

明 細 書

発明の名称：

スタフィロкокカス・アルジェンテウスの検出のためのプライマーセット
及びプローブ

技術分野

[0001] 本発明は、スタフィロкокカス・アルジェンテウス (*Staphylococcus argenteus*) の存在を検出するためのプライマーセット及びプローブ等に関する。

背景技術

[0002] 感染症原因菌の検出方法として、原因菌を分離培養し、その生化学的性状をもとに菌の同定を行う培養同定法や、原因菌特異的遺伝子をPCR法等の遺伝子法により増幅し検出する遺伝子法等が知られている。

[0003] スタフィロкокカス・アルジェンテウスは、低頻度であるが稀に血液等の検体中で観測される菌種である。その臨床的意義については未だ明らかとされていない。しかしながら、スタフィロкокカス・アルジェンテウスをリアルタイムPCR等の遺伝子法で測定すると、食中毒を引き起こす黄色ブドウ球菌 (スタフィロкокカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)) のような他のスタフィロкокカス属菌種と誤同定されやすいという問題があった (特許文献1、2)。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2017-163969号公報
特許文献2：特開2017-163970号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記事情に鑑みて、本発明は、スタフィロкокカス・アルジェンテウスの

存在を検出するためのプライマーセット及びプローブ等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、スタフィロкокカス・アルジェンテウスの *nuc* (*thermostable nuclease*) 遺伝子の配列に着目することで、従来偽陰性の結果を示すことの多かったスタフィロкокカス・アルジェンテウスをその他のスタフィロкокカス属菌種と鑑別することが可能な配列を見出し、本発明を完成させるに至った。

[0007] 即ち、本願は以下の発明を包含する。

[1] 検体におけるスタフィロкокカス・アルジェンテウス (*Staphylococcus argenteus*) の存在を検出するためのプライマーセットであって、

スタフィロкокカス・アルジェンテウスの *nuc* 遺伝子を標的とする第一のプライマーと第二のプライマーとを含む、プライマーセット。

[2] *nuc* 遺伝子が、配列番号3又は4に示される塩基配列を有するか、あるいは配列番号3又は4のいずれかに示される塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列を有し、且つ *TNase* をコードする、[1] に記載のプライマーセット。

[3] 標的とされる *nuc* 遺伝子が、配列番号3又は4に示される塩基配列の217位から331位までの塩基配列のうちの連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有する、[1] 又は[2] に記載のプライマーセット。

[4] 第一のプライマーが、配列番号9に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号9に記載の塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号9に記載の塩基配列と同じ機能を有する、[1] ~ [3] のいずれかに記載のプライマーセット。

[5] 第二のプライマーが、配列番号10に記載の塩基配列を有するか、

あるいは配列番号 10 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 10 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 10 に記載の塩基配列と同じ機能を有する、[1] ～ [4] のいずれかに記載のプライマーセット。

[6] スタフィロコッカス・シュバイツェリ (*Staphylococcus schweitzeri*) の *nuc* 遺伝子を標的とする第三のプライマーを更に含む、[1] ～ [5] のいずれかに記載のプライマーセット。

[7] 第三のプライマーが、配列番号 11 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 11 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 10 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 11 に記載の塩基配列と同じ機能を有する、[1] ～ [6] のいずれかに記載のプライマーセット。

[8] スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子を標的とする第四のプライマーと第五のプライマーとを更に含む、[1] ～ [7] のいずれかに記載のプライマーセット。

[9] 第四のプライマーが、配列番号 6 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 6 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 10 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 6 に記載の塩基配列と同じ機能を有する、[1] ～ [8] のいずれかに記載のプライマーセット。

[10] 第五のプライマーが、配列番号 7 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 7 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 10 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 7 に記載の塩基配列と同じ機能を有する、[1] ～ [9] のいずれかに記載のプライマーセット。

[11] プライマーがビオチンで標識されている、[1] ～ [10] のいずれかに記載のプライマーセット。

〔12〕 検体におけるスタフィロコッカス・アルジェンテウスの存在を検出するためのプローブであって、

スタフィロコッカス・アルジェンテウスの *nuc* 遺伝子を標的とする、プローブ。

〔13〕 *nuc* 遺伝子が、配列番号 3 又は 4 に示される塩基配列を有するか、あるいは配列番号 3 又は 4 に示される塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列を有し、且つ *Nuc* タンパク質をコードする、〔12〕に記載のプローブ。

〔14〕 標的とされる *nuc* 遺伝子が、配列番号 3 又は 4 に示される塩基配列の 217 位から 331 位までの塩基配列のうちの連続する少なくとも 8 塩基を含む塩基配列を有する、〔12〕又は〔13〕に記載のプローブ。

〔15〕 配列番号 12 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 12 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 10 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 12 に記載の塩基配列と同じ機能を有する、〔12〕～〔14〕のいずれかに記載のプローブ。

〔16〕 〔1〕～〔11〕のいずれかに記載のプライマーセットと、〔12〕～〔15〕のいずれかに記載のプローブとを含む、キット。

〔17〕 スタフィロコッカス・アウレウスの *nuc* 遺伝子を標的とするプローブを更に含む、〔16〕に記載のキット。

〔18〕 スタフィロコッカス・アウレウスの *nuc* 遺伝子を標的とするプローブが配列番号 8 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 8 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 8 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 8 に記載の塩基配列と同じ機能を有する、〔17〕に記載のキット。

〔19〕 検体において、スタフィロコッカス・アルジェンテウスの存在を検出するための方法であって、〔1〕～〔11〕のいずれかに記載のプライ

マーセットを用いる、方法。

[20] 第一、第二及び第三のプライマーを用いてスタフィロкокカス・アルジェンテウスとスタフィロкокカス・シュバイツェリ又はそれ以外のスタフィロкокカス属細菌とを鑑別する工程を含む、[19]に記載の方法。

[21] [12]～[15]のいずれかに記載のプローブを更に用いる、[19]又は[20]に記載の方法。

[22] それ以外のスタフィロкокカス属細菌がスタフィロкокカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 又はコアグラゼ陰性スタフィロкокカス属細菌である、[19]～[21]のいずれかに記載の方法。

[23] コアグラゼ陰性スタフィロкокカス属細菌が、スタフィロкокカス・エピデルミジス (*Staphylococcus epidermidis*) ;スタフィロкокカス・アウリクラリス (*Staphylococcus auricularis*) ;スタフィロкокカス・カルノサス (*Staphylococcus carnosus*) ;スタフィロкокカス・コンディメンティ (*Staphylococcus condimentii*) ;スタフィロкокカス・ディブキイ (*Staphylococcus debuckii*,) ;スタフィロкокカス・マッシリエンシス (*Staphylococcus massiliensis*)、スタフィロкокカス・ピスチファーメンタンス (*Staphylococcus piscifermentans*) ;スタフィロкокカス・シミュランス (*Staphylococcus simulans*) ;スタフィロкокカス・キャピティス (*Staphylococcus capitis*) ;スタフィロкокカス・キャプラエ (*Staphylococcus caprae*) ;スタフィロкокカス・サカロリティクス (*Staphylococcus saccharolyticus*) ;スタフィロкокカス・ヘモリティカス (*Staphylococcus haemolyticus*) ;スタフィロкокカス・ディブリエシ (*Staphylococcus devriesei*)

); スタフィロコッカス・ホミニス (Staphylococcus hominis); スタフィロコッカス・ヒイカス (Staphylococcus hyicus); スタフィロコッカス・アグネティス (Staphylococcus agnetis); スタフィロコッカス・クロモジェネス (Staphylococcus chromogenes); スタフィロコッカス・コルヌビエンシス (Staphylococcus cornubiensis); スタフィロコッカス・フェリス (Staphylococcus felis); スタフィロコッカス・デルフィニ (Staphylococcus delphini); スタフィロコッカス・インタメディウス (Staphylococcus intermedius); スタフィロコッカス・ルタエ (Staphylococcus lutrae); スタフィロコッカス・ミクロティ (Staphylococcus microti); スタフィロコッカス・マスカ (Staphylococcus muscae); スタフィロコッカス・シュードインタメディウス (Staphylococcus pseudintermedius); スタフィロコッカス・ロスツイ (Staphylococcus rostri); スタフィロコッカス・シェレイフェリ (Staphylococcus schleiferi); スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス (Staphylococcus lugudnensis); スタフィロコッカス・サプロフィティクス (Staphylococcus saprophyticus); スタフィロコッカス・アレタエ (Staphylococcus arlettae) スタフィロコッカス・カエリ (Staphylococcus caeli); スタフィロコッカス・コオニ (Staphylococcus cohnii); スタフィロコッカス・エクロラム (Staphylococcus equorum); スタフィロコッカス・ガリナラム (Staphylococcus gallinarum); スタフィロコッカス・クローシ (Staphylococcus kloosii); スタフィロコッカス・リーイ (Staphylococcus

leei) ; スタフィロコッカス・ネパレンシス (*Staphylococcus nepalensis*) ; スタフィロコッカス・サキナス (*Staphylococcus succinus*) ; スタフィロコッカス・キシロサス (*Staphylococcus xylosus*) ; スタフィロコッカス・スキュリ (*Staphylococcus sciuri*) ; スタフィロコッカス・フレウレッティ (*Staphylococcus fleurettii*) ; スタフィロコッカス・レンティス (*Staphylococcus lentus*) ; スタフィロコッカス・ステパノビッチ (*Staphylococcus stepanovicii*) ; スタフィロコッカス・ビトゥリナス (*Staphylococcus vitulinus*) ; スタフィロコッカス・シミュランス (*Staphylococcus simulans*) ; スタフィロコッカス・パステウリ (*Staphylococcus pasteurii*) 及びスタフィロコッカス・ワネリ (*Staphylococcus warneri*) から成る群から選択される1種又は2種以上である、[19]～[22]のいずれかに記載の方法。

[24] それ以外のスタフィロコッカス属細菌がスタフィロコッカス・アウレウスであり、スタフィロコッカス・アウレウスの *nuc* 遺伝子を標的とする、第四のプライマーと第五のプライマー及び／又はプローブを更に用いる、[23]に記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明のプライマー及び／又はプローブによれば、誤同定されやすかったスタフィロコッカス・アルジェンテウスを従来よりも高精度に他のスタフィロコッカス属細菌と鑑別することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] S. アウレウスの NCTC 13626 株、AR 221 株の *nuc* 遺伝子 (配列番号 1、2)、S. アルジェンテウスの NCTC 13711 株、XNO 106 株の *nuc* 遺伝子 (配列番号 3、4)、S. schweitzeri FSCB 5 株の *nuc* 遺伝子 (配列番号 5) の多重整列結果。

[図2]配列番号6、7のプライマーセットを用いて得られた増幅産物の増殖曲線の結果。実線はS. アウレウス JCM5676株、破線はS. アルジェンテウス JCM31982株の結果をそれぞれ示す。

[図3]配列番号9、10、11のプライマーセットを用いて得られた増幅産物の増殖曲線の結果。実線はS. アウレウス JCM5676株、破線はS. アルジェンテウス JCM31982株の結果をそれぞれ示す。

[図4]S. アウレウス及びS. アルジェンテウスのゲノムDNAを対象としたDNAプローブを用いた基板上での検出結果。縦軸は π Codeにおいて測定した蛍光強度を示す。

[図5]臨床検体を対象としたDNAプローブを用いた基板上での検出結果。縦軸は π Codeにおいて測定した蛍光強度を示す。

[図6]配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットを用いて得られた増幅産物の増殖曲線の結果。

[図7]配列番号13、14のプライマーセットを用いて得られた増幅産物の増殖曲線の結果。

[図8]配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットを用いたときのPCR産物の熱融解曲線解析結果。

[図9]配列番号13、14のプライマーセットを用いたときのPCR産物の熱融解曲線解析結果。

[図10]配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットと、配列番号13、14のプライマーセットを用いた、S. アウレウス及びS. アルジェンテウスのゲノムDNAの基板上での検出結果。縦軸は π Codeにおいて測定した蛍光強度を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明の実施の形態（以下、「本実施形態」という。）について説明するが、本発明の範囲は以下の実施形態に限定して解釈されない。

[0011] （プライマーセット）

第一の態様において、検体におけるスタフィロコッカス・アルジェンテウ

ス (*Staphylococcus argenteus*) の存在を検出するためのプライマーセットが提供される。プライマーセットは、スタフィロコッカス・アルジェンテウスの *nuc* 遺伝子を標的とする第一のプライマーと第二のプライマーとからなる。

[0012] スタフィロコッカス属細菌における *nuc* 遺伝子は、ブドウ球菌属の中でも、黄色ブドウ球菌特有の熱安定性ヌクレアーゼである *TNase* をコードしており、遺伝子法における標的遺伝子として適していることが知られている (*Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J. Clin. Microbiol.* 30 : 1654-1660, 1992.)。

[0013] 検体は、スタフィロコッカス・アルジェンテウスを含むスタフィロコッカス属菌種の存在が疑われるものであれば特に限定されないが、ヒト又は非ヒト由来の血液、血清、血漿、尿、便、唾液、喀痰、組織液、髄液、ぬぐい液等の体液等又はその希釈物等が挙げられ、血液、血清、血漿、尿、便、髄液又はこれらの希釈物が好ましい。検体は食品であってもよい。

[0014] スタフィロコッカス・アルジェンテウスの *nuc* 遺伝子の例として、配列番号3又は4に示される塩基配列を有するか、あるいは配列番号3又は4に示される塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列を有し、且つ *TNase* をコードするものが挙げられる。

[0015] 例えば、フォワードプライマーとしての第一のプライマーは、ストリンジェントな条件下で、配列番号3又は4に示される塩基配列、又は配列番号3又は4に示される塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列、とハイブリダイズすることができるものであればどのような配列を有していてもよい。

[0016] 同様に、リバープライマーとしての第二のプライマーは、ストリンジェ

ントな条件下で、配列番号3又は4に示される塩基配列の相補鎖、又は配列番号3又は4に示される塩基配列の相補鎖において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列、とハイブリダイズすることができるものであればどのような配列を有していてもよい。

[0017] 本明細書で使用する場合、「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件を意味し、例えば塩基配列の長さなどの情報を基に適宜決定され得る。例えば、ストリンジェントな条件は、Molecular Cloning (Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)を参照して設定することができる。ストリンジェントな条件とは、相同性（好ましくは同一性）が高いポリヌクレオチド同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するポリヌクレオチド同士がハイブリダイズし、それより低い相同性を示すポリヌクレオチド同士がハイブリダイズしない条件ともいえる。

[0018] 具体的なストリンジェントな条件としては、ハイブリダイゼーション液（50%ホルムアミド、10×SSC（0.15M NaCl, 15mMクエン酸ナトリウム、pH7.0）、5×デンハルト溶液、1%SDS、10%デキストラン硫酸、10μg/mlの変性サケ精子DNA、及び50mMリン酸バッファー（pH7.5））中に所望の塩基配列に相補的な塩基配列と、スタフィロコッカス・アルジェンテウスの存在が疑われる検体とを約42℃～約50℃でインキュベーションし、そして0.1×SSC、0.1%SDSを用いて約65℃～約70℃で洗浄する条件である。

[0019] プライマー、プローブの設計は、他の類縁種の配列と交差反応を起こさないように行われるが、増幅産物などの検出に使用する系やその他の条件に応じて適宜変更することができる。100～200塩基長の長さの増幅産物を生成する場合、例えば、配列番号3又は4に示される塩基配列の217位か

331 位までの塩基配列を標的とすることが好ましい。プライマー及びプローブは、このような標的を構成する塩基配列のうちの連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有するように設計される。プライマーの末端、特に3'末端において、スタフィロコッカス・アルジェンテウス以外のスタフィロコッカス細菌とのミスマッチが存在するように設計を行うことが好ましい。

- [0020] スタフィロコッカス・アルジェンテウスのnuc遺伝子を標的とする第一のプライマーの例として、以下の配列番号9に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号9に記載の塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号9に記載の塩基配列と同じ機能を有するものが挙げられる。

5' -GGTGAACACCCCTGGTCTC-3' (配列番号9)

- [0021] スタフィロコッカス・アルジェンテウスのnuc遺伝子を標的とする第二のプライマーの例として、以下の配列番号10に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号10に記載の塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号10に記載の塩基配列と同じ機能を有するものが挙げられる。

5' -GATATTCCGGCCCCATAATG-3' (配列番号10)

- [0022] 第一及び第二のプライマーの長さは任意であり、例えば約10塩基～約35塩基の範囲で適宜設定できるが、少なくとも10塩基以上であることが好ましい。

- [0023] 第一のプライマーと第二のプライマーの比率は特に限定されず、同じであってもよいし、互いに異なってもよい。プライマーセットが非対称PCR法で使用される場合、一方のプライマーの濃度が他方のプライマーの濃度よりも高くなるように調整され得る。

- [0024] スタフィロコッカス属細菌はコアグララーゼ陽性と陰性のものに分類され、

例えば、スタフィロкокカス・アルジェンテウスはコアグラージェ陽性である。コアグラージェ陰性スタフィロкокカス属細菌（CNS）の中にはスタフィロкокカス・エピデルミデイス（表皮ブドウ球菌）という臨床材料から頻出されるスタフィロкокカス属細菌があり、スタフィロкокカス・アルジェンテウスはこのようなコアグラージェ陰性スタフィロкокカス属細菌とも鑑別される必要がある。コアグラージェ陰性スタフィロкокカス属細菌にはnuc遺伝子断片が存在しないため、鑑別に適している。

[0025] 配列番号10の塩基配列をベースとするプライマーは、スタフィロкокカス・シュバイツェリ（*Staphylococcus schweitzeri*）の存在を検出するためのフォワードプライマーとしても使用可能である。コアグラージェ陽性であるスタフィロкокカス・シュバイツェリは黄色ブドウ球菌の類縁であるが、配列上はよりスタフィロкокカス・アルジェンテウスに近い種であることが知られている。

[0026] 第一と第二のプライマーはスタフィロкокカス・アルジェンテウスのnuc遺伝子の全部又は一部の領域を特異的に増幅することができ、これにより、その他のスタフィロкокカス属菌種との鑑別が可能になる。あるいは、第一と第二のプライマーの増幅産物を融解曲線解析にかけ、その融解温度を他のプライマーセットによる増幅産物の融解温度と比較することでスタフィロкокカス・アルジェンテウスとその他のスタフィロкокカス菌種とを区別することもできる。

[0027] 第一と第二のプライマーはスタフィロкокカス・アルジェンテウスのnuc遺伝子の一部の領域を特異的に増幅することができ、これにより、その他のスタフィロкокカス属菌種との鑑別が可能になる。その他のスタフィロкокカス属菌種としては、スタフィロкокカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）又はコアグラージェ陰性スタフィロкокカス属細菌等がある。

[0028] ブドウ球菌属（genus *Staphylococcus*）は現在36菌種19亜種に分類されており、自然界においてはヒト、家畜を含む哺乳動

物、鳥類に広く分布している。黄色ブドウ球菌として知られるスタフィロコッカス・アウレウスはブドウ球菌属の中で最も病原性が高く、ヒトの化膿性疾患やブドウ球菌食中毒を起こす。スタフィロコッカス・アウレウスはコアグラゼ陽性である。

[0029] コアグラゼ陰性スタフィロコッカス属細菌には、限定しないが、スタフィロコッカス・アウリクラリス (*Staphylococcus auricularis*) ; スタフィロコッカス・カルノサス (*Staphylococcus carnosus*) ; スタフィロコッカス・コンディメンティ (*Staphylococcus condimentii*) ; スタフィロコッカス・ディブキイ (*Staphylococcus debuckii*,) ; スタフィロコッカス・マッシリエンシス (*Staphylococcus massiliensis*) ; スタフィロコッカス・ピスチファーメンタンス (*Staphylococcus piscifermentans*) ; スタフィロコッカス・シミュランス (*Staphylococcus simulans*) ; スタフィロコッカス・エピデルミデイス (*Staphylococcus epidermidis*) ; スタフィロコッカス・キャピティス (*Staphylococcus capitis*) ; スタフィロコッカス・キャプラエ (*Staphylococcus caprae*) ; スタフィロコッカス・サカロリティクス (*Staphylococcus saccharolyticus*) ; スタフィロコッカス・ヘモリティカス (*Staphylococcus haemolyticus*) ; スタフィロコッカス・ディブリエシ (*Staphylococcus devriesei*) ; スタフィロコッカス・ホミニス (*Staphylococcus hominis*) ; スタフィロコッカス・ヒイカス (*Staphylococcus hyicus*) ; スタフィロコッカス・アグネティス (*Staphylococcus agnetis*) ; スタフィロコッカス・クロモジェネス (*Staphylococcus chromogenes*) ; スタフィロコッカス・コルヌビエンシス (*Staphylococcus*

cornubiensis) ; スタフィロコッカス・フェリス (Staphylococcus felis) ; スタフィロコッカス・デルフィニ (Staphylococcus delphini) ; スタフィロコッカス・インタメディウス (Staphylococcus intermedius) ; スタフィロコッカス・ルタエ (Staphylococcus lutrae) ; スタフィロコッカス・ミクロティ (Staphylococcus microti) ; スタフィロコッカス・マスカ (Staphylococcus muscae) ; スタフィロコッカス・シュードインタメディウス (Staphylococcus pseudintermedius) ; スタフィロコッカス・ロスツイ (Staphylococcus rostri) ; スタフィロコッカス・シェレイフェリ (Staphylococcus schleiferi) ; スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス (Staphylococcus lugudnensis) ; スタフィロコッカス・サブロフィティクス (Staphylococcus saprophyticus) ; スタフィロコッカス・アレタエ (Staphylococcus arlettae) ; スタフィロコッカス・カエリ (Staphylococcus caeli) ; スタフィロコッカス・コオニ (Staphylococcus cohnii) ; スタフィロコッカス・エクロラム (Staphylococcus equorum) ; スタフィロコッカス・ガリナラム (Staphylococcus gallinarum) ; スタフィロコッカス・クローシ (Staphylococcus kloosii) ; スタフィロコッカス・リーイ (Staphylococcus leei) ; スタフィロコッカス・ネパレンシス (Staphylococcus nepalensis) ; スタフィロコッカス・サキナス (Staphylococcus succinus) ; スタフィロコッカス・キシロサス (Staphylococcus xylosus) ; スタフィロコッカス・スキュリ (Staphylococcus sciuri) ; スタフィロコッカス・フレウレッティ (Staphylococcus

s f l e u r e t t i i) ; スタフィロコッカス・レンティス (S t a p h y l o c o c c u s l e n t u s) ; スタフィロコッカス・ステパノビッチ (S t a p h y l o c o c c u s s t e p a n o v i c i i) ; スタフィロコッカス・ビトゥリナス (S t a p h y l o c o c c u s v i t u l i n u s) ; スタフィロコッカス・シミュランス (S t a p h y l o c o c c u s s i m u l a n s) ; スタフィロコッカス・パステウリ (S t a p h y l o c o c c u s p a s t e u r i) ; スタフィロコッカス・ワネリ (S t a p h y l o c o c c u s w a r n e r i) 等が含まれる。

[0030] プライマーセットは第一及び第二のプライマー以外のプライマー、例えば第三、第四、第五、第六等の追加のプライマーを含んでいてもよい。適切な追加のプライマーを使用することで検出感度が向上し得る。そのようなプライマーとしては、例えば、検体中に含まれることが予想されるスタフィロコッカス・アルジェンテウスやその他のスタフィロコッカス属菌種を検出するためのプライマー等が想定される。その他のスタフィロコッカス属菌種としてはスタフィロコッカス・シュバイツェリが挙げられる。

[0031] スタフィロコッカス・シュバイツェリを検出するためのフォワードプライマーとしては上述した配列番号 10 に記載のものがあり、リバープライマーとしては配列番号 11 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 11 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 10 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 11 に記載の塩基配列と同じ機能を有するものが挙げられる。

[0032] 上記プライマーを用いる核酸増幅反応により、検体に含まれるスタフィロコッカス・アルジェンテウスの存在を検出し、ひいては他のスタフィロコッカス属細菌と鑑別することができる。例えば、スタフィロコッカス・アウレウスの n u c 遺伝子を標的とする第四のプライマーと第五のプライマーを使用することで、鑑別の精度を向上させることができる。

[0033] 第四のプライマーの例として、配列番号 6 に記載の塩基配列を有するか、

あるいは配列番号 6 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 10 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 6 に記載の塩基配列と同じ機能を有するものが挙げられる。

[0034] 第五のプライマーの例として、配列番号 7 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 7 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 10 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 7 に記載の塩基配列と同じ機能を有するものが挙げられる。

[0035] 核酸増幅法としては PCR 法があり、マルチプレックス PCR、LAMP (Loop-mediated isothermal AMPLification) 法、ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法、RCA (Rolling Circle Amplification) 法、LCR (Ligase Chain Reaction) 法、SDA (Strand Displacement Amplification) 法等を挙げることができる。検体に多数のスタフィロコッカス属細菌が含まれていると予想される場合、複数の菌を網羅的に同時検出することが可能なマルチプレックス PCR が好ましい。

[0036] 増幅産物の検出方法は、ポリアクリルアミド又はアガロースゲルを用いた電気泳動法など、既知の方法で行うことができる。例えば、電気泳動では、分子量が既知のマーカーの移動度に対する増幅産物の移動度から、増幅産物の存在を同定することができる。

[0037] 核酸増幅反応後の増幅産物の検出には、増幅産物を特異的に認識することができる標識体を利用してもよい。そのような標識体としては蛍光色素、ビオチン、ジゴキシゲニン等が挙げられる。標識体として蛍光を用いた場合には、その蛍光を蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダー等を用いて検出すること

ができる。

[0038] (プローブ)

第二の態様において、検体におけるスタフィロкокカス・アルジェンテウスの存在を検出するためのプローブが提供される。プローブはスタフィロкокカス・アルジェンテウスの *nuc* 遺伝子を標的とすることができる。

[0039] プローブは、好ましくはその内部がスタフィロкокカス・アルジェンテウス以外のスタフィロкокカス属細菌に対するミスマッチを含むように設計される。これにより、ハイブリダイズ時のフルマッチ部分の塩基長が短くなり、特異性が向上し、偽陽性が低減し得る。

[0040] スタフィロкокカス・アルジェンテウス又はスタフィロкокカス・シュバイツェリ用のプローブの例として、以下の配列番号 12 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 12 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 8 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 12 に記載の塩基配列と同じ機能を有するものが挙げられる。5' - C A T A T T T T C A A C G C C T - 3' (配列番号 12)

[0041] スタフィロкокカス・アルジェンテウス又はスタフィロкокカス・シュバイツェリ以外のスタフィロкокカス属細菌用のプローブを組み合わせてもよい。スタフィロкокカス・アウレウス用のプローブの例として、以下の配列番号 8 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 18 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 50 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 8 に記載の塩基配列と同じ機能を有するものが挙げられる。

[0042] プローブはビーズ等の固相体に結合されてもよい。そのような固相体の例としては、マルチプレックスアッセイに適したビーズ、例えば、WO 2018052464A1 に開示されているようなマルチプレックスアッセイについての情報を記憶するための固有のアナログコード識別子を有するビーズが挙げられる。

[0043] (キット)

第三の態様において、検体におけるスタフィロコッカス・アルジェンテウスの存在を検出するためのプライマーセットと、検体におけるスタフィロコッカス・アルジェンテウスの存在を検出するためのプローブとを含むキットが提供される。

[0044] キットには、スタフィロコッカス・アルジェンテウスの検出に使用する試薬、例えば増幅反応を行うための試薬を含めてもよい。増幅反応を行う試薬は、例えば緩衝液、塩類、プライマー、デオキシリボヌクレオチド類、耐熱性DNAポリメラーゼ等を含む。キットの内容物や試薬は増幅方法に応じて当業者が適宜決定することができ、キットはプライマーを用いて得られる増幅産物又はプローブとハイブリダイゼーションさせるための固相体を更に含んでいてもよい。

[0045] キットは更に、検体中に含まれることが予想されるスタフィロコッカス・アウレウス又はスタフィロコッカス・エピデルミディス、あるいはその他のスタフィロコッカス菌種を検出するためのプライマーやプローブを含んでもよい。スタフィロコッカス・アウレウスを検出するためのプライマー、プローブの例として、配列番号6及び7に示される塩基配列を有するプライマー、配列番号8に示される塩基配列を有するプローブが挙げられる。

[0046] (検出方法)

第四の態様において、検体におけるスタフィロコッカス・アルジェンテウスの存在を検出するための方法が提供される。スタフィロコッカス・アルジェンテウスの存在の検出には上記プライマーセット、及び／又はプローブを用いることができる。

[0047] 配列番号9及び10のプライマーセットを使用することでスタフィロコッカス・アルジェンテウスがスタフィロコッカス・アウレウス又はその他のスタフィロコッカス属細菌から鑑別され得る。配列番号10のリバースプライマーに配列番号11のフォワードプライマーを組み合わせることでスタフィロコッカス・シュバイツェリの存在も検出することができる。

[0048] 検体を更にANI (Average Nucleotide Identity) 解析にかけることで検出された細菌の異同を判断してもよい。

[0049] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない

実施例

[0050] 実施例1：S. アウレウス、S. アルジェンテウスのゲノムDNAを対象としたDNAプローブを用いた基板上での検出

[0051] プライマー・プローブの設計

図1に示すS. アウレウスのNCTC13626株、AR221株のnuc遺伝子(配列番号1、2)、S. アルジェンテウスのNCTC13711株、XNO106株のnuc遺伝子(配列番号3、4)、S. シュバイツェリのFSCB5株のnuc遺伝子(配列番号5)の多重整列結果から、配列番号6～12のプライマー・プローブを設計した。

[表1]

配列番号6： S. アウレウスプライマー	GGTGAACACCCTGGTTTC
配列番号7： S. アウレウスプライマー	CGATATTCGGCCCCATG
配列番号8： S. アウレウスプローブ	GTTGCAGCAGTTTGAG
配列番号9： S. アルジェンテウスプライマー	GGTGAACACCCTGGTCTC
配列番号10： S. アルジェンテウス/シュバイツェリプライマー	GATATTCGGCCCCATAATG
配列番号11： S. シュバイツェリプライマー	GAACTGCAGCATTTTG
配列番号12： S. アルジェンテウス/シュバイツェリプローブ	GAACTGCAGCATTTTG

[0052] 核酸増幅の確認

S. アウレウスJCM5676株、S. アルジェンテウスJCM31982株から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、配列番号6、7のプライマー、もしくは、9、10、11のプライマーを用いて、リアルタイムPCRによる増幅を行った。増幅に用いた試薬はTakara Multiplex Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ社)、インターカラー色素にEvaGreen (biotium社)を使用した。各プライマーは

終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ 、鋳型のゲノムDNAは $10 \mu\text{g/L}$ となるように添加し、TaKaRa Multiplex Assay Kit Ver. 2内の $2\times\text{Reaction buffer}$ は $1\times$ 、Multiplex Enzyme Mix は 1U を使用し、鋳型DNA等を混合してPCR反応液を調製した。測定装置にはLight Cycler 480 System II (Roche Diagnostics社) を用いた。

[0053] 使用した増幅反応条件は以下のとおりである。

94°C : 30 秒

60°C : 60 秒 $\rightarrow 94^{\circ}\text{C}$: 30 秒 (サイクル数 45 回)

72°C : 600 秒

[0054] 配列番号6、7のプライマーを用いたときの測定結果を図2に、配列番号9、10、11のプライマーを用いたときの測定結果を図3に示す。配列番号6、7のプライマーセットではS. アウレウスJCM5676株のみで増幅が確認されたのに対し、配列番号9、10、11のプライマーセットではS. アルジェンテウスJCM31982株のみで増幅が確認された。以上から、配列番号6、7のプライマーセットおよび9、10、11のプライマーセットが、互いに標的とした核酸成分を増幅させる機能があることが分かった。

[0055] 核酸増幅および検出

S. アウレウスJCM 5676株、S. アルジェンテウスJCM 31982株を用い、配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットを用いて、PCRによる増幅、および、基板上でのハイブリダイゼーション反応および標識化、蛍光測定を行った。このとき、配列番号7および11の5'末端に、リンカーを介しビオチン修飾を行ったプライマーを使用した。

[0056] 増幅にはTaKaRa Multiplex Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ社) を使用した。各プライマーは終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ 、鋳型のゲノムDNAは $10 \mu\text{g/L}$ となるように添加し、TaKaRa Multiplex Assay Kit Ver. 2内の $2\times\text{React i}$

on bufferは1X、Multiplex Enzyme Mixは1Uを使用し、鋳型DNA等を混合してPCR反応液を調製した。核酸増幅装置にはT100 Thermal Cycler (Bio-Rad社)を用いた。増幅反応終了後、基板上でのハイブリダイゼーション反応に供する前に、熱変性反応を同機器にて行った。

[0057] 基板上でのハイブリダイゼーション反応に用いた試薬は、配列番号8のプロープが固定化された基板1および配列番号12のプロープが固定化された基板2が含まれた溶液、Saline-sodium-phosphate-EDTA Buffer (SSPE-buffer)、熱変性を実施したPCR反応液を混合した。

[0058] 標識化にはStreptavidin-Phycoerythrin (PlexBio社)を試薬に用いた。基板上でのハイブリダイゼーション反応および標識化は、機器にIntelliPlex 1000 πCode Processor (PlexBio社)を用いた。

[0059] 蛍光測定装置は、PlexBio (登録商標) 100 Fluorescent Analyzer (PlexBio社)を用いた。

[0060] 使用した反応条件は以下のとおりである。

増幅反応条件

94℃: 30秒

60℃: 60秒→94℃: 30秒 (サイクル数30回)

72℃: 600秒

[0061] 熱変性条件

95℃: 5分→4℃へ急冷

[0062] ハイブリダイズ条件

37℃: 20分インキュベート

[0063] 標識化条件

37℃ 10分インキュベート

[0064] 測定結果を図4に示す。S. アウレウスJCM5676株を鋳型とした場

合、基板1において蛍光が観測され、また、S. アルジェンテウス JCM 31982株を鋳型とした場合、基板2において蛍光が観測された。また、陰性コントロールとして、水を鋳型とした場合では、蛍光は観測されなかった。以上から、配列番号6、7、9、10、11のプライマーおよび配列番号8および配列番号12のプロブを用いることで、従来では鑑別のできなかったS. アウレウスとS. アルジェンテウスの鑑別が可能となることが期待できた。また、配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットを同一系中で共存させても機能することが確認できた。

[0065] 実施例2：臨床検体（血液培養液）3検体を対象としたDNAプロブを用いた基板上での検出

[0066] 核酸増幅および検出

培養同定法において、S. アウレウスと同定された検体1および2、S. エピデルミディスと同定された検体3に対して、QIAamp Biostic Bacteremia DNA Kit (QIAGEN社)を用い、試薬付属の標準プロトコールに則り抽出したゲノムDNAを鋳型とし、配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットを用いて、PCRによる増幅、および、基板上でのハイブリダイゼーション反応および標識化、蛍光測定を行った。このとき、配列番号7および11の5'末端に、リンカーを介しビオチン修飾を行ったプライマーを使用した。

[0067] 増幅にはTaKaRa Multiplex Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ社)を使用した。各プライマーは終濃度0.2 μ M、鋳型のゲノムDNAは10 μ g/Lとなるように添加し、TaKaRa Multiplex Assay Kit Ver. 2内の2×Reaction bufferは1×、Multiplex Enzyme Mixは1Uを使用し、鋳型DNA等を混合してPCR反応液を調製した。核酸増幅装置にはT100 Thermal Cycler (Bio-Rad社)を用いた。増幅反応終了後、基板上でのハイブリダイゼーション反応に供する前に、熱変性反応を同機器にて行った。

- [0068] 基板上でのハイブリダイゼーション反応に用いた試薬は、配列番号8のプロープが固定化された基板1および配列番号12のプロープが固定化された基板2が含まれた溶液、Saline-sodium-phosphate-EDTA Buffer (SSPE-buffer)、熱変性を実施したPCR反応液を混合した。
- [0069] 標識化にはStreptavidin-Phycoerythrin (PlexBio社)を試薬に用いた。基板上でのハイブリダイゼーション反応および標識化は、機器にIntelliPlex 1000 πCode Processor (PlexBio社)を用いた。
- [0070] 蛍光測定装置は、PlexBio (登録商標) 100 Fluorescent Analyzer (PlexBio社)を用いた。
- [0071] 使用した反応条件は以下のとおりである。
- 増幅反応条件
- 94℃ : 30秒
- 60℃ : 60秒 → 94℃ : 30秒 (サイクル数30回)
- 72℃ : 600秒
- [0072] 熱変性条件
- 95℃ : 5分 → 4℃へ急冷
- [0073] ハイブリダイズ条件
- 37℃ : 20分インキュベート
- [0074] 標識化条件
- 37℃ : 10分インキュベート
- [0075] 測定結果を図5に示す。検体1を鋳型とした場合、基板1において蛍光が観測され、また、検体2を鋳型とした場合、基板2において蛍光が観測された。このことから、実施例1に鑑み、検体2はS. アルジェンテウスである可能性が示唆された。後の検証1にて、検体1および2について、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析とANIによる菌種同定を行った結果、検体1はS. アウレウスであったのに対し、検体2はS. アルジェンテウスと

して分類がされることが判明し、実施例 1 と合わせ、配列番号 6、7、9、10、11 のプライマーセットを用い、配列番号 8 および配列番号 12 のプローブを用いることで、従来では鑑別のできなかった *S. アウレウス* と *S. アルジェンテウス* の鑑別が可能となった。

[0076] また、検体 3 については、どちらの基板からも蛍光が観測されなかったため、配列番号 6、7、9、10、11 のプライマーセットを用い、配列番号 8 および配列番号 12 のプローブを用いても、他のスタフィロコッカス属細菌である *S. エピデルミディス* を誤って検出することはないことが分かった。

[0077] 検証 1：検体 1 および 2 の次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析と ANI による菌種同定

遺伝子の配列情報を用いた菌種同定には、古くは DDH (DNA-DNA Hybridization) 法が用いられてきたが、現在では、ANI (Average Nucleotide Identity) 法が標準的な手法として取って代わってきている。

ANI とは、解析対象の全ゲノムの配列が、データベース上に登録されているどのリファレンス配列に対して配列類似性が高いかという計算結果をもとにして、菌種の同定を行う手法である。

[0078] i) 分離コロニーからの釣菌およびゲノム抽出

分離コロニーから釣菌し、Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (日本ジェネティクス社) で処理した上清を、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス社) を用い、試薬付属の標準プロトコールに則り、ゲノムを抽出した。

[0079] ii) ライブラリー調製

QIAseq FX DNA Library kit (QIAGEN 社) を用いて、試薬付属の標準プロトコールに則り、ライブラリーを調製した。

[0080] i i i) シーケンス反応

MiSeq Reagent kit v3 600 cyclesを用い、試薬付属の標準プロトコールに則り、機器にMiSeq (illumina社)を用いて、300bp×2のペアエンドシーケンス反応をおこなった。

[0081] i i i i) ANIによる菌種同定

機器から取得した生データに対し、トリミングにTrimmomatic version 0.38を用い、de novoアセンブリーにSPAdes version 3.13.0を用いて全ゲノムの配列を作成した。データベースにNational Center for Biotechnology InformationのNCBI RefSeqを用いて、BBToolsでANIによる菌種同定をおこなった。

[0082] 検体1は、データベース上のS. アウレウスと最も高い類似性 (ANI Value: 98.62%)を示し、次点はS. シュバイツェリ (ANI Value: 93.56%)であった。また、検体2は、データベース上のS. アルジェンテウスと最も高い類似性 (ANI Value: 99.09%)を示し、次点はS. シュバイツェリ (ANI Value: 94.87%)であった。一般的に、ANIによる菌種同定における、同一菌種であると判定する閾値は95~96% (Kim, M, HS Oh, SC Park, J Chun. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 64: 346-351.)とされており、本閾値を以って、検体1はS. アウレウス、検体2はS. アルジェンテウスとして同定がされた。以上から、全ゲノム解析とANIによる菌種同定からも、実施例2の結果の妥当性が支持された。

[0083] 比較例 1 : 先行技術との比較 プライマーセットの増幅効率の調査

[0084] 特開 2017-163969 号公報 (上掲) に記載の S. アルジェンテウスプライマーである配列番号 13、14 (表 2) と、本願の配列番号 6、7、9、10、11 のプライマー性能としての増幅能力を比較した。

[0085] [表 2]

配列番号 13 : S. アルジェンテウスプライマー	GAAACAAAGCATCCTAAAAAAGG
配列番号 14 : S. アルジェンテウスプライマー	AAGCCTTGACGAACTAAAGC

[0086] 核酸増幅の確認

S. アウレウス JCM5676 株、S. アルジェンテウス JCM3198 2 株から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、配列番号 13、14、あるいは、配列番号 6、7、9、10、11 のプライマーセットを用いて、リアルタイム PCR による増幅を行った。増幅に用いた試薬は TaKaRa Multiplex Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ社)、インターカラー色素に EvaGreen (biotium 社) を使用した。各プライマーは終濃度 0.2 μ M、鋳型のゲノム DNA は 10 μ g/L となるように添加し、TaKaRa Multiplex Assay Kit Ver. 2 内の 2 $\times$ Reaction buffer は終濃度 1 $\times$ 、Multiplex Enzyme Mix は 1U を使用し、鋳型 DNA 等を混合して PCR 反応液を調製した。測定装置には Mic Real time PCR (Bio Molecular Systems 社) を用い、3 重測定した。

[0087] 使用した条件は以下のとおりである。

増幅反応

94 $^{\circ}$ C : 30 秒

60 $^{\circ}$ C : 60 秒 $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C : 30 秒 (サイクル数 40 回)

72 $^{\circ}$ C : 600 秒

[0088] 熱融解反応

95 $^{\circ}$ C : 5 秒

65℃：30秒

65℃→95℃ 0.1℃/秒

- [0089] 配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットを用いたときの測定結果を図6に、配列番号13、14のプライマーセットを用いたときの測定結果を図7に示す。配列番号6、7、9、10、11のプライマーセット、配列番号13、14のプライマーセット共に、S. アウレウス JCM5676株とS. アルジェンテウス JCM31982株の増幅が確認された。以上から、配列番号6、7、9、10、11および配列番号13、14のプライマーセットが、互いに標的とした核酸成分を増幅させる機能があることが分かった。
- [0090] 配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットを用いたときのPCR産物の熱融解曲線解析結果を図8に、配列番号13、14のプライマーセットを用いたときの解析結果を図9に示す。
- [0091] 熱融解曲線解析はPCR反応後に反応液を低温にし、液中で相補鎖を形成させることでインターカレーターを取り込ませたのち、反応液を加熱していくことで、相補鎖の乖離に伴うインターカレーターの放出過程を経時的な蛍光測定を行うことで観測し、液中に存在する核酸分子の成分を解析する手法である。相補鎖が乖離する温度は塩基長や組成等で決定されるそれぞれの核酸分子に固有のパラメータであるため、この温度を確認することで、液中にどのような核酸分子が存在しているかを確認でき、プライマーダイマーに代表される非特異的な増幅産物の解析に広く用いられている。
- [0092] 配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットおよび配列番号13、14によって増幅されたS. アウレウス JCM5676株とS. アルジェンテウス JCM31982株のPCR産物の熱融解曲線解析結果は、すべて単峰性の分布だった。分布が単峰性であることから、反応液中の核酸成分は単一成分であり、目的とした特異的な増幅産物が発生していることが確認され、両プライマーセットは特異的なプライマーセットであることがわかった。
- [0093] 各プライマーセットの増幅能力を比較するため、Cq値を算出した結果を

表3に示す。C_q値は判定閾値を超えた時のPCRのサイクル数であり、同一の標的を増幅する場合、C_q値が小さいプライマーセットほど増幅効率が高いプライマーセットであると言える。S. アルジェンテウスJCM31982株のC_q値において、配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットが、配列番号13、14のプライマーセットよりも6.6小さいことがわかった。このことから、配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットはS. アルジェンテウスの増幅において配列番号13、14のプライマーセットよりも優れていることが分かった。一方で、S. アウレウスJCM5676株のC_q値はプライマーセット間でほとんど差がなく、S. アウレウスの増幅において両プライマーセットは同程度の性能であることが分かった。

[0094] [表3]

	S. aureus (JCM 31982)	S. argentueus (JCM 5676)
配列番号 6、7、9、10、11	27.46 ± 0.15	23.30 ± 0.04
配列番号 13、14	27.20 ± 0.08	29.97 ± 0.23

[0095] 比較例2：先行技術との比較 鑑別能力の比較[0096] 核酸増幅および検出

S. アウレウスJCM5676株、S. アルジェンテウスJCM31982株から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、配列番号6、7、9、10、11あるいは配列番号13、14のプライマーセットを用いて、PCRによる増幅、および、基板上でのハイブリダイゼーション反応および標識化、蛍光測定を行った。このとき、配列番号7および11の5'末端に、リンカーを介しビオチン修飾を行ったプライマーを使用した。各プライマーは終濃度0.2 μM、鋳型のゲノムDNAは10 μg/Lとなるように添加し、Takara Multiplex Assay Kit Ver. 2内の2×R

e a c t i o n b u f f e r は終濃度 1×、M u l t i p l e x E n z y m e M i x は 1 U を使用し、鋳型 DNA 等を混合して PCR 反応液を調製した。核酸増幅装置には T 1 0 0 T h e r m a l C y c l e r (B i o - R a d 社) を用いた。増幅反応終了後、基板上でのハイブリダイゼーション反応に供する前に、熱変性反応を同機器にて行った。

[0097] 基板上でのハイブリダイゼーション反応に用いた試薬は、配列番号 8 のプローブが固定化された基板 1 が含まれた容器、配列番号 1 2 のプローブが固定化された基板 2 が含まれた溶液、配列番号 1 5 (ATAAGCTAAGCCACGTCC) のプローブが固定化された基板 3 が含まれた溶液、S a l i n e - s o d i u m - p h o s p h a t e - E D T A B u f f e r (S S P E - b u f f e r)、熱変性を実施した PCR 反応液を混合した。

[0098] 標識化には S t r e p t a v i d i n - P h y c o e r y t h r i n (P l e x B i o 社) を試薬に用いた。基板上でのハイブリダイゼーション反応および標識化は、機器に I n t e l l i P l e x 1 0 0 0 π C o d e P r o c e s s o r (P l e x B i o 社) を用いた。

[0099] 蛍光測定装置は、P l e x B i o (登録商標) 1 0 0 F l u o r e s c e n t A n a l a y z e r (P l e x B i o 社) を用いた。

[0100] 使用した反応条件は以下のとおりである。

増幅反応条件

9 4 ° C : 3 0 秒

6 0 ° C : 6 0 秒 → 9 4 ° C : 3 0 秒 (サイクル数 3 0 回)

7 2 ° C : 6 0 0 秒

[0101] 熱変性条件

9 5 ° C : 5 分 → 4 ° C へ急冷

[0102] ハイブリダイズ条件

3 7 ° C : 2 0 分 インキュベート

[0103] 標識化条件

3 7 ° C : 1 0 分 インキュベート

- [0104] 測定結果を図10に示す。基板1、基板2については実施例1で評価したとおり、S. アウレウスとS. アルジェンテウスを鑑別する能力があることが分かっている。基板3については、S. アウレウス、S. アルジェンテウス共にほとんど蛍光が観測されず、有意に検出がほぼできない。
- [0105] 以上から、配列番号6、7、9、10、11のプライマーセットを、配列番号8のプローブが固定化された基板1や配列番号12のプローブが固定化された基板2が含まれた溶液に対して用いるアッセイは先行技術よりも増幅効率が秀でていることが分かった。

請求の範囲

- [請求項1] 検体におけるスタフィロкокカス・アルジェンテウス (*Staphylococcus argenteus*) の存在を検出するためのプライマーセットであって、
- スタフィロкокカス・アルジェンテウスの *nuc* 遺伝子を標的とする第一のプライマーと第二のプライマーとを含む、プライマーセット。
- [請求項2] *nuc* 遺伝子が、配列番号 3 又は 4 に示される塩基配列を有するか、あるいは配列番号 3 又は 4 のいずれかに示される塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列を有し、且つ T N a s e をコードする、請求項 1 に記載のプライマーセット。
- [請求項3] 標的とされる *nuc* 遺伝子が、配列番号 3 又は 4 に示される塩基配列の 2 1 7 位から 3 3 1 位までの塩基配列のうちの連続する少なくとも 1 0 塩基を含む塩基配列を有する、請求項 1 又は 2 に記載のプライマーセット。
- [請求項4] 第一のプライマーが、配列番号 9 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 9 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 1 0 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 9 に記載の塩基配列と同じ機能を有する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のプライマーセット。
- [請求項5] 第二のプライマーが、配列番号 1 0 に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号 1 0 に記載の塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも 1 0 塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号 1 0 に記載の塩基配列と同じ機能を有する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のプライマーセット。

- [請求項6] スタフィロコッカス・シュバイツェリ (*Staphylococcus schweitzeri*) の *nuc* 遺伝子を標的とする第三のプライマーを更に含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のプライマーセット。
- [請求項7] 第三のプライマーが、配列番号11に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号11に記載の塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号11に記載の塩基配列と同じ機能を有する、請求項1～6のいずれか一項に記載のプライマーセット。
- [請求項8] スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の *nuc* 遺伝子を標的とする第四のプライマーと第五のプライマーとを更に含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のプライマーセット。
- [請求項9] 第四のプライマーが、配列番号6に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号6に記載の塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号6に記載の塩基配列と同じ機能を有する、請求項1～8のいずれか一項に記載のプライマーセット。
- [請求項10] 第五のプライマーが、配列番号7に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号7に記載の塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号7に記載の塩基配列と同じ機能を有する、請求項1～9のいずれか一項に記載のプライマーセット。
- [請求項11] プライマーがビオチンで標識されている、請求項1～10のいずれか一項に記載のプライマーセット。

- [請求項12] 検体におけるスタフィロкокカス・アルジェンテウスの存在を検出するためのプローブであって、
スタフィロкокカス・アルジェンテウスのnuc遺伝子を標的とする、プローブ。
- [請求項13] nuc遺伝子が、配列番号3又は4に示される塩基配列を有するか、あるいは配列番号3又は4に示される塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列を有し、且つNucタンパク質をコードする、請求項12に記載のプローブ。
- [請求項14] 標的とされるnuc遺伝子が、配列番号3又は4に示される塩基配列の217位から331位までの塩基配列のうちの連続する少なくとも8塩基を含む塩基配列を有する、請求項12又は13に記載のプローブ。
- [請求項15] 配列番号12に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号12に記載の塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも10塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号12に記載の塩基配列と同じ機能を有する、請求項12～14のいずれか一項に記載のプローブ。
- [請求項16] 請求項1～11のいずれか一項に記載のプライマーセットと、請求項12～15のいずれか一項に記載のプローブとを含む、キット。
- [請求項17] スタフィロкокカス・アウレウスのnuc遺伝子を標的とするプローブを更に含む、請求項16に記載のキット。
- [請求項18] スタフィロкокカス・アウレウスのnuc遺伝子を標的とするプローブが配列番号8に記載の塩基配列を有するか、あるいは配列番号8に記載の塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列中、連続する少なくとも8塩基を含む塩基配列を有し、且つ、配列番号8に記載の塩基配列と同じ機能を有する、請求項17に記載のキット。
- [請求項19] 検体において、スタフィロкокカス・アルジェンテウスの存在を検

出するための方法であって、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載のプライマーセットを用いる、方法。

[請求項20] 第一、第二及び第三のプライマーを用いてスタフィロコッカス・アルジェンテウスとスタフィロコッカス・シュバイツェリ又はそれ以外のスタフィロコッカス属細菌とを鑑別する工程を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

[請求項21] 請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか一項に記載のプローブを更に用いる、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の方法。

[請求項22] それ以外のスタフィロコッカス属細菌がスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 又はコアグラゼ陰性スタフィロコッカス属細菌である、請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項23] コアグラゼ陰性スタフィロコッカス属細菌が、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*) ; スタフィロコッカス・アウリクラリス (*Staphylococcus auricularis*) ; スタフィロコッカス・カルノサス (*Staphylococcus carnosus*) ; スタフィロコッカス・コンディメンティ (*Staphylococcus condimentii*) ; スタフィロコッカス・ディブキイ (*Staphylococcus debuckii*,) ; スタフィロコッカス・マッシリエンシス (*Staphylococcus massiliensis*)、スタフィロコッカス・ピスチファーメンタンス (*Staphylococcus piscifermentans*) ; スタフィロコッカス・シミュランス (*Staphylococcus simulans*) ; スタフィロコッカス・キャピティス (*Staphylococcus capitis*) ; スタフィロコッカス・キャプラエ (*Staphylococcus caprae*) ; スタフィロコッカス・サカロリティクス (*Staphylo*

coccus saccharolyticus) ; スタフィロコッカス・ヘモリティカス (Staphylococcus haemolyticus) ; スタフィロコッカス・デブリエシ (Staphylococcus devriesei) ; スタフィロコッカス・ホミニス (Staphylococcus hominis) ; スタフィロコッカス・ヒイカス (Staphylococcus hyicus) ; スタフィロコッカス・アグネティス (Staphylococcus agnetis) ; スタフィロコッカス・クロモジェネス (Staphylococcus chromogenes) ; スタフィロコッカス・コルヌビエンシス (Staphylococcus cornubiensis) ; スタフィロコッカス・フェリス (Staphylococcus felis) ; スタフィロコッカス・デルフィニ (Staphylococcus delphini) ; スタフィロコッカス・インタメディウス (Staphylococcus intermedius) ; スタフィロコッカス・ルタエ (Staphylococcus lutrae) ; スタフィロコッカス・ミクロティ (Staphylococcus microti) ; スタフィロコッカス・マスカ (Staphylococcus muscae) ; スタフィロコッカス・シュードインタメディウス (Staphylococcus pseudintermedius) ; スタフィロコッカス・ロスツイ (Staphylococcus rostri) ; スタフィロコッカス・シェレイフェリ (Staphylococcus schleiferi) ; スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス (Staphylococcus lugdunensis) ; スタフィロコッカス・サプロフィティクス (Staphylococcus saprophyticus) ; スタフィロコッカス・アレタエ (Staphylococcus arlettae) ; スタフィロコッカス・カエリ (Staphylococcus

caeli) ; スタフィロコッカス・コオニ (Staphylococcus cohnii) ; スタフィロコッカス・エクロラム (Staphylococcus equorum) ; スタフィロコッカス・ガリナラム (Staphylococcus gallinarum) ; スタフィロコッカス・クローシ (Staphylococcus kloosii) ; スタフィロコッカス・リーイ (Staphylococcus leei) ; スタフィロコッカス・ネパレンシス (Staphylococcus nepalensis) ; スタフィロコッカス・サキナス (Staphylococcus succinus) ; スタフィロコッカス・キシロサス (Staphylococcus xylosus) ; スタフィロコッカス・スキュリ (Staphylococcus sciuri) ; スタフィロコッカス・フレウレッティ (Staphylococcus fleurettii) ; スタフィロコッカス・レンティス (Staphylococcus lentus) ; スタフィロコッカス・ステパノビッチ (Staphylococcus stepanovicii) ; スタフィロコッカス・ビトゥリナス (Staphylococcus vitulinus) ; スタフィロコッカス・シミュランス (Staphylococcus simulans) ; スタフィロコッカス・パステウリ (Staphylococcus pasteurii) 及びスタフィロコッカス・ワネリ (Staphylococcus warneri) から成る群から選択される1種又は2種以上である、請求項19～22のいずれか一項に記載の方法。

[請求項24]

それ以外のスタフィロコッカス属細菌がスタフィロコッカス・アウレウスであり、スタフィロコッカス・アウレウスのnuc遺伝子を標的とする、第四のプライマーと第五のプライマー及び／又はプローブを更に用いる、請求項23に記載の方法。