

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-97493

(P2019-97493A)

(43) 公開日 令和1年6月24日(2019.6.24)

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

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2017-232768 (P2017-232768)	(71) 出願人	803000056
(22) 出願日	平成29年12月4日 (2017. 12. 4)	(74) 代理人	110001427
		(72) 発明者	星野 仁彦
		(72) 発明者	吉田 光範
		Fターム(参考)	4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QS25 QS34 QX02

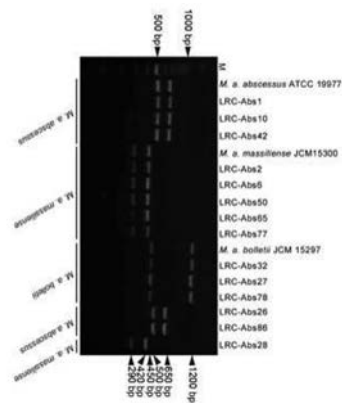
(54) 【発明の名称】 非結核性抗酸菌3亜種を識別できるプライマーセット、及び、非結核性抗酸菌3亜種の識別方法

(57) 【要約】

【課題】非結核性抗酸菌であるMycobacterium abscessus subsp. abscessus、Mycobacterium abscessus subsp. massiliense、及びMycobacterium abscessus subsp. boletiiの3亜種を識別できるプライマーセットを提供する。

【解決手段】第1のプライマーは、配列番号1で示されるフォワードプライマー(Primer F)及び配列番号2で示されるリバースプライマー(Primer R)である。第2のプライマーは、配列番号3で示されるフォワードプライマー(Primer F)及び配列番号4で示されるリバースプライマー(Primer R)である。

【選択図】 図4



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非結核性抗酸菌である *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*、及び *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* の 3 亜種を識別できるプライマーセットであって、

第 1 のプライマーは下記からなり、

フォワードプライマー gttcggatcgcatggcgttgctg . . . 配列番号 1

リバースプライマー gggatgctgtgatcgaggtcggc . . . 配列番号 2

第 2 のプライマーは下記からなる

フォワードプライマー gagggcacgggagagaccaccggag . . . 配列番号 3

リバースプライマー ccatttcYctatcYcgcccg(Yはc又はt) . . . 配列番号 4

ことを特徴とする非結核性抗酸菌 3 亜種の識別プライマーセット。

10

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載のプライマーセットを用いた核酸増幅により、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*、及び *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* の 3 亜種を識別することを特徴とする非結核性抗酸菌 3 亜種の識別方法。

## 【請求項 3】

前記核酸増幅は、マルチプレックスPCRを用いることを特徴とする請求項 2 に記載の非結核性抗酸菌 3 亜種の識別方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、非結核性抗酸菌 3 亜種を識別できるプライマーセット、及び、非結核性抗酸菌 3 亜種の識別方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

抗酸菌は結核菌、らい菌、及び非結核性抗酸菌の 3 つに大別される。非結核性抗酸菌は現在までに 170 種類以上の菌種が報告されており、そのうち 30 種類程度がヒトに病原性を示すことがわかっている。非結核性抗酸菌症のなかでも、*Mycobacterium abscessus* complex 症は既存の抗菌薬が効きづらく有効な治療法が確立されていないため、患者数は蓄積し、重症者も増えてきている。本邦においても、肺 *Mycobacterium abscessus* complex 症の患者数が急増している。最新の疫学調査から、罹患率は 10 万人あたり 0.5 人と推定され、前回調査から約 5 倍に増えていることが判明した。

30

## 【0003】

原因菌群である *Mycobacterium abscessus* complex は、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*、及び *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* の 3 亜種により構成され、それぞれの亜種により抗菌薬に対する感受性や、抗菌薬に対する耐性獲得能、及び治療成績に違いが見られることが報告されていることから、3 亜種を鑑別することは適切な治療法を選択する上で重要である。

40

## 【0004】

しかしながら、本邦の臨床現場において頻用されている抗酸菌種鑑別キット DDH マイコバクテリア極東では、*Mycobacterium abscessus* complex を亜種レベルで鑑別することはできない。*Mycobacterium abscessus* complex 3 亜種を正確かつ客観的に鑑別するためには、ゲノム情報に基づく系統解析、hsp65 遺伝子や rpoB 遺伝子等のハウスキーピング遺伝子、及びスペーサー領域を用いたマルチローカスシーケンス解析、又はパルスフィールド電気泳動による解析が必要であるが、これらの方法は労力及び費用の負担が大きく、また迅速性の面からも臨床現場における菌種の鑑別には適さない。

## 【0005】

非特許文献 1 には、マルチプレックス PCR プライマーを用いて、*Mycobacterium abscessus*

50

us subsp. abscessusとMycobacterium abscessus subsp. massilienseとの2種を識別する手法が記載されている。しかしながら、上述の亜種3種は治療反応性に差異があり、亜種3種の何れかであるか識別できる手法が求められる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Discrimination of Mycobacterium abscessus subsp. massiliense from Mycobacterium abscessus subsp. abscessus in Clinical Isolates by Multiplex PCR, Kazue Nakanaga, Journal of Clinical Microbiology, January 2014 Volume 52 Number 1

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明はかかる問題点に鑑みてなされたものであって、非結核性抗酸菌であるMycobacterium abscessus subsp. abscessus、Mycobacterium abscessus subsp. massiliense、及びMycobacterium abscessus subsp. bolletiiの3亜種を識別できるプライマーセット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】

【0008】

本発明にかかるプライマーセットは、非結核性抗酸菌であるMycobacterium abscessus subsp. abscessus、Mycobacterium abscessus subsp. massiliense、及びMycobacterium abscessus subsp. bolletiiの3亜種を識別できるプライマーセットであって、

20

第1のプライマーは下記からなり、

フォワードプライマー(Primer F) gttcggatcgcgatggcgttgtgctg・・・配列番号1

リバースプライマー(Primer R) gggatgctgtgatcggatcggc・・・配列番号2

第2のプライマーは下記からなることを特徴とする。

フォワードプライマー(Primer F) gagggcacgggagagaccaccggag・・・配列番号3

リバースプライマー(Primer R) ccatctcYctatcYcgccc(Yはc又はt)・・・配列番号4

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、非結核性抗酸菌であるMycobacterium abscessus subsp. abscessus、Mycobacterium abscessus subsp. massiliense、及びMycobacterium abscessus subsp. bolletiiの3亜種を識別できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】非結核性抗酸菌3亜種の系統解析の結果を示す図である。

【図2】配列番号1及び2のプライマーセットについて、偽陽性による増幅反応が起きないことを示す電気泳動写真図である。

【図3】配列番号3及び4のプライマーセットについて、偽陽性による増幅反応が起きないことを示す電気泳動写真図である。

40

【図4】マルチプレックスPCR用プライマーによるMycobacterium abscessus complexの標準株及び臨床分離株検出を示す電気泳動写真図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明するが、当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

【0012】

肺Mycobacterium abscessus complex症は3つの亜種に分けられ、治療無効とされるMyc

50

obacterium abscessus subsp. abscessus及び稀だが同等に難治とされるMycobacterium abscessus subsp. bolletiiと、マクロライド治療が有効なMycobacterium abscessus subsp. massilienseと、を明確に区別することは実地臨床でも不可欠となってきた。亜種により治療反応性に差異が生じる原因は、耐性誘導遺伝子(ermgene)の活性の有無により特徴づけられることが分かっている。

#### 【0013】

本発明者らは、Mycobacterium abscessus complex症の原因菌群であるMycobacterium abscessus subsp. abscessus、Mycobacterium abscessus subsp. massiliense、及びMycobacterium abscessus subsp. bolletiiの標準株及び臨床分離株のゲノム情報を取得し、比較ゲノム解析を行った。この解析により、Mycobacterium abscessus complexに属する3亜種のそれぞれに特異的な挿入・欠損部位を発見した。

10

#### 【0014】

本発明にかかるプライマーセットは、マルチプレックスPCR用のプライマーセットである。マルチプレックスPCRは、一つのPCR反応系に複数のプライマー対を同時に使用することで、複数の遺伝子領域を同時に増幅する方法である。

#### 【0015】

本発明にかかるプライマーセットは、第1プライマー対及び第2のプライマー対からなる。

#### 【0016】

第1のプライマーは下記からなる。

20

フォワードプライマー gttcggatcgcatggcgttgtgctg . . . 配列番号1

リバースプライマー gggatgctgtgatcgaggtcggc . . . 配列番号2

第2のプライマーは下記からなる。

フォワードプライマー gagggcacgggagagaccaccggag . . . 配列番号3

リバースプライマー ccatctcYctatcYcgccc(Yはc又はt) . . . 配列番号4

これらのプライマーセットを用いた核酸増幅により、非結核性抗酸菌であるMycobacterium abscessus subsp. abscessus、Mycobacterium abscessus subsp. massiliense、及びMycobacterium abscessus subsp. bolletiiの3亜種を識別できる。核酸増幅には前述のようにマルチプレックスPCRを用いる。

#### 【実施例】

30

#### 【0017】

Mycobacterium abscessus complex 3亜種の標準株及び臨床分離株のゲノム情報は、純粋培養から調製したDNA及び次世代シーケンサ(MiSeq (illumina))によって得た。

#### 【0018】

まず初めに、得られたMycobacterium abscessus complexの標準株及び臨床分離株のゲノム情報と、NCBI (National Center for Biotechnology Information)に既に登録されている標準株の配列情報(アクセッション番号NC\_010397 (Mycobacterium abscessus subsp. abscessus)、NZ\_AP014547 (Mycobacterium abscessus subsp. massiliense)、NZ\_AHAS00000000 (Mycobacterium abscessus subsp. bolletii))を使用した系統解析を行い、Mycobacterium abscessus complex臨床分離株の菌種を亜種レベルで鑑別した。

40

#### 【0019】

次に、得られたゲノム情報に対して、Mauveソフトウェア(Darlingら(2005))を用いて核酸配列のアライメントを行い、3亜種それぞれに特異的な挿入・欠損部位を探索・発見し、その部位の上流及び下流の共通配列に相補的なPCRプライマーを作成した。

#### 【0020】

第1のプライマーは下記であった。

フォワードプライマー gttcggatcgcatggcgttgtgctg . . . 配列番号1

リバースプライマー gggatgctgtgatcgaggtcggc . . . 配列番号2

第2のプライマーは下記であった。

フォワードプライマー gagggcacgggagagaccaccggag . . . 配列番号3

50

リバースプライマー ccatttcYctatcYcgcccg(Yはc又はt)・・・配列番号 4

まず、本発明のPCR用プライマーセットが、増幅対象領域を正しく増幅できるかを確認するための検証実験を行った。

【0021】

試験方法は、本発明のPCR用プライマーを含有するPCR反応液を用いてPCR法により増幅反応を行い、増幅産物を電気泳動することで、正しい増幅産物が得られることを確認した。具体的には、二種類のプライマーセットごとに以下の試験1及び2において説明する。

【0022】

(試験1)

まず、PCRプライマーセットして、配列番号1及び2に示す塩基配列からなるプライマーを備えたものを用いた。増幅対象領域は、*Mycobacterium abscessus* 3亜種それぞれのゲノムDNAに共通する膜輸送体タンパク質(MAB\_2613、MMASJCM\_RS12825、MBOL\_24380)の下流領域である。この下流領域には、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*と比較して*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*において81bpの配列欠損が、*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*において781bpの配列挿入がみられる。従って増幅産物は、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*が503 bpに対して、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*が422 bp、*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*が1204 bpである。

【0023】

PCR反応液としては以下の組成のものを用いた。プライマーはSigma-Genosys LP社より合成した。それ以外はapplied biosystems社製である。

・緩衝液、核酸合成基質及び核酸合成酵素の混合溶液2×AmpliQ Gold 360 Master Mix 10 µl

- ・PCR補助試薬 10×GC enhancer 2 µl
- ・primer F (10 ng/µl、final conc. 10 ng) 1 µl
- ・primer R (10 ng/µl、final conc. 10 ng) 1 µl
- ・試料のDNA 1 µl
- ・滅菌水 5 µl

(全量20 µl)

また、試料のDNAは、次の1～13に示す抗酸菌の供試菌株又は臨床分離株のゲノムDNAをそれぞれ別個に含有させ、個別にPCRを行った。

1. *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977
2. *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*の臨床分離株5株
3. *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* JCM 15300
4. *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*の臨床分離株6株
5. *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* JCM 15297
6. *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*の臨床分離株3株
7. *Mycobacterium chelonae* JCM 6388
8. *Mycobacterium conceptionense* JCM 15299
9. *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841
10. *Mycobacterium houstonense* JCM 15656
11. *Mycobacterium salmoniphilum* ATCC 13758
12. *Mycobacterium senegalense* ATCC 35796
13. *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700084
14. Negative Cont.

これらの抗酸菌の菌株は次の機関から分譲されたものである。

- ・ATCC American Type Culture Collection
- ・JCM Japan Collection of Microorganisms

また、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*及び*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*の臨床分離株は、公益財団

10

20

30

40

50

法人結核予防会結核研究所より分譲されたものである。これらの臨床分離株については、ゲノムシーケンスを行ったのちに供試菌株 1、3 及び 5 とともに系統解析を行い、いずれの亜種に分類されるか確認した。系統解析の結果を図 1 に示す。

【 0 0 2 4 】

なお、供試菌株 7 ~ 1 3 の抗酸菌を含有する PCR 反応液を用いた試験は、本実施形態の PCR 用プライマーセットについての偽陽性反応を確認するために行った。また 1 4 の試験は、試料の DNA に代えて同量の滅菌水を PCR 反応液に加えたものである。

【 0 0 2 5 】

PCR 法による遺伝子の増幅には、マスターサイクラー・グラディエント (エッペンドルフ社製) 又は PCR Thermal Cycler Dice (タカラ社製) を使用した。また、PCR 条件は、次の条件で行った。

- ( 1 ) 9 5      2 分
- ( 2 ) 9 5      4 0 秒
- ( 3 ) 6 2      4 0 秒
- ( 4 ) 7 2      1 分
- ( 2 ) ~ ( 4 ) を 3 0 サイクル
- ( 5 ) 7 5      5 分

次に、PCR 法による産物を、アガロースゲル電気泳動により増幅対象領域ごとに泳動させ、正しい増幅産物が得られているか否かを確認した。電気泳動は、Mupid-2 plus (タカラ社製) を用いて行った。その結果を図 2 に示す。

【 0 0 2 6 】

図 2 において、各バンドは各試料の DNA 等を含有する PCR 反応液を用いて行った PCR の産物を、それぞれ電気泳動した結果を示している。試験 2 においても同様である。

【 0 0 2 7 】

試験 1 の PCR プライマーセットは、配列番号 1 及び 2 に示す塩基配列からなるプライマーを備えたものであり、増幅対象領域は *Mycobacterium abscessus* 3 亜種に共通する膜輸送体遺伝子の下流領域であり、増幅産物は、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* が 503 bp、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* が 422 bp、*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* が 1204 bp である。

【 0 0 2 8 】

図 2 では、試料 DNA として *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* のゲノム DNA を使用した供試菌株 1 及び臨床分離株 2 において 5 0 0 bp 付近のバンドが見られる。同様に、供試菌株 3 及び臨床分離株 4 において 4 2 0 bp 付近にバンドが見られ、供試菌株 5 及び臨床分離株 6 において 1 2 0 0 bp 付近にバンドが見られる。その他供試菌株 7 ~ 1 3 には同付近にバンドは見られない。

【 0 0 2 9 】

以上のことから、試料 DNA として *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* 及び *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* のゲノム DNA を使用した菌株 1 ~ 6 では、試験 1 のプライマーセットにより、*Mycobacterium abscessus* 3 亜種に共通する膜輸送体遺伝子の下流領域が正しく増幅されていると判断できる。

【 0 0 3 0 】

一方、試料の DNA としてその他のゲノムを使用した供試菌株 7 ~ 1 3 のレーンを参照すると、膜輸送体遺伝子の下流領域が増幅されたものと誤認してしまうような、非対象領域の増幅は見られなかった。

【 0 0 3 1 】

これにより、配列番号 1 及び 2 に示す塩基配列からなるプライマーを備えた PCR 用プライマーセットを用いることで、*Mycobacterium abscessus* 3 亜種に共通する膜輸送体の下流領域を特異的に増幅できることが確認された。

【 0 0 3 2 】

10

20

30

40

50

## (試験2)

PCR用プライマーとしてセットとして、配列番号3及び4に示す塩基配列からなるプライマーを備えたものを用いた点以外は、試験1と同様にして実験を行った。その結果を図3に示す。

## 【0033】

試験2のPCR用プライマーセットの増幅対象領域は、*Mycobacterium abscessus* 3亜種に共通するATP結合カセット輸送体遺伝子(MAB\_1655、MMASJCM\_RS08315、MBOL\_16200)の下流領域である。この下流領域には、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*と比較して*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*において361bpの配列欠損が、*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*において200bpの配列欠損がみられる。従って増幅産物は、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*が652bpに対して、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*が291bp、*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*が452bpである。

10

## 【0034】

図3では、試料DNAとして*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*のゲノムDNAを使用した供試菌株1及び臨床分離株2において650bp付近のバンドが見られる。同様に、供試菌株3及び臨床分離株4において450bp付近にバンドが見られ、供試菌株5及び臨床分離株6において290bp付近にバンドが見られる。その他共試菌株7～13には同付近にバンドは見られない。

## 【0035】

従って、試料DNAとして*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*、*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*及び*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*のゲノムDNAを使用した菌株1～6では、試験2のプライマーセットにより、*Mycobacterium abscessus* 3亜種に共通するATP結合カセット輸送体遺伝子の下流領域が正しく増幅されていると判断できる。

20

## 【0036】

一方、試料のDNAとしてその他のゲノムを使用した供試菌株7～13のレーンを参照すると、ATP結合カセット輸送体遺伝子の下流領域が増幅されたものと誤認してしまうような、非対象領域の増幅は見られなかった。

## 【0037】

これにより、配列番号3及び4に示す塩基配列からなるプライマーを備えたPCR用プライマーセットを用いることで、*Mycobacterium abscessus* 3亜種に共通するATP結合カセット輸送体遺伝子の下流領域を特異的に増幅できることが確認された。

30

## 【0038】

以上の通り、本実施形態のPCRプライマーセットは、それぞれ単独で用いた場合には、当該プライマーセットの増幅対象でない他の抗酸菌のゲノムDNAに関し、偽陽性による増幅反応が起きないことが確認された。

## 【0039】

次に、これらのPCR用プライマーセットを同時に使用した場合において、対象領域を特異的に増幅できるかを検証した。その結果を以下の実施例において説明する。

40

## 【0040】

まず、PCRプライマーセットとして、試験1及び試験2で使用した全てのプライマーセットを用いて実験を行った。すなわち、本実施例のPCR反応液には、配列番号1～4に示す塩基配列からなる全てのプライマーを含有させた。

## 【0041】

本実施例のPCR反応液は、プライマー、試料のDNA、及び滅菌水以外は試験1と同様であり、以下の組成のものを使用した。

- ・緩衝液、核酸合成基質及び核酸合成酵素の混合溶液 2 × AmpliTaq Gold 360 Master Mix 10 µl
- ・PCR補助試薬 10 × GC enhancer 2 µl

50

- ・ primer F (配列番号 1、10 ng/μl、final conc. 10 ng) 1 μl
  - ・ primer R (配列番号 2、10 ng/μl、final conc. 10 ng) 1 μl
  - ・ primer F (配列番号 3、10 ng/μl、final conc. 10 ng) 1 μl
  - ・ primer R (配列番号 4、10 ng/μl、final conc. 10 ng) 1 μl
  - ・ 試料のDNA 1 μl
  - ・ 滅菌水 3 μl
- (全量 20 μl)

また、試料のDNAは、次の 1 ~ 6 に示す抗酸菌の供試菌株又は臨床分離株のゲノムDNAをそれぞれ別個に含有させ、個別にPCRを行った。

- 1 . Mycobacterium abscessus subsp. abscessus ATCC 19977
- 2 . Mycobacterium abscessus subsp. abscessus の臨床分離株 5 株
- 3 . Mycobacterium abscessus subsp. massiliense JCM 15300
- 4 . Mycobacterium abscessus subsp. massiliense の臨床分離株 6 株
- 5 . Mycobacterium abscessus subsp. bolletii JCM 15297
- 6 . Mycobacterium abscessus subsp. bolletii の臨床分離株 3 株

PCR法による遺伝子の増幅は、試験 1 と同様に、マスターサイクラー・グラディエント (エッペンドルフ社製) 又はPCR Thermal Cycler Dice (タカラ社製) を使用した。また、PCR条件は、次の条件で行った。

- ( 1 ) 9 5 2 分
- ( 2 ) 9 5 4 0 秒
- ( 3 ) 6 2 4 0 秒
- ( 4 ) 7 2 1 分
- ( 2 ) ~ ( 4 ) を 3 0 サイクル
- ( 5 ) 7 5 5 分

次に、PCR法による産物を、アガロースゲル電気泳動により増幅対象領域ごとに泳動させ、正しい増幅産物が得られているか否かを確認した。電気泳動は、Mupid-2 plus (タカラ社製) を用いて行った。その結果を図 4 に示す。

#### 【 0 0 4 2 】

図 4 において、各バンドは各試料のDNA等を含有するPCR反応液を用いて行ったPCRの産物を、それぞれ電気泳動した結果を示している。

#### 【 0 0 4 3 】

図 4 では、試料DNAとしてMycobacterium abscessus subsp. abscessus のゲノムDNAを使用した供試菌株 1 及び臨床分離株群 2 において 5 0 0 bp 及び 6 5 0 bp 付近のバンドが見られる。同様に、供試菌株 3 及び臨床分離株群 4 において 4 2 0 bp 及び 2 9 0 bp 付近にバンドが見られ、供試菌株 5 及び臨床分離株群 6 において 1 2 0 0 bp 及び 4 5 0 bp 付近にバンドが見られる。

#### 【 0 0 4 4 】

これらは、それぞれ理論上の増幅産物の塩基配列と近似するものであり、本実施形態のPCRプライマーセットによって、それぞれ対象とする抗酸菌の増幅対象領域が特異的に増幅できていると考えられる。

#### 【 産業上の利用可能性 】

#### 【 0 0 4 5 】

非結核性抗酸菌 3 亜種の識別に利用できる。

#### 【 配列表フリーテキスト 】

#### 【 0 0 4 6 】

配列番号 1 ~ 4 : プライマー

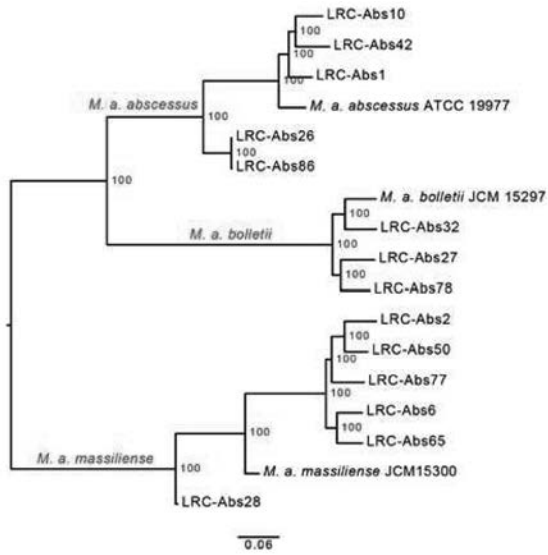
10

20

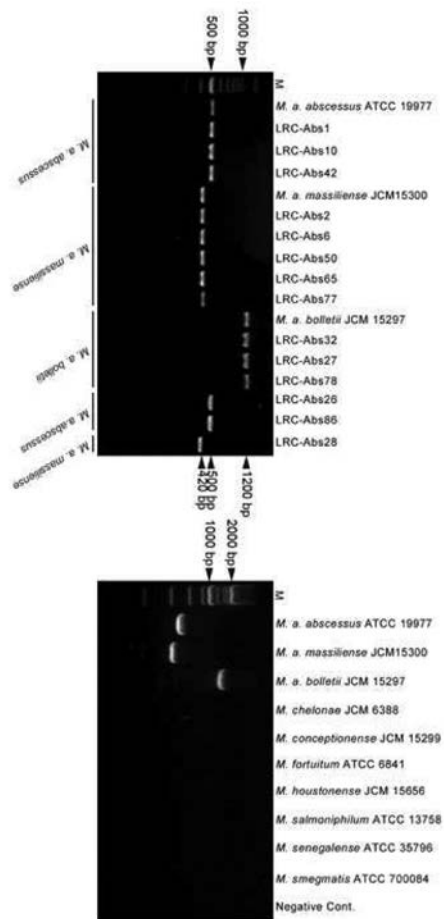
30

40

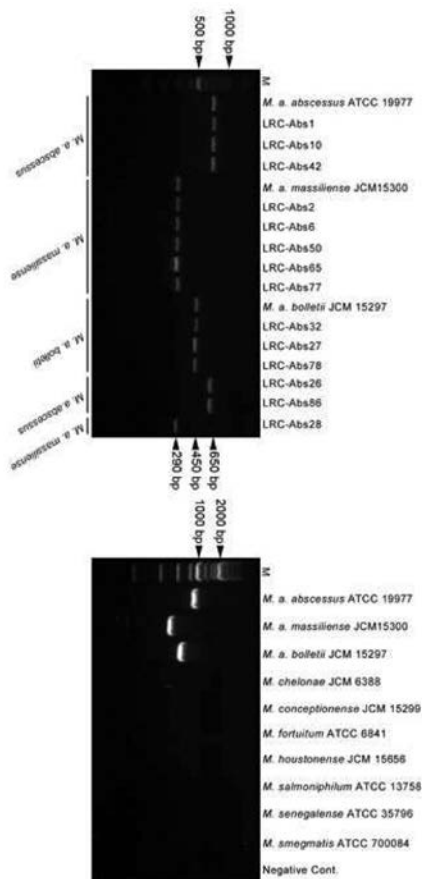
【 図 1 】



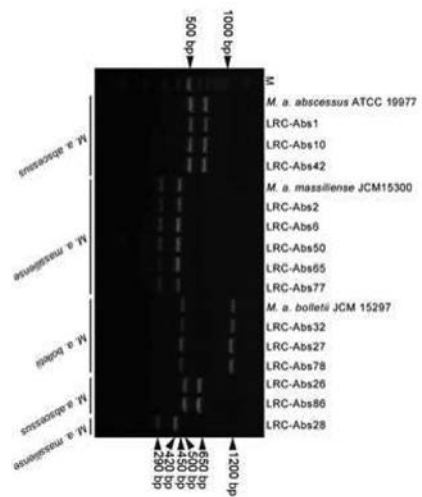
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

2019097493000001.app