

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-201637

(P2004-201637A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	
G O 1 N 33/569	G O 1 N 33/569 A	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2002-377519 (P2002-377519)	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成14年12月26日 (2002.12.26)	(72) 発明者	西口 洋朗 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	山口 英世 東京都八王子市大塚359 帝京大学医真菌研究センター
		(72) 発明者	横村 浩一 東京都八王子市大塚359 帝京大学医真菌研究センター
		Fターム(参考)	4B024 AA11 CA05 CA11 HA11 4B063 QA18 QQ43 QR62 QS25

(54) 【発明の名称】 病原真菌遺伝子の検出及びそれに用いるオリゴヌクレオチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】病原真菌の検出に有効なオリゴヌクレオチド及びその組み合わせに関する。更に詳しくは該オリゴヌクレオチドを用いて病原真菌を検出する方法、ならびにその為の検出キットに関する。

【解決手段】病原真菌特異的オリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を3種類同時に用いることにより、もしくは特定のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を2種類同時にプライマーとして用いることにより広範囲の病原真菌の18SrRNA遺伝子を検出することを特徴とする病原真菌遺伝子の検出方法、ならびに該オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する検出キット。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、2 及び 3 に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を 3 種類同時にプライマーとして用いることにより、広範囲の病原真菌の 18S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅させて検出することを特徴とする病原真菌の検出方法。

【請求項 2】

配列番号 1、2 及び 3 に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を 4 : 4 ~ 1 : 4 ~ 1 の割合で 3 種類同時に用いる請求項 1 の検出方法。

【請求項 3】

配列番号 1 及び 4 に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を 2 種類同時にプライマーとして用いることにより、広範囲の病原真菌の 18S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅させて検出することを特徴とする病原真菌の検出方法。 10

【請求項 4】

配列番号 1 及び 4 に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を 1 : 2 ~ 1 の割合で 2 種類同時に用いる請求項 3 の検出方法。

【請求項 5】

請求項 1 或いは 3 に記載のオリゴヌクレオチドの組み合わせからなる該オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする病原真菌遺伝子検出用キット。

【請求項 6】

さらに請求項 2 或いは 4 に記載の割合で該組み合わせのオリゴヌクレオチドを含有する請求項 5 記載のキット。 20

【請求項 7】

病原真菌遺伝子を検出するために用いられるオリゴヌクレオチドの組合せであって、(1) 配列番号 1 に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部、或いはそれらの相補配列の一部或いは全部からなるオリゴヌクレオチド、および、(2) 配列番号 2 ~ 4 に記載のオリゴヌクレオチド配列より選択される 1 つ以上のオリゴヌクレオチドの一部或いは全部、或いはそれらの相補配列の一部或いは全部からなるオリゴヌクレオチド、からなるオリゴヌクレオチドの組合せ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は病原真菌の検出に有効なオリゴヌクレオチド及びその組み合わせに関する。更に詳しくは該オリゴヌクレオチドを用いて病原真菌を検出する方法、ならびにその為の検出キットに関する。 30

【0002】

【従来技術】高度医療の普及に伴い易感染患者は増加の一途をたどり、カンジダ症、アスペルギルス症を初めとする深部(全身性)真菌症は、易感染患者が高率に罹患する重要な感染症として医療上の問題となっている。今日治療のための様々な抗菌剤が開発されているにもかかわらず、深部真菌症の診断は極めて困難であり、有効な診断法が未だに確立されていないのが現状である。現在までに市販されている深部真菌症の診断方法としては、各属或いは各種の病原真菌抗原またはこれに対する抗体を免疫学的に検出する方法、病原真菌の菌体成分または代謝産物を生化学的に検出する方法等があるが、いずれの方法においても病理学的に真菌感染が認められない患者(健康人を含む)に対しても有意に高値を示す擬陽性の問題があり、また感度においても臨床的な要請に十分に答えられる現状ではないうえに、結果が出るまでにかかなりの時間を要する。 40

【0003】

近年、PCR 法によって特定の病原真菌のみの遺伝子を迅速かつ特異的に検出する方法が報告されているが、深部真菌症起因菌が多様化している現状を考慮すると、特定の菌種のみを検出する従来の PCR 法では検出できる菌種が限られているうえに、検体に対して考えられる起因菌の種類の数だけ同時に別個の検査が必要であり、必ずしも臨床的要請に十分対応できる診断法とは言えず、より広い範囲の病原真菌感染症全体を迅速かつ特異的に診断 50

できる方法の確立が求められていた。

【0004】

そこで以上の問題を解説すべく、本発明者の一人である山口英世(帝京大学)が出願した登録番号2110122「病原真菌遺伝子増幅プライマー」の特許では、18S リボゾームRNA(以下、18S rRNA) 遺伝子の配列の中から、特に広範囲の病原真菌に共通に保存され、ヒトや細菌には共通性の少ない領域から設計した2種類のプライマーを用いてPCR法にて検出する方法が提示された。しかし、一部の属においてプライマー配列の異なりが原因と思われる感度不足が認められ、更なる感度向上が求められた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】各種病原真菌の特徴はその遺伝子により規定されているが、各々の病原真菌に共通した特徴的な遺伝子領域に対応するオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いてPCR法を施行し、各種病原真菌に共通した特徴的遺伝子を検出する事ができれば、そのような菌の存在を確定することができる。 10

【0006】

本発明の目的は、上記特許にて試料中の病原真菌を簡便、迅速かつ高感度、特異的に検出するための方法及びそれに用いるオリゴヌクレオチド、ならびに検出用キットを改良し、一部の属においてプライマー配列の異なりが原因と思われる感度不足を解消するための方法及びそれに用いるオリゴヌクレオチド、ならびに検出用キットを提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題解決のため真菌及びその他の生物の18S rRNA遺伝子に関し種々の検討を重ね、一部の属においてプライマー配列の異なりが原因と思われる感度不足を解消する検出方法を確認し、本発明を完成させるに至った。 20

【0008】

すなわち、本発明は以下の各項の病原真菌の検出方法等を提供する。

項1. 配列番号1、2及び3に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を3種類同時にプライマーとして用いることにより、広範囲の病原真菌の18S rRNA遺伝子をPCR法により増幅させて検出することを特徴とする病原真菌の検出方法。

項2. 配列番号1、2及び3に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を4:4~1:4~1の割合で3種類同時に用いる項1の検出方法。

項3. 配列番号1及び4に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を2種類同時に用いることにより、広範囲の病原真菌の18S rRNA遺伝子をPCR法により増幅させて検出することを特徴とする病原真菌の検出方法。 30

項4. 配列番号1及び4に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を1:2~1の割合で2種類同時に用いる請求項4の検出方法。

項5. 請求項1或いは3に記載のオリゴヌクレオチドの組み合わせからなる該オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする病原真菌遺伝子検出用キット。

項6. さらに請求項2或いは4に記載の割合で該組み合わせのオリゴヌクレオチドを含有する項5記載のキット。

項7. 病原真菌遺伝子を検出するために用いられるオリゴヌクレオチドの組合せであって、(1)配列番号1に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部、或いはそれらの相補配列の一部或いは全部からなるオリゴヌクレオチド、および、(2)配列番号2~4に記載のオリゴヌクレオチド配列より選択される1つ以上のオリゴヌクレオチドの一部或いは全部、或いはそれらの相補配列の一部或いは全部からなるオリゴヌクレオチド、からなるオリゴヌクレオチドの組合せ。 40

【0009】

本発明を概説すれば、カンジダ属、ハンセヌラ属、サッカロマイセス属、トリコスポロン属、クリプトコッカス属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、プラストマイセス属、コクシジオイデス属及びニューモシスチス属等を含む広範囲の病原真菌、特に好適にはカンジダ属、クリプトコッカス属、アスペルギルス属を含む病原真菌の検出方法に関し、配列番号1~4に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部からなる該オリゴヌクレオ 50

チドの適した組み合わせをプライマーとして用い、該真菌の18S rRNA遺伝子をPCR法により、より高感度に検出することを特徴とする。更に、病原真菌の検出用キットに関し、上記方法にて該病原真菌の検出を行うための検出キットであって、該病原真菌の18S rRNA遺伝子をPCR法により、より増幅させるための上記オリゴヌクレオチドの組み合わせ及び増幅されたDNAを検出することを特徴とする。

【0010】

18S rRNA遺伝子中の、病原真菌に共通する特徴的なオリゴヌクレオチドの配列は、以下の手順で決定することができる。

(1) 遺伝子配列データバンク (GenBank) に登録されている遺伝子配列のうち、各種病原真菌、ヒト及び大腸菌の18S rRNA遺伝子 (DNA) を各々の塩基配列間で比較し、表1に示す各種病原真菌に共通であって、ヒト (登録番号M10098) 及び大腸菌 (登録番号M24996) には共通しない配列領域を限定する。

10

表1

アスペルギルス・フミガタス	M 5 5 6 2 6
ペニシリウム・ノタツム	M 5 5 6 2 8
カンジダ・アルピカンス	M 6 0 3 0 2
カンジダ・ギリエルモンディイ	M 6 0 3 0 4
カンジダ・ケフィル	M 6 0 3 0 3
カンジダ・クルゼイ	M 6 0 3 0 5
カンジダ・ルシタニエ	M 6 0 3 0 6
カンジダ・パラブシローシス	M 6 0 3 0 7
カンジダ・ヴィスワナティイ	M 6 0 3 0 9
カンジダ・グラブラータ	M 6 0 3 1 1
ハンセヌラ・ポリモルファ	M 6 0 3 1 0
サッカロマイセス・セレピシエ	V 0 1 3 3 5
クリプトコッカス・ネオフォルマンズ	M 5 5 6 2 5
ブラストマイセス・デルマチチジス	M 5 5 6 2 4
コクシジオイデス・イミチス	M 5 5 6 2 7
ニューモシスチス・カリニイ	X 1 2 7 0 8

20

【0011】

(2) 上記の病原真菌に特異的な配列領域から、表1に示した全ての病原真菌の18S rRNA遺伝子のみを特異的に増幅することのできるオリゴヌクレオチドの組み合わせ (配列番号1、2及び3或いは1及び4) を決定する。オリゴヌクレオチドはDNA合成機により合成でき、カラムやHPLC等にて精製できる。

30

【0012】

検出する病原真菌DNAは、血液等の病原真菌感染試料より調製する事ができる。PCR法については、タック・ポリメラーゼ (Taq polymerase) を含む遺伝子増幅キット及び自動遺伝子増幅装置が市販されており、これと本発明のオリゴヌクレオチドの組み合わせを用い、病原真菌DNAの増幅反応が可能である。PCR法では、酵素として、例えば、耐熱性タック・ポリメラーゼを用い、DNAの変性 (約95℃) の工程、オリゴヌクレオチドDNAのアニール (約59℃) の工程及びDNA合成 (約72℃) の工程よりなるサイクルを任意の回数繰り返すことで、目的遺伝子のみを指数的に増幅させることができる。例えばサイクルを25回繰り返せば、目的DNAは約10万倍に増幅される。微量試料より高感度にDNAを検出するには、現在このPCR法が最も有効な方法である。増幅後の目的DNAの検出は、例えばアガロースゲル電気泳動やポリアクリルアミドゲル電気泳動等、或いは増幅領域内に特異的なDNA配列がありこれをプローブとして用いることができればスポット法やサザンブロット法等で行うことができる。

40

【0013】

本発明の配列番号1のオリゴヌクレオチドはフォワードプライマー、配列番号2および3のオリゴヌクレオチドはそれぞれリバースプライマーである。従来の配列番号1のフォワ

50

ードプライマーと配列番号2のリバースプライマーの組合せでは、広範囲の病原真菌、とくにクリプトコッカス属を含む広範囲の18S rRNA遺伝子を検出するには十分ではなかったが、配列番号3のリバースプライマーを併用すると、クリプトコッカス属に対するプライマーの特異結合性が増大することの理由によりクリプトコッカス属に対しても十分な感度を得られる。あるいは、配列番号1のフォワードプライマーと配列番号4のリバースプライマーの組合せを用いることにより、より少ないプライマー数で同等の結果が得られる。

【0014】

本発明でプライマーとして用いる、配列番号1～4のいずれかのオリゴヌクレオチドは、その目的を十分満たすのであれば、その一部分を用いても良い。

【0015】

本発明の病原真菌の検出方法では、クリプトコッカス属に対するプライマーの特異結合性が増大することの理由により、配列番号1、2及び3に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を4：4～1：4～1の割合で3種類同時に用いることが好ましい。

【0016】

本発明の病原真菌の検出方法では、クリプトコッカス属に対するプライマーの特異結合性が増大することの理由により、配列番号1及び4に記載のオリゴヌクレオチド配列の一部或いは全部を1：2～1の割合で2種類同時に用いることが好ましい。

【0017】

本願発明の病原真菌遺伝子検出用キットは、請求項1或いは3に記載のオリゴヌクレオチドの組み合わせからなる該オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする。

【0018】

このように病原真菌の18S rRNA遺伝子に特有な塩基配列から設計したオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いたPCR法によって、一部の属におけるプライマー配列の異なりが原因と思われる感度不足を解消し、より多くの病原真菌を高感度に検出することができるとともに病原遺伝子検出用キットを作製することが可能である。

なお、キットに用いる試薬は溶液状、凍結乾燥物或いはプレート等に固定化された状態でもよい。、以上、本発明によって病原真菌の早期発見が可能となり、早期治療に結びつく。

【0019】

【実施例】以下、本発明を実施例をもって詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって制限されるものではない。

【0020】

実施例1

主用病原真菌カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガタス及びクリプトコッカス・ネオフォルマンズの18S rRNA遺伝子のPCR法による検出

(1) オリゴヌクレオチド(DNA)の合成及び精製

配列表の配列番号1～3に示したオリゴヌクレオチド(DNA)の合成及び精製は、日本バイオサービスに依頼した。

(2) カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガタス及びクリプトコッカス・ネオフォルマンズのゲノムDNAの調製

カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガタス及びクリプトコッカス・ネオフォルマンズの培養及びゲノムDNAの調製は、榎村らの方法 [真菌症遺伝子診断 編集 / 榎村浩一 発行 / メジカルセンス] により行い、100、10及び1pg/5µLに調製した。

(3) カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガタス及びクリプトコッカス・ネオフォルマンズの18S rRNA遺伝子に特異的な領域のPCR法による増幅

実施例1の(2)で調製したカンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガタス及びクリプトコッカス・ネオフォルマンズのDNAを各々5µLずつ0.2mL用PCRチューブに取り、3µLの10×増幅用緩衝液(100mM Tris-HCl(pH8.3)、500mMKCl)、3µLの2mM dNTPs(dATP、dGTP、dTTP、dCTP)、1.8µLの25mM MgCl₂、0.6µLの15pmol/µLオリゴヌクレオチド1、0.3µLの15pmol/µLオリゴヌクレオチド2、0.3µLの15pmol/µLオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チド3及び0.3 μ Lの5U/ μ L タックポリメラーゼ(東洋紡製)を加え、更に滅菌水を加えて30 μ Lの溶液にした。対象として、上記組成中オリゴヌクレオチド2を0.6 μ L、オリゴヌクレオチド3は混合しない溶液も調製した(登録番号2110122の組成)。反応条件は95 \cdot 5分間の変性後、95 \cdot 30秒の変性 59 \cdot 30秒のアニーリング 72 \cdot 1分の合成反応を34サイクル行い、72 \cdot 7分間伸長反応を行った。以上の反応を自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー(Perkin-Elmer社 PCR System 9700)により実施した。

(4) カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガタス及びクリプトコッカス・ネオフォルマンズの18S rRNA遺伝子に特異的な領域のPCR法による増幅後の検出

10 μ Lの反応液を2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線による蛍光で増幅されたDNAを確認した。その結果、3種類のオリゴヌクレオチドを用いた反応液ではカンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガタス及びクリプトコッカス・ネオフォルマンズとともに1pg/5 μ L添加まで687bp付近に単一の増幅が確認できたが、2種類のオリゴヌクレオチド(登録番号2110122の組成)を用いた反応液ではカンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガタスでは1pg/5 μ L添加まで増幅が確認できたが、クリプトコッカス・ネオフォルマンズでは100pg/5 μ L添加しか増幅が確認できなかった。

10

このことは、本発明によりクリプトコッカス・ネオフォルマンズにおいて更なる感度向上ができたことを示していると考えられる。

【0021】

【発明の効果】以上詳細に説明したように、本発明により、病原真菌の18SrRNA遺伝子を検出することによる、試料中の病原真菌の更なる高感度な検出法及び検出キットが提供される。

20

【0022】

【配列表】

<110> Toyo Boseki Kabushiki Kaisya

<120> 病原真菌遺伝子の検出及びそれに用いるオリゴヌクレオチド

<130> 02-1032

<141> 2002-12-26

<160> 4

<170> PatentIn version 2.1

10

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> synthetic DNA (E primer)

<400> 1

actttcgaig gtaggatag 19

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic DNA (E primer)

<400> 2

tgatcgtcctt cgatccccta 20

30

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> synthetic DNA (E primer)

<400> 3

taatcgtttt tgatccccta ac 22

40

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> synthetic DNA (E primer)

<400> 4

tracgtytt ygatccccta ac 22