

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6299660号
(P6299660)

(45) 発行日 平成30年3月28日 (2018. 3. 28)

(24) 登録日 平成30年3月9日 (2018. 3. 9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 F

請求項の数 4 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2015-89562 (P2015-89562)	(73) 特許権者	000006035
(22) 出願日	平成27年4月24日 (2015. 4. 24)		三菱ケミカル株式会社
(65) 公開番号	特開2015-231362 (P2015-231362A)		東京都千代田区丸の内1-1-1
(43) 公開日	平成27年12月24日 (2015. 12. 24)	(74) 代理人	100092783
審査請求日	平成29年7月12日 (2017. 7. 12)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	特願2014-98719 (P2014-98719)	(74) 代理人	100120134
(32) 優先日	平成26年5月12日 (2014. 5. 12)		弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100153693
			弁理士 岩田 耕一
早期審査対象出願		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		(72) 発明者	大島 宏之
			神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号
			三菱レイヨン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 菌叢解析方法と菌叢解析用デバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のプローブ (a) と、プローブ (b) と、プローブ (c) とを搭載した、細菌叢解析用デバイス。

(a) 腸内、皮膚、口内、土壌、海水、河川又は活性汚泥に含まれる細菌から選ばれる検出の対象となる2種以上の細菌のそれぞれに特異的な16S rRNAにハイブリダイズする核酸からなるプローブ

(b) 前記2種以上の細菌が共通に有する塩基配列にハイブリダイズするプローブを含む総量指標プローブ

(c) 被検試料中に含まれる細菌に由来する核酸にはハイブリダイズせず、被検試料中に含まれる細菌のDNAが増幅されないように人工的に設計された核酸にハイブリダイズする、1種類又は複数種類の絶対量指標プローブ

【請求項 2】

デバイスが、繊維型DNAマイクロアレイである請求項1に記載のデバイス。

【請求項 3】

口内に含まれる細菌が、Porphyromonas属、Tannerella属又はTreponema属に属する細菌である、請求項1又は2に記載のデバイス。

【請求項 4】

以下の工程を含む、検出対象菌種のコピー数を演算する方法。

(1) 予め単離された検出対象細菌のそれぞれについて、請求項1～3のいずれか1項に

10

20

記載のデバイスを用いて各プローブのシグナル強度を測定する工程(2) 前記シグナル強度比から係数を算出する工程

(3) 前記 (2) の工程で算出した算出値をプローブのハイブリダイゼーション効率係数とし、当該ハイブリダイゼーション効率係数を用いて被検試料から得られるデータの各検出対象菌種のコピー数を演算する工程

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【 0 0 0 1 】**

本発明は、菌叢解析用デバイス及びそれを用いた菌叢の解析方法に関する。

【背景技術】

10

【 0 0 0 2 】

サンプル中に含まれる細菌の菌種の同定や定量結果は、環境や動植物の健康状態等を評価する指標として有用であり、感染症診断を含めて今日さまざまな応用例がある。

このような評価方法としては、実際に顕微鏡などでサンプル中に含まれる細菌を個々に観察し、形態等から細菌の菌種を同定し、各々の細菌について直接的に数を数える方法が挙げられる。場合によっては、選択培地等を用いて細菌をスクリーニングすることで同定効率を向上させることもある。

【 0 0 0 3 】

また、細菌の合成するタンパク質を当該タンパク質に特異的な抗体を利用して検出する方法や、代謝産物を質量分析機器にて検出する方法がある。

20

最も迅速性に優れ、汎用的に使われている技術は、PCRやLAMP法といった分子生物学的な核酸増幅技術や、インベーター法等のシグナル増幅技術である。これらの手法により、検出対象細菌がもつ特異的な配列の核酸を選択的増幅し検出する方法は、広く利用されている（特許文献1、2）。

【 0 0 0 4 】

一方で、サンプル中に含まれる細菌群、いわゆる菌叢を包括的に解析する技術についても環境評価や診断等の分野での応用を目指した研究が多くなされている。例えば、検出対象となる細菌に共通した核酸配列を基に当該核酸を非選択的に増幅し、その後制限酵素処理でフラグメント解析したり、クローニングしてシーケンサー等による配列決定をしたり、もしくは当該増幅配列内における特異的な配列とのハイブリダイゼーションによる同定

30

したりすることなどが挙げられる。これらのために電気泳動装置や、DNAチップ等のハイスループットなデバイスを用いることもある（特許文献3、4）。

【先行技術文献】**【特許文献】****【 0 0 0 5 】**

【特許文献1】特開2004-57059号公報

【特許文献2】特開2007-244349号公報

【特許文献3】特開2004-290171号公報

【特許文献4】特許第5139620号公報

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】**【 0 0 0 6 】**

環境中に存在する細菌叢、例えば腸内細菌、皮膚の常在菌、口内細菌、土壌中に含まれる細菌、活性汚泥中に含まれる細菌などは、多種類の細菌が相互に影響しつつ、その存在する環境自体にも大きな影響を与えている。

これらの菌叢を解析する場合、培養を用いた方法では時間がかかるし、多種類の細菌から構成される一部の細菌のみしか検出できない恐れがある。また、培養前と培養後で菌叢が異なる可能性も考えられる。抗原抗体反応や質量分析を用いた方法は、特異的な抗体のない細菌や、事前に当該細菌に特徴的なタンパク質や代謝物等が明らかでない細菌が存在する場合は適用が困難なので、検出できる細菌の種類が限られる。

50

【 0 0 0 7 】

例えば、菌叢に含まれる多種類の細菌を一括評価するために、PCR等の増幅手段によって菌叢中に含まれる核酸を一括増幅し、DNAチップ等によってプローブとのハイブリダイゼーションの特異性を基に個々の細菌を選別し、定性的に評価することは可能であるが、網羅的なアレイであったとしても、菌叢の中に未知の細菌が存在する可能性を考慮すると、全体としての菌の量を定量的に評価することは困難であった。また、プローブのハイブリダイゼーション効率も個々に異なることから、定量的に評価することは困難であった。

【 0 0 0 8 】

そこで本発明は、菌叢を定量的に評価するための菌叢解析方法及びその方法に用いるデバイス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】

【 0 0 0 9 】

本発明者は上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、細菌のそれぞれに特異的な16S rRNAにハイブリダイズする核酸からなるプローブと、総量指標プローブ及び/又は絶対量指標プローブとを使用することにより菌叢を解析し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、以下のプローブ(a)と、プローブ(b)及び(c)の少なくとも一方のプローブとを搭載したデバイスである。

(a) 検出の対象となる1種又は2種以上の細菌のそれぞれに特異的な16S rRNAにハイブリダイズする核酸からなるプローブ

(b) 総量指標プローブ

(c) 1種類又は複数種類の絶対量指標プローブ

【 0 0 1 1 】

本発明のデバイスにおいて、プローブ(b)は、前述した検出の対象となる1種又は2種以上の細菌が共通に有する塩基配列を含むものであることが好ましい。また、プローブ(c)は、所定の外部添加コントロール1と、当該外部添加コントロール1とは異なる少なくとも1種類の外部コントロール2との混合物であって、前記外部添加コントロール1に対し外部添加コントロール2が2のn乗倍(nは任意の整数)の濃度比で混合されている混合物中に含まれるものであることが好ましい。

【 0 0 1 2 】

ここで、検出の対象となる細菌は、例えば、腸内細菌、皮膚の常在菌、及び口内細菌などが挙げられる。

腸内細菌としては、例えば、Lactobacillus属、Streptococcus属、Veillonella属、Bacteroides属、Eubacterium属、Bifidobacterium属、及びClostridium属の細菌のうちの少なくとも1種が挙げられる。

皮膚の常在菌としては、例えば、Propionibacterium属、及びStaphylococcus属の細菌のうちの少なくとも1種が挙げられる。

口内細菌としては、例えば、Porphyromonas属、Tannerella属、Treponema属、Campylobacter属、Fusobacterium属、Parvimonas属、Streptococcus属、Aggregatibacter属、Capnocytophaga属、Eikenella属、Actinomyces属、Veillonella属、Selenomonas属、Lactobacillus属、Pseudomonas属、Haemophilus属、Klebsiella属、Serratia属、Moraxella属、及びCandida属の細菌うちの少なくとも1種が挙げられる。

また、口内細菌としては、より具体的には、例えば、Porphyromonas gingivalis、Tannerella forsythia、Treponema

10

20

30

40

50

denticola、*Campylobacter gracilis*、*Campylobacter rectus*、*Campylobacter showae*、*Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*、*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*、*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*、*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*、*Fusobacterium periodonticum*、*Parvimonas micra*、*Prevotella intermedia*、*Prevotella nigrescens*、*Streptococcus constellatus*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Campylobacter concisus*、*Capnocytophaga gingivalis*、*Capnocytophaga ochracea*、*Capnocytophaga sputigena*、*Eikenella corrodens*、*Streptococcus gordonii*、*Streptococcus intermedius*、*Streptococcus mitis*、*Streptococcus mitis bv 2*、*Actinomyces odontolyticus*、*Veillonella parvula*、*Actinomyces naeslundii II*、*Selenomonas noxia*、及び*Streptococcus mutans*のうちの少なくとも1種が挙げられる。

10

【0013】

20

また本発明のデバイスにおいて、プローブ(a)は、好ましくは以下のいずれかの配列が挙げられる。

(ア) 配列番号3～59に示される塩基配列から選ばれる少なくとも2つの配列

(イ) (ア)の相補配列

(ウ) (ア)又は(イ)の配列と実質的に同一の配列

また、本発明のデバイスは、繊維型マイクロアレイとすることができる。

【0014】

さらに、本発明は、以下の工程を含む、検出対象菌種の絶対量を推定する方法である。

(1) 予め単離された検出対象細菌のそれぞれについて、当該検出対象細菌を検出するためのプローブのシグナル強度比から係数を算出する工程

30

(2) 上記(1)の工程で算出した算出値をプローブのハイブリダイゼーション効率係数とし、当該ハイブリダイゼーション効率係数を用いて被検サンプルから得られるデータの各検出対象菌種のコピー数を演算する工程

(3) 上記(2)の工程で演算した演算後のシグナル強度を、絶対量指標プローブのシグナル強度と比較する工程

【発明の効果】**【0015】**

増幅産物の配列中に、菌種特異的なプローブと、総量指標プローブもしくは絶対量指標プローブのいずれか一方、もしくは両方を搭載したデバイスを用いることで、菌叢中の複数の菌を一括に絶対定量が可能となる。また、サンプル中に含まれる菌の総量も定量可能である。

40

【発明を実施するための形態】**【0016】**

以下本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願2014-098719号(2014年5月12日出願)の明細書の全体を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

【0017】

50

本発明の検出対象菌種の絶対量を推定する方法（絶対量推定方法）は、以下の工程を含む。

（１）予め単離された検出対象細菌のそれぞれについて、当該検出対象細菌を検出するためのプローブのシグナル強度比から係数を算出する工程

（２）上記（１）の工程で算出した算出値をプローブのハイブリダイゼーション効率係数とし、当該ハイブリダイゼーション効率係数を用いて被検サンプルから得られるデータの各検出対象菌種のコピー数を演算する工程

（３）上記（２）の工程で演算した演算後のシグナル強度を、絶対量指標プローブのシグナル強度と比較する工程

【００１８】

10

ここで本発明の絶対量推定方法に使用することができるデバイスは、以下のプローブ（ａ）と、プローブ（ｂ）及び（ｃ）の少なくとも一方のプローブとを搭載したデバイスである。

（ａ）検出の対象となる複数種類の細菌のそれぞれに特異的な１６ＳｒRNAにハイブリダイズする核酸からなるプローブ

（ｂ）総量指標プローブ

（ｃ）１種類又は複数種類の絶対量指標プローブ

【００１９】

デバイス

プローブが独立にかつ位置を特定できるように固定化されているアレイタイプのデバイスであればどのような種類のデバイスであっても使用可能である。アレイのタイプも特に限定されないが、後述の総量指標プローブでのシグナルを安定的に取得する目的からすると、単に平面基板上にプローブを固定化しているものよりも、プローブ固定化量の多いアレイが適している。このようなアレイとしては、DNAマイクロアレイ好ましい。特に、ゲルを介して三次元的にプローブを固定化する繊維型DNAマイクロアレイが挙げられる。デバイスについて、その支持体の形態は特に限定されず、平板、棒状、ビーズ等のいずれの形態も使用できる。支持体として、平板を使用する場合は、その平板上に、所定の間隔をもって、所定のプローブを種類毎に固定することができる（スポットティング法等；*Science* 270, 467-470 (1995) 等参照）。また、平板上の特定の位置で、所定のプローブを種類毎に逐次合成していくこともできる（フォトリソグラフィ法等；*Science* 251, 767-773 (1991) 等参照）。

20

30

【００２０】

他の好ましい支持体の形態としては、中空繊維を使用するものが挙げられる。支持体として中空繊維を使用する場合は、オリゴヌクレオチドプローブを種類毎に各中空繊維に固定し、すべての中空繊維を集束させ固定した後、繊維の長手方向で切断を繰り返すことにより得られるデバイスが好ましく例示できる。このデバイスは、貫通孔基板にオリゴヌクレオチドプローブを固定化したタイプのものと説明することができる（特許第351082号公報等を参照、図1）。

【００２１】

支持体へのプローブの固定化方法は特に限定されず、どのような結合様式でもよい。また、支持体に直接固定化することに限定はされず、例えば、予め支持体をポリリジン等のポリマーでコーティング処理し、処理後の支持体にプローブを固定することもできる。さらに、支持体として中空繊維等の管状体を使用する場合は、管状体にゲル状物を保持させ、そのゲル状物にプローブを固定化することもできる。

40

【００２２】

プローブ

本明細書では、細菌由来の核酸をハイブリダイゼーション反応により捕捉し、捕捉された核酸を蛍光や化学発光、着色、RI等で測定し、細菌の有無を判別することや量を測定することを検出と呼ぶ。

プローブは検出対象となる細菌の持つ核酸をハイブリダイゼーションにより捕捉するも

50

のであり、当該捕捉対象核酸に特異的な配列の相補配列から構成されるオリゴDNAが用いられることが多いが、捕捉対象核酸に特異的な配列とハイブリダイゼーションするものであれば、DNAであってもRNAであってもよい。PNAやLNAなどを含んでいてもよい。用途に応じてcDNAを固定化する場合もある。

【0023】

一般的に多種類のプローブを一括搭載しているデバイス（例えば、DNAマイクロアレイ）を使用する場合、多種類のプローブを同一条件下でハイブリダイゼーション反応に供するため、プローブ間のハイブリダイゼーション効率を揃えることが重要となる。このような目的のため、プローブは設計時にGC含量や配列長を調整し、Tm値を可能な範囲で一定に揃える必要がある。デバイスに搭載されるプローブの種類や数は特に限定されない。

10

【0024】

細菌特異的プローブ（前記プローブ（a））は、鋳型となる塩基配列又はプローブの塩基配列中に、細菌の種類によって特異的な塩基配列を含むものである。

【0025】

デバイス（例えば、DNAマイクロアレイ）に対してサンプルをハイブリダイゼーションさせる際、多くの場合は検出感度を向上させ、検出可能な標識を付加するために、PCRやLAMP法などの核酸増幅手法を適用する。増幅反応においては、後の工程におけるデバイスとのハイブリダイゼーションに必要な範囲を増幅させることが重要であり、ハイブリダイゼーションに必要でない部分は試薬コスト等の観点からなるべく増幅させないことが望ましい。

20

【0026】

上述のPCR法では、プライマー対で挟まれた範囲のみを増幅するため、ハイブリダイゼーションに不必要な配列を除外した上で増幅反応を行うのに適している。ここで「対」とは、増幅反応に最低限必要なプライマーのセットであり、その種類は増幅反応の方法によって異なる場合がある。一般的なPCRの場合は、プライマー対はフォワードプライマーとリバースプライマーの2種類のオリゴDNAから構成される。

【0027】

特定のプライマーとは、増幅対象配列が限定されるという意味であり、プライマー対は必ずしも1対である必要はない。必要に応じて2対以上のプライマー対を用いるマルチプレックス手法も適用できる。例えば、細菌増幅用プライマー対（配列番号1、2）や、外部添加コントロール用プライマー対（配列番号91、92）を利用することが可能である。

30

【0028】

上記のようなデバイス（例えば、DNAマイクロアレイ）を用いて菌叢解析を行う際には、用途は特に限定されない。健康状態の検査・診断的な用途であれば、腸内細菌叢、口内細菌叢、皮膚の常在菌などが考えられる。また、環境検査的な用途であれば土壌中の細菌叢、水処理における活性汚泥等に活用が可能である。

【0029】

これらの中で、腸内細菌叢の評価を行う場合は、例えば、*Lactobacillus* 属、*Streptococcus* 属、*Veionella* 属、*Bacteroides* 属、*Eubacterium* 属、*Bifidobacterium* 属、及び *Clostridium* 属の細菌などを、検出対象菌種とすることができる。

40

【0030】

皮膚の常在菌の評価を行う場合は、例えば、*Propionibacterium* 属細菌（例えば、*Propionibacterium acnes*）、及び *Staphylococcus* 属細菌などを、検出対象菌種とすることができる。

【0031】

口内細菌叢の評価を行う場合は、例えば、*Porphyromonas* 属、*Tannerella* 属、*Treponema* 属、*Campylobacter* 属、*Fusobac*

50

terium属、Parvimonas属、Streptococcus属、Aggregatibacter属、Capnocytophaga属、Eikenella属、Actinomyces属、Veillonella属、Selenomonas属、Lactobacillus属、Pseudomonas属、Haemophilus属、Klebsiella属、Serratia属、Moraxella属、及びCandida属の細菌などを、検出対象菌種とすることができる。より具体的には、例えば、現在歯周病や虫歯や日和見感染に関連していると考えられる、Porphyromonas gingivalis、Tannerella forsythia、Treponema denticola、Prevotella intermedia、Aggregatibacter actinomycetemcomitans、Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii、Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum、Fusobacterium nucleatum subsp. animalis、Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum、Streptococcus mutans、Streptococcus salivarius、Streptococcus sanguis、Streptococcus mitis、Actinomyces viscosus、Lactobacillus gasseri、Lactobacillus phage、Lactobacillus casei、Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus、Streptococcus aureus、Pseudomonas aeruginosa、Streptococcus pyogenes、Streptococcus pneumoniae、Haemophilus influenzae、Klebsiella pneumoniae、Serratia marcescens、Serratia macescens、Moraxella catarrhalis、Candida albicans、Campylobacter gracilis、Campylobacter rectus、Campylobacter showae、Fusobacterium periodonticum、Parvimonas micra、Prevotella nigrescens、Streptococcus constellatus、Campylobacter concisus、Capnocytophaga gingivalis、Capnocytophaga ochracea、Capnocytophaga sputigena、Eikenella corrodens、Streptococcus gordonii、Streptococcus intermedius、Streptococcus mitis bv 2、Actinomyces odontolyticus、Veillonella parvula、Actinomyces naeslundii II、及びSelenomonas noxiaなどの細菌を検出対象菌種とすることが好ましく、より好ましくは、Porphyromonas gingivalis、Tannerella forsythia、及びTreponema denticolaであり、特に好ましくは、Porphyromonas gingivalisである。

【0032】

これらについては、例えば、後述の表1に示すプライマー（配列番号1、2）を用いて増幅する場合、配列番号3～59に記載の配列をプローブとすることが可能である。配列番号3～59に示される塩基配列から選ばれる少なくとも2つの配列を用いることが好ましい。配列番号3～59に示される塩基配列から選ばれる少なくとも2つの配列の相補配列であってもよく、配列番号3～59に示される塩基配列から選ばれる少なくとも2つの配列と実質的に同一の配列又は配列番号3～59に示される塩基配列から選ばれる少なくとも2つの配列の相補配列と実質的に同一の配列であってもよい。

【0033】

ここで、実質的に同一とは、配列番号3～59に記載の配列又は相補配列に対してスト

10

20

30

40

50

リンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズさせるのに十分な長さである。

プローブの長さとしては、例えば、15塩基以上、好ましくは17塩基以上、より好ましくは20塩基以上の配列である。ここで、ストリンジェントな条件とは、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する。すなわち、高い相同性（相同性又は同一性が95%以上、好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上）を有する一対のポリヌクレオチドがハイブリダイズする条件をいう。より具体的には、このような条件は、当該分野において周知慣用な手法、例えば、ノーザンブロッティング法、ドットブロット法、コロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法又はサザンブロットハイブリダイゼーション法などにおいて採用される条件を設定することができる。具体的には、ポリヌクレオチドを固定化したメンブランを用いて、0.7~1MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC（Saline Sodium Citrate; 150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）溶液を用い、65℃でメンブランを洗浄することにより達成できる。

【0034】

これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するポリヌクレオチドが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0035】

総量指標プローブ（前記プローブ（b））

デバイス（例えば、DNAマイクロアレイ）に搭載するプローブの種類がどれだけ多くても、被検試料の中には、未同定の細菌が混在する可能性が高く、増幅される核酸の中には、特異的なプローブが搭載されていない検出対象ではない細菌（「非検出対象細菌」という）由来の核酸が存在する。

従って、すべての細菌を検出対象細菌として検出することは困難であり、菌叢を解析する上では、検出対象細菌が、非検出対象細菌を含む全体の細菌叢の中でどの程度の割合であるのか、また、そもそもサンプル中にどれくらいの量の細菌が存在しているのかといった観点から細菌の総量を評価することもきわめて重要となる。

【0036】

非検出対象細菌は、(i)正体は分かっているが検出対象としなくてもよい細菌、及び(ii)存在や種類が不明である細菌の和として理解できる。その一方で、(ii)については存在も不可知で特異的な配列も不明であるため、必ずしも実際に検出できるとは限らない。このため、(ii)の中でも、増幅できた菌については非検出対象細菌を含むすべての検出対象細菌とする。増幅できた菌については必ずプライマー配列に対する相補配列を持っているので、プライマーと同じ配列をもつプローブに対してハイブリすることができ。

【0037】

従って、本発明において全ての検出対象細菌とは特定のプライマー対で増幅できた細菌を意味する。

このような細菌の総量を評価するに際しては、例えば、デバイス（DNAマイクロアレイ）とは独立に細菌数を測定することも可能である。この場合、デバイス中に細菌の総量の指標となるプローブを搭載しておくことが操作の簡便性を向上させる観点から有利となる。プローブについては、プライマー対によって増幅される塩基配列の中から、多種類の菌種に共通な塩基配列を使用してもよい。そのような配列が見つからない場合は、比較的共通な配列を複数設計し、それらを総合的に判断することで総量指標プローブとしてもよい。総量指標プローブは、好ましくは、被検試料に含まれる細菌に由来する核酸にハイブリダイズするプローブ、詳しくは、前記特定のプライマー対により増幅される塩基配列のうちの、検出対象となる複数種類の細菌が共通に有する塩基配列を含むプローブである。

【0038】

総量指標は、個々の菌種特異的な増幅産物の合計量を表すため、一般的に量が多くなることから、シグナル強度が頭打ち（検出できるシグナル強度の許容範囲を超えるシグナルが出てしまうこと）になりやすい。

【 0 0 3 9 】

そのような状況を防ぐためには、個々の菌種特異的な増幅産物を捕捉するプローブと比較して、ハイブリダイゼーション効率を落とすことで対応が可能である。PCRを実施するに際しては、二種類のオリゴDNAを一つのプライマー対とし、そのうちの一方を蛍光標識し、他方を基本的に無標識として使用する。例えば無標識の方のオリゴDNAと同じものをプローブとして用いると、増幅された全PCR産物がハイブリダイゼーションすることになるので、このハイブリダイゼーションシグナルを測定する。プローブを設計する際には、例えば当該プローブのTm値を低くする。具体的にはGC含量を少なくすることや、プローブの配列長自体を短くする方法が考えられる。

10

【 0 0 4 0 】

また、ハイブリダイゼーションに際して、増幅された核酸と総量指標プローブとのハイブリダイゼーションに対して競合的に作用するような核酸を添加することで、シグナル強度の低減化を図ることが可能である。このような核酸としては、例えば、総量指標プローブと（部分的に）同じ配列を有する核酸、あるいは総量指標プローブの相補配列を（部分的に）有する核酸などが挙げられる。

【 0 0 4 1 】

一方で、プライマー対と同じもしくは一部同じ配列を総量指標プローブとすることも可能である。例えば、フォワードプライマーに蛍光標識がなされている場合、リバースプライマーを構成する配列の全部もしくは一部を含むプローブを使用することで、増幅産物の総量を評価することが可能となる。

20

【 0 0 4 2 】

フォワードプライマーに蛍光標識がなされている場合、フォワードプライマーから伸長した側の鎖をハイブリダイゼーションに供してシグナル検出する。この場合、上記同様、当該プローブの捕捉対象となる増幅産物の多さから、シグナル強度が頭打ちすることが懸念されるが、上記と同様にプローブの長さやGC含量を調整することでその影響を抑えることが可能である。

【 0 0 4 3 】

30

ハイブリダイゼーション効率係数

本明細書において、ハイブリダイゼーション効率係数とは、各菌種におけるプローブのシグナル強度から、各プローブにおけるハイブリダイゼーション効率係数を算出する。複数の細菌に対してハイブリダイゼーションを形成するプローブについてはその平均値をハイブリダイゼーション効率係数とする。

【 0 0 4 4 】

外部添加コントロール

本明細書において、外部添加コントロールとは、被検サンプル中に含まれる細菌のDNAが増幅されないように人工的に設計された核酸を意味する。増幅反応やハイブリダイゼーション反応の前に、サンプル中に一定量添加する核酸である。外部添加コントロールは、通常の増幅反応を行えば増幅反応が確実に行われる核酸であり、いわゆる陽性コントロールとしての役割を果たす。従って、外部添加コントロールに特異的なプローブをデバイス（例えば、DNAマイクロアレイ）に搭載しておけば、その検出結果から、増幅反応やハイブリダイゼーション等が適切に実施されたかを評価することができる。

40

【 0 0 4 5 】

また、外部添加コントロールを複数設計し、それぞれについて濃度を変えた混合物を使用すれば、当該濃度に対する検出結果、例えば蛍光強度との対応付けにより、サンプル中に含まれる細菌やその総量を定量することが可能である。

外部添加コントロールを増幅反応前に添加するのであれば、上記特定のプライマー対にて増幅される核酸であること、すなわちプライマー対と相補な塩基配列を所持しているこ

50

と、かつ、ハイブリダイゼーションで検出するためには、検出対象細菌、非検出対象細菌いずれにおいても所持していない塩基配列を所持している必要がある。

【0046】

外部添加コントロールの設計

例えば、MICROSOFT社のソフトウェア「EXCEL」のRND BETWEEN関数を使用し、1から4までの整数をランダムにX個(Xは任意の数)発生させ、それをつなげて1から4までの数値のみから構成されるX桁の数値とし、1をA、2をT、3をC、4をGと置き換えることにより、ATGCのX塩基によるランダム配列を多数得ることができる。これらの配列につき、GとTの和がAとTの和と同数になる配列のみを抜粋し、抜粋された配列を、NCBIのGenBank等のデータベースに対してBlast検索し、類似配列の少ないものを選抜し、配列の両末端にプライマー配列を付加することで、設計可能である。また、設計された配列を適宜連結させて長くしたり、部分的に除去して短くすることも可能である。外部添加コントロールを複数用いて検出対象細菌等を定量する場合、増幅反応時における反応効率をなるべく一定にするために、検出対象細菌にて増幅される塩基長と大きな差のないようにすることが望ましい。例えば、検出対象細菌の増幅産物が500bp程度となるのであれば、外部添加コントロールの増幅産物は300bpから1000bp程度とすることが望ましい。一方で、増幅後に電気泳動等で増幅鎖長を確認する場合においては、検出対象細菌とは異なる長さの増幅産物となるように設計した上で、外部添加コントロール由来の増幅産物を検出対象細菌のバンドとは異なる位置で検出し、ハイブリダイゼーションの前に増幅反応の成否を確認することも可能である。

10

20

【0047】

また、外部添加コントロールを複数使用する場合においては、各外部添加コントロール間においては、プローブによって捕捉される配列やその付近以外は同じ塩基配列で構成されることが望ましい。

【0048】

外部添加コントロールを添加したうえで増幅反応をPCR等で実施する場合

1種類又は複数種類の絶対量指標プローブ(前記プローブ(c))は、特定のプライマー対を用いて増幅されたプローブであって被検試料に含まれる細菌に由来する核酸にはいずれもハイブリダイズせず、コントロールとして作製した外部添加コントロール核酸にハイブリダイズするプローブである。

30

絶対量指標プローブは、所定の外部添加コントロール1と、当該外部添加コントロール1とは異なる少なくとも1種類の外部添加コントロール2との混合物に含まれている。この場合、外部添加コントロール2は、外部添加コントロール1に対し2のn乗(nは任意の整数)の濃度比で混合されている。これはPCR自体がnサイクル後に2n倍の増幅産物量となるためである。外部添加コントロールの種類は2種類以上であるが、50種類以下であることが好ましい。

【0049】

またデバイス(例えば、DNAマイクロアレイ)のダイナミックレンジが 10^4 程度であることを考慮すると、濃度段階を2ⁿ倍のステップで15種類用意すれば $2^{15} > 10^4$ であるため、デバイス(例えば、DNAマイクロアレイ)のダイナミックレンジ内においては十分な指標とすることができ。ただし、各15種類の濃度ステップにおける外部添加コントロールを複数用意する場合においては、より多種類の外部添加コントロールを用意することも可能であるため、例えば各濃度段階において3種類の外部添加コントロールを作製する場合などを考慮すると45種類程度の外部添加コントロールを、2のn乗の濃度ステップにて混合することが望ましい。

40

【0050】

本発明において、複数種類の絶対量指標プローブを用いる場合、複数種類の外部添加コントロール核酸が増幅されてそれぞれのプローブで複数種類の外部添加コントロールを検出する。k種類(第1番~第k番)の外部添加コントロールを使用する場合、第1番から

50

みた第 $k - 1$ 番の濃度比と、第 1 番からみた第 k 番の濃度比を 2 の n 乗 (n は任意の整数) で表すことができる。

【0051】

例えば、第 1 番からみた第 2 番のときの n を 3 とし、第 1 番からみた第 3 番のときの n も 3 とすると、第 1 番からみた第 2 番の濃度比も、第 1 番からみた第 3 番の濃度比も、2 の 3 乗 = 8 倍となって同じ濃度比にすることができる。また、第 1 番からみた第 2 番のときの n を 2 とし第 1 番からみた第 3 番のときの n を 3 とし、別の濃度比にすることもできる。

すなわち、複数種類の絶対量指標プローブを、同一濃度で使用してもよく、異なる濃度で使用してもよい。

【0052】

基本的には、複数種類の絶対量指標プローブはどのような組み合わせで入れてもよい。15 種類の場合に、濃度 1 のものを 7 種類、濃度 2 のもの (濃度 1 に対する濃度比が 2 のもの、以下同様) を 8 種類入れてもよく、濃度 1 のものを 7 種類、濃度 4 のものを 8 種類入れてもよい。濃度 1 のものを 2 種類、濃度 4 のものを 3 種類、濃度 8 のものを 1 種類・・・でもよい。後述する実施例のように、濃度 1 のものを 1 種類、濃度 2 のものを 1 種類、濃度 4 のものを 1 種類、濃度 8 のものを 1 種類、・・・濃度 15 のものを 1 種類でもよい。

【0053】

検量線を引くために、濃度が 2 段階以上あることが必要であるが、その 2 段階が、2 の n 乗 (n は整数) の濃度比になっていればよい。

一方で、サンプル中に含まれる外部添加コントロールはあまりにも濃度が高いと検出対象の細菌と増幅反応における競合が激しくなり、本来検出できるはずの検出対象細菌が検出できなくなる可能性もあるため、アプリケーションに応じて適宜濃度調整をする必要がある。

【0054】

複数の外部添加コントロールをハイブリダイゼーションによって検出するために、複数の外部添加コントロールそれぞれに特異的な配列の相補配列をプローブとして個別にデバイス (例えば、DNA マイクロアレイ) に搭載する必要がある。

上記デバイス (DNA マイクロアレイ) を用いて実際に未知サンプル (実サンプル) の細菌叢に含まれる検出対象菌種の有無や量を解析する場合、上記のデバイスに含まれる検出対象菌種に対するプローブそれぞれについて、絶対量指標プローブのシグナルと、総量指標プローブのシグナル強度を基に補正する係数で処理することで、検出対象細菌由来の核酸を絶対定量することが可能となる。

【0055】

検出対象菌種の絶対量推定方法

検出対象細菌

菌叢の中に未知の細菌がいる可能性は否定できない。このため、デバイス (例えば、DNA マイクロアレイ) を用いて全ての細菌種を検出対象とすることは困難である。過去に同定済みの細菌の中からある現象を評価するに際して、検出するにふさわしい細菌が対象となる。例えば、口内細菌は数百種類存在し、同定されている菌も多い。しかし、歯周病を評価するに際しては、これらの同定される菌が必ずしも検出対象として適しているとは限らない。

【0056】

従って、歯周病を評価する場合は、歯周ポケットの中に存在する、例えば、*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola*、*Prevotella intermedia*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*、*Fusobacterium nucleatum subsp. polymor*

10

20

30

40

50

phum、Fusobacterium nucleatum subsp. animalis、Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatumなどが歯周病を評価することに適している菌であると言える。さらに好ましくは、Porphyromonas gingivalis、Tannerella forsythia、Treponema denticolaが、特に好ましくはPorphyromonas gingivalisが歯周病を評価することに適している。

【0057】

これらの細菌の個々について、上記特定のプライマー対で増幅される塩基配列の中から、当該細菌に特異的な配列をプローブとして選抜する。すなわち、特定のプライマー対で増幅された塩基配列の中には、プローブとして使用できるものと使用できないものが含まれているので、そのうち使用できるプローブを選別する。基本的には一種類のプライマー対で多種類の菌を増幅し、増幅配列内で、菌種によって配列の多様性が認められる部分でプローブを作製する。

10

【0058】

本来のプローブとして使用できる配列と同じ作用効果を有するプローブも実質的に同一の配列であるプローブとして使用できる。

従って、これらの検出対象細菌は上記特定のプライマー対によって増幅される核酸配列を持っている必要があり、また、これらの核酸を基に当該細菌を検出するために、増幅された配列内に、他の細菌とは異なる菌種特異的な配列を含んでいる必要がある。

【0059】

20

一方でその特異性は、属レベルの特異性を基に同じ属の細菌を一括に検出するものであってもよいし、個々の種レベルで検出可能な特異性であってもよく、菌叢解析の目的に応じて当適宜判断が可能である。

複数の細菌を一括に増幅し、さらに特異的な配列を基にして検出するに際しては、プライマー対については菌種間で保存された配列から設計する必要があり、鋳型（プライマーによって増幅される範囲）として細菌特異的な配列を持っている遺伝子を使用する必要がある。このような鋳型となる遺伝子としては16S rRNAが挙げられる。本発明においては、16S rRNAそのものを検出対象としてもよいし、転写もととなるゲノムDNAにおける16S rRNAを検出対象とすることも可能である。

【0060】

30

例えば、まず検出対象細菌を単離する。このとき、すでに菌株として販売されているものを使用してもよい。また、細菌は生きていても死んでいてもよく、さらに細菌そのものではなく細菌から抽出されたゲノムDNAであってもよい。

【0061】

(1) 予め単離された検出対象細菌のそれぞれについて、当該検出対象細菌を検出するためのプローブのシグナル強度比から係数を算出する工程

これら単離された細菌もしくは核酸の1種類について、本発明のデバイスによって処理を行う。その結果、当該細菌特異的なプローブで検出されるシグナルAと、総量指標プローブで検出されるシグナルBが得られる。

【0062】

40

また別途、上記とは異なる単離された細菌もしくは核酸を用いて同様に本発明のデバイスによる処理を行う。その結果、当該細菌特異的なプローブで検出されるシグナルCと、総量指標プローブで検出されるシグナルDが得られるとする。

【0063】

(2) 上記(1)の工程で算出した算出値をプローブのハイブリダイゼーション効率係数とし、当該ハイブリダイゼーション効率係数を用いて被検サンプルから得られるデータの各検出対象菌種のコピー数を演算する工程

ここで、シグナルBおよびシグナルDについては、同じ配列の総量指標プローブから得られるシグナルであるため、理論上ハイブリダイゼーションの効率は同じといえる。一方で、シグナルAとシグナルBにおいてはプローブ配列自体が異なるが、検出対象とする核

50

酸は同じであり、ハイブリダイゼーションに供された量や実験条件も同一である。このことは、シグナルCとシグナルDについても同様のことが言える。

【0064】

従って、シグナルBとシグナルDの値が一致する場合のシグナルAとシグナルCの強度比が、それぞれのプローブのハイブリダイゼーション効率の違いとなる。従って、 A/B の値と C/D の値は、各プローブにおけるハイブリダイゼーション効率の違いを補正したうえで比較が可能な値となる。例えば実サンプルを用いてDNAマイクロアレイでデータを取得した際に、あらかじめ取得しておいたこれらの個々の値の逆数を、それぞれのプローブのシグナル強度に乗算することで、各プローブ間のハイブリダイゼーション効率を補正したうえで、シグナル強度を比較することが可能となる。

10

【0065】

(3) 上記(2)の工程で演算した演算後のシグナル強度を、絶対量指標プローブのシグナル強度と比較する工程

これらのシグナル強度を、絶対量指標プローブのシグナル強度と比較することで、各菌種の絶対量を評価することが可能となる。

この工程では、検出対象の分子数が既知である外部添加コントロールともハイブリダイゼーション効率の違いを補正したうえでシグナル強度の比較を行うと、より正確な絶対量の値を算出することが可能となる。すなわち、外部コントロールの分子数が既知であるので、それらのシグナル強度と添加した外部コントロールの分子数の対応で作成できる検量線により、各菌種特異的なプローブのシグナル強度をより正確に分子量に変換することが可能となる。

20

【0066】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0067】

<デバイスとプライマーの作製>

NCBIより16S rRNAの配列データをダウンロードし、菌種間において高度に保存された二つの配列を表1に示すフォワードプライマー(配列番号1)およびリバースプライマー(配列番号2)としてオリゴDNAの合成(Life Technologies社)を行った。またこのとき、フォワードプライマーについてはCy5による蛍光標識を行った。これらのプライマーについて、フォワードプライマーは50 pmol/μL、リバースプライマーは10 pmol/μLの濃度にそれぞれ調製した。

30

【0068】

【表1】

配列番号	役割	備考	配列(5'→3')
1	フォワードプライマー(細菌増幅用)	5'に蛍光標識	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
2	リバースプライマー(細菌増幅用)		CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACC
91	フォワードプライマー(外部添加コントロール増幅用)	5'に蛍光標識	GAGAAGCCTACACAAACGTAACGTC
92	リバースプライマー(外部添加コントロール増幅用)		CTCTAAAGACCGCTCTATCTCGG

【0069】

検出対象とする口内細菌(Porphyromonas gingivalis (P.g.), Tannerella forsythia (T.f.), Treponema denticola (T.d.), Campylobacter gracilis (C.gr.), Campylobacter rectus (C.r.), Campylobacter showae (C.sh.), Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii (F.n.v), Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum (F.n.p), Fusobacterium nucleatum subsp. animalis (F.n.a), Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum (F.n.a), Fusobacterium periodontic

40

50

um (F.p.), Parvimonas micra (P.m.), Prevotella
intermedia (P.i.), Prevotella nigrescen
s (P.n.), Streptococcus constellatus (S.c.)
、Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A
.a.)、Campylobacter concisus (C.c.)、Capnocy
tophaga gingivalis (C.gi.)、Capnocytophaga
ochracea (C.o.)、Capnocytophaga sputigen
a (C.sp.)、Eikenella corrodens (E.c.)、Stre
ptococcus gordonii (S.g.)、Streptococcus in
termedius (S.i.)、Streptococcus mitis (S.m.)
、Streptococcus mitis bv 2 (S.mb.)、Actino
myces odontolyticus (A.o.)、Veillonella pa
rvula (V.p.)、Actinomyces naeslundii II (A.
n.)、Selenomonas noxia (S.n.)それぞれのゲノムDNAを
基にして、上記プライマーで増幅される範囲を1塩基ずつずらしながら20塩基の配列を
設計した。

10

【0070】

次に、上記設計した塩基配列の中から、およそそのGC含量が50%前後となるものを
抽出し、それらの配列すべてをNCBIのBLASTプログラムを用い、全菌種に対する
16SrRNA配列をマスキングデータベースとして相同性検索を行い、配列特異性の最
も高かった配列を二つ抽出した。抽出された配列を菌種間で比較し、他に比べてGC含量
の高いものについてはその配列の前後を1塩基から2塩基を追加し、低いものについては
1塩基から2塩基削除した。

20

【0071】

得られた配列をプローブとするために、5末端ビニル化オリゴDNAを合成した(配列
番号3~59)。別途、前記特定のプライマー対により増幅される塩基配列のうちの、検
出の対象となる複数種類の細菌が共通に有する塩基配列の、5末端ビニル化オリゴDNA
を合成した(配列番号60)。

さらに、16SrRNA中には含まれない配列からなるプローブを15種類(配列番号
61~75)用意し、これらについても5末端ビニル化オリゴDNAを合成した。

30

【0072】

これらすべての種類の5末端ビニル化オリゴDNAを用い、プローブを三菱レイヨン性
DNAチップジェノパールのプラットフォームを用いてアレイ化した。設計したすべての
プローブ配列を表2に示す。

【0073】

【表 2】

配列番号	役割	その他検出対象細菌	配列(5'→3')
3	Porphyromonas gingivalis (P.g.)用プローブ		TTCAATGCAATACTCGTATC
4	Porphyromonas gingivalis (P.g.)用プローブ		GTACATTCAATGCAATACTC
5	Tannerella forsythia (T.f.)用プローブ		CACGTATCTCATTTTATTC
6	Tannerella forsythia (T.f.)用プローブ		AATACACGTATCTCATTTTATT
7	Treponema denticola (T.d.)用プローブ		CTCTTCTTCTTATTCTTCAT
8	Treponema denticola (T.d.)用プローブ		CCTCTTCTTCTTATTCTTCAT
9	Campylobacter gracilis (C.g.)用プローブ		GCCTTCGCAATAGGTATT
10	Campylobacter gracilis (C.g.)用プローブ		CGCCTTCGCAATAGGTAT
11	Campylobacter rectus (C.r.)用プローブ		ATTCTTTCCCAAGAAAAGGA
12	Campylobacter rectus (C.r.)用プローブ	C.s.	GTCAATAATTCTTTCCCAAGA
13	Campylobacter showae (C.s.)用プローブ		CAATGGGTATTCTTCTTGAT
14	Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii (F.n.)用プローブ		TAGTTATACAGTTTCCCAACG
15	Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii (F.n.)用プローブ		GTAGTTATACAGTTTCCCAAC
16	Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum (F.n.)用プローブ		TCCAGTACTCTAGTTACACA
17	Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum (F.n.)用プローブ		CCAGTACTCTAGTTACACA
18	Fusobacterium nucleatum subsp. animalis (F.n.)用プローブ		TTTCTTTCTTCCCAACTGAA
19	Fusobacterium nucleatum subsp. animalis (F.n.)用プローブ		ATTTCTTTCTTCCCAACTGA
20	Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum (F.n.)用プローブ		TACATTCCGAAAAACGTAT
21	Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum (F.n.)用プローブ		TTACATTCCGAAAAACGTCA
22	Fusobacterium periodonticum (F.p.)用プローブ		TATGCAGTTTCCCAACGCAA
23	Fusobacterium periodonticum (F.p.)用プローブ		CTCTAGTTATGCAGTTTCC
24	Parvimonas micra (P.m.)用プローブ		AAGTGCTTAATGAGGTTAAG
25	Parvimonas micra (P.m.)用プローブ		TTTCAAGTGCTTAATGAGGT
26	Prevotella intermedia (P.i.)用プローブ		GGGTAATGCAAAAAGGCA
27	Prevotella intermedia (P.i.)用プローブ		GCAAGGTAGATGTTGAGCA
28	Prevotella nigrescens (P.n.)用プローブ		CTTTATTCCACATAAAAGC
29	Prevotella nigrescens (P.n.)用プローブ		TCCTTATTCTAGGTAGAT
30	Streptococcus constellatus (S.c.)用プローブ		AAGTACCGTCACTGTGTG
31	Streptococcus constellatus (S.c.)用プローブ		TTAAGTACCGTCACTGTGT
32	Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a.)用プローブ		GTCAATTTGGCATGCTATTA
33	Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a.)用プローブ		TTTAACGTCAATTTGGCATG
34	Campylobacter concisus (C.c.)用プローブ		CCCAAGCAGTTCTATGGT
35	Campylobacter concisus (C.c.)用プローブ		TCCCAAGCAGTTCTATGG
36	Capnocytophaga gingivalis (C.g.)用プローブ		TACACGTACACCTTATTCTT
37	Capnocytophaga gingivalis (C.g.)用プローブ		CATCAATGTACACGTACAC
38	Capnocytophaga ochracea (C.o.)用プローブ		CATTCAAGACCAACAGTTT
39	Capnocytophaga ochracea (C.o.)用プローブ		CAACCATTCAAGACCAAGA
40	Capnocytophaga sputigena (C.s.)用プローブ		GCTTAGTTGAGCTAAGCG
41	Capnocytophaga sputigena (C.s.)用プローブ		TCAAAGGCAGTTGCTTAGT
42	Eikenella corrodens (E.c.)用プローブ		CTAGCTATCCAGTTCCAGAA
43	Eikenella corrodens (E.c.)用プローブ		CTCTAGCTATCCAGTTTCCAG
44	Streptococcus gordonii (S.g.)用プローブ	S.s.	CACCCGTTCTTCTCTTACA
45	Streptococcus gordonii (S.g.)用プローブ	S.s.	CACCCGTTCTTCTCTTAC
46	Streptococcus intermedius (S.i.)用プローブ		CAGTATGAACCTTCCATTCT
47	Streptococcus intermedius (S.i.)用プローブ		ACAGTATGAACCTTCCATTCT
48	Streptococcus mitis (S.m.)用プローブ	S.m. bv 2, S.o.	CCCTCTTGCATCAAGT
49	Streptococcus mitis (S.m.)用プローブ		TCTCCCTCTTGCATCA
50	Streptococcus mitis bv 2 (S.m.)用プローブ	S.o.	TCCCTCTTGCATCAAGT
51	Actinomyces odontolyticus (A.o.)用プローブ		AAGTCAGCCCGTACCCA
52	Actinomyces odontolyticus (A.o.)用プローブ		CGCACTCAAGTCAGCCC
53	Veillonella parvula (V.p.)用プローブ		CTATTGCAAGAGGCGCTT
54	Veillonella parvula (V.p.)用プローブ		TATTGCAAGAGGCGCTT
55	Actinomyces naeslundii II (A.n.)用プローブ		CACAAGGAGCAGGCGCTG
56	Actinomyces naeslundii II (A.n.)用プローブ		CCACCCACAAGGAGCAG
57	Selenomonas noxia (S.n.)用プローブ		TTGCGATTAGGCAGGTTG
58	Selenomonas noxia (S.n.)用プローブ		CTATTGCGATTAGGCAGGTT
59	Streptococcus mutans (S.mu.)用プローブ		CACAGCTTCTTGACTTAC
60	総菌量 (16S rRNA consensus seq.)用プローブ		CGTATTACCGCGCTGCTGGCAC
61	外部Ctrl1用プローブ		CGTGCAATTGCTGTAGGTTGACCCCTAAT
62	外部Ctrl2用プローブ		GCAGCTACGTTTCATACCTACGCAAGGCATT
63	外部Ctrl3用プローブ		GAGGAGATACCGAATCGGTGACGACATTT
64	外部Ctrl4用プローブ		TGTTGCTGAGGTCGTGACGATTGGCAA
65	外部Ctrl5用プローブ		CCCTACTGAGCAACGTTGCACTAATGGA
66	外部Ctrl6用プローブ		AACAACGACCGAGTGCATAGTCACGTACGA
67	外部Ctrl7用プローブ		AGGAGCCCTAAGGTATTGGCGAGAAAAGTC
68	外部Ctrl8用プローブ		GTGAGTATCCGCATATCTTCCGAGGTTGCA
69	外部Ctrl9用プローブ		ACTTAGCTGACCGAAGGACCATTAACGCTGT
70	外部Ctrl10用プローブ		TGGAAGGGATCCGTAGTCAACCGTTGACTT
71	外部Ctrl11用プローブ		CGGATCGACATACGACGCTACAGAATGTT
72	外部Ctrl12用プローブ		TAAACGCTAGGCGAGACTATGAGTGCTCC
73	外部Ctrl13用プローブ		CGTATGGATCGATCCGACGTACCACATTAG
74	外部Ctrl14用プローブ		ACTGCGTATGATCGACACGGCTAATCGTAG
75	外部Ctrl15用プローブ		CTATTGACCGAGCATATCACTACGTAGGC

【 0 0 7 4 】

< 検体の調製 >

次に、サーマルサイクラーの電源を入れ、表 3 に示す通りプログラムを設定した。

【 0 0 7 5 】

【表 3】

Ramp max、液量20ul					
95℃	95℃	56℃	72℃	40℃	4℃
1min	10sec	30sec	20sec	8min	∞ (無限大)
40 Cycles					

【0076】

消毒用エタノールとキムワイブ/キムタオル等でゴム手袋、実験台の上、ピペットマン、チューブラック等をきれいに清掃し、氷の上にチューブラックを置いた。チューブラックの上に、評価用サンプル、プライマー(2本)、Ex Taq、外部添加コントロール、ヌクレアーゼフリーの水を置いた。必要に応じて試薬を溶解、ボルテックス、スピンドウンした。プレミックス作製用エッペンチューブ、プライマー希釈用エッペンチューブ、外部添加コントロール希釈用チューブ、反応実施用エッペンチューブ(0.2mL, サンプル数分)をチューブラックに置いた。プライマー希釈用エッペンチューブにプライマーをそれぞれ10pmol/μLとなるように希釈して入れた。

10

【0077】

<PCR用Premixの作製>

エッペンチューブに水をサンプル数×6μL入れた。10万倍希釈外部添加コントロールをサンプル数×1μL入れた。10pmol/μLプライマー(reverse) サンプル数×1μLを入れた。50pmol/μLプライマー(forward) サンプル数×1μLを入れた。2x Taqをサンプル数×10μL入れた。ボルテックスで攪拌し、スピンドウンしたものを、Premixとした。

20

【0078】

<反応液の作製>

Premixを19μL、反応用エッペンチューブ(0.2mL)に小分け分注し、反応用エッペンチューブに、下表に示すサンプルを1μL入れた。ボルテックスで攪拌し、スピンドウンし、反応液とした。

サンプルは凍結乾燥された菌株もしくはゲノムDNAをATCCから購入したものを使用した。使用したサンプルを表4に示した。ゲノムDNAについては10ng/μLに調整したもの、菌株については、300μLの水で溶解したものから、Dneasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN社)を用いて、DNAを抽出した。濃度は0.01から10pgまで、それぞれ必要な範囲を測定した。

30

【0079】

【表 4】

細菌種類	ATCC番号
<i>Prevotella nigrescens</i> Shah and Gharbia	33563
<i>Capnocytophaga ochracea</i> Leadbetter et al.	33596
<i>Eikenella corrodens</i> (Eiken) Jackson and Goodman	23834
<i>Streptococcus mitis</i> Andrewes and Horder emend. Judicial Commission	49456D-5
<i>Actinomyces naeslundii</i> Thompson and Lovstedt	12104D-5
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277D
<i>Tannerella forsythensis</i>	43037D-5
<i>Treponema denticola</i>	35405D-5
<i>Prevotella intermedia</i>	25611D-5
<i>Haemophilus actinomycetemcomitans</i>	700685D-5
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<i>Campylobacter concisus</i>	BAA-1457D-5
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236D-5
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>Animalis</i>	51191
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> deposited as <i>Fusobacterium polymorphum</i>	10953
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>Vincenti</i>	49256
<i>Streptococcus gordonii</i>	35105D-5
<i>Campylobacter rectus</i> ; Strain FDC 371	33238D-5
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612

【0080】

<PCR>

反応液をサーマルサイクラーにセットし、サーマルサイクラーの蓋をしっかりと閉じ、スタートボタンを押して反応を開始した。

【0081】

<ハイブリダイゼーションの準備>

サーマルサイクラーのスイッチを入れて、プログラム[95 5min(必要に応じて4で任意の時間放置)反応液量:100μL、Ramp Speed:Max]を設定した。小さな容器(96 well plateが入る大きさ)に氷を入れ、氷の隙間に水がいきわたるくらい純水を入れた。

【0082】

<ハイブリダイゼーション用Premixの作製>

1. 5mLのエッペンチューブもしくは8mLのコニカルチューブを用意した。チューブにきれいな水をサンプル数×1.1×64μL入れた。チューブに1M Tris-HClをサンプル数×1.1×48μL入れた。チューブに1M NaClをサンプル数×1.1×48μL入れた。チューブに0.5% Tween20をサンプル数×1.1×20μL入れた。ボルテックスでよく混ぜて、必要に応じてスピンドウンし、ハイブリダイゼーション用Premixとした。

【0083】

<ハイブリダイゼーション溶液の作製>

サンプル溶液(PCR産物の入った0.2mLのエッペンチューブ)に対してハイブリダイゼーション用Premix180μLを小分け分注した。ボルテックスして、スピンドウンし、ハイブリダイゼーション溶液とした。

【0084】

<ハイブリダイゼーション前処理>

ハイブリダイゼーション溶液をサーマルサイクラーにセットして、蓋をしっかりとめて加温を開始した。95 5分の加熱が終了後、即座に蓋をあけ、中に入っているサンプルチューブをプラスチックのラックごと取り出し、氷水の入った小さな容器に漬け込み、2分放置した。その後、サンプルチューブを氷水から取り出し、氷上のラックにおいた。

【0085】

< ハイブリダイゼーション >

エアインキュベーターが50℃になっていることを確認し、ハイブリチャンバーに全量(200 µl)のハイブリダイゼーション溶液を入れた。上記で作製したジェノパールハイブリチャンバー内に浸漬した。ハイブリチャンバーに蓋をし、密閉した状態でエアインキュベーター内に入れ、そのままの状態ですべて2時間遮光放置した。

【0086】

< 洗浄 >

2時間経過後、ハイブリチャンバーをエアインキュベーターから取り出し、蓋を開けた。0.24 M T N Tバッファの入ったコニカルチューブをウォーターインキュベーターから取り出し、蓋についた結露を落とすために、一旦コニカルチューブの蓋をしたまま回転し、その後、蓋を開けた。ハイブリチャンバーからピンセットでチップを取り出し、底面をキムワイプ等に接触させ、過剰なハイブリ溶液を吸収除去した。チップをコニカルチューブに入れ、再度蓋をして、ウォーターインキュベーターに浸漬し、そのまま20分間加温した。20分経過後、上記と同様の方法で、チップを同一バッファの入った別のコニカルチューブに移し、さらに20分間加温した。20分経過後、上記と同様の方法で、チップを今度は0.24 M T N Tバッファの入ったコニカルチューブに移し、さらに10分間加温した。10分経過後、上記と同様の方法で、チップを同一バッファの入った8 mLのコニカルチューブに移し、回転架台を用いて10分以上回転撹拌した。

【0087】

< 検出操作 >

チップをコニカルチューブから取り出し、Genopall Reader用検出ケース(三菱レイヨン製)にセットした。

Genopall Reader(三菱レイヨン製)を用い、装置取扱い説明書に従って以下の露光時間を40秒、4秒、1秒、0.1秒の各条件にてDNAマイクロアレイの撮像を行い、検出された蛍光シグナルを基に換算された数値データを解析に使用した。

【0088】

< 解析 >

市販の表計算ソフトを用い、パソコン上でサンプル名称他、サンプルやチップ、実験条件に関する情報とシグナル強度の数値を貼り付けた。

外れ値を除外した複数のバックグラウンドスポット(プローブが搭載されていないスポット)の平均値をバックグラウンド値とした。またその時の標準偏差の値を最小シグナル値とした。

プローブスポットのシグナル値から、バックグラウンド値を減算し、正味シグナル値を算出した。

【0089】

正味シグナル値が最小シグナル値よりも低い場合はそれらを最小シグナル値に置き換えた。

結果を表5(表5-1~5-5;表5-1の左端側に表5-2~5-5が順に繋がったもの全体で表5である。)に示した。データ中の細囲いは、細菌種特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナルを示している。部分的にクロスハイブリダイゼーションは散見されるものの、およそのサンプルにおいては当該菌種を検出するプローブと総量指標プローブに強いシグナルが検出された。

【0090】

【表 5 - 1】

ゲノム溶液		Porphyromonas gingivalis	Porphyromonas gingivalis	Tannerella forsythensis	Tannerella forsythensis	Treponema denticola	Treponema denticola	Campylobacter rectus; Strain FDC 371	Campylobacter rectus; Strain FDC 371
ATCC®		33277D	33277D	43037D-5	43037D-5	35405D-5	35405D-5	33238D-5	33238D-5
ゲノム濃度(pg)		10	1	10	1	10	1	10	1
		Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]
プローブ名	Porphyromonas gingivalis	96266	23734	0	0	0	0	26	39
	Tannerella forsythensis	287	65	83775	10806	71	0	67	36
	Treponema denticola	3106	313	2449	485	128616	21716	936	3238
	Campylobacter gracilis	0	1	0	0	0	0	0	18
	Campylobacter rectus	0	0	0	0	0	0	259619	178618
	Fusobacterium属	0	0	0	0	5	0	21	0
	Prevotella nigrescens Shah and Gharbia	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prevotella intermedia	0	0	0	0	0	0	45	35
	Prevotella nigrescens Shah and Gharbia	0	0	0	0	0	0	59	14
	Haemophilus actinomycetemcomitans	0	0	0	0	0	0	0	0
	Haemophilus actinomycetemcomitans	0	0	0	0	0	0	0	141
	Campylobacter concisus	0	0	0	0	0	0	33	7
	Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga sputigena	0	0	0	0	0	0	16	0
	Capnocytophaga ochracea Leadbetter et al.	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eikenella corrodens (Eiken) Jackson and Goodman	0	0	0	0	0	0	14	5
	Streptococcus gordonii, Streptococcus mitis	0	0	0	0	0	0	22	0
	Streptococcus intermedius	0	0	0	0	0	0	0	0
	Actinomyces odontolyticus Batty	0	0	0	0	0	0	0	0
	Veillonella parvula	0	0	0	0	0	0	16	0
	Actinomyces naesslundii Thompson and Lovstedt	0	0	0	0	0	0	13	0
Selenomonas noxia	0	0	0	0	0	0	0	0	
Streptococcus mutans	377	314	356	338	348	309	380	371	
総菌量		37600	12768	17675	3726	25882	6310	106219	86251
Ext.Std.1		126	45	109	84	78	17	188	204
Ext.Std.3		118	74	79	90	198	37	50	123
Ext.Std.5		138	148	245	481	347	320	277	63
Ext.Std.7		793	1254	715	1016	5446	1383	702	1001
Ext.Std.9		4046	4704	2475	3483	3739	5050	2289	4841
Ext.Std.11		14300	18001	7735	15539	11282	19250	8679	15285
Ext.Std.15		48766	53168	34709	46573	43382	53816	40152	48988

【 0 0 9 1 】

【表 5 - 2】

Campylobacter rectus; Strain FDC 371	Campylobacter rectus; Strain FDC 371	Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum deposited as Fusobacterium polymorphum	Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum deposited as Fusobacterium polymorphum	Fusobacterium nucleatum subsp. Animalis	Fusobacterium nucleatum subsp. Animalis	Fusobacterium nucleatum subsp. Vincenti	Fusobacterium nucleatum subsp. Vincenti	Fusobacterium periodonticum	Fusobacterium periodonticum	Prevotella intermedia	Prevotella intermedia	Prevotella nigrescens Shah and Gharbia
33238D-5	33238D-5	10953	10953	51191	51191	49256	49256	33693	33693	25611D-5	25611D-5	33563
0.1	0.01	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10
Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]	Median [nW/m ²]
0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0
1	0	4	0	64	0	0	0	0	0	6	0	0
842	1433	952	212	1544	315	2006	312	1019	3439	1279	4080	1615
0	0	0	0	0	11	0	11	0	0	0	0	0
36308	10526	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
10	0	119629	30238	130167	18696	119973	18215	391862	184989	10	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20283	10567	0
8	0	9	0	0	0	13	0	40	9	14	0	43528
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1163	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
11	0	0	0	0	0	3	0	0	0	6	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
4	0	0	0	0	0	4	2	0	0	14	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	11	0	0
6	0	10	0	0	0	6	2	0	0	12	14	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
382	350	341	383	396	283	336	277	405	304	320	341	349
22742	7386	131295	38805	128834	29629	111639	28715	135529	59569	54849	36867	20228
63	99	65	96	30	23	103	33	255	0	64	388	115
131	154	93	32	0	24	4	36	0	1	73	54	4
410	373	318	44	235	138	95	148	636	290	208	496	498
1975	1923	550	895	901	412	478	423	559	809	919	2667	1365
3345	5059	3209	3225	2981	2342	2653	2309	3252	3989	2776	4960	2998
15442	17493	10195	10205	11901	8412	10606	8222	13196	14223	11749	15234	10161
55308	51326	49729	41805	49401	36696	42306	36215	47429	52023	47116	52934	39461

【 0 0 9 2 】

【表 5 - 3】

Prevotella nigrescens Shah and Gharbia	Haemophilus actinomyces temcomitan s	Haemophilus actinomyces temcomitan s	Haemophilus actinomyces temcomitan s	Haemophilus actinomyces temcomitan s	Campylobacter concisus	Campylobacter concisus	Campylobacter gracilis	Campylobacter gracilis	Capnocytophaga gingivalis	Capnocytophaga gingivalis	Capnocytophaga gingivalis	Capnocytophaga gingivalis
33563	700685D-5	700685D-5	700685D-5	700685D-5	BAA-1457D-5	BAA-1457D-5	33236D-5	33236D-5	33624D-5	33624D-5	33624D-5	33624D-5
1	10	1	0.1	0.01	10	1	10	1	10	1	0.1	0.01
Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1260	291	1325	784	1325	612	2076	916	2373	14	171	790	1964
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
395	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	33	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6800	0	0	0	0	0	0	0	0	157	129	67	0
0	0	0	0	0	33	0	0	0	50	49	0	0
0	120599	103161	45974	4815	0	162	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	7022	4063	0	0	0	19	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	296293	231959	140610	24974
0	0	0	0	0	0	0	0	0	218	205	105	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0
24	0	0	0	0	7	0	0	0	64	68	6	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	34	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0
0	0	0	0	0	4	0	0	0	39	44	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
311	362	340	345	314	335	324	335	294	346	371	347	333
7080	74399	56861	25274	4641	95912	67513	127603	83627	95493	74759	43777	9987
27	170	0	125	0	208	274	126	124	143	234	154	165
109	28	0	32	0	8	58	2	64	5	18	71	107
26	138	0	411	390	6	29	13	603	65	180	100	163
702	481	1208	974	1018	452	723	656	990	137	916	1597	1164
5354	1619	2165	4860	3798	2092	3333	1803	4093	976	2713	4617	4644
14547	7349	13061	16807	18101	8579	13680	8896	14127	5466	12926	13877	23074
53380	34666	48495	55907	54868	38479	51446	43336	49793	28059	44293	51310	51241

【 0 0 9 3 】

【表 5 - 4】

Capnocytophaga ochracea Leadbetter et al.	Capnocytophaga ochracea Leadbetter et al.	Capnocytophaga sputigena	Capnocytophaga sputigena	Eikenella corrodens (Eiken) Jackson and Goodman	Eikenella corrodens (Eiken) Jackson and Goodman	Streptococcus gordonii	Streptococcus gordonii	Streptococcus gordonii	Streptococcus gordonii	Streptococcus intermedius	Streptococcus mitis Andrewes and Horder emend. Judicial Commission	Streptococcus mitis Andrewes and Horder emend. Judicial Commission
33596	33596	33612	33612	23834	23834	35105D-5	35105D-5	35105D-5	35105D-5	27335	49456D-5	49456D-5
10	1	10	1	10	1	10	1	0.1	0.01	1	10	1
Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2556	461	3438	132	1483	324	589	2028	0	847	3517	581	1964
0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	12	0	0	8	0	0	0
0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	23	6	0	2	0	0	0
0	0	0	0	0	0	764	445	136	8	0	326	153
0	0	0	0	0	0	0	135	0	0	0	0	322
0	0	0	0	0	0	24	6	0	0	0	0	0
0	0	23575	4527	0	0	61	34	0	4	0	0	0
1286	1213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	2069	1566	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	255987	184642	68339	4230	0	22166	10640
0	0	0	0	0	0	203	106	13	0	0	117	43
0	0	0	0	0	0	342	180	49	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	52	20	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	54	27	0	0	0	5	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24413	0	0
358	332	324	336	367	250	352	344	369	316	322	342	311
60130	14813	67942	20427	45349	14166	81654	56042	24939	3467	19880	87733	54940
103	73	98	80	65	0	101	16	189	57	61	174	98
47	48	1	65	1	0	30	46	13	42	65	68	63
294	583	43	148	373	114	162	149	1143	221	356	192	391
906	870	1062	2677	666	1176	741	898	2246	924	1430	729	1204
3890	3030	3872	3704	2796	2720	2461	3452	4876	3694	4897	2469	3014
13830	14313	13942	15994	11183	11366	8637	14675	17473	14860	14947	9756	12274
50763	51746	51675	46761	49049	47333	42754	47008	52839	48260	55380	44099	47207

【 0 0 9 4 】

【表 5 - 5】

Actinomyces naeslundii Thompson and Lovstedt	Actinomyces naeslundii Thompson and Lovstedt	Selenomonas noxia	Streptococcus mutans	Streptococcus mutans	Streptococcus mutans	Streptococcus mutans
12104D-5	12104D-5	43541	25175D-5	25175D-5	25175D-5	25175D-5
10	1	10	10	1	0.1	0.01
Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]	Median [nW/m2]
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
1795	1804	2494	363	385	810	605
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	10	4	0	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	12	7	0	0
0	0	12	13517	10757	4237	368
0	0	0	0	0	0	0
0	0	9	17	10	0	0
0	0	0	14	7	0	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	17	11	0	0
0	0	4	25	19	0	0
0	0	1	9	6	0	0
0	0	0	10	3	0	0
0	0	0	51	41	0	0
692	236	1	9	10	0	0
0	0	62754	0	0	0	0
328	337	367	222667	185000	73300	6857
110312	64221	36621	95717	73257	32683	5650
101	58	153	149	45	413	116
181	37	215	118	104	184	89
378	483	527	202	327	177	990
1885	1294	1161	619	1543	1510	2060
3249	4474	5067	1794	3577	4443	4906
14779	15821	14621	8707	14323	17783	18443
50679	56321	52987	38984	51223	53917	49743

【 0 0 9 5】

次に、各菌種におけるプローブのシグナル強度から、各プローブにおけるハイブリダイゼーション効率係数を算出した。複数の細菌に対してハイブリダイゼーションを形成するプローブについてはその平均値をハイブリダイゼーション効率係数とし、結果を表 6 に示した。なお、値の記載のない部分は、単離された菌または核酸が無いため、ハイブリダイゼーション効率係数が算出できなかったものである。

【 0 0 9 6】

10

20

30

【表 6】

		ハイブリダイゼーション係数 [SLOPE (pg/SI)]	RSQ
プローブ名	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1.E-04	0.98
	<i>Tannerella forsythensis</i>	1.E-04	1.00
	<i>Treponema denticola</i>	8.E-05	1.00
	<i>Campylobacter rectus</i>	6.E-06	0.99
	<i>Fusobacterium</i> 属	6.E-05	0.94
	<i>Prevotella intermedia</i>	5.E-04	0.81
	<i>Prevotella nigrescens</i> Shah and Gharbia	2.E-04	1.00
	<i>Haemophilus actinomycetemcomitans</i>	9.E-06	0.88
	<i>Campylobacter concisus</i>	1.E-03	0.75
	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> , <i>Capnocytophaga sputigena</i>	4.E-06	0.76
	<i>Capnocytophaga ochracea</i> Leadbetter et al.	5.E-03	0.38
	<i>Eikenella corrodens</i> (Eiken) Jackson and Goodman	4.E-03	0.56
	<i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Streptococcus mitis</i>	5.E-06	0.92
	<i>Actinomyces naeslundii</i> Thompson and Lovstedt	2.E-02	0.94
	<i>Streptococcus mutans</i>	5.E-06	0.91
	総菌量	1.E-04	0.82

10

20

【実施例 2】

【0097】

< 外部添加コントロールの作製 >

フォワードプライマーとリバースプライマーで増幅可能で、かつ配列番号 61 ~ 75 のプローブを用いてそれぞれ独立にハイブリダイゼーションが可能である、配列番号 76 ~ 90 に記載の 2 本鎖 DNA を合成した。合成した配列を表 7 に示す。

【0098】

【表 7】

配列番号	名称	[copy/μL]	配列(5'→3')
76	外部Ctrl1	10	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
77	外部Ctrl2	20	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
78	外部Ctrl3	40	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
79	外部Ctrl4	80	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
80	外部Ctrl5	160	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
81	外部Ctrl6	320	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
82	外部Ctrl7	640	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
83	外部Ctrl8	1280	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
84	外部Ctrl9	2560	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
85	外部Ctrl10	5120	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
86	外部Ctrl11	10240	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
87	外部Ctrl12	20480	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
88	外部Ctrl13	40960	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
89	外部Ctrl14	81920	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG
90	外部Ctrl15	163840	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGCTAACGGTACACCCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTA CCGACATGTAGGCATACCTACGGAAGGCAATTCCCTGAAAGCCTCGCTTTATCCGGAACCTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGGCT ACATTTACCTGTATGCGGTGATGCGGATTAAGGTCGATTAAGGTCGAAACCTACACGACAATGCACGTGCGAAGCGGTTGCTATGCACATTGGC TAAGGCCACGGAACACGAATCAGCTGAGATCACTTACTATTGACGGAACCTACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCAACAGC ATAAGGAACCTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAGATAGAGCGGCTTTAGAG

【0099】

<PCRからデータ取得まで>

菌株やゲノムDNA溶液の代わりに社内で公募した検査対象者1名の唾液500μLから、Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社)を用いて、DNAを抽出した。その濃度は、14.8ng/μLであり、3000倍希釈した溶液1μLを実サンプルとし、10万倍希釈した外部添加コントロールを1μL添加した。その他は反応溶液中の水の量を1サンプルあたり1μL減らす以外、実施例1の手順と同じ方法によりPCRを行い、続いてDNAマイクロアレイによるハイブリダイゼーションを行って、各プローブにおける蛍光シグナルデータを取得した。検出限界以上のシグナルが検出されたプローブについて結果を表8にまとめた。

【 0 1 0 0 】

【表 8】

		SI Median [nW/m2]	3000倍希釈溶液 copy number	希釈前 copy number [copy]
プローブ名	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	0	0
	<i>Tannerella forsythensis</i>	11	1	1794
	<i>Treponema denticola</i>	121	4	13101
	<i>Campylobacter rectus</i>	0	0	0
	<i>Fusobacterium</i> 属	2709	65	195095
	<i>Prevotella intermedia</i>	0	0	0
	<i>Prevotella nigrescens</i> Shah and Gharbia	54	6	17112
	<i>Haemophilus actinomycetemcomitans</i>	0	0	0
	<i>Campylobacter concisus</i>	0	0	0
	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> , <i>Capnocytophaga sputigena</i>	0	0	1
	<i>Capnocytophaga ochracea</i> Leadbetter et al.	0	0	0
	<i>Eikenella corrodens</i> (Eiken) Jackson and Goodman	0	0	0
	<i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Streptococcus mitis</i>	258	1	1835
	<i>Actinomyces naeslundii</i> Thompson and Lovstedt	43	285	854334
	<i>Streptococcus mutans</i>	409	1	2902
	総菌量	25292	1368	4105165

10

20

【 0 1 0 1 】

表 8 の結果は、実施例 1 にて算出したハイブリダイゼーション効率係数を利用し、各プローブにおけるコピー数を算出したものである。

表 8 においては、「コピー数」の欄に記載の数字が、実際の細菌の個数を意味している。

【 0 1 0 2 】

絶対量指標プローブの定量範囲内（検出限界以下であったプローブとシグナル強度が頭打ちになったプローブのデータを除外したデータ）にて作成された検量線の傾きの値を算出した。結果を表 9 に示す。

【 0 1 0 3 】

30

【表 9】

プローブ (配列番号)	検出対象外部 コントロール	添加コピー数 [copy/ μ l]	SI Median [nW/m2]
58	外部Ctrl1	10	154
60	外部Ctrl3	40	308
64	外部Ctrl7	640	956
66	外部Ctrl9	2560	3122
68	外部Ctrl11	10240	13759
72	外部Ctrl15	163840	53059

40

【 0 1 0 4 】

以上より、検査対象人の唾液サンプル中に含まれる検出対象細菌を絶対定量することが可能となった。

【産業上の利用可能性】

【 0 1 0 5 】

本発明によれば、環境中に含まれる複数の細菌の個々を一括に定量可能とし、かつ全体の量の増減を評価できる。従って、本発明のデバイスは、例えば腸内、皮膚、口内等の健康状態の評価、土壌、海水、河川の環境評価、活性汚泥の性能評価等に利用可能である。

【配列表フリーテキスト】

【 0 1 0 6 】

50

配列番号 1 ~ 9 2 : 合成核酸

【配列表】

0006299660000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 野澤 あい

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社内

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 特開2003-284559(JP,A)

特表2004-504069(JP,A)

特開平06-261757(JP,A)

特開2009-072168(JP,A)

Journal of Applied Microbiology, 2006年, Vol.100, p.985-998

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00

C12N 15/09

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/REGISTRY(STN)