

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程を有することを特徴とする検体中の細菌数を定量する方法：
- （１）検体由来の核酸を鋳型として、細菌の16S rRNA遺伝子の増幅用のユニバーサルプライマーペアを用いてPCR法により第１の増幅産物を得る第１のPCR工程、
- （２）前記第１のPCR工程により得られた第１の増幅産物の有する配列の内部配列を増幅するためのプライマーペアを用いてnested PCR法により第２の増幅産物を得る第２のPCR工程、及び
- （３）菌種が既知であるコントロール細菌由来の増幅産物の量と前記コントロール細菌の細菌数との関係を示す検量用のデータを用いて、前記第２のPCR工程で得られた第２の増幅産物の量から前記検体中の細菌数を求める菌数定量工程。
- [請求項2] 以下の工程を有することを特徴とする請求項１に記載の検体中の細菌数を定量する方法：
- （Ａ）検体由来の核酸を鋳型として、細菌の16S rRNA遺伝子の増幅用のユニバーサルプライマーペアを用いてPCR法により第１の増幅産物を得る第１のPCR工程、
- （Ｂ）前記第１のPCR工程により得られた第１の増幅産物の有する配列の内部配列を増幅するためのプライマーペアを用いてnested PCR法により第２の増幅産物を得る第２のPCR工程、
- （Ｃ）菌種が既知であるコントロール細菌の既知の細菌数に対応した核酸試料を用いてPCR法により第３の増幅産物を得る第３のPCR工程、
- （Ｄ）前記第３のPCR工程により得られた第３の増幅産物を用いてnested PCR法により第４の増幅産物を得る第４のPCR工程、
- （Ｅ）前記既知の菌数と前記第４の増幅産物の量から検量用のデータを作成する工程、及び（Ｆ）前記第２のPCR工程で得られた第２の増幅産物の量から前記検量用のデータを用いて前記検体中の細菌数を求

める菌数定量工程。

[請求項3] 前記工程（C）、（E）及び（F）を、以下の工程により行う請求項2に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

（C－1）菌種が既知であるコントロール細菌の異なる複数の既知の細菌数に対応した複数の核酸試料をそれぞれ個々に用いてPCR法により第3の増幅産物を得る第3のPCR工程、

（E－1）前記既知の菌数と前記第4の増幅産物の量から検量線を作成する工程、及び

（F－1）前記第2のPCR工程で得られた第2の増幅産物の量から前記検量線を用いて前記検体中の細菌数を求める菌数定量工程。

[請求項4] 前記第1のPCR工程における遺伝子増幅がプラトーにならないサイクル数で前記第1のPCR工程を行うことを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

[請求項5] 前記第1の増幅産物を含む反応液を希釈して前記第2のPCR工程に供する希釈工程を有することを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

[請求項6] 同一PCR装置内で、前記第1のPCR工程と前記第3のPCR工程を並行して行い、かつ、同一PCR装置内で、前記第2のPCR工程と前記第4のPCR工程を並行して行うことを特徴する請求項2乃至5のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

[請求項7] 第2のPCR工程を複数のプライマーペアをそれぞれ個々に用いて行い、各プライマーペアで増幅された複数の増幅産物の融解温度（ T_m 値）の組合せまたは T_m 値間の差の組合せに基づいて前記検体中の細菌の菌種を同定する工程を更に有することを特徴とする請求項1乃至6のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

[請求項8] 前記第2のPCR工程用の複数のプライマーペアの少なくとも1つを用いて前記第4のPCR工程を行う（但し、複数のプライマーペアを用いる場合は、複数のプライマーペアをそれぞれ個々に用いて第4のPC

R工程を行う)ことを特徴とする請求項7に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

[請求項9] 前記コントロール細菌が、大腸菌であることを特徴とする請求項1乃至8のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

[請求項10] 前記第1のPCR工程に用いるユニバーサルプライマーペアにおいて、フォワードプライマー、リバースプライマーの一方又は両方が、1塩基異なる2種のプライマーが等量混合されたものである、請求項1乃至9のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

[請求項11] 以下の工程を有することを特徴とする検体中の細菌数を定量する方法：

(1) 検体由来の核酸を鋳型として、細菌の16S rRNA遺伝子の増幅用のユニバーサルプライマーペアを用いてPCR法により第1の増幅産物を得る第1のPCR工程、

(2) 前記第1のPCR工程により得られた第1の増幅産物の有する配列の内部配列を増幅するためのプライマーペアを用いてnested PCR法により第2の増幅産物を得る第2のPCR工程、

(3) 菌種が既知であるコントロール細菌由来の増幅産物の量と前記コントロール細菌の細菌数との関係を示す検量用のデータを用いて、前記第2のPCR工程で得られた第2の増幅産物の量から前記検体中の暫定細菌数を求める菌数定量工程、

(4) 前記検体中の細菌の菌種を同定する菌種同定工程、及び

(5) 前記菌数定量工程で求めた暫定細菌数を、前記コントロール細菌及び前記菌種同定工程で同定された菌種の16S rRNAオペロンコピー数に基づいて補正して前記検体中の細菌数を確定する細菌数補正工程。

[請求項12] 以下の工程を有することを特徴とする請求項11に記載の検体中の細菌数を定量する方法：

(A) 検体由来の核酸を鋳型として、細菌の16S rRNA遺伝子の増幅用

のユニバーサルプライマーペアを用いてPCR法により第1の増幅産物を得る第1のPCR工程、

(B) 前記第1のPCR工程により得られた第1の増幅産物の有する配列の内部配列を増幅するためのプライマーペアを用いてnested PCR法により第2の増幅産物を得る第2のPCR工程、

(C) 菌種が既知であるコントロール細菌の既知の細菌数に対応した核酸試料を用いてPCR法により第3の増幅産物を得る第3のPCR工程、

(D) 前記第3のPCR工程により得られた第3の増幅産物を用いてnested PCR法により第4の増幅産物を得る第4のPCR工程、

(E) 前記既知の菌数と前記第4の増幅産物の量から検量用のデータを作成する工程、

(F) 前記第2のPCR工程で得られた第2の増幅産物の量から前記検量用のデータを用いて前記検体中の暫定細菌数を求める菌数定量工程、

(G) 前記検体中の細菌の菌種を同定する菌種同定工程、及び

(H) 前記菌数定量工程で求めた暫定細菌数を、前記コントロール細菌及び前記菌種同定工程で同定された菌種の16S rRNAオペロンコピー数に基づいて補正して前記検体中の細菌数を確定する細菌数補正工程。

[請求項13] 前記工程(C)、(E)及び(F)を、以下の工程により行う請求項12に記載の検体中の細菌数を定量する方法。

(C-1) 菌種が既知であるコントロール細菌の異なる複数の既知の細菌数に対応した複数の核酸試料をそれぞれ個々に用いてPCR法により第3の増幅産物を得る第3のPCR工程、

(E-1) 前記既知の菌数と前記第4の増幅産物の量から検量線を作成する工程、及び

(F-1) 前記第2のPCR工程で得られた第2の増幅産物の量から前記検量線を用いて前記検体中の暫定細菌数を求める菌数定量工程。

- [請求項14] 前記第1のPCR工程における遺伝子増幅がプラトーにならないサイクル数で前記第1のPCR工程を行うことを特徴とする請求項11乃至13のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。
- [請求項15] 前記第1の増幅産物を含む反応液を希釈して前記第2のPCR工程に供する希釈工程を有することを特徴とする請求項11乃至14のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。
- [請求項16] 同一PCR装置内で、前記第1のPCR工程と前記第3のPCR工程を並行して行い、かつ、同一PCR装置内で、前記第2のPCR工程と前記第4のPCR工程を並行して行うことを特徴する請求項12乃至15のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。
- [請求項17] 前記菌種同定工程が、第2のPCR工程を複数のプライマーペアをそれぞれ個々に用いて行い、各プライマーペアで増幅された複数の増幅産物の融解温度（ T_m 値）の組合せまたは T_m 値間の差の組合せに基づいて前記検体中の細菌の菌種を同定する工程を有することを特徴とする請求項11乃至16のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。
- [請求項18] 前記第2のPCR工程用の複数のプライマーペアの少なくとも1つを用いて前記第4のPCR工程を行う（但し、複数のプライマーペアを用いる場合は、複数のプライマーペアをそれぞれ個々に用いて第4のPCR工程を行う）ことを特徴とする請求項17に記載の検体中の細菌数を定量する方法。
- [請求項19] 前記コントロール細菌が、大腸菌であることを特徴とする請求項11乃至18のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。
- [請求項20] 前記第1のPCR工程に用いるユニバーサルプライマーペアにおいて、フォワードプライマー、リバースプライマーの一方又は両方が、1塩基異なる2種のプライマーが等量混合されたものである、請求項11乃至19のいずれか1項に記載の検体中の細菌数を定量する方法。
- 。

[請求項21] 血液検体を遠心分離し、赤血球画分、バフィーコート画分及び血漿画分に分離したのち、上清の血漿画分とバフィーコートを含む試料Aと、上清の血漿画分を含みバフィーコートを含まない試料Bを作製する工程（a）、

以下の工程（2-1）、（2-2）及び（2-3）を有する検体中の細菌数を定量する方法により、前記試料Aと前記試料Bの各々の細菌数を定量する工程（b）、

および

前記試料Aと前記試料Bの、細菌数を比較することにより前記血液試料中の細菌のコンタミネーションの有無を判定する工程（c）

を含む、コンタミネーションの有無の判定方法。

（2-1）検体由来の核酸を鋳型として、細菌の16S rRNA遺伝子の増幅用のユニバーサルプライマーペアを用いてPCR法により第1の増幅産物を得る第1のPCR工程、

（2-2）前記第1のPCR工程により得られた第1の増幅産物の有する配列の内部配列を増幅するためのプライマーペアを用いてnested PCR法により第2の増幅産物を得る第2のPCR工程、及び

（2-3）検量用のデータを用いて、前記第2のPCR工程で得られた第2の増幅産物の量から前記検体中の暫定細菌数を求める菌数定量工程。

[請求項22] 前記細菌数を定量する工程（b）が、さらに工程（2-4）及び（2-5）を含む、請求項21に記載のコンタミネーションの有無の判定方法。

（2-4）前記検体中の細菌の菌種を同定する菌種同定工程、及び

（2-5）前記菌数定量工程で求めた暫定細菌数を、前記コントロール細菌及び前記菌種同定工程で同定された菌種の16S rRNAオペロンコピー数に基づいて補正して前記検体中の細菌数を確定する細菌数補正工程。

[請求項23] 前記コンタミネーションの有無を判定する工程（c）において、前記試料Aと前記試料Bの菌数の差と誤差範囲を考慮して判定する、請求項21または22に記載のコンタミネーションの有無の判定方法。