

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02006/043368

発行日 平成20年5月22日(2008.5.22)

(43) 国際公開日 平成18年4月27日(2006.4.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 A	4B024
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B063
<b>C12Q 1/04 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	
	C12Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

出願番号 特願2006-542267 (P2006-542267)	(71) 出願人 899000057 学校法人日本大学 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2005/016069	
(22) 国際出願日 平成17年8月26日(2005.8.26)	
(31) 優先権主張番号 特願2004-304878 (P2004-304878)	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
(32) 優先日 平成16年10月19日(2004.10.19)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(74) 代理人 100095360 弁理士 片山 英二
(31) 優先権主張番号 特願2004-317283 (P2004-317283)	(74) 代理人 100093676 弁理士 小林 純子
(32) 優先日 平成16年10月29日(2004.10.29)	(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 関 みつ子 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Streptococcus pneumoniae* の検出方法、検出用プライマーセット及び検出用キット

## (57) 【要約】

*Streptococcus pneumoniae* 由来の *lytA* 遺伝子の塩基配列領域のうち第40番目から第450番目の領域中の部分配列と同一又は相補的な塩基配列からなる1種以上のプライマーを備えたLAMPプライマーセットを用いて当該 *lytA* 遺伝子を増幅し、得られる増幅産物を検出することを特徴とする *Streptococcus pneumoniae* の検出方法。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

*Streptococcus pneumoniae*由来の *lytA* 遺伝子の塩基配列領域のうち第 40 番目から第 450 番目の領域中の部分配列と同一又は相補的な塩基配列からなる 1 種以上のプライマーを備えた LAMP プライマーセットを用いて当該 *lytA* 遺伝子を増幅し、得られる増幅産物を検出することを特徴とする *Streptococcus pneumoniae* の検出方法。

## 【請求項 2】

LAMP プライマーセットが、*Streptococcus pneumoniae* 由来の *lytA* 遺伝子の塩基配列のうち第 40 番目から第 450 番目の領域から設計される FIP プライマー、BIP プライマー、F3 プライマー及び B3 プライマーからなるものである請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

LAMP プライマーセットが、さらにループプライマーを含むものである請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

FIP プライマーは、*lytA* 遺伝子の塩基配列のうち第 76 番目から第 132 番目、又は第 239 番目から第 308 番目の領域から設計されるものである請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 5】

BIP プライマーは、*lytA* 遺伝子の塩基配列のうち第 153 番目から第 216 番目、又は第 332 番目から第 413 番目の領域から設計されるものである請求項 2 記載の方法。

20

## 【請求項 6】

F3 プライマーは、*lytA* 遺伝子の塩基配列のうち第 47 番目から第 76 番目、又は第 221 番目から第 237 番目の領域から設計されるものである請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 7】

B3 プライマーは、*lytA* 遺伝子の塩基配列のうち第 226 番目から第 240 番目、又は第 417 番目から第 434 番目の領域から設計されるものである請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 8】

ループプライマーは、*lytA* 遺伝子の塩基配列のうち第 178 番目から第 195 番目の領域から設計されるものである請求項 3 記載の方法。

30

## 【請求項 9】

プライマーセットが、以下の (a) ~ (e) に示される塩基配列の組み合わせからなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(b) 配列番号 5、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(c) 配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

40

(d) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 及び配列番号 12 で表される塩基配列の組み合わせ

(e) 配列番号 23、配列番号 24、配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 25 で表される塩基配列の組み合わせ

## 【請求項 10】

以下の (a) ~ (e) に示される塩基配列の組み合わせからなる群から選ばれる少なくとも 1 つを含む、*Streptococcus pneumoniae* の検出用プライマーセット。

(a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

50

(b) 配列番号 5、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(c) 配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(d) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 及び配列番号 12 で表される塩基配列の組み合わせ

(e) 配列番号 23、配列番号 24、配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 25 で表される塩基配列の組み合わせ

【請求項 11】

請求項 10 記載のプライマーセットを含む、*Streptococcus pneumoniae* の検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は *Streptococcus pneumoniae* の検出方法、*Streptococcus pneumoniae* 検出用プライマーセット及び *Streptococcus pneumoniae* 検出用キットに関し、特に特異性に優れた検出方法、検出用プライマーセット及び検出用キットに関する。

【背景技術】

肺炎球菌 (ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*))、以下「*S. pneumoniae*」と略すこともある。) は、肺炎、心内膜炎、菌血症、敗血症、髄膜炎、中耳炎の原因菌の 1 つであり、通常ヒトの体内で共生している他の溶血レンサ球菌と区別して *S. pneumoniae* による感染を検出することは臨床研究や診断において重要である。

従来、この *S. pneumoniae* による感染を検出、診断するために、コロニー形態、オプトヒン感受性、胆汁溶解性や血清反応等の培養による選別及び生化学的検査法が用いられている。

しかし、上述のような培養による選別及び生化学的検査法を併用した場合には、感染が判明するまでに 3 日以上を要するのに加え、コロニーをその形状や色の相違などから正確に選別するためには熟練した技術が必要であり、臨床診断及びその後の処置に支障をきたすおそれがあった。

一方、近年においては、PCR (polymerase chain reaction) 法を用いた *S. pneumoniae* の検出法も提案されている (特開平 9 - 327300 号公報)。PCR 法による検出では、*S. pneumoniae* に特異的なプライマーを用い、採取した DNA サンプルを鋳型に核酸増幅を行わせることで、この核酸増幅の有無により *S. pneumoniae* の有無を検知することができる。この方法では、培養による選別と生化学的検査法を併用した場合に比べ短時間で簡便に、一定の信頼性のある検出が可能である。

【発明の開示】

PCR 法を用いて検出する場合には、上述したように *S. pneumoniae* に特徴的な遺伝子を標的として増幅反応を行うのが一般的であり、このような *S. pneumoniae* に特徴的な遺伝子として、例えば autolysin をコードする *lytA* 遺伝子や、pneumolysin をコードする *ply* 遺伝子が知られている。しかしながら、最近では、*S. pneumoniae* 以外の菌であって、遺伝子型及び表現型からは *S. pneumoniae* と近縁のストレプトコッカス・ミチス (*Streptococcus mitis*) (以下、「*S. mitis*」と略すこともある) に分類される菌の中に、autolysin あるいは pneumolysin をコードする遺伝子を保持するものの存在が報告されている (参照: Whatmore A.M., 他 7 名, "Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: cha

10

20

30

40

50

racterization of "atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes." , Infect. Immun. , 2000 , vol. 68 , p. 1374 - 1382 )。このため、lytA遺伝子やply遺伝子を標的としてPCRを行った場合にも、口腔常在菌である*S. mitis*やストレプトコッカス・オラリス(*Streptococcus oralis*) (以下、「*S. oralis*」と略すこともある)等の一部の菌とは区別が困難であった。

また、PCR法による遺伝子増幅を行う場合には、サーマルサイクラー等の設備が必要でありコストと手間がかかる等の問題もあった。

本発明は上述のような問題点に鑑みてなされたものであり、迅速かつ簡便で、特異性に優れた*S. pneumoniae*の検出方法、*S. pneumoniae*検出用プライマーセット及び*S. pneumoniae*検出用キットを提供することを課題とする。

上記課題に鑑みてより特異性に優れた検出方法を開発するために、本発明者らは、まず4種の*S. pneumoniae*のlytA遺伝子(GenBankアクセッション番号: AE008540, AE007483, M13812, AF467249)と、その他のautolysinをコードする9種の菌株(*S. mitis*のlytA遺伝子(EMBLアクセッション番号: AJ617815, AJ617816), *Streptococcus*属のlytA遺伝子(EMBLアクセッション番号: AJ252190, AJ252191, AJ252192, AJ252193, AJ252194, AJ252195, AJ252196))の塩基配列を比較した。その結果、*S. pneumoniae*のみに共通する特異的な塩基配列を解明した。そして、これらの塩基配列からLAMP法用プライマーを設計し、lytA遺伝子の特異的に増幅することにより*S. pneumoniae*を検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の通りである。

(1) *Streptococcus pneumoniae*由来のlytA遺伝子の塩基配列領域のうち第40番目から第450番目の領域中の部分配列と同一又は相補的な塩基配列からなる1種以上のプライマーを備えたLAMPプライマーセットを用いて当該lytA遺伝子を増幅し、得られる増幅産物を検出することを特徴とする*Streptococcus pneumoniae*の検出方法。

上記検出方法において、LAMPプライマーセットは、例えば*Streptococcus pneumoniae*由来のlytA遺伝子の塩基配列のうち第40番目から第450番目の領域から設計されるFIPプライマー、BIPプライマー、F3プライマー及びB3プライマーからなるものを使用することができる。さらに、これらのLAMPプライマーセットには、さらにループプライマーを含めることが可能である。

ここで、FIPプライマーは、lytA遺伝子の塩基配列のうち第76番目から第132番目、又は第239番目から第308番目の領域から設計することができ、BIPプライマーは、lytA遺伝子の塩基配列のうち第153番目から第216番目、又は第332番目から第413番目の領域から設計することができる。また、F3プライマーは、lytA遺伝子の塩基配列のうち第47番目から第76番目、又は第221番目から第237番目の領域から設計することができ、B3プライマーは、lytA遺伝子の塩基配列のうち第226番目から第240番目、又は第417番目から第434番目の領域から設計することができる。本発明においては、ループプライマーを含めることができるが、そのループプライマーは、lytA遺伝子の塩基配列のうち第178番目から第195番目の領域から設計することができる。

本発明において好ましいプライマーセットとしては、例えば以下の(a)~(e)に示される塩基配列の組み合わせからなる群から選ばれる少なくとも1つを挙げることができる。

(a) 配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4で表される塩基配列の組み合わせ

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 5、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(c) 配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(d) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 及び配列番号 12 で表される塩基配列の組み合わせ

(e) 配列番号 23、配列番号 24、配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 25 で表される塩基配列の組み合わせ

(2) 以下の (a) ~ (e) に示される塩基配列の組み合わせからなる群から選ばれる少なくとも 1 つを含む、*Streptococcus pneumoniae* の検出用プライマーセット。

(a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(b) 配列番号 5、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(c) 配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 及び配列番号 4 で表される塩基配列の組み合わせ

(d) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 及び配列番号 12 で表される塩基配列の組み合わせ

(e) 配列番号 23、配列番号 24、配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 25 で表される塩基配列の組み合わせ

(3) 上記 (2) に記載のプライマーセットを含む、*Streptococcus pneumoniae* の検出用キット。

#### 【図面の簡単な説明】

図 1 は、*lytA* 遺伝子の塩基配列、並びに *S. pneumoniae* に特異的な塩基部分及び実施例 1 の LAMP プライマーの設計領域を示す図である。

図 2 は、実施例 1 の各 LAMP プライマーの構成及び *lytA* 遺伝子上の対応位置を説明する図である。

図 3 は、感度試験における電気泳動結果を示す写真である。

図 4 は、リアルタイム濁度測定結果を示すグラフである。(実施例 1 及び 2 の比較)

図 5 は、リアルタイム濁度測定結果を示すグラフである。(実施例 1 及び 4 の比較)

図 6 は、実施例 1 についてリアルタイム濁度測定結果を示すグラフである。

図 7 は、濁度と鋳型 DNA 濃度の常用対数の関係を示すグラフである。

図 8 は、実施例 4 についてリアルタイム濁度測定結果を示すグラフである。

図 9 は、実施例 5 についてリアルタイム濁度測定結果を示すグラフである。

図 10 は、実施例 5 についてスレッシュホールドタイムと鋳型 DNA コピー数の常用対数との関係を示すグラフである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

なお、本明細書において引用した刊行物及び特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

本発明は、*S. pneumoniae* の *lytA* 遺伝子において、種特異的領域に着目して LAMP プライマーセットを設計することにより *S. pneumoniae* を特異的に検出することを可能としたものである。

ここで、「LAMP プライマーセット」とは、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による核酸増幅に用いられるプライマーセットである(参照文献: *Nucleic Acid Research*, 2000, Vol. 28, No. 12, e63)。

LAMP プライマーは、PCR 法で用いられる PCR プライマーよりも多くの領域に対して設定されることから、標的の選択性も高いと考えられ、かつ本発明では *lytA* 遺伝

10

20

30

40

50

子のうち *S. pneumoniae* に特異的な領域に対してプライマーを設定することから、*S. pneumoniae* を特異的に検出することが可能である。

lytA 遺伝子の塩基配列の一例 (GenBank アクセション番号: AE008540) を図 1 及び配列番号 26 に示す。なお、図 1 中、「番号」と付された行は塩基の位置を、「プライマー」と付された行は FIP、BIP、F3 及び B3 プライマー (後述) を設計するための領域の位置の一例を示す。また、「塩基」と付された行は配列番号 26 と同様に lytA 遺伝子の塩基配列を左側から右側に向かって 5' → 3' 方向となるように示しており、「共通」と付された行は「\*」により当該位置の塩基が前記 4 種の *S. pneumoniae* にのみ共通することを示している。なお、図 1 の「プライマー」行中の矢印は実施例 1 のプライマーの 5' → 3' 方向を示す。従って、左矢印で範囲指定した領域は、当該領域に相補的な領域がプライマーとされることを示す。

本発明では 1 種以上のプライマーが第 40 番目から第 450 番目の領域の少なくとも一部分と同一又は相補的な塩基配列からなっている。本発明においては、さらに共通塩基が多く分散して存在する第 84 番目から第 180 番目の領域の全部又は一部が、増幅される領域 (プライマー部分も含む) に内包されることが好ましい。

本発明のプライマーを用いた場合には、*S. pneumoniae* の検出において、特異性に優れるのみでなく、検出感度及び検出の迅速性に優れると共に、さらに、増幅曲線に線形性が認められ、定量性も良好である。

次に、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。

図 2 に示すように、LAMP プライマーセットは、標的遺伝子 (lytA 遺伝子) 上の異なる 6 領域 (5' 末端側から順に F3, F2, F1, B1c, B2c, B3c) 及びこれに相補的な領域 (5' 末端側から順に B3, B2, B1, F1c, F2c, F3c) から設計されるプライマーを組み合わせる構成されるものである。本発明において使用される LAMP プライマーセットは、lytA 遺伝子の塩基配列の 5' 末端側から、F1c 領域及び F2 領域のヌクレオチドを連結してなる Forward Inner Primer (以下、「FIP」と略すこともある。) と、5' 末端側から B1c 領域及び B2 領域のヌクレオチドを連結してなる Backward Inner Primer (以下、「BIP」と略すこともある。) と、F3 領域のヌクレオチドからなる F3 プライマーと、B3 領域のヌクレオチドからなる B3 プライマーと、からなっている。なお、所望によりさらにループプライマー (Loop Primer F 及び / または Loop Primer B) を設計し、これらを用いて DNA の増幅を行い、増幅産物を検出してもよい。ループプライマーは、B1 領域と B2 領域との間、あるいは F1 領域と F2 領域との間において形成される 1 本鎖部分に相補的な配列をもつプライマーである。表 1 中、実施例 5 の欄には、Loop Primer B (LB) の一例を示した。

本発明においては、FIP プライマーは、lytA 遺伝子の塩基配列 (配列番号 26) のうち第 76 番目から第 132 番目 (以下、「76-132」のように表示することもある。他のプライマーについても同様。)、又は第 239 番目から第 308 番目の領域から設計することができ、その内訳は、例えば実施例 1 では F2 として 76-94 の領域 (F2c はその相補鎖領域)、F1 として 108-131 の領域 (F1c はその相補鎖領域) から設計したもの (配列番号 1) が好ましい。BIP プライマーは、lytA 遺伝子の塩基配列のうち 153-216、又は 332-413 の領域から設計することができ、その内訳は、例えば実施例 1 では B1c として 153-176 (B1 の 153-176 の相補鎖)、B2 として 196-216 の領域から設計したもの (配列番号 2) が好ましい。F3 プライマーは、lytA 遺伝子の塩基配列のうち 47-76 の領域又は 221-237 の領域から設計することができ、例えば実施例 1 では 55-74 の領域から設計したもの (配列番号 3) が好ましい。B3 プライマーは、lytA 遺伝子の塩基配列のうち 226-240 の領域、又は 417-434 の領域から設計することができ、例えば実施例 1 では 226-240 の領域から設計したもの (配列番号 4) が好ましい。実施例 2 ~ 5 についても、各プライマーを設計するために好ましい領域として表 1 の実施例の欄 (実 2 ~ 実 5) に記載の領域を選択することができる。

10

20

30

40

50

さらに、本発明において、ループプライマーを使用すると、検出までの時間をさらに短縮することが可能である。したがって、ループプライマーF(LF)及びループプライマーB(LB)の一方又は両方を使用して、検出の効率化を図ることができる。

LFとしては、例えばlytA遺伝子の塩基配列のうち95-110の領域又は256-283の領域から設計することができる。

LBとしては、例えばlytA遺伝子の塩基配列のうち176-195の領域から設計することができ、178-195の領域から設計したもの(配列番号25)が好ましい。

本発明の一例である実施例1のLAMPプライマーセットのlytA遺伝子における位置を図1及び図2に、本発明の一例である実施例1~5のLAMPプライマーセットについてプライマーの種類と配列番号との対応を表1に示す。

【表1】

表 1

実施例/ 比較例	FIP		BIP		F3	B3	LB	検出時間
	F2	F1	B1	B2				
実1	配列番号1 76-94 108-131		配列番号2 153-176 196-216		配列番号3 55-74	配列番号4 226-240		17分42秒
実2	配列番号5 76-94 106-130		配列番号2 153-176 196-216		配列番号3 55-74	配列番号4 226-240		33分12秒
実3	配列番号6 77-94 107-131		配列番号7 153-176 194-215		配列番号8 61-76	配列番号4 226-240		35分24秒
実4	配列番号9 239-255 284-308		配列番号10 332-356 396-413		配列番号11 221-237	配列番号12 417-434		43分
比2	配列番号13 76-94 122-142		配列番号14 155-176 199-218		配列番号15 47-66	配列番号16 235-254		非検出
比3	配列番号17 76-94 116-128		配列番号18 154-175 199-219		配列番号15 47-66	配列番号19 234-254		非検出
比4	配列番号20 78-96 120-141		配列番号18 154-175 199-219		配列番号15 47-66	配列番号19 234-254		非検出
比5	配列番号21 78-96 122-143		配列番号14 155-176 199-218		配列番号15 47-66	配列番号16 235-254		非検出
比6	配列番号22 77-94 120-141		配列番号18 154-175 199-219		配列番号15 47-66	配列番号19 234-254		非検出
実5	配列番号23 76-94 111-132		配列番号24 155-176 196-216		配列番号15 47-66	配列番号4 226-240	配列番号25 178-195	13分42秒

表1において、「F2」、「F1」、「B1」、「B2」、「F3」及び「B3」の欄に記載の数字は、「F3」、「F2」及び「F1」については、それぞれ図2に示すセンス鎖のF3領域、F2領域及びF1領域の位置を示し、「B1」、「B2」、及び「B3」については、それぞれ図2に示すセンス鎖のB1c領域、B2c領域及びB3c領域の位置を示している。従って、例えば、実施例1におけるFIPプライマーにおいて、表1の「F1」の欄に記載された領域(108-131の領域)は、FIPプライマーの構成要素の一部であるF1cの領域(F1に対して相補鎖側)であることを意味する。また、表1の「B3」の欄に記載された領域は、図2に示すセンス鎖のB3cの領域を意味する。このような領域の位置番号の意味は、他のプライマーについても同様である。

上記表1に示す各プライマーの塩基配列を以下の表2及び表3に示す。

10

20

30

40

【表 2】

表 2

実施例	プライマー	配列	配列番号
実施例 1	FIP	cgccagtgat aatccgcttc attccactca actgggaate cgc	1
	BIP	tttctcgac attgttggga acggccagge accattatca acagg	2
	F3	ccatatagge aagtacacgc	3
	B3	agcattccaa ccgcc	4
実施例 2	FIP	gccagtgata atccgcttca ttctgactc aactgggaat cgc	5
	BIP	tttctcgac attgttggga acggccagge accattatca acagg	2
	F3	ccatatagge aagtacacgc	3
	B3	agcattccaa ccgcc	4
実施例 3	FIP	cgccagtgat aatccgcttc attctactca actgggaatc cgc	6
	BIP	tttctcgac attgttggga acggcaggca ccattatcaa caggtc	7
	F3	aggcaagtac acgcac	8
	B3	agcattccaa ccgcc	4
実施例 4	FIP	cggtagtccg tcctgaactc ttcttctgag acctatgcag cg	9
	BIP	atctagcaga tgaagcaggt ttgccttctg gcaatactcg tgc	10
	F3	ttggggggcgg ttggaat	11
	B3	gagtgggtgt ttggttg	12
実施例 5	FIP	ccgccagtga taatccgctt cacactcaac tgggaatccg c	23
	BIP	tctcgacat tgttgggaac ggccaggcac cattatcaac agg	24
	F3	gcgtgcaacc atataggcaa	15
	B3	agcattccaa ccgcc	4
	LB	tgcacatgc aggtagga	25

10

20

30



【表 3】

表 3

比較例	プライマー	配列	配列番号
比較例 2	FIP	ctgggtcttt cgcagctga tcaactcaact gggaatccgc	13
	BIP	tctcgacat tgttggaac ggtcccaggc accattatca ac	14
	F3	gcgtgcaacc atataggcaa	15
	B3	gctgcatagg tctcagcatt	16
比較例 3	FIP	gtctttccgc cagtgataat ccgaactcaa ctgggaatcc gc	17
	BIP	ttctcgaca ttgttggaac cgggtcccagg caccattatc aac	18
	F3	gcgtgcaacc atataggcaa	15
	B3	gctgcatagg tctcagcatt c	19
比較例 4	FIP	tgggtctttc cgccagtga aactcaactg ggaatccgca t	20
	BIP	ttctcgaca ttgttggaac cgggtcccagg caccattatc aac	18
	F3	gcgtgcaacc atataggcaa	15
	B3	gctgcatagg tctcagcatt c	19
比較例 5	FIP	ctgggtcttt cgcagctga tcaactgg gaatccgcat	21
	BIP	tctcgacat tgttggaac ggtcccaggc accattatca ac	14
	F3	gcgtgcaacc atataggcaa	15
	B3	gctgcatagg tctcagcatt	16
比較例 6	FIP	tgggtctttc cgccagtga aaactcaact gggaatccgc	22
	BIP	ttctcgaca ttgttggaac cgggtcccagg caccattatc aac	18
	F3	gcgtgcaacc atataggcaa	15
	B3	gctgcatagg tctcagcatt c	19

10

20

上述のような *S. pneumoniae* 検出用 LAMP プライマーセットは、例えば DNA 自動合成機を用いて化学的に合成することで調製することができる。なお、本発明においてプライマーは、前述したような所定の塩基配列を有し、他の塩基と塩基対形成が可能なオリゴヌクレオチドであって、その 3' 末端において相補鎖合成の基点となる -OH 基を備えるものを意味する。したがって、この条件を満たす限り、そのバックボーンは必ずしもホスホジエステル結合によるものに限定されず、例えば P でなく S をバックボーンとしたホスホチオエート体やペプチド結合に基づくペプチド核酸からなるものであってもよい。

30

本発明で用いることができる鋳型依存性核酸合成酵素は、鎖置換活性を有するものであれば特に限定されない。このような酵素としては、*Bst* DNA ポリメラーゼ (ラージフラグメント)、*Bca* (exo-) DNA ポリメラーゼ、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメント、*Vent* (Exo-) DNA ポリメラーゼ (*Vent* DNA ポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)、*Deep Vent* (Exo-) DNA ポリメラーゼ (*Deep Vent* DNA ポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの) および *KOD* DNA ポリメラーゼ等が挙げられ、好ましくは *Bst* DNA ポリメラーゼ (ラージフラグメント) が挙げられる。*Bst* DNA ポリメラーゼを用いる場合は、その反応至適温度である 60 ~ 65 付近で反応を行うのが望ましい。

40

また、増幅産物の検出には公知の技術が適用できる。例えば増幅された遺伝子配列を特異的に認識する標識オリゴヌクレオチドを用いたり、あるいは、反応終了後の反応液をそのままアガロース電気泳動にかけても容易に検出できる。また、本発明によるプライマー

50

は、例えばDNAチップのようにそれ自身を固相に結合させておくこともできる。固相化プライマーを合成開始点とする場合には、核酸の合成反応生成物が固相に捕捉されることから、分離、検出が容易となる。

さらに、LAMP法による遺伝子増幅は加速度的かつ効率的に行なわれるので、反応液中にあらかじめ二本鎖核酸の分子内に特異的に取り込まれるインターカレーターであるエチジウムブロマイドやSYBR(登録商標)Green I等を添加することにより増幅を確認できる。また、LAMP法では核酸の合成により基質が大量に消費され、副産物であるピロリン酸が、共存するマグネシウムと反応してピロリン酸マグネシウムとなり、肉眼でも確認できる程に白濁する。この白濁を反応終了後の観察、もしくは反応中の濁度の上昇を経時的に光学的に観察できる測定機器、例えば650nmの吸光度の変化を通常の分光光度計を用いて増幅の確認が可能である。

10

これらのLAMP反応に必要な各種の試薬類は、予めパッケージングしてS.pneumoniae検出用キットとして供給することができる。具体的には、本発明のキットは、前記S.pneumoniae検出用のLAMPプライマーセットを含むが、その他に、相補鎖合成の基質となるdNTP、鎖置換型の相補鎖合成を行うDNAポリメラーゼ、酵素反応に好適な条件を与える緩衝液など、さらに必要に応じて合成反応生成物の検出のために必要な試薬類を含めることができる。また、核酸の2重鎖を不安定にするための試薬(例えばベタイン)を含めることもできる。

このように、LAMP法では、酵素活性を維持しうる温度で、等温のままインキュベートするだけで、増幅反応を進行させることが可能である。このため、PCR法のような温度調節のための設備が不要であり低コストかつ簡便に検出を行うことができるとともに、温度変化に伴う時間ロスもないので迅速に検出が可能である。

20

#### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### [ 特異性確認試験について ]

本発明に係るS.pneumoniaeの検出方法を実施し、本発明の検出方法の特異性を確認したので説明する。

#### (1) 染色体DNAの準備

まず、試験に供する各種の菌から染色体DNAを精製し、増幅反応の鋳型となるDNAを準備した。

30

染色体DNAは、酵母用のDr.Gentle(登録商標、タカラバイオ株式会社製)を用いて各種の菌体から抽出し、QIamp(登録商標)DNAミニキット(キアゲン社製)を用いて精製することで得た。抽出及び精製の操作は、添付のマニュアルに従って行った。

本試験では、10種のレンサ球菌及び7種のレンサ球菌以外の菌に分類される計32種の菌株から染色体DNAを抽出して用いた。これら32種の菌株を表4に示す。

【表 4】

表 4

菌種	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC903 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC9811 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC10557 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC12396	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus agalactiae</i> IID1625	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus milleri</i> NCTC10703	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus sobrinus</i> NIDR6715 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	10
<i>Streptococcus sobrinus</i> OMZ176	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus mutans</i> XC47	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus mutans</i> PK1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus mutans</i> JC2 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC10556 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC7073 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC9222 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus salivarius</i> HHT <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	+	+	+	+	+	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC6305	+	+	+	+	+	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> GTC261 (NCTC7465) <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	20
<i>Streptococcus pneumoniae</i> IID553 (NYS DH DP-2) <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> IID554 (NYS DH DP-3, 5A) <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	-	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	-	-	-	-	-	
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> Y-4	-	-	-	-	-	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC33277	-	-	-	-	-	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 381 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC49417 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC12104 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Actinomyces naeslundii</i> T14 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Actinomyces naeslundii</i> WVU627 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	30
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC25611 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC25261 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC33563 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	

表中、a は菌の出所が日本大学歯学部細菌学講座であることを示す。

表中、b は菌の出所が岐阜大学医学部微生物学教室であることを示す。

表中、c は菌の出所が東京大学医科学研究所であることを示す。

## (2) LAMP 反応について

次に、実施例 1 ~ 5 の LAMP プライマーセット (表 1 参照) を用いて、(1) で調整した各種の菌由来の染色体 DNA を鋳型に LAMP 反応を行った。 40

LAMP 反応液 (25  $\mu$ l) は、FIP 及び BIP 各 40 pmol, F3 プライマー及び B3 プライマー各 5 pmol, 8 U の Bst DNA ポリメラーゼラジフラグメント (New England Biolabs 社製), デオキシヌクレオシド トリフォスフェート各 1.4 mM, ベタイン 0.8 M, Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) 20 mM, KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, ツイーン 20 を 0.1%, 及び、上記 (1) のようにして生成された鋳型 DNA 溶液 2  $\mu$ l を添加して調製した。

そして、この LAMP 反応液を、63 °C で 35 分間又は 60 分間インキュベートすることで LAMP 反応を進行させ、最後に 80 °C で 2 分間加温することで反応を終了させた。 50

## (3) 増幅の有無の確認について

増幅の有無は、反応チューブを直接目視し、LAMP反応液の白濁の有無を観察することで検出した。すなわち、複製配列が存在する場合には反応の副産物として複製配列の量に比例した量のピロリン酸マグネシウムが産生されるのでLAMP反応液が白濁し、一方存在しない場合にはLAMP反応液は透明のままであるため、その白濁を指標として増幅産物の検出を行った。

また、増幅の有無は、増幅産物のアガロースゲル電気泳動によっても確認した。この際、増幅産物そのままのものと、増幅産物を制限酵素TasI (Fermentas社製)により消化したものとをそれぞれ3%のアガロースゲル中で電気泳動し、エチジウムブロミドで染色して泳動パターンを確認した。なお、増幅産物をそのまま電気泳動した場合には、複製配列はLAMP反応に特徴的なラダー状のパターンとして現われる。また、制限酵素により消化したものを電気泳動した場合には、複製配列は102bp及び111bpの断片として現われる。

10

## (4) 試験結果について

上述の試験結果を表4に示す。結果は、35分間又は60分間のインキュベーションにより目視によって増幅(白濁)が確認された場合を「+」、60分間のインキュベーション後目視によって増幅が確認できなかった場合を「-」とした。この結果、表4にも示すように、実施例1~5のいずれのLAMPプライマーセットを用いても、S.pneumoniaeを鑄型とした場合には、35分間又は60分間のインキュベーションにより多量の増幅産物が確認された。対照的に、他の菌種では60分間のインキュベーションを行っても増幅産物は確認されなかった。この結果は、電気泳動の結果とも一致し、実施例1においては102bp及び111bpの断片が確認された。また、増幅産物のシーケンスも行ったが、LAMP反応により増幅された配列は期待した配列と一致した。

20

このことから、本発明に係るS.pneumoniaeの検出方法は、特異性に優れることが確認された。

## [感度確認試験について]

次に、上記実施例1~5のLAMPプライマーセットを用いた場合の検出感度を確認したので説明する。

## (1) 染色体DNAの調製

本試験では、S.pneumoniae ATCC6305から特異性確認試験と同様に染色体DNAを精製し、鑄型とした。反応液中の鑄型DNAの濃度(コピー数)は、Ultraspec3300pro (Amersham Biosciences社製)を用い、分子サイズを2Mbpとして定量した。

30

## (2) LAMP法及びPCR法について

上記(1)のように予め定量された鑄型DNA溶液を10倍ずつ希釈して1~1,000,000倍の溶液を調製し、これをLAMP反応の鑄型DNA溶液として用いることで、検出限界を確認した。LAMP反応液は、鑄型DNA溶液の濃度が異なる以外、鑄型DNA溶液の添加量及びその他の添加物の添加量において前記特異性確認試験と同様であり、LAMP反応の条件も同様とした。

また、本発明の検出方法と比較するために、PCR法による増幅、検出も行った(比較例1)。

40

PCRプライマーセットは、autolysinをコードする遺伝子(lytA遺伝子)を標的とするもの(lytA-F、lytA-R)を用いた(Nagai, K., 他6名, "Evaluation of PCR primers to screen for Streptococcus pneumoniae isolates and -lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants", J. Antimicrob. Chemother., 2001, vol. 48, p. 915-918)。その配列を以下に示す。

lytA-F: caaccgtaca gaatgaagcgg (配列番号27)

50

lytA - R : ttatttcgtgc aatactcgtg cg (配列番号28)  
 PCR反応液(10 $\mu$ l)は、デオキシヌクレオシド トリフォスフェート各0.2mM、Tris-HCl緩衝液(pH8.3)10mM、KCl 50mM、MgCl<sub>2</sub> 2mM、1UのExTaq DNAポリメラーゼ(タカラバイオ株式会社製)、フォワードプライマー(lytA-F)及びリバースプライマー(lytA-R)各0.5 $\mu$ M及び鑄型DNA溶液1 $\mu$ lを加えて調製した。

PCR反応は、サーマルサイクラー(MJ research社製)を用いて30サイクル行った。各サイクルでは、94 15秒間の変性、53 15秒間のアニーリング、72 15秒間の合成を順に行った。

(3) 増幅の有無の確認について

LAMP反応による増幅の有無は、前記特異性確認試験と同様に、白濁の有無を目視により確認することにより判定した。

さらに、比較例1におけるPCRによる増幅産物の有無とともに、増幅産物(2 $\mu$ l)を3%アガロースゲル中に電気泳動することで確認した。

(4) 試験結果について

試験結果は、上記のように電気泳動により増幅産物が確認された場合には「+」とし、増幅産物が確認されなかった場合は「-」とした。試験結果を、表5及び図3に示す。

【表5】

	1,000,000	100,000	10,000	1,000	100	10	1	0
実施例1 (35分)	+	+	+	+	-	-	-	-
実施例1 (60分)	+	+	+	+	+	+	-	-
実施例2 (35分)	+	-	-	-	-	-	-	-
実施例2 (60分)	+	+	+	+	-	-	-	-
実施例3 (35分)	-	-	-	-	-	-	-	-
実施例3 (60分)	+	+	+	+	-	-	-	-
実施例4 (35分)	-	-	-	-	-	-	-	-
実施例4 (60分)	+	+	-	-	-	-	-	-
実施例5 (35分)	+	+	+	+	+	+	-	-
実施例5 (60分)	+	+	+	+	+	+	-	-
比較例1 (PCR)	+	+	+	-	-	-	-	-

表5に示すように、実施例1のLAMPプライマーを用いた検出方法では、LAMP反応を60分間行うことで、鑄型DNA濃度が10コピーの場合にも検出することができた。また、実施例5のLAMPプライマーを用いた場合は、LAMP反応が35分間であっても、鑄型DNA濃度が10コピーのものを検出することができた。一方、PCR法を用いた検出においては、鑄型DNA濃度が10,000コピーでなければ検出することができなかった。このため、実施例1及び5ではLAMP反応を利用することで、検出の感度が比較例1よりも1,000倍も優れていることが確認された。また、表5に示すように、鑄型DNA濃度が1,000コピーである場合には、実施例1及び5では35分で検出可能であり、また、実施例2及び3では60分で検出可能であったことから、感度及び迅速性に優れることが確認された。

また、図3は、LAMP反応後の増幅産物を電気泳動したゲルを撮影した写真である。紙面両端のレーンMは100bpの間隔を示すためのマーカーを流したレーンであり、レーン1は鋳型DNAを1,000,000コピーとした場合の増幅産物、以後同様にレーン2は100,000コピー、レーン3は10,000コピー、レーン4は1,000コピー、レーン5は100コピー、レーン6は10コピー、レーン7は1コピー、レーン8は0コピーを鋳型とした場合の増幅産物を流したものとなっている。

また、レーン9は、レーン1の増幅産物をTasIで消化後に泳動したレーンである。TasI部位は標的部位の中央部付近(F1, B1cの間)に存在するため、TasIで処理すると増幅断片が標的部位の中央部付近(F1, B1cの間)で切断され、ループとループとの間の長さによって断片化される。このため、レーン9では102bp及び111bpの位置にバンドが現われることが予測される。

レーン1~6では、増幅産物がラダー状の泳動パターンを示しており、これより増幅産物が反転部分を有し、LAMP反応に特徴的なステム-ループ構造をとっていることが確認される。また、レーン9には102bp及び111bpに切断片が現われており、標的となる部分が増幅されていることが確認された。

[臨床的な検出について]

次に、実施例1~5のLAMPプライマーセットを用いて臨床的な検出を行ったので説明する。

まず、健康児(5~6歳)の口腔粘膜のサンプルを採取し、PCR法によってpneumolysin又はautolysinをコードする遺伝子を有する25種類の溶血レンサ球菌を単離した。このautolysinをコードする遺伝子を標的とするPCRプライマーセットは前述の感度試験と同様のものを用いた。また、pneumolysinをコードする遺伝子を標的とするPCRプライマーセットとしては、以下のPCRプライマーセット(ply-F及びply-R)を用いた(Salo, P., 他2名, "Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum", J. Infect. Dis., vol. 171, p. 479-482)。プライマーの塩基配列を以下に示す。

ply-F: atttctgtaa cagctaccaa cga (配列番号29)

ply-R: gaattccctg tcttttcaaa gtc (配列番号30)

また、PCR反応液の組成及び反応条件は、autolysinをコードする遺伝子を標的とするPCR反応では前記感度試験と同様であり、pneumolysinをコードする遺伝子を標的とするPCR反応では、反応液の組成は前記感度試験と同様で、反応条件はサーマルサイクラー(MJ research社製)を用いて30サイクルを行い、各サイクルでは94℃1分間の変性、55℃1分間のアニーリング、72℃1分間の合成を順に行った。

単離された25種類の溶血レンサ球菌は、4種のS. pneumoniaeと、通常は肺炎球菌に見られる病原性因子のpneumolysin又はautolysinをコードする遺伝子を有する21種のStreptococcus属の菌株(3種のS. oralis、17種のS. mitis、1種のStreptococcus属の未識別の菌株)であった。単離された菌種を表6に示す。

【表 6】

表 6

単離 番号	APIによる 識別	オプトヒン 感受性	胆汁 溶解性	(1)~(3)による 識別結果	PCR		実施例				
					lytA	ply	1	2	3	4	5
1	<i>S. oralis</i>	-	+	<i>S. oralis</i>	-	+	-	-	-	-	-
2	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	+	-	-	-	-	-	-
3	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
4	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
5	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
6	<i>S. oralis</i>	-	+	<i>S. oralis</i>	-	+	-	-	-	-	-
7	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
8	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
9	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
10	<i>S. mitis</i>	-	-	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
11	<i>S. mitis</i>	-	-	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
12	<i>S. pneumoniae</i>	+	+	<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+
13	<i>S. pneumoniae</i>	+	+	<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+
14	<i>S. pneumoniae</i>	+	+	<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+
15	not identified	-	-	<i>S. species</i>	+	-	-	-	-	-	-
16	<i>S. mitis</i>	-	-	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
17	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
18	<i>S. oralis</i>	-	-	<i>S. oralis</i>	-	+	-	-	-	-	-
19	<i>S. pneumoniae</i>	+	+	<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+
20	<i>S. mitis</i>	-	-	<i>S. mitis</i>	+	-	-	-	-	-	-
21	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
22	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
23	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
24	<i>S. mitis</i>	-	+	<i>S. mitis</i>	-	+	-	-	-	-	-
25	<i>S. mitis</i>	-	-	<i>S. mitis</i>	+	-	-	-	-	-	-

10

20

30

40

50

次に、上記 25 種の菌について、口腔内のレンサ球菌に通常適用される下記の判定基準 (1) ~ (3) を用いて、同定を行った。

(1) オプトヒン感受性試験を、直径 6.5 mm、オプトヒン含量 5 µg のディスク (栄研化学株式会社製) を用いて、5% の CO<sub>2</sub> 存在下で行った。そして、少なくとも直径 13 mm の阻止円がない場合は感受性なし「-」とし、少なくとも直径 13 mm の阻止円が形成されている場合には感受性あり「+」とした。

(2) 胆汁溶解試験を、Hawn と Beebe の方法に従って行った (参照: Hawn C. V. Z., E. Beebe., "Rapid method for demonstrating bile solubility of *Diplococcus pneumoniae*.", J. Bacteriol., 1965, vol. 90, p. 549)。そして、胆汁溶解性の場合には「+」、胆汁非溶解性の場合には「-」とした。

(3) 商業用のキット API 20 Strep (bio Merieux 社製) を用い、酵素活性及び糖発酵性等に基づいて同定を行った。

上記 (1) ~ (3) のそれぞれの結果、及び、(1) ~ (3) より総合的に判断した識別結果を表 6 に示す。

さらに、PCR 法及び LAMP 法をそれぞれ用いて、25 種の菌についてスクリーニングを行った。この際、PCR 法及び LAMP 法の比較を行うために、鋳型 DNA のコピー数が等しくなるように、反応チューブ 1 本当たり 10<sup>6</sup> コピーに調製した。PCR プライマーは上述したものであり、LAMP プライマーは実施例 1 ~ 5 のものを用いた。LAMP 法における反応時間は 60 分とした。

その結果、LAMP 法では 4 種の菌 (*S. pneumoniae*) がポジティブ反応を示し、21 種の菌がネガティブ反応を示した。これに対し、PCR 法では、lytA 遺伝子に関しては 8 種がポジティブ反応を示し 17 種がネガティブ反応を示した。また、ply 遺伝子に関しては 21 種がポジティブ反応を示し 4 種がネガティブ反応を示した。

このように、LAMP法を用いた場合には、他の21種の菌を検出することなく、4種の*S. pneumoniae*を完全に検出することができたのに対し、PCR法を用いた場合には、*lytA*遺伝子に関しては4種の菌を誤ってポジティブとして検出し、*ply*遺伝子に関しては17種の菌を誤って検出したことになる。

従って、本発明の検出方法を用いれば、口腔咽頭において共生し、かつ、16SrRNAの配列が99%以上一致するなど最も*S. pneumoniae*と近縁な*S. mitis*及び*S. oralis*などとの区別も可能であり、*S. pneumoniae*感染の臨床診断にも有効であることが確認された。

[リアルタイム濁度測定試験について]

次に、実施例1、2、及び、実施例4(表2に配列を示す)のLAMPプライマーセットを用いたLAMP反応についてリアルタイム濁度測定を行った。

(1) 検出の迅速性について

本試験では、実施例1、2及び実施例4のLAMPプライマーセットを用い、LAMP反応液組成及びLAMP反応条件を前述と同様とし、鑄型DNAの濃度(コピー数)を反応チューブ1本当たり所定コピー数となるように調製し、LAMP反応を60分間行った。このLAMP反応の間、Loopamp(登録商標)リアルタイム濁度測定装置(テラメックス株式会社製、型番LA-200)を用いて6秒毎に650nmの吸光度を読み取った。

結果を、図4及び図5に示す。なお、図4中、Aは実施例1のプライマーを用いコピー数 $10^7$ のDNAを鑄型とした増幅結果、Bは実施例1のプライマーを用いコピー数0のDNAを鑄型とした増幅結果、Cは実施例2のプライマーを用いコピー数 $10^7$ のDNAを鑄型とした増幅結果、Dは実施例2のプライマーを用いコピー数0のDNAを鑄型とした増幅結果を示す。また、図5中、Aは実施例1のプライマーを用いコピー数 $10^7$ のDNAを鑄型とした増幅結果、Bは実施例1のプライマーを用いコピー数0のDNAを鑄型とした増幅結果、Cは実施例4のプライマーを用いコピー数 $10^7$ のDNAを鑄型とした増幅結果、Dは実施例4のプライマーを用い、コピー数0のDNAを鑄型とした増幅結果を示す。

これらの図に示すように、鑄型DNA濃度が同じでもLAMPプライマーによって、濁度が立ち上がる時間(増幅効率)は異なっていたが、いずれの実施例においても検出が可能であり、実施例1のLAMPプライマーセットを用いた場合に最も迅速に検出可能であることが確認された。特に実施例1と実施例2とでは、プライマーの配列上の違いは微差であり(FIPのF1c領域の5'末端の一塩基及び3'末端の二塩基)、特異性や感度の性能はほぼ互角である。

F1c領域の微差により迅速性が異なるのは、LAMP反応特有の伸長反応起点(ループ部分)を形成するF1c領域が、LAMP反応の速度を決定するのに重要な役割を果たしているためであると考えられる。中でも、実施例1及び実施例2における試験結果からF1c領域の5'末端側で、*S. pneumoniae*に特異的な三つの塩基に隣接したC(*lytA*遺伝子上の131番目)がループ部分形成におけるF1c/F1アニールの迅速性に重要な役割を果たしているものと推測される。

次に、反応チューブ1本当たりの鑄型DNA濃度を $0 \sim 10^6$ コピーに調製し、実施例1及び実施例4のLAMPプライマーセットをそれぞれ添加してLAMP反応を行い、この反応中に上記リアルタイム濁度測定装置を用いて6秒毎に650nmの吸光度を測定した。

実施例1におけるリアルタイム濁度測定の結果を図6に示す。

図6に示すように、鑄型DNA濃度が10コピー以上であれば、60分以内に濁度が0.1以上になることが確認され、この結果は前記感度試験における目視及び電気泳動による増幅の有無の判別結果と一致した。また、最初に用いた鑄型DNA濃度の増加に伴い、スレッシュホールドタイム(濁度が0.1を超えるまでの時間)が短くなることが確認された。

図7には、実施例1の場合のスレッシュホールドタイム(Tt)と当初の鑄型DNA濃

10

20

30

40

50



度の常用対数の関係を示す。これらの間には線形性が認められ、相関係数  $r^2 = 0.986$  と高い相関を示した。これは、2004年森らが示すように、*S. pneumoniae* 由来の鋳型DNAの初期濃度が未知の場合に、その存在の有無のみでなくその濃度も定量可能であることを意味する (Mori, Y., 他3名, "Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA", *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 59, p. 145 - 157)。すなわち、例えば、濃度未知のサンプルについても、同様に希釈倍率の異なる希釈液を調製し、各希釈液を用いてLAMP反応を行った場合のスレッシュホールドタイムを測定することで回帰直線を作成すれば、この回帰直線から、未知の鋳型DNAの初期濃度を特定することができる。

10

実施例4のLAMPプライマーセットを用いた場合には、図8に示すように濁度の立ち上がり曲線を描いた。10,000コピーのスレッシュホールドタイムは約85分であったが、十分検出することができた(図8)。また、図8に示すように、得られた3つのサンプルのスレッシュホールドタイムに若干の相関性の傾向が確認された。

以上のことから、各実施例において*S. pneumoniae*を検出することができ、中でも実施例1のプライマーセットは、検出の迅速性及び定量性に極めて優れていた。

【ループプライマーを用いたLAMP法による検出】

染色体DNAの調製は前記と同様にし、LAMPプライマーセットは表1の「実施例5」の欄に記載のもの(配列番号23、配列番号24、配列番号15、配列番号4及び配列番号25)を用い、染色体DNAを鋳型にLAMP反応を行った。

20

結果を表1並びに図9及び10に示す。

ループプライマーを使用したときの検出時間は13分42秒であり(表1)、実施例1よりもさらに迅速に検出することができた。

図9は、リアルタイム濁度測定装置を用いたLAMP反応速度の測定結果を示すグラフである。図9に示すように、鋳型DNA濃度が10コピー以上であれば、30分以内に濁度が0.1以上になることが確認された。鋳型DNAの濃度が10コピーから $10^6$ コピーまで10倍ごとに増加するに従い、スレッシュホールドタイムが短縮された。

図10は、反応時間とDNA濃度との関係を示すものであり、両者は、 $r^2$ 値が0.999という直線関係を示した。

30

【産業上の利用可能性】

本発明の検出方法によれば、従来のPCR法などと比べても特異性に優れ、検出感度が高く、かつ、迅速に検出可能であると共に、*S. pneumoniae*の定量も可能である。また、LAMP反応は等温条件下でも進行し、また結果を目視により確認することができるため、設備もシンプルで、病院の検査室等でも簡易、迅速に行うことができる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号1：合成DNA  
 配列番号2：合成DNA  
 配列番号3：合成DNA  
 配列番号4：合成DNA  
 配列番号5：合成DNA  
 配列番号6：合成DNA  
 配列番号7：合成DNA  
 配列番号8：合成DNA  
 配列番号9：合成DNA  
 配列番号10：合成DNA  
 配列番号11：合成DNA  
 配列番号12：合成DNA  
 配列番号13：合成DNA  
 配列番号14：合成DNA  
 配列番号15：合成DNA

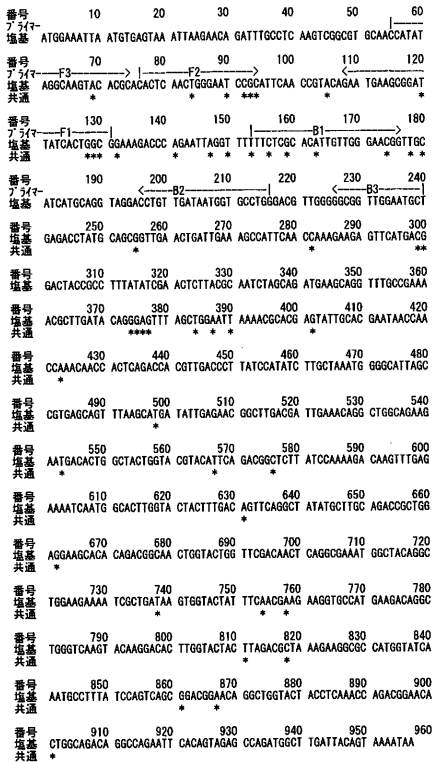
40

50

- 配列番号 16 : 合成 DNA
- 配列番号 17 : 合成 DNA
- 配列番号 18 : 合成 DNA
- 配列番号 19 : 合成 DNA
- 配列番号 20 : 合成 DNA
- 配列番号 21 : 合成 DNA
- 配列番号 22 : 合成 DNA
- 配列番号 23 : 合成 DNA
- 配列番号 24 : 合成 DNA
- 配列番号 25 : 合成 DNA
- 配列番号 27 : 合成 DNA
- 配列番号 28 : 合成 DNA
- 配列番号 29 : 合成 DNA
- 配列番号 30 : 合成 DNA

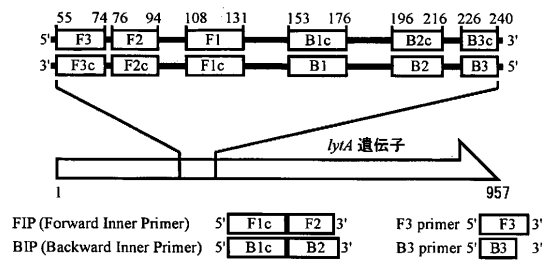
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

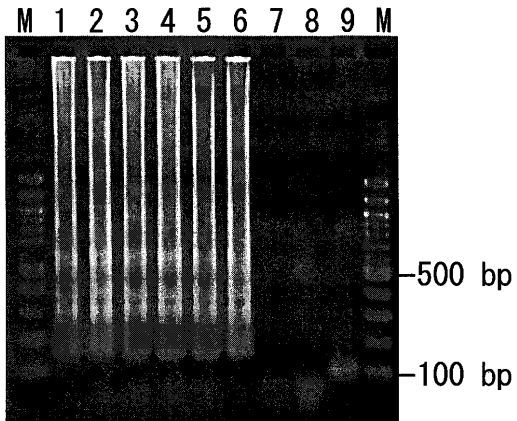
図 2



FIP (Forward Inner Primer) 5' F1c F2 3' F3 primer 5' F3 3'  
 BIP (Backward Inner Primer) 5' B1c B2 3' B3 primer 5' B3 3'

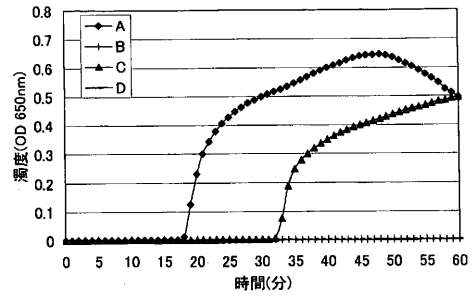
【 図 3 】

図 3



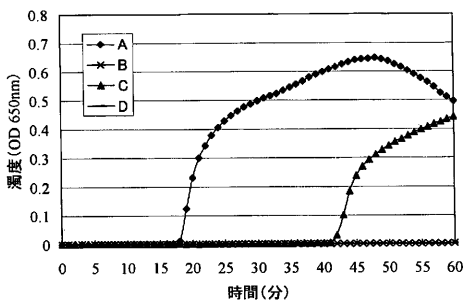
【 図 4 】

図 4



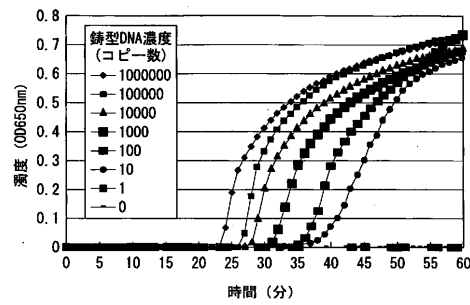
【 図 5 】

図 5



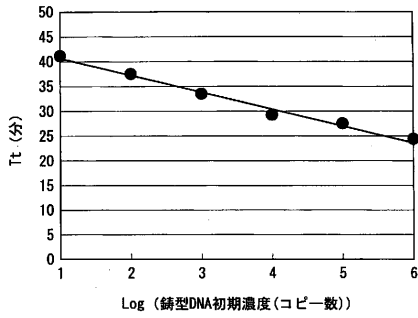
【 図 6 】

図 6



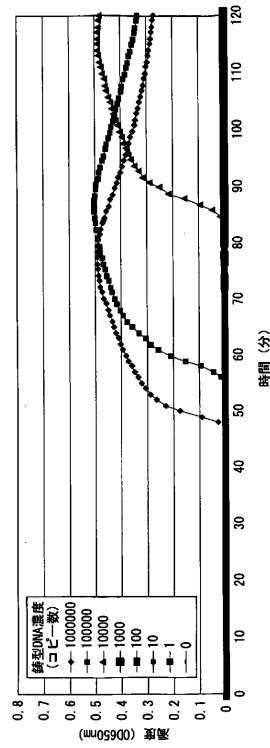
【 図 7 】

図 7



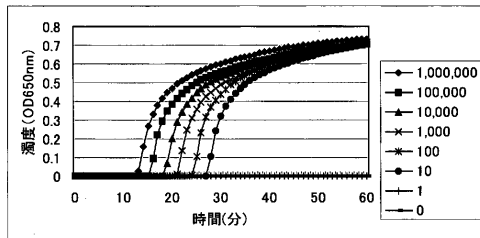
【 図 8 】

図 8



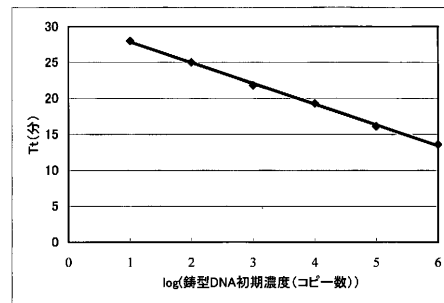
【 図 9 】

図 9



【 図 10 】

図 10



【配列表】

2006043368000001.xml

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/016069									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C12Q1/68</b> (2006.01), <b>C12N15/09</b> (2006.01)											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C12Q1/68</b> (2006.01), <b>C12N15/09</b> (2006.01)											
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), CAPLUS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">P, X</td> <td>SEKI, M. et al., "Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Targeting the <i>lytA</i> Gene for Detection of <i>Streptococcus Pneumoniae</i>", J.Clin.Microbiol., (Apr.2005), Vol.43, No.4, pages 1581 to 1586, full text</td> <td style="text-align: center;">1-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>SHEPPARD, C.L. et al., "Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of <i>Streptococcus pneumoniae</i> DNA in clinical samples", J.Medical Microbiology, (Mar.2004), Vol.53, pages 189 to 195, full text</td> <td style="text-align: center;">1-11</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	P, X	SEKI, M. et al., "Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Targeting the <i>lytA</i> Gene for Detection of <i>Streptococcus Pneumoniae</i> ", J.Clin.Microbiol., (Apr.2005), Vol.43, No.4, pages 1581 to 1586, full text	1-11	Y	SHEPPARD, C.L. et al., "Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of <i>Streptococcus pneumoniae</i> DNA in clinical samples", J.Medical Microbiology, (Mar.2004), Vol.53, pages 189 to 195, full text	1-11
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
P, X	SEKI, M. et al., "Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Targeting the <i>lytA</i> Gene for Detection of <i>Streptococcus Pneumoniae</i> ", J.Clin.Microbiol., (Apr.2005), Vol.43, No.4, pages 1581 to 1586, full text	1-11									
Y	SHEPPARD, C.L. et al., "Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of <i>Streptococcus pneumoniae</i> DNA in clinical samples", J.Medical Microbiology, (Mar.2004), Vol.53, pages 189 to 195, full text	1-11									
<input checked="" 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 22 November, 2005 (22.11.05)		Date of mailing of the international search report 06 December, 2005 (06.12.05)									
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer									
Facsimile No.		Telephone No.									

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016069

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	S.pneumoniae autolysin (lytA) gene, complete cds", GenBank [Online], 26 April, 1993 (26.04.93), Accession No.M13812 [Retrieved on 22 November, 2005 (22.11.05)], Retrieved from the United States NCBI web site	1-11
Y	NAGAMINE, K. et al., "Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers", Mol.Cell.Probes, (2002), Vol.16, pages 223 to 229, full text	1-11
Y	GILLESPIE, S.H. et al., "Detection of Streptococcus pneumoniae in Sputum Samples by PCR", J.Clin.Microbiol., (1994), Vol.32, No.5, pages 1308 to 1311, full text	1-11
Y	RUDOLPH, K.M. et al., "Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia", J.Clin.Microbiol., (1993), Vol.31, No.10, pages 2661 to 2666, full text	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/016069	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)			
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. C12Q1/68 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)			
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) CAplus (STN) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq			
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	
P,X	SEKI,M. et al., "Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Targeting the lytA Gene for Detection of Streptococcus pneumoniae", J.Clin.Microbiol., (Apr. 2005), Vol.43, No.4, pp.1581-1586, 全文	1-11	
Y	SHEPPARD,C.L. et al., "Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of Streptococcus pneumoniae DNA in clinical samples", J.Medical Microbiology, (Mar. 2004), Vol.53, pp.189-195, 全文	1-11	
<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 「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 22.11.2005		国際調査報告の発送日 06.12.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JJP) 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) 伏見 邦彦 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3334



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 5 / 0 1 6 0 6 9
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	"S. pneumoniae autolysin (lytA) gene, complete cds", GenBank[Online] , (1993.04.26), Accession no. M13812 [Retrieved on 2005.11.22], Retrieved from the United States NCBI web site	1-11
Y	NAGAMINE,K. et al., "Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers", Mol.Cell.Probes, (2002), Vol.16, pp.223-229, 全文	1-11
Y	GILLESPIE,S.H. et al., "Detection of Streptococcus pneumoniae in Sputum Samples by PCR", J.Clin.Microbiol., (1994), Vol.32, No.5, pp.1308-1311, 全文	1-11
Y	RUDOLPH,K.M. et al., "Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia", J.Clin.Microbiol., (1993), Vol.31, No.10, pp.2661-2666, 全文	1-11

## 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 津田 啓方

東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

Fターム(参考) 4B024 AA13 CA02 CA11 HA14

4B063 QA18 QA19 QQ06 QQ43 QQ52 QR08 QR32 QR56 QR62 QS25

QS34 QX02

(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。