

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5565781号
(P5565781)

(45) 発行日 平成26年8月6日(2014.8.6)

(24) 登録日 平成26年6月27日(2014.6.27)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
G O 1 N	33/569	(2006.01)	G O 1 N	33/569 F

請求項の数 4 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2012-508098 (P2012-508098)	(73) 特許権者	800000013 有限会社山口ティール・エル・オー 山口県宇部市常盤台2丁目16番1号
(86) (22) 出願日	平成23年3月30日(2011.3.30)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/001934	(72) 発明者	白井 睦訓 山口県宇部市南小串一丁目1番1号国立大 学法人山口大学医学部内
(87) 国際公開番号	W02011/122034	(72) 発明者	江崎 孝行 岐阜県岐阜市柳戸1番1国立大学法人岐阜 大学内
(87) 国際公開日	平成23年10月6日(2011.10.6)	(72) 発明者	林 司 東京都文京区本郷二丁目38番18号株式 会社カインノス内
審査請求日	平成24年12月26日(2012.12.26)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-83836 (P2010-83836)		
(32) 優先日	平成22年3月31日(2010.3.31)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-83823 (P2010-83823)		
(32) 優先日	平成22年3月31日(2010.3.31)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸クロマトグラフ法を利用した肺炎原因菌の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィルラ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィルラ、クレブシエラ・ニューモニエ、シュドモナス・アエルギノーサ、モラクセラ・カタラーリス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)、スタフィロコッカス・アウレウスから選ばれる少なくとも3種類の肺炎菌類を検出対象とする肺炎原因菌の検出方法であって、以下の工程(a)~工程(f)を備え、

1) 試料中より任意に抽出された各肺炎菌に特異的な標的核酸を、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類のNASBAマルチプレックスプライマー対のセットを用いて1本鎖核酸として増幅する工程(a);

2) 増幅産物と相補的なヌクレオチド配列から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類のプローブ対を調製する工程(b);

3) 標識高分子担体に少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプローブを結合させ、第1プローブ結合標識高分子担体を調製する工程(c);

4) 第1のプローブと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプローブを、肺炎菌ごとに識別可能な所定の位置に固相化した第2プローブ担持展開支持体を調製する工程(d);

5) 前記増幅産物を、展開支持体に担持された第2プローブ及び標識高分子担体に結合した第1プローブにハイブリダイズさせて検出する工程(e);

10

20

6) 検出像を判定することにより評価する工程 (f) ;

かつ、上記工程 (a) において用いられる肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類の N A S B A マルチプレックスプライマー対のセットが、以下の (i) ~ (x) に表されるプライマー対、あるいは、

かかるプライマー対を構成する配列番号 2 1 ~ 4 0 に示されるヌクレオチド配列において、1 ~ 3 個の塩基が欠失、置換又は付加されたヌクレオチド配列から構成され、各肺炎菌特異的な標的核酸を増幅することができるプライマー対から選ばれることを特徴とする検出方法。

(i) 配列番号 2 1 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 1 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

10

(i i) 配列番号 2 2 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 2 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(i i i) 配列番号 2 3 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 3 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(i v) 配列番号 2 4 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 4 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

20

(v) 配列番号 2 5 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 5 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(v i) 配列番号 2 6 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 6 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(v i i) 配列番号 2 7 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 7 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(v i i i) 配列番号 2 8 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 8 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

30

(i x) 配列番号 2 9 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 9 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(x) 配列番号 3 0 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 4 0 に示されるヌクレオチド配列及びその 5 ' 末端側に付加された R N A ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

【請求項 2】

少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプローブが、配列番号 1 ~ 1 0 に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類の D N A からなり、第1のプローブと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプローブが、配列番号 1 1 ~ 2 0 に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類の D N A であることを特徴とする請求項 1 記載の検出方法。

40

【請求項 3】

ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィルラ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、クレブシエラ・ニューモニエ、シュドモナス・アエルギノーサ、モラクセラ・カタラーリス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (M R S A)、スタフィロコッカス・アウレウスから選ばれる少なくとも3種類の肺炎菌類を検出対象とする肺炎原因菌の検出キッ

50

トであって、

1) 試料中より任意に抽出された各肺炎菌に特異的な標的核酸を増幅することができる以下の(x i) ~ (x x)に表されるプライマー対、あるいは、かかるプライマー対を構成する配列番号2 1 ~ 4 0に示されるヌクレオチド配列において、1 ~ 3個の塩基が欠失、置換又は付加されたヌクレオチド配列から構成され、各肺炎菌特異的な標的核酸を増幅することができるプライマー対から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類のNASBAマルチプレックスプライマー対；

(x i) 配列番号2 1に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 1に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

10

(x i i) 配列番号2 2に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 2に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(x i i i) 配列番号2 3に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 3に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(x i v) 配列番号2 4に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 4に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(x v) 配列番号2 5に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 5に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

20

(x v i) 配列番号2 6に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 6に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(x v i i) 配列番号2 7に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 7に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(x v i i i) 配列番号2 8に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 8に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

30

(x i x) 配列番号2 9に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号3 9に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

(x x) 配列番号3 0に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号4 0に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；

2) 増幅産物と相補的なヌクレオチド配列から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプローブが標識高分子担体に結合された第1プローブ結合標識高分子担体；

40

3) 第1のプローブと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプローブが、肺炎菌ごとに識別可能な所定の位置に固相化された第2プローブ担持展開支持体を備えたことを特徴とするキット。

【請求項4】

少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプローブが、配列番号1 ~ 1 0に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類のDNAからなり、第1のプローブと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプローブが、配列番号1 1 ~ 2 0に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類のDNAであることを特徴とする請求項3記載のキット。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、肺炎原因菌の検出方法や検出キット、より詳しくは、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*)、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、クラミドフィルラ・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、シュードモナス・アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*)、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (MRSA) (*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) を検出対象とする肺炎原因菌の検出方法や検出キットに関する。

10

【背景技術】

【0002】

肺炎は、現在のところ日本人の死因別死亡率で第4位であり、がん等の基礎疾患の合併症としてもしばしば起こり、罹患者数が非常に多い疾患として知られている。従来肺炎の原因となる微生物(原因菌)の探索試験として行われている培養検査は少なくとも数日の時間を要し、更に培養された原因菌について薬剤感受性試験を行うと1週間近くもかかることから、治療選択に十分寄与する検査方法にはなっていないとされている。救急救命病室(ICU)に入院が必要な重症の肺炎に関しては、迅速で正確な原因菌の決定が治療選択において極めて重要であり、適切な初期治療は肺炎患者の救命確率を確実に上昇させることが報告されている。しかし実際には、依然として培養法に代わる原因菌同定技術が確立されていないため、原因菌が不明の状態で行わなければならないのが現状であり、経験治療による抗生物質の使用がやむを得ず行われることで耐性菌の出現に繋がるおそれがある。

20

【0003】

肺炎の原因となる原因菌は、発生頻度の高い菌種が全体の50%近くを占め、ウイルスまで含めた主な原因菌は20~30種類程度であるとされている。この中には通常の手法で培養できないものもあり、また、培養によっても原因菌決定が困難である場合もある。特に、菌種・菌量に依存して抗生物質を適宜選択して治療する必要がある肺炎においては、複数種類の肺炎原因菌を同時に検出することと、検出されたシグナルの定量的な解析が非常に重要である。また、原因菌の種類によって最適な治療薬が異なるが、原因菌決定前に治療を開始するのも医療倫理上やむを得ないというのが実情である。これらの問題を解決するために、複数の菌種の中から特定の菌を迅速かつ定量的に検出可能な手法の開発が待たれていた。

30

【0004】

例えば、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)の自己溶菌酵素(LytA)をコードするlytA遺伝子、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)の16SrRNAをコードする遺伝子、化膿レンサ球菌の16SrRNAをコードする遺伝子、マイコプラズマ・ニューモニエ(*Mycoplasma Pneumoniae*)の16SrRNAをコードする遺伝子のそれぞれに由来するプライマー、又は、さらにレジオネラ菌(*Legionella pneumophila*)の16SrRNAをコードする遺伝子及びレジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)の病原因子であるタンパク質MIPをコードするmip遺伝子に由来するプライマーを加えたプライマーセットを用いて、4種類の呼吸器感染症起因菌を同時に検出する方法(例えば、特許文献1参照)が提案されている。

40

【0005】

また、呼吸器疾患と関連した10種のバクテリアに特異的なプライマーセットとして、バクテリアを含む試料から分離された核酸をテンプレートとし、一番目のオリゴヌクレオチドと、二番目のオリゴヌクレオチドとを含む百日咳菌、肺炎クラミドフィルラ菌、インフルエンザ菌、マイコプラズマ肺炎菌、クレブシエラ肺炎菌、レジオネラ肺炎菌、モラクセラ・カタラーリス、緑膿菌、黄色ブドウ球菌及び肺炎レンサ球菌に存在する標的配列を特

50

異的に増幅するプライマーセットと、かかる菌に存在する標的核酸を特異的に検出するプローブからなる、呼吸器疾患と関連した10種のバクテリアに特異的なプライマーセット及びプローブオリゴヌクレオチドセット(例えば、特許文献2及び3参照)が提案されている。

【0006】

また、10個以上の連続塩基の断片を含むオリゴヌクレオチドから選択される5種以上の呼吸器疾患を引き起こすウイルスの標的配列を同時に増幅させることができる核酸プライマーセットや、10個以上の連続塩基の断片を含むオリゴヌクレオチドおよびそれに相補的なオリゴヌクレオチドからなる群から選択される長さが10bp~100bpである一つ以上のオリゴヌクレオチドを含む、はしかウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、SARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)、ヘルペス・ゾスターウイルス(VZV)、アデノウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス1(HPIV1)、ヒトパラインフルエンザウイルス2(HPIV2)、ヒトパラインフルエンザウイルス3(HPIV3)、インフルエンザウイルスA(IVA)、インフルエンザウイルスB(IVB)、呼吸器多核体ウイルスA(RSVA)および呼吸器多核体ウイルスB(RSVB)のうち一つ以上を検出するためのプローブオリゴヌクレオチドが提案され、試料から核酸を得るステップと、前記核酸プライマーセットを利用して前記核酸を増幅するステップと、前記増幅産物を検出するステップが含まれる旨記載され、試料から核酸を得るステップは、試料からRNAを分離するステップと、分離されたRNAからcDNAを得るステップとを含み、cDNAを得るステップは、例えば、逆転写酵素を利用してなされ、逆転写酵素を利用する逆転写酵素反応は、RT-PCRを用いてもよいことや、前記増幅するステップは、PCRによって行われうる旨が記載されている(例えば、特許文献4参照)。

【0007】

一方、試料中に微量に存在する大別されるノロウイルスの遺伝子グループであるジェノグループI(GI)とジェノグループII(GII)の遺伝子の特異的に増幅するための方法であって、試料中より抽出されたRNAから所定の温度下で核酸を増幅できるNASBA法による相補的な1本鎖核酸を得る工程と、該NASBA法による増幅産物を所定の温度下で核酸を増幅できるRT-LAMP法により、さらに核酸を増幅する工程とを含む工程からなることを特徴とするノロウイルスの簡易高感度検出法が提案されている(例えば、特許文献5参照)。

【0008】

本発明者らは、複数種類の肺炎原因菌の検出に用いられるプライマーセットであって、通常のPCRに加えて、マルチプレックスPCR、リアルタイムPCR、RT-PCR等を用いて肺炎球菌、インフルエンザ菌、マイコプラズマ・ニューモニエ、及びクラミドフィラ・ニューモニエを同時に検出が可能となるプライマーセット(例えば、特許文献6参照)や、16SrRNA中の菌特異的なRNA鎖から、標的RNAの特異的配列に相当するDNA配列とタグ配列の5'末端にRNAポリメラーゼプロモーター配列を付加した液相ユニバーサルプライマーを調製することを含む、標的RNAの検出・定量方法(例えば、特許文献7参照)や、Staphylococcus属菌、Streptococcus属菌、Klebsiella属菌、Escherichia属菌、Mycobacterium属菌、Legionella属菌、Vibrio属菌、Bacillus属菌、Neisseria属菌、Campylobacter属菌、Chlamydia属菌、Chlamydomonas属菌、Mycoplasma属菌、Listeria属菌、Salmonella属菌及びYersinia属菌から選択される1種又は2種以上の細菌から選択される2種以上であり、タグ配列と前記病原微生物が保持するDNA遺伝子上のターゲット核酸に選択的にアニールする塩基配列とを有する少なくとも1種類の第1のプライマーセットと、前記タグ配列と実質的に同一のタグ配列を有する少なくとも1種類の第2のプライマーセットとを用いてポリメラーゼ連鎖反応を実施するポリメラーゼ連鎖反応工程と、前記ターゲット核酸を含む増幅産物を検出する工程とを備える病原微生物の検出方法(例えば、特許文献8参照)を提案している。

【0009】

また、試料中の標的となる核酸を特異的に検出又は定量するための方法であって、試料

10

20

30

40

50

中より任意に抽出された標的核酸からハプテン又はペプチドを結合していないプライマーを用いて1本鎖核酸として増幅する工程、該増幅産物をメンブレンに結合した増幅産物と相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブ及び着色高分子担体で標識した相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせて検出する工程及び該検出像を目視判定により評価する工程を含む核酸の検出又は定量方法について既に開発し、例えばメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)の培養菌株から抽出した全RNAを鋳型としてNASBAの増幅反応を行い、増幅産物を核酸クロマトストリップにより検出する方法を確立している(例えば、特許文献9参照)。

【0010】

NASBA法と核酸クロマトグラフィーを組み合わせた、ノロウイルス遺伝子の2種類の遺伝子タイプを検出するための試薬(スイフトジーン ノロウイルスGEI/GII「カインス」)も報告されているが、かかる試薬は、遺伝的に多様な15種類以上の遺伝子型が属するGEIタイプと、18種類以上の遺伝子型が属するGIIタイプを大別して判定するものであって、原因肺炎菌を特定するための精度を有するものとはいえなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開2005-110545号公報

【特許文献2】特開2006-174837号公報

【特許文献3】特許第4235645号公報

【特許文献4】特開2006-180878号公報

【特許文献5】特開2009-240207号公報

【特許文献6】特開2009-39046号公報

【特許文献7】国際公開2009/057330号パンフレット

【特許文献8】国際公開2008/041354号パンフレット

【特許文献9】特許第4268944号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の課題は、肺炎患者の診断に際して、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、クレブシエラ・ニューモニエ、シュドモナス・アエルギノーサ、モラクセラ・カタラーリス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)、スタフィロコッカス・アウレウス(これら個々の菌を以下「検出対象肺炎菌」又は単に「肺炎菌」、総称して「10種類の検出対象肺炎菌」ということがある。)の迅速で正確な検出方法や、それに用いる検出キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、臨床における実用化を図るために、肺炎の原因菌の検出精度をより高める方法について検討し、DnaJ遺伝子が16SrRNA配列の約10倍の遺伝子多型を有するとされる知見をもとにDnaJ領域をはじめ、各種肺炎菌に特異的な遺伝子領域を中心に、10種類の各肺炎原因菌のDnaJ遺伝子等に含まれる10種類の検出対象肺炎菌の各ターゲット領域に対するプライマー対のセットを設計し、かかるプライマー対のセットを用いて、NASBA法により遺伝子産物を増幅し、増幅産物である標的核酸を定性・定量して、複数種類の肺炎原因菌を高精度に検出できることを見いだした。さらにかかる増幅産物を、プライマー対のセットとは異なる10種類の検出対象肺炎菌の各ターゲット領域内の配列にハイブリダイズする各種肺炎菌固有のプローブ対のセットを設計し、かかるプローブ対のセットを用いて核酸クロマトグラフ法を行うことにより、一回の操作で10種類までの複数種類の検出対象肺炎菌を高精度に検出できることを見いだし、本発明を完成するに至った。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

すなわち、本発明は、(1) ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、クレブシエラ・ニューモニエ、シュードモナス・アエルギノーズ、モラクセラ・カタラーリス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)、スタフィロコッカス・アウレウスから選ばれる少なくとも3種類の肺炎菌類を検出対象とする肺炎原因菌の検出方法であって、1) 試料中より任意に抽出された各肺炎菌に特異的な標的核酸からプライマーを用いて1本鎖核酸として増幅する工程(a); 2) 増幅産物と相補的なヌクレオチド配列から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類のプローブ対を調製する工程(b); 3) 標識高分子担体に少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプローブを結合させ、第1プローブ結合標識高分子担体を調製する工程(c); 4) 第1のプローブと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプローブを、肺炎菌ごとに識別可能な所定の位置に固相化した第2プローブ担持展開支持体を調製する工程(d); 5) 前記増幅産物を、展開支持体に担持された第2プローブ及び標識高分子担体に結合した第1プローブにハイブリダイズさせて検出する工程(e); 6) 検出像を判定することにより評価する工程(f); の各工程を備えたことを特徴とする検出方法や、(2) プライマーが、配列番号21に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号31に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号22に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号32に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号23に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号33に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号24に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号34に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号25に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号35に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号26に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号36に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号27に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号37に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号28に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号38に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号29に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号39に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号30に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号40に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類のプライマー対であることを特徴とする上記(1)記載の検出方法や、(3) 少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプローブが、配列番号1~10に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類のDNAからなり、第1のプローブと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプローブが、配列番号11~20に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類のDNAである上記(1)又は(2)記載の検出方法に関する。

【 0 0 1 5 】

また、本発明は、(4) ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ、レジオネラ・

10

20

30

40

50

ニューモフィラ、クレブシエラ・ニューモニエ、シュードモナス・アエルギノーサ、モラクセラ・カタラーリス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（MRSA）、スタフィロコッカス・アウレウスから選ばれる少なくとも3種類の肺炎菌類を検出対象とする肺炎原因菌の検出キットであって、試料中より任意に抽出された各肺炎菌に特異的な標的核酸を増幅することができる配列番号21に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号31に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号22に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号32に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号23に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号33に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号24に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号34に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号25に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号35に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号26に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号27に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号37に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号28に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号38に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号29に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号39に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号30に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号40に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類のプライマー対を備えたことを特徴とするキットや、(5)さらに、1)増幅産物と相補的なヌクレオチド配列から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプロープが標識高分子担体に結合された第1プロープ結合標識高分子担体；2)第1のプロープと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプロープが、肺炎菌ごとに識別可能な所定の位置に固相化された第2プロープ担持展開支持体；を備えたことを特徴とする上記(4)記載のキットや、(6)少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプロープが、配列番号1~10に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類のDNAからなり、第1のプロープと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプロープが、配列番号11~20に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類のDNAであることを特徴とする上記(5)記載のキットに関する。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、肺炎患者の診断に際して、簡便な方法により、迅速で正確な肺炎原因菌の特定が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】8株のモラクセラ・カタラーリス菌株を対象とし、プライマー対を用いた検証データを示す図である。

【図2】本発明で用いられる肺炎菌特異的プライマー対によりストレプトコッカス・ニューモニエのNASBA法による標的遺伝子のRNAを増幅したデータを示す図である。

10

20

30

40

50

【図3】本発明で用いられる肺炎菌特異的プライマー対によりレジオネラ・ニューモフィラのNASBA法による標的遺伝子のRNAを増幅したデータを示す図である。

【図4】本発明で用いられる肺炎菌特異的プライマー対によりクレブシエラ・ニューモニエのNASBA法による標的遺伝子のRNAを増幅したデータを示す図である。

【図5】本発明で用いられる肺炎菌特異的プライマー対によりモラクセラ・カタラーリスのNASBA法による標的遺伝子のRNAを増幅したデータを示す図である。

【図6】本発明で用いられる肺炎菌特異的プライマー対によりスタフィロコッカス・アウレウスのNASBA法による標的遺伝子のRNAを増幅したデータを示す図である。

【図7】本発明で用いられる肺炎菌特異的プライマー対によりマイコプラズマ・ニューモニエのNASBA法による標的遺伝子のRNAを増幅したデータを示す図である。

10

【図8】本発明で用いられる肺炎菌特異的プライマー対によりクラミドフィラ・ニューモニエのNASBA法による標的遺伝子のRNAを増幅したデータを示す図である。

【図9】本発明で用いられるプライマー10対のマルチプレックス化を実施した際に、各プライマー対の標的菌以外の対象菌との非特異反応の有無の検証結果を示す図である。

【図10】レジオネラ・ニューモフィラ、シュドモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、MRSA、ヘモフィルス・インフルエンザについて、マルチプレックスプライマーを用いたNASBA法による標的RNA増幅産物が検出されたことを示す図である。

【図11】スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、モラクセラ・カタラーリス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエについて、各菌に対応するプライマー対を使用して、マルチプレックスプライマーを用いたNASBA法によりRNA増幅を行った際に、標的RNA増幅産物が検出されたことを示す図である。

20

【図12】モラクセラ・カタラーリスにおいて、NASBAによって増幅したRNAが目的の標的NASBA産物であることをリアルタイムPCRで確認されたことを示す図である。

【図13】本発明の核酸クロマトグラフ法の1つの具体例を模式図として示す。

【図14】各肺炎菌専用プローブ間の非特異結合を検討した図を示す。

【図15】レジオネラ・ニューモフィラ、シュドモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、MRSA、ヘモフィルス・インフルエンザ、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、モラクセラ・カタラーリス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエについて、各菌に対応するプライマー対を使用して、個別にNASBA法によりRNA増幅を行った際に、標的RNA増幅産物が核酸クロマトグラフィーにより検出されたことを示す図である。

30

【図16】各プローブの標的菌以外の対象菌との非特異反応の有無の検証結果を示す図である。

【図17】レジオネラ・ニューモフィラ、シュドモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、MRSA、ヘモフィルス・インフルエンザ、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、モラクセラ・カタラーリス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエについて、各菌に対応するプライマー対を使用して、マルチプレックスプライマーを用いたNASBA法によりRNA増幅を行った際に、標的RNA増幅産物が核酸クロマトグラフィーにより検出されたことを示す図である。

40

【図18】肺炎原因菌5菌種を本発明の核酸クロマトグラフ測定用試験片に供した図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の肺炎原因菌を検出する方法としては、1) 試料中より任意に抽出された各肺炎菌に特異的な標的核酸からプライマーを用いて1本鎖核酸として増幅する工程(a); 2) 増幅産物と相補的な配列番号1~20に示されるヌクレオチド配列から選ばれる、肺炎

50

菌ごとに異なる少なくとも3種類のプローブ対を調製する工程(b); 3) 配列番号1~10に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類の各肺炎菌の第1のプローブを標識高分子担体に結合させ、第1プローブ結合標識高分子担体を調製する工程(c); 4) 配列番号11~20に示されるヌクレオチド配列から選ばれる、第1のプローブと対をなす少なくとも3種類の各肺炎菌の第2のプローブを、肺炎菌ごとに識別可能な所定の位置に固相化した固相化第2プローブを担持した展開支持体を調製する工程(d); 5) 前記増幅産物を、展開支持体に担持された固相化第2プローブ及び標識高分子担体結合第1プローブにハイブリダイズさせて検出する工程(e); 6) 検出像を判定することにより評価する工程(f); を備えた、10種類の検出対象肺炎菌から選ばれる少なくとも3種類の検出対象肺炎菌を検出対象とする方法であれば特に制限されないが、検出対象肺炎菌として少なくとも5種類、すなわち5~10種類を検出することが好ましい。

10

【0019】

本発明の肺炎原因菌を検出する方法としては、1) 試料中より任意に抽出された各肺炎菌に特異的な標的核酸を増幅することができる配列番号21に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号31に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号22に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号32に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号23に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号33に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号24に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号34に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号25に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号35に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号26に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号36に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号27に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号37に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号28に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号38に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号29に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号39に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; 配列番号30に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号40に示されるヌクレオチド配列及びその5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー; から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも3種類のプライマー対を調製する工程(a'); 2) 検出対象の肺炎菌類の核酸を含む可能性のある被検試料と、少なくとも3種類のキメラプライマー対を接触させ、RNA増幅法により遺伝子産物を増幅する工程(b'); 3) 増幅産物である標的核酸を定性・定量する工程(c'); を備えた10種類の検出対象肺炎原因菌から選ばれる少なくとも3種類の検出対象肺炎原因菌を検出対象とする方法を用いることもできる。この方法においては、検出対象肺炎菌として少なくとも5種類、すなわち5~10種類を検出することが好ましい。

20

30

40

【0020】

上記検出対象肺炎菌が3種類の場合、外来患者において検出されることが多いストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ及びクラミドフィラ・ニューモニエ(以下「外来患者

50

用検出対象肺炎菌」ともいう)のうち、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ及びマイコプラズマ・ニューモニエや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ及びレジオネラ・ニューモフィラや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、及びクラミドフィラ・ニューモニエ等の3種類の組合せや、院内感染により入院患者において検出されることが多いシュードモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、スタフィロコッカス・アウレウス、MRSA、モラクセラ・カタラーリス(以下「入院患者用検出対象肺炎菌」ともいう)のうち、シュードモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ及びスタフィロコッカス・アウレウスや、クレブシエラ・ニューモニエ、スタフィロコッカス・アウレウス及びMRSAや、シュードモナス・アエルギノーサ、MRSA及びモラクセラ・カタラーリスや、スタフィロコッカス・アウレウス、MRSA及びモラクセラ・カタラーリス等の3種類の組合せや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ及びMRSAや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ及びシュードモナス・アエルギノーサ等の3種類の組合せなどからなる120通りの3種類の肺炎菌類の組合せを例示することができる。

10

【0021】

上記検出対象肺炎菌が4種類の場合、外来患者用検出対象肺炎菌のうち、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ及びレジオネラ・ニューモフィラや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ及びクラミドフィラ・ニューモニエや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、レジオネラ・ニューモフィラ及びクラミドフィラ・ニューモニエや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ及びクラミドフィラ・ニューモニエや、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ及びクラミドフィラ・ニューモニエ等の4種類の組合せや、入院患者用検出対象肺炎菌のうち、シュードモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、スタフィロコッカス・アウレウス及びMRSAや、シュードモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、スタフィロコッカス・アウレウス、及びモラクセラ・カタラーリスや、シュードモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、MRSA及びモラクセラ・カタラーリスや、シュードモナス・アエルギノーサ、スタフィロコッカス・アウレウス、MRSA及びモラクセラ・カタラーリスや、クレブシエラ・ニューモニエ、スタフィロコッカス・アウレウス、MRSA及びモラクセラ・カタラーリス等の4種類の組合せや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ及びMRSAや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、シュードモナス・アエルギノーサ及びMRSA等の4種類の組合せなどからなる210通りの4種類の肺炎菌類の組合せを例示することができる。

20

30

【0022】

上記検出対象肺炎菌が5種類の場合、外来患者用検出対象肺炎菌5種類や、入院患者用検出対象肺炎菌5種類の他、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ及びMRSAや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ及びMRSAや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、MRSA及びスタフィロコッカス・アウレウスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、シュードモナス・アエルギノーサ及びクラミドフィラ・ニューモニエや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、MRSA及びモラクセラ・カタラー

40

50

リス等からなる252通りの5種類の肺炎菌類の組合せを例示することができる。

【0023】

上記検出対象肺炎菌が6種類の場合、外来患者用検出対象肺炎菌及びMRSAや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、MRSA及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ、MRSA及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、クラミドフィラ・ニューモニエ、シュールドモナス・アエルギノーサや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、シュールドモナス・アエルギノーサ、MRSAや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ、シュールドモナス・アエルギノーサ、MRSAや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス、モラクセラ・カタラーリス等からなる210通りの6種類の肺炎菌類の組合せを例示することができる。

10

【0024】

上記検出対象肺炎菌が7種類の場合、外来患者用検出対象肺炎菌、MRSA及びスタフィロコッカス・アウレウスや、外来患者用検出対象肺炎菌、MRSA及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、シュールドモナス・アエルギノーサ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、シュールドモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス及びモラクセラ・カタラーリス等からなる120通りの7種類の肺炎菌類の組合せを例示することができる。

20

30

【0025】

上記検出対象肺炎菌が8種類の場合、外来患者用検出対象肺炎菌、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス及びモラクセラ・カタラーリスや、外来患者用検出対象肺炎菌、シュールドモナス・アエルギノーサ、MRSA及びスタフィロコッカス・アウレウスや、外来患者用検出対象肺炎菌、シュールドモナス・アエルギノーサ、MRSA及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、シュールドモナス・アエルギノーサ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス及びモラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエ、シュールドモナス・アエルギノーサ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス及びモラクセラ・カタラーリス等からなる90通りの8種類の肺炎菌類の組合せを例示することができる。

40

【0026】

上記検出対象肺炎菌が9種類の場合、外来患者用検出対象肺炎菌、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス、モラクセラ・カタラーリス、及びクレブシエラ・ニューモニエや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、シュールドモナス・アエルギノーサ、ク

50

レブシエラ・ニューモニエ、スタフィロコッカス・アウレウス、MRSA、モラクセラ・カタラーリスや、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、マイコプラズマ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、シュードモナス・アエルギノーサ、MRSA、スタフィロコッカス・アウレウス、モラクセラ・カタラーリス等からなる10通りの9種類の肺炎菌類の組合せを例示することができる。

【0027】

上記工程(a)における増幅産物を調製する方法としては、検出対象肺炎菌を含む可能性のある試料中より任意に抽出された上記各検出対象肺炎菌に特異的な標的核酸を、当該標的核酸を増幅することができるプライマーを用いて1本鎖核酸として増幅する方法であれば特に制限されない。上記各肺炎菌に特異的な標的核酸としては、
 10
 ・ニューモニエのlytAや、ヘモフィルス・インフルエンザのdnaJや、マイコプラズマ・ニューモニエのdnaJ1や、クラミドフィラ・ニューモニエのdnaJや、スタフィロコッカス・アウレウスのspaAや、MRSAのmecAや、レジオネラ・ニューモフィラのdnaJや、モラクセラ・カタラーリスのdnaJや、シュードモナス・アエルギノーサのdnaJや、クレブシエラ・ニューモニエのdnaJに含まれる領域の核酸を例示することができる。

【0028】

上記工程(a)又は(a')において用いられるプライマー対は、10種類の検出対象肺炎菌における各肺炎菌特異的な標的核酸を増幅することができるプライマー対であり、
 20
 配列番号21~40に示されるヌクレオチド配列から選ばれる検出対象肺炎菌ごとに異なる標的配列を含むプライマー対である。より具体的には、
 ・ニューモニエには5'-CAATCTAGCAGATGAAGCAGG-3'(配列番号21)と5'-GGTTGTTTGGTTGGTTATTCG-3'(配列番号31)、
 ・ヘモフィルス・インフルエンザには5'-TCAATACTCTTGACACATTTGTGAT-3'(配列番号22)と5'-ATACGAAGAAACCTTGCTGAC-3'(配列番号32)、
 ・マイコプラズマ・ニューモニエには5'-CCGGGATGGTTAGCTGTAACAG-3'(配列番号23)と5'-TACCTTCTTGTACTTACTTCC-3'(配列番号33)、
 ・クラミドフィラ・ニューモニエには5'-CATGGTGTTGAGAAAGGAACCTTGTAGT-3'(配列番号24)と5'-TCCACGACTCTGTACCACCTTG-3'(配列番号34)、
 ・レジオネラ・ニューモフィラには5'-CGTCAATCACGTGGACAAAGAG-3'(配列番号25)と5'-AGTACCATGTCCTTGGAAACGGT-3'(配列番号35)、
 ・クレブシエラ・ニューモニエには5'-GAAGTTCCGATCAACTTCCAC-3'(配列番号26)と5'-AAGCTCTCCTGAAGCTCTTT-3'(配列番号36)、
 ・シュードモナス・アエルギノーサには5'-ACAGGGATCGGAAATCAT-3'(配列番号27)と5'-CGCGGACCTGCGCTACACCCTGGACC-3'(配列番号37)、
 ・モラクセラ・カタラーリスには5'-CAAAGGCTTGC CCAAAGATA-3'(配列番号28)と5'-GAAGCCGAAGAAAAGCTCAA-3'(配列番号38)、
 ・MRSAには5'-GTATGTGGAAAGTTAGATTGGG-3'(配列番号29)と5'-GATACATTTCTTTGGAAACGAT-3'(配列番号39)、
 ・スタフィロコッカス・アウレウスには5'-GAGTACATGTCGTTAAACCTGGTG-3'(配列番号30)と5'-TACAGTTGTACCAGATGAATGG-3'(配列番号40)にそれぞれに示される標的ヌクレオチド配列を含む、
 フォワードプライマーとリバー(キメラ)プライマーからなるプライマー対の組合せが用いられる。また、上記配列に代えて、
 ・クレブシエラ・ニューモニエについては5'-AGCGTATGAAATCCTGACTGAT-3'(配列番号54)と5'-CAAAGATATCGCTGAAGTCG-3'(配列番号56)、
 ・シュードモナス・アエルギノーサについては5'-GCGAGGTGTCGCTCTGCAAC-3'(配列番号55)と5'-GATGTGCAAGGTGGTGGTGGAA-3'(配列番号57)に示される標的ヌクレオチド配列を含む、
 フォワードプライマーとリバー
 30
 40
 50

(キメラ)プライマーからなるプライマー対の組合せを用いることもできる。

【0029】

上記フォワードプライマーとして、配列番号21～30、54又は55に示されるヌクレオチド配列からなるプライマーを用いる。これら検出対象肺炎菌ごとに異なる10種類の各標的配列の5'末端側にはタグ配列を付加することができる。かかるタグ配列としては、5'-TAGCAGGATCCCTCTAAG-3'(配列番号41)を例示することができる。上記リバースプライマーとして、配列番号31～40、56又は57に示されるヌクレオチド配列、及びこれら検出対象肺炎菌ごとに異なる10種類の各標的配列の5'末端側に付加されたRNAポリメラーゼプロモーター配列からなるプライマーを用いる。かかるRNAポリメラーゼプロモーター配列としては、T7RNAポリメラーゼのプロモーター配列、T3RNAポリメラーゼのプロモーター配列、SP6RNAポリメラーゼのプロモーター配列等を挙げることができるが、なかでもT7RNAポリメラーゼのプロモーター配列が、高いRNA増幅効率の点で好ましい。T7RNAポリメラーゼのプロモーター配列として、例えば、5'-AATTCCTAATACGACTCACTATAGGGAG-3'(配列番号42)や5'-CTAATACGACTCACTATAGGAG-3'(配列番号43)を挙げることができる。上記配列番号21～40又は54～57に示されるヌクレオチド配列において、1塩基又は数個(例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個)の塩基が欠失、置換又は付加されていても、各肺炎菌特異的な標的核酸を増幅することができるものであれば、本発明におけるプライマーとして使用することができる。上記フォワードプライマーやリバースプライマーは、DNA合成装置等を用いて常法により合成することができる。

【0030】

上記工程(a)又は(b')における検出対象の肺炎菌類の核酸を含む可能性のある被検試料としては、肺炎罹患患者の唾液、喀痰、末梢血、気管支肺胞洗浄、鼻腔洗浄液、うがい液、鼻咽頭スワブ及びそれらに含まれる微生物や、かかる微生物の培養物の細胞溶解液等を挙げることができる。かかる被検試料から核酸を抽出するための方法としては、チオシアン酸グアニジンを用いるRNA抽出法や、EDTA-SDS-フェノール-エタノールを用いる核酸抽出法等の公知の方法の他、ExtraGenII(東ソー社製)やMora-Extract(Advanced Microorganism Research社製)等の市販品を用いることができる。抽出したRNAやDNAを適宜切断処理して、1又は複数の標的RNAや標的DNAの5'側配列と3'側標的的特異的配列とを含むRNAやDNAを調製することができる。

【0031】

標的核酸が標的RNAである場合、上記工程(a)又は(b')において用いられる標的核酸を増幅するために、NASBA法、転写媒介性増幅法(TMA法)、転写酵素と逆転写酵素の協奏反応によるRNA増幅・検出法(Transcription Reverse Transcription Concerted Reaction、TRC法)等の公知のRNA増幅法を用いることができるが、NASBA法、特に国際公開2009/057330号パンフレットに記載のNASBA法を有利に用いることができる。このNASBA法は、試料中の標的RNAをRNAポリメラーゼや逆転写酵素を介して増幅する方法であるが、例えば、国際公開2009/057330号パンフレットに記載のNASBA法においては、(A)標的RNAの5'側標的的特異的配列に相当するDNA配列を含む、配列番号1～10に示されるキメラプライマーの5'末端を基板表面に固定させ、固相DNA(+)プライマーを調製する工程；(B)標的RNAの3'側配列と相補的なcDNA配列を含むプライマーの5'末端側にT7RNAポリメラーゼプロモーター配列を付加した、配列番号11～20に示される液相cDNA(-)プライマーを調製する工程；(B')必要に応じて、タグ配列の5'末端にRNAポリメラーゼプロモーター配列を付加した液相ユニバーサルプライマーを調製する工程；(C)標的RNAの3'側配列と5'側標的的特異的配列とを含む試料RNAを調製する工程；(D)工程(B)で調製された液相cDNA(-)プライマーと、工程(C)で調製された試料RNA鎖とを液相で接触させ、液相cDNA(-)プライマーと試料RNA

とをハイブリダイズさせ、次いで逆転写酵素によりDNA(-)鎖を伸長させてcDNA鎖-RNA鎖複合体を調製する工程；(E)工程(D)で調製されたcDNA鎖-RNA鎖複合体に、DNA鎖-RNA鎖複合体におけるRNA鎖を特異的に分解するRNA分解酵素を作用させ、一本鎖DNA(-)を調製する工程；(F)工程(E)で調製された一本鎖DNA(-)と、工程(A)で調製された固相DNA(+)プライマーとを液相で接触させ、一本鎖DNA(-)と固相DNA(+)プライマーとをハイブリダイズさせ、次いでDNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する酵素によりDNA(+)鎖を伸長させて二本鎖DNAを調製する工程；(G)工程(F)で調製された二本鎖DNAにRNAポリメラーゼを作用させ、DNA(-)鎖由来のRNAポリメラーゼプロモーター配列を利用して、一本鎖RNA(-)を増幅させる工程からなる方法が開示されている。

10

【0032】

標的核酸が標的DNAである場合も、上記工程(a)又は(b')において用いられる標的核酸を増幅するためにNASBA法やPCR法、ストランド置換増幅法(SDA法)、リガーゼ連鎖反応法(LCR法)等を用いることができる。フォワードプライマーとして配列番号21~30、54又は55に示されるヌクレオチド配列から選ばれるプライマーが、リバースプライマーとして配列番号31~40、56又は57に示されるヌクレオチド配列を含むプライマーが用いられる。

【0033】

上記工程(b)において用いられるプローブ対は、上記増幅産物と相補的なヌクレオチド配列から選ばれる肺炎菌ごとに異なるプローブ対、例えば配列番号1~20に示されるヌクレオチド配列から選ばれる肺炎菌ごとに異なるプローブ対であり、配列表では、便宜上DNA配列で示されているが、DNAのヌクレオチド配列からなるプローブ対であってもよいし、RNAのヌクレオチド配列からなるプローブ対であってもよい。しかし、プローブとしての安定性に優れていることからDNAのヌクレオチド配列からなるプローブ対であることが好ましい。

20

【0034】

上記の検出対象となる肺炎菌ごとに異なるプローブ対としては、ストレプトコッカス・ニューモニエの5'-ACGCACGAGTATTGCACGAATAACC-3'(配列番号1)と5'-TGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGT-3'(配列番号11)、ヘモフィルス・インフルエンザの5'-AAACTTGTCCGCATTGCCACGGTTC-3'(配列番号2)と5'-CTCTGGGGCTGAAAAAGGTTCATAAG-3'(配列番号12)、マイコプラズマ・ニューモニエの5'-AGGCCAAACACAAGTGTAAAGACTTG-3'(配列番号3)と5'-AGAATCAACGCTCCATCTTTGGTAC-3'(配列番号13)や、クラミドフィラ・ニューモニエの5'-ATCTTGTGAAACCTGTTCTGGTCAA-3'(配列番号4)と5'-TCAAAGGGATTAAATCCTGCGAACGT-3'(配列番号14)や、レジオネラ・ニューモフィラの5'-GAAGTTGAAATTACCGTTCCAAAGAC-3'(配列番号5)と5'-CAATTGACCCCTTGAAGAAGCAGCTA-3'(配列番号15)、クレブシエラ・ニューモニエの5'-GTGGTGGAGACGCCGGTGGGGCTGA-3'(配列番号6)と5'-TGAAACCCAGACCCGCAAGCTGTTC-3'(配列番号16)、シュードモナス・アエルギノーサの5'-GGTGACCGGTGTGGTGGCCGG-3'(配列番号7)と5'-GTCCTTGCAACCGACCCAGGGTCCGGCA-3'(配列番号17)、モラクセラ・カタラーリスの5'-GGTTGCGCGTTTTTCAAGGATCACTG-3'(配列番号8)と5'-CCACCAGAGCCCATGCCCTTGTTCAT-3'(配列番号18)、MRSAの5'-AGACCGAAACAATGTGGAATTGGC-3'(配列番号9)と5'-ATGCAGAAAGACCAAGCATACATAT-3'(配列番号19)、及び、スタフィロコッカス・アウレウスの5'-CATGATCAAACCTGGTCAAGAACTTG-3'(配列番号10)と5'-CGGCACCTACTGCTGACAAAATTGCT-3'(配列番号

30

40

50

20)の組合せを具体的に示すことができる。また、プローブ対として、ヘモフィルス・インフルエンザの5'-AACTTGTC CGCAT TGCCACGGTTCT-3'(配列番号44)と5'-TGTGATAGCTGTGGTGGCTCTGGGG-3'(配列番号49)、クラミドフィラ・ニューモニエの5'-TCAAGGGATTAAATCCTGCGAACGT-3'(配列番号45)と5'-ATCTTGTGAAACCTGTTCTGGTCAA-3'(配列番号50)、レジオネラ・ニューモフィラの5'-AAGAAGCAGCTATAGGAAAAGAAGT-3'(配列番号46)と5'-GGGGCGCTGATTTGCAATTTAATGT-3'(配列番号51)、クレブシエラニューモニエの5'-TCGAACAGGGCGGCATGGGGCGGGCGG-3'(配列番号47)と5'-CAGAAGCGTGC GG CCTACGATCAGT-3'(配列番号52)、シュドモナス・アエルギノースの5'-TCCAGGTTCA CCGGGGTTTCCACC-3'(配列番号48)と5'-GCTCTGCAACGACTTGCGGAACTC-3'(配列番号53)の組合せを用いることもできる。

【0035】

上記10種類のプローブ対のいずれを工程(c)における第1のプローブ又は工程(d)における第2のプローブにするかは、その存在が予想される検出対象肺炎菌等に応じて適宜選択・決定することができる。また、上記配列番号1~20又は44~53に示されるヌクレオチド配列において、1塩基又は数個(例えば1~5個、好ましくは1~3個、より好ましくは1~2個、さらに好ましくは1個)の塩基が欠失、置換又は付加されていても、各肺炎菌特異的な標的核酸を検出することができるものであれば、本発明における

【0036】

上記工程(c)における、第1プローブとしては、上記第2のプローブと対をなす少なくとも3種類のプローブ、例えば配列番号1~10に示されるヌクレオチド配列から選ばれる第2のプローブと対をなす少なくとも3種類、好ましくは少なくとも5種類の各肺炎菌の第1プローブを挙げることができ、例えば、5種類の各肺炎菌の第1プローブが標識高分子担体に結合した第1プローブ結合標識高分子担体を同時に2組用いることもできる。かかる複数の第1のプローブを標識高分子担体に結合させる方法としては、5'又は3'末端に付加基を導入した配列番号1~10に示されるヌクレオチド配列を有するDNAを、付加基を導入した標識高分子担体に結合させる方法を挙げることもできる。上記付加基としては、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基等を挙げることもできるが、例えば、標識高分子担体がカルボキシル基で修飾されている場合はアミノ基が好ましい。また、複数の第1のプローブを一つの標識高分子担体に結合させているので、この場合、検出に際して、従来のように、一つの標識高分子担体に一つの第1プローブを結合した第1プローブ結合標識高分子担体を複数混合する操作を必要としないことから、検出操作が簡便となるばかりでなく、標識ラテックス等の以下に述べる標識高分子担体濃度を至適濃度に設定することができる点で好ましい。本発明の1つの具体例を模式図として図13に示す。

【0037】

上記標識高分子担体における高分子担体としては、カルボキシメチルセルロース(CMC)、カルボキシル基を有するポリアクリル酸塩等の親水性樹脂やアクリル系ラテックス、ポリエステル系ラテックス、ポリスチレン系ラテックス、ポリウレタン系ラテックス、ポリ酢酸ビニル系ラテックス、SBR樹脂、NBR樹脂、ポリアミド系ラテックス、カルボキシ変性ポリスチレン系ラテックス等のラテックスなどを挙げることもできるが、上記配列番号1~10に示されるヌクレオチド配列にアミノ基が導入されている場合には、アミノ基とカルボキシル基を介して共有結合を生じる反応によって、配列番号1~10に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類、好ましくは少なくとも5種類の各肺炎菌の第1のプローブを標識高分子担体に結合させることが容易となるため、ポリスチレン系ラテックス中にカルボキシル基を導入したカルボキシ変性ポリスチレン系ラテックスが好ましく、具体的には、カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス(固型分4

% (w/w)) (Duke Scientific社製) やカルボキシル基含有ポリスチレンラテックス (固型分10% (w/w)) (Bangs社製) を用いることができる。

【0038】

具体的な第1プローブが複数結合した標識高分子担体である第1プローブ結合標識高分子担体の調製方法としては、例えば、配列番号1~10に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類の各肺炎菌の5'末端にアミノ基を導入した第1プローブと、カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス (Bangs社製) と、水溶性カルボジイミドを50mMのMES (2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate) (同仁化学研究所社製) 緩衝液中で混合し、ラテックス中のカルボキシル基と第1のプローブのアミノ基とを結合させた後、モノエタノールアミン (和光純薬工業社製) を添加し、さらに反応させ、上記反応液を遠心分離後上清除去し、得られた沈殿に非イオン性の界面活性剤を含むHEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) (埼京化成社製) 緩衝液で洗浄及び再懸濁して調製する方法を挙げることができる。また、高分子担体の粒子径の大きさは適宜選択することができるが、メンブレン孔径より小さい粒径から選択されることが好ましく、例えば直径500nm以下の粒子の大きさを選択することができる。

10

【0039】

また、上記標識高分子担体として、展開支持体の色と識別可能な色を呈する、高分子担体を用いてもよく、顔料等を用いて着色した高分子担体を用いることもできる他、蛍光標識高分子担体を用いることもできる。

20

【0040】

上記工程(d)における第2プローブとしては、上記第1のプローブと対をなす少なくとも3種類のプローブ、例えば配列番号11~20に示されるヌクレオチド配列から選ばれる、第1プローブと対をなす少なくとも3種類、好ましくは少なくとも5種類の各肺炎菌の第2プローブを挙げることができる。かかる第2プローブは支持体上に固相化されるが、一つの第2プローブを支持体上の所定の位置に固相化する(専用)ことも、複数の第2プローブを支持体上の所定の位置に固相化する(共用)こともできる。第2プローブを担持展開した支持体の調製方法としては、肺炎菌ごとに展開支持体上の識別可能な所定の位置に第2プローブを固相化する方法を挙げることができる。例えば、5'又は3'末端に付加基を導入した配列番号11~20に示されるヌクレオチド配列を有するプローブを展開支持体に固相化させる方法を挙げることができる。上記付加基としては、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基等を挙げることができるが、例えば、展開支持体がカルボキシル基で修飾されている場合はアミノ基が好ましく、かかる付加基の付加の有無に関わらず、化学合成法等公知の方法を利用して第2のプローブを作製することが可能である。

30

【0041】

上記展開支持体としては、ナイロンメンブレンやカルボキシル基修飾ナイロンメンブレン等のナイロンメンブレン誘導体、セルロースメンブレンやニトロセルロースメンブレン等セルロースメンブレン誘導体などを挙げることができるが、上記配列番号11~20に示されるヌクレオチド配列にアミノ基が導入されている場合には、アミノ基とカルボキシル基を介して共有結合を生じる反応によって、配列番号11~20に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも3種類、好ましくは少なくとも5種類の各肺炎菌の第2のプローブを展開支持体上の識別可能な所定の位置に固相化することが容易となるため、カルボキシル基修飾ナイロンメンブレンが好ましい。

40

【0042】

第2プローブ担持展開支持体の具体的な調製方法としては、例えば、カルボキシル基修飾ナイロンメンブレンを水溶性カルボジイミドにより処理し、脱イオン水で洗浄して活性化し、かかる活性化したカルボキシル基修飾ナイロンメンブレンに、第2のプローブ配列を有するヌクレオチドを肺炎菌ごとに識別可能となるように適宜割り振った所定の位置に固相化し、15分間風乾し、その後第2のプローブ配列を有するヌクレオチドが固相化さ

50

れたカルボキシル基修飾ナイロンメンブレンをT r i sベース緩衝液で処理することで活性基を消去し、ヌクレオチドが固相化されたメンブレンを脱イオン水で洗浄して調製する方法を例示することができる。第2プローブ配列を有するヌクレオチドの固相化の態様としては特に制限されず、ライン状でも円形スポット状でもよい。

【0043】

工程(e)における前記増幅産物を検出する方法としては、展開支持体に担持された第2プローブ及び標識高分子担体結合第1プローブに、増幅した1本鎖核酸をハイブリダイズさせて検出する方法であれば特に制限されないが、あらかじめ複数の第1プローブを標識高分子担体に結合した第1プローブ結合標識高分子担体を保持部に保持しておくことが好ましく、かかる保持部として、ADVANTEC製の吸収パッドを好適に例示することができる。かかる第1プローブ結合標識高分子担体を保持した吸収パッド等からなる保持部を、前記第2プローブ担持展開支持体の他端に順次連結することにより、本発明の検出方法に有利に用いることができる核酸クロマトグラフ用試験片とすることができる。保持部の作製方法としては、第1プローブ配列を有するヌクレオチドが複数結合している標識高分子担体を保持部に塗布し、乾燥させる方法を例示することができる。

10

【0044】

工程(e)において、前記工程(a)における増幅産物を、展開支持体に担持された第2プローブ及び標識高分子担体に結合した第1プローブにハイブリダイズさせて検出する方法としては、例えば、上記核酸クロマトグラフ用試験片を、増幅産物を含む溶液に浸すことで、上記第1プローブ結合標識高分子担体は、上記保持部から展開支持体に浸出し、展開支持体上の第1プローブと対をなす各検出対象肺炎菌の第2プローブが固相化されている所定の位置に達した場合に、かかる所定の位置で、上記増幅産物をサンドイッチハイブリダイズすることで捕捉することができる。増幅産物中に標的となる1本鎖核酸が複数種存在する場合であっても順次所定の位置で各第2プローブにより補足されることになる。

20

【0045】

ついで、工程(f)において、第1プローブ配列を有するヌクレオチドが結合している標識高分子担体が、第2プローブ配列を有するヌクレオチドが展開支持体上の固相化されている位置に達した所定の位置で蓄積することで、所定の位置に現れる着色ラインや着色スポット等の有無を検出像として直接又は蛍光可視化装置で、判定することにより評価することができる。なお、上記判定は、簡便性の点で目視判定とすることが好ましい。

30

【0046】

また、配列番号1~10に示される配列からなる第1プローブに代えて又は追加して配列番号44~48に示される配列からなるヌクレオチドを用いることができ、配列番号11~20に示される配列からなる第2プローブに代えて又は追加して配列番号49~53に示される配列からなるヌクレオチドを用いることもできる。

【0047】

工程(c')における標的核酸を定性・定量する方法としては、電気泳動、ハイブリダイゼーション法、シーケンシング法を挙げることができる。電気泳動法としては、アガロースゲルを用いた分子ふるい効果で増幅産物の分子量解析をする方法や、キャピラリー電気泳動を利用したアジレントテクノロジー株式会社の解析システムを例示する事ができる。ハイブリダイゼーション法としては、リアルタイムPCRの様に、リアルタイムモニタリング用試薬を用いて増幅産物の生成過程をリアルタイムでモニタリングし解析する方法を挙げることができる。リアルタイムモニタリング試薬としては、例えば、TaqMan(登録商標: Applied Biosystems社製)プローブ等を挙げることができる。ハイブリダイゼーション法には、ノーザンブロット法を含めることもできる。シーケンシング法としては、ジデオキシヌクレオチドを用いてDNAポリメラーゼの合成を塩基特異的に停止させるジデオキシ法等を例示することができる。

40

【0048】

50

本発明の肺炎原因菌の検出キットとしては、上記本発明の肺炎原因菌に検出方法に用いることができ、試料中より任意に抽出された各肺炎菌に特異的な標的核酸を増幅することができる配列番号 2 1 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 1 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 2 2 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 2 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 2 3 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 3 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 2 4 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 4 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 2 5 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 5 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 2 6 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 6 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 2 7 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 7 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 2 8 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 8 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 2 9 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 3 9 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 3 0 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 4 0 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 5 4 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 5 6 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；配列番号 5 5 に示されるヌクレオチド配列からなるフォワードプライマーと、配列番号 5 7 に示されるヌクレオチド配列及びその 5' 末端側に付加された RNA ポリメラーゼプロモーター配列からなるリバースプライマー；から選ばれる、肺炎菌ごとに異なる少なくとも 3 種類、好ましくは少なくとも 5 種類、すなわち 5 ~ 1 0 種類のプライマー対を備えたキットを例示することができ、かかるキットは、上記プライマー対の他、前記工程 (b') における RNA 増幅法に用いられる各種試薬類や、前記工程 (c') における標的核酸を定性・定量するために用いられる各種試薬類を備えていてもよい。または、試料中より任意に抽出された各肺炎菌に特異的な標的核酸からプライマーを用いて 1 本鎖核酸として増幅する増幅セットと；増幅産物と相補的なヌクレオチド配列、例えば配列番号 1 ~ 1 0 又は 4 4 ~ 4 8 に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも 3 種類の各肺炎菌の第 1 のプローブが標識高分子担体に結合された第 1 プローブ結合標識高分子担体と；第 1 のプローブと対をなす第 2 のプローブ、例えば配列番号 1 1 ~ 2 0 又は 4 9 ~ 5 3 に示されるヌクレオチド配列から選ばれる少なくとも 3 種類の各肺炎菌の第 2 プローブが、肺炎菌ごとに識別可能な所定の位置に固相化された、各肺炎菌専用の又は複数の肺炎菌共用の第 2 プローブ担持展開支持体とを備えたキットであってもよく、上記増幅セットと前記核酸クロマトグラフ用試験片とを備えたキットを好適に例示することができる。かかるキットは上記本発明の肺炎原因菌の検出方法に好適に用いることができる。

【 0 0 4 9 】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

10

20

30

40

50

法によりRNAが増幅したことを確認した。

【0053】

(各プライマー間における特異性の検証)

本件プライマー10対のマルチプレックス化を実施した際に、各プライマーが標的菌以外の対象菌と非特異反応を起こすか否かを検証した。結果を図9に示す。本件プライマー10対のすべてのプライマーにおいて非特異反応は認められなかった。

【0054】

(マルチプレックスプライマーを用いたNASBA法による標的RNA増幅)

レジオネラ・ニューモフィラ、シュドモナス・アエルギノーサ、クラミドフィラ・ニューモニエ、MRSA、ヘモフィルス・インフルエンザについて、本件プライマー対を用いたマルチプレックス化の検討結果を図10に示す。また同様に、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、モラクセラ・カタラーリス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエについて、本件プライマー対を用いたマルチプレックス化の検討結果を図11に示す。すべての標的検出対象肺炎原因菌種のRNAがNASBA法により増幅されることが確認された。

10

【0055】

(NASBA産物の確認)

NASBAによって増幅したRNAが目的の標的配列を有するか否かを判断する必要がある。NASBA反応の副産物として合成されるDNAを標的としたリアルタイムPCRを実施し、NASBA産物とNASBA未反応サンプルのコントロールのCt値を測定し、この差を比較することによって標的NASBA産物を間接的に確認した。SYBR premix EX Taq Hot start (TaKaRa bio社製)を用いて、プロトコルに準じ、PCRは、95 ; 3min、(95 ; 10sec、65 ; 10sec、72 ; 10sec) x 40 cyclesの条件で行った。全菌種において、NASBAによって増幅したRNAが目的の標的NASBA産物を間接的に確認された。モラクセラ・カタラーリスの例を図12に示す。

20

【0056】

[プローブ対の決定]

検出対象となる各検出対象肺炎菌の以下の表1に示される遺伝子領域の核酸の標的配列に対し相補的配列を持つ1対のアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブの作製を試みた。

30

【0057】

【表 1】

菌株名	遺伝子領域
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	LytA
<i>Haemophilus influenzae</i>	DnaJ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	DnaJ1
<i>Legionella pneumophila</i>	DnaJ
<i>Chlamydomphilia pneumoniae</i>	DnaJ1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DnaJ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DnaJ
<i>Staphylococcus aureus</i>	spaA
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	mecA
<i>Moraxella catarrhalis</i>	DnaJ

10

20

【0058】

各種肺炎菌について、表 1 に記載されている各遺伝子領域の増幅された一本鎖核酸に対するプローブ候補として 20 ~ 30 塩基長の配列を選択するために、配列情報解析ソフトウェア DNA S I S p r o (登録商標) (日立ソフトウェア社製) を用いて解析し、配列番号 1 ~ 20 に示される配列を有するオリゴヌクレオチドプローブを決定した。

30

【0059】

[第 1 プローブ結合標識高分子担体の作製]

オリゴヌクレオチドプローブとカルボキシル基含有ポリスチレンラテックスとを結合させるために、5' 末端にアミノ基を導入した 5' 末端アミノ基導入オリゴヌクレオチドを合成した。上記で選択された配列からなる 20 種類の各オリゴヌクレオチドの 5' 末端アミノ基導入オリゴヌクレオチドを各肺炎菌の第一のプローブ配列として作製した。検出対象とされる、少なくとも 3 種類、好ましくは少なくとも 5 種類の各肺炎菌の第 1 のプローブ配列を有するヌクレオチドと、カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス (Bangs 社製) とを、水溶性カルボジイミドを 50 mM の M E S (2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate) (同仁化学研究所社製) 緩衝液中で混合し、ラテックス中のカルボキシル基と複数の第 1 プローブのアミノ基とを結合させた後、モノエタノールアミン (和光純薬工業社製) を添加し、さらに反応させた。上記反応液を遠心分離後上清除去し、得られた沈殿に非イオン性の界面活性剤を含む H E P E S (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) (埼京化成社製) 緩衝液で洗浄及び再懸濁して、第 1 のプローブ配列を有するヌクレオチドが複数結合している標識高分子担体が調製され、使用まで 4 にて保存された。

40

【0060】

[第 2 プローブ配列を有するオリゴヌクレオチドが、肺炎菌ごとに識別可能な所定の位置に固相化された展開支持体の作製]

50

上記で選択された第2プローブ配列からなるオリゴヌクレオチドと、カルボキシル基修飾ナイロンメンブレン（ポール社製）とを結合させるために、選択された第2プローブ配列の3'末端にアミノ基を導入した3'末端アミノ基導入オリゴヌクレオチド（第2プローブ）をDNA合成機により作製した。上記メンブレンを水溶性カルボジイミドにより処理し、脱イオン水で洗浄し活性化させた。かかる活性化されたカルボキシル基修飾ナイロンメンブレンに上記3'末端アミノ基導入オリゴヌクレオチド（第2プローブ）の1種類を結合させ、15分間風乾した。風乾されたメンブレンをTrisベース緩衝液で処理し、残存する活性基を除去した後、メンブレンを脱イオン水で洗浄し、再び風乾することで、第2プローブ配列を有するオリゴヌクレオチドが、肺炎菌ごとに識別可能な所定の位置にライン状に固相化された展開支持体が作製された。検出対象の肺炎菌が3種以上のため、上記処理を肺炎菌ごとに少なくとも3回行った。

10

【0061】

5'又は3'末端側にアミノ基が導入された配列は以下表2の通りである。各種肺炎菌について、以下の組合せにより本発明の核酸クロマトグラフ法を行うこととした。なお、表中肺炎菌名最後尾の「L」は標識高分子担体に結合しているプローブであることを示し、「M」は固相化されたプローブであることを示す。

【0062】

【表2】

肺炎菌	プローブ配列(5'-3')
MRSA L	NH2-AGACCGAAACAATGTGGAATTGGC
MRSA M	ATGCAGAAAGACCAAAGCATACATAT-NH2
Pseudomonas aeruginosa L	NH2-GGTGACCGGTGTGGTGCCGG
Pseudomonas aeruginosa M	GTCTTGCAACCGACCAGGGTCCGCA-NH2
Haemophilus influenza L	NH2-AACTTGTCCGCATTGCCACGGTTC
Haemophilus influenza M	CTCTGGGGCTGAAAAAGGTTCTAAAG-NH2
Staphylococcus aureus L	NH2-CATGATCAAACCTGGTCAAGAACTTG
Staphylococcus aureus M	CGGCACTACTGCTGACAAAATTGCT-NH2
Streptococcus pneumoniae L	NH2-ACGCACGAGTATTGCACGAATAACC
Streptococcus pneumoniae M	TGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGT-NH2
Chlamydomphila pneumoniae L	NH2-ATCTTGTGAAACCTGTTCTGGTCAA
Chlamydomphila pneumoniae M	TCAAGGGATTAATCCTGCGAACGT-NH2
Klebsiella pneumoniae L	NH2-GTGGTGGAGACGCCGGTGGGGCTGA
Klebsiella pneumoniae M	TGAAACCCAGACCGGCAAGCTGTTC-NH2
Legionella pneumophila L	NH2-GAAGTTGAAATTACCGTTCCAAGAC
Legionella pneumophila M	CAATTGACCCTTGAAGAAGCAGCTA-NH2
Moraxella catarrhais L	NH2-GGTTGCGCGTTTTTCAGGATCACTG
Moraxella catarrhais M	CCACCAGAGCCCATGCCTTGTTTCAT-NH2
Mycoplasma pneumoniae L	NH2-AGGCCAAACACAAGTGTAAGACTTG
Mycoplasma pneumoniae M	AGAATCAACGCTCCATCTTTGGTAC-NH2

20

30

40

【0063】

[リファレンスライン]

肺炎原因菌の検出位置にラインが検出されなかった場合、検出される核酸が無いことが

50

その要因である点を明らかとするために、クロマトストリップ上を標識高分子担体がフローできたことを証明する目的で検出されるラインがリファレンスラインである。なお、このラインは標識高分子担体のフローの確認を行う目的で検出されるため、検出される肺炎原因菌の核酸がある場合もリファレンスラインが検出されるようにすることが好ましい。

【 0 0 6 4 】

[核酸クロマトグラフ測定用試験片の作製]

本発明に用いられる核酸クロマトグラフ用試験片を以下のように作製した。上記各肺炎菌の第1プローブ配列を有するヌクレオチドが複数結合している標識高分子担体を緩衝液に溶解して展開パッド (ADVANTEC社製) に塗布後、乾燥させて保持部とした。上記展開支持体の一端に、上記展開支持体とは重なり合わない部分で保持部を連結した。さらに、該展開支持体の他端に吸収パッド (ADVANTEC社製) を連結し、核酸クロマトグラフ測定用試験片とした。

10

【 0 0 6 5 】

[標識高分子担体結合第1プローブ間の非特異結合の確認]

外来患者の肺炎菌特定に特に有効とされる5種類の肺炎原因菌についての外来用プローブセットと、入院患者の肺炎菌特定に特に有効とされる5種類の肺炎原因菌についての入院用プローブセットについて、各肺炎菌用の標識高分子担体結合第1プローブと第2プローブ (専用) との間において直接的にハイブリダイズして特異的結合が生じないかどうかを増幅産物の非存在下でチェックした。第1プローブ結合標識高分子担体として、外来患者用検出対象肺炎菌の5種類の第1プローブが結合された第1プローブ結合標識高分子担体と、入院患者用検出対象肺炎菌の5種類の第1プローブが結合された第1プローブ結合標識高分子担体とを用い、第2プローブ担持展開支持体としては、5種類の外来患者用検出対象肺炎菌の第2プローブがそれぞれ担持された5枚の第2プローブ担持展開支持体 (専用) と、5種類の入院患者用検出対象肺炎菌の第2プローブがそれぞれ担持された5枚の第2プローブ担持展開支持体 (専用) とを用いた。結果を図14に示す。実験に供したいずれの菌株においても、リファレンスの位置に赤色の着色線が観察され、増幅産物の非存在下において、標識高分子担体結合第1プローブと第2プローブとの間に非特異結合が生じないことが確認された。

20

【 0 0 6 6 】

[核酸クロマトグラフ法による標的NASBA産物の検出]

レジオネラ・ニューモフィラ、シュードモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、MRSA、ヘモフィルス・インフルエンザ、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、モラクセラ・カタラーリス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエについて、各菌に対するプライマーで増幅されたNASBA産物を核酸クロマトグラフィーで検出検討した。測定用試験片は、表2に示されるプローブを用いて、上記の方法に準じて各検出対象肺炎菌毎に個別に作製して行った。その結果を図15に示す。いずれのNASBA産物も、各肺炎菌専用プローブが結合されている核酸クロマトストリップで検出された。

30

【 0 0 6 7 】

(各プローブにおける特異性の検証)

各プローブが標的菌以外の対象菌のNASBA産物と非特異反応を起こすか否かを検証した。結果を図16に示す。本件プローブのすべてにおいて非特異反応は認められなかった。

40

【 0 0 6 8 】

(マルチプレックスプライマーで増幅されたNASBA産物の核酸クロマトグラフィーによる検出)

レジオネラ・ニューモフィラ、シュードモナス・アエルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、MRSA、ヘモフィルス・インフルエンザ、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、モラクセラ・カタラーリス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミドフィラ・ニューモニエについて、本件プライマー対を用いたマルチ

50

プレックスプライマーで増幅されたNASBA産物を核酸クロマトグラフィーで検出した。その結果を図17に示す。マルチプレックスプライマーを用いて増幅されたNASBA産物は、いずれも核酸クロマトグラフィーで検出された。

【0069】

[複数肺炎菌の検出]

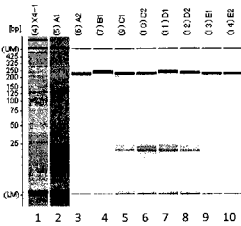
レジオネラ・ニューモフィラは、BCYE培地を用い35で培養し、クラミドフィラ・ニューモニエは、HEp-2細胞を用いて培養し、マイコプラズマ・ニューモニエは、PPL0培地を用い37で培養し、ヘモフィルス・インフルエンザは、チョコレート培地を用い37で培養し、ストレプトコッカス・ニューモニエは、羊血液培地を用い37で培養した。培養後の各菌懸濁液100μLからEXTRAGENII試薬(東ソー社製)を用いて各試料より核酸を抽出し、50μLのRNase free waterで上記5種類の菌の核酸を溶解した。2.5μLの核酸溶液をNASBA Amplificationキット(カイノス社製)を用いてtotal RNAを鋳型としてNASBA Amplificationキット(カイノス社製)を使用し、本発明のプロブ対のセットとは異なる10菌種の各ターゲット領域内の配列にハイブリダイズする各菌種固有のプライマー対を用いて、NASBA増幅反応を行った。この際の各菌専用プライマー濃度は、最終濃度が0.2μMになるように調製した。増幅反応後各菌の溶液は、増幅終了後のNASBA増幅産物を前処理する事なく1本にまとめ、直ちに核酸クロマトストリップを用いて核酸クロマトグラフ法による肺炎菌の検出を試みた。NASBA産物をフローさせなかった場合は、フローが行われた事を示すリファレンスラインのみ検出された(図18A参照)。上記肺炎原因菌5菌種のNASBA産物をフローさせた場合リファレンスラインとは別に各々の検出位置にラインが検出された(図18B参照)。

10

20

【図1】

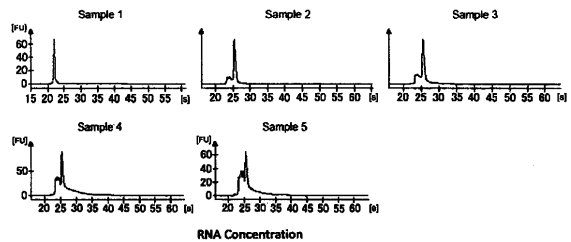
Moraxella catarrhalis dnaJ プライマーの設計



- 1: Ladder
- 2: Negative control
- 3: *Moraxella catarrhalis* GTC 01544
- 4: *Moraxella catarrhalis* GTC 02090
- 5: *Moraxella catarrhalis* GTC 10829
- 6: *Moraxella catarrhalis* GTC 10830
- 7: *Moraxella catarrhalis* GTC 10831
- 8: *Moraxella catarrhalis* GTC 10832
- 9: *Moraxella catarrhalis* GTC 10833
- 10: *Moraxella catarrhalis* GTC 10834

【図3】

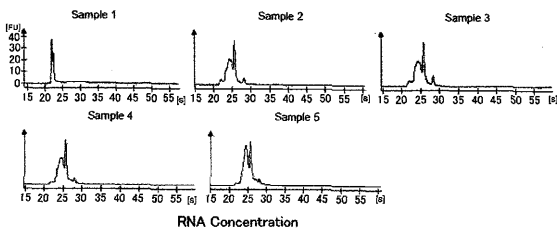
L. pneumophila SG1 (dnaJ)



- Sample 1: *Legionella pneumophila* SG1 (control, template 1) ... 1,932 pg/μl
 - Sample 2: *Legionella pneumophila* SG1 (template 1) ... 35,658 pg/μl
 - Sample 3: *Legionella pneumophila* SG1 (template 1/10) ... 28,630 pg/μl
 - Sample 4: *Legionella pneumophila* SG1 (template 1/100) ... 37,010 pg/μl
 - Sample 5: *Legionella pneumophila* SG1 (template 1/1000) ... 28,478 pg/μl
- RNAの増幅を確認した。

【図2】

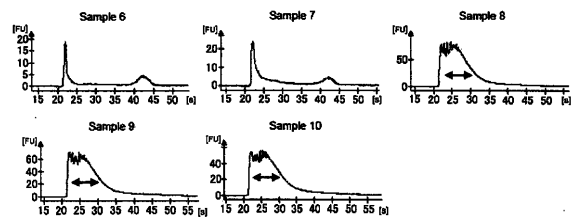
S. pneumoniae (lytA)



- Sample 1: *S. pneumoniae* (control, template 1) ... 2,039 pg/μl
 - Sample 2: *S. pneumoniae* (template 1) ... 76,597 pg/μl
 - Sample 3: *S. pneumoniae* (template 1/10) ... 226,365 pg/μl
 - Sample 4: *S. pneumoniae* (template 1/100) ... 88,861 pg/μl
 - Sample 5: *S. pneumoniae* (template 1/1000) ... 89,706 pg/μl
- RNAの増幅を確認した

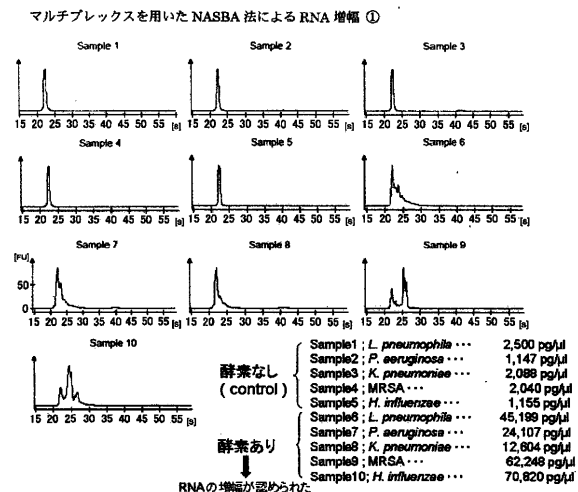
【図4】

K.pneumoniae subsp.pneumoniae (dnaJ)

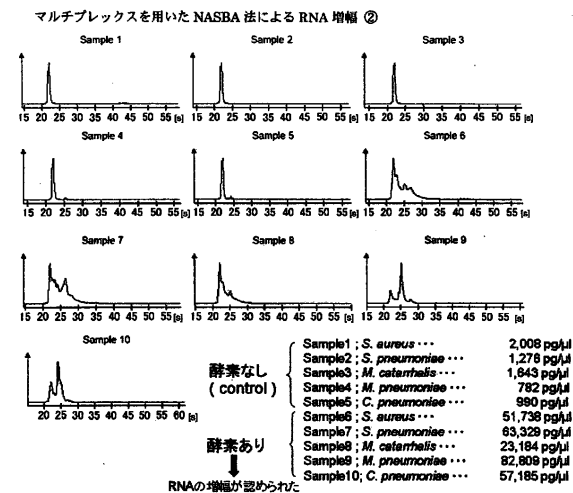


- sample 6: *K.pneumoniae subsp.pneumoniae* (control, template 1) ... 3,312 pg/μl
 - sample 7: *K.pneumoniae subsp.pneumoniae* (template 1) ... 6,137 pg/μl
 - sample 8: *K.pneumoniae subsp.pneumoniae* (template 1/10) ... 113,421 pg/μl
 - sample 9: *K.pneumoniae subsp.pneumoniae* (template 1/100) ... 100,200 pg/μl
 - sample 10: *K.pneumoniae subsp.pneumoniae* (template 1/1000) ... 82,930 pg/μl
- RNAの増幅を確認した。

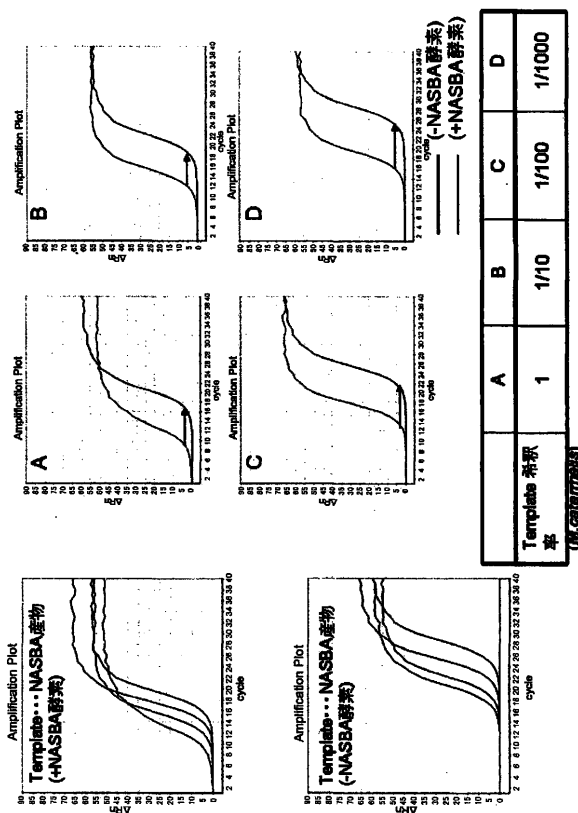
【 図 1 0 】



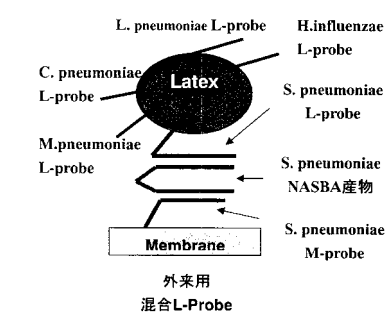
【 図 1 1 】



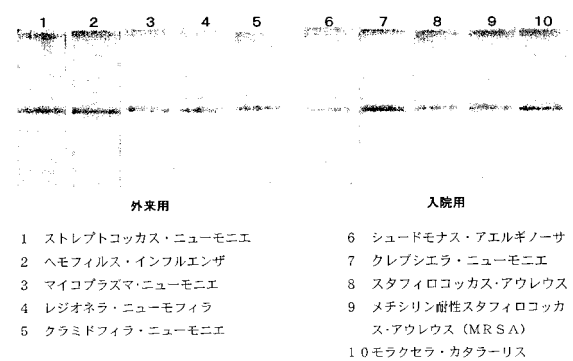
【 図 1 2 】



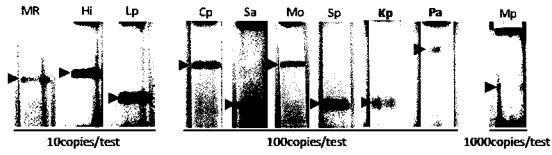
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

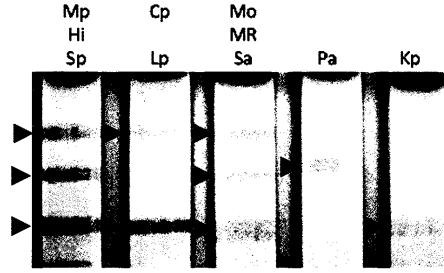


MR : メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (MR S A)
 Hi : ヘモフィルス・インフルエンザ
 Lp : レジオネラ・ニューモフィラ
 Cp : クラミドフィラ・ニューモニエ
 Sa : スタフィロコッカス・アウレウス
 Mo : モラクセラ・カタラーリス
 Sp : ストレプトコッカス・ニューモニエ
 Kp : クレブシエラ・ニューモニエ
 Pa : シュードモナス・アエルギノーサ
 Mp : マイコプラズマ・ニューモニエ

【 図 1 6 】

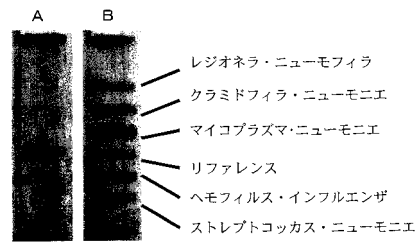
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>Spneumoniae</i>	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 <i>H. influenzae</i>	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
3 <i>M. pneumoniae</i>	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-
4 <i>C. pneumoniae</i>	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-
5 <i>L. pneumophila</i>	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-
6 <i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-
7 <i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
8 <i>M. catarrhalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-
9 <i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-
10 MRSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○

【 図 1 7 】



Mp : マイコプラズマ・ニューモニエ
 Hi : ヘモフィルス・インフルエンザ
 Sp : ストレプトコッカス・ニューモニエ
 Cp : クラミドフィラ・ニューモニエ
 Lp : レジオネラ・ニューモフィラ
 Mo : モラクセラ・カタラーリス
 MR : メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (MR S A)
 Sa : スタフィロコッカス・アウレウス
 Pa : シュードモナス・アエルギノーサ
 Kp : クレブシエラ・ニューモニエ

【 図 1 8 】



【 配列表 】

0005565781000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 宇治家 武史
東京都文京区本郷二丁目38番18号株式会社カイノス内
- (72)発明者 我那覇 誠
東京都文京区本郷二丁目38番18号株式会社カイノス内
- (72)発明者 山本 茂一
東京都文京区本郷二丁目38番18号株式会社カイノス内

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特開2006-201062(JP,A)
特開2009-39046(JP,A)
国際公開第2008/041354(WO,A2)
臨床化学, (2007), 36, [1], p.19-24
第82回日本細菌学会総会予稿集, (2009), p.105(WS21-3)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

BIOSIS/MEDLINE(STN)