

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/097323

発行日 平成21年7月16日 (2009. 7. 16)

(43) 国際公開日 **平成19年8月30日 (2007. 8. 30)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

出願番号 特願2008-501721 (P2008-501721)	(71) 出願人 305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福3190
(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/053078	
(22) 国際出願日 平成19年2月20日 (2007. 2. 20)	
(31) 優先権主張番号 特願2006-43469 (P2006-43469)	(74) 代理人 100114074 弁理士 大谷 嘉一
(32) 優先日 平成18年2月21日 (2006. 2. 21)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 仁井見 英樹 富山県富山市杉谷2630 富山大学附属 病院内
(31) 優先権主張番号 特願2006-278371 (P2006-278371)	(72) 発明者 北島 勲 富山県富山市杉谷2630 富山大学附属 病院内
(32) 優先日 平成18年10月12日 (2006. 10. 12)	Fターム(参考) 4B024 AA13 CA02 CA04 CA09 CA11 HA12
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	4B063 QA19 QQ42 QQ52 QR55 QR62 QS34

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染症起因菌の迅速同定方法

(57) 【要約】

【課題】

感染症起因菌、とりわけ敗血症の起因菌を迅速に検出・同定し、適切な抗菌薬を選択するシステムを提供すること。

【解決手段】

本発明は、リアルタイムPCRなどの遺伝子増幅を行い、遺伝子増幅産物の融解曲線分析により求めた融解温度(T_m値)の組合せ、或いは各T_m値間の差の組合せを解析することにより起因菌の検出・同定を迅速に行う方法である。

具体的には細菌の16SリボソームRNAに1~7つ、真菌の18SリボソームRNAに1~6つ、MRS A特異的なspa遺伝子およびmecA遺伝子に各1つ、計4~16

10

。本発明の方法により、感染症起因菌、とりわけ敗血症の起因菌を迅速に検出・同定することができ、敗血症の迅速診断法と敗血症治療におけるEvidence-based Medicineが可能となる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

微生物の DNA を抽出し、これを鋳型として、以下の (B)、(F)、(M) のプライマーセットで遺伝子増幅を行い、次いで、微生物に特異的な融解温度 (T_m 値) の組み合わせを解析することを特徴とする感染症起因菌の同定方法。

(B) 全ての細菌の 16 S r R N A 遺伝子の複数領域を増幅できるプライマーセット、および各プライマー塩基配列の全部または一部を含むプライマー。

(F) 全ての真菌の 18 S r R N A 遺伝子の複数領域を増幅できるプライマーセット、および各プライマー塩基配列の全部または一部を含むプライマー。

(M) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の S p a 遺伝子および m e c A 遺伝子を実験的に増幅するプライマーセット。 10

【請求項 2】

遺伝子増幅が P C R である請求の範囲 1 記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項 3】

P C R がリアルタイム P C R である請求の範囲 2 記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項 4】

細菌の 16 S r R N A 遺伝子の増幅領域が 1 ~ 7 つである請求の範囲 1 ~ 3 のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項 5】

真菌の 18 S r R N A 遺伝子の増幅領域が 1 ~ 6 つである請求の範囲 1 ~ 4 のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。 20

【請求項 6】

標準コントロールとして、一定濃度の *E. coli* 標準株 DNA をテンプレートとし、

(B) 全ての細菌の 16 S r R N A 遺伝子の複数領域を増幅できるプライマーセット、および各プライマー塩基配列の全部または一部を含むプライマーセットのいずれか 1 つを用いて標準 T_m 値を毎回測定することにより、測定機器による T_m 値の誤差を補正する方法が付加された請求の範囲 1 ~ 5 のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項 7】

感染症起因菌同定のアルゴリズムとして、T_m 値そのものの組合せだけでなく、各 T_m 値間の差の組合せを利用して同定することで、測定誤差の影響を最小限とする方法が付加された請求の範囲 1 ~ 6 のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。 30

【請求項 8】

微生物が敗血症の起因菌である請求の範囲 1 ~ 7 のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項 9】

未知の微生物 DNA を抽出し、これを鋳型として、[1] 真菌の 18 S r R N A 遺伝子の複数領域を増幅できるプライマーセットで遺伝子増幅を行い、真菌に特異的な融解温度 (T_m 値) を解析し、次いで、[2] メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の S p a 遺伝子および m e c A 遺伝子を実験的に検出するプライマーセットで遺伝子増幅を行い、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に特異的な融解温度 (T_m 値) を解析し、次いで、[3] 細菌の 16 S r R N A 遺伝子の複数領域を増幅できるプライマーセットで遺伝子増幅を行い、細菌に特異的な融解温度 (T_m 値) を解析して、それぞれの T_m 値の組合せ、或いは標準 T_m 値を含めた各 T_m 値間の差の組合せを解析することを特徴とする感染症起因菌の同定方法。 40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、感染症、特に敗血症の早期治療実現のため、起因菌を迅速に検出・同定する方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

10

20

30

40

50

敗血症は重篤な全身感染症で、確定診断には血液中の起因微生物の検出・同定が必須である。

近年、癌治療や臓器移植など医療の高度化に伴い、敗血症発症のリスクの高い重症患者が増えている。

また、院内感染の観点からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)をはじめとする多剤耐性菌が敗血症の起因菌となることも多く、適切な抗菌薬を選択し患者を救命するためには、血液中の起因菌を可能な限り迅速に検出・同定することが臨床上重要である。

しかし現在の細菌学的検出法では、血液培養ボトルの提出から細菌の同定までに少なくとも18時間はかかるため、結果が判明するまでの間は経験に基づく治療(empiric therapy)を施行せざるを得なく、盲目的に抗菌薬の選択を余儀なくされていることが臨床的現状である。

その結果、広域スペクトルの抗菌薬使用による多剤耐性菌の出現や、不適切な抗菌薬選択により敗血症患者を救命できない事態が生じている。

一方、敗血症起因菌DNAの痕跡をPCR(polymerase chain reaction)により増幅し、増幅された起因菌DNAを、経験的に想定した菌に標的を定めた菌種固有のヌクレオチドプローブとハイブリッド形成させ、起因菌を検出・同定する試みがなされた(特許文献1)。

さらに、検出・同定の迅速性を求めて、リアルタイムPCRによる技術が開発されている(非特許文献1)。

【0003】

【特許文献1】特開平6-90799号公報

【非特許文献1】生物試料分析, Vol. 28, No 5. (2005), 400-404

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

非特許文献1の敗血症検査法は、ハイブリダイゼーションプローブを用いたリアルタイムPCRを基本原理としている。

しかし、該方法では、菌種それぞれに特異的なハイブリダイゼーションプローブを作製する必要があり、数多くの起因菌を同定するためには際限なくハイブリダイゼーションプローブを用意しなければならない。

つまり、検出する菌種の数には用意するプローブの数に依存するため、広範な菌種の同定は現実的に不可能である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、最近接塩基法の「融解温度(melting temperature: Tm値)は塩基配列で決まる」という理論的根拠を元に、菌種毎のTm値の違いを起因菌同定に応用することについて鋭意研究した結果、本発明を完成するに至った。

本発明は、微生物のDNAを抽出し、これを鋳型として、特定のプライマーセットを使用してPCRなどで遺伝子増幅を行い、次いで、微生物に特異的な融解温度(Tm値)の組合せ、或いは各Tm値間の差を解析することにより起因菌の検出・同定を迅速に行う方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 細菌の16SrRNAは、ほぼ全ての細菌に共通の塩基配列領域(20~40塩基)を7~8ヶ所もつことが知られている。

その全て或いは一部の箇所にフォワードとリバースのプライマーをそれぞれ設定することにより、1~7つの遺伝子増幅領域を作製する。

(2) 遺伝子増幅領域は、約150~200塩基であり、プライマーを設定した共通保存領域以外は、それぞれの細菌に固有の塩基配列を持つ。

従って、Tm値も塩基配列の違いを反映して固有の値を示し、細菌毎に1~7種類の特徴的なTm値を持つことが推定される。

10

20

30

40

50

それ故、細菌の種類に応じた1～7つのTm値を調べ、データベース化する。

このデータベースを利用して未知の細菌を同定することができる。

(3) さらに、真菌に固有のプライマーを1～6つ、MRSA同定の為のspa、mecAのプライマーを併用することで、未知の起因菌に対し、細菌感染とその種類(MRSA含む)、或いは真菌感染とその種類を同定出来る。

(4) 非特異的な遺伝子産物が生じ、目的のTm値に近い値を示す場合、擬陽性のリスクが生じる。

そのような場合、遺伝子増幅後の増幅産物をアガロース・ゲルに流してバンドの大きさを確認することで、結果を二重にチェックすることが出来る。

すなわち、従来の遺伝子増幅による検出法で二重チェックするシステムを採用することで検査精度の向上が図れる。

(5) 遺伝子増幅方法としてリアルタイムPCRを採用した場合、その定量性を利用して、菌量を治療前後で相対定量することで、治療効果のモニタリングの向上を図ることが出来る。

(6) リアルタイムPCR機器には、ヒートブロックで温度制御するブロック型と、空気を介して温度制御するエアバス型の2種類あるが、試行回毎にヒートブロック型で±0.1～0.3 (メーカーで異なる)、エアバス型で±0.4のTm値測定誤差が生じる(同じ試行回ではサンプル間誤差は±0.2程)。

この測定誤差で菌種同定が妨げられないように、同じ試行回の各Tm値間の差異パターンを判定に利用する方法を採用することが好ましい。

【0006】

本発明に使用されるプライマー以下のとおりである。

<組み合わせグループ1>

全ての細菌の16SrRNA遺伝子に共通な配列部位から5カ所を選び、フォワードプライマーとリバースプライマーを設定する。

具体的には以下のプライマーの塩基配列の全部または一部を含むプライマー、(B1)大腸菌(E. coli)の16SrRNA遺伝子(配列番号1)の809番目から905番目に相当する97塩基のDNAを増幅するプライマーセット(bacteria primer 1: Bac. 1)。

配列番号2. GATTAGATACCCCTGGTAGTCCACG (24mer) フォワード

配列番号3. CCCGTCAATTCTTTGAGTTT (21mer) リバース

(B2)大腸菌(E. coli)の16SrRNA遺伝子の927番目から1092番目に相当する166塩基のDNAを増幅するプライマーセット(bacteria primer 2: Bac. 2)。

配列番号4. AAACTCAAAGGAATTGACGGG (21mer) フォワード

配列番号5. CGCTCGTTGCGGGAC (15mer) リバース

(B3)大腸菌(E. coli)の16SrRNA遺伝子の1108番目から1218番目に相当する111塩基のDNAを増幅するプライマーセット(bacteria primer 3: Bac. 3)。

配列番号6. GTCCCGCAACGAGCG (15mer) フォワード

配列番号7. ATTGTAGCACGTGTGTAGCCC (21mer) リバース

(B4)大腸菌(E. coli)の16SrRNA遺伝子の1240番目から1369番目に相当する130塩基のDNAを増幅するプライマーセット(bacteria primer 4: Bac. 4)。

配列番号8. GGGCTACACACGTGCTACAAT (21mer) フォワード

10

20

30

40

50

配列番号 9 . C C G G G A A C G T A T T C A C C (1 7 m e r) リバース

【 0 0 0 7 】

全ての真菌の 1 8 S r R N A 遺伝子に共通な配列部位を選び 1 組の由来するフォワードプライマーとリバースプライマーを設定する。

具体的には以下のプライマーの塩基配列の全部または一部を含むプライマー、

(F 1) 真菌の 1 8 S r R N A 遺伝子のプライマーセット (f u n g i p r i m e r : F u n g i)

配列番号 1 0 . G A A T G A G T A C A A T G T A A A T A C C T T A A C G (2 8 m e r) フォワード

配列番号 1 1 . T A A C T G C A A C A A C T T T A A T A T A C G C (2 5 m e r) リバース

10

【 0 0 0 8 】

M R S A の S p a 遺伝子および m e c A 遺伝子のプライマーは、L i g h t C y c l e r P r o b e D e s i g n 2 ソフトウェアを用い、最もスコアが高いプライマーデザインを選定する。

具体的には、

(M 1) M R S A の S p a 遺伝子のプライマーセット (s p a p r i m e r : s p a) 。

配列番号 1 2 . T G A A C G A A G A A C A A C G C A A T (2 0 m e r) フォワード

20

配列番号 1 3 . T T T G C T C A C T G A A G G A T C G T C (2 1 m e r) リバース

(M 2) M R S A の m e c A 遺伝子のプライマーセット (m e c A p r i m e r : m e c A)

配列番号 1 4 . A T T A T A A A G C A A T C G C T A A A G A A C T A A G T A (3 0 m e r) フォワード

配列番号 1 5 . C C A A T A A C T G C A T C A T C T T T A T A G C C (2 6 m e r) リバース

【 0 0 0 9 】

< 組み合わせグループ 2 >

30

全ての細菌の 1 6 S r R N A 遺伝子に共通な配列部位から 1 0 カ所を選び、フォワードプライマーとリバースプライマーを設定する。

具体的には以下のプライマーの塩基配列の全部または一部を含むプライマー、

(B 5) 大腸菌 (E . c o l i) の 1 6 S r R N A 遺伝子の 8 番目から 3 4 5 番目に相当する 3 3 8 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (b a c t e r i a p r i m e r 5 : B a c . 5) 。

配列番号 1 7 . A G A G T T T G A T C A T G G C T C A G (2 0 m e r) フォワード

配列番号 1 8 . C G T A G G A G T C T G G A C C G T (1 8 m e r) リバース

(B 6) 大腸菌 (E . c o l i) の 1 6 S r R N A 遺伝子の 3 3 6 番目から 5 3 4 番目に相当する 1 9 9 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (b a c t e r i a p r i m e r 6 : B a c . 6) 。

40

配列番号 1 9 . G A C T C C T A C G G G A G G C A (1 7 m e r) フォワード

配列番号 2 0 . T A T T A C C G C G G C T G C T G (1 7 m e r) リバース

(B 7) 大腸菌 (E . c o l i) の 1 6 S r R N A 遺伝子の 5 1 9 番目から 8 0 5 番目に相当する 2 8 7 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (b a c t e r i a p r i m e r 7 : B a c . 7) 。

配列番号 2 1 . A G C A G C C G C G G T A A T A (1 6 m e r) フォワード

配列番号 2 2 . G G A C T A C C A G G G T A T C T A A T C C T (2 3 m e r)

リバース

50

(B8) 大腸菌 (*E. coli*) の 16S rRNA 遺伝子の 780 番目から 960 番目に相当する 181 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (bacteria primer 8 : Bac. 8)。

配列番号 23 . AACAGGATTAGATACCCCTGGTAG (23mer) フォワード

配列番号 24 . AATTA AACACATGCTCCACC (21mer) リバース

(B9) 大腸菌 (*E. coli*) の 16S rRNA 遺伝子の 951 番目から 1070 番目に相当する 120 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (bacteria primer 9 : Bac. 9)。

10

配列番号 25 . TGGTTTAATTTCGATGCAACGC (21mer) フォワード

配列番号 26 . GAGCTGACGACAGCCAT (17mer) リバース

(B10) 大腸菌 (*E. coli*) の 16S rRNA 遺伝子の 1084 番目から 1192 番目に相当する 109 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (bacteria primer 10 : Bac. 10)。

配列番号 27 . TTGGGTTAAGTCCCGC (16mer) フォワード

配列番号 28 . CGTCATCCCCACCTTC (16mer) リバース

(B11) 大腸菌 (*E. coli*) の 16S rRNA 遺伝子の 1220 番目から 1385 番目に相当する 166 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (bacteria primer 11 : Bac. 11)。

20

配列番号 29 . GGCTACACACGTGCTACAAT (20mer) フォワード

配列番号 30 . CCGGGAACGTATTCAACC (17mer) リバース

【0010】

真菌の 18S rRNA 遺伝子に共通な配列部位から 7ヶ所を選び、フォワードプライマーとリバースプライマーを設定する。

具体的には以下のプライマーの塩基配列の全部または一部を含むプライマー、

(F2) カンジダ菌 (*C. Albicans*) の 18S rRNA 遺伝子 (配列番号 16) の 149 番目から 407 番目に相当する 259 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (fungi primer 2 : Fungi 2)

30

配列番号 31 . GTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC (26mer) フォワード

配列番号 32 . GGTAGCCGTTTCTCAGG (17mer) リバース

(F3) カンジダ菌 (*C. Albicans*) の 18S rRNA 遺伝子の 390 番目から 551 番目に相当する 162 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (fungi primer 3 : Fungi 3)

配列番号 33 . GCCTGAGAAACGGCTACCA (19mer) フォワード

配列番号 34 . CCTCCAATTGTTCTCTCGTTAAG (22mer) リバース

40

(F4) カンジダ菌 (*C. Albicans*) の 18S rRNA 遺伝子の 531 番目から 762 番目に相当する 232 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (fungi primer 4 : Fungi 4)

配列番号 35 . TTAACGAGGAACAATTGGAGGG (22mer) フォワード

配列番号 36 . GCCTGCTTTGAACACTCTAATTT (23mer) リバース

(F5) カンジダ菌 (*C. Albicans*) の 18S rRNA 遺伝子の 989 番目から 1134 番目に相当する 146 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (fungi primer 5 : Fungi 5)

50

配列番号 37 . A T A C C G T C G T A G T C T T A A C C A (2 1 m e r) フォワード

配列番号 38 . G T C A A T T C C T T T A A G T T T C A G C C T (2 4 m e r) リバース

(F 6) カンジダ菌 (C . A l b i c a n s) の 1 8 S r R N A 遺伝子の 1 2 6 0 番目から 1 4 2 8 番目に相当する 1 6 9 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (f u n g i p r i m e r 6 : F u n g i 6)

配列番号 39 . C A T G G C C G T T C T T A G T T G G (1 9 m e r) フォワード

配列番号 40 . G G G C A T C A C A G A C C T G T T (1 8 m e r) リバース
(F 7) カンジダ菌 (C . A l b i c a n s) の 1 8 S r R N A 遺伝子の 1 4 1 4 番目から 1 6 3 0 番目に相当する 2 1 7 塩基の DNA を増幅するプライマーセット (f u n g i p r i m e r 7 : F u n g i 7)

配列番号 41 . A G G T C T G T G A T G C C C T T A G (1 9 m e r) フォワード

配列番号 42 . C G G G C G G T G T G T A C A A A (1 7 m e r) リバース

【 0 0 1 1 】

M R S A の S p a 遺伝子および m e c A 遺伝子のプライマーは、 L i g h t C y c l e r P r o b e D e s i g n 2 ソフトウェアを用い、最もスコアが高いプライマーデザインを選定する。

具体的には、

(M 3) M R S A の S p a 遺伝子のプライマーセット (s p a p r i m e r 2 : s p a 2) 。

配列番号 43 . T A A A C G A T G C T C A A G C A C C A A (2 1 m e r) フォワード

配列番号 44 . G G T T T A A C G A C A T G T A C T C C G (2 1 m e r) リバース

(M 4) M R S A の m e c A 遺伝子のプライマーセット (m e c A p r i m e r 2 : m e c A 2)

配列番号 45 . C A A A C T A C G G T A A C A T T G A T C G C (2 3 m e r) フォワード

配列番号 46 . A T G T A T G C T T T G G T C T T T C T G C (2 2 m e r) リバース

【 0 0 1 2 】

本発明の遺伝子増幅の方法として、 P C R 法が好ましく、さらにリアルタイム P C R 法が好ましい。

本発明に使用されるリアルタイム P C R は、二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬 (インターカレーター) を P C R 反応系に加えるインターカレーター法である。

インターカレーターとして、エジチジウムブロマイド、サイバー・グリーン I (S Y B R G r e e n I) などが挙げられる。

好ましいインターカレーターは、サイバー・グリーン I である。

尚、本発明で使用するプライマーは全てのバクテリア DNA に反応する為、使用すべきサイバー・グリーン I は、組換え宿主由来のバクテリア DNA 混入を最小限に抑えた高純度のサイバーグリーン I を使用すべきである。

【 0 0 1 3 】

本発明において、 T m 値とは、 P C R 産物の 5 0 % がその相補鎖と解離する時の温度である。

また、最近接塩基法による T m 値計算式の「 T m 値は塩基配列で決まる」という理論的根拠を元に、菌種ごとの塩基配列の違いを T m 値の違いとして起因菌同定に応用することができる。

10

20

30

40

50

従って、「 T_m 値から測定誤差の影響を排除する」ことが正確に同定する上で最も重要となる。このため、以下の方法で測定誤差の影響を排除する。

先ず、 T_m 値は緩衝液の組成などが異なる実験条件下では変化するため、塩化マグネシウム濃度の固定されたサイバー・グリーンIを反作用緩衝液として使用することで、反応液の組成による測定誤差を生じないようにする。

次に、リアルタイムPCR機器自体が試行回毎に測定誤差を生じるため、コントロールとしての標準 T_m 値を設定すると共に、同じ試行回での各 T_m 値間の差異パターンを判定に利用する。

【0014】

本発明において、測定機器の試行間誤差を補正する目的で、基準 T_m 値を使用することができる。 10

具体的には、テンプレートとして一定濃度の*E. coli*標準株のDNAを用い、細菌の16S rRNA遺伝子の一領域を増幅する1つのプライマーセットを使用して毎回 T_m 値を測定し、試行回毎の T_m 値のズレを補正する。

すなわち、同じテンプレートに同じプライマーの組み合わせであれば、理論的には毎回同じ T_m 値となる。

しかし、実際に得られた T_m 測定値がズレた場合、それは試行間誤差となるので、そのズレ分だけ補正を行えばよい。

【0015】

本発明の方法の手順は以下のとおりである。 20

(1) 微生物のDNAを抽出する。

(2) 抽出した未知の微生物DNAに対し、以下の細菌、MRSA、および真菌のプライマーセットを用いて遺伝子増幅後、それぞれの T_m 値を一時に測定し、細菌、MRSA、および真菌の T_m 値の組合せを得る。

(3) 真菌であるか否か。

[上記(2)の T_m 値の組合せの中で、全ての真菌の18S rRNA遺伝子の一領域～複数領域を増幅できるプライマーセットを用いて得た真菌に特異的な T_m 値を先ず解析することで、真菌であるか否か、或いは真菌の種類を判定する。]

(4) MRSAであるか否か。

[上記(2)の T_m 値の組合せの中で、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)のSpa遺伝子およびmecA遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットを用いて得たMRSAに固有の遺伝子増幅を解析することで、MRSAであるか否かを判定する。] 30

(5) どの細菌であるか絞り込む

[上記(2)の T_m 値の組合せの中で、全ての細菌の16S rRNA遺伝子の複数領域を増幅できるプライマーセットを用いて得た細菌に特異的な T_m 値を解析することで、細菌の種類を同定する。]

細菌の絞り込みは、具体的には、細菌の T_m 値の一つに注目して(場合によっては、標準 T_m 値で先ず補正する)、その T_m 値に値の近い菌種に範囲を狭め、順次 T_m 値の差を取って絞り込む、または、直接、標準 T_m 値を含む、各 T_m 値間の差をとって、その差の組み合わせをフィンガープリントとして同定する。 40

また、起因菌が細菌か、真菌か、あるいはMRSAであるかを迅速、簡便に同定する方法としては、 T_m 値を利用しなくても未知の微生物DNAを抽出し、これを鋳型として、[1]真菌の18S rRNA遺伝子の全ての真菌に共通、且つ真菌特異的に検出するプライマー1つ、[2]メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のSpa遺伝子およびmecA遺伝子の特異的に検出するプライマー各々1つずつ、[3]細菌の16S rRNA遺伝子の全ての細菌に共通、且つ細菌特異的に検出するプライマー1つ、の計4つのプライマーでPCRを行い、アガロース・ゲルに電気泳動して目的サイズのバンドを確認する方法がある。

【発明の効果】

【0016】

(1) 4～18個、好ましくは4～16個のプライマーセットを元にリアルタイムPCR 50

Rなどの遺伝子増幅を実施し、得られるTm値をデータベースと照合することにより、抗菌薬選択に必要な起因菌の菌種同定が出来る。

(2) 血液検体の場合、DNA抽出からTm値の解析、そして同定までに要する時間は約2時間であり、迅速診断が可能となる。

(3) DNAを抽出する血液検体の量を一定とした場合、菌量の相対量を定量でき、抗菌薬投与後の治療効果のモニタリングが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】アガロース・ゲル上の泳動バンドを示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明を実施例および試験例によってより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

以下の実施例では、細菌のプライマー7つ(bacteria primer 5~11)、MRSAのSpa、mecA遺伝子のプライマーそれぞれ1つずつ(spa primer 2, mecA primer 2)、そして真菌のプライマー1つ(Fungi primer 5)、標準Tm値測定用プライマー1つ(bacteria primer 3)の計11のプライマーで実施した。

[実験材料とDNA抽出]

使用菌株は、2004年4月1日から2005年3月31日までの1年間に、富山大学附属病院検査部細菌検査室に提出された1323検体中陽性となった160株(保存菌株)を使用した。

通常分離培養法は、全自動血液培養検査装置バクテアラート(Bact/Alert:日本ビオメリュー)を用いて培養した。

使用ボトルは専用のSA培養ボトル(好気性菌用)、SN培養ボトル(嫌気性菌用)、PF培養ボトル(重篤な小児疾患病原菌検出用)を組み合わせた。分離同定は、定法に従った。

DNAの抽出は、保存菌株をミュラー・ヒントン(Mueller-Hinton)寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン)、羊血液寒天培地(日水製薬)およびサブロー寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン)で分離培養後、その1コロニーを滅菌生食水1mlの入ったマイクロチューブに浮遊させ、12,000rpmで2分間遠心し上清を捨て菌のペレットを残し、次に、インスタジーンマトリクス(Insta Gene Matrix:日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ)を200μl加え、56で15~30分間加温する。

その後、マイクロチューブを激しくボルテックスして、100のヒートブロックで8分間ボイルする。

最後に、12,000rpmで2分間遠心しその上清をDNA抽出液とした。

【0019】

[リアルタイムPCR法]

リアルタイムPCR機器としてライトサイクラー1.5(LightCycler1.5:ロシュ・ダイアグノスティクス)を使用した。

リアルタイムPCR用試薬は、パワーサイバークリーンPCRマスターミックス(Power SYBR Green PCR Master Mix:アプライド・バイオシステムズ)を用いた。

PCRの成分構成は、ゲノムDNAテンプレート量2μl、PCRプライマー10倍濃縮2μl(最終濃度は250n)、リアルタイムPCR用試薬2倍濃縮10μl、BSA(500μg/ml)2μl、超純水4μlで、計20μlの系で行った。

リアルタイムPCRのプログラム設定を表1に示す。

なお、伸長反応時間は、300塩基長までの増幅を可能にする最短時間である12秒に設定した。

10

20

30

40

50

表 1 にリアルタイム PCR のプログラム設定を示す。

【表 1】

プログラム	解析モード	サイクル数	区分	設定温度	時間	蛍光収集方法
前保温	設定なし	1	1	95℃	10 min	設定なし
増幅	定量	35	変性	95℃	10 sec	—
			アニーリング	55℃	10 sec	—
			伸張	72℃	12 sec	単一方法
融解曲線分析	融解曲線	1	変性	95℃	0 sec	—
			アニーリング	65℃	15 sec	—
			融解	95℃ 0.1℃/sec.	0 sec	連続方法
冷却	設定なし	1	1	40℃	30 sec	—

10

【0020】

[融解曲線分析による T_m 値のデータ解析]

リアルタイム PCR を施行後の、T_m 値の解析は、先ず、定量曲線をチェックし、それぞれのプライマーが量的に立ち上がっているかどうかを確認した。

他のプライマーの立ち上がりサイクル数に比較し、極端にサイクル数の低い立ち上がりはプライマーが掛かっていないと判断した。

次に、融解曲線の形状をチェックした。

急激に PCR 産物が一本鎖に解離し始める " 崖 " の形状 (急激な F1 値の低下所見) が確認できなければ、その T_m 値は採用しなかった。

上記 2 項目を確認した後、T_m 値を融解ピーク曲線 (melting peak) の " 山 " から計算した。

20

【0021】

[プライマーの検出感度]

各プライマーの検出感度を事前に測定した。結果を表 2 に示した。

【表 2】

プライマー	検出限界 (ゲノム DNA)
bacteria primer 5	1 ng/μl
bacteria primer 6	1 fg/μl
bacteria primer 7	10 fg/μl
bacteria primer 8	1 fg/μl
bacteria primer 9	10 pg/μl
bacteria primer 10	1 ng/μl
bacteria primer 11	1 fg/μl
fungi primer 5	10 pg/μl
spa primer 2	10 pg/μl
mecA primer 2	1 ng/μl

30

40

50

検出感度を評価するため、菌株から取り出したゲノムDNAを順次希釈し、リアルタイムPCRにて検出の有無を確認した。

それぞれのプライマーの検出感度には差が生じたが、システムとして評価するには検出感度の最も低いプライマー（bacteria primer 5, 10 と mecA primer 2）を基準に決め、システムとしての感度をゲノムDNA 1ng/μlと設定した。

【0022】

[起因菌Tm値データベースの作成]

未知の敗血症起因菌を同定するシステムを構築するために、先ず頻度の高い起因菌に関するTm値データベースの作成を行った。

データベースに登録する起因菌を決定するため、富山大学医学部附属病院検査部にて2004年4月1日から2005年3月31日までの1年間、血液培養検査で陽性となった有効株160株についての検出菌頻度を調べ、計34種の起因菌についてデータベースを作成した（表3～7）。

表はグラム陽性・陰性、球菌・桿菌に分けて分類し、検出頻度の高い順に並べたものである。

この表では、菌からTm値を探すツールとして利用できる。尚、大腸菌標準株DNAとbac.7プライマーの組合せで得られるコントロールTm値は84.43度とした。

表において、

() 中のTm値は、検出される可能性も、されない可能性もあることを示す。

(-) とTm値との併記は、検出されないか、或いは検出された場合のTm値を示す。

“ - ” は、検出されないことを示す。

【0023】

グラム陽性球菌を表3に示す。

【表3】

name	Fungi.5	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	Spa.2	mecA.2
<i>S. aureus</i> (MRSA)	—	82.94	82.39	82.39	83.87	80.66	81.51	80.87	81.07	-76.21
<i>S. epidermidis</i> (MRSE)	—	83.22	82.33	83.05	83.7	80.87	81.47	80.3	—	-75.88
<i>Staphylococcus capitis</i> . Subsp. <i>ureolyticus</i>	—	83.78	82.5	83.05	83.75	80.77	81.43	81.17	—	-76.13
<i>S. capitis</i> . Subsp. <i>capitis</i>	—	83.65	82.37	83.1	83.64	80.12	81.31	80.24	—	—
<i>Staphylococcus auricularis</i>	—	83.18	82.57	83.14	83.87	80.56	81.86	80.96	81.9	-76.14
<i>Staphylococcus warneri</i>	—	83.49	82.16	83.11	84.2	80.5	81.66	81.55	—	—
<i>Staphylococcus hominis</i>	—	83.05	82.92	83	83.77	79.87	81.44	80.79	—	—
<i>Streptococcus bovis</i>	—	82.75	83.2	82.8	84.3	79.53	80.84	82.58	—	—
<i>Streptococcus mitis</i>	—	83.36	82.6	82.93	83.36	81.6	81.43	83.31	—	—
<i>Streptococcus oralis</i>	—	83.42	82.65	82.83	83.47	81.91	81.43	83.37	—	—
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	83.47	82.42	83	83.26	81.27	81.2	83.1	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	—	84.75	82.78	84.2	84.24	80.71	82.16	83.63	—	—
<i>Enterococcus faecium</i>	—	(-) 84.28	82.14	83.96	83.97	81.36	81.32	83.06	—	—
<i>Enterococcus avium</i>	—	(-) 83.87	81.88	83.85	84.02	81.22	81.76	82.66	—	—
<i>Enterococcus gallinarum</i>	—	83.67	82.1	84.08	84.2	(-) 81.22	81.9	82.17	—	—

【0024】

グラム陽性桿菌を表4に示す。

【表 4】

name	Fungi.5	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	Spa.2	mecA.2
<i>Corynebacterium species</i>	—	85.33	85.86	84.76	(—) 84.27	81.82	84.41	84.18	—	—
<i>Listeria monocytogenes</i>	—	84.44	81.74	84.27	83.71	81.46	81.95	81.77	—	—
<i>Bacillus cereus</i>	—	84.02	83.21	83.4	83.3	81.3	81.49	82.15	—	—

【0025】

グラム陰性球菌を表5に示す。

10

【表 5】

name	Fungi.5	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	Spa.2	mecA.2
<i>Acinetobacter species</i>	—	84.11	82.65	82.4	83.47	80.26	(—) 80.63	81.88	—	—

【0026】

グラム陰性桿菌を表6に示す。

【表 6】

name	Fungi.5	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	Spa.2	mecA.2
<i>Escherichia coli</i>	—	84.62	83.76	84.6	85.06	81.5	83.03	82.64	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	85.02	84.48	84.85	84.29	81.2	81.84	81.14	—	—
<i>Klebsiella oxytoca</i>	—	84.84	83.46	84.43	83.84	81.08	81.42	81.21	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	84.59	82.49	83.53	83.94	81.52	(—) 83.14	82.96	—	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	84.85	84.39	84.84	84.27	81.41	81.81	81.15	—	—
<i>Enterobacter aerogenes</i>	—	84.71	83.36	84.78	84.74	80.74	82.46	81.16	—	—
<i>Haemophilus influenzae</i>	—	84.01	82.34	82.85	83.36	80.65	81.58	81.81	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>	—	85.03	84.14	84.96	84.91	81.12	82.32	81.75	—	—
<i>Morganella morganii</i>	—	84.42	83.38	83.94	84.54	80.9	82.8	81.46	—	—
<i>Sphingomonas paucimobills</i>	—	—	83.06	83.47	83.56	81.87	81.67	83.58	—	—
<i>Serratia marcescens</i>	—	84.76	83.82	84.27	84.01	80.92	82.48	81.65	—	—
<i>Kluyvera ascorbata</i>	—	83.7	82.41	83.27	83.89	80.85	81.84	80.67	—	—

20

30

【0027】

真菌を表7に示す。

【表 7】

name	Fungi.5	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	Spa.2	mecA.2
<i>Candida albicans</i>	79.79	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Candida krusei</i>	81.11	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Candida parapsilosis</i>	79.62	—	—	—	—	—	—	—	—	—

40

【0028】

[起因菌同定早見表の作成]

未知の敗血症起因菌を解析した場合、得られるデータは1つのコントロールTm値と、10のPCR増幅産物Tm値の組合せであるが、表3～7のデータベースではTm値から起因菌を同定するには不便である。

従ってTm値から起因菌を容易に同定するために、起因菌同定早見表を作成した(表8)。

50

【 0 0 2 9 】

【 表 8 】

fungi.5	spa.2	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	mecA.2	name
81.11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Candida krusei
79.79	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Candida albicans
79.62	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Candida parapsilosis
—	81.9	83.18	82.57 -0.61	83.14 0.57	83.87 0.73	80.56 -3.31	81.86 1.3	80.96 -0.9	-76.14	Staphylococcus auricularis
—	81.07	82.94	82.39 -0.55	82.39 0	83.87 1.48	80.66 -3.21	81.51 0.85	80.87 -0.64	-76.21	S. aureus (MRSA)
—	—	85.33	85.86 0.53	84.76 -1.1	84.27 -0.49	81.82 -2.45	84.41 2.59	84.18 -0.23	—	Corynebacterium species
—	—	85.03	84.14 -0.89	84.96 0.82	84.91 -0.05	81.12 -3.79	82.32 1.2	81.75 -0.57	—	Citrobacter freundii
—	—	85.02	84.48 -0.54	84.85 0.37	84.29 -0.56	81.2 -3.09	81.84 0.64	81.14 -0.7	—	Klebsiella pneumoniae
—	—	84.85	84.39 -0.46	84.84 0.45	84.27 -0.57	81.41 -2.86	81.81 0.4	81.15 -0.66	—	Enterobacter cloacae
—	—	84.84	83.46 -1.38	84.43 0.97	83.84 -0.59	81.08 -2.76	81.42 0.34	81.21 -0.21	—	Klebsiella oxytoca
—	—	84.76	83.82 -0.94	84.27 0.45	84.01 -0.26	80.92 -3.09	82.48 1.56	81.65 -0.83	—	Serratia marcescens
—	—	84.75	82.78 -1.97	84.2 1.42	84.24 0.04	80.71 -3.53	82.16 1.45	83.63 1.47	—	Enterococcus faecalis
—	—	84.71	83.36 -1.35	84.78 1.42	84.74 -0.04	80.74 -4	82.46 1.72	81.16 -1.3	—	Enterobacter aerogenes
—	—	84.62	83.76 -0.86	84.6 0.84	85.06 0.46	81.5 -3.56	83.03 1.53	82.64 -0.39	—	Escherichia coli
—	—	84.59	82.49 -2.1	83.53 1.04	83.94 0.41	81.52 -2.42	83.14 1.62	82.96 -0.18	—	Pseudomonas aeruginosa
—	—	84.44	81.74 -2.7	84.27 2.53	83.71 -0.56	81.46 -2.25	81.95 0.49	81.77 -0.18	—	Listeria monocytogenes
—	—	84.42	83.38 -1.04	83.94 0.56	84.54 0.6	80.9 -3.64	82.8 1.9	81.46 -1.34	—	Morganella morganii
—	—	(—) 84.28	82.14 -2.14	83.96 1.82	83.96 0	81.36 -2.6	81.32 -0.04	83.06 1.74	—	Enterococcus faecium
—	—	84.11	82.65 -1.46	82.4 -0.25	83.47 1.07	80.26 -3.21	80.63 0.37	81.88 1.25	—	Acinetobacter species
—	—	84.02	83.21 -0.81	83.4 0.19	83.3 -0.1	81.3 -2	81.49 0.19	82.15 0.66	—	Bacillus cereus
—	—	84.01	82.34 -1.67	82.85 0.51	83.36 0.51	80.65 -2.71	81.58 0.93	81.81 0.23	—	Haemophilus influenzae
—	—	(—) 83.87	81.88 -1.99	83.85 1.97	84.02 0.17	81.22 -2.8	81.76 0.54	82.66 0.9	—	Enterococcus avium
—	—	83.78	82.5 -1.28	83.05 0.55	83.75 0.7	80.77 -2.98	81.43 0.66	81.17 -0.26	-76.13	Staphylococcus capitis. Subsp. ureolyticus
—	—	83.7	82.41 -1.29	83.27 0.86	83.89 0.62	80.85 -3.04	81.84 0.99	80.67 -1.17	—	Kluyvera ascorbata
—	—	83.67	82.1 -1.57	84.08 1.98	84.2 0.12	81.22 -2.98	81.9 0.68	82.17 0.27	—	Enterococcus gallinarum
—	—	83.65	82.37 -1.28	83.1 0.73	83.64 0.54	80.12 -3.52	81.31 1.19	80.24 -1.07	—	S. capitis. Subsp. capitis
—	—	83.49	82.16 -1.33	83.11 0.95	84.2 1.09	80.5 -3.7	81.66 1.16	81.55 -0.11	—	Staphylococcus warneri
—	—	83.47	82.42 -1.05	83 0.58	83.26 0.26	81.27 -1.99	81.2 -0.07	83.1 1.9	—	Streptococcus pneumoniae
—	—	83.42	82.65 -0.77	82.83 0.18	83.47 0.64	81.91 -1.56	81.43 -0.48	83.37 1.94	—	Streptococcus oralis
—	—	83.36	82.6 -0.76	82.93 0.33	83.36 0.43	81.6 -1.76	81.43 -0.17	83.31 1.88	—	Streptococcus mitis
—	—	83.22	82.33 -0.89	83.05 0.72	83.7 0.65	80.87 -2.83	81.47 0.6	80.3 -1.17	-75.88	S. epidermidis (MRSE)
—	—	83.05	82.92 -0.13	83 0.08	83.77 0.77	79.87 -3.9	81.44 1.57	80.79 -0.65	—	Staphylococcus hominis
—	—	82.75	83.2 0.45	82.8 -0.4	84.3 1.5	79.53 -4.77	80.84 1.31	82.58 1.74	—	Streptococcus bovis
—	—	—	83.06	83.47 0.41	83.56 0.09	81.87 -1.69	81.67 -0.2	83.58 1.91	—	Sphingomonas paucimobilis

10

20

30

40

50

* コントロール T m 値 = 8 4 . 4 3

カッコ () 中の T m 値は、検出される可能性も、されない可能性もあることを示す。

(-) と T m 値との併記は、検出されないか、或いは検出された場合の T m 値を示す。

“ - ” は、検出されないことを示す。

各 T m 値に下記した数値は、左隣の T m 値に比較した、大小の差を示す。

【 0 0 3 0 】

表は左の項目から順にチェックするものとする。横の並びは先ず、 F u n g i p r i m e r が陽性となる真菌を見極めの最優先事項として最上段に並べた。

10

次に s p a が陽性となる菌が少ないことを考慮して、2番目の優先次項においた。

優先順位の最後には m e c A をおいたが、この理由はメチシリン耐性遺伝子の有無は同一菌種でも異なるからである。

S t a p h y l o c o c c u s e p i d e r m i d i s や他の S t a p h y l o c o c c u s 種の一部は m e c A を持つ可能性があるが、陰性であった場合の同定が煩雑にならないよう、敢えて優先順位の最後においた。上記の優先次項を除いた同定法については、 b a c t e r i a p r i m e r 7 種による T m 値の組合せを解析する。

そこで先ず、最初のプライマー (b a c . 5) では T m 値の高い方から順に並べることにした。

このように並べることで、容易な検索が可能となった。

20

さらに、早見表の b a c t e r i a の T m 値に差異のパターンが分かるよう、差異の数値を下記した。左隣の T m 値に対する変動幅の大小間系を ± の数値で表わした。これにより、リアルタイム P C R 機器自体の試行回毎の測定誤差に影響されること無く、 b a c t e r i a の 7 つの T m 値の差異パターンにより判別することが可能となる。

【 0 0 3 1 】

[ブラインドテストによる検証]

[試験 1]

本発明システムを評価するため、菌名を隠して本発明の 1 1 のプライマーセットでリアルタイム P C R を行い、 T m 値の組合せをデータベースと照合し、菌種の同定を試みた。

得られた T m 値の組合せを表 9 に示す。

30

【 0 0 3 2 】

【表 9】

Fungi.5	Spa.2	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	mecA.2	name
—	—	84.17	82.05 -2.12	83.09 1.04	83.46 0.37	81.03 -2.43	82.7 1.67	82.56 -0.14	—	?

【 0 0 3 3 】

F u n g i 5 , s p a 2 , m e c A 2 はそれぞれ陰性であり、 b a c t e r i a p r i m e r のみで P C R 産物の T m 値が得られた。

コントロール T m 値が 8 4 . 0 2 を示したので、本来の値である 8 4 . 4 3 から - 0 . 4 1 全体に施行間誤差を生じていると判断し、 B a c . 5 の T m 値に + 0 . 4 1 加えて補正を行った。

40

すると b a c . 5 の T m 値が 8 4 . 5 8 であったので、機器の施行内誤差 ± 0 . 2 を考慮し、起因菌早見表の 8 4 . 7 8 ~ 8 4 . 2 8 の部分に注目した (表 1 0 の B a c . 5 の列) 。

次に B a c . 6 が B a c . 5 と比較して T m 値差が - 2 . 1 2 なので、施行内誤差 ± 0 . 2 を考慮して - 1 . 9 2 ~ - 2 . 3 2 の範囲の差に注目すると、3つの候補、すなわち E n t e r o c o c c u s f a e c a l i s , P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a , E n t e r o c o c c u s f a e c i u m が残る結果となった。

次に B a c . 7 への T m 値差は + 1 . 0 4 なので、 + 1 . 2 4 ~ + 0 . 8 4 の範囲に注目すると P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a のみに絞られた。

50

その後の bac. 8, 9, 10, 11 への Tm 値差は全て *Pseudomonas aeruginosa* のデータベース値と合致し、結果も *Pseudomonas aeruginosa* で正解であった。

計 12 回のブラインドテストを行った結果、全ての同定に正解を得ることが出来た。

【 0 0 3 4 】

【 表 1 0 】

fungi.5	spa.2	bac.5	bac.6	bac.7	bac.8	bac.9	bac.10	bac.11	mecA.2	name
—	—	84.76	83.82 -0.94	84.27 0.45	84.01 -0.26	80.92 -3.09	82.48 1.56	81.65 -0.83	—	<i>Serratia marcescens</i>
—	—	84.75	82.78 -1.97	84.2 1.42	84.24 0.04	80.71 -3.53	82.16 1.45	83.63 1.47	—	<i>Enterococcus faecalis</i>
—	—	84.71	83.36 -1.35	84.78 1.42	84.74 -0.04	80.74 -4	82.46 1.72	81.16 -1.3	—	<i>Enterobacter aerogenes</i>
—	—	84.62	83.76 -0.86	84.6 0.84	85.06 0.46	81.5 -3.56	83.03 1.53	82.64 -0.39	—	<i>Escherichia coli</i>
—	—	84.59	82.49 -2.1	83.53 1.04	83.94 0.41	81.52 -2.42	83.14 1.62	82.96 -0.18	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
—	—	84.44	81.74 -2.7	84.27 2.53	83.71 -0.56	81.46 -2.25	81.95 0.49	81.77 -0.18	—	<i>Listeria monocytogenes</i>
—	—	84.42	83.38 -1.04	83.94 0.56	84.54 0.6	80.9 -3.64	82.8 1.9	81.46 -1.34	—	<i>Morganella morganii</i>
—	—	(—) 84.28	82.14 -2.14	83.96 1.82	83.96 0	81.36 -2.6	81.32 -0.04	83.06 1.74	—	<i>Enterococcus faecium</i>

10

20

【 0 0 3 5 】

[Tm 値を利用しない簡便な代替方法について]

本発明のプライマーを使用して、リアルタイム PCR 等の Tm 値測定機器を使うことなく、起因菌が細菌か、真菌か、MRSA か、の簡便・迅速同定が可能となる。

具体的には、一般の PCR 用サーマルサイクラーを用い、本発明のバクテリアプライマー 1 つ、真菌プライマー 1 つ、spa, mecA プライマーそれぞれ 1 つずつの計 4 種類のプライマーで未知の起因菌 DNA をテンプレートとした PCR を行い、増幅産物をアガロース・ゲルで泳動する。その結果、既存のサイズのバンドが確認されれば、細菌、真菌、MRSA いずれかの感染を区別出来ることになる (図 1) 。

その結果、リアルタイム PCR の様な機器の無い施設においても、簡便・迅速に細菌・真菌・MRSA 感染の区別を行うことが出来、早期の適切な抗菌薬の選択に役立つ。

尚、本発明で使用するバクテリアプライマーは全てのバクテリア DNA に反応する為、使用すべき DNA ポリメラーゼは、組換え宿主由来のバクテリア DNA 混入を最小限に抑えた高純度のポリメラーゼを使用すべきである。

【 0 0 3 6 】

簡便な代替方法を用いて確認された、アガロース・ゲル上の泳動バンドを図 1 に示す。

使用したプライマー; bac. 6, fungi. 5, spa, mecA, の計 4 つ。

使用した DNA ポリメラーゼ; AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD (アプライド・バイオシステムズ)

【 産業上の利用分野 】

【 0 0 3 7 】

本発明の方法により、感染症起因菌、とりわけ敗血症の起因菌を迅速に検出・同定することができ、敗血症の迅速診断法が実現する。

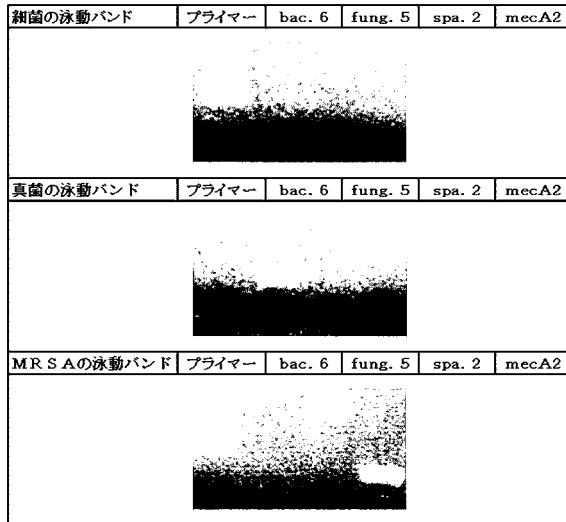
即ち、本発明により起因菌を 2 時間以内に同定するシステム構築が可能となるため、敗血症早期に最適な抗菌薬選択が可能となる。

また、抗菌薬投与後の治療効果のモニタリングも可能となる。

30

40

【 図 1 】



【 配列表 】

2007097323000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成20年11月27日(2008.11.27)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

微生物のDNAを抽出し、これを鋳型として遺伝子増幅を行い、次いで、当該微生物に特異的な融解温度（ T_m 値）の組み合わせを解析し、感染症起因菌の同定を行うのに用いるための下記（B）、（F）及び（M）からなる遺伝子増幅用プライマーセット。

（B）全ての細菌の16S rRNA遺伝子の、1つ又は複数の領域を増幅できるプライマーセット、および各プライマー塩基配列の全部または一部を含むプライマーセット。

（F）全ての真菌の18S rRNA遺伝子の、1つ又は複数の領域を増幅できるプライマーセット、および各プライマー塩基配列の全部または一部を含むプライマーセット。

（M）メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のSpa遺伝子およびmecA遺伝子の特異的に増幅するプライマーセット。

【 請求項 2 】

同定対象となる微生物のDNAを抽出し、これを鋳型として、以下の（B）、（F）、（M）のプライマーセットで遺伝子増幅を行い、次いで、当該微生物に特異的な融解温度（ T_m 値）の組み合わせを、既知の微生物に特異的な融解温度（ T_m 値）と比較解析することを特徴とする感染症起因菌の同定方法。

(B) 全ての細菌の16S rRNA遺伝子の、1つ又は複数の領域を増幅できるプライマーセット、および各プライマー塩基配列の全部または一部を含むプライマーセット。

(F) 全ての真菌の18S rRNA遺伝子の、1つ又は複数の領域を増幅できるプライマーセット、および各プライマー塩基配列の全部または一部を含むプライマーセット。

(M) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のSpa遺伝子およびmecA遺伝子の特異的に増幅するプライマーセット。

【請求項3】

遺伝子増幅がPCRである請求項2記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項4】

PCRがリアルタイムPCRである請求項3記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項5】

細菌の16S rRNA遺伝子の増幅領域が1～7つである請求項2～4のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項6】

真菌の18S rRNA遺伝子の増幅領域が1～6つである請求項2～5のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項7】

標準コントロールとして、一定濃度の大腸菌標準株DNAをテンプレートとし、

(B) 全ての細菌の16S rRNA遺伝子の1つ又は複数の領域を増幅できるプライマーセット、および各プライマー塩基配列の全部または一部を含むプライマーセットのいずれか1つを用いて標準Tm値を毎回測定することにより、測定機器によるTm値の誤差を補正する方法が付加された請求項2～6のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項8】

感染症起因菌同定のアルゴリズムとして、Tm値そのものの組合せだけでなく、各Tm値間の差の組合せを利用して同定することで、測定誤差の影響を最小限とする方法が付加された請求項2～7のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項9】

微生物が敗血症の起因菌である請求項2～8のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項10】

未知の微生物DNAを抽出し、これを鋳型として、[1]真菌の18S rRNA遺伝子の複数領域を増幅できるプライマーセットで遺伝子増幅を行い、真菌に特異的な融解温度(Tm値)を解析し、次いで、[2]メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のSpa遺伝子およびmecA遺伝子の特異的に検出するプライマーセットで遺伝子増幅を行い、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に特異的な融解温度(Tm値)を解析し、次いで、[3]細菌の16S rRNA遺伝子の複数領域を増幅できるプライマーセットで遺伝子増幅を行い、細菌に特異的な融解温度(Tm値)を解析して、それぞれのTm値の組合せ、或いは標準Tm値を含めた各Tm値間の差の組合せを、既知の微生物に特異的な融解温度(Tm値)と比較解析することを特徴とする感染症起因菌の同定方法。

【手続補正書】

【提出日】平成21年4月9日(2009.4.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細菌の16S rRNA遺伝子のうち、ほぼ全ての細菌に共通する塩基配列領域を含む約90～400の塩基からなる所定の遺伝子領域を3ヶ所以上と、

真菌の18SrRNA遺伝子の所定の遺伝子領域、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のSpa遺伝子及びmecA遺伝子をそれぞれ特異的に遺伝子増幅できる合計6つ以上のプライマーセットを用いて、遺伝子増幅し、次いでそのTm値を取得することで予め既知の微生物の前記遺伝子領域の各Tm値をデータベース化し、
同定対象となる未知の微生物のDNAに対して前記データベース化に用いたプライマーセットにて遺伝子増幅を試み、陽性を示した遺伝子領域のTm値を取得し、前記データベースと照合することにより、当該未知の微生物を同定することを特徴とする感染症起因菌の同定方法。

【請求項2】

真菌の18SrRNA遺伝子のうち、ほぼ全ての真菌に共通する塩基配列領域を含む約90～400の塩基からなる所定の遺伝子領域を3ヶ所以上と、
細菌の16SrRNA遺伝子の所定の遺伝子領域、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のSpa遺伝子及びmecA遺伝子をそれぞれ特異的に遺伝子増幅できる合計6つ以上のプライマーセットを用いて、遺伝子増幅し、次いでそのTm値を取得することで予め既知の微生物の前記遺伝子領域の各Tm値をデータベース化し、
同定対象となる未知の微生物のDNAに対して前記データベース化に用いたプライマーセットにて遺伝子増幅を試み、陽性を示した遺伝子領域のTm値を取得し、前記データベースと照合することにより、当該未知の微生物を同定することを特徴とする感染症起因菌の同定方法。

【請求項3】

細菌の16SrRNA遺伝子のうち、ほぼ全ての細菌に共通する塩基配列領域を含む約90～400の塩基からなる所定の遺伝子領域を3ヶ所以上と、
真菌の18SrRNA遺伝子のうち、ほぼ全ての真菌に共通する塩基配列領域を含む約90～400の塩基からなる所定の遺伝子領域を3ヶ所以上と、
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のSpa遺伝子及びmecA遺伝子をそれぞれ特異的に遺伝子増幅できる合計8つ以上のプライマーセットを用いて、遺伝子増幅し、次いでそのTm値を取得することで予め既知の微生物の前記遺伝子領域の各Tm値をデータベース化し、
同定対象となる未知の微生物のDNAに対して前記データベース化に用いたプライマーセットにて遺伝子増幅を試み、陽性を示した遺伝子領域のTm値を取得し、前記データベースと照合することにより、当該未知の微生物を同定することを特徴とする感染症起因菌の同定方法。

【請求項4】

標準コントロールとして、前記データベース化に用いたうちの1つのプライマーセットにて標準株の標準Tm値を毎回測定し、
当該標準Tm値にて測定機器誤差を補正することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項5】

同定対象となる未知の微生物のDNAに対して前記細菌の16SrRNA遺伝子の3ヶ所以上又は真菌の18SrRNA遺伝子の3ヶ所以上の前記データベース化に用いたそれぞれのプライマーセットにてTm値を取得し、取得した各Tm値間の差の組合せを利用して同定することで、測定誤差の影響を低減したことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項6】

遺伝子増幅をPCR法で行い、Tm値を吸光度測定法により取得することを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【請求項7】

遺伝子増幅及びTm値の取得をリアルタイムPCR法で行うことを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の感染症起因菌の同定方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

本発明者らは、最近接塩基法の「融解温度 (melting temperature : T_m値) は塩基配列で決まる」という理論的根拠を元に、菌種毎のT_m値の違いを起因菌同定に応用することについて鋭意研究した結果、本発明を完成するに至った。

本発明は、微生物のDNAを抽出し、これを鋳型として、特定のプライマーセットを使用してPCRなどで遺伝子増幅を行い、次いで、微生物に特異的な融解温度 (T_m値) の組合せ、或いは各T_m値間の差を解析することにより起因菌の検出・同定を迅速に行う方法である。

ここで、T_m値の測定には一般的教科書に示されている従来の吸光度測定方法を用いることもでき、近年開発されたリアルタイムPCR法を用いて、遺伝子増幅及びT_m値を取得してもよい。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 細菌の16S rRNAは、ほぼ全ての細菌に共通の塩基配列領域 (20 ~ 40塩基) を7 ~ 8ヶ所もつことが知られている。

その全て或いは一部の箇所にフォワードとリバースのプライマーをそれぞれ設定することにより、1 ~ 7つの遺伝子増幅領域を作製する。

(2) 遺伝子増幅領域は、約150 ~ 200塩基であり、プライマーを設定した共通保存領域以外は、それぞれの細菌に固有の塩基配列を持つ。

従って、T_m値も塩基配列の違いを反映して固有の値を示し、細菌毎に1 ~ 7種類の特徴的なT_m値を持つことが推定される。

それ故、細菌の種類に応じた1 ~ 7つのT_m値を調べ、データベース化する。

このデータベースを利用して未知の細菌を同定することができる。

(3) さらに、真菌に固有のプライマーを1 ~ 6つ、MRSA同定の為のSpa、mecAのプライマーを併用することで、未知の起因菌に対し、細菌感染とその種類 (MRSA含む)、或いは真菌感染とその種類を同定出来る。

(4) 非特異的な遺伝子産物が生じ、目的のT_m値に近い値を示す場合、擬陽性のリスクが生じる。

そのような場合、遺伝子増幅後の増幅産物をアガロース・ゲルに流してバンドの大きさを確認することで、結果を二重にチェックすることが出来る。

すなわち、従来の遺伝子増幅による検出法で二重チェックするシステムを採用することで検査精度の向上が図れる。

(5) 遺伝子増幅方法としてリアルタイムPCRを採用した場合、その定量性を利用して、菌量を治療前後で相対定量することで、治療効果のモニタリングの向上を図ることが出来る。

(6) リアルタイムPCR機器には、ヒートブロックで温度制御するブロック型と、空気を介して温度制御するエアバス型の2種類あるが、試行回毎にヒートブロック型で±0.1 ~ 0.3 (メーカーで異なる)、エアバス型で±0.4のT_m値測定誤差が生じる (同じ試行回ではサンプル間誤差は±0.2程)。

この測定誤差で菌種同定が妨げられないように、同じ試行回の各T_m値間の差異パターンを判定に利用する方法を採用することが好ましい。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/569(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, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/569 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JDream2), JMEDPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/053155 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 24 June, 2004 (24.06.04), & JP 2006-508694 A & EP 1570079 A1 & US 2006/0099596 A1	1-9
A	WO 2004/053148 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 24 June, 2004 (24.06.04), & JP 2006-508669 A & EP 1570070 A1 & US 2006/0240427 A1	1-9
A	Mikio MORI, 'Real Time PCR o Oyo shita Haikessyo Kensa Ho', Seibutsu Shiryo Bunseki, 2005, Vol.28, No.5, pages 400 to 404	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 21 May, 2007 (21.05.07)		Date of mailing of the international search report 29 May, 2007 (29.05.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/053078									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/569											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE(STN)、BIOSIS/WPI(DIALOG)、JSTPlus(JDream2)、JMEDPlus(JDream2)											
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									
A	WO 2004/053155 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2004.06.24 & JP 2006-508694 A & EP 1570079 A1 & US 2006/0099596 A1	1-9									
A	WO 2004/053148 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2004.06.24 & JP 2006-508669 A & EP 1570070 A1 & US 2006/0240427 A1	1-9									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 21.05.2007		国際調査報告の発送日 29.05.2007									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 池上 文緒	4B 3765								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/053078
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
A	森幹夫, リアルタイム PCR を応用した敗血症検査法, 生物試料分析, 2005, 第 28 巻, 第 5 号, p.400-404	1 - 9

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。