

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 10 月 5 日(05.10.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/170376 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/012348
- (22) 国際出願日: 2017 年 3 月 27 日(27.03.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-069163 2016 年 3 月 30 日(30.03.2016) JP
- (71) 出願人: 和光純薬工業株式会社(WAKO PURE
CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒5408605
大阪府大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号
Osaka (JP).
- (72) 発明者: 中村 竜也(NAKAMURA Tatsuya); 〒
6610963 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 Hyogo (JP).
渡邊 基夫(WATANABE Motoo); 〒6610963 兵庫
県尼崎市高田町 6 番 1 号 Hyogo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,

CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ロピア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: CHLAMYDIA TRACHOMATIS DETECTING PRIMER SET, CHLAMYDIA TRACHOMATIS DETECTING METHOD USING SAME, AND REAGENT KIT THEREFOR

(54) 発明の名称: クラミジア・トラコマティス検出用プライマーセット及びこれを用いたクラミジア・トラ
コマティス検出方法、並びにそのための試薬キット

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a *Chlamydia trachomatis* detecting method in which the probability of erroneous determination such as a false negative or a false positive is low and which exhibits superior sensitivity and specificity. The present invention pertains to: "a *Chlamydia trachomatis* detecting primer set which contains a first primer pair comprising a forward primer having a base sequence represented by SEQ ID NO: 5 and a reverse primer having a base sequence represented by SEQ ID NO: 6; a *Chlamydia trachomatis* detecting method using the primer set; and a reagent kit therefor".

(57) 要約: 本発明の課題は、偽陰性や偽陽性といった誤判定が生じる確率が低く、感度および特異性に優れた、クラミジア・トラコマティスの検出方法を提供することにある。本発明は、「配列番号 5 で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 6 で表される塩基配列からなるリバースプライマーからなる第 1 プライマー対を含む、クラミジア・トラコマティス検出用プライマーセット及び該プライマーセットを用いるクラミジア・トラコマティス検出方法、並びにそのための試薬キット」に関する。



WO 2017/170376 A1

明 細 書

発明の名称：

クラミジア・トラコマティス検出用プライマーセット及びこれを用いたクラミジア・トラコマティス検出方法、並びにそのための試薬キット

技術分野

[0001] 本発明は、クラミジア・トラコマティス (Chlamydia trachomatis) (以下、CTと略記する場合がある。)を検出するためのプライマーセット及びこれを用いたクラミジア・トラコマティスの検出方法、該方法を実施するための試薬キットに関する。

背景技術

[0002] 今日、性風俗の多様化や若者を中心とする性行動様式の変化に伴い、クラミジア感染症の増加が著しい。

クラミジア感染症の原因菌は、クラミジア・トラコマティスであり、ヒトの目や尿道、子宮頸管や咽頭に感染し、様々な炎症を引き起こす。また、クラミジア・トラコマティスには、ヒトに感染し得る15種類程度の血清型 (A-K, Ba, L1-L3等) が知られている。そのため、複数の血清型のクラミジア・トラコマティスを検出する必要がある。

[0003] 現在、クラミジア・トラコマティスの検出方法としては、核酸増幅反応を利用した、クラミジア・トラコマティスに特異的な潜在プラスミド (Cryptic plasmid) を検出する方法が主流となっている (特許文献1、非特許文献1)。

[0004] また、クラミジア・トラコマティスの臨床試料は、尿、咽頭、子宮頸管から採取することが推奨されている。しかし、尿、咽頭、子宮頸管由来の試料には、ヒトゲノムDNAが含まれており、このヒトゲノムDNAは、目的の核酸増幅反応を阻害してしまうことがわかっている。そのため、ヒトゲノムDNA存在下であっても、特異的にクラミジア・トラコマティスを増幅させる必要がある。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第5811086号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Moller, J. K., et al., Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46, p. 3892-3895

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかし、特許文献1及び非特許文献1において開示された検出方法では、ヒトゲノムDNA等の夾雑DNA存在下で核酸増幅反応を行うと、非特異的な核酸が多数増幅されてしまう。その結果、尿、咽頭、子宮頸管由来の試料を用いたクラミジア・トラコマティスの検出を行うと、偽陽性が生じてしまうことがあった。

また、非特許文献1において開示された検出方法では、クラミジア・トラコマティスの複数の血清型を検出することができないため、偽陰性が生じてしまうこともあった。

つまり、核酸増幅反応を利用した、従来のクラミジア・トラコマティスの検出方法では、偽陰性や偽陽性といった誤判定が生じてしまうという問題を有していた。

[0008] 本発明は、上記した如き状況に鑑みてなされたものであって、偽陰性や偽陽性といった誤判定が生じる確率が低く、感度および特異性に優れたクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットの提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、上記課題を解決する目的で成されたもので、以下の構成よりなる。

(1) 配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列

番号6で表されるリバースプライマーの組み合わせからなる第1プライマー対を含む、クラミジア・トラコマティス検出用プライマーセット。

(2) 上記(1)のプライマーセットを用い、試料中の核酸を鋳型として核酸増幅反応を行い、得られた核酸増幅産物を検出することを特徴とする、クラミジア・トラコマティスの検出方法。

(3) 上記(1)のプライマーセットを含んでなる、クラミジア・トラコマティス検出用試薬キット。

発明の効果

[0010] 本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットによれば、ヒトゲノムDNA等の夾雑DNA存在下であっても、非特異的な核酸の増幅を抑えることができる。また、ヒトに感染し得るクラミジア・トラコマティスの複数の血清型を検出することもできる。

[0011] 更に、本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットを用いる本発明の方法は、従来法で発生する偽陰性や偽陽性といった誤判定を軽減し、クラミジア・トラコマティスを高感度で特異的に精度よく検出することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例2、比較例1及び比較例2で得られた、ヒトゲノムDNA含有試料に対して、各種プライマー対を用いて得られたPCR増幅産物をキャピラリー電気泳動により、分離、検出した泳動図である。

[図2]実施例3及び比較例3で得られた、クラミジア・トラコマティスDNAおよびヒトゲノムDNA含有試料に対して、各種プライマー対を用いて得られたPCR増幅産物をキャピラリー電気泳動により、分離、検出した泳動図である。

[図3]実施例5及び比較例4で得られた、ヒトゲノムDNA含有試料に対して、各種プライマー対を用いて得られたマルチプレックスPCR増幅産物をキャピラリー電気泳動により、分離、検出した泳動図である。

[図4]実施例6及び比較例5で得られた、クラミジア・トラコマティスDNA

およびヒトゲノムDNA含有試料に対して、各種プライマー対を用いて得られたマルチプレックスPCR増幅産物をキャピラリー電気泳動により、分離、検出した泳動図である。

[図5]実施例6及び比較例5で得られた、泳動図におけるクラミジア・トラコマティス潜在プラスミドに対応するバンドの蛍光強度（濃さ）から算出した、クラミジア・トラコマティス潜在プラスミドの核酸濃度を表す図である。

発明を実施するための形態

[0013] ＜1＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセット

本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセット（以下、本発明のプライマーセットと略記する場合がある。）は、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号6で表される塩基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第1プライマー対（以下、本発明に係る第1プライマー対と略記する場合がある。）を含むことを特徴とする。

[0014] 上記配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号6で表される塩基配列からなるリバースプライマーは、クラミジア・トラコマティスの潜在プラスミドpLGV440（以下、潜在プラスミドと略記する場合がある。）にアニーリングするものである。これらプライマーの組み合わせからなる本発明に係る第1プライマー対と、潜在プラスミドの全塩基配列（配列番号1、GenBankID:HE603230.1、塩基番号1～7492）とを用いて核酸増幅反応（PCR等）に付すと、潜在プラスミドの全塩基配列のうち、配列番号2で表される塩基配列を持つ塩基番号4770～4917の領域（148塩基対）が増幅される。

[0015] 本発明のプライマーセットは、本発明に係る第1プライマー対に加えて、更に、クラミジア・トラコマティスのゲノムDNA（以下、CTゲノムDNAと略記する場合がある。）とアニーリングするフォワードプライマーとリバースプライマーの組み合わせからなる第2プライマー対（以下、本発明に係る第2プライマー対と略記する場合がある。）を含んでもよい。

[0016] 本発明に係る第2プライマー対は、CTゲノムDNAとアニーリングするものであれば何れでもよい。尚、CTゲノムDNAの全塩基配列は、GenBank ID: HE601796.2に開示されている。

また、本発明に係る第2プライマー対は、本発明に係る第1プライマー対とは異なる塩基配列である。

[0017] 本発明に係る第2プライマー対は、自体公知の方法に従って設計されればよい。

例えば、プライマー設計のために一般的に用いられているプライマーデザイン用のソフト（例えば、Primer3）等）を用いてプライマーを設計すればよい。

その際、本発明に係る第2プライマー対におけるフォワードプライマーとリバースプライマーの塩基数は、それぞれ通常プライマー配列としての特異性を維持するために必要な塩基数と考えられている10～50塩基であり、10～35塩基が好ましく、15～35塩基がより好ましく、18～30塩基が特に好ましい。

[0018] 本発明に係る第2プライマー対の具体例としては、配列番号7～9の何れかで表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基配列からなるリバースプライマーとの組み合わせからなるものが挙げられる。

[0019] 本発明に係る第2プライマー対として、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマー、及び配列番号10で表される塩基配列からなるリバースプライマーを用いて核酸増幅反応（PCR等）に付すと、CTゲノムDNAの全塩基配列のうち、塩基番号782264～782436の領域（配列番号3：173塩基対）が増幅される。

[0020] また、配列番号8で表される塩基配列からなるフォワードプライマー、及び配列番号10で表される塩基配列からなるリバースプライマーを用いて核酸増幅反応（PCR等）に付すと、CTゲノムDNAの全塩基配列のうち、塩基番号782264～782436の領域（配列番号3：173塩基対）

が増幅される。

[0021] 更に、配列番号9で表される塩基配列からなるフォワードプライマー、及び配列番号10で表される塩基配列からなるリバースプライマーを用いて核酸増幅反応（PCR等）に付すと、CTゲノムDNAの全塩基配列のうち、塩基番号782264～782437の領域（配列番号4：174塩基対）が増幅される。

[0022] 中でも、本発明に係る第2プライマー対としては、配列番号7または8で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものが好ましく、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものがより好ましい。

[0023] 潜在プラスミドを対象とする本発明に係る第1プライマー対に、CTゲノムDNAを対象とする本発明に係る第2プライマー対を加えた本発明のプライマーセットを用いた場合、近年報告されている潜在プラスミドが欠損したクラミジア・トラコマティス変異株（An, Q., et al., Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30, p. 2814-2821）であっても、その核酸を増幅、検出することができる。

[0024] 本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を構成するプライマー（以下、本発明に係るプライマーと略記する場合がある。）を得る方法としては、特に限定はされないが、自体公知の化学合成法により調製する方法、ベクター等を用いる遺伝子操作法により得る方法が挙げられる。中でも、容易・大量かつ安価に一定品質のプライマーを得ることが可能なことから、化学合成法が好ましい。

例えば、DNAシンセサイザーを用い、通常ホスホアミダイト法にてオリゴヌクレオチドを合成し、陰イオンカラムクロマトグラフィーにより精製すれば、目的とする本発明に係るプライマーを得ることができる。

[0025] 尚、プライマーの合成を行う委託業者から購入してもよい。

[0026] 本発明に係るプライマーの少なくとも1つは、標識物質で標識されたものであってもよい。

[0027] 標識物質で標識された本発明に係るプライマーを用いる場合であって、本発明に係る第1プライマー対のみを用いる場合は、フォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方が標識物質で標識されていればよい。

[0028] また、標識物質で標識された本発明に係るプライマーを用いる場合であって、本発明に係る第1プライマー対と本発明に係る第2プライマー対の2つのプライマー対を用いる場合は、本発明に係る第1プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方および本発明に係る第2プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。

[0029] 本発明に係るプライマーを標識物質で標識するために用いられる標識物質としては、蛍光物質、放射性同位体や酵素、発光物質など公知の標識物質が挙げられ、蛍光物質が好ましい。

[0030] 上記蛍光物質としては、例えば、TAMRATM（シグマアルドリッチ株式会社製）、Alexa555、Alexa647（サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社製）、Cyamine Dye系のCy3、Cy5（GEヘルスケア株式会社製）、フルオレセイン等が挙げられ、TAMRATM（シグマアルドリッチ株式会社製）が好ましい。

上記放射性同位体としては、例えば、³²P、³³P、³⁵S等が挙げられる。

上記酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ等が挙げられる。

上記発光物質としては、例えば、Acridinium Esterを含む化学発光試薬等が挙げられる。

尚、標識物質で標識された本発明に係るプライマーは、直接標識物質がプライマーに結合していても、リンカーを介して結合していてもよい。該リンカーとしては、この分野で通常用いられるものであればよく、1～3塩基の

核酸であってもよい。

[0031] 本発明に係るプライマーを標識物質で標識する方法としては、この分野で通常行われているオリゴヌクレオチドの標識方法が挙げられ、標識物質毎に適宜方法を選択すればよい。

[0032] 本発明に係るプライマーを蛍光物質で標識する方法としては、例えば、フルオレセイン標識したヌクレオチドを自体公知の方法に従って、プライマーに取り込ませる方法が挙げられる。

また、リンカーアームを有するヌクレオチドを配列のオリゴヌクレオチド中に置換する方法 (Nucleic Acids Res., 1986年、第14巻、p. 6115) でもヌクレオチドを蛍光物質で標識することができる。例えば、5位にリンカーアームを有するウリジンを特開昭60-500717号公報に開示された合成法によりデオキシウリジンから化学合成し、そのデオキシウリジンを含有するオリゴヌクレオチドを合成し、次いでそのオリゴヌクレオチド鎖に蛍光物質を導入する方法がある (特開昭60-500717号公報)。

[0033] 本発明に係るプライマーを放射性同位体で標識する方法としては、例えば、プライマーを合成する際に、放射性同位体で標識されたヌクレオチドを取り込ませることによって、プライマーを標識する方法や、プライマーを合成した後、放射性同位体で標識する方法等が挙げられる。具体的には、一般的に用いられるランダムプライマー法、ニックトランスレーション、T4ポリヌクレオチドキナーゼによる5'末端標識法、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いた3'末端標識法等が挙げられる。

[0034] 本発明に係るプライマーを酵素で標識する方法としては、例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素分子を、標識するプライマーに直接共有結合させる等の直接標識法が挙げられる。

[0035] 本発明に係るプライマーを発光物質で標識する方法としては、自体公知の方法に従って、ヌクレオチドを発光標識する方法が挙げられる。

[0036] また、ビオチン-アビジン反応を利用した検出システムに従って、上記の

標識物質を本発明に係るプライマーに結合させてもよい。

その際には、E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Clinical Chemistry* 1991, 37, p. p. 625-636に記載の手法に従って行えばよい。

[0037] ＜2＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出方法

本発明のクラミジア・トラコマティス検出方法（以下、本発明のCT検出方法と略記する場合がある。）は、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号6で表される塩基配列からなるリバーспライマーとの組み合わせからなる第1プライマー対を含むプライマーセットを用い、試料中の核酸を鋳型として核酸増幅反応を行い、得られた核酸増幅産物を検出することによりなされる。

[0038] 本発明のCT検出方法に用いられる試料としては、例えば尿、尿道スワブ懸濁液、膣スワブ懸濁液、子宮頸管スワブ懸濁液、うがい液、口腔スワブ懸濁液、咽頭スワブ懸濁液等の各種臨床試料や培養菌体等が挙げられる。これらの試料は、本発明のCT検出の前に、予め試料中に存在する菌の濃縮、分離や、菌体からのDNAの抽出、精製などの操作を前処理として行ってもよい。その方法としては、酵素、界面活性剤、アルカリ、熱による処理などがある。

[0039] 上記試料からDNAを抽出及び精製するには、自体公知の方法に従って行えばよく、具体的には、クラミジアの細胞壁を破壊した後、DNAの抽出及び精製を行えばよい。

[0040] 上記試料中のクラミジアの細胞壁を破壊する方法としては、SDS等の界面活性剤や、グアニジンチオシアネート（GTC）等の蛋白変性剤で菌体を処理してクラミジアの膜構造を破壊する方法、又はガラスビーズ等によって物理的に破碎する方法等が挙げられる。

[0041] 上記DNAの抽出及び精製は、クラミジアの細胞壁を破壊した後、フェノール及びクロロホルムを用いて抽出及び精製する方法、エタノール、イソプロパノール等を用いて抽出及び精製する方法等によりなされればよい。

また、DNAの抽出及び精製は、市販のキット〔例えば、Genomic-
tip（株式会社キアゲン製）〕を用いて実施してもよい。

[0042] 本発明のCT検出方法には、更に、本発明に係る第2プライマー対を用いてもよい。具体的には、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号6で表される塩基配列からなるリバースプライマーとの組み合わせからなる第1プライマー対と、配列番号7～9の何れかで表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基配列からなるリバースプライマーとの組み合わせからなる第2プライマー対とを含むプライマーセットを用い、試料中の核酸を鋳型として核酸増幅反応を行い、得られた核酸増幅産物を検出することによりなされる。

[0043] 本発明のCT検出方法において、本発明に係る第1プライマー対及び第2プライマー対を用いる場合の本発明に係る第1プライマー対と第2プライマー対の組み合わせとしては、以下に示す表1の（1）又は（2）が好ましく、（1）がより好ましい。

[0044] [表1]

	第1プライマー対		第2プライマー対	
(1)	フォワードプライマー	配列番号5	フォワードプライマー	配列番号7
	リバースプライマー	配列番号6	リバースプライマー	配列番号10
(2)	フォワードプライマー	配列番号5	フォワードプライマー	配列番号8
	リバースプライマー	配列番号6	リバースプライマー	配列番号10

[0045] 本発明のCT検出方法において、本発明に係るプライマーの少なくとも一つは標識物質で標識されたものを用いてもよい。

[0046] 本発明のCT検出方法において、標識物質で標識された本発明に係るプライマーを用いる場合であって、CT検出用プライマーとして本発明に係る第1プライマー対のみを用いる場合は、フォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方が標識物質で標識されていればよい。

[0047] 本発明のCT検出方法において、標識物質で標識された本発明に係るプライマーを用いる場合であって、CT検出用プライマーとして本発明に係る第

1 プライマー対と本発明に係る第2プライマー対の2つのプライマー対を用いる場合は、本発明に係る第1プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方および本発明に係る第2プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。

[0048] また、淋菌は、クラミジア・トラコマティスと同時に感染することが多いが、治療薬がクラミジア・トラコマティスの場合とは異なる。そのため、クラミジア・トラコマティスと淋菌とを同時に検出することは、臨床的意義が高い。そこで、クラミジア・トラコマティスと淋菌とを同時に検出する場合は、本発明のプライマーセットと淋菌を検出するプライマー対とを用いて核酸増幅反応を行い、クラミジア・トラコマティス由来の核酸増幅産物と淋菌由来の核酸増幅産物とを検出すればよい。

[0049] 更に、内部コントロールとして適当な菌を選択し、当該菌由来の核酸、及び当該菌を検出するためのプライマー対を加えて、本発明のプライマーセットを用いた核酸増幅反応を行い、クラミジア・トラコマティス由来の核酸増幅産物と当該菌由来の核酸増幅産物を検出することにより、核酸増幅反応が正しく行えたか否かを確認してもよい。

[0050] 尚、内部コントロールとして選択する菌は、例えば、クラミジア・トラコマティスのみを検出する場合、クラミジア・トラコマティス以外の菌であり、クラミジア・トラコマティス及び淋菌を検出する場合、クラミジア・トラコマティス及び淋菌以外の菌である。

[0051] 尚、本発明のC T検出方法において、淋菌検出用プライマー対及び内部コントロール検出用プライマー対を構成するプライマーは、それぞれ標識物質で標識されたものを用いてもよい。

[0052] 本発明のC T検出方法において、標識物質で標識された淋菌検出用プライマー対を用いる場合は、淋菌検出用プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。

- [0053] 本発明のC T検出方法において、標識物質で標識された内部コントロール検出用プライマー対を用いる場合は、内部コントロール検出用プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。
- [0054] 本発明のC T検出方法において、標識物質で標識された淋菌検出用プライマー対及び内部コントロール検出用プライマー対を用いる場合は、淋菌検出用プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方及び内部コントロール検出用プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。
- [0055] 本発明のC T検出方法に用いるプライマー、プライマー対、プライマーセット、標識物質及び標識物質で標識する方法の詳細については、＜1＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットにおいて記載した通りである。
- [0056] 本発明のC T検出方法における本発明のプライマーセットを用いて行う核酸増幅反応（以下、本発明に係る核酸増幅反応と略記する場合がある。）は、特に制限されず、自体公知の方法に従って行えばよい。具体的には、例えば、PCR（Polymerase Chain Reaction）法、TMA（Transcription-mediated amplification）法、SDA（Strand Displacement Amplification）法等が挙げられ、PCR法が好ましい。
- [0057] また、本発明に係る核酸増幅反応におけるターゲットは通常DNAであるが、ターゲットがRNAであっても逆転写により相補的DNA（cDNA）を合成して、ターゲットとすることができる。その方法としては、例えば、TRC（Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction）法等が挙げられる。
- [0058] 本発明に係る核酸増幅反応において用いられる、Taq DNAポリメラーゼ〔例えば、KOD Exo（－）（東洋紡株式会社製）〕等の核酸合成酵素

素や、 $dNTP$ ($dATP$ 、 $dCTP$ 、 $dGTP$ 、 $dGTP$) 等の核酸合成基質は、通常この分野で用いられるものであればよい。

[0059] 更に、本発明に係る核酸増幅反応における反応液中に、 $Tris-HCl$ 、 K_2HPO_4 等の緩衝液、 $MgCl_2$ 、 KCl 、 $(NH_4)_2SO_4$ 等の塩、ポリエチレングリコール、 $Triton$ (ダウケミカルカンパニー株式会社製)、 $Nonidet$ (シェルケミカル株式会社製)、 $CHAPS$ (株式会社同仁化学製) 等の界面活性剤、プロクリン300 (シグマアルドリッチ株式会社) 等の防腐剤、 BSA (ウシ血清アルブミン) 等のポリペプチドが含まれていてもよい。また、上記成分に加えて、核酸増幅反応が阻害されない限り、他の任意の成分が含まれていてもよい。

[0060] 本発明のCT検出方法における、増幅産物を検出する方法は、通常この分野で行われている自体公知の方法に基づいてなされればよい。具体的には、例えば、(a) 電気泳動により検出する方法、(b) リアルタイム法により検出する方法等が挙げられ、(a) 電気泳動により検出する方法が好ましい。

[0061] 以下に、夫々の方法について、説明する。

(a) 電気泳動により検出する方法

電気泳動により検出する方法とは、本発明に係るプライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応により得られた増幅産物を、電気泳動により分離し、検出する手法であり、具体的な方法としては、(a-1) 標識プライマー法、(a-2) インターカレーター法及び(a-3) 標識プローブ法が挙げられる。

[0062] (a-1) 標識プライマー法

標識プライマー法とは、『本発明に係るプライマーの少なくとも一方を標識物質で標識した標識プライマーを含むプライマー対を用い、被検試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応を行う。次いで、得られた増幅産物を電気泳動により分離し、該増幅産物中の標識を検出する。その結果、該増幅産物の標識が本発明に係るプライマー対で増幅される産物の塩基対数

で検出できた場合に、「その被検試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する』方法である。

尚、本明細書において、「標識を検出する」とは、標識物質の性質に基づいて標識物質を直接又は間接的に測定することを意味する。

[0063] 標識プライマー法における、プライマー、プライマー対、標識物質および標識物質で標識する方法の詳細については、＜1＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットに記載した通りである。

[0064] 標識プライマー法における電気泳動としては、物質の荷電強度に依存して異なる速度で移動又は異なる距離を移動する方法に基づくものであればよく、具体的には、例えば、キャピラリー電気泳動、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（スラブ電気泳動）、デンブゲル電気泳動、等電点電気泳動等が挙げられ、アガロースゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動が好ましく、キャピラリー電気泳動がより好ましい。

尚、上記キャピラリー電気泳動を行う場合は、WO 2007/027495、WO 2011/118496、WO 2008/075520等に記載の自体公知の方法に従って行えばよい。

[0065] 標識プライマー法について、（a-1-1）本発明に係る第1プライマー対を用いる場合及び（a-1-2）本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を用いる場合に分けて、以下に、具体的に説明する。

[0066] （a-1-1）本発明に係る第1プライマー対を用いる場合

例えば、まず、本発明に係る第1プライマー対におけるプライマーの少なくとも一方を標識物質で標識する。次いで、この標識物質で標識されたプライマーを含む本発明に係る第1プライマー対を用い、試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応を行う。次いで、得られた増幅産物を電気泳動により分離し、該増幅産物中の標識を検出する。

その結果、該増幅産物の標識が本発明に係る第1プライマー対で増幅される産物の塩基対数で検出できた場合に、「その被検試料は、クラミジア・ト

ラコマティス陽性である。」と判定する。

[0067] (a-1-2) 本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を用いる場合

例えば、まず、本発明に係る第1プライマー対におけるプライマーの少なくとも一方および本発明に係る第2プライマー対におけるプライマーの少なくとも一方を標識物質で標識する。次いで、これら標識物質で標識された本発明に係る第1プライマー対および標識物質で標識されたプライマーを含む本発明に係る第2プライマー対を用い、試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応を行う。次いで、本発明に係る第1プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応により得られた増幅産物（第1増幅産物）および本発明に係る第2プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応により得られた増幅産物（第2増幅産物）それぞれを電気泳動により分離し、該第1増幅産物および該第2増幅産物中の標識を検出する。

その結果、該第1増幅産物の標識が本発明に係る第1プライマー対で増幅される産物の塩基対数で検出できた場合、又は該第2増幅産物の標識が本発明に係る第2プライマー対で増幅される産物の塩基対数で検出できた場合、の少なくとも何れか一方である場合、「その被検試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する。

[0068] 尚、上記本発明に係る第2プライマー対の具体例としては、配列番号7～9の何れかで表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものが挙げられ、配列番号7または8で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものが好ましく、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものがより好ましい。

[0069] また、淋菌や内部コントロールとして選択した菌等の菌類を同時に検出する場合には、クラミジア・トラコマティスを検出するための本発明に係るプ

ライマー対に加えて、標識物質で標識された淋菌や内部コントロールとして選択した菌等の菌類を検出するためのプライマー対を用いて上記と同様に核酸増幅反応を行い、検出方法を行えばよい。

[0070] (a-2) インターカレーター法

インターカレーター法とは、『本発明に係るプライマー対を用い、被検試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応を行い、得られた増幅産物を電気泳動により分離する。次いで、該増幅産物をインターカレーターで染色し、該インターカレーター由来の蛍光を検出する。その結果、該インターカレーター由来の蛍光を検出できた場合に、「その被検試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する』方法である。

[0071] インターカレーター法におけるプライマー対の詳細については、＜1＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットに記載した通りである。

[0072] インターカレーター法における電気泳動としては、(a-1) 標識プライマー法と同じものが挙げられ、好ましいものも同じである。

[0073] また、インターカレーター法におけるインターカレーターとしては、通常、この分野で用いられているインターカレーターであれば何でもよい。その具体例は、下記(1)～(5)のインターカレーター並びに下記(6)及び(7)のインターカレーター類似物質が挙げられる。

即ち、(1) エチジウム化合物〔例えば、エチジウムブロマイド、エチジウムホモダイマー1 (EthD-1)、エチジウムホモダイマー2 (EthD-2)、臭化エチジウムモノアジド (EMA)、ジヒドロエチジウム等〕、

(2) アクリジン色素 (例えば、アクリジンオレンジ等)、

(3) ヨウ素化合物 (ヨウ素化プロピジウム、ヨウ素化ヘキシジウム等)、シアニンダイマー系色素〔例えば、POPO-1、BOBO-1、YOYO-1、TOTO-1、JOJO-1、POPO-3、LOLO-1、BOBO-3、YOYO-3、TOTO-3 (何れもサーモフィッシャーサイエン

ティフィック株式会社製)等]、

(4) シアニンモノマー系色素 [例えば、PO-PRO-1、BO-PRO-1、YO-PRO-1、TO-PRO-1、JO-PRO-1、PO-PRO-3、LO-PRO-1、BO-PRO-3、YO-PRO-3、TO-PRO-3、TO-PRO-5 (何れもサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)等]、

(5) SYTOX系色素 [例えば、SYTOX Green、SYTOX Blue、SYTOX Orange (何れもサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)等]、SYBR系色素 [例えば、SYBR Gold、SYBR Green I、SYBR Green II (何れもサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)]、GelRed系色素 [例えば、GelRed (和光純薬工業株式会社製)等]、

(6) DNA二重らせんのマイナーグループに結合するもの[例えば、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI) (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)等]、

(7) アデニン-チミン(A-T)配列に特異的に結合するもの[例えば、ペンタハイドレート(ビス-ベンズイミド)(Hoechst 33258)

(サーモフィッシャーサイエンティフィック)、トリヒドロクロライド(Hoechst 33342) (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)、ビスベンズイミド色素(Hoechst 34580) (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)等]、が挙げられる。

[0074] (a-3) 標識プローブ法

標識プローブ法とは、『本発明に係るプライマー対を用い、被検試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応を行い、得られた増幅産物を電気泳動により分離する。次いで、該増幅産物を熱処理に付すことにより、一本鎖にする。次いで、標識物質で標識された、該増幅産物の塩基配列と相補的な塩基配列を有するプローブをハイブリダイズさせることで、ハイブリッド体を得て、該ハイブリッド体中の標識を検出する。その結果、該ハイブリ

ッド体中の標識を検出できた場合に、「その被検試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する』方法である。

[0075] 標識プローブ法における、プライマー対及び標識物質、標識物質で標識する方法の詳細については、＜1＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットに記載した通りである。

[0076] 標識プローブ法における電気泳動としては、（a-1）標識プライマー法と同じものが挙げられ、好ましいものも同じである。

[0077] （b）リアルタイム法により検出する方法

リアルタイム法により検出する方法とは、本発明に係るプライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応により得られる増幅産物を、リアルタイムに検出する方法であり、具体的な方法としては、（b-1）TaqMan™プローブ法及び（b-2）インターカレーター法が挙げられる。

[0078] （b-1）TaqMan™プローブ法

TaqMan™プローブ法とは、『本発明に係るプライマー対及び蛍光標識プローブを用い、被検試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応（例えば、リアルタイムPCR）を行い、該プローブ由来の蛍光を検出できた場合に、「その被検試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する』方法である。

[0079] TaqMan™プローブ法におけるプライマー対の詳細については、＜1＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットに記載した通りである。

[0080] TaqMan™プローブ法における蛍光標識プローブとは、本発明に係るプライマー対を用い、本発明に係る核酸増幅反応を行った場合に増幅される領域にハイブリダイズするよう設計され、且つ、その5'末端を例えば、蛍光色素（レポーター蛍光色素）で、3'末端を例えば、クエンチャー色素で標識したものである。

[0081] TaqMan™プローブ法について、（b-1-1）本発明に係る第1プライマー対を用いる場合及び（b-1-2）本発明に係る第1プライマー対

及び本発明に係る第2プライマー対を用いる場合に分けて、より具体的に説明する。

[0082] (b-1-1) 本発明に係る第1プライマー対を用いる場合

例えば、まず、本発明に係る第1プライマー対、及び本発明に係る第1プライマー対で本発明に係る核酸増幅反応を行った場合に増幅される領域にハイブリダイズするように設計されたプローブの5'末端がレポーター蛍光色素で標識され、3'末端がクエンチャー色素で標識された標識プローブ(第1標識プローブ)を用いて、試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応を行う。

その結果、該第1標識プローブから遊離されたレポーター蛍光色素由来の蛍光が検出された場合、「その試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する。

[0083] (b-1-2) 本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を用いる場合

例えば、まず、本発明に係る第1プライマー対、及び本発明に係る第1プライマー対で本発明に係る核酸増幅反応を行った場合に増幅される領域にハイブリダイズするように設計されたプローブの5'末端がレポーター蛍光色素で標識され、3'末端がクエンチャー色素で標識された標識プローブ(第1標識プローブ)、本発明に係る第2プライマー対、及び本発明に係る第2プライマー対で本発明に係る核酸増幅反応を行った場合に増幅される領域にハイブリダイズするように設計されたプローブの5'末端がレポーター蛍光色素で標識され、3'末端がクエンチャー色素で標識された標識プローブ(第2標識プローブ)を用いて、試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応を行う。

その結果、該第1標識プローブから遊離されたレポーター蛍光色素由来の蛍光又は該第1標識プローブから遊離されたレポーター蛍光色素由来の蛍光の少なくとも一方が検出された場合、「その試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する。

[0084] 上記方法における、第1標識プローブのレポーターと第2標識プローブのレポーターはそれぞれ異なる蛍光波長を有していてもよい。

尚、第1標識プローブと第2標識プローブの塩基配列は互いに異なるものである。

[0085] 尚、本発明に係る第2プライマー対の具体例としては、配列番号7～9の何れかで表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものが挙げられ、配列番号7または8で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものが好ましく、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものがより好ましい。

[0086] 上記(b-1-1)及び(b-1-2)におけるTaqManTMプローブ法においては、さらに、本発明に係るプライマー対以外に、淋菌や内部コントロールとして選択した菌等の菌類を検出するためのプライマー対を加えて、本発明に係る核酸増幅反応を行ってもよい。これら菌類は、同様にTaqManTMプローブ法を用いて検出しても、自体公知の方法により検出してもよい。

[0087] (b-2) インターカレーター法

インターカレーター法とは、『本発明に係るプライマー対及びインターカレーターを用い、被検試料中の核酸を鋳型として本発明に係る核酸増幅反応（例えば、リアルタイムPCR）を行う。次いで、得られた増幅産物の増幅量と相関してインターカレーションするインターカレーター由来の蛍光を検出する。その結果、該インターカレーター由来の蛍光を検出できた場合に、「その被検試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する』方法である。

[0088] インターカレーター法におけるプライマー対の詳細については、＜1＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットに記載した通り

である。

[0089] インターカレーター法におけるインターカレーターとしては、(a-2) インターカレーター法と同じものが挙げられる。

[0090] 本発明のクラミジア・トラコマティス検出方法の好ましい具体例を、増幅産物を検出する方法として、(a'-1) 標識プライマー法、(b'-1) TaqManTMプローブ法を用いる場合に分けて以下に説明する。

[0091] (a'-1) 標識プライマー法

標識プライマー法を用いる場合の本発明のクラミジア・トラコマティス検出方法の具体例を、(a'-1-1) 本発明に係る第1プライマー対を用いる場合、(a'-1-2) 本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を用いる場合に分けて、以下に説明する。

[0092] (a'-1-1) 本発明に係る第1プライマー対を用いる場合

まず、クラミジア・トラコマティスを検出する試料中から、自体公知の方法に従って、精製DNAを得る。

[0093] 一方、例えば、DNAシンセサイザーを用い、ホスホアミダイド法にて、本発明に係る第1プライマー対（即ち、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号6で表される塩基配列からなるリバースプライマー）を合成する。次いで、自体公知の方法により、本発明に係る第1プライマー対の少なくとも一方を標識物質（例えば、蛍光物質）で標識する。

[0094] 標識物質で標識されたプライマーを含む本発明に係る第1プライマー対を増幅用プライマーとして用い、試料から得られた精製DNAに対して、下記のように本発明に係る核酸増幅反応（例えば、PCR）を行う。

[0095] 即ち、各0.1～2 μMの本発明に係る第1プライマー対を構成するプライマー、1.0～4.0 mMの塩（例えば、MgCl₂）、80～150 μg/mLのポリペプチド（例えば、BSA）、0.8～1.5%の界面活性剤（例えば、ポリエチレングリコール）、0.1～0.5%の防腐剤（例えば、プロクリン300）、夫々0.2～0.3 mMの核酸合成基質（例えば、

dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 及び10～80単位/mlの核酸合成酵素(例えば、Taq DNAポリメラーゼ)を含有するpH7～9の10mMの緩衝液(例えば、Tris-HCl緩衝液)を調整し、本発明に係る核酸増幅反応用反応液とする。この本発明に係る核酸増幅反応用反応液20～30 μ Lに、精製DNAを1～100ng加え、本発明に係る核酸増幅反応用試料を得る。

[0096] この本発明に係る核酸増幅反応用試料を用い、サーマルサイクラー等の核酸増幅装置を用いて、本発明に係る核酸増幅反応(例えば、PCR)を行う。

[0097] 即ち、93℃～98℃、1～10分加熱した後、(1)93℃～98℃、10～30秒→(2)50℃～70℃、10～30秒→(3)68～72℃、30秒～5分を1サイクルとして、30～45サイクル行う。

[0098] 次いで、得られた核酸増幅産物について、電気泳動(例えば、キャピラリー電気泳動)を行った後、該増幅産物中の標識を検出する。

[0099] その結果、得られた核酸増幅産物中の標識が本発明に係る第1プライマー対で増幅される産物の塩基対数(148塩基対)で検出できた場合、「その試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する。

[0100] 尚、2100バイオアナライザー(アジレントテクノロジー株式会社製)等の全自動マイクロチップ型キャピラリー電気泳動装置を用いてキャピラリー電気泳動を行った場合、得られるデータは、横軸が電気泳動時間、縦軸が蛍光強度で表される。横軸の電気泳動時間は、分子量マーカの電気泳動時間からDNA等のサイズに換算することができる。そのため、本発明に係る第1プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応により得られる核酸増幅産物の長さ(塩基対数)を予め算出しておき、「得られた核酸増幅産物が算出された核酸増幅産物に該当するか否か」を確認してもよい。

[0101] 即ち、本発明に係る第1プライマー対の少なくとも一方が蛍光物質で標識されたものを用いて、上記と同様に本発明に係る核酸増幅反応(例えば、PCR)を行う。

- [0102] 一方、本発明に係る第1プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応（例えば、PCR）で増幅される核酸増幅産物の長さ（塩基対数）を算出しておく。
- [0103] 本発明に係る第1プライマー対を用いた場合、潜在プラスミドの全塩基配列のうち、配列番号2で表される塩基配列からなる148塩基対の核酸が増幅されると予測される。
- [0104] 次いで、得られた核酸増幅産物を、例えば、2100バイオアナライザー（アジレントテクノロジー株式会社製）等の全自動マイクロチップ型キャピラリー電気泳動装置を用いて、キャピラリー電気泳動に付す。そして、キャピラリー電気泳動により得られたサンプルのデータを、機器のソフトでゲルイメージに換算する。
- [0105] その結果、得られた核酸増幅産物の長さ（塩基対数）が、148塩基対の核酸増幅産物と同じ場合、「その試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する。
- [0106] (a' - 1 - 2) 本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を用いる場合
まず、クラミジア・トラコマティスを検出する試料中から、自体公知の方法に従って、精製DNAを得る。
- [0107] 一方、例えば、DNAシンセサイザーを用い、ホスホアミダイド法にて、本発明に係る第1プライマー対（即ち、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号6で表される塩基配列からなるリバースプライマー）及び本発明に係る第2プライマー対（例えば、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号10で表される塩基配列からなるリバースプライマー）を合成する。次いで、本発明に係る第1プライマー対の少なくとも一方および本発明に係る第2プライマー対の少なくとも一方を標識物質（例えば、蛍光物質）で標識する。
- [0108] 標識物質で標識されたプライマーを含む、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を増幅用プライマーとして用い、試料か

ら得られた精製DNAに対して、下記のように本発明に係る核酸増幅反応（例えば、マルチプレックスPCR）を行う。

- [0109] 即ち、各0.1～2 μ Mの本発明に係る第1プライマー対を構成するプライマー、各0.1～2 μ Mの本発明に係る第2プライマー対を構成するプライマー、1.0～4.0 mMの塩（例えば、 $MgCl_2$ ）、80～150 μ g/mLのポリペプチド（例えば、BSA）、0.8～1.5%の界面活性剤（例えば、ポリエチレングリコール）、0.1～0.5%の防腐剤（例えば、プロクリン300）、夫々0.2～0.3 mMの核酸合成基質（例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP）及び10～80単位/mLの核酸合成酵素（例えば、Taq DNAポリメラーゼ）を含有するpH7～9の10 mMの緩衝液（例えば、Tris-HCl緩衝液）を調整し、本発明に係る核酸増幅反応用反応液とする。この本発明に係る核酸増幅反応用反応液20～30 μ Lに、クラミジア・トラコマティスの精製DNA試料を1～100 ng加え、本発明に係る核酸増幅反応用試料を得る。
- [0110] この本発明に係る核酸増幅反応用試料を用い、サーマルサイクラー等の核酸増幅装置を用いて、本発明に係る核酸増幅反応（例えば、マルチプレックスPCR）を行う。
- [0111] 即ち、93℃～98℃、1～10分加熱した後、（1）93℃～98℃、10～30秒→（2）50℃～70℃、10～30秒→（3）68～72℃、30秒～5分を1サイクルとして、30～45サイクル行う。
- [0112] 次いで、得られた核酸増幅産物それぞれについて、電気泳動（例えば、キャピラリー電気泳動）を行った後、該増幅産物中の標識を検出する。
- [0113] その結果、得られた核酸増幅産物中の標識が本発明に係る第1プライマー対で増幅される産物の塩基対数（148塩基）で検出できた場合、または得られた核酸増幅産物中の標識が本発明に係る第2プライマー対で増幅される産物の塩基対数（173塩基）で検出できた場合、の少なくとも何れか一方である場合、「その試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する。

- [0114] 尚、2100バイオアナライザー（アジレントテクノロジー株式会社製）等の全自動マイクロチップ型キャピラリー電気泳動装置を用いてキャピラリー電気泳動を行った場合、得られるデータは、横軸が電気泳動時間、縦軸が蛍光強度で表される。横軸の電気泳動時間は、分子量マーカの電気泳動時間からDNA等のサイズに換算することができる。そのため、本発明に係る第1プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応により得られる核酸増幅産物の長さ（塩基対数）及び本発明に係る第2プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応により得られる核酸増幅産物の長さ（塩基対数）を予め算出しておき、「得られた核酸増幅産物が算出された核酸増幅産物に該当するか否か」を確認してもよい。
- [0115] 即ち、本発明に係る第1プライマー対の少なくとも一方および本発明に係る第2プライマー対の少なくとも一方が蛍光物質で標識されたものを用いて、本発明に係る核酸増幅反応（例えば、マルチプレックスPCR）を行う。
- [0116] 一方、本発明に係る第1プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応（例えば、PCR）で増幅される核酸増幅産物の長さ（塩基対数）及び本発明に係る第2プライマー対（例えば、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号10で表される塩基配列からなるリバースプライマー）を用いた本発明に係る核酸増幅反応（例えば、PCR）で増幅される核酸増幅産物の長さ（塩基対数）を算出しておく。
- [0117] 本発明に係る第1プライマー対を用いた場合、潜在プラスミドの全塩基配列のうち、配列番号2で表される塩基配列からなる148塩基対の核酸が増幅されると予測される。
- [0118] 一方、上記本発明に係る第2プライマー対を用いた場合、CTゲノムDNAの全塩基配列のうち、配列番号3で表される塩基配列からなる173塩基対の核酸が増幅されると予測される。
- [0119] 次いで、得られた核酸増幅産物を、例えば、2100バイオアナライザー（アジレントテクノロジー株式会社製）等の全自動マイクロチップ型キャピラリー電気泳動装置を用いて、キャピラリー電気泳動に付す。そして、キャ

ピラリ電気泳動により得られたサンプルのデータを、機器のソフトでゲルイメージに換算する。

[0120] その結果、得られた核酸増幅産物が、148塩基対の核酸増幅産物、または173塩基対の核酸増幅産物の少なくとも何れか一方と同じである場合、「その試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する。

[0121] (b' - 1) TaqMan™プローブ法

TaqMan™プローブ法を用いる場合の本発明のクラミジア・トラコマティス検出方法の具体例を(b' - 1 - 1)本発明に係る第1プライマー対を用いる場合を、(b' - 1 - 2)本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を用いる場合に分けて、以下に説明する。

[0122] (b' - 1 - 1) 本発明に係る第1プライマー対を用いる場合

まず、自体公知の方法に従って、クラミジア・トラコマティスを検出する試料中から精製DNA試料を得る。

[0123] 一方、例えば、DNAシンセサイザーを用い、ホスホアミダイト法にて、本発明に係る第1プライマー対（即ち、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号6で表される塩基配列からなるリバースプライマー）を合成する。

[0124] また、本発明に係る第1プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応（例えば、PCR）で増幅される塩基配列から、プローブとして利用するための配列を設計し、この塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを合成する。このオリゴヌクレオチドの5'末端にレポーター蛍光色素のFAMを、3'末端にクエンチャー色素のTAMRAを自体公知の方法により結合し、蛍光標識プローブ（第1標識プローブ）を得る。

[0125] 上記で合成した本発明に係る第1プライマー対を増幅用プライマーとして用い、例えば下記のように本発明に係る核酸増幅反応（例えば、リアルタイムPCR）を行う。

[0126] 即ち、各0.1～2μMの本発明に係る第1プライマー対を構成するプライマー、0.1～1μMの第1標識プローブ、1.0～4.0mMの塩（例

例えば、 $MgCl_2$ ）、50～100mMの塩（例えば、KCl）、300～600 $\mu g/mL$ のポリペプチド（例えば、BSA）、0.05～2%の界面活性剤（例えば、コール酸ナトリウム）、夫々0.1～0.3mMの核酸合成基質（例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP）、10～80単位/mLの核酸合成酵素（例えば、Taq DNAポリメラーゼ）を含有するpH8～9の10mMの緩衝液（例えば、Tris-HCl緩衝液）を調製し、本発明に係る核酸増幅反応用反応液とする。この本発明に係る核酸増幅反応用反応液20～25 μL にクラミジア・トラコマティスの精製DNA試料1～100ngを加え、本発明に係る核酸増幅反応用試料を得る。

[0127] この本発明に係る核酸増幅反応用試料を用い、サーマルサイクラー等を用いて本発明に係る核酸増幅反応（例えば、リアルタイムPCR）を行う。

[0128] 即ち、93℃～98℃、5～15分加熱した後、（1）93℃～98℃、10～30秒→（2）50～70℃、30～90秒を1サイクルとして、30～55サイクル行い、1サイクル毎にレポーター蛍光色素由来の蛍光強度量を測定する。

[0129] この場合、レポーター蛍光色素由来の蛍光が測定された場合に、クラミジア・トラコマティス陽性と判定される。

[0130] 更に、自体公知の方法により検量線を作成することによって、試料中のクラミジア・トラコマティスの数を計算することもできる。

[0131] （b' - 1 - 2）本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を用いる場合

まず、自体公知の方法に従って、クラミジア・トラコマティスを検出する試料中から精製DNA試料を得る。

[0132] 別に、例えば、DNAシンセサイザーを用い、ホスホアミダイト法にて、本発明に係る第1プライマー対（即ち、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号6で表される塩基配列からなるリバースプライマー）及び本発明に係る第2プライマー対（例えば、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号10で

表される塩基配列からなるリバースプライマー)を合成する。

[0133] 次いで、本発明に係る第1プライマー対を用いた本発明に係る核酸増幅反応(例えば、PCR)で増幅される塩基配列から、プローブとして利用するための配列を設計し、この塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを合成する。さらに、このオリゴヌクレオチドの5'末端にレポーター蛍光色素のFAMを、3'末端にクエンチャー色素のTAMRAを自体公知の方法により結合し、蛍光標識プローブ(第1標識プローブ)を得る。

[0134] また、本発明に係る第2プライマー対(例えば、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号10で表される塩基配列からなるリバースプライマー)を用いた本発明に係る核酸増幅反応(例えば、PCR)で増幅される塩基配列から、プローブとして利用するための配列を設計し、この塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを合成する。さらに、このオリゴヌクレオチドの5'末端にレポーター蛍光色素のHEXを、3'末端にクエンチャー色素のTAMRAを自体公知の方法により結合し、蛍光標識プローブ(第2標識プローブ)を得る。

[0135] 上記で合成した本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を増幅用プライマーとして用い、例えば下記の通り本発明に係る核酸増幅反応(例えば、リアルタイムPCR)を行う。

[0136] 即ち、各0.1~2 μ Mの本発明に係る第1プライマー対を構成するプライマー、各0.1~2 μ Mの本発明に係る第2プライマー対を構成するプライマー、0.1~1 μ Mの第1標識プローブ、0.1~1 μ Mの第2標識プローブ、1.0~4.0mMの塩(例えば、MgCl₂)、50~100mMの塩(例えば、KCl)、300~600 μ g/mLのポリペプチド(例えば、BSA)、0.05~2%の界面活性剤(例えば、コール酸ナトリウム)、夫々0.1~0.3mMの核酸合成基質(例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、10~80単位/mLの核酸合成酵素(例えば、Taq DNAポリメラーゼ)を含有するpH8~9の10mMの緩衝液(例えば、Tris-HCl緩衝液)を調製し、本発明に係る核酸増幅反応用反

応液とする。この本発明に係る核酸増幅反応用反応液 20～25 μ L にクラミジア・トラコマティスの精製 DNA 試料 1～100 ng を加え、本発明に係る核酸増幅反応用試料を得る。

[0137] この本発明に係る核酸増幅反応用試料を用い、サーマルサイクラー等を用いて本発明に係る核酸増幅反応（例えば、リアルタイム PCR）を行う。

[0138] 即ち、93℃～98℃、5～15分加熱した後、（1）93℃～98℃、10～30秒→（2）50～70℃、30～90秒を1サイクルとして、30～55サイクル行い、1サイクル毎にレポーター蛍光色素由来の蛍光強度量を測定する。

[0139] その結果、第1標識プローブ由来の蛍光、または第2標識プローブ由来の蛍光の少なくともいずれか一方が検出された場合、「その試料は、クラミジア・トラコマティス陽性である。」と判定する。

[0140] 更に、自体公知の方法で検量線を作成することによって、試料中のクラミジア・トラコマティスの数を計算することもできる。

[0141] <3>本発明のクラミジア・トラコマティス検出用試薬キット

本発明のクラミジア・トラコマティス検出用試薬キット（以下、本発明の試薬キットと略記する場合がある。）は、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号6で表される塩基配列からなるリバープライマーの組み合わせからなる第1プライマー対を含むことを特徴とするものである。

[0142] 本発明の試薬キットには、更に、本発明に係る第2プライマー対を用いてもよい。具体的には、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号6で表される塩基配列からなるリバープライマーとの組み合わせからなる第1プライマー対と、配列番号7～9の何れかで表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基配列からなるリバープライマーとの組み合わせからなる第2プライマー対とを含むプライマーセットを含んでなるものが挙げられる。

[0143] 本発明の試薬キットにおいて、本発明に係る第1プライマー対及び第2プ

ライマー対を含ませる場合には、以下に示す表 2 の（１）又は（２）が好ましく、（１）がより好ましい。

[0144] [表2]

	第1プライマー対		第2プライマー対	
(1)	フォワードプライマー	配列番号5	フォワードプライマー	配列番号7
	リバースプライマー	配列番号6	リバースプライマー	配列番号10
(2)	フォワードプライマー	配列番号5	フォワードプライマー	配列番号8
	リバースプライマー	配列番号6	リバースプライマー	配列番号10

[0145] 本発明の試薬キットにおいて、本発明に係るプライマーの少なくとも一つは標識物質で標識されたものであってもよい。

[0146] 例えば、本発明の試薬キットにおいて、標識物質で標識された本発明に係るプライマーを含ませる場合であって、C T検出用プライマーとして本発明に係る第1プライマー対のみを含ませる場合は、フォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方が標識物質で標識されていればよい。

[0147] 例えば、本発明の試薬キットにおいて、標識物質で標識された本発明に係るプライマーを含ませる場合であって、本発明に係る第1プライマー対と本発明に係る第2プライマー対の2つのプライマー対を含ませる場合は、本発明に係る第1プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方および本発明に係る第2プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。

[0148] 本発明の試薬キットに含まれる、プライマー、プライマー対、プライマーセット、標識物質及びプライマーを標識物質で標識する方法の詳細については、＜1＞本発明のクラミジア・トラコマティス検出用プライマーセットにおいて記載した通りである。

[0149] 本発明の試薬キットにおいて、クラミジア・トラコマティスを検出するための本発明に係るプライマー対に加えて、淋菌を検出するためのプライマー対や内部コントロールとして選択した菌又は当該菌由来の核酸、及び当該菌

を検出するためのプライマー対を含ませてもよい。

[0150] 尚、本発明の試薬キットにおいて、淋菌検出用プライマー対及び内部コントロール検出用プライマー対を構成するプライマーは、それぞれ標識物質で標識されていればよい。

[0151] 例えば、本発明の試薬キットにおいて、標識物質で標識された淋菌検出用プライマー対を含ませる場合は、淋菌検出用プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。

[0152] 例えば、本発明の試薬キットにおいて、標識物質で標識された内部コントロール検出用プライマー対を含ませる場合は、内部コントロール検出用プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。

[0153] 例えば、本発明の試薬キットにおいて、標識物質で標識された淋菌検出用プライマー対及び内部コントロール検出用プライマー対を含ませる場合は、淋菌検出用プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方及び内部コントロール検出用プライマー対のフォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも一方がそれぞれ標識物質で標識されていればよい。

[0154] 本発明の試薬キット中において、通常この分野で用いられる試薬類、例えば、緩衝液、安定化剤、防腐剤等であって、共存する試薬等の安定性を阻害せず、PCR等の核酸増幅反応やハイブリダイゼーション反応を阻害しないものを含ませることができる。また、その濃度も、通常この分野で用いられる濃度範囲から適宜選択すればよい。

[0155] 緩衝液の具体例を挙げると、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等、通常のPCR等の核酸増幅反応やハイブリダイゼーション反応を実施する場合に用いられている緩衝液は全て挙げられ、そのpHも特に限定されないが、通常5～9の範囲が好ましい。

[0156] また、必要に応じて核酸合成酵素（例えば、Taq DNAポリメラーゼ等）、核酸合成基質（例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP等）、インターカレーター（例えば、エチジウムブロマイド、SYBR™ Green I等）、標識物質（例えば、FAM、TAMRA等）、蛍光標識プローブ、電気泳動用試薬（例えば、ゲル）、DNAマーカー等を含ませることができる。

[0157] さらに、本発明の試薬キットには、本発明のクラミジア・トラコマティスを検出する方法、クラミジア・トラコマティスの有無を判断するための説明書等を含ませておいてもよい。当該「説明書」とは、当該方法における特徴、原理、操作手順、判定手順等が文章又は図表等により実質的に記載されている当該キットの取り扱い説明書、添付文章、あるいはパンフレット等を意味する。

[0158] 以下、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、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

[0159] 実施例で用いられる細菌は、いずれも臨床分離株であり、培養後、コロニーの形状や従来の各種生化学的試験などによって菌種が既に鑑別されているものである。

[0160] 実施例 1 本発明に係る第 1 プライマー対を用いたクラミジア・トラコマティスの検出

[0161] (1) プライマー対（本発明に係る第 1 プライマー対）

下記表 3 に示す塩基配列からなるフォワードプライマー（CT1P1F-2）とリバースプライマー（CT1P1R-9）とを用いた。尚、フォワードプライマー（CT1P1F-2）は、その配列の 5' 末端を蛍光物質 TAMRA で標識したものをを用いた。

[0162] [表3]

プライマー		塩基配列	配列番号
フォワード	CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaaataatc - 3'	5
リバース	CT1P1R-9	5' - aagctttttccgcatccaaacca - 3'	6

[0163] (2) ターゲット配列

本発明に係る第1プライマー対 (CT1P1F-2 及び CT1P1R-9) は、潜在プラスミドの全塩基配列 (GenBank ID: HE603230.1) のうち、塩基番号4770~4917の領域 (配列番号2:148塩基対) からなる塩基配列をターゲット配列とする。

[0164] (3) クラミジアDNAの調製

下記表4に示す各クラミジア (クラミジア属: Chlamydia trachomatis、クラミドフィラ属: Chlamydophila caviae, Chlamydophila pneumoniae, Chlamydophila psittaci, Chlamydophila pecorum) を自体公知の方法に従って培養した後、自体公知の核酸精製法を用いて精製ゲノムDNAを取得した。各々の得られた精製DNAのコピー数はSYBR™ Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ株式会社製) を用い、リアルタイムPCR装置 [StepOnePlus™ (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)] で算出した。該精製DNAはTE緩衝液 (pH 8.0) (株式会社ニッポンジーン製) を用い、 $10^5 \text{ copy} / \mu\text{L}$ に調製し、クラミジアDNAとした。

尚、用いた細菌株は、すべて岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 公文裕巳教授の研究室から供与されたものである。

[0165]

[表4]

種	株
<i>C. caviae</i>	GPIC
<i>C. pneumoniae</i>	KKpn
	TW183
<i>C. psittaci</i>	cal10
	6BC
	Budgerigan-1
<i>C. trachomatis</i>	A (Serovar)
	B (Serovar)
	Ba (Serovar)
	C (Serovar)
	D (Serovar)
	E (Serovar)
	F (Serovar)
	G (Serovar)
	H (Serovar)
	I (Serovar)
	J (Serovar)
	K (Serovar)
	L1 (Serovar)
	L2 (Serovar)
	L3 (Serovar)

[0166] (4) P C R

上記(1)の各0.8 μ Mのプライマー(CT1P1F-2及びCT1P1R-9)、1.2 mMのMgCl₂、100 μ g/mLのBSA、1%のポリエチレングリコール、0.2%のプロクリン300(シグマアルドリッチ株式会社製)、夫々0.25 mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP(東洋紡株式会社製)並びに60単位/mLのKOD Exo(-)(東洋紡株式会社製)を含有する10 mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を調製し、これをPCR用反応液とした。

上記(3)で調製した各クラミジアDNA 1 μ Lを、得られたPCR用反応液25 μ Lに懸濁し、これをPCR用試料とした。

このPCR用試料を96 well plate(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)に入れ、StepOnePlus™(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)を用いて、PCRを行った。反応は95℃で2分加熱した後、(1)97℃で10秒→(2)65.

5℃で20秒→(3)71. 5℃で30秒を1サイクルとして、40サイクルを行った。

その後、得られた核酸増幅産物を、全自動マイクロチップ型キャピラリー電気泳動装置2100バイオアナライザー（アジレントテクノロジー株式会社製）を用いて、機器に添付のプロトコルに従ってキャピラリー電気泳動することで、得られた核酸増幅産物の分離・検出を行った。

[0167] (5) 結果

キャピラリー電気泳動の結果を、下記表5にまとめた。表5において、結果が陽性とは、ターゲットの148塩基対の核酸増幅産物が検出されたことを示す。結果が陰性とは、ターゲットの核酸増幅産物が検出されなかったことを示す。

[0168] [表5]

種	株	結果
<i>C. caviae</i>	GPIC	陰性
<i>C. pneumoniae</i>	KKpn	陰性
	TW183	陰性
<i>C. psittaci</i>	cal10	陰性
	6BC	陰性
	Budgerigan-1	陰性
<i>C. trachomatis</i>	A (Serovar)	陽性
	B (Serovar)	陽性
	Ba (Serovar)	陽性
	C (Serovar)	陽性
	D (Serovar)	陽性
	E (Serovar)	陽性
	F (Serovar)	陽性
	G (Serovar)	陽性
	H (Serovar)	陽性
	I (Serovar)	陽性
	J (Serovar)	陽性
	K (Serovar)	陽性
	L1 (Serovar)	陽性
	L2 (Serovar)	陽性
	L3 (Serovar)	陽性

[0169] 表5の結果より明らかな通り、本発明に係る第1プライマー対を用い、クラミジア・トラコマティスの各々の株に由来するDNA試料を鋳型としてPCRを行った場合のみ、ターゲットの核酸増幅産物が確認され、これらの試

料はクラミジア・トラコマティス陽性と判定できた。

一方、クラミジア・トラコマティス以外の菌に由来するDNA試料を鋳型としてPCRを行った場合には、該当するターゲットの核酸増幅産物は確認されず、これらの試料は、クラミジア・トラコマティス陰性と判定できた。

[0170] 以上のことより、本発明に係る第1プライマー対を用いて、核酸増幅反応を行うことで、クラミジア・トラコマティスを特異的に検出可能であることがわかった。

[0171] 実施例2、比較例1および2 各種プライマー対を用いたPCRに対するヒトゲノムDNAの影響

[0172] (1) プライマー対

・本発明に係る第1プライマー対（実施例2）

実施例1と同じプライマー対を用いた。

・特許文献1のプライマー対（比較例1）

特許文献1（特許第5811086号公報）に開示されているプライマー対として、下記表6に示す塩基配列からなるフォワードプライマー（Ishik Fw）とリバースプライマー（Ishik Rv）とを用いた。

尚、リバースプライマー（Ishik Rv）は、その配列の5'末端を蛍光物質TAMRAで標識したものをを用いた。

・非特許文献1のプライマー対（比較例2）

非特許文献1（Moller, J. K., et al., Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46, p. 3892-3895）に開示されているプライマー対として、下記表6に示す塩基配列からなるフォワードプライマー（Mollar Fw）とリバースプライマー（Mollar Rv）とを用いた。

尚、フォワードプライマー（Mollar Fw）は、その配列の5'末端を蛍光物質TAMRAで標識したものをを用いた。

使用した各プライマー対を、下記表6にまとめた。

[0173]

[表6]

	プライマー		塩基配列	配列番号
実施例2	フォワード	CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaaataatc - 3'	5
	リバーズ	CT1P1R-9	5' - aagctttttccgcatccaaacca - 3'	6
比較例1	フォワード	IshikFw	5' - cgctcaaggaccagcaaata - 3'	11
	リバーズ	IshikRv	5' - gctttttccgcatccaaac - 3'	12
比較例2	フォワード	MollarFw	5' - ccgctcaaggaccagcaa - 3'	13
	リバーズ	MollarRv	5' - agaagcattggttgatgaatta - 3'	14

[0174] (2) ヒトゲノムDNAの調製

健常者（クラミジア・トラコマティス非感染者）のヒト全血からDNAを、NucleoSpin™Blood XLキット（マッハライナーゲル株式会社製）にて精製した。次いで、Etachinmate（株式会社ニッポンジーン製）にて濃縮し、TE緩衝液（pH 8.0）（株式会社ニッポンジーン製）を用い、1 mg/mLに調製し、これをヒトゲノムDNAとした。

[0175] (3) PCR

プライマー対として、本発明に係る第1プライマー対、特許文献1のプライマー対、並びに非特許文献1のプライマー対を用いた以外は、実施例1（4）と同様の方法により、以下のPCR用反応液をそれぞれ調製した。

- ・本発明に係る第1プライマー対を含むPCR用反応液
- ・特許文献1のプライマー対を含むPCR用反応液
- ・非特許文献1のプライマー対を含むPCR用反応液

上記（2）で調製したヒトゲノムDNA 1 μLを、3種のPCR用反応液25 μLにそれぞれ懸濁添加し、これをPCR用試料とした。

このPCR用試料を用い、実施例1（4）と同様の方法によりPCRを行い、次いで、キャピラリー電気泳動することで、核酸増幅産物の分離、検出を行った。

[0176] (4) 結果

キャピラリー電気泳動の結果を、図1に示す。図1の各レーンにおいて使用したプライマー対を下記表7に示す。

また、図 1 において、バンドは、核酸増幅産物が検出されたことを示す。尚、PCR 用試料は、クラミジア・トラコマティス DNA を含まないので、核酸増幅産物を示すバンドが検出された場合、そのバンドは非特異的に核酸が増幅されていること（非特異的核酸増幅産物が得られたこと）を示す。

[0177] [表7]

	レーン	プライマー		配列番号
比較例2	1	フォワード	MollarFw	13
		リバーズ	MollarRv	14
比較例1	2	フォワード	IshikFw	11
		リバーズ	IshikRv	12
実施例2	3	フォワード	CT1P1F-2	5
		リバーズ	CT1P1R-9	6

[0178] 図 1 の結果から明らかな通り、本発明に係る第 1 プライマー対を用いて PCR を行った場合（レーン 3：実施例 2）、ヒトゲノム DNA 存在下であっても、核酸増幅産物の増幅を示すバンドは検出されなかった。即ち、非特異的に核酸が増幅されていないことがわかった。

一方、特許文献 1 に開示のプライマー対を用いて PCR を行った場合（レーン 2：比較例 1）、及び非特許文献 1 に開示のプライマー対を用いて PCR を行った場合（レーン 1：比較例 2）、ヒトゲノム DNA 存在下において、核酸増幅産物を示すバンドが多数検出された。即ち、非特異的に核酸が増幅されていることがわかった。

特に、150 塩基対付近のバンド（レーン 2：比較例 1）は、特許文献 1 に開示のプライマー対の潜在プラスミドのターゲット配列である 145 塩基対に極めて近いため、偽陽性となる可能性が極めて高いことがわかった。

[0179] 以上の結果より、本発明に係る第 1 プライマー対を用いると、非特異的な核酸の増幅を抑制することができるため、偽陽性となる可能性が極めて低いことがわかった。

一方、特許文献 1 に開示のプライマー対、及び非特許文献 1 に開示のプライマー対を用いると、非特異的な核酸の増幅を抑制できないため、偽陽性となる可能性が高いことがわかった。

[0180] 実施例3および比較例3 ヒトゲノムDNA存在下におけるクラミジア・トラコマティスの検出

[0181] (1) プライマー対

・本発明に係る第1プライマー対（実施例3）

実施例1と同じプライマー対を用いた。

・非特許文献1のプライマー対（比較例3）

比較例2と同じプライマー対を用いた。

使用した各プライマー対を、下記表8にまとめた。

[0182] [表8]

	プライマー		塩基配列	配列番号
実施例3	フォワード	CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaaataatc - 3'	5
	リバース	CT1P1R-9	5' - aagctttttccgcatccaaccca - 3'	6
比較例3	フォワード	MollarFw	5' - ccgctcaaggaccagcaa - 3'	13
	リバース	MollarRv	5' - agaagcattggttgatgaatta - 3'	14

[0183] (2) ターゲット配列

本発明に係る第1プライマー対（実施例3）は、潜在プラスミドの全塩基配列（GenBank ID: HE603230.1）のうち、塩基番号4770～4917の領域（148塩基対：配列番号2）からなる塩基配列をターゲット配列とする。

非特許文献1のプライマー対（比較例3）は、潜在プラスミドの全塩基配列（GenBank ID: HE603230.1）のうち、塩基番号4770～4886の領域（117塩基対：配列番号20）からなる塩基配列をターゲット配列とする。

(3) クラミジアDNAの調製

実施例1(3)で調製した、各C. trachomatis株（A、B、Ba、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L1、L2、L3）から精製したクラミジアDNAを用いた。

[0184] (4) ヒトゲノムDNAの調製

実施例2(2)で調製したヒトゲノムDNAを用いた。

[0185] (5) P C R

プライマー対として、本発明に係る第1プライマー対、並びに非特許文献1のプライマー対を用いた以外は、実施例1(4)と同様の方法により、以下のP C R用反応液をそれぞれ調製した。

- ・本発明に係る第1プライマー対を含むP C R用反応液
- ・非特許文献1のプライマー対を含むP C R用反応液

上記(3)及び(4)で調製した各クラミジアDNA 1 μ L及びヒトゲノムDNA 1 μ Lを、2種のP C R用反応液25 μ Lにそれぞれ懸濁添加し、P C R用試料を調製した。

これら各種P C R用試料を用い、実施例1(4)と同様の方法により、P C R、キャピラリー電気泳動をすることで、核酸増幅産物の分離、検出を行った。

[0186] (6) 結果

キャピラリー電気泳動の結果を図2に示す。図2の各レーンと増幅に用いたプライマー対及びクラミジアDNAとの関係を下記表9に示す。

また、図2において、バンドは核酸増幅産物が検出されたことを示す。

尚、本発明に係る第1プライマー対を用いた場合(実施例3)は、ターゲット配列が148塩基対であるので、148塩基対付近にバンドが検出されれば、ターゲットであるクラミジア・トラコマティスを検出できたと言える。

また、非特許文献1のプライマー対(比較例3)を用いた場合は、ターゲット配列が117塩基対であるので、117塩基対付近にバンドが検出されれば、ターゲットであるクラミジア・トラコマティスを検出できたと言える。

[0187]

[表9]

	レーン	クラミジアDNA (血清型)	プライマー	配列番号
実施例3	1	A	フォワード:CT1P1F-2 リバーズ:CT1P1R-9	5 6
	2	B		
	3	Ba		
	4	C		
	5	D		
	6	E		
	7	F		
	8	G		
	9	H		
	10	I		
	11	J		
	12	K		
	13	L1		
	14	L2		
	15	L3		
比較例3	16	A	フォワード:MollarFw リバーズ:MollarRv	13 14
	17	B		
	18	Ba		
	19	C		
	20	D		
	21	E		
	22	F		
	23	G		
	24	H		
	25	I		
	26	J		
	27	K		
	28	L1		
	29	L2		
	30	L3		

[0188] 図2の結果から明らかな通り、本発明に係る第1プライマー対を用いてPCRを行った場合（レーン1～15：実施例3）、すべての血清型のクラミジア・トラコマティスで148塩基対付近にバンドが検出され、クラミジア・トラコマティスの複数血清型を検出することができた。さらに、非特異的な核酸の増幅を示すバンド、即ち148塩基対付近以外のバンドは検出されなかった。

[0189] 一方、非特許文献1のプライマー対を用いてPCRを行った場合（レーン16～30：比較例3）、血清型D（レーン20）および血清型H（レーン24）については、117塩基対付近に薄くバンドが認められたが、これら

以外についてはバンドが認められず、すべての血清型を検出することはできなかった。また、150～1000塩基対の間に、非特異的な核酸の増幅を示すバンドが多数確認された。

[0190] 以上の結果より、本発明に係る第1プライマー対を用いると、全ての血清型を検出することができ、偽陰性となる可能性が極めて低いことがわかった。また、偽陽性の原因となる非特異的な核酸の増幅を抑制することができることもわかった。

一方、非特許文献1のプライマー対を用いると、クラミジア・トラコマティスの全ての血清型を検出することはできないことがわかった。更に、偽陽性の原因となる非特異的な核酸の増幅を抑制できないこともわかった。

[0191] 実施例4 本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を用いたクラミジア・トラコマティスの検出

[0192] (1) プライマー対

・本発明に係る第1プライマー対

実施例1と同じプライマー対を用いた。

・本発明に係る第2プライマー対

下記表10に示す塩基配列からなるフォワードプライマー（CT2F-4）とリバースプライマー（CT2__8）とを用いた。

尚、リバースプライマー（CT2__8）は、その配列の5'末端を蛍光物質TAMRAで標識したものをを用いた。

リバースプライマー（CT2__8）は、WO93/00447のSeq ID92に開示されているものである。

・淋菌検出用プライマー対

下記表10に示す塩基配列からなるフォワードプライマー（NG21F）とリバースプライマー（NG24R）とを用いた。

尚、リバースプライマー（NG24R）は、その配列の5'末端を蛍光物質TAMRAで標識したものをを用いた。

フォワードプライマー（NG21F）は、WO96/12824のSeq

ＩＤ１２に開示されている配列の５'末端を５塩基削り、３'末端に２塩基付加したものである。リバープライマー（ＮＧ２４Ｒ）は、ＷＯ９３／００４４７のＳｅｑＩＤ１０８に開示されているものである。

淋菌検出用プライマー対は、このプライマー対が存在していても、本発明に係る第１プライマー対及び本発明に係る第２プライマー対を含むプライマーセットを用いてクラミジア・トラコマティスを検出できるか否かを検証するために用いた。

使用した各プライマー対を、下記表１０にまとめた。

[0193] [表10]

プライマー対名称	プライマー		塩基配列	配列番号
第1プライマー対	フォワード	CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaataatc - 3'	5
	リバー	CT1P1R-9	5' - aagcttttccgcatccaacca - 3'	6
第2プライマー対	フォワード	CT2F-4	5' - ccagaaaaagatagcgagcacaaagagag - 3'	7
	リバー	CT2 8	5' - cacagaattccgctgatcataagg - 3'	10
淋菌検出用 プライマー対	フォワード	NG21F	5' - attgtgttgaacaccgcccg - 3'	15
	リバー	NG24R	5' - ttcggctccttattcggttgacc - 3'	16

[0194] (2) ターゲット配列

本発明に係る第１プライマー対は、潜在プラスミドの全塩基配列（ＧｅｎＢａｎｋＩＤ：ＨＥ６０３２３０．１）のうち、塩基番号４７７０～４９１７の領域（１４８塩基対：配列番号２）からなる塩基配列をターゲット配列とする。

本発明に係る第２プライマー対は、ＣＴゲノムＤＮＡの全塩基配列（ＧｅｎＢａｎｋＩＤ：ＨＥ６０１７９６．２）のうち、塩基番号７８２２６４～７８２４３６の領域（１７３塩基対：配列番号３）からなる塩基配列をターゲット配列とする。

[0195] (3) クラミジアＤＮＡの調製

実施例１（３）で調製した、各クラミジア株から精製したクラミジアＤＮＡを用いた。

[0196] (4) マルチプレックスＰＣＲ

各０．８μＭのプライマー（ＣＴ１Ｐ１Ｆ－２及びＣＴ１Ｐ１Ｒ－９）、各０．４μＭのプライマー（ＣＴ２Ｆ－４及びＣＴ２__８）、各０．１５μ

Mのプライマー（NG21F及びNG24R）、1.2 mMのMgCl₂、100 μg/mLのBSA、1%のポリエチレングリコール、0.2%のプロクリン300（シグマアルドリッチ株式会社製）、夫々0.25 mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP（東洋紡株式会社製）並びに60単位/mLのKOD Exo（-）（東洋紡株式会社製）を含有する10 mM Tris-HCl緩衝液（pH8.0）を調製し、これをマルチプレックスPCR用反応液とした。

上記（3）で調製した各クラミジアDNA 1 μLを、マルチプレックスPCR用反応液25 μLに懸濁添加し、これをマルチプレックスPCR用試料とした。

このマルチプレックスPCR用試料を96 well plate（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製）に入れ、サーマルサイクラー〔StepOne Plus™（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製）〕を用いて、マルチプレックスPCRを行った。

反応は95℃で2分加熱した後、（1）97℃で10秒→（2）65.5℃で20秒→（3）71.5℃で30秒を1サイクルとして、40サイクルを行った。

その後、得られた核酸増幅産物を、全自動マイクロチップ型キャピラリー電気泳動装置2100バイオアナライザー（アジレントテクノロジー株式会社製）を用いて、機器に添付のプロトコルに従ってキャピラリー電気泳動をすることで、得られた核酸増幅産物の分離・検出を行った。

[0197] （5）結果

キャピラリー電気泳動の結果を、下記表11にまとめた。表11において、結果が陽性とは、ターゲットの148塩基対の核酸増幅産物、またはターゲットの173塩基対の核酸増幅産物の少なくとも何れか一方が検出されたことを示す。結果が陰性とは、ターゲットである、潜在プラスミドの全塩基配列のうち目的の核酸増幅産物、及びCTゲノムDNAの全塩基配列のうち目的の核酸増幅産物が検出されなかったことを示す。

[0198] [表11]

種	株	結果
<i>C. caviae</i>	GPIC	陰性
<i>C. pneumoniae</i>	KKpn	陰性
	TW183	陰性
<i>C. psittaci</i>	cal10	陰性
	6BC	陰性
	Budgerigan-1	陰性
<i>C. trachomatis</i>	A (Serovar)	陽性
	B (Serovar)	陽性
	Ba (Serovar)	陽性
	C (Serovar)	陽性
	D (Serovar)	陽性
	E (Serovar)	陽性
	F (Serovar)	陽性
	G (Serovar)	陽性
	H (Serovar)	陽性
	I (Serovar)	陽性
	J (Serovar)	陽性
	K (Serovar)	陽性
	L1 (Serovar)	陽性
	L2 (Serovar)	陽性
	L3 (Serovar)	陽性

[0199] 表 1 1 の結果より明らかな通り、本発明に係る第 1 プライマー対及び本発明に係る第 2 プライマー対を含むプライマーセットを用い、クラミジア・トラコマティスの各々の株に由来する DNA 試料を鋳型として PCR を行った場合のみ、ターゲットの核酸増幅産物が確認され、これらの試料はクラミジア・トラコマティス陽性と判定できた。

[0200] 一方、クラミジア・トラコマティス以外の菌に由来する DNA 試料を鋳型として、本発明に係る第 1 プライマー対及び本発明に係る第 2 プライマー対を含むプライマーセットを用いて同様にマルチプレックス PCR を行った場合には、該当するターゲットの核酸増幅産物は確認されず、これらの試料は、クラミジア・トラコマティス陰性と判定できた。

[0201] また、淋菌検出用プライマー対が存在していても、本発明に係る第 1 プライマー対及び本発明に係る第 2 プライマー対を含むプライマーセットを用いて、クラミジア・トラコマティスを特異的に検出することができた。

[0202] 以上のことより、本発明に係る第 1 プライマー対及び本発明に係る第 2 プ

ライマー対を含むプライマーセットを用いて、クラミジア・トラコマティス
を特異的に検出可能であることがわかった。

[0203] 実施例 5 および比較例 4 各種プライマー対を用いた PCR に対するヒトゲ
ノム DNA の影響

[0204] (1) プライマー対

- ・本発明に係る第 1 プライマー対

実施例 1 と同じプライマー対を用いた。

- ・本発明に係る第 2 プライマー対 (a)

実施例 4 と同じプライマー対を用いた。

- ・本発明に係る第 2 プライマー対 (b)

下記表 1 2 に示す塩基配列からなるフォワードプライマー (CT2F-5)
) とリバースプライマー (CT2__8) とを用いた。

尚、リバースプライマー (CT2__8) は、その配列の 5' 末端を蛍光物
質 TAMRA で標識したものをを用いた。

- ・本発明に係る第 2 プライマー対 (c)

下記表 1 2 に示す塩基配列からなるフォワードプライマー (CT2F-6)
) とリバースプライマー (CT2__8) とを用いた。

尚、リバースプライマー (CT2__8) は、その配列の 5' 末端を蛍光物
質 TAMRA で標識したものをを用いた。

- ・特許文献 1 のプライマー対

比較例 1 と同じプライマー対を用いた。

- ・CT ゲノム DNA を対象とする公知プライマー対

下記表 1 2 に示す塩基配列からなるフォワードプライマー (CT2__7)
とリバースプライマー (CT2__8) とを用いた。

尚、リバースプライマー (CT2__8) は、その配列の 5' 末端を蛍光物
質 TAMRA で標識したものをを用いた。

CT ゲノム DNA を対象とする公知プライマー対を構成するフォワードプ
ライマー (CT2__7) は、US 5 5 7 3 9 0 7 の Seq ID 2 に記載され

ている。リバープライマー（CT2__8）は、WO93/00447のSeq ID 92に記載されている。

・淋菌検出用プライマー対

実施例4と同じプライマー対を用いた。

使用した各プライマー対を、下記表12にまとめた。

[0205] [表12]

	プライマー対名称	プライマー	塩基配列	配列番号
実施例 (5-1)	第1プライマー対	フォワード CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaataatc - 3'	5
		リバー CT1P1R-9	5' - aagctttttccgcatccaaacca - 3'	6
	第2プライマー対(a)	フォワード CT2F-4	5' - ccagaaaaagatagcgagcacaagagag - 3'	7
		リバー CT2 8	5' - cacagaattccgctcgatcataagg - 3'	10
	淋菌検出用 プライマー対	フォワード NG21F	5' - attgtgtgaaacaccgcccg - 3'	15
		リバー NG24R	5' - ttccgctccttattcggttgacc - 3'	16
実施例 (5-2)	第1プライマー対	フォワード CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaataatc - 3'	5
		リバー CT1P1R-9	5' - aagctttttccgcatccaaacca - 3'	6
	第2プライマー対(b)	フォワード CT2F-5	5' - ccagaaaaagatagcgagcacaagaga - 3'	8
		リバー CT2 8	5' - cacagaattccgctcgatcataagg - 3'	10
	淋菌検出用 プライマー対	フォワード NG21F	5' - attgtgtgaaacaccgcccg - 3'	15
		リバー NG24R	5' - ttccgctccttattcggttgacc - 3'	16
実施例 (5-3)	第1プライマー対	フォワード CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaataatc - 3'	5
		リバー CT1P1R-9	5' - aagctttttccgcatccaaacca - 3'	6
	第2プライマー対(c)	フォワード CT2F-6	5' - gccagaaaaagatagcgagcacaagag - 3'	9
		リバー CT2 8	5' - cacagaattccgctcgatcataagg - 3'	10
	淋菌検出用 プライマー対	フォワード NG21F	5' - attgtgtgaaacaccgcccg - 3'	15
		リバー NG24R	5' - ttccgctccttattcggttgacc - 3'	16
比較例4	特許文献1の プライマー対	フォワード IshikFw	5' - cgctcaaggaccagcaata - 3'	11
		リバー IshikRv	5' - gctttttccgcatccaaac - 3'	12
	CTゲノムDNA対象の プライマー対	フォワード CT2 7	5' - gatagcgagcacaagagagctaa - 3'	17
		リバー CT2 8	5' - cacagaattccgctcgatcataagg - 3'	10
	淋菌検出用 プライマー対	フォワード NG21F	5' - attgtgtgaaacaccgcccg - 3'	15
		リバー NG24R	5' - ttccgctccttattcggttgacc - 3'	16

[0206] (2) ヒトゲノムDNAの調製

実施例2(2)で調製したヒトゲノムDNAを用いた。

[0207] (3) マルチプレックスPCR

プライマー対として、上記(1)を用いた以外は、実施例4(4)と同様の方法により、以下のマルチプレックスPCR用反応液をそれぞれ調製した。

・本発明に係る第1プライマー対、本発明に係る第2プライマー対(a)、
淋菌検出用プライマー対を含むマルチプレックスPCR用反応液

・本発明に係る第1プライマー対、本発明に係る第2プライマー対(b)、
淋菌検出用プライマー対を含むマルチプレックスPCR用反応液

- ・本発明に係る第1プライマー対、本発明に係る第2プライマー対(c)、
淋菌検出用プライマー対を含むマルチプレックスPCR用反応液

- ・特許文献1のプライマー対、CTゲノムDNA対象のプライマー対、淋菌
検出用プライマー対を含むマルチプレックスPCR用反応液

上記(2)で調製したヒトゲノムDNA 1 μ Lを、4種のマルチプレックスPCR用反応液25 μ Lにそれぞれに懸濁添加し、これをマルチプレックスPCR用試料とした。

このマルチプレックスPCR用試料を用い、実施例4(4)と同様の方法により、マルチプレックスPCR、キャピラリー電気泳動をすることで、核酸増幅産物の分離、検出を行った。

[0208] (4) 結果

キャピラリー電気泳動の結果を、図3に示す。図3の各レーンにおいて使用したプライマー対を、下記表13に示す。

また、図3において、バンドは、核酸増幅産物が検出されたことを示す。尚、マルチプレックスPCR用試料は、クラミジア・トラコマティスDNAを含まないので、核酸増幅産物を示すバンドが検出された場合、そのバンドは非特異的に核酸が増幅されていること(非特異的核酸増幅産物が得られたこと)を示す。

[0209]

[表13]

	レーン	プライマー対名称	プライマー		配列番号
実施例 (5-1)	1	第1プライマー対	フォワード	CT1P1F-2	5
			リバース	CT1P1R-9	6
		第2プライマー対(a)	フォワード	CT2F-4	7
			リバース	CT2_8	10
		淋菌検出用 プライマー対	フォワード	NG21F	15
			リバース	NG24R	16
実施例 (5-2)	2	第1プライマー対	フォワード	CT1P1F-2	5
			リバース	CT1P1R-9	6
		第2プライマー対(b)	フォワード	CT2F-5	8
			リバース	CT2_8	10
		淋菌検出用 プライマー対	フォワード	NG21F	15
			リバース	NG24R	16
実施例 (5-3)	3	第1プライマー対	フォワード	CT1P1F-2	5
			リバース	CT1P1R-9	6
		第2プライマー対(c)	フォワード	CT2F-6	9
			リバース	CT2_8	10
		淋菌検出用 プライマー対	フォワード	NG21F	15
			リバース	NG24R	16
比較例4	4	特許文献1の プライマー対	フォワード	IshikFw	11
			リバース	IshikRv	12
		CTゲノムDNA対象の プライマー対	フォワード	CT2_7	17
			リバース	CT2_8	10
		淋菌検出用 プライマー対	フォワード	NG21F	15
			リバース	NG24R	16

[0210] 図3の結果から明らかな通り、特許文献1のプライマー対およびCTゲノムDNA対象のプライマー対を含むプライマーセットを用いて、マルチプレックスPCRを行った場合（レーン4：比較例4）、非特異的な核酸の増幅を示す蛍光強度の高い（濃い）バンドが多数検出された。

特に、140～200塩基対の間の核酸増幅産物（バンド）は、蛍光強度が高く、潜在プラスミドのターゲット配列である145塩基対およびCTゲノムDNAのターゲット配列である164塩基対に近い場合、偽陽性となる可能性が高いことがわかった。

[0211] 一方、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対（a）を含むプライマーセットを用いて、マルチプレックスPCRを行った場合（レーン1：実施例5-1）、本発明に係る第1プライマー対及び本発

明に係る第2プライマー対（b）を含むプライマーセットを用いて、マルチプレックスPCRを行った場合（レーン2：実施例5-2）、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対（c）を含むプライマーセットを用いて、マルチプレックスPCRを行った場合（レーン3：実施例5-3）は、ヒトゲノムDNA存在下であっても、非特異的な核酸の増幅を示すバンドは少なく、バンドの蛍光強度も低い（薄い）ものであった。

また、潜在プラスミドのターゲット配列である148塩基対及びCTゲノムDNAのターゲット配列である173塩基対、174塩基対付近にはバンドが認められないため、偽陽性となる可能性が極めて低いことがわかった。

[0212] 以上の結果より、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を含むプライマーセットを用いると、非特異的な核酸の増幅が抑制され、偽陽性となる可能性が極めて低いことがわかった。

一方、特許文献1のプライマー対およびCTゲノムDNA対象のプライマー対を含むプライマーセットを用いると、非特異的な核酸の増幅は抑制されず、偽陽性となる可能性が高いことがわかった。

[0213] 実施例6および比較例5 ヒトゲノムDNA存在下におけるクラミジア・トラコマティスの検出

[0214] （1）プライマー対

- ・ 本発明に係る第1プライマー対
実施例1と同じプライマー対を用いた。
- ・ 本発明に係る第2プライマー対（a）
実施例4と同じプライマー対を用いた。
- ・ 本発明に係る第2プライマー対（b）
実施例5と同じプライマー対を用いた。
- ・ 特許文献1のプライマー対
比較例1と同じプライマー対を用いた。
- ・ CTゲノムDNA対象のプライマー対
比較例4と同じプライマー対を用いた。

・淋菌検出用プライマー対

実施例 4 と同じプライマー対を用いた。

使用した各プライマー対を、下記表 14 にまとめた。

[0215] [表14]

	プライマー対名称	プライマー	塩基配列	配列番号
実施例 (6-1)	第1プライマー対	フォワード CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaataatc - 3'	5
		リバース CT1P1R-9	5' - aagctttttccgcatccaaacca - 3'	6
	第2プライマー対(a)	フォワード CT2F-4	5' - ccagaaaagatagcgagcacaagagag - 3'	7
		リバース CT2 8	5' - cacagaattccgtcgatcataagg - 3'	10
	淋菌検出用 プライマー対	フォワード NG21F	5' - attgtgtgaaacaccgcccg - 3'	15
		リバース NG24R	5' - ttccgctccttattcggttgacc - 3'	16
実施例 (6-2)	第1プライマー対	フォワード CT1P1F-2	5' - ccgctcaaggaccagcaataatc - 3'	5
		リバース CT1P1R-9	5' - aagctttttccgcatccaaacca - 3'	6
	第2プライマー対(b)	フォワード CT2F-5	5' - ccagaaaagatagcgagcacaagaga - 3'	8
		リバース CT2 8	5' - cacagaattccgtcgatcataagg - 3'	10
	淋菌検出用 プライマー対	フォワード NG21F	5' - attgtgtgaaacaccgcccg - 3'	15
		リバース NG24R	5' - ttccgctccttattcggttgacc - 3'	16
比較例5	特許文献1の プライマー対	フォワード IshikFw	5' - cgctcaaggaccagcaataa - 3'	11
		リバース IshikRv	5' - gctttttccgcatccaaac - 3'	12
	CTゲノムDNA対象の プライマー対	フォワード CT2 7	5' - gatagcgagcacaagagagctaa - 3'	17
		リバース CT2 8	5' - cacagaattccgtcgatcataagg - 3'	10
	淋菌検出用 プライマー対	フォワード NG21F	5' - attgtgtgaaacaccgcccg - 3'	15
		リバース NG24R	5' - ttccgctccttattcggttgacc - 3'	16

[0216] (2) ターゲット配列

本発明に係る第1プライマー対は、潜在プラスミドの全塩基配列 (GenBank ID: HE603230. 1) のうち、塩基番号4770~4917の領域 (148塩基対: 配列番号2) からなる塩基配列をターゲット配列とする。

本発明に係る第2プライマー対 (a) は、CTゲノムDNAの全塩基配列 (GenBank ID: HE601796. 2) のうち、塩基番号782264~782436の領域 (173塩基対: 配列番号3) からなる塩基配列をターゲット配列とする。

本発明に係る第2プライマー対 (b) は、CTゲノムDNAの全塩基配列 (GenBank ID: HE601796. 2) のうち、塩基番号782264~782436の領域 (173塩基対: 配列番号3) からなる塩基配列をターゲット配列とする。

特許文献1のプライマー対は、潜在プラスミドの全塩基配列 (GenBank ID: HE603230. 1) のうち、塩基番号4771~4915の

領域（１４５塩基対：配列番号１９）からなる塩基配列をターゲット配列とする。

ＣＴゲノムＤＮＡ対象のプライマー対は、ＣＴゲノムＤＮＡの全塩基配列（ＧｅｎＢａｎｋＩＤ：ＨＥ６０１７９６．２）のうち、塩基番号７８２２６４～７８２４２７の領域（１６４塩基対：配列番号２０）からなる塩基配列をターゲット配列とする。

[0217] （３）クラミジアＤＮＡの調製

実施例１（３）で調製した、*C. trachomatis* 株（Ｄ）から精製したクラミジアＤＮＡを用いた。

[0218] （４）ヒトゲノムＤＮＡの調製

実施例２（２）で調製したヒトゲノムＤＮＡを用いた。

[0219] （５）マルチプレックスＰＣＲ

プライマー対として、上記（１）を選択した以外は、実施例４（４）と同様の方法により、以下のマルチプレックスＰＣＲ用反応液をそれぞれ調製した。

- ・本発明に係る第１プライマー対、本発明に係る第２プライマー対（ａ）、淋菌検出用プライマー対を含むマルチプレックスＰＣＲ用反応液
- ・本発明に係る第１プライマー対、本発明に係る第２プライマー対（ｂ）、淋菌検出用プライマー対を含むマルチプレックスＰＣＲ用反応液
- ・特許文献１のプライマー対、ＣＴゲノムＤＮＡ対象のプライマー対、淋菌検出用プライマー対を含むマルチプレックスＰＣＲ用反応液

上記で調製したクラミジアＤＮＡ １μＬ及びヒトゲノムＤＮＡ １μＬを、３種のマルチプレックスＰＣＲ用反応液２５μＬそれぞれに懸濁添加し、これをマルチプレックスＰＣＲ用試料とした。

このマルチプレックスＰＣＲ用試料を用い、実施例４（４）と同様の方法により、マルチプレックスＰＣＲ、キャピラリー電気泳動をすることで、核酸増幅産物の分離、検出を行った。

さらに得られた潜在プラスミドのターゲット配列のバンドの蛍光強度（濃

さ) から、増幅された潜在プラスミドの核酸濃度を算出した。

[0220] (6) 結果

キャピラリー電気泳動の結果を図4及び図5に示す。図4及び図5の各レーンにおいて使用したプライマー対を下記表15に示す。

また、図4において、バンドは核酸が増幅されたことを示す。

尚、本発明に係る第1プライマー対および本発明に係る第2プライマー対(a)を含むプライマーセットを用いた場合(実施例6-1)並びに、本発明に係る第1プライマー対および本発明に係る第2プライマー対(b)を含むプライマーセットを用いた場合(実施例6-2)はターゲット配列が148塩基対および173塩基対であるので、148塩基対、または173塩基対付近の何れか一方にバンドが検出された場合、ターゲットであるクラミジア・トラコマティスを検出できたと言える。

特許文献1のプライマー対およびCTゲノムDNA対象のプライマー対を含むプライマーセットを用いた場合(比較例5)は、ターゲット配列が145塩基対および164塩基対であるので、145塩基対付近、または164塩基対付近の何れか一方にバンドが検出された場合、ターゲットであるクラミジア・トラコマティスを検出できたと言える。

また、図5は、図4における潜在プラスミドのターゲット配列のバンドの蛍光強度(濃さ)から、核酸濃度を算出し、グラフ化したものである。

[0221]

[表15]

	レーン	プライマー対名称	プライマー		配列番号
比較例5	1	特許文献1の プライマー対	フォワード	IshikFw	11
			リバーズ	IshikRv	12
		CTゲノムDNA対象の プライマー対	フォワード	CT2_7	17
			リバーズ	CT2_8	10
		淋菌検出用 プライマー対	フォワード	NG21F	15
			リバーズ	NG24R	16
実施例 (6-1)	2	第1プライマー対	フォワード	CT1P1F-2	5
			リバーズ	CT1P1R-9	6
		第2プライマー対(a)	フォワード	CT2F-4	7
			リバーズ	CT2_8	10
		淋菌検出用 プライマー対	フォワード	NG21F	15
			リバーズ	NG24R	16
実施例 (6-2)	3	第1プライマー対	フォワード	CT1P1F-2	5
			リバーズ	CT1P1R-9	6
		第2プライマー対(b)	フォワード	CT2F-5	8
			リバーズ	CT2_8	10
		淋菌検出用 プライマー対	フォワード	NG21F	15
			リバーズ	NG24R	16

[0222] 図4の結果から明らかな通り、特許文献1のプライマー対およびCTゲノムDNA対象のプライマー対を含むプライマーセットを用いてマルチプレックスPCRを行った場合（レーン1：比較例5）、145塩基対および164塩基対付近にバンドが検出され、クラミジア・トラコマティスを検出することができたものの、130～400塩基対付近に、非特異的な核酸の増幅を示す蛍光強度の高い（濃い）バンドが多数確認された。

特に、130～200塩基対の間の核酸増幅産物（バンド）は、蛍光強度が高く、潜在プラスミドのターゲット配列である145塩基対およびCTゲノムDNAのターゲット配列である164塩基対に近い、偽陽性となる可能性が極めて高いことがわかった。

[0223] 一方、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対（a）を含むプライマーセットを用いてマルチプレックスPCRを行った場合（レーン2：実施例6-1）、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対（b）を含むプライマーセットを用いてマルチプレックスPCRを行った場合（レーン3：実施例6-2）、148塩基対及び1

7 3 塩基対付近にバンドが検出され、クラミジア・トラコマティスを検出することができた。

また、非特異的な核酸の増幅を示すバンドは少なく、そのバンドの蛍光強度は低い（薄い）ものであった。

[0224] また、図5の結果から明らかな通り、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対（a）を含むプライマーセットを用いてマルチプレックスPCRを行った場合（レーン2：実施例6-1）、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対（b）を含むプライマーセットを用いてマルチプレックスPCRを行った場合（レーン3：実施例6-2）、その中でも特に本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対（a）を含むプライマーセットを用いてマルチプレックスPCRを行った場合は、特許文献1のプライマー対及びCTゲノムDNA対象のプライマー対を含むプライマーセットを用いてマルチプレックスPCRを行った場合（レーン1：比較例5）と比較して、潜在プラスミドのターゲット配列の核酸濃度が高いことがわかった。

[0225] 以上の結果より、本発明に係る第1プライマー対及び本発明に係る第2プライマー対を含むプライマーセットを用いると、非特異的な核酸の増幅を抑制することができるため、偽陽性となる可能性が極めて低いことがわかった。また、クラミジア・トラコマティスを高感度に検出することができることから、偽陰性となる可能性も極めて低いことがわかった。

一方、特許文献1のプライマー対及びCTゲノムDNA対象のプライマー対を含むプライマーセットを用いると、非特異的な核酸の増幅を抑制できないため、偽陽性となる可能性が高いことがわかった。また、クラミジア・トラコマティスを高感度に検出することができないことから、偽陰性となる可能性も極めて高いこともわかった。

産業上の利用可能性

[0226] 本発明のプライマーセットを用いたクラミジア・トラコマティスの検出方法によれば、ヒトゲノムDNAが混在する可能性が高い、尿、咽頭、子宮頸

管由来の試料を用いた場合であっても、診断上の誤判定を軽減することが可能となり、従来法と比較して、クラミジア・トラコマティスを高感度で特異的に精度よく検出することができる。

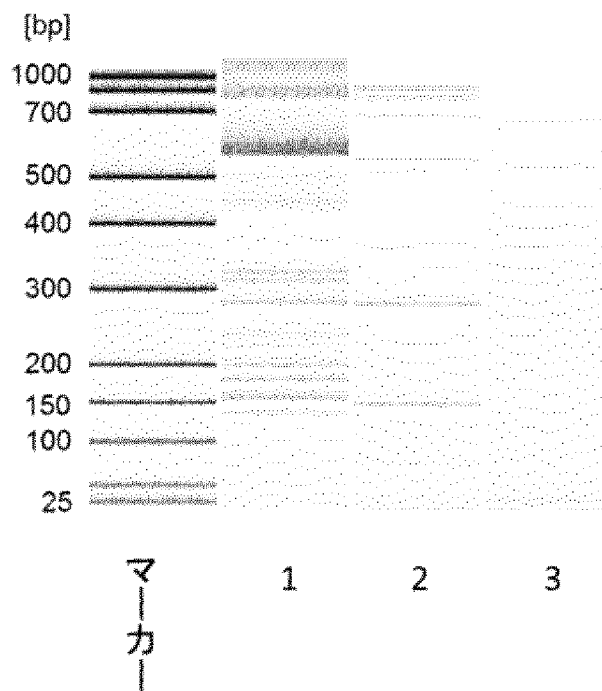
請求の範囲

- [請求項1] 配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号6で表される塩基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第1プライマー対を含む、クラミジア・トラコマティス検出用プライマーセット。
- [請求項2] さらに、配列番号7～9の何れかで表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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第2プライマー対を含む、請求項1に記載のプライマーセット。
- [請求項3] 第2プライマー対が、配列番号7で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号10で表される塩基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ものである、請求項2に記載のプライマーセット。
- [請求項4] 少なくとも1つのプライマーが標識物質で標識されたものである、請求項1～3の何れかに記載のプライマーセット。
- [請求項5] 標識物質が蛍光物質、放射性同位体、酵素、発光物質から選択されるものである、請求項4に記載のプライマーセット。
- [請求項6] 請求項1～5の何れかに記載のプライマーセットを用い、試料中の核酸を鋳型として核酸増幅反応を行い、得られた核酸増幅産物を検出することを特徴とする、クラミジア・トラコマティスの検出方法。
- [請求項7] 下記工程を含有することを特徴とする、請求項6に記載の検出方法
(1) 請求項1～5の何れかに記載のプライマーセットを用い、試料中の核酸を鋳型として核酸増幅反応を行う、
(2) (1)の核酸増幅反応で得られた核酸増幅産物について電気泳動を行い、その結果に基づいてクラミジア・トラコマティスの有無を判定する。
- [請求項8] 核酸増幅反応がPCRである、請求項6又は7に記載の検出方法。
- [請求項9] 電気泳動がキャピラリー電気泳動である、請求項7又は8に記載の検

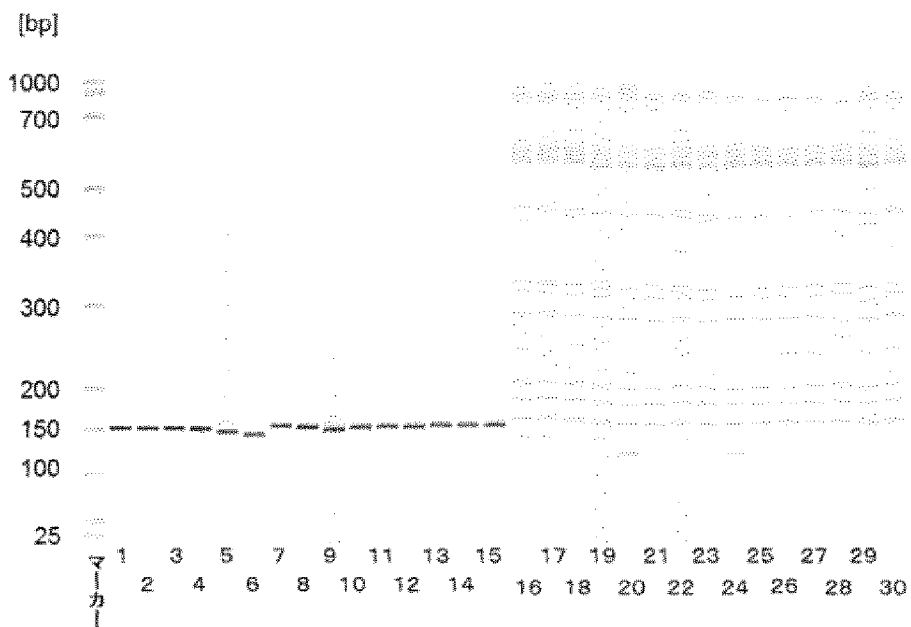
出方法。

- [請求項10] 請求項1～5の何れかに記載のプライマーセットを含んでなる、クラミジア・トラコマティス検出用試薬キット。
- [請求項11] 少なくとも1つのプライマーが標識物質で標識されたものであるプライマーセットを含んでなる、請求項10に記載の試薬キット。

[図1]

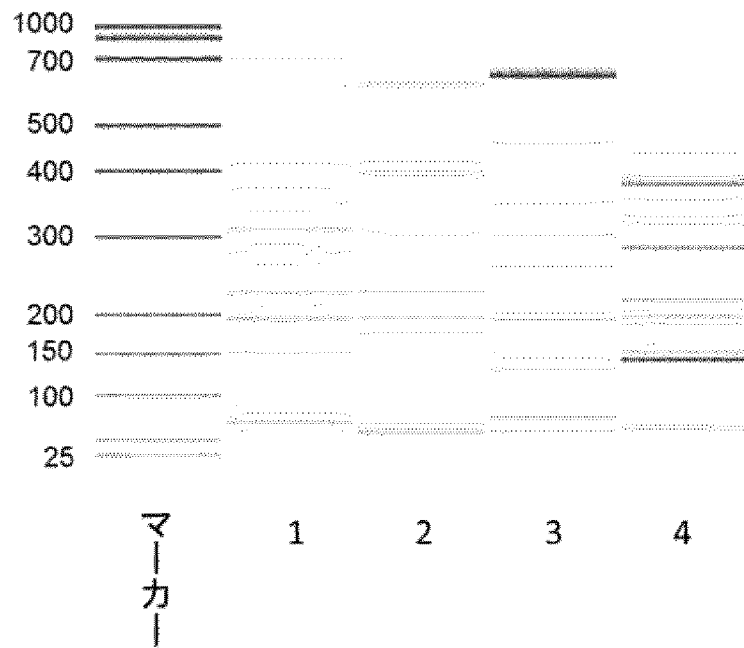


[図2]



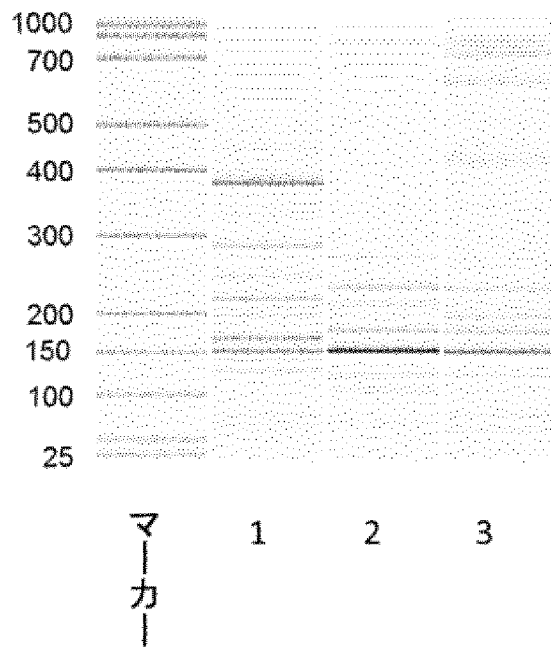
[図3]

[bp]

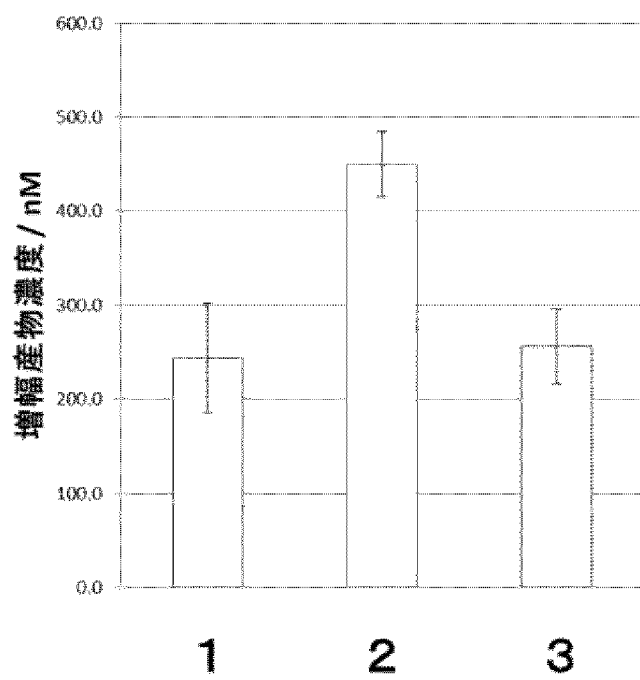


[図4]

[bp]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), REGISTRY(STN),

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MØLLER, J. K. et al., Comparison of Gen-Probe transcription-mediated amplification, Abbott PCR, and Roche PCR assays for detection of wild-type and mutant plasmid strains of Chlamydia trachomatis in Sweden, J. CLIN. MICROBIOL., 2008, Vol.46, No.12, pages 3892-3895, Print ISSN 0095-1137, particularly, page 3892, summary, page 3892, left column, lines 12 to 16, page 3893, left column, 24th to 8th lines from the bottom, Ct _{forw} Primer, Ct _{rev} Primer	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 June 2017 (14.06.17)Date of mailing of the international search report
27 June 2017 (27.06.17)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012348

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-221088 A (Becton, Dickinson and Co.), 17 August 1999 (17.08.1999), particularly, abstract; paragraphs [0001], [0004], [0021], [0058]; SEQ ID NO:18, 19 & US 6096501 A1 particularly, abstract; column 1, lines 5 to 14; column 2, lines 3 to 8; column 6, lines 23 to 42; column 16, line 10 to column 17, line 7; SEQ ID NO:18, 19 & US 6218125 B1 & EP 915170 A1	1-11
A	JP 5-317097 A (Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.), 03 December 1993 (03.12.1993), particularly, abstract; paragraphs [0008], [0009] (Family: none)	1-11
A	WO 1993/00447 A1 (ABBOTT LABORATORIES), 07 January 1993 (07.01.1993), particularly, page 35, line 35 to page 37, line 31; SEQ ID NO:92 & JP 6-508750 A & JP 4-211399 A & JP 9-502344 A & JP 8-509125 A & US 5427930 A1 & US 5453355 A1 & US 5516663 A1 & US 5573907 A1 & US 5792607 A1 & WO 1995/006749 A1 & WO 1994/024311 A1 & EP 439182 A2	1-11
A	JP 2009-538605 A (Bio-Rad Pasteur), 12 November 2009 (12.11.2009), particularly, claims; abstract & JP 5518471 B2 & US 2009/0104610 A1 particularly, claims; abstract & US 2014/0309136 A1 & WO 2007/137650 A1 & EP 1862557 A1	1-11
A	JP 2009-514549 A (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), 09 April 2009 (09.04.2009), particularly, abstract & US 2010/0248220 A1 particularly, abstract & WO 2007/056398 A2	1-11
A	MARSHALL, R. et al., Characteristics of the m2000 automated sample preparation and multiplex real-time PCR system for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae, J. CLIN. MICROBIOL., 2007, Vol.45, No.3, pages 747-751, Print ISSN 0095-1137, particularly, page 747, summary	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、REGISTRY (STN)、CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)、GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq、PubMed、CiNii

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MØLLER, J. K. et al., Comparison of Gen-Probe transcription-mediated amplification, Abbott PCR, and Roche PCR assays for detection of wild-type and mutant plasmid strains of Chlamydia trachomatis in Sweden, J. CLIN. MICROBIOL., 2008, Vol.46, No.12, pages 3892-3895, Print ISSN 0095-1137, 特に第3892頁要旨, 第3892頁左欄第12行~第16行, 第3893頁左欄下から第24行~第8行, C _t _{forw} プライマー, C _t _{rev} プライマー	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.06.2017

国際調査報告の発送日

27.06.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

白井 美香保

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

4502

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 11-221088 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 1999.08.17, 特に要約, 段落0001, 0004, 0021, 0058, 配列番号18, 配列番号19 & US 6096501 A1, 特に要約, 第1欄第5行~第14行, 第2欄第3行~第8行, 第6欄第23行~第42行, 第16欄第10行~第17欄第7行, 配列番号18, 配列番号19 & US 6218125 B1 & EP 915170 A1	1-11
A	JP 5-317097 A (扶桑薬品工業株式会社) 1993.12.03, 特に要約, 段落0008, 0009 (ファミリーなし)	1-11
A	WO 1993/00447 A1 (ABBOTT LABORATORIES) 1993.01.07, 特に第35頁第35行~第37頁第31行, 配列番号92 & JP 6-508750 A & JP 4-211399 A & JP 9-502344 A & JP 8-509125 A & US 5427930 A1 & US 5453355 A1 & US 5516663 A1 & US 5573907 A1 & US 5792607 A1 & WO 1995/006749 A1 & WO 1994/024311 A1 & EP 439182 A2	1-11
A	JP 2009-538605 A (ビオーラド・パストゥール) 2009.11.12, 特に特許請求の範囲, 要約 & JP 5518471 B2 & US 2009/0104610 A1, 特に特許請求の範囲, 要約 & US 2014/0309136 A1 & WO 2007/137650 A1 & EP 1862557 A1	1-11
A	JP 2009-514549 A (シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド) 2009.04.09, 特に要約 & US 2010/0248220 A1, 特に要約 & WO 2007/056398 A2	1-11
A	MARSHALL, R. et al., Characteristics of the m2000 automated sample preparation and multiplex real-time PCR system for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae, J. CLIN. MICROBIOL., 2007, Vol.45, No.3, pages 747-751, Print ISSN 0095-1137, 特に第747頁要旨	1-11