

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7166771号
(P7166771)

(45)発行日 令和4年11月8日(2022.11.8)

(24)登録日 令和4年10月28日(2022.10.28)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
請求項の数 11 (全36頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2018-62538(P2018-62538)	(73)特許権者	516125624
(22)出願日	平成30年3月28日(2018.3.28)		ユーロイミュン・メディツィニシェ・
(65)公開番号	特開2018-171053(P2018-171053 A)		ラボルディアグノシュティカ・アクチエ
(43)公開日	平成30年11月8日(2018.11.8)		ンゲゼルシャフト
審査請求日	令和1年7月17日(2019.7.17)		ドイツ国 2 3 5 6 0 リューベック,
審査番号	不服2021-7787(P2021-7787/J1)	(74)代理人	ザーカンブ 3 1
審査請求日	令和3年6月15日(2021.6.15)		100099623
(31)優先権主張番号	17000524.3	(74)代理人	弁理士 奥山 尚一
(32)優先日	平成29年3月30日(2017.3.30)		100107319
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	松島 鉄男
			100125380
		(74)代理人	弁理士 中村 綾子
			100142996
		(74)代理人	弁理士 森本 聡二
			100180231
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 皮膚糸状菌症の診断のためのアッセイ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸を増幅し得る、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを含むプライマー対であって、前記核酸が配列番号 2 2 で表される核酸配列を含み、

前記正方向プライマーが、病原体のゲノムにおける配列番号 2 2 で表される核酸配列の上流に位置する領域に特異的にハイブリダイズし、前記逆方向プライマーが、病原体のゲノムにおける配列番号 2 2 で表される核酸配列の下流に位置する領域に特異的にハイブリダイズし、

前記プライマー対が、配列番号 1 1 および 2 3 からなる群から選択される配列もしくは配列番号 1 1 および 2 3 からなる群から選択される配列と少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列を含む正方向プライマーと、配列番号 1 3 で示される配列もしくは配列番号 1 3 で示される配列と 9 0 % 同一の核酸配列を含む逆方向プライマーとからなり；または、配列番号 1 0 で示される配列もしくは配列番号 1 0 で示される配列と少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列を含む正方向プライマーと、配列番号 1 2 で示される配列もしくは配列番号 1 2 で示される配列と少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列を含む逆方向プライマーとからなり、

前記病原体が、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum* および *T. erinacei* からなる群から選択される、プライマー対。

10

20

【請求項 2】

皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸プローブであって、前記核酸プローブが、検出可能なシグナル分子に融合されており、200個以下のヌクレオチドの長さを有し、かつ、配列番号14～17、19～21および24～28からなる群から選択される配列または配列番号14～17、19～21および24～28からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一の核酸配列を含むものであり、前記病原体が、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*および*T. erinacei*からなる群から選択される、核酸プローブ。

10

【請求項 3】

検出可能な標識、好ましくは、蛍光標識、放射性標識、コロイド金標識または酵素的に活性な標識を含む群からの検出可能な標識を含む、請求項1に記載のプライマー対または請求項2に記載の核酸プローブ。

【請求項 4】

請求項2に記載の核酸プローブを含むキャリア。

【請求項 5】

前記キャリアは、シラン被覆ガラス、プラスチックまたはシリコン材料のマイクロアレイプレートである、請求項4に記載のキャリア。

【請求項 6】

皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号22で表される核酸配列を含む核酸配列を単離されたサンプル中で検出する工程を包含する方法であって、前記病原体が、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*および*T. erinacei*からなる群から選択され、

20

患者から単離されたサンプル中、好ましくは、爪、毛もしくは皮膚材料中に存在する配列番号22で表される核酸配列を含む任意の核酸を、請求項1に記載のプライマー対を使用して増幅し、そのようにして、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号22を含む核酸配列が前記サンプル中に存在する場合に、アンプリコンを生成する工程

30

を包含する、方法。

【請求項 7】

前記アンプリコンを検出する工程をさらに包含する、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記アンプリコンは、蛍光、放射能、コロイド金、または化学発光によって検出される、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

病原体と関連する皮膚、毛および爪の感染症の診断のための、請求項1に記載のプライマー対、請求項2に記載の核酸プローブ、または請求項4または5に記載のキャリアを含む組成物であって、前記病原体が、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*および*T. erinacei*からなる群から選択される、組成物。

40

【請求項 10】

請求項1に記載のプライマー対、請求項2に記載の核酸プローブおよび/または請求項4または5に記載のキャリアを含む、病原体と関連する皮膚、毛および爪の感染症の診断のためのキットであって、前記病原体が、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*および*T. erinacei*からなる群から選択される、キット。

50

【請求項 1 1】

皮膚、毛および爪の感染症と関連する、配列番号 2 2 で表される核酸配列を含む核酸を有する病原体の診断のためのキットを製造するための、請求項 1 に記載のプライマー対、請求項 2 に記載の核酸プローブまたは請求項 4 または 5 に記載のキャリアの使用であって、前記病原体が、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum* および *T. erinacei* からなる群から選択される、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、配列番号 2 2 を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸を増幅するための、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを含むプライマー対、配列番号 2 2 を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸、上記核酸を含むキャリア、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号 2 2 を含む核酸配列をサンプル中で検出する工程を包含する方法、疾患の診断のための上記プライマー対、上記核酸または上記キャリアの使用、ならびに疾患の診断のための、上記プライマー対、上記核酸および/もしくは上記キャリアを含むキットに関する。

【背景技術】

20

【0002】

ヒト病原性皮膚糸状菌は、3つの属、*Trichophyton*、*Microsporum* および *Epidermophyton* に属し、ヒトの皮膚、爪および毛に感染する真菌である。*Epidermophyton* 属は、単一の種 (*E. floccosum*) によってのみ代表される一方で、*Microsporum* 属および *Trichophyton* 属は、いくつかの異なる種から構成される。近年、以前は *Arthroderma* に割り当てられていたいくつかの種が、再分類され、*Trichophyton* に割り当てられている (Hoogら, 2016)。そしてこの再割り当ては、この特許出願全体を通じて支持される。

【0003】

30

欧州各国における皮膚糸状菌の皮膚、毛および爪の感染症の有病率は、3 ~ 22%の間で変動する。局所治療は、大部分の症例では十分であるが、その感染症が、*Microsporum* 属および *Trichophyton* 属の特定の株 (例えば、*T. verrucosum* および *T. mentagrophytes*) によって引き起こされる場合、長期のおよびしばしば高価な全身処置が必要である。

【0004】

全身の抗真菌薬は、消化管副作用のような種々の副作用と関連し、この副作用は、テルピナフィンで経口処置した患者のうちの 3 ~ 5%において起こる。さらに、骨髄抑制および肝臓の副作用が、それほど頻繁ではないものの起こり得る。従って、特定の株による皮膚、毛および爪の感染症の診断は、処置レジメンが考案されかつ治療が開始される前に確認されるべきである。

40

【0005】

皮膚糸状菌の現在の診断は、臨床標本中の孢子および菌糸の顕微鏡による同定、続いて、インビトロ培養および真菌の形態の同定に基づく。皮膚、毛および爪材料の直接検鏡はしばしば、真菌感染症の先制診断に関しては十分であるが、それは特定の種の診断をもたらさない。迅速かつ安価ではあるものの、この技術は、比較的感度が低く、全症例のうちの 15%までで偽陰性の結果を示す。

【0006】

培養の適用は、症例のうちのおよそ 95%において、10 ~ 15日間で特定の種の同定を可能にする。しかし、いくつかのゆっくりと増殖する単離物もしくは非定型の単離物に

50

関しては、診断の時間は3～6週間までである。従って、皮膚糸状菌感染症の診断のための単純で迅速かつ特異的な方法が必要とされる。

【0007】

PCRベースの方法は、真菌感染症の診断のために導入されてきた。例えば、US2010/0311041は、真菌から核酸を抽出するための方法、患者サンプル中で真菌を検出するためのPCR方法、ならびに皮膚糸状菌を検出し、3つの属、*Trichophyton*、*Microsporum*および*Epidermophyton*による感染症を診断するためのPCRキットを開示する。

【0008】

しかし、当該分野の技術水準で開示される方法は、欠点を有する。特に、それらは、*Trichophyton*属および*Microsporum*属（これらは、動物好性および非動物好性の種を含む）に由来する密接に関連した株の迅速かつ信頼性の高い区別を可能にしない。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【文献】米国特許出願公開第2010/0311041号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

従って、本発明の根底にある課題は、皮膚、毛および爪の疾患、好ましくは、皮膚、毛および爪の感染症、より好ましくは真菌による皮膚、毛および爪の感染症の診断のための方法および試薬を提供することである。

20

【0011】

本発明の根底にある別の課題は、密接に関連する種から、*Trichophyton*属の病原体、特に、*T. benhamiae*（黄色）および*T. concentricum*を同定および区別するための方法および試薬を提供することである。

【0012】

本発明の根底にある課題は、添付の独立請求項および従属請求項の主題によって解決される。

30

【0013】

第1の局面において、本発明の根底にある課題は、配列番号22、好ましくは、配列番号1を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸を増幅し得る、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを含むプライマー対によって解決される。

【0014】

第2の局面において、本発明の根底にある課題は、配列番号22、好ましくは、配列番号1、もしくはその相補鎖を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸、または上記核酸配列を含むベクターもしくは細胞によって解決される。

【0015】

好ましい実施形態において、上記プライマー対または上記核酸は、検出可能な標識、好ましくは、蛍光標識、放射性標識、コロイド金標識または酵素的に活性な標識を含む群からの検出可能な標識を含む。

40

【0016】

第3の局面において、本発明の根底にある課題は、本発明に従うプライマー対と、上記正方向プライマーと上記逆方向プライマーとの間にある核酸配列であって、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する上記核酸配列は、上記正方向プライマーの配列と上記逆方向プライマーの配列との間にある上記病原体のゲノムの中に位置し、好ましくは、上記病原体を含むサンプルを、本発明に従うプライマーを使用して増幅することによって得られる、核酸配列とを含む核酸によって解決される。

50

【 0 0 1 7 】

第4の局面において、本発明の根底にある課題は、本発明に従う核酸を含むキャリアによって解決される。

【 0 0 1 8 】

好ましい実施形態において、上記キャリアは、シラン被覆ガラス、プラスチックまたはシリコン材料のマイクロアレイプレートである。

【 0 0 1 9 】

第5の局面において、本発明の根底にある課題は、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号22、好ましくは、配列番号1を含む核酸配列をサンプル中で検出する工程を包含する方法によって解決される。より好ましくは、上記核酸は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号9を含む群より選択される配列を含む。

10

【 0 0 2 0 】

好ましい実施形態において、本発明に従う方法は、

a) 患者に由来するサンプル、好ましくは、爪、毛または皮膚/爪材料を提供する工程、
 b) 上記サンプル中に存在する配列番号22、好ましくは、配列番号1を含む任意の核酸を、上記プライマー対を使用して増幅し、そのようにして、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号22（または配列番号1）を含む核酸配列が上記サンプル中に存在する場合、アンプリコンを生成する工程
 をさらに包含する。より好ましくは、上記核酸は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号9ならびにこれらの改変体を含む群より選択される配列を含む。

20

【 0 0 2 1 】

好ましい実施形態において、本発明に従う方法は、

c) アンプリコンを検出する工程
 をさらに包含する。

【 0 0 2 2 】

好ましい実施形態において、上記アンプリコンは、蛍光、放射能、コロイド金または化学発光によって検出される。

【 0 0 2 3 】

第6の局面において、本発明の根底にある課題は、疾患、好ましくは、病原体と関連する皮膚、毛および爪の感染症の診断のための、本発明に従うプライマー対、核酸またはキャリアの使用によって解決される。

30

【 0 0 2 4 】

第7の局面において、本発明の根底にある課題は、本発明に従うプライマー対、核酸および/またはキャリアを含む、好ましくは、疾患、より好ましくは、病原体と関連する皮膚、毛および爪の感染症の診断のためのキットによって解決される。

【 0 0 2 5 】

第8の局面において、本発明の根底にある課題は、疾患、好ましくは、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体、より好ましくは、配列番号22、好ましくは、配列番号1を含む核酸を有する皮膚、毛および爪の感染症を伴う病原体の診断のためのキットの製造のための、本発明に従うプライマー対、核酸またはキャリアの使用によって解決される。

40

【 0 0 2 6 】

第9の局面において、本発明の根底にある課題は、真菌、好ましくは、*Trichophyton*属の、より好ましくは、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae*（アフリカ）、*T. benhamiae*（黄色）、*T. concentricum*、*T. erinacei*（アフリカ）および*T. erinacei*を含む群の真菌の同定のためのプライマー対、核酸、キャリア、使用またはキットの使用によって解決される。

【 0 0 2 7 】

50

好ましい実施形態において、上記病原体は、*Trichophyton*を含む群に由来する。

【0028】

好ましい実施形態において、上記病原体は、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*、*T. erinacei* (アフリカ) および *T. erinacei* を含む群に由来する。

【0029】

本発明は、皮膚、毛および爪の感染症と関連する種々の病原体が、コンセンサス配列、配列番号22もしくは配列番号1に関連する、直接関連する株間で僅かではあるが、特徴的な配列相違（これら相違は、皮膚、毛および爪の感染症に罹患している患者に由来する臨床サンプルのようなサンプル中で、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体の種々の密接に関連する株を、好ましくは、*Trichophyton*属から、およびより好ましくは、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (白色)、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*、*T. erinacei* (アフリカ) および *T. erinacei* を含む群から区別するために使用され得る) を有する相同性のメタロプロテアーゼを共通して有するという本発明者らの驚くべき知見に基づく。

【0030】

皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸を増幅し得る、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを含むプライマー対の好ましい実施形態において、上記病原体は、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (白色)、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*、*T. erinacei* (アフリカ) および *T. erinacei* を含む群より選択される。

【0031】

皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸の好ましい実施形態において、上記病原体は、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*、*T. erinacei* (アフリカ) および *T. erinacei* を含む群より選択される。

【0032】

本発明によれば、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号22もしくは配列番号1を含む核酸が、検出される。好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*Trichophyton*属の病原体、より好ましくは *T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (白色)、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*、*T. erinacei* (アフリカ) および *T. erinacei* を含む群の病原体に由来する。好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*T. tonsurans* に由来し、配列番号2によって表される。別の好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*T. equinum* に由来し、配列番号3によって表される。別の好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*T. interdigitale* (ヒト好性+動物好性)、I、II、III、III*、IV、Mに由来し、配列番号4によって表される。別の好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*T. benhamiae* (黄色) に由来し、配列番号5によって表される。別の好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*T. benhamiae* (白色) に由来し、配列番号6によって表される。別の好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*T. benhamiae* (アフリカ) に由来し、配

10

20

30

40

50

列番号7によって表される。別の好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*T. concentricum*に由来し、配列番号8によって表される。別の好ましい実施形態において、上記配列番号22もしくは配列番号1は、*T. erinacei*に由来し、配列番号9によって表される。

【0033】

本発明は、病原体に由来する上記メタロプロテアーゼをコードする核酸を増幅するための、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを含むプライマー対のような種々の試薬を企図する。特異的ハイブリダイゼーションが担保されかつプライマーダイマー化もしくは二次構造形成が回避されるようにプライマーを設計する方法は、当該分野の技術水準で、例えば、Dennis, Y. M., Chius, R. W. K., and Allen Chan, K. C. (2006) *Clinical applications of PCR*, Humana Press, 第18頁に記載されている。好ましい実施形態において、各プライマーは、10~40、より好ましくは、12~35、より好ましくは、14~30ヌクレオチドの長さを有する。好ましい実施形態において、用語「正方向プライマー」は、本明細書で使用される場合、上記プライマーが、PCR反応において5'→3'方向に伸長され得、配列番号22もしくは配列番号1を含む核酸の合成を生じるように、病原体のゲノム中で配列番号22もしくは配列番号1の上流にハイブリダイズするプライマーに関する。

【0034】

好ましい実施形態において、上記正方向プライマーは、区別される病原体、好ましくは、*Trichophyton*属の種の中で十分に保存されている配列番号22もしくは配列番号1の上流にある病原体のゲノムの領域に特異的にハイブリダイズする、上記種の配列番号22もしくは配列番号1の可変性の部分がたとえ異なるとしても、1より多くの種の配列番号22もしくは配列番号1を増幅するために使用され得るという趣旨のユニバーサル正方向プライマーである。好ましい実施形態において、上記正方向プライマーは、*T. tonsurans*、*T. equinum*および*T. interdigitale* (ヒト好性+動物好性)、I、II、III、III*、IV、Mによって共有される保存された領域にハイブリダイズし、GGGAGGGAGACTAGTTGを含む配列またはその改変体を含む。別の好ましい実施形態において、上記正方向プライマーは、*T. benhamiae* (黄色)、*T. benhamiae* (白色)、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. concentricum*および*T. erinacei*によって共有される保存された領域に結合し、GCATTTCCCATGGCTを含む配列またはその改変体を含む。

【0035】

好ましい実施形態において、用語「逆方向プライマー」とは、本明細書で使用される場合、上記プライマーが、PCR反応において5'→3'方向に伸長され得、配列番号22もしくは配列番号1に相補的な配列を含む核酸の合成を生じるように、上記病原体のゲノム中の配列番号22もしくは配列番号1の下流に特異的にハイブリダイズするプライマーに関する。

【0036】

好ましい実施形態において、上記逆方向プライマーは、区別される病原体、好ましくは、*Trichophyton*属の種の中で十分に保存されている配列番号22もしくは配列番号1の下流にある病原体のゲノムの領域に特異的にハイブリダイズする、上記種の配列番号22もしくは配列番号1を含む配列または配列番号22もしくは配列番号1に相補的な配列がたとえ異なるとしても、1より多くの種の配列番号22もしくは配列番号1に相補的な配列を増幅するために使用され得るという趣旨の、ユニバーサル逆方向プライマーである。好ましい実施形態において、上記逆方向プライマーは、*T. tonsurans*、*T. equinum*および*T. interdigitale* (ヒト好性+動物好性)、I、II、III、III*、IV、Mによって共有される保存された領域にハイブリダイズし、AATTTTTCGCCGCCAAGを含む配列もしくはその改変体を含む。

別の好ましい実施形態において、上記逆方向プライマーは、*T. benhamiae* (黄色)、*T. benhamiae* (白色)、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. concentricum* および *T. erinacei* によって共有される保存された領域に結合し、TGGCTCTGTTACGTGを含む配列またはその改変体を含む。

【0037】

別の好ましい実施形態において、上記プライマー対は、1より多くのプライマー対、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、28、32、36、40もしくは48またはこれより多くのプライマー対を含む組成物中に存在し得る。好ましい実施形態において、上記組成物は、*T. tonsurans*、*T. equinum* および *T. interdigitalis* (ヒト好性+動物好性)、I、II、III、III*、IV、Mに由来する配列番号22もしくは配列番号1をコードする核酸を増幅するために使用され得るプライマー対、ならびに加えて、*T. benhamiae* (黄色)、*T. benhamiae* (白色)、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. concentricum* および *T. erinacei* に由来する配列番号22もしくは配列番号1をコードする核酸を増幅するために使用され得るプライマー対を含む。好ましい実施形態において、上記組成物は、上記プライマー対に、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体を区別するために使用され得る1もしくはこれより多くの配列、好ましくは、*Rezaii-Matehkolaei*ら (2014) *Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes*, *Medical Mycology* 42, 674)、転写伸長因子 (*Mirhendi*ら (2015), *Translation elongation factor 1-alpha gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes*, *Medical Mycology* 53, 215)、内部転写スペーサー領域 (*internal transcribed spacer region*) 1および2 (*Graeser*ら (2008), *The New Species Concept in Dermatophytes - a Polyphasic Approach*, *Mycopathologia* 166, 239) ならびにトポイソメラーゼもしくはその一部として言及される核酸配列を含む群より選択される配列を特異的にハイブリダイズすることによって、増幅または検出するために使用され得るプライマー対を含み得る。このようなプライマー組成物は、本発明に従って使用され得、*Rezaii-Matehkolaei*ら、転写伸長因子、内部転写スペーサー領域1および2、ならびにトポイソメラーゼもしくはその一部として言及される核酸配列を含む群より選択される配列に特異的にハイブリダイズし得る1種もしくはこれより多くの核酸を含むキャリアを使用して分析され得、任意のこのような配列の存在を検出するために使用され得る。

【0038】

正方向プライマーの、その5'-3'配向での最後の塩基対と配列番号22もしくは配列番号1の、その5'-3'配向での最初の塩基対との間の距離は、優先性が増大する順序において、10000塩基対、8000塩基対、6000塩基対、4000塩基対、2000塩基対、1000塩基対、800塩基対、600塩基対、400塩基対、200塩基対、100塩基対もしくはこれより少ない塩基対である。

【0039】

上記逆方向プライマーの、その5'-3'配向での最後の塩基対と、配列番号22もしくは配列番号1の、その5'-3'配向での最後の塩基対との間の距離は、優先性が増大する順序において、10000塩基対、8000塩基対、6000塩基対、4000塩基対、2000塩基対、1000塩基対、800塩基対、600塩基対、400塩基対、200塩基対、100塩基対もしくはこれより少ない塩基対である。

【0040】

本発明の教示は、本出願で、例えば、機能、名称、配列もしくはアクセッション番号に

10

20

30

40

50

よって明示的にまたは暗示的に言及される正確な配列を有する核酸を使用して行われ得るのみならず、このような核酸の改変体を使用しても行われ得る。好ましい実施形態において、核酸の用語「改変体」は、参照核酸もしくは野生型核酸と少なくとも70、より好ましくは、75、80、85、90、95、98、99もしくは99.5%の配列同一性を有し、好ましくは、参照核酸もしくは野生型核酸と同じ標的に特異的にハイブリダイズする能力を有する核酸、ならびに核酸の相補鎖が好ましくはストリンジेंटな条件下で、上記参照核酸もしくは野生型核酸にハイブリダイズするその核酸を含む。好ましい実施形態において、用語「特異的にハイブリダイズする」とは、本明細書で使用される場合、プライマーもしくはプローブのような核酸が、ストリンジेंटな条件下でその標的核酸にハイブリダイズすることを意味する。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーは、当業者によって容易に決定可能であり、一般に、プライマーもしくはプローブの長さ、反応温度および塩濃度に依存する経験的計算である。一般に、プライマーもしくはプローブが長いほど、適切なアニーリングのためのより高い温度に耐える一方で、プライマーもしくはプローブが短いほど、そのようにはならない。ハイブリダイゼーションは、一般に、1本鎖もしくは2本鎖のDNAが、それらの融解温度を下回る環境に存在する相補鎖に結合する能力に依存する。そのプローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望の相同性の程度が高いほど、使用され得る相対的温度は高くなる。結果として、相対的温度が高いほど、反応条件がよりストリンジेंटになりかつ非特異的結合に用心する傾向がある一方で、その温度が低いほど、その傾向は低くなる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーのさらなる詳細および説明に関しては、Ausubel, F. M. (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Incを参照のこと。さらに、当業者は、ハイブリダイゼーションによってDNA配列をどのように同定するかに関して、マニュアル、Boehringer Mannheim GmbH (1993) *The DIG System Users Guide for Filter Hybridization*, *Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany*およびLiebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1991) *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 255 - 260に示される指示に従い得る。好ましい実施形態において、ストリンジेंटな条件は、任意のハイブリダイゼーションに関して適用される。すなわち、ハイブリダイゼーションは、上記プライマーもしくはプローブが、標的配列と70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%またはこれより高く同一である場合にのみ起こる。上記標的配列に関して低い程度の同一性を有する核酸は、ハイブリダイズし得るが、このようなハイブリッドは、不安定であり、PCRのアニーリング工程またはプローブハイブリダイゼーション後の洗浄工程の間に除去される。ストリンジेंटな条件下でのプローブハイブリダイゼーションの洗浄工程において、例えば、塩濃度を2×SSCに低下させるか、または必要に応じておよびその後、0.25×SSCへと低下させ、その一方で温度は、優先性が増大する順序において、およそ39 ~ 69、およそ41 ~ 67、およそ43 ~ 65、およそ45 ~ 63、およそ47 ~ 61、およそ49 ~ 59、およそ51 ~ 57、およそ53 ~ 57である。特に好ましい実施形態において、上記温度は、およそ51 ~ 57またはおよそ53 ~ 57である。好ましい実施形態において、PCR反応において使用されるプライマー対は、検出可能な標識、好ましくは、蛍光標識、放射性標識、コロイド金標識または酵素的に活性な標識を含む群からの検出可能な標識を含む。より好ましくは、上記標識は、cy-3、cy-5、HEX、FAM、ROXおよびTAMRAを含む群から好ましくは選択される蛍光標識である。適切な標識、これら標識をプライマーのような核酸に連結し、このような標識を検出する方法は、当該分野の技術水準で記載されている。

【0041】

好ましい実施形態において、本発明のプライマー対の各プライマーおよび/もしくは本

10

20

30

40

50

発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 22、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的配列を増幅し得るかまたはこれら配列にハイブリダイズし得る配列を含むかまたはその配列からなるが、ただし上記プライマー対および/または上記プロープは、配列番号 6、配列番号 29、配列番号 30 に示される配列および/もしくはその相補的配列を増幅できないかまたはその配列にハイブリダイズできない。従って、いくつかの実施形態において、本発明のプロープは、配列番号 22 に示される配列もしくはその相補的な配列にハイブリダイズし得る配列を含むかまたはその配列からなるが、ただし上記プロープは、配列番号 6、配列番号 29、配列番号 30 に示される配列および/もしくはその相補的配列にハイブリダイズできない。代替の実施形態において、本発明のプロープは、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列にハイブリダイズし得る配列を含むかまたはその配列からなるが、ただし上記プロープは、配列番号 6、配列番号 29、配列番号 30 に示される配列および/もしくはその相補的な配列にハイブリダイズできない。ハイブリダイゼーションに関するストリンジントな条件は、上記で記載される。ヌクレオチドハイブリダイゼーションを測定するための方法は、当該分野で周知である。本発明のプライマー対および/もしくはプロープが配列番号 6、配列番号 29、配列番号 30 に示される配列および/もしくはその相補的な配列を増幅できないかまたはその配列にハイブリダイズできないという但し書きに関する実施形態において、上記配列は、その全体の長さにわたって、配列番号 6、配列番号 29、配列番号 30 に示される配列および/もしくはその相補的な配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくは 100% の配列同一性を有する。

【0042】

好ましい実施形態において、本発明のプライマー対の各プライマーおよび/もしくは本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 22、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列を増幅し得るかまたはその配列にハイブリダイズし得る配列を含むかまたはその配列からなり、ここで本発明のプライマー対の各プライマーおよび/もしくは本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 22、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにわたって、配列番号 22、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% もしくは 100% の配列同一性を有する。従って、いくつかの実施形態において、本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 22 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにわたって、配列番号 22 に示される配列もしくはその相補的な配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 22 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにわたって、配列番号 22 に示される配列もしくはその相補的な配列と少なくとも 95% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 2 2 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにならって、配列番号 2 2 に示される配列もしくはその相補的な配列と少なくとも 98% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 2 2 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにならって、配列番号 2 2 に示される配列もしくはその相補的な配列と 100% の配列同一性を有する。

10

【0043】

好ましい実施形態において、本発明のプロープは、検出可能なシグナル分子に融合される、250 個以下、200 個以下、150 個以下、100 個以下、90 個以下、80 個以下、70 個以下、65 個以下、60 個以下、55 個以下、50 個以下、45 個以下、40 個以下、35 個以下、30 個以下、25 個以下、もしくは 20 個以下のヌクレオチドの長さを有する。

20

【0044】

いくつかの実施形態において、本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにならって、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにならって、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列と少なくとも 95% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにならって、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列と少なくとも 98% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明のプロープのヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列のフラグメントである配列を含むかまたはその配列からなり、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、もしくは少なくとも 26 個の連続するヌクレオチドの長さにならって、配列番

30

40

50

号 1 に示される配列もしくはその相補的な配列と 1 0 0 % の配列同一性を有する。

【 0 0 4 5 】

本発明の他の好ましい実施形態において、本発明のプライマー対の各プライマーおよび本発明のプローブの上記の記載される特性は、組み合わせられる。すなわち、(1) 上記プライマー対および/もしくは上記プローブが、配列番号 6、配列番号 2 9、配列番号 3 0 に示される配列および/もしくはその相補的な配列を増幅できないかまたはその配列にハイブリダイズできないこと、(2) 本発明のプローブが、制限された長さを有すること、ならびに(3) 本発明のプライマー対の各プライマーおよび本発明のプローブが、配列番号 2 2 もしくはその相補的な配列のフラグメントを含み、ここで上記フラグメントは、少なくとも 5 個の連続するヌクレオチドの長さにならび、配列番号 2 2 に示される配列もしくはその相補的な配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有することが組み合わせられる。

10

【 0 0 4 6 】

本発明によれば、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 を含む核酸配列またはその相補鎖に特異的にハイブリダイズし得る核酸が、提供される。上記核酸は、単離された核酸であり得る。この核酸は、病原体に由来する配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 を含む核酸を検出するために、およびその配列を他の配列から区別するために、より具体的には、相同な配列を、配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 を含むこのような感染症と関連する他の病原体から区別するために、プローブとして使用され得る。従って、この核酸は、配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 を含む配列またはその相補的な配列に特異的にハイブリダイズし得る鎖を含む。好ましくは、このような病原体に由来する配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 を含む核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸は、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 4 ~ 2 8 およびこれらの改変体を含む群より選択される。

20

【 0 0 4 7 】

配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸は、好ましくは、キャリア上に固定化され得る。このようにして、配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 を含む病原体に由来する核酸にアニールされる場合に、上記核酸を、患者に由来するサンプル中の任意の他の核酸または他の物質から分離することは、より簡単である。上記キャリアは、配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 もしくはその改変体を含む核酸に特異的にハイブリダイズし得る核酸、より好ましくは、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 4 ~ 2 8 およびそれらの改変体を含む群より選択される配列を含む核酸でキャリアを被覆することによって作製され得る。好ましい実施形態において、上記キャリアは、マイクロアレイプレートである。適切なマイクロアレイ、これらの調製法および使用法は、当該分野の技術水準において、例えば、Mueller, H. J. & Roeder, T. (2004) *Der Experimentator - Microarrays*, Elsevier/Spektrum, 第 3 章および第 4 章において記載される。

30

【 0 0 4 8 】

本発明によれば、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 を含む核酸を、サンプル中で検出する工程を包含する方法が、提供される。好ましい実施形態において、用語「検出する」とは、本明細書で使用される場合、配列番号 2 2 もしくは配列番号 1 またはその改変体の存在または非存在を検出することを意味する。より好ましい実施形態において、上記用語は、存在する核酸が、*Trichophyton* 属の、ならびにより好ましくは、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (白色)、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum*、*T. erinacei* (アフリカ)、*T. erinacei* および *T. concentricum* を含む群の 1 種もしくはこれより多くの病原体に由来する配列番号 2 2

40

50

もしくは配列番号 1 を含むか否か、ならびに必要に応じて、これらの病原体の配列のうちのどれが存在するのかを決定することを意味する。最も好ましい実施形態において、上記用語は、サンプル中に存在する核酸が、*T. benhamiae* (黄色) もしくは *T. concentricum* に由来するか否かを決定する、従って、その両方の生物を区別することを意味する。別の好ましい実施形態において、上記検出は、半定量的検出であってもよいし、定量的検出であってもよい。具体的配列を検出するために使用され得る方法は、当該分野の技術水準において、例えば、Lottspeich, F. & Engels, J. W. (2012), *Bioanalytik, Springer Spektrum*, 第 3 版に記載される。好ましい実施形態において、上記方法は、マイクロアレイ、核酸配列決定、質量分析法および PCR、より好ましくはリアルタイム PCR を含む群より選択される。別の好ましい実施形態において、皮膚、毛および爪の感染症と関連する上記病原体は、配列番号 22 もしくは配列番号 1 によって部分的にコードされるポリペプチドを同定することによって検出される。当業者は、適切な方法、好ましくはイムノアッセイおよび質量分析法を含む群より選択される適切な方法に精通している。抗体は、配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む核酸配列間の差異を、当該分野の技術水準、例えば、Lottspeich, F. & Engels, J. W. (2012), *Bioanalytik*, 第 6 章に記載される標準的方法を使用してタンパク質レベルで区別するために生成され得る。

10

【0049】

本発明に従う方法は、サンプル中で、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸に加えて、1 種もしくはこれより多くのさらなる核酸配列を検出する工程を必要に応じて包含し得る。このような配列は、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する別の配列番号 22 もしくは配列番号 1 であり得る。例えば、上記方法は、*T. tonsurans*、*T. equinum* および *T. interdigitale* (ヒト好性 + 動物好性)、I、II、III、III*、IV、M を含む群の病原体に由来する配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む第 1 の核酸、ならびに *T. benhamiae* (黄色)、*T. benhamiae* (白色)、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. concentricum* および *T. erinacei* を含む群の病原体に由来する別の配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む第 2 の核酸を検出する工程を包含し得る。このようなさらなる配列は、好ましくは、皮膚、毛および爪の疾患と関連する病原体に由来するメタロプロテアーゼをコードする配列とともに、同時に検出される。好ましい実施形態において、多重 PCR 反応は、検出される配列を増幅するために行われ、そして必要に応じて、これに続いて、マイクロアレイ分析が、好ましくは、メタロプロテアーゼをコードする配列の配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含むアンプリコンおよびそのさらなる配列のうちの 1 つを含む任意のアンプリコンの蛍光検出を使用して、行われ得る。

20

30

【0050】

好ましい実施形態において、上記方法は、a) サンプル、好ましくは患者に由来するサンプルを提供する工程を包含し得る。本発明に従う方法もしくは試薬を使用して試験されるサンプルは、皮膚、毛および爪の感染症に罹患していると疑われる患者から得られてもよく、好ましくは、ケラチンを含む患者の身体の部分に由来するサンプルである。より好ましい実施形態において、上記サンプルは、爪、毛もしくは皮膚のサンプルであり、より好ましくは、単離されたサンプルである。上記患者は、好ましくは、哺乳動物患者、より好ましくはヒトである。あるいは、上記サンプルは、環境サンプル、例えば、土壌またはスイミングプールもしくは病院のような潜在的に汚染されている領域の床に由来する環境サンプルであり得る。さらなる分析の前に、上記サンプルは、例えば、存在する任意の核酸を抽出することによって加工処理され得る。好ましい実施形態において、用語「抽出する」とは、本明細書で使用される場合、例えば、増幅および/または検出に干渉し得るいかなる汚染物質をも除去するために、核酸がサンプルから精製されるおよび/または濃縮されることを意味する。好ましい実施形態において、上記核酸は、DNA または RNA であり、より好ましくは DNA である。好ましくは病原体を検出するために、より好ましく

40

50

は真菌病原体を検出するために核酸を抽出するための方法および試薬は、市販されている。検出するために、上記サンプルを直接、または抽出された核酸を使用することは可能であるが、上記方法が、b) 配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む任意の核酸、ならびに必要なに応じて任意のさらなる配列を増幅し、そのようにして、1 種もしくはこれより多くのアンプリコンを生成する工程を包含することは、好ましい。このような増幅は、PCR によって行われ得る。適切な方法および試薬は、当該分野の技術水準において、例えば、Dennis, Y. M., Chius, R. W. K., and Allen Chan, K. C. (2006) *Clinical applications of PCR*, Humana Press, 第 1 章に記載される。本質的には、上記サンプルまたは上記抽出される核酸は、本発明に従う少なくとも 1 つのプライマー対、および必要に応じてさらなるプライマー対と接触させられ、続いて、PCR 緩衝液中の NTP および二価カチオンのような必要とされる任意の試薬の存在下で、上記核酸を増幅し得るポリメラーゼが添加される。その得られた反応混合物は、数回の増幅サイクルに供され、各々のサイクルは、上記核酸の 2 つの相補鎖を分離する工程を包含する変性工程、上記プライマーが上記核酸鎖にハイブリダイズすることが認められるアニーリング工程、および上記核酸の両方の鎖に対する相補鎖の生成を包含する伸長反応を含む。結果として、プライマー対および上記プライマー対の正方向プライマーと逆方向プライマーとの間に位置した病原体のゲノム核酸に由来する配列を含む 2 本鎖アンプリコンが、生成される。上記アンプリコンは、上記サンプル中の核酸の濃度を超える濃度で、好ましくは、優先性が増大する順序において、10 倍、10² 倍、10³ 倍、10⁴ 倍もしくは 10⁵ 倍より高い濃度で存在する。PCR 増幅およびさらなる配列を含むアンプリコンの生成のためのいくつかの反応が、行われ得る。上記正方向プライマーおよび/または逆方向プライマーは、標識され得、標識されたアンプリコンを生じ得る。

【0051】

好ましい実施形態において、PCR 反応において使用されるプライマー対は、検出可能な標識、好ましくは、蛍光標識、放射性標識、コロイド金標識または酵素的に活性な標識を含む群の検出可能な標識を含む。より好ましくは、上記標識は、好ましくは、cy-3、cy-5、HEX、FAM、ROX および TAMRA を含む群より選択される蛍光標識である。適切な標識、このような標識をプライマーのような核酸に連結し、そして検出する方法は、当該分野の技術水準において記載されている。

【0052】

その後または工程 b) が行われるのと同時に、好ましくは、蛍光、放射能、コロイド金または化学発光によって、任意のアンプリコンが標識され得る。好ましい実施形態において、上記標識は、工程 b) を行う前に、例えば、蛍光標識、放射性標識、酵素的に活性な標識、もしくは化学発光標識が、上記プライマー対のうち的一方もしくは両方のプライマーに付着される場合に、上記プライマーに連結され得る。別の好ましい実施形態において、上記アンプリコンは、増幅反応が進行するにつれて、例えば、標識された NTP の組み込みまたは並行する標識反応によって、標識され得る。別の好ましい実施形態において、上記アンプリコンは、工程 b) の後に、例えば、上記アンプリコンに、蛍光標識、放射性標識、酵素的に活性な標識、もしくは化学発光標識を付着させることによって、または上記アンプリコンに、2 本鎖 DNA に結合する標識 (例えば、臭化エチジウムもしくは臭化プロピジウムのような蛍光性挿入剤) を付加することによって、標識され得る。

【0053】

その後もしくは工程 b) が行われると同時に、上記アンプリコンまたは複数のアンプリコンが検出され得る。例えば、上記 PCR は、反応が進行するにつれて連続蛍光検出を伴うリアルタイム PCR であり得る。上記アンプリコンが後に検出されるべき場合には、上記アンプリコンは、工程 c) の前に、PCR 反応混合物から抽出され得る。その後の検出のために、上記アンプリコンは、抽出されてもされなくても、特異的ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む病原体に由来する核酸に特異的にハイブリダイズし得る核酸、好ましくは、配列番号 14、配列番号 15、配

10

20

30

40

50

列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 24～28 およびそれらの改変体を含む群の配列を含む核酸と接触させられ得る。配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む核酸は、好ましくは、キャリア上に固定化される。それは、上記検出を行う前に、汚染物質を除去するために洗浄工程に供され得る。このような状況において、上記アンプリコンが標識され、存在する標識されたアンプリコンが配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む核酸に特異的にハイブリダイズされる場合に上記標識が検出されることは、好ましい。

【0054】

好ましくは、上記検出は、皮膚、毛および爪の疾患と関連する病原体に由来する配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含むアンプリコンが、皮膚、毛および爪の疾患と関連する別の病原体に由来する配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含むアンプリコン、またはさらなるもしくは実際には任意の他の配列を含むアンプリコンから区別され得るように、行われる。

10

【0055】

本発明によれば、上記プライマー対、上記核酸および/または上記キャリアを含むキットが、提供され得る。上記プライマー対または上記核酸は、標識され得る。本発明の教示は、キット、好ましくは、疾患を診断するためのキットを提供する。上記キットは、上記キットの使用方法を詳述する指示および病原体に由来する配列番号 22 もしくは配列番号 1 に特異的にハイブリダイズし得る核酸と、被験体（好ましくは、ヒト被験体）に由来するサンプルとを、キャリア（例えば、マイクロアレイ）上で接触させるための手段を含み得る。さらに、上記キットは、陽性コントロール、例えば、皮膚、毛および爪の疾患と関連する病原体に由来する配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む 1 種もしくはこれより多くの核酸、ならびに陰性コントロール、例えば、配列番号 22 もしくは配列番号 1 を欠いている核酸を含み得る。最後に、このようなキットは、較正曲線を調製するために、皮膚、毛および爪の疾患と関連する病原体に由来する配列番号 22 もしくは配列番号 1 を含む 1 種もしくはこれより多くの核酸を含む標準溶液を含み得る。好ましい実施形態において、上記配列番号 22 もしくは配列番号 1 は、*Microsporium* 属および *Trichophyton* 属の病原体、より好ましくは *T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae*（白色）、*T. benhamiae*（アフリカ）、*T. benhamiae*（黄色）、*T. concentricum*、*T. erinacei*（アフリカ）および *T. erinacei* を含む群の病原体に由来する。

20

30

【0056】

本発明によれば、上記プライマー対、キャリア、核酸、細胞、ベクターもしくはキットは、疾患、好ましくは、皮膚、毛および爪の疾患、より好ましくは、皮膚、毛および爪の感染症、より好ましくは真菌による皮膚、毛および爪の感染症、最も好ましくは、皮膚糸状菌症の診断のために、またはその疾患の診断のためのキットの製造のために、使用され得る。好ましくは、上記疾患は、*Trichophyton* 属の病原体、より好ましくは、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae*（白色）、*T. benhamiae*（アフリカ）、*T. benhamiae*（黄色）、*T. concentricum*、*T. erinacei*（アフリカ）および *T. erinacei* を含む群の病原体と関連する感染症である。

40

【0057】

好ましい実施形態において、用語「診断」とは、本明細書で使用される場合、患者がある特定の疾患もしくは障害に罹患しているか、または過去に、診断時にもしくは将来的に、罹患する可能性があるか、または平均的被験体もしくは比較上の被験体（この比較上の被験体は、好ましくは、類似の症状を有する）より罹患する可能性があるかの評価の裏付けとなる情報を得ること、上記疾患がどのように進行しつつあるかもしくは将来的に進行していく可能性があるかを発見すること、またはある特定の処置（例えば、アレルギー患者の減感作のための薬物のような適切な薬物の投与）に関して患者の応答性を評価するこ

50

とを目的とした何らかの種の手順をいう。言い換えると、用語「診断」は、診断することのみならず、予後を予測することおよび/または疾患もしくは障害の経過をモニターすることをも包含する。

【0058】

従って、用語「診断」は、好ましくは、本発明に従う診断法もしくは診断薬剤が、単一の試験、ましてやパラメーターに基づいて最終診断を下すために決定的かつ十分であることを意味するのではなく、「鑑別診断」（すなわち、診断パラメーターのある範囲に基づいて、考えられる条件の範囲の可能性を考慮する体系的診断手順）といわれるものへの寄与に言及し得る。これは、間接的診断（すなわち、陰性の結果は、1つの疾患が除外され得るが、翻って、別の疾患が存在する可能性がより高いことを意味する）を含み得る。用語「診断」はまた、患者にとって最も有望な処置レジメンを選択するために使用される方法または薬剤に言及し得る。言い換えると、上記方法または薬剤は、被験体のための処置レジメンを選択することに関連し得る。用語「診断」は、疾患の原因となる病原体の同定または2種の密接に関連する病原体（好ましくは、*T. benhamiae*（黄色）または*T. concentricum*）の区別にも言及し得る。

10

【0059】

本発明は、以下の非限定的な図面、配列、および例示によってさらに例証され、これらから、本発明のさらなる特徴、実施形態、局面および利点が理解され得る。

【0060】

摘要

本発明は、配列番号22を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸を増幅するための、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを含むプライマー対、配列番号22を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸、上記核酸を含むキャリア、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する、配列番号22を含む核酸配列をサンプル中で検出する工程を包含する方法、疾患の診断のための上記プライマー対、上記核酸または上記キャリアの使用、ならびに疾患の診断のための上記プライマー対、上記核酸および/または上記キャリアを含むキットに関する。

20

【0061】

本発明の実施形態において、例えば、以下の項目が提供される。

30

(項目A1)

配列番号22を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸を増幅し得る、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを含むプライマー対。

(項目A2)

配列番号22もしくはその相補鎖を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸、または前記核酸配列を含むベクターもしくは細胞。

(項目A3)

項目A1に記載のプライマー対と、正方向プライマーと逆方向プライマーとの間にある核酸配列であって、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する前記核酸配列は、前記正方向プライマーの配列と前記逆方向プライマーの配列との間にある前記病原体のゲノムの中に位置し、好ましくは、前記病原体を含むサンプルを、前記項目のいずれかに記載のプライマーを使用して増幅することによって得られる、核酸配列とを含む核酸。

40

(項目A4)

検出可能な標識、好ましくは、蛍光標識、放射性標識、コロイド金標識または酵素的に活性な標識を含む群からの検出可能な標識を含む、前記項目のいずれかに記載のプライマー対または前記項目のいずれかに記載の核酸。

(項目A5)

前記項目のいずれかに記載の核酸を含むキャリア。

(項目A6)

50

前記キャリアは、シラン被覆ガラス、プラスチックまたはシリコン材料のマイクロアレイプレートである、前記項目のいずれかに記載のキャリア。

(項目 A 7)

皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号 2 2 を含む核酸配列をサンプル中で検出する工程を包含する方法。

(項目 A 8)

a) 患者に由来するサンプル、好ましくは、爪、毛もしくは皮膚材料を提供する工程

b) 前記サンプル中に存在する配列番号 2 2 を含む任意の核酸を、項目 A 1 または 4 のいずれかに記載のプライマー対を使用して増幅し、そのようにして、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号 2 2 を含む核酸配列が前記サンプル中に存在する場合に、アンプリコンを生成する工程を包含する、前記項目のいずれかに記載の方法。

10

(項目 A 9)

c) 前記アンプリコンを検出する工程をさらに包含する、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 A 10)

前記アンプリコンは、蛍光、放射能、コロイド金、または化学発光によって検出される、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 A 11)

疾患、好ましくは、病原体と関連する皮膚、毛および爪の感染症の診断のための、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、前記項目のいずれかに記載の核酸、または前記項目のいずれかに記載のキャリアの使用。

20

(項目 A 12)

前記項目のいずれかに記載のプライマー対、前記項目のいずれかに記載の核酸および/または前記項目のいずれかに記載のキャリアを含むキットであって、好ましくは、疾患、より好ましくは、病原体と関連する皮膚、毛および爪の感染症の診断のためのキット。

(項目 A 13)

疾患、好ましくは、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体、より好ましくは、配列番号 2 2 を含む核酸を有する皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体の診断のためのキットを製造するための、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、前記項目のいずれかに記載の核酸または前記項目のいずれかに記載のキャリアの使用。

30

(項目 A 14)

真菌、好ましくは、*Trichophyton* 属の真菌、より好ましくは *T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum* および *T. erinacei* を含む群の真菌の同定のための、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、核酸、キャリア、キットの使用。

(項目 A 15)

前記病原体は *Trichophyton* 属に由来する、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、核酸、キャリア、方法、使用またはキット。

40

(項目 A 16)

前記病原体は、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum* および *T. erinacei* を含む群に由来する、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、核酸、キャリア、方法、使用またはキット。

(項目 B 1)

配列番号 2 2 を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する核酸を増幅し得る、正方向プライマーおよび逆方向プライマーを含むプライマー対。

(項目 B 2)

配列番号 2 2 もしくはその相補鎖を含む皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に

50

由来する核酸配列に特異的にハイブリダイズし得る核酸、または前記核酸配列を含むベクターもしくは細胞。

(項目 B 3)

前記項目のいずれかに記載のプライマー対と、正方向プライマーと逆方向プライマーとの間にある核酸配列であって、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する前記核酸配列は、前記正方向プライマーの配列と前記逆方向プライマーの配列との間にある前記病原体のゲノムの中に位置し、好ましくは、前記病原体を含むサンプルを、前記項目のいずれかに記載のプライマーを使用して増幅することによって得られる、核酸配列とを含む核酸。

(項目 B 4)

検出可能な標識、好ましくは、蛍光標識、放射性標識、コロイド金標識または酵素的に活性な標識を含む群からの検出可能な標識を含む、前記項目のいずれかに記載のプライマー対または前記項目のいずれかに記載の核酸。

(項目 B 5)

前記項目のいずれかに記載の核酸を含むキャリア。

(項目 B 6)

前記キャリアは、シラン被覆ガラス、プラスチックまたはシリコン材料のマイクロアレイプレートである、前記項目のいずれかに記載のキャリア。

(項目 B 7)

皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号 2 2 を含む核酸配列を単離されたサンプル中で検出する工程を包含する方法。

(項目 B 8)

患者から単離されたサンプル中、好ましくは、爪、毛もしくは皮膚材料中に存在する配列番号 2 2 を含む任意の核酸を、項目 B 1 または 4 のいずれかに記載のプライマー対を使用して増幅し、そのようにして、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体に由来する配列番号 2 2 を含む核酸配列が前記サンプル中に存在する場合に、アンプリコンを生成する工程

を包含する、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 B 9)

前記アンプリコンを検出する工程をさらに包含する、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 B 10)

前記アンプリコンは、蛍光、放射能、コロイド金、または化学発光によって検出される、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 B 11)

疾患、好ましくは、病原体と関連する皮膚、毛および爪の感染症の診断のための、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、前記項目のいずれかに記載の核酸、または前記項目のいずれかに記載のキャリアを含む組成物。

(項目 B 12)

前記項目のいずれかに記載のプライマー対、前記項目のいずれかに記載の核酸および/または前記項目のいずれかに記載のキャリアを含むキットであって、好ましくは、疾患、より好ましくは、病原体と関連する皮膚、毛および爪の感染症の診断のためのキット。

(項目 B 13)

疾患、好ましくは、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体、より好ましくは、配列番号 2 2 を含む核酸を有する皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体の診断のためのキットを製造するための、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、前記項目のいずれかに記載の核酸または前記項目のいずれかに記載のキャリアの使用。

(項目 B 14)

疾患、好ましくは、皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体、より好ましくは、配列番号 2 2 を含む核酸を有する皮膚、毛および爪の感染症と関連する病原体の診断のための、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、前記項目のいずれかに記載の核酸または

10

20

30

40

50

前記項目のいずれかに記載のキャリアを含むキット。

(項目 B 1 5)

真菌、好ましくは、*Trichophyton*属の真菌、より好ましくは *T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum* および *T. erinacei* を含む群の真菌の同定のための、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、核酸もしくはキャリアを含む組成物、または前記項目のいずれかに記載のキット。

(項目 B 1 6)

前記病原体は *Trichophyton* 属に由来する、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、核酸、キャリア、組成物またはキット。

10

(項目 B 1 7)

前記病原体は、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum* および *T. erinacei* を含む群に由来する、前記項目のいずれかに記載のプライマー対、核酸、キャリア、組成物またはキット。

(項目 B 1 8)

前記病原体は *Trichophyton* 属に由来する、前記項目のいずれかのいずれかに記載の方法または使用。

(項目 B 1 9)

20

前記病原体は、*T. tonsurans*、*T. equinum*、*T. interdigitale*、*T. benhamiae* (アフリカ)、*T. benhamiae* (黄色)、*T. concentricum* および *T. erinacei* を含む群に由来する、前記項目のいずれかに記載の方法または使用。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】図1は、メタロプロテアーゼに関連する種々の配列と、共有される核酸配列モチーフおよび導かれるコンセンサス配列とを含む配列アラインメントを示す。

【0063】

【図2-1】図2は、*Trichophyton interdigitale* (ヒト好性) (A)、*Trichophyton interdigitale* (動物好性) (B)、*Trichophyton tonsurans* (C) および *Trichophyton equinum* (D) のテンプレートからハイブリダイズしたPCR生成物での捕捉マイクロアレイを示す。*Trichophyton tonsurans* の特異的プローブは、白丸によって強調され、点線で囲まれたスポットは、グリッドを設定するためにソフトウェアから必要とされるコントロールである。*Trichophyton tonsurans* テンプレート (C) からのPCR生成物のみが、その特異的プローブ (6a、6b) にハイブリダイズし、蛍光シグナルを示した。

30

【図2-2】図2は、*Trichophyton interdigitale* (ヒト好性) (A)、*Trichophyton interdigitale* (動物好性) (B)、*Trichophyton tonsurans* (C) および *Trichophyton equinum* (D) のテンプレートからハイブリダイズしたPCR生成物での捕捉マイクロアレイを示す。*Trichophyton tonsurans* の特異的プローブは、白丸によって強調され、点線で囲まれたスポットは、グリッドを設定するためにソフトウェアから必要とされるコントロールである。*Trichophyton tonsurans* テンプレート (C) からのPCR生成物のみが、その特異的プローブ (6a、6b) にハイブリダイズし、蛍光シグナルを示した。

40

【0064】

【図3】図3は、*Trichophyton benhamiae* (黄色) (A)、*Trichophyton benhamiae* (白色) (B)、*Trichophyton*

50

benhamiae (アフリカ) (C) および *Trichophyton concentricum* (D) のテンプレートからハイブリダイズした PCR 生成物での捕捉マイクロアレイを示す。 *Trichophyton benhamiae* (黄色) および *Trichophyton concentricum* の特異的プローブは、白丸によって強調され、点線で囲まれたスポットは、グリッドを設定するためにソフトウェアから必要とされるコントロールである。 *Trichophyton benhamiae* (黄色) (A) および *Trichophyton concentricum* (D) のテンプレートからの PCR 生成物のみが、その特異的プローブにハイブリダイズし、蛍光シグナルを示した。

【0065】

10

【図4】図4は、 *Trichophyton benhamiae* (白色) (A)、 *Trichophyton benhamiae* (黄色) (B) および *Trichophyton benhamiae* (アフリカ) (C) のテンプレートからハイブリダイズした PCR 生成物での捕捉マイクロアレイを示す。 *Trichophyton benhamiae* (黄色) および *Trichophyton benhamiae* (白色/アフリカ) の特異的プローブは、白丸によって強調され、点線で囲まれたスポットは、グリッドを設定するためにソフトウェアから必要とされるコントロールである。 *Trichophyton benhamiae* (白色) (A)、 *Trichophyton benhamiae* (黄色) (B) および *Trichophyton benhamiae* (黄色) (C) のテンプレートからの PCR 生成物が、その特異的プローブにハイブリダイズし、蛍光シグナルを示した。

20

【0066】

【図5】図5は、 *Trichophyton erinacei* (A)、 *Trichophyton benhamiae* (白色) (B) および *Trichophyton benhamiae* (アフリカ) (C) のテンプレートからハイブリダイズした PCR 生成物での捕捉マイクロアレイを示す。 *Trichophyton erinacei* の特異的プローブは、白丸によって強調され、点線で囲まれたスポットは、グリッドを設定するためにソフトウェアから必要とされるコントロールである。 *Trichophyton erinacei* (A) のテンプレートからの PCR 生成物のみが、その特異的プローブにハイブリダイズし、蛍光シグナルを示した。

30

【0067】

【図6】図6は、 *Trichophyton benhamiae* (白色) (A)、 *Trichophyton benhamiae* (黄色) (B) および *Trichophyton concentricum* (C) のテンプレートからハイブリダイズした PCR 生成物での捕捉マイクロアレイを示す。 *Trichophyton benhamiae* (白色/アフリカ)、 *Trichophyton benhamiae* (黄色) および *Trichophyton concentricum* の特異的プローブは、白丸によって強調され、点線で囲まれたスポットは、グリッドを設定するためにソフトウェアから必要とされるコントロールである。 *Trichophyton benhamiae* (白色)、 *Trichophyton benhamiae* (黄色) および *Trichophyton concentricum* のテンプレートからの PCR 生成物のみが、その特異的プローブにハイブリダイズし、蛍光シグナルを示した。

40

【発明を実施するための形態】

【0068】

本発明は、以下の核酸配列に関する (5' - 3' 配向で示される) :

配列番号 1 :

増幅されるメタロプロテアーゼ関連核酸のコンセンサス配列

【化 1】

CACNNNNNTAACCNTACCCnnnnTCCnnGnnGnnnGGnnnnnnAnCnnnTGGATTATGGnnTn
nTTCGTGGAnTAnGGTnnnnAnnCGATCnTGnnnATGGCACTnnTnGGTnnnnTnGnCAnnTn
 CCAAAAGnnGnnGCAGGGnnnnACCnnnTTnnnnnnTGGnAnGGTGTAGGCAATnnTTnTnGnG
 nCnnCATCGnnGAnGnnnATCGnnGnAGnA

配列番号 2 :

T. tonsurans に由来するメタロプロテアーゼに関連する標的配列

【化 2】

CACGCTTATAACCGTACCCGAGATCCCTTGCGGTACGGATGCATAACGGCTGGATTATGG
 GCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGCGATCTTGATGATGGCACTTATCGGTGAGATG
 AGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGCAGGGGAAGACCGAATTCATGGCTGGGAGGGTGTAG
 GCAATAGTTCTGGGACGGCATCGTCGATGTTTATCGTAGCAGAACCACTGAACAGGGC
 CACCCTCTGAAACGGATGCTTTGGAAATCGAGTAGAGATGCATGGAAACCTCCTTCCTG
 GTTGCAGAATC

10

配列番号 3 :

T. equinum に由来するメタロプロテアーゼに関連する標的配列

【化 3】

CACGCTCATAACCGTACCCGAGATCCCTTGCGGTGCGGACGCATAACGGCTGGATTATG
 GGCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGCGATCTTGATGATGGCACTTATCGGTGAGAT
 GAGGCAGTTGCCAAAAGATGTAGCAGGGGAAGACCGAATTCATGGCTGGGAGGGTGT
 A
 GGCAATAGTTCTGGGACGGCATCGTCGATGTTTATCGTAGCAGAACCACTGAACAGGG
 CCACCCTCTGAAACGGATGCTTTGGAAATCGAGTAGAGATGCATGGAAACCTCCTTCCT
 GGTGCGAGAATC

20

配列番号 4 :

T. interdigitale (ヒト好性 + 動物好性)、I、II、III、III*
 、IV、M に由来するメタロプロテアーゼに関連する標的配列

【化 4】

CACGGTAATAACCGTACCCGAGGTCCCCGGCGTGCGGACTCATAACGGCTGGATTATG
 GGCTCCTTCGTGGATTATGGTCGAGACGCGATCTTGACCATGGCACTTCTTGGTGGAGAT
 GGGGCAGTTGCCAAAAGATGTCGCAGGGAAAGACCGAATTCATGGCTGGGAGGGTGT
 A
 GGCAATAGTTCTGCGACGGCATCGTCGATGTTTATCGTGGCAGAACCACTAACAGGGC
 CACCCTCTGAAACGGATGCTTTGGAAATCGAGTTGAGATGCGCGGAAACCTCCTTCCTG
 GTTGCAGGATC

30

配列番号 5 :

T. benhamiae (黄色) に由来するメタロプロテアーゼに関連する標的配列

【化 5】

CTCCGGTGAGAGAGTGCAATTGCACGATCGTAACCGTACCCCAAGTCCTTGCAGAACG
 GTGTAACAACCCCTTGGATTATGGAGTAATTCGTGGATTATGGTGTGACACGATCCTGG
 CCATGGCACTTATTGTTTGGTGGGGCAGTTGCCAAAAGATGGAGCAGGGGAAGACCG
 AGTTCTCGCCTGGAAGGGTGTAGGCAATGATTTTGGGCCTACATCGGTGACGTGCATC
 GGAGCAGTAC

40

配列番号 6 :

T. benhamiae (白色) に由来するメタロプロテアーゼに関連する標的配列

50

【化 6】

CTCTGGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGATTGTAACCATACCCATGGTCCTTGCAGTGCG
GTGTGACAGCATTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGATTACGGTCCCGACACGATCCTGA
 CGATGGCACTCATTGGTGCGGTGGGGCAGTTGCCAAAAGAGGGAGCAGGGGTGAACC
 TCATTCCTAGCTGGAAAGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACTGCATCGGCGAGGACCAT
 CGGAGCAGAAC

配列番号 7 :

T . b e n h a m i a e (アフリカ) に由来するメタロプロテアーゼに関連する標的配列

【化 7】

CTCTTGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGCTGATAACCGTACCCATGGTCCTTGCAGTGCG
GCTTGACAACACTTGGATTATGGGCTCCTTCGTGGACTACGGTCCCGATACGATCCTGA
 CGATGGCACTTATTGGTGCGGTGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTGCGAGGGGTGAACCT
 CATTCTAGATGGAAAGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACCGCATCGGCGAGGACCATC
 GGAGCAGAAC

10

配列番号 8 :

T . c o n c e n t r i c u m に由来するメタロプロテアーゼに関連する標的配列

【化 8】

CTCCGGTGAGAGAGTGCAGTTGCACGATTGTAACCGTACCCCAAGTCCTTGCAGAACG
 GTGTAACAACACTTGGATTATGGAGTAATTCGTGGATTATGGTGTGACACGATCCTGG
 CCATGGCACTTATTGGTTTGGTGGGGCAGTTGCCAAAAGTTGGGGCAGGGGAAGACCG
 AGTTCTCGCCTGGAAGGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGCCTACATCGGTGACGTGCATC
 GGAGTAGTAC

20

配列番号 9 :

T . e r i n a c e i に由来するメタロプロテアーゼに関連する標的配列

【化 9】

CTCCCGTGAGAGAGTGCAGTTGCACTACTGTAACCGTACCCATGGTCCTTGCAGTGTG
GGTTAGCAACATTTGGATTATGGAGTGCTTCGTGGATTACGGTCCCAACACGATCCTGA
 CCATGGCACTTCTTGGTTTTGTGCGCCATATTCCAAAAGATGGGGCAGGGGTGAACCTC
 ATTGTTAGATGGAAGGGTGTAGGCAATGGTTCTGGGACCGCATCGGCGAGGACCATCG
 GAGCAGTA

30

配列番号 10 :

ユニバーサル正方向プライマー (Trichophyton tonsurans、Trichophyton equinum、Trichophyton interdigitale (ヒト好性 + 動物好性) I、II、III、III*、IV、M) :

GGGAGGGAGACTAGTTG

配列番号 11 :

ユニバーサル正方向プライマー (Trichophyton benhamiae (黄色)、Trichophyton benhamiae (白色)、Trichophyton benhamiae (アフリカ)、Trichophyton concentricum、Trichophyton erinacei)

GCAATTCCTCATGGCT

配列番号 12 :

ユニバーサル逆方向プライマー (Trichophyton tonsurans、Trichophyton equinum、Trichophyton interdigitale (ヒト好性 + 動物好性) I、II、III、III*、IV、M)

AATTTTTCGCCGCCAAG

40

50

配列番号 13 :

ユニバーサル逆方向プライマー (*Trichophyton benhamiae* (黄色)
)、*Trichophyton benhamiae* (白色)、*Trichophyton benhamiae* (アフリカ)、*Trichophyton concentricum*、*Trichophyton erinacei*)
TGGCTCTGTTACGTG

配列番号 14 :

Trichophyton tonsurans プローブ
GATCCTTGGCGTACGGATGCATA

配列番号 15 :

Trichophyton equinum プローブ
AGATCCCTGGCGTGCG

10

配列番号 16 :

Trichophyton interdigitale (ヒト好性 + 動物好性) I、II、III、III*、IV、M プローブ
GAGATGCGCGGAAACCTC

配列番号 17 :

Trichophyton benhamiae (黄色) プローブ
GTGTAGGCAATGATTTTGGGCTACAT

配列番号 18 :

Trichophyton benhamiae (白色) プローブ
TGCAGTGCGGTGTGACAGCATTTGG

20

配列番号 19 :

Trichophyton benhamiae (アフリカ) プローブ
CAGTGC GGCTTGACAACAC

配列番号 20 :

Trichophyton concentricum プローブ
AAAGTTGGGGCAGGGGAAGA

配列番号 21 :

Trichophyton erinacei プローブ
TTGCAGTGTGGGTTAGCAACATTTG

30

配列番号 22 :

コンセンサス配列

c a c n n n n n t a a c c n t a c c c n n n n t c c n n g n n g n n n g g n n n
n n n a n c n n n t g g a t t a t g g n n t n n t t c g t g g a n t a n g g t n
n n n a n n c g a t c n t g n n n a t g g c a c t n n t n g g t n n n n t g n n
n c a n n t n c c a a a a g n n g n n g c a g g g n n n n a c c n n n t t n n n
n n n t g g n a n g g t g t a g g c a a t n n t t n t g n n n c n n c a t c g n
n g a n g n n n a t c g n n g n a g n a

配列番号 23 :

プライマー
c t g g c c a t g g c a c t t a t t g g

40

配列番号 24 :

プローブ
g a t g t a g g c c c a a a a t c a t t g c c t a c a c

配列番号 25 :

プローブ
c t g c c c c a a c t t t t g g c a a c t g

配列番号 26 :

プローブ

50

t a g g c a a t g a t t t t g g g c c t a

配列番号 27 :

プローブ

c a t c g g c g a g g a c c a t c g g a

配列番号 28 :

プローブ

g c a a t g g t t c t g g g c c t a c a t c

配列番号 29 :

T . r u b r u m に由来する配列

c t t t t g t g a g a g a g t c c a g t t g c a c g c c t g t a a c c g t a c c
c g a a g t c c t t g c a g t a c g g t t t g g c c a c a t t t g g a t t a t g
g a g t g c t t c g t g g a c t a t a g t g g t g a c a c g a t c c t g a c c a
t g g c a c t t a t t g g t c c a g t g g g g t a g t t g c c a a a a g g g g c
c g c a g g g g a a g a c c g c a t t c t g a a t t g g a a g a g t g t a g g c
a a t g g t t c t g g g c c t a c a t c g g t g a t g c a t a t c g g a g c a g
t g c

10

配列番号 30 :

T . v e r r u c o s u m に由来する配列

c t a t t g g g a g g g a g t c c a g t t g c a c t c c t g t a a c c g t a c c
c a t g g t c c t t g g c g t g c g g g g a c a t a a c a t t t g g a t t a t g
g g c t c c t t c g t g g a t t a c g g t c c c a a c a c g a t c c t g a c g a
t g g c a c t c c t t g t t g a c g t g g g g c a g t t g c c a a a a g g g g g
g g c a g g g g a a g a c c g a a t t c a t a g a t g g a a g g g t g t a g g c
a a t g g t t c t g g g a c t g c a t c g g c g a t a t t t a t c g g a g c a g
a a c

20

【実施例】

【0069】

実施例：以下の実施例は、種々の病原体株が本発明に従う教示を使用して区別され得ることを示す。

【0070】

30

実施例 1

プライマーおよびプローブの設計

サンプル中の T . t o n s u r a n s の同定のために、そのメタロプロテアーゼ遺伝子を、有用な標的領域として選択した。オリゴヌクレオチド配列の比較に基づいて、プライマーセット（正方向プライマー 5 ´ c y 3 - G G G A G G G A G A C T A G T T G 3 ´、逆方向プライマー 5 ´ c y 3 - A A T T T T T C G C C G C C A A G 3 ´）および Trichophyton tonsurans の検出のための種特異的プローブ（5 ´ C 6 - アミノ - リンカー - G A T C C T T G G C G T A C G G A T G C A T A 3 ´）を設計した。その設計したプローブを、内部反復、二次構造、融解温度および GC 含有量に関してチェックした。

40

【0071】

DNA マイクロアレイ

T . t o n s u r a n s およびいくつかのコントロールのために設計されたプローブを、規定された位置に位置づけられた微視的に小さいスポットとして、s c i F L E X A R R A Y E R S 1 1 (S c i e n i o n A G , G e r m a n y) とともに固体キャリア材料上にスポットした。

【0072】

皮膚糸状菌培養物からの DNA 抽出

皮膚糸状菌試験培地アガー (S I F I N , G e r m a n y , T N 2 1 0 2) 上で培養を行った。培養した T . t o n s u r a n s (C B S 4 8 3 . 7 6)、T . i n t e

50

rdigitale ヒト好性 / 動物好性 (2235, Pel01) および *T. equinum* (CBS 127.97) の DNA を、OmniPrep™ for Fungus キット (G-Biosciences, USA, no. 786-399) を使用して製造業者の説明書に従って抽出し、内部転写スパーサー (internal transcribe spacer) (ITS) 配列決定によって種レベルで同定した。

【0073】

PCR

各 PCR 反応を、*Trichophyton tonsurans*、*Trichophyton interdigitale* (ヒト好性)、*Trichophyton interdigitale* (動物好性) または *Trichophyton equinum* の 5 μ l DNA 抽出物 (5 ng / μ l) の添加によって、容積 20 μ l で行った。各反応は、1x Green GoTaq (登録商標) Flexi Buffer (Promega, USA, X9801)、2.5 mM MgCl₂ (Promega, USA, X9801)、0.4 mM 各 dNTP (各 25 mM) (Bioline, Germany, BIO-39029)、0.75 U GoTaq (登録商標) Flexi DNA Polymerase (5 U / μ l) (Promega, USA, M830)、0.5 μ M 正方向プライマーおよび 0.5 μ M 逆方向プライマー (Metabion, Germany) を含んだ。増幅は、ABI 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, USA, no. 4359659) で行い、96 で 3 分間の予備溶解工程および 96 で 15 秒 (融解)、52 で 15 秒 (アニーリング)、72 で 40 秒 (伸長) の 35 サイクルからなり、72 において 1 分間保持で終了させた。

【0074】

ハイブリダイゼーション

PCR 反応から生じるアンプリコンは、上記正方向プライマーおよび / または逆方向プライマーの 5' 末端に付着した蛍光色素 (これは、PCR 生成物がマイクロアレイ上の相補的プローブに結合する場合に、アンプリコンをマイクロアレイスキャナー (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101) によって検出されることを可能にする) を含んだ。ハイブリダイゼーション工程のために、25 μ l PCR 生成物を、65 μ l ハイブリダイゼーション緩衝液 A (EUROIMMUN AG、ハイブリダイゼーション緩衝液 A、ZM0101-0108) と混合した。この混合物のうちの 65 μ l を、EUROIMMUN titerplane 技術 (EUROIMMUN AG, titerplane + ハイブリダイゼーションステーション, ZM 9999-0105 + YG 0615-0101) を使用して、マイクロアレイにハイブリダイズさせた。55 での 1 時間のインキュベーション後に、その EUROArray スライドを、製造業者のプロトコルに従って特別な緩衝溶液で洗浄して、非特異的結合配列を除去した (EUROIMMUN AG, 洗浄試薬 1 + 2, ZM 0121-0050 + ZM0122-0012)。洗浄後に、そのスライドを圧縮空気で乾燥させたところ、強く対形成した鎖のみがハイブリダイズしたまま残った。標識された PCR 生成物とのハイブリダイゼーションからシグナルが生成された。これを、マイクロアレイスキャナーを介して検出した。

【0075】

読み取りおよび評価

最終データ読み取りおよびその評価を、EUROArrayScanner および EUROArrayScan ソフトウェア (EUROIMMUN AG, EUROArrayScan ソフトウェア, YG 0901-0101) を使用して行った。*Trichophyton tonsurans*、*Trichophyton interdigitale* (ヒト好性)、*Trichophyton interdigitale* (動物好性) および *Trichophyton equinum* のテンプレートからハイブリダイズした PCR 生成物での捕捉マイクロアレイを、図 2 に示す。

【0076】

10

20

30

40

50

*Trichophyton tonsurans*の特異的プローブは、白丸によって強調され、点線で囲まれたスポットは、グリッドを設定するためにソフトウェアから必要とされるコントロールである。*Trichophyton tonsurans*テンプレート(C)からのPCR生成物のみが、その特異的プローブ(6a、6b)にハイブリダイズし、蛍光シグナルを示した。これは、他の株のうちのいずれかに由来するDNAを使用した場合には存在しない。

【0077】

これは、本発明の方法が、皮膚、毛および爪の疾患と関連する*Trichophyton*株を区別するために使用され得ることを示す。

【0078】

実施例 2

材料および方法

DNAマイクロアレイは、それらのDNA配列によって互いから異なるDNA分子(プローブ)からなる。生物のDNAがマイクロアレイにおいてこれらの規定されたプローブにマッチするセグメントを含む場合、その相補的なDNA領域は、一緒に結合する(ハイブリダイズする)。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において使用される蛍光標識プライマーに起因して、プローブと増幅された標的配列との間の明確なハイブリダイゼーションは、マイクロアレイスキャナーを介して検出され得る。評価される陽性シグナルは、その標的配列が検出できたことを意味する。この実施例において、DNAマイクロアレイを介する皮膚糸状菌*Trichophyton benhamiae*(黄色)および*Trichophyton concentricum*の検出が示される。プローブ特異性の検証のために、最も密接に関連する種*Trichophyton benhamiae*(白色)および*Trichophyton benhamiae*(アフリカ)も、分析の中に含めた。その使用される方法は、EUROIMMUN DNAマイクロアレイプラットフォームに基づいた。

【0079】

プライマーおよびプローブの設計

サンプル中の*Trichophyton benhamiae*(黄色)および*Trichophyton concentricum*の同定のために、そのメタロプロテアーゼ遺伝子を、有用な標的領域として選択した。オリゴヌクレオチド配列の比較に基づいて、プライマーセット(正方向プライマー 5' cy3-CTGGCCATGGCACTTATTGG 3'、逆方向プライマー 5' cy3-TGGCTCTGTTACGTG 3')ならびに*Trichophyton benhamiae*(黄色)の検出のための種特異的プローブ(5' C6-アミノ-リンカー-GATGTAGGCCCAAATCATTGCCCTACAC 3')および*Trichophyton concentricum*の検出のための種特異的プローブ(5' C6-アミノ-リンカー-CTGCCCCAACTTTTGGCAACTG 3')を設計した。その設計したプローブを、内部反復、二次構造、融解温度(T_m)およびGC含有量に関してチェックした。

【0080】

DNAマイクロアレイ

Trichophyton benhamiae(黄色)、*Trichophyton concentricum*およびいくつかのコントロールのために設計されたプローブを、規定された位置に位置づけられた微視的に小さいスポットとして、sciFLEXAR RAYER S11(Sciencion AG, Germany)とともに固体キャリア材料にスポットした。

【0081】

皮膚糸状菌培養物からのDNA抽出

皮膚糸状菌試験培地アガー(SIFIN, Germany, TN 2102)上で培養を行った。培養した*Trichophyton benhamiae*(黄色)(CBS 623.66)、*Trichophyton benhamiae*(白色)(CBS 28

10

20

30

40

50

0.83)、*Trichophyton benhamiae* (アフリカ) (CBS 808.72) および *Trichophyton concentricum* (CBS 563.83) のDNAを、OmniPrep™ for Fungusキット (G-Biosciences, USA, no. 786-399) を使用して製造業者の説明書に従って抽出し、内部転写スパーサー (ITS) 配列決定によって種レベルで同定した。

【0082】

PCR

各PCR反応を、*Trichophyton benhamiae* (黄色)、*Trichophyton benhamiae* (白色)、*Trichophyton benhamiae* (アフリカ) および *Trichophyton concentricum* の5 μ l DNA抽出物 (5 ng/ μ l) の添加によって、容積20 μ lで行った。各反応は、1x Green GoTaq (登録商標) Flexi Buffer (Promega, USA, X9801)、2.5mM MgCl₂ (Promega, USA, X9801)、0.4mM 各dNTP (各25mM) (Bioline, Germany, BIO-39029)、0.75 U GoTaq (登録商標) Flexi DNA Polymerase (5 U/ μ l) (Promega, USA, M830)、0.8 μ M 正方向プライマーおよび0.4 μ M 逆方向プライマー (Metabion, Germany) を含んだ。増幅は、ABI 2720サーマルサイクラー (Applied Biosystems, USA, no. 4359659) で行い、96 で3分間の予備溶解工程および96 で15秒 (融解)、52 で15秒 (アニーリング)、72 で40秒 (伸長) の35サイクルからなり、72 において1分間保持で終了させた。

【0083】

ハイブリダイゼーション

その生じるPCR生成物を、蛍光色素 (これは、PCR生成物がマイクロアレイ上の相補的プローブに結合する場合に、それら生成物をマイクロアレイスキャナー (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101) によって検出されることを可能にする) で標識した。ハイブリダイゼーション工程のために、25 μ l PCR生成物を、65 μ l ハイブリダイゼーション緩衝液A (EUROIMMUN AG、ハイブリダイゼーション緩衝液A、ZM0101-0108) と混合した。この混合物のうちの65 μ lを、EUROIMMUN titerplane技術 (EUROIMMUN AG, titerplane+ハイブリダイゼーションステーション, ZM 9999-0105+YG 0615-0101) を使用して、マイクロアレイにハイブリダイズさせた。55 での1時間のインキュベーション後に、そのEUROArrayスライドを、製造業者のプロトコルに従って特別な緩衝溶液で洗浄して、非特異的結合配列を除去した (EUROIMMUN AG, 洗浄試薬1+2, ZM 0121-0050+ZM0122-0012)。洗浄後に、そのスライドを圧縮空気で乾燥させたところ、強く対形成した鎖のみがハイブリダイズしたまま残った。標識されたPCR生成物とのハイブリダイゼーションからシグナルが生成された。これを、マイクロアレイスキャナーを介して検出した。

【0084】

読み取りおよび評価

最終データ読み取りおよびその評価を、EUROArrayScannerおよびEUROArrayScanソフトウェア (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanソフトウェア, YG 0901-0101) を使用して行った。*Trichophyton benhamiae* (黄色)、*Trichophyton benhamiae* (白色)、*Trichophyton benhamiae* (アフリカ) および *Trichophyton concentricum* のテンプレートからハイブリダイズしたPCR生成物での捕捉マイクロアレイを、図3に示す。マイクロアレイでのcy3標識PCR生成物およびコントロールとハイブリダイズしたその特異的プローブ (図3中の白丸) がまた、ハイブリダイゼーション緩衝液中の標識オリゴヌクレオチドとそのアレイの角

にあるプローブ配列との間のハイブリダイゼーションに起因して、蛍光シグナルを示した場合に、株を、*Trichophyton benhamiae* (黄色)または*Trichophyton concentricum*であると同定した。

【0085】

実施例3

材料および方法

DNAマイクロアレイは、それらのDNA配列によって互いから異なるDNA分子(プローブ)からなる。生物のDNAがマイクロアレイにおいてこれらの規定されたプローブにマッチするセグメントを含む場合、その相補的なDNA領域は、一緒に結合する(ハイブリダイズする)。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において使用される蛍光標識プライマーに起因して、プローブと増幅された標的配列との間の明確なハイブリダイゼーションは、マイクロアレイスキャナーを介して検出され得る。評価される陽性シグナルは、その標的配列が検出できたことを意味する。この実施例において、DNAマイクロアレイを介する皮膚糸状菌*Trichophyton benhamiae* (黄色)および*Trichophyton benhamiae* (白色/アフリカ)の検出が示される。その使用される方法は、EUROIMMUN DNAマイクロアレイプラットフォームに基づいた。

10

【0086】

プライマーおよびプローブの設計

サンプル中の*Trichophyton benhamiae* (黄色)または*Trichophyton benhamiae* (白色/アフリカ)の同定のために、そのメタロプロテアーゼ遺伝子を、有用な標的領域として選択した。オリゴヌクレオチド配列の比較に基づいて、プライマーセット(正方向プライマー 5' cy3-CTGGCCATGGCACTTATTGG 3'、逆方向プライマー 5' cy3-TGGCTCTGTTCGTG 3')ならびに*Trichophyton benhamiae* (黄色)の検出のための種特異的プローブ(5' C6-アミノ-リンカー-TAGGCAATGATTTTGGGCCTA 3')および*Trichophyton benhamiae* (白色/アフリカ)の検出のための種特異的プローブ(5' C6-アミノ-リンカー-CATCGGCGAGGACCATCGGA 3')を、設計した。その設計したプローブを、内部反復、二次構造、融解温度(T_m)およびGC含有量に関してチェックした。

20

【0087】

DNAマイクロアレイ

Trichophyton benhamiae (黄色)、*Trichophyton benhamiae* (白色/アフリカ)およびいくつかのコントロールのために設計されたプローブを、規定された位置に位置づけられた微視的に小さいスポットとして、sciFLEXARRAYER S11 (Sciencion AG, Germany)とともに固体キャリア材料にスポットした。

30

【0088】

皮膚糸状菌培養物からのDNA抽出

皮膚糸状菌試験培地アガー(SIFIN, Germany, TN 2102)上で培養を行った。培養した*Trichophyton benhamiae* (黄色)(CBS 623.66)、*Trichophyton benhamiae* (白色)(CBS 280.83)および*Trichophyton benhamiae* (アフリカ)(CBS 808.72)のDNAを、OmniPrepTM for Fungusキット(G-Biosciences, USA, no. 786-399)を使用して製造業者の説明書に従って抽出し、内部転写スペーサー(ITS)配列決定によって種レベルで同定した。

40

【0089】

PCR

各PCR反応を、*Trichophyton benhamiae* (黄色)、*Trichophyton benhamiae* (白色)および*Trichophyton benhamiae* (アフリカ)の5 μ l DNA抽出物(5 ng/ μ l)の添加によって、容

50

積 20 μ l で行った。各反応は、1 \times Green GoTaq (登録商標) Flexi Buffer (Promega, USA, X9801)、2.5 mM MgCl₂ (Promega, USA, X9801)、0.4 mM 各 dNTP (各 25 mM) (Bioline, Germany, BIO-39029)、0.75 U GoTaq (登録商標) Flexi DNA Polymerase (5 U/ μ l) (Promega, USA, M830)、0.4 μ M 正方向プライマーおよび 1,6 μ M 逆方向プライマー (Metabion, Germany) を含んだ。増幅は、ABI 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, USA, no. 4359659) で行い、96 で3分間の予備溶解工程および 96 で15秒 (融解)、52 で15秒 (アニーリング)、72 で40秒 (伸長) の35サイクルからなり、72 10
 において1分間保持で終了させた。

【0090】

ハイブリダイゼーション

その生じる PCR 生成物を、蛍光色素 (これは、PCR 生成物がマイクロアレイ上の相補的プローブに結合する場合に、それら生成物をマイクロアレイスキャナー (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101) によって検出されることを可能にする) で標識した。ハイブリダイゼーション工程のために、25 μ l PCR 生成物を、65 μ l ハイブリダイゼーション緩衝液 A (EUROIMMUN AG、ハイブリダイゼーション緩衝液 A、ZM0101-0108) と混合した。この混合物のうちの 65 μ l を、EUROIMMUN titerplane 技術 (EUROIMMUN AG, titerplane+ハイブリダイゼーションステーション, ZM 9999-0105+YG 0615-0101) を使用して、マイクロアレイにハイブリダイズさせた。55 での1時間のインキュベーション後に、その EUROArray スライドを、製造業者のプロトコルに従って特別な緩衝溶液で洗浄して、非特異的結合配列を除去した (EUROIMMUN AG, 洗浄試薬 1+2, ZM 0121-0050+ZM0122-0012)。洗浄後に、そのスライドを圧縮空気で乾燥させたところ、強く対形成した鎖のみがハイブリダイズしたまま残った。標識された PCR 生成物とのハイブリダイゼーションからシグナルが生成された。これを、マイクロアレイスキャナーを介して検出した。 20

【0091】

読み取りおよび評価

最終データ読み取りおよびその評価を、EUROArrayScanner および EUROArrayScan ソフトウェア (EUROIMMUN AG, EUROArrayScan ソフトウェア, YG 0901-0101) を使用して行った。Trichophyton benhamiae (黄色)、Trichophyton benhamiae (白色) および Trichophyton benhamiae (アフリカ) のテンプレートからハイブリダイズした PCR 生成物での捕捉マイクロアレイを、図 4 に示す。マイクロアレイでの cy3 標識 PCR 生成物およびコントロールとハイブリダイズしたその特異的プローブ (図 4 中の白丸) がまた、ハイブリダイゼーション緩衝液中の標識オリゴヌクレオチドとそのアレイの角にあるプローブ配列との間のハイブリダイゼーションに起因して、蛍光シグナルを示した場合に、株を、Trichophyton benhamiae (黄色) または Trichophyton benhamiae (白色/アフリカ) であると同定した。 40

【0092】

実施例 4

材料および方法

DNA マイクロアレイは、それらの DNA 配列によって互いから異なる DNA 分子 (プローブ) からなる。生物の DNA がマイクロアレイにおいてこれらの規定されたプローブにマッチするセグメントを含む場合、その相補的な DNA 領域は、一緒に結合する (ハイブリダイズする)。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) において使用される蛍光標識プライ 50

マーに起因して、プローブと増幅された標的配列との間の明確なハイブリダイゼーションは、マイクロアレイスキャナーを介して検出され得る。評価される陽性シグナルは、その標的配列が検出できたことを意味する。この実施例において、DNAマイクロアレイを介する皮膚糸状菌 *Trichophyton erinacei* の検出が示される。プローブ特異性の検証のために、最も密接に関連する種 *Trichophyton benhamiae* (白色) および *Trichophyton benhamiae* (アフリカ) も、分析の中に含めた。その使用される方法は、EUROIMMUN DNAマイクロアレイプラットフォームに基づいた。

【0093】

プライマーおよびプローブの設計

サンプル中の *Trichophyton erinacei* の同定のために、そのメタロプロテアーゼ遺伝子を、有用な標的領域として選択した。オリゴヌクレオチド配列の比較に基づいて、プライマーセット (正方向プライマー 5' cy3 - CTGGCCATGGCACTTATTGG 3'、逆方向プライマー 5' cy3 - TGGCTCTGTTACGTG 3') および *Trichophyton erinacei* の検出のための種特異的プローブ (5' C6 - アミノ - リンカー - GATGTAGGCCCAAATCAATTGCCTACAC 3') を設計した。その設計したプローブを、内部反復、二次構造、融解温度 (T_m) および GC 含有量に関してチェックした。

【0094】

DNAマイクロアレイ

Trichophyton erinacei およびいくつかのコントロールのために設計されたプローブを、規定された位置に位置づけられた微視的に小さいスポットとして、sciFLEXARRAYER S11 (Sciencion AG, Germany) とともに固体キャリア材料にスポットした。

【0095】

皮膚糸状菌培養物からのDNA抽出

皮膚糸状菌試験培地アガー (SIFIN, Germany, TN 2102) 上で培養を行った。培養した *Trichophyton erinacei* (CBS 677.86)、*Trichophyton benhamiae* (白色) (CBS 280.83) および *Trichophyton benhamiae* (アフリカ) (CBS 808.72) のDNAを、OmniPrep™ for Fungusキット (G-Biosciences, USA, no. 786-399) を使用して製造業者の説明書に従って抽出し、内部転写スパーサー (ITS) 配列決定によって種レベルで同定した。

【0096】

PCR

各PCR反応を、*Trichophyton erinacei*、*Trichophyton benhamiae* (白色) および *Trichophyton benhamiae* (アフリカ) の5 μ l DNA抽出物 (5 ng/ μ l) の添加によって、容積20 μ lで行った。各反応は、1 \times Green GoTaq (登録商標) Flexi Buffer (Promega, USA, X9801)、2.5 mM MgCl₂ (Promega, USA, X9801)、0.4 mM 各dNTP (各25 mM) (Bioline, Germany, BIO-39029)、0.75 U GoTaq (登録商標) Flexi DNA Polymerase (5 U/ μ l) (Promega, USA, M830)、0.5 μ M 正方向プライマーおよび0.5 μ M 逆方向プライマー (Metabion, Germany) を含んだ。増幅は、ABI 2720サーマルサイクラー (Applied Biosystems, USA, no. 4359659) で行い、96 で3分間の予備溶解工程および96 で15秒 (融解)、52 で15秒 (アニーリング)、72 で40秒 (伸長) の35サイクルからなり、72 において1分間保持で終了させた。

【0097】

ハイブリダイゼーション

その生じるPCR生成物を、蛍光色素（これは、PCR生成物がマイクロアレイ上の相補的プローブに結合する場合に、それら生成物をマイクロアレイスキャナー（EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602-0101）によって検出されることを可能にする）で標識した。ハイブリダイゼーション工程のために、25 µl PCR生成物を、65 µl ハイブリダイゼーション緩衝液A（EUROIMMUN AG、ハイブリダイゼーション緩衝液A、ZM0101-0108）と混合した。この混合物のうちの65 µlを、EUROIMMUN titerplane技術（EUROIMMUN AG, titerplane+ハイブリダイゼーションステーション, ZM 9999-0105+YG 0615-0101）を使用して、マイクロアレイにハイブリダイズさせた。55 °Cでの1時間のインキュベーション後に、そのEUROArrayスライドを、製造業者のプロトコルに従って特別な緩衝溶液で洗浄して、非特異的結合配列を除去した（EUROIMMUN AG, 洗浄試薬1+2, ZM 0121-0050+ZM0122-0012）。洗浄後に、そのスライドを圧縮空気で乾燥させたところ、強く対形成した鎖のみがハイブリダイズしたまま残った。標識されたPCR生成物とのハイブリダイゼーションからシグナルが生成された。これを、マイクロアレイスキャナーを介して検出した。

10

【0098】

読み取りおよび評価

最終データ読み取りおよびその評価を、EUROArrayScannerおよびEUROArrayScanソフトウェア（EUROIMMUN AG, EUROArrayScanソフトウェア, YG 0901-0101）を使用して行った。Trichophyton erinacei、Trichophyton benhamiae（白色）およびTrichophyton benhamiae（アフリカ）のプレートからハイブリダイズしたPCR生成物での捕捉マイクロアレイを、図5に示す。マイクロアレイでのcy3標識PCR生成物およびコントロールとハイブリダイズしたその特異的プローブ（図5中の白丸）がまた、ハイブリダイゼーション緩衝液中の標識オリゴヌクレオチドとそのアレイの角にあるプローブ配列との間のハイブリダイゼーションに起因して、蛍光シグナルを示した場合に、株を、Trichophyton erinaceiであると同定した。

20

30

【0099】

実施例5

材料および方法

DNAマイクロアレイは、それらのDNA配列によって互いから異なるDNA分子（プローブ）からなる。生物のDNAがマイクロアレイにおいてこれらの規定されたプローブにマッチするセグメントを含む場合、その相補的なDNA領域は、一緒に結合する（ハイブリダイズする）。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）において使用される蛍光標識プライマーに起因して、プローブと増幅された標的配列との間の明確なハイブリダイゼーションは、マイクロアレイスキャナーを介して検出され得る。評価される陽性シグナルは、その標的配列が検出できたことを意味する。この実施例において、DNAマイクロアレイを介する皮膚糸状菌Trichophyton benhamiae（白色）、Trichophyton benhamiae（黄色）およびTrichophyton concentricumの検出が示される。その使用される方法は、EUROIMMUN DNAマイクロアレイプラットフォームに基づいた。

40

【0100】

プライマーおよびプローブの設計

サンプル中のTrichophyton benhamiae（白色）、Trichophyton benhamiae（黄色）およびTrichophyton concentricumの同定のために、そのメタロプロテアーゼ遺伝子を、有用な標的領域として選択した。オリゴヌクレオチド配列の比較に基づいて、プライマーセット（正方向プラ

50

イマー 5' cy3 - GCATTTCCCATGGCT 3'、逆方向プライマー 5' cy3 - TGGCTCTGTTACGTG 3') ならびに *Trichophyton benhamiae* (白色/アフリカ) の検出のための種特異的プローブ (5' C6 - アミノ - リンカー - CATCGGCGAGGACCATCGGA 3')、*Trichophyton benhamiae* (黄色) の検出のための種特異的プローブ (5' C6 - アミノ - リンカー - TAGGCAATGATTTTGGGCCTA 3') および *Trichophyton concentricum* の検出のための種特異的プローブ (5' C6 - アミノ - リンカー - GCAATGGTTCTGGGCCTACATC 3') を、設計した。その設計したプローブを、内部反復、二次構造、融解温度 (Tm) および GC 含有量に関してチェックした。

10

【0101】

DNAマイクロアレイ

Trichophyton benhamiae (白色)、*Trichophyton benhamiae* (黄色)、*Trichophyton concentricum* およびいくつかのコントロールのために設計されたプローブを、規定された位置に位置づけられた微視的に小さいスポットとして、sciFLEXARRAYER S11 (Sci enion AG, Germany) とともに固体キャリア材料にスポットした。

【0102】

皮膚糸状菌培養物からのDNA抽出

皮膚糸状菌試験培地アガー (SIFIN, Germany, TN 2102) 上で培養を行った。培養した *Trichophyton benhamiae* (アフリカ) (CBS 808.72)、*Trichophyton benhamiae* (黄色) (CBS 623.66) および *Trichophyton concentricum* (CBS 563.83) のDNAを、OmniPrep™ for Fungusキット (G - Biosciences, USA, no. 786 - 399) を使用して製造業者の説明書に従って抽出し、内部転写スペーサー (ITS) 配列決定によって種レベルで同定した。

20

【0103】

PCR

各PCR反応を、*Trichophyton benhamiae* (白色)、*Trichophyton benhamiae* (黄色)、*Trichophyton concentricum* の5µl DNA抽出物 (5ng/µl) の添加によって、容積20µlで行った。各反応は、1xGreen GoTaq (登録商標) Flexi Buffer (Promega, USA, X9801)、2.5mM MgCl₂ (Promega, USA, X9801)、0.4mM 各dNTP (各25mM) (Bioline, Germany, BIO - 39029)、0.75 U GoTaq (登録商標) Flexi DNA Polymerase (5 U/µl) (Promega, USA, M830)、1,0µM 正方向プライマーおよび1,0µM 逆方向プライマー (Metabion, Germany) を含んだ。増幅は、ABI 2720サーマルサイクラー (Applied Biosystems, USA, no. 4359659) で行い、96 で3分間の予備溶解工程および96 で15秒 (融解)、52 で15秒 (アニーリング)、72 で40秒 (伸長) の35サイクルからなり、72 において1分間保持で終了させた。

30

40

【0104】

ハイブリダイゼーション

その生じるPCR生成物を、蛍光色素 (これは、PCR生成物がマイクロアレイ上の相補的プローブに結合する場合に、それら生成物をマイクロアレイスキャナー (EUROIMMUN AG, EUROArrayScanner, YG 0602 - 0101) によって検出されることを可能にする) で標識した。ハイブリダイゼーション工程のために、25µl PCR生成物を、65µl ハイブリダイゼーション緩衝液A (EUROIMMUN AG、ハイブリダイゼーション緩衝液A、ZM0101 - 0108) と混合した

50

。この混合物のうちの65 µlを、EUROIMMUN titerplane技術(EUROIMMUN AG, titerplane+ハイブリダイゼーションステーション, ZM 9999-0105+YG 0615-0101)を使用して、マイクロアレイにハイブリダイズさせた。55 °Cでの1時間のインキュベーション後に、そのEUROARRAYスライドを、製造業者のプロトコルに従って特別な緩衝溶液で洗浄して、非特異的結合配列を除去した(EUROIMMUN AG, 洗浄試薬1+2, ZM 0121-0050+ZM0122-0012)。洗浄後に、そのスライドを圧縮空気で乾燥させたところ、強く対形成した鎖のみがハイブリダイズしたまま残った。標識されたPCR生成物とのハイブリダイゼーションからシグナルが生成された。これを、マイクロアレイスキャナーを介して検出した。

10

【0105】

読み取りおよび評価

最終データ読み取りおよびその評価を、EUROARRAYScannerおよびEUROARRAYScanソフトウェア(EUROIMMUN AG, EUROARRAYScanソフトウェア, YG 0901-0101)を使用して行った。Trichophyton benhamiae(白色)、Trichophyton benhamiae(黄色)およびTrichophyton concentricumのテンプレートからハイブリダイズしたPCR生成物での捕捉マイクロアレイを、図6に示す。マイクロアレイでのcy3標識PCR生成物およびコントロールとハイブリダイズしたその特異的プローブ(図6中の白丸)がまた、ハイブリダイゼーション緩衝液中の標識オリゴヌクレオチドとそのアレイの角にあるプローブ配列との間のハイブリダイゼーションに起因して、蛍光シグナルを示した場合に、株を、Trichophyton benhamiae(白色/アフリカ)、Trichophyton benhamiae(黄色)およびTrichophyton concentricumであると同定した。

20

30

40

50

【 図面 】

【 図 1 】

```

T.interdigitale -----CACGGTAAFAACCGTACCCGAGGTCGCCGGCGGCTGCGGA
T.tonsurans -----CACGGCTTAFAACCGTACCCGAGATCTTGGCGTACGGA
T.benhamiae (白色) CCTCTGGTGAGAGAGTGCAGTTGACAGATTGTAACCATAGCCATGGCTTGGAGTGGGGT
T.erinaeaei CTCCTGGTGAGAGAGTGCAGTTGACACTACTGTAAACCGTACCCATGGCTTGGAGTGGGG
T.benhamiae (アフリカ) CTCTTGTGAGAGAGTGCAGTTGACCGCTGTAFAACCGTACCCATGGCTTGGAGTGGGG
T.equinum -----CACGGCTTAFAACCGTACCCGAGATCTTGGCGTACGGA
T.benhamiae (黄色) CTCCTGGTGAGAGAGTGCAGTTGACAGATGTAFAACCGTACCCAGTCTTGGAGAGCGGT
T.concentricum CTCCTGGTGAGAGAGTGCAGTTGACAGATTGTAFAACCGTACCCAGTCTTGGAGAGCGGT
コンセンサス
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCACXXXXXXXXXXXXTCCXXXXXXXXXXXXX
T.interdigitale CTCATAACGGCTGGATTATGGGCTCTTCTGGGATTATGGTTCGAGAGCGGATCTTGACCA
T.tonsurans TGCATAACGGCTGGATTATGGGCTCTTCTGGGATTATGGTTCGAGAGCGGATCTTGATGA
T.benhamiae (白色) GTGCACACATTGGATTATGGGCTCTTCTGGGATTATGGTTCGAGAGCGGATCTTGACGA
T.erinaeaei TTAGCACACATTGGATTATGGGCTCTTCTGGGATTATGGTTCGAGAGCGGATCTTGACCA
T.benhamiae (アフリカ) TTGACACACTTGGATTATGGGCTCTTCTGGGACTACGGTCCGATACGATCTTGACGA
T.equinum CGCATAACGGCTGGATTATGGGCTCTTCTGGGATTATGGTTCGAGAGCGGATCTTGATGA
T.benhamiae (黄色) GTAAACACCTTGGATTATGGGCTCTTCTGGGATTATGGTTCGAGAGCGGATCTTGACGA
T.concentricum GTAAACACACTTGGATTATGGGCTCTTCTGGGATTATGGTTCGAGAGCGGATCTTGACCA
.*.* *****.* *****.* *****.* *****.*.* *****.*.*
XXXXXXXXXXXXXCTGGATTATGGGCTCTTCTGGGATTATGGTTCGAGAGCGGATCTTGXXXXX
T.interdigitale TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTCGAGAGGAAAGCGAATTC
T.tonsurans TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGAGGGGAAAGCGAATTC
T.benhamiae (白色) TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGAGGAGCAGGGGTGAACCTCATTC
T.erinaeaei TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGAGGGGAAAGCGAATTC
T.benhamiae (アフリカ) TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGAGGGGAAAGCGAATTC
T.equinum TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGAGGGGAAAGCGAATTC
T.benhamiae (黄色) TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGAGGGGAAAGCGAATTC
T.concentricum TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGAGGGGAAAGCGAATTC
*****.*.* *****.*.* *****.*.* *****.*.* *****.*.*
TGGCACTTATGGTTCGAGATGGGGCAGTTGCCAAAAGATGTTGAGGGGAAAGCGAATTC
T.interdigitale ATGGCTGGAGGGGTGAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGATGTTTATGTTGGAG
T.tonsurans ATGGCTGGAGGGGTGAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGATGTTTATGTTGGAG
T.benhamiae (白色) CTAGCTGGAAGGGTGTAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGAGGAGCCATCGAGGAG
T.erinaeaei TTAGATGGAAGGGTGTAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGAGGAGCCATCGAGGAG
T.benhamiae (アフリカ) CTAGATGGAAGGGTGTAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGAGGAGCCATCGAGGAG
T.equinum ATGGCTGGAGGGGTGAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGATGTTTATGTTGGAG
T.benhamiae (黄色) TGGCTGGAGGGGTGAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGATGTTTATGTTGGAG
T.concentricum TGGCTGGAGGGGTGAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGATGTTTATGTTGGAG
.*.*.* *****.*.* *****.*.* *****.*.* *****.*.*
XXXXXXXXXXTGGAGGGGTGAGGCAATGTTCTGCAAGCGCATGCTGAGGAGCCATCGAGGAG
T.interdigitale AACCACTTAACAGGGCCACCTCTGAACAGATGCTTTGGAATCGAGTTGAGATGCGCG
T.tonsurans AACCACTTAACAGGGCCACCTCTGAACAGATGCTTTGGAATCGAGTTGAGATGCGATG
T.benhamiae (白色) AAC-----
T.erinaeaei TA-----
T.benhamiae (アフリカ) AAC-----
T.equinum AACCACTTAACAGGGCCACCTCTGAACAGATGCTTTGGAATCGAGTTGAGATGCGATG
T.benhamiae (黄色) TA-----
T.concentricum TA-----
.*
コンセンサス
XA
T.interdigitale GAAACCTCCCTCCGGTTCGAGGATC
T.tonsurans GAAACCTCCCTCCGGTTCGAGGATC
T.benhamiae (白色) -----
T.erinaeaei -----
T.benhamiae (アフリカ) -----
T.equinum GAAACCTCCCTCCGGTTCGAGGATC
T.benhamiae (黄色) -----
T.concentricum -----

```

Fig. 1

【 図 2 - 1 】

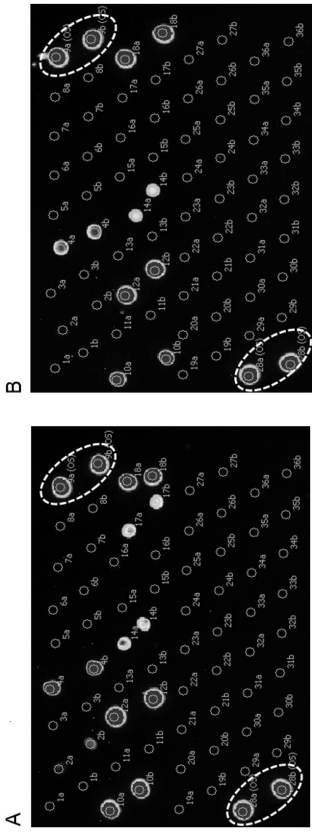


Fig. 2

【 図 2 - 2 】

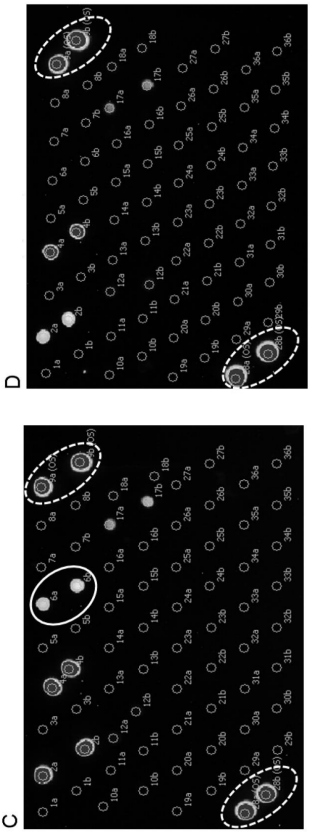


Fig. 2

【 図 3 】

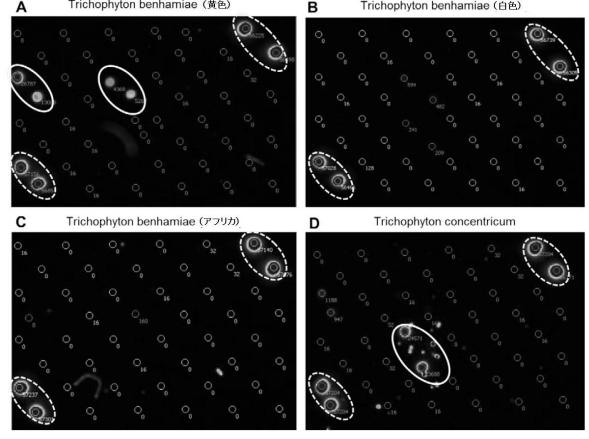


Fig. 3

10

20

30

40

50

【 図 4 】

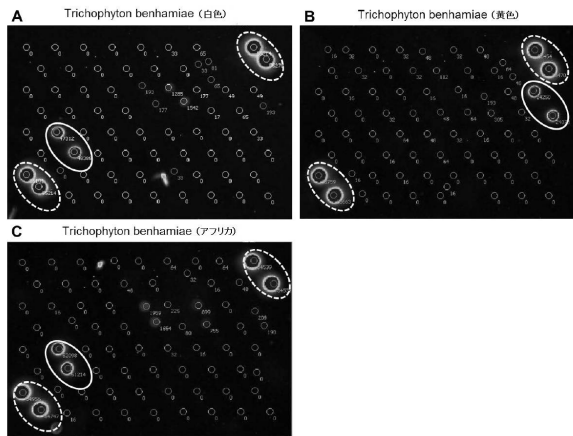


Fig. 4

【 図 5 】

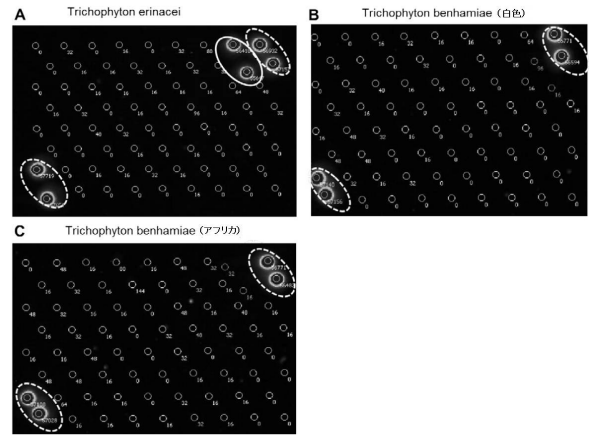


Fig. 5

【 図 6 】

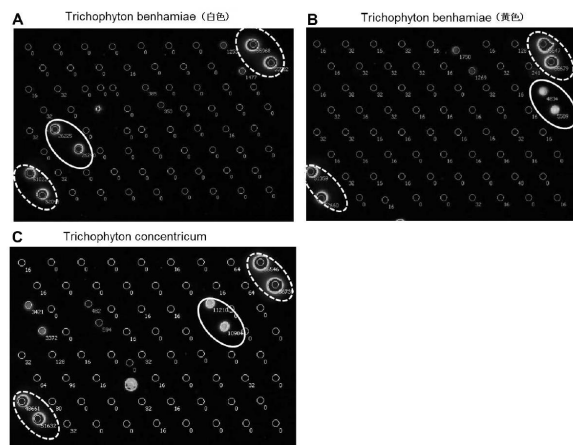


Fig. 6

【 配列表 】

[0007166771000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/6895(2018.01)

F I

C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/63 Z
 C 1 2 Q 1/6895 Z Z N A

弁理士 水島 亜希子

(74)代理人 100096769

有原 幸一

(72)発明者 メラニー ハルデル

ドイツ国 2 4 1 4 6 キール, ハーンブッシュ 2 2

(72)発明者 イボンヌ グレーザー

ドイツ国 1 5 5 3 7 ハンゲルスベルク, アム シュプレーウーファー 6 4

(72)発明者 クリステアーネ クプシュ

ドイツ国 1 2 0 5 9 ベルリン, ソンネンアレー 1 4 2

(72)発明者 マルクス カヴァラル

ドイツ国 2 3 9 2 3 ヘレンベルク, アム プランケンモール 1 4

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 福井 悟

審判官 川合 理恵

(56)参考文献

Ann Dermatol, 2014, Vol. 26, pp. 338 - 342
 GenBank [online], Accession No. AB419215, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB419215.1>, 11-MAR-2009 uploaded, DEFINITION: Bombyx mori non-coding RNA, ovarian small RNA - 33025, complete sequence
 GenBank [online], Accession No. DW706653, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/dw706653>, 10-NOV-2006 uploaded, DEFINITION: EST030134 Trichophyton rubrum cDNA library 7 Trichophyton rubrum cDNA clone plasmid: FUNGI__9_110B_31, mRNA sequence
 BMC Genomics, 2006, Vol. 7, Article 255
 Medical Mycology, 2014, Vol. 52, pp. 36 - 45

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00

CAPLus/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS/Registry (STN)