

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5470400号
(P5470400)

(45) 発行日 平成26年4月16日(2014.4.16)

(24) 登録日 平成26年2月7日(2014.2.7)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 13 (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2011-535919 (P2011-535919) (86) (22) 出願日 平成21年11月12日 (2009.11.12) (65) 公表番号 特表2012-508567 (P2012-508567A) (43) 公表日 平成24年4月12日 (2012.4.12) (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/008071 (87) 国際公開番号 W02010/054819 (87) 国際公開日 平成22年5月20日 (2010.5.20) 審査請求日 平成24年3月8日 (2012.3.8) (31) 優先権主張番号 61/114,858 (32) 優先日 平成20年11月14日 (2008.11.14) (33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(73) 特許権者 591013229 バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド BAXTER INTERNATIONAL INCORPORATED アメリカ合衆国 60015 イリノイ州、ディアフィールド、ワン・バクスター・パークウェイ (番地なし)</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的試料中の低量RNA種の特異的検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的試料中の低量の標的RNA種の検出のための方法であって、ここに、該標的RNAが試料1mlにつき10000コピー未満の量で存在し、該方法が、

(a) 逆転写酵素(RT)を用いてRNAをcDNAに逆転写する工程、ここに、工程(a)はホットスタート条件下で実施される、

(b) 該RTを不活性化する工程、および

(c) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって標的cDNAを検出する工程

を含み、ここに、該生物学的試料が細胞小器官、タンパク質、ペプチド、膜、脂質、核酸および/または非標的RNA種、ならびにその組み合わせおよびフラグメントのような細胞成分のバックグラウンド、および該標的RNAが 10^4 の全RNA分子中において1分子未満で存在する全RNAの大きいバックグラウンドを有し、ここに、該RTが組み換えサーマス・サーモフィルス(Thermus thermophilus) DNAポリメラーゼ(rTth-pol)であるところの、方法。

【請求項2】

さらに、工程(a)の後、工程(a)のRTを用いて標的cDNAを増幅する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

熱処理、フェノールでの処理、プロテイナーゼKでの処理、およびカオトロピック剤での処理からなる群から選択される方法によって、工程(b)でRTが不活性化される、請

求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

カオトロピック剤での処理によって R T が不活性化され、さらに工程 (b) の後、反応混合物から該カオトロピック剤を除去する工程を含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

カオトロピック剤が尿素、過塩素酸リチウムおよびグアニジニウム塩からなる群から選択される、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

工程 (c) のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) がリアルタイム P C R である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 7】

標的 R N A がマイコプラズマに由来する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

マイコプラズマがアコレプラズマ・ライドラウィ (*Acholeplasma laidlawii*)、マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*)、マイコプラズマ・ヒオリニス (*Mycoplasma hyorhinis*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、マイコプラズマ・シノヴィエ (*Mycoplasma synoviae*) およびマイコプラズマ・オラーレ (*Mycoplasma orale*) からなる群から選択される、

20

請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

標的 R N A が 1 6 S リボソーム R N A である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

生物学的試料中のマイコプラズマ汚染の検出のための方法であって、

- (a) 生物学的試料から全 R N A を抽出する工程、
- (b) 逆転写酵素 (R T) を用いて R N A を c D N A に逆転写する工程、
- (c) 工程 (b) の R T を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって、マイコプラズマ 1 6 S リボソーム R N A (1 6 S r R N A) 由来の c D N A を増幅する工程、
- (d) カオトロピック剤の添加によって、R T を不活性化する工程、
- (e) 反応混合物からカオトロピック剤を除去する工程、および
- (f) ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって、マイコプラズマ 1 6 S r R N A 由来の c D N A を検出する工程

30

を含む方法であって、ここに、R T が組み換えサーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) D N A ポリメラーゼ (r T t h - p o l) である、方法

【請求項 11】

工程 (b) がホットスタート条件下で実施される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

カオトロピック剤が尿素、過塩素酸リチウムおよびグアニジニウム塩からなる群から選択される、請求項 10 記載の方法。

40

【請求項 13】

工程 (f) のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) がリアルタイム P C R である、請求項 10 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、生物学的試料中の低量 R N A 種の検出のための方法およびキット、ならびに生物学的試料中のマイコプラズマ汚染の検出のための方法およびキットに関する。

50

【背景技術】

【0002】

発明の背景

数あるなかでも、最も広く行きわたり、成功したRNA分子検出および分析方法は、いわゆるRT/PCR（逆転写/ポリメラーゼ連鎖反応）である。該方法において、RNA分子は、逆転写酵素（RT）によってcDNA分子に転写され、次いで、PCRに基づく方法によって検出および/または分析される。

【0003】

当該分野における初期の研究者らは、トリの骨髄芽球症ウイルスRTまたはモロニー（Moloney）ネズミ白血病ウイルスRTを逆転写に用いた。しかしながら、cDNA合成の鑄型としてRNAを用いることにおける重要な問題は、これらの中等温度好性のウイルス性RTが安定なRNA二次構造によってcDNAを合成することができないことであった。該問題を迂回するために、逆転写は、二次的RNA構造を解くことができ、さらに、プライマー伸長の特異性を増加させることのできる高い反応温度で実施することができる。これは、70の最適温度で活性があるサーマス・サーモフィルス（*Thermus thermophilus*）DNAポリメラーゼ（*Tth pol*）のような、逆転写のための熱安定性酵素の使用を必要とする。

【0004】

しかしながら、熱安定性逆転写酵素の使用は、新たな問題も引き起こす。特に、生物学的試料中の低量のRNA種を検出および/または分析しようとする場合、熱安定性逆転写酵素は、次のRT/PCR工程の間に、非特異的反応産物の生成を触媒することができる。これは、特に、全RNAの大きいバックグラウンドを有する試料中の場合であり、例えば生物医薬品の品質管理において、必要なレベルより遙かに高いレベルへの、標的RNAの検出限界の実質的な増加をもたらす。該問題を回避するために、全ての取扱および逆転写後のRT/PCR工程を高温にて、ホットスタート条件下で実施しなければならない。しかしながら、このことは、しばしば、特に工業規模で作業する場合、非現実的であり、かつ、不利益である。

【0005】

しばしば全RNAの大きいバックグラウンドにおいて、低量のRNA種の高感度検出が特に適当である応用は、生物学的試料中のマイコプラズマ汚染の検出である。

【0006】

マイコプラズマは、自己複製することができる最も小さい既知ゲノムのうちの一つを有する細菌である。ほとんどのマイコプラズマは、天然には無害の共生生物であるが、そのいくつかは天然宿主に感染することができ、様々な重篤度の疾患の原因となる。マイコプラズマ、特にマイコプラズマ（*Mycoplasma*）およびアコレプラズマ（*Acholeplasma*）属の種は、また、初代および連続細胞系統の汚染の原因となることが多く、細胞由来の生物学的および医薬的生産物の開発および生産に關与する研究および工業的研究室にとって深刻な問題の典型を示す。かくして、細胞系統繁殖および取扱の工程において通常使用される全ての予防的手段にも拘わらず、マイコプラズマ汚染は引き続き、頻繁に起こる問題である。

【0007】

細胞系統および細胞由来の生物学的生産物のマイコプラズマ試験のために推奨される分析プロトコールは、プロス/寒天培養の使用および指標細胞系統試験を包含する。プロス/寒天培養方法は、培養可能なマイコプラズマ物質の検出を目的とするが、指標細胞系統は、培養条件が面倒で培養できないマイコプラズマ種を検出するために使用される。これら2つの方法の組合せは、有効なマイコプラズマ検出を可能にするが、試験手法全体は高価であり、冗長で、かつ時間がかかる（最短で28日）。さらに、該アプローチに反応しない多くの培養できないマイコプラズマ種が存在する。

【0008】

核酸、特にマイコプラズマ由来のマリボソームRNAの核酸の増幅に基づく新規なマイコ

10

20

30

40

50

プラズマ試験法が近年開発されている。これらの方法は、コスト、分析感度、簡便性および時間に関し、ある種の利益を有する。しかしながら、現在利用可能な方法の検出限界は、特に全RNAまたは他の巨大分子の大きいバックグラウンドを有する試料で作業する場合、まだ生物医薬品の品質管理に必要なレベルよりも上回る。

【0009】

したがって、当該分野において、生物学的試料中の低量のRNA種の検出限界の改善を可能にするように現行のRT/PCR法を改善する必要性が存在する。

【0010】

上記の問題の解決は、本願の特許請求の範囲において特徴付けられた具体例によって達成される。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

発明の概要

本発明の目的は、生物学的試料中の低量のRNA種の検出のための改善された方法を提供することにある。特に、本発明は、該方法および生物学的試料中の低量のRNA種の検出のためのキットに関する。さらに、本発明の別の目的は、試料中のマイコプラズマ汚染の検出のための改善された方法およびキットを提供することにある。

【発明を実施するための形態】

【0012】

発明の詳細な記載

一の態様において、本発明は、生物学的試料中の低量の標的RNA種の検出のための方法であって、

(a) 逆転写酵素(RT)を用いてRNAをcDNAに逆転写する工程、

(b) 該RTを不活性化する工程、および

(c) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって標的cDNAを検出する工程

を含む方法に関する。

20

【0013】

本明細書中で使用される場合、「生物学的試料」なる語は、生物学的に関連する巨大分子を含有する、または含有する疑いのあるいずれかの試料、例えば、生物医薬品、例えば、ワクチンまたは組み換えタンパク質の製造過程の種々の段階に由来する試料、細胞培養上清、細胞ライゼート、細胞抽出物、食物または環境試料、ヒトまたは動物の体に由来する試料、例えば、全血、血清、血漿、尿、分泌液または塗沫、生物学的起源のいずれか他の試料およびRNAを含有するか、または含有する疑いのあるいずれか他の組成物に関する。

30

【0014】

本発明の好ましい具体例において、生物学的試料は、細胞成分の大きいバックグラウンドを有する。

【0015】

本明細書中で使用される場合、「細胞成分」なる語は、細胞小器官、タンパク質、ペプチド、膜、脂質、核酸、特に非標的RNA種、およびその組合せまたはフラグメントに関する。

40

【0016】

本発明の別の好ましい具体例において、生物学的試料は、全RNAの大きいバックグラウンドを有する。

【0017】

本明細書中で使用される場合、「全RNAの大きいバックグラウンド」なる語は、標的RNAが 10^4 全RNA分子中において1分子未満、好ましくは 10^6 全RNA分子中において1分子未満、より好ましくは 10^8 全RNA分子中において1分子未満、最も好ましくは 10^{10} 全RNA分子中において1分子未満で存在する状況に関する。

50

【 0 0 1 8 】

本発明の好ましい具体例において、標的RNAは、試料1mlにつき10000コピー未満、好ましくは試料1mlにつき1000コピー未満、より好ましくは試料1mlにつき100コピー未満、最も好ましくは試料1mlにつき10コピー未満の量で存在する。

【 0 0 1 9 】

本発明の好ましい具体例によると、本発明の方法にしたがうRTを用いるRNAのcDNAへの逆転写は、ホットスタート条件下で実施される。

【 0 0 2 0 】

本明細書中で使用される場合、「ホットスタート条件」なる語は、プライマー伸長に關与する酵素の添加前に、反応混合物がプライマー/核酸複合体の融点に、または該融点よりも高温に加熱されるいずれかの条件、またはプライマー伸長に關与する酵素が周囲温度で不活性であり、プライマー/核酸複合体の融点にて、または該融点よりも高温にて実施される高温活性化工程によって活性化されるいずれかの条件に関する。

10

【 0 0 2 1 】

本発明の好ましい具体例において、本発明の方法は、さらに、RTを用いるRNAのcDNAへの逆転写後に、同じRTを用いて標的cDNAを増幅する工程を含む。該さらなる工程は、「プライムPCR」と呼ばれ、好ましくは、ホットスタート条件下で5~15サイクル、より好ましくはホットスタート条件下で5~11サイクル、最も好ましくはホットスタート条件下で5~10サイクル実施される。

【 0 0 2 2 】

したがって、別の態様において、本発明は、生物学的試料中の低量の標的RNA種の検出のための方法であって、

- (a) 逆転写酵素(RT)を用いてRNAをcDNAに逆転写する工程、
 - (b) 工程(a)のRTを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、cDNAを増幅する工程
 - (c) 該RTを不活性化する工程、および
 - (d) PCRによって標的cDNAを検出する工程
- を含む方法に関する。

20

【 0 0 2 3 】

RT(すなわち、RNA依存性DNAポリメラーゼ)およびDNAポリメラーゼ(すなわち、DNA依存性DNAポリメラーゼ)の両方の活性を有する酵素は、当該分野でよく知られており、例えば、サーマス・サーモフィルス(Thermus thermophilus)DNAポリメラーゼ(Tth pol)を包含する。ある特定の酵素がある特定の活性を示す条件もまた、当該分野でよく知られている。Tth polの場合、逆転写活性は、Mn²⁺イオンによって促進され、DNAポリメラーゼ活性は、Mg²⁺イオンによって促進される。

30

【 0 0 2 4 】

本発明の好ましい具体例において、本発明の方法において使用されるRTは、サーマス・サーモフィルスDNAポリメラーゼ(Tth pol)である。さらに好ましい具体例において、Tth polは、組み換え生産される(rTth pol)。

40

【 0 0 2 5 】

本発明の別の好ましい具体例において、RTは、本発明の方法において、好ましくは、熱処理、フェノールでの処理、プロテイナーゼKでの処理、およびカオトロピック剤での処理からなる群から選択される方法によって、不活性化される。

【 0 0 2 6 】

本発明にしたがう熱処理は、RTを含有する反応混合物を80~100℃、好ましくは90~100℃、より好ましくは95℃に加熱することを含む。熱処理の期間は、15~90分、好ましくは30~75分、より好ましくは60分である。特に好ましい具体例において、熱処理は、RTを含有する反応混合物を95℃に60分間加熱することを含む。

【 0 0 2 7 】

50

本発明にしたがうプロテイナーゼKでの処理は、1～10単位のプロテイナーゼK、より好ましくは2～5単位のプロテイナーゼK、最も好ましくは5単位のプロテイナーゼKを反応混合物に添加することを含む。プロテイナーゼK処理の期間は、30～90分、好ましくは45～75分、最も好ましくは60分である。特に好ましい具体例において、プロテイナーゼKでの処理は、5単位のプロテイナーゼKの60分間の添加を含む。

【0028】

本発明の好ましい具体例において、RTは、本発明の方法において、カオトロピック剤での処理によって不活性化される。本発明にしたがうカオトロピック剤での処理は、RTを含有する反応混合物に、RTを不活性化するのに十分な量および時間でカオトロピック剤を添加することを含む。特定のカオトロピック剤の量および時間は、当該分野でよく知られている。本発明のより好ましい具体例において、カオトロピック剤は、尿素、過塩素酸リチウムおよびグアニジニウム塩からなる群から選択される。最も好ましい具体例において、カオトロピック剤は、グアニジニウム塩である。

10

【0029】

本発明のさらに好ましい具体例において、本発明の方法は、さらに、カオトロピック剤を用いるRTの不活性化後に、該カオトロピック剤を反応混合物から除去する工程を含む。反応混合物からカオトロピック剤を除去するための方法は、当該分野でよく知られており、例えば、DNA結合スピンカラムを用いる反応混合物中に含有される核酸の精製を包含する。

【0030】

PCRによる標的cDNAの検出は、「ブーストPCR」とも呼ばれる。本発明の好ましい具体例において、本発明の方法におけるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、リアルタイムPCRである。

20

【0031】

本明細書中で使用される場合、「リアルタイムPCR」なる語は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づき、標的のDNA分子を増幅させ、同時に定量化することが可能ないずれかの方法に関する。

【0032】

本発明の好ましい具体例において、標的RNAは、マイコプラズマから由来する。本明細書中で使用される場合、「マイコプラズマ」なる語は、マイコプラズマ(Mycoplasma)、ウレアプラズマ(Ureaplasma)、メソプラズマ(Mesoplasma)、エントモプラズマ(Entomoplasma)、スピロプラズマ(Spiroplasma)、アコレプラズマ(Acholeplasma)、アステロプラズマ(Asteroleplasma)、およびサーモプラズマ(Thermoplasma)属を包含するモリクテス(Mollicutes)クラスのいずれかのメンバーに関する。本発明のより好ましい具体例において、マイコプラズマは、アコレプラズマ・ライドラウィ(Acholeplasma laidlawii)、マイコプラズマ・ガリセプテイクム(Mycoplasma gallisepticum)、マイコプラズマ・ヒオリニス(Mycoplasma hyorhynis)、マイコプラズマ・ホミニス(Mycoplasma hominis)、マイコプラズマ・フェルメンタンス(Mycoplasma fermentans)、マイコプラズマ・シノヴィエ(Mycoplasma synoviae)およびマイコプラズマ・オラーレ(Mycoplasma orale)からなる群から選択される。

30

40

【0033】

本発明のさらに好ましい具体例において、標的RNAは、16SリボソームRNA(16S rRNA)である。

【0034】

別の態様において、本発明は、生物学的試料中のマイコプラズマ汚染の検出のための方法であって、

(a) 該試料から全RNAを抽出する工程、

50

(b) 逆転写酵素 (RT) を用いて RNA を cDNA に逆転写する工程、
 (c) 工程 (b) の RT を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、マイコプラズマ 16S リボソーム RNA (16S rRNA) 由来の cDNA を増幅する工程、
 (d) カオトロピック剤の添加によって、RT を不活性化する工程、
 (e) 反応混合物からカオトロピック剤を除去する工程、および
 (f) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、マイコプラズマ 16S rRNA 由来の cDNA を検出する工程
 を含む方法に関する。

【0035】

試料から全 RNA を抽出するための手段は、当該分野でよく知られており、フェノール / クロロホルムでの抽出およびイソプロパノールでの沈澱を包含する。 10

【0036】

本発明の好ましい具体例において、検出されるべきマイコプラズマ汚染は、試料中における約 10 cfu/ml 以下のマイコプラズマの汚染である。

【0037】

マイコプラズマ 16S rRNA の逆転写のためのプライマー、ならびに PCR によるマイコプラズマ 16S rRNA 由来の cDNA の増幅のためのプライマーは、当該分野でよく知られている。

【0038】

本発明の好ましい具体例において、試料中におけるマイコプラズマ汚染の検出のための方法の RT を用いる RNA の cDNA への逆転写は、ホットスタート条件下で実施される。 20

【0039】

本発明の別の好ましい具体例において、試料中のマイコプラズマ汚染の検出のための方法において使用される RT は、サーマス・サーモフィルス DNA ポリメラーゼ (Tth pol) である。さらに好ましい具体例において、Tth pol は、組み換え生産される (rTth-pol)。

【0040】

本発明のさらに好ましい具体例において、試料中のマイコプラズマ汚染の検出のための方法において使用されるカオトロピック剤は、尿素、過塩素酸リチウムおよびグアニジニウム塩からなる群から選択される。最も好ましい具体例において、カオトロピック剤は、グアニジニウム塩である。 30

【0041】

本発明の一のさらに好ましい具体例において、試料中のマイコプラズマ汚染の検出のための方法における PCR は、リアルタイム PCR である。

【0042】

別の態様において、本発明は、生物学的試料中の低量の標的 RNA 種の検出のためのキットであって、少なくとも、RT および該 RT の不活性化のための手段を含むキットに関する。RT の不活性化のための手段は、プロテイナーゼ K またはカオトロピック剤であってもよい。該キットは、さらに、例えば、逆転写のためのプライマー、特定の cDNA の検出のためのプライマー、キャリアー RNA、カリブレター RNA、カリブレター DNA、適当な酵素、バッファー、試薬、反応容器および消耗品を含んでもよい。 40

【0043】

さらなる態様において、本発明は、生物学的試料中のマイコプラズマ汚染の検出のためのキットであって、少なくとも、組み換えサーマス・サーモフィルス DNA ポリメラーゼ (rTth-pol)、マイコプラズマ 16S rRNA の逆転写のための適当なプライマー、マイコプラズマ 16S rRNA 由来の cDNA の増幅のための適当なプライマー、rTth-pol の不活性化のためのカオトロピック剤、反応混合物から該カオトロピック剤を除去するための手段、および PCR による、例えばリアルタイム PCR によるマイコプラズマ 16S rRNA 由来の cDNA の検出のためのプライマーを含むキットに関 50

する。カオトロピック剤を除去するための手段は、DNA結合スピカラムであってもよい。該キットは、さらに、例えば、試料から全RNAを抽出するための手段、キャリアRNA、カリブレターRNA、カリブレターDNA、適当な酵素、バッファー、試薬、反応容器および/または消耗品を含んでいてもよい。全RNAを抽出するための手段は、フェノール、クロロホルムおよびイソプロパノール、またはそれらを含むバッファーであってもよい。

本発明は、さらに、下記の実施例において説明されるが、それらに限定されるものではない。

【実施例】

【0044】

10

一般的手法：

該方法は、目的の生物学的試料の遠心分離から開始し、次いで、該試料ペレットから全RNAを抽出する。次いで、 Mn^{2+} の存在下、ホットスタート条件下で、組み換えサーマス・サーモフィルスDNAポリメラーゼ(rTth-pol)を用いて、RNAをcDNAに逆転写する。 Mn^{2+} のキレート化および Mg^{2+} の添加後、rTth-polがホットスタート条件下でPCR増幅を5サイクルまたは10サイクル実施する(プライムPCR)。次いで、該PCR反応物をグアニジン含有バッファーに移して、rTth-polを不活性化する。スピカラムに基づくキットを用いる精製により、該プライムPCRの精製されたPCR産物がもたらされ、次いでそれを、二重リアルタイムPCRにおいてDNA標準(カリブレターDNA)と共に増幅させる(ブーストPCR)。別法では、RNA標準(カリブレターRNA)をRNA抽出の最初に添加して、開始時からその手法を標準化し、調節することができる。

20

【0045】

実験手法：

RNA抽出。全ての工程を2mlの反応チューブ中で行った。2mlの試料を1000rpmにて、4で10分間遠心分離した。ペレットを1ml RNA-BeeTM(登録商標)(Tel-Test Inc., TX)中に再懸濁し、5μlの1mg/ml酵母tRNAを加え、試料を遠心機中、70および1000rpmにて20分間インキュベートした。その後、110μlのクロロホルムを加え、13000rpmで5分間の遠心分離によって相を分離した。得られた上相に500μlのイソプロパノールを添加することによって、RNAを沈澱させ、試料をドライアイス上で5分間維持した。RNAペレットを13000rpmにて15分間の遠心分離によって収集し、500μlの70%EtOHで洗浄し、試料を13000rpmにて10分間遠心分離した。上清を捨て、RNAペレットを250μlの二重蒸留水(bidest. H₂O)(bdH₂O)中に溶解した。

30

【0046】

逆転写。6μlのRTミックス(1μlの10x逆転写バッファー(Applied Biosystems, Austria)、1μlの10mM MnCl₂、0.5μlの10μM逆方向プライマー、0.8μlの2.5mMの各dNTP、2.2μl(5.5U)のrTth-polおよび0.5μlのbdH₂O)を4μlのRNA抽出物に加えた。80で2分間、62で5分間、70で10分間および80で2分間、逆転写を行った。

40

【0047】

プライムPCR。予め85 ± 5に加熱した40μlのPCRミックス(4μlの10xキレートバッファー(Applied Biosystems, Austria)、5μlの25mM MgCl₂、2.5μlの10μM順方向プライマー、2μlの10μM逆方向プライマーおよび26.5μlのbdH₂O)を逆転写から得られた反応混合物に加えた。下記のプロトコールにしたがって、PCRを実施した。80で2分、95で2分、5x(95で10秒、62で30秒、72で30秒)。

【0048】

50

RTの不活性化。プライムPCR後、50 μ lのまだ熱い反応混合物を253 μ lの不活性化バッファー(3 μ lのキャリアRNA(1 μ g/ μ lの酵母tRNA)、250 μ lのバッファーPBI(Qiaquick PCR Purification Kit; Qiagen, Germany))に加え、混合した。該試料を2mlのコレクションチューブ中においてQiaquickミニスピカラム(Qiagen, Germany)にアプライし、13000rpmで1分間遠心分離した。該コレクションチューブを廃棄し、新しいコレクションチューブ中に該スピカラムを置き、750 μ lのバッファーPE(Qiaquick PCR Purification Kit; Qiagen, Germany)を加え、試料を13000rpmで1分間遠心分離した。該コレクションチューブを再び廃棄し、新しいコレクションチューブ中、13000rpmで1分間、該スピカラムを遠心分離した。次いで、該スピカラムを新しい1.5mlの反応チューブ中に置き、50 μ lの10mM Tris(pH8.0)を加え、13000rpmで1分間の遠心分離により、DNAを溶出した。

10

【0049】

ブーストPCR。10 μ lの溶出したDNAをオプティカルチューブ中に置き、対照として5 μ lのカリブレターDNAおよび35 μ lのTMP CRミックス(1x TaqManバッファーA(Applied Biosystems, Austria)、5mMのMgCl₂、200nMの各プライマー、100nMの各プローブ、200 μ Mの各dNTP、9%グリセロール(wt/vol)、0.05%のゼラチン(wt/vol)、0.01%のTween20(wt/vol)、2.5UのAmpli Taq Goldポリメラーゼ(Applied Biosystems, Austria))を加えた。リアルタイムPCRを下記のプロトコールにしたがって実施した。95 $^{\circ}$ Cで10分、40x(95 $^{\circ}$ Cで15秒、62 $^{\circ}$ Cで1分)。

20

【0050】

実施例1：ワクチンの製造過程に由来する試料中のマイコプラズマ・シノヴィエの検出
ワクチンの製造過程に由来する試料を種々の量のマイコプラズマ・シノヴィエでスパイクし、上記の実験手法にしたがって処理した。RT不活性化(試料1~6)の有利な効果を明らかにするために、RTが不活性化されていない(試料7~12)、またはRTが全く加えられていない(試料13~18)対照試料を含めた。RNA抽出、逆転写、プライムPCRおよびRT不活性化の後、リアルタイムPCRによって、cDNAの存在について試料を分析した。該ブーストPCRの前に、所定量のカリブレターDNAを反応混合物に加えた。異なるプライマーセットを用いて、該カリブレターDNAを標的核酸と一緒に増幅した。異なる標識プローブを用いることによって、カリブレターおよび標的DNA由来のシグナルを区別した。プライムおよびブーストPCRのためのプライマーは、マイコプラズマ16S rRNAに特異的であった。表1にまとめた結果は、リアルタイムPCR由来のCt値、すなわち、特異的PCR産物を検出するために必要とされたサイクル数を示す。より低いCt値は、より迅速な検出を意味し、一方、Ct値40は、リアルタイムPCRのラン全体にわたって検出可能な生産物がなかったことを示す。

30

【0051】

【表 1】

表 1 : ワクチンの製造過程に由来する試料中のマイコプラズマ・シノヴィエの検出

試料番号	マイコプラズマ・シノヴィエ [cfu/ml]	RTあり	RT不活性化	Ct (カリブレター)	Ct (標的)
1	100	+	+	29.88	30.82
2	100	+	+	29.67	30.71
3	10	+	+	29.68	33.16
4	10	+	+	29.71	35.42
5	-	+	+	29.85	40.00
6	-	+	+	29.95	40.00
7	100	+	-	39.30	40.00
8	100	+	-	34.41	40.00
9	10	+	-	34.64	40.00
10	10	+	-	35.12	40.00
11	-	+	-	34.42	40.00
12	-	+	-	36.11	40.00
13	100	-	-	29.56	40.00
14	100	-	-	29.43	40.00
15	10	-	-	29.39	40.00
16	10	-	-	29.40	40.00
17	-	-	-	29.31	40.00
18	-	-	-	29.37	40.00

10

20

【 0 0 5 2 】

表 1 の結果は、明らかに、活性な R T の存在 (試料 7 ~ 1 2) は、 1 0 0 c f u / m l のマイコプラズマ・シノヴィエであっても検出不可能にするが、 R T の不活性化は、た

30

【 0 0 5 3 】

実施例 2 : ワクチンの製造過程に由来する試料中のマイコプラズマ・フェルメンタンスの検出

40

実施例 1 における試料と同じ試料を種々の量のマイコプラズマ・フェルメンタンスでスパイクし、上記の実験手法にしたがって処理した。 R T 不活性化 (試料 1 ~ 6) の有利な効果を明らかにするために、 R T が不活性化されていない対照試料 (試料 7 ~ 1 2) を含めた。 R N A 抽出、逆転写、プライム P C R および R T 不活性化の後、リアルタイム P C R によって、 c D N A の存在について試料を分析した。該ブースト P C R の前に、所定量のカリブレター D N A を反応混合物に加えた。プライムおよびブースト P C R のためのプライマーは、また、マイコプラズマ 1 6 S r R N A に特異的であった。表 2 にまとめた結果は、リアルタイム P C R 由来の C t 値を示す。

【 0 0 5 4 】

【表 2】

表 2：ワクチンの製造過程に由来する試料中のマイコプラズマ・フェルメンタンスの検出

試料番号	マイコプラズマ・フェルメンタンス[cfu/ml]	RTあり	RT不活性化	Ct (カリブレター)	Ct (標的)
1	100	+	+	29.31	29.57
2	100	+	+	29.46	30.44
3	10	+	+	29.30	33.46
4	10	+	+	29.47	34.72
5	—	+	+	29.67	40.00
6	—	+	+	29.27	40.00
7	100	+	—	40.00	40.00
8	100	+	—	40.00	40.00
9	10	+	—	40.00	40.00
10	10	+	—	40.00	40.00
11	—	+	—	40.00	40.00
12	—	+	—	40.00	40.00

10

【0055】

表 2 の結果は、活性な RT の存在（試料 7 ~ 12）は、100 cfu/ml のマイコプラズマ・フェルメンタンスであっても検出不可能にするが、RT の不活性化は、たった 10 cfu/ml であっても検出可能にすることを確認する。さらに、RT 不活性化を伴わない試料におけるカリブレター DNA についての Ct 値増加は、不活性化なしに、RT が、ブースト PCR の間にカリブレターおよび標的 DNA の特異的産物の生成に干渉する非特異的反応産物を導く反応を触媒することができることを確認する。

【0056】

実施例 3：組み換えタンパク質の製造過程に由来する試料中のマイコプラズマ・フェルメンタンスの検出

組み換えタンパク質の製造過程に由来する試料を種々の量のマイコプラズマ・フェルメンタンスでスパイクし、上記の実験手法にしたがって処理した。RT 不活性化の有利な効果を表 3、試料 1 ~ 6 に示す。ワクチンの製造過程由来の試料に関しては、該手法は、また、組み換えタンパク質を製造するために使用された細胞懸濁中へスパイクされたわずかに 10 cfu/ml のマイコプラズマ・フェルメンタンスの検出をも可能にする。

20

30

【0057】

【表 3】

表 3：組み換えタンパク質の製造過程に由来する試料中のマイコプラズマ・フェルメンタンスの検出

試料番号	マイコプラズマ・フェルメンタンス[cfu/ml]	RTあり	RT不活性化	Ct (カリブレター)	Ct (標的)
1	100	+	+	28.33	27.34
2	100	+	+	28.56	27.15
3	10	+	+	28.57	30.12
4	10	+	+	28.50	30.72
5	—	+	+	28.66	40.00
6	—	+	+	28.38	40.00

40

50

フロントページの続き

(73)特許権者 501453189

バクスター・ヘルスケア・ソシエテ・アノニム

BAXTER HEALTHCARE S.A.

スイス国 8152 グラットパーク (オブフィコン), サーガウアーシュトラッセ 130

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(74)代理人 100156111

弁理士 山中 伸一郎

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 トーマス・ヘンメルレ

オーストリア、アー - 1190 ヴィエンナ、ホーフツァイレ10 - 12 / 15 / 8番

(72)発明者 カルステン・ウルバン

オーストリア、アー - 1220 ヴィエンナ、シフミュールンシュトラッセ106 / 6 / 13番

(72)発明者 フランツ・グルーバー

オーストリア、アー - 1220 ヴィエンナ、ヴォルフスミルヒガッセ47番

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 Hear. Res., (2003), 185, [1-2], p.97-108

Anal. Biochem., (1999), 273, [2], p.307-310

Vet. Microbiol., (2002), 89, [1], p.17-28

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed