

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6704565号
(P6704565)

(45) 発行日 令和2年6月3日(2020.6.3)

(24) 登録日 令和2年5月15日(2020.5.15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q	1/689	(2018.01)	C 1 2 Q	1/689	Z N A Z
C 1 2 Q	1/6844	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z
C 1 2 Q	1/6837	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6837	Z
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	B

請求項の数 15 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-547698 (P2016-547698)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月7日(2015.9.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/004535
 (87) 国際公開番号 W02016/038877
 (87) 国際公開日 平成28年3月17日(2016.3.17)
 審査請求日 平成30年9月3日(2018.9.3)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-184379 (P2014-184379)
 (32) 優先日 平成26年9月10日(2014.9.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73) 特許権者 504179255
 国立大学法人 東京医科歯科大学
 東京都文京区湯島1-5-45
 (73) 特許権者 501005092
 株式会社GCリンフォテック
 東京都江東区冬木18番4号
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (74) 代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次
 (74) 代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作
 (74) 代理人 100188352
 弁理士 松田 一弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイコプラズマを検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

マルチプレックスリアルタイム定量PCRにより被検試料中のマイコプラズマを検出するためのフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットであって、

前記セットが、1種又は2種以上のフォワードプライマーと、2種又は3種以上のリバースプライマーと、1種又は2種以上のプローブとを含み、

前記プローブが、前記フォワードプライマー及び前記リバースプライマーによる増幅産物を特異的に検出するためのプローブであり、

前記フォワードプライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列のうち、17個~30個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号1のヌクレオチド番号14~24のヌクレオチド配列(caaggtatccs)を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであり、前記リバースプライマーが、配列番号14、17~20の1種又は2種以上のヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであり、前記プローブが、配列番号33のヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、セット。

【請求項2】

1種又は2種以上のフォワードプライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列のうち、17個~30個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号1

のヌクレオチド番号 14 ~ 27 のヌクレオチド配列 (caaggatccstac) を含むヌクレオチド配列からなる 1 種又は 2 種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 に記載のセット。

【請求項 3】

1 種又は 2 種以上のフォワードプライマーが、以下の (A) 及び (B) からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のセット：

(A)：配列番号 2 のヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 30 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号 2 のヌクレオチド番号 14 ~ 24 のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマー：

10

(B)：配列番号 3 のヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 30 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号 3 のヌクレオチド番号 14 ~ 24 のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマー：

【請求項 4】

2 種のフォワードプライマーを含み、前記 2 種のフォワードプライマーが、配列番号 4 ~ 7、11 及び 12 から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 13 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のセット。

20

【請求項 5】

リバースプライマーの少なくとも 1 種が、配列番号 14 のヌクレオチド番号 3 ~ 20 のヌクレオチド配列 (wsccaaggcatccacah) を含むオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のセット。

【請求項 6】

2 種又は 3 種以上のリバースプライマーが、以下の (C1)、(C2-1)、(C2-2)、(C2-3)、(D)、(E1)、(E2)、(F) 及び (G) から選択される 2 種又は 3 種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のセット：

(C1)：配列番号 15 のヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 26 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

30

(C2-1)：配列番号 16 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 の m が a で、ヌクレオチド番号 22 の w が a であるヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 26 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(C2-2)：配列番号 16 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 の m が c で、ヌクレオチド番号 22 の w が a であるヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 26 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(C2-3)：配列番号 16 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 の m が a で、ヌクレオチド番号 22 の w が t であるヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 26 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

40

(D)：配列番号 17 のヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 26 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(E1)：配列番号 18 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 2 の s が g であり、ヌクレオチド番号 4 及び 9 の r が g であるヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 24 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(E2) 配列番号 18 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 2 の s が c であり

50

、ヌクレオチド番号4及び9のrがaであるヌクレオチド配列のうち、17個～24個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(F)：配列番号19のヌクレオチド配列のうち、17個～25個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(G)：配列番号20のヌクレオチド配列のうち、17個～23個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

【請求項7】

2種又は3種以上のリバースプライマーが、以下のオリゴヌクレオチドから選択される2種又は3種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のセット：

配列番号21のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号22のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号24のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号25のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号26のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号27のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号17のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号28のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号29のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号19のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

配列番号20のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項8】

プローブが、配列番号33のヌクレオチド番号7～16のヌクレオチド配列 (sggrtgga ty) 又はその相補的なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のセット。

【請求項9】

1種又は2種以上のプローブが、以下の(H)～(L)から選択される1種又は2種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載のセット：

(H) 配列番号34のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(I) 配列番号35のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(J) 配列番号36のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(K) 配列番号37のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(L) 配列番号38のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

【請求項10】

1種又は2種以上のプローブが、以下の(h)～(l)から選択される1種又は2種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載のセット：

(h) 配列番号39のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

- (i) 配列番号 4 0 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :
- (j) 配列番号 4 1 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :
- (k) 配列番号 4 2 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :
- (l) 配列番号 4 3 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 1】

プローブが、5'末端を蛍光物質で、3'末端を消光物質で修飾されているTaqMan（登録商標）プローブであることを特徴とする請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載のセット。

【請求項 1 2】

マルチプレックスリアルタイム定量PCRにより被検試料中のマイコプラズマを検出するためのキットであって、

前記キットが、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載のフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットと、固体支持体とを備え、前記プローブが前記固体支持体上に固定されていることを特徴とする、キット。

【請求項 1 3】

マルチプレックスリアルタイム定量PCRにより被検試料中のマイコプラズマを検出する方法であって、

(a) 被検試料からDNAを抽出する工程 a :

(b) 上記工程 a で抽出したDNAを鋳型とし、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載のセット又は請求項 1 2 に記載のキットにおけるフォワードプライマー及びリバースプライマーを用いてマルチプレックスリアルタイム定量PCRを行う工程 b : 及び、

(c) 請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載のセット又は請求項 1 2 に記載のキットにおけるプローブを用いて、上記工程 b におけるマルチプレックスリアルタイム定量PCRによる増幅産物を検出することにより、前記被検試料中にマイコプラズマが存在しているか否かを検出する工程 c :

を含む方法。

【請求項 1 4】

工程 c における、マルチプレックスリアルタイム定量PCRによる増幅産物の検出が、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載のセット又は請求項 1 2 に記載のキットにおけるプローブとの特異的なハイブリダイゼーションが生じるか否かを検出することによりなされることを特徴とする請求項 1 3 に記載のマイコプラズマを検出する方法。

【請求項 1 5】

マイコプラズマ・アルギニニ (*Mycoplasma arginini*)、マイコプラズマ・ブカーレ (*Mycoplasma buccale*)、マイコプラズマ・ファウシウム (*Mycoplasma faucium*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・オラーレ (*Mycoplasma orale*)、マイコプラズマ・サリバリウム (*Mycoplasma salivarium*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、マイコプラズマ・リポフィラム (*Mycoplasma lipophilum*)、マイコプラズマ・プリマタム (*Mycoplasma primatum*)、マイコプラズマ・ハイオリニス (*Mycoplasma hyorhinis*)、マイコプラズマ・シノビアエ (*Mycoplasma synoviae*)、マイコプラズマ・ゲニタリウム (*Mycoplasma genitalium*)、マイコプラズマ・ニューモニアエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、アコレプラズマ・レイドラウィイ (*Acholeplasma laidlawii*)、ウレアプラズマ・ウレアリティカム (*Ureaplasma urealyticum*)、マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) 及びスピロプラズマ・シトリ (*Spiroplasma citri*) からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のマイコプラズマの検出限界感度が 1 0 c f u / m L 以下であることを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 に記載のマイコプラズマを検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイコプラズマを検出する方法に関し、より詳細には、より多種のマイコプラズマを、より迅速・簡便・高感度・高精度に検出できるマイコプラズマの検出方法や、

10

20

30

40

50

かかる検出のためのフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットや、かかるセットを含むキットに関する。

【背景技術】

【0002】

マイコプラズマ(Mycoplasma)は、モリクテス(Mollicutes)綱に分類される真正細菌の一属で、広義では、マイコプラズマ属の他、ウレアプラズマ(Ureaplasma)属、メソプラズマ(Mesoplasma)属、エントモプラズマ(Entomoplasma)属、スピロプラズマ(Spiroplasma)属、アコレプラズマ(Acholeplasma)属、アステロプラズマ(Asteroleplasma)属、及びサーモプラズマ(Thermoplasma)属も含めてマイコプラズマと呼ばれることもある。マイコプラズマは、自己増殖可能な最小の生物であり、現在、200種類以上の種が知られている。マイコプラズマは、一般の真正細菌に見られるペプチドグリカン細胞壁を持たないため、細胞の形状は不定形で可塑性を有している。また、マイコプラズマは大きさが約0.2~0.8µmと小さく、また、形状も不定形であるので、0.2µm程度の濾過滅菌用フィルターを通過することができる。そのため、細胞培養用培地について濾過滅菌を行っても、マイコプラズマを除去することはできず、特に一部の種のマイコプラズマは、細胞培養における微生物汚染の代表的な原因菌として知られている。

10

【0003】

マイコプラズマは、細胞壁がないため、細胞培養に通常使用されるペニシリン系、セフェム系等の抗生物質による影響を受けない。また、マイコプラズマは、他の細菌汚染物質とは異なり、培地の濁度の上昇や培養細胞の変性等の可視的な変化を引き起こすことなく細胞培養上清中で増殖する。そのため、マイコプラズマの検出方法が実施されない限り、マイコプラズマ汚染は看過され、汚染を拡大させてしまう。マイコプラズマは、細胞膜に吸着して細胞の栄養素を枯渇させ、細胞の増殖を阻害したり、遺伝子発現を変化させるため、感染した培養物からの実験結果は信頼性の低いものとなる。したがって、研究を行う際には、マイコプラズマ汚染がないことを確認することは、重要な前提となる。また、細胞の培養を伴う再生医療、細胞治療の分野では、マイコプラズマに感染した細胞を治療に用いた場合、免疫系に悪影響を与えたり、肺炎、尿道炎、関節炎を引き起こす恐れもある。したがって、生物由来医薬品の製造や、再生医療、細胞治療の現場において、マイコプラズマ否定試験は必須とされている。

20

【0004】

マイコプラズマ否定試験法として、日本薬局方の参考情報には、培養法(寒天及び液体培地法)、指標細胞を用いたDNA染色法(指標細胞培養法)、2段階PCR法、の3種類方法が提示されている。しかし、培養法には培養期間が28日と長すぎるという問題点、DNA染色法には低感度であるという問題点、2段階PCR法(Nested PCR法)には増幅産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる擬陽性が生じやすいという問題点があり、3種類のいずれの試験法も、再生医療、細胞治療の安全性試験法としては実用性が不十分であった。したがって、より実用的なマイコプラズマの検出法の開発が進められている。

30

【0005】

例えば、特許文献1には、リアルタイムPCRによりマイコプラズマの遺伝子を特異的に増幅するためのプライマー対や、該プライマー対を用いてマイコプラズマを検出する方法などが開示されている。この方法では、マイコプラズマの23SrRNA遺伝子を増幅ターゲットとしている。また、非特許文献1には、リアルタイムPCRによりマイコプラズマ等の遺伝子を特異的に増幅するためのプライマー対や、該プライマー対による増幅産物を検出するためのプローブや、該プライマー対及びプローブを用いてマイコプラズマ等を検出する方法などが開示されている。この方法では、マイコプラズマ等のtuf遺伝子を増幅ターゲットとしている。さらに、特許文献2には、LAM(Loop-mediated isothermal amplification)法という特殊な遺伝子増幅法により、マイコプラズマの遺伝子を特異的に増幅するためのプライマーセットや、該プライマーセットによる増幅産物を検出するためのプローブや、該プライマーセット及びプローブを用いてマイコプラズマを検出

40

50

する方法などが開示されている。この方法では、マイコプラズマの16S rRNA遺伝子を増幅ターゲットとしている。さらに、特許文献3には、リアルタイム核酸増幅反応(リアルタイムPCR)によりマイコプラズマの遺伝子の特異的に増幅するためのプライマーを含むキットや、該プライマーを用いて細胞培養培地中のマイコプラズマを検出する方法などが開示されている。この方法では、マイコプラズマのrpoB遺伝子を増幅ターゲットとしている。これらのように、マイコプラズマの検出法については開発が進められているが、より多種のマイコプラズマを、より迅速・簡便・高感度・高精度に検出できる、より実用的なマイコプラズマ検出法が求められている。

【0006】

なお、非特許文献2には、マイコプラズマを検出するための旧来の2段階PCR法に用いるプライマーではあるが、マイコプラズマの16S rRNA遺伝子、23S rRNA遺伝子及び両遺伝子間のスペーサー領域を増幅ターゲットとするプライマーが開示されている。しかし、旧来の2段階PCRは前述したように、増幅産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる擬陽性が生じ易いという問題があった。

【0007】

ところで、一部の種のマイコプラズマは、肺炎の原因菌ともなることが知られている。そのため、例えば特許文献4には、肺炎患者の診断に際して、PCRなどにより、マイコプラズマ・ニューモニエなどの肺炎菌類の遺伝子の特異的に増幅して該肺炎菌類を検出する方法や、該方法に用いるためのプライマーや、該方法で生じる増幅産物に相補的なプローブなどが開示されている。この方法において、マイコプラズマ・ニューモニエを検出する際の増幅ターゲットは、DnaJ1遺伝子であった。このように、マイコプラズマを原因とする肺炎を診断する目的においても、かかるマイコプラズマを、より迅速・簡便・高感度・高精度に検出できる、より実用的なマイコプラズマ検出法が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2004-305207号公報

【特許文献2】特開2012-60925号公報

【特許文献3】特開2013-515458号公報

【特許文献4】国際公開2011/122034号パンフレット

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】International Journal of Medical Microbiology (2009) 299, 291-300

【非特許文献2】Res. Microbiol. (1993) 144, 489-493

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、より多種のマイコプラズマを、より迅速・簡便・高感度・高精度に検出できるマイコプラズマの検出方法や、かかる検出のためのフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットや、キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意検討する中で、マイコプラズマに特異的な配列を有する16S rRNA遺伝子、23S rRNA遺伝子及び両遺伝子間のスペーサー領域のうち、特定の配列に対応するフォワードプライマー及びリバースプライマーと、該プライマー対による増幅産物を検出するためのプローブとの組合せを複数設計し、かかるプライマー対とプローブとの複数の組合せを用いて、マルチプレックスリアルタイム定量PCRを行ったところ、多種のマイコプラズマを、迅速・簡便・高感度及び高精度に検出することができることを見だし、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 2 】

すなわち、本発明は、

(1) マルチブラックリアルタイム定量 P C R により被検試料中のマイコプラズマを検出するためのフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットであって、

前記セットが、1種又は2種以上のフォワードプライマーと、2種又は3種以上のリバースプライマーと、1種又は2種以上のプローブとを含み、

前記プローブが、前記フォワードプライマー及び前記リバースプライマーによる増幅産物を特異的に検出するためのプローブであり、

前記フォワードプライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列のうち、17個～30個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号1のヌクレオチド番号14～24のヌクレオチド配列 (caaggtatccc) を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであり、前記リバースプライマーが、配列番号14、17～20の1種又は2種以上のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであり、前記プローブが、配列番号33のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、セットや、

(2) 1種又は2種以上のフォワードプライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列のうち、17個～30個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号1のヌクレオチド番号14～27のヌクレオチド配列 (caaggtatccctac) を含むヌクレオチド配列からなる1種又は2種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記(1) に記載のセットや、

(3) 1種又は2種以上のフォワードプライマーが、以下の(A) 及び(B) からなる群から選択される1種又は2種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記(1) 又は(2) に記載のセット :

(A) : 配列番号2のヌクレオチド配列のうち、17個～30個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号2のヌクレオチド番号14～24のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマー :

(B) : 配列番号3のヌクレオチド配列のうち、17個～30個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号3のヌクレオチド番号14～24のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマー : や、

(4) 2種のフォワードプライマーを含み、前記2種のフォワードプライマーが、配列番号4～7、11及び12から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号13のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記(1) ～(3) のいずれかに記載のセットや、

(5) リバースプライマーの少なくとも1種が、配列番号14のヌクレオチド番号3～20のヌクレオチド配列 (wsccaaggcatccacah) を含むオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記(1) ～(4) のいずれかに記載のセットや、

(6) 2種又は3種以上のリバースプライマーが、以下の(C 1)、(C 2 - 1)、(C 2 - 2)、(C 2 - 3)、(D)、(E 1)、(E 2)、(F) 及び(G) から選択される2種又は3種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記(1) ～(5) のいずれかに記載のセット :

(C 1) : 配列番号15のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(C 2 - 1) : 配列番号16のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号20のmがaで、ヌクレオチド番号22のwがaであるヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

10

20

30

40

50

(C2-2) : 配列番号16のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号20のmがcで、ヌクレオチド番号22のwがaであるヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(C2-3) : 配列番号16のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号20のmがaで、ヌクレオチド番号22のwがtであるヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(D) : 配列番号17のヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(E1) : 配列番号18のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号2のsがgであり、ヌクレオチド番号4及び9のrがgであるヌクレオチド配列のうち、17個~24個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(E2) 配列番号18のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号2のsがcであり、ヌクレオチド番号4及び9のrがaであるヌクレオチド配列のうち、17個~24個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(F) : 配列番号19のヌクレオチド配列のうち、17個~25個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(G) : 配列番号20のヌクレオチド配列のうち、17個~23個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド : や、

(7) 2種又は3種以上のリバースプライマーが、以下のオリゴヌクレオチドから選択される2種又は3種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記(1)~(6)のいずれかに記載のセット :

配列番号21のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号22のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号24のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号25のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号26のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号27のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号17のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号28のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号29のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号19のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

配列番号20のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド : や、

(8) プローブが、配列番号33のヌクレオチド番号7~16のヌクレオチド配列 (sggrtgatgaty) 又はその相補的なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記(1)~(7)のいずれかに記載のセットや、

(9) 1種又は2種以上のプローブが、以下の(H)~(L)から選択される1種又は2種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記(1)~(8)のいずれかに記載のセット :

(H) 配列番号34のヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(I) 配列番号35のヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド :

(J) 配列番号36のヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列から

10

20

30

40

50

なるオリゴヌクレオチド：

(K) 配列番号 37 のヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 26 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(L) 配列番号 38 のヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 26 個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：や、

(10) 1 種又は 2 種以上のプローブが、以下の (h) ~ (l) から選択される 1 種又は 2 種以上のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする上記 (1) ~ (9) のいずれかに記載のセット：

(h) 配列番号 39 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(i) 配列番号 40 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(j) 配列番号 41 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(k) 配列番号 42 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

(l) 配列番号 43 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：や、

(11) プローブが、5' 末端を蛍光物質で、3' 末端を消光物質で修飾されている TaqMan (登録商標) プローブであることを特徴とする上記 (1) ~ (10) のいずれかに記載のセットに関する。

【 0013 】

また、本発明は、

(12) マルチプレックスリアルタイム定量 PCR により被検試料中のマイコプラズマを検出するためのキットであって、

前記キットが、上記 (1) ~ (11) のいずれかに記載のフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットと、固体支持体とを備え、前記プローブが前記固体支持体上に固定されていることを特徴とする、キットに関する。

【 0014 】

さらに、本発明は、

(13) マルチプレックスリアルタイム定量 PCR により被検試料中のマイコプラズマを検出する方法であって、

(a) 被検試料から DNA を抽出する工程 a：

(b) 上記工程 a で抽出した DNA を鋳型とし、上記 (1) ~ (11) のいずれかに記載のセット又は上記 (12) に記載のキットにおけるフォワードプライマー及びリバースプライマーを用いてマルチプレックスリアルタイム定量 PCR を行う工程 b：及び、

(c) 上記 (1) ~ (11) のいずれかに記載のセット又は上記 (12) に記載のキットにおけるプローブを用いて、上記工程 b におけるマルチプレックスリアルタイム定量 PCR による増幅産物を検出することにより、前記被検試料中にマイコプラズマが存在しているか否かを検出する工程 c：

を含む方法や、

(14) 工程 c における、マルチプレックスリアルタイム定量 PCR による増幅産物の検出が、上記 (1) ~ (11) のいずれかに記載のセット又は上記 (12) に記載のキットにおけるプローブとの特異的なハイブリダイゼーションが生じるか否かを検出することによりなされることを特徴とする上記 (13) に記載のマイコプラズマを検出する方法や、

(15) マイコプラズマ・アルギニニ (*Mycoplasma arginini*)、マイコプラズマ・ブカール (*Mycoplasma buccale*)、マイコプラズマ・ファウシウム (*Mycoplasma faucium*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・オラーレ (*Mycoplasma orale*)、マイコプラズマ・サリバリウム (*Mycoplasma salivarium*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、マイコプラズマ・リポフィラム (*Mycoplasma lipophilum*)、マイコプラズマ・プリマタム (*Mycoplasma primum*)、マイコプラズマ・ハイオリニス (*Mycoplasma hyorhinis*)、マイコプラズマ・シノビアエ (*Mycoplasma synoviae*)、マイコプラズマ・ゲニタリウム (*Mycoplasma genitalium*)、マイ

10

20

30

40

50

コプラズマ・ニューモニアエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、アコレプラズマ・レイドラウイ (*Acholeplasma laidlawii*)、ウレアプラズマ・ウレアリティカム (*Ureaplasma urealyticum*)、マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) 及びスピロプラズマ・シトリ (*Spiroplasma citri*) からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のマイコプラズマの検出限界感度が 10 cfu/mL 以下であることを特徴とする上記 (13) 又は (14) に記載のマイコプラズマを検出する方法に関する。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、より多種のマイコプラズマを、より迅速・簡便・高感度・高精度に検出できるマイコプラズマの検出方法や、かかる検出のためのフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットや、キットを提供することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】上パネルは、本発明における各フォワードプライマーや各リバースプライマーが、マイコプラズマのゲノム上でどの位置に対応するかを示す図である。下パネルは、フォワードプライマー、プローブ、リバースプライマーからなる各セット（組合せ）が、それぞれどのような種類のマイコプラズマをターゲットとしているかを示す図である。

【図2】本検出法（本発明の検出方法）と、参考論文記載の検出法（非特許文献1記載の検出法）とで、各種マイコプラズマに対する検出感度を測定した結果を示す図である。

【図3】本発明のマルチプレックスリアルタイム定量PCR法において、交差反応性が実際に否定された細菌、真菌及び哺乳類由来細胞を示す。

20

【図4】F1フォワードプライマー、そのバリエーションプライマー、R1リバースプライマー、及びそのバリエーションプライマーの各配列の位置関係を示す図である。

【図5】F1フォワードプライマーやそのバリエーションプライマーと、R1リバースプライマーやそのバリエーションプライマーとの組合せについて、本発明のマルチプレックスリアルタイム定量PCR法を行った結果を示す図である。ct値とは、PCR増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数であり、ct値が小さいほどその対象をより高感度で検出していることを表す。

【図6】マイコプラズマ（マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ハイオリニス、マイコプラズマ・ゲニタリウム、マイコプラズマ・フェルメンタンス、スピロプラズマ・シトリ）と、マイコプラズマではないクロストリジウム・スポロゲネス (*Clostridium sporogenes*) とのゲノム配列を比較した結果の一部を示す図である。

30

【図7-1】本発明におけるフォワードプライマー、プローブ、リバースプライマーの近辺のゲノム配列を、マイコプラズマ・ミクロティ (*Mycoplasma microti*)、マイコプラズマ・ペネトランス (*Mycoplasma penetrans*)、マイコプラズマ・アイオワエ (*Mycoplasma iowae*)、マイコプラズマ・ムリス (*Mycoplasma muris*)、ウレアプラズマ・ウレアリティカム (*Ureaplasma urealyticum*)、マイコプラズマ・ニューモニアエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、マイコプラズマ・ゲニタリウム (*Mycoplasma genitalium*)、マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) で比較した結果を表す図である。

【図7-2】本発明におけるフォワードプライマー、プローブ、リバースプライマーの近辺のゲノム配列を、マイコプラズマ・ミクロティ (*Mycoplasma microti*)、マイコプラズマ・ペネトランス (*Mycoplasma penetrans*)、マイコプラズマ・アイオワエ (*Mycoplasma iowae*)、マイコプラズマ・ムリス (*Mycoplasma muris*)、ウレアプラズマ・ウレアリティカム (*Ureaplasma urealyticum*)、マイコプラズマ・ニューモニアエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、マイコプラズマ・ゲニタリウム (*Mycoplasma genitalium*)、マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) で比較した結果を表す図である。

40

【図7-3】本発明におけるフォワードプライマー、プローブ、リバースプライマーの近辺のゲノム配列を、マイコプラズマ・ミクロティ (*Mycoplasma microti*)、マイコプラズマ・ペネトランス (*Mycoplasma penetrans*)、マイコプラズマ・アイオワエ (*Mycoplasma iowae*)、マイコプラズマ・ムリス (*Mycoplasma muris*)、ウレアプラズマ・ウレアリテ

50

イカム (*Ureaplasma urealyticum*)、マイコプラズマ・ニューモニアエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、マイコプラズマ・ゲニタリウム (*Mycoplasma genitalium*)、マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) で比較した結果を表す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

(本発明のフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセット)

本発明のフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセット(以下、単に「本発明のセット」とも表示する。)としては、マルチプレックスリアルタイム定量PCRにより被検試料中のマイコプラズマを検出するためのフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットであって、前記セットが1種又は2種以上のフォワードプライマーと、2種又は3種以上のリバースプライマーと、1種又は2種以上のプローブとを含み、前記プローブは、前記フォワードプライマー及び前記リバースプライマーによる増幅産物を特異的に検出するためのプローブであり、前記フォワードプライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列のうち、17個～30個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号1のヌクレオチド番号14～24のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであり、前記リバースプライマーが、配列番号14、17～20の1種又は2種以上のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであり、前記プローブが、配列番号33のヌクレオチド配列のうち、17個～26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドである限り特に制限されない。

10

20

【0018】

本発明におけるフォワードプライマーとしては、配列番号1のヌクレオチド配列のうち、17個～30個(好ましくは17個～26個、より好ましくは17個～23個、さらに好ましくは18個～22個、さらにより好ましくは19～21個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号1のヌクレオチド番号14～24のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドである限り特に制限されないが、マイコプラズマをより高感度又はより高精度に検出する観点から、これらのオリゴヌクレオチドの中でも、配列番号1のヌクレオチド番号11～24のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドや、配列番号1のヌクレオチド番号14～27のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドが好ましく、配列番号1のヌクレオチド番号11～27のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドがより好ましい。配列番号1のヌクレオチド番号27のヌクレオチド「c」は、マイコプラズマではきわめて高く保存されており、かつ、マイコプラズマ以外の細菌では「c」以外のヌクレオチドであることが多いため、マイコプラズマに特徴的な配列となっている。

30

【0019】

本発明のセットは、フォワードプライマーを1種のみ含んでいてもよいが、より多種のマイコプラズマを検出する観点から、少なくとも以下の(A)、(B)の2種を含む、2種以上のフォワードプライマーを含んでいることが好ましく、以下の(A)、(B)の2種のフォワードプライマーを含んでいることがより好ましい。

40

(A)：配列番号2のヌクレオチド配列(配列番号1のヌクレオチド番号24のヌクレオチドsがcであるヌクレオチド配列)のうち、17個～30個(好ましくは17個～26個、より好ましくは17個～23個、さらに好ましくは18個～22個、さらにより好ましくは19～21個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号2のヌクレオチド番号14～24のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマー：(F1系のフォワードプライマーの上位概念)

(B)：配列番号3のヌクレオチド配列(配列番号1のヌクレオチド番号24のヌクレオチドsがgであるヌクレオチド配列)のうち、17個～30個(好ましくは17個～26

50

個、より好ましくは17個~23個、さらに好ましくは18個~22個、さらにより好ましくは19~21個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択され、かつ、配列番号3のヌクレオチド番号14~24のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマー:(F2フォワードプライマーの上位概念)

【0020】

本発明のセットが含む上記1種又は2種以上のフォワードプライマーのより具体的な例としては、以下の(A1)~(A6)及び(B1)から選択される1種又は2種以上のオリゴヌクレオチドのフォワードプライマーが好ましく、中でも、以下の(A1)~(A6)から選択される1種又は2種以上のオリゴヌクレオチドのフォワードプライマーと、以下の(B1)のオリゴヌクレオチドのフォワードプライマーとを含んでいることがより好ましい。

10

(A1):配列番号2のヌクレオチド番号8~30のヌクレオチド配列(F1フォワードプライマーの5'末端に2塩基、3'末端に2塩基延ばした配列)のうち、17個~21個(好ましくは18個~20個、より好ましくは19個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(F1フォワードプライマーの上位概念)

(A2):配列番号2のヌクレオチド番号9~30のヌクレオチド配列(M1フォワードプライマーの5'末端に2塩基、3'末端に1塩基延ばした配列)のうち、17個~21個(好ましくは18個~20個、より好ましくは19個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(M1フォワードプライマーの上位概念)

20

(A3):配列番号2のヌクレオチド番号6~28のヌクレオチド配列(TFフォワードプライマーの5'末端に2塩基、3'末端に2塩基延ばした配列)のうち、17個~21個(好ましくは18個~20個、より好ましくは19個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(TFフォワードプライマーの上位概念)

(A4):配列番号2のヌクレオチド番号9~30のヌクレオチド配列(MyTF-1フォワードプライマーの5'末端に2塩基延ばした配列)のうち、18個~22個(好ましくは19個~21個、より好ましくは20個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(MyTF-1フォワードプライマーの上位概念)

30

(A5):配列番号2のヌクレオチド番号4~26のヌクレオチド配列(MyTF-5フォワードプライマーの5'末端に2塩基、3'末端に2塩基延ばした配列)のうち、17個~21個(好ましくは18個~20個、より好ましくは19個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(MyTF-5フォワードプライマーの上位概念)

(A6):配列番号2のヌクレオチド番号5~29のヌクレオチド配列(MyTF-6フォワードプライマーの5'末端に2塩基、3'末端に2塩基延ばした配列)のうち、19個~23個(好ましくは20個~22個、より好ましくは21個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(MyTF-6フォワードプライマーの上位概念)

40

(B1):配列番号3のヌクレオチド番号8~30のヌクレオチド配列(F2プライマーフォワードの5'末端に2塩基、3'末端に2塩基延ばした配列)のうち、17個~21個(好ましくは18個~20個、より好ましくは19個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(F2フォワードプライマーの上位概念)

【0021】

上記の(A1)のオリゴヌクレオチドとしては以下の(a1)のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記の(A2)のオリゴヌクレオチドとしては以下の(a2)のオリゴヌクレ

50

オチドが好ましく、上記の(A3)のオリゴヌクレオチドとしては以下の(a3)のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記の(A4)のオリゴヌクレオチドとしては以下の(a4)のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記の(A5)のオリゴヌクレオチドとしては以下の(a5)のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記の(A6)のオリゴヌクレオチドとしては以下の(a6)のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記の(B1)のオリゴヌクレオチドとしては以下の(b1)のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(a1)：配列番号4のヌクレオチド配列(配列番号2のヌクレオチド番号10~28のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(F1フォワードプライマー)

(a2)：配列番号5のヌクレオチド配列(配列番号2のヌクレオチド番号11~29のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(M1フォワードプライマー)

(a3)：配列番号6のヌクレオチド配列(配列番号2のヌクレオチド番号8~26のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(TFフォワードプライマー)

(a4)：配列番号7のヌクレオチド配列(配列番号2のヌクレオチド番号11~30のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(MyTF-1フォワードプライマー)

(a5)：配列番号11のヌクレオチド配列(配列番号2のヌクレオチド番号6~24のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(MyTF-5フォワードプライマー)

(a6)：配列番号12のヌクレオチド配列(配列番号2のヌクレオチド番号7~27のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(MyTF-6フォワードプライマー)

(b1)：配列番号13のヌクレオチド配列(配列番号3のヌクレオチド番号10~28のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(F2フォワードプライマー)

【0022】

上記のF1フォワードプライマー、M1フォワードプライマー、TFフォワードプライマー、MyTF-1フォワードプライマー、MyTF-5フォワードプライマー、MyTF-6フォワードプライマー(これらをまとめて、「F1系フォワードプライマー」とも表示する。)の中では、F1フォワードプライマー、M1フォワードプライマー、TFフォワードプライマー、MyTF-1フォワードプライマー、MyTF-5フォワードプライマーが好ましく、中でも、F1フォワードプライマー、MyTF-1フォワードプライマー、MyTF-5フォワードプライマーがより好ましい。

【0023】

上記フォワードプライマー(A)、(A1)~(A6)及び(a1)~(a6)は、例えば、マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ブカーレ、マイコプラズマ・ファウシウム、マイコプラズマ・ホミニス、マイコプラズマ・オラーレ、マイコプラズマ・サリバリウム、マイコプラズマ・フェルメンタンス、マイコプラズマ・リポフィラム、マイコプラズマ・プリマタム、マイコプラズマ・ハイオリニス、マイコプラズマ・シノピアエ、マイコプラズマ・ゲニタリウム、マイコプラズマ・ニューモニアエ、アコレプラズマ・レイドラウィイ、ウレアプラズマ・ウレアリティカム、マイコプラズマ・ガリセプティカムの検出に適しており、上記フォワードプライマー(B)、(B1)及び(b1)は、例えば、スピロプラズマ・シトリの検出に適している。

【0024】

本発明におけるリバープライマーとしては、配列番号14、17~20の1種又は2種以上のヌクレオチド配列のうち、17~26個(好ましくは18個~25個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドである限り特に制限されない。本発明のセットは、リバープライマーを1種のみ含んでいてもよいが、より多種のマイコプラズマを検出する観点から、好ましくは以下の(C)~(G)[より好ましくは(C1)、(C2-1)、(C2-2)、(C2-3)、(D)、(E1)、(E2)、(F)、(G)]から選択される2種以上(好ましくは3種以上、より好ましくは4種以上、さらに好ましくは5種以上、より好ましくは6種以上

10

20

30

40

50

、さらに好ましくは7種以上、より好ましくは8種以上、さらに好ましくは9種のリバースプライマーを含んでいることが好ましい。

(C)：配列番号14のヌクレオチド配列のうち、17個～26個(好ましくは18個～24個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：(R1系及びR4系のリバースプライマーの上位概念)

(D)：配列番号17のヌクレオチド配列のうち、17個～26個(好ましくは18個～26個、より好ましくは20個～26個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：(R2リバースプライマーの上位概念)

(E)：配列番号18のヌクレオチド配列のうち、17個～24個(好ましくは18個～22個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：(R3及びR6のリバースプライマーの上位概念)

(F)：配列番号19のヌクレオチド配列のうち、17個～25個(好ましくは18個～25個、より好ましくは20個～25個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：(R5リバースプライマーの上位概念)

(G)：配列番号20のヌクレオチド配列のうち、17個～23個(好ましくは18個～23個、より好ましくは20個～23個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：(R7リバースプライマーの上位概念)

【0025】

上記の(C)のオリゴヌクレオチドとしては、以下の(C1)や(C2)のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(C1)：配列番号15のヌクレオチド配列のうち、17個～26個(好ましくは18個～24個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：(R1系のリバースプライマーの上位概念)

(C2)：配列番号16のヌクレオチド配列のうち、17個～26個(好ましくは20個～26個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：(R4系のリバースプライマーの上位概念)

【0026】

上記(C1)のオリゴヌクレオチドとしては以下の(c1-1)や、(c1-2)や、(c1-3)のオリゴヌクレオチドが好ましく、中でも、(c1-1)のオリゴヌクレオチドがより好ましい。

(c1-1)：配列番号21のヌクレオチド配列(配列番号15のヌクレオチド番号1～23のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(R1リバースプライマー)

(c1-2)：配列番号22のヌクレオチド配列(配列番号15のヌクレオチド番号1～22のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(M6-2リバースプライマー)

(c1-3)：配列番号24のヌクレオチド配列(配列番号15のヌクレオチド番号3～20のヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド：(TR-2リバースプライマー)

【0027】

上記(C2)のオリゴヌクレオチドとしては、以下の(C2-1)や、(C2-2)や、(C2-3)のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(C2-1)：配列番号16のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号20のmがaで、ヌクレオチド番号22のwがaであるヌクレオチド配列(配列番号16のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号20～23のヌクレオチド配列(mawa)が、配列番号30(aaaa)であるヌクレオチド配列)のうち、17個～26個(好ましくは18個～24個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：(R4-1リバースプライマーの上位概念)

10

20

30

40

50

(C 2 - 2) : 配列番号 16 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 の m が c で、ヌクレオチド番号 22 の w が a であるヌクレオチド配列 (配列番号 16 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 ~ 23 のヌクレオチド配列 (mawa) が、配列番号 31 (caaa) であるヌクレオチド配列) のうち、17 個 ~ 26 個 (好ましくは 18 個 ~ 24 個) の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド : (R 4 - 2 リバースプライマーの上位概念)

(C 2 - 3) : 配列番号 16 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 の m が a で、ヌクレオチド番号 22 の w が t であるヌクレオチド配列 (配列番号 16 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 ~ 23 のヌクレオチド配列 (mawa) が、配列番号 32 (aata) であるヌクレオチド配列) のうち、17 個 ~ 26 個 (好ましくは 18 個 ~ 24 個) の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド : (R 4 - 3 リバースプライマーの上位概念)

【0028】

上記 (C 2 - 1) のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (c 2 - 1) のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記 (C 2 - 2) のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (c 2 - 2) のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記 (C 2 - 3) のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (c 2 - 3) のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(c 2 - 1) : 配列番号 25 のヌクレオチド配列 (配列番号 16 のヌクレオチド番号 3 ~ 26 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 の m が a で、ヌクレオチド番号 22 の w が a であるヌクレオチド配列) からなるオリゴヌクレオチド : (R 4 - 1 リバースプライマー)

(c 2 - 2) : 配列番号 26 のヌクレオチド配列 (配列番号 16 のヌクレオチド番号 3 ~ 26 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 の m が c で、ヌクレオチド番号 22 の w が a であるヌクレオチド配列) からなるオリゴヌクレオチド : (R 4 - 2 リバースプライマー)

(c 2 - 3) : 配列番号 27 のヌクレオチド配列 (配列番号 16 のヌクレオチド番号 3 ~ 26 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 20 の m が a で、ヌクレオチド番号 22 の w が t であるヌクレオチド配列) からなるオリゴヌクレオチド : (R 4 - 3 リバースプライマー)

【0029】

上記の (D) のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (d) のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(d) 配列番号 17 のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド : (R 2 リバースプライマー)

【0030】

上記の (E) のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (E 1) や、(E 2) のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(E 1) : 配列番号 18 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 2 の s が g であり、ヌクレオチド番号 4 及び 9 の r が g であるヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 24 個 (好ましくは 18 個 ~ 22 個) の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド : (R 3 リバースプライマーの上位概念)

(E 2) 配列番号 18 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 2 の s が c であり、ヌクレオチド番号 4 及び 9 の r が a であるヌクレオチド配列のうち、17 個 ~ 24 個 (好ましくは 18 個 ~ 22 個) の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド : (R 6 リバースプライマーの上位概念)

【0031】

上記の (E 1) のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (e 1) のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記の (E 2) のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (e 2) のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(e 1) : 配列番号 28 のヌクレオチド配列 (配列番号 18 のヌクレオチド番号 5 ~ 24

10

20

30

40

50

のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号9のrがgであるヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド:(R3リバースプライマー)

(e2):配列番号29のヌクレオチド配列(配列番号18のヌクレオチド番号5~24のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号9のrがaであるヌクレオチド配列)からなるオリゴヌクレオチド:(R6リバースプライマー)

【0032】

上記の(F)のオリゴヌクレオチドとしては、以下の(f)のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(f)配列番号19のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(R5リバースプライマー)

【0033】

上記の(G)のオリゴヌクレオチドとしては、以下の(g)のオリゴヌクレオチドが好ましい。

(g)配列番号20のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(R7リバースプライマー)

【0034】

上記リバースプライマー(C1)、(c1-1)、(c1-2)及び(c1-3)は、例えば、マイコプラズマ・ゲニタリウム、マイコプラズマ・ニューモニアエの検出に適しており、上記リバースプライマー(C2-1)及び(c2-1)は、例えば、マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ブカーレ、マイコプラズマ・ファウシウム、マイコプラズマ・ホミニス、マイコプラズマ・オラーレ、マイコプラズマ・サリバリウム 20の検出に適しており、上記リバースプライマー(C2-2)及び(c2-2)は、例えば、マイコプラズマ・フェルメンタンス、マイコプラズマ・リポフィラム、マイコプラズマ・プリマタムの検出に適しており、上記リバースプライマー(C2-3)及び(c2-3)は、例えば、マイコプラズマ・ハイオリニスの検出に適しており、上記リバースプライマー(D)及び(d)は、例えば、アコレプラズマ・レイドラウイイの検出に適しており、上記リバースプライマー(E1)及び(e1)は、例えば、マイコプラズマ・ガリセプティカムの検出に適しており、上記リバースプライマー(E2)及び(e2)は、例えば、ウレアプラズマ・ウレアリティカムの検出に適しており、上記リバースプライマー(F)及び(f)は、例えば、スピロプラズマ・シトリの検出に適しており、上記リバースプライマー(G)及び(g)は、例えば、マイコプラズマ・シノビアエの検出に適している。 30

【0035】

本発明におけるプローブとしては、配列番号33のヌクレオチド配列のうち、17個~26個の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドである限り特に制限されないが、配列番号33のヌクレオチド番号7~16のヌクレオチド配列(sggrtgatg)又はその相補的なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドが好ましく、配列番号44~48のヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドがより好ましい。本発明のセットは、プローブを1種のみ含んでいてもよいが、より多種のマイコプラズマを検出する観点から、好ましくは以下の(H)~(L)から選択される2種以上、 40より好ましくは3種以上、さらに好ましくは4種以上、さらにより好ましくは5種のプローブを含んでいることが好ましい。

(H):配列番号34のヌクレオチド配列(配列番号33のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号33のsがgであり、rがaであり、yがcである配列)のうち、17個~26個(好ましくは19個~25個、より好ましくは20個~24個)の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド:(P1-1プローブの上位概念)

(I):配列番号35のヌクレオチド配列(配列番号33のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号33のsがgであり、rがgであり、yがtである配列)のうち、17個~26個(好ましくは19個~25個、より好ましくは20個~24個)の連続するヌ 50

10

20

30

40

50

クレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：（P 1 - 2 プローブの上位概念）

（J）：配列番号 36 のヌクレオチド配列（配列番号 33 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 33 の s が g であり、r が a であり、y が t である配列）のうち、17 個～26 個（好ましくは 19 個～25 個、より好ましくは 20 個～24 個）の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：（P 1 - 3 プローブの上位概念）

（K）：配列番号 37 のヌクレオチド配列（配列番号 33 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 33 の s が g であり、r が g であり、y が c である配列）のうち、17 個～26 個（好ましくは 19 個～25 個、より好ましくは 20 個～24 個）の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：（P 1 - 4 プローブの上位概念）

（L）：配列番号 38 のヌクレオチド配列（配列番号 33 のヌクレオチド配列において、ヌクレオチド番号 33 の s が c であり、r が a であり、y が c である配列）のうち、17 個～26 個（好ましくは 19 個～25 個、より好ましくは 20 個～24 個）の連続するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列又はその相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：（P 2 プローブの上位概念）

【0036】

上記の（H）のオリゴヌクレオチドとしては、以下の（h）のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記（I）のオリゴヌクレオチドとしては、以下の（i）のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記（J）のオリゴヌクレオチドとしては、以下の（j）のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記（K）のオリゴヌクレオチドとしては、以下の（k）のオリゴヌクレオチドが好ましく、上記（L）のオリゴヌクレオチドとしては、以下の（l）のオリゴヌクレオチドが好ましい。

（h）：配列番号 39 のヌクレオチド配列（配列番号 34 のヌクレオチド番号 2～23 のヌクレオチド配列）からなるオリゴヌクレオチド：（P 1 - 1 プローブ）

（i）：配列番号 40 のヌクレオチド配列（配列番号 35 のヌクレオチド番号 2～23 のヌクレオチド配列）からなるオリゴヌクレオチド：（P 1 - 2 プローブ）

（j）：配列番号 41 のヌクレオチド配列（配列番号 36 のヌクレオチド番号 2～23 のヌクレオチド配列）からなるオリゴヌクレオチド：（P 1 - 3 プローブ）

（k）：配列番号 42 のヌクレオチド配列（配列番号 37 のヌクレオチド番号 2～23 のヌクレオチド配列）からなるオリゴヌクレオチド：（P 1 - 4 プローブ）

（l）：配列番号 43 のヌクレオチド配列（配列番号 38 のヌクレオチド番号 2～23 のヌクレオチド配列）からなるオリゴヌクレオチド：（P 2 プローブ）

【0037】

上記プローブ（H）及び（h）は、例えば、マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ブカーレ、マイコプラズマ・ファウシウム、マイコプラズマ・ホミニス、マイコプラズマ・オラーレ、マイコプラズマ・サリバリウム、マイコプラズマ・フェルメンタンス、マイコプラズマ・リポフィラム、マイコプラズマ・プリマタム、マイコプラズマ・ハイオリニス、アコレプラズマ・レイドラウィイ、ウレアプラズマ・ウレアリティカムの検出に適しており、中でも、マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ブカーレ、マイコプラズマ・ファウシウム、マイコプラズマ・ホミニス、マイコプラズマ・サリバリウム、マイコプラズマ・フェルメンタンス、マイコプラズマ・リポフィラム、マイコプラズマ・ハイオリニス、アコレプラズマ・レイドラウィイ、ウレアプラズマ・ウレアリティカムの検出により適している。また、上記プローブ（I）及び（i）は、例えば、マイコプラズマ・ガリセプティカムの検出に適している。また、上記プローブ（J）及び（j）は、例えば、マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ブカーレ、マイコプラズマ・ファウシウム、マイコプラズマ・ホミニス、マイコプラズマ・オラーレ、マイコプラズマ・サリバリウム、マイコプラズマ・フェルメンタンス、マイコプラズマ・リポフィラム、マイコプラズマ・プリマタム、マイコプラズマ・シノビアエの検出に適しており、中でも、

マイコプラズマ・オラーレ、マイコプラズマ・プリマタム、マイコプラズマ・シノビアエの検出により適している。また、上記プローブ（K）及び（k）は、例えば、マイコプラズマ・ゲニタリウム、マイコプラズマ・ニューモニアエの検出に適している。

上記プローブ（L）及び（l）は、例えば、スピロプラズマ・シトリの検出に適している。

【 0 0 3 8 】

本発明におけるフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブの好ましい組合せとしては、以下の表 1 の組合せ C A ~ C I を挙げることができる。本発明のセットは、より多種のマイコプラズマを検出する観点から、かかる組合せ C A ~ C I から選択される 2 種（好ましくは 3 種以上、より好ましくは 4 種以上、さらに好ましくは 5 種以上、より好ましくは 6 種以上、さらに好ましくは 7 種以上、より好ましくは 8 種以上、特に好ましくは 9 種）の組合せを含んでいることが好ましい。

【 0 0 3 9 】

【表 1】

組合せ名	左の組合せに含まれるプライマーやプローブ		
	フォワード プライマー	リバース プライマー	プライマー対に対応する プローブ
CA	(A) (例えばF 1)	(C 2-1) (例えばR 4-1)	(H) (例えばP 1-1) 又は (J) (例えばP 1-3)
CB	(A) (例えばF 1)	(C 2-2) (例えばR 4-2)	(H) (例えばP 1-1) 又は (J) (例えばP 1-3)
CC	(A) (例えばF 1)	(C 2-3) (例えばR 4-3)	(H) (例えばP 1-1)
CD	(A) (例えばF 1)	(G) (例えばR 7)	(J) (例えばP 1-3)
CE	(A) (例えばF 1)	(C 1) (例えばR 1)	(K) (例えばP 1-4)
CF	(A) (例えばF 1)	(D) (例えばR 2)	(H) (例えばP 1-1)
CG	(A) (例えばF 1)	(E 1) (例えばR 3)	(H) (例えばP 1-1)
CH	(A) (例えばF 1)	(E 2) (例えばR 6)	(I) (例えばP 1-2)
CI	(B) (例えばF 2)	(F) (例えばR 5)	(L) (例えばP 2)

10

20

30

40

【0040】

上記組合せCAは、検出対象として、マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ブカーレ、マイコプラズマ・ファウシウム、マイコプラズマ・ホミニス、マイコプラズマ・オラーレ、マイコプラズマ・サリバリウムを含んでおり、上記組合せCBは、検出対象として、マイコプラズマ・フェルメンタンス、マイコプラズマ・リポフィラム、マイコプラズマ・プリマタムを含んでおり、上記組合せCCは、検出対象として、マイコプラズマ・ハイオリニスを含んでおり、上記組合せCDは、検出対象として、マイコプラズマ・シノピアエを含んでおり、上記組合せCEは、検出対象として、マイコプラズマ・ゲニタリ

50

ウム、マイコプラズマ・ニューモニアエを含んでおり、上記組合せ C F は、検出対象として、アコレプラズマ・レイドラウィイを含んでおり、上記組合せ C G は、検出対象として、マイコプラズマ・ガリセプティカムを含んでおり、上記組合せ C H は、検出対象として、ウレアプラズマ・ウレアリティカムを含んでおり、上記組合せ C I は、検出対象として、スピロプラズマ・シトリを含んでいる。

【 0 0 4 1 】

上記の各フォワードプライマーやリバープライマーは、それぞれのヌクレオチド配列において、1又は数個（例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個）のヌクレオチドが欠失、置換又は付加されていても、それぞれが検出対象とするマイコプラズマ群に特異的な標的核酸を増幅することができるものであれば、本発明におけるプライマーとして使用することができる。本発明におけるフォワードプライマーやリバープライマーは、リン酸トリエチル法や、リン酸ジエステル法等の常法により、通常用いられるDNA合成装置等を利用して合成することができる。

10

【 0 0 4 2 】

本発明におけるプローブは、対応するプライマー対による増幅産物（アンプリコン）に特異的にハイブリダイズすることによって、二重鎖分子（ハイブリッド）を形成し得る一本鎖核酸である。かかる一本鎖核酸としては、プローブとしての安定性に優れていることから、一本鎖DNAが好ましく挙げられる。上記の各プローブは、それぞれのヌクレオチド配列と85%以上（好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上）の配列同一性を有するヌクレオチド配列であって、それぞれが検出対象とするマイコプラズマ群の増幅産物に特異的にハイブリダイズすることができるものであれば、本発明におけるプローブとして使用することができる。本発明におけるプローブは、リン酸トリエチル法や、リン酸ジエステル法等の常法により、通常用いられるDNA合成装置等を利用して合成することができる。

20

【 0 0 4 3 】

本発明におけるプローブは、対応するプライマー対による増幅産物を検出するために標識物質で標識されていることが好ましく、迅速、高感度で検出する観点から、蛍光物質で標識されていることがより好ましく、蛍光物質と消光物質で二重標識されていることがより好ましく、TaqMan（登録商標）プローブであることがさらに好ましい。TaqManプローブは、通常、核酸プローブの5'末端を蛍光物質（レポーター蛍光色素）で修飾し、3'末端を消光物質（クエンチャー蛍光色素）で修飾する。レポーター蛍光色素の例としては6-FAM（6-カルボキシフルオレセイン）、TET（6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン）、HEX（6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン）等のフルオレッセイン系蛍光色素が挙げられ、クエンチャー蛍光色素の例としては、6-カルボキシテトラメチルローダミン（TAMRA）、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）等のローダミン系蛍光色素が挙げられるが、本発明においては、配列番号5の塩基配列を用いつつ、Tm値を対応するプライマー対のTm値よりも8～10程度高くするために、非蛍光消光物質であるminor groove binder（MGB）が好適に用いられる。これらの蛍光色素は公知であり、市販のリアルタイムPCR用キットに含まれているのでそれを用いることができる。

30

40

【 0 0 4 4 】

（本発明におけるキット）

本発明のマルチプレックスリアルタイム定量PCRにより被検試料中のマイコプラズマを検出するためのキット（以下、単に「本発明のキット」とも表示する。）としては、フォワードプライマーとリバープライマーとプローブのセットと、固体支持体とを備え、前記プローブが前記固体支持体上に固定されている限り特に制限されない。固体支持体上に固定されているプローブを用いると、増幅産物をより迅速に検出し得る点で好ましい。本発明における「固体支持体」とは、プローブのオリゴヌクレオチドを結合できる基材を意味し、例えば、マイクロプレート（マイクロタイタープレート）、膜（ナイロン、ニトロセルロースなど）、ビーズ（樹脂など）、金属微粒子、基板（ガラス、シリコン、樹脂

50

など)などが挙げられる。固体支持体上へのプローブの固定化は、共有結合、非共有結合のいずれを利用してよく、マイクロプレートを用いる場合、そのウェル内にプローブ溶液を滴下して単に乾燥させるだけであってもよい。

【0045】

(マイコプラズマを検出する方法)

本発明のマイコプラズマを検出する方法は、マルチプレックスリアルタイム定量PCRにより被検試料中のマイコプラズマを検出する方法であって、

(a)被検試料からDNAを抽出する工程a:

(b)上記工程aで抽出したDNAを鋳型とし、本発明のプライマー対のセット又は本発明のキットを用いてマルチプレックスリアルタイム定量PCRを行う工程b:及び、

(c)上記工程bにおけるマルチプレックスリアルタイム定量PCRによる増幅産物を検出することにより、前記被検試料中にマイコプラズマが存在するか否かを検出する工程c:

を含む方法である限り特に制限されない。かかる方法によって、より多種のマイコプラズマを、より迅速・簡便・高感度・高精度に検出することができる。

【0046】

本発明における「マイコプラズマ」とは、マイコプラズマ(*Mycoplasma*)属に属する細菌だけでなく、マイコプラズマ(*Mycoplasma*)属、ウレアプラズマ(*Ureaplasma*)属、メソプラズマ(*Mesoplasma*)属、エントモプラズマ(*Entomoplasma*)属、スピロプラズマ(*Spiroplasma*)属、アコレプラズマ(*Acholeplasma*)属、アステロプラズマ(*Asteroleplasma*)属、及びサーモプラズマ(*Thermoplasma*)属を包含するモリクテス(*Mollicutes*)綱に属する細菌を意味するが、中でも、マイコプラズマ属、ウレアプラズマ属、スピロプラズマ属、アコレプラズマ属に属する細菌が好ましく挙げられ、中でも、マイコプラズマ属に属する細菌がより好ましく挙げられる。本発明の検出対象として特に好ましいマイコプラズマとしては、マイコプラズマ・アルギニニ(*Mycoplasma arginini*)、マイコプラズマ・ブカーレ(*Mycoplasma buccale*)、マイコプラズマ・ファウシウム(*Mycoplasma faucium*)、マイコプラズマ・ホミニス(*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・オラーレ(*Mycoplasma orale*)、マイコプラズマ・サリバリウム(*Mycoplasma salivarium*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス(*Mycoplasma fermentans*)、マイコプラズマ・リポフィラム(*Mycoplasma lipophilum*)、マイコプラズマ・プリマタム(*Mycoplasma primatum*)、マイコプラズマ・ハイオリニス(*Mycoplasma hyorhinis*)、マイコプラズマ・シノビアエ(*Mycoplasma synoviae*)、マイコプラズマ・ゲニタリウム(*Mycoplasma genitalium*)、マイコプラズマ・ニューモニアエ(*Mycoplasma pneumoniae*)、アコレプラズマ・レイドラウィイ(*Acholeplasma laidlawii*)、ウレアプラズマ・ウレアリティカム(*Ureaplasma urealyticum*)、マイコプラズマ・ガリセプティカム(*Mycoplasma gallisepticum*)、及びスピロプラズマ・シトリ(*Spiroplasma citri*)からなる群から選択される1種又は2種以上のマイコプラズマが挙げられる。

【0047】

本発明における「被検試料」としては特に制限されず、哺乳類、爬虫類、両生類、鳥類等の動物や植物などの培養細胞、細胞培養上清、生体試料などが挙げられる。なお、被検試料からDNAを抽出する前に、必要に応じて、濾過、不純物除去などの前処理を行ってもよい。

【0048】

上記工程aとしては、被検試料からDNAを抽出する工程である限り特に制限されない。被検試料からDNAを抽出する方法としては、常法を用いることができ、例えば、フェノール/クロロホルム法等の液-液抽出法や、担体を用いる固液抽出法を用いることができる。また、試薬メーカーにより市販されているQIAamp(登録商標)DNA Mini Kit(QIAGEN社製)、Loopamp(登録商標)SR DNA抽出キット(栄研化学株式会社製)等の各種DNA抽出キットを用いてもよい。

【0049】

QIAamp (登録商標) DNA Mini Kit (QIAGEN社製) を用いて被検試料からDNAを抽出する方法の一例を以下に説明する。

マイクロチューブに、被検試料を200 μ L採取する。マイクロチューブ内のサンプルに、20 μ LのプロテイナーゼK、及び、200 μ LのBuffer ALを添加した後、ボルテックスを用いて15秒間攪拌する。マイクロチューブを、56 $^{\circ}$ Cで10分間保温する。サンプルに200 μ Lのエタノール(100%)を添加した後、ボルテックスを用いて15秒間攪拌する。サンプルをQIAamp Mini spin Column (2mL collection tube付属)に移した後、室温及び6000 \times gで1分間遠心する。前述のQIAamp Mini spin Columnを新しい2mL collection tubeに移し、サンプルに500 μ LのBuffer AW1を加える。室温及び6000 \times gで1分間遠心する。前述のQIAamp Mini spin Columnを新しい2mL collection tubeに移し、サンプルに500 μ LのBuffer AW2を加える。室温及び20000 \times gで3分間遠心する。前述のQIAamp Mini spin Columnを新しい2mL collection tubeに移した後、室温及び20000 \times gで1分間遠心する。前述のQIAamp Mini spin Columnを1.5 mL tubeに移し、メンブレンに200 μ LのBuffer AEを加える。室温で1分間保温した後、室温及び6000 \times gで1分間遠心し、DNA抽出液を得る。カラムは廃棄する。

10

【0050】

上記工程bとしては、上記工程aで抽出したDNAを鋳型とし、本発明のプライマー対のセット又は本発明のキットを用いてマルチプレックスリアルタイム定量PCRを行う工程である限り特に制限されない。マルチプレックスリアルタイム定量PCRとは、リアルタイム定量PCRにおいて、複数(2対以上又は3対以上)のプライマー対を1つの増幅反応場において同時に用いるPCRであり、リアルタイム定量PCR(リアルタイムPCR)とは、PCRによる増幅産物の量をリアルタイムでモニターし解析する手法である。マルチプレックスリアルタイム定量PCRは、電気泳動が不要で迅速性と定量性に優れている。かかるマルチプレックスリアルタイム定量PCRは、上記工程aで抽出したDNAを鋳型とし、本発明のプライマー対のセット又は本発明のキットを用いること以外は、マルチプレックスリアルタイム定量PCRの通常の方法を用いることができる。マルチプレックスリアルタイム定量PCRの通常の方法は、例えば、「Molecular Cloning、第4版」(Green及びSambrook、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2012年)や、マルチプレックスリアルタイム定量PCR用のキット(例えばBrilliant Multiplex QPCR Master Mix(アジレントテクノロジー社製)等)の取扱説明書などで説明されている。リアルタイム定量PCRにおいて、増幅産物を検出する方法としては、インターカレーター法とプローブ法が主に知られているが、マイコプラズマをより高感度、高精度に検出する観点から、プローブを用いて増幅産物を検出するプローブ法が好ましく挙げられる。

20

30

【0051】

本発明におけるフォワードプライマー、リバースプライマー、プローブの使用濃度としては、マイコプラズマの検出が可能である限り特に制限されず、当業者であれば使用濃度を適宜調整して用いることができるが、例えば、0.005~3 μ Mの範囲内を挙げることができ、0.01~1 μ Mの範囲内を好ましく挙げることができる。

40

【0052】

マルチプレックスリアルタイム定量PCR法の好ましい方法として、例えば以下のA法やB法を挙げることができる。

【0053】

(A法)

0.2 mLチューブに反応液を40 μ Lと、被検試料由来のDNA溶液を10 μ L加え、トータル50 μ LでPCR反応を行うことができる。PCR用の反応液は、1 \times PCR Gold Buffer (15 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl) (ABI社製)、3 mM MgCl₂ (ABI社製)、60 mM トレハロース、200 μ M each dNTPs (Trilink社製)、1.25 Uのamplitaq Gold DNA polymerase、フォワードプライマー(0

50

．5 μ MのF 1、0．2 μ MのF 2) (筑波オリゴサービス社に製造委託)、リバープライマー(0．5 μ MのR 1、0．3 μ MのR 2、0．15 μ MのR 3、0．125 μ MのR 4 - 1、0．125 μ MのR 4 - 2、0．125 μ MのR 4 - 3、0．2 μ MのR 5、0．15 μ MのR 6、0．125 μ MのR 7) (筑波オリゴサービス社に製造委託)、蛍光プローブ(0．045 μ MのP 1 - 1、0．045 μ MのP 1 - 2、0．045 μ MのP 1 - 3、0．045 μ MのP 1 - 4及び0．002 μ MのP 2) (筑波オリゴサービス社に製造委託)を混合して調製することができる。PCR条件は、95、10分間の活性化の後、95、15秒間の変性、60、1分間のアニールと伸張(シグナル検出)というサイクルを45サイクル行うことができる。PCR産物の濃度は、蛍光プローブのシグナルを検出することによって算出することができる。これらのマルチプレックスリアルタイム定量PCR試験には、LightCycler 480 (Roche diagnostics社製)というリアルタイムPCRシステムを用いることができる。ネガティブコントロールにはDistilled WaterDeionized, Sterile (ニッポンジーン社製)を用いることができる。

10

【0054】

(B法)

0．2 mLチューブに反応液を40 μ Lと、被検試料由来のDNA溶液を10 μ L加え、トータル50 μ LでPCR反応を行うことができる。PCR用の反応液は、1x PCR Buffer (75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 3 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) Tween 20, 250 μ M each dNTPs)、1.25 UのTaq DNA polymerase (Thermo scientific社製)、5 μ gのanti-taq high (TOYOBO社製)、フォワードプライマー(0．5 μ MのF 1、0．2 μ MのF 2) (筑波オリゴサービス社に製造委託)、リバープライマー(0．5 μ MのR 1、0．3 μ MのR 2、0．15 μ MのR 3、0．125 μ MのR 4 - 1、0．125 μ MのR 4 - 2、0．125 μ MのR 4 - 3、0．2 μ MのR 5、0．15 μ MのR 6、0．125 μ MのR 7) (筑波オリゴサービス社に製造委託)、蛍光プローブ(0．045 μ MのP 1 - 1、0．045 μ MのP 1 - 2、0．045 μ MのP 1 - 3、0．045 μ MのP 1 - 4及び0．002 μ MのP 2) (筑波オリゴサービス社に製造委託)を混合して調製することができる。PCR条件は、95、1分間のPreDenatureの後、95、5秒間の変性、60、1分間のアニールと伸張(シグナル検出)を45サイクル行うことができる。PCR産物の濃度は、蛍光プローブのシグナルを検出することによって算出することができる。これらのマルチプレックスリアルタイム定量PCR試験には、LightCycler 480 (Roche diagnostics社製)というリアルタイムPCRシステムを用いることができる。ネガティブコントロールにはDistilled WaterDeionized, Sterile (ニッポンジーン社製)を用いることができる。

20

30

【0055】

マルチプレックスリアルタイム定量PCRの実施や、その増幅産物の検出は、LightCycler 480 (Roche diagnostics社製)などの、市販されているリアルタイムPCRシステムを用いて行うことができる。

【0056】

本発明のマイコプラズマを検出する方法における、マイコプラズマの検出限界感度は、通常100 cfu/mL以下であり、好ましくは10 cfu/mL以下、より好ましくは5 cfu/mL以下である。特に、マイコプラズマ・アルギニニ(好ましくはATCC 23838)、マイコプラズマ・フェルメンタンス(好ましくはNBRC 15854)、マイコプラズマ・ガリセプティカム(好ましくはNBRC 14855)、マイコプラズマ・ハイオリニス(好ましくはNBRC 14858)、マイコプラズマ・オラーレ(好ましくはNBRC 14477)、マイコプラズマ・ニューモニアエ(好ましくはNBRC 14401)、マイコプラズマ・シノビアエ(好ましくはATCC 25204)、アコレプラズマ・レイドラウィイ(好ましくはNBRC 14400)、スピロプラズマ・シトリについての検出限界感度は、好ましくは10 cfu/mL以下、より好ましくは5 cfu/mL以下である。

40

【0057】

50

以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】

【0058】

[マイコプラズマを検出するためのプライマー及びプローブの設計]

極めて多種のマイコプラズマを特異的に検出し得るプライマー及びプローブを設計するために、図1の下パネルの“Mollicutes species”に記載のマイコプラズマのゲノム配列と、図3に記載の他の細菌、真菌及び哺乳類のゲノム配列を収集してアラインメントを作成し、解析を行った。そして、16S rRNA遺伝子、23S rRNA遺伝子及び両遺伝子間のスペーサー領域のうち、特定の領域が、細菌の種類毎に特有な配列を有していながらも、マイコプラズマ間では比較的高度に保存されていることを見だし、この特定の領域に基づいて、多種のマイコプラズマを特異的に検出し得るプライマー及びプローブの設計を行った。すなわち、マイコプラズマのその特定の領域のゲノム配列又はその相補配列にはアニールするが、他の細菌のそれらの配列にはアニールしない(ミスマッチが多い)と予想される配列をフォワードプライマー又はリバースプライマーとし、また、それらのプライマーによる増幅産物に含まれる別の特定の領域の配列又はその相補配列にはハイブリダイズするが、他の細菌のそれらの配列にはハイブリダイズしないと予想される配列をプローブとした(図1の上パネルや、図7-1~図7-3参照)。一例として、マイコプラズマ(マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ハイオリニス、マイコプラズマ・ゲニタリウム、マイコプラズマ・フェルメンタンス、スピロプラズマ・シトリ)と、マイコプラズマではないクロストリジウム・スポロゲネス(*Clostridium sporogenes*)とのゲノム配列を比較した結果の一部を図6に示す。

【0059】

図1の下パネルに示すように、F1フォワードプライマー(配列番号4)と、R4-1リバースプライマー(配列番号25)と、P1-1(配列番号39)又はP1-3(配列番号41)プローブとがセット(組合せA)(Group 1aのマイコプラズマを対象)となり、F1フォワードプライマー(配列番号4)と、R4-2リバースプライマー(配列番号26)と、P1-1(配列番号39)又はP1-3(配列番号41)プローブとがセット(組合せB)(Group 1bのマイコプラズマを対象)となり、F1フォワードプライマー(配列番号4)と、R4-3リバースプライマー(配列番号27)と、P1-1プローブ(配列番号39)とがセット(組合せC)(Group 1cのマイコプラズマを対象)となり、F1フォワードプライマー(配列番号4)と、R7リバースプライマー(配列番号20)と、P1-3プローブ(配列番号41)とがセット(組合せD)(Group 6のマイコプラズマを対象)となり、F1フォワードプライマー(配列番号4)と、R1リバースプライマー(配列番号21)と、P1-4プローブ(配列番号42)とがセット(組合せE)(Group 2のマイコプラズマを対象)となり、F1フォワードプライマー(配列番号4)と、R2リバースプライマー(配列番号17)と、P1-1プローブ(配列番号39)とがセット(組合せF)(Group 4のマイコプラズマを対象)となり、F1フォワードプライマー(配列番号4)と、R3リバースプライマー(配列番号28)と、P1-1プローブ(配列番号39)とがセット(組合せG)(Group 3aのマイコプラズマを対象)となり、F1フォワードプライマー(配列番号4)と、R6リバースプライマー(配列番号29)と、P1-2プローブ(配列番号40)とがセット(組合せH)(Group 3bのマイコプラズマを対象)となり、F2フォワードプライマー(配列番号13)と、R5リバースプライマー(配列番号19)と、P2プローブ(配列番号43)とがセット(組合せI)(Group 5のマイコプラズマを対象)となる。なお、図1の下パネルから分かるように、上記組合せAは、マイコプラズマ・アルギニニ、マイコプラズマ・ブカーレ、マイコプラズマ・ファウシウム、マイコプラズマ・ホミニス、マイコプラズマ・オラーレ、及び、マイコプラズマ・サリバリウムを検出ターゲットとしており、上記組合せBは、マイコプラズマ・フェルメンタンス、マイコプラズマ・リポフィラム、及び、マイコプラズマ・プリマタムを検出ターゲットとしており、上記組合せCは、マイコプラズマ・ハイオリニスを検出タ

10

20

30

40

50

ターゲットとしており、上記組合せDは、マイコプラズマ・シノビアエを検出ターゲットとしており、上記組合せEは、マイコプラズマ・ゲニタリウム、及び、マイコプラズマ・ニューモニアエを検出ターゲットとしており、上記組合せFは、アコレプラズマ・レイドラウイを検出ターゲットとしており、上記組合せGは、マイコプラズマ・ガリセプティカムを検出ターゲットとしており、上記組合せHは、ウレアプラズマ・ウレアリティカムを検出ターゲットとしており、上記組合せIは、スピロプラズマ・シトリを検出ターゲットとしている。上記セットA～Iの各プライマー及びプローブを、オリゴヌクレオチド合成装置により合成した。

【実施例2】

【0060】

[プライマー及びプローブのセットによるマイコプラズマ検出の感度測定試験]

実施例1で作製したセットA～Iの各プライマー及びプローブが、各種マイコプラズマをどの程度の感度で測定し得るかを確認するために、以下のような、マルチプレックスリアルタイム定量PCR試験を行った。

【0061】

(材料)

マイコプラズマ・アルギニニ(ATCC 23838)、マイコプラズマ・フェルメンタンス(NBRC 15854)、マイコプラズマ・ガリセプティカム(NBRC 14855)、マイコプラズマ・ハイオリニス(NBRC 14858)、マイコプラズマ・オラーレ(NBRC 14477)、マイコプラズマ・ニューモニアエ(NBRC 14401)、マイコプラズマ・シノビアエ(ATCC 25204)、アコレプラズマ・レイドラウイ(NBRC 14400)、スピロプラズマ・シトリ(ATCC 27556)。

5 Units/ μ LのAmplitaq Gold DNA polymerase (ABI社製)。

Ampitaq Gold付属試薬(ABI): 10 \times PCR Buffer (150 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl), 25 mM MgCl₂, 10 mM each dNTP mix。

Distilled Water, Deionized, Sterile (ニッポンジーン社製)。

【0062】

(方法: A法)

0.2 mLチューブに反応液を40 μ Lと、上記のいずれかのマイコプラズマのDNA溶液(5, 10, 100, 又は1000 cfu/reaction)を10 μ L加え、トータル50 μ LでPCR反応を行った。PCR用の反応液は、1 \times PCR Gold Buffer (15 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM KCl) (ABI社製)、3 mM MgCl₂ (ABI社製)、60 mM トレハロース、200 μ M each dNTPs (ABI社製)、1.25 Uのamplitaq Gold DNA polymerase、フォワードプライマー(0.5 μ MのF1、0.2 μ MのF2) (筑波オリゴサービス社に製造委託)、リバースプライマー(0.5 μ MのR1、0.3 μ MのR2、0.15 μ MのR3、0.125 μ MのR4-1、0.125 μ MのR4-2、0.125 μ MのR4-3、0.2 μ MのR5、0.15 μ MのR6、0.125 μ MのR7) (筑波オリゴサービス社に製造委託)、蛍光プローブ(0.045 μ MのP1-1、0.045 μ MのP1-2、0.045 μ MのP1-3、0.045 μ MのP1-4及び0.002 μ MのP2) (筑波オリゴサービス社に製造委託)を混合して調製した。PCR条件は、95 $^{\circ}$ C、10分間の活性化の後、95 $^{\circ}$ C、15秒間の変性、60 $^{\circ}$ C、1分間のアニールと伸張(シグナル検出)というサイクルを45サイクル行った。PCR産物の濃度は、蛍光プローブのシグナルを検出することによって算出した。これらのマルチプレックスリアルタイム定量PCR試験には、LightCycler 480 (Roche diagnostics社製)というリアルタイムPCRシステムを用いた。

【0063】

この試験の結果を図2の左側(「本検出法」)に示す。また、比較対象方法として、tuf遺伝子の保存領域を利用した従来公知のマルチプレックスリアルタイム定量PCR法(非特許文献1)を実施した。その結果を図2の右側(「参考論文記載の検出法」)に示す。これらの結果から、本発明の検出法は、類似する従来検出法と比較して、同等か又は

10

20

30

40

50

それより優れた検出感度が得られることが示された。例えば、比較対象方法では、5 cfu / reactionのマイコプラズマ・フェルメンタンスを3サンプルとも検出できなかったが(0 / 3)、本発明の検出法では、3サンプルとも検出することができた(3 / 3)。また、本発明の検出法では、マイコプラズマ・ガリセプティカム、マイコプラズマ・オラレ、マイコプラズマ・シノビアエ、アコレプラズマ・レイドラウィイ及びスピロプラズマ・シトリに対して、比較対象方法よりも格段に優れた検出感度が得られることが示された。

【実施例3】

【0064】

[マイコプラズマ以外の細菌との交差反応性の確認]

本発明のマルチプレックスリアルタイム定量PCR法におけるフォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブについて、マイコプラズマ以外の他の種類の細菌、真菌及び哺乳類由来細胞に対する交差反応性を確認した。かかる他の種類の細菌等として、図3に列挙された細菌等について、実施例2の方法と同様の方法で本発明のマルチプレックスリアルタイム定量PCR法を行ったところ、蛍光プローブのシグナルは検出されなかった。このように、図3に列挙された細菌、真菌及び哺乳類由来細胞に対する交差反応性は否定された。また、この他に、*Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis*、*Bartonella bacilliformis*、*Bartonella grahamii*、*Borrelia duttonii*、*Borrelia recurrentis*、*Campylobacter curvus*、*Campylobacter hominis*、*Chlamydia muridarum*、*Chlamydia trachomatis*、*Chlamydophilia pneumonia*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Fusobacterium necrophorum*、*Haemophilus influenza*、*Helicobacter pylori*、*Kineococcus radiotolerans*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus helveticus*、*Listeria monocytogenes*、*Listeria welshimeri serovar6b str*、*Micrococcus luteus*、*Moraxella catarrhalis*、*Moraxella lacunata*、*Mycobacterium gilvum*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis alpha 14*、*Nocardia carnea*、*Nocardia farcinica*、*Pediococcus pentosaceus*、*Pseudomonas putida*、*Rhodococcus jostii*、*Rickettsia africae*、*Rickettsia peacockii*、*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus suis*、*Streptococcus thermophilus*、*Treponema denticola*、*Treponema pallidum*について、公知の配列データベースから入手したそれらの細菌の遺伝子配列情報と、本発明のフォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブの配列とを比較した結果、これらの細菌は、本発明のマルチプレックスリアルタイム定量PCR法における、マイコプラズマに対する交差反応性が否定されると推定された。図3に示されるように、本発明のマルチプレックスリアルタイム定量PCR法は、マイコプラズマ以外のきわめて多種の細菌等に対して交差反応性がない、あるいはないと推定され、マイコプラズマに対する特異性がきわめて高いことが示された。

【実施例4】

【0065】

[バリエーションプライマーの感度及び交差反応性の確認]

F1フォワードプライマー、R1リバースプライマー、あるいはこれらを改変したバリエーションプライマーについて、マイコプラズマ検出の感度、及び、ラクトバチルス・ブルガリクス(*Lactobacillus bulgaricus*)に対する交差反応性の確認を試みた。

【0066】

また、F1フォワードプライマーのバリエーションとして、以下の表2記載のフォワードプライマーを設計し、オリゴヌクレオチド合成装置により合成した。なお、これらのバリエーションのプライマーのヌクレオチド数や、F1フォワードプライマーとの関係(F1フォワードプライマーに対して、5'末端側又は3'末端側に、何ヌクレオチド延伸又は短縮したか)を以下の表に示す。

【0067】

10

20

30

40

【表 2】

バリエーションの フォワードプライ マーの名称	配列番号	ヌクレオチド数	F 1 フォワードプライマーとの関係
M 1	5	1 9	5' 末端側を 1 ヌクレオチド短縮 3' 末端側を 1 ヌクレオチド延伸
T F	6	1 9	5' 末端側を 2 ヌクレオチド延伸 3' 末端側を 2 ヌクレオチド短縮
M y T F - 1	7	2 0	5' 末端側を 1 ヌクレオチド短縮 3' 末端側を 2 ヌクレオチド延伸
M y T F - 2	8	2 1	5' 末端側を 1 0 ヌクレオチド延伸 3' 末端側を 8 ヌクレオチド短縮
M y T F - 3	9	2 2	5' 末端側を 8 ヌクレオチド延伸 3' 末端側を 5 ヌクレオチド短縮
M y T F - 4	1 0	2 2	5' 末端側を 1 0 ヌクレオチド延伸 3' 末端側を 7 ヌクレオチド短縮
M y T F - 5	1 1	1 9	5' 末端側を 4 ヌクレオチド延伸 3' 末端側を 4 ヌクレオチド短縮
M y T F - 6	1 2	2 1	5' 末端側を 3 ヌクレオチド延伸 3' 末端側を 1 ヌクレオチド短縮

10

20

30

【 0 0 6 8 】

また、R 1 リバースプライマーのバリエーションとして、以下の表 3 記載のリバースプライマーを設計し、オリゴヌクレオチド合成装置により合成した。なお、これらのバリエーションのプライマーのヌクレオチド数や、R 1 リバースプライマーとの関係（R 1 リバースプライマーに対して、5' 末端側又は 3' 末端側に、何ヌクレオチド延伸又は短縮したか）を以下の表 3 に示す。

【 0 0 6 9 】

【表 3】

バリエーションの リバースプライマ ー名称	配列番号	ヌクレオチド数	R 1 リバースプライマーとの関係
M6-2	2 2	2 2	5' 末端側における延伸、短縮無し 3' 末端側を 1 ヌクレオチド短縮
TR	2 3	1 8	5' 末端側における延伸、短縮無し 3' 末端側を 5 ヌクレオチド短縮
TR-2	2 4	1 8	5' 末端側を 2 ヌクレオチド短縮 3' 末端側を 3 ヌクレオチド短縮

10

【 0 0 7 0 】

上記の F 1 フォワードプライマーやそのバリエーションプライマー、あるいは、上記の R 1 リバースプライマーのバリエーションプライマーの各配列の位置関係を図 4 に示す。なお、図 4 における移動度とは、基準となるプライマー（フォワードプライマーの場合は F 1、リバースプライマーの場合は R 1）の 3' 末端のヌクレオチドに対して、バリエーションプライマーの 3' 末端のヌクレオチドの位置がどちら側に何ヌクレオチド移動したかを表している。例えば、M 1 フォワードプライマーは、F 1 フォワードプライマーの 3' 末端側のヌクレオチドを 1 つ延伸しているため、移動度「+ 1」となり、MyTF-6 フォワードプライマーは、F 1 フォワードプライマーの 3' 末端側のヌクレオチドを 1 つ短縮しているため、移動度「- 1」となる。

20

【 0 0 7 1 】

F 1 フォワードプライマー及びそのバリエーションプライマーと、R 1 リバースプライマー及びそのバリエーションプライマーとの全ての組合せ（以下の表 4 参照）について、本発明のマルチプレックスリアルタイム定量 PCR 法（上記実施例 2 参照）を行った。その際、細菌としては、マイコプラズマ・ゲニタリウム（約 10^6 cfu / reaction）や、ラクトバチルス・ブルガリクス（約 10^6 cfu / reaction）を用い、蛍光プローブとしては、P 1 - 1, P 1 - 2, P 1 - 3, P 1 - 4 及び P 2 を混合したものを用いた。また、ネガティブコントロールには、Distilled Water Deionized, Sterile（ニッポンジーン社製）を用いた。

30

【 0 0 7 2 】

【表 4】

Forward	F1				M1				TF				MyTF-1			
Reverse	M6-2	TR	TR-2	R1	M6-2	TR	TR-2	R1	M6-2	TR	TR-2	R1	M6-2	TR	TR-2	R1
Forward	MyTF-2				MyTF-3				MyTF-4				MyTF-5			
Reverse	M6-2	TR	TR-2	R1	M6-2	TR	TR-2	R1	M6-2	TR	TR-2	R1	M6-2	TR	TR-2	R1
Forward	MyTF-6															
Reverse	M6-2	TR	TR-2	R1												

40

【 0 0 7 3 】

50

このマルチプレックスリアルタイム定量PCR試験における各サンプルの検出結果を図5に示す。未検出の場合は「-」で表し、検出の場合はc t値を示した。c t値とは、PCR増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数であり、c t値が小さいほどその対象をより高感度で検出していることを表す。図5の結果から分かるように、フォワードプライマーとして、M1、F1、TF、MyTF-1、MyTF-5を用いた場合は、リバースプライマーとしてM6-2、TR、TR-2、R1のいずれを用いた場合であっても、マイコプラズマではないラクトバチルス・ブルガリクスを検出することはなく、マイコプラズマ・ゲニタリウムを高感度で検出した。一方、フォワードプライマーとしてMyTF-3、MyTF-4、MyTF-6を用いた場合は、リバースプライマーとしてM6-2、TR-2、R1を用いた際にはラクトバチルス・ブルガリクスを検出することはなかったが、リバースプライマーとしてTRを用いた場合は、ラクトバチルス・ブルガリクスと交差反応性を示した。ただし、MyTF-3、MyTF-4、MyTF-6の3種のフォワードプライマーの中では、ラクトバチルス・ブルガリクスに対するMyTF-6のc t値は比較的高く(42.25)、MyTF-6はこれら3種のフォワードプライマーの中ではラクトバチルス・ブルガリクスに対する交差反応性が最も低かった。また、フォワードプライマーとしてMyTF-2を用いた場合は、リバースプライマーとしてM6-2を用いた際にはラクトバチルス・ブルガリクスを検出することはなかったものの、リバースプライマーとしてTR、TR-2、R1を用いた場合は、ラクトバチルス・ブルガリクスと交差反応性を示した。

10

【0074】

20

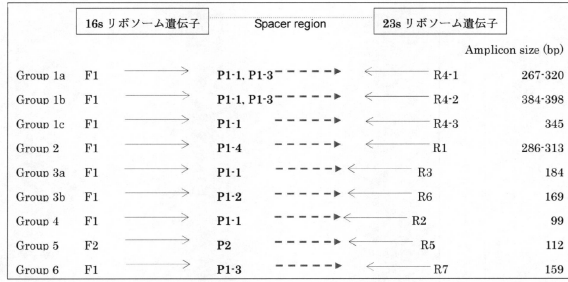
以上の図5の結果から、フォワードプライマーとしては、F1、M1、TF、MyTF-1、MyTF-5及びMyTF-6が好ましく、中でも、F1フォワードプライマー、MyTF-1フォワードプライマー、MyTF-5フォワードプライマーがより好ましいことが示された。

【産業上の利用可能性】**【0075】**

本発明によれば、より多種のマイコプラズマを、より迅速・簡便・高感度・高精度に検出できるマイコプラズマの検出方法や、かかる検出のためのフォワードプライマーとリバースプライマーとプローブのセットや、キットを提供することができる。本発明は、生物由来医薬品や再生医療や細胞治療のための細胞培養の現場におけるマイコプラズマ汚染の検出の他、マイコプラズマ感染症の診断などにも利用することができる。

30

【図1】



各グループの代表例

Group 1a: *M. orale*, Group 1b: *M. fermentans*, Group 1c: *M. hyorhinis*,

Group 2: *M. pneumoniae*, Group 3a: *M. gallisepticum*, Group 3b: *U. urealyticum*,

Group 4: *A. laidlawii*, Group 5: *S. citri*, Group 6: *M. synoviae*

Group	Forward primer	Probe	Reverse primer	Mollicutes species
Group 1a	F1	P1-1,P1-3	R4-1	<i>M. arginini</i> , <i>M. buccale</i> , <i>M. faucium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. salivarium</i>
Group 1b	F1	P1-1,P1-3	R4-2	<i>M. fermentans</i> , <i>M. lipophilum</i> , <i>M. primatum</i>
Group 1c	F1	P1-1	R4-3	<i>M. hyorhinis</i>
Group 2	F1	P1-4	R1	<i>M. genitalium</i> , <i>M. pneumoniae</i>
Group 3a	F1	P1-1	R3	<i>M. gallisepticum</i>
Group 3b	F1	P1-2	R6	<i>U. urealyticum</i>
Group 4	F1	P1-1	R2	<i>A. laidlawii</i>
Group 5	F2	P2	R5	<i>S. citri</i>
Group 6	F1	P1-3	R7	<i>M. synoviae</i>

【図2】

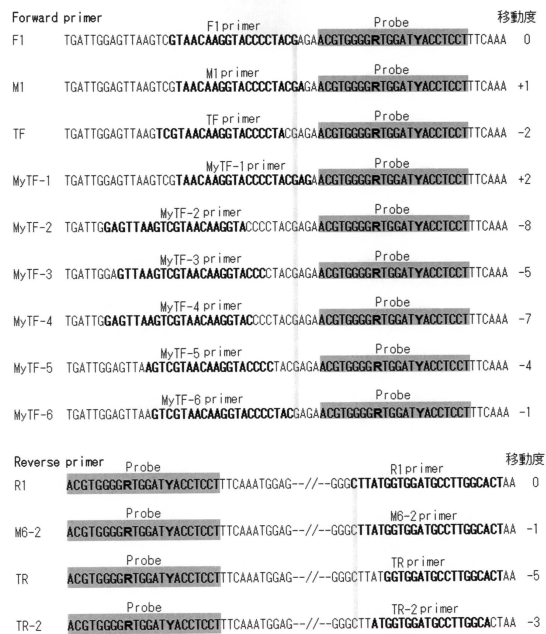
	cfu/reaction	本検出法	参考文献記載の検出法
<i>Mycoplasma arginini</i>	1000	3/3	3/3
	100	3/3	3/3
	10	3/3	3/3
	5	3/3	3/3
<i>Mycoplasma fermentans</i>	1000	3/3	3/3
	100	3/3	3/3
	10	3/3	3/3
	5	3/3	0/3
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	1000	3/3	0/3 (10 ⁵ のみ3/3)
	100	3/3	0/3
	10	3/3	0/3
	5	3/3	0/3
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	1000	3/3	3/3
	100	3/3	3/3
	10	3/3	3/3
	5	3/3	3/3
<i>Mycoplasma orale</i>	1000	3/3	3/3
	100	3/3	3/3
	10	3/3	0/3
	5	3/3	0/3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1000	3/3	3/3
	100	3/3	3/3
	10	3/3	3/3
	5	3/3	3/3
<i>Mycoplasma synoviae</i>	1000	3/3	3/3
	100	3/3	3/3
	10	3/3	1/3
	5	3/3	0/3
<i>Ascholesplasma laidlawii</i>	1000	3/3	0/3 (10 ⁵ のみ3/3)
	100	3/3	0/3
	10	3/3	0/3
	5	3/3	0/3
<i>Synglaxia citri</i>	1000	3/3	0/3
	100	3/3	0/3
	10	3/3	0/3
	5	3/3	0/3

【図3】

Bacterial genome DNA	Fungal genome DNA	Mammal cells
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Brevibacterium brevis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Human T lymphocyte
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Mouse T lymphocyte
<i>Clostridium kluyveri</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	Raji cell
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CHO DG44
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptomyces avermiltis</i>	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>		
<i>Lactobacillus casei</i>		
<i>Lactobacillus gasseri</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Multiplex qPCR法で交差反応を示さなかった細菌、真菌及び哺乳類由来細胞

【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 M 1/00 A

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100145920

弁理士 森川 聡

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72)発明者 清水 則夫

東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内

(72)発明者 高橋 秀行

東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 特開平04-004899(JP,A)

国際公開第2005/078102(WO,A1)

特開平06-098800(JP,A)

韓国公開特許第10-2009-0081039(KR,A)

特開平05-000088(JP,A)

STAKENBORG, T., et al., Vet. Res. Commun., 2006年, vol.30, issue 3, p.239-247

FRAGA, AP., et al., Braz. J. Microbiol., 2013年, vol.44, no.2, p.505-510

高橋秀行ほか, マルチプレックスqPCR法による新規マイコプラズマ検査法の開発, 再生医療, 2014年 1月, vol.13, 増刊号, p.357(P-2-190)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 6 8 9

C 1 2 Q 1 / 6 8 4 4

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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

WPIDS/WPIX(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq