

明 細 書

発明の名称：

試料細菌のRNAを用いた細菌同定方法及びそのためのキット

技術分野

[0001] 本発明は、試料中の細菌の迅速な同定方法及びそのためのキットに関する。

背景技術

[0002] 重篤な全身感染症で、確定診断には血液中の起因微生物の検出・同定が必須である敗血症の患者数は、近年、癌治療や臓器移植など医療の高度化に伴って増加している。院内感染の観点からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）をはじめとする多剤耐性菌が敗血症の起因菌となることも多く、適切な抗生剤を選択し患者を救命するためには、血液中の起因微生物を可能な限り迅速に検出・同定することが臨床上重要である（特許文献1）。

このような背景から、敗血症の迅速な検査方法として、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を用いた検査システムが検討されている。このような検査方法としては、微生物からDNAを抽出し、これを鋳型として、特定のプライマーペアを使用してPCRなどで遺伝子増幅を行い、次いで、微生物に特異的な融解温度（ T_m 値）の組合せ、或いは各 T_m 値間の差を解析することにより起因菌の検出・同定を迅速に行うPCR法が知られている（特許文献2）。

上記PCR法では、抽出したDNAを鋳型に1st PCRを行い、目的とするDNA断片の全長を増幅し、増幅されたDNA断片を鋳型に2nd PCR（nested PCR）を行うことで、高感度に検出している。しかしながら、二段階のPCRが必要であることは、検査時間や作業性において課題である。特に作業性においては、2回のPCRは煩雑であり、作業者の負担軽減、および作業の全自動化に向けて、改良が必要であった。

様々な臨床、食品、環境、またはその他の実験的サンプル中の細菌RNAを検

出し、汚染物または病原体を同定することも行われている。いくつかの重要な細菌種を検出対象とし、検出対象細菌種に特有のRNA分子を検出することにより、検出対象外の細菌種の存在下でさえその検出を可能にする特異的プローブが開発されている。逆転写PCRアッセイ法において、目的RNAを鋳型とした逆転写反応によりcDNAを合成し、それに続くPCRにおけるcDNAの増幅を通じて、目的RNA分子を検出する方法も行われている（特許文献3）。

T_m値に基づく細菌同定法についても、特許文献1において、DNAの代わりにRNAを抽出し、得られたRNAに基づいて調製されたcDNAも利用できるとしているが、詳細な検討は行われていなかった。

特許文献3には、細菌から診断用RNAを直接検出するための方法が記載されている。

特許文献4には、生物学的試料中のRNA種の特異的検出方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2010/082640号

特許文献2：国際公開第2007/097323号

特許文献3：特開2012-34705号公報

特許文献4：国際公開第2010/054819号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 特許文献2に開示される技術に基づけば、短時間のうちに高感度で微生物の検出および同定が可能である。しかしながら、先に述べたとおり、上記の方法はPCRを2回行わなければならない、操作が煩雑で作業者の負担になるだけでなく、作業の全自動化の障害となる場合があると考えられる。

また、特許文献4には逆転写酵素を使ってRNAをcDNAに逆転写した後、PCRによって増幅されたcDNAを検出する方法が記載されている。

細菌中にはDNAよりもRNAの方がより多く存在する。試料中の細菌からRNAを抽出し、一段回目のPCRの代わりにRNAを用いた逆転写反応によりcDNAを調製し、調製したcDNAを鋳型にしてPCRを行う方が、論理的に考えれば、細菌の検出感度を向上させることが期待できる。

しかしながら、本発明者らの検討により、特許文献4に記載の様な反応を行った場合、PCR中に逆転写反応により余計な反応が起こり、目的とするDNA断片以外の不必要なDNA断片が多数得られるため、事実上細菌の同定が出来ないことがわかった。

本発明は、試料中の細菌のRNAをターゲットとすることで、限定的な数種の細菌ではなく、多くの細菌を、細菌同定用の試薬や条件を変えことなく細菌同定可能な細菌同定方法及びそのためのキットを提供することを課題とする。また、本発明は、1回のPCRのみでも高感度に検出・同定し、煩雑な操作および作業者の負担を軽減することを可能とする同定方法及びそれに用いるキットを提供することを課題とする。

本願発明の別の課題は、上記の課題を解決するために必要な細菌同定方法を見出すことにある。

上記のとおり、試料中のRNAを用いるという従来の発想だけでは細菌の検出、同定は達成できない場合があることは発明者らの検討により明らかである。本発明者らは、標的cDNAを検出するためのPCR工程に持ち込まれる逆転写用のプライマーの濃度が高すぎることで、特許文献4に記載される方法において事実上細菌の同定が出来ない場合の原因であることを突き止めた。

本発明者らはこの実験事実を出発点として検討を重ね、更にその先に、当業者が従来認識していなかった新たな解決課題が存在することを初めて見出した。即ち、試料から抽出したRNAを逆転写酵素によりcDNAを調製し、調製されたcDNAを鋳型としてPCRする場合、PCR中に生じる目的以外のDNA断片の生成を抑制する必要があることが見出された。この課題は、課題そのものが、従来技術において従来当業者が認識していない未知のものである。

課題を解決するための手段

[0005] 上記のとおり、本発明者らは全く新規な課題を解決するため鋭意検討を重ねた。

その結果、逆転写反応から持ち込まれる、PCR反応時の反応系内の逆転写用プライマーの濃度を調整すること、それも通常考えられるよりも極めて低い濃度になるように調整すると、不必要なDNA断片の生成が顕著に抑制され、Tmマッピングの条件を適正に調整することにより、試料中の細菌を検出、同定できることを見出した。

更に、PCR反応時の反応系内に存在する逆転写用プライマーの濃度には最適域が存在し、その範囲内になるように逆転写用プライマーの濃度を適正に制御すれば、たとえ試料中の菌数が極めて低濃度であっても、感度良く検出、同定が可能であることを見出した。

本発明は以上のような全く新しい知見に基づいて完成されたものである。

即ち、本発明は以下のとおりである。

[1] 以下の工程(1)～(3)を有することを特徴とする細菌同定方法。

(1) 同定対象細菌の同定用の塩基配列を含むcDNAを調製するための逆転写用のプライマー、試料中の細菌から抽出されたRNA、及びRNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素を含む第一の反応系を用いて、逆転写反応を行い、合成されたcDNA及び前記逆転写用のプライマーを含む反応混合物を得る工程、

(2) 前記反応混合物、前記同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを合成するためのプライマーペア、及びDNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素を含む第二の反応系を用いて、PCRを行う工程、但し、第二の反応系において、前記反応混合物から供給される前記逆転写用のプライマーの濃度が0.08nM以上20nM以下である、及び

(3) PCR後の前記第二の反応系から、前記同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAの生成を検出する工程。

[2] 前記工程(1)及び(2)を、別の反応容器内で、あるいは、同一の反応容器内で、順に行なうことを特徴とする上記[1]項に記載の細菌同

定方法。

〔3〕 前記同定対象細菌の同定用の塩基配列が、細菌の16S rDNAに含まれる塩基配列であり、前記RNAが前記試料中の細菌の16S rRNAを含むことを特徴とする上記〔1〕項または〔2〕項に記載の細菌同定方法。

〔4〕 前記逆転写用のプライマーが配列番号1の塩基配列からなることを特徴とする〔3〕に記載の細菌同定方法。

〔5〕 前記プライマーペアが、以下の（A群）～（C群）からなる群から選択された少なくとも1つのプライマーペアであることを特徴とする上記〔1〕または〔4〕に記載の細菌同定方法。

（A群）

- ・プライマーペア1a：配列番号2の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号3の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア2a：配列番号4の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号5の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア3a：配列番号6の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号7の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア4a：配列番号8の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号9の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア5a：配列番号10の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号11の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア6a：配列番号12の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号13の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア7a：配列番号14の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号15の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ。

（B群）前記（A群）の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で1または2の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペア、及び

（C群）前記（A群）又は（B群）の各プライマーペアの一方又は両方のプ

ライマーの塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。

〔6〕 前記工程（3）において、生成された二本鎖DNAの T_m 値を測定し、得られた T_m 値と予め測定しておいた同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAの T_m 値またはそれらから二次的に得られるデータを比較して、前記試料中の細菌を同定することを特徴とする上記〔1〕乃至〔5〕のいずれか1項に記載の細菌同定方法。

〔7〕 前記工程（1）の後、前記反応混合物を単独で直接又は希釈し、前記工程（2）に用いることを特徴とする上記〔1〕乃至〔6〕のいずれか1項に記載の細菌同定方法。

〔8〕 試料中の細菌から抽出されたRNAの逆転写反応による反応混合物に含まれるcDNAを鋳型とするPCRにより前記試料中の細菌を同定するためのキットであって、

下記（a）乃至（c）を有し、

（a）前記逆転写反応のための第一の反応系の調製用としての、同定対象細菌の同定用の塩基配列を含むcDNAを調製するための逆転写用のプライマー、

（b）前記PCRのための第二の反応系の調製用としての、前記同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを合成するためのプライマーペア、及び

（c）RNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素、

前記第二の反応系が前記逆転写反応による反応混合物を含み、前記逆転写用のプライマーの量が、該反応混合物を介して前記第二の反応系に供給された際の逆転写用のプライマーの濃度が0.08nM以上20nM以下となるように調整されている、

ことを特徴とするキット。

〔9〕 前記逆転写反応と前記PCRの手順が記載されている取扱説明書をさらに有することを特徴とする上記〔8〕に記載のキット。

〔10〕 前記取扱説明書には、前記第二の反応系に含まれる前記逆転写用のプライマーの濃度が0.08nM以上20nM以下となるように手順が記載されていることを特徴とする上記〔9〕に記載のキット。

〔11〕 前記同定対象細菌の同定用の塩基配列が、細菌の16S rDNAに含まれる塩基配列であり、前記RNAが前記試料中の細菌の16S rRNAを含むことを特徴とする上記〔8〕乃至〔10〕のいずれか1に記載のキット。

〔12〕 前記逆転写用のプライマーが配列番号1の塩基配列からなることを特徴とする上記〔11〕に記載のキット。

〔13〕 前記プライマーペアが、以下の（A群）～（C群）からなる群から選択された少なくとも1つのプライマーペアであることを特徴とする上記〔11〕または〔12〕に記載のキット。

（A群）

- ・プライマーペア1a：配列番号2の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号3の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア2a：配列番号4の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号5の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア3a：配列番号6の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号7の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア4a：配列番号8の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号9の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア5a：配列番号10の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号11の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア6a：配列番号12の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号13の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア7a：配列番号14の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号15の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ。

（B群）前記（A群）の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で1または2の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペア、及び

（C群）前記（A群）又は（B群）の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。

発明の効果

[0006] 本発明により、検出感度を維持したまま1回のPCRでも細菌の検出および同定を行うことができる。このため作業者の負担の軽減およびシステムの自動化を行うことができる。

本発明の同定方法は、第二の反応系における逆転写用プライマーの濃度を適正に調整することにより、菌数100CFU／検体程度の希薄な菌を含む試料に対しても感度良く細菌の検出・同定が可能である。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]実施例1におけるPCR産物のアガロース電気泳動の結果を示す図である。

[図2]実施例2におけるPCR産物のアガロース電気泳動の結果を示す図である。

[図3]実施例3におけるPCR産物のアガロース電気泳動の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0008] 本発明にかかる細菌同定方法は、以下の工程を有する。

(I) 試料中の細菌から抽出されたRNAを用いて逆転写反応によりcDNAを含む反応混合物を得る工程。

(II) cDNAを含む反応混合物と、細菌同定用のプライマーペアを用いてPCRを行う工程。

(III) 細菌同定用のプライマーペアによりPCRで増幅した二本鎖DNAの生成を検出する工程。

工程(I)における逆転写反応には、同定対象細菌の同定用の塩基配列を含むcDNAを調製するための逆転写用のプライマー、試料中の細菌から抽出されたRNA、及びRNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素を含む第一の反応系が用いられる。

本発明における反応混合物は、第一の反応系での逆転写反応を行って得られる反応混合物と反応に関与せずに未反応のまま残存した未反応物とを含む

混合物を意味する。

第一の反応系に用いる逆転写用のプライマーはcDNAの合成時に消費されるが、通常、目的とするcDNAの合成量に必要な量よりも多い過剰量で用いられる。そのため、第一の反応系による逆転写反応による反応混合物には、反応生成物としての合成されたcDNAと、未反応物としての残存する逆転写用のプライマーが含まれる。

工程（II）におけるPCRには、工程（I）で得られた反応混合物、同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを合成するためのプライマーペア及びDNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素を含む第二の反応系が用いられる。

上記のとおり、工程（I）で得られた反応混合物には逆転写反応に消費されなかった逆転写用のプライマーが含まれており、工程（II）におけるこの逆転写用のプライマーの量を調整することによって高感度検出を行うことができる。そのために、第二の反応系の調製時の逆転写用のプライマーの濃度は、0.08nM～20nM、より好ましくは0.4nM～20nM、更に好ましくは0.8nM～20nM、更に好ましくは2nM～20nMから選択される。

第二の反応系への逆転写用のプライマーの持込量が多い場合には、PCRによる増幅産物中に目的としない増幅産物が含まれ、細菌同定におけるバックグラウンドの上昇による同定精度の低下を生じる場合がある。そこで、第二の反応系における逆転写用のプライマーの濃度を上記の範囲に設定する。

工程（I）及び（II）は、別の反応容器内で、あるいは、同一の反応容器内で、順に行なうことができる。

本発明にかかる細菌同定用のキットは以下の構成成分（a）乃至（c）を有する。

（a）逆転写反応のための第一の反応系の調製用としての、同定対象細菌の同定用の塩基配列を含むcDNAの調製のための逆転写用のプライマー、

（b）PCRのための第二の反応系の調製用としての、同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを合成するためのプライマーペア、及び

(c) 第一の反応系の調製用としての、RNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素。

本発明にかかる細菌同定用のキットは、さらに所望により、

(d) 第二の反応系の調製用としての、DNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素を有していてもよい。

キットに含まれる逆転写用のプライマーの量は、逆転写反応により得られる反応混合物を介して第二の反応系に供給された際の濃度が0.08nM~20nM、より好ましくは0.4nM~20nM、更に好ましくは0.8nM~20nM、更に好ましくは2nM~20nMとなるように、調整される。

なお、本発明にかかる細菌同定方法及びそのためのキットは、試料中における検出対象菌の有無を検出する検出方法にも利用することができる。

[0009] 以下、本発明にかかる細菌同定方法及びそのためのキットの好ましい形態について説明する。

[0010] <RNA抽出>

RNA抽出方法としては、アルカリ溶解法、ボーリング法、フェノール抽出などが知られており、また、メーカー各社から専用のRNA抽出キットも販売されている。

本発明における試料中の細菌からのRNAの抽出方法は特に限定されず、公知の方法を用いることができる。検体により最適な方法は異なるため、対象検体に相応した方法を選択することが望ましい。なお、本願実施例において使用しているロシュ社製High Pure RNA Isolation Kitは好適に使用可能なRNA抽出方法の一例である。

<逆転写反応>

試料中の細菌から得られたRNAを、逆転写反応によりcDNAとする必要がある。本発明における逆転写反応方法は特に限定されず、公知の方法を用いることができる。後述する実施例において使用しているプロメガ社製M-MLV Reverse Transcriptase, RNase (H-), Point Mutantは好適に使用可能な逆転写反応方法の一例である。

第一の反応系に添加するRNA及びRNA依存型DNAポリメラーゼの量は、特に限定されず、目的とするcDNAの合成が可能となる量を選択すればよい。

＜逆転写用のプライマー＞

逆転写用のプライマーは、細菌同定のために利用する塩基配列を含むcDNAの、逆転写反応による合成用として利用される。逆転写用のプライマーは、試料中の細菌から抽出されたRNA中の細菌同定に必要な塩基配列と相補的な塩基配列を含むcDNA（断片）を合成できるプライマーであれば特に制限されない。細菌同定用の塩基配列を含むDNAを合成可能とされる公知の、あるいは新たに調製したプライマーを用いることができる。また、市販のプライマーも利用できる。

細菌同定用の塩基配列としては、16S rDNA中に多くの塩基配列が知られており、16S rDNAに対応する16S rRNAを細菌同定用のRNAとして利用することが好ましい。

細菌の16S rRNAをターゲットとする場合は、逆転写用プライマーとして、16S rRNAの、細菌同定に利用し得る領域を含むcDNAの合成の開始位置に相補的な公知のプライマーや新たに調製したプライマーを用いることができる。また、市販のプライマーも利用できる。

なお、逆転写用プライマーによって合成されるcDNAが、後述する細菌同定のプライマーペアによる増幅が可能な領域を有するように、逆転写用プライマーを選択することが好ましい。

特に好適な逆転写用プライマーの例として以下の配列番号1の塩基配列からなるプライマーが挙げられる。

配列番号1 : AGACCCGGGA ACGTATTC

- [0011] 第一の反応系に添加する逆転写用プライマーの量は、目的とする逆転写反応に必要な量であり、かつ、第一の反応系を用いた逆転写反応の反応混合物を添加する第二の反応系での逆転写用プライマーの濃度が20nM以下となるように調整される。また、第二の反応系での逆転写用のプライマーの濃度の下限値は、試料中に存在する細菌を検出、同定できる程度にRNAからcDNAを合成

できる程度の濃度である。このような観点から、第二の反応系の逆転写用のプライマーの濃度は、好ましくは $0.08\text{nM}\sim 20\text{nM}$ 、より好ましくは $0.4\text{nM}\sim 20\text{nM}$ 、更に好ましくは $0.8\text{ nM}\sim 20\text{nM}$ 、更に一層好ましくは $2\text{nM}\sim 20\text{nM}$ の範囲となるように調整するとよい。

この逆転写用プライマーの量の調整には、以下の方法を利用することができる。

(A) 第一の反応系での逆転写反応により得られた反応混合物をそのまま単独で第二の反応系によるPCRに用いる場合

第一の反応系において得られた反応混合物の量と、この反応混合物を含む第二の反応系の量の合計量に対する反応混合物による逆転写用のプライマーの持込濃度を算出する。ただし、この濃度の算出において逆転写反応で消費された逆転写用のプライマーの量は考慮しない。従って、この濃度の算出において用いる逆転写用プライマーの量は、第一の反応系に添加した逆転写プライマーの量に基づいて求める。こうして算出された第二の反応系に持ち込まれた逆転写用のプライマーの濃度が、上述した範囲となるように、第一の反応系に添加する逆転写用のプライマーの濃度を設定する。

上記のように設定された第一の反応系の逆転写用のプライマーの濃度に基づいて、目的とする逆転写反応を行うことができるように、第一の反応系の組成や逆転写反応の条件を設定することが好ましい。

例えば、第一の反応系から得られた反応混合物の量に対して、第2の反応系の量が10倍量である場合は、第一の反応系に添加する逆転写用のプライマーの濃度を、第二の反応系に含まれる逆転写用のプライマーの濃度の10倍に設定すればよい。第二の反応系における逆転写用のプライマーの濃度を上述の好ましい範囲としての $0.08\text{nM}\sim 20\text{nM}$ に設定する場合は、第一の反応系における逆転写用のプライマーの濃度を $0.8\text{nM}\sim 200\text{nM}$ の範囲に設定する。

なお、逆転写用のプライマー濃度を逆転写反応に必要とされる量よりも十分に過剰量としておくことで、上述の逆転写用のプライマーの第二の反抗系への持込量の算出において逆転写反応で消費されたプライマーの量を考慮し

なくとも、近似的にこの持込量を算出することができる。

また、本発明は、第二の反応系に持ち込まれる逆転写用のプライマーの量の上限値を、本発明の効果をj得るための閾値として設定することを特徴としている。上述のように逆転写反応において消費されたプライマーの量を考慮せずに第一の反応系に添加する逆転写用のプライマーの濃度を設定しておくことで、逆転写反応での消費分を差し引いた逆転写用のプライマーの第二の反応系への持込量は自動的に上述した閾値以下となる。

上記の調整方法（A）では、逆転写反応により得られる反応混合物は、そのまま単独で、すなわち、なにも添加せず、かつ、反応混合物からなにも分離せずに、そのまま直接第二の反応系の調製に用いられる。

（B）第一の反応系での逆転写反応により得られた反応混合物を希釈して第二の反応系によるPCRに用いる場合

目的とする逆転写反応を行う上で必要な逆転写用プライマーの濃度を用いた場合に、逆転写反応による反応混合物を上記の調整方法（A）に従って第二の反応液の調製に用いると、逆転写用のプライマーの第二の反応系での濃度が20nMを超えてしまう場合には、上述した第二の反応系における逆転写用のプライマーの濃度となるように、第一の反応系から得られる反応生物を希釈する。この希釈における希釈率は、第一の反応系における逆転写用のプライマーの濃度、第一の反応系から得られる反応混合物の量、第二の反応系の量に基づいて設定することができる。

なお、この調整方法（B）における逆転写用のプライマーの濃度の算出においても、第一の反応系での逆転写反応において消費されるプライマーの量は無視することができる。

また、反応混合物の希釈には、プライマー溶液の希釈用の緩衝液等の液媒体やPCR用の第二の反応系の調製に利用される緩衝液等の液媒体を利用することができる。

[0012] <PCR用のプライマー>

PCR用のプライマーペア、すなわち、フォワードプライマーとリバースプラ

イマーとの組合せとしては、細菌同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを増幅できるものであればよく、限定されない。プライマーペアは、同定対象細菌の菌種に応じて選択することができる。

細菌の16S rDNAをターゲットとする場合は、細菌同定用として16S rDNAにある細菌同定用の塩基配列を増幅可能なプライマーペアを利用することができる。16S rDNA中には種々の細菌同定用の塩基配列が知られており、プライマーペアとしては、公知の細菌同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを増幅できるプライマーペアを用いることができる。

後述する通り、cDNAから複数DNA断片をPCRで増幅し、それらDNA断片の T_m 値をもとに、細菌を同定する場合は、16S rDNA上に存在する可変領域（S. Chakravorty, et al., Journal of Microbiological Methods 2007, 69, 330-339 参照）を各々含む二本鎖DNAが増幅されるプライマーペアを用いることが好ましい。

PCR用のプライマーペアは、1種または複数種の組合せを用いることができる。複数種のプライマーセットを用いる場合は、同定菌種を増やす上で、あるいは同定精度の向上を図る上で、4～7種のプライマーペアをそれぞれ個々に用いることが好ましい。

好ましいプライマーペアとしては、以下の（A群）～（C群）からなる群から選択された少なくとも1つのプライマーペアを挙げることができる。

（A群）

- ・プライマーペア1 a：配列番号2の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号3の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア2 a：配列番号4の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号5の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア3 a：配列番号6の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号7の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア4 a：配列番号8の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号9の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

- ・プライマーペア 5 a : 配列番号 1 0 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 1 1 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア 6 a : 配列番号 1 2 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 1 3 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・プライマーペア 7 a : 配列番号 1 4 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 1 5 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ。

(B 群) 前記 (A 群) の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で 1 または 2 の塩基が付加、欠失または置換した改変フォワードプライマー及び／または改変リバースプライマーを含むプライマーペア、及び

(C 群) 前記 (A 群) 又は (B 群) の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。

[0013] 上述のPCR用プライマーの具体例としては、以下の第 1 群～第 7 群に記載されるプライマーペアを挙げることができる。これらの 7 つの群のそれぞれから選択された 7 つのプライマーペアのうちの 4 ～ 7 つのプライマーペアをそれぞれ個々に用いることがより好ましい。

(1) プライマーペア第 1 群 :

(1 a) 配列番号 2 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 3 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

(1 b - 1) 配列番号 2 の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号 3 からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(1 b - 2) 配列番号 2 からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(1 b - 3) 配列番号 2 の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号 3 の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(1 c - 1) 配列番号2の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(1 c - 2) 配列番号2の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号3の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(1 c - 3) 配列番号2の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(1 c - 4) 配列番号2の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号3の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(2) プライマーペア第2群：

(2 a) 配列番号4の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号5の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

(2 b - 1) 配列番号4の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号5からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(2 b - 2) 配列番号4からなるフォワードプライマーと、配列番号5の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(2 b - 3) 配列番号4の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号5の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(2 c - 1) 配列番号4の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号5の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(2 c - 2) 配列番号4の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォー

ドプライマーと、配列番号5の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(2c-3) 配列番号4の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号5の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(2c-4) 配列番号4の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号5の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(3) プライマーペア第3群：

(3a) 配列番号6の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号7の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

(3b-1) 配列番号6の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号7からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(3b-2) 配列番号6からなるフォワードプライマーと、配列番号7の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(3b-3) 配列番号6の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号7の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(3c-1) 配列番号6の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号7の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(3c-2) 配列番号6の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号7の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(3c-3) 配列番号6の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号7の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み

合わせからなるプライマーペア。

(3c-4) 配列番号6の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号7の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(4) プライマーペア第4群：

(4a) 配列番号8の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号9の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

(4b-1) 配列番号8の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号9からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(4b-2) 配列番号8からなるフォワードプライマーと、配列番号9の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(4b-3) 配列番号8の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号9の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(4c-1) 配列番号8の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号9の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(4c-2) 配列番号8の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号9の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(4c-3) 配列番号8の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号9の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(4c-4) 配列番号8の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号9の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

[0014] (5) プライマーペア第5群：

(5 a) 配列番号10の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号11の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

(5 b-1) 配列番号10の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号11からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(5 b-2) 配列番号10からなるフォワードプライマーと、配列番号11の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(5 b-3) 配列番号10の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号11の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(5 c-1) 配列番号10の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号11の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(5 c-2) 配列番号10の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号11の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(5 c-3) 配列番号10の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号11の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(5 c-4) 配列番号10の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号11の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(6) プライマーペア第6群：

(6 a) 配列番号12の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号13の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

(6 b-1) 配列番号12の改変塩基配列からなる改変フォワードプライ

マーと、配列番号 1 3 からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(6 b - 2) 配列番号 1 2 からなるフォワードプライマーと、配列番号 1 3 の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(6 b - 3) 配列番号 1 2 の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号 1 3 の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(6 c - 1) 配列番号 1 2 の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 1 3 の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(6 c - 2) 配列番号 1 2 の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号 1 3 の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(6 c - 3) 配列番号 1 2 の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 1 3 の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(6 c - 4) 配列番号 1 2 の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号 1 3 の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(7) プライマーペア第 7 群：

(7 a) 配列番号 1 4 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 1 5 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

(7 b - 1) 配列番号 1 4 の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号 1 5 からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(7 b - 2) 配列番号 1 4 からなるフォワードプライマーと、配列番号 1 5 の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプ

ライマーペア。

(7b-3) 配列番号14の改変塩基配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号15の改変塩基配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(7c-1) 配列番号14の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号15の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(7c-2) 配列番号14の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号15の相補配列からなるリバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(7c-3) 配列番号14の相補配列からなるフォワードプライマーと、配列番号15の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

(7c-4) 配列番号14の改変塩基配列の相補配列からなる改変フォワードプライマーと、配列番号15の改変塩基配列の相補配列からなる改変リバースプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

[0015] 配列番号2～15の塩基配列を以下に示す。

配列番号2 : GCAGGCTTAA CACATGCAAG TCG

配列番号3 : CGTAGGAGTC TGGACCGT

配列番号4 : GTCCAGACTC CTACGGGAG

配列番号5 : CCTACGTATT ACCGCGG

配列番号6 : AGCAGCCGCG GTAATA

配列番号7 : GGA CTACCAG GGTATCTAAT CCT

配列番号8 : AACAGGATTA GATACCCTGG TAG

配列番号9 : AATTAAACCA CATGCTCCAC C

配列番号10 : TGGTTTAATT CGATGCAACG C

配列番号11 : GAGCTGACGA CAGCCAT

配列番号12 : GTTAAGTCCC GCAACGAG

配列番号 1 3 : CCATTGTAGC ACGTGTGTAG CC

配列番号 1 4 : GGCTACACAC GTGCTACAAT GG

配列番号 1 5 : AGACCCGGGA ACGTATTC

[0016] <PCR用の試薬>

本発明でPCR分析のために使用されるプライマーペア以外の試薬は、公知のものを公知の組合せにより使用することができる。測定に必要な試薬としては、PCR用の酵素、pH緩衝液、dNTP、Mg²⁺源、ろ過処理などにより精製された滅菌水が挙げられる。また、リアルタイムPCR分析においては蛍光色素が上記に加えて必要となる。

<PCR用の酵素>

本発明において使用されるPCR用の酵素は、DNA依存型DNAポリメラーゼであり、市販の様々なものを用いることができるが、特に陰性となるような検体が対象となる試験では、偽陽性の原因となる細菌由来のDNA混入量を最小限にとどめたDNA依存型耐熱性DNAポリメラーゼを用いることが好ましい。具体的には、真核生物で生産されたもの、高度精製処理されたもの、又は選択的膜透過性色素であるEMA (ethidium monoazide) やPMA (propidium monoazide) により処理されたものが挙げられるが、この限りではない。

<PCR分析>

逆転写反応により得られた反応生成物としてのcDNAおよびプライマーペアは、PCR法において使用される。PCR法としては、細菌の同定に利用する塩基配列を含む二本鎖DNAの増幅のためのPCR法であれば種々のPCR法を利用できる。好ましい分析法としては、リアルタイムPCRであり、より好ましくはリアルタイムPCRとT_m値測定のための融解曲線分析の組み合わせである。

PCRにおける温度サイクルの条件は、特に限定されないが、後述する実施例において実施している条件、「95℃, 5分→94℃, 10秒・60℃, 20秒・72℃, 10秒・85℃, 2秒を40サイクル→95℃, 10秒」が一例である。

リアルタイムPCRにおいては、DNA増幅工程終了後、融解曲線解析により、増幅されたDNAのT_m値を測定できる。こうした測定は、リアルタイムPCR装置

の多くの機種で可能であり、機器の使用方法に準じて実施可能である。

[0017] <同定方法>

試料中の細菌を同定するために、本発明にかかるプライマーペアを用いてcDNAを含む反応混合物から得られる増幅産物に含まれる二本鎖DNA断片のT_m値を利用することができる。

好ましい同定方法として以下の方法を挙げることができる。

まず、試料に含まれる可能性が考えられる複数種の、好ましくは多数種の細菌の16S rRNAまたは16S rDNAを用いて、本発明にかかる同定方法により、あるいは本発明にかかる方法の一部を利用した方法により、二本鎖DNA断片とそのT_m値をあらかじめ取得しておき、それらのT_m値（測定値そのもの）ないしは、測定されたT_m値から二次的に得られるデータを取得して保存しておく。例えば、後述する“T_m値の相対値”を、比較データないしはデータベースとして保存しておく。この比較データは、既知の細菌から得られた二本鎖DNA断片の“T_m値の相対値”を予め取得しておいたデータである。また、この比較データのデータベースは、上記の比較データを複数の細菌からの二本鎖DNA断片について網羅的に取得したデータを格納するものである。

次に、試料中の細菌から得られたT_m値ないしは“T_m値の相対値”と、この保存された比較データないしデータベースを比較して、試料中の種が不明な細菌を同定することができる。

同定するためのアルゴリズムとしては、上述したT_m値そのものの組合せだけでなく、各T_m値間の差の組合せを利用して同定することで、例えば機器の試行回毎の測定誤差といった測定誤差の影響を最小限とする工程を付加することができる。

上記の、機器の試行回毎の測定誤差を補正する方法として、複数のプライマーペア毎に得られた“T_m値の組合せの平均値”を算出し、その平均値からの各T_m値の“相対値の組合せ”を利用することが出来る。この相対値としては、平均値からの各T_m値の差を取った値を用いることができ、この相対値が、前述した“T_m値の相対値”である。つまり、T_m値の組合せの配置を“形”

として同定する方法である。T_m値の組合せの配置を2次元で示した“形”は測定誤差に影響されない。例えば、検出細菌に特異的なT_m値の組合せ（n個（nは4以上、7以下の整数））をT_{1 db}～T_{n db}とし（dbはdatabase）、その平均値からの相対値をそれぞれd_{1 db}～d_{n db}とする。同様に検体から得られた未知の検出対象生物のT_m値の組合せ（n個（nは4以上、7以下の整数））をT_{1 ref}～T_{n ref}とし（refはreference）、その平均値からの相対値をそれぞれd_{1 ref}～d_{n ref}とする。そうしてdatabaseと比較し、「相対値の組合せが近似したもの＝T_m値の組合せの配置の“形”が近いもの」、を同定アルゴリズムとして利用する。

具体的な計算方法としては、例えば、ユークリッド空間上の2点間距離を算出する方法（式1）が挙げられるが、この限りではない。

[0018] [数1]

$$\text{Dist.} = \sqrt{[(D_{1\text{db}} - D_{1\text{ref}})^2 + (D_{2\text{db}} - D_{2\text{ref}})^2 + \cdots + (D_{n\text{db}} - D_{n\text{ref}})^2]} \cdots (\text{式1})$$

[0019] 式1による計算方法であれば、この計算式によって得られるDist. 値が0に最も近いものが求める検出細菌種として同定される。ただし、使用するPCR機器の測定誤差の関係上、機器の温度制御スペックやプライマーの数にもよるが、Dist. 値の許容範囲としては、0～0.37、好ましくは0～0.30である。

以上のアルゴリズムは、コンピュータ上でデータベース型同定ソフトウェアとして利用できる。

上記のT_m値の相対値を用いた細菌種の同定、すなわちT_mマッピング法による細菌種の同定は、例えば特許文献2、国際公開2010/082640号の段落[0237]または国際公開2015/053293号の段落[0111]～[0116]に開示の方法に従って、あるいはそれらに開示の方法を適宜改変して行なってもよい。T_mマッピング法による細菌種の同定の一例では、菌種が既知である細菌から得られる複数の特定のプライマーペアにより増幅された複数の増幅産物のT_m値の組合せ、あるいは複数のT_m値間の差の組合せに関する同定用データが利用される。検体から集めた未知の菌体

試料から同じ複数のプライマーペアによって得られる増幅産物の T_m 値の組合せ、あるいは T_m 値間の差の組合せを、同定用データベースと照合し、その一致性を判断して、検体中の未知の細菌の同定を行う。

[0020] <細菌同定用のキット>

本発明にかかる細菌同定用のキットは、前出した以下の（a）乃至（c）の各構成成分を有する。

（a）逆転写反応のための第一の反応系の調製用としての、同定対象細菌の同定用の塩基配列を含むcDNAの調製のための逆転写用のプライマー。

（b）PCRのための第二の反応系の調製用としての、同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを合成するためのプライマーペア。

（c）第一の反応系の調製用としての、RNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素。

これらの構成成分に加えて、以下の（d）を有してもよい。

（d）第二の反応系の調製用としての、DNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素。

さらに、逆転写反応とPCRの手順、例えば、先に挙げた工程(I)～(III)についての手順が記載されている取扱説明書をキットに添付してもよい。

また、この取扱説明書には、第二の反応系に含まれる逆転写用のプライマーの濃度が20nM以下、好ましくは0.08nM～20nM、より好ましくは0.4nM～20nM、更に好ましくは0.8 nM～20 nM、更に好ましくは2nM～20nMとなるように手順、例えば先に挙げた調整方法（A）及び（B）が記載されていることが好ましい。

取扱説明書には、第一の反応系を用いた反応と、第二の反応系を用いた反応を、異なる反応容器内で、あるいは同一の反応容器内で、この順に行なうことができる点の説明が含まれていてもよい。

細菌同定用のキットは、先に<PCR用の試薬>の項で挙げた各試薬、例えばPCR用の酵素、pH緩衝液、dNTP、 Mg^{2+} 源、ろ過処理などにより精製された滅菌水、並びにリアルタイムPCR分析用の蛍光色素等の少なくとも1種を有しても

よい。更に、先に挙げた T_m 値を用いて細菌種を同定する場合は、既知の細菌種から得られた T_m 値、あるいは比較データもしくはデータベースを格納した媒体をキットに追加してもよい。また、これらの格納データを、インターネットを経由して使用者に提供するようにしてもよく、取り扱い説明書はこの点の説明や先に挙げたコンピュータ上で利用可能なデータベース型同定ソフトウェアについての説明を含んでいてもよい。

また、キットは同定用のポジティブコントロール、ネガティブコントロールを更に含んでも良い。

[0021] <同定可能な細菌種>

同定可能な微生物は、分類上細菌に該当するものであれば、機構上検出及び細菌種の同定が可能である。具体的な細菌種としては、*Achromobacter denitrificans*、*Achromobacter xylosoxidans*、*Acinetobacter baumannii*、*Acinetobacter calcoaceticus*、*Actinomyces israelii*、*Aerococcus christensenii*、*Aeromonas hydrophila*、*Aeromonas sobria*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Alcaligenes faecalis*、*Alistipes onderdonkii*、*Anaerococcus vaginalis*、*Anaeroglobus geminatus*、*Arcanobacterium haemolyticum*、*Arcanobacterium pyogenes*、*Arthrobacter cummingsii*、*Atopobium vaginae*、*Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus coagulans*、*Bacillus lichiformis*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus sphaericus*、*Bacillus subtilis*、*Bacteroides dorei*、*Bacteroides finegoldii*、*Bacteroides fragilis*、*Bacteroides nordii*、*Bacteroides salyersiae*、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*Bacteroides uniformis*、*Bacteroides vulgatus*、*Bartonella henselae*、*Bartonella quintana*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bilophila wadsworthia*、*Bordetella pertussis*、*Borrelia burgdorferi*、*Borrelia recurrentis*、*Brevibacillus laterosporus*、*Brucella abortus*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Burkholderia cepacia*、*Burkholderia mallei*、*Burkholderia pseudomallei*、*Campylobacter coli*、*Campylobacter curvus*、*Campylobacter jejuni*、*Campylobacter rectus*

、*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga granulosa*, *Capnocytophaga haemolytica*, *Capnocytophaga sputigena*, *Cardiobacterium hominis*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium hylemonae*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium subterminale*, *Clostridium tertium*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium confusum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium kroppenstedtii*, *Corynebacterium maginleyi*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium riegelii*, *Corynebacterium tuberculostrictum*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium xerosis*, *Edwardsiella ictaluri*, *Eggerthella lenta*, *Eikenella corrodens*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Empedobacter brevis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus bovis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus italicus*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus sanguinicola*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*, *Eubacterium lentum*, *Eubacterium limosum*, *Finegoldia magna*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Fusobacterium varium*, *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Granulicatella adiacens*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus in*

fluenzae, Haemophilus parainfluenzae, Hafnia alvei, Halomonas venusta
、 Helicobacter cinaedi, Helicobacter pylori, Kingella kingae, Klebsie
lla granulomatis, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Lactobac
illus acidophilus, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus delbrueckii
、 Lactobacillus jensenii, Lactococcus garvieae, Legionella pneumophila,
Leptospira interrogans, Listeria monocytogenes, Micrococcus luteus
、 Moraxella catarrhalis, Morganella morganii, Mycoplasma genitalium,
Mycoplasma hominis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, No
cardia cyriacigeorgica, Odoribacter splanchnicus, Pantoea agglomerans
、 Parabacteroides distasonis, Parvimonas micra, Pasteurella multocida
、 Pediococcus damnosus, Peptoniphilus asaccharolyticus, Peptoniphilus
gorbachii, Peptostreptococcus anaerobius, Plesiomonas shigelloides,
Porphyromonas asaccharolytica, Porphyromonas gingivalis, Prevotella b
ivia, Prevotella bivia, Prevotella corporis, Prevotella intermedia, P
revotella melaninogenica, Prevotella nigrescens, Prevotella timonensi
s, Prevotella veroralis, Propionibacterium acnes, Propionibacterium a
vidum, Propionibacterium granulosum, Proteus mirabilis, Proteus vulga
ris, Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Pseudomonas aerugino
sa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Rothia dentocariosa
、 Rothia mucilaginosa, Salmonella enterica, Serratia marcescens, Serr
atia plymuthica, Shigella boydii, Shigella dysenteriae, Shigella flex
neri, Shigella sonnei, Spirillum minus, Staphylococcus aureus, Staphy
lococcus auricularis, Staphylococcus capitis, Staphylococcus caprae,
Staphylococcus carnosus, Staphylococcus cohnii, Staphylococcus epider
midis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus hominis, Staphyloc
occus lugdunensis, Staphylococcus pasteurii, Staphylococcus pettenkoffe
ri, Staphylococcus pulvereri, Staphylococcus saccharolyticus, Staphyl
ococcus saprophyticus, Staphylococcus schleiferi, Staphylococcus simu

lans、Staphylococcus warneri、Staphylococcus xylosus、Stenotrophomonas maltophilia、Streptobacillus moniliformis、Streptococcus agalactiae、Streptococcus anginosus、Streptococcus bovis、Streptococcus canis、Streptococcus constellatus、Streptococcus dysgalactiae、Streptococcus equi、Streptococcus gallolyticus、Streptococcus gordonii、Streptococcus infantarius、Streptococcus iniae、Streptococcus intermedius、Streptococcus lutetiensis、Streptococcus mitis、Streptococcus mutans、Streptococcus oralis、Streptococcus pasteurianus、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus porcinus、Streptococcus pyogenes、Streptococcus salivarius、Streptococcus salivarius、Streptococcus sanguinis、Streptococcus sobrinus、Streptococcus suis、Streptococcus vestibularis、Sutterella wadsworthensis、Treponema pallidum、Ureaplasma parvum、Vagococcus fluvialis、Veillonella atypica、Veillonella parvula、Vibrio alginolyticus、Vibrio cholerae、Vibrio fluvialis、Vibrio parahaemolyticus、Vibrio vulnificus、Yersinia enterocolitica、Yersinia pestis、Yersinia pseudotuberculosisなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

実施例

[0022] (製造例 1)

本発明に使用したDNAポリメラーゼは、特許文献 1 の段落0195～0205に記載の方法で生産した。

(製造例 2)

本発明で使用した三井化学製データベースは、特許文献 2 の段落0022～0030に記載の方法で作成した。

(微生物株)

以下の実施例で使用したMRSA (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) : JMC16555株 (カタログ番号)、Escherichia coli : JCM1649T (カタログ番号)、Pseudomonas aeruginosa : JCM5962T株 (カタログ番号) はいず

れも理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室(JCM) (住所 : 〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1) から公的に入手可能である。

[0023] (実施例1)

MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) をLB寒天培地に播種し、30℃で一晩培養し、コロニー形成後4℃で保存した。コロニーを、2 mlのLB液体培地に植菌し、30℃, 180 rpmで16時間振とう培養した。培養液は、CytoFLEX (Beckman Coulter) を用いて細菌数の計測を行い、原液の細菌濃度を決定した。

上記で得られたMRSA培養液の原液を、1×PBSを用いて、200 µlあたりの細菌数が、100 CFU、500 CFU、1,000 CFU、5,000 CFU、10,000 CFUとなるように希釈した。それぞれの希釈培養液200 µlを、Pathogen Lysis Tubes (Qiagen) に加えた。さらに、製品に付属のReagent DX 100 µl、およびHigh Pure RNA Isolation Kit (Roche) に付属のLysis/- Binding Buffer 400 µlを加え、デルタミキサー Se-08 (タイテック) にセットし、10分間ボルテックスを行った。

High Pure RNA Isolation Kit (Roche) に付属のカラムをリザーバーにセットし、上記細菌破碎液の上清550 µl をカラムに移液し、卓上微量高速遠心機CT15E (日立工機) にて8,000×g、1分間遠心した。カラムを新しいリザーバーにセット後、High Pure RNA Isolation Kit (Roche) に付属のWash Buffer Iを500 µl 加え、8,000×g、1分間遠心した。再びカラムを新しいリザーバーにセットし、High Pure RNA Isolation Kit (Roche) に付属のWash Buffer IIを500 µl 加え、8,000×g、1分間遠心した。カラムを新しいリザーバーにセットし、High Pure RNA Isolation Kit (Roche) に付属のWash Buffer IIを200 µl加え、13,000×g、2分間遠心した。カラムを新しい1.5 mlエッペンドルフチューブにセットし、High Pure RNA Isolation Kit (Roche) に付属のElution Bufferを50 µl加え、8,000×g、1分間遠心し、RNA溶液を回収した。

[0024] 回収したRNA溶液 10.75 μ lと、0.005 μ M~100 μ Mの各濃度の逆転写用のプライマー（配列番号1の塩基配列からなる）（invitrogen）1 μ lを混合し、70℃で5分間インキュベートし、その後4℃で5分間インキュベートした。逆転写反応の第一の反応系における逆転写用のプライマーの終濃度は0.2nM~4000nMとなる。インキュベート後、RNAと逆転写用プライマーとの混合物に、M-MLV Reverse Transcriptase, RNase (H-), Point Mutant（プロメガ）に付属のM-MLV RT (H-) Point Mutant 1 μ lおよびM-MLV RT 5 $\times$ Reaction Buffer 5 μ l、dNTP（ニッポンジーン）6.25 μ l、RNase Inhibitor Recombinant type (ToYoBo) 0.2 μ l、1 $\times$ PBS 0.8 μ lを加え、第一の反応系（溶液）を得た。得られた第一の反応系を、50℃で20分間インキュベートすることで、合成されたcDNAを含む液状の反応混合物を得た。

こうして得られた反応混合物中のcDNA（2 μ l）を鋳型としてPCRを行った。逆転写反応時0.2nM~4000nMであった逆転写用のプライマーのPCR用の第二の反応系（溶液）での終濃度は0.02 nM~400nMとなる。PCR用の第二の反応系としてのPCR溶液は、10 $\times$ Buffer（ニッポンジーン）2 μ l、2.0 mM CleanAMPTM Hot Start PCR (TriLink) 2 μ l、25mM MgCl₂（ニッポンジーン）2 μ l、5 μ M PCR用のプライマーペア（invitrogen）1.2 μ l、1U/ μ l DNAポリメラーゼ（特許文献1の段落0195~0205に記載の方法で生産）1 μ l、Evagreen（Biotium）1 μ l、DW（ナカライテスク）8.8 μ lからなる。

[0025] なお、PCR用のプライマーペアとしては、以下のプライマーペアをそれぞれ個々に用いた。

- ・プライマーペア1 a：配列番号2の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号3の塩基配列からなるリバープライマーと組合せ、
- ・プライマーペア2 a：配列番号4の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号5の塩基配列からなるリバープライマーと組合せ、
- ・プライマーペア3 a：配列番号6の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号7の塩基配列からなるリバープライマーと組合せ、
- ・プライマーペア4 a：配列番号8の塩基配列からなるフォワードプライマ

ーと配列番号 9 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

- ・ プライマーペア 5 a : 配列番号 10 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 11 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・ プライマーペア 6 a : 配列番号 12 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 13 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、
- ・ プライマーペア 7 a : 配列番号 14 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 15 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ。

[0026] PCR溶液調製後、PCRチューブをRotor-Gene Q (Qiagen) にセットし、リアルタイムPCRを実施した。PCRの反応条件は、95℃, 5分→94℃, 10秒・60℃, 20秒・72℃, 10秒・85℃, 2秒を40サイクル→95℃, 10秒、とした。解析データから得られる各PCR産物のT_m値（融解温度）から、三井化学製データベース（特許文献2の段落0022～0030に記載の方法で調製）に照合することで細菌を同定した。

上記記載の方法で同定した結果を表1に示す。なお表1における評価は以下のようにして行った。

○：同定可能

△：同定可能だがピーク汚い

×：同定不能

ー：試験未実施

また、添加したプライマー濃度が、2、5、10 μ Mの100CFUのPCR産物について、アガロースゲル電気泳動を行った結果を、図1に示す。図1（A）は添加した逆転写用のプライマー濃度が2 μ MのときのPCR産物について、アガロースゲル電気泳動を行った結果である。図1（B）は添加した逆転写用のプライマー濃度が5 μ MのときのPCR産物について、アガロースゲル電気泳動を行った結果である。図1（C）は添加した逆転写用のプライマー濃度が10 μ MのときのPCR産物について、アガロースゲル電気泳動を行った結果である。なお、図1（A）～（C）の番号で示される各レーンは以下の産物及び化合物の電気泳動の結果を示す。

- (1) プライマーペア 1 a の P C R 産物
- (2) プライマーペア 2 a の P C R 産物
- (3) プライマーペア 3 a の P C R 産物
- (4) プライマーペア 4 a の P C R 産物
- (5) プライマーペア 5 a の P C R 産物
- (6) プライマーペア 6 a の P C R 産物
- (7) プライマーペア 7 a の P C R 産物
- (8) マーカー

[0027]

[表1]

表 1		S. aureus													
		下段：PCRでのDNA合成反応開始時の逆転写用のプライマー濃度 (nM)							上段：逆転写用プライマー溶液のプライマー濃度 (μM)						
		0.005	0.01	0.02	0.04	0.08	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20	40
菌数 (CFU/ 検体)	100	x	x	x	x	x	x	x	○	○	○	○	x	○	x
	500	-	-	x	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-	-
	1000	x	x	△	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	x
	5000	-	-	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-	-
	10000	-	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	○	x

[0028] 表 1 に示したとおり、各菌数とも、細菌が同定できるか否かは、逆転写用

プライマー濃度に依存することが分かった。

また、反応条件を適正に調整することにより、少ない菌数でも十分に感度良く同定が可能であることも分かった。

[0029] (実施例 2)

E. coliを用いて、プライマー濃度と菌数について検討した。細菌をE. coliとしたこと以外、実施例 1 と同様である。同定結果を表 2 に示す。また、アガロースゲル電気泳動の結果を図 2 に示す。図 2 (A) ~ (C) は図 1 と同様に添加した逆転写用プライマー溶液のプライマー濃度が 2 μ M、5 μ M、10 μ Mでのアガロース電気泳動の結果をそれぞれ示す。なお、図 2 (A) ~ (C) の番号で示される各レーンは以下の産物及び化合物の電気泳動の結果を示す。

・ 図 2 (A)

- (1) マーカー
- (2) プライマーペア 1 a の P C R 産物
- (3) プライマーペア 2 a の P C R 産物
- (4) プライマーペア 3 a の P C R 産物
- (5) プライマーペア 4 a の P C R 産物
- (6) プライマーペア 5 a の P C R 産物
- (7) プライマーペア 6 a の P C R 産物
- (8) プライマーペア 7 a の P C R 産物

・ 図 2 (B)

- (1) マーカー
- (2) プライマーペア 1 a の P C R 産物
- (3) プライマーペア 2 a の P C R 産物
- (4) プライマーペア 3 a の P C R 産物
- (5) プライマーペア 4 a の P C R 産物
- (6) プライマーペア 5 a の P C R 産物
- (7) プライマーペア 6 a の P C R 産物

(8) プライマーペア 7 a の P C R 産物

(9) マーカー

・ 図 2 (C)

(1) プライマーペア 1 a の P C R 産物

(2) プライマーペア 2 a の P C R 産物

(3) プライマーペア 3 a の P C R 産物

(4) プライマーペア 4 a の P C R 産物

(5) プライマーペア 5 a の P C R 産物

(6) プライマーペア 6 a の P C R 産物

(7) プライマーペア 7 a の P C R 産物

(8) マーカー

[0030]

[表2]

菌数 (CFU/ 検体)	<i>E. coli</i>	上段：逆転写用プライマー溶液のプライマー濃度 (μM)															
		下段：PCRでのDNA合成反応開始時の逆転写用のプライマー濃度 (nM)															
		0.005	0.01	0.02	0.04	0.08	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	40	200	50	100
100	×	×	×	×	△	○	○	○	-	○	○	○	×	×	×	×	×
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	×	×	×	○	○	○	○	○	-	○	○	○	×	×	×	×	×
5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10000	-	-	-	○	○	○	○	○	-	○	○	○	×	×	×	×	×

[0031] 表2に示したとおり、各菌数とも、細菌が同定できるか否かは、逆転写用

プライマー濃度に依存することが分かった。

また、反応条件を適正に調整することにより、少ない菌数でも十分に感度良く同定が可能であることも分かった。

[0032] (実施例3)

*P. aeruginosa*を用いて、プライマー濃度と菌数について検討した。細菌を *P. aeruginosa*としたこと以外、実施例1と同様である。同定結果を表3に示す。また、アガロースゲル電気泳動の結果を図3に示す。図3(A)～(C)は図1と同様に添加した逆転写用のプライマー溶液のプライマー濃度が2 μ M、5 μ M、10 μ Mでのアガロース電気泳動の結果をそれぞれ示す。なお、図3(A)～(C)の番号で示される各レーンは以下の産物及び化合物の電気泳動の結果を示す。

・図3(A)

- (1) マーカー
- (2) プライマーペア1 aのPCR産物
- (3) プライマーペア2 aのPCR産物
- (4) プライマーペア3 aのPCR産物
- (5) プライマーペア4 aのPCR産物
- (6) プライマーペア5 aのPCR産物
- (7) プライマーペア6 aのPCR産物
- (8) プライマーペア7 aのPCR産物
- (9) マーカー

・図3(B)及び(C)

- (1) プライマーペア1 aのPCR産物
- (2) プライマーペア2 aのPCR産物
- (3) プライマーペア3 aのPCR産物
- (4) プライマーペア4 aのPCR産物
- (5) プライマーペア5 aのPCR産物
- (6) プライマーペア6 aのPCR産物

[0034] 表3に示したとおり、各菌数とも、細菌が同定できるか否かは、逆転写用プライマー濃度に依存することが分かった。

また、反応条件を適正に調整することにより、少ない菌数でも十分に感度良く同定が可能であることも分かった。

[0035] (実施例4)

実施例1で使用したMRSAを用いて、本手法における検出感度を確認した。検体当たりの菌数を、20 CFU、40 CFUとして、1 μ Mのプライマー濃度の逆転写用のプライマー溶液を用い、第二の反応系における逆転写用のプライマーの終濃度を4 nMとする以外は、実施例1と同様に同定試験を行った。プライマーペア1 a～7 aについて、得られたT_m値および同定結果を表4に示す。

[0036] [表4]

表4：検出感度試験結果

	プライマーペア No.							同定菌種
	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	
20 CFU-1	88.60	88.50	89.25	89.65	85.65	87.90	86.65	<i>S. aureus</i>
20 CFU-2	88.75	88.60	89.25	89.65	85.65	87.75	86.50	<i>S. aureus</i>
20 CFU-3	88.50	88.50	89.15	89.60	85.75	87.75	86.50	<i>S. aureus</i>
40 CFU-1	88.40	88.50	89.25	89.65	85.75	87.65	86.75	<i>S. aureus</i>
40 CFU-2	88.40	88.40	89.15	89.50	85.65	87.65	86.50	<i>S. aureus</i>

産業上の利用可能性

[0037] 本発明の方法により、感染症起因菌、とりわけ敗血症の起因菌を迅速に検出・同定することができ、敗血症の迅速診断法が実現する。

即ち、本発明により起因菌を1回のPCRで同定するシステム構築が可能となるため、作業負担の軽減、検査の全自動化が可能となる。