

さらに、本発明は、塩基配列が、CTGACTGGCT CGGCGCTCGG TAC であるポリヌクレオチドに係るものである。

また本発明は、塩基配列が、GGTCGCAGAA CATGGCGTAA GGであるポリヌクレオチドに係るものである。

さらに本発明は、分子中に少なくとも、

GTTTCATGCAC GCCACTACTT GCAAGGGTCA CTCGGCATT TCGGAGGATA AAGGGAAAGA
GTTGACATTG CGGCGGAGGT TAGACATGCA AGTCAGGGCA CGGATGTGCG CCATCTCGTA
CCCTG

の塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチドに係るものである。

また本発明は、分子中に少なくとも、上の塩基配列であるポリヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチドに関するものである。

さらに、本発明は、分子中に少なくとも、上記に記載の塩基配列と相補的な塩基配列であるポリヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチドに係るものである。

さらに本発明は、上記3種類のいずれかに記載の塩基配列から選ばれる連続した少なくとも15の塩基からなるポリヌクレオチドまたは相補的ポリヌクレオチド

ドに係るものである。

また本発明は、塩基配列が、GTTCATGCAC GCCACTACTT GCAAGGであるポリヌクレオチドに係るものである。

さらに本発明は、塩基配列が、CAGGGTACGA GATGGCGCAC ATCCであるポリヌクレオチドに係るものである。

また本発明は、被検体に含有されるリーシュマニア原虫由来のDNAを鋳型とした遺伝子増幅反応により増幅したリーシュマニア原虫由来のDNAまたは該DNA由来のポリヌクレオチドを検出することにより、被検体中のリーシュマニア原虫由来のDNAまたは該DNA由来のポリヌクレオチドを検出する方法に係るものである。

リーシュマニア原虫、その種類、その培養について

本発明に係るリーシュマニア原虫の種類は以下の7種類である。

- L. braziliensis panamensis (MHOM/PA/71/LS94)
- L. braziliensis braziliensis (MHOM/BR/75/M2904)
- L. braziliensis guyanensis (MHOM/BR/75/M4147)
- L. mexicana mexicana (MNYC/BZ/62/M379)
- L. mexicana aristedesi (MORY/PA/68/GML3)
- L. mexicana amazonensis (MHOM/BR/73/M2269)
- L. major (MHOM/SU/73/5ASKH)
- L. chagasi (MHOM/BR/74/PP75)

遺伝子 (DNA) の抽出

本発明においては、これらの原虫からDNAを分離精製する方法は特に制限されず、公知の手段を用いることが可能であり、本発明では特にフェノール・クロロホルム法が好適に使用可能である。

アービトラリプライマー遺伝子増幅反应用プライマー (AP-PCRプライマー)

本発明において、リーシュマニアに共通するDNAを検索するために、遺伝子

増幅方法を使用するが、このためのアービトラリプライマは特に制限されるものでなく、例えば本発明においては、任意選択して以下の6種類のプライマーを使用するものである。

INV-1 (5' -ACCGGAATTCTTGGCTGTTGGCACGATGAG-3')

INV-2 (5' -TTGCAAGCTTTTATCTGGTTATATTGACAG-3')

LS-3 (5' -AAGTGTTGATACCCACTTTGT-3')

LS-2 (5' -CAATGGGTTACTGTTACAAC-3')

MS2-F (5' -CCTTAGGTTCTGGTAATGAC-3')

MS2-R (5' -GGGTGCAATCTCACTGGGAC-3')

これら6種類のプライマは、7種類のリーシュマニア原虫に共通のDNAと、ブラジル型リーシュマニアにのみ特異的なDNAを見いだす目的に使用可能とするものである。

遺伝子増幅反応の条件の検討

遺伝子増幅の条件についても特に制限されないが、例えばSakai 等の方法 (Sakai, et. al., Science, 230、1350, 1985、Sakai, et. al., Science, 239, 487, 1988)、または成書 (例えばMolecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989) に準じて検討し設定することが可能である。

本発明においては、この条件は例えば以下のものが好適に使用可能である。

DNAポリメラーゼの条件として、

- (1) 94℃、5分で1サイクル
- (2) 94℃、1分；37℃、1分；72℃、1分を10サイクル
- (3) 94℃、1分；60℃、1分；72℃、7分を30サイクル
- (4) 72℃、7分で1サイクル
- (5) 15℃で保存

が好適に使用可能である。

リーシュマニア原虫DNAフラグメントの検出

遺伝子増幅反応処理後の試料は、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）で分離分析可能であり（例えばMolecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 194-196, 1982、6、36章）、各バンドの同定は例えばエチジウムブロミド染色法（例えばMolecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 194-196, 1982）にて染色することにより可能である。

電気泳動パターンに基づき増幅されたDNAを比較することで、リーシュマニアに共通するDNA、またはリーシュマニアの特定の型に特異的なDNAを選び出すことが可能である。

例えば、本発明においては、第1A及び1B図に示したように、上記の6種類のプライマのうち、LS-3プライマを使用することにより特定のバンドのDNA（F4とする）をすべてのリーシュマニアに共通して増幅し、さらに特定のバンドのDNA（F10とする）をブラジル型リーシュマニアに共通して増幅することが可能となる。

リーシュマニアに特異的なDNAの塩基配列決定

リーシュマニアに特異的な上記のF4、およびF10のバンドのDNAの塩基配列の決定方法は、本発明においては特に制限されず、公知のマキシムギルバート法、サンガー法、DNAシーケンサー等による塩基配列決定方法が使用可能である。例えばABI製のモデル373ADNAシーケンサーが好適に使用可能である。すなわち、本発明においては、上記ABI製のモデル373ADNAシーケンサーを使用して上記の2種類のDNA、F10、F4の塩基配列が決定され、それぞれ配列表1、2に記載の塩基配列を得る。

リーシュマニアに特異的なDNAの検出用ポリヌクレオチドの選択

被検体中のリーシュマニアに特異的なDNAを遺伝子増幅反応を利用して検出するための検出用ポリヌクレオチドプライマー（フォワードプライマー、リバースプライマー）は、上記の方法で決定されたリーシュマニアに特異的なDNAの塩基配列から選ぶことが可能である。

例えば本発明においては、DNAバンドF4の検出用として塩基配列が配列表5および配列表6に記載のポリヌクレオチドを選択することが可能である。

またDNAバンドF10の検出用として塩基配列が配列表2および配列表3に記載のポリヌクレオチドを選択することが可能である。

選択されたポリヌクレオチドの調製方法は特には制限されず、公知のオリゴヌクレオチド調製手段が使用可能であり、例えば、DNA自動合成機等の方法で一般に合成可能である。本発明においては、ABI社製392DNA/RNA合成機を使用して可能である。

さらに得られたリーシュマニアに特異的なDNAの検出用ポリヌクレオチドプライマーを用いて、各種の遺伝子増幅反応によりリーシュマニアに特異的なDNAを増幅することが可能となる。

遺伝子増幅反応

本発明においては、本発明に係る検出用ポリヌクレオチド、すなわちプライマーを被検体に加えることにより、被検体中に目的とするリーシュマニア原虫が存在すればプライマーの伸張反応に基づくリーシュマニア遺伝子を増幅することが可能である。本発明においては、遺伝子増幅の方法は特に制限されず、一般の方法、すなわち、該伸張反応は、4種類のヌクレオチド三リン酸dNTP（デオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸）を基質として、該ポリヌクレオチドプライマーに結合させることにより可能である。

さらに使用可能な酵素としては、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) のDNAポリメラーゼI、*E.coli* DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、T4 DNAポリメラーゼ、耐熱性細菌由来のTaqポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、pfuポリメラーゼ等が好適に使用可能である。

特に高温で酵素活性を保持する耐熱性細菌由来のDNAポリメラーゼを使用することが好ましい。プライマーによる目的とするDNAの塩基配列認識の特異

性を高めることが可能だからである（詳細は特開平1-314965、特開平1-252300を参照）。

本発明においては、配列表5と6に記載のプライマーの組合わせを用いて伸張反応を繰り返すことにより、リーシュマニアに共通のF10バンドのDNAを効率的に増幅可能であり、さらに配列表2と3に記載のプライマーの組合わせを用いて伸張反応を繰り返すことにより、ブラジル型リーシュマニアに特異的なF4バンドのDNAを効率的に増幅可能である。

遺伝子増幅反応条件については、例えば次の成書、Molecular Cloning 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press chapter 4、またはPCR実験マニュアル HBJ出版社、実験医学 増刊Vol 8, No.9, 1990年羊土社を参照することが可能である。

被検体および検出法

本発明においては、被検体は特に制限されず、上記のリーシュマニアに特異的なDNAの検出用ポリヌクレオチドを用いて7種類のリーシュマニアに共通の特異的なDNAバンドF4とブラジル型に共通の特異的なDNAバンドF10とを、遺伝子増幅により検出可能とする。

被検体としては、例えば、臨床上外観よりリーシュマニア感染と見られる病巣周辺部の組織を採取することで可能である。採取方法は例えば、成書、病理標本の作り方（文光堂）の記載の方法に準じて可能である。

例えば、組織を採取後、コンパウンドにて包埋し、液体窒素等で急速冷凍し、クリオスタットにて凍結切片を作製し、得られた切片スライドを用いて遺伝子増幅反応を行うことが可能である。この場合、該スライド数枚を使用することによりリーシュマニア由来の遺伝子の存在の有無を検出可能となる。

増幅された遺伝子は一般的な方法で検出可能である。例えばアガロース電気泳動で分離した後、エテジウムブロミド等で染色し、紫外線照射により遺伝子による各バンドを検出可能である。

さらに、本発明における被検体としては、採取した組織から抽出したDNAを使用することも可能である（例えば細胞工学実験プロトコール5～7ページ、秀潤社に記載の方法を参照）。

すなわちサザンブロット法（Southern.E.M., J.Mol.Biol., 98, 503, 1975）を応用するものである（Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989）。

採取組織から得られたDNAを適当な制限酵素処理により断片とし、電気泳動により分離する。さらにDNAをニトロセルロース等のメンブレンに転写し、紫外線照射等によりDNAをメンブレンに固定する。

さらに、本発明に係るF4バンドDNA、F10バンドDNAの一部の塩基配列（36個から42個程度の連続した塩基配列が望ましい）を合成したものに検出用ラベル化したものと前記のメンブレンに固定されたDNAとハイブリダイゼーションさせることによりリーシュマニア由来のDNAを検出可能とするものである。

ラベル化としては、例えば³²P等の放射性物質でラベル（例えば3'、5'末端いずれも可能である）したり、またはビオチンであればアビジン（もしくはストレプトアビジン）-酵素結合体、またはハプテンであれば抗体-酵素結合体を用いて基質と反応させることにより検出可能となる。

さらに、ドットハイブリダイゼーション法を使用しても検出可能であり（Sakai, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6230-6234, 1989, または特開平1-31496を参考）。標識物質は特に制限はなく、蛍光物質（フルオロセイン、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、テキサスレッド、フィコエリスリン等）、化学発光物質（アクリジン、Eu-DPTA等）が、好適に使用可能である。また間接法も使用可能であり、ビオチン、ジオキシゲニン等も使用可能である。

例えば本発明においては、各検出用ポリヌクレオチドの5'末端にアミノリン

ク2 (ABI社製) を結合することで可能となる。

感染の判断およびリーシュマニア感染種の判断

上記説明したように、本発明に係る検出用ポリヌクレオチドプライマーを使用して、上記のF4バンドDNAおよび、F10バンドDNAを遺伝子増幅して検出可能とし、F4が観測された場合にリーシュマニアに感染していると判断可能であり、さらに、F10を検出した場合は、ブラジル型リーシュマニアに感染していると判断可能である。

実施例

つぎに実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

(1) リーシュマニア原虫遺伝子の抽出 (鋳型遺伝子)

以下の7種類の原虫を用いて検討した。

- L. braziliensis panamensis (MHOM/PA/71/LS94)
- L. braziliensis braziliensis (MHOM/BR/75/M2904)
- L. braziliensis guyanensis (MHOM/BR/75/M4147)
- L. mexicana mexicana (MNYC/BZ/62/M379)
- L. mexicana aristedesi (MORY/PA/68/GML3)
- L. mexicana amazonensis (MHOM/BR/73/M2269)
- L. major (MHOM/SU/73/5ASKH)
- L. chagasi (MHOM/BR/74/PP75)

これらのリーシュマニアのプロマスティゴートをシュナイダー培地で培養した後、回収し、SE緩衝液 (0.15M NaCl, 0.1M EDTA(pH8.0)) に懸濁した。

得られた懸濁液 (サスペンション) にサルコシルを加えて細胞を溶解した後プロテイナーゼKを加え60℃で1時間反応させた。

1時間後、16,000rpmにて90分間4℃で遠心分離した。

得られた上清について、フェノールクロロホルム溶液を等量加えてタンパク

質を除去した。

その後2.5 倍量のエタノールを加えて -80°C で20分間放置し、DNAを沈殿させた。

さらに16,000rpm で10分間の遠心分離の後沈殿をTE緩衝液(10mM Tris-HCl 8pH8.0), 1mM EDTA)に溶解し、鋳型(テンプレート)DNAとした。

(2) 遺伝子増幅反应用プライマー

アービトラリプライマとして以下の6種類のプライマを合成した。

合成はDNAシンセサイザ(ABI社製)を用いて行った。

INV-1 (5' -ACCGGAATTCTTGGCTGTTGGCACGATGAG-3')

INV-2 (5' -TTGCAAGCTTTTATCTGGTTATATTGACAG-3')

LS-3 (5' -AAGTGTGATACCCACTTTGT-3')

LS-2 (5' -CAATGGGTTACTGTTACAAC-3')

MS2-F (5' -CCTTAGGTTCTGGTAATGAC-3')

MS2-R (5' -GGGTGCAATCTCACTGGGAC-3')

(3) 遺伝子増幅の条件の検討

(1)で調製した鋳型DNA 50ng に対し、上記のアービトラリプライマをそれぞれ250ng加え、 dNTP_{mix} と $15.6 \mu\text{M}$, 0.6ユニットのTaqポリメラーゼおよび10mM Tris-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl_2 , 0.001%ゼラチンを加えて最終容量を $25 \mu\text{l}$ にて遺伝子増幅を行った。

遺伝子増幅条件は以下に示される。

(i) 94°C 、5分：1サイクル

(ii) 94°C 、1分； 37°C 、1分； 72°C 、1分：10サイクル

(iii) 94°C 、1分； 60°C 、1分； 72°C 、7分：30サイクル

(iv) 72°C 、7分：1サイクル

(v) 15°C で保存

上記の遺伝子増幅反応後 $5 \mu\text{l}$ を用いて、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動

で生成物を分離分析し、銀染色法にて染色した。

(4) リーシュマニア原虫フラグメントの検出

(3)の結果を、用いた(2)のプライマにより検討し第1A及び1B図に示した。

すなわち LS-3 のプライマを用いることにより、*L.braziliensis*に特有に発現しているF10バンドおよび*L.braziliensis*と *L.mexicana* の両方の原虫に発現しているF4バンドを検出することができる。

(5) F4バンドとF10バンドのDNAの塩基配列決定

各バンドは、目的のバンドをポリアクリルアミドゲルから切出し、ボイル法(例えば、*Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989)により抽出した。

この抽出した各バンドのDNAをTAクローニングキット(Invitrogen社)を用いてベクターに組込んだ。

このベクターのDNAについて、M13ユニバーサルプライマーと、リバープライマーを用いて、モデル373ADNAシーケンサー(ABI社製)を用いてシーケンスを行った。

その結果配列表1および4に記載される塩基配列を得た。

F10バンドDNA

CTGTGTTAAT CTCAGTCGTC CTTCTCTTCT CTTCTGACTG GCTCGGCGCT CGGTACCGCT
TCTCGTTTCG CTTTGAACGG GAGAGCGGAG GAGAACGAGG AGGTGGGCGT ATCTGCTGAT
GAGAGCGGTC GGATCTGCAT GCATCACCGG TCCCTCGGAT GCACACACAT ACACACACAC
TCGGCCCCGA GTCCCTCGCT TTGTGCCGCC TTTTTTCTTG TCTTGCCTTA CGCCATGTAC
TGCGACCACC CACACACACA CAC

F4バンドDNA

GTTTCATGCAC GCCACTACTT GCAAGGGTCA CTCGGCATT TCGGAGGATA AAGGGAAAGA
GTTGACATTG CGGCGGAGGT TAGACATGCA AGTCAGGGCA CGGATGTGCG CCATCTCGTA

CCCTG

(6) 検出用プライマーの合成

(5) で得られた塩基配列から、F4バンド、F10バンドDNAの検出用プライマーとしてそれぞれ2種類ずつ4種類(配列表2、3、および5、6に記の塩基配列)を選択し、これらを合成した。

合成は、DNAシンセサイザ(ABI社製)を用いて行った。

(7) リーシュマニアに特異的なDNAの増幅

(6) で合成して得られたF4バンド検出用プライマー(配列表5、6)およびF10バンド検出用プライマー(配列表2、3)を用い、(1) で得られた鋳型DNAを用いて遺伝子増幅反応を行った。

反応の条件はプライマーを変えた以外は(3)と同条件で行った。

すなわち、(1) で調製した鋳型DNA 50ng に対し、上記のプライマ(配列表5、6の組み合わせ、または配列用2、3の組み合わせ)をそれぞれ250ng加え、 $dNTP_{mix}$ と 15.6 μM , 0.6ユニットの Taqポリメラーゼおよび 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.001%ゼラチンを加えて最終容量を 25 μl にて遺伝子増幅を行った。

遺伝子増幅条件は以下に示される。

(i) 94°C、5分：1サイクル

(ii) 94°C、1分；60°C、1分；72°C、7分：30サイクル

(iii) 72°C、7分：1サイクル

(iv) 15°Cで保存

上記の遺伝子増幅反応後 5 μl を用いて、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で生成物を分離分析し、銀染色法にて染色した。

F4検出用プライマー(配列表5、6)を用いた場合、リーシュマニアすべての種類でF4バンドのDNAの増幅が認められた(第2A及び2B図)。

一方F10検出用のプライマー(配列表2、3)を用いた場合は、リーシュマ

ニアブラジル型のみ F 1 0 バンドの DNA の増幅が認められた（第 3 A 及び 3 B 図）。

さらに類縁の寄生虫であるトリパノゾーマについても、F 4 バンド検出用および F 1 0 バンド検出用プライマーを用いて増幅される DNA があるかどうか検討したところ、全く増幅が認められず（第 4 図）、以上の増幅はリーシュマニア原虫に特異的であることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明により、各種のリーシュマニアに特異的な DNA を検索可能となり、単離し、塩基配列を同定可能とする。

従って本発明により、リーシュマニア原虫を検体から正確に検出出来ることから、リーシュマニア原虫の感染かどうかを診断するための診断試薬、診断キット等への応用が可能となる。さらには、リーシュマニアのブラジル型とメキシコ型の区別が可能であることから、リーシュマニア感染が判明した後の治療法の決定の有用な判定データも提供できる。また本発明に係る方法により例えば、リーシュマニア流行地域での大規模な集団検診が短時間で簡単に一度に大量の検体を診断するための迅速集団診断用の試薬、診断キット等の応用開発をも可能とするものである。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：263

配列の型：核酸

トポロジー：2本鎖

配列の種類：DNA

配列

CTGTGTTAAT CTCAGTCGTC CTTCTCTTCT CTTCTGACTG GCTCGGGCT CGGTACCGCT 60
TCTCGTTTCG CTTTGAACGG GAGAGCGGAG GAGAACGAGG AGGTGGGCGT ATCTGCTGAT 120
GAGAGCGGTC GGATCTGCAT GCATCACCGG TCCCTCGGAT GCACACACAT ACACACACAC 180
TCGGCCCGCA GTCCCTCGCT TTGTGCCGCC TTTTTTCTTG TCTTGCCTTA CGCCATGTAC 240
TGCGACCACC CACACACACA CAC

配列番号：2

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

CTGACTGGCT CGGCGCTCGG TAC 23

配列番号：3

配列の長さ：22

配列の型：核酸

トポロジー：2本鎖

配列の種類：DNA

配列

GGTCGCAGAA CATGGCGTAA GG 22

配列番号：4

配列の長さ：125

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GTTTCATGCAC GCCACTACTT GCAAGGGTCA CTCGGCATT TCGGAGGATA AAGGGAAAGA 60
GTTGACATTG CGGCGGAGGT TAGACATGCA AGTCAGGGCA CGGATGTGCG CCATCTCGTA 120
CCCTG

配列番号：5

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：2本鎖

配列の種類：DNA

配列

GTTTCATGCAC GCCACTACTT GCAAGG 26

配列番号：6

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

CAGGGTACGA GATGGCGCAC ATCC

請求の範囲

1. 分子中に少なくとも、

CTGTGTTAAT CTCAGTCGTC CTTCTCTTCT CTTCTGACTG GCTCGGCGCT CGGTACCGCT
 TCTCGTTTCG CTTTGAACGG GAGAGCGGAG GAGAACGAGG AGGTGGGCGT ATCTGCTGAT
 GAGAGCGGTC GGATCTGCAT GCATCACCGG TCCCTCGGAT GCACACACAT ACACACACAC
 TCGGCCCGCA GTCCTCGCT TTGTGCCGCC TTTTTTCTTG TCTTGCCTTA CGCCATGTAC
 TGGACCACC CACACACACA CAC

の塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

2. 分子中に少なくとも、

請求項 1 に記載の塩基配列であるポリヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

3. 分子中に少なくとも、

請求項 1 に記載の塩基配列と相補的な塩基配列であるポリヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

4. 請求項 1～3 のいずれかに記載の塩基配列から選ばれる連続した少なくとも 15 の塩基からなるポリヌクレオチドまたは相補的ポリヌクレオチド。

5. 塩基配列が、CTGACTGGCT CGGCGCTCGG TAC であるポリヌクレオチド。

6. 塩基配列が、GGTCGCAGAA CATGGCGTAA GG であるポリヌクレオチド。

7. 分子中に少なくとも、

GTTTCATGCAC GCCACTACTT GCAAGGGTCA CTCGGCATT TGGCAGGATA AAGGGAAAGA
 GTTGACATTG CGGCGGAGGT TAGACATGCA AGTCAGGGCA CGGATGTGCG CCATCTCGTA
 CCCTG

の塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

8. 分子中に少なくとも、

請求項 7 に記載の塩基配列であるポリヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配

列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

9. 分子中に少なくとも、

請求項7に記載の塩基配列と相補的な塩基配列であるポリヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

10. 請求項7から9のいずれかに記載の塩基配列から選ばれる連続した少なくとも15の塩基からなるポリヌクレオチドまたは相補的ポリヌクレオチド。

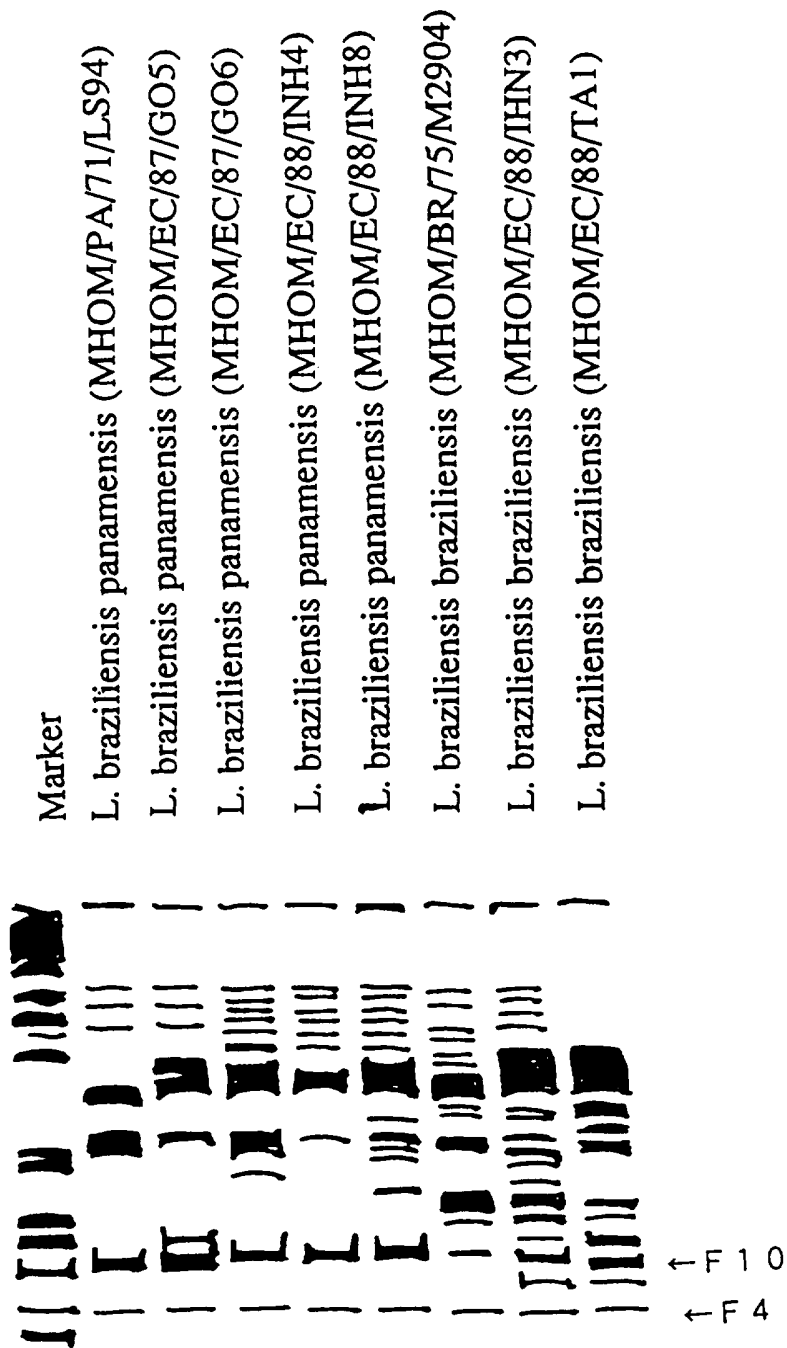
11. 塩基配列が、GTTTCATGCAC GCCACTACTT GCAAGG であるポリヌクレオチド。

12. 塩基配列が、CAGGGTACGA GATGGCGCAC ATCC であるポリヌクレオチド。

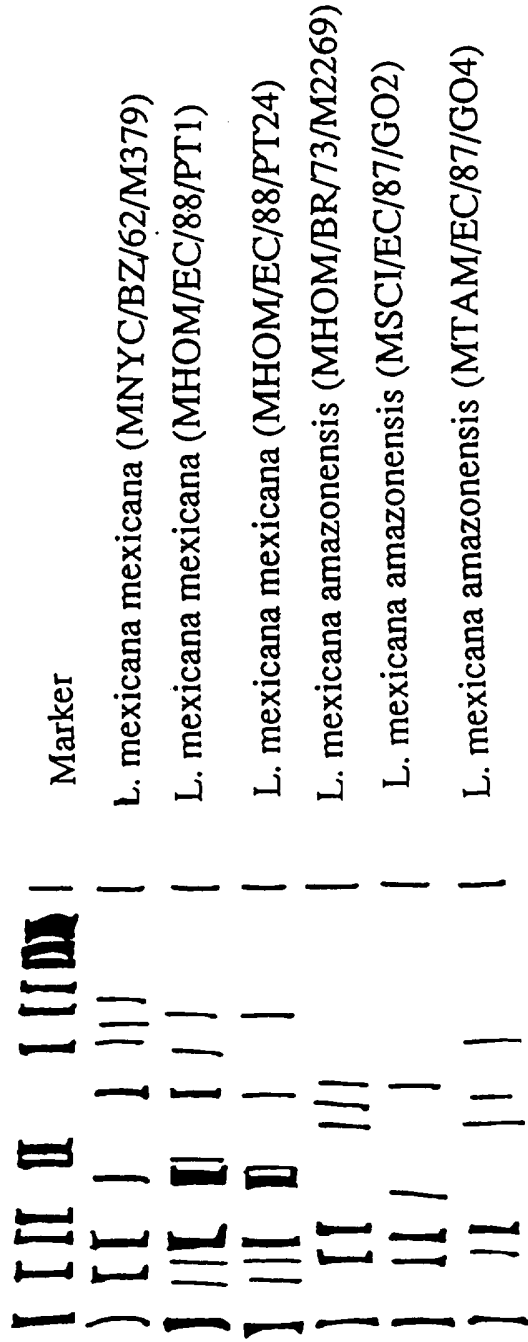
13. 被検体に含有されるリーシュマニア原虫由来のDNAを鋳型とした遺伝子増幅反応により、請求項1～3または7～9のいずれかに記載の塩基配列を少なくとも含むポリヌクレオチドを特異的に増幅したリーシュマニア原虫由来のDNAまたは前記DNA由来のポリヌクレオチドを検出することにより、被検体中のリーシュマニア原虫由来のDNAまたは前記DNA由来のポリヌクレオチドを検出する方法。

14. 被検体に含有されるリーシュマニア原虫由来のDNAを鋳型とし、請求項4～6または10～12のいずれかに記載のポリヌクレオチドを少なくとも1つ用いる遺伝子増幅反応により特異的に増幅し、上記増幅されたリーシュマニア原虫由来のDNAまたは前記DNA由来のポリヌクレオチドを検出することにより、被検体中のリーシュマニア原虫由来のDNAまたは該DNA由来のポリヌクレオチドを検出する方法。

第 1 A 例

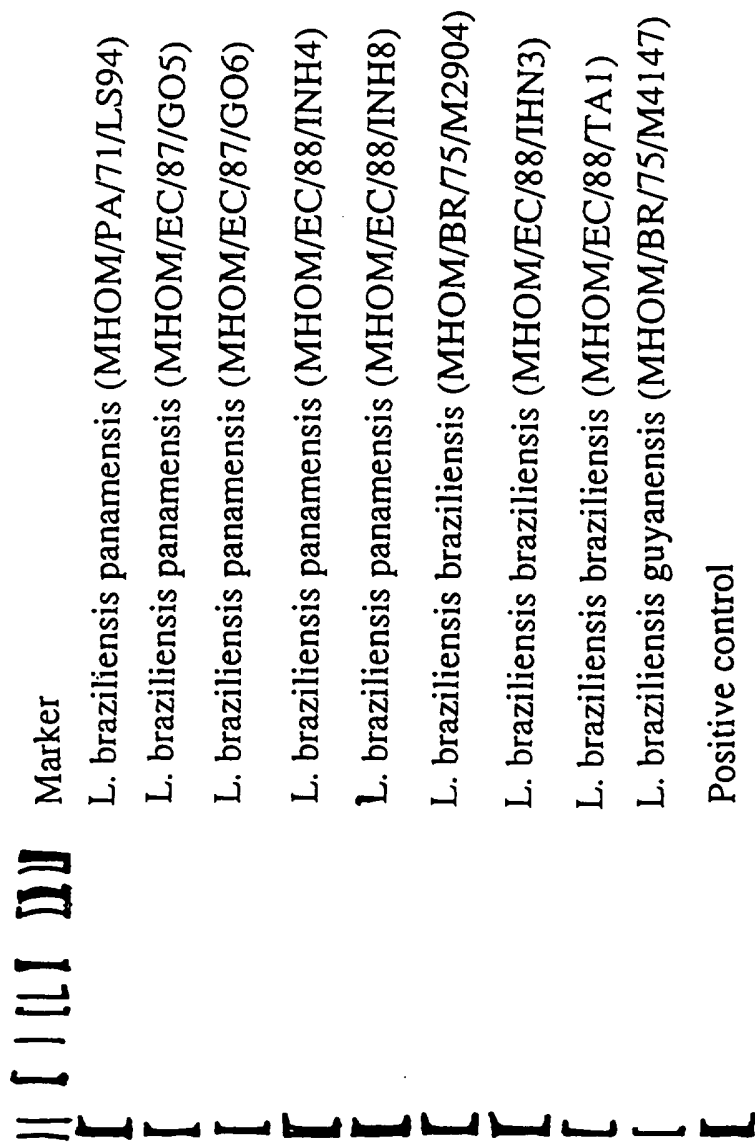


第 1 B 図

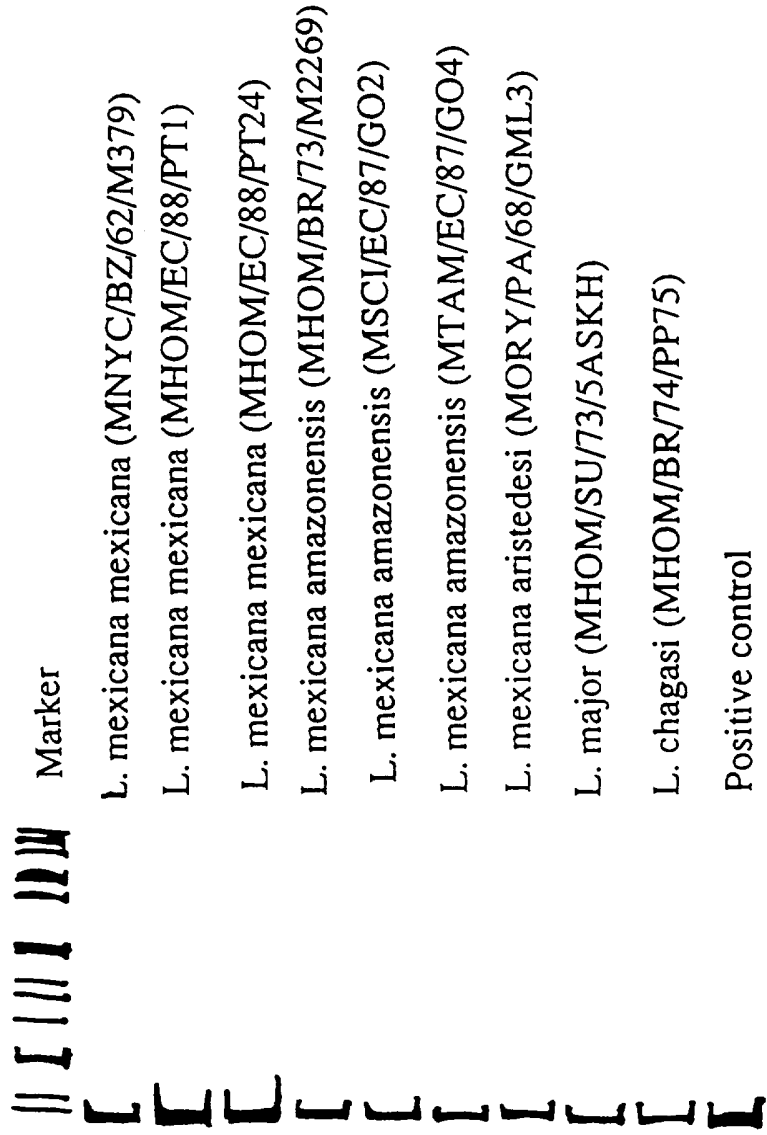


← F 4

第 2 A 図



第 2 B 页



← F 4

第 3 A 例

L (//) // (//) //	Marker
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> panamensis (MHOM/PA/71/LS94)
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> panamensis (MHOM/EC/87/GO5)
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> panamensis (MHOM/EC/87/GO6)
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> panamensis (MHOM/EC/88/INH4)
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> panamensis (MHOM/EC/88/INH8)
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> <i>braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2904)
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> <i>braziliensis</i> (MHOM/EC/88/INH3)
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> <i>braziliensis</i> (MHOM/EC/88/TA1)
L (//) // (//) //	L. <i>braziliensis</i> <i>guyanensis</i> (MHOM/BR/75/M4147)
L (//) // (//) //	Positive control

← F10

第 3 B 図



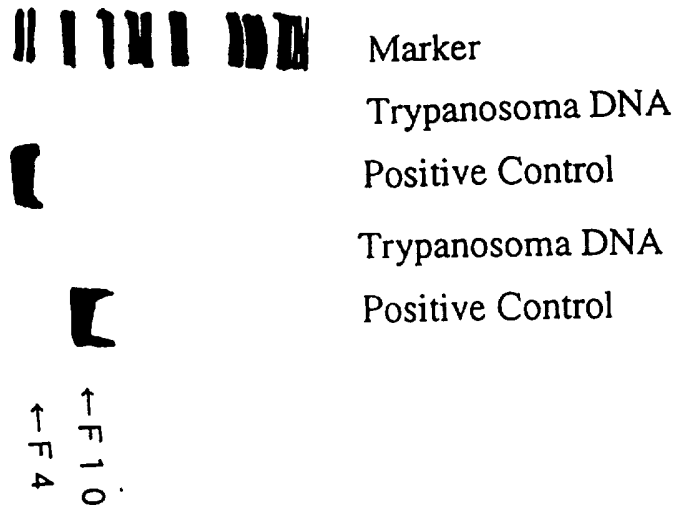
Marker

- L. mexicana mexicana (MNYC/BZ/62/M379)
- L. mexicana mexicana (MHOM/EC/88/PT1)
- L. mexicana mexicana (MHOM/EC/88/PT24)
- L. mexicana amazonensis (MHOM/BR/73/M2269)
- L. mexicana amazonensis (MSCI/EC/87/GO2)
- L. mexicana amazonensis (MTAM/EC/87/GO4)
- L. mexicana aristedesi (MORY/PA/68/GML3)
- L. major (MHOM/SU/73/5ASKH)
- L. chagasi (MHOM/BR/74/PP75)
- Positive control



↑ F 1 0

第4図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. C1 ⁶ C12Q1/68, C12N15/00, C07H21/04, G01N33/50 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C1 ⁶ C12Q1/68, C12N15/00, C07H21/04, G01N33/50 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSYS PREVIEW, CAS, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 420435, A2 (Miles Michael Alexander), April 3, 1991 (03. 04. 91) (Family: none)	1 - 14
A	WO, 84/01174, A1 (Harvard College), March 29, 1984 (29. 03. 84) & EP, 119209, A	1 - 14
A	Acta Tropica, Vol. 52 (1992) Maarten H.L. et al. "Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the Leishmania braziliensis complex by amplification of kinetoplast DNA" p. 45-58	1 - 14
A	Parasitology, Vol. 109 (1994) Eresh S. et al. Identification and diagnosis of Leishmania mexicana complex isolates by polymerase chain reaction" p. 423-433	1 - 14
A	Parasitology, Vol. 105 (1992) Smith A.J. et al. "Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples	1 - 14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "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 when the document is taken alone "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		
Date of the actual completion of the international search June 10, 1996 (10. 06. 96)		Date of mailing of the international search report June 18, 1996 (18. 06. 96)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00893

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>of kala-azar patients" p. 183-192</p> <p>Am. J. Trop. Med., Vol 49(3) (1993) Piarroux R. et al. "Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from Leishmania infantum. Development of a visceral Leishmaniasis Polymerase chain reaction" p. 364-369</p>	1 - 14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
IntCl ¹ C12Q 1/68, C12N 15/00, C07H 21/04, G01N 33/50		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
IntCl ¹ C12Q 1/68, C12N 15/00, C07H 21/04, G01N 33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSYS Preview, CAS, WPI		
C. 関連すると認められる文献		
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	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 420435, A2 (マイルズ・マイケル・アレキサンダー) 03. 4月. 1991 (03. 04. 91) (ファミリーなし)	1-14
A	WO, 84/01174, A1 (ハーバード カレッジ) 29. 3月. 1984 (29. 03. 84) & EP, 119209, A	1-14
A	Acta Tropica, Vol.52 (1992) Maarten H.L. et al. 「Diagnosis of New World leishmaniasis:specific detection of species of the <i>Leishmania braziliensis</i> complex by amplification of kinetoplast DNA」 p.45-58	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な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日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日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文献		
国際調査を完了した日	10. 06. 96	国際調査報告の発送日
		18.06.96
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 種村 慈樹 印	4B 9453
	電話番号 03-3581-1101 内線 3449	

C (続き). 関連すると認められる文献		
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	関連する 請求の範囲の番号
A	Parasitology, Vol.109 (1994) Eresh S. et al. 「Identification and diagnosis of <i>Leishmania mexicana</i> complex isolates by polymerase chain reaction」 p.423-433	1-14
A	Parasitology, Vol.105 (1992) Smith A.J. et al. 「Rapid and sensitive detection of <i>Leishmania</i> kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients」 p.183-192	1-14
A	Am. J. Trop. Med., Vol.49[3] (1993) Piarroux R. et al. 「Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from <i>Leishmania infantum</i> . Development of a visceral Leishmaniasis Polymerase chain reaction」 p.364-369	1-14