

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/059798

発行日 平成29年8月10日 (2017.8.10)

(43) 国際公開日 平成28年4月21日 (2016.4.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	ZNAZ 4B029
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A 4B063
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

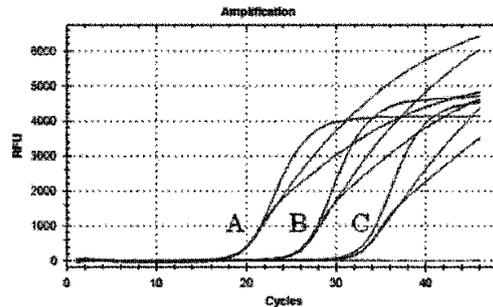
出願番号 特願2016-553975 (P2016-553975)	(71) 出願人 504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島 1-5-4 5
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/005198	
(22) 国際出願日 平成27年10月14日 (2015.10.14)	(71) 出願人 515281156 日本テクノサービス株式会社 茨城県牛久市中央 1-19-1
(31) 優先権主張番号 特願2014-212496 (P2014-212496)	(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日 平成26年10月17日 (2014.10.17)	(74) 代理人 100102255 弁理士 小澤 誠次
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(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】 新規な陽性コントロール核酸を利用した、被検試料中の標的核酸の検出・定量法

(57) 【要約】

本発明の課題は、被検試料用容器内への混入の有無を簡便かつ迅速に確認し得る、陽性コントロール核酸と該陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセットを提供することにある。また、本発明の課題は、被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を簡便かつ迅速に確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法を提供することにある。被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法に用いる、陽性コントロール核酸及び該陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセットにおいて、前記プローブのヌクレオチド配列を、被検試料が由来する生物種並びに標的核酸が由来する生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が70%以下であり、かつ、65以下のT_m値を有するヌクレオチド配列としたこと等を解決手段とする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸に特異的なプライマーセットと標的核酸に特異的なプローブとを用いて被検試料中の標的核酸の検出又は定量を行う際に用いるための、陽性コントロール核酸と、前記陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセットであって、

前記陽性コントロール核酸が、前記標的核酸の陽性コントロールとなり、かつ、(I)以下の(A)乃至(D)の特徴を有するヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、(II)上記(I)のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、及び(III)上記(I)の一本鎖核酸と上記(II)の一本鎖核酸から形成される二本鎖核酸、から選ばれるいずれかであり、

陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブのヌクレオチド配列が、被検試料が由来する生物種並びに標的核酸が由来する生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が70%以下であり、かつ、65以下のTm値を有するヌクレオチド配列であることを特徴とする、前記セット：

(A) 標的核酸に特異的な5'プライマーのヌクレオチド配列A1及び標的核酸に特異的な3'プライマーに対して相補的なヌクレオチド配列A2を含む；

(B) 標的核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列B1、又は、前記ヌクレオチド配列B1に対して相補的なヌクレオチド配列B2を含む；

(C) 陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列C1、又は、前記ヌクレオチド配列C1に対して相補的なヌクレオチド配列C2を含む；

(D) 前記ヌクレオチド配列B1又はB2、及び、前記ヌクレオチド配列C1又はC2が、前記ヌクレオチド配列A1とA2の間に配置されている。

【請求項 2】

陽性コントロール核酸のヌクレオチド配列における(I)のヌクレオチド配列が、

(I') 標的核酸のヌクレオチド配列のうち、ヌクレオチド配列A1及びA2、並びに、ヌクレオチド配列B1又はB2を有する一本鎖核酸において、ヌクレオチド配列A1及びA2とヌクレオチド配列B1又はB2以外の部分に、ヌクレオチド配列C1又はC2が挿入されたヌクレオチド配列であるか、若しくは、

前記標的核酸のヌクレオチド配列のうち、ヌクレオチド配列A1及びA2、並びに、ヌクレオチド配列B1又はB2を有する一本鎖核酸において、ヌクレオチド配列A1及びA2とヌクレオチド配列B1又はB2以外の部分の1若しくは2個以上のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列C1又はC2に置換されたヌクレオチド配列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】

ヌクレオチド配列A1及びA2のヌクレオチド数がそれぞれ15～50個の範囲内であり、ヌクレオチド配列B1及びB2のヌクレオチド数がそれぞれ15～100個の範囲内であり、ヌクレオチド配列C1及びC2のヌクレオチド数がそれぞれ15～100個の範囲内であり、陽性コントロール核酸に特異的なプローブのヌクレオチド数が15～100個の範囲内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。

【請求項 4】

陽性コントロール核酸に特異的なプローブのヌクレオチド配列が、ヌクレオチド数が2個である以下のヌクレオチド配列を2～4回繰り返し得られるヌクレオチド数4～8個の繰り返しヌクレオチド配列からなる群から選択される、2種又は3種以上のヌクレオチド配列が連結されたヌクレオチド配列である、請求項1～3のいずれかに記載のセット：AT、AG、AC、TA、TG、TC、GA、GT、GC、CA、CT、CG。

【請求項 5】

被検試料中の標的核酸の検出又は定量に用いるためのキットであって、該キットが、前記標的核酸に特異的なプライマーセットと；前記標的核酸に特異的なプローブと；陽性コントロール核酸と、前記陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含む請求項1～4のいずれかに記載のセットと；2個又は3個以上の反応容器と；を備え、

10

20

30

40

50

前記 2 個又は 3 個以上の反応容器のうち、被検試料用である一部の反応容器内には、標的核酸に特異的な前記プライマーセットと、標的核酸に特異的な前記プローブと、陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブとが固相化されており、陽性コントロール核酸用である他の一部の反応容器内には、標的核酸に特異的な前記プライマーセットと、標的核酸に特異的な前記プローブと、前記陽性コントロール核酸と、陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブとが固相化されていることを特徴とする、キット。

【請求項 6】

被検試料中の 2 種類の異なる標的核酸の検出又は定量に用いるための請求項 5 に記載のキットであって、

前記キットが、前記 2 種類の標的核酸にそれぞれ特異的な 2 種類のプライマーセットと ; 前記 2 種類の標的核酸にそれぞれ特異的な 2 種類のプローブと ; 前記 2 種類の標的核酸に対してそれぞれ陽性コントロールとなる 2 種類の陽性コントロール核酸と、前記 2 種類の陽性コントロール核酸に特異的な 1 種類又は 2 種類のプローブとを含むセットと ; 2 個又は 3 個以上の反応容器と ; を備え、

前記 2 種類の標的核酸のうち、一方の種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子の核酸であり、他方の種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子の核酸であり、

被検試料用の個々の反応容器内には、前記 2 種類のプライマーセットと、前記 2 種類のプローブと、前記 1 種類又は 2 種類のプローブとが固相化されており、陽性コントロール核酸用の個々の反応容器内には、前記 2 種類のプライマーセットと、前記 2 種類のプローブと、前記 2 種類の陽性コントロール核酸と、前記 1 種類又は 2 種類のプローブとが固相化されていることを特徴とする、キット。

【請求項 7】

各反応容器内に、さらにポリメラーゼが固相化されていることを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載のキット。

【請求項 8】

請求項 6 又は 7 に記載のキットであって、

2 個又は 3 個以上の反応容器が、3 個又は 4 個以上の連結された反応容器であり、

前記反応容器のうち、1 個又は 2 個以上の反応容器が被検試料用の反応容器であり、1 個又は 2 個以上の反応容器が陽性コントロール核酸用の反応容器であり、1 個又は 2 個以上の反応容器が陰性コントロール用の反応容器であり、

前記陰性コントロール用の反応容器には、2 種類の標的核酸にそれぞれ特異的な 2 種類のプライマーセットと ; 2 種類の標的核酸にそれぞれ特異的な 2 種類のプローブと ; 2 種類の陽性コントロール核酸に特異的な 1 種類又は 2 種類のプローブとが固相化されていることを特徴とする、キット。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のキットであって、

3 個又は 4 個以上の連結された反応容器が、4 個又は 5 個以上の連結された反応容器であり、

前記反応容器のうち、2 個又は 3 個以上の反応容器が陽性コントロール核酸用の反応容器であり、

前記陽性コントロールの 2 個又は 3 個以上の反応容器に固相化されている陽性コントロール核酸の量が段階的に異なり、前記 2 個又は 3 個以上の反応容器のうち、陽性コントロール核酸の量が最も多い反応容器における陽性コントロール核酸の量が、陽性コントロール核酸の量が最も少ない反応容器における陽性コントロール核酸の量に対して 10 倍以上であることを特徴とする、キット。

【請求項 10】

被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法であって、前記方法が、

(a) 被検試料用の反応容器内において、被検試料から得られた核酸と、前記標的核酸に特異的なプライマーセットとを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物を得る工程 a :

10

20

30

40

50

(b) 陽性コントロール核酸用の反応容器内において、陽性コントロール核酸と、標的核酸に特異的な前記プライマーセットとを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物を得る工程 b :

(c) 被検試料用の反応容器内において、上記工程 a で得られた増幅産物を、前記標的核酸に特異的なプローブ及び前記陽性コントロール核酸に特異的なプローブと接触させ、前記標的核酸及び前記陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行う工程 c : 及び、

(d) 陽性コントロール核酸用の反応容器内において、上記工程 b で得られた増幅産物を、標的核酸に特異的な前記プローブ及び陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブと接触させ、前記標的核酸及び前記陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行う工程 d :

を含む方法であり、

上記工程 (c) において前記陽性コントロール核酸が検出されない場合に、被検試料用容器内への前記陽性コントロール核酸の混入がないと確認することができ、

前記陽性コントロール核酸が、前記標的核酸の陽性コントロールとなり、かつ、(I) 以下の (A) 乃至 (D) の特徴を有するヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、(II) 上記 (I) のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、及び (III) 上記 (I) の一本鎖核酸と上記 (II) の一本鎖核酸から形成される二本鎖核酸、から選ばれるいずれかであり、

陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブのヌクレオチド配列が、被検試料が由来する生物種並びに標的核酸が由来する生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が 70% 以下であり、かつ、65 以下の Tm 値を有するヌクレオチド配列であることを特徴とする、方法 :

(A) 標的核酸に特異的な 5' プライマーのヌクレオチド配列 A1 及び標的核酸に特異的な 3' プライマーに対して相補的なヌクレオチド配列 A2 を含む :

(B) 標的核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列 B1、又は、前記ヌクレオチド配列 B1 に対して相補的なヌクレオチド配列 B2 を含む :

(C) 陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列 C1、又は、前記ヌクレオチド配列 C1 に対して相補的なヌクレオチド配列 C2 を含む :

(D) 前記ヌクレオチド配列 B1 又は B2、及び、前記ヌクレオチド配列 C1 又は C2 が、前記ヌクレオチド配列 A1 と A2 の間に配置されている。

【請求項 11】

被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を確認しつつ、被検試料中の 2 種類の異なる標的核酸を検出又は定量する請求項 10 に記載の方法であって、

標的核酸に特異的なプライマーセットとして、2 種類の標的核酸にそれぞれ特異的な 2 種類のプライマーセットを用い、

陽性コントロール核酸として、2 種類の陽性コントロール核酸を用い、

標的核酸に特異的なプローブとして、2 種類の標的核酸にそれぞれ特異的な 2 種類のプローブを用い、

陽性コントロール核酸に特異的なプローブとして、2 種類の陽性コントロール核酸に特異的な 1 種類又は 2 種類のプローブを用いて、

前記 2 種類の標的核酸及び前記 2 種類の陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行うことを含む方法であり、

工程 (c) において前記陽性コントロール核酸が検出されない場合に、被検試料用容器内への前記陽性コントロール核酸の混入がないと確認することができ、

前記 2 種類の標的核酸のうち、一方の種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子の核酸であり、他方の種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子の核酸である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法に関する。より詳細には、被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入（コンタミネーション）の有無を確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸の増幅及び検出に関する技術は、感染症の診断、農作物の核酸検査、遺伝子診断などの様々な分野において幅広く利用されている。核酸の増幅や検出を行う方法として、様々な方法が用いられている。

【0003】

核酸の増幅法としては、代表的なPCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法）の他、TRC法（転写-逆転写協奏反応法）、TMA法（転写媒介性増幅法）、NASBA法（核酸配列ベース増幅法）、LAMP法（ループ媒介性等温増幅法）、SMAF法（スマート増幅プロセス法）、ICAN法（等温キメラプライマー開始核酸増幅法）などが知られている。また、増幅産物から目的とする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、より高感度、高精度な検出が可能であることから、プローブ法がよく用いられている。プローブ法に用いるプローブには多くの種類があり、ハイブリプローブ、Taqman（登録商標）プローブ、Qプローブ、サイクリングプローブ、Eプローブ（登録商標）、Qプローブ、molecular beaconプローブなどが知られている。

【0004】

核酸の増幅及び検出を行うとき、偽陰性の場合、すなわち、実際には陽性であるにもかかわらず、何らかの原因で陰性の結果が出る場合がある。このような偽陰性を避けるため、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する際に、被検試料の反応容器とは別の反応容器内において、被検試料に代えて陽性コントロール核酸を用い、同様の核酸の増幅、検出の操作を行うことがしばしばなされている。陽性コントロール核酸を用いた場合に陽性の結果が出ていれば、被検試料を用いた場合の陰性の結果に信頼性が高まり、偽陰性の可能性を格段に低下させることができる。また、被検試料中の標的核酸のコピー数や濃度をより正確に測定するために、被検試料の反応容器とは別の反応容器において、既知濃度の陽性コントロール核酸を用い、同様の核酸の増幅、検出の操作を行うことがしばしばなされている。例えば特許文献1には、標的ポリヌクレオチドを検出するための方法において、陽性コントロール核酸として、外部コントロールポリヌクレオチド（ECP）を用いる方法

【0005】

陽性コントロール核酸は、陽性コントロールとしての機能を発揮するために、標的核酸と同様に、プライマー結合配列及びプローブ結合配列を必然的に有する。したがって、核酸の増幅及び検出を行う際に、陽性コントロール核酸を併用する場合、陽性コントロール核酸やその増幅産物が、被検試料用の反応容器内に誤って混入すれば、偽陽性反応の原因となってしまうという問題があった。特に、核酸の増幅及び検出という試験においては、他の一般的な比較試験とは異なり、添加した陽性コントロールが何十万倍、何百万倍にも増幅されるため、ごく微量の陽性コントロール核酸であっても、それが混入すれば偽陽性となる可能性がきわめて高い。さらに、近年は、複数のチューブが1列に連結されたストリップチューブや、多数のウェルがプレート上に配置されたマイクロプレートなどの多数の反応容器が互いに近接した器具を用いて、1度に多数の反応を効率的に行うことが多いため、陽性コントロール核酸が被検試料用の反応容器内に誤って混入してしまう懸念は依然として高い。加えて、近年、核酸の増幅及び検出をより簡便かつ迅速に行うことができるように、前述の多数の反応容器が近接した器具において、陽性コントロール核酸やプライマーセットなど、核酸増幅反応に必要な試薬をそれぞれの反応容器内にあらかじめ配置又は固相化することもよく行われている。陽性コントロール核酸を反応容器内に配置又は固相化する際には、より高濃度の陽性コントロール核酸を扱うため、ごくわずかであってもそれが被検試料用の容器内に誤って混入すれば、偽陽性の原因となったり、標的核酸の定量値が大きくなる原因となってしまう。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

核酸の増幅及び検出に関する従来からの一般的な問題として、キャリアオーバーコンタミネーション（持ち越し汚染）の問題がある。キャリアオーバーコンタミネーションとは、以前に行った核酸増幅反応の増幅産物が、新たに行う核酸増幅反応の容器内に混入することにより、偽陽性等が生じることをいう。かかるキャリアオーバーコンタミネーションを防止する方法の1つとして、dTTPの代わりにdUTPを含む基質を用いてPCRを行い、増幅産物にウラシル塩基を取り込ませ、次のPCRを行う際にウラシル-N-グリコシラーゼ（UNG）処理することで、コンタミネーションした増幅産物を分解する手法（dUTP/UDGコンタミネーション除去法）がよく知られている（非特許文献1）。また、かかるdUTP/UDGコンタミネーション除去法を改良した方法として、脱塩基DNAの分解を促進するポリアミンを併用した方法が開示されている（特許文献2）。

10

【 0 0 0 7 】

しかし、核酸の増幅及び検出を行う際に、特に被検試料用容器内への陽性コントロール核酸について、その混入を防止する実用的な方法、あるいは、かかる混入の有無を簡便かつ迅速に確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する実用的な方法は報告されていなかった。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 特表 2 0 0 4 - 5 0 7 2 4 8 号 公 報

20

【 特許文献 2 】 特開 2 0 1 0 - 4 8 8 4 号 公 報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 Gene , Vol . 9 3 (1) , 1 2 5 - 1 2 8 (1 9 9 0)

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

本発明は、被検試料用容器内への混入の有無を簡便かつ迅速に確認し得る、陽性コントロール核酸と該陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセットを提供することにある。また、本発明は、被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を簡便かつ迅速に確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法を提供することにある。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明者らは、上記課題を解決するべく鋭意検討を行ったところ、陽性コントロール核酸を、(I)後述の(A)乃至(D)の特徴を有するヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、(II)上記(I)のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、及び(III)上記(I)の一本鎖核酸と上記(II)の一本鎖核酸から形成される二本鎖核酸、から選ばれるいずれかとし、かつ、

陽性コントロール核酸に特異的なプローブのヌクレオチド配列を、被検試料が由来する生物種並びに標的核酸が由来する生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が70%以下であり、かつ、65以下のTm値を有するヌクレオチド配列とすることによって、上記課題を解決できることを見だし、本発明を完成するに至った。

40

(A) 標的核酸に特異的な5'プライマーのヌクレオチド配列A1及び標的核酸に特異的な3'プライマーに対して相補的なヌクレオチド配列A2を含む；

(B) 標的核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列B1、又は、前記ヌクレオチド配列B1に対して相補的なヌクレオチド配列B2を含む；

(C) 陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列C1、又は、前記ヌクレオチド配列C1に対して相補的なヌクレオチド配列C2を含む；

50

(D) 前記ヌクレオチド配列 B 1 又は B 2、及び、前記ヌクレオチド配列 C 1 又は C 2 が、前記ヌクレオチド配列 A 1 と A 2 の間に配置されている：

【0012】

すなわち、本発明は、

(1) 標的核酸に特異的なプライマーセットと標的核酸に特異的なプローブとを用いて被検試料中の標的核酸の検出又は定量を行う際に用いるための、陽性コントロール核酸と、前記陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセットであって、

前記陽性コントロール核酸が、前記標的核酸の陽性コントロールとなり、かつ、(I) 以下の(A)乃至(D)の特徴を有するヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、(II) 上記(I)のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、及び(III) 上記(I)の一本鎖核酸と上記(II)の一本鎖核酸から形成される二本鎖核酸、から選ばれるいずれかであり、

陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブのヌクレオチド配列が、被検試料が由来する生物種並びに標的核酸が由来する生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が70%以下であり、かつ、65 以下のTm値を有するヌクレオチド配列であることを特徴とする、前記セット：

(A) 標的核酸に特異的な5'プライマーのヌクレオチド配列 A 1 及び標的核酸に特異的な3'プライマーに対して相補的なヌクレオチド配列 A 2 を含む：

(B) 標的核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列 B 1、又は、前記ヌクレオチド配列 B 1 に対して相補的なヌクレオチド配列 B 2 を含む：

(C) 陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列 C 1、又は、前記ヌクレオチド配列 C 1 に対して相補的なヌクレオチド配列 C 2 を含む：

(D) 前記ヌクレオチド配列 B 1 又は B 2、及び、前記ヌクレオチド配列 C 1 又は C 2 が、前記ヌクレオチド配列 A 1 と A 2 の間に配置されている：や、

(2) 陽性コントロール核酸のヌクレオチド配列における(I)のヌクレオチド配列が、(I') 標的核酸のヌクレオチド配列のうち、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2、並びに、ヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 を有する一本鎖核酸において、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2 とヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 以外の部分に、ヌクレオチド配列 C 1 又は C 2 が挿入されたヌクレオチド配列であるか、若しくは、

前記標的核酸のヌクレオチド配列のうち、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2、並びに、ヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 を有する一本鎖核酸において、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2 とヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 以外の部分の1若しくは2個以上のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列 C 1 又は C 2 に置換されたヌクレオチド配列であることを特徴とする上記(1)に記載のセットや、

(3) ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2 のヌクレオチド数がそれぞれ15~50個の範囲内であり、ヌクレオチド配列 B 1 及び B 2 のヌクレオチド数がそれぞれ15~100個の範囲内であり、ヌクレオチド配列 C 1 及び C 2 のヌクレオチド数がそれぞれ15~100個の範囲内であり、陽性コントロール核酸に特異的なプローブのヌクレオチド数が15~100個の範囲内であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載のセットや、

(4) 陽性コントロール核酸に特異的なプローブのヌクレオチド配列が、ヌクレオチド数が2個である以下のヌクレオチド配列を2~4回繰り返して得られるヌクレオチド数4~8個の繰り返しヌクレオチド配列からなる群から選択される、2種又は3種以上のヌクレオチド配列が連結されたヌクレオチド配列である、上記(1)~(3)のいずれかに記載のセット：

A T、A G、A C、T A、T G、T C、G A、G T、G C、C A、C T、C G：に関する。

【0013】

また、本発明は、

(5) 被検試料中の標的核酸の検出又は定量に用いるためのキットであって、該キットが、前記標的核酸に特異的なプライマーセットと；前記標的核酸に特異的なプローブと；陽

10

20

30

40

50

性コントロール核酸と、前記陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含む上記(1)～(4)のいずれかに記載のセットと；2個又は3個以上の反応容器と；を備え、

前記2個又は3個以上の反応容器のうち、被検試料用である一部の反応容器内には、標的核酸に特異的な前記プライマーセットと、標的核酸に特異的な前記プローブと、陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブとが固相化されており、陽性コントロール核酸用である他の一部の反応容器内には、標的核酸に特異的な前記プライマーセットと、標的核酸に特異的な前記プローブと、前記陽性コントロール核酸と、陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブとが固相化されていることを特徴とする、キットや、

(6)被検試料中の2種類の異なる標的核酸の検出又は定量に用いるための上記(5)に記載のキットであって、

前記キットが、前記2種類の標的核酸にそれぞれ特異的な2種類のプライマーセットと；前記2種類の標的核酸にそれぞれ特異的な2種類のプローブと；前記2種類の標的核酸に対してそれぞれ陽性コントロールとなる2種類の陽性コントロール核酸と、前記2種類の陽性コントロール核酸に特異的な1種類又は2種類のプローブとを含むセットと；2個又は3個以上の反応容器と；を備え、

前記2種類の標的核酸のうち、一方の種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子の核酸であり、他方の種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子の核酸であり、

被検試料用の個々の反応容器内には、前記2種類のプライマーセットと、前記2種類のプローブと、前記1種類又は2種類のプローブとが固相化されており、陽性コントロール核酸用の個々の反応容器内には、前記2種類のプライマーセットと、前記2種類のプローブと、前記2種類の陽性コントロール核酸と、前記1種類又は2種類のプローブとが固相化されていることを特徴とする、キットや、

(7)各反応容器内に、さらにポリメラーゼが固相化されていることを特徴とする上記(5)又は(6)に記載のキットや、

(8)上記(6)又は(7)に記載のキットであって、

2個又は3個以上の反応容器が、3個又は4個以上の連結された反応容器であり、

前記反応容器のうち、1個又は2個以上の反応容器が被検試料用の反応容器であり、1個又は2個以上の反応容器が陽性コントロール核酸用の反応容器であり、1個又は2個以上の反応容器が陰性コントロール用の反応容器であり、

前記陰性コントロール用の反応容器には、2種類の標的核酸にそれぞれ特異的な2種類のプライマーセットと；2種類の標的核酸にそれぞれ特異的な2種類のプローブと；2種類の陽性コントロール核酸に特異的な1種類又は2種類のプローブとが固相化されていることを特徴とする、キットや、

(9)上記(8)に記載のキットであって、

3個又は4個以上の連結された反応容器が、4個又は5個以上の連結された反応容器であり、

前記反応容器のうち、2個又は3個以上の反応容器が陽性コントロール核酸用の反応容器であり、

前記陽性コントロールの2個又は3個以上の反応容器に固相化されている陽性コントロール核酸の量が段階的に異なり、前記2個又は3個以上の反応容器のうち、陽性コントロール核酸の量が最も多い反応容器における陽性コントロール核酸の量が、陽性コントロール核酸の量が最も少ない反応容器における陽性コントロール核酸の量に対して10倍以上であることを特徴とする、キット

【0014】

また、本発明は、

(10)被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法であって、前記方法が、

(a)被検試料用の反応容器内において、被検試料から得られた核酸と、前記標的核酸に特異的なプライマーセットとを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物を得る工程a；

10

20

30

40

50

(b) 陽性コントロール核酸用の反応容器内において、陽性コントロール核酸と、標的核酸に特異的な前記プライマーセットとを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物を得る工程 b :

(c) 被検試料用の反応容器内において、上記工程 a で得られた増幅産物を、前記標的核酸に特異的なプローブ及び前記陽性コントロール核酸に特異的なプローブと接触させ、前記標的核酸及び前記陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行う工程 c : 及び、

(d) 陽性コントロール核酸用の反応容器内において、上記工程 b で得られた増幅産物を、標的核酸に特異的な前記プローブ及び陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブと接触させ、前記標的核酸及び前記陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行う工程 d :

を含む方法であり、

上記工程 (c) において前記陽性コントロール核酸が検出されない場合に、被検試料用容器内への前記陽性コントロール核酸の混入がないと確認することができ、

前記陽性コントロール核酸が、前記標的核酸の陽性コントロールとなり、かつ、(I) 以下の (A) 乃至 (D) の特徴を有するヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、(II) 上記 (I) のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、及び (III) 上記 (I) の一本鎖核酸と上記 (II) の一本鎖核酸から形成される二本鎖核酸、から選ばれるいずれかであり、

陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブのヌクレオチド配列が、被検試料が由来する生物種並びに標的核酸が由来する生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が 70% 以下であり、かつ、65 以下の Tm 値を有するヌクレオチド配列であることを特徴とする、方法 :

(A) 標的核酸に特異的な 5' プライマーのヌクレオチド配列 A1 及び標的核酸に特異的な 3' プライマーに対して相補的なヌクレオチド配列 A2 を含む :

(B) 標的核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列 B1、又は、前記ヌクレオチド配列 B1 に対して相補的なヌクレオチド配列 B2 を含む :

(C) 陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列 C1、又は、前記ヌクレオチド配列 C1 に対して相補的なヌクレオチド配列 C2 を含む :

(D) 前記ヌクレオチド配列 B1 又は B2、及び、前記ヌクレオチド配列 C1 又は C2 が、前記ヌクレオチド配列 A1 と A2 の間に配置されている : や

(11) 被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を確認しつつ、被検試料中の 2 種類の異なる標的核酸を検出又は定量する上記 (10) に記載の方法であって、

標的核酸に特異的なプライマーセットとして、2 種類の標的核酸にそれぞれ特異的な 2 種類のプライマーセットを用い、

陽性コントロール核酸として、2 種類の陽性コントロール核酸を用い、

標的核酸に特異的なプローブとして、2 種類の標的核酸にそれぞれ特異的な 2 種類のプローブを用い、

陽性コントロール核酸に特異的なプローブとして、2 種類の陽性コントロール核酸に特異的な 1 種類又は 2 種類のプローブを用いて、

前記 2 種類の標的核酸及び前記 2 種類の陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行うことを含む方法であり、

工程 (c) において前記陽性コントロール核酸が検出されない場合に、被検試料用容器内への前記陽性コントロール核酸の混入がないと確認することができ、

前記 2 種類の標的核酸のうち、一方の種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子の核酸であり、他方の種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子の核酸である、方法に関する。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、被検試料用容器内への混入の有無を簡便かつ迅速に確認し得る、陽性コントロール核酸と該陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセットを提供す

10

20

30

40

50

ることができる。また、本発明によれば、被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を簡便かつ迅速に確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】本発明のキットの一形態である、試薬固相化8連ストリップPCRチューブを表す図である。A～Cは、陽性コントロール核酸用の反応容器であり、D～Gは、被検試料用の反応容器であり、Hは陰性コントロール用の反応容器である。

【図2】本発明のキットの一形態である、試薬固相化8連ストリップPCRチューブを表す図である。A～Cは、陽性コントロール核酸用の反応容器であり、D～Gは、被検試料用の反応容器であり、Hは核酸増幅反应用バッファーのための反応容器である。

【図3】本願実施例4におけるリアルタイムPCRアッセイの、反応容器A～C（陽性コントロール核酸用の反応容器）における増幅曲線を示す図である。横軸は反応サイクル数を表し、縦軸は蛍光強度RFUを表す。

【図4】図3の結果に基づいて各標的（EBV、TBP、IC）について算出したCq値（Y）と、陽性コントロール核酸のコピー数を常用対数で示した数値（X）とを用いて、回帰分析を行うことによって求めた回帰式（検量線）を表す図である。横軸は陽性コントロール核酸のコピー数を常用対数で示した数値を表し、縦軸はCq値を表す。

【図5】本願実施例4におけるリアルタイムPCRアッセイの、反応容器D～G（被検試料用の反応容器）における増幅曲線を示す図である。横軸は反応サイクル数を表し、縦軸は蛍光強度RFUを表す。

【図6】本願実施例5におけるリアルタイムPCRアッセイの、反応容器D（陽性コントロール核酸を1コピー混入させた、被検試料用の反応容器）における増幅曲線を示す図である。横軸は反応サイクル数を表し、縦軸は蛍光強度RFUを表す。

【図7】本願実施例6におけるリアルタイムPCRアッセイの、反応容器A（PPmix等、酵素及びバッファーを同一容器内で固相化）と、反応容器B（PPmix等及び酵素を同一容器内で固相化し、バッファー（ Mg^{2+} 及びdNTPを含む）は別容器で固相化）における増幅曲線を示す図である。横軸は反応サイクル数を表し、縦軸は蛍光強度RFUを表す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

1. [陽性コントロール核酸と、該陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセット]

陽性コントロール核酸と、該陽性コントロール核酸に特異的なプローブ（以下、単に「陽性コントロール核酸用プローブ」とも表示する。）とを含むセット（以下、単に「本発明のセット」とも表示する。）は、標的核酸に特異的なプライマーセット（以下、単に「標的核酸用プライマーセット」とも表示する。）と標的核酸に特異的なプローブ（以下、単に「標的核酸用プローブ」とも表示する。）とを用いて被検試料中の標的核酸の検出又は定量を行う際に用いるためのものである。本発明における陽性コントロール核酸は、上記標的核酸の陽性コントロールとなる。本発明の陽性コントロール核酸は、被検試料中の標的核酸の検出に有用である。例えば、本発明の陽性コントロール核酸を用いると、標的核酸用プライマーセットが目的通りの機能を果たして核酸増幅反応が正しく行われていること、及び、標的核酸用プローブが目的通りの機能を果たしていることを確認することができる。また、本発明の陽性コントロール核酸は、被検試料中の標的核酸の定量（絶対定量や相対定量）にも有用である。絶対定量に用いる場合は、例えば、既知濃度の陽性コントロール核酸の測定結果に基づいて検量線を作成することにより、未知濃度の被検試料サンプル中の標的核酸の定量を精度よく行うことができる。また、相対定量に用いる場合は、例えば、一定濃度に達するまでに要するサイクル数を、陽性コントロール核酸サンプルと被検試料サンプルの間で比較し、1サイクルで2倍に増幅するPCR原理に基づいて、相対的な濃度差を算出することもできる。

10

20

30

40

50

【0018】

(本発明における陽性コントロール核酸)

本発明の陽性コントロール核酸としては、

(I) 以下の(A)乃至(D)の特徴を有するヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、

(II) 上記(I)のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなる一本鎖核酸、及び、

(III) 上記(I)の一本鎖核酸と上記(II)の一本鎖核酸から形成される二本鎖核酸、から選ばれるいずれかである限り特に制限されない。

(A) 標的核酸に特異的な5'プライマーのヌクレオチド配列A1及び標的核酸に特異的な3'プライマーに対して相補的なヌクレオチド配列A2を含む；

(B) 標的核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列B1、又は、前記ヌクレオチド配列B1に対して相補的なヌクレオチド配列B2を含む；

(C) 陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブに対して相補的なヌクレオチド配列C1、又は、前記ヌクレオチド配列C1に対して相補的なヌクレオチド配列C2を含む；

(D) 前記ヌクレオチド配列B1又はB2、及び、前記ヌクレオチド配列C1又はC2が、前記ヌクレオチド配列A1とA2の間に配置されている。

【0019】

本発明の陽性コントロール核酸は、前述したように一本鎖核酸又は二本鎖核酸である。かかる核酸としては、DNAやRNA等のポリヌクレオチドが挙げられるが、安定性の観点からDNAであることが好ましい。

【0020】

上記(A)における各ヌクレオチド配列A1としては、標的核酸に特異的な5'プライマー(以下、単に「標的核酸用5'プライマー」とも表示する。)のヌクレオチド配列であるかぎり特に制限されず、上記(A)におけるヌクレオチド配列A2としては、標的核酸に特異的な3'プライマー(以下、単に「標的核酸用3'プライマー」とも表示する。)に対して相補的なヌクレオチド配列であるかぎり特に制限されない。陽性コントロール核酸がヌクレオチド配列A1及びA2を含んでいると、標的核酸用プライマーセットに含まれる標的核酸用5'プライマーや、標的核酸用3'プライマーが陽性コントロール核酸にハイブリダイズし、核酸増幅反応を行った際に、陽性コントロール核酸が増幅されて、陽性コントロールとしての機能を発揮することができる。なお、標的核酸用プライマーセットが、標的核酸用5'プライマーを2種類以上含んでいる場合は、陽性コントロール核酸は、それらのすべての種類の標的核酸用5'プライマーについてのヌクレオチド配列A1を含んでおり、標的核酸用プライマーセットが、標的核酸用3'プライマーを2種類以上含んでいる場合は、陽性コントロール核酸は、それらのすべての種類についてのヌクレオチド配列A2を含んでいる。

【0021】

上記(A)におけるヌクレオチド配列A1やA2のヌクレオチド数としては、通常15~50個の範囲内、好ましくは17~35個の範囲内が挙げられる。かかるヌクレオチド配列A1やA2の各ヌクレオチド配列のヌクレオチド数はそれぞれ同じであっても異なってもよい。また、かかるヌクレオチド配列A1やA2のヌクレオチド数は、そのヌクレオチド配列が対応する標的核酸用プライマーのヌクレオチド数と必ずしも同一でなくてもよいが、同一であることが好ましい。

【0022】

上記(B)におけるヌクレオチド配列B1としては、標的核酸用プローブに対して相補的なヌクレオチド配列である限り特に制限されず、上記(B)におけるヌクレオチド配列B2としては、上記ヌクレオチド配列B1に対して相補的なヌクレオチド配列である限り特に制限されない。陽性コントロール核酸がヌクレオチド配列B1又はB2を含んでいると、陽性コントロール核酸を鋳型とする核酸増幅反応により生じた増幅産物に対して、標的核酸用プローブがハイブリダイズすることができる。したがって、例えば、陽性コントロール核酸用の反応容器内において、陽性コントロール核酸を用いて核酸増幅反応を行っ

10

20

30

40

50

た場合に、標的核酸用プローブに由来するシグナルを検出又は定量することによって、標的核酸用プライマーセットが目的通りの機能を果たして核酸増幅反応が正しく行われていること、及び、標的核酸用プローブが目的通りの機能を果たしていることを確認したり、陽性コントロール核酸の濃度とシグナル強度等との関係を表す検量線を作成することができる。

【0023】

上記(B)におけるヌクレオチド配列B1やB2のヌクレオチド数としては、好ましくは15~100個の範囲内、より好ましくは17~60個の範囲内、さらに好ましくは20~40個の範囲内が挙げられる。かかるヌクレオチド配列B1やB2の各ヌクレオチド配列のヌクレオチド数はそれぞれ同じであっても異なってもよい。また、かかるヌクレオチド配列B1やB2のヌクレオチド数としては、そのヌクレオチド配列が対応する標的核酸用プローブのヌクレオチド数と必ずしも同一でなくてもよいが、同一であることが好ましい。

10

【0024】

上記(C)におけるヌクレオチド配列C1としては、陽性コントロール核酸に特異的なプローブ(陽性コントロール核酸用プローブ)に対して相補的なヌクレオチド配列である限り特に制限されず、上記(C)におけるヌクレオチド配列C2としては、上記ヌクレオチド配列C1に対して相補的なヌクレオチド配列である限り特に制限されない。陽性コントロール核酸がヌクレオチド配列C1又はC2を含んでいると、陽性コントロール核酸を鋳型とする核酸増幅反応により生じた増幅産物に対して、陽性コントロール核酸用プローブが特異的にハイブリダイズすることができる。したがって、例えば、被検試料用の反応容器内において核酸増幅反応を行った場合に、陽性コントロール核酸用プローブに由来するシグナルの有無を検出することによって、被検試料用の反応容器内に陽性コントロール核酸の混入の有無を確認することができる。

20

【0025】

上記(C)におけるヌクレオチド配列C1やC2のヌクレオチド数としては、好ましくは15~100個の範囲内、より好ましくは17~60個の範囲内、さらに好ましくは20~40個の範囲内が挙げられる。かかるヌクレオチド配列C1やC2の各ヌクレオチド配列のヌクレオチド数はそれぞれ同じであっても異なってもよい。また、かかるC1やC2のヌクレオチド配列のヌクレオチド数としては、そのヌクレオチド配列が対応する陽性コントロール核酸用プローブのヌクレオチド数と必ずしも同一でなくてもよいが、同一であることが好ましい。

30

【0026】

陽性コントロール核酸を2種類以上併用する場合、ヌクレオチド配列C1やC2は、陽性コントロール核酸の種類毎に異なってもよいが、より少ない種類の陽性コントロール核酸用プローブでより多い種類の陽性コントロール核酸を検出する観点から、併用する陽性コントロール核酸のうち2種類以上又は全ての種類の陽性コントロール核酸において、同じ配列であるヌクレオチド配列C1やC2を利用することが好ましく、併用する全ての種類の陽性コントロール核酸において、同じ上記ヌクレオチド配列C1又はC2を利用することがより好ましい。

40

【0027】

また、上記(D)に記載したように、本発明における陽性コントロール核酸においては、上記ヌクレオチド配列B1又はB2、及び、上記ヌクレオチド配列C1又はC2が、上記ヌクレオチド配列A1とA2の間に配置されている。このような配置とすることにより、陽性コントロール核酸の増幅産物に、ヌクレオチド配列B1又はB2、及び、ヌクレオチド配列C1又はC2が含まれることとなり、かかる増幅産物を標的核酸用プローブや、陽性コントロール核酸用プローブで検出又は定量することが可能となる。なお、標的核酸用プライマーセットが、標的核酸用5'プライマーを2種類以上含み、及び/又は、標的核酸用3'プライマーを2種類以上含んでいる場合、上記(D)におけるヌクレオチド配列A1は、2種類以上のヌクレオチド配列A1のうち、陽性コントロール核酸の5'末端

50

側に最も近いヌクレオチド配列 A 1 を意味し、上記 (D) におけるヌクレオチド配列 A 2 は、2 種類以上のヌクレオチド配列 A 2 のうち、陽性コントロール核酸の 3' 末端側に最も近いヌクレオチド配列 A 2 を意味する。

【 0 0 2 8 】

本発明の陽性コントロール核酸の好ましい態様として、陽性コントロール核酸のヌクレオチド配列が、標的核酸のヌクレオチド配列が変更されたヌクレオチド配列である場合を挙げることができ、具体的には、該陽性コントロール核酸の (I) に記載のヌクレオチド配列が、

(I') 標的核酸のヌクレオチド配列のうち、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2、並びに、ヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 を有する一本鎖核酸において、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2 とヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 以外の部分に、ヌクレオチド配列 C 1 又は C 2 が挿入されたヌクレオチド配列であるか、若しくは、

前記標的核酸のヌクレオチド配列のうち、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2、並びに、ヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 を有する一本鎖核酸において、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2 とヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 以外の部分の 1 若しくは 2 個以上 (好ましくは 1 ~ 2 0 0 個、より好ましくは 1 ~ 1 0 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 0 個) のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列 C 1 又は C 2 に置換されたヌクレオチド配列である陽性コントロール核酸を好ましく挙げることができ、中でも、

(I'') 標的核酸のヌクレオチド配列のうち、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2、並びに、ヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 を有する一本鎖核酸において、ヌクレオチド配列 A 1 及び A 2 とヌクレオチド配列 B 1 又は B 2 以外の部分に、ヌクレオチド配列 C 1 又は C 2 が挿入されたヌクレオチド配列である陽性コントロール核酸をより好ましく挙げることができる。

【 0 0 2 9 】

本発明における陽性コントロール核酸は、常法にしたがって、合成、核酸増幅反応、クローニング、又はそれらの組み合わせによって作製することができ、簡便性の観点から、合成によって作製することが好ましく挙げられる。また、かかる陽性コントロール核酸の作製は、人工遺伝子等の製造を行う会社に委託することもできる。

【 0 0 3 0 】

(本発明における陽性コントロール核酸に特異的なプローブ)

本発明の陽性コントロール核酸に特異的なプローブ (陽性コントロール核酸用プローブ) とは、陽性コントロール核酸の一部に特異的にハイブリダイズし、本発明の陽性コントロール核酸を特異的に検出又は定量し得るプローブを意味する。かかる陽性コントロール核酸用プローブのヌクレオチド配列としては、被検試料が由来する生物種並びに標的核酸が由来する生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が 7 0 % 以下、好ましくは 6 8 % 以下、より好ましくは 6 5 % 以下、さらに好ましくは 6 2 % 以下であるヌクレオチド配列であり、かつ、6 5 以下、好ましくは 6 0 以下、より好ましくは 5 5 以下、さらに好ましくは 5 0 以下、より好ましくは 4 7 以下、さらに好ましくは 4 5 以下、より好ましくは 4 3 以下の T m 値を有するヌクレオチド配列である限り特に制限されない。陽性コントロール核酸用プローブをこのようなヌクレオチド配列とすることにより、陽性コントロール核酸用プローブが陽性コントロール核酸以外の核酸にハイブリダイズしてしまうことを回避することができ、その結果、陽性コントロール核酸用プローブは陽性コントロール核酸に特異的にハイブリダイズすることになる。

【 0 0 3 1 】

本発明の陽性コントロール核酸用プローブは、通常、一本鎖核酸であることが好ましい。かかる核酸としては、DNA や RNA 等のポリヌクレオチドが挙げられるが、安定性の観点から DNA であることが好ましい。

【 0 0 3 2 】

上記の陽性コントロール核酸用プローブは、被検試料が由来する生物種及び標的核酸が

由来する生物種だけでなく、より多くの生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が70%以下、好ましくは68%以下、より好ましくは65%以下、さらに好ましくは62%以下であることが好ましい。陽性コントロール核酸用プローブの配列としてこのような配列を用いると、被検試料が由来する生物種が別の種類である場合や、標的核酸が別の種類である場合にも利用することができる、より汎用性の高い陽性コントロール核酸となるからである。前述の「より多くの生物種」としては、哺乳類、細菌、菌類、及び、ウイルスからなる群、好ましくは、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、細菌、菌類、及び、ウイルスからなる群から選択される2種以上、好ましくは4種以上、より好ましくは10種以上、さらに好ましくは20種以上、より好ましくは50種以上、さらに好ましくは100種以上、より好ましくは500種以上、さらに好ましくは1000種以上、より好ましくは5000種以上、さらに好ましくは7500種以上、より好ましくは10000種以上、さらに好ましくは12500種以上、より好ましくは15000種以上を挙げることができる。これらの生物種のゲノムやその転写産物の配列は、GenBank等の配列データベースの配列情報などを調べることによって確認することができる。

【0033】

本発明において、被検試料が由来する生物種と、標的核酸が由来する生物種は、異種であっても同種であってもよい。異種である場合の例としては、哺乳動物が病原微生物に感染しているかどうかを確認する目的で、該病原微生物の特定の核酸を標的核酸とし、哺乳動物に由来する被検試料を用いる場合が挙げられる。同種である場合の例としては、哺乳動物が疾患に罹患しているかどうかを確認する目的で、その疾患に関連する哺乳動物遺伝子の特定の核酸を標的核酸とし、哺乳動物に由来する被検試料を用いる場合が挙げられる。

【0034】

上記の陽性コントロール核酸用プローブは、65以下、好ましくは60以下、より好ましくは55以下、さらに好ましくは50以下、より好ましくは47以下、さらに好ましくは45以下、より好ましくは43以下のT_m値を有するヌクレオチド配列であるが、あるヌクレオチド配列のT_m値がいくつであるかは、最近接塩基対法、Wallace法、GC%法等の公知の算出方法によって算出することができ、中でも、最近接塩基対法による算出を好ましく挙げることができる。なお、本発明において、あるヌクレオチド配列のT_m値(melting temperature:融解温度)とは、そのヌクレオチド配列と、それに相補的なヌクレオチド配列からなる2本鎖核酸が含まれる溶液の温度を上昇させていったときに、前述の全ての2本鎖核酸のうち、半分の2本鎖核酸が解離する温度を意味する。

【0035】

本発明の陽性コントロール核酸用プローブのヌクレオチド配列の好ましい選択方法としては、以下のような工程を含む選択方法を好ましく挙げることができる。

工程(i):ヌクレオチド数が2~4個(好ましくは2~3個、より好ましくは2個)であるヌクレオチド配列を2~4回(好ましくは2~3回、より好ましくは2回)繰り返して得られるヌクレオチド数4~16個(好ましくは4~12個、より好ましくは4~8個、さらに好ましくは4~6個)の繰り返しヌクレオチド配列からなる群を得る工程:

工程(ii):上記工程(i)で得られた群から選択される、2種又は3種以上の繰り返しヌクレオチド配列を連結して、候補ヌクレオチド配列を設定する工程:

工程(iii):上記工程(ii)で設定した候補ヌクレオチド配列又は後述の工程(iv)で条件を満たしていると確認した候補ヌクレオチド配列が、被検試料が由来する生物種並びに標的核酸が由来する生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が70%以下、好ましくは68%以下、より好ましくは65%以下、さらに好ましくは62%以下であるヌクレオチド配列であるという条件を満たしているかどうかを、配列データベースの配列情報などを利用して確認する工程:

工程(iv):上記工程(ii)で設定した候補ヌクレオチド配列又は上記工程(iii)で条件を満たしていると確認した候補ヌクレオチド配列が、65以下、好ましくは60以

下、より好ましくは55以下、さらに好ましくは50以下、より好ましくは47以下、さらに好ましくは45以下、より好ましくは43以下のTm値を有するヌクレオチド配列という条件を満たしているかどうかを確認する工程：

工程(v)：上記工程(iii)及び上記工程(iv)の両方の条件を満たしている候補ヌクレオチド配列を、陽性コントロール核酸用プローブのヌクレオチド配列として選択する工程：

【0036】

上記工程(i)における、「ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列」としては、AT、AG、AC、TA、TG、TC、GA、GT、GC、CA、CT、CGが挙げられ、「ヌクレオチド数が3個であるヌクレオチド配列」としては、ATA、ATG、ATC、AGA、AGT、AGC、ACA、ACT、ACG、TAT、TAG、TAC、TGA、TGT、TGC、TCA、TCT、TCG、GAT、GAG、GAC、GTA、GTG、GTC、GCA、GCT、GCG、CAT、CAG、CAC、CTA、CTG、CTC、CGA、CGT、CGCが挙げられる。

10

【0037】

ヌクレオチド数が2～4個であるヌクレオチド配列を2～4回繰り返し返して得られるヌクレオチド数4～16個の繰り返しヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド数が2～4個であるヌクレオチド配列を2～4回繰り返し返して得られるヌクレオチド配列である限り、ヌクレオチド数が2～4個であるヌクレオチド配列1種のみが繰り返し返しに用いられていてもよいし、ヌクレオチド数が2～4個であるヌクレオチド配列2種以上が繰り返し返しに用いられていてもよい。また、繰り返し返しに用いられるヌクレオチド配列のヌクレオチド数は、2～4個の範囲内でそれぞれ異なってもよいが、同じヌクレオチド数のヌクレオチド配列を繰り返し返しに用いることが好ましい。なお、上記の「ヌクレオチド数が2～4個であるヌクレオチド配列を2～4回繰り返し返して得られるヌクレオチド数4～16個の繰り返しヌクレオチド配列からなる群」には、かかる繰り返し返しにより理論上得られる全種類のヌクレオチド数4～16個の繰り返しヌクレオチド配列が含まれる。

20

【0038】

上記工程(i)における好ましい候補ヌクレオチド配列としては、「ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列を2回繰り返し返して得られるヌクレオチド数4個の繰り返しヌクレオチド配列」や、「ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列を3回繰り返し返して得られるヌクレオチド数6個の繰り返しヌクレオチド配列」や、「ヌクレオチド数が3個であるヌクレオチド配列を2回繰り返し返して得られるヌクレオチド数6個の繰り返しヌクレオチド配列」が挙げられ、中でも、「ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列を2回繰り返し返して得られるヌクレオチド数4個の繰り返しヌクレオチド配列」や、「ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列を3回繰り返し返して得られるヌクレオチド数6個の繰り返しヌクレオチド配列」がより好ましく挙げられる。

30

【0039】

上記の「ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列を2回繰り返し返して得られるヌクレオチド数4個の繰り返しヌクレオチド配列」としては、ATAAT、AGAG、ACAC、TATA、TGTG、TCTC、GAGA、GTGT、GCGC、CACA、CTCT、CGCGが挙げられ、上記の「ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列を3回繰り返し返して得られるヌクレオチド数6個の繰り返しヌクレオチド配列」としては、ATAATAT、AGAGAG、ACACAC、TATATA、TGTGTG、TCTCTC、GAGAGA、GTGTGT、GCGCGC、CACACA、CTCTCT、CGCGCGが挙げられる。また、上記の「ヌクレオチド数が3個であるヌクレオチド配列を2回繰り返し返して得られるヌクレオチド数6個の繰り返しヌクレオチド配列」としては、ATAATA、ATGATG、ATCATC、AGAGA、AGTAGT、AGCAGC、ACAACA、ACTACT、ACGACG、TATTAT、TAGTAG、TACTAC、TGATGA、TGTGTG、TGCTGC、TCATCA、TCTTCT、TCGTGC、GATGAT、GAGGAG、GACGAC、GTAGTA、GTGGTG、GTCGT

40

50

C、G C A G C A、G C T G C T、G C G G C G、C A T C A T、C A G C A G、C A C C A C、C T A C T A、C T G C T G、C T C C T C、C G A C G A、C G T C G T、C G C C G C が挙げられる。

【0040】

上記工程 (ii) としては、上記工程 (i) で得られた群から選択される、2種又は3種以上の繰り返しヌクレオチド配列を連結して、候補ヌクレオチド配列を設定する工程である限り特に制限されず、2種又は3種以上の繰り返しヌクレオチド配列を連結する順序はランダムでもよいが、隣接する繰り返しヌクレオチド配列同士が異なる種類となるように連結することが好ましい。また、候補ヌクレオチド配列をいくつ連結するかは、候補ヌクレオチド配列のヌクレオチド数や、本発明の陽性コントロール核酸用プローブのヌクレオチド配列のヌクレオチド数を考慮して、適宜設定することができる。

10

【0041】

上記工程 (iii) における条件を満たしているかどうかを確認する方法として具体的には、配列データベース (GenBank等) の配列情報及びホモロジーサーチ用ソフトウェア (例えばBLAST (登録商標) 等) などを利用して、上記工程 (ii) で設定した候補ヌクレオチド配列又は後述の工程 (iv) で条件を満たしていると確認した候補ヌクレオチド配列が、上記工程 (iii) における条件を満たしているかどうかを確認する方法が挙げられる。かかる方法の好ましい態様として、以下の条件AによるBLASTのホモロジーサーチを行う方法が挙げられる。かかるホモロジーサーチを行うと、サーチ対象となったすべての配列との配列同一性を知ることができ、最も高い配列同一性が例えば70%以下であるかどうかを確認することができる。

20

【0042】

(条件A)

Databaseとして1) ~ 3) を順に選択して、ホモロジーサーチを行う。

program : Nucleotide blast

Database : 1) Human genomic + transcript; 2) Mouse genomic + transcript; 3) Others (nr etc) ;

Optimize for : Highly similar sequence (megablast)

【0043】

上記条件AによるBLASTのホモロジーサーチを行うと、最多でおよそ160000種の生物種のゲノム及び転写産物の配列との配列同一性を確認することができる。

30

【0044】

上記工程 (iv) における条件を満たしているかどうかを確認する方法として具体的には、上記工程 (ii) で設定した候補ヌクレオチド配列又は上記工程 (iii) で条件を満たしていると確認した候補ヌクレオチド配列が、上記工程 (iv) における条件を満たしているかどうかを、最近接塩基対法、Wallace法、GC%法等の公知の算出方法 (好ましくは最近接塩基対法) によって算出する方法が挙げられる。このようなTmの算出は、ウェブサイト上のソフトウェアなどを用いれば、簡便に行うことができる。

【0045】

上記条件AによるBLASTのホモロジーサーチを含む、上記工程 (i) ~ (v) の選択方法を実際に行うことによって選択された、本発明の陽性コントロール核酸用プローブの好ましいヌクレオチド配列として、配列番号1~3のヌクレオチド配列や配列番号15のヌクレオチド配列が挙げられる。配列番号1~3における上記配列同一性 (%) とTm値 () は、後述の表1に示すとおりである。

40

【0046】

かかる陽性コントロール核酸用プローブのヌクレオチド数としては、陽性コントロール核酸に特異的にハイブリダイズし得る限り特に制限されず、また、用いる核酸増幅法にも依るが、好ましくは13~100個の範囲内、より好ましくは17~60個の範囲内、さらに好ましくは20~30個の範囲内が挙げられる。

【0047】

50

陽性コントロール核酸を2種類以上用いる場合、かかる陽性コントロール核酸用プローブは、陽性コントロール核酸毎に異なるものを用いてもよいが、より少ない種類の陽性コントロール核酸用プローブでより多い種類の陽性コントロール核酸を検出する観点から、併用する陽性コントロール核酸用プローブのうち2種類以上又はすべての種類の陽性コントロール核酸用プローブにおいて同じヌクレオチド配列を利用することが好ましく、併用する全ての陽性コントロール核酸用プローブにおいて、同じヌクレオチド配列を利用することがより好ましい。

【0048】

本発明の陽性コントロール核酸用プローブは、対応する陽性コントロール核酸を検出又は定量するために標識物質で標識されていることが好ましく、より迅速又はより高感度で検出又は定量する観点から、蛍光物質で標識されていることがより好ましい。蛍光物質以外の上記標識物質としては、ビオチン、ビオチンとアビジンの複合体、あるいはペルオキシダーゼ、等の酵素が挙げられ、上記蛍光物質としては、ルシフェラーゼ等の蛍光タンパク質のほか、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、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）、JOE（6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ2',7'-ジメトキシフルオレセイン）、Cy3、Cy5、HEX（4,7,2',4',5',7'-ヘキサクロロ-6-カルボキシフルオレセイン）等の蛍光色素が好ましく挙げられる。本発明における標的核酸用プローブとしては、蛍光物質（レポーター蛍光色素）と消光物質（クエンチャー蛍光色素）で二重標識されていることがより好ましい。レポーター蛍光色素の例としては前述の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や、BHQ-1（[(4-(2-ニトロ-4-メチル-フェニル)-アゾ)-イル-(2-メトキシ-5-メチル-フェニル)-アゾ]-アニリン）、BHQ-2（[(4-(1-ニトロ-フェニル)-アゾ)-イル-(2,5-ジメトキシ-フェニル)-アゾ]-アニリン）等のブラックホールクエンチャーが挙げられる。なお、陽性コントロール核酸用プローブと、標的核酸用プローブとを同時に、簡便かつ迅速に検出又は定量し得る点で、陽性コントロール核酸用プローブに用いる標識（好ましくは蛍光標識）は、標的核酸用プローブに用いる標識（好ましくは蛍光標識）とは異なる標識（好ましくは蛍光標識）を用いることが好ましい。

【0049】

本発明における陽性コントロール核酸用プローブのタイプは特に制限されず、TaqMan（登録商標）プローブ、モレキュラービーコンプローブ、サイクリングプローブ、Eprobe（登録商標）、Qprobe（登録商標）、スコープオンプローブ、hybridization-probeなどが挙げられ、中でもTaqManプローブが好ましく挙げられる。TaqManプローブは、通常、核酸プローブの5'末端が蛍光物質（レポーター蛍光色素）で修飾され、3'末端が消光物質（クエンチャー蛍光色素）で修飾されたリニアオリゴヌクレオチドである。モレキュラービーコンプローブは、通常、核酸プローブの5'末端が蛍光物質（レポーター蛍光色素）で修飾され、3'末端が消光物質（クエンチャー蛍光色素）で修飾された、ステムループ構造を取り得るオリゴヌクレオチドである。サイクリングプローブは、通常、RNAとDNAからなるキメラオリゴヌクレオチドであり、一方の末端が蛍光物質（レポーター蛍光色素）で修飾され、他方の末端が消光物質（クエンチャー蛍光色素）で修飾されたオリゴヌクレオチドである。Eprobeは、通常、チミン塩基に蛍光色素を2つ有する人工核酸であり、ターゲットと結合していない1本鎖の状態では蛍光発光が抑制され、ターゲットと結合すると蛍光を発する。Qprobeは、通常、シトシンを末端とするオリゴヌクレオチドであり、その末端のシトシンが蛍光物質で標識されている。グアニン消光プローブとも呼ばれる。スコープオンプローブは、通常、核酸プローブの一方の末端が蛍光物質（レポーター蛍光色素）で修飾され、3'末端が消光物質（クエンチャー蛍光色素）で修飾された、ヘアピンループ構造を取り得るオリゴヌクレオチドである。hybridization-probeは、3'末端が蛍光色素で修飾されたオリゴヌクレオチドからなるドナープロ

ープと、5'末端が蛍光色素で修飾されたオリゴヌクレオチドからなるアクセプタープローブから構成されており、これらプローブがターゲットに結合すると両方の蛍光色素が近接して、ドナープローブの蛍光色素の蛍光によってアクセプタープローブの蛍光色素が励起して発光するものである。

【0050】

本発明における陽性コントロール核酸用プローブは、常法にしたがって、合成、核酸増幅反応、クローニング、又はそれらの組み合わせによって作製することができ、簡便性の観点から、合成によって作製することが好ましく挙げられる。また、かかる標的核酸用プローブの作製は、オリゴヌクレオチドプローブの製造を行う会社に委託することもできる。

10

【0051】

(陽性コントロール核酸と、陽性コントロール核酸用プローブとを含むセット)

本発明のセットは、陽性コントロール核酸と、陽性コントロール核酸用プローブとを含んでいる。本発明のセットが含む陽性コントロール核酸は1種類又は2種類以上であり、好ましくは2種類以上であり、より好ましくは2種類以上4種類以下である。陽性コントロール核酸を2種類以上含んでいる本発明のセットを同一の反応容器内で併用するか又は2種類以上の別の反応容器内でそれぞれ用いると、被検試料中の標的核酸を2種類以上検出又は定量することができる点で好ましく、特に、同一の反応容器内で併用すると、より少ない反応容器で被検試料中の標的核酸を2種類以上、同時に検出又は定量することができる点でより好ましい。本発明のセットが含む陽性コントロール核酸を2種類以上とする場合、少なくとも1種類の陽性コントロール核酸を、ハウスキーピング遺伝子の核酸を標的核酸とする陽性コントロール核酸とすることが好ましい。ハウスキーピング遺伝子を標的核酸とする陽性コントロール核酸を少なくとも1種類用いると、被検試料中の被検試料の量(例えば、被検細胞数やゲノム核酸量)を推定することができるので、特定量の被検試料当たりの標的核酸の量を測定や、反応容器ごとの被検試料の量のバラツキの補正に有用である。

20

【0052】

本発明のセットが含む陽性コントロール核酸用プローブは1種類又は2種類以上である。本発明のセットが含む陽性コントロール核酸用プローブの種類数は、陽性コントロール核酸の種類数と同じであってもよいが、より少ない種類の陽性コントロール核酸用プローブでより多い種類の陽性コントロール核酸を検出又は定量する観点から、併用する陽性コントロール核酸のうち2種類以上又は全ての種類の陽性コントロール核酸を検出又は定量し得る陽性コントロール核酸用プローブを少なくとも1種類用いることが好ましく、併用する全ての種類の陽性コントロール核酸を検出又は定量し得る陽性コントロール核酸用プローブを1種類用いることがより好ましい。

30

【0053】

(本発明における標的核酸)

本発明における標的核酸とは、被検試料中から検出又は定量を行う対象となる核酸を意味し、より具体的には、後述の「標的核酸に特異的なプライマーセット」を用いた核酸増幅反応により増幅される領域の核酸を意味する。標的核酸は、疾患の診断や、疾患の発症リスクの判定などの目的に応じて適宜選択することができ、例えば、疾患の原因又は増悪と関連する遺伝子等(非コード領域も含む)又はその一部又はそれらの転写産物、疾患の発症により異常発現する遺伝子等(非コード領域も含む)又はその一部又はそれらの転写産物、及び、疾患の発症リスクと関連する遺伝子等(非コード領域も含む)又はその一部又はそれらの転写産物などが挙げられる。また、かかる標的核酸は、被検試料中から検出又は定量を行う際に、その標的核酸を特異的に検出又は定量し得る部分を選択することが好ましい。このような選択は、配列データベースの配列情報などを利用して、被検試料が由来する生物種や標的核酸が由来する生物種のゲノムやその転写産物の配列や、候補遺伝子等のヌクレオチド配列等を調べ、かかるヌクレオチド配列の中から標的核酸の候補配列(標的核酸候補配列)を選択し、かかる標的核酸候補配列についてBLAST等でホモロ

40

50

ジーサーチを行うことによって実施することができる。例えば、標的核酸候補配列が、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）のゲノム又はそれらの転写産物から選択された配列の場合は、少なくともその生物種の、上記標的核酸候補配列の部分以外の「ゲノムやそれらの転写産物」との配列同一性が低い標的核酸候補配列を、標的核酸として選択することができる。他方、標的核酸候補配列が、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）以外の生物種（例えばウイルス）のゲノム又はその転写産物から選択された配列の場合は、少なくとも、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）のゲノムやそれらの転写産物との配列同一性が低く、かつ、標的核酸が由来する生物種（例えばウイルス）の、上記標的核酸候補配列の部分以外の「ゲノムやそれらの転写産物」との配列同一性が低い候補配列を、標的核酸として選択することができる。

10

【0054】

前述したような、疾患の原因又は増悪と関連する遺伝子等、疾患の発症により異常発現する遺伝子等、及び、疾患の発症リスクと関連する遺伝子等を特異的に検出又は定量し得る部分を標的核酸とすれば、被検試料中のその標的核酸の有無を検出したり、その標的核酸を定量することにより、その被検試料が由来する被検生物がその疾患に罹患しているか否かや罹患の程度を確認又は診断したり、あるいは、該被検生物のその疾患の発症リスクがどの程度であるかを判定することができる。上記遺伝子等の具体例として、疾患の原因等となり得る以下のウイルスや細菌の遺伝子等が好ましく挙げられる。

【0055】

上記のウイルスとしては、ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV1)、2型(HIV2)およびヒト成人T細胞白血病ウイルス1型(HTLV1)、2型(HTLV2)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ピコルナウイルス(Picornaviruses)、カリシウイルス(Caliciviruses)、オルソミクソウイルス(Orthomyxoviruses)、トガウイルス(Togaviruses)などのRNAウイルス類や、BKウイルス(BKV)、JCウイルス(JCV)、サイトメガロウイルス(CMV)、EBウイルス(EBV)、ヒトヘルペスウイルス6型(HHV6)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘帯状疱疹(VZV)、ポックスウイルス(Poxviruses)、パルボウイルス(Parvoviruses)、パポバウイルス(Papovaviruses)、B型肝炎ウイルス(HBV)、アデノウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)などのDNAウイルス類などが挙げられる。

20

30

【0056】

また、上記細菌としては、サルモネラ属細菌(チフス菌、パラチフスA菌、パラチフスB菌、腸炎菌、ネズミチフス菌、アリゾナ菌等)、シゲラ属細菌(赤痢菌等)、ビブリオ属細菌(腸炎ビブリオ、コレラ菌、NAGビブリオ、ビブリオ・ミミカス、バルニフィカス、アルギノリチカス等)、エロモナス属細菌(エロモナス・ヒドロフィア、ソブリアキャピエ、サルモニサイダ等)、プレジオモナス属細菌(プレジオモナス・シゲロイデス等)、カンピロバクター属細菌(カンピロバクター・ジェジュニー、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・フィタス等)、クロストリジウム属細菌(ウエルシュ菌、ボツリヌス菌等)、スタフィロコッカス属細菌(黄色ブドウ球菌、MRSA等)、エシェリキア属細菌(大腸菌、腸管出血性大腸菌(O157等)、毒素原性大腸菌、組織侵入性大腸菌、病原血清型大腸菌、腸管付着性大腸菌属等)、エルシニア属細菌(エルシニア・エンテロコリチカ、偽結核菌、ペスト菌等)、バシラス属細菌(セレウス菌、炭疽菌、枯草菌、バシルス・ステアロサーモフィラス等)、リステリア属細菌(リステリア・モノシトジェンズ等)、ミコバクテリア属細菌(人型結核菌、牛型結核菌、鳥型結核菌等)、トレポネーマ属細菌(梅毒菌)、ナイセリア属細菌(淋菌)などが挙げられる。また、疾患の原因となり得る菌類としては、カンジダ属菌、アスペルギルス属菌、ムコール属菌、クリプトコッカス属菌、ニューモシスチス属菌などが挙げられる。

40

【0057】

本発明における標的核酸の具体例としては、EBVを特異的に検出又は定量し得るBALF5遺伝子(GenBankアクセッション番号V01555のヌクレオチド番号153699~156746の

50

ヌクレオチド配列：配列番号4)の一部のヌクレオチド配列(好ましくは、配列番号4のヌクレオチド番号1889~2028のヌクレオチド配列：配列番号5)からなるポリヌクレオチド、インフルエンザウイルスを特異的に検出又は定量し得るヘマグルチニン遺伝子やノイラミニダーゼ遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、サルモネラ属細菌を特異的に検出又は定量し得る *invA* 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、サイトメガロウイルス(CMV)を特異的に検出又は定量し得る UL83 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、アデノウイルス(ADV)を特異的に検出又は定量し得る *hexon* タンパク質遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、単純ヘルペスウイルス1型(HSV1)を特異的に検出又は定量し得る UL27 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、ヒトヘルペスウイルス6型(HHV6)を特異的に検出又は定量し得る U57 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、バルボウイルスB19(pB19)を特異的に検出又は定量し得る NS1 遺伝子又は NS2 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、マイコプラズマを特異的に検出又は定量し得る *rrsA*~*rrlA* 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)を特異的に検出又は定量し得る *gag* 遺伝子、*pol* 遺伝子又は *LTR* 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、C型肝炎ウイルスを特異的に検出又は定量し得る NS1 遺伝子又は *NCR* 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、B型肝炎ウイルスを特異的に検出又は定量し得る *S* 遺伝子又は *X* 遺伝子の一部のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドなどを挙げる事ができる。

10

20

【0058】

本発明における標的核酸は、前述したような、疾患の原因又は増悪と関連する遺伝子又はその一部、疾患の発症により異常発現する遺伝子又はその一部、及び、疾患の発症リスクと関連する遺伝子又はその一部などのほか、ハウスキーピング遺伝子又はその一部とすることもできる。標的核酸をハウスキーピング遺伝子又はその一部とすると、被検試料中の被検試料の量(例えば、被検細胞数やゲノム核酸量)を推定することができるので、特定量の被検試料当たりの標的核酸の量を測定や、反応容器ごとの被検試料の量のバラツキの補正に有用である。

【0059】

上記のハウスキーピング遺伝子としては、TBP(TATA-box binding protein)遺伝子、GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)遺伝子、18S rRNA 遺伝子、ACTB(β -actin)遺伝子、ALAS(5-aminolevulinic acid synthase)遺伝子、2M(2 microglobulin)遺伝子、グロビン(α -globin)遺伝子、G6PD(Glucose-6-phosphate dehydrogenase)遺伝子、GUSB(β -glucuronidase)遺伝子、Hprt1(hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)遺伝子、Ipo8(importin 8)遺伝子、PBGD(porphobilinogen deaminase)遺伝子、PGK1(phosphoglycerate kinase 1)遺伝子、PPIA(peptidylprolyl isomerase A)遺伝子、RPL13A(ribosomal protein L13a)遺伝子、RPLP0(ribosomal protein large P0)遺伝子、SDHA(succinate dehydrogenase subunit A)遺伝子、TFRC(transferrin receptor)遺伝子、YWHAZ(3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta)遺伝子等を挙げる事ができ、中でも、TBP遺伝子を好ましく挙げる事ができる。

30

40

【0060】

ハウスキーピング遺伝子又はその一部を標的核酸とする場合も、疾患の原因又は増悪と関連する遺伝子又はその一部等を標的核酸とする場合と同様に、被検試料中から検出又は定量を行う際に、その標的核酸を特異的に検出又は定量し得る部分を選択することが好ましい。ハウスキーピング遺伝子のヌクレオチド配列は公知であるので、このような選択は、配列データベースの配列情報などを利用して、被検試料が由来する被検生物種や標的核酸が由来する生物種のゲノムやその転写産物の配列や、候補遺伝子のヌクレオチド配列等を調べ、かかるヌクレオチド配列の中から標的核酸の候補配列(標的核酸候補配列)を選

50

択し、かかる標的核酸候補配列についてBLAST等でホモロジーサーチを行うことによって実施することができる。例えば、標的核酸候補配列が、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）のゲノム又はそれらの転写産物から選択された配列の場合は、少なくともその生物種の、上記標的核酸候補配列の部分以外の「ゲノムやそれらの転写産物」との配列同一性が低い標的核酸候補配列を、標的核酸として選択することができる。他方、標的核酸候補配列が、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）以外の生物種（例えばウイルス）のゲノム又はその転写産物から選択された配列の場合は、少なくとも、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）のゲノムやそれらの転写産物との配列同一性が低く、かつ、標的核酸が由来する生物種（例えばウイルス）の、上記標的核酸候補配列の部分以外の「ゲノムやそれらの転写産物」との配列同一性が低い候補配列を、標的核酸として選択することができる。

10

【0061】

本発明における標的核酸の種類としては、DNA、RNA等の核酸が挙げられ、中でも、DNA、RNAが好ましく挙げられ、前記DNAとしては、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA等が挙げられ、前記RNAとしては、全RNA、mRNA、rRNA、siRNA、hnRNA、piRNA、aRNA、miRNA、合成RNA等が挙げられる。標的核酸のヌクレオチド数としては特に制限されないが、好ましくは60～500個の範囲内、より好ましくは70～300個の範囲内が挙げられる。本発明における標的核酸は、2本鎖であってもよいし、1本鎖であってもよい。

20

【0062】

2. [標的核酸に特異的なプライマーセットと、標的核酸に特異的なプローブと、陽性コントロール核酸と、陽性コントロール核酸に特異的なプローブと、2個又は3個以上の反応容器とを備えたキット]

本発明のキットは、被検試料中の標的核酸の検出又は定量に用いるためのキットである。本発明のキットを用いると、標的核酸の検出又は定量に際して、プライマー、プローブ等の試薬操作を簡略化することができるため、被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を簡便かつ迅速に確認しつつ、被検試料中の標的核酸をより簡便かつ迅速に検出又は定量することができる。また、本発明のキットは、常温で例えば6か月以上保存が可能であるため、本発明のキットを手元に保有しておけば、標的核酸の検出又は定量を行う必要が生じたときに速やかにそれを行うことが可能となる。

30

【0063】

本発明のキットとしては、標的核酸に特異的なプライマーセット（標的核酸用プライマーセット）と；標的核酸に特異的なプローブ（標的核酸用プローブ）と；本発明の陽性コントロール核酸と、前記陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセットと；2個又は3個以上の反応容器と；を備え、

前記2個又は3個以上の反応容器のうち、被検試料用である一部の反応容器内には、標的核酸に特異的な前記プライマーセットと、標的核酸に特異的な前記プローブと、陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブとが固相化されており、陽性コントロール核酸用である他の一部の反応容器内には、標的核酸に特異的な前記プライマーセットと、標的核酸に特異的な前記プローブと、前記陽性コントロール核酸と、陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブとが固相化されている限り特に制限されないが、標的核酸の検出又は定量をより簡便かつ迅速に行う観点から、標的核酸の核酸増幅反応に必要な試薬のうち、プライマーセットや陽性コントロール核酸以外の試薬も、被検試料用の反応容器内及び陽性コントロール核酸用の反応容器内に固相化されていてもよい。プライマーセットや陽性コントロール核酸以外の上記試薬としては、核酸を重合させる酵素（例えばポリメラーゼ）、核酸の材料となる物質（例えばdNTP）、核酸増幅反応用のバッファー（例えば、Tris-Cl等の緩衝作用を有する成分や、Tween20等の界面活性剤など）、及び、Mg²⁺からなる群から選択される1種又は2種以上（好ましくは3種以上、より好ましくは4種すべて）が挙げられる。プライマーセットや陽性コントロール核酸以外のこれらの試薬は、市販のものを用いることができる。なお、プライマーセットや陽性コントロール核酸以外

40

50

に、核酸を重合させる酵素や核酸増幅反応用のバッファーや核酸の材料となる物質や Mg^{2+} についても同一反応容器内に固相化してもよいが、室温保存安定性のより高いキットを得る観点から、核酸を重合させる酵素、核酸増幅反応用のバッファー（好ましくは、核酸を重合させる酵素及び核酸増幅反応用のバッファー）、核酸の材料となる物質、及び、 Mg^{2+} からなる群から選択される1種又は2種以上、より好ましくは、核酸を重合させる酵素及び/又は核酸増幅反応用のバッファー（該バッファーは、好ましくは、核酸の材料となる物質及び Mg^{2+} を含むバッファー）、さらに好ましくは、核酸を重合させる酵素又は核酸増幅反応用のバッファー（該バッファーは、好ましくは、核酸の材料となる物質及び Mg^{2+} を含むバッファー）は、プライマーセットや陽性コントロール核酸とは別の反応容器内に固相化するか、あるいは、いずれの反応容器にも固相化しないことが好ましく、標的核酸の検出又は定量をより簡便かつ迅速に行う観点から、核酸を重合させる酵素、核酸増幅反応用のバッファー（好ましくは、核酸を重合させる酵素及び核酸増幅反応用のバッファー）、核酸の材料となる物質、及び、 Mg^{2+} からなる群から選択される1種又は2種以上、より好ましくは、核酸を重合させる酵素及び/又は核酸増幅反応用のバッファー（該バッファーは、好ましくは、核酸の材料となる物質及び Mg^{2+} を含むバッファー）、さらに好ましくは、核酸を重合させる酵素又は核酸増幅反応用のバッファー（該バッファーは、好ましくは、核酸の材料となる物質及び Mg^{2+} を含むバッファー）は、プライマーセットや陽性コントロール核酸とは別の反応容器内に固相化することがより好ましい。また、少なくとも、核酸を重合させる酵素及び核酸増幅反応用のバッファー（該バッファーは、好ましくは、核酸の材料となる物質及び Mg^{2+} を含むバッファー）を、プライマーセットや陽性コントロール核酸とは別の反応容器内に固相化することは、さらに、核酸を重合させる酵素と、核酸増幅反応用のバッファー（該バッファーは、好ましくは、核酸の材料となる物質及び Mg^{2+} を含むバッファー）は別の反応容器内に固相化することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0064】

本発明のキットにおける2個又は3個以上の反応容器としては、2個又は3個以上の反応容器である限り、材質、大きさ、形状など特に制限されないが、操作性の観点から、2個又は3個以上の反応容器は連結されていることが好ましい。かかる反応容器としては例えば、チューブ、ウェルプレート（ディープウェルプレートを含む）等が挙げられ、より詳細には、4連チューブ、8連チューブ（例えば図1）、12連チューブ、24ウェルプレート、48ウェルプレート、96ウェルプレート、384ウェルプレート等を挙げることができ、中でも、ポリスチレン製、ポリプロピレン製等のプラスチック製のものを好ましく挙げることができる。これらのチューブやウェルプレートは、市販のものを用いることができる。なお、本発明のキットにおける反応容器の個数の上限は特に制限されないが、例えば384個、96個、48個、24個、12個などを挙げることができる。

【0065】

標的核酸用プライマーセットや、標的核酸用プローブや、陽性コントロール核酸や、陽性コントロール核酸用プローブや、上記の他の試薬を反応容器内に固相化する方法としては、特に制限されないが、容器内に、各試薬を添加し、及び、トレハロース等の安定化剤を添加し、次いで、乾燥する方法を挙げることができ、中でも、減圧下で乾燥する方法を好ましく挙げることができる。

【0066】

本発明のキットにおける反応容器には、被検試料用の反応容器、及び、陽性コントロール核酸用の反応容器に加えて、陰性コントロール用の反応容器が含まれていることが好ましい。かかる陰性コントロール用の反応容器には、標的核酸に特異的な前記プライマーセットと、標的核酸に特異的な前記プローブと、陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブとが固相化されている。標的核酸の検出又は定量を行う際、陰性コントロール用の反応容器には、被検試料は添加しない。

【0067】

本発明のキットにおける反応容器には、被検試料用の反応容器、及び、陽性コントロー

ル核酸用の反応容器に加えて、核酸を重合させる酵素及び/又は核酸増幅反応用バッファを固相化するための反応容器が別途含まれていることが好ましく、少なくとも、核酸増幅反応用バッファを固相化するための反応容器が別途含まれていることがより好ましい。この別途含まれている反応容器は、被検試料用の反応容器や、陽性コントロール核酸用の反応容器と連結されていてもよいし、それらとは独立した反応容器であってもよい。核酸増幅反応用バッファを固相化するための反応容器Hが、被検試料用の反応容器や、陽性コントロール核酸用の反応容器と連結されている例を図2に示す。反応容器Hに、反応容器A～G等の他の反応容器に必要なバッファ、好ましくは余裕を持たせるために少し多めのバッファ（例えば、バッファの必要量を100重量部としたときに、103～120重量部、好ましくは105～120重量部のバッファ）を固相化しておくこと、リアルタイムPCRを行う際に反応容器Hに所定量の水を添加するだけで、バッファを速やかに調製することができる。なお、図2では、反応容器A～Gの7サンプル分のバッファが必要であるが、反応容器Hにおいては7.5サンプル分のバッファを固相化されている。

10

【0068】

本発明のキットにおける2個又は3個以上の反応容器は、3個又は4個以上の反応容器（好ましくは3個又は4個以上の連結された反応容器）であることが好ましく、4個又は5個以上の反応容器（好ましくは4個又は5個以上の連結された反応容器）であることがより好ましい。

20

【0069】

本発明のキットが3個又は4個以上（好ましくは4個又は5個以上）の反応容器又は連結された反応容器を備えている場合、前記反応容器のうち、1個又は2個以上（好ましくは1～382個、より好ましくは1～381個）の反応容器が被検試料用の反応容器であり、1個又は2個以上（好ましくは2個又は3個以上、より好ましくは2～5個、さらに好ましくは2～4個）の反応容器が陽性コントロール核酸用の反応容器であり、1個又は2個以上（好ましくは1個）の反応容器が陰性コントロール用の反応容器であることが好ましい。本発明のキットを標的核酸の相対定量に用いる場合は、陽性コントロール核酸用の反応容器は1個でも十分であるが、標的核酸の絶対定量に用いる場合は、陽性コントロール核酸用の反応容器を2個又は3個以上設けることが好ましい。2個又は3個以上のその反応容器間で陽性コントロール核酸の量（濃度）を段階的に変化させて、標的核酸用プローブや陽性コントロール核酸用プローブのシグナルを検出すると、精度のより高い検量線（回帰式）が得られる結果、標的核酸の絶対定量をより精度良く行うことができる。

30

【0070】

陽性コントロール核酸用の反応容器を2個又は3個以上設け、それら容器内の陽性コントロール核酸の量（濃度）を段階的に変化させる場合、陽性コントロール核酸の量（濃度）が少ない方から反応容器を順位付けしたときに、1つ順位が下がる毎に、その量（濃度）を例えば2～100倍の範囲内、好ましくは3～50倍の範囲内、より好ましくは4～20倍の範囲内、さらに好ましくは8～15倍の範囲内、より好ましくは10倍で増加させていくことが好ましい。なお、陽性コントロール核酸の量を段階的に変化させる場合、各段階の増加率は一致していてもよいが、一致していなくてもよい。また、前述の2個又は3個以上の陽性コントロール核酸用の反応容器のうち、陽性コントロール核酸の量が最も多い反応容器における陽性コントロール核酸の量（濃度）が、陽性コントロール核酸の量が最も少ない反応容器における陽性コントロール核酸の量（濃度）に対して10倍以上、好ましくは20倍以上、さらに好ましくは40倍、より好ましくは100倍以上とすることができる。

40

【0071】

（本発明における標的核酸に特異的なプライマーセット）

本発明のキットには、本発明における標的核酸に特異的なプライマーセットが備えられている。本発明における標的核酸に特異的なプライマーセット（標的核酸用プライマーセット）とは、標的核酸の一部に特異的にハイブリダイズし、標的核酸を特異的に増幅し得

50

るプライマー（以下、単に「標的核酸用プライマー」とも表示する。）のセットを意味する。かかるセットとしては、1種又は2種以上のセンスプライマーと、1種又は2種以上のアンチセンスプライマーとを含んでいてもよいが、通常の核酸増幅法を用いる場合は、1種類の標的核酸につき、1種のセンスプライマーと、1種のアンチセンスプライマーを含んでいることが好ましい。ただし、LAMP法やSMAF法など、用いる核酸増幅法に依っては、1種の標的核酸につき、1種のセンスプライマーと、1種のアンチセンスプライマーでは十分ではなく、センスプライマー及び/又はアンチセンスプライマーを2種以上必要とする場合もあるため、当業者は、必要に応じてプライマーセットの構成を選択することができる。プライマーセットを構成する各プライマーは、ポリヌクレオチドであり、安定性の観点からDNAであることが好ましい。各プライマーのヌクレオチド数は、標的核酸を特異的に増幅し得る限り特に制限されず、また、用いる核酸増幅法にも依るが、通常15～50個の範囲内、好ましくは17～35個の範囲内である。各プライマーのヌクレオチド数はそれぞれ同じであっても異なってもよい。

10

20

30

40

50

【0072】

標的核酸用プライマーセットのヌクレオチド配列は、当業者であれば、標的核酸に応じて適宜選択することができる。具体的には、配列データベースの配列情報などを利用して、標的核酸近辺のヌクレオチド配列を調べ、かかるヌクレオチド配列の中からプライマーの候補配列を選択し、かかる候補配列についてBLAST等でホモロジーサーチを行って、上記標的核酸の部分以外のゲノムやその転写産物との配列同一性が低いものをさらに選択することによって、標的核酸用プライマーのヌクレオチド配列を選択することができる。なお、本願明細書において、5'プライマー及び3'プライマーは、それぞれセンスプライマー及びアンチセンスプライマーであってもよいし、それぞれアンチセンスプライマー及びセンスプライマーであってもよい。

【0073】

本発明における標的核酸用プライマーセットは、常法にしたがって、合成、核酸増幅反応、クローニング、又はそれらの組み合わせによって作製することができ、簡便性の観点から、合成によって作製することが好ましく挙げられる。また、かかるプライマーセットの作製は、オリゴヌクレオチドプライマーの製造を行う会社に委託することもできる。

【0074】

（本発明における標的核酸に特異的なプローブ）

本発明のキットには、本発明における標的核酸に特異的なプローブが備えられている。本発明における本発明における標的核酸に特異的なプローブ（標的核酸用プローブ）とは、標的核酸の一部に特異的にハイブリダイズし、標的核酸を特異的に検出又は定量し得るプローブを意味する。かかる標的核酸用プローブは、1種の標的核酸に対して1種で十分であるが、1種の標的核酸に対して2種以上用いてもよい。また、かかる標的核酸用プローブは、DNAやRNA等のポリヌクレオチドであるが、安定性の観点からDNAであることが好ましい。かかる標的核酸用プローブのヌクレオチド数としては、標的核酸に特異的にハイブリダイズし得る限り特に制限されず、また、用いる核酸増幅法にも依るが、好ましくは9～100個の範囲内、より好ましくは15～60個の範囲内、さらに好ましくは20～40個の範囲内が挙げられる。かかる標的核酸用プローブは、二本鎖であってもよいが、一本鎖であることが好ましい。なお、本明細書に記載される特定のヌクレオチド配列への言及は、DNAの配列として言及しているが、RNAの場合はその特定のヌクレオチド配列においてTをUに置き換えたヌクレオチド配列となる。

【0075】

本発明における標的核酸用プローブは、対応するプライマー対による増幅産物を検出又は定量するために標識物質で標識されていることが好ましく、より迅速又はより高感度で検出又は定量する観点から、蛍光物質で標識されていることがより好ましい。蛍光物質以外の上記標識部位や、蛍光物質以外の標識物質については、前述したとおりである。ただし、陽性コントロール核酸用プローブと、標的核酸用プローブとを同時に、簡便かつ迅速に検出又は定量し得る点で、標的核酸用プローブに用いる標識（好ましくは蛍光標識）は

、陽性コントロール核酸用プローブに用いる標識（好ましくは蛍光標識）とは異なる標識（好ましくは蛍光標識）を用いることが好ましい。

【0076】

本発明における標的核酸用プローブのタイプは特に制限されず、TaqMan（登録商標）プローブ、モレキュラービーコンプローブ、サイクリングプローブ、Eprobe（登録商標）、Qprobe（登録商標）、スコピオンプローブ、hybridization-probeなどが挙げられ、中でもTaqManプローブが好ましく挙げられる。ただし、本発明における標的核酸用プローブのタイプは、本発明における陽性コントロール核酸用プローブと同じタイプとすることが、簡便性などの観点で好ましい。

【0077】

本発明における標的核酸用プローブのヌクレオチド配列は、当業者であれば、標的核酸に応じて適宜選択することができる。このような選択は、標的核酸のヌクレオチド配列の中から選択したプローブの候補配列について、BLAST等でホモロジーサーチを行うことによって実施することができる。例えば、プローブの候補配列を含む標的核酸が、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）のゲノム又はそれらの転写産物から選択されている場合は、少なくともその生物種の、上記標的核酸の部分以外の「ゲノムやそれらの転写産物」との配列同一性が低い候補配列を、標的核酸用プローブのヌクレオチド配列として選択することができる。他方、標的核酸が、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）以外の生物種（例えばウイルス）のゲノム又はその転写産物から選択されている場合は、少なくとも、被検試料が由来する生物種（例えばヒト）のゲノムやそれらの転写産物との配列同一性が低く、かつ、標的核酸が由来する生物種（例えばウイルス）の、上記標的核酸の部分以外の「ゲノムやそれらの転写産物」との配列同一性が低い候補配列を、標的核酸用プローブのヌクレオチド配列として選択することができる。

【0078】

本発明における標的核酸用プローブは、常法にしたがって、合成、核酸増幅反応、クローニング、又はそれらの組み合わせによって作製することができ、簡便性の観点から、合成によって作製することが好ましく挙げられる。また、かかる標的核酸用プローブの作製は、オリゴヌクレオチドプローブの製造を行う会社に委託することもできる。

【0079】

本発明のキットは、被検試料中の2種類又は3種類以上の異なる標的核酸の検出又は定量に用いるためのキットであってもよい。このようなキットであると、被検試料中の2種類以上の異なる標的核酸を検出又は定量することができる点で好ましい。このような用途に用いる場合の本発明のキットとしては、2種類又は3種類以上の標的核酸にそれぞれ特異的な2種類又は3種類以上のプライマーセットと；前記2種類又は3種類以上の標的核酸にそれぞれ特異的な2種類又は3種類以上のプローブと；前記2種類又は3種類以上の標的核酸に対してそれぞれ陽性コントロールとなる2種類又は3種類以上の陽性コントロール核酸と、前記2種類又は3種類以上の陽性コントロール核酸に特異的な1種類又は2種類以上（好ましくは1種又は2種、より好ましくは1種）のプローブとを含むセットと；2個又は3個以上の反応容器と；を備え、

被検試料用の反応容器内には、前記2種類又は3種類以上のプライマーセットと、前記2種類又は3種類以上のプローブと、前記1種類又は2種類以上（好ましくは1種又は2種、より好ましくは1種）のプローブとが固相化されており、陽性コントロール核酸用の反応容器内には、前記2種類又は3種類以上のプライマーセットと、前記2種類又は3種類以上のプローブと、前記2種類又は3種類以上の陽性コントロール核酸と、前記1種類又は2種類以上（好ましくは1種又は2種、より好ましくは1種）のプローブとが固相化されている限り特に制限されないが、標的核酸の検出又は定量をより簡便かつ迅速に行う観点から、標的核酸の核酸増幅反応に必要な試薬のうち、プライマーセット以外の試薬も、被検試料用の反応容器内及び陽性コントロール核酸用の反応容器内に固相化されていることが好ましい。

【0080】

10

20

30

40

50

上記の、被検試料中の2種類又は3種類以上の異なる標的核酸の検出又は定量に用いるためのキットの中でも、被検試料用の「個々の」反応容器内に、前記2種類又は3種類以上の標的核酸用プライマープライマーセットと、前記2種類又は3種類以上の標的核酸用プローブと、前記1種類又は2種類以上（好ましくは1種又は2種、より好ましくは1種）の陽性コントロール核酸用プローブとが固相化されており、陽性コントロール核酸用の「個々の」反応容器内に、前記2種類又は3種類以上の標的核酸用プライマーセットと、前記2種類又は3種類以上の標的核酸用プローブと、前記2種類又は3種類以上の陽性コントロール核酸と、前記1種類又は2種類以上（好ましくは1種又は2種、より好ましくは1種）の陽性コントロール核酸用プローブとが固相化されているキットをより好ましく挙げられる。このように、被検試料用の「個々の」反応容器内や、陽性コントロール核酸用の「個々の」反応容器内で、2種類以上のプライマーセット、2種類以上の標的核酸用プローブ、1種類以上の陽性コントロール核酸用プローブなどを併用すると、被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を簡便かつ迅速に確認しつつ、より少ない反応容器で被検試料中の標的核酸を2種類以上、同時に検出又は定量することができる点でより好ましい。

10

20

30

40

50

【0081】

本発明のキットに含まれる陽性コントロール核酸用プローブの種類数は、本発明のキットに含まれる陽性コントロール核酸の種類数と同じであってもよいが、より少ない種類の陽性コントロール核酸用プローブでより多い種類の陽性コントロール核酸を検出又は定量する観点から、併用する陽性コントロール核酸のうち2種類以上又は全ての種類の陽性コントロール核酸を検出又は定量し得る陽性コントロール核酸用プローブを少なくとも1種類用いることが好ましく、併用する全ての種類の陽性コントロール核酸を検出又は定量し得る陽性コントロール核酸用プローブを1種類用いることがより好ましい。

【0082】

被検試料中の2種類又は3種類以上の異なる標的核酸の検出又は定量に用いるためのキットにおいて、前記2種類又は3種類以上の標的核酸は、いずれもハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子の核酸であってもよいが、前記2種類又は3種類以上の標的核酸のうち、少なくとも1種類の標的核酸がハウスキーピング遺伝子の核酸であり、かつ、少なくとも1種類又は2種類以上の標的核酸がハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子の核酸であることが好ましい。2種類又は3種類以上の標的核酸のうち、少なくとも1種類の標的核酸として、ハウスキーピング遺伝子の核酸を用いると、被検試料中の被検試料の量（例えば、被検細胞数やゲノム核酸量）を推定することができるので、特定量の被検試料当たりの標的核酸の量を測定や、反応容器ごとの被検試料の量のバラツキの補正に有用である。

【0083】

3. [被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法]

被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法（以下、単に「本発明の方法」とも表示する。）としては、

(a) 被検試料用の反応容器内において、被検試料から得られた核酸と、標的核酸に特異的なプライマーセット（本発明の標的核酸用プライマーセット）とを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物を得る工程 a :

(b) 陽性コントロール核酸用の反応容器内において、陽性コントロール核酸（本発明の陽性コントロール核酸）と、標的核酸に特異的な前記プライマーセットとを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物を得る工程 b :

(c) 被検試料用の反応容器内において、上記工程 a で得られた増幅産物を、標的核酸に特異的なプローブ（本発明の標的核酸用プローブ）及び前記陽性コントロール核酸に特異的なプローブ（本発明の陽性コントロール核酸用プローブ）と接触させ、前記標的核酸及び前記陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行う工程 c : 及び、

(d) 陽性コントロール核酸用の反応容器内において、上記工程 b で得られた増幅産物を

、標的核酸に特異的な前記プローブ及び陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブと接触させ、前記標的核酸及び前記陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行う工程 d :

を含む方法であり、

上記工程(c)において前記陽性コントロール核酸が検出されない場合に、被検試料用容器内への前記陽性コントロール核酸の混入がないと確認することができる方法である限り特に制限されない。

【0084】

上記工程aとしては、被検試料用の反応容器内において、被検試料から得られた核酸と、本発明の標的核酸用プライマーセットとを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物を得る工程である限り特に制限されない。被検試料から核酸(好ましくはDNA又はRNA)を得る方法としては、特に制限されず、常法を用いることができる。被検試料からDNAを得る方法として具体的には、「プロテイナーゼK/フェノール抽出法」、「プロテイナーゼK/フェノール/クロロホルム抽出法」、「アルカリ溶解法」、「ポイリング法」、市販のDNA抽出カラムを用いた方法などを挙げることができる。被検試料からRNAを得る方法として具体的には、「グアニジン-塩化セシウム超遠心法」、「AGPC(Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform)法」、市販のRNA抽出カラムを用いた方法などを挙げることができる。

10

【0085】

また、上記工程aにおける核酸増幅反応の種類としては、特に制限されず、温度サイクルを実施するPCR(Polymerase Chain Reaction)法(好ましくはリアルタイムPCR法)、RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)法、LCR(ligase chain reaction)法その他、温度サイクルを伴わない各種等温増幅法が含まれる。等温増幅法としては、例えば、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法、SMA(SMART Amplification Process)法、NASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)法、ICAN(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids)法(登録商標)、TRC(Transcription-Reverse transcription Concerted)法、SDA(Strand Displacement Amplification)法、TMA(Transcription-Mediated Amplification)法、RCA(Rolling Circle Amplification)法等が挙げられる。これらの核酸増幅反応は公知であり、当業者は、公知の文献や、市販のキットの取り扱い説明書を参照して、核酸増幅反応の条件を適宜設定し、市販のキットを利用するなどして、これらの核酸増幅反応を行うことができる。なお、前述した他、本明細書における「核酸増幅反応」には、核酸の増幅を目的とする、変温あるいは等温による核酸増幅反応が広く包含されるものとする。

20

30

【0086】

上記工程aにおける核酸増幅反応には、被検試料から得られた核酸と、本発明の標的核酸用プライマーセットの他、核酸増幅反応に必要な各試薬を用いることができる。かかる試薬としては、核酸を重合させる酵素(例えばポリメラーゼ)、核酸の材料となる物質(例えばdNTP)、核酸増幅反应用のバッファー(例えば、Tris-Cl等の緩衝作用を有する成分や、Tween20等の界面活性剤など)、及び、 Mg^{2+} からなる群から選択される1

40

【0087】

核酸増幅反応を行う際には、用いる核酸増幅反応の種類などに応じて、市販の核酸増幅装置を用いることができ、中でも、プローブのシグナル(好ましくは蛍光シグナル)を測定し得る装置も備えた核酸増幅装置を好ましく挙げることができる。核酸の増幅と、蛍光シグナルの測定の両方が可能なリアルタイムPCR装置として、Bio-RAD社製のCFX96や、Roche社製のLight cycler 480を挙げることができる。

【0088】

上記工程bとしては、陽性コントロール核酸用の反応容器内において、本発明の陽性コ

50

ントロール核酸と、本発明の標的核酸用プライマーセットとを用いて核酸増幅反応を行い、増幅産物を得る工程である限り特に制限されない。

【0089】

上記工程cとしては、被検試料用の反応容器内において、上記工程aで得られた増幅産物を、本発明の標的核酸用プローブ及び本発明の陽性コントロール核酸用プローブと接触させ、前記標的核酸及び前記陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行う工程である限り特に制限されない。標的核酸の有無の検出又は定量や、陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量は、本発明の標的核酸用プローブの標識物質（好ましくは蛍光標識物質）や、本発明の陽性コントロール核酸用プローブの標識物質（好ましくは蛍光標識物質）のシグナル（好ましくは蛍光シグナル）を検出又は定量することが好ましい。かかる検出や定量は、核酸増幅装置に併設された蛍光シグナルを測定し得る装置等を用いて行うことが好ましい。また、得られた蛍光シグナルは、Light cycler 480ソフトウェア等の市販のソフトウェアを用いて解析することができる。

10

【0090】

上記工程dとしては、陽性コントロール核酸用の反応容器内において、上記工程bで得られた増幅産物を、標的核酸に特異的な前記プローブ及び陽性コントロール核酸に特異的な前記プローブと接触させ、前記標的核酸及び前記陽性コントロール核酸の有無の検出又は定量を行う工程である限り特に制限されない。かかる検出や定量は、上記工程cにおける検出や定量と同様の方法により行うことができる。

【0091】

本発明の方法においては、上記工程cにおいて前記陽性コントロール核酸が検出されない場合に、被検試料用容器内への前記陽性コントロール核酸の混入がないと確認することができる。本発明の工程は、上記工程a～dに加えて、以下の工程eを含んでいてもよい。

20

(e) 上記工程cにおいて前記陽性コントロール核酸が検出されるかどうかを調べることによって、被検試料用容器内への前記陽性コントロール核酸の混入の有無を確認する工程e：

【0092】

本発明の方法を標的核酸の相対定量に利用する場合は、上記工程bや工程dにおいて用いる陽性コントロール核酸用の反応容器は1個でも十分であるが、本発明の方法を標的核酸の絶対定量に利用する場合は、上記工程bや工程dにおいて、陽性コントロール核酸用の反応容器を2個又は3個以上用いることが好ましい。2個又は3個以上のその反応容器間で陽性コントロール核酸の量（濃度）を段階的に変化させて、標的核酸用プローブや陽性コントロール核酸用プローブ（好ましくは標的核酸用プローブ）のシグナルを検出すると、精度のより高い検量線（回帰式）が得られる結果、標的核酸の絶対定量をより精度良く行うことができる。

30

【0093】

陽性コントロール核酸を検出したシグナルから検量線を算出する方法は、市販のソフトウェアを用いるなど、公知の手法を用いることができる。好ましい方法としては、蛍光シグナルをLight cycler 480ソフトウェア等を用いてfit-point法等により解析した各標的のCq値（特定のシグナル強度に達するまでに要する反応サイクル数）と、陽性コントロール核酸の濃度（好ましくは陽性コントロール核酸のコピー数）との関係について回帰分析を行うことによって、検量線（回帰式）を算出することができる。

40

【0094】

上記工程cにおいて測定する本発明の標的核酸用プローブのシグナル（好ましくは蛍光シグナル）の強度を、得られた検量線に適用すると、被検試料中の標的核酸の濃度を精度良く求めることができる。

【0095】

本発明の方法の好適な態様として、本発明のキットを用いることによって、被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を簡便かつ迅速に確認しつつ、被検試料中

50

の標的核酸をより簡便かつ迅速に検出又は定量する方法を挙げることができる。

【0096】

本明細書において「ヌクレオチド配列 X に相補的なヌクレオチド配列」には、

(X1)ヌクレオチド配列 X と厳密に相補的な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おり、かつ、ヌクレオチド配列 X と特異的なハイブリッド(二重鎖分子)を形成するヌクレオチド配列や、

(X2)ヌクレオチド配列 X と厳密に相補的なヌクレオチド配列に対して95%以上、好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上の配列同一性を有し、かつ、ヌクレオチド配列 X と特異的なハイブリッドを形成するヌクレオチド配列が含まれる。なお、本明細書において「厳密に相補的な」とは、一般的に用いられている「相補的な」を意味し、例えば「ATGC」というDNA配列と厳密に相補的な配列は、「TAGC」となる。

10

【0097】

また、本明細書において「ヌクレオチド配列 Y に特異的なヌクレオチド配列」には、

(Y1)ヌクレオチド配列 Y と厳密に相補的な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おり、かつ、ヌクレオチド配列 Y と特異的なハイブリッド(二重鎖分子)を形成するヌクレオチド配列や、

(Y2)ヌクレオチド配列 Y と厳密に相補的なヌクレオチド配列に対して95%以上、好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上の配列同一性を有し、かつ、ヌクレオチド配列 Y と特異的なハイブリッドを形成するヌクレオチド配列が含まれる。

20

【0098】

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】

【0099】

(陽性コントロール核酸に特異的なプローブの設計)

陽性コントロール核酸に特異的なプローブのヌクレオチド配列(すなわち、本発明におけるヌクレオチド配列 C1 に相補的なヌクレオチド配列)は以下のような方法で設計した。

30

[1]ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列をそれぞれ2又は3回繰り返して得られるヌクレオチド数4又は6個の繰り返しヌクレオチド配列からなる群を得た。上記の「ヌクレオチド数が2個であるヌクレオチド配列」としては、AT、AG、AC、TA、TG、TC、GA、GT、GC、CA、CT、CGを用いた。

[2]上記[1]で得られた群から選択される、2種又は3種以上の繰り返しヌクレオチド配列をランダムに連結して、候補ヌクレオチド配列を設定した。

[3]2014年5月時点の配列データベース(GenBank等)の配列情報及びホモロジーサーチ用ソフトウェア(BLAST(登録商標)等)などを利用して、上記[2]で設定した候補ヌクレオチド配列について、被検試料が由来する生物種(ヒト)及び標的核酸が由来する生物種(EBV)を含む16000種の生物種のゲノム及びその転写産物のいずれの部分の配列に対しても配列同一性が70%以下であるヌクレオチド配列であるかどうかを確認した。なお、BLASTによるホモロジーサーチは、Databaseとして1)~3)を順に選択して、以下の条件により行った。

40

program : Nucleotide blast

Database : 1) Human genomic + transcript; 2) Mouse genomic + transcript; 3) Others(nr etc);

Optimize for : Highly similar sequence (megablast)

[4]上記[2]で設定した候補ヌクレオチド配列のTm値()が65以下かどうか

50

を、最近接塩基対法により確認した。

[5] 上記 [3] における配列同一性が 70 % 以下であり、かつ、上記 [4] における T m 値が 65 以下である候補ヌクレオチド配列を、陽性コントロール核酸に特異的なプローブのヌクレオチド配列とした。

【 0 1 0 0 】

実際に、上記の [1] ~ [5] によって、以下の陽性コントロール核酸に特異的なプローブのヌクレオチド配列を選択した。なお、選択する際には、上記 [3] における配列同一性及び上記 [4] における T m 値の温度の両方ができるだけ低いものを選択した。

CACA ATAT ACAC GCGC TATA TCTC ACAC (配列番号 1)

ATAT GAGA ACAC TGTG TCTC TATA GCGC (配列番号 2)

ATAT CACA ACAC TATA TCTC ACAC GCGC (配列番号 3)

なお、配列番号 1 ~ 3 の各ヌクレオチド配列が示した、上記 [3] のホモロジーサーチにおける配列同一性 (ホモロジーサーチにおける配列同一性の最高値) 、及び、T m 値 () は以下のとおりであった。

【 0 1 0 1 】

【 表 1 】

	配列同一性	T m 値
配列番号 1	60.7%	44°C
配列番号 2	67.9%	44°C
配列番号 3	64.0%	42°C

【 0 1 0 2 】

配列番号 1 ~ 3 に示されるヌクレオチド配列のプローブをそれぞれ作製し、それらのプローブが、以下の 13 種の生物のゲノム DNA を検出しないことを確認した。

ヒト、EBV、HSV1、HSV2、VZV、CMV、HHV6、HHV7、HHV8、PVB19 (Parvoviruses B19)、JCV、HBV、ADV1。

【 実施例 2 】

【 0 1 0 3 】

(陽性コントロール核酸の作製)

1 . EBV 用の陽性コントロール核酸の作製

EBV の BALF5 遺伝子 (GenBank アクセッション番号 V01555 のヌクレオチド番号 153 699 ~ 156746 のヌクレオチド配列 : 配列番号 4) のヌクレオチド番号 1889 ~ 2028 を標的核酸 (以下、「標的核酸 EBV」と表示する。) (配列番号 5) とする陽性コントロール核酸を以下のような方法で作製した。

【 0 1 0 4 】

ユーロフィンジェノミクス株式会社 (旧 オペロンバイオテクノロジー株式会社) に標的核酸 EBV のヌクレオチド配列を伝え、同社に該標的核酸 EBV の人工遺伝子、及び、EBV 用の陽性コントロール核酸の人工遺伝子の合成を委託した。EBV 用の陽性コントロール核酸の配列 (配列番号 6) は、上記実施例 1 で作製した陽性コントロール核酸に特異的なプローブ (配列番号 2) に相補的な挿入配列 (配列番号 2 のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列) を、標的核酸 EBV の配列 (配列番号 5) のヌクレオチド番号 99 と 100 の間に挿入した配列とした。納品されたベクターにクローニングされた人工遺伝子を線状にして、前述の 2 種の人工遺伝子の増幅効率の比較検討を実施した。上記標的核酸 EBV を増幅し得るフォワードプライマー (5 ' プライマー) である EBV - F (TAGGGCCAGTCAAGTTG : 配列番号 7) 、リバープライマー (3 ' プライマー) である EBV - R (ACCCTGCGAAGACATAGAG : 配列番号 8) およ

びEBV-probe (CGGTCAACAATCTCCACGCTG : 配列番号9)の合成は、日本テクノサービス社に委託して行った。前述の2種の人工遺伝子(該標的核酸EBV、又は、EBV用の陽性コントロール核酸)を鋳型とし、上記の両プライマー(EBV-F及びEBV-R)及びプローブ(EBV-probe)を用いてリアルタイムPCRを行い、両人工遺伝子間に増幅効率の差がなく、EBV用の陽性コントロール核酸(配列番号6)が適正な陽性コントロールになり得ることを確認した。

【0105】

2. ヒトTBP遺伝子用の陽性コントロール核酸の作製

ヒトTBP遺伝子(NC_000006.12)のヌクレオチド番号170562136~170562215を標的核酸(以下、「標的核酸TBP」と表示する。)(配列番号10)とする陽性コントロール核酸を以下のような方法で作製した。

10

【0106】

ユーロフィンジェノミクス株式会社(旧 オペロンバイオテクノロジー株式会社)に標的核酸TBPのヌクレオチド配列を伝え、同社に該標的核酸TBPの人工遺伝子、及び、TBP用の陽性コントロール核酸の人工遺伝子の合成を委託した。TBP用の陽性コントロール核酸の配列(配列番号13)は、上記実施例1で作製した陽性コントロール核酸に特異的なプローブ(配列番号2)に相補的な挿入配列(配列番号2のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列)を、標的核酸TBP(配列番号10)の配列のヌクレオチド番号29と30の間の位置に挿入した配列とした。納品されたベクターにクローニングされた人工遺伝子を線状にして、前述の2種の人工遺伝子の増幅効率の比較検討を実施した。上記標的核酸TBPを増幅し得るフォワードプライマー(5'プライマー)であるTBP-F(GCACCACTCCACTGTATCCC : 配列番号11)、リバープライマー(3'プライマー)であるTBP-R(CCCAGAACTCTCCGAAGCTG : 配列番号12)およびTBP-probe(ACCCCACTCACTCCCTGCCACGC : 配列番号14)の合成は、日本テクノサービス社に委託して行った。前述の2種の人工遺伝子(標的核酸TBP、又は、TBP用の陽性コントロール核酸)を鋳型とし、上記の両プライマー(TBP-F及びTBP-R)及びプローブ(TBP-probe)を用いてリアルタイムPCRを行い、両人工遺伝子間に増幅効率の差がなく、TBP用の陽性コントロール核酸(配列番号13)が適正な陽性コントロールになり得ることを確認した。

20

30

【実施例3】

【0107】

(被検試料中の標的核酸の検出又は定量に用いるためのキットの作製)

被検試料中の標的核酸の検出又は定量に用いるためのキットは、以下のような方法で作製した。

【0108】

まず、市販の8連ストリップPCRチューブ(Roche社製)を用意した。これは、8個の反応容器(ウェル)が1列に連結されたものである(図1参照)。また、上記標的核酸EBVを特異的に増幅・検出し得るEBVプライマー・プローブミックス(EBV-PPmix)として、前述のEBV-F、EBV-R及びEBV-probeを用意し、上記の標的核酸TBPを特異的に増幅し得るTBP-PPmixとして、前述のTBP-F、TBP-R及びTBP-probeを用意した。また、陽性コントロール核酸に特異的なプローブとして、上記の実施例2では、配列番号2のプローブを用いたが、本実施例3ではIC-probe(CACATGTGATATGCGCAGAGTCTC : 配列番号15)を用意した。また、実施例2と同様の方法にて、EBV用の新たな陽性コントロール核酸(配列番号16)と、TBP遺伝子用の新たな陽性コントロール核酸(配列番号17)を作製した。これらの陽性コントロール核酸は、配列番号2の「陽性コントロール核酸に特異的なプローブ」ではなく、上記の配列番号15の「陽性コントロール核酸に特異的なプローブ(IC-probe)」にハイブリダイズするように設計した。具体的には、EBV用の新たな陽性コントロール核酸(配列番号16)は、IC-probe(配列番

40

50

号15)に相補的な挿入配列を、標的核酸EBVの配列(配列番号5)のヌクレオチド番号99と100の間に挿入した配列とした。また、TBP遺伝子用の新たな陽性コントロール核酸(配列番号17)は、IC-probe(配列番号15)に相補的な挿入配列(配列番号2のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列)を、標的核酸TBP(配列番号10)の配列のヌクレオチド番号29と30の間の位置に挿入した配列とした。

【0109】

前述のEBV-probeのヌクレオチド配列(配列番号9)は、標的核酸EBV(配列番号5)のヌクレオチド番号32~51のヌクレオチド配列に相当するヌクレオチド配列である。EBV-probeの5'末端はレポーター蛍光色素6-FAMで、3'末端はクエンチャー蛍光色素BHQ-1で修飾されている。また、前述のTBP-probeのヌクレオチド配列(配列番号14)は、標的核酸TBP(配列番号10)のヌクレオチド番号40~61のヌクレオチド配列に相当するヌクレオチド配列である。TBP-probeの5'末端はレポーター蛍光色素HEXで、3'末端はクエンチャー蛍光色素BHQ-1で修飾されている。前述のIC-probeのヌクレオチド配列(配列番号15)は、EBV用の陽性コントロール核酸(配列番号6)のヌクレオチド番号100~123のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列であり、また、TBP遺伝子用の陽性コントロール核酸(配列番号13)のヌクレオチド番号30~53のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列である。IC-probeの5'末端はレポーター蛍光色素Cy5で、3'末端はクエンチャー蛍光色素BHQ-3で修飾されている。

10

【0110】

図1に示すように、前述の8連ストリップPCRチューブの8個の反応容器(左から順にA~H)のうち、A~Cの3つを陽性コントロール核酸用の反応容器とし、D~Gの4つを被検試料用の反応容器とし、Hを陰性コントロール用の反応容器とした。

20

【0111】

陽性コントロール核酸用の反応容器A~Cには、EBV PPmix(EBV-F、EBV-R及びEBV-probe)、TBP PPmix(TBP-F、TBP-R及びTBP-probe)、IC-probe、EBV用の陽性コントロール核酸、及び、TBP遺伝子用の陽性コントロール核酸を加えた後、トレハロース等の安定化剤をさらに添加し、次いで、減圧下で乾燥することによりこれらを固相化した。なお、陽性コントロール核酸の濃度は、反応容器A~Cで段階的になるようにし、反応容器Cにおいては 1×10^1 コピーとし、反応容器Bにおいては 1×10^3 コピーとし、反応容器Aにおいては 1×10^5 コピーとした。

30

【0112】

被検試料用の反応容器D~Gには、EBV PPmix(EBV-F、EBV-R及びEBV-probe)、TBP PPmix(TBP-F、TBP-R及びTBP-probe)、IC-probeを加えた後、トレハロース等の安定化剤をさらに添加し、次いで、減圧下で乾燥することによりこれらを固相化した。

【0113】

陰性コントロール用の反応容器Hには、反応容器D~Gと同様に、EBV PPmix(EBV-F、EBV-R及びEBV-probe)、TBP PPmix(TBP-F、TBP-R及びTBP-probe)、IC-probeを加えた後、トレハロース等の安定化剤をさらに添加し、次いで、減圧下で乾燥することによりこれらを固相化した。

40

【0114】

以上のように、8連ストリップPCRチューブの各反応容器内に各種の試薬を固相化することにより、被検試料中の標的核酸の検出又は定量に用いるための8連ストリップPCRチューブを作製した。

【実施例4】

【0115】

(試薬固相化8連ストリップPCRチューブを用いたリアルタイムPCRアッセイ 1)
上記実施例3で作製した試薬固相化8連ストリップPCRチューブを用いて、EBVの

50

BALF5 遺伝子、及び、ヒトTBP 遺伝子について、以下のような方法で、マルチプレックスリアルタイムPCRアッセイを行った。

【0116】

模擬被検試料として、EBVウイルス陽性細胞株であるSNT8から抽出したゲノムDNAを用意した。次に、上記の試薬固相化8連ストリップPCRチューブの各反応容器に、TakaraBio社製のPremix EX Taq (probe qPCR)を10 μ Lずつ添加した。Premix EX Taqは、TaqポリメラーゼであるTaKaRa Ex Taq HSや、dNTP Mixtureや、Mg²⁺や、バッファー成分を含んでいる。陽性コントロール核酸用の反応容器A~C及び陰性コントロール用の反応容器Hには、模擬被検試料を添加せず、被検試料用の反応容器D~Gには模擬被検試料である上記ゲノムDNAをそれぞれ100ng、10ng、1ng、0.1ng 10

【0117】

リアルタイムPCR装置としては、Bio-RAD社製のCFX96を用いた。PCRの反応条件は、95 $^{\circ}$ Cで10秒間熱処理した後、95 $^{\circ}$ C 5秒間、60 $^{\circ}$ C 30秒間からなる反応サイクルを45サイクル行った。PCRの増幅産物の量は、EBV-probeについては6-FAMの蛍光を、TBP-probeについてはHEXの蛍光を、IC-probeについてはCy5の蛍光を検出・定量することにより行った。これら3種の蛍光シグナルをLight cycler 480ソフトウェアを用いてfit-point法により解析し、各標的のCq値(特定のシグナル強度に達するまでに要する反応サイクル数)を求めた。

【0118】

[反応容器A~Cにおける結果]

このようなリアルタイムPCRアッセイの、反応容器A~C(陽性コントロール核酸用の反応容器)における結果を図3に示す。反応容器A~Cのいずれにおいても、EBV-probe(6-FAM)、TBP-probe(HEX)、IC-probe(Cy5)の3種類の蛍光シグナルが検出された。また、反応容器A(陽性コントロール核酸:1 \times 10⁵コピー)、反応容器B(陽性コントロール核酸:1 \times 10³コピー)、反応容器C(陽性コントロール核酸:1 \times 10¹コピー)のうち、陽性コントロール核酸のコピー数が多い反応容器ほど、より少ない反応サイクル数でも蛍光シグナルが検出された。

【0119】

また、反応容器A~Cのそれぞれにおいて、各標的について算出したCq値(Y)と、陽性コントロール核酸のコピー数を常用対数で示した数値(X)とを用いて、回帰分析を行い、回帰式求めた。その結果を図4に示す。図4に示すように、EBVを標的とする回帰式、TBPを標的とする回帰式、ICを標的とする回帰式のいずれも、直線である一次式となり、しかも、決定係数R²(相関係数Rの2乗)がきわめて高かった。これらの結果から、本発明の陽性コントロール核酸及び陽性コントロール核酸用プローブを含むセットや、試薬固相化8連ストリップPCRチューブ等の本発明のキットは、検出の定量性に優れ、また、定量性に優れた検量線が得られることが示された。

なお、EBVを標的とする回帰式は、 $Y = -3.1483X + 34.623$ であり、決定係数R² = 1であった。また、TBPを標的とする回帰式は、 $Y = -3.3332 + 35.702$ であり、決定係数R² = 0.99999であった。また、ICを標的とする回帰式は、 $Y = -3.175 + 34.089$ であり、決定係数R² = 0.99998であった。

【0120】

[反応容器D~Gにおける結果]

前述のリアルタイムPCRアッセイの、反応容器D~G(被検試料用の反応容器)における結果を図5に示す。反応容器D~Gのいずれにおいても、EBV-probe(6-FAM)、TBP-probe(HEX)の2種類の蛍光シグナルが検出されたが、IC-probe(Cy5)の蛍光シグナルは検出されなかった。模擬被検試料である前述のゲノムDNAには、陽性コントロール核酸とは異なり、ICプローブがハイブリダイズする配列(IC配列)が含まれていない。反応容器D~GにおいてICプローブの蛍光シグ

ナルが検出されなかったことは、ICプローブがヒトやウイルスのゲノムやその転写産物に非特異的にハイブリダイズしなかったことを表している。したがって、仮に、被検試料用の反応容器においてICプローブの蛍光シグナルが検出されたとすれば、その被検試料用の反応容器内に陽性コントロール核酸が混入してしまっていることが判明する。なお、反応容器D（模擬被検試料：100ng）、反応容器E（模擬被検試料：10ng）、反応容器F（模擬被検試料：1ng）、反応容器G（模擬被検試料：0.1ng）のうち、添加した模擬被検試料の量が多い反応容器ほど、より少ない反応サイクル数でも、EBV-probe（6-FAM）及びTBP-probe（HEX）による蛍光シグナルが検出された。

【0121】

[反応容器Hにおける結果]

前述のリアルタイムPCRアッセイの、反応容器H（陰性コントロール用の反応容器）においては、EBV-probe（6-FAM）、TBP-probe（HEX）、IC-probe（Cy5）の3種類の蛍光シグナルはいずれも検出されなかった。反応容器Hには、陽性コントロール核酸も模擬被検試料も含まれていないため、当然の結果である。

【実施例5】

【0122】

（試薬固相化8連ストリップPCRチューブを用いたリアルタイムPCRアッセイ2）

被検試料用の反応容器内に、陽性コントロール核酸が1コピーでも混入した場合に、どのような検出結果となるかを調べるために、以下のリアルタイムPCRアッセイを行った。

【0123】

試薬固相化8連ストリップPCRチューブの反応容器D（被検試料用の反応容器）に、模擬被検試料を添加せず、及び、EBV用の陽性コントロール核酸を1コピーずつ混入させたこと以外は、実施例4における方法と同じ方法でリアルタイムPCRアッセイを行った。

【0124】

このようなリアルタイムPCRアッセイの、反応容器Dにおける結果を図6に示す。反応容器Dにおいても、EBV-probe（6-FAM）、IC-probe（Cy5）の2種類の蛍光シグナルが検出された。この結果から、本発明の陽性コントロール核酸及び陽性コントロール核酸用プローブを含むセットや、試薬固相化8連ストリップPCRチューブ等の本発明のキットは、1コピーレベルの陽性コントロール核酸の混入であっても、検出できることが示された。なお、今回のリアルタイムPCRアッセイの反応容器Dには、模擬被検試料中に含まれていたヒトゲノムが含まれていないため、TBP-probe（HEX）の蛍光シグナルは検出されていない。

【実施例6】

【0125】

（試薬固相化8連ストリップPCRチューブを用いたリアルタイムPCRアッセイ3）

上記実施例4及び5では、8連ストリップPCRチューブに、プライマーやプローブや陽性コントロール核酸を固相化したが、ポリメラーゼ酵素や、バッファーについては固相化していなかった。プライマーやプローブや陽性コントロール核酸に加えて、ポリメラーゼ酵素及びバッファーも同一チューブ内に固相化した場合に、室温での保存安定性にどのような影響があるかを調べるために、以下のリアルタイムPCRアッセイを行った。

【0126】

実施例3と同様の方法にて、市販の8連ストリップPCRチューブ（Roche社製）の反応容器A及びBを、陽性コントロール核酸用反応容器とした。ただし、反応容器A及びBにおける陽性コントロール核酸の濃度は同じとした。また、反応容器Bでは、EBV P P m i x（EBV-F、EBV-R及びEBV-probe）、TBP P P m i x（TBP-F、TBP-R及びTBP-probe）、IC-probe、EBV用の陽性コ

10

20

30

40

50

ントロール核酸、及び、T B P 遺伝子用の陽性コントロール核酸（以下、「P P m i x 等」とも表示する。）、並びに、T a q ポリメラーゼであるTaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TakaraBio社製)を固相化し、反応容器 B 用のバッファー（M g ²⁺ 及び d N T P も含む）はさらに別の反応容器 C に固相化した。一方、反応容器 A では、これら P P m i x 等及びTaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TakaraBio社製)に加え、バッファー（M g ²⁺ 及び d N T P も含む）も固相化した。この 8 連ストリップ P C R チューブを室温で 2 ヶ月間保存した後、実施例 4 における方法と同様の方法でリアルタイム P C R を行った。ただし、T a q ポリメラーゼとして、TaKaRa Ex Taq HS に代えて TaKaRa Ex Taq Hot Start Version を用いた。

【 0 1 2 7 】

10

このようなリアルタイム P C R アッセイの、反応容器 A（P P m i x 等、酵素及びバッファーを同一反応容器内に固相化）の結果を図 7 の左に示し、反応容器 B（P P m i x 等及び酵素を同一容器内で固相化し、バッファーは別容器で固相化）の結果を図 7 の右に示す。図 7 から分かるように、反応容器 B（P P m i x 等及び酵素を同一容器内で固相化し、バッファーは別容器で固相化）では 3 種の蛍光がきちんと確認され、検出された蛍光強度（R F U）も高かったのに対し、反応容器 A（P P m i x 等、酵素及びバッファーとを同一反応容器内に固相化）では、3 種のうち、1 種の蛍光が確認できず、他の蛍光強度も反応容器 B よりも低かった。この結果から、P P m i x 等、酵素及びバッファーを同一反応容器内に固相化すると、室温での長期の保存性安定性が低下し、リアルタイム P C R の検出感度が少し低下する場合があることが示された。したがって、室温での長期の保存安定性を得る観点からは、酵素と、バッファー（M g ²⁺ 及び d N T P も含む）を固相化する場合は、別の反応容器内に固相化することが好ましいことが示唆された。なお、P P m i x 等、酵素及びバッファーを同一反応容器内に固相化した場合であっても、室温保存期間が 2 週間程度であれば検出感度に特に問題はなく、1 週間程度であれば全く問題はなかった。

20

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 2 8 】

本発明によれば、被検試料用容器内への混入の有無を簡便かつ迅速に確認し得る、陽性コントロール核酸と該陽性コントロール核酸に特異的なプローブとを含むセットを提供することができる。また、本発明によれば、被検試料用容器内への陽性コントロール核酸の混入の有無を簡便かつ迅速に確認しつつ、被検試料中の標的核酸を検出又は定量する方法を提供することができる。

30

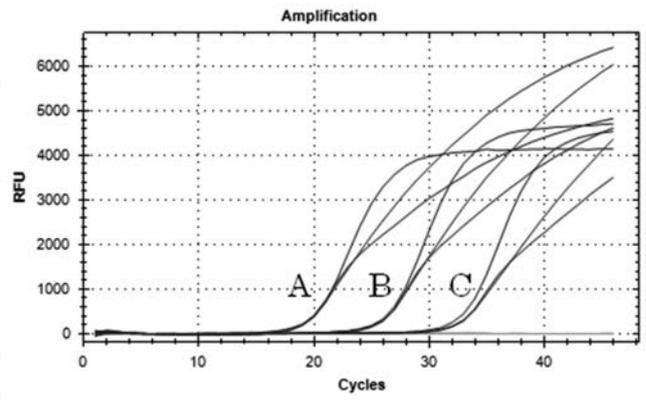
【 図 1 】

	A	B	C	D	E	F	G	H
用途	Positive control	Positive control	Positive control	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Negative control
検査対象	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC
固相化DNA	Standard 1x10 ⁸	Standard 1x10 ⁶	Standard 1x10 ⁴					

【 図 2 】

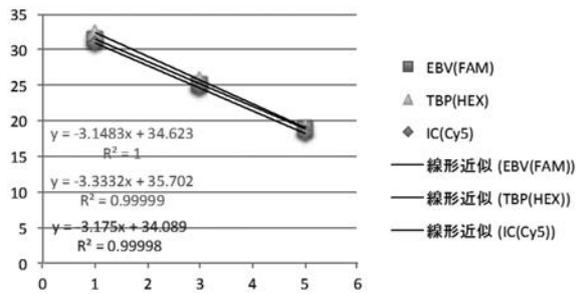
	A	B	C	D	E	F	G	H
用途	Positive control	Positive control	Positive control	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Reagent preparation
固相化物	Primer/ probe/Taq/ standard	Primer/ probe/Taq/ standard	Primer/ probe/Taq/ standard	Primer/ probe/Taq/	Primer/ probe/Taq/	Primer/ probe/Taq/	Primer/ probe/Taq/	Buffer (for 7.5 sample)
固相化DNA	Standard 1x10 ⁸	Standard 1x10 ⁶	Standard 1x10 ⁴					

【 図 3 】

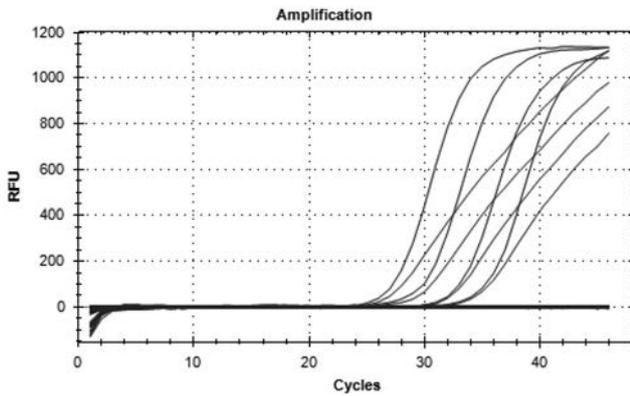


【 図 4 】

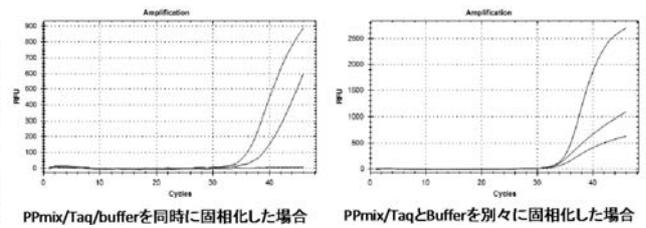
検量線解析



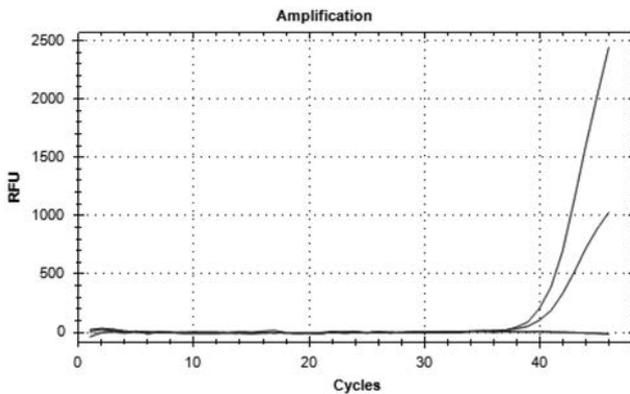
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



【配列表】

2016059798000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/005198
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C12Q1/68 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPI(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-507248 A (Applera Corp.), 11 March 2004 (11.03.2004), abstract; claims; pages 8 to 9, 12 to 13, 21 to 24; fig. 1 to 3 & US 2003/0027179 A1 abstract; pages 1 to 2, 4, 8 to 10; fig. 1 to 3 & WO 02/016648 A2 & EP 1339870 A1	1-11
Y	JP 2004-329209 A (Hitachi, Ltd.), 25 November 2004 (25.11.2004), abstract; claims; page 6; examples & US 2004/0209291 A1 abstract; claims; page 2; examples & CN 1537954 A	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 24 December 2015 (24.12.15)		Date of mailing of the international search report 12 January 2016 (12.01.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/005198

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-130006 A (Gotaro WATANABE), 31 May 2007 (31.05.2007), claims (Family: none)	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2015/005198									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <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>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015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	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPI (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
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 請求項の番号									
Y	JP 2004-507248 A (アプレラ コーポレイション) 2004.03.11, 要約, 特許請求の範囲, 第8-9頁, 第12-13頁, 第21-24頁, 図1-3 & US 2003/0027179 A1, 要約, 第1-2頁, 第4頁, 第8-10頁, 図1-3 & WO 02/016648 A2 & EP 1339870 A1	1-11									
C欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 24.12.2015		国際調査報告の発送日 12.01.2016									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 鳥居 敬司	4B 5804								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 5 1 9 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2004-329209 A (株式会社日立製作所) 2004.11.25, 要約, 特許請求の範囲, 第6頁, 実施例 & US 2004/0209291 A1, 要約, 特許請求の範囲, 第2頁, 実施例 & CN 1537954 A	1-11
A	JP 2007-130006 A (渡邊 剛太郎) 2007.05.31, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-11

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(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 渡邊 健

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 外丸 靖浩

茨城県牛久市中央1-19-1 つくばオリゴサービス株式会社内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB20 FA12 GB03

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 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。