

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532818

(P2005-532818A)

(43) 公表日 平成17年11月4日(2005.11.4)

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

(21) 出願番号	特願2004-522471 (P2004-522471)	(71) 出願人	391008825
(86) (22) 出願日	平成15年7月16日 (2003. 7. 16)		ヘンケル・コマンディットゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月18日 (2005. 3. 18)		・アウフ・アクチエン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/007718		HENKEL KOMMANDITGES
(87) 国際公開番号	W02004/009843		ELLSCHAFT AUF AKTIE
(87) 国際公開日	平成16年1月29日 (2004. 1. 29)		N
(31) 優先権主張番号	102 32 775.0		ドイツ連邦共和国 デュッセルドルフ ヘ
(32) 優先日	平成14年7月18日 (2002. 7. 18)		ンケルシュトラッセ 67
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		40191 Dusseldorf, He
(31) 優先権主張番号	103 06 616.0		nkelsstrasse 67, Germ
(32) 優先日	平成15年2月14日 (2003. 2. 14)		any
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100068526
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,		弁理士 田村 恭生
	ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR	(74) 代理人	100103230
), AU, BR, BY, CA, CN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KR, LT, LV, MX, NO,		弁理士 高山 裕貢
	NZ, PL, RU, SG, UA, US, UZ, VN, YU, ZA		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の検出

(57) 【要約】

本発明は、皮膚に生じる少なくとも一種または数種の微生物を検出するための、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含むキットに関し、かつ本発明のキットを用いる方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

皮膚に生じる少なくとも一種または数種の微生物に対する少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含む、微生物を検出するためのキット。

【請求項 2】

微生物が、スタフィロコッカス属、ペプトストレプトコッカス属、プロピオニバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バイヨネラ属、マラセチア属、またはスポロミユサ分類群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

微生物を、インサイチュ・ハイブリダイゼーションにより検出する、より好ましくは蛍光インサイチュ・ハイブリダイゼーションにより検出することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のキット。 10

【請求項 4】

キットが、プロピオニバクテリウム・アクネス種に対する少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のキット。

【請求項 5】

キットがさらに、少なくとも一種または数種のスタフィロコッカスに対する少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項 4 に記載のキット。

【請求項 6】

キットが、少なくとも一種または数種のマラセチアに対する少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のキット。 20

【請求項 7】

オリゴヌクレオチドが、特に、オリゴヌクレオチドと共有結合している検出可能なマーカを担持していることを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のキット。

【請求項 8】

検出可能なマーカが、

- a) 蛍光マーカ、
- b) 化学発光マーカ、
- c) 放射性マーカ、
- d) 酵素活性な基、
- e) ハプテン、
- f) ハイブリダイゼーションにより検出可能な核酸、

からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

酵素マーカが、ペルオキシダーゼ、好ましくはホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、およびホスファターゼ、好ましくはアルカリ・ホスファターゼからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

i) 配列番号：01～30 に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

ii) 少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 84%、より好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは 95% のヌクレオチドが、i) のオリゴヌクレオチドと一致するオリゴヌクレオチド、 40

iii) i) および ii) のいずれかに記載の 1 つのオリゴヌクレオチドに由来し、1 つまたはそれ以上のヌクレオチドがその配列から欠失されているか、または伸長されているオリゴヌクレオチド、および

iv) ストリンジェントな条件下で i)、ii) または iii) のオリゴヌクレオチドの 1 つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択される少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載のキット。

【請求項 11】

i) a) 配列番号：01～03に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、
 b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、
 からなる群から選択されるスタフィロコッカス属の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

ii) a) 配列番号：04～06および27～29に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、
 からなる群から選択されるペプトストレプトコッカス属の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

iii) a) 配列番号：07～12および19～26に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、
 からなる群から選択されるコリネバクテリウム属の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

iv) a) 配列番号：13～15に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、
 からなる群から選択されるベイヨネラ属の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

v) a) 配列番号：16および17に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、
 からなる群から選択されるプロピオニバクテリウム・アクネス属の細菌を特異的に検出す

10

20

30

40

50

るための少なくとも１つのオリゴヌクレオチド、
および／または

v i) a) 配列番号：１８に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項１０の i i) に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項１０の i i i) に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下で a) 、 b) または c) のオリゴヌクレオチドの１つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択されるマラセチア属の菌類を特異的に検出するための少なくとも１つのオリゴヌクレオチド、 10

および／または

v i i) a) 配列番号：３０に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項１０の i i) に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項１０の i i i) に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下で a) 、 b) または c) のオリゴヌクレオチドの１つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択されるスポロミュサ分類群由来の微生物を特異的に検出するための少なくとも１つのオリゴヌクレオチド、 20

を含む請求項１０に記載のキット。

【請求項１２】

キットが、１つまたはそれ以上の標識したオリゴヌクレオチドに加えて、少なくとも１つ、好ましくは１つまたはそれ以上の標識していないオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項１～１１のいずれかに記載のキット。

【請求項１３】

キットがさらに、オリゴヌクレオチドを含まない少なくとも１つのハイブリダイゼーション溶液を含むことを特徴とする、請求項１～１２に記載のキット。

【請求項１４】

キットがさらに、少なくとも１つの適切な洗浄液または該洗浄液の濃縮液を含むことを特徴とする、請求項１～１３のいずれかに記載のキット。 30

【請求項１５】

キットがさらに、少なくとも１つの適切な透過処理液を含むことを特徴とする、請求項１～１４のいずれかに記載のキット。

【請求項１６】

キットがさらに、少なくとも１つの適切な固定液を含むことを特徴とする、請求項１～１５のいずれかに記載のキット。

【請求項１７】

キットがさらに、少なくとも１つの適切なポジティブコントロール溶液を含むことを特徴とする、請求項１～１６のいずれかに記載のキット。 40

【請求項１８】

キットがさらに、少なくとも１つの適切なネガティブコントロール溶液を含むことを特徴とする、請求項１～１７のいずれかに記載のキット。

【請求項１９】

キットがさらに、包埋液を含むことを特徴とする、請求項１～１８のいずれかに記載のキット。

【請求項２０】

皮膚に生じる微生物、より詳細にはスタフィロコッカス属、ペプトストレプトコッカス属、プロピオニバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バイヨネラ属、マラセチア属お 50

よび／またはスポロミュサ分類群を請求項 1 ～ 19 のいずれかに記載のキットを用いたインサイチュ・ハイブリダイゼーションにより検出する方法であって、次の工程：

- a) 皮膚の試料を採取し、
- b) 採取した試料に存在する微生物を固定し、
- c) 固定化した微生物を少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの組合せと一緒にインキュベートし、ハイブリダイゼーションを誘導し、
- d) ハイブリダイズしていないオリゴヌクレオチドを除去し、そして
- e) オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした微生物を検出し、場合により定量するを含むことを特徴とする、微生物を検出する方法。

【請求項 21】

10

工程 a) にて試料を皮膚表面から採取することを特徴とする、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

i) 好ましくはエタノール、アセトンおよびエタノール／酢酸混合液からなる群から選択される変性試薬、

ii) 好ましくはホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒドからなる群から選択される架橋試薬、または

iii) 熱固定処理

により固定を行うことを特徴とする、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

20

固定後、微生物を担体に固定化することを特徴とする、請求項 20 ～ 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

ハイブリダイゼーションの前に、微生物を透過性にすることを特徴とする、請求項 20 ～ 23 に記載の方法。

【請求項 25】

透過性を、好ましくはリゾチーム、リソスタフィン、プロテイナーゼ K、プロナーゼおよびムタノリシンからなる群から選択される細胞壁溶解酵素を用いた部分分解により行うことを特徴とする、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

30

皮膚上の微生物を検出および／または定量するために、請求項 1 ～ 19 のいずれかに記載のキットを使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、皮膚に生じる少なくとも一種または数種の微生物に対する少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含む微生物を検出するためのキットに関し、かつ本発明のキットを用いる方法に関する。

【0002】

40

ヒトの皮膚は、例えば約 2 m^2 の面積を有し、微生物が生息する最も広いヒト組織の 1 つである。進化の過程において、宿主とその寄生微生物は密接な関係を有しながら発達した。微生物は、様々な分泌腺を介して皮膚から供される栄養物を代謝している。結果として生じる皮膚表面の酸性化が、病原微生物のコロニー化を防いでいる。

【0003】

しかしながら、微生物の代謝活性は望まない効果も有しうる。例えば、体臭およびふけの形成、ならびに様々な皮膚疾患の進行が、微生物の活性によって起こり得る。

【0004】

原理上、皮膚微生物叢（フローラ）に属するすべての微生物を、皮膚から単離することができる。Priceによれば、2 つの異なる群が存在する（Price, P.B.: The bacteriology

50

of the normal skin: A new quantitative test applied to a study of the bacterial flora and the disinfectant action of mechanical cleansing. J. Infect. Dis., 63:301-318, 1938に記載)。

【0005】

a) 常在フローラ (Resident flora) : ヒト皮膚上で増殖することの可能な微生物、または皮膚試料の分析において、常時多数または高い割合で発見され得る微生物。上述の特性は、これらの常在微生物が皮膚に強く係留されている (付着している) ことに起因することが記載されている。

【0006】

b) 一過性フローラ (Transient flora) : ヒト皮膚上で増殖することのできない微生物、または皮膚試料の分析において、不定期に、かつ少数 / 低い割合でしか発見されない微生物。理論的には、これらの微生物は自由であり、すなわち皮膚の構成成分に付着していない。

【0007】

より詳しい知識に基づくと、上述の常在皮膚フローラはすべて、原則、新しい医薬品または化粧品の活性成分を探索する観点から重要である。さらに、様々な微生物間の相互作用が、健康な皮膚とその疾患の関係の幅広い理解をもたらすことが可能であり、かつより良い活性成分、処置または医薬品の開発を促進する。化粧品産物、例えば消臭剤、クリームなどによる関連皮膚微生物の選択的影響もまた、皮膚のミクロな生態系の構造および機能の十分な知識を前提としている。

【0008】

従来、微生物の検出は主に、血清学的または顕微鏡的に行われていた。その方法は、少数の微生物を直接検出するためには感度が十分ではない。従って、従来は微生物を増加させる培養工程を前段に行い検出していた。この方法の1つの不利点は、いくつかの微生物は利用可能な栄養媒体上で全く増加せず、よってそれらを検出することができないことである。現在、すべての細菌のうちたった0.1~14%のみが培養可能であることを、様々な環境試料の分析が示す。特に、培養-依存的な方法は、複雑な生物群集の組成物の分析に不適当であることが明らかである。なぜならば、選択した培養条件に依存して、特にこれらの培養条件によく合う微生物の増殖が促進され、結果として、開始試料中の存在比率が大きく変化してしまうためである。これらの集団数の変動のため、微生物の定量分析は全体として不可能である。この方法のもう1つの不利点は、既知のいくつかの培養方法がとても面倒であることと、それらの結果が多くの場合不安定であることである。これは、偽陽性および偽陰性の分析結果を両方とも生じることとなる。

【0009】

上述の培養の不利点を鑑み、微生物検出の現代的な方法はすべて、共通の目標を有している: それは、培養の必要性を排除することにより培養の不利点を回避することを目指している。

【0010】

微生物を検出する現代的な方法の例としては、DNAベースまたはRNAベース (DNA = デオキシリボ核酸、RNA = リボ核酸) のハイブリダイゼーションあるいは増幅方法がある。ハイブリダイゼーションとは、具体的には2つの一本鎖の相補的なオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの2重らせん (double helix) を形成することと理解されている。ハイブリダイゼーションは特に、2つのDNA分子または2つのRNA分子間と、DNA分子およびRNA分子間の両方で起こりうる。標的配列がもう一方の配列と十分に相補的である場合にのみ、様々な分子がハイブリダイズする。

【0011】

検出するための相補的な標的配列を固定化することも可能であり、それはいわゆるDNAチップ上にて行われることが多い。実用新案番号DE 20,110,013は、口腔疾患、特に膜炎の診断および処置のための担体 (DNAチップ) などをクレームしている。口腔内フローラに発生する細菌またはウイルスの既知の基準 (参照) 配列と相補的なオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドを、この担体上に固定化することができる。前記相補性に基づいて、この遺伝子チップに用いられるオリゴヌクレオチドを、任意の条件下で対応する基準（参照）配列とハイブリダイズすること可能である。この担体の不利点は、微生物が培養により増幅されなければならないか、あるいは存在する試料からの遺伝子情報がハイブリダイゼーション前にチップ上で増幅されなければならないことである。従って、試料に元々存在する微生物を定量することはどちらも不可能である。

【0012】

既知の増幅方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）がある。PCRにて、特定の微生物ゲノムに特有の断片を特異的なプライマーを用いて増幅する。プライマーがその標的部位を見つけると、その遺伝物質の断片を100万倍も増幅することになる。その後10の分析、例えばアガロース・ゲルを用いたDNA断片の単離にて、定性的評価を行うことができる。最も簡単な場合には、これは、用いたプライマーの標的部位が分析試料中に存在したという情報を供する。その他の情報はなにも供され得ない。これらの標的部位は、生存している細菌および死んだ細菌の両方、あるいはネイキッドDNA（naked DNA）に由来し得る。この段階では、区別をすることはできない。さらに、分析試料中に存在する様々な物質が、DNA増幅酵素、taq-ポリメラーゼの阻害を誘導しうる。これは、一般的に偽陰性結果の原因となる。さらに発展したPCR技術が定量的PCRであり、それは存在する微生物の量と増幅したDNAの量の相関関係を確立すること目的としている。PCRの利点としては、その高い特異性と必要な時間の短さが含まれる。主な不利点は、その高い細菌混入（contamination）の受けやすさと、その結果生じる偽陽性の結果であり、上述の生存細胞および死亡細胞、またはネイキッドDNA（naked DNA）の区別が不可能であること、および最終的に偽陰性の危険性が阻害物質の存在に起因して生じることである。

【0013】

蛍光標識したオリゴヌクレオチドを用いたインサイチュ・ハイブリダイゼーション（in situ hybridization）法は、90年代の初めに開発され、多くの環境試料にて成功裏に用いられている（Amann et al. (1990), J. Bacteriol. 172, 762）。その方法は、「FISH」（蛍光インサイチュ・ハイブリダイゼーション）と呼称され、どんな細胞にも生じるリボソーム・リボ核酸（RNA）が高い保存性と可変性の配列、すなわち属または同じ種でさえ特有の配列を有しているという事実を利用している。相補的オリゴヌクレオチドを、これらの配列ドメインに対して作製することができ、さらに検出可能なマーカーと一緒に作製することができる。これらのいわゆる核酸プローブを用いて、微生物種、属または群を、試料中にて高い特異性で直接的に同定することが可能であり、必要であれば、可視化または定量することもできる。この方法は、生物群集の実際のインサイチュ条件を歪曲無しの表示を呈する唯一の方法である。現在までに、培養されておらず、かつ記載もされていない微生物が同定されている。

【0014】

FISHにて、細胞内に浸透したプローブが分析サンプル中に存在する。開発されたプローブに対する微生物の種、属または群が分析試料中に存在している場合、微生物細胞中のプローブはその標的配列と結合しており、プローブの標識を介して細胞を検出することができる。

微生物を同定するためのさらに上述した方法（培養、PCR）を凌ぐFISH技術の利点は、多数かつ多様である。

【0015】

第一に、伝統的な培養により検出することが不可能な多数の微生物を、プローブを用いて検出することができる。試料の細菌集団のたった15%が培養により可視化され得るが、FISH技術は多くの試料中に検出される全細菌集団を100%まで可視化することが可能である。第二に、FISH技術により培養よりもはるかに迅速に微生物を検出することができる。培養による微生物の同定に数日を要するとしても、FISH技術により、たとえ種レベルであっても、サンプリングから微生物の同定までを数時間のみで行うことが

可能である。第三に、培養培地と異なり、プローブをその特異性にてほぼ自由に選択することができる。個々の種を、属全体または微生物群全体として適切なプローブで検出することができる。第四に、微生物種または全体の微生物集団を、試料そのものの中にて正確に定量することができる。第五に、試料中の多様な微生物集団を可視化することができる。

【0016】

PCRとは対照的に、FISHは生存している微生物のみを確実に検出する。PCRで得られるネイキッドDNA (naked DNA) または死んだ微生物による偽陽性の結果が、FISHでは起こらない。さらに、阻害物質の存在による偽陰性の結果も、細菌混入のために生じる偽陽性の結果と同様に除かれる。

【0017】

従って、FISH技術は、試料中における微生物を直接的に検出するための、迅速かつ高い特異性の両方を有するすぐれた手段である。培養法とは対照的に、直接的であり、さらに試料中に存在する微生物を定量することも可能である。

【0018】

故に、本発明で取り扱う問題は、特にヒトと接触する微生物または微生物群を、これらの微生物を迅速かつ任意に試料中にて定量することができ、さらに個々の種または微生物種の群を、他の微生物の同時存在にもかかわらず安全に検出することができるような方法にて検出することを可能にした。

【0019】

上述の問題は、皮膚に生じる少なくとも一種または数種の微生物に対する数なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む、微生物を検出するためのキットにより解決され、本発明のキットを用いる方法の提供により解決された。

【0020】

本発明にて、「皮膚」とは、ヒトの皮膚および/または動物の皮膚あるいは粘膜、ならびに皮膚付着物(髪、毛包、爪、分泌腺)であると理解される。

【0021】

本発明にて、用語「微生物群」とは、同じ属に属するか、非常によく似たrRNAを有するかどちらかの、少なくとも2つの種の微生物を含むと解される。例えば、本発明の微生物群は、1つの属のすべての種を含むことも可能である。

【0022】

本発明によれば、微生物群を探索すること、例えばそれらの発生または他のパラメーターにより探し出すこともまた望ましい。この例として、皮膚に存在する1つの属(例えばコリネバクテリウム属(*Corynebacterium*))の多くの種またはすべての種を、この属(この場合は、コリネバクテリウム属)から選択された1群の種と判断することもできる。

【0023】

本発明のキットまたは装置一式は、1つの特定の種に対するオリゴヌクレオチド、一種に対するいくつかのオリゴヌクレオチド、数種の微生物に対する1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドと、2つまたはそれ以上の微生物群に対するいくつかのオリゴヌクレオチドを共に含むことができる。故に、例えばコリネバクテリウム属の任意の群に対する1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチド、例えばプロピオニバクテリウム・アクネス属(*Propionibacterium acnes*)を検出するための1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドを、1つのキットに含ませることができる。

【0024】

特に好ましい態様にて、1つの属のすべての微生物を検出するために、1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドあるいはそれらの組合せを本発明のキットに用いることができる。これは、今まで培養することが困難または不可能であり、あるいはそのような試料中にて検出することができなかつたある属の種でさえ、今や検出することができるという利点を有する。例えば、マラセチア属に対する特定のオリゴヌクレオチドを用いることで、試料中のこの真菌のすべての種を検出することができる。

【0025】

10

20

30

40

50

本発明のキットに含まれるオリゴヌクレオチドは、上記の微生物のたった一種に対して特に選択されてもよい。このようにして、その皮膚における存在が特定の疾患との関係で議論されているような特有の性質を有す微生物種を有利に検出することができる。そのような特異的なプローブを用い、同属の他の種および「配列類似」の微生物に加えて、それらが検出され得る。このことは、例えば、他のプロピオニバクテリア (propionibacteria) を含む試料中にて、プロピオニバクテリウム・アクネスに特異的なオリゴヌクレオチドを用いて、P. アクネスを正確かつ特異的に検出することができるため、アクネス属の調査に重要である。

【0026】

本発明にて、本発明のキットまたは装置一式は、例えば溶液中（例えば、緩衝溶液）または混合物（例えば、凍結乾燥状態）中に少なくとも1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。さらに、前記オリゴヌクレオチド類は、互いに一緒に存在しても良く、分かれて存在しても良い（例えば、異なる容器中に）。

10

【0027】

前記オリゴヌクレオチドは、検出される微生物の染色体DNAまたはエピソームDNA、あるいはmRNAまたはrRNAにも相補的であり得る。検出される微生物中にて1回以上の繰り返し (repetition frequency) 中に存在するドメインに相補的なオリゴヌクレオチドを選択することが有利である。検出される配列は、1細胞につき500~100,000回存在することが好ましく、具体的に好ましい態様にては、1,000~50,000回である。このため、rRNAを標的部として用いることが好ましく、なぜならば細胞中にリボソームは、それぞれの活性な細胞にてタンパク質合成部位として数千倍存在するからである。

20

【0028】

本発明にて、オリゴヌクレオチドは一般的に、12~1,000ヌクレオチド、好ましくは12~100ヌクレオチドであり、より好ましくは12~50ヌクレオチドであり、最も好ましくは16~25ヌクレオチドを含むDNAまたはRNAオリゴヌクレオチドであってよい。

【0029】

前記オリゴヌクレオチドは、適当な相補配列が、検出される微生物中に存在するかどうかにより選択される。前記配列は、一方では検出する微生物に特異的であり、他方では浸透オリゴヌクレオチドに実質的に接近可能である、すなわち例えばリボソームタンパク質またはrRNAの2次構造により覆われて（マスクされて）いないものが適している。

30

【0030】

特定の配列を選択することにより、微生物種、微生物属または微生物群を検出することが可能となる。15ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの場合、配列の相補性は100%なくてはならない。15ヌクレオチド以上を含むオリゴヌクレオチドの場合、1~数個の誤対合部位を含んでもよい。

【0031】

1つの具体的な態様にて、本発明のキットは皮膚に生息するマイクロフローラを検出するためのオリゴヌクレオチドを含んでいてよい。

40

他の利点は、検出される微生物を定量することができることである。こうして、まず、上述した微生物の皮膚マイクロフローラの絶対的かつ相対的な量の割合に関する知識を得ることができる。このことにより、医療または美容処置の結果、およびすべてのその効果を処置前、処置中ならびに処置後に測定することを可能にする。この点に関するもう一つの利点は、本発明の工程が生存細胞のみを検出することである。

【0032】

1つの具体的な好ましい態様にて、微生物がスタフィロコッカス属、ペプトストレプトコッカス属、プロピオニバクテリウム属 (Propionibacterium)、コリネバクテリウム属、ベイヨネラ属 (Veillonella)、マラセチア属またはスポロミュサ分類群 (Sporomusa taxon) から選択される。

50

【0033】

これまで、皮膚のマイクロフローラは既知の培養方法によってのみ調べられてきた。上述したそれらの方法の欠点のために、培養可能な細菌または菌類しか検出することができなかった。そのような種の例としては、スタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*)、スタフィロコッカス・エピダルミジス (*S. epidermidis*)、スタフィロコッカス・コーニイ (*S. cohnii*)、スタフィロコッカス・ヘモリチクス (*S. haemolyticus*)、スタフィロコッカス・ホミニス (*S. hominis*)、スタフィロコッカス・キャピチス (*S. capitis*)、スタフィロコッカス・ワーネリ (*S. warneri*)、スタフィロコッカス・サイウリ (*S. sciuri*)、スタフィロコッカス・スクレイフェリ (*S. schleiferi*)、スタフィロコッカス・インターメディウス (*S. intermedius*)、ベイヨネラ種、プロピオニバクテリウム・アクネス、マラセチア・スロフィエ (*Malassezia slooffiae*)、マラセチア・パチデルマチス (*M. pachydermatis*)、マラセチア・フルフル (*M. furfur*)、コリネバクテリウム・ミヌティシマム属 (*Corynebacterium minutissimum*)、コリネバクテリウム・アミコラタム属 (*C. amycolatum*)、コリネバクテリウム・ストリアタム (*C. striatum*) およびコリネバクテリウム・セロシス (*C. xerosis*) が含まれる。

10

【0034】

本発明のオリゴヌクレオチドを添加することにより、上述のこれらのおよび他の属の種を定性的のみならず、定量的に検出することができる。この定量情報は、とりわけ活性成分の試験または皮膚疾患の早期診断に有用である。

【0035】

さらに、特に配列番号：19～30と同じまたは類似の配列を有するオリゴヌクレオチドを含む本発明のキットを用いることで、同じ属に属したとしても、その属のある種と同時に他の微生物種を検出することが可能となる。

20

既述のように、皮膚に生じる微生物種のさらに十分な知識が、新しい活性原理の探索においてとりわけ重要である。

【0036】

本発明の1つの具体的な態様にて、微生物の検出をインサイチュ・ハイブリダイゼーションにより行い、より好ましくは蛍光インサイチュ・ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization) により行う。蛍光インサイチュ・ハイブリダイゼーションによる微生物の分析の利点、すなわち培養工程の削除および微生物の定量化の可能性、はすでに詳細に記載した。

30

【0037】

FISH技術による様々な微生物集団の定量化もまた、利点がある。決定した細胞数から、その後、とりわけ、異なる微生物の集団の相互作用についての結論を引出し、例えば治療目的またはその他の手段に関してそれらを検討することが可能である。特に、いくつかの異なる微生物集団または種を、一度にかつ同時に検出することができるように、様々なマーカーを異なるオリゴヌクレオチドに結合することができる。例えば、いくつかのオリゴヌクレオチドを含む1つのキットを、様々な種または種の群に対して用いることが有利である。

【0038】

具体的な好ましい態様にて、本発明のキットは、プロピオニバクテリウム・アクネス種に対する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

40

既述のように、プロピオニバクテリウム・アクネスを検出するためのキットは、解明すべきにきびの臨床像において、皮膚の他の微生物に対する有効性および有害性について試験すべき新規な抗にきび剤、および開発すべき新しい治療または早期検出法の連結を可能とする。

【0039】

さらに、プロピオニバクテリウム・アクネス種に対するヌクレオチドの他に、本発明のキットは、他の微生物群または種に対する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドも含むことができる。

50

にきび皮膚はしばしば、他の微生物（特に、スタフィロコッカス属またはストレプトコッカス属の微生物）による二次感染を示す。そのような二次感染の早期の識別は、処置の点で非常に価値があり、例えば早期処置により極めて弱い感染形状にすることが可能である。

【0040】

具体的な好ましい態様にて、本発明のキットおよび装置一式は、プロピオニバクテリウム・アクネス種に対する少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、およびスタフィロコッカス種に対する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

もう1つの具体的な好ましい態様にて、本発明のキットは、少なくとも一種または数種のマラセチアに対する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

10

【0041】

酵母マラセチアは、特に皮膚の剥離、例えば頭皮の剥離への関与が推測されている。この点に関する新しい知見は、本発明のキットにより、キットを用いたふけの有無についてボランティアを試験し、その結果を比較することにより与えられ得る。臨床の試料を、本発明のキットを用いてマラセチアについて試験することもできる。

【0042】

1つの具体的な態様にて、オリゴヌクレオチドは、検出可能なマーカー（好ましくは、蛍光マーカー）を担持しており、より好ましくは、それはオリゴヌクレオチドと共有結合している。オリゴヌクレオチドと標的配列の完全なハイブリダイゼーションの検出可能性は、微生物の同定および任意の定量化のための前段要件である。より具体的には、これは多くの場合、オリゴヌクレオチドに対する検出可能なマーカーの共有結合により達成される。用いられる検出可能なマーカーは、蛍光群であることが多く、例えばCy-2、Cy-3またはCy-5（Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA）、FITC（フルオレセイン・イソチオシアネート）、CT（5, (6)-カルボキシテトラメチルローダミン-N-ヒドロキシスクシニミド・エステル（Molecular Probes Inc., Eugene, USA））、TRITC（テトラメチルローダミン-5,6-イソチオシアネート（Molecular Probes Inc., see above））またはFLUOS（5, (6)-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシニイミド・エステル（Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany））である。または、化学発光性の基または放射活性マーカー、例えば、³⁵S、³²P、³³P、¹²⁵Iを用いることができる。しかし、オリゴヌクレオチドと酵素的活性分子、例えばアルカリ・ホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、-D-ガラクトシダーゼまたはグルコース・オキシダーゼのカップリングにより検出能を達成することもできる。これらの酵素それぞれに多数の既知の発色体があり、それらは天然基質の代わりに反応し、着色または蛍光産物を供することができる。そのような発色体の例を、以下の表1に一覧とする。

20

30

【表 1】

表1

酵素	発色体	
アルカリホスファターゼ と酸性ホスファターゼ	4-メチルルンペリフェリル ホスフェート (*), ビス (4-メチルルンペリフェリル ホスフェート), (*), 3-O-メチルフルオレセイン , フラボン -3- ジホスフェート トリアンモニウム塩 (*), p- ニトロフェニルホスフェート ジソディウム塩	10
ペルオキシダーゼ	チラミン ヒドロクロライド (*), 3-(p- ヒドロキシフェニル)- プロピオン酸 (*), p- ヒドロキシフェニル アルコール (*), 2,2'- アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン スルホン酸) (ABTS), オルト- フェニレンジアミン ジヒドロクロライド , o- ジアニシジン , 5- アミノサリチル酸 , p- クレゾール (*), 3,3'-ジメチルオキシベンジジン, 3-メチル -2- ベンゾチアゾリン ヒドラジン , テトラメチルベンジジン	20 30
ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ	H_2O_2 + ジアンモニウム ベンジジン H_2O_2 + テトラメチル ベンジジン	
β -D- ガラクトシダーゼ	o- ニトロフェニル - β -D- ガラクトピラノシド , 4-メチルルンペリフェリル- β -D-ガラクトシド	40
グルコース・オキシダーゼ	ABTS, グルコース と チアゾリル ブルー	

* 蛍光

【0043】

最後に、ハイブリダイゼーションに適したもう1つの核酸配列が、その5'末端または3'末端に存在するように、オリゴヌクレオチドを設計することができる。この核酸配列も同様に、約15~1,000ヌクレオチド、好ましくは15~50ヌクレオチドを含む。この第二の核酸領域は、上述した方法の1つにより検出可能なオリゴヌクレオチドによ

り順に認識され得る。

【0044】

もう一つの可能性は、検出可能なオリゴヌクレオチドとハプテンの連結（カップリング）であって、ハプテンはそれを認識する抗体と順次接触し得る。ジゴキシゲニンを、そのようなハプテンの例として記載することができる。記載した以外の他の例は、専門家によく知られている。

【0045】

さらに具体的には、酵素マーカーは、ペルオキシダーゼ、好ましくはホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、およびホスファターゼ、好ましくはアルカリ・ホスファターゼからなる群から選択される。

10

【0046】

好ましい態様にて、キットは、以下：

i) 配列番号：01～30に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

ii) 少なくとも80%、好ましくは少なくとも84%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは95%のヌクレオチドが、i)のオリゴヌクレオチドと一致するオリゴヌクレオチド、

iii) i)およびii)のいずれかに記載の1つのオリゴヌクレオチドに由来し、1つまたはそれ以上のヌクレオチドがその配列から欠失されているか、または伸長されているオリゴヌクレオチド、および

iv) ストリンジェントな条件下でi)、ii)またはiii)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

20

からなる群から選択される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

【0047】

配列番号：01～18に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、およびそれと少なくとも80%のヌクレオチド、好ましくは少なくとも84%のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも90%のヌクレオチド、最も好ましくは95%のヌクレオチドが一致するオリゴヌクレオチドに加えて、本発明は、1つまたはそれ以上のヌクレオチドが伸長または欠失されている、上述のオリゴヌクレオチドに由来するオリゴヌクレオチドも包含する。

【0048】

さらに、配列番号：19～30に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、およびそれと少なくとも77%のヌクレオチド、好ましくは少なくとも83%のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも88%のヌクレオチド、最も好ましくは94%のヌクレオチドが一致するオリゴヌクレオチドに加えて、本発明は、1つまたはそれ以上のヌクレオチドが伸長または欠失されている、上述のオリゴヌクレオチドに由来するオリゴヌクレオチドも包含する。

30

【0049】

より好適には1～40ヌクレオチド、好ましくは1～25ヌクレオチド、より好適には1～15ヌクレオチドを、上述のオリゴヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に付着することも可能である。

本発明により、1～7ヌクレオチド、好ましくは1～5ヌクレオチド、より好ましくは1～3ヌクレオチド、例えば該配列由来の1または2ヌクレオチドを欠失した上述のオリゴヌクレオチド由来のオリゴヌクレオチドを用いることもできる。

40

【0050】

1つの具体的な利点は、相応に（対応させて）選択したオリゴヌクレオチドの高い特異性である。よって、属の個々の種が高い特異性で検出され得る場合、微生物の任意の属または群を特異的に検出することができる。

【0051】

本発明のキットまたは装置一式は、皮膚に生じる微生物の迅速かつ効率的な検出に用いることができ、より好適にはFISH法を用いることができる。オリゴヌクレオチド配列を、他の方法、例えば遺伝子チップ上に固定化するプローブとして用いることもできる。

【0052】

50

1つの具体的な態様にて、本発明のキットは、

i) a) 配列番号：01～03に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のように対応するオリゴヌクレオチド、

c) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のように対応するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択されるスタフィロコッカス属の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

ii) a) 配列番号：04～06および27～29に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のよう一致するオリゴヌクレオチド、

c) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のよう一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択されるペプトストレプトコッカス属の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

iii) a) 配列番号：07～12および19～26に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のよう一致するオリゴヌクレオチド、

c) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のよう一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択されるコリネバクテリウム属の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

iv) a) 配列番号：13～15に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のよう一致するオリゴヌクレオチド、

c) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のよう一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択されるベイヨネラ属の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

v) a) 配列番号：16および17に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のii)に記載のよう一致するオリゴヌクレオチド、

c) a)のオリゴヌクレオチドと請求項10のiii)に記載のよう一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下でa)、b)またはc)のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

10

20

30

40

50

からなる群から選択されるプロピオニバクテリウム・アクネス種の細菌を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

v i) a) 配列番号 : 18 に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項 10 の i i) に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項 10 の i i i) に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下で a)、b) または c) のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択されるマラセチア属の菌類を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

および/または

v i i) a) 配列番号 : 30 に示す配列を有するオリゴヌクレオチド、

b) a) のオリゴヌクレオチドと請求項 10 の i i) に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、

c) a) のオリゴヌクレオチドと請求項 10 の i i i) に記載のように一致するオリゴヌクレオチド、および

d) ストリンジェントな条件下で a)、b) または c) のオリゴヌクレオチドの1つに相補的な配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、

からなる群から選択されるスポロミュサ分類群由来の微生物を特異的に検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、

を含む。

【0053】

本発明のキットは、特に、スタフィロコッカス属、ペプトストレプトコッカス属、プロピオニバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バイヨネラ属、マラセチア属および/またはスポロミュサ分類群の微生物を特異的に検出することに適している。

【0054】

従って、グループ i) ~ v i i) 由来の1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの以下の組合せは、本発明のキットとして使用することが可能である。このことは、例えば、グループ i)、i i)、i i i)、i v)、v)、v i) または v i i) の1つ由来の1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドを選択することを意味する。

【0055】

グループ i) 由来の1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドとグループ i i) 由来の1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの組合せ、および同様にグループ i) と i i i)、i) と i v)、i) と v)、i) と v i)、および i i) と v i i)、i i i) と i i i i)、i i i) と i v)、i i i) と v)、i i i) と v i)、および i i i i) と v i i i)、i v) と v)、i v) と v i)、i v) と v i i)、v) と v i)、v) と v i i)、および v i) と v i i i) 由来の1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの組合せを、本発明に包含する。

【0056】

グループ i)、i i) および i i i) 由来の1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの組合せ、ならびに同様に i) と i i) および i v) ; i) と i i) および v) ; i) と i i) および v i) ; i) と i i i) および i v) ; i) と i i i i) および v) ; i) と i i i i) および v i)、i) と i i i i) および v i i) ; i) と i v) および v) ; i) と i v) および v i) ; i) と i v) および v i i)、i) と v) および v i)、i) と v) および v i i) ; i i) と i i i) および i v) ; i i) と i i i i) および v) ; i i) と i i i i) および v i)、i i) と i i i i) および v

10

20

30

40

50

i i) ; i i) と i v) および v) ; i i) と i v) および v i) 、 i i) と i v) および v i i) ; i i) と v) および v i) 、 i i) と v) および v i i) ; i i i) と i v) および v) ; i i i) と i v) および v i) 、 i i i) と i v) および v i i) ; i i i) と v) および v i) 、 i i i) と v) および v i i) 、 ならびに i v) と v) および v i) 、 i v) と v) および v i i) 、 i v) と v i) および v i i) 、 v) と v i) および v i i) 由来の 1 つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの組合せもまた、本発明に用いることができる。

【 0 0 5 7 】

4 つのグループ、すなわち、グループ i) と i i) 、 i i i) および i v) ; i) と i i) 、 i i i) および v) ; i) と i i) 、 i i i) および v i) ; i) と i i) 、 i i i) および v i i) ; i) と i i) 、 i v) および v) ; i) と i i) 、 i v) および v i) ; i) と i i) 、 v) および v i) ; i) と i i) 、 v) および v i i) ; i) と i i) 、 v i) および v i i) ; i) と i i i) 、 i v) および v) ; i) と i i i) 、 i v) および v i) ; i) と i i i) 、 i v) および v i i) ; i) と i i i) 、 v) および v i) ; i) と i i i) 、 v) および v i i) ; i) と i v) 、 v) および v i) ; i) と i v) 、 v) および v i i) ; i) と i v) 、 v i) および v i i) ; i i) と i i i) 、 i v) および v) ; i i) と i i i) 、 i v) および v i) ; i i) と i i i) 、 i v) および v i i) ; i i) と i i i) 、 v) および v i) ; i i) と i i i) 、 v) および v i i) 、 または i i i) と i v) 、 v) および v i) ; i i i) と i v) 、 v) および v i i) 、 i i i) と i v) 、 v i) および v i i) それぞれから選択される 1 つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの組合せもまた、本発明に包含される。

【 0 0 5 8 】

5 つのグループ、すなわち、i) と i i) 、 i i i) 、 i v) および v) ; i) と i i) 、 i i i) 、 i v) および v i) ; i) と i i) 、 i i i) 、 i v) および v i i) ; i) と i i) 、 i i i) 、 v) および v i) ; i) と i i) 、 i i i) 、 v) および v i i) ; i) と i i i) 、 i v) 、 v) および v i) ; i) と i i i) 、 i v) 、 v) および v i i) ; i) と i i) 、 i v) 、 v) および v i) ; i) と i i) 、 i v) 、 v) および v i i i) ; i) と i i) 、 i v) 、 v i) および v i i) ; i i) と i i i) 、 i v) 、 v) および v i) ; i i) と i i i) 、 i v) 、 v) および v i i) 由来の 1 つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの組合せもまた、本発明に包含される。

【 0 0 5 9 】

6 つのグループ、すなわち、i と i i) 、 i i i) 、 i v) 、 v) および v i) ; i) と i i) 、 i i i) 、 i v) 、 v) および v i i) ; i) と i i i) 、 i v) 、 v) 、 v i) および v i i) ; i i) と i i i) 、 i v) 、 v) 、 v i) および v i i) 由来の 1 つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの組合せ、ならびに 7 つすべてのグループ由来の 1 つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドの組合せもまた、本発明に包含される。

【 0 0 6 0 】

従って、本発明のキットは、微生物種または微生物群を検出するために適している。例えば、この目的のために i) のオリゴヌクレオチドの 1 つまたはそれ以上が、スタフィロコッカスの任意の種を検出するために選択される。

【 0 0 6 1 】

さらに一方で、上述した様々な属の微生物の種および / または群の検出を、適切なキットの組合せ (記載した可能性のある組合せ) によりもう一つと同時におよび / または一緒に行うことができることが有利である。例えば、オリゴヌクレオチドの適切な組合せを用いて、スタフィロコッカス属の微生物の検出 (i) のオリゴヌクレオチドの 1 つまたはそれ以上を選択することによる) を、コリネバクテリウム属の微生物の検出 (i i i) のオリゴヌクレオチドの 1 つまたはそれ以上を選択することによる) と同時に、および / または一緒に行うことができる。様々な組合せにより、本キットを個々に特定の要件に合うように構成することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

より具体的には、本発明のキットは、スタフィロコッカス属の微生物を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチドであり、rRNAと相補的なオリゴヌクレオチドおよび配列番号：01～03に示す配列を有するオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。

【 0 0 6 3 】

記載したオリゴヌクレオチドはそれぞれ、以下のスタフィロコッカス属の種の少なくとも1つを検出する：スタフィロコッカス・アウレウス属 (*S. aureus*)、スタフィロコッカス・エピダルミジス (*S. epidermidis*)、スタフィロコッカス・サッカロリティクス (*S. saccharolyticus*)、スタフィロコッカス・カブラエ (*S. caprae*)、スタフィロコッカス・キャピチス (*S. capitis*)、スタフィロコッカス・ワーネリ (*S. warneri*)、スタフィロコッカス・パステューリ (*S. pasteurii*)、スタフィロコッカス・アーレッテ (*S. arlettae*)、スタフィロコッカス・ガリナルム (*S. gallinarum*)、スタフィロコッカス・コーニイ (*S. cohnii*)、スタフィロコッカス・サッシヌス (*S. succinus*)、スタフィロコッカス・クルーシイ (*S. kloosii*)、スタフィロコッカス・サブロフィティクス (*S. saprophyticus*)、スタフィロコッカス・エクロラム (*S. equorum*)、スタフィロコッカス・キシロシス (*S. xylosus*)、スタフィロコッカス・ヘモリチクス (*S. haemolyticus*)、スタフィロコッカス・ホミニス (*S. hominis*)、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス (*S. lugdunensis*)、スタフィロコッカス・クロモゲネス (*S. chromogenes*)、スタフィロコッカス・アウリクラリス (*S. auricularis*)、スタフィロコッカス・スクレイフェリ (*S. schleiferi*)、スタフィロコッカス・サイウリ (*S. sciuri*)、スタフィロコッカス・レントス (*S. lentus*)、スタフィロコッカス・ビトゥルス (*S. vitulus*)、スタフィロコッカス・プルベリ (*S. pulveri*)、スタフィロコッカス・フェリス属 (*S. felis*)、スタフィロコッカス・ハイカス (*S. hyicus*)、スタフィロコッカス・ピスシファーマンタス (*S. piscifermentans*)、スタフィロコッカス・カルノシス (*S. carnosus*)、スタフィロコッカス・シムランス (*S. simulans*)、スタフィロコッカス・インターメディウス (*S. intermedius*)、スタフィロコッカス・デルフィニ (*S. delphini*)、スタフィロコッカス・ムスカ (*S. muscae*) およびスタフィロコッカス・コンディメンチ (*S. condimentii*)。

【 0 0 6 4 】

類似のrRNA配列を有するが、スタフィロコッカス属に属さない微生物は、これらのオリゴヌクレオチドにより検出されないことが好都合である：パエニバチルス・ポリミキサ (*Paenibacillus polymyxa*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・マイコデス (*Bacillus mycoides*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、ブルクホリデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*)、バクテロイド・ユニホルミス (*Bacteroides uniformis*) およびペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*)。これは、特有の利点であり、プローブの高い特異性を示す。

【 0 0 6 5 】

配列番号：02に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、スタフィロコッカス属の微生物、より好適にはスタフィロコッカス・インターメディウス (*S. intermedius*)、スタフィロコッカス・デルフィニ (*S. delphini*)、スタフィロコッカス・ムスカ (*S. muscae*)、スタフィロコッカス・コンディメンチ (*S. condimentii*)、スタフィロコッカス・ピスシファーマンタス (*S. piscifermentans*)、スタフィロコッカス・カルノシス (*S. carnosus*)、スタフィロコッカス・スクレイフェリ (*S. schleiferi*)、スタフィロコッカス・フェリス (*S. felis*) およびスタフィロコッカス・シムランス (*S. simulans*)、好ましくはスタフィロコッカス・インターメディウス (*S. intermedius*) およびスタフィロコッカス・スクレイフェリ (*S. schleiferi*) を検出するために適している。

【 0 0 6 6 】

配列番号：01～02に示す配列を有する本発明のキット中のオリゴヌクレオチドの組

合せは、特に好ましい。この組合せは、少なくとも以下のスタフィロコッカス属の一種を検出する：スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピダルミジス (*S. epidermidis*)、スタフィロコッカス・カブラエ (*S. caprae*)、スタフィロコッカス・キャピチス (*S. capitis*)、スタフィロコッカス・ワーネリ (*S. warneri*)、スタフィロコッカス・パステューリ (*S. pasteurii*)、スタフィロコッカス・アーレッテ (*S. arlettae*)、スタフィロコッカス・ガリナルム (*S. gallinarum*)、スタフィロコッカス・コーニイ (*S. cohnii*)、スタフィロコッカス・サッシヌス (*S. succinus*)、スタフィロコッカス・クルーシイ (*S. kloosii*)、スタフィロコッカス・サプロフィティクス (*S. saprophyticus*)、スタフィロコッカス・エクロラム (*S. equorum*)、スタフィロコッカス・キシロシス (*S. xylosus*)、スタフィロコッカス・ヘモリチクス (*S. haemolyticus*)、スタ
 10
 スタフィロコッカス・ホミニス (*S. hominis*)、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス (*S. lugdunensis*)、スタフィロコッカス・クロモゲネス (*S. chromogenes*)、スタフィロコッカス・アウリクラリス (*S. auricularis*)、スタフィロコッカス・スクレイフェリ (*S. schleiferi*)、スタフィロコッカス・サイウリ (*S. sciuri*)、スタフィロコッカス・レントス (*S. lentus*)、スタフィロコッカス・ビトゥルス (*S. vitulus*)、スタフィロコッカス・プルベリ (*S. pulverii*)、スタフィロコッカス・インターメディウス (*S. intermedius*)、スタフィロコッカス・デルフィニ (*S. delphini*)、スタフィロコッカス・フェリス (*S. felis*)、スタフィロコッカス・ムスカ (*S. muscae*)、スタフィロコッカス・コンディメンチ (*S. condimentii*)、スタフィロコッカス・ピスシファーメンタス (*S. piscifermentans*)、スタフィロコッカス・カルモサス (*S. carnosus*) およびスタフィ
 20
 ロコッカス・シムランス (*S. simulans*)。

【0067】

より具体的には、本発明のキットは、ペプトストレプトコッカス属を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチドであり、rRNAに相補的なオリゴヌクレオチドおよび配列番号：04～06と27～29に示す配列を有するオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。

【0068】

最新の知見によれば、「ペプトストレプトコッカス属」という属名で知られる細菌は、より具体的にはアネロコッカス属 (*Anaerococcus*)、ペプトニフィルス属 (*Peptoniphilus*) およびフィネゴルリア属 (*Finegoldia*) といった様々なサブグループに配属すること
 30
 ができる。

【0069】

記載したオリゴヌクレオチドはそれぞれ、総称して「ペプトストレプトコッカス」として知られている以下のアネロコッカス属 (*Anaerococcus*)、ペプトニフィルス属 (*Peptoniphilus*) およびフィネゴルリア属 (*Finegoldia*) 種の少なくとも一つを検出する：ペプトニフィルス・アサッカロリティクス (*P. assaccharolyticus*)、ペプトニフィルス・ラクリマリス (*P. lacrimalis*)、ペプトニフィルス・ハレイ (*P. hareii*)、フィネゴルリア・マグナス (*F. magnus*)、アネロコッカス・テトラジウス (*A. tetradius*)、アネロコッカス・ヒドロジェナリス (*A. hydrogenalis*)、アネロコッカス・ラクトリティクス (*A. lactolyticus*)、アネロコッカス・オクトビウス (*A. octavius*) およびアネロコ
 40
 カス・バジマリス (*A. vaginalis*) を検出する。

【0070】

配列番号：04～06に示す配列を有するオリゴヌクレオチドが、特に好ましい。これらのオリゴヌクレオチドはそれぞれ、以下のペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococci*) の一種、より具体的にはアネロコッカス属 (*Anaerococcus*) の一種を少なくとも検出する：アネロコッカス・ヒドロジェナリス (*Anaerococcus hydrogenalis*)、アネロコッカス・ラクトリティクス (*A. lactolyticus*)、アネロコッカス・オクトビウス (*A. octavius*)、アネロコッカス・プレボッチ (*A. prevotii*)、アネロコッカス・テトラジウス (*Anaerococcus tetradius*) およびアネロコッカス・バジナリス (*A. vaginalis*)。

【0071】

以下に記載したペプトストレプトコッカス属種および類似の rRNA 配列を有するが、ペプトストレプトコッカス属に属さない他の微生物、特に具体的にはアネロコッカス属 (*Anaerococcus*) が、検出されないことが都合良い：ペプトニフィルス・ラクリマリス (*Peptoniphilus lacrimalis*)、ペプトストレプトコッカス・アネロピルス (*Peptostreptococcus anaerobius*)、フィネゴルリア・マグナス (*Finegoldia magnus*) およびルミノコッカス・プロダクツ (*Ruminococcus productus*)、ブレビバクテリウム・エピダーミジス (*Brevibacterium epidermidis*)、アビオトロファ・エレガンス (*Abiotropha elegans*) およびクロストリジウム・ハスチホルム (*Clostridium hastiforme*)。

【0072】

具体的な好ましい態様にて、本発明のキットは、配列番号：04に示す配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、「ペプトストレプトコッカス」の属名で知られる微生物の少なくとも以下の種を検出する：アネロコッカス・ヒドロジェナリス (*Anaerococcus hydrogenalis*)、アネロコッカス・ラクトリティクス (*A. lactolyticus*)、アネロコッカス・オクトビウス (*A. octavius*)、アネロコッカス・プレボッチ (*A. prevotii*) およびアネロコッカス・バジナリス (*A. vaginalis*)。

10

【0073】

より具体的には、本発明のキットはさらに、ペプトストレプトコッカス属の微生物を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチドであり、rRNAに相補的なオリゴヌクレオチドおよび配列番号：27～29に示す配列を有するオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。

20

【0074】

以下に記載のペプトストレプトコッカス属の一種、および類似の rRNA 配列を有するが、ペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococci*) に属さない他の微生物は、検出されないことが都合良い：ミクロモナス・ミクロス (*Micromonas micros*)、ヘルココッカス・クンジ (*Helcococcus kunzii*)、ヘルココッカス・オビス (*Helcococcus ovis*)。

【0075】

配列番号：27および28に示す配列を有するオリゴヌクレオチドが、特に好ましい。これらのオリゴヌクレオチドは、以下のペプトニフィルス属 (*Peptoniphilus*) の少なくとも一種を検出する：ペプトニフィルス・アサッカロリティクス (*Peptoniphilus assaccharolyticus*)、ペプトニフィルス・ハレイ (*P. hareii*)、ペプトニフィルス・インドリクス (*P. indolicus*) (より具体的には、ATCC 29427株および近親関係の株、すなわち非常に類似の rRNA を有する株) およびペプトニフィルス・ラクリマリス (*P. lacrimalis*)。

30

【0076】

類似の rRNA を有する以下の種は、これらのオリゴヌクレオチドにより検出されない：シュードモナス・サッカロフィラ (*Pseudomonas saccharophila*)、バリオボラックス・パラドクサス (*Variovorax paradoxus*)、フィネゴルリア・マグナ (*Finegoldia magna*)、スタフィロコッカス・エピダルミジス、プロピオニバクテリウム・アクネス、ミクロモナス・ミクロス (*Micromonas micros*)、ギャリコラ・バラネセ (*Gallicola baranese*)、アトポビウム・パルブラム (*Atopobium parvulum*)、ベイヨネラ・ディスパル、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、ならびにアネロコッカス属 (*Anaerococcus*) およびコリネバクテリウム属の一種。

40

【0077】

配列番号：28に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、特にペプトニフィルス・ラクリマリス (*Peptoniphilus lacrimalis*) 種の微生物を検出する。

配列番号：29に示す配列を有するオリゴヌクレオチドもまた、特に好ましい。総称して「ペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococci*)」として知られている微生物由来の、このオリゴヌクレオチドは、少なくともフィネゴルリア・マグナ (*Finegoldia magna*) を検出し、rRNA がこの種と非常によく似ている微生物も検出する。一方、以下の微生物は同時に検出されない：アネロコッカス・ヒドロジェナリス (*Anaerococcus hydrogenali*

50

s)、ペプトストレプトコッカス・アネロビルス (*Peptostreptococcus anaerobius*)、ペプトニフィルス・ラクリマリス (*Peptoniphilus lacrimalis*)、スタフィロコッカス・エピダルミジス、*Halocella cellulosilytica*、プロピオニバクテリウム・アクネス、ミクロモナス・ミクロス (*Micromonas micros*)、ベイヨネラ・ディスパル、シュードモナス・ブチダ (*Pseudomonas putida*)、ならびに *Anaerococcus* 属、コリネバクテリウム属および *Peptoniphilus* 属の他の一種。

【0078】

より具体的には、本発明のキットは、コリネバクテリウム属の微生物を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチドであり、rRNA に相補的なオリゴヌクレオチドおよび配列番号：07～12 に示す配列を有するオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。

10

【0079】

記載したオリゴヌクレオチドはそれぞれ、以下のコリネバクテリウム属の少なくとも一種を検出する：コリネバクテリウム・グルタミンカム (*C. glutamicum*)、コリネバクテリウム・リポフィロフラバム (*C. lipophiloflavum*)、コリネバクテリウム・グルクロノリチカム (*C. glucuronolyticum*)、コリネバクテリウム・マクジニレイ (*C. macginleyi*)、コリネバクテリウム・アコレンス (*C. accolensi*)、コリネバクテリウム・ファスチジオサム (*C. fastidiosum*)、コリネバクテリウム・セグメントサム (*C. segmentosum*)、コリネバクテリウム・アンモニアジェネス (*C. ammoniagenes*)、コリネバクテリウム・ミヌティシマム (*C. minutissimum*)、コリネバクテリウム・フラベッセンス (*C. flavescens*)、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・シュードジェニタリウム (*C. pseudogenitalium*)、コリネバクテリウム・ジェニタリウム (*C. genitalium*)、コリネバクテリウム・ムコファシエンス (*C. mucofaciens*)、コリネバクテリウム・オーリス (*C. auris*)、コリネバクテリウム・マイセトイデス (*C. mycetoides*)、コリネバクテリウム・シスチテジス (*C. cystitidis*)、コリネバクテリウム・ピロスム (*C. pilosum*)、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシス (*C. pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・アルセランス (*C. ulcerans*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*C. diphteriae*)、コリネバクテリウム・ビタルメン (*C. vitarumen*)、コリネバクテリウム・クッシェリ (コリネバクテリウム・クッシェリ (*C. kutscheri*))、コリネバクテリウム・ジェニタリウム (*C. genitalium*)、コリネバクテリウム・アルゲントランテン (*C. argentoratens*)、コリネバクテリウム・カルネ (*C. callunae*)、コリネバクテリウム・ボービス (*C. bovis*)、コリネバクテリウム・バリアビリス (*C. variabilis*)、コリネバクテリウム・アミコラタム (*C. amycolatam*)、コリネバクテリウム・ツベルカロステリカム (*C. tuberculostearicum*)、コリネバクテリウム・セロシス (*C. xerosis*)、コリネバクテリウム・マトルコッチ (*C. matruchotii*)、コリネバクテリウム・ジェイケイウム (*C. jeikeium*)、コリネバクテリウム・エフィシエンス (*C. efficiens*)、コリネバクテリウム・ソムセニイ (*C. thomsenii*)、コリネバクテリウム・ニグリカンス (*C. nigricans*)、コリネバクテリウム・オーリスカニス (*C. auriscanis*)、コリネバクテリウム・モーレパーケンス (*C. mooreparkense*)、コリネバクテリウム・カゼイ (*C. casei*)、コリネバクテリウム・カンボリーセンシシ (*C. camporealensis*)、コリネバクテリウム・サンドスバセンス (*C. sundsvallense*)、コリネバクテリウム・マスチジス (*C. mastidis*)、コリネバクテリウム・イミタンス (*C. imitans*)、コリネバクテリウム・リエジェリイ (*C. riegelii*)、コリネバクテリウム・アスペルム (*C. asperum*)、コリネバクテリウム・フレニイ (*C. freneyi*)、コリネバクテリウム・ストリアタム (*C. striatum*)、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*) およびコリネバクテリウム・シムランス (*C. simulans*)。

20

30

40

【0080】

類似の rRNA 配列を有するが、コリネバクテリウム属に属さない以下の微生物は、これらのオリゴヌクレオチドにより検出されないことが都合良い：クロストリジウム・アセ

50

トブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、ユーバクテリウム・モニリホルム (*Eubacterium moniliforme*) およびフソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)。以下の皮膚マイクロフローラに属する細菌もまた、検出されない：ミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*)、ミクロコッカス・バリアンス (*Micrococcus varians*)、ミクロコッカス・ライエ (*Micrococcus lyae*)、アシネトバクター・カルコアセチスク (*Acinetobacter calcoaceticus*) およびストレプトコッカス・ポジェンス (*Streptococcus pyogenes*)。これは、重要な利点であり、プローブの高い特異性を示している。

【0081】

配列番号：10に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、コリネバクテリウム・ストリアタム種 (*C. striatum*) および/またはコリネバクテリウム・セロシス種 (*C. xerosis*) のコリネバクテリアを検出するために特に好ましい。

さらに、配列番号：11に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、コリネバクテリウム・ジェイケイウム種 (*C. jeikeium*) のコリネバクテリアを検出するために用いられる。

【0082】

具体的な好ましい態様にて、本発明のキットは、配列番号：07、08、10および11に示す配列を有するオリゴヌクレオチドの組合せを含む。この組合せは、コリネバクテリウム属の少なくとも以下の種を検出する：コリネバクテリウム・グルタミカム (*C. glutamicum*)、コリネバクテリウム・リポフィロフラバム (*C. lipophiloflavum*)、コリネバクテリウム・グルクロノリチカム (*C. glucuronolyticum*)、コリネバクテリウム・マクジニレイ (*C. macginleyi*)、コリネバクテリウム・アコレンス (*C. accolensi*)、コリネバクテリウム・ファスチジオサム、コリネバクテリウム・セグメントサム (*C. segmentosum*)、コリネバクテリウム・アンモニアジェネス (*C. ammoniagenes*)、コリネバクテリウム・ミヌティシマム (*C. minutissimum*)、コリネバクテリウム・フラベッセンス (*C. flavescens*)、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・シュードジェニタリウム (*C. pseudogenitalium*)、コリネバクテリウム・ジェニタリウム (*C. genitalium*)、コリネバクテリウム・ムコファシエンス (*C. mucofaciens*)、コリネバクテリウム・オーリス (*C. auris*)、コリネバクテリウム・マイセトイデス (*C. mycetoides*)、コリネバクテリウム・システジス (*C. cystitidis*)、コリネバクテリウム・ピロスム (*C. pilosum*)、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシス (*C. pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・アルセランス (*C. ulcerans*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*C. diphtheriae*)、コリネバクテリウム・カンボリーセンシシ (*C. camporealensis*)、コリネバクテリウム・ビタルメン (*C. vitarumen*)、コリネバクテリウム・クッシェリ (*C. kutscheri*)、コリネバクテリウム・アルゲントランテン (*C. argentoratensis*)、コリネバクテリウム・カルネ (*C. callunae*)、コリネバクテリウム・ボービス (*C. bovis*)、コリネバクテリウム・レナル (*C. renale*)、コリネバクテリウム・リエジェリイ (*C. riegelii*)、C. コリネバクテリウム・バリアビリス (*C. variabilis*)、コリネバクテリウム・アミコラタム (*C. amycolatium*)、コリネバクテリウム・ツベルカロステリカム、コリネバクテリウム・セロシス (*C. xerosis*)、コリネバクテリウム・マトルコッチ (*C. matruchotii*)、コリネバクテリウム・ジェイケイウム (*C. jeikeium*)。

【0083】

1つの具体的な態様にて、本発明のキットはさらに、コリネバクテリウム属の微生物を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチドであり、rRNAに相補的なオリゴヌクレオチドおよび配列番号：19～26に示す配列を有するオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。

【0084】

記載したオリゴヌクレオチドはそれぞれ、以下のコリネバクテリウム属の少なくとも一種を検出する：コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・ジェニタリウム、コリネバ

クテリウム・ムチファシエンス (*C. mucifaciens*)、コリネバクテリウム・アミコラタム (*C. amycolatum*)、コリネバクテリウム・ツベルカロステリカムおよびコリネバクテリウム・リエジェリイ (*C. riegelii*)。これらのオリゴヌクレオチドは、コリネバクテリウム属の一種と非常に近親の関係にある1つまたはそれ以上の群を特異的に検出することに適している。

【0085】

類似の rRNA 配列を有する以下の微生物は、これらのオリゴヌクレオチドにより検出されないことが都合良い：クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、ユーバクテリウム・ユーリ (*Eubacterium yurii*) およびフソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)。皮膚マイクロフローラに属する以下の細菌もまた、検出されない：ミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*)、ミクロコッカス・バリアンス (*Micrococcus varians*)、ミクロコッカス・ライエ (*Micrococcus lyae*)、アシネトバクター・カルコアセチスク (*Acinetobacter calcoaceticus*) およびストレプトコッカス・ボジェンス (*Streptococcus pyogenes*)。これは、重要な利点であり、プローブの高い特異性を示している。

10

【0086】

具体的な好ましい態様にて、配列番号：19に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、コリネバクテリウム属由来の微生物のグループを検出するために用いられる。コリネバクテリウム属は、コリネバクテリウム・ツベルカロステリカム (より具体的には、ATCC 35692) または CDC G5840 (Acc. No. X80498) という名称の株の周囲のグループ、および非常によく似た rRNA を有する微生物、すなわちその微生物と非常に近親の関係の微生物またはその rRNA が、記載したオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする部分にて記載した微生物の rRNA と類似および/または完全に一致しているあるいはほとんど一致している (すなわち、1つまたはそれ以上のヌクレオチド、好ましくは1つから3つのヌクレオチドの違いを有する) 微生物により形成されている。

20

【0087】

このプローブは、コリネバクテリウム・ツベルカロステリカムを検出することに都合良く、以下の非常によく似た rRNA を有するコリネバクテリウム属の一種は、より遠縁の関係のコリネバクテリウム属の一種であり検出されない：コリネバクテリウム・ミニティシマム (*C. minutissimum*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*C. diphtheriae*)、コリネバクテリウム・ストリアタム (*C. striatum*)、コリネバクテリウム・セロシス (*C. xerosis*)、コリネバクテリウム・ファスチジオサム、コリネバクテリウム・カンポリーセンシシ (*C. camporealensis*)、コリネバクテリウム・アコレンス (*C. accolensi*)、コリネバクテリウム・シュウドジェニタリウムおよびコリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・ジェイケイウム (*C. jeikeium*)、コリネバクテリウム・デュラム (*C. durum*)、コリネバクテリウム・ムチファシエンス、コリネバクテリウム・レナル (*C. renale*)、コリネバクテリウム・リエジェリイ (*C. riegelii*)、コリネバクテリウム・グルラミカム (*C. glutamicum*)、コリネバクテリウム・リポフィロフラバム (*C. lipophiloflavum*)、コリネバクテリウム・グルクロノリチカム (*C. glucuronolyticum*)、コリネバクテリウム・アンモニアジェネス (*C. ammoniagenes*)、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシス (*C. pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・クツシェリ (*C. kutscheri*)、コリネバクテリウム・カルネ (*C. callunae*) およびコリネバクテリウム・ウレアリチカム (*C. urealyticum*)。

30

40

【0088】

配列番号：20に示す配列を有するプローブは、コリネバクテリウム・アミコラタム属 (*C. amycolatum*) および近親の関係の種を特異的に検出するために、特に好ましい。このプローブは、コリネバクテリウム・アミコラタムおよび非常によく似た rRNA を有し、記載したオリゴヌクレオチドと rRNA ハイブリダイジングする部分にて誤対合はほとんどなく、好ましくは誤対合のないコリネバクテリウム属の一種を検出することに都合良

50

いが、以下のより遠縁の関係のコリネバクテリウム属の一種は検出しない：コリネバクテリウム・アスペルム、コリネバクテリウム・ジェイケイウム (*C. jeikeium*)、コリネバクテリウム・ボービス (*C. bovis*)、コリネバクテリウム・フレニイ (*C. freneyi*)、コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・デュラム (*C. durume*)、コリネバクテリウム・マトルコッチ (*C. matruchotii*)、コリネバクテリウム・ムチファシエンス、コリネバクテリウム・レナル (*C. renale*)、コリネバクテリウム・グルミカム (*C. glutamicum*) およびコリネバクテリウム・セロシス (*C. xerosis*)、およびさらにコリネバクテリウム・リポフィロフラバム (*C. lipophiloflavum*)、コリネバクテリウム・グルクロノリチカム (*C. glucuronolyticum*)、コリネバクテリウム・ミヌティシマム (*C. minutissimum*)、コリネバクテリウム・アンモニアジェネ 10
ス (*C. ammoniagenes*)、コリネバクテリウム・カンポリーセンシシ (*C. camporealensis*)、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシス (*C. pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・リエジェリイ (*C. riegelii*)、コリネバクテリウム・クツシェリ (*C. kutscheri*)、コリネバクテリウム・カルネ (*C. callunae*) およびコリネバクテリウム・ウレアリチカム (*C. urealyticum*)。

【 0 0 8 9 】

配列番号：21に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、微生物の任意の種、より具体的にはコリネバクテリウム属を検出するために特に好ましく、それは配列番号：31に示す16S rRNAの部分配列と少なくとも60%のヌクレオチド、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも 20
95%のヌクレオチドの相同性を有する。

【 0 0 9 0 】

このプローブは、上述のコリネバクテリウム属の一種を有利に検出するが、以下のより遠縁の関係のコリネバクテリウム属の種は検出しない：コリネバクテリウム・ジェニタリウム、コリネバクテリウム・ムチファシエンス、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・グルクロノリチカム (*C. glucuronolyticum*)、コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・シュードジェニタリウムおよびコリネバクテリウム・リポフィロフラバム (*C. lipophiloflavum*)、およびさらにコリネバクテリウム・アミコラタム (*C. amycolatum*)、コリネバクテリウム・ジェイケイウム (*C. jeikeium*)、コリネバクテリウム・デュラム (*C. durume*)、コリ 30
ネバクテリウム・レナル (*C. renale*)、コリネバクテリウム・ストリアータム (*C. striatum*)、コリネバクテリウム・グルミカム (*C. glutamicum*)、コリネバクテリウム・アコレンス (*C. accolensi*)、コリネバクテリウム・セロシス (*C. xerosis*)、コリネバクテリウム・ミヌティシマム (*C. minutissimum*)、コリネバクテリウム・カンポリーセンシシ (*C. camporealensis*)、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシス (*C. pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・クツシェリ (*C. kutscheri*)、コリネバクテリウム・カルネ (*C. callunae*) およびコリネバクテリウム・ウレアリチカム (*C. urealyticum*)。

【 0 0 9 1 】

配列番号：23に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、コリネバクテリウム・アフエメンタンス種 (*C. afermentans*) のコリネバクテリウムを検出するために特に好ましい 40
。

このプローブは、コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*) および非常によく似たrRNAを有するコリネバクテリウム属の一種を検出することに都合良いが、以下のより遠縁の関係のコリネバクテリウム属の種は検出しない：コリネバクテリウム・ジェニタリウム (*C. genitalium*)、コリネバクテリウム・ムチファシエンス、コリネバクテリウム・アンモニアジェネス (*C. ammoniagenes*)、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・グルクロノリチカム (*C. glucuronolyticum*)、コリネバクテリウム・リエジェリイ (*C. riegelii*)、コリネバクテリウム・ソムセニイ、コリネバクテリウム・シュードジェニタリウム (*C. pseudogenitalium*) およびコリ 50

ネバクテリウム・リポフィロフラバム (*C. lipophiloflavum*)、およびさらにコリネバクテリウム・アミコラタム (*C. amycolatum*)、コリネバクテリウム・ジェイケイウム (*C. jeikeium*)、コリネバクテリウム・デュラム (*C. durum*)、コリネバクテリウム・レナル (*C. renale*)、コリネバクテリウム・ストリアタム (*C. striatum*)、コリネバクテリウム・グルラミカム (*C. glutamicum*)、コリネバクテリウム・アコレンス (*C. accolensi*)、コリネバクテリウム・セロシス (*C. xerosis*)、コリネバクテリウム・ミヌティシマム (*C. minutissimum*)、コリネバクテリウム・カンボリーセンシシ (*C. camporealensis*)、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*)、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシス (*C. pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・クツシェリ (*C. kutscheri*)、コリネバクテリウム・カルネ (*C. callunae*) およびコリネバクテリウム・ウレアリチカム (*C. urealyticum*)。 10

【0092】

配列番号：25に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、コリネバクテリウム・アフエメンタンス種 (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・ムチファシエンス種、コリネバクテリウム・コレイエ種 (*C. coyleiae*) および/または「コリネバクテリウム・ジェニタリウム」のコリネバクテリアを検出するために特に好ましい。

このプローブは、コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・ムチファシエンス、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*) および「コリネバクテリウム・ジェニタリウム (*C. genitalium*)」ならびに非常によく似た rRNA を有するコリネバクテリウム属の一種を有利に検出するが、以下のより遠縁の関係 20 のコリネバクテリウム属の一種は検出しない：コリネバクテリウム・セロシス (*C. xerosis*)、コリネバクテリウム・ジェイケイウム (*C. jeikeium*)、コリネバクテリウム・ウレアリチカム (*C. urealyticum*)、コリネバクテリウム・アミコラタム属 (*C. amycolatum*)、コリネバクテリウム・グルラミカム (*C. glutamicum*)、コリネバクテリウム・ストリアタム (*C. striatum*)、コリネバクテリウム・アコレンス (*C. accolensi*)、コリネバクテリウム・レナル (*C. renale*)、コリネバクテリウム・アンモニアジェネス (*C. ammoniagenes*) およびコリネバクテリウム・クツシェリ (*C. kutscheri*)、およびさらにコリネバクテリウム・グルクロノリチカム (*C. glucuronolyticum*)、コリネバクテリウム・カンボリーセンシシ (*C. camporealensis*)、コリネバクテリウム・シュードツベルクローシス (*C. pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・デュラム (*C. durum*)、コ 30 リネバクテリウム・ミヌティシマム (*C. minutissimum*)、コリネバクテリウム・リポフィロフラバム (*C. lipophiloflavum*)、コリネバクテリウム・カルネ (*C. callunae*) およびコリネバクテリウム・ソムセニイ。

【0093】

さらに、このオリゴヌクレオチドは、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) に属さず、非常によく似た rRNA を有する以下の微生物も検出しない：ナノムレア・ファスチジオサ (*Nanomurea fastidiosa*)、ミクロモノスポラ・エキノスポラ (*Micromonospora echinospora*)、アビオトロファ・エレガンス (*Abiotropha elegans*) およびアルカノバクテリウム・ピオゲネス (*Arcanobacterium pyogenes*)。 40

【0094】

配列番号：26に示す配列を有するプローブは、コリネバクテリウム・リエゲリ (*C. rieggelli*) を特異的に検出するために特に好ましい。

【0095】

具体的な態様にて、本発明のキットは、ベイヨネラ属の微生物を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチドであり、rRNA と相補的なプローブおよび配列番号：13～15に示す配列を有するオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるプローブを含む。

【0096】

記載したオリゴヌクレオチドはそれぞれ、以下のベイヨネラ属の少なくとも一種を検出する：ベイヨネラ・ディスパル (*V. dispar*)、ベイヨネラ・パーバラ (*V. parvula*) およびベイヨネラ・アティピカ (*V. atypica*)。ベイヨネラ属は、系統樹にて大部分が単離 50

されているため、非標的微生物は検出されないことが都合良い。

【0097】

具体的に好ましい態様にて、本発明のキットは、配列番号：13～14に示す配列を有するオリゴヌクレオチドの組合せを含む。この組合せは、以下のベイヨネラ属の少なくとも一種を検出する：ベイヨネラ・ディスパル (*V. dispar*)、ベイヨネラ・パーバラ (*V. parvula*) およびベイヨネラ・アティピカ (*V. atypica*)。

【0098】

より具体的には、本発明のキットは、プロピオニバクテリウム・アクネス種の微生物を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチドであり、rRNAに相補的なプローブおよび配列番号：16～17に示す配列を有するオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるプローブを含む。

10

【0099】

記載したオリゴヌクレオチドはそれぞれ、プロピオニバクテリウム・アクネス種を特異的に検出する。

具体的に好ましいキットは、配列番号：16に示す配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0100】

類似のrRNA配列を有するがプロピオニバクテリウム・アクネス種に属さない微生物は、検出されないことが都合良い：プロピオニバクテリウム・プロピオニクス (*P. propionicus*)、プロピオニバクテリウム・グラニューローサ (*P. granulorum*)、プロピオニバクテリウム・アビダム (*P. avidum*)、プロピオニバクテリウム・フレウデンレイッチイ (*P. freudenreichii*)、プロピオニバクテリウム・トエニ (*P. thoeni*)、プロピオニバクテリウム・リンフォフィルス (*P. lymphophilus*)、コリネバクテリウム・ミヌティシマム (*C. minutissimum*)、サッカロモノスポラ・ビリディス (*Saccharomonospora viridis*)、ノカルディオデス種 (*Nocardiodetes*)、プロピオニフェラクス・イノキュア (*Propioniferax innocua*)、ゴードニア・スプッチ (*Gordonia sputi*) およびアツカノバクテリウム (*Arcanobacterium*)。

20

【0101】

もう1つの具体的な態様にて、本発明のキットは、マラセチア属の微生物を特異的に検出するオリゴヌクレオチドであり、rRNAに相補的なオリゴヌクレオチドおよび配列番号：18に示す配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。

30

【0102】

記載したオリゴヌクレオチドは、以下のマラセチア属の少なくとも一種を検出する：マラセチア・スロフィエ、マラセチア・パチデルマチス (*M. pachydermatis*)、マラセチア・フルフル (*M. furfur*)。

類似のRNA配列を有するが、マラセチア属に属さない以下の微生物は、検出されないことが都合良い：カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans*) およびカンジダ・クルセイ (*Candida krucei*)。

【0103】

配列番号：30に示す配列を有するオリゴヌクレオチドは、スポロミュサ分類群の任意の微生物、好ましくはスポロミュサ分類群のサブグループおよび記載した微生物と非常によく似たrRNAを有する微生物から形成されるファスコラルクトバクテリウム属 (*Phascolarctobacterium*) およびアシダミノコッカス属 (*Acidaminococcus*) の微生物を検出するために特に好ましい。

40

【0104】

記載したオリゴヌクレオチドは、少なくともアシダミノコッカス・フェルメンタンス種 (*Acidaminococcus fermentans*)、ファスコラルクトバクテリウム・フェウム種 (*Phascolarctobacterium faecium*) および非常によく似たRNAを有する近親の關係の微生物を検出するが、以下の微生物は検出しない：ベイヨネラ種、ハロバチルス・ハロフィルス (*Halobacillus halophilus*)、スポロムサ・パウチボランス (*Sporomusa paucivorans*)、

50

マクロコッカス・カセオリチクス (*Macrococcus caseolyticus*)、アネロムサ・アシダミノフィラ (*Anaeromusa acidaminophila*)、ハロセラ・セルロシリチカ (*Halocella cellulosilytica*)、ペプトストレプトコッカス・アネロビルス (*Peptostreptococcus anaerobius*)、スクシクラスチカム・ルミニス (*Succiniclasticum ruminis*) およびスクシニスピラ・モビリス (*Succinispira mobilis*)。

【0105】

1つの具体的な好ましい態様にて、本発明のキットは、標識したオリゴヌクレオチドだけでなく、標識していないオリゴヌクレオチドも含み、微生物の検出に用いられ得る。標識していないオリゴヌクレオチドおよび標識したオリゴヌクレオチドの両方を含む試料のインキュベーションは、プローブの特異性を増大するために用いられることが好ましい。例えば、近親の関係の微生物種を、検出される微生物種と近親の関係にある検出されない微生物種に対する1つのオリゴヌクレオチドを用いて識別することができ、そのオリゴヌクレオチドは、選択された条件下で標識したプローブよりもrRNAの標的配列を有する検出されない微生物とよりハイブリダイズする。標識していないプローブが、標識したプローブよりも検出されない微生物のrRNAとよりハイブリダイズし、標識したプローブと検出されない微生物のrRNAの結合のために、標識していないオリゴヌクレオチド (competitor) の使用によって偽陽性結果が防止される。任意の微生物種または微生物群の特異的な検出がこうして可能となり、とりわけ非常によく似たrRNA配列を有する近親の関係である種の存在においても可能である。

10

【0106】

例えば、本発明にて、配列番号：22のオリゴヌクレオチドと一緒に配列番号：21のオリゴヌクレオチドを用いることが適当である。この場合、配列番号：21に示すオリゴヌクレオチドは標識されており、配列番号：22に示すオリゴヌクレオチドは標識されていないことが好ましい。故に、16S rRNA配列が配列番号：31に示す配列を含む微生物種は検出され得るが、同時にコリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*) を検出されなくすることが容易である (実施例の分析結果を参照のこと)。

20

【0107】

本発明にて、配列番号：23と24を共に有するオリゴヌクレオチドを用いることも、適当であろう。配列番号：23を有するオリゴヌクレオチドは、コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*) を検出するためのプローブとして標識して用いられ、配列番号：24のオリゴヌクレオチドは、配列番号：31に示す配列を含む16S rRNA配列の微生物種の非常によく似た標的配列を覆い隠している。

30

【0108】

さらに、配列番号：26のオリゴヌクレオチドは、配列番号：25のオリゴヌクレオチドと一緒に標識していない競合物質として用いることができる。この方法にて、系統樹にて互いに近親の以下のコリネバクテリウム属の一種は、検出することができる：コリネバクテリウム・アフエメンタンス (*C. afermentans*)、コリネバクテリウム・ジェニタリウム (*C. genitalium*)、コリネバクテリウム・ムチファシエンス、コリネバクテリウム・コレイエ (*C. coyleiae*) が、非常によく似たrRNA配列を有し、同時に検出されるコリネバクテリウム種のコリネバクテリウム・リエジェリイ (*C. riegelii*) は検出されない。

40

【0109】

本発明の具体的な好ましい態様にて、キットはさらに他の微生物種、群または属を検出するための少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

【0110】

配列番号：19~30の1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドに加えて、1つのキットは、スタフィロコッカス属、バイヨネラ属、マラセチア属および/またはプロピオニバクテリウム属の一種を検出するために1つまたはそれ以上の他のオリゴヌクレオチドを含むことが好ましい。様々な皮膚関連微生物を、1つの試料にて同時にまたは「並行して」、より好ましくは一回の工程にて検出することができることが都合良い。さらに、本明

50

細書に記載のオリゴヌクレオチド、特に配列番号：１～１８のオリゴヌクレオチドが、特に適している。

【０１１１】

例えば、配列番号：１９～３０の配列を有する１つまたはそれ以上あるいはすべてのオリゴヌクレオチドを添加したキットは、検出されるより多くの群の微生物を検出することを可能にする１つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドを含むことが、特に好ましい。

例えば、実際にまず、１つまたはそれ以上のプローブを用いてコリネバクテリウム属の微生物を含む試料を同定し、その後、コリネバクテリウム属の個々の微生物種または群に特異的な陽性試料を調べることが可能である。

【０１１２】

好ましいオリゴヌクレオチドが、コリネバクテリウム属の多くの異なる種を検出するため、好ましくはコリネバクテリウム属の皮膚関連種を検出するために用いられ、好ましくは組合せて用いられ、それらは配列番号：７～１２に示す配列を有するオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは配列番号：７、８、１０および１１であり、特に配列番号：７、８、１０および１１のオリゴヌクレオチドは同時に用いられる場合が好ましい。最後に、上述した配列番号：１９～２６のオリゴヌクレオチドの１つまたはそれ以上を、コリネバクテリウム属の所望の微生物の一種に依存してキットに添加しても良い。

【０１１３】

配列プロトコールの配列を、以下の表２に示す。

【表 2】
表2

配列番号	配列 5' → 3'	特異性
01	CAC ATC AGC GTC AGT TAC	スタフィロコッカス I
02	CAC ATC AGC GTC AGT TGC	スタフィロコッカス II
03	AAG CTT AAG GGT TGC GCT	スタフィロコッカス III
04	GCC TTC TAA ATC ACG CGG	ペプトストレプトコッカス I
05	AGC CCA AGT CAT AAA GGG	ペプトストレプトコッカス II
06	TAC ACT CTC TCA AGC CGG	ペプトストレプトコッカス III
07	AGC ACT CAA GTT ATG CCC	コリネバクテリウム I
08	AGT ACT CAA GTT ATG CCC	コリネバクテリウム II
09	AGC ACT CAA GTA ATG CCC	コリネバクテリウム III
10	AGC ACT CAA GTC A-G CCC	コリネバクテリウム IV
11	AGC ACT CTA GTT ATG CCC	コリネバクテリウム V
12	GGC CGG CTT TCA GCG ATT	コリネバクテリウム VI
13	GCT TCC ATC GCT CTT CGT	ベイヨネラ I
14	GTT CTG TCC ATC AAT GTC	ベイヨネラ II
15	TTC CGT CTA TTA ACT CCC	ベイヨネラ III
16	TCA CGC TTC GTC ACA GGC	プロビオニバクテリウム・アクネス
17	CAG GCT CGC CAC TCT CTG	プロビオニバクテリウム・アクネス
18	TAC GGC GAT TCC AAA AAC C	マラセチア
19	CAC ACT AAA AAT GGC TCC	コリネバクテリウム VII
20	TCC ACA CCA TGG TCC TAT	コリネバクテリウム VIII
21	CCA TCC AAA ATG CGG TCC	コリネバクテリウム IX
22	CCA TCC AAA ATG TGG TCC	コリネバクテリウム X
23	CAC CAT CCA AAA TGT GGT C	コリネバクテリウム XI
24	CAC CAT CCA AAA TGC GGT C	コリネバクテリウム XII
25	CTG CAG TCC CGC AGT TA	コリネバクテリウム XIII
26	CTG CAG TCC CAC AGT TA	コリネバクテリウム XIV
27	GCA TTT CCG CCT GCG AAC	ペプトストレプトコッカス IV
28	GCA TTG CCG CCT GCG AAC	ペプトストレプトコッカス V
29	CAC TAT ATA GCT T/GCC CTC	ペプトストレプトコッカス VI
30	CAT CTC AGC GTC AGA CAC	スポロミュサ分類群

10

20

30

40

本発明のキットは、重要な構成成分として（特にインサイチュ・ハイブリダイゼーション法にて用いられる場合に）検出される微生物に特異的なオリゴヌクレオチドを含む特定のハイブリダイゼーション溶液を含むことが可能である。さらに、オリゴヌクレオチドを含まない相当するハイブリダイゼーション溶液、および相当する洗浄溶液または相当する洗浄溶液の濃縮液を含んでいて良い。さらに、任意に酵素溶液、固定液、および任意に包埋液を含んでいて良い。陽性コントロールおよび陰性コントロールを同時に行うためのハイブリダイゼーション溶液（例えば、非ハイブリダイジング・オリゴヌクレオチドの添加の有無）は、任意に存在して良い。

【0115】

本発明の方法は、以下の工程を含む：

10

- a) 皮膚の試料を採取し、
- b) 採取した試料に存在する微生物を固定し、
- c) 固定化した微生物を少なくとも1つのオリゴヌクレオチドと一緒にインキュベートし、ハイブリダイゼーションを誘導し、
- d) ハイブリダイズしていないオリゴヌクレオチドを除去し、そして
- e) オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした微生物を検出し、場合により定量する。

【0116】

本発明にて、微生物の「固定」とは、微生物細胞壁がオリゴヌクレオチドに対して透過性になるように処置されることと解される。通常、エタノールを固定に用いる。細胞壁が、以下のこれらの手段のオリゴヌクレオチドにより透過性にされ得ない場合、同様の結果を導くのに十分な他の手段が専門家に知られている。これらには、例えば、メタノール、アルコールの混合液、希釈したパラホルムアルデヒド溶液または希ホルムアルデヒド溶液などが含まれる。

20

【0117】

本発明によれば、特に固定した細胞を「ハイブリダイゼーション」のために蛍光標識したオリゴヌクレオチドとインキュベートする。これらの標識したオリゴヌクレオチドは、任意に細胞壁を透過した後、オリゴヌクレオチドに相同的な標的配列にそれ自身が結合することができる。その結合は、相補的な核酸フラグメント間に水素結合を構築することであると解される。

30

【0118】

本発明のキットのオリゴヌクレオチドは、本発明の方法における適切なハイブリダイゼーション溶液と一緒に用いられる。この溶液の適切な構成成分は、専門家によく知られている。相当する溶液は、例えば、0%～80%の濃度のホルムアミド、好ましくは0%～45%の濃度のホルムアミド、より好ましくは20%～40%の濃度のホルムアミドを含み、かつ例えば、0.1 mol/l～1.5 mol/lの塩濃度、好ましくは0.5 mol/l～1.0 mol/lの塩濃度（塩としては、NaClが好ましい）、より好ましくは0.9 mol/lの塩濃度を有する。さらに、洗浄剤（一般的には、SDS）は、一般に0.001%～0.2%の濃度、好ましくは0.005%～0.1%の濃度、より好ましくは0.01%の濃度である。適切な緩衝物質（例えば、Tris-HCl、クエン酸ナトリウム、HEPES、PIPESなど）は、溶液をバッファリングしており、典型的に0.01 mol/l～0.1 mol/lの濃度、好ましくは0.01 mol/l～0.05 mol/lの濃度、より好ましくは0.02 mol/lの濃度である。ハイブリダイゼーション溶液のpHは、一般に6.0～9.0の間であり、好ましくは7.0～8.0の間、より好ましくは約8.0である。

40

【0119】

他の添加物としては、例えばハイブリダイゼーション反応における非特異的結合を防ぐためのサケ精子DNAまたはブロッキング試薬、あるいはハイブリダイゼーション反応を加速させるためのポリエチレン・グリコール、ポリビニル・ピロリドンまたは硫酸デキストランをも含んで用いることができる。さらに、すべての生存微生物および/または試料中に存在する微生物のDNAを着色するために、物質（例えば、DAPI、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩）を添加することもできる。相当する添加剤は、専門家

50

によく知られており、既知の典型的な濃度で添加することができる。

【0120】

ハイブリダイゼーション溶液中のオリゴヌクレオチドの濃度は、その標識の性質および標的構造物の数により決定される。迅速かつ効率的なハイブリダイゼーションを供するために、オリゴヌクレオチドの数を標的物質の数よりも桁違いに多くしなければならない。しかし、過剰量の蛍光標識したオリゴヌクレオチドが、バックグラウンドの蛍光の増大を導くことを念頭に置くことが重要である。従って、オリゴヌクレオチドの濃度は、0.5~500 ng/ μ lの範囲であるべきである。本発明の方法の好ましい濃度は、1 μ lのハイブリダイゼーション溶液に対して、用いた個々のオリゴヌクレオチドが1~10 ngである。用いたハイブリダイゼーション溶液の量は、8 μ l~100mlの間であり、本発明の好ましい態様にて10 μ l~1,000 μ lの間であり、具体的に好ましい態様にて20 μ l~40 μ lの間である。

10

【0121】

ハイブリダイゼーションの継続時間は、通常10分~12時間の間であり、好ましくは約1.5時間である。ハイブリダイゼーション温度は、44 ~ 48 の間が好ましく、より好ましくは46 である。ハイブリダイゼーション温度、およびハイブリダイゼーション溶液中における塩ならびに洗浄剤の濃度といったパラメーターは、オリゴヌクレオチド、より好ましくは検出する細胞内の標的配列に対するそのオリゴヌクレオチドの長さおよび相補性の程度に依存して最適化することができる。この点に関し専門家は、相関性の予測に精通している。

【0122】

ハイブリダイゼーションの完了時に、ハイブリダイズしていないオリゴヌクレオチドおよび余剰のオリゴヌクレオチドを従来の洗浄溶液を用いて通常通りに、除去または洗い流す必要がある。所望であれば、この洗浄溶液は、洗浄剤、例えばSDSなどを0.001~0.1%、好ましくは0.01%の濃度で含み、Tris-HClまたは適切な緩衝物質を0.001~0.1 mol/lの濃度で、好ましくは0.02 mol/lの濃度で含み、pHは6.0~9.0の範囲であり、好ましくは約8.0である。洗浄剤は存在しても良いが、必須ではない。さらに、洗浄溶液は通常、(必要な厳密度に依存して)0.003 mol/l~0.9 mol/lの濃度、好ましくは0.01 mol/l~0.9 mol/lの濃度でNaClを含む。0.07 mol/lの濃度のNaClが、特に好ましい。0.05 mol/l~0.22 mol/lの濃度のNaClは、配列番号：19~30のオリゴヌクレオチドを用いて行い得る特異的な検出のハイブリダイゼーションに特に適当である。さらに、洗浄溶液は、好ましくは0.005 mol/lの濃度でEDTAを含むことが可能である。洗浄溶液は、適当な量で専門家に知られている保存料を含むことができる。

20

30

【0123】

結合していないオリゴヌクレオチドを、通常44 ~ 52 、好ましくは44 ~ 50 、より好ましくは44 ~ 48 の温度で、10~40分間、好ましくは15分間、「洗い流し」を行う。

【0124】

用いたオリゴヌクレオチドの標識の性質に依存して、最終評価を光学顕微鏡、epifluorescence顕微鏡、化学照度計(chemoluminometer)、蛍光光度計などを用いて行うことができる。

本発明の方法の利点は、多種多様である。

40

【0125】

具体的な利点としては、この検出工程の速さである。従来の培養が、検出に最高7日までを要するのに対し、本発明の工程を利用後3時間で結果が得られる。これは初めて、用いた処置の効果および望まない効果の添付の診断用対照を供する。この点に関するもう1つの利点としては、本発明の方法が、記載したすべての微生物を同時に検出することを可能にし、サンプル採取から評価までのすべての工程を1度に行うことができるための時間的な利点がある。

【0126】

もう1つの主な利点は、これらの医学的および美容的に関連のある皮膚フローラの微生物を、ここに初めて同時に検出することが可能であることである。故に、オリゴヌクレオ

50

チドに対する異なるマーカーを用いて、すべての、いくつかのまたは個々の微生物群または種を、お互いに区別して同時にかつ明確に検出することができる。さらに、これらの微生物群または種の集団比率およびそれらの相互作用を、こうして初めて分析することができる。これは、医学的および/または美容的に関連ある皮膚の問題を明確に診断すること、かつ選択的に処置することの可能性を初めて開示する。皮膚のマイクロフロー全体における医学的治療または美容的処置の効果を測定することも、ここに初めて可能である。故に、処置のあらゆる効果および望まない効果を早期に認識し、さらなる処置にて増幅あるいは抑制することができる。

【0127】

さらに、従来の検出方法により検出することができなかった皮膚フローラの微生物を、
本発明のキットを用いて本工程にてここに初めて検出することができる。 10

微生物の様々な群を、オリゴヌクレオチドの特異性または用いたオリゴヌクレオチドにより検出することができる。一方では微生物の大集団、もう一方では比較的小集団の、近親関係の群および一様な個々の種を、近親の関係の微生物種と同じく、他と同時に特異的に検出することができる。

【0128】

さらに、本発明の方法により、(陽性シグナルの場合に)系統樹に未知の微生物種を組み込むことができ、または特定のプローブを用いたハイブリダイゼーション方法による生化学的な検出を基に配属の確認を行うことが可能となる。

【0129】

本発明の方法の好ましい態様にて、本方法の工程a)にて皮膚表面から試料を採取する。ボランティアから皮膚試料を採取し、皮膚表面からの微生物の剥離を促すことを目的として、皮膚を洗浄液に接触する。生理的に安全な洗浄剤、例えばトゥイーン(Tween)またはトライトン(Triton)を総重量に対し約0.01~1%の濃度で用いることが好ましい。pHは5~10、好ましくは7~9の範囲、例えば8が好都合である。 20

【0130】

微生物のよりよい剥離を達成するために、皮膚の表面を搔爬用器具で削る。適切な搔爬用器具は、様々な直径、例えば0.05~1.5cm、様々な材料、例えばガラス、金属またはプラスチックの棒である。同じ材料の円形のスパチュラも適している。直径0.4~0.8cmのガラスの棒またはプラスチック・スパチュラを用いることが好ましい。ガラスピペットの Mauspiece、例えば5ml ガラスピペットも、都合良く用いることができる。微生物の改善した剥離のために皮膚の表面に比較的丸い棒を用いることが特に適当である。 30

【0131】

粗い表面のプラスチック・スパチュラ、例えばガラス-ファイバー-強化ポリアミドのサンプリング用スパチュラ(Merck, Art. No. 231J2412、二重スパチュラ、長さ180mm)は、特に適している。綿棒で擦り、比較的粘性の媒体で軽く叩くことによりサンプリングし、または接着膜(例えば、商業的に利用可能な家庭用接着テープ)で皮膚サンプリングすることもまた、本発明の目的に適当である。これらの方法を用いて、例えば、適切な緩衝溶液で洗い流すことにより微生物を入手することが可能である。他の方法としては、接着テープ自体上でも行うことができる。 40

【0132】

本発明のもう1つの好ましい態様にて、i)エタノール、アセトンおよびエタノール/酢酸混合液からなる群から選択される好ましい変性試薬、ii)ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒドからなる群から選択される好ましい架橋試薬、またはiii)熱固定、により固定を行うことができる。

1つの好ましい態様にて、固定後、微生物を担体上に固定化することができる。

具体的に好ましい態様にて、微生物の固定した細胞を、本発明の方法の工程c)前に透過性にすることができる。

【0133】

本発明にて、「透過性にする」とは、細胞を酵素的に処理することと解される。この処 50

理は、菌類およびグラム陽性細菌の細胞壁をオリゴヌクレオチドに対し透過性にする。この処理のために適切な酵素、その適切な濃度および適切な溶媒が、専門家に知られている。本発明の方法は、もちろんグラム陰性細菌の分析にも適している；その時、透過性にするための酵素的処理は、適宜適合され、あるいは完全になくてもよい。

【0134】

ハイブリダイゼーション前に透過性にした細胞は、オリゴヌクレオチドを細胞内に透過することは可能であるが、リボソームおよびその rRNA を細胞から除くことはできないという利点を有する。全細胞ハイブリダイゼーションのこの技術の主な利点は、細菌の形態が原型のまま残り、これらの原型の細菌をインサイチュウ (in situ)、すなわちそれらの自然な環境にて検出することができることである。従って、細菌の定量のみでなく、

10

【0135】

最も具体的な好ましい態様にて、透過性にすることは、細胞壁溶解酵素 (cell-wall-lytic enzyme)、好ましくはリゾチーム (lysozyme)、リソスタフィン (lysostaphin)、プロテイナーゼ K (proteinase K)、プロナーゼ (pronase) およびムタノリシン (mutanolysin) からなる群から望ましく選択される酵素を用いた部分分解により行うことができる。

【0136】

さらに、具体的な好まし態様にて、本発明は、陽性対照として適切なオリゴヌクレオチドを供する。このオリゴヌクレオチドは、分析した試料中に存在する多くの、任意にはすべての細菌または原核生物を検出することを特徴とする。例えば、オリゴヌクレオチド EUB338 (細菌) は、Amann et al. (1990) に記載されており、オリゴヌクレオチド EUK (原核生物) は、この方法に適している。このような陽性対照を、適用した方法が適切に行われるかどうかをモニターするために用いることができる。しかし、とりわけ、測定された全体としての細菌集団内に特異的に検出される微生物の割合を決定することが可能である。

20

【0137】

本発明はまた、皮膚上の微生物を検出および/または定量するためのキットの使用に関する。故に、キットの使用、より具体的には本発明の方法におけるキットの使用は、活性物質の探索、皮膚マイクロフローラの分析、および活性物質を含む化粧品の効果試験にて有用である。ヒト皮膚および動物皮膚の直接的な分析、またはそれらから採取した試料における分析は両方とも、他の微生物の高いバックグラウンドに対してさえ、本発明のキットを用いて効率的に行うことができる。

30

【0138】

以下の実施例は、例示の目的で記載されており、いかなる場合にも本発明を制限するものではない。

【0139】

[実施例]

皮膚菌の微生物の検出

サンプリング

サンプリングは洗浄剤による洗浄法により行った (P. Williamson, A.M. Kligman (1965), J. Invest. Derm., Vol. 45, No. 6)。

40

手順：

1. 両端が開いているプラスチック・シリンダーを、調査する皮膚表面上にその損傷のない末端を押さえつけ、1.5 ml の洗浄溶液 (0.523 KH_2PO_4 g/liter、16.73 K_2HPO_4 g/liter、8.50 NaCl g/liter、10.00 トウイーン 80 g/liter および 1.00 トリプトン g/liter を含む、pH 8.0 の生理的トウイーン緩衝溶液) を充填した。

2. 上述の搔爬用器具の 1 つを用いて、処理する範囲を、その 6×横および 6×縦を軽い圧力で擦った。

3. 吸引下で液体を除いた後、その手順を繰り返した。

50

【0140】

2つの液体を混合した。2つの混合した液体試料の一部を、次のオリゴヌクレオチドを用いた検出に用いた；他の一部を、試料中に存在する微生物の培養による同時の検出に用いた（対照として用いるための）。

洗浄溶液の調製には、無菌水（例えば、ミリポア水）を用いなければならない。

【0141】

固定処理

その後、1容量の純エタノールを、採取した試料に添加し、次に遠心した（室温、8,000 r.p.m、5分）。上清の液体を廃棄し、ペレットを1容量の1×PBS溶液中にて洗浄した。最後に、ペレットを1/10容量の固定溶液（50% エタノール）に再懸濁し、さらに用いるまで - 20 で保存した。 10

細胞懸濁液のアリコート、顕微鏡用スライドに塗布し、乾燥した（46℃、30分。または十分に乾燥するまで）。その後、細胞を、もう1つの固定溶液（純エタノール）を塗布することにより十分に脱水状態にし、乾燥した（46℃、3分。または十分に乾燥するまで）。

【0142】

透過処理（透過性化）

その後、適当な容量の適当な酵素溶液を塗布し、試料をインキュベートした（室温で、15分）。この工程を、他の適当な酵素溶液で任意に繰り返した。

透過処理液（透過性化液）を蒸留水で取り除き、試料を再び十分に乾燥した（十分に乾燥するまで46℃でインキュベーション）。その後、細胞を、固定液（純エタノール）を塗布することにより十分に再脱水し、乾燥した（46℃、3分。または十分に乾燥するまで）。 20

【0143】

ハイブリダイゼーション

その後、検出する微生物に特異的な上述のオリゴヌクレオチドを含むハイブリダイゼーション溶液を固定し、完全に消化し脱水した細胞に適用した。その後、スライドを、ハイブリダイゼーション溶液で湿らせたチャンバー内に置いた（46℃で90分間、ヌクレオチドなしで）。 30

【0144】

洗浄

その後、顕微鏡用スライドを、洗浄溶液を充満したチャンバー内に置き、インキュベートした（46℃、15分）。 30

その後、スライドを、蒸留水を充満したチャンバーに短期間浸し側面位から空気乾燥した（46℃、30分。または十分に乾燥するまで）。

【0145】

検出

その後、標本ホルダーを適切な包埋媒質中に包埋した。その後、試料を、蛍光顕微鏡を用いて分析した。 40

【0146】

分析結果

1. 上述のサンプリング方法を用いて、混合皮膚の女性ボランティアの前額部から微生物試料を採取した（typized by a cosmetician and confirmed by sebumeter measurements）。

蛍光シグナルを計測し、結果を全細胞数と比較することにより、プロピオニ細菌の非常に高い割合を測定した（>90%）。スタフィロコッカスの低い割合を、発見した（<10%）。コリネ細菌は発見されなかった。

【0147】

2. 微生物試料を、上述のサンプリング方法により他の女性ボランティアの皮膚から採取した。 50

微生物の16 S r R N A 遺伝子を、試料の一部から単離した。その後の配列決定が、配列が新規の配列であるが、コリネバクテリウム属に属しうる微生物であることを示した。この配列は、開発されたこの微生物を検出できる相当するプローブ（配列番号：21）に基づき、配列プロトコール中の配列番号：31を示した。

【0148】

試料の他の部分を、皮膚関連コリネ細菌を検出するために、前述の細菌特異的プローブEUBおよび混合プローブ（配列番号：07～11）とハイブリダイズした。

蛍光シグナルを計測し、結果を細菌特異的プローブにより測定した全細胞数と比較することにより、コリネ細菌の高割合を測定した（約73%）。

【0149】

配列番号：21の標識したオリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたこの試料のコリネ細菌の低い割合（約5%）を、同時に競合物質として標識していない配列番号：22のオリゴヌクレオチドを用いて、蛍光シグナルを計測し、結果を前述の検出したコリネ細菌数と比較して測定した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Henkel KGaA

 <120> Nachweis von Mikroorganismen

 <130> H 05519 PCT
 <150> DE 102 32 775.0; DE 103 06 616.0
 <151> 2002-07-18; 2003-02-14

 <160> 31

 <170> PatentIn version 3.1

 <210> 1 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotide

 <400> 1
 cacatcagcg tcagttac 18

 <210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial 20

 <220>
 <223> Oligonucleotide

 <400> 2
 cacatcagcg tcagttgc 18

 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotide 30

 <400> 3
 aagcttaagg gttgcgct 18

 <210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotide

 <400> 4
 gccttctaaa tcacgcgg 18 40

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 5
agcccaagtc ataaagg

18

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

10

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 6
tacactctct caagccgg

18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide

20

<400> 7
agcactcaag ttatgcc

18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 8
agtactcaag ttatgcc

18

30

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 9
agcactcaag taatgcc

18

<210> 10

40

<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 10
agcactcaag tcagccc

17

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

10

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 11
agcactctag ttatgccc

18

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide

20

<400> 12
ggccggcttt cagcgatt

18

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 13
gcttccatcg ctcttcgt

18

30

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 14
gttctgtcca tcaatgtc

18

<210> 15

40

<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleotide		
<400> 15		
ttccgtctat taactccc	18	
<210> 16		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial		10
<220>		
<223> Oligonucleotide		
<400> 16		
tcacgcttcg tcacaggc	18	
<210> 17		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleotide		20
<400> 17		
caggctcgcc actctctg	18	
<210> 18		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleotide		
<400> 18		
tacggcgatt caaaaaacc	19	30
<210> 19		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide		
<400> 19		
cacactaaaa atggctcc	18	
<210> 20		
<211> 18		
<212> DNA		40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 20

tccacacccat ggtcctat

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

10

<400> 21

ccatccaaaa tgcggtcc

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 22

ccatccaaaa tgtggtcc

18

20

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 23

caccatccaa aatgtggtc

19

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 24

caccatccaa aatgcggtc

19

30

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Oligonucleotide

<400> 25

ctgcagtccc gcagtta

17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 26

ctgcagtccc acagtta

17

10

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 27

gcatttcgcg ctgcgaac

18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 28

gcattgcgcg ctgcgaac

18

20

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> variation

<222> {13}..{13}

<223> "k"=G,T; Oligonucleotide

<400> 29

cactatatag ctkccctc

18

30

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

40

<400> 30
catctcagcg tcagacac

18

<210> 31
<211> 1431
<212> RNA
<213> Corynebacterium spec.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1308)..(1308)
<223> "n"=A,C,G,U

10

<400> 31
gaugaacgcu ggcggcgugc uuaacacaug caagucgaac ggaaaggccu cugcuugcag 60
ggguacucga guggcgaaacg ggugaguaac acguggguga ucugcccugc acuucgggau 120
aagccuggga aacuggggucu aaauaccgau aggaccgcau uuuggauggu gugguggaaa 180
guuuuucggu gugggaugag cucgcggccu aucagcuugu ugguggggua auggccuacc 240
aaggcgucga cggguagccg gccugagagg guguacggcc acauugggac ugagauacgg 300
cccagacucc uacgggagggc agcagugggg aaauuugcac aaugggogca agccugaugc 360
agcgacgccc cgugggggau gacggccuuc ggguuguaaa cuccuuucgc uagggacgaa 420
gcuuuuuugu gacgguaaccu ggagaagaag caccggcuua cuacgugcca gcagccgccc 480
uaauacguag ggugcgagcg uuguccgga uucugggcg uaaagagcuc guaggugguu 540
ugucgcgucg uuuguguaag cccgcagcuu aacugcgga cugcaggcga uacgggcaua 600
acuugagugc uguaggggag acuggaauuc cuggguuagc gguggaaugc gcagauauca 660
ggaggaacac cgaugggcga ggacggucuc ugggcaguaa cugacgcuga ggagcgaaa 720
cauggguagc gaacaggauu agauaccucg guaguccaug ccguaaacgg uggcgcuag 780
gugugagucc cuuccacggg guucgugccg uagcuaacgc auuaagcgcc ccgccugggg 840
aguacggccc caaggcuaaa acucaaagga auugacgggg gcccgacaa gccggcgagc 900
auguggauna auucgaugca acgcgaagaa ccuuaccugg gcuugacaua caccagaucg 960
ccguagagau acgguuuccc uuugugguug guguacaggu ggugcauggu ugucgucagc 1020
ucgugucgug agauguuggg uuaagucccg caacgagcgc aaccuuuguc uuauguugcc 1080
agcacguugu gguggggacu cgugagagac ugccgggguu aacucggagg aaggugggga 1140
ugacgucaaa ucaucauguc ccuuauugcc agggcuucac acaugcuaca auggucggua 1200
caacgcgcuu gcgagccugu gaggguuggc uaaucgcugu aaagccgguc guaguucgga 1260
uuggggucug caacucgacc ccaugaaguc ggagucgcu guaaucgnag aucagcaacg 1320
cugcggugaa uacguucccg ggccuuguac acaccgcccg ucacgucaug aaaguuggua 1380

20

30

40

acacccgaag ccaguggccu gucaugggag cugucgaagg ugggaucggc g 1431

【手続補正書】

【提出日】平成17年3月18日(2005.3.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2005532818000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/07718

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

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)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/75636 A (KAIROS SCIENT INC) 14 December 2000 (2000-12-14) page 32, line 4 - line 9 -----	1-26
X	EP 0 786 519 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 30 July 1997 (1997-07-30) page 3126 page 3175 page 3162 page 3130 SEQ ID NOs: 4936, 5142, 5086, 4953 -----	1-26
A	US 6 037 122 A (RUIYI RAYMOND ET AL) 14 March 2000 (2000-03-14) column 1, lines 33-40; claims 1-24 -----	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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 document 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

25 November 2003

Date of mailing of the international search report

22.03.2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/07718

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: -
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the Supplemental Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-26 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/07718

Continuation of Box I.2

Claims: -

The current claims 1-9, 20-26 and in part claims 12-19 relate to a kit characterised by a desirable attribute or property, namely specificity for at least one species or a group of species of micro-organisms which occur on the skin.

The claims therefore encompass all kits that have this attribute or quality, yet the application provides support in the description (PCT Article 5) for only a limited number of such kits. In the present case, the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Regardless of the above, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the kit in terms of the result which is to be achieved. Again, this lack of clarity is such that it is not possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported and disclosed in the above sense, namely a kit characterised in that it contains a nucleotide as per table 2 (pages 33, 34) (in addition, there is a lack of unity of invention here – see “Invitation to Pay Additional Fees”).

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(c)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the defects that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/07718

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely:

Invention 1: Claims 1-26 (all in part)

Kit for detecting micro-organisms with the oligonucleotide with the sequence indicated in SEQ ID NO: 1 and the use thereof for detecting and/or quantifying micro-organisms on the skin. Methods for detecting micro-organisms.

Inventions 2-30: Claims 1-26 (all in part)

As invention 1, but where invention 2 corresponds to SEQ ID NO: 2, invention 3 to SEQ ID NO: 3..., and invention 30 corresponds to SEQ ID NO: 30.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/07718

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0075636	A	14-12-2000	AU 5595200 A WO 0075636 A1	28-12-2000 14-12-2000
EP 0786519	A	30-07-1997	CA 2194411 A1 EP 0786519 A2 JP 9322781 A US 2003186364 A1 US 2003054436 A1 US 2002103338 A1 US 6593114 B1	06-07-1997 30-07-1997 16-12-1997 02-10-2003 20-03-2003 01-08-2002 15-07-2003
US 6037122	A	14-03-2000	FR 2733755 A1 CA 2175515 A1 EP 0745691 A2	08-11-1996 04-11-1996 04-12-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07718

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/75636 A (KAİROS SCİENT INC) 14. Dezember 2000 (2000-12-14) Seite 32, Zeile 4 - Zeile 9 -----	1-26
X	EP 0 786 519 A (HUMAN GENOME SCİENCES INC) 30. Juli 1997 (1997-07-30) Seite 3126 Seite 3175 Seite 3162 Seite 3130 SEQ ID N0s: 4936, 5142, 5086, 4953 -----	1-26
A	US 6 037 122 A (RUMY RAYMOND ET AL) 14. März 2000 (2000-03-14) Spalte 1, Zeilen 33-40; Ansprüche 1-24 -----	1-26

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. November 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22. 03. 2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5018 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/07718

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. -
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. -
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. -
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-26 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07718

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: -

Die geltenden Patentansprüche 1-9,20-26 und teilweise Ansprüche 12-19 beziehen sich auf ein Kit, charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich Spezifität für mindestens eine Spezies oder eine Gruppe von Spezies von Mikroorganismen, die Auf der Haut vorkommen.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Kits, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Kits liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Kit über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich ein Kit dadurch gekennzeichnet dass es ein Nukleotid gemäß Tabelle 2 (Seiten 33,34) enthält (außerdem gibt es hier mangelnder Einlichkeit, siehe "Aufforderung zur Zahlung zusätzlicher Gebühren")

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäß Art. 17 (2) PCT geführt haben.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07718

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

Erfindung 1: Ansprüche 1-26 (alle teilweise)

Kit zum Nachweis von Mikroorganismen mit dem Oligonukleotid mit der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Sequenz und dessen Verwendung zum Nachweis und/oder Quantifizierung von Mikroorganismen auf der Haut. Verfahren zum nachweis von Mikroorganismen.

Erfindungen 2-30: Ansprüche 1-26 (alle teilweise)

Wie Erfindung 1, aber wobei Erfindung 2 übereinstimmt mit SEQ ID NO:2, Erfindung 3 mit SEQ ID NO:3.... Erfindung 30 stimmt überein mit SEQ ID NO: 30.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07718

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0075636 A	14-12-2000	AU 5595200 A WO 0075636 A1	28-12-2000 14-12-2000
EP 0786519 A	30-07-1997	CA 2194411 A1 EP 0786519 A2 JP 9322781 A US 2003186364 A1 US 2003054436 A1 US 2002103338 A1 US 6593114 B1	06-07-1997 30-07-1997 16-12-1997 02-10-2003 20-03-2003 01-08-2002 15-07-2003
US 6037122 A	14-03-2000	FR 2733755 A1 CA 2175515 A1 EP 0745691 A2	08-11-1996 04-11-1996 04-12-1996

フロントページの続き

- (74)代理人 100087114
弁理士 齋藤 みの里
- (72)発明者 アンドレア・ゼットラー
ドイツ連邦共和国デー - 4 0 2 2 5 デュッセルドルフ、ヒンメルガイスター・シュトラッセ 1 8 7 番
- (72)発明者 クラウディア・ヤソイ
ドイツ連邦共和国デー - 4 0 2 3 7 デュッセルドルフ、シューマンシュトラッセ 9 1 番
- (72)発明者 レギーネ・ショルテュセク
ドイツ連邦共和国デー - 4 0 8 2 2 メットマン、ライプツィガー・シュトラッセ 2 6 番
- (72)発明者 ヴェラ・マイエンシャイン
ドイツ連邦共和国デー - 6 3 4 8 6 ブルフケーベル、フリッツ - シューベルト - リング 4 6 番
- (72)発明者 ジルケ・ニーフェラー
ドイツ連邦共和国デー - 4 1 2 3 6 メンヒェングラートバッハ、ハウプトシュトラッセ 2 1 1 番
- (72)発明者 アルブレヒト・ヴァイス
ドイツ連邦共和国デー - 4 0 7 6 4 ランゲンフェルト、フォレレンヴェーク 3 7 番
- (72)発明者 カール - ハインツ・トレベジウス
ドイツ連邦共和国デー - 8 3 0 9 3 パート・エンドルフ、レーベンヴェーク 1 番
- (72)発明者 クラウディア・バイムフォーア
ドイツ連邦共和国デー - 8 0 6 3 6 ミュンヘン、ブルーテンブルクシュトラッセ 3 2 番
- (72)発明者 ヴォルフガング・ルートヴィッヒ
ドイツ連邦共和国デー - 8 3 6 7 9 ザクゼンカム、アルペンブリックシュトラッセ 8 番
- (72)発明者 リヒャルト・ロベルト・バムベルク
ドイツ連邦共和国デー - 8 3 0 5 2 ブルックミュール、オットー - ペルッツ - シュトラッセ 4 アー 番
- (72)発明者 カール - ハインツ・シュライファー
ドイツ連邦共和国デー - 8 5 7 1 6 ウンターシュライスハイム、シュヴァルベンシュトラッセ 3 アー 番
- (72)発明者 シュテファン・ミュルナー
ドイツ連邦共和国デー - 4 0 7 6 4 ランゲンフェルト、ハーゲブッテンヴェーク 2 1 番
- (72)発明者 イングリッド・ベルクマイヤー
ドイツ連邦共和国デー - 8 0 6 3 8 ミュンヘン、ベックリンシュトラッセ 1 5 番
- F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA12
4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QS11
QS25 QS36 QX02