



(43) 国際公開日
2009 年 1 月 22 日 (22.01.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/011277 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/062479
- (22) 国際出願日: 2008 年 7 月 10 日 (10.07.2008)
- (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2007-184729 2007 年 7 月 13 日 (13.07.2007) JP
 特願2007-184730 2007 年 7 月 13 日 (13.07.2007) JP
 特願2007-184731 2007 年 7 月 13 日 (13.07.2007) JP
 特願2007-184732 2007 年 7 月 13 日 (13.07.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋紡績株式会社 (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA)
 [JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目

- 2 番 8 号 Osaka (JP). 氏内 圭一 (SHIUCHI, Keiichi)
[JP/JP]; 〒9140047 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号
東洋紡績株式会社 内 Fukui (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 楠本 正博
(KUSUMOTO, Masahiro) [JP/JP]; 〒9140047 福井県
敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社 内
Fukui (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF ACID-FAST BACTERIUM, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 抗酸菌属細菌の検出および同定用オリゴヌクレオチド、およびその用途

[図1]

[illegible]

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a rapid, reliable and simple method for the detection or the species identification of an acid-fast bacterium which is important in clinical diagnosis. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] A melting curve analysis is carried out by using a probe whose target nucleic acid is a region having a high bacteria species specificity in *dnaJ1* gene in an acid-fast bacterium.

(57) 要約:【課題】臨床診断上重要な抗酸菌属細菌について迅速、確実かつ簡便に検出または菌種同定する方法を提供する。【解決手段】抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が極めて高い領域を標的核酸とするプローブを用いた融解曲線解析を行う。

AA REGION A
BB REGION B



(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

明 細 書

抗酸菌属細菌の検出および同定用オリゴヌクレオチド、およびその用途 技術分野

[0001] 本発明は、臨床診断上、

(1)ヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、

(2)トリ型結核菌(*Mycobacterium avium*)またはマイコバクテリウム・イントラセル
ラーレ(*Mycobacterium intracellulare*)、または、

(3)マイコバクテリウム・カンサシイ(*Mycobacterium kansasii*)

を迅速、確実かつ簡便に検出するためのオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを
利用するヒト型結核菌をはじめとする抗酸菌属細菌の検出方法ならびにそれらの試
薬に関する。

また、本発明は、臨床診断上、ヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)をは
じめとする抗酸菌属(*Mycobacterium*属)細菌を迅速、確実かつ簡便に検出または
菌種同定するためのオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを利用する抗酸菌属細
菌の検出または菌種同定方法ならびにそれらの試薬に関する。

背景技術

[0002] 抗酸菌属は抗酸性の性質をもつグラム陽性桿菌であり、結核菌やらい菌など、重篤
な病変を引き起こす病原菌が多い。一般に抗酸菌は発育が遅く、培養にはかなりの
時間を要する。

[0003] この中でもヒト型結核菌はヒトに結核を起こす病原体であり、その検査は临床上、極
めて重要である。ヒト型結核菌が起因となる病変には肺結核が圧倒的に多いが、ほと
んど全ての臓器に結核性病変を起こし、結核性胸膜炎、結核性髄膜炎、カリエス、腸
結核、腎結核、関節結核などを起こす。感染源は患者であり、飛沫感染などによって
経気道的に感染する。

[0004] ヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)の他にも、ウシ型結核菌(*Mycoba
cterium bovis*)、アフリカ型結核菌(*Mycobacterium africanum*)、ネズミ型結
核菌(*Mycobacterium microti*)、マイコバクテリウム・カネッティ(*Mycobacteriu*

m canettii)、マイコバクテリウム・カプレ (*Mycobacterium caprae*)、アシカ型結核菌 (*Mycobacterium pinnipedii*) が結核菌群に分類されている。

- [0005] 従来、結核菌群の検査は培養法によって行っていた。一般的には小川培地上で結核菌を分離培養し、培地上の性状(増殖速度・温度、コロニーの形状や色素産生など)、ナイアシンテスト、硝酸還元試験、耐熱カタラーゼ試験、ツイーン80水解試験などの結果から菌種を同定する。しかし、ヒト型結核菌は増殖が遅く、分離培養だけで約3～4週間を要し、その後の各種試験で、さらに約2～3週間を要する。そのため、ヒト型結核菌の検出または同定検査は、その臨床上の重要性・緊急性にもかかわらず、約1ヶ月以上を要し、機動的な診断や投薬に大きな制約となっていた。ヒト型結核菌が産生するタンパク質を抗原抗体反応で検出する方法などが開発されてきたが、未だ十分な菌種同定を行うまでに至っておらず、しかも、感度的に問題があるため分離培養が必要なことは変わりがなかった。
- [0006] 結核菌群の他にも、トリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、マイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*)、マイコバクテリウム・スクロフラセウム (*Mycobacterium scrofulaceum*)、マイコバクテリウム・フォーチュイタム (*Mycobacterium fortuitum*) などの非定型抗酸菌が、ヒトに病原性を示すことが知られている。症状は結核に比べて軽く、感染力も弱い、抗結核剤に耐性であり、有効な薬剤はない。これらは結核菌と同様に、ヒトの肺、リンパ節、皮膚などを冒し、特に肺感染症が多い。
- [0007] 一般に、肺結核の鑑別は、臨床症状、病理組織学的所見からは極めて困難であるため、菌の同定によってなされなければならない。非定型抗酸菌の病原性はマイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*) > トリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*) > その他の順で大きく、上位3菌種は特に重要である。
- [0008] 従来から、これらの非定型抗酸菌をヒト結核菌と同様、小川培地上で分離培養し、培地上の性状(増殖速度・温度、コロニーの形状や色素産生など)、ナイアシンテスト、硝酸還元試験、耐熱カタラーゼ試験、ツイーン80水解試験、光発光テストなどの結果から菌種を同定している。しかし、これらも一般的に増殖が遅く、菌種の同定までに

約1ヶ月以上を要することが多い。

- [0009] 結核菌群と非定型抗酸菌の同定は、臨床上、極めて重要である。ヒト型結核菌は病状が重篤であるが、ストレプトマイシン、リファンピシン、エタンブトール、イソニコチン酸ヒドラジドなどの抗結核剤投与が有効なため、早期に治療を開始する必要がある。一方、非定型抗酸菌は一般にこれらの薬剤に対して耐性である。菌種の同定は、その後の治療方針を大きく左右するのである。しかしながら前述したように、これらの菌は増殖が遅く、菌種同定には数週間を要する。また、マイコバクテリウム・スメグマ菌(*Mycobacterium smegmatis*)など、類似の非病原性菌が検出されることもある。迅速で確実な検出及び菌種同定法が望まれるのはこのためである。
- [0010] 最近、DNAやRNAを人為的に増幅し、増幅後の核酸を検出することによって、高感度に病原体を検出する方法が開発されてきた。既に知られている核酸増幅方法としてPCR(特許文献1、特許文献2、特許文献3)、NASBA(非特許文献1)、LCR(特許文献4、特許文献5)、SDA(非特許文献2)、RCR(特許文献6)、TMA(非特許文献3) LAMP(非特許文献4)、ICAN(非特許文献5)などが挙げられる。
- [0011] なかでもPCR法は、標的核酸、4種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、一対のオリゴヌクレオチドプライマー、および耐熱性DNAポリメラーゼの存在下で、温度の上昇および下降を繰り返すことにより、当該一対のオリゴヌクレオチドプライマーで挟まれる標的核酸の特定領域を指数関数的に増幅させることができる。
- [0012] 通常PCR法は特許文献3に示されているように、a) 90～105℃の範囲内の温度(好ましくは90～100℃)で0.5～5分間(好ましくは0.5～3分間)、変性させる工程、b) 35～65℃の範囲内の温度(好ましくは37～60℃)で0.5～5分間(好ましくは1～3分間)、プライマーと鋳型のハイブリッドを形成させる(アニーリング)工程、およびc) 40～80℃の範囲内の温度(好ましくは50～75℃)で0.5～40分間(好ましくは1～3分間)、プライマー伸長生成物を形成させる(伸長)工程、からなる増幅サイクルを用いる。
- [0013] PCR法のサイクルを繰り返し行うことで増幅した核酸断片は、各種の検出方法を用いて検出できるようになる。現在利用されている代表的な検出方法として、アガロースゲル電気泳動法がある。しかしながら、電気泳動による検出では指数関数的に増幅さ

れた標的核酸の増幅産物を取り扱う必要があり、コンタミネーションが起こる危険性が高かった。また、操作も煩雑であり検出終了までの時間も1時間以上を要するため、当該検出方法の臨床診断への適用は困難であった。

[0014] 電気泳動以外の検出方法として、二本鎖核酸に結合した時に蛍光が増強される性質を示すDNA挿入色素(インターカレーター)を利用する方法が一般的に用いられている。核酸増幅中のDNA濃度の上昇に伴う蛍光の増強は、反応の進行を測定するために、また標的核酸分子のコピー数を決定するために利用できる。さらに、精密に制御された温度変化に伴う蛍光の変化をモニターすることにより、例えばPCRサイクル反応の終了時点で、DNA融解曲線を作成することができる。このような融解曲線解析では二本鎖核酸の性質をある程度識別することができ、融解曲線解析での融解温度が極端に低い場合はプライマーダイマーなど、標的核酸断片より短い核酸断片が増幅されたことが考えられるし、主なピークが一本でない場合は標的核酸断片ではない非特異的な増幅核酸断片が存在することを示している。このように、蛍光を測定する方法によれば、増幅核酸断片の飛散などによりコンタミネーションが起こり正しい判定結果が得られなくなる危険性や、煩雑な操作から起こり得る人為的なミスを防止することができるため、臨床診断に適している。しかし、一般的なインターカレーター法は二本鎖核酸特異的に蛍光が生じるため、特に臨床診断など、目的の核酸配列に特異的な検出が必要とされる場合には、当該核酸配列に非特異的な二本鎖核酸をも検出する可能性があるため、それほど有効ではない。

[0015] 核酸配列特異的プローブ法は、増幅反応の進行をモニターするために、さらなる核酸反応成分(核酸プローブ)を利用する。この方法は、検出の基本として蛍光エネルギー転移(FET)を利用することが多い。一つあるいはそれ以上の核酸プローブを蛍光色素で標識し、一方のプローブに標識された蛍光色素はエネルギー供与体分子として、もう一方の蛍光色素はエネルギー受容体分子として働くことができるようにする。これらは時として、それぞれレポーター分子および消光分子として知られる。エネルギー供与体分子は励起スペクトラム範囲の特異的波長の光で励起され、引き続いて蛍光放出波長の範囲で光を放出する。エネルギー受容体分子も、様々な距離依存性エネルギー転移機構により、当該供与体分子からエネルギーを受け取ることに

より、この波長で励起される。蛍光エネルギー転移の特別な例には、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)がある。一般に、エネルギー受容体分子とエネルギー供与体分子が近接している場合、例えば、これらが同じまたは隣接する分子上にある場合に、受容体分子は供与体分子の放出エネルギーを受け取ることができる。通常、FRETまたはFRETプローブには二つの種類、すなわち、エネルギー受容体からエネルギー供与体を分離するために核酸プローブの加水分解を用いるものと、供与体分子と受容体分子の空間的關係を変化させるためにハイブリダイゼーションを用いるものが利用される。

[0016] 加水分解を用いるプローブは、TaqMan(登録商標)プローブとして市販されている。このプローブは、エネルギー供与体およびエネルギー受容体分子で標識されたオリゴヌクレオチドからなり、増幅核酸断片の一方の鎖の特異的領域にハイブリダイズするように設計される。例えばPCRにおいて、プライマーがこの鎖にアニールした後、Taqポリメラーゼが5'から3'へのポリメラーゼ活性によりDNAを伸長する。このときTaqMan(登録商標)プローブは、Taqによる伸長の開始を防ぐために、3'末端がリン酸化で保護されている。もしTaqMan(登録商標)プローブが産物の鎖にハイブリダイズしていれば、伸長するTaq分子がプローブを加水分解し、エネルギー受容体とエネルギー供与体を遊離し、検出可能なシグナルが発生する。このシグナルは累積的であり、遊離のエネルギー供与体および受容体分子の濃度は増幅反応の各サイクルで上昇する。しかし、蛍光シグナルの生成がプローブの加水分解反応の発生に依存するため、この方法には時間的不利益が存在する。また、50サイクル以上というような多数回の増幅サイクルが必要な場合、加水分解が非特異的に起こり得る問題点も見出されている。

[0017] ハイブリダイゼーションを用いるプローブは、数多くの型式のものが利用可能である。例えば、分子ビーコンは、ヘアピンループを形成するような相補的な5'および3'配列を有するオリゴヌクレオチドであり、その末端に標識された蛍光色素は、ヘアピン構造が形成されるためにFRETが起こるような近接位置にある。分子ビーコンの標的核酸配列へのハイブリダイゼーションに伴ってエネルギー受容体とエネルギー供与体が分離されるとFRETは起こらなくなることを利用して、検出を行う。

- [0018] また、標識プローブの対合も利用可能である。エネルギー供与体分子を標識したプローブとエネルギー受容体分子を標識したプローブが増幅核酸断片の鎖上で近接してハイブリダイズすることによってFRETが生じ、このFRETによって生じた波長の蛍光を検出する。このタイプの変種には、標識増幅プライマーと単一の近接する標識プローブの利用が含まれる。しかし、二つの標識オリゴヌクレオチドの使用、または二つの標識分子を含む分子ビーコンの使用は、一般に検出にかかるコストが高いことが問題である。さらに、例えば臨床診断において複数の病原体について菌種を同定しようとする場合には、複数のエネルギー受容体およびエネルギー供与体のペアと、それらから発せられる複数の波長の蛍光シグナルを検出する装置とが必要であり、非常に高価なシステムと複雑な試薬設計を強いられることが問題である。前述のように、ヒト型結核菌と非定型抗酸菌の同定は臨床診断上重要であり、迅速で確実な検出および菌種同定法が望まれているが、これらの技術では要望を満たすことができない。
- [0019] 特許文献7では、DNA二本鎖結合剤と、DNA二本鎖結合剤から蛍光エネルギーを吸収できるあるいは蛍光エネルギーを与えることができる反応性分子を含む核酸プローブを利用し、標的核酸の増幅反応を経て、蛍光をモニターする検出方法が開示されている。当該検出方法では標識オリゴヌクレオチドが一つで良いためコストの面で有利であるが、特許文献7に開示された技術を用いても、上述のような、臨床診断において複数の病原体について菌種を同定しようとする場合に、複数のエネルギー受容体およびエネルギー供与体のペアと、それらから発せられる複数の波長の蛍光シグナルを検出する装置とが必要であり、非常に高価なシステムと複雑な試薬設計を強いられる問題は解決されていない。
- [0020] 特許文献8では、ハイブリダイゼーションの際に蛍光が消光する核酸プローブを用いた検出方法が開示されている。蛍光色素で標識された核酸プローブを標的核酸にハイブリダイズさせ、当該ハイブリダイゼーションの前後において蛍光色素が発する蛍光の減少量を測定する方法、または蛍光色素で標識された核酸プライマーを標的核酸にハイブリダイゼーションさせた後に伸長させ、核酸変性時の蛍光量に対するアニーリング反応および伸長反応時の蛍光量の減少を測定する方法が示されている。さ

らに当該方法を用いたリアルタイム定量的PCR法、および該PCR法で得られるデータの解析の際にアニーリング反応時の蛍光強度値を変性反応時のもので補正する過程を有するデータ解析法が記載されている。当該検出方法では標識オリゴヌクレオチドが一つで良く、さらにインターカラーターも使用しないためコストの面で有利であるが、特許文献8に開示された技術を用いても、臨床診断において複数の病原体について菌種を同定しようとする場合には、複数の蛍光色素と、それらから発せられる複数の波長の蛍光シグナルを検出する装置とが必要であり、上述のような非常に高価なシステムと複雑な試薬設計を強いられる問題は解決されていない。

特許文献1:米国特許第4, 683, 195号

特許文献2:米国特許第4, 683, 202号

特許文献3:米国特許第4, 965, 188号

特許文献4:国際公開89/12696号

特許文献5:特開平2-2934号

特許文献6:国際公開90/1069号公報

特許文献7:特表2003-500001

特許文献8:特許第3437816号

非特許文献1:Nucleic acid sequence-based amplification method; Nature 第350巻、第91頁(1991)

非特許文献2:Strand Displacement Amplification; Nucleic acid research 第20巻、第1691頁(1992)

非特許文献3:Transcription mediated amplification method; J. Clin. Microbiol. 第31巻、第3270頁(1993)

非特許文献4:Loop-mediated isothermal amplification method ; J Clin Microbiol. 2004 第42巻:第1, 956頁

非特許文献5:Isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids: Kekkaku. 2003 第78巻、第533頁

図面の簡単な説明

[0021] [図1]本発明の抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域を示

す図である。

[図2]融解曲線解析を模式的に示す図である。

[図3]本発明のdnaJ1遺伝子領域と16SrRNA遺伝子について、進化系統樹を示す図である。

[図4]実施例1のオリゴ12を用いて検出した結果を示した図である。

[図5]実施例1のオリゴ22を用いて検出した結果を示した図である。

[図6]実施例1のオリゴ23を用いて検出した結果を示した図である。

[図7]実施例1のオリゴ24を用いて検出した結果を示した図である。

[図8]実施例1のオリゴ25を用いて検出した結果を示した図である。

[図9]実施例3のオリゴ27を用いて検出した結果を示した図である。

[図10]実施例3のオリゴ28を用いて検出した結果を示した図である。

[図11]実施例3のオリゴ29を用いて検出した結果を示した図である。

[図12]実施例3のオリゴ30を用いて検出した結果を示した図である。

[図13]実施例3のオリゴ31を用いて検出した結果を示した図である。

[図14]比較例1のオリゴ32を用いて検出した結果を示した図である。

[図15]実施例4のオリゴ27を用いて検出した結果を示した図である。

[図16]実施例5のオリゴ33を用いて検出した結果を示した図である。

[図17]実施例5のオリゴ34を用いて検出した結果を示した図である。

[図18]比較例2のオリゴ35を用いて検出した結果を示した図である。

[図19]実施例6のオリゴ40を用いて検出した結果を示した図である。

[図20]実施例7のオリゴ47を用いて検出した結果を示した図である。

[図21]実施例7のオリゴ48を用いて検出した結果を示した図である。

[図22]実施例7のオリゴ49を用いて検出した結果を示した図である。

[図23]実施例8のオリゴ50を用いて検出した結果を示した図である。

[図24]比較例3のオリゴ51を用いて検出した結果を示した図である。

[図25]実施例11のオリゴ52を用いて検出した結果を示した図である。

[図26]実施例11のオリゴ53を用いて検出した結果を示した図である。

[図27]比較例4のオリゴ54を用いて検出した結果を示した図である。

[図28]実施例12のオリゴ57を用いて検出した結果を示す図である。

[図29]実施例13のオリゴ64を用いて検出した結果を示す図である。

[図30]比較例5のオリゴ65を用いて検出した結果を示す図である。

[図31]実施例15のオリゴ57を用いて検出した結果を示す図である。

[図32]実施例16のオリゴ68を用いて検出した結果を示す図である。

[図33]実施例17の結果を示す図である。

[図34]本発明の抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において領域C、領域Dおよび領域Eを示す図である。

[図35]実施例18の結果を示す図である。

[図36]実施例19の結果を示す図である。

[図37]実施例20の結果を示す図である。

[図38]実施例21の結果を示す図である。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0022] 前述のように、電気泳動による検出では指数関数的に増幅された標的核酸の増幅産物を取り扱うことから、コンタミネーションが起り、正しい判定結果が得られなくなる危険性があるため臨床診断には適していない。

[0023] また、インターカレーターを用いる方法ではコンタミネーションの可能性は低減されるが、二本鎖核酸特異的に蛍光が生じるため、標的核酸配列に非特異的な二本鎖核酸をも検出し、正しい判定結果が得られなくなる危険性があるため臨床診断には適していない。

[0024] 核酸配列特異的なプローブを用いる方法では、上述したような判定結果の正確性に関する問題点はある程度改善されているが、例えばヒト型結核菌と非定型抗酸菌の同定など、臨床診断上重要である複数の病原体について菌種を同定しようとする場合には、複数の蛍光色素と、それらから発せられる複数の波長の蛍光シグナルを検出する装置とが必要であり、非常に高価なシステムと複雑な試薬設計を強いられるため臨床診断には適していない。

[0025] 本発明は、上記従来の問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、臨床診

断上重要なヒト型結核菌をはじめとする抗酸菌属細菌を迅速、確実かつ簡便に検出または菌種同定するためのオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを利用する抗酸菌属細菌の検出または菌種同定方法ならびにそれらの試薬を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0026] 本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、ヒト型結核菌をはじめとする抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子における特定領域の菌種特異性が高く、当該遺伝子領域を標的核酸とするプローブを用いることにより、

(1)ヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、

(2)トリ型結核菌(*Mycobacterium avium*)またはマイコバクテリウム・イントラセラーレ(*Mycobacterium intracellulare*)、または、

(3)マイコバクテリウム・カンサシイ(*Mycobacterium kansasii*)

について非常に正確に検出または菌種同定できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

また、本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、ヒト型結核菌をはじめとする抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子における特定領域の菌種特異性が高く、当該遺伝子領域を標的核酸とするプローブを用いることにより、従来技術では困難であった、複数の抗酸菌属細菌の検出または菌種同定を単一の種類の蛍光色素により達成できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

[0027] [項1A]

配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち、少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

[項2A]

少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とするヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)の検出方法。

(1)少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー(A)と、該プライマー(A)の伸長産物の一部と相補的な少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー(B)と、を用い

て配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅する第一工程、

(2) 第一工程で得られうるプライマー(B)の伸長産物と、配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ct)と、をハイブリダイズさせ複合体(Pt)を形成せしめる第二工程、

(3) 第二工程で得られうる該複合体(Pt)を検出する第三工程。

[項3A]

(1)～(3)の工程を密封状態のままで行うことを特徴とする項2Aに記載の検出方法。

[項4A]

検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ct)が蛍光色素で標識されていることを特徴とする項2Aまたは3Aに記載の検出方法。

[項5A]

複合体(Pt)の検出にIFP法を用いることを特徴とする項2A～4Aのいずれかに記載の検出方法。

[項6A]

複合体(Pt)の検出にQ-Probe法を用いることを特徴とする項2A～4Aのいずれかに記載の検出方法。

[項7A]

少なくとも以下の(1)および(2)を含むことを特徴とするヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)の検出キット。

(1) 配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅することが可能なオリゴヌクレオチドプライマー(A)およびオリゴヌクレオチドプライマー(B)、

(2) 配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ct)。

[項1B]

配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち、少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

[項2B]

少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とするトリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*) またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*) の検出方法。

- (1) 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー(A)と、該プライマー(A)の伸長産物の一部と相補的な少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー(B)と、を用いて配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅する第一工程、
- (2) 第一工程で得られうるプライマー(B)の伸長産物と、配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(C_m)と、をハイブリダイズさせ複合体(P_m)を形成せしめる第二工程、
- (3) 第二工程で得られうる該複合体(P_m)を検出する第三工程。

[項3B]

- (1)～(3)の工程を密封状態のままで行うことを特徴とする項2Bに記載の検出方法。

[項4B]

検出用オリゴヌクレオチドプローブ(C_m)が蛍光色素で標識されていることを特徴とする項2Bまたは3Bに記載の検出方法。

[項5B]

複合体(P_m)の検出にIFP法を用いることを特徴とする項2B～4Bのいずれかに記載の検出方法。

[項6B]

複合体(P_m)の検出にQ-Probe法を用いることを特徴とする項2B～4Bのいずれかに記載の検出方法。

[項7B]

少なくとも以下の(1)および(2)を含むことを特徴とするトリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*) またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*) の検出キット。

(1) 配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅することが可能なオリゴヌクレオチドプライマー(A)およびオリゴヌクレオチドプライマー(B)、

(2) 配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Cm)。

[項1C]

配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち、少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

[項2C]

少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とするマイコバクテリウム・カンザシイ (*Mycobacterium kansasii*) の検出方法。

(1) 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー(A)と、該プライマー(A)の伸長産物の一部と相補的な少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー(B)と、を用いて配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅する第一工程、

(2) 第一工程で得られうるプライマー(B)の伸長産物と、配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ck)と、をハイブリダイズさせ複合体(Pk)を形成せしめる第二工程、

(3) 第二工程で得られうる該複合体(Pk)を検出する第三工程。

[項3C]

(1)～(3)の工程を密封状態のままで行うことを特徴とする項2Cに記載の検出方法。

[項4C]

検出用オリゴヌクレオチドプローブ (Ck) が蛍光色素で標識されていることを特徴とする項2Cまたは3Cに記載の検出方法。

[項5C]

複合体 (Pk) の検出にIFP法を用いることを特徴とする項2C～4Cのいずれかに記載の検出方法。

[項6C]

複合体 (Pk) の検出にQ-Probe法を用いることを特徴とする項2C～4Cのいずれかに記載の検出方法。

[項7C]

少なくとも以下の(1)および(2)を含むことを特徴とするマイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*) の検出キット。

(1) 配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅することが可能なオリゴヌクレオチドプライマー (A) およびオリゴヌクレオチドプライマー (B)、

(2) 配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する検出用オリゴヌクレオチドプローブ (Ck)。

[項1D]

配列番号1、2、36、37、55および56からなる群のうちいずれかに示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち、少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

[項2D]

少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とする抗酸菌属細菌の菌種同定方法。

(1) 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー (A) と、該プライマー (A) の伸長産物の一部と相補的な少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー (B) と、を用いて配列番号1、2、36、37、55および56からなる群のうちいずれかに示される核酸配

列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅する第一工程、

(2) 第一工程で得られうるプライマー(B)の伸長産物と、配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ct)と、をハイブリダイズさせ複合体(Pt)を形成せしめ、

該プライマー(A)の伸長産物と、配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Cm)と、をハイブリダイズさせ複合体(Pm)を形成せしめ、

該プライマー(A)の伸長産物と、配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ck)と、をハイブリダイズさせ複合体(Pk)を形成せしめる第二工程、

(3) 第二工程で得られうる該複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)のうち、どの複合体が形成したかを判別する第三工程。

[項3D]

プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)のT_m値が、互いに3°C以上異なることを特徴とする項2Dに記載の菌種同定方法。

[項4D]

プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)の長さが、互いに1塩基以上異なることを特徴とする項2Dまたは3Dに記載の菌種同定方法。

[項5D]

(1)～(3)の工程を密封状態のままで行うことを特徴とする項2D～4Dのいずれかに記載の菌種同定方法。

[項6D]

検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)が蛍光色素で標識されていることを特徴とする項2D～5Dのいずれかに記載の菌種同定方法。

[項7D]

複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)から発せられる蛍光を測定しながら、連続的な温度上昇または下降を伴う融解曲線解析を行い、該複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)のうち、どの複合体が形成したかを判別することを特徴とする項2D～6Dのいずれかに記載の菌種同定方法。

[項8D]

融解曲線解析を行う際の複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)の検出にIFP法を用いることを特徴とする項7Dに記載の菌種同定方法。

[項9D]

融解曲線解析を行う際の複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)の検出にQ-Probe法を用いることを特徴とする項7Dに記載の菌種同定方法。

[項10D]

少なくとも以下の(1)～(4)を含むことを特徴とする抗酸菌属細菌の菌種同定方法。

(1)配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ct)、

(2)配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Cm)、

(3)配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ck)、

(4)プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)の核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅することが可能なオリゴヌクレオチドプライマー(A)およびオリゴヌクレオチドプライマー(B)。

発明の効果

[0028] 本発明によれば、以上のように、臨床診断上重要な抗酸菌属細菌について迅速、確実かつ簡便に検出または菌種同定することが可能となる。具体的には、ヒト型結核菌

をはじめとする抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が極めて高い領域を標的核酸とするプローブを用いた融解曲線解析を行うことにより、

(1) ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、

(2) トリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*) またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、または、

(3) マイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*)

について非常に正確に検出または菌種同定できるという効果を奏する。

また、本発明によれば、以上のように、臨床診断上重要な抗酸菌属細菌について迅速、確実かつ簡便に検出または菌種同定することが可能となる。具体的には、ヒト型結核菌をはじめとする抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が極めて高い領域を標的核酸とするプローブを用いた融解曲線解析を行うことにより、従来技術では困難であった、複数の抗酸菌属細菌の検出または菌種同定を単一の種類の蛍光色素により達成できるものである。それゆえ、単一種類の蛍光だけを検出する安価なシステムにて、コンタミネーションによる誤判定の危険を冒すことなく、抗酸菌属細菌を検出または菌種同定することができるという効果を奏する。

発明を実施するための最良の形態

[0029] 本明細書において「抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域」とは、後述のPCR法を用いて、以下の配列を有する2種類のオリゴヌクレオチド、

5'-CTACAAGGAGCTGGGCGTCTCCTCTG-3' (配列番号3)

および

5'-CCCGAGGGAGCGCCGCGCAACCCGGCCTCGCCCTG-3' (配列番号4)

をプライマーとして使用した際に、増幅される抗酸菌属細菌の遺伝子領域に含まれる。当該増幅領域について、トリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*) は配列番号13に、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*) は配列番号14に、マイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*) は配列番号15に、ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は配列番号16に、それぞれ具体的な核酸配列を記載する。

また、上記の「抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域」は、「領域Aおよび領域B」として後述するが、従来公知であるdnaJ遺伝子の部分配列(特許第2966478号、特許第3134940号、L Clin. Microbio1. 第31巻446頁参照)より当該遺伝子の下流に位置し、従来技術において抗酸菌属細菌の検出および／または同定には使用されなかった領域である。

[0030] 本発明の抗酸菌属細菌の検出方法は、上記のような抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域を検出する検出工程を含んでいる。

[0031] 上記検出工程は、抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域の少なくとも一部をコードする核酸配列を増幅する増幅工程を含むことが好ましい。当該増幅工程では、試料中の全核酸配列中から増幅したい核酸配列(標的核酸)のみが、その固有の配列に対して相補性を有するプライマーを利用して増幅される。具体的に上記増幅工程では、一本鎖に変性させた抗酸菌属細菌の染色体またはその断片に、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)、DNAポリメラーゼおよび2種類以上のオリゴヌクレオチド(プライマー)等を作用させることによって、上記プライマー間の配列が増幅される。

[0032] 上記増幅工程に用いられる具体的な核酸増幅方法としては特に限定されず、適宜公知の方法を用いることができる。例えば、上記核酸増幅方法としては、PCR、NASBA(Nucleic acid sequence-based amplification method; Nature 第350巻、第91頁、1991年参照)、LCR(国際公開89/12696号、特開平2-2934号参照)、SDA(Strand Displacement Amplification; Nucleic Acids Res. 第20巻、第1691頁、1992年参照)、RCA(国際公開90/1069号参照)、TMA(Transcription mediated amplification method; J. Clin. Microbiol. 第31巻、第3270頁、1993年参照)、LAMP(Loop-mediated isothermal amplification method; J. Clin Microbiol. 第42巻:第1, 956頁、2004年参照)、ICAN(isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids; Kekkaku. 第78巻、第533頁、2003年参照)などを挙げることができるが、これらに限定されない。上記核酸増幅方法を用いれば、従来では検出不可能であった、極めて微量(1分子でも可)の試料核酸をも検出することが可能であり

、上記増幅工程に好適に用いることが可能である。

[0033] また、試料中の核酸量が少ない場合には、上記増幅工程に先立って、抗酸菌属細菌の染色体またはその断片を上記増幅工程と同じ方法によって増幅しておくことも可能である。

[0034] 上記増幅工程において用いられる核酸増幅方法としては、上記方法の中でもPCR法を用いることが好ましい。PCR法は、試料核酸、一对のプライマー(AおよびB)、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、および耐熱性DNAポリメラーゼの存在下で、変性工程、アニーリング工程、伸長反応の3工程からなる反応サイクルを繰り返すことによって、上記一对のプライマー(AおよびB)によって挟まれる試料核酸中の領域を、指数関数的に増幅させることができる。すなわち、変性工程にて試料核酸を変性し、続くアニーリング工程にて各プライマーと当該プライマーに相補的な試料核酸中の領域とをハイブリダイズさせ、続く伸長工程にて各プライマーを起点として、試料核酸に相補的なDNA鎖を伸長させる。この1サイクルによって、1本の二本鎖DNAが2本の二本鎖DNAに増幅される。従って、このサイクルをn回繰り返せば、理論上、上記一对のプライマー(AおよびB)で挟まれた試料DNAの領域は2のn乗倍に増幅される。

[0035] ヒト型結核菌を検出する場合、増幅工程に使用する一对のプライマー(AおよびB)としては、増幅された核酸断片に上記の抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域を含んでいれば特に限定されないが、GC含量が65%以下の領域に設計することが好適である。より好適には、配列番号17(領域C)または配列番号18(領域D)または配列番号19(領域E)の核酸配列中または各配列に相補的な核酸配列中に設計できる。配列番号3及び配列番号4をプライマーとして使用した場合に増幅される核酸配列領域はGC含量が高い(約70%)。該領域中において、領域C、領域D、領域EはそれぞれGC含量が60.34%、60.47%、55.88%と比較的低い領域である。そのため、GC含量が高いことによるプライマーの非特異反応が起こりにくく、試料中の標的核酸を特異的に増幅することができる。

例えば、プライマー(A)としては、

5' - ACGGCGCTGAGTTCAACCTCAACG - 3' (配列番号5)

5' - CCAAGCGCAAGGAGTACGACGAA - 3' (配列番号6)

プライマー(B)としては、

5' - GAACAAGCCACCGAACAAGTCACCGAT - 3' (配列番号7)

5' - CGTCGAACATTTTCGTTGAGGTTGAACT - 3' (配列番号8)

5' - CAAGCCACCGAACAGGTCGCCGAT - 3' (配列番号9)

のような配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができる。

[0036] ヒト型結核菌を検出する場合、

少なくともプライマー(A)とプライマー(B)を用いて増幅させた核酸断片と配列番号1または2に示される核酸配列または該核酸配列に相補的な核酸配列が「90%以上一致する」とは、ヒト型結核菌の株間で該核酸断片に変異が存在する場合の一致率を示している。ヒト型結核菌株間で変異が存在する場合でも、非結核性抗酸菌と区別して、ヒト型結核菌を特異的に検出できることを表している。好適には該一致率は90%以上である。臨床分離された非結核性抗酸菌35種の保有する核酸配列と配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列との一致率を表1に示す。配列番号1と最も一致している菌種は マイコバクテリウム・マルモエンス(*Mycobacterium malmoense*)で、一致率88%であり、配列番号2と最も一致している菌種はマイコバクテリウム・チタエ(*Mycobacterium chitae*)で、一致率88%である。ヒト型結核菌と同属の非結核性抗酸菌であっても一致率は90%に満たない。また、ヒト型結核菌20株の保有する核酸配列と、配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列との一致率は、20株全て90%以上である。

[0037] [表1]

菌株	配列番号1 の一致率 (%)	配列番号2 の一致率 (%)
<i>M. tuberculosis</i>	100	100
<i>M. avium</i>	82	80
<i>M. intracellulare</i>	78	80
<i>M. arupense</i>	71	81
<i>M. abscessus</i>	73	64
<i>M. acapulcensis</i>	75	73
<i>M. agri</i>	73	80
<i>M. asiaticum</i>	77	79
<i>M. celatum</i>	71	81
<i>M. chelonae</i>	71	65
<i>M. chitae</i>	69	88
<i>M. chubuense</i>	71	74
<i>M. cookii</i>	82	83
<i>M. flavescentis</i>	82	77
<i>M. fortuitum</i>	60	73
<i>M. gastri</i>	73	83
<i>M. gordonae</i>	86	80
<i>M. immunogenum</i>	71	65

菌株	配列番号1 の一致率 (%)	配列番号2 の一致率 (%)
<i>M. kansasii</i>	71	83
<i>M. kumamotoense</i>	69	83
<i>M. malmoense</i>	88	76
<i>M. marinum</i>	64	80
<i>M. nonchromogenicum</i>	71	87
<i>M. parascrofulaceum</i>	87	77
<i>M. peregrinum</i>	78	80
<i>M. phlei</i>	68	73
<i>M. porcinum</i>	70	81
<i>M. scrofulaceum</i>	87	80
<i>M. senegalense</i>	68	77
<i>M. shimoidei</i>	64	83
<i>M. simiae</i>	67	80
<i>M. smegmatis</i>	71	73
<i>M. terrae</i>	69	83
<i>M. triviale</i>	73	70
<i>M. vaccae</i>	64	73
<i>M. xenopi</i>	83	83

[0038] トリ型結核菌またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレを検出する場合、増幅工程に使用する一対のプライマー(AおよびB)としては、増幅された核酸断片に上記の抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域を含んでいれば特に限定されないが、GC含量が65%以下の領域に設計することが好適である。より好適には、配列番号41(領域C)または配列番号42(領域D)または配列番号43(領域E)の核酸配列中または各配列に相補的な核酸配列中に設計できる。配列番号3及び配列番号4をプライマーとして使用した場合に増幅される核酸配列領域はGC含量が高い(約70%)。該領域中において、領域C、領域D、領域EはそれぞれGC含量が55.17%、57.89%、63.33%と比較的低い領域である。そのため、GC含量が高いことによるプライマーの非特異反応が起こりにくく、試料中の標的核酸を特異的に増幅することができる。

[0039] トリ型結核菌またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレを検出する場合、少なくともプライマー(A)とプライマー(B)を用いて増幅させた核酸断片と配列番号36または37に示される核酸配列または該核酸配列に相補的な核酸配列が「90%以上一致する」とは、トリ型結核菌およびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ(以後、MACと略する)の株間で該核酸断片に変異が存在する場合の一致率を示している

。MAC株間で変異が存在する場合でも、MAC以外の抗酸菌種と区別して、MACを特異的に検出できることを表している。好適には該一致率は90%以上である。より好適には95%以上であり、さらに好適には97%以上である。臨床分離されたヒト型結核菌及び非結核性抗酸菌35種の保有する核酸配列と配列番号36に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列との一致率を例として表2に示す。配列番号36と最も一致している菌種は マイコバクテリウム・マルモエンス(*Mycobacterium malmoeense*)で、一致率88%である。MACと同属の抗酸菌種であっても一致率は90%に満たない。また、トリ型結核菌やマイコバクテリウム・イントラセルラーレ各40株の保有する核酸配列と、配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列との一致率は、80株全て90%以上である。

[0040] [表2]

菌種	配列番号1 の一致率 (%)	菌種	配列番号1 の一致率 (%)
<i>M. avium</i>	100	<i>M. kansasii</i>	64
<i>M. intracellulare</i>	97	<i>M. kumamotoense</i>	74
<i>M. tuberculosis</i>	78	<i>M. malmoeense</i>	88
<i>M. abscessus</i>	69	<i>M. marinum</i>	75
<i>M. albus</i>	65	<i>M. nonchromogenicum</i>	68
<i>M. caputis</i>	72	<i>M. parascrofulaceum</i>	80
<i>M. agri</i>	85	<i>M. peregrinum</i>	73
<i>M. asiaticum</i>	80	<i>M. phlei</i>	63
<i>M. celatum</i>	69	<i>M. porcinum</i>	68
<i>M. chelonae</i>	75	<i>M. scrofulaceum</i>	81
<i>M. chitae</i>	77	<i>M. senegalense</i>	59
<i>M. chubuense</i>	79	<i>M. shimoi</i>	71
<i>M. cookii</i>	83	<i>M. simiae</i>	69
<i>M. flavescens</i>	67	<i>M. smegmatis</i>	69
<i>M. fortuitum</i>	73	<i>M. terrae</i>	74
<i>M. gastri</i>	67	<i>M. triviale</i>	71
<i>M. goodii</i>	75	<i>M. vaccae</i>	79
<i>M. immunogenum</i>	72	<i>M. xenopi</i>	75

[0041] マイコバクテリウム・カンサシイを検出する場合、増幅工程に使用する一対のプライマー(AおよびB)としては、増幅された核酸断片に上記の抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域を含んでい

れば特に限定されない。GC含量が65%以下の領域に設計することが好適である。より好適には、配列番号58(領域C)または配列番号59(領域D)または配列番号60(領域E)の核酸配列中または各配列に相補的な核酸配列中に設計できる。配列番号3及び配列番号4をプライマーとして使用した場合に増幅される核酸配列領域はGC含量が高い(約70%)。該領域中において、領域C、領域D、領域EはそれぞれGC含量が58.62%、58.14%、50.00%と比較的低い領域である。そのため、GC含量が高いことによるプライマーの非特異反応が起こりにくく、試料中の標的核酸を特異的に増幅することができる。

- [0042] マイコバクテリウム・カンサシイを検出する場合、少なくともプライマー(A)とプライマー(B)を用いて増幅させた核酸断片と配列番号55または56に示される核酸配列または該核酸配列に相補的な核酸配列が「90%以上一致する」とは、マイコバクテリウム・カンサシイの株間で該核酸断片に変異が存在する場合の一致率を示している。マイコバクテリウム・カンサシイ株間で変異が存在する場合でも、カンサシイ以外の抗酸菌と区別して、カンサシイを特異的に検出できることを表している。好適には該一致率は90%以上である。さらに好適には97%以上である。臨床分離されたヒト型結核菌及び非結核性抗酸菌35種の保有する核酸配列と配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列との一致率を表3に示す。表3の中で、配列番号55と最も一致している菌種はマイコバクテリウム・マリナム(*Mycobacterium marinum*)で、一致率83%であり、配列番号56と最も一致している菌種はマイコバクテリウム・ゴルドナエ(*Mycobacterium goodii*)で、一致率83%である。マイコバクテリウム・カンサシイと同属の抗酸菌であっても一致率は90%に満たない。また、マイコバクテリウム・カンサシイ7株の保有する核酸配列と、配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列との一致率は、7株全て90%以上である。

- [0043] [表3]

菌種	配列番号1 の一致率 (%)	配列番号2 の一致率 (%)
<i>M. kansasii</i>	100	100
<i>M. avium</i>	67	54
<i>M. intracellulare</i>	71	61
<i>M. abscessus</i>	56	74
<i>M. abscessus</i>	62	60
<i>M. abscessus</i>	71	48
<i>M. agri</i>	64	78
<i>M. abscessus</i>	70	79
<i>M. calidus</i>	71	78
<i>M. chelonae</i>	71	40
<i>M. chelonae</i>	76	77
<i>M. chelonae</i>	64	40
<i>M. chelonae</i>	70	80
<i>M. flavescens</i>	69	47
<i>M. fortuitus</i>	67	77
<i>M. fortuitus</i>	78	58
<i>M. goodii</i>	74	88
<i>M. goodii</i>	71	60

菌種	配列番号1 の一致率 (%)	配列番号2 の一致率 (%)
<i>M. tuberculosis</i>	71	88
<i>M. tuberculosis</i>	62	67
<i>M. tuberculosis</i>	64	57
<i>M. tuberculosis</i>	88	57
<i>M. tuberculosis</i>	62	67
<i>M. tuberculosis</i>	76	58
<i>M. tuberculosis</i>	56	70
<i>M. tuberculosis</i>	49	70
<i>M. tuberculosis</i>	56	67
<i>M. tuberculosis</i>	76	50
<i>M. tuberculosis</i>	67	78
<i>M. tuberculosis</i>	80	78
<i>M. tuberculosis</i>	80	78
<i>M. tuberculosis</i>	71	68
<i>M. tuberculosis</i>	62	67
<i>M. tuberculosis</i>	67	60
<i>M. tuberculosis</i>	78	78
<i>M. tuberculosis</i>	71	70

[0044] ヒト型結核菌をはじめとする抗酸菌属細菌を同定する場合、増幅工程に使用する一対のプライマー(AおよびB)としては、増幅された核酸断片に上記の抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域を含んでいれば特に限定されないが、GC含量が65%以下の領域に設計することが好適である。より好適には、図34に示される領域C、領域Dまたは領域Eの核酸配列中または各配列に相補的な核酸配列中に設計できる。配列番号3及び配列番号4をプライマーとして使用した場合に増幅される核酸配列領域はGC含量が高い(約70%)。該領域中において、図34で示される領域C、領域D、領域Eは抗酸菌属細菌ではいずれもGC含量が65%以下と比較的低い領域である。そのため、GC含量が高いことによるプライマーの非特異反応が起こりにくく、試料中の標的核酸を特異的に増幅することができる。

[0045] 本発明の抗酸菌属細菌の検出方法および同定方法において、検出工程に使用する検出用オリゴヌクレオチドプローブについて説明する。本発明の抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が高い領域は、図1に、一例としてヒト型結核菌をはじめとする4種類の抗酸菌属細菌についてdnaJ1遺伝子の部分配列を用いて示したように、領域Aおよび領域Bの2箇所があり、どちらの領域を用いても本発明の効果をj得ることができる。なお、図1において、Maは配列番号13に記載のトリ型結核菌(My

cobacterium avium)に由来する核酸配列であり、Miは配列番号14に記載のマイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)に由来する核酸配列であり、Mkは配列番号15に記載のマイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*)に由来する核酸配列であり、Mtは配列番号16に記載のヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)に由来する核酸配列である。

[0046] ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)を特異的に検出するための検出用または同定用オリゴヌクレオチドプローブ (Ct)としては、配列番号1 (領域A)または配列番号2 (領域B)に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば特に限定されない。連続した9塩基以下の核酸配列になると、オリゴヌクレオチドプローブ (Ct)の核酸配列がヒト型結核菌以外の抗酸菌や他属の細菌の核酸配列に一致し、ヒト型結核菌に特異的な検出ができなくなる。好適には、配列番号1 (領域A)中の、5′-GGTTTCGGGG-3′ (配列番号20)を少なくとも含む核酸配列または該配列に相補的な核酸配列を使用できる。好適には、配列番号2 (領域B)中の、5′-AACCGGCGGT-3′ (配列番号21)を少なくとも含む核酸配列または該配列に相補的な核酸配列を使用できる。配列番号20および配列番号21の核酸配列または該配列に相補的な核酸配列は抗酸菌属の種間において特に変異が多く存在する領域であるため、より特異的な検出が可能となる。さらに好適には、本明細書の実施例に記載のオリゴヌクレオチドを使用することができる。

[0047] 臨床診断において、トリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*)およびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)は、トリ型結核菌複合体 (*Mycobacterium avium* complex; MAC)として同様に扱われることが多い。トリ型結核菌またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレ、すなわちMACを特異的に検出するための検出用または同定用オリゴヌクレオチドプローブ (Cm)としては、配列番号36 (領域A)または配列番号37 (領域B)に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば特に限定されない。連続した9塩基以下の核酸配列になると、オリゴヌクレオチドプローブ (Cm)の核酸配列がMAC以外の抗酸菌や他属の細菌の核酸配列に一致し、M

ACに特異的な検出ができなくなる。好適には、配列番号36(領域A)中の、5′-TC AACGTTCGG-3′(配列番号44)を少なくとも含む核酸配列または該配列に相補的な核酸配列を使用できる。好適には、配列番号37(領域B)中の、5′-AGCGGC GGCA-3′(配列番号45)を少なくとも含む核酸配列または該配列に相補的な核酸配列を使用できる。配列番号44および配列番号45の核酸配列または該配列に相補的な核酸配列は抗酸菌属の種間において特に変異が多く存在する領域であるため、より特異的な検出が可能となる。さらに好適には、本明細書の実施例に記載のオリゴヌクレオチドを使用することができる。

[0048] マイコバクテリウム・カンサシイ(*Mycobacterium kansasii*)を特異的に検出するための検出用または同定用オリゴヌクレオチドプローブ(Ck)としては、配列番号55(領域A)または配列番号56(領域B)に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば特に限定されない。連続した9塩基以下の核酸配列になると、オリゴヌクレオチドプローブ(Ck)の核酸配列がマイコバクテリウム・カンサシイ以外の抗酸菌や他属の細菌の核酸配列に一致し、マイコバクテリウム・カンサシイに特異的な検出ができなくなる。好適には、配列番号55(領域A)中の、5′-GGAGGCGGCT-3′(配列番号61)または5′-CTACGGCTCC-3′(配列番号62)を少なくとも含む核酸配列または該配列に相補的な核酸配列を使用できる。好適には、配列番号56(領域B)中の、5′-TT CCGGCGGA-3′(配列番号63)を少なくとも含む核酸配列または該配列に相補的な核酸配列を使用できる。配列番号61~63の核酸配列または該配列に相補的な核酸配列は抗酸菌属の種間において特に変異が多く存在する領域であるため、より特異的な検出が可能となる。より好適には、本明細書の実施例に記載のオリゴヌクレオチドを使用することができる。

[0049] 上記のプローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)は、菌種特異性が高いため検出の際に任意に混合して使用することができるが、より好適には、本明細書の実施例に記載の組み合わせを使用することができる。

[0050] 本発明の抗酸菌属細菌の検出方法において、検出にIFP法やQ-Probe法など蛍光色素を用いる方法を用いれば、核酸増幅後の反応容器の蓋を開けることなく検出

または菌種同定を行う、いわゆるホモジニアス検出が可能となり、臨床診断において致命的なコンタミネーションによる誤判定の危険性を抑制することができる。

- [0051] ここで、図2を用いて、融解曲線解析の原理について説明する。図2は融解曲線解析の原理を模式的に示す図であり、(a)は検出にIFP法を用いる融解曲線解析の原理を示し、(b)は検出にQ-Probe法を用いる融解曲線解析の原理を示し、(c)は融解曲線解析で核酸増幅の結果を確認した結果の一例を示す。
- [0052] 図2(a)に示すように、IFP法では、特許文献7に記載のように、二本鎖核酸に結合する化合物(インターカレーター)と、当該化合物が当該二本鎖核酸に結合したときに、発する蛍光が変化する反応分子で標識したプローブとを用いる。つまり、二本鎖核酸が一本鎖核酸に解離した状態の当該反応分子が発する蛍光を検出してもよく、解離していない状態の当該反応分子が発する蛍光を検出してもよい。
- [0053] インターカレーターは二本鎖核酸に特異的に結合し蛍光を発する物質であれば良く、SYBR Green I(商標)、LC Green I(商標)、LC Green Plus(商標)、エチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ、チアゾールオレンジ、オキサゾールイエロー、ローダミン等があるがこの限りではない。 $[2-[N-[(3\text{-dimethylaminopropyl})-N\text{-propylamino}]-4-[2,3\text{-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylenidene}]-1\text{-phenyl-quolinium}]$ を用いても良い。
- [0054] 二本鎖核酸構造は、標的核酸中の塩基とその相補的な核酸配列中の塩基の間で起こる塩基対生成によって形成される。塩基対生成はC(シトシン)とG(グアニン)、A(アデニン)とT(チミン)またはA(アデニン)とU(ウラシル)の間で起こる水素結合により生じる。インターカレーターはこの二本鎖核酸構造を標的に結合し、蛍光を生じるようになる。
- [0055] 核酸プローブに標識する蛍光物質は、核酸増幅工程中分解もしくは減衰しなければよく、蛍光検出工程で検出できればよい。蛍光物質としてはFITC、6-FAM、HEX、TET、TAMRA、Texas Red(商標)、Cy3、Cy5、ローダミン等があるが、好ましくはFRETを生じる蛍光物質であり、より好ましくはインターカレーターと相互作用して特異的に検出できればよく、特に好ましい蛍光物質としてはTexas Red(商標)が挙げられるがこの限りではない。FRET現象を利用すれば、蛍光検出工程において核

酸プローブの存在のみで発する蛍光が抑えられ、標的核酸とハイブリダイゼーションした核酸プローブの発する蛍光を特異的に検出することが可能となる。

- [0056] 本発明に用いられる、好ましいインターカラーターと核酸プローブに標識する蛍光物質の組み合わせは、(SYBR Green I(商標)とTexas Red(商標))、(LC Green I(商標)とTexas Red(商標))、(LC Green Plus(商標)とTexas Red(商標))または([2-[N-[(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl-quolinium]とTexas Red(商標))である。
- [0057] 図2(b)に示すように、Q-Probe法では、特許文献8に記載のように、3'末端にC(シトシン)を有し、C(シトシン)とG(グアニン)とが水素結合したときに蛍光が消える蛍光色素で標識したプローブを用いる。核酸増幅後に温度を徐々に上昇させて、二本鎖核酸が一本鎖核酸に解離すると、消光していた蛍光色素が再度発光する。この蛍光を検出すれば、核酸増幅の確認を行うことができる。
- [0058] 標識プローブに標識する蛍光物質は、核酸増幅工程中分解もしくは蛍光が減衰してなくならなければよく、ハイブリダイゼーション時に消光を生じる蛍光物質であればよい。特に標識プローブの末端においてグアニンとシトシンの塩基対形成時に蛍光の消光を生じる蛍光物質が好ましい。具体的には、フルオロセインまたはその誘導体(例えばフルオロセインイソチオシアネート(FITC))、BODIRY(商標)シリーズ、ローダミンまたはその誘導体(例えば5-カルボキシローダミン6G(GR6G)やテトラメチルローダミン(TAMRA))などを使用できるが、BODIPYシリーズやCR6Gの使用が特に好ましい。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法に従って行うことができる。蛍光色素の消光を利用すれば、インターカラーターなど二本鎖核酸構造への挿入色素を用いることなく、またFRET現象を起こす二種類のプローブを用いることなく、一種類の蛍光物質に標識されたプローブを用いて単純かつ特異的に標的核酸配列を検出することができる。標識プローブの塩基配列中の蛍光物質の標識位置は特に限定されないが、末端部に標識されていることが好ましく、末端に標識されていることがより好ましい。
- [0059] 標識プローブの塩基配列とそれに対し相補的な標的核酸の塩基配列の選択はハイ

ブリダイゼーション時に蛍光の消光を生じるために重要である。標識プローブの塩基配列は標的核酸とのハイブリダイゼーション時に消光を生じる塩基配列であればよく、二本鎖核酸構造形成時に、蛍光物質が修飾されている標識プローブ末端部にG(グアニン)とC(シトシン)の対が少なくとも1つ以上存在するように設計すればよい。標識プローブの末端が標識されている場合は、その末端塩基がG(グアニン)もしくはC(シトシン)であること、または標識プローブの末端と塩基対を形成する標的核酸の塩基から1もしくは3塩基離れてG(グアニン)が存在するように標識プローブの塩基配列が設計されていることがより好ましい。標識プローブの末端が標識されており、かつ末端塩基がC(シトシン)であるように設計することがさらに好ましい。

[0060] 図2(c)に示すように融解曲線解析の結果は、温度および蛍光強度の変化量によってアウトプットすればよい。図2(c)は縦軸を蛍光強度の変化量としている。これは、上述のIFP法では、二本鎖核酸が一本鎖核酸に解離した状態で、上記反応分子が発する蛍光を検出した場合を示す。また、Q-Probe法での蛍光色素の発光を検出した場合でもある。IFP法で、解離していない状態の上記反応分子が発する蛍光を検出する場合は、解離した状態で発する蛍光を検出した場合と比べて、蛍光強度の変化量の正負が反対になる。つまり、得られる表の形は、図2(c)に示す表の各線の形を、温度軸を対象に反転させた形となる。換言すれば、解離していない状態の上記反応分子が発する蛍光を検出して、縦軸を、蛍光強度の変化量のマイナスとすれば、図2(c)に示す表の各線の形と同じになる。

[0061] また、図2(c)では3通りの試料に対して核酸増幅を行なった結果を示している。つまり、形成される二本鎖核酸の配列によって解離する温度が異なるため、各線のピークを示す温度が異なることが試料中に含まれた核酸の塩基配列が異なっていたことを示している。実線及び破線の結果を示した試料には、それぞれ異なる塩基配列を有する標的核酸が、1種類ずつ含まれていたことを示す。一点鎖線の結果を示した試料には、実線及び破線の結果を示した試料に含まれていた標的核酸が共に含まれていたことを示す。このように融解曲線解析を行なうことで、核酸増幅による増幅及び試料中に含まれていた標的核酸の塩基配列すなわち抗酸菌属細菌の種類を判別することができる。

[0062] 抗酸菌属細菌の検出には、16SリボソームRNA (rRNA) 遺伝子が従来から広く用いられてきた。しかし、16SrRNA遺伝子は菌種特異性が本発明のdnaJ1遺伝子領域に比べて低く、したがってプローブの菌種特異性が低いため検出の際に非特異的なシグナルが生成することが問題であった。換言すれば、本発明の抗酸菌属細菌の検出方法では、本発明のdnaJ1遺伝子領域の菌種特異性が高いため、当該遺伝子を標的とするプローブの菌種特異性も高く、正確に菌種を種毎に判別または同時に判別することができる。

[0063] ヒト型結核菌を検出する場合、例えば、配列番号1 (領域A) を用いればヒト型結核菌とBCGを判別することが可能となる。BCGはウシ型結核菌を実験室で継代培養することにより作成された弱毒株である。これを生ワクチンとして利用したBCGワクチンは結核感染の予防に有効であることが知られており、世界中で利用されている。しかしながら、生ワクチンであるがためにBCGが体内に定着し、ヒト型結核菌の診断で偽陽性の原因となることがしばしば見られた。ヒト型結核菌とBCGの遺伝子の類似性により、結核の迅速診断に有力な従来の遺伝子検査 (16SリボソームRNA遺伝子を利用した遺伝子検査) ではBCGとヒト型結核菌を区別することができなかった。本発明で標的としているdnaJ1遺伝子の配列番号1 (領域A) はヒト型結核菌に極めて特異的な領域であり、BCGでは変異が含まれる領域となっている。

[0064] トリ型結核菌またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレを検出する場合、標的遺伝子としてdnaJ遺伝子は優れている。16SリボソームRNA遺伝子を用いて抗酸菌属細菌の検出を行った場合、例えば特許第2675723号に開示されているように、MACで総称されるトリ型結核菌とマイコバクテリウム・イントラセルラーレの2菌種は異なるプローブにより検出せざるを得なかった。本発明の配列番号3および配列番号4のプライマーを用いて増幅されるdnaJ1遺伝子領域の中にはMACに含まれる菌種間の一致率が90%以上であり、かつMACに含まれない抗酸菌種との一致率は90%未満である領域が含まれる。そのためMACとMAC以外の抗酸菌種を明確に分けることができる。さらに領域を特定すればトリ型結核菌とマイコバクテリウム・イントラセルラーレの2菌種をMACとして同時に検出するためのプローブが設計できる。つ

まり1種類のプローブによりMACを特異的に検出することが可能となる。

- [0065] マイコバクテリウム・カンサシイ(Mycobacterium kansasii)を特異的に検出する場合、抗酸菌属細菌の検出には、16SリボソームRNA(rRNA)遺伝子が従来より広く用いられてきた。しかし、16SrRNA遺伝子は菌種特異性が本発明のdnaJ1遺伝子領域に比べて低く、したがってプローブの菌種特異性が低いため検出の際に非特異的なシグナルが生成することが問題であった。例えばマイコバクテリウム・カンサシイとマイコバクテリウム・ガストリイの16SリボソームRNA遺伝子は、全く同じであった。ゆえに従来の16SrRNA遺伝子を用いたマイコバクテリウム・カンサシイの検出ではマイコバクテリウム・ガストリイが偽陽性として検出されていた。本発明で標的としているdnaJ1遺伝子はマイコバクテリウム・カンサシイとマイコバクテリウム・ガストリイで塩基配列が異なっている。本発明のdnaJ1遺伝子領域の菌種特異性が高いため、当該遺伝子を標的とするプローブの菌種特異性も高く、正確に菌種の判別を行うことができる。
- [0066] 本発明の抗酸菌属細菌の菌種同定方法において、上記のような融解曲線解析を行う場合、プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)がそれぞれ標的核酸または増幅核酸断片とハイブリダイズした複合体(Pt)、(Pm)、および(Pk)の融解温度、すなわち当該複合体において二本鎖核酸が一本鎖核酸に解離する温度が重要である。
- [0067] 一般に、オリゴヌクレオチドプローブを用いた融解曲線解析における融解温度は、当該プローブのTm値に依存する。Tm値とはプライマーが相補塩基とアニーリングし解離する時の温度を表す。Tm値は計算により算出することも可能である。Tm値の計算方法は、ハイブリダイゼーションにおける塩濃度等をパラメーターにして各種の計算方法が考案されている。一般的に良く用いられる計算方法としては、最近接塩基対法(Schildkraut C., Lifson S. (1965) Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration — Biopolymers 3, 195—208、Breslauer K. J., Frank R., Blocker H., Markey L. A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence — Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3746—3750)やWallance法(Wallace, R. B.; Shaffer, J.; Murphy R. F.; Bonner, J.; Hirose

, T. ; Itakura, K. ; (1979) Nucelic Acid Res. 6, 3543)、GC%法 (Dependence of the Melting Temperature of DNA on Salt Concentration、Schildkraut C. , Lifson S. (1965) BIOPOLYMERS 3. 195 –208、Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro、W. Rychlik、Nucl. Acids Res. (1990) 18(21)6409–6412)などを用いることができ、標的核酸の配列または検出の条件などによっては計算方法によるTm値の差異が影響するが、当業者にとって容易に想到し得る検討により実験的に当該Tm値の差異を修正し、本発明の効果を有するプローブを設定することができる。Breslauer K. J. , Frank R. , Blocker H. , Markey L. A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3746–3750に記載の方法にて計算したTm値を用いることが好ましい。

[0068] 本発明の抗酸菌属細菌の菌種同定方法において、プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)のTm値は、互いに3°C以上異なることが好ましい。一例として、プローブのTm値が大きい順に、(Ct) > (Cm) > (Ck)である場合には、プローブ(Ct)と(Cm)のTm値の差が3°C以上であり、プローブ(Cm)と(Ck)のTm値の差が3°C以上であればよい。Tm値が互いに3°C以上異なっていれば、融解曲線解析などを用いて、各プローブがそれぞれ標的核酸または増幅核酸断片とハイブリダイズした複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)の種類を明確に判別することができる。

[0069] このように、本発明の抗酸菌属細菌の菌種同定方法において、3°C以上のTm値の差で複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)の種類を判別できる理由として、プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)の菌種特異性が高い、すなわち本発明で発見したdnaJ1遺伝子領域の菌種特異性が高いことが挙げられる。

[0070] 図3に本発明のdnaJ1遺伝子領域と16SrRNA遺伝子について、進化系統樹を示した。進化系統樹は菌種間で遺伝子配列に差異が生じる確率を示す指標であり、数値すなわち進化距離が大きいほど菌種間で遺伝子配列の差異が大きいことを表している。図3のように、本発明のdnaJ1遺伝子領域は、16SrRNA遺伝子に比べ、菌種による遺伝子配列の違いが約10倍高く、抗酸菌属細菌の菌種を同定するための遺伝

子として優れていることが分かる。遺伝子の進化系統樹は、例えば遺伝子解析ソフトウェアGENETYX(株式会社ゼネティクス製)などを用いて、遺伝子配列より計算することができる。

- [0071] また、本発明のdnaJ1遺伝子領域の進化距離は、従来公知であるdnaJ遺伝子の部分配列(特許第2540023号、特許第2966478号、特許第3134940号、特許第3151415号、特許第3360736号、特開2001-103986、J. Clin. Microbiol. 第31巻446頁参照)より大きい。これは、本発明のdnaJ1遺伝子領域の菌種特異性が、従来公知のdnaJ遺伝子の部分配列より高く、抗酸菌属細菌の検出または菌種を同定するための遺伝子として優れていることを意味する。
- [0072] また、本発明の抗酸菌属細菌の菌種同定方法において、T_m値の他にも、プローブの長さを指標として、当該プローブの設計を簡易的に行うこともできる。プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)の長さは、互いに1塩基以上異なることが好ましい。一例として、プローブが長い順に、(Ct) > (Cm) > (Ck)である場合には、プローブ(Ct)と(Cm)の長さの差が1塩基以上であり、プローブ(Cm)と(Ck)の長さの差が1塩基以上であればよい。プローブの長さが互いに1塩基以上異なっていれば、融解曲線解析などを用いて、各プローブがそれぞれ標的核酸または増幅核酸断片とハイブリダイズした複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)の種類を明確に判別することができる。このような簡易的なプローブ設計法も従来技術では困難であり、本発明のdnaJ1遺伝子領域の菌種特異性が高いことに由来する。

実施例

- [0073] 以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

- [0074] [実施例1:Q-Probe法を用いたヒト型結核菌の検出1]

(1) 試料の調製

4種類の抗酸菌属細菌、すなわち、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・カンサシイより、それぞれフェノール・クロロフォルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0075] (2)プライマー及び標識プローブの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号10～12、22～25に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ10～12、22～25と示す)を合成した。合成はマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はパーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。もしくはDNA合成受託会社((株)日本バイオサービス、シグマアルドリッチジャパン(株)、オペロンバイオテクノロジー(株)など)に依頼した。オリゴ10がプライマー(A)であり、オリゴ11がプライマー(B)であり、オリゴ12、22～25がプローブ(Ct)である。オリゴ12、22、23、25は3'末端がBODIPY-FLにより標識されている。オリゴ24は5'末端がBODIPY-FLにより標識されている。

[0076] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0077] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ10 250nM、

オリゴ11 1500nM、

オリゴ12、オリゴ22～25(BODIPY-FL標識) 250nM、

$\times 10$ 緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0078] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94℃・2分
98℃・0秒、
65℃・5秒、(50サイクル)
94℃・1分、
40℃・1分、
40℃～75℃ (0. 5℃／秒で温度上昇)。

[0079] (4) 結果1

図4～8はライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図4にオリゴ12を用いた場合の検出結果を示す。図4より明らかなように、ヒト型結核菌(MT)のDNAを試料とした場合にのみ明瞭なピークが観察され、トリ型結核菌(MA)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、マイコバクテリウム・カンサシイ(MK)それぞれのDNAを試料とした場合には陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ(Ct)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(Ct)を用いることでヒト型結核菌を特異的に検出できることを示している。

[0080] (5) 結果2

図5～8は、図4のオリゴ12にかえてオリゴ22～25を用いて検出した結果を表した図である。図5～8より明らかなように、配列番号2(領域B)に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば、ヒト型結核菌(MT)のDNAを試料とした場合に特異的なピークが観察される。さらに配列番号2(領域B)中の、5'－AACCGGCGGT－3' (配列番号21)を少なくとも含む標識プローブのオリゴ12、22～24ではオリゴ25を使用した場合(図8)に見られたヒト型結核菌以外の判別しうる非特異ピークすら観察されなかった。

[実施例2: Q－Probe法を用いたヒト型結核菌の検出2]

(1) 試料の調製

36種類の抗酸菌属細菌をそれぞれマクファランドNo. 1の濃度となるようにTEバッファーに懸濁し、AMR社製MORA－EXTRACT用ビーズ充填チューブに入れた。

チューブを95℃10分間加熱し、ボルテックスにより5分間菌体破碎処理を行った。その後破碎処理後の液を100倍希釈して菌体破碎液とし、これを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0081] (2) 核酸増幅および融解曲線解析

36種類の抗酸菌属細菌菌体破碎液および陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0082] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ10 250nM、

オリゴ11 1500nM、

オリゴ12(3'末端をBODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

菌体破碎液 1 μ L

[0083] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例1と同様の条件を使用した。

[0084] (3) 結果

表4に36種類の抗酸菌属細菌の検出結果を示す。検出欄の「+」が検出可能な菌種。「-」が検出されない菌種を示す。「+」の検出可能な菌種では、図4のヒト型結核菌(MT)を試料として用いた時に見られるような検出ピークが確認できた。ヒト型結核菌(MT)の菌体破碎液を試料とした場合にのみ検出が確認された。抗酸菌属であっても種の異なる35種類の抗酸菌属菌体破碎液を試料とした場合では陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ(オリゴ12)の特異性

が非常に高いことを示しており、プローブ(オリゴ12)を用いることでヒト型結核菌を特異的に検出できることを示している。

[0085] [表4]

菌種	検出	菌種	検出
<i>M. tuberculosis</i>	+	<i>M. kansasii</i>	-
<i>M. avium</i>	-	<i>M. kumamotoense</i>	-
<i>M. intracellulare</i>	-	<i>M. malmoense</i>	-
<i>M. arupense</i>	-	<i>M. marinum</i>	-
<i>M. abscessus</i>	-	<i>M. nonchromogenicum</i>	-
<i>M. acapulcensis</i>	-	<i>M. parascrofulaceum</i>	-
<i>M. agri</i>	-	<i>M. peregrinum</i>	-
<i>M. asiaticum</i>	-	<i>M. phlei</i>	-
<i>M. celatum</i>	-	<i>M. porcinum</i>	-
<i>M. chelonae</i>	-	<i>M. scrofulaceum</i>	-
<i>M. chitae</i>	-	<i>M. senegalense</i>	-
<i>M. chubuense</i>	-	<i>M. shimoidei</i>	-
<i>M. cookii</i>	-	<i>M. simiae</i>	-
<i>M. flavescens</i>	-	<i>M. smegmatis</i>	-
<i>M. fortuitum</i>	-	<i>M. terrae</i>	-
<i>M. gastri</i>	-	<i>M. triviale</i>	-
<i>M. gordonae</i>	-	<i>M. vaccae</i>	-
<i>M. immunogenum</i>	-	<i>M. xenopi</i>	-

[0086] [実施例3:Q-Probe法を用いたヒト型結核菌の検出3]

(1) 試料の調製

実施例1と同様に、4種類の抗酸菌属細菌より、それぞれフェノール・クロロホルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0087] (2) プライマーの合成

実施例1同様に、配列番号26～31に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ26～31と示す)を合成した。オリゴ26がプライマー(A)であり、オリゴ11がプライマー(B)であり、オリゴ27～31がプローブ(Ct)である。オリゴ27、29～31は3'末端がBODIPY-FLにより標識されており、オリゴ28は5'末端がBODIPY-F Lにより標識されている。

[0088] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0089] 試薬1

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ26 1500nM、

オリゴ11 250nM、

オリゴ27、28(BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

試薬2

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ26 250nM、

オリゴ11 1500nM、

オリゴ29～31(BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0090] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例1と同様の条件を使用した。

[0091] (4) 結果1

図9～13は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図9にオリゴ27を用いた場合の検出結果を示す。図9より明らかなように、ヒト型結核菌(MT)のDNAを試料とした場合にのみ明瞭なピークが観察され、トリ型結核菌(MA)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、マイコバクテリウム・カンサシイ(MK)それぞれのDNAを試料とした場合には陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ(オリゴ27)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(オリゴ27)を用いることでヒト型結核菌を特異的に検出できることを示している。

[0092] (5) 結果2

図10～13は、図9のオリゴ27にかえて、それぞれオリゴ28～31を用いて検出した結果を表した図である。図10～13より明らかなように、配列番号1(領域A)に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば、ヒト型結核菌(MT)のDNAを試料とした場合にMTを特異的に検出できた。オリゴ30またはオリゴ31(図12または図13)を用いた時に見られるNC、MA、MI、MKの非特異ピークについては、MTピークの温度と異なっているため、MTを判別することは可能である。さらに配列番号1(領域A)中の、5'-GGTTTCGGGG-3'(配列番号20)の相補的な核酸配列を少なくとも含む標識プローブのオリゴ27ではオリゴ28～31よりもヒト型結核菌に特異的かつ明瞭な検出ピークが得られていることがわかる。

[0093] [比較例1: Q-Probe法を用いたヒト型結核菌の検出4]

(1) 試料の調製

実施例3と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0094] (2) プライマー

実施例1同様に、配列番号32に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ32と示す)を合成した。オリゴ32はプローブである。オリゴ32は5'末端がBO

DIPY-FLにより標識されている。

[0095] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0096] 試薬1

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ26 1500nM、

オリゴ11 250nM、

オリゴ32 (BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0097] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例1と同様の条件を使用した。

[0098] (4) 結果

図14は、図9のオリゴ27にかえて、オリゴ32を用いて検出した結果を表した図である。オリゴ32は領域Aまたは領域Bまたはそれぞれの相補的な核酸配列に含まれない核酸配列を有したプローブである。図14より明らかなように、オリゴ32を用いた場合ではMTに特異的な検出ピークが得られず、MTを検出できなかった。

[0099] [実施例4: Q-Probe法を用いたヒト型結核菌(MT)とBCGの判別]

(1) 試料の調製

MTおよびBCGをそれぞれマクファランドNo. 1の濃度となるようにTEバッファーに

懸濁し、AMR社製MORA-EXTRACT用ビーズ充填チューブに入れた。チューブを95℃10分間加熱し、ボルテックスにより5分間菌体破碎処理を行った。その後破碎処理後の液を100倍希釈して菌体破碎液とし、これを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0100] (2) 核酸増幅および融解曲線解析

MTおよびBCGの各菌体破碎液および陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりBCGを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0101] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ26 250nM、

オリゴ11 1500nM、

オリゴ27 (BODIPY-FL標識) 250nM、

$\times 10$ 緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

MTまたはBCG菌体破碎液 1 μ L

[0102] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例1と同様の条件を使用した。

[0103] (4) 結果

図15は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図15はオリゴ27を用いてMTおよびBCGを検出した結果を表している。図15より明らかなように、オリゴ27を用いればMT菌体破碎液を試料にした場合65℃に検出ピークが得られ、BCG菌体破碎液を試料にした場合58℃に検出ピークが得られた。MTおよびBCGを判別できる明

瞭なピークが観察された。これは、従来の遺伝子検査方法では判別できなかったM
TとBCGを判別できたことを示している。

[0104] [実施例5:IFP法を用いたヒト型結核菌の検出1]

(1)試料の調製

実施例1と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0105] (2)プライマー及び標識プローブの合成

実施例1同様に、配列番号33、34に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ33、34と示す)を合成した。オリゴ33、34はプローブである。オリゴ33、34は5'末端および3'末端がTexas Redにより標識されている。

[0106] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは640nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0107] 試薬1

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ26 1500nM、

オリゴ11 150nM、

オリゴ33(Texas Red標識)1000nM、

$\times 10$ 緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

SYBR Green I(商標)(インビトロジェン社製)1/20000

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

試薬2

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ10 150nM、

オリゴ11 1500nM、

オリゴ34 (Texas Red標識) 1000nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

SYBR Green I(商標) (インビトロジェン社製) 1/20000

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0108] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

65°C・5秒、(50サイクル)

94°C・1分、

40°C・1分、

40°C～75°C (0.5°C/秒で温度上昇)。

[0109] (4) 結果

図16、17はライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図16にオリゴ33(領域Aに設計)、図17にオリゴ34(領域Bに設計)を用いた場合の検出結果を示す。図16、17に示すように、ヒト型結核菌(MT)のDNAを試料とした場合にのみ明瞭なピークが観察され、トリ型結核菌(MA)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、マイコバクテリウム・カンサシイ(MK)それぞれのDNAを試料とした場合には陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブの特異性が非常に高

いことを示しており、オリゴ33またはオリゴ34を用いることでヒト型結核菌を特異的に検出できることを示している。

[0110] 〔比較例2:IFP法を用いたヒト型結核菌の検出2〕

(1) 試料の調製

実施例1と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0111] (2) プライマー及び標識プローブの合成

実施例1同様に、配列番号35に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ35と示す)を合成した。オリゴ35はプローブである。オリゴ35は5'末端および3'末端がTexas Redにより標識されている。

[0112] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは640nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0113] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ26 150nM、

オリゴ11 1500nM、

オリゴ35(Texas Red標識) 1000nM、

$\times 10$ 緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

SYBR Green I(商標)(インビトロジェン社製) 1/20000

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0114] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分
98°C・0秒、
65°C・5秒、(50サイクル)
94°C・1分、
40°C・1分、
40°C～75°C (0.5°C/秒で温度上昇)。

[0115] (4)結果

図18は、図16のオリゴ33にかえて、オリゴ35を用いて検出した結果を表した図である。オリゴ35は領域Aまたは領域Bまたはそれぞれの相補的な核酸配列に含まれない核酸配列を有したプローブである。図18より明らかなようにオリゴ35を用いた場合、MTに特異的な検出ピークが得られず、MTを検出できなかった。

[0116] [実施例6:Q-Probe法を用いたMACの検出]

(1)試料の調製

4種類の抗酸菌属細菌、すなわち、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・カンサシイより、それぞれフェノール・クロロフォルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0117] (2)プライマーおよび標識プローブの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号38～40に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ38～40と示す)を合成した。合成はマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55°C、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はパーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。もしくはDNA合成受託会社((株)日本バイオサービス、シグマアルドリッチジャパン(株)、オペロンバイオテクノロジー(株)など)に依頼した。オリゴ38がプライマー(A)であり、オリゴ39がプライマー(B)であり、オリゴ40がプローブ(Cm)である。オリゴ40は5'末端がBODIPY-FLにより標識され、3'末端がリン酸化されている。

[0118] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0119] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ39 1500nM、

オリゴ40(5'末端をBODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0120] 核酸増幅増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

63°C・5秒、(50サイクル)

94°C・1分、

40°C・1分、

40°C～75°C(0.5°C/秒で温度上昇)。

[0121] (4) 結果

図19は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図19より明らかなように、トリ型結核菌(MA)およびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、すなわちMACのDNAを試料とした場合にのみ明瞭なピークが観察され、ヒト型結核菌(MT)、マイコ

バクテリウム・カンサシイ(MK)それぞれのDNAを試料とした場合には陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ(Cm)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(Cm)を用いることでMACを特異的に検出できることを示している。

[0122] [実施例7:Q-Probe法を用いたMACの検出2]

(1)試料の調製

実施例6と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0123] (2)プライマーおよび標識プローブの合成

実施例6同様に、配列番号47～49に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ47～49と示す)を合成した。オリゴ47～49はプローブであり、オリゴ47は3'末端がBODIPY-FLにより標識され、オリゴ48、49は5'末端がBODIPY-FLにより標識されている。

[0124] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMACを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0125] 試薬1

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 1500nM、

オリゴ39 250nM、

オリゴ47、48(BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

試薬2

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ39 1500nM、

オリゴ49 (BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L

[0126] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例6と同様の条件を使用した。

[0127] (4) 結果2

図20～22は、図19のオリゴ40にかえてオリゴ47～49を用いて検出した結果を表した図である。図19～22より明らかなように、配列番号36 (領域A) に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば、MACのDNAを試料とした場合に特異的なピークが観察される。さらに配列番号36 (領域A) 中の、5′-TCAACGTCGG-3′ (配列番号44) を少なくとも含む標識プローブのオリゴ47, 48ではMACに属するMAおよびMIともMACに特異的な同一の検出ピークが得られている。しかし、5′-TCAACGTCGG-3′の配列を完全に含まない配列を持つオリゴ49を使用した場合 (図22) では、MAとMIの塩基配列に一塩基の変異が含まれるため、検出ピークがMAで64°C、MIで59°Cとずれが生じている。配列番号36 (領域A) 中の、5′-TCAACGTCGG-3′は、MACの検出の際には、より有用な配列であることがわかる。

[0128] [実施例8: Q-Probe法を用いたMACの検出3]

(1) 試料の調製

実施例6と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0129] (2) プライマーおよび標識プローブの合成

実施例6同様に、配列番号46、50に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド (

以下、オリゴ46、50と示す)を合成した。オリゴ46はプライマー(B)である。オリゴ50はプローブであり、3'末端がBODIPY-FLにより標識されている。

[0130] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMACを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0131] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ46 1500nM、

オリゴ50 (BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0132] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例6と同様の条件を使用した。

[0133] (4) 結果2

図23は、図19のオリゴ40にかえてオリゴ50を用いて検出した結果を表した図である。図23より明らかなように、配列番号37(領域B)に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば、MACのDNAを試料とした場合に特異的なピークが観察される。加えて、オリゴ50は配列番号37(領域B)中の5'-AGCGGCGGCA-3'(配列番号45)を少なくとも含む核酸配列を有する標識プローブであるため、MACに特異的な検出ピーク以外の非特異ピークは観察されなかった。

[0134] [比較例3:Q-Probe法を用いたMACの検出4]

(1)試料の調製

実施例6と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0135] (2)プライマーおよび標識プローブの合成

実施例6同様に、配列番号51に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ51と示す)を合成した。オリゴ51はプローブである。オリゴ51は5'末端がBODIPY-FLにより標識され、かつ3'末端がリン酸化されている。

[0136] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMKを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0137] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 1500nM、

オリゴ39 250nM、

オリゴ51(BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0138] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例6と同様の条件を使用した。

[0139] (4)結果

図24は、図19のオリゴ40にかえて、オリゴ51を用いて検出した結果を表した図であ

る。オリゴ51は領域Aまたは領域Bまたはそれらの相補的な核酸配列の連続した10塩基以上を含まない核酸配列を有したプローブである。図24より明らかなように、オリゴ51を用いた場合ではMA、MI、MKのDNAを鋳型としたときに検出ピークが得られるが、MAとMIの検出ピークの間にMKの検出ピークが存在するため、MAC (MAとMI)に特異的な検出ピークは得られなかった。データには示さないが、オリゴ51の塩基配列はMAC株間で変異が存在する領域であるためトリ型結核菌種であってもMKと同一のピークを示す株や、イントラセラーレ種であっても検出ピークが異なる株が存在する。つまり、MACに属する株の検出ピークが特定できない。オリゴ51の核酸配列は一例であるが、配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列以外の核酸配列を標識プローブの核酸配列に用いると、他の抗酸菌種も同時に検出することによる偽陽性の可能性およびMAC株間で検出ピークが異なることによる偽陰性の可能性が高いことがわかる。

[実施例9:Q-Probe法を用いたMACの検出5]

(1) 試料の調製

36種類の抗酸菌属細菌をそれぞれマクファランドNo.1の濃度となるようにTEバッファーに懸濁し、AMR社製MORA-EXTRACT用ビーズ充填チューブに入れた。チューブを95°C10分間加熱し、ボルテックスにより5分間菌体破碎処理を行った。その後破碎処理後の液を100倍希釈して菌体破碎液とし、これを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0140] (2) 核酸増幅および融解曲線解析

36種類の抗酸菌属細菌菌体破碎液および陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMACを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシユ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0141] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ39 1500nM、
オリゴ40 (3'末端をBODIPY-FL標識) 250nM、
×10緩衝液 1 μ L、
dNTP 0.2mM、
MgSO₄ 4mM、
KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、
菌体破砕液 1 μ L

[0142] 核酸増幅および融解曲線解析条件
実施例6と同様の条件を使用した。

[0143] (3) 結果

表5に36種類の抗酸菌属細菌の検出結果を示す。検出欄の「+」が検出可能な菌種。「-」が検出されない菌種を示す。MACの菌体破砕液を試料とした場合にのみ64°Cにおける特異的な検出ピークが確認された。抗酸菌属であってもMACとは種の異なる34種類の抗酸菌属菌体破砕液を試料とした場合では陰性コントロール(NC)と同様に64°Cの特異的な検出ピークが得られなかった。これは、プローブ(オリゴ40)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(オリゴ40)を用いることでMACを特異的に検出できることを示している。

[0144] [表5]

菌種	検出
<i>M. avium</i>	+
<i>M. intracellulare</i>	+
<i>M. tuberculosis</i>	-
<i>M. arupense</i>	-
<i>M. abscessus</i>	-
<i>M. acapulcensis</i>	-
<i>M. agri</i>	-
<i>M. asiaticum</i>	-
<i>M. celatum</i>	-
<i>M. chelonae</i>	-
<i>M. chitae</i>	-
<i>M. chubuense</i>	-
<i>M. cooki</i>	-
<i>M. flavescens</i>	-
<i>M. fortuitum</i>	-
<i>M. gastri</i>	-
<i>M. gordonae</i>	-
<i>M. immunogenum</i>	-

菌種	検出
<i>M. kansasii</i>	-
<i>M. kumamotoense</i>	-
<i>M. mageritense</i>	-
<i>M. marinum</i>	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	-
<i>M. parascrofulaceum</i>	-
<i>M. peregrinum</i>	-
<i>M. phlei</i>	-
<i>M. porcinum</i>	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-
<i>M. senegalense</i>	-
<i>M. shimadae</i>	-
<i>M. simiae</i>	-
<i>M. smegmatis</i>	-
<i>M. terae</i>	-
<i>M. triviale</i>	-
<i>M. vaccae</i>	-
<i>M. xenopi</i>	-

[0145] [実施例10:Q-Probe法を用いたMACの検出6]

(1) 試料の調製

臨床分離されたMAC40株をそれぞれマクファランドNo.1の濃度となるようにTEバッファーに懸濁し、AMR社製MORA-EXTRACT用ビーズ充填チューブに入れた。チューブを95℃10分間加熱し、ボルテックスにより5分間菌体破碎処理を行った。その後破碎処理後の液を100倍希釈して菌体破碎液とし、これを試料とした。陰性コントロール(NC)としては、水を試料とした。

[0146] (2) 核酸増幅および融解曲線解析

臨床分離されたMAC40株の菌体破碎液および陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMACを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0147] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 1500nM、

オリゴ39 250nM、

オリゴ47 (3'末端をBODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

菌体破砕液 1 μ L

[0148] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例6と同様の条件を使用した。

[0149] (3) 結果

表6に臨床分離されたMAC40株の検出結果を示す。検出欄の「+」が検出可能な菌種。「-」が検出されない菌種を示す。表3の一致率(%)は配列番号13に示される塩基配列の塩基番号1～340までの配列をMAC株間で比較した時の一致率を示している。MAC40株の菌体破砕液全てにおいて検出が確認された。この時の融解曲線解析の検出ピークは図20と同様のピークが得られた。領域A配列中の5'-TC AACGTTCGG-3' (配列番号44)を少なくとも含む標識プローブのオリゴ47を用いればMACを株間差なく検出できることを示している。プローブ(オリゴ47)のMACに対する特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(オリゴ47)を用いることで株間差の大きいMACを特異的に検出できることを示している。

[0150] [表6]

菌種	一致率(%)	検出
MAC1	100	+
MAC2	98.94	+
MAC3	92.96	+
MAC4	99.73	+
MAC5	98.67	+
MAC6	99.73	+
MAC7	99.73	+
MAC8	100	+
MAC9	99.2	+
MAC10	92.34	+
MAC11	99.73	+
MAC12	99.73	+
MAC13	92.96	+
MAC14	98.67	+
MAC15	98.94	+
MAC16	90.98	+
MAC17	92.39	+
MAC18	92.96	+
MAC19	92.76	+
MAC20	90.43	+

菌種	一致率(%)	検出
MAC21	90.19	+
MAC22	92.39	+
MAC23	92.72	+
MAC24	92.39	+
MAC25	92.39	+
MAC26	91.76	+
MAC27	92.82	+
MAC28	90.96	+
MAC29	90.72	+
MAC30	92.96	+
MAC31	92.39	+
MAC32	92.39	+
MAC33	92.96	+
MAC34	93.01	+
MAC35	93.09	+
MAC36	93.35	+
MAC37	91.76	+
MAC38	92.96	+
MAC39	92.29	+
MAC40	92.55	+
NC	-	-

[0151] [実施例11:IFP法を用いたMACの検出1]

(1) 試料の調製

実施例6と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0152] (2) プライマー及び標識プローブの合成

実施例6同様に、配列番号52、53に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ52、53と示す)を合成した。オリゴ52、53はプローブである。オリゴ52、53は5'末端および3'末端がTexas Redにより標識されている。

[0153] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMACを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは640nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0154] 試薬1

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 1500nM、

オリゴ39 250nM、

オリゴ52 (Texas Red標識) 1000nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

SYBR Green I(商標)(インビトロジェン社製) 1/20000

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

試薬2

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ39 1500nM、

オリゴ53 (Texas Red標識) 1000nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

SYBR Green I(商標)(インビトロジェン社製) 1/20000

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0155] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

63°C・5秒、(50サイクル)

94℃・1分、
40℃・1分、
40℃～75℃ (0. 5℃／秒で温度上昇)。

[0156] (4) 結果

図25、26はライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図25にオリゴ52(領域Aに設計)、図26にオリゴ53(領域Bに設計)を用いた場合の検出結果を示す。図25、26に示すように、MAC (MA、MI) のDNAを試料とした場合にのみ明瞭なピークが観察され、ヒト型結核菌 (MT)、マイコバクテリウム・カンサシイ (MK) それぞれのDNAを試料とした場合には陰性コントロール (NC) と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ (オリゴ52, 53) の特異性が非常に高いことを示しており、領域Aまたは領域Bに設計したプローブ (オリゴ52, 53) を用いることでMACを特異的に検出できることを示している。

[0157] [比較例4:IFP法を用いたMACの検出2]

(1) 試料の調製

実施例6と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0158] (2) プライマー及び標識プローブの合成

実施例6同様に、配列番号54に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド (以下、オリゴ54と示す) を合成した。オリゴ54はプローブである。オリゴ54は5'末端および3'末端がTexas Redにより標識されている。

[0159] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

実施例11と同じ条件を使用した。

[0160] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 1500nM、

オリゴ39 250nM、

オリゴ54 (Texas Red標識) 1000nM、
×10緩衝液 1 μ L、
dNTP 0.2mM、
MgSO₄ 4mM、
SYBR Green I(商標)(インビトロジェン社製) 1/20000
KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、
抽出DNA溶液 20ng

[0161] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分
98°C・0秒、
63°C・5秒、(50サイクル)
94°C・1分、
40°C・1分、
40°C～75°C (0.5°C/秒で温度上昇)。

[0162] (4)結果

図27は、図25のオリゴ52にかえて、オリゴ54を用いて検出した結果を表した図である。オリゴ54は領域Aまたは領域Bまたはそれぞれの相補的な核酸配列に含まれない核酸配列を有したプローブである。図27より明らかなようにオリゴ54を用いた場合、MACに特異的な検出ピークが得られず、MACを検出できなかった。

[0163] [実施例12:Q-Probe法を用いたマイコバクテリウム・カンサシイの検出]

(1)試料の調製

4種類の抗酸菌属細菌、すなわち、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・カンサシイより、それぞれフェノール・クロロフォルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0164] (2)プライマー及び標識プローブの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号38、39、57に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ

38、39、57と示す)を合成した。合成はマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55°C、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はパーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。もしくはDNA合成受託会社((株)日本バイオサービス、シグマアルドリッチジャパン(株)、オペロンバイオテクノロジー(株)など)に依頼した。オリゴ38がプライマー(A)であり、オリゴ39がプライマー(B)であり、オリゴ57がプローブである。オリゴ57は5'末端がBODIPY-FLにより標識され、3'末端がリン酸化されている。

[0165] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりマイコバクテリウム・カンサシイを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0166] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ39 1500nM、

オリゴ57(5'末端をBODIPY-FL標識) 250nM、

$\times 10$ 緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0167] 核酸増幅増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

65°C・5秒、(50サイクル)

94°C・1分、

40°C・1分、
40°C～75°C (0.5°C/秒で温度上昇)。

[0168] (4) 結果

図28は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図28より明らかなように、マイコバクテリウム・カンサシイ(MK)のDNAを試料とした場合にのみ明瞭なピークが観察され、ヒト型結核菌(MT)、トリ型結核菌(MA)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)それぞれのDNAを試料とした場合には陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ(オリゴ57)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(オリゴ57)を用いることでマイコバクテリウム・カンサシイを特異的に検出できることを示している。

[0169] [実施例13: Q-Probe法を用いたマイコバクテリウム・カンサシイの検出2]

(1) 試料の調製

実施例12と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0170] (2) プライマー

実施例12同様に、配列番号64、70に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ64、70と示す)を合成した。オリゴ70はプライマー(B)である。オリゴ64はプローブであり、3'末端がBODIPY-FLにより標識されている。

[0171] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMKを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0172] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ70 1500nM、
オリゴ64 (BODIPY-FL標識) 250nM、
×10緩衝液 1 μ L、
dNTP 0.2mM、
MgSO₄ 4mM、
KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、
抽出DNA溶液 20ng

[0173] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例12と同様の条件を使用した。

[0174] (4) 結果

図29は、図28のオリゴ57にかえてオリゴ64を用いて検出した結果を表した図である。図29より明らかなように、配列番号56 (領域B) に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば、MKのDNAを試料とした場合に特異的なピークが観察される。また、図28より明らかなように、配列番号55 (領域A) に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を有していれば、MKのDNAを試料とした場合に特異的なピークが観察される。

[0175] [比較例5: Q-Probe法を用いたマイコバクテリウム・カンサシイの検出3]

(1) 試料の調製

実施例12と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0176] (2) プライマー

実施例12同様に、配列番号65に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド (以下、オリゴ65と示す) を合成した。オリゴ65はプローブである。オリゴ65は5'末端がBODIPY-FLにより標識され、かつ3'末端がリン酸化されている。

[0177] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMKを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイ

アグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0178] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ70 1500nM、

オリゴ65 (BODIPY-FL標識) 250nM、

$\times 10$ 緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0179] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例12と同様の条件を使用した。

[0180] (4) 結果

図30は、図28のオリゴ57にかえて、オリゴ65を用いて検出した結果を表した図である。オリゴ65は領域Aまたは領域Bまたはそれらの相補的な核酸配列の連続した10塩基以上を含まれない核酸配列を有したプローブである。図30より明らかなように、オリゴ65を用いた場合ではMKを鋳型としたときに検出ピークが得られるが、MAを鋳型としたときにも同様の検出ピークが得られた。つまり、MKに特異的な検出ピークは得られなかった。

[0181] [実施例14: Q-Probe法を用いたマイコバクテリウム・カンサシイの検出4]

(1) 試料の調製

36種類の抗酸菌属細菌をそれぞれマクファランドNo. 1の濃度となるようにTEバッファーに懸濁し、AMR社製MORA-EXTRACT用ビーズ充填チューブに入れた。チューブを95°C 10分間加熱し、ボルテックスにより5分間菌体破碎処理を行った。その後破碎処理後の液を100倍希釈して菌体破碎液とし、これを試料とした。陰性コン

コントロールとしては、水を試料とした。

[0182] (2) 核酸増幅および融解曲線解析

36種類の抗酸菌属細菌菌体破碎液および陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMKを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530 nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0183] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ39 1500nM、

オリゴ57(3'末端をBODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

菌体破碎液 1 μ L

[0184] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例12と同様の条件を使用した。

[0185] (3) 結果

表7に36種類の抗酸菌属細菌の検出結果を示す。検出欄の「+」が検出可能な菌種。「-」が検出されない菌種を示す。MKの菌体破碎液を試料とした場合にのみ検出が確認された。抗酸菌属であっても種の異なる35種類の抗酸菌属菌体破碎液を試料とした場合では陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ(オリゴ57)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(オリゴ57)を用いることでマイコバクテリウム・カンサシイを特異的に検出できることを示している。

[0186] [表7]

菌種	検出
<i>M. kansasii</i>	+
<i>M. avium</i>	-
<i>M. intracellulare</i>	-
<i>M. arupense</i>	-
<i>M. abscessus</i>	-
<i>M. acapulcensis</i>	-
<i>M. agri</i>	-
<i>M. asiaticum</i>	-
<i>M. celatum</i>	-
<i>M. chelonae</i>	-
<i>M. chitae</i>	-
<i>M. chubuense</i>	-
<i>M. cookii</i>	-
<i>M. flavescens</i>	-
<i>M. fortuitum</i>	-
<i>M. szulgai</i>	-
<i>M. goodii</i>	-
<i>M. immunogenum</i>	-

菌種	検出
<i>M. kumamotoense</i>	-
<i>M. malmoense</i>	-
<i>M. marinum</i>	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	-
<i>M. parascrofulaceum</i>	-
<i>M. peregrinum</i>	-
<i>M. phlei</i>	-
<i>M. porcinum</i>	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-
<i>M. senegalense</i>	-
<i>M. shimoi</i>	-
<i>M. simiae</i>	-
<i>M. smegmatis</i>	-
<i>M. terrae</i>	-
<i>M. triviale</i>	-
<i>M. tuberculosis</i>	-
<i>M. vaccae</i>	-
<i>M. xenopi</i>	-

[0187] [実施例15:Q-Probe法を用いたマイコバクテリウム・カンサシイとマイコバクテリウム・ガストリイの判別]

(1) 試料の調製

マイコバクテリウム・カンサシイ(MK)およびマイコバクテリウム・ガストリイ(MG)をそれぞれマクファランドNo. 1の濃度となるようにTEバッファーに懸濁し、AMR社製MORA-EXTRACT用ビーズ充填チューブに入れた。チューブを95℃10分間加熱し、ボルテックスにより5分間菌体破碎処理を行った。その後破碎処理後の液を100倍希釈して菌体破碎液とし、これを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0188] (2) プライマー

実施例12同様に、配列番号66、67に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ66、67と示す)を合成した。オリゴ66、67はプローブである。オリゴ66は3'末端がBODIPY-FLにより標識されている。オリゴ67は5'末端がBODIPY-FLにより標識されている。

[0189] (3) 核酸増幅および融解曲線解析

MKおよびMGの各菌体破碎液および陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMKを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0190] 試薬1

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ39 1500nM、

オリゴ57、67(BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

MKまたはMG菌体破碎液 1 μ L

試薬2

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 1500nM、

オリゴ39 250nM、

オリゴ66(BODIPY-FL標識) 250nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

MKまたはMG菌体破碎液 1

[0191] 核酸増幅および融解曲線解析条件

実施例12と同様の条件を使用した。

[0192] (4)結果

図31は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図31はオリゴ57を用いてMKおよびMGを検出した結果を表している。図31より明らかなように、オリゴ57を用いればMK菌体破碎液を試料にした場合60℃付近に検出ピークが得られ、MG菌体破碎液を試料にした場合、検出ピークが得られなかった。本発明の標的核酸検出方法を用いれば、16SrRNA遺伝子をターゲットとした遺伝子検査方法では判別できなかったMKとMGを判別できた。また、オリゴ66をプローブとして用いた場合でも、MKに特異的な検出ピークが得られ、MGは検出されなかった。オリゴ66を使用しても、図31に示すようなオリゴ57使用の時と同様の結果が得られた(ただし、検出ピークは65℃付近)。オリゴ57およびオリゴ66はそれぞれ配列番号62および配列番号61の相補的な核酸配列を含む塩基配列である。なお、データは示さないがオリゴ67を使用した場合、MKとMGの判別はできなかった。オリゴ67の塩基配列は領域Aに含まれているため、MKの検出は可能である。しかしながら、配列番号61もしくは配列番号62を含まないため、MKとMGを判別することはできなかった。この結果からわかるように、領域Aまたは領域B内でさらに配列番号61～63を含むプローブを設計すれば、より特異的にMKを検出できることがわかる。

[0193] [実施例16:IFP法を用いたマイコバクテリウム・カンサシイの検出]

(1)試料の調製

実施例12と同様に調製した4種類の抗酸菌属細菌のDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0194] (2)プライマー及び標識プローブの合成

実施例12同様に、配列番号68、69に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ68、69と示す)を合成した。オリゴ68、69はプローブである。オリゴ68、69は5'末端および3'末端がTexas Redにより標識されている。

[0195] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりMKを検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは640nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0196] 試薬1

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 1500nM、

オリゴ39 150nM、

オリゴ68、69(Texas Red標識)1000nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

SYBR Green I(商標)(インビトロジェン社製)1/20000

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0197] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

65°C・5秒、(50サイクル)

94°C・1分、

40°C・1分、

40°C～75°C(0.5°C/秒で温度上昇)。

[0198] (4)結果

図32はオリゴ68を用いて検出した結果を示しており、ライトサイクラーソフトウェアの解析によりグラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図32に示すように、MKのDNAを試料とした場合にのみ明瞭なピークが観察され、トリ型結核菌(MA)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、ヒト型

結核菌(MT)それぞれのDNAを試料とした場合には陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ(オリゴ68)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(オリゴ68)を用いることでヒト型結核菌を特異的に検出できることを示している。また、図32のオリゴ68にかえて、オリゴ69を用いて検出した結果、MKとMIで同じピークが検出された。オリゴ69は領域Aまたは領域Bまたはそれらの相補的な核酸配列の連続した10塩基以上を含まない核酸配列を有したプローブである。オリゴ69を用いた場合では、MKを鋳型としたときに検出ピークが得られるが、MIを鋳型としたときにも同様の検出ピークが得られたことから、MKに特異的な検出ができなかった。

[0199] [実施例17:Q-Probe法を用いたヒト型結核菌およびMACの同定]

(1)試料の調製

4種類の抗酸菌属細菌、すなわち、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・カンサシイより、それぞれフェノール・クロロフォルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0200] (2)プライマーの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号38、71、12、40に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ38、71、12、40と示す)を合成した。合成はマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はパーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。もしくはDNA合成受託会社((株)日本バイオサービス、シグマアルドリッチジャパン(株)、オペロンバイオテクノロジー(株)など)に依頼した。オリゴ38がプライマー(A)であり、オリゴ71がプライマー(B)であり、オリゴ12がプローブ(Ct)であり、オリゴ40がプローブ(Cm)である。オリゴ12は3'末端がBODIPY-FLにより標識され、オリゴ40は5'末端がBODIPY-FLにより標識され、かつ3'末端がリン酸化されている。

[0201] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加し

て、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0202] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ71 1500nM、

オリゴ12(3'末端をBODIPY-FL標識) 200nM、

オリゴ40(5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化) 200nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0203] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

65°C・5秒、(50サイクル)

94°C・1分、

40°C・1分、

40°C~75°C(0.5°C/秒で温度上昇)。

[0204] (4) 結果

図33は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。図33より明らかなように、ヒト型結核菌(MT)試料とした場合に明瞭なピークが観察され、またトリ型結核菌(MA)およびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、すなわちMACのDNAを試料とした場合にヒト型結核菌(MT)とは異なる位置に明瞭なピークが観察され、マイコバク

テリウム・カンサシイ(MK)のDNAを試料とした場合には陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、プローブ(Ct)およびプローブ(Cm)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(Ct)およびプローブ(Cm)を組み合わせることで、一度の測定でヒト型結核菌およびMACを同定できることを示している。

[0205] [実施例18:Q-Probe法を用いたヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイの同定]

(1)試料の調製

4種類の抗酸菌属細菌、すなわち、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・カンサシイより、それぞれフェノール・クロロフォルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0206] (2)プライマーの合成

実施例17と同様の方法にて、配列番号57、73に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ57、73と示す)を合成した。オリゴ57、73はプローブ(Ck)である。オリゴ57は5'末端がBODIPY-FLにより標識され、かつ3'末端がリン酸化されている。オリゴ73は3'末端がBODIPY-FLにより標識されている。

[0207] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0208] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ71 1500nM、

オリゴ73(3'末端をBODIPY-FL標識) 100nM、

オリゴ40 (5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化) 80nM、
オリゴ57 (5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化) 300nM、
×10緩衝液 1 μ L、
dNTP 0.2mM、
MgSO₄ 4mM、
KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、
抽出DNA溶液 20ng

[0209] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分
98°C・0秒、
63°C・5秒、(50サイクル)
94°C・1分、
40°C・1分、
40°C～75°C (0.5°C/秒で温度上昇)。

[0210] (4) 結果

図35は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。プライマー(B)として用いたオリゴ15の伸長産物に対して、標識プローブであるオリゴ73、40、57はハイブリダイズする。つまり検出に用いる3種類の標識プローブは全て同じプライマーを用いて伸長させた伸長産物とハイブリダイズすることになる。図35より明らかなように、ヒト型結核菌(MT)試料とした場合に68°Cに明瞭なピークが観察され、またトリ型結核菌(MA)およびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、すなわちMACのDNAを試料とした場合に63°Cに明瞭なピークが観察され、さらにマイコバクテリウム・カンサシイ(MK)のDNAを試料とした場合には59°Cにピークが観察された。MT、MAC、MKのそれぞれに特異的な検出ピークが観察された。陰性コントロール(NC)はピークが得られなかった。これは、プローブ(Ct)、プローブ(Cm)およびプローブ(Ck)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(Ct)、プローブ(Cm)およびプローブ(Ck)の3種類のプローブを組み合わせて用いることで、一度の測定で抗酸菌の中で臨

床診断上特に重要となるヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイを一度に同定できることを示している。

[0211] [実施例19:Q-Probe法を用いたヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイの同定2]

(1) 試料の調製

4種類の抗酸菌属細菌、すなわち、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・カンサシイより、それぞれフェノール・クロロフォルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0212] (2) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0213] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 500nM、

オリゴ71 500nM、

オリゴ27(3'末端をBODIPY-FL標識) 100nM、

オリゴ40(5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化) 80nM、

オリゴ57(5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化) 300nM、

$\times 10$ 緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0214] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分
98°C・0秒、
65°C・5秒、(50サイクル)
94°C・1分、
40°C・1分、
40°C～75°C (0. 5°C／秒で温度上昇)。

[0215] (3) 結果

図36は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。プライマー(A)として用いたオリゴ38の伸長産物に対して、標識プローブであるオリゴ27はハイブリダイズし、プライマー(B)として用いたオリゴ71の伸長産物に対して、標識プローブであるオリゴ40、57はハイブリダイズする。つまり検出に用いる3種類の標識プローブのうち、プローブ(Ct)は、プローブ(Cm)および(Ck)とは「異なるプライマーを用いて伸長させた伸長産物」とハイブリダイズすることになる。図36より明らかなように、ヒト型結核菌(MT)試料とした場合に66°Cに明瞭なピークが観察され、またトリ型結核菌(MA)およびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、すなわちMACのDNAを試料とした場合に63°Cに明瞭なピークが観察され、さらにマイコバクテリウム・カンサシイ(MK)のDNAを試料とした場合には59°Cにピークが観察された。MT、MAC、MKのそれぞれに特異的な検出ピークが観察された。陰性コントロール(NC)はピークが得られなかった。これは、プローブ(Ct)、プローブ(Cm)およびプローブ(Ck)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(Ct)、プローブ(Cm)およびプローブ(Ck)の3種類のプローブを組み合わせることで、一度の測定で抗酸菌の中で臨床診断上特に重要となるヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイを一度に同定できることを示している。

[0216] [実施例20: Q-Probe法を用いたヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイの同定3]

(1) 試料の調製

4種類の抗酸菌属細菌、すなわち、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・

イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・カンサシイより、それぞれフェノール・クロロフォルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0217] (2)プライマーの合成

実施例1と同様の方法にて、配列番号72に示される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、オリゴ72と示す)を合成した。オリゴ72はプローブ(Ck)である。オリゴ72は5'末端がBODIPY-FLにより標識され3'末端がリン酸化されている。

[0218] (3)核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0219] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 500nM、

オリゴ71 500nM、

オリゴ73(3'末端をBODIPY-FL標識)100nM、

オリゴ47(3'末端をBODIPY-FL標識)160nM、

オリゴ72(5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化)300nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0220] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

65°C・5秒、(50サイクル)
94°C・1分、
40°C・1分、
40°C～75°C (0.5°C/秒で温度上昇)。

[0221] (4) 結果

図37は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光シグナルの微分値として解析結果を表した図である。プライマー(A)として用いたオリゴ38の伸長産物に対して、標識プローブであるオリゴ47はハイブリダイズし、プライマー(B)として用いたオリゴ71の伸長産物に対して、標識プローブであるオリゴ73、72はハイブリダイズする。つまり検出に用いる3種類の標識プローブのうち、プローブ(Cm)は、プローブ(Ct)および(Ck)とは「異なるプライマーを用いて伸長させた伸長産物」とハイブリダイズすることになる。図37より明らかなように、ヒト型結核菌(MT)試料とした場合に68°Cに明瞭なピークが観察され、またトリ型結核菌(MA)およびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、すなわちMACのDNAを試料とした場合に60°Cに明瞭なピークが観察され、さらにマイコバクテリウム・カンサシイ(MK)のDNAを試料とした場合には63°Cにピークが観察された。MT、MAC、MKのそれぞれに特異的な検出ピークが観察された。陰性コントロール(NC)はピークが得られなかった。これは、プローブ(Ct)、プローブ(Cm)およびプローブ(Ck)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(Ct)、プローブ(Cm)およびプローブ(Ck)の3種類のプローブを組み合わせることで、一度の測定で抗酸菌の中で臨床診断上特に重要となるヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイを一度に同定できることを示している。

[0222] [実施例21:Q-Probe法を用いたヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイの同定4]

(1) 試料の調製

4種類の抗酸菌属細菌、すなわち、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・カンサシイより、それぞれフェノール・クロロフォルム法を用いて抽出したDNAを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料

とした。

[0223] (2) 核酸増幅および融解曲線解析

4種類の抗酸菌属細菌DNAおよび陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシェ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モードは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0224] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 500nM、

オリゴ71 500nM、

オリゴ27(3'末端をBODIPY-FL標識) 100nM、

オリゴ47(3'末端をBODIPY-FL標識) 160nM、

オリゴ72(5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化) 300nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0225] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

65°C・5秒、(50サイクル)

94°C・1分、

40°C・1分、

40°C～75°C(0.5°C/秒で温度上昇)。

[0226] (3) 結果

図38は、ライトサイクラーソフトウェアの解析により、グラフの横軸を温度、縦軸を蛍光

シグナルの微分値として解析結果を表した図である。プライマー(A)として用いたオリゴ38の伸長産物に対して、標識プローブであるオリゴ27、47はハイブリダイズし、プライマー(B)として用いたオリゴ71の伸長産物に対して、標識プローブであるオリゴ72はハイブリダイズする。つまり検出に用いる3種類の標識プローブのうち、プローブ(Ck)は、プローブ(Ct)および(Cm)とは「異なるプライマーを用いて伸長させた伸長産物」とハイブリダイズすることになる。図38より明らかなように、ヒト型結核菌(MT)試料とした場合に66°Cに明瞭なピークが観察され、またトリ型結核菌(MA)およびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ(MI)、すなわちMACのDNAを試料とした場合に60°Cに明瞭なピークが観察され、さらにマイコバクテリウム・カンサシイ(MK)のDNAを試料とした場合には63°Cにピークが観察された。MT、MAC、MKのそれぞれに特異的な検出ピークが観察された。陰性コントロール(NC)はピークが得られなかった。これは、プローブ(Ct)、プローブ(Cm)およびプローブ(Ck)の特異性が非常に高いことを示しており、プローブ(Ct)、プローブ(Cm)およびプローブ(Ck)の3種類のプローブを組み合わせることで、一度の測定で抗酸菌の中で臨床診断上特に重要となるヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイを一度に同定できることを示している。

[0227] [実施例22:Q-Probe法を用いたヒト型結核菌、MACおよびマイコバクテリウム・カンサシイの同定2]

(1) 試料の調製

36種類の抗酸菌属細菌をそれぞれマクファランドNo. 1の濃度となるようにTEバッファーに懸濁し、AMR社製MORA-EXTRACT用ビーズ充填チューブに入れた。チューブを95°C10分間加熱し、ボルテックスにより5分間菌体破碎処理を行った。その後破碎処理後の液を100倍希釈して菌体破碎液とし、これを試料とした。陰性コントロールとしては、水を試料とした。

[0228] (2) 核酸増幅および融解曲線解析

36種類の抗酸菌属細菌菌体破碎液および陰性コントロールにそれぞれ下記試薬を添加して、下記条件によりヒト型結核菌を検出した。核酸増幅および融解曲線解析にはロシュ・ダイアグノスティック社製ライトサイクラー(登録商標)を使用した。測定モー

ドは530nmを利用し、ライトサイクラーソフトウェアにより結果を解析した。

[0229] 試薬

以下の試薬を含む10 μ L溶液を調製した。

KOD plus DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ38 250nM、

オリゴ71 1500nM、

オリゴ73 (3'末端をBODIPY-FL標識) 100nM、

オリゴ40 (5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化) 80nM、

オリゴ57 (5'末端をBODIPY-FL標識、3'末端をリン酸化) 300nM、

×10緩衝液 1 μ L、

dNTP 0.2mM、

MgSO₄ 4mM、

KOD plus DNAポリメラーゼ 0.2U、

抽出DNA溶液 20ng

[0230] 核酸増幅および融解曲線解析条件

94°C・2分

98°C・0秒、

63°C・5秒、(50サイクル)

94°C・1分、

40°C・1分、

40°C～75°C (0.5°C/秒で温度上昇)。

[0231] (3) 結果

表8に36種類の抗酸菌属細菌の検出結果を示す。検出欄への数値の記載は検出可能な菌種であることを示す。例えば「68」は68°Cに検出ピークが見られることを示している。55°C以上においてピークが検出できない菌種は「-」と記載する。オリゴ73 (Ct)、オリゴ40 (Cm) およびオリゴ57 (Ck) の組み合わせで検出可能な菌種は、図35で特異的な検出ピークが得られているMT、MAC、MKである。実施例18の結果と同様にMTの菌体破砕液を試料とした場合には68°C、MACの菌体破砕液を試料

とした場合には63℃、MKの菌体破碎液を試料とした場合には59℃の検出ピークが観察された。しかし、MT、MAC、MK以外の抗酸菌種32種類の菌体破碎液を試料とした場合では陰性コントロール(NC)と同様にピークが得られなかった。これは、オリゴ73(Ct)、オリゴ40(Cm)およびオリゴ57(Ck)を組み合わせることによって、临床上重要であるMT、MAC、MKの三種を特異的に検出でき、かつ三種を1つの試薬により明確に同定できることを示している。

[0232] [表8]

菌種	検出	菌種	検出
<i>M. tuberculosis</i>	68	<i>M. kansasii</i>	59
<i>M. avium</i>	63	<i>M. kumamotoense</i>	-
<i>M. intracellulare</i>	63	<i>M. malmoense</i>	-
<i>M. abscessus</i>	-	<i>M. marinum</i>	-
<i>M. abscessus</i>	-	<i>M. nonchromogenicum</i>	-
<i>M. abscessus</i>	-	<i>M. parascrofulaceum</i>	-
<i>M. agri</i>	-	<i>M. peregrinum</i>	-
<i>M. asiaticum</i>	-	<i>M. phlei</i>	-
<i>M. celatum</i>	-	<i>M. porcinum</i>	-
<i>M. chelonae</i>	-	<i>M. scrofulaceum</i>	-
<i>M. chitae</i>	-	<i>M. senegalense</i>	-
<i>M. chubuense</i>	-	<i>M. simiae</i>	-
<i>M. cookii</i>	-	<i>M. smegmatis</i>	-
<i>M. flavescens</i>	-	<i>M. terrae</i>	-
<i>M. fortuitum</i>	-	<i>M. triviale</i>	-
<i>M. gastri</i>	-	<i>M. vaccae</i>	-
<i>M. goodii</i>	-	<i>M. xenopi</i>	-
<i>M. immunogenum</i>	-		

産業上の利用可能性

[0233] 本発明によれば、臨床診断上重要な抗酸菌属細菌について迅速、確実かつ簡便に検出または菌種同定することが可能となる。具体的には、ヒト型結核菌をはじめとする抗酸菌属細菌のdnaJ1遺伝子において菌種特異性が極めて高い領域を標的核酸とするプローブを用いた融解曲線解析を行うことにより、ヒト型結核菌、MAC、マイコバクテリウム・カンサシイ(*Mycobacterium kansasii*)、について非常に正確に検出または同時に菌種同定できる。

また、従来技術では困難であった、複数の抗酸菌属細菌の検出または菌種同定を単一の種類の蛍光色素により達成でき、それゆえ、単一種類の蛍光だけを検出する安価なシステムにて、コンタミネーションによる誤判定の危険を冒すことなく、抗酸菌属細菌を検出または菌種同定することができるという効果を奏する。

したがって、産業界に大きく寄与することが期待される。

請求の範囲

- [1] 配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち、少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。
- [2] 配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち、少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。
- [3] 配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち、少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。
- [4] 少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とするヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の検出方法。
- (1) 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー(A)と、該プライマー(A)の伸長産物の一部と相補的な少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー(B)と、を用いて配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅する第一工程、
- (2) 第一工程で得られうるプライマー(B)の伸長産物と、配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ct)と、をハイブリダイズさせ複合体(Pt)を形成せしめる第二工程、
- (3) 第二工程で得られうる該複合体(Pt)を検出する第三工程。
- [5] 少なくとも以下の(1)および(2)を含むことを特徴とするヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の検出キット。
- (1) 配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅することが可能なオリゴヌクレオチドプライマー(A)およびオリゴヌクレオチドプライマー(B)、
- (2) 配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する検出用オリゴヌクレオチドプ

ローブ (Ct)。

- [6] 少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とするトリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*) またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*) の検出方法。

(1) 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー (A) と、該プライマー (A) の伸長産物の一部と相補的な少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー (B) と、を用いて配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅する第一工程、

(2) 第一工程で得られうるプライマー (B) の伸長産物と、配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ (Cm) と、をハイブリダイズさせ複合体 (Pm) を形成せしめる第二工程、

(3) 第二工程で得られうる該複合体 (Pm) を検出する第三工程。

- [7] 少なくとも以下の(1)および(2)を含むことを特徴とするトリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*) またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*) の検出キット。

(1) 配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅することが可能なオリゴヌクレオチドプライマー (A) およびオリゴヌクレオチドプライマー (B)、

(2) 配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する検出用オリゴヌクレオチドプローブ (Cm)。

- [8] 少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とするマイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*) の検出方法。

(1) 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー (A) と、該プライマー (A) の伸長産物の一部と相補的な少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー (B) と、を用いて配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅する第一工程、

(2) 第一工程で得られうるプライマー (B) の伸長産物と、配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類の検出用オリゴヌクレオチドプローブ (C_k) と、をハイブリダイズさせ複合体 (P_k) を形成せしめる第二工程、
(3) 第二工程で得られうる該複合体 (P_k) を検出する第三工程。

[9] 少なくとも以下の(1)および(2)を含むことを特徴とするマイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*) の検出キット。

(1) 配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅することが可能なオリゴヌクレオチドプライマー (A) およびオリゴヌクレオチドプライマー (B)、
(2) 配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する検出用オリゴヌクレオチドプローブ (C_k) 。

[10] 少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とする抗酸菌属細菌の菌種同定方法。

(1) 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー (A) と、該プライマー (A) の伸長産物の一部と相補的な少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマー (B) と、を用いて配列番号1、2、36、37、55および56からなる群のうちいずれかに示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅する第一工程、
(2) 第一工程で得られうるプライマー (A) または (B) の伸長産物と、配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類のヒト型結核菌検出用オリゴヌクレオチドプローブ (C_t) と、をハイブリダイズさせ複合体 (P_t) を形成せしめ、
該プライマー (A) または (B) の伸長産物と、配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類のトリ型結核菌またはマイコバクテリウム・イントラセラーレ検出用オリゴヌクレオチドプローブ (C_m) と、をハイブリダイズさせ複合体 (P_m)

を形成せしめ、

該プライマー(A)または(B)の伸長産物と、配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類のマイコバクテリウム・カンサシイ検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ck)と、をハイブリダイズさせ複合体(Pk)を形成せしめる第二工程、
(3)第二工程で得られうる該複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)のうち、どの複合体が形成したかを判別する第三工程。

- [11] プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)のT_m値が、互いに3°C以上異なることを特徴とする請求項10に記載の菌種同定方法。
- [12] プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)の長さが、互いに1塩基以上異なることを特徴とする請求項10または11に記載の菌種同定方法。
- [13] 複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)から発せられる蛍光を測定しながら、連続的な温度上昇または下降を伴う融解曲線解析を行い、該複合体(Pt)、(Pm)、または(Pk)のうち、どの複合体が形成したかを判別することを特徴とする請求項10～12のいずれかに記載の菌種同定方法。
- [14] 少なくとも以下の(1)～(4)を含むことを特徴とする抗酸菌属細菌の菌種同定方法。
 - (1)配列番号1または2に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類のヒト型結核菌検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ct)、
 - (2)配列番号36または37に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類のトリ型結核菌またはマイコバクテリウム・イントラセルラーレ検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Cm)、
 - (3)配列番号55または56に示される核酸配列または該配列に相補的な核酸配列のうち少なくとも連続した10塩基よりなる核酸配列を含有する少なくとも1種類のマイコバクテリウム・カンサシイ検出用オリゴヌクレオチドプローブ(Ck)、
 - (4)プローブ(Ct)、(Cm)、および(Ck)の核酸配列または該配列に相補的な核酸配列と90%以上一致する核酸配列を含む核酸断片を増幅することが可能なオリゴヌ

クレオチドプライマー (A) およびオリゴヌクレオチドプライマー (B)。

[図1]

Ma 1: AGCTGGCGCGGATCTACACCGGATGCCAACC CGGACAATCCCGCGCGCGCGGAACGATTCAGGCGGTC TCCGAGGCG 80
 Hi 1: AACTGGCGCGGATCTGCACCGGATGCCAACC CGGACAATCCCGCGCGCGGTGAACGATTCAGGCGGTC TCCGAGGCG 80
 Mr 1: AGTTGCTCGCGGAGAATCATCCC GACGGAACC CGGCAACAAGGCGCGCGGAATCGCTACAGGCGGTC TCCGAGGCA 80
 Hr 1: AGTTGGCGCGCGGATCTGCATCCG GACGGAACC CGGCAACCC GCGCGCGCGGAACGTTCAAGGCGGTT TCCGAGGCG 80
 * . ** ** ** ** ** ** ** **

Ma 81: CACAACGTGTGTCTCGACCC GGC CAAGCGCAAGGAATAC GACGAAA CCC GAAGCGTTT TCCGCGGAGCGCGTTT TCCGCGG 160
 Hi 81: CACAACGTGTGTCTCGATCC GGC CAAGCGCAAGGAATAC GACGAAA CCC GAAGCGTGT TCCGCGGAGCGCGTTT TCCGCGG 160
 Mr 81: AAAAGAAGTGTACCGATCC GGC CAAGCGCAAGGAATAC GACGAAA CCC GCGCGCTGT TCCGCGGAGCGCGTTT TCCGCGG 160
 Hr 81: CATAACGTGTGTCTCGATCC GGC CAAGCGCAAGGAGTAC GACGAAA CCC GCGCGCTGT TCCGCGGAGCGCGTTT TCCGCGG 160
 * ** ** ** ** ** ** **

領域A

Ma 161: GCGCGCGTTTCGACACCGGTGGTTTCGGCGGCTTCAACGTCCGCGGCGGACGGG-----CGGAGTTCAACCTCAACG 231
 Hi 161: GCGCGCGTTTCGATACCGCGGCTTCGGTTCGCTTCAACGTCCGCGGCGGACGGG-----CGGAGTTCAACCTCAACG 231
 Mr 161: TCGTAGGTTTCGACCGCGGCTTCGGCGGCTTCCGGGAGCGCGCTACGGCTCCGATGCGCGCGAGTTCAACCTCAACG 240
 Hr 161: CCCTCGGTTTCGACCGGCTTTCGGCGGCTTCCGGGCTTCGGGTCGCTCGAGACGCGCGCGAGTTCAACCTCAACG 240
 * ** ** ** ** ** ** **

領域B

Ma 232: ATTTGTTTCGACCGCGCGGCGCGGAGCGCGCAACCAATCGGCGACCTGTTTCGGCGGCTGTTTCGGCGCGGCTTCGGGCG 311
 Hi 232: ATCTGTTTCGACCGCGCGGCGCGGAGCGCGCAACCAATCGGCGACCTGTTTCGGCGGATTGTTTCGGCGCGGCGCGCGGCG 311
 Mr 241: ATTTGTTTCGACCGCGCGGCGCGTTCGGCGGCAACCAATCGGCGACTGTTTCGGCGGCTGTTTCGGCGCGGCGCGGCGGCG 320
 Hr 241: ACTTGTTTCGACCGCGCGGCGCGAACC GCGGTAACCAATCGGCGACTGTTTCGGTGGCTTGTTCGAGCGCGGTGGCAGC 320
 * ** ** ** ** ** ** **

Ma 312: GCGCGCGCGACCGCGCGCGCGCGCGCAACGACCTCGAACCAGAGCCAGCTGGATTTCGTGAGCGCGCGCAAGGCGCT 391
 Hi 312: GCGCGCGCGACCGCGCGCGCGCGCGCAACGACCTCGAACCAGAGCCAGCTGGAAATTCGTGAGCGCGCGCAAGGCGTGT 391
 Mr 321: GCGCGCGCGACCGCGCGCGCGCGCGCAACGATCTGGAGACCGAGAGCCAGCTTGATTTCGTGAGCGCGCGCAAGGCGCT 400
 Hr 321: GCGCGTCCGACCGCGCGCGCGCGCGCAACGACCTGGAGACCGAGAGCCAGTTGCATTTCGTGAGCGCGCGCAAGGCGCT 400
 * * * * * ** ** ** ** ** ** **

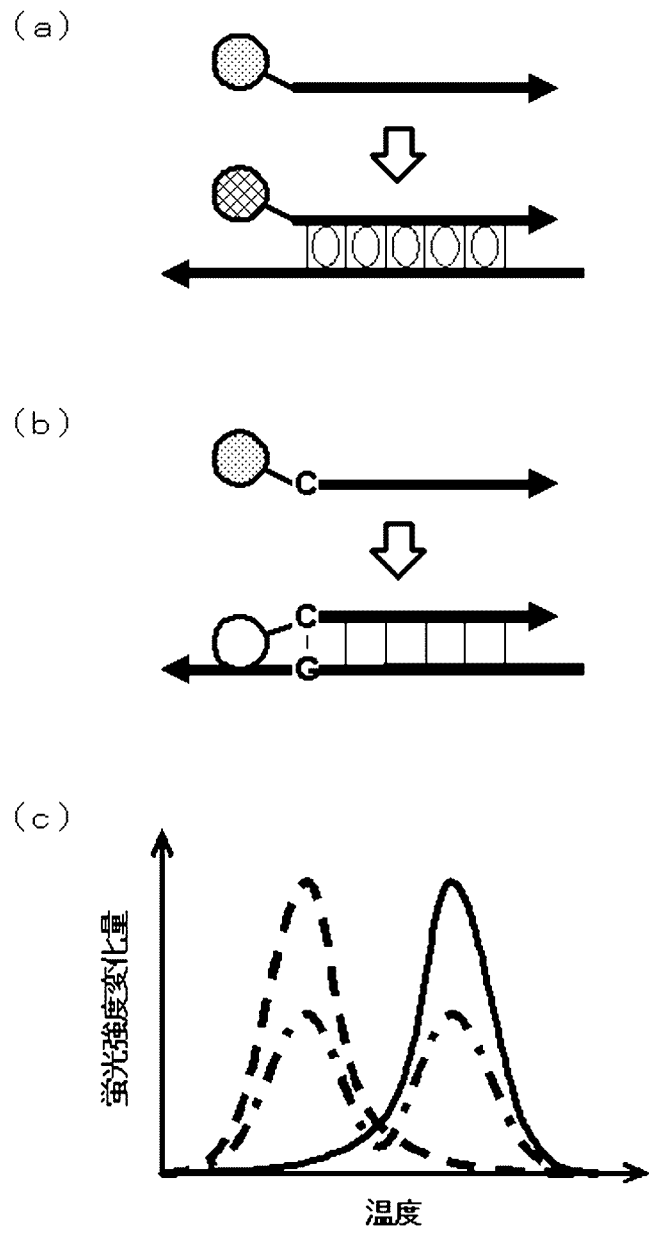
Ma 392: GCGGATGCGGCTGCGGCTGACCAAGCGCGCGCGGTGCACCACTGCGCACGGCAGCGCGGCGCGCGCGGCGGACCGGCGCA 471
 Hi 392: GCGGATGCGGCTGCGGCTGACCAAGCGCGCGCGGTGCACCACTGCGCATGCGAGCGGGGCGCGCGCGGCGGACCGGCGCA 471
 Mr 401: GCGGATGCGGCTGCGGCTGACCAAGCGCGCGCGGTGCACCACTGCGCACGGCAGCGCGCGCGCGGCGGACCGGCGCTA 480
 Hr 401: GCGGATGCGGCTGCGGATTAACCAAGCGCGCGCGGTGCACCACTGCGCATGCGAGCGGGGCGCGCGCGGCGGACCGGCGCA 480
 * * * * * ** ** ** ** ** ** **

Ma 472: AGGTGTGCGCCACCTGTAAAGGCTCCGGCGTAATCAGCGCAACCAAGGCGGCTTTCGGCTTCTCCGAGCGCTGCACCGAT 551
 Hi 472: AGGTGTGTCCACCTGTAAAGGCTCCGGCGTATCAACCGCAACCAAGGCGGCTTTCGGTTTCTCCGAGCGCTGCACCGAT 551
 Mr 481: AGGTGTGTCCGACCTGTAAAGGCGCGCGGCTGATCAACCGCAATCAGGCGGCTTTCGGCTTCTCCGAGCGCTGCACCGAT 560
 Hr 481: AGGTGTGTCCACTGTAAAGGCTCCGGCGTATCAACCGCAATCAGGCGGCTTTCGGCTTCTCCGAGCGCTGCACCGAT 560
 * * * * * ** ** ** ** ** ** **

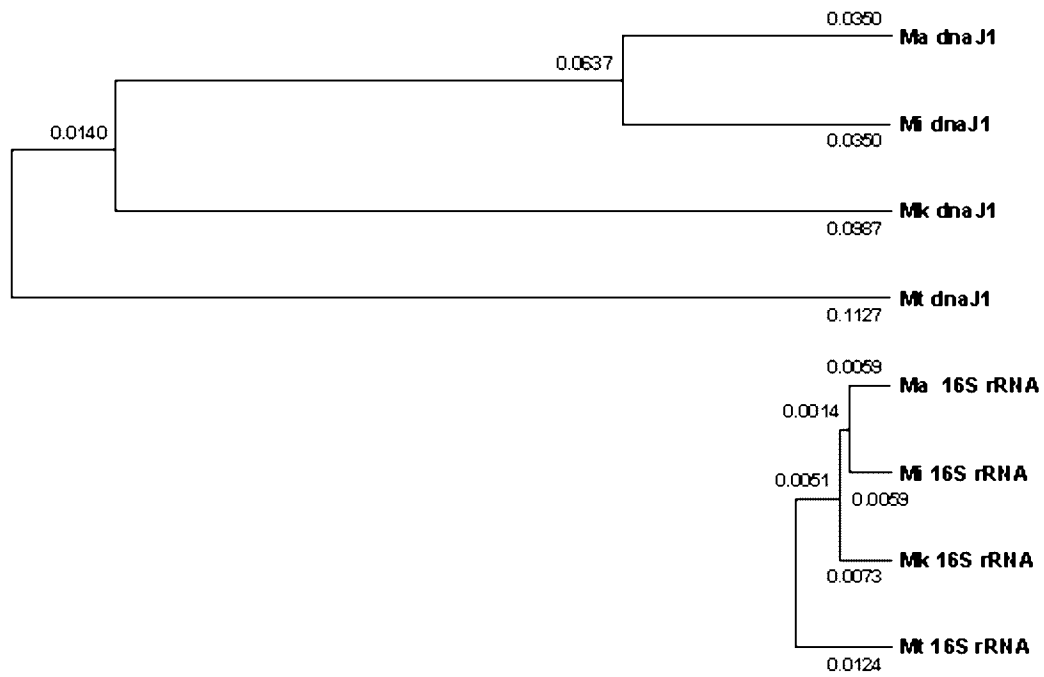
Ma 552: TCCCGGGGACCGGCTCGATCATCGAGCACCCCTGCGAGGAGTCAAGGCGACCGGGTCAACCCCGCACCGGCGACCAT 631
 Hi 552: TCCCGGGGACCGGCTCGATCATCGAGCACCCCTGCGAGGAGTCAAGGCGACCGGGTCAACCCCGGACCGGCGACCAT 631
 Mr 561: TCCCGGGGTACCGGCTCGATCATCGAGCACCCCTGATGAGTCAAGGCGACTCGGCTCAACCCCGTACCCGCGACCAT 640
 Hr 561: TCCCGAGGTACCGGCTCGATCATCGAGCACCCCTGCGAGGAGTCAAGGCGACCGGCTGACCGCGCACCGGCGACCAT 640
 * * * * * ** ** ** ** ** ** **

Ma 632: CAACGTGCGGATCCCGCGCGGCGT 655
 Hi 632: CAACGTGCGGATCCCGCGCGGCGT 655
 Mr 641: CAACGTGCGGATCCCGCGCGGCGT 664
 Hr 641: CAACGTGCGGATCCCGCGCGGCGT 664
 * * * * * ** ** ** ** ** ** **

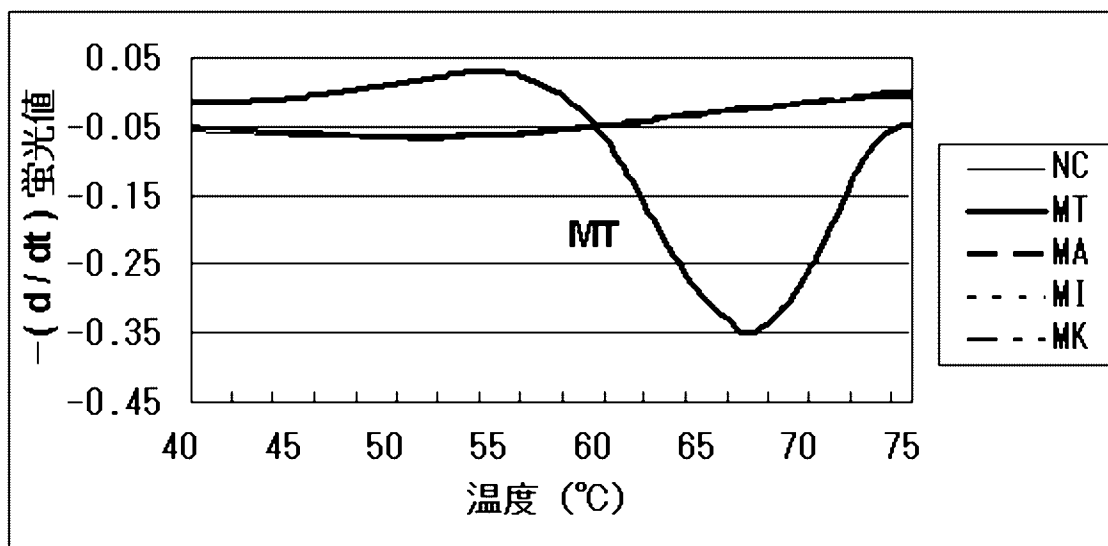
[図2]



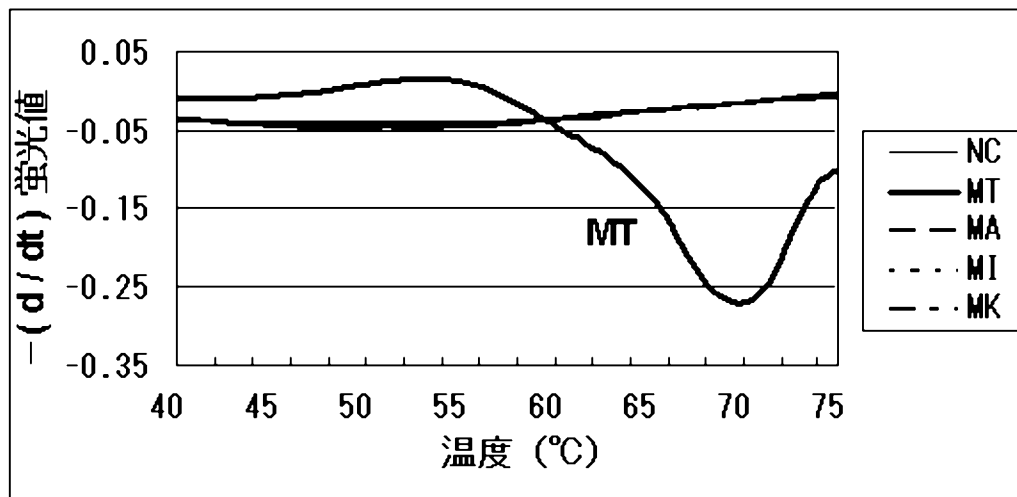
[図3]



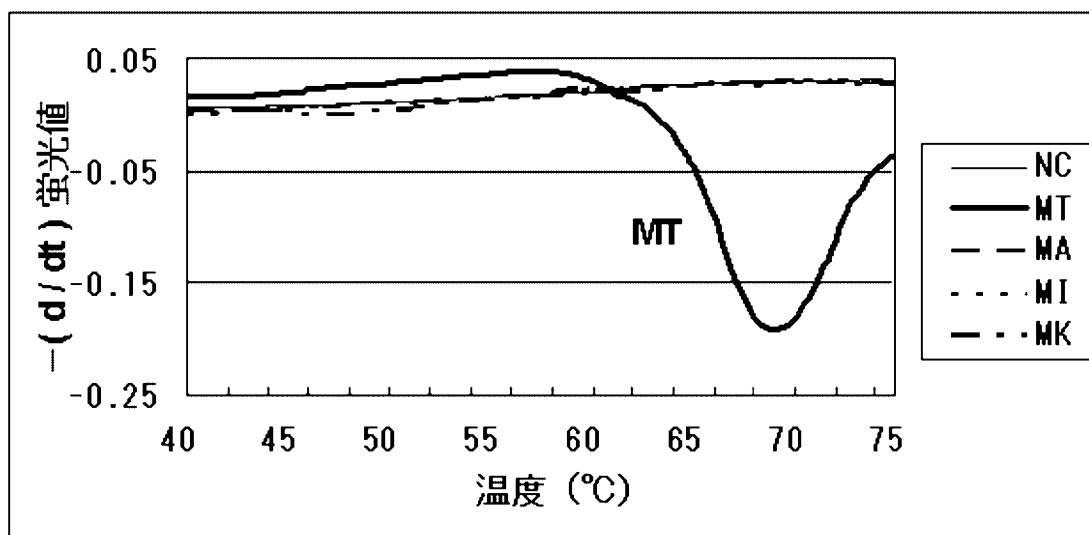
[図4]



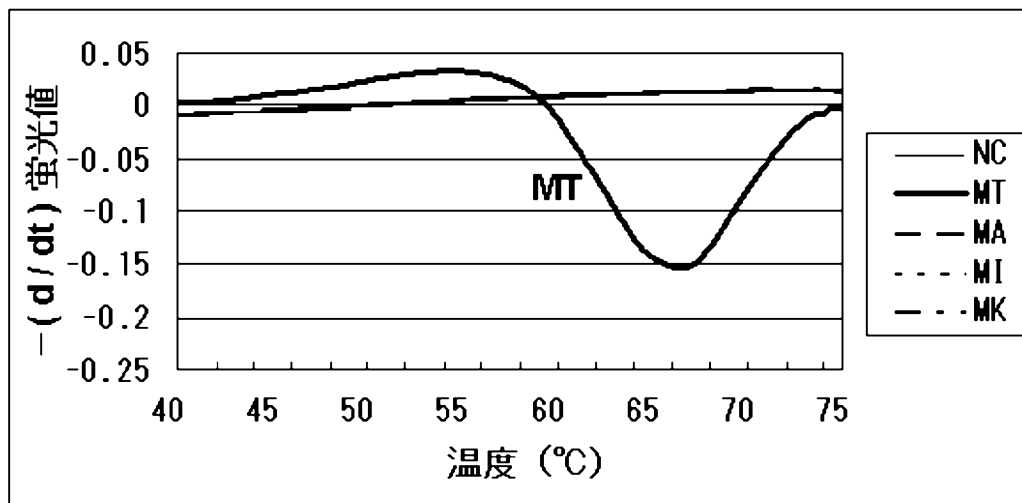
[図5]



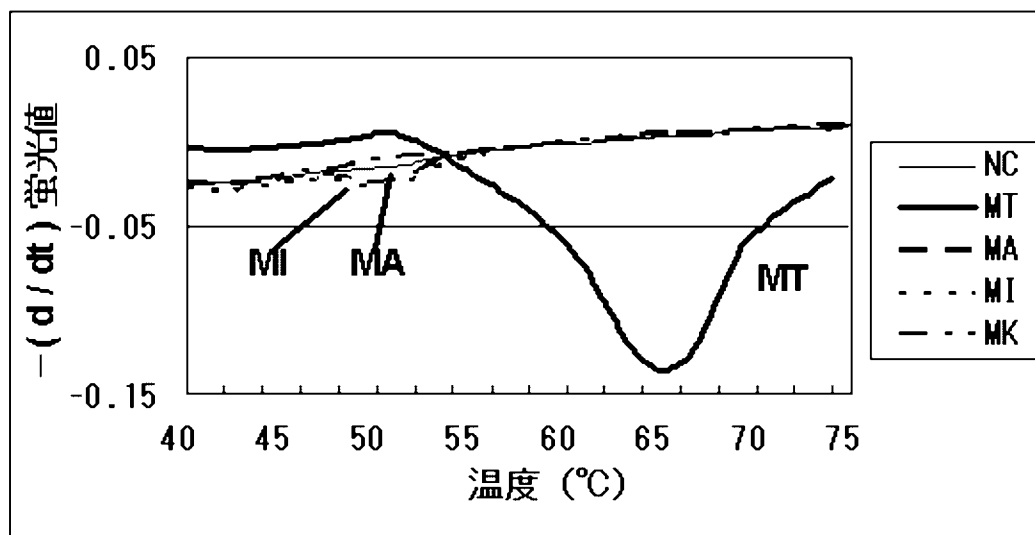
[図6]



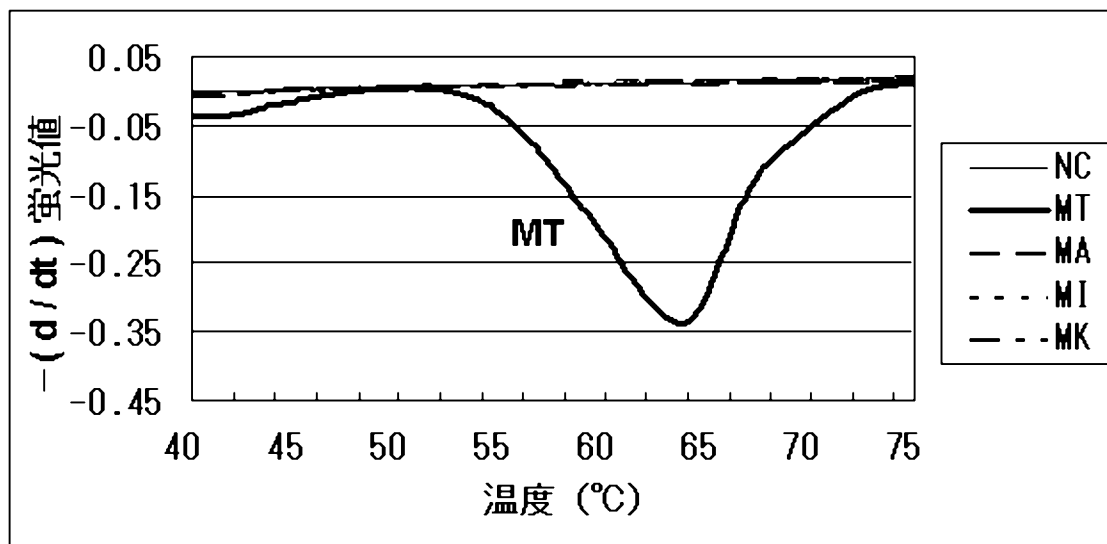
[図7]



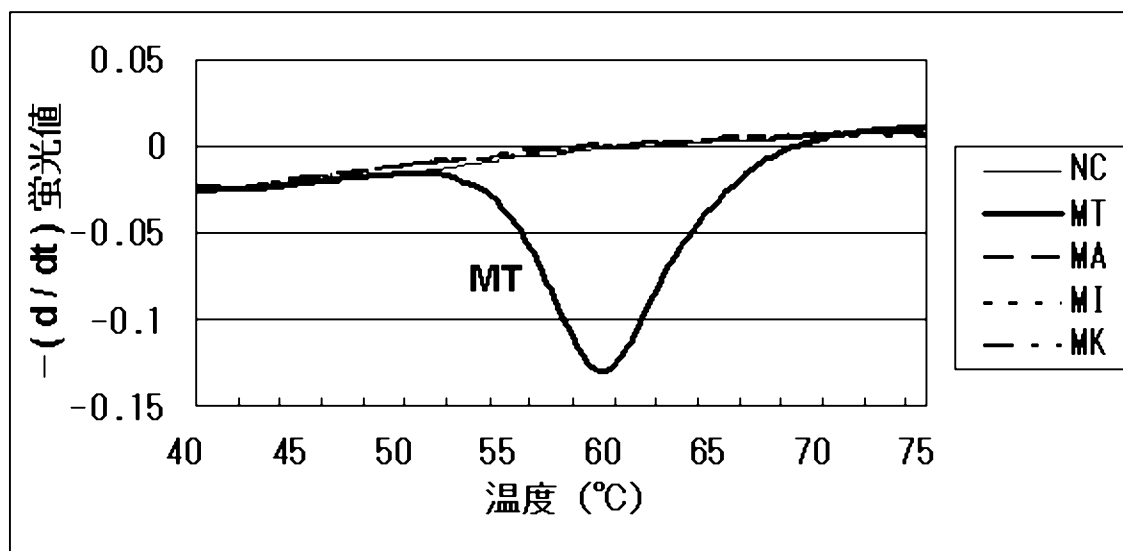
[図8]



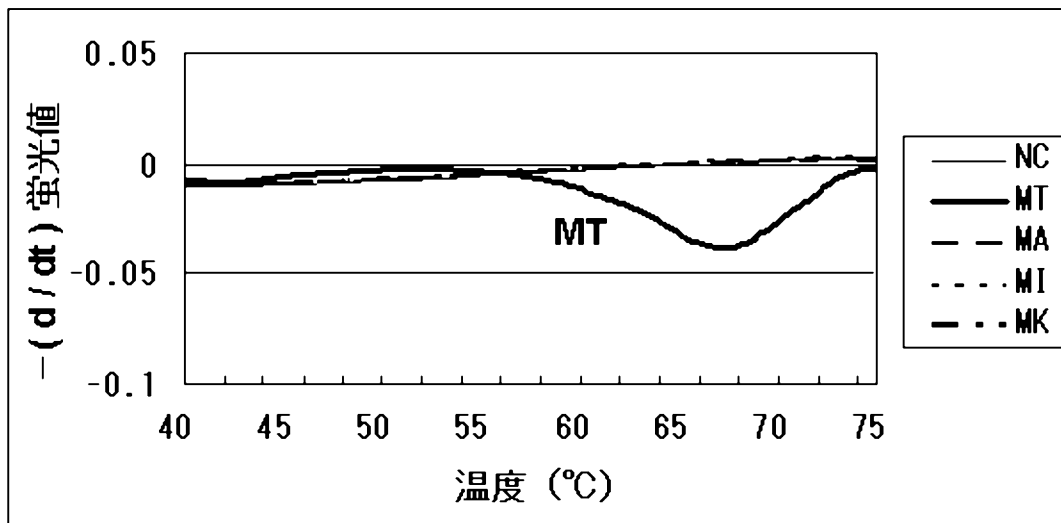
[図9]



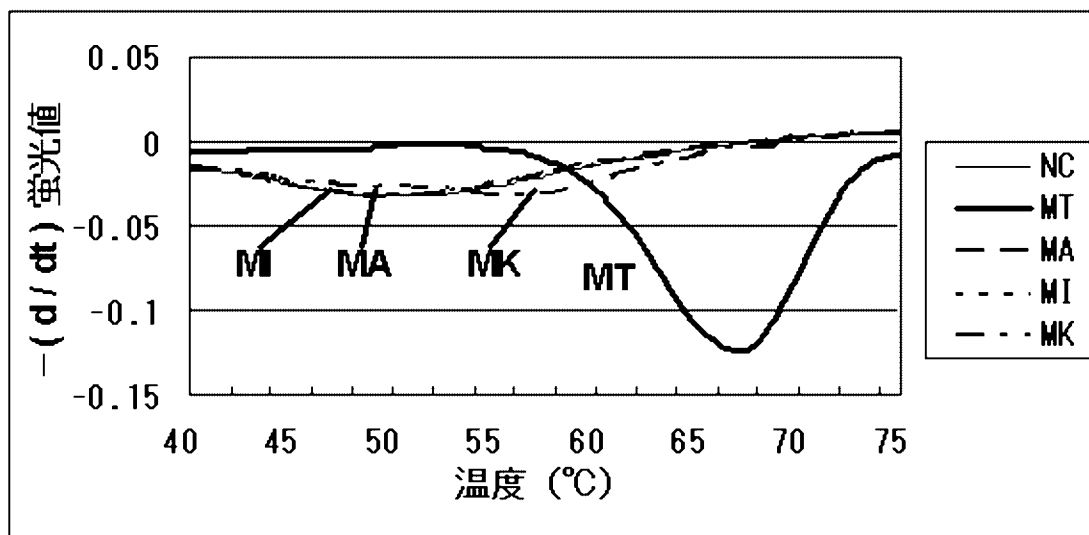
[図10]



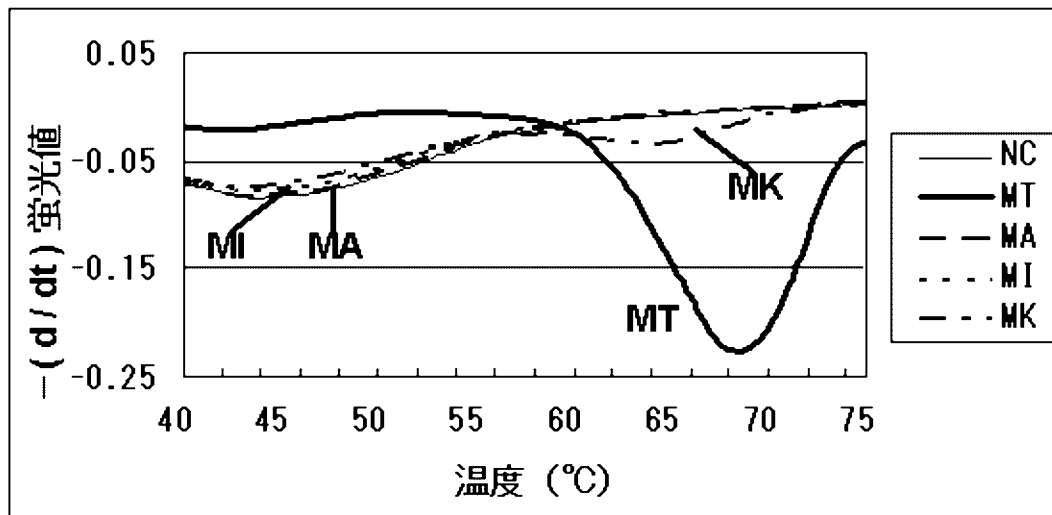
[図11]



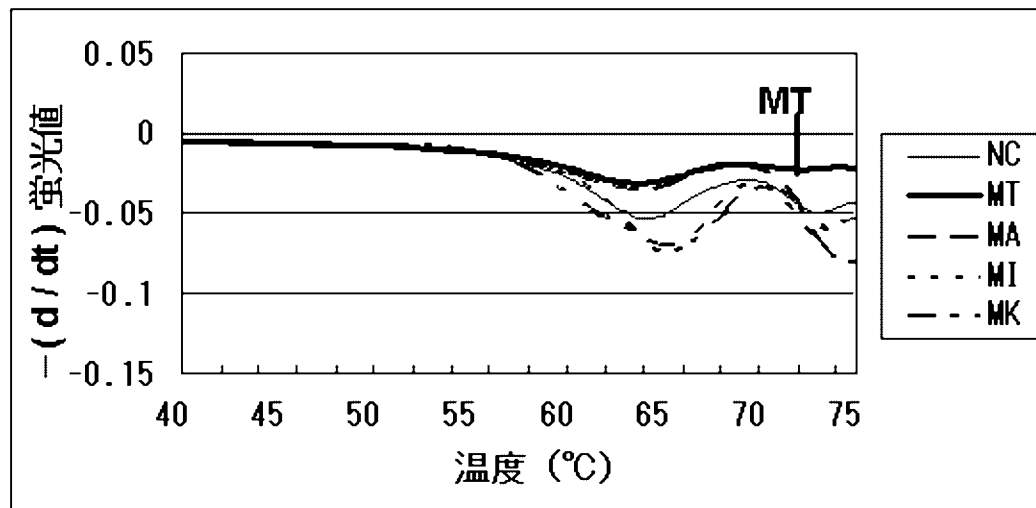
[図12]



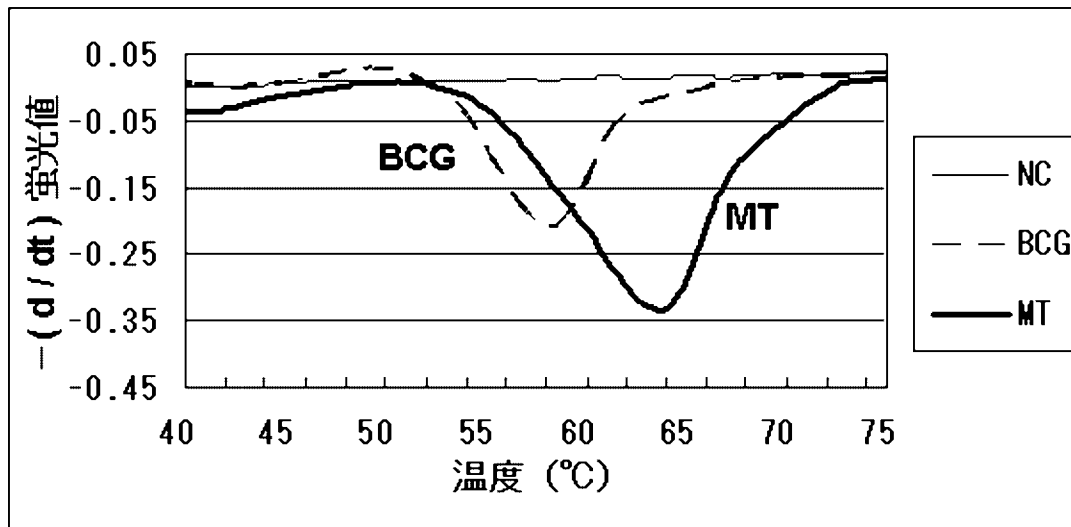
[図13]



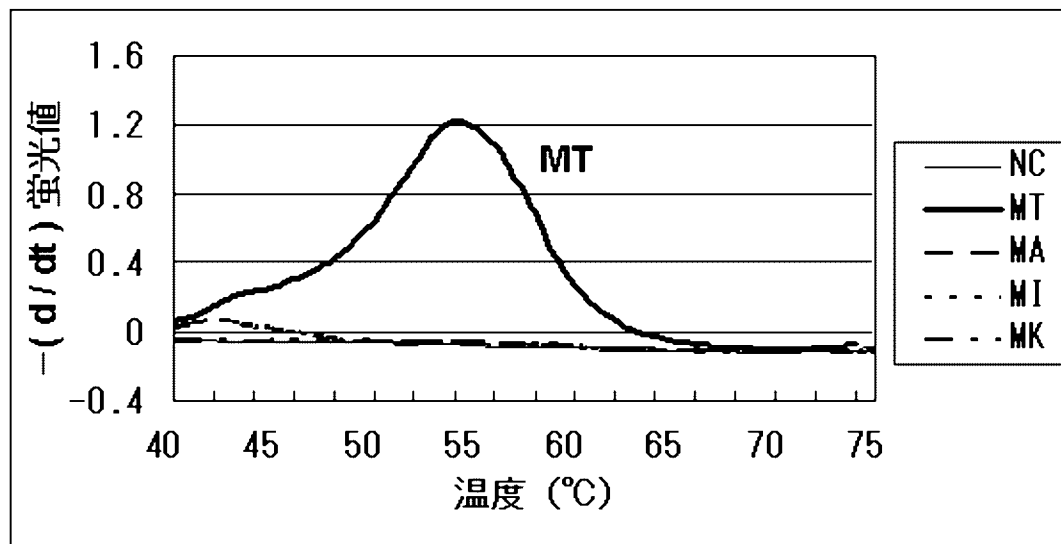
[図14]



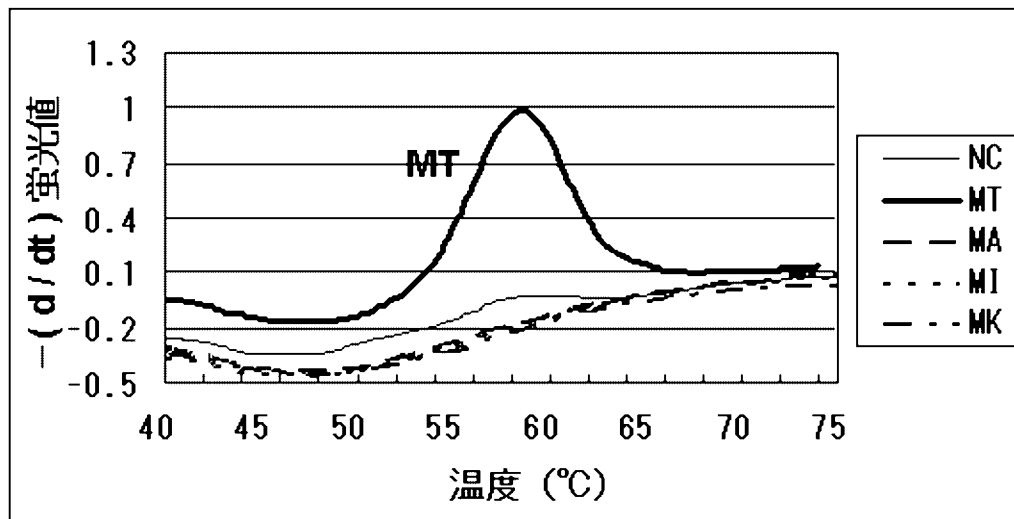
[図15]



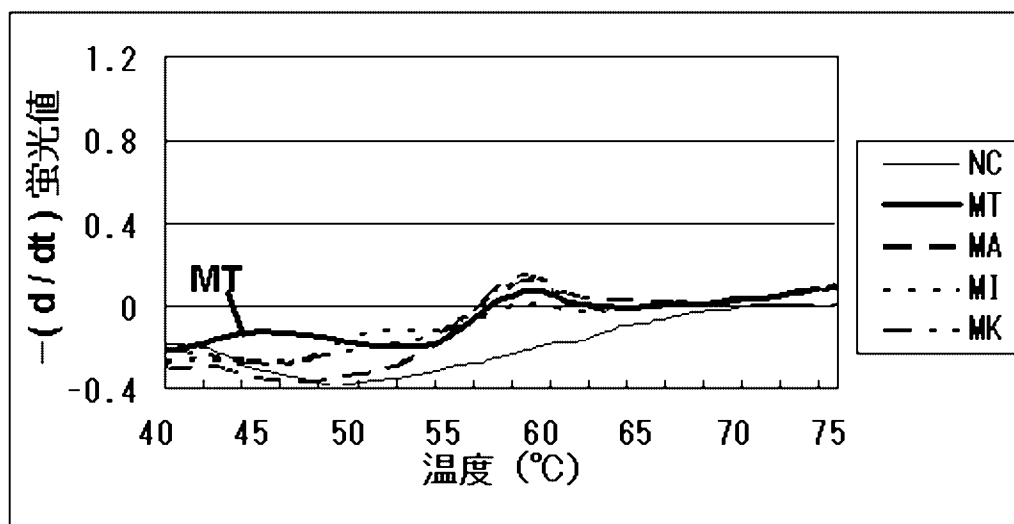
[図16]



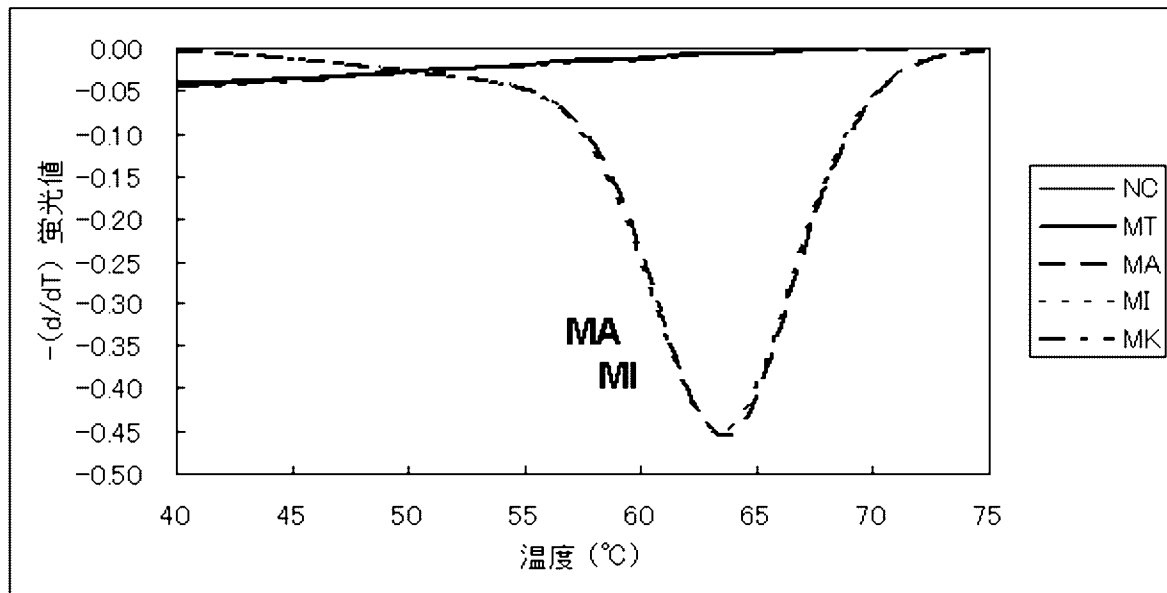
[図17]



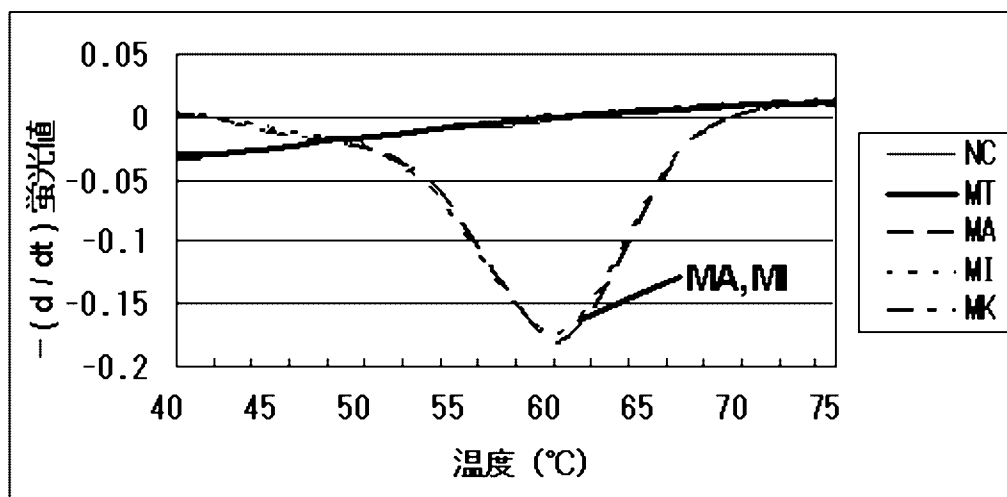
[図18]



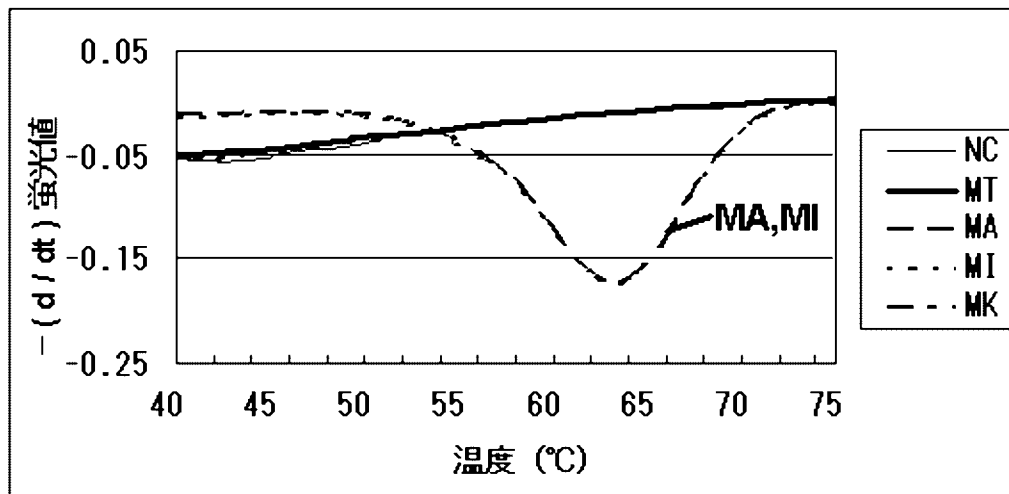
[図19]



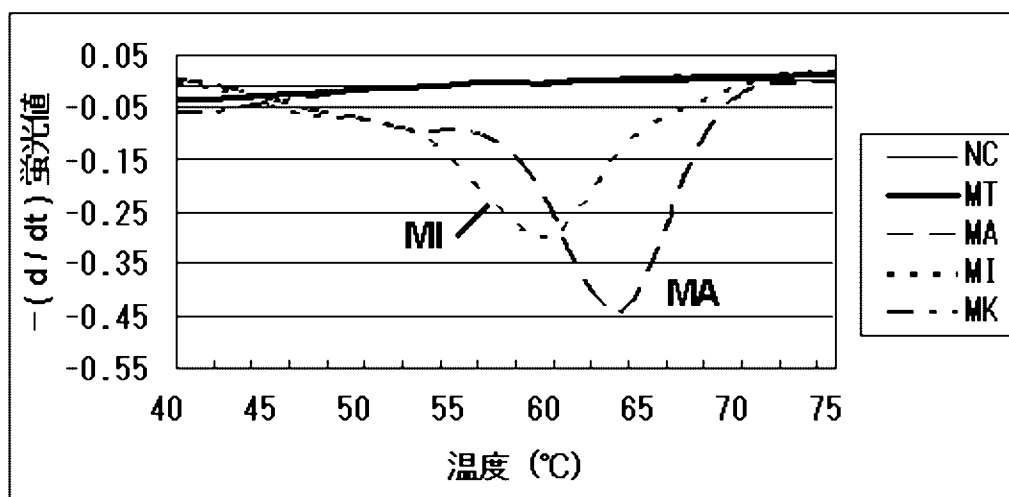
[図20]



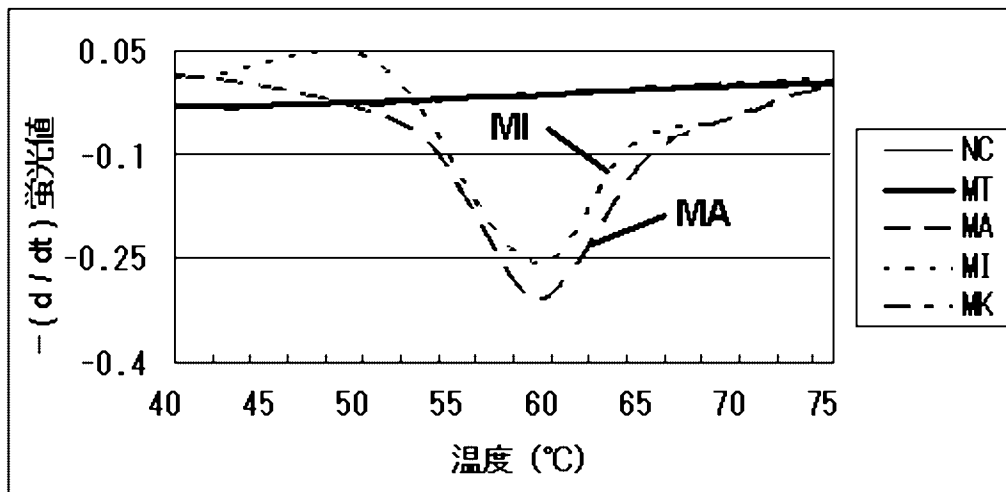
[図21]



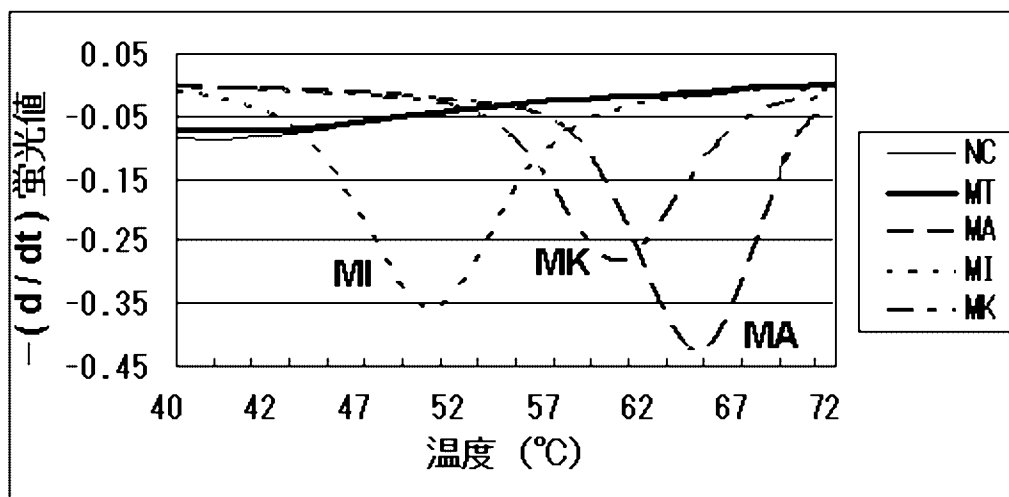
[図22]



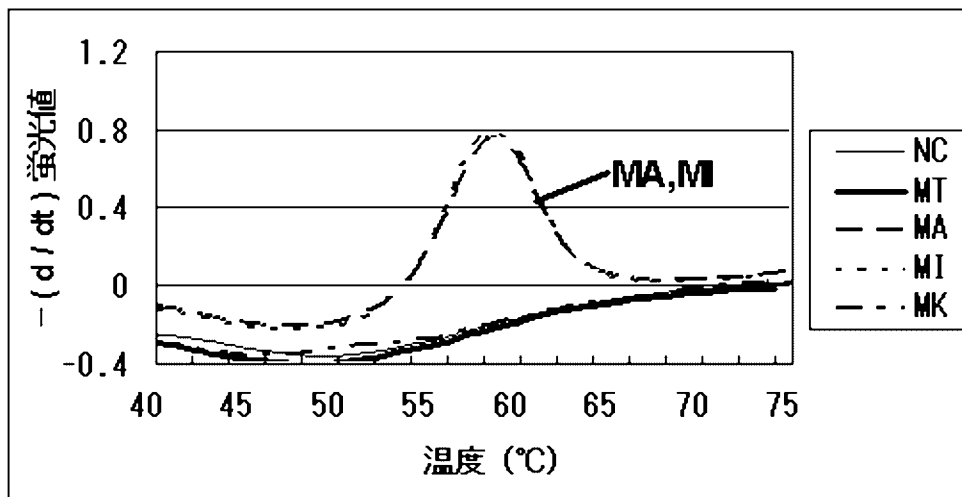
[図23]



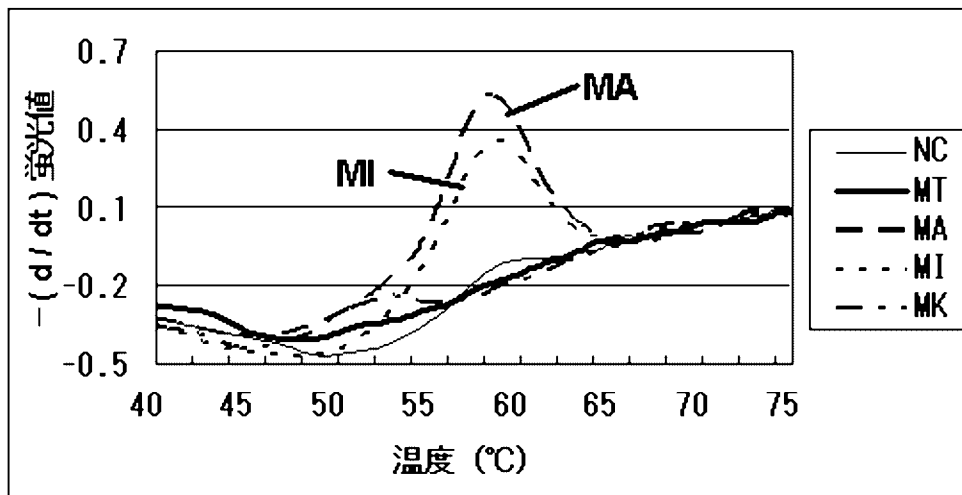
[図24]



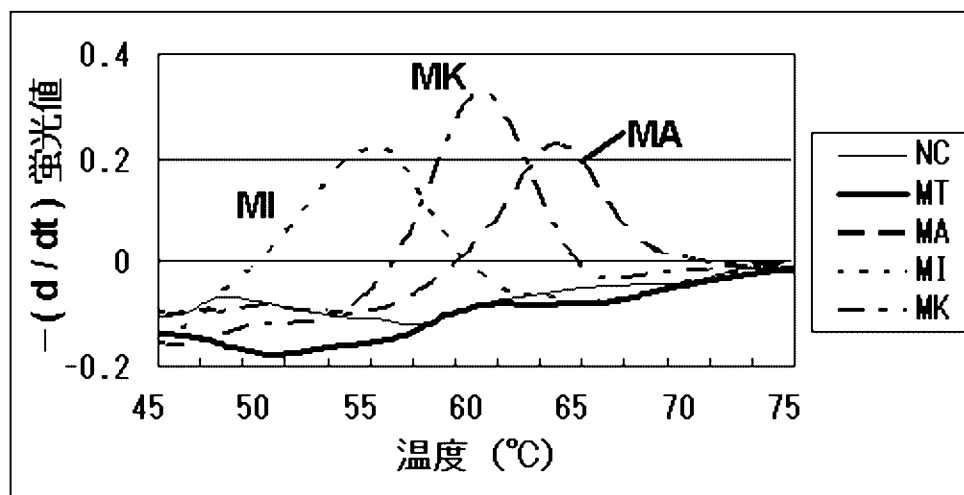
[図25]



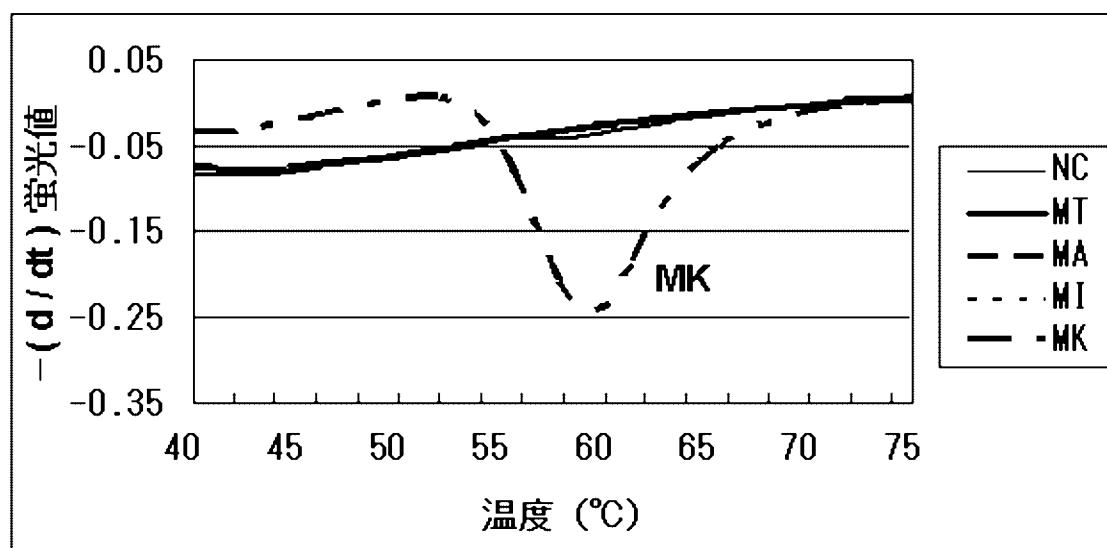
[図26]



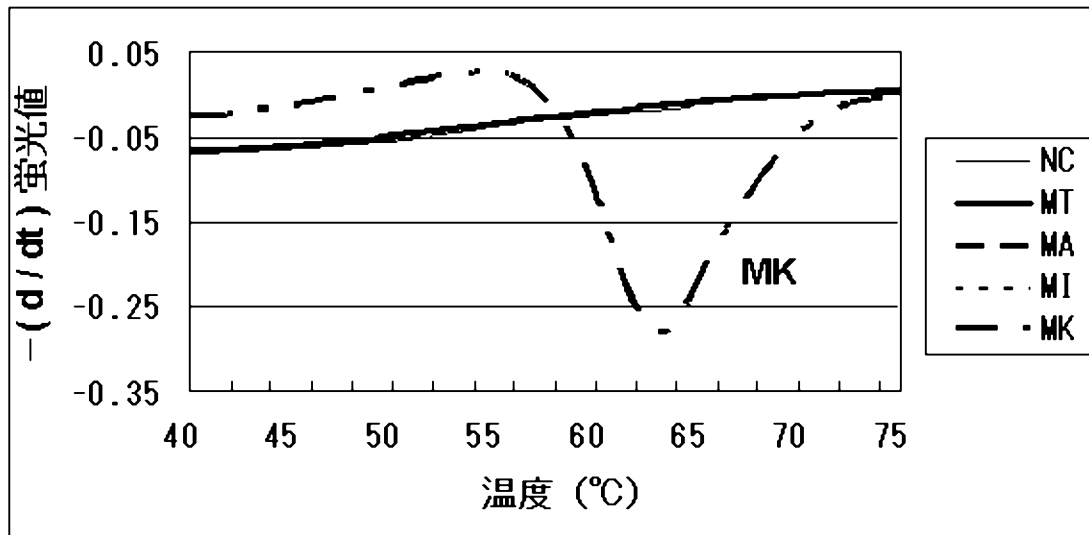
[図27]



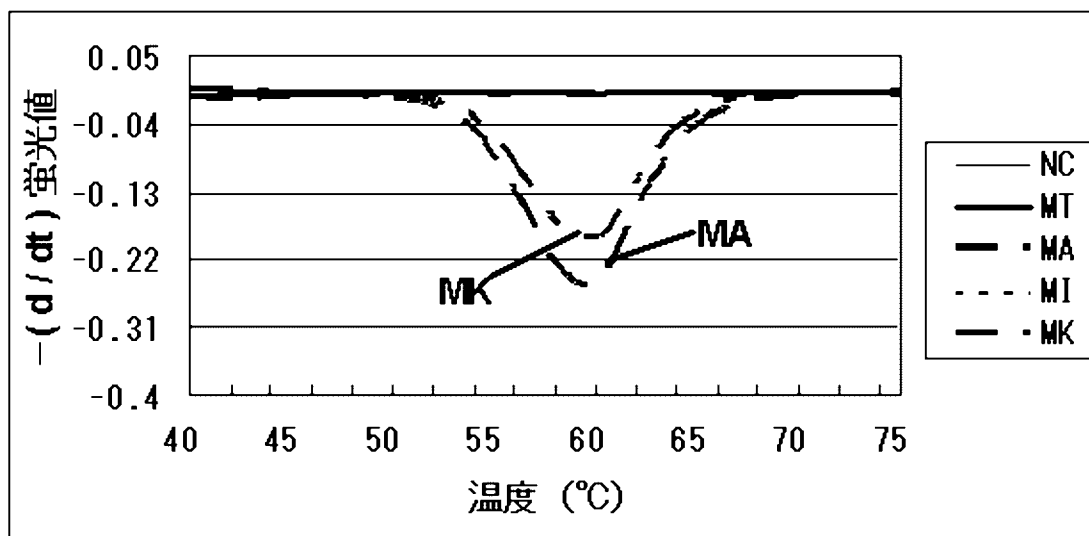
[図28]



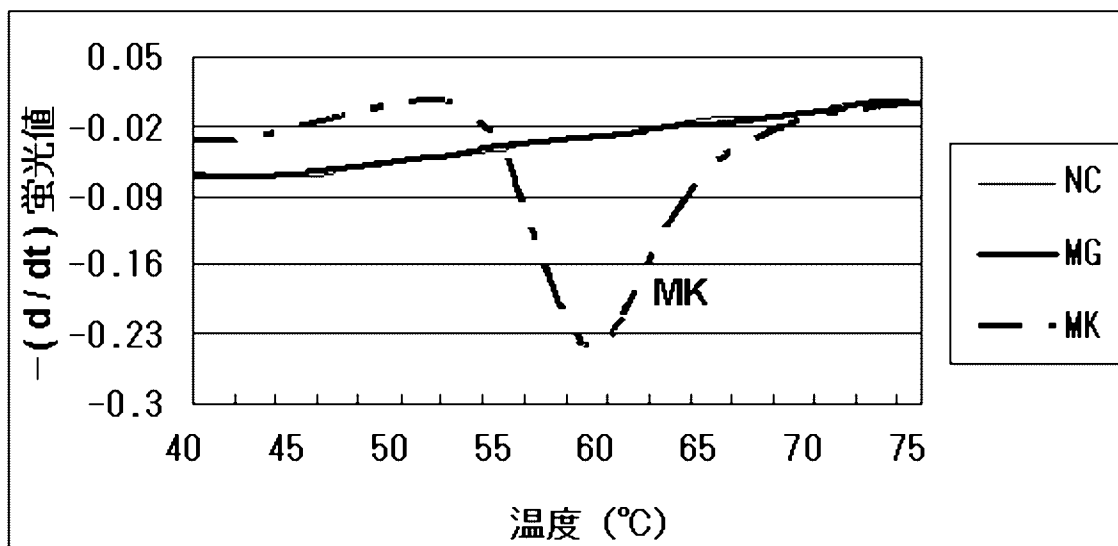
[図29]



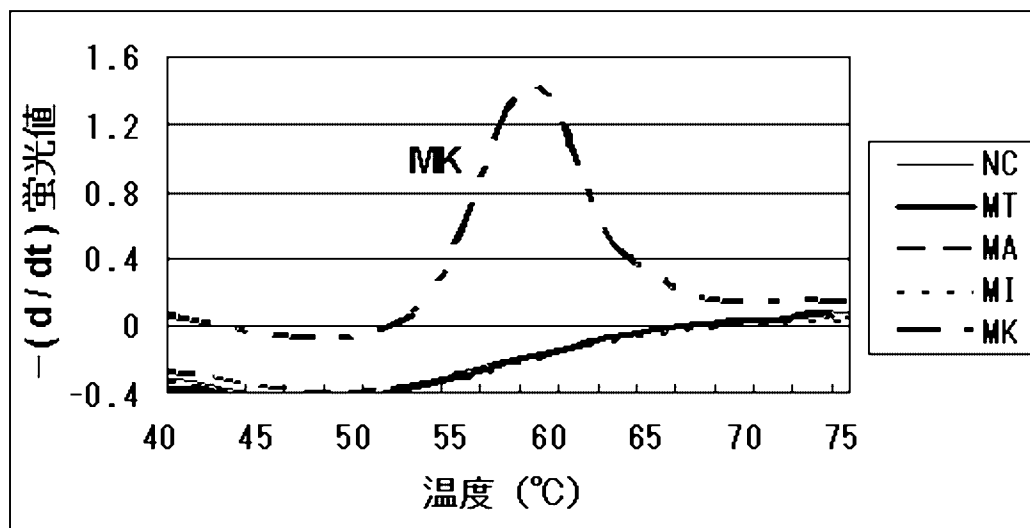
[図30]



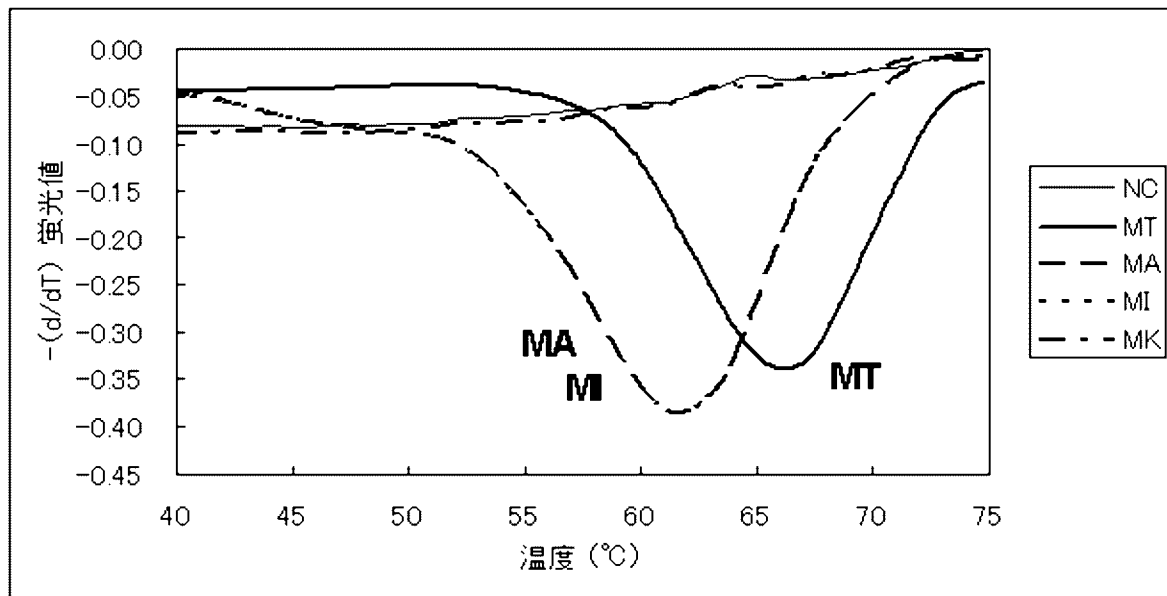
[図31]



[図32]



[図33]



[図34]

```

Ma 1: AGCTGGCGCGGATCTACACCCGGATGCCAACCCCGACAAATCCCGCCGCCGCCGAACGATTC AAGGCGGTCTCCGAGCGC 80
Mi 1: AACTGGCGCGGATCTGCACCCGGATGCCAACCCCGACAAATCCCGCCGCCGCCGAACGATTC AAGGCGGTCTCCGAGCGC 80
Mr 1: AGTTGCTCGCGGAGAAATCATCCCGACCGAAACCCGGGCAACCAAGCGCGGCCGAGGATCGCTACAAGGCGGTCTCCGAGGCA 80
Mt 1: AGTTGCGCGCGGACCTGCATCCCGACCGGAACCCGGGCAACCCGGGCCGCCGCCGAACGCTTC AAGGCGGTTCGAGGCGC 80
* . ** . . . . . ** . . . . . ** . . . . . ** . . . . . ** . . . . . ** . . . . . ** . . . . . ** . . . . .

Ma 81: CACAACGTGTGTGTCGACCCCGGCCAAGCGCAAGGAATACGACGAACCCGAGGCTTTTCCCGGAGCGGTTCGCGCG 160
Mi 81: CACAACGTGTGTGTCGATCCGCGCAAGCGCAAGGAATACGACGAACCCGAGGCTTTTCCCGGCGCGGTTCGCGCG 160
Mr 81: AAAGAAGTGCTCACCGATCCGCGCAAGCGCAAGGAATACGACGAACCCGCGGCTTTTCCCGGCGCGGTTCGCGCG 160
Mt 81: CATAACGTGCTGTGTCGATCCGCGCAAGCGCAAGGAGTACGACGAACCCGCGGCTTTTCCCGGCGCGGTTCGCGCG 160
* . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

領域C 領域D

Ma 161: GCGCGGTTTCGACACCGGTGGTTTCGCGGCTTCAACGTCGCGCGGACCGCGCGCGGTTTCAACCTCAACC 231
Mi 161: GCGCGGTTTCGATACCGGTGGTTTCGCGGCTTCAACGTCGCGCGGACCGCGCGCGGTTTCAACCTCAACC 231
Mr 161: TCGTAGGTTTCGACCGCGGTTCGCGGCTTTCGCGGAGCGCGCTACGCGCTCCGATGGCGCGGAGTTC AACTCAACC 240
Mt 161: CCGTCGTTTCGACACCGGTTCGCGGCTTTCGCGGCTTTCGCGGTCGTTGACACCGCGCGGAGTTC AACTCAACC 240
* . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

領域E

Ma 232: ATTTGTTTCGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCACCAACATCGCGGACCTGTTTCGCGGCTTTCGCGCGGCTTCGCGC 311
Mi 232: ATCTGTTTCGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCACCAACATCGCGGACCTGTTTCGCGGATTTTCGCGCGGCGCGCGC 311
Mr 241: ATTTGTTTCGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGAACCAATATCGGTGACTTGTTCGCGGCTTTCGCGCGGCGCGCGC 320
Mt 241: ACTTGTTCGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGTACCACCATCGGTGACTTGTTCGCGGCTTTCGCGGCGCGCGCGC 320
* . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

Ma 312: GCGCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAACGACCTCGAAGACCGACCGCTGATTTTCGTCGAGGCGCGCAAGGCGT 391
Mi 312: GCGCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAACGACCTCGAAGACCGAACCCTGGAATTCGTCGAGGCGCGCAAGGCGT 391
Mr 321: GCGCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAACGATTCGAGACCGACCGCTGATTTTCGTCGAGGCGCGCAAGGCGT 400
Mt 321: GCGCGTCCGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAACGACCTCGAAGACCGACCGATTTTCGTCGAGGCGCGCAAGGCGT 400
* . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

Ma 392: GCGGATGCGGCTGCGGCTGACCGCGCGCGCGCGCGCGCAACCTGCCACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCA 471
Mi 392: GCGGATGCGGCTGCGGCTGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAACCTGCCACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCA 471
Mr 401: GCGGATGCGGCTGCGGCTGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAACCTGCCACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCA 480
Mt 401: GCGGATGCGGCTGCGGATTAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAACCTGCCACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCA 480
* . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

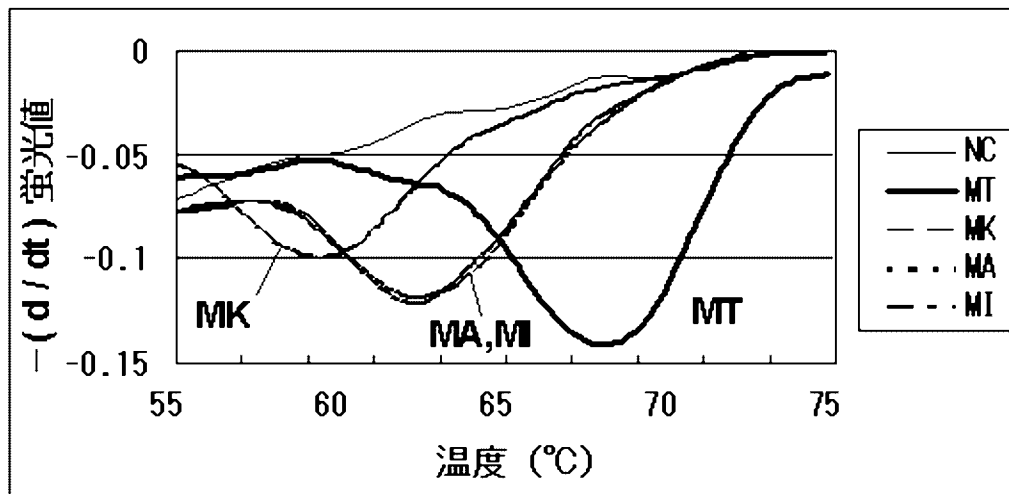
Ma 472: AGGTGTGCCCCACCTGTAAACCGCTCCGCGTAAATCAGCGCGCAACGAGGCGCTTTCGCTTCTCCGAGCCCTGCACCGAT 551
Mi 472: AGGTGTGTCCCACTGCAACCGCTCCGCGTATCAACCGCGCAACGAGGCGCGTTCGTTTCTCCGAGCCCTGCACCGAT 551
Mr 481: AGGTGTGTCCGACCTGCAACCGCGCGCGCGGTGATCAACCGCAATCAGGCGCGTTCGCTTCTCCGAGCCCTGCACCGAT 560
Mt 481: AGGTGTGTCCCACTTGCACCGCTCCGCGTATCAACCGCAATCAGGCGCGTTCGCTTCTCCGAGCCCTGCACCGAT 560
* . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

Ma 552: TCGCGGCGCGCGCGCTCGATCATCGAGCACCCCTGCGAGGAGTGCAGGCGCACCGGCTCACACCGCACCCCGCACCAT 631
Mi 552: TCGCGGCGCGCGCGCTCGATCATCGAGCACCCCTGCGAGGAGTGCAGGCGCACCGGCTCACACCGCACCCCGCACCAT 631
Mr 561: TCGCGGCGTACCGCTCGATCATCGAGCACCCCTGTGATGAGTGCAGGCGCACCGGCTCACACCGTACCCCGCACCAT 640
Mt 561: TCGCGAGGTACCGCTCGATCATCGAGCACCCCTGCGAGGAGTGCAGGCGCACCGGCTCACACCGCACCCCGCACCAT 640
* . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

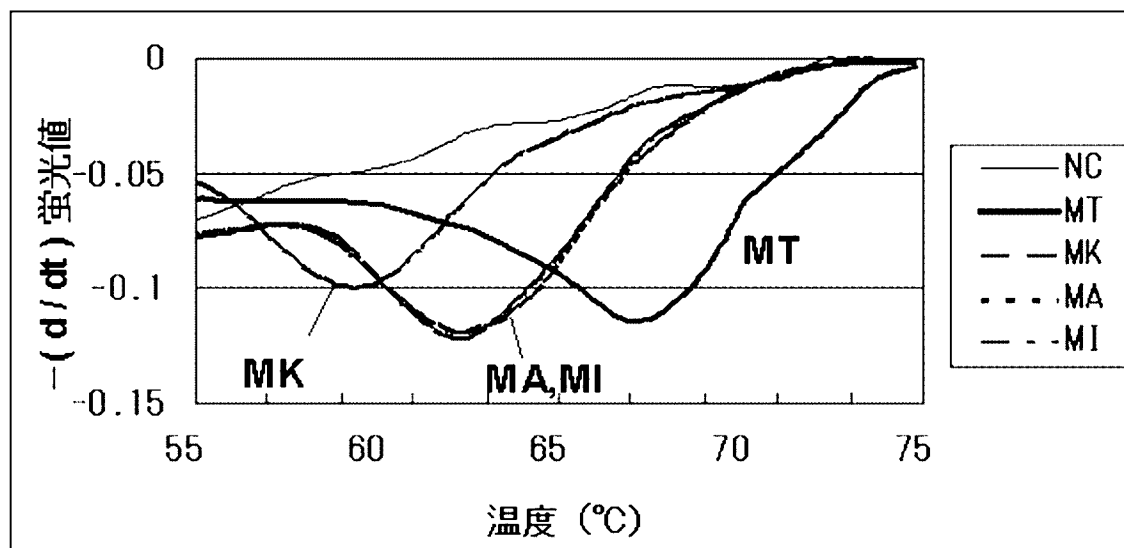
Ma 632: CAACGTGCGGATCCCGCGCGCGCT 655
Mi 632: CAACGTGCGGATCCCGCGCGCGCT 655
Mr 641: CAACGTGCGGATCCCGCGCGCGCT 664
Mt 641: CAACGTGCGGATCCCGCGCGGCT 664
* . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

```

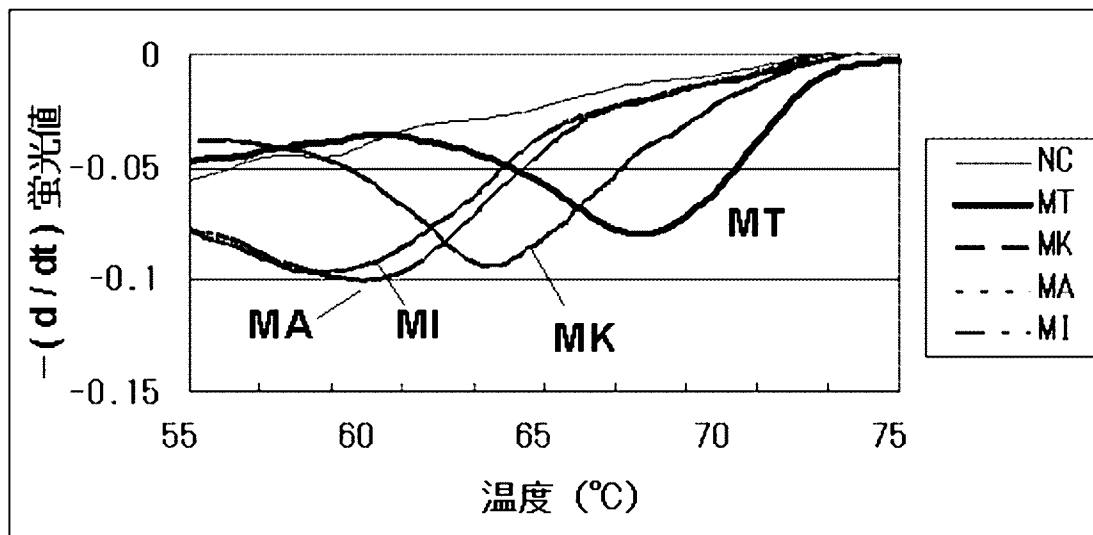
[図35]



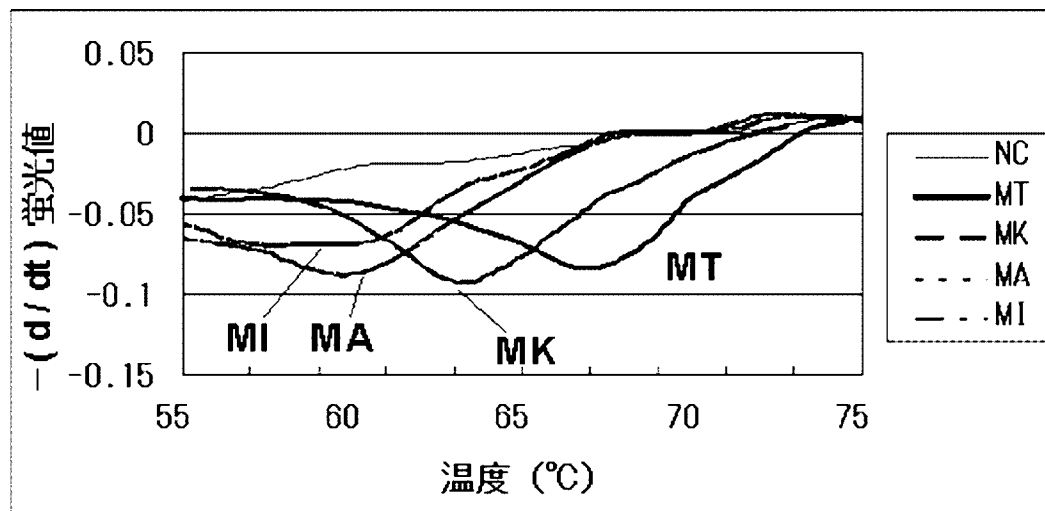
[図36]



[図37]



[図38]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, C12Q1/04(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)

C12N15/00-15/90, C12Q1/04, C12Q1/68

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII),
Igaku · Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	M. tuberculosis dnaJ gene. [online]. 19-OCT-2006. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION X06422, VERSION X06422.1 GI:44591, [Retrieved on 2008-07-30]. Retrieved from the internet: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?44591:EMBL:10468460>	$\frac{1}{4-5, 10-14}$
Y	STEWART, Graham R., et al., Analysis of the function of mycobacterial DnaJ proteins by overexpression and microarray profiling., Tuberculosis, 2004, Vol.84, No.3-4, pages 180-187	4-5, 10-14
Y	Makiko NODA et al., "Mycobacterium-zoku Kin no dnaJ Hairetsu ni Motozuku Keito Kaiseki", Japanese journal of bacteriology. 2006, Vol.61, No.1, page 136 (lecture No.:III-E-8)	4-5, 10-14

☒ 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
01 October, 2008 (01.10.08)

Date of mailing of the international search report
14 October, 2008 (14.10.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062479

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Makiko NODA et al., "Kosankin no Taso Idenshi Kaiseki kara Mita Kinshukan no Idenshi Hairetsu no Takei", Japanese journal of bacteriology. 2007 Feb, Vol.62, No.1, page 53 (lecture No.: WS2-3)	4-5, 10-14
Y	JP 09-511658 A (Becton Dickinson and Co.), 25 November, 1997 (25.11.97), Full text & WO 1997/008340 A1 & AU 9667156 A & FI 9701802 A & EP 787210 A1 & BR 9606602 A & US 5681705 A & MX 9702990 A1 & KR 97707298 A & TW 349123 A & AU 710387 B & CA 2203545 C & JP 3134940 B2 & JP 2001-103986 A & MX 201737 B & EP 787210 B1 & DE 69627625 E & KR 434244 B	4-5, 10-14
Y	JP 04-036199 A (Iatron Laboratories, Inc.), 06 February, 1992 (06.02.92), Full text & JP 2966478 B2	4-5, 10-14
Y	JP 10-323189 A (Toyobo Co., Ltd.), 08 December, 1998 (08.12.98), Full text (Family: none)	4-5, 10-14
Y	JP 2001-286300 A (Japan Bioindustry Association et al.), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text & JP 3437816 B2 & JP 2003-334078 A & JP 2004-305219 A & JP 3985959 B2	4-5, 10-14
A	COLE, S. T., et al., Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence., Nature, 1998, Vol.393, No.6685, pages 537-544	4-5, 10-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062479

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Where a group of inventions is claimed in one and the same international application, the requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1) shall be fulfilled only when there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical feature" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2). The determination of unity of inventions shall be made without regard to whether a group of inventions are claimed in separate claims or as alternatives within a single claim (PCT Rule 13.3). (continued to the extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 4-5, 10-14 (parts relating to SEQ ID NOS: 1-2)

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The oligonucleotides respectively depicted in SEQ ID NOs: 1-2, SEQ ID NOs: 36-37 and SEQ ID NOs: 55-56 recited in claims 1-14 share no common chemical structure or function, and only one common matter among the oligonucleotides is a fact that they are originated from dnaJ1 gene in an acid-fast bacterium.

However, a nucleic acid originated from dnaJ1 gene in a specific microorganism belonging to the genus Mycobacterium (which is a microorganism belonging to the group of acid-fast bacteria) is already disclosed in Documents 1-6 (dnaJ gene in Documents 1-6 is regarded as dnaJ1 gene). Therefore, the common matter cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence.

Thus, there is no other common matter that can be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence among the inventions relating to the oligonucleotides respectively depicted in SEQ ID NOs: 1-2, SEQ ID NOs: 36-37 and SEQ ID NOs: 55-56 recited in claims 1-14.

Therefore, these inventions cannot be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and are considered to be three groups of inventions relating to the oligonucleotides depicted in SEQ ID NOs: 1-2, SEQ ID NOs: 36-37 and SEQ ID NOs: 55-56, respectively.

Document 1: M. tuberculosis dnaJ gene. [online]. 19-OCT-2006. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION X06422, VERSION X06422.1 GI:44591, [Retrieved on 2008-07-30]. Retrieved from the internet: <URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?44591:EMBL:10468460>>

Document 2: STEWART, Graham R., et al., Analysis of the function of mycobacterial DnaJ proteins by overexpression and microarray profiling., Tuberculosis, 2004, Vol.84, No.3-4, pages 180-187

Document 3: Makiko NODA et al., "Mycobacterium-zoku Kin no dnaJ Hairetsu ni Motozuku Keito Kaiseki", Japanese journal of bacteriology. 2006, Vol.61, No.1, page 136 (lecture No.: III-E-8)

Document 4: Makiko NODA et al., "Kosankin no Taso Idenshi Kaiseki kara Mita Kinshukan no Idenshi Hairetsu no Tagata", Japanese journal of bacteriology. 2007 Feb, Vol.62, No.1, page 53 (lecture No.: WS2-3)

Document 5: JP 09-511658 A (Becton Dickinson and Co.), 25 November, 1997 (25.11.97), full text

Document 6: JP 04-036199 A (Iatron Laboratories, Inc.), 06 February, 1992 (06.02.92), full text

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/04(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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12Q1/04, 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

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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース

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 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	M. tuberculosis dnaJ gene. [online]. 19-OCT-2006. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION X06422, VERSION X06422.1 GI:44591, [Retrieved on 2008-07-30]. Retrieved from the internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?44591:EMBL:10468460 >	<u>1</u> 4-5, 10-14
Y	STEWART, Graham R., et al., Analysis of the function of mycobacterial DnaJ proteins by overexpression and microarray profiling., Tuberculosis, 2004, Vol.84, No.3-4, pages 180-187	4-5, 10-14

☒ 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

0 1 . 1 0 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

1 4 . 1 0 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

清水 晋治

4 B

3 5 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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 請求の範囲の番号
Y	野田万希子 他, Mycobacterium 属菌の dnaJ 配列に基づく系統解析, 日本細菌学雑誌. 2006, 第 61 巻, 第 1 号, p.136(講演番号:III-E-8)	4-5, 10-14
Y	野田万希子 他, 抗酸菌の多相遺伝子解析からみた菌種間の遺伝子配列の多型, 日本細菌学雑誌. 2007 Feb, 第 62 巻, 第 1 号, p.53(講演番号:WS2-3)	4-5, 10-14
Y	JP 09-511658 A (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー)1997.11.25, 全文 & WO 1997/008340 A1 & AU 9667156 A & FI 9701802 A & EP 787210 A1 & BR 9606602 A & US 5681705 A & MX 9702990 A1 & KR 97707298 A & TW 349123 A & AU 710387 B & CA 2203545 C & JP 3134940 B2 & JP 2001-103986 A & MX 201737 B & EP 787210 B1 & DE 69627625 E & KR 434244 B	4-5, 10-14
Y	JP 04-036199 A (株式会社ヤトロン)1992.02.06, 全文 & JP 2966478 B2	4-5, 10-14
Y	JP 10-323189 A (東洋紡績株式会社)1998.12.08, 全文 (ファミリーなし)	4-5, 10-14
Y	JP 2001-286300 A (財団法人バイオインダストリー協会 外 2 名)2001.10.16, 全文 & JP 3437816 B2 & JP 2003-334078 A & JP 2004-305219 A & JP 3985959 B2	4-5, 10-14
A	COLE, S. T., et al., Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence., Nature, 1998, Vol.393, No.6685, pages 537-544	4-5, 10-14

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件（PCT規則13.1）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（PCT規則13.2）。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる（PCT規則13.3）。

（特別ページに続く）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1, 4-5, 10-14（配列番号1-2の部分）

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求の範囲 1-14 に記載された配列番号 1-2、配列番号 36-37、配列番号 55-56 で示されるオリゴヌクレオチドは、共通の化学構造や機能を有するものでなく、抗酸菌の dnaJ 遺伝子に由来することにおいてのみ共通する。

しかしながら、抗酸菌に属する微生物であるマイコバクテリウム属の特定の微生物における dnaJ 遺伝子由来の核酸については、文献 1-6 に記載されているように既に関示されていたのだから（文献 1-6 における dnaJ 遺伝子は dnaJ 遺伝子と認める。）、当該事項は PCT 規則 13.2 の第 2 文の意味において特別な技術的特徴ではない。

そうすると、請求の範囲 1-14 に記載された、配列番号 1-2、配列番号 36-37、配列番号 55-56 のそれぞれで示されるオリゴヌクレオチドに関する発明の間には、PCT 規則 13.2 の第 2 文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

よって、これら一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、配列番号 1-2、配列番号 36-37、配列番号 55-56 のそれぞれで示されるオリゴヌクレオチドに関する 3 個の発明からなる発明群であると認める。

文献 1 : M. tuberculosis dnaJ gene. [online]. 19-OCT-2006. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION X06422, VERSION X06422.1 GI:44591, [Retrieved on 2008-07-30].

Retrieved from the internet:

<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?44591:EMBL:10468460>>

文献 2 : STEWART, Graham R., et al.,
Analysis of the function of mycobacterial DnaJ proteins by overexpression and microarray profiling.,
Tuberculosis, 2004, Vol.84, No.3-4, pages 180-187

文献 3 : 野田万希子 他,
Mycobacterium 属菌の dnaJ 配列に基づく系統解析,
日本細菌学雑誌. 2006, 第 61 巻, 第 1 号, p.136(講演番号:III-E-8)

文献 4 : 野田万希子 他,
抗酸菌の多相遺伝子解析からみた菌種間の遺伝子配列の多型,
日本細菌学雑誌. 2007 Feb, 第 62 巻, 第 1 号, p.53(講演番号:WS2-3)

文献 5 : JP 09-511658 A(ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー)1997.11.25, 全文

文献 6 : JP 04-036199 A(株式会社ヤマトロン)1992.02.06, 全文