(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3608823号
(P3608823)
(45)発行日　平成17年1月12日(2005.1.12)　(24)登録日　平成16年10月22日(2004.10.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA
C07H 21/04	C07H	21/04	B
C12Q 1/04	C12Q	1/04	
C12Q 1/68	C12Q	1/68	A

請求項の数 13　(全 20 頁)

(21)出願番号　特願平6-235339
(22)出願日　平成6年9月29日(1994.9.29)
(65)公開番号　特開平8-89254
(43)公開日　平成8年4月9日(1996.4.9)
審査請求日　平成13年8月10日(2001.8.10)

(73)特許権者　594162076
株式会社東洋紡ジーンアナリシス
大阪府大阪市北区堂島浜二丁目２番８号
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(72)発明者　村山　▲そう▼明
東京都板橋区加賀２丁目１１番１号　帝京大学医学部細菌学教室内
(72)発明者　槙村　浩一
東京都八王子市大塚３５９　帝京大学医真菌センター内
(72)発明者　山口　英世
東京都板橋区加賀２丁目１１番１号　帝京大学医学部細菌学教室内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】真菌の検出および真菌の菌種同定用オリゴヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
カンジダ・ルシタニエ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｌｕｓｉｔａｎｉａｅ）を検出および同定するオリゴヌクレオチドであって、その核酸配列がＡＧＣＡＡＴＡＡＧＡ　ＧＧＡＧＧＡＣＴＧＴ（配列番号７）あるいはその相補鎖から選択される配列を含有し、カンジダ・ルシタニエの１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド。
【請求項２】
カンジダ・クルゼイ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｋｒｕｓｅｉ）を検出および同定するオリゴヌクレオチドであって、その核酸配列ＴＡＴＧＧＴＡＡＧＣ　ＡＣＴＧＴＴＧＣＧＧ（配列番号８）あるいはその相補鎖から選択される配列を含有し、カンジダ・クルゼイの１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド。
【請求項３】
カンジダ・グラブラータ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｇｌａｂｒａｔａ）を検出および同定するオリゴヌクレオチドであって、その核酸配列ＣＡＡＧＴＣＣＴＴＧ　ＴＧＧＣＴＴＧＧＣＧ（配列番号９）あるいはその相補鎖から選択される配列を含有し、カンジダ・グラブラータの１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド。
【請求項４】

クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）を検出および同定するオリゴヌクレオチドであって、その核酸配列ＧＴＧＧＴＣＣＴＧＴ　ＡＴＧＣＴＣＴＴＴＡ（配列番号１０）あるいはその相補鎖から選択される配列を含有し、クリプトコッカス・ネオフォルマンスの１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド。

【請求項５】

アスペルギルス・フミガタス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）を検出および同定するオリゴヌクレオチドであって、その核酸配列ＡＴＧＧＣＣＴＴＣＡ　ＣＴＧＧＣＴＧＴＧＧ（配列番号１１）あるいはその相補鎖から選択される配列を含有し、アスペルギルス・フミガタスの１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド。

【請求項６】

ニュウモシスチス・カリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｉｓｔｉｓｃａｒｉｎｉｉ）を検出および同定するオリゴヌクレオチドであって、その核酸配列ＧＡＡＧＴＴＧＴＧＴ　ＧＣＡＣＴＧＧＣＧＣ（配列番号１２）あるいはその相補鎖から選択される配列を含有し、ニュウモシスチス・カリニの１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド。

【請求項７】

請求項１から請求項６のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを含有する標識プローブ。

【請求項８】

請求項１から請求項６のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを含有する核酸プライマー。

【請求項９】

真菌の検出、真菌の菌種の同定、あるいは真菌の検出と菌種の同定とを行う方法であって、

（１）請求項１から請求項８のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを標識プローブとして、１または２以上選択する工程；

（２）該標識プローブとして用いたオリゴヌクレオチドと試料とをハイブリダイズさせる工程；

（３）ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを検出する工程、

を含む方法。

【請求項１０】

真菌の検出、真菌の菌種の同定、あるいは真菌の検出と菌種の同定とを行うための試薬キットであって、請求項７に記載の標識プローブを含む、キット。

【請求項１１】

真菌の検出、真菌の菌種の同定、あるいは真菌の検出と菌種の同定とを行うための試薬キットであって、請求項８に記載の核酸プライマーを含む、キット。

【請求項１２】

真菌の検出、真菌の菌種の同定、あるいは真菌の検出と菌種の同定とを行うための試薬キットであって、請求項７に記載の標識プローブおよび請求項８に記載の核酸プライマーを含む、キット。

【請求項１３】

真菌の検出、真菌の菌種の同定、あるいは真菌の検出と菌種の同定とを行う方法であって、

（１）請求項１から請求項８のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして、１つ選択する工程；

（２）（１）で選択したオリゴヌクレオチドが記載通りの配列の場合は配列番号３に記載のオリゴヌクレオチドと、相補配列の場合は配列番号２に記載のオリゴヌクレオチドとを組み合わせ、ペアにする工程；

（３）（２）で組み合わせたペアのオリゴヌクレオチド一組を用い、試料を鋳型として

核酸を増幅する工程；
（４）増幅した核酸を検出する工程；
を含む方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は真菌症の検出・診断に有効なオリゴヌクレオチドに関する。更に詳しくは、臨床診断上、カンジダ症、アスペルギルス症等の病原真菌を迅速、確実かつ簡便に検出するための、および病原真菌を同定するためのオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドを用いて病原真菌を検出する方法、ならびに病原真菌の検出・同定のための試薬に関する。
【０００２】
【従来の技術】
高度医療の普及に伴い、易感染患者は増加の一途をたどっている。カンジダ症およびアスペルギルス症をはじめとする深在性（全身性）真菌症は、易感染患者が高率に罹患する重要な感染症として医療上の問題となっている。真菌症の治療には、様々な抗真菌剤が開発されている。しかし、真菌剤は開発されていても、真菌症であると診断するための迅速かつ確実な方法は未だ開発されていないのが現状である。現在使用されている深在性真菌症の診断法としては、病原真菌の検出、病原真菌の抗原またはこれに対する抗体を免疫学的に検出する方法、病原真菌の菌体成分または代謝産物を生化学的に検出する方法などがある。例えば、カンジダ症の診断には、カンジダ抗原またはこれに対する抗体を検出する方法がある。しかし、病理学的に真菌感染が認められない患者（健康人を含む）をも検出するという擬陽性の問題があり、また感度の点でも臨床的な要請に十分答えていない。
【０００３】
アスペルギルス症の診断は、臨床検体から得られた培養、同定によって行われるが、たとえ病理学的にアスペルギルスの感染が明かな症例であったとしても、患者の検体からアスペルギルスが培養される割合（陽性率）は低く、さらに培養が出来たとしてもアスペルギルス属の同定の根拠となる分生子頭が形成されるまでに２週間以上かかるのが普通であり、このことがアスペルギルス症の発症前診断を困難にしている。現在のところ、アスペルギルス症の診断キットとして現在までに認可されているものはなく、実験室的な診断法としてアスペルギルス抗原またはこれに対する抗体を免疫学的に検出する方法、アスペルギルスの菌体成分または代謝産物を生化学的に検出する方法があるが、いずれの方法も、病理学的に真菌感染が認められない患者（健康人を含む）をも検出してしまう欠点がある。
【０００４】
カンジダ症およびアスペルギルス症のほかにも、クリプトコッカス症およびカリニ原虫による感染症はＡＩＤＳおよび移植患者などの易感染性宿主における重要な病原微生物による疾患である。クリプトコッカス症の診断には、免疫凝集反応を用いる方法があるが、この方法はトリコスポロン・クタネウム（Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ　ｃｕｔａｎｅｕｍ）が病原と考えられる夏型過敏性肺臓炎の患者をも検出して擬陽性反応を示すことがあり、更に鑑別が必要となっている。また、カリニ原虫の培養は一般的には不可能であり、グロコット染色により虫体を顕微鏡で検出する方法に頼っている。さらに虫体総数の大部分を占めるトロフォゾイトを染めることは難しく、確実な診断のためには多量の虫体を必要としているのが現状である。
【０００５】
さらに、広範囲の深在性病原性真菌を迅速、確実に検出する事の重要性は深在性真菌症に対する薬剤の開発とも密接に関係する。病原真菌の菌種によって抗菌剤を選択する必要があるからである。そのために、病原真菌の同定が必要とされる場合が少なくない。従って、直接的で簡便、迅速かつ確実な真菌の検出および真菌の菌種の同定の方法が望まれていた。
【０００６】
【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、直接的で簡便、迅速かつ確実な真菌の検出および真菌の菌種の同定の方法と、それに用いる新規のオリゴヌクレオチド、ならびにその検出用試薬を提供することである。

【０００７】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題解決のため真菌およびその他の生物の１８ＳリボゾームＲＮＡ（以下１８ＳｒＲＮＡという）遺伝子に関して種々の検討を重ねた結果、真菌の検出および真菌の菌種の同定に適当な核酸配列を得、それを用いた検出方法を確立して本発明を完成させるに至った。

【０００８】

本発明は、真菌の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズする、真菌の検出および真菌の菌種同定用オリゴヌクレオチドである。

【０００９】

本発明における真菌とは、カンジダ属、ハンセヌラ属、サッカロマイセス属、トリコスポロン属、クリプトコッカス属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、ブラストマイセス属、コクシジオイデス属、ニュウモシスチス属、マラセジア属およびデバリオマイセス属を含む。上記オリゴヌレオチドは、好ましくは、配列番号１に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する（以下、核酸配列を示す場合に、Ａはアデニン、Ｃはシトシン、Ｇはグアニン、Ｔはチミンを表す。また、いずれの位置のＴがウラシル（Ｕ）と置換されていてもよい）。以下、核酸配列の一部は、少なくとも５塩基以上、好ましくは１０塩基以上、さらに好ましくは２０塩基以上の長さを有する。

【００１０】

好ましい実施態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号１に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００１１】

さらに好ましい実施態様においては、オリゴヌクレオチドは配列番号２、配列番号３、配列番号４または配列番号５に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはそれらの相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００１２】

また本発明は、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドである。

【００１３】

好ましい実施態様においては、そのオリゴヌクレオチドが配列番号６に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００１４】

また本発明は、カンジダ・ルシタニエ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｌｕｓｉｔａｎｉａｅ）の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドである。　好ましい実施態様においては、そのオリゴヌクレオチドは配列番号７に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００１５】

また本発明は、カンジダ・クルゼイ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｋｒｕｓｅｉ）の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドである。

好ましい実施態様においては、そのオリゴヌクレオチドは配列番号８に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００１６】

また本発明は、カンジダ・グラブラータ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｇｌａｂｒａｔａ）の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドである。

好ましい実施態様においては、そのオリゴヌクレオチドは配列番号９に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００１７】

また本発明は、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドである。

好ましい実施態様においては、そのオリゴヌクレオチドは配列番号１０に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００１８】

また本発明は、アスペルギルス・フミガタス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドである。

好ましい実施態様においては、そのオリゴヌクレオチドは配列番号５または配列番号１１に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００１９】

また本発明は、ニュウモシスチス・カリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｉｓｔｉｓ　ｃａｒｉｎｉｉ）の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドである。

好ましい実施態様においては、そのオリゴヌクレオチドは配列番号１２に記載の核酸配列の一部または全部、あるいはその相補配列の一部または全部、から選択される配列を含有する。

【００２０】

また本発明は、真菌の１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列と特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドであり、好ましい実施態様においては、そのオリゴヌクレオチドが配列番号１に記載の核酸配列の一部、あるいはその相補配列の一部を、真菌の菌種に応じて改変した配列を含有する。

【００２１】

また本発明は、上記オリゴヌクレオチドをプローブまたはプライマーとして使用する真菌の検出および真菌の菌種同定方法である。

さらに本発明は、上記オリゴヌクレオチドを含有する標識プローブである。

さらに本発明は、上記オリゴヌクレオチドを含有する核酸プライマーである。

本発明は、上記標識プローブを含む、真菌の検出および真菌の菌種同定用試薬キットである。

さらに本発明は、上記核酸プライマーを含む、真菌の検出および真菌の菌種同定用試薬キットである。

【００２２】

以下、本発明を詳細に説明する。

【００２３】

本発明者らは、現在までに決定された真菌およびその他の生物の遺伝子配列データバンク（ＧｅｎＢａｎｋ）に登録されている１８ＳｒＲＮＡ遺伝子配列を参考にして各属および種間の遺伝子配列の相同性の理論的検証と実験的検証を重ねた結果、配列番号１に記載の１位から６８７位までの６８７塩基対の核酸配列に相当する部分が、真菌の検出および真菌の菌種の同定に関して適当な核酸配列であることを見い出した。この６８７塩基対の領域に相当する部分（カンジダ・アルビカンスでは６７３塩基対であるが、他の属では長さが異なる場合がある）は、真菌種間で保存されている相同性の高い部分（以下、真菌共通

領域という）と、真菌科内でも属または種によって配列が大きく異なる部分（以下、属または種特異的領域という）とからなり、本発明者らはこれらの領域の配列を検出することで真菌の検出および真菌の菌種の同定を可能にした。

【００２４】

上記の真菌共通領域は、真菌種内ではよく保存されているが他の生物とは配列に相違があり、本発明者らはこの領域の真菌に共通する配列を検出して真菌の存在を検出し得ることを実験的に確認した。具体的には、例えば、この真菌共通領域内の核酸配列またはその相補配列である、配列番号２、配列番号３、配列番号４または配列番号５に記載の核酸配列の一部または全部を含有するオリゴヌクレオチドを核酸プライマーまたは標識プローブとして使用して真菌を検出する。これにより、１回の測定で全ての真菌を検出し得る。しかし、この測定のみでは真菌属および真菌の菌種を同定し得ない。

【００２５】

上記の種特異的領域は、真菌属間でも、そして属内の真菌の菌種間でも配列の相違があり、本発明者らはこの領域の特定の真菌種に特有の配列を検出することで、その真菌の存在を検出し得ることを実験的に確認した。具体的には、例えば、カンジダ・アルビカンスの種特異的領域内の核酸配列またはその相補配列である、配列番号６に記載の核酸配列の一部または全部を含有するオリゴヌクレオチドを核酸プライマーおよび標識プローブとして使用して、カンジダ・アルビカンスを検出する。

【００２６】

真菌の他の菌種についても、それぞれの菌種に特有の配列を検出してカンジダ・アルビカンスと同様に検出し得る。例えば、カンジダ・アルビカンスの場合配列番号６に記載の核酸配列の領域に相当する配列は、カンジダ・ルシタニエ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｌｕｓｉｔａｎｉａｅ）では配列番号７に記載の核酸配列であり、カンジダ・クルゼイ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｋｒｕｓｅｉ）では配列番号８に記載の核酸配列であり、カンジダ・グラブラータ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｇｌａｂｒａｔａ）では配列番号９に記載の核酸配列であり、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）では配列番号１０に記載の核酸配列であり、アスペルギルス・フミガタス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）では配列番号１１に記載の核酸配列であり、ニュウモシスチス・カリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｉｓｔｉｓ　ｃａｒｉｎｉｉ）では配列番号１２に記載の核酸配列である。

【００２７】

従って、配列番号６から配列番号１２のいずれかに記載の核酸配列の一部または全部を含有するオリゴヌクレオチドを核酸プライマーまたは標識プローブとして使用すれば、それぞれ、カンジダ・アルビカンス（配列番号６）、カンジダ・ルシタニエ（配列番号７）、カンジダ・クルゼイ（配列番号８）、カンジダ・グラブラータ（配列番号９）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（配列番号１０）、アスペルギルス・フミガタス（配列番号１１）、およびニュウモシスチス・カリニ（配列番号１２）を検出し得る。

【００２８】

本発明におけるオリゴヌクレオチドは、配列表の配列番号１の１位のＡから６８７位のＡまでの核酸配列の一部、あるいはその相補配列の一部を、真菌の菌種に応じて改変した配列を含有する。ここで一部の改変とは１または２以上のＤＮＡの欠失・挿入・置換などをいい、部位特異的点突然変異、あるいは欠失突然変異などを含む。

【００２９】

本発明における検出には、上記の１８ＳｒＲＮＡの遺伝子配列を検出して、血液、喀痰などのような各種臨床検体中に含まれる真菌および真菌の種を検出すること以外に、単離および培養された菌体の真菌種を判定することなども含まれることはいうまでもない。また、本発明における試料には、上記各種臨床検体、上記単離、培養菌体、およびこれらから単離、精製された核酸なども含まれる。また、増幅された核酸も含まれ得る。

【００３０】

本発明はまた、標識プローブに関する。標識プローブとして使用するオリゴヌクレオチド

は、配列表に記載の配列またはその相補配列の全域を使用する必要はなく、使用する核酸ハイブリダイゼーション条件に合わせて解離温度（Ｔｍ値）などを計算し、適当な領域を適当な長さで使用し得る。しかし、十分な特異性を有するプローブは、望ましくは１０塩基以上、さらに望ましくは２０塩基以上の長さが適当である。本発明の核酸プライマーとして使用するオリゴヌクレオチドも、配列またはその相補配列から、適当な長さの配列を用いて作製し得る。また、使用する条件および目的などに応じて、オリゴヌクレオチド中に、ある程度の改変を行い得ることは容易に予想できる。

【００３１】

本発明のオリゴヌクレオチドは化学合成により調製し得るので、クローン化したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに比べて、容易に、大量にかつ安価に一定品質のオリゴヌクレオチドが得られ得る。本発明のオリゴヌクレオチドはデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）のいずれでもあり得る。リボ核酸の場合はチミジン残基（Ｔ）をウリジン残基（Ｕ）と読み替えることは言うまでもない。あるいは任意の位置のＴをＵに変えて合成を行ったウリジン残基を含むＤＮＡでもあり得る。同様に任意の位置のＵをＴに変えたチミジン残基を含むＲＮＡでもあり得る。さらにオリゴヌクレオチド中に欠失、挿入または置換のような点突然変異、あるいは改変ヌクレオチドがあり得る。

【００３２】

本発明の標識プローブとしての標識は放射性物質、酵素、蛍光物質、または発光物質など公知の標識物が用いられ得る。標識の方法は末端標識または配列中の標識のいずれでもあり得る。あるいは糖、リン酸基、または塩基部分への標識もあり得る。例えば、リンカーアームを有するヌクレオチドを配列中のオリゴヌクレオチドと置換して酵素標識し得る（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．； １４巻６１１５頁１９８６年）。５位にリンカーアームを有するウリジンを、特開昭６０－５００７１７号公報に開示された合成法によりデオキシウリジンから化学合成し、上記オリゴヌクレオチドに導入し得る。

【００３３】

本発明のオリゴヌクレオチドは固相担体に結合して、捕捉プローブとしても用いられ得る。この場合、捕捉プローブと標識プローブとの組合せでサンドイッチアッセイ（特開昭５８－４００９９号公報参照）を行い得る。あるいは、標的核酸を標識して捕捉する方法（特開昭６２－２６５９９９　号公報参照）も用いられ得る。あるいは、オリゴヌクレオチドをビオチンで標識し、ハイブリダイゼーション後にアビジン結合担体で捕捉する方法も用いられ得る。

【００３４】

本発明は更に核酸プライマーに関する。オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用する場合、ＤＮＡポリメラーゼなどによる核酸増幅（例えばＰＣＲ；特開昭６０－２８１号公報参照）を行い、真菌のみについて共通の領域の核酸配列の増幅またはカンジダ・アルビカンスなど特定の菌種に特有の配列のみの増幅がされ得る。ＰＣＲ反応時に放射性標識ヌクレオチドを取り込ませる方法またはＰＣＲ増幅産物を電気泳動により分画して特有のバンドを検出する方法で、容易に１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の核酸配列を検出し得る。あるいは、上記標識オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて増幅産物を直接検出し得る。

【００３５】

本発明はまた、真菌の検出、真菌の菌種の同定、あるいは真菌の検出と菌種の同定とを行う方法である。

【００３６】

上記真菌共通領域の配列を利用する真菌の検出と、上記種特異的領域の特定の真菌種に特有の配列を利用する特定の真菌種の検出とは、それぞれのみでも臨床診断上有用であるが、これらを有機的に組み合わせることによりさらにその有用性を高め得る。例えば、配列番号２または配列番号３に記載の核酸配列を含有するオリゴヌクレオチドを核酸プライマーとして用いて臨床検体についてＰＣＲを行えば、真菌についてのみ、１８ＳｒＲＮＡの遺伝子配列の一部を有するＤＮＡが増幅される。このＤＮＡを、アガロースゲル電気泳動，または真菌に共通する配列である配列番号４に記載の核酸配列を有する標識プローブを

用いるハイブリダイゼーションアッセイにより検出し、各種真菌の存在を検出し得る。さらに、この増幅したＤＮＡは菌種によって配列が異なる部分を含有しているので、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１および配列番号１２などに記載の核酸配列を含む標識プローブを用いるハイブリダイゼーションアッセイによりこれらのＤＮＡを検出し、臨床検体中の真菌の菌種を同定し得る。更に真菌に共通の配列を有するオリゴヌクレオチドと菌種に特異的な配列を有するオリゴヌクレオチドとを同時に用いることにより真菌の検出と菌種の同定が同時に行われ得る。

【００３７】

この方法により、長時間を要する従来の培養法に比べて極めて短時間（１日以内）に真菌の検出および真菌の菌種の同定を行い得る。具体的には、易感染性患者などの臨床検体などを配列番号２または配列番号３に記載の核酸配列を含有する核酸プライマーを用いてＤＮＡを増幅し、１８ＳｒＲＮＡの遺伝子配列の一部を有するＤＮＡの増幅により真菌の存在が証明される。さらに、この増幅されたＤＮＡがハイブリダイゼーションアッセイにおいて配列番号６に記載の核酸配列を含む標識プローブとの反応により、カンジダ・アルビカンスの存在が証明され、病原体として疑われる。反応しない場合、別の真菌が病原体として疑われる。この真菌の菌種は、増幅したＤＮＡをさらに別の標識プローブで調べて同定し得る。

【００３８】

従来、ｒＲＮＡそのものをハイブリダイゼーションアッセイで検出して真菌の菌種を同定する方法（特表平１－５０３３５６号公報参照）などが開発されているが、やはり感度が低く、培養を必要とする。さらにＲＮＡは分解し易いため菌体から抽出する操作が難しく、しかもそのＲＮＡサンプルは保存および扱いが難しい。このため再現性に問題がある。本発明は、１８ＳｒＲＮＡの遺伝子ＤＮＡを検出し得る。ＤＮＡは極めて安定であり、簡単な操作で抽出し得、保存性もよくＤＮＡ増幅も容易である。

【００３９】

【実施例】

以下に、本発明の実施例を例示して、本発明の効果をより一層明確にする。

【００４０】

（実施例１）

（１）真菌検出用ＰＣＲプライマーの合成

ＤＮＡシンセサイザー３９２型（ＡＢＩ社製）を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号２に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、真菌プライマーＦという）および配列番号３に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、真菌プライマーＲという）を合成した。手法はＡＢＩ社のマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で５５℃、一夜実施した。精製はＨＰＬＣ（ベックマン社製）を用いて逆相カラムにて実施した。

【００４１】

（２）試料の調製

以下に示すＤＮＡをＰＣＲの試料として使用した。カンジダ・アルビカンスの培養、そのスフェロプラストの調製およびゲノムＤＮＡの調製は、阿部らの方法［昭和６２年１１月１０日、（株）ソフトサイエンス社発行、口野嘉幸ほか２名編「遺伝子・タンパク質・実験操作ブロッティング法」（初版）］に従って行った。その他の細菌および生物試料については、それぞれのＤＮＡ抽出および精製の常法に従って調製したものを、最終１ｎｇ／μｌ濃度となるようにＰＣＲ反応液に加えた。

【００４２】

1.カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)	6株
2.カンジダ・アルビカンスヴァステラトイデ (Candida albicans var stellatoidea)	2株
3.カンジダ・トロピカリス (Candida tropicalis)	2株
4.カンジダ・クルゼイ (Candida kurusei)	2株
5.カンジダ・グイリエモンヂ (Candida guilliermondii)	2株
6.カンジダ・パラプシロシス (Candida parapsilosis)	2株
7.カンジダ・カフィル (Candida kafyr)	2株
8.カンジダ・グラブラータ (Candida glabrata)	2株
9.カンジダ・ルシタニエ (Candida lusitaniae)	2株
10. サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)	2株
11. クリプトコッカス・ネオフォルマンス (Cryptococcus neoformans)	2株
12. トリコスポロン・ベイゲリ (Trichosporon beigelii)	2株
13. マラセジア・フウフウ (Malassezia furfur)	2株
14. アスペルギルス・フミガタス (Aspergillus fumigatus)	１８株
15. アスペルギルス・フラバス (Aspergillus flavus)	2株
16. アスペルギルス・ニドランス (Aspergillus nidulans)	2株
17. アスペルギルス・オリゼイ (Aspergillus oryzae)	1株
18. アスペルギルス・ベルジコラ (Aspergillus versicolor)	2株
19. アスペルギルス・テレウス (Aspergillus terreus)	2株
20. ペニシリウム・エクパンズム(Penicillium expansum)	1株
21. ペニシリウム・ノタツム (Penicillium notatum)	1株
22. ペニシリウム・シトレビリデ (Penicillium citreo-viride)	1株
23. ペニシリウム・フニクロズム (Penicillium fuiculosum)	1株
24. ペニシリウム・オリゼイ (Penicillium oryzae)	1株
25. ニュウモシスチス・カリニ (Pneumocistis carinii)	1株
26. ハンセヌラ・アノマラ (Hansenula anomala)	2株
27. デバリオマイセス・ポリモロプス (Debaryomyces polymorphus)	1株
28.アスペルギルス・ニゲル (Aspergillus niger)	2株

（３）ＰＣＲ

反応液の組成は、それぞれ１μＭのプライマーＦおよびプライマーＲ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．９）、１．５ｍＭ　$MgCl_2$、８０ｍＭ　ＫＣｌ、５００μｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、０．１％コール酸ナトリウム、０．１％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、それぞれ０．２ｍＭのｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、およびｄＴＴＰ、ならびに耐熱性のＴｈ　ＤＮＡポリメラーゼ（東洋紡製）４０単位／ｍｌ　である。反応条件は次の通りである。

熱変性：　　９４℃、１分
アニーリング：５５℃、２分
重合反応：　７２℃、１分

上記操作をＤＮＡサーマルサイクラー（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ／Ｃｅｔｕｓ社製）を用いて２５回行った。

【００４３】

（４）検出

５μｌの反応液を１．５％アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した後、紫外線による蛍光を検出した。泳動は、１００ｖの定電圧で３０分間行った。操作方法および他の条件は、ＭａｎｉａｔｉｓらのＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８２年）に記載の方法に従った。反応液と同時に分子量マーカーも泳動し、相対移動度を比較して、検出されたＤＮＡ断片の長さを算出した。

【００４４】

（５）結果

アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した後に紫外線で６８７塩基対の蛍光バンドが確認されたものを陽性とする。この結果、真菌の試料はすべてバンドが確認され、陽性と判定されたのに対して、その他の細菌および生物試料はいずれもバンドがみとめられず、陰性と判定された。

【００４５】

従って、本発明のオリゴヌクレオチドをＰＣＲに用いて、真菌を特異的に検出し得ると判明した。さらにＰＣＲなどのような核酸増幅による検出は高感度が期待できるため、真菌を単離する前の臨床検体などから直接検出し得、従来の培養に必要な時間（数週間）が不要になると考えられる。

【００４６】

（実施例２）

（１）リンカーアームを有する真菌の検出および真菌の菌種同定用オリゴヌクレオチドの合成

ＤＮＡシンセサイザー３９２型（ＡＢＩ社製）を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号６に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プローブ１という）、配列番号７に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プローブ２という）、配列番号８に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プローブ３という）、配列番号９に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プローブ４という）、配列番号１０に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プローブ５という）、配列番号１１に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プローブ６という）、および配列番号１２に記載の配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プローブ７という）を合成した。この合成においては、５位にリンカーアームを有するウリジンを、上記オリゴヌクレオチドに導入した。５位にリンカーアームを有するウリジンは、特表昭６０－５００７１７号公報に開示された合成法によりデオキシウリジンから化学合成して調製した。このウリジンはオリゴヌクレオチド内の任意のＴを置換し得るが、この実施例では５’末端のＴを置換した。合成リンカーオリゴヌクレオチドはアンモニア水で５０℃、一夜脱保護処理した後、ＨＰＬＣ（ベックマン社製）の逆相カラムを用いて精製した。

【００４７】

（２）リンカーオリゴヌクレオチドの酵素（アルカリ性ホスファターゼ）による標識

上記リンカーオリゴヌクレオチドと、そのリンカーアームを介するアルカリ性ホスファタ

ーゼとの結合を、文献（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．；１４巻６１１５頁１９８６年）に従って行った。

【００４８】

リンカーオリゴヌクレオチド１．５ Ａ２６０を０．２Ｍ $NaHCO_3$ １２．５μｌに溶解し、次いで１０ｍｇ／ｍｌスベリン酸ジスクシニミジル（ＤＳＳ）２５μｌを加えて室温で２分間反応させた。反応液を１ｍＭ CH_3COONa（ｐＨ５．０）で平衡化したＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－２５（ファルマシア社製）カラム（１ｃｍφｘ３０ｃｍ）でゲル濾過して過剰のＤＳＳを除去した。

【００４９】

末端のアミノ基が活性化されたリンカーオリゴヌクレオチドを、さらにモル比で２倍量のアルカリ性ホスファターゼ（ベーリンガーマンハイム社製、１００ｍＭ $NaHCO_3$、３Ｍ ＮａＣｌに溶解したもの）と室温で１６時間反応させてアルカリ性ホスファターゼ標識プローブを得た。

得られた標識プローブは、ＦＰＬＣ（ファルマシア社製）で陰イオン交換カラムを用いて精製した。標識プローブを含む画分を集め、セントリコン３０Ｋ（アミコン社製）を用いて限外濾過法により濃縮した。

【００５０】

（３）試料の調製

実施例１の（１）～（３）の操作で得られたＰＣＲ反応液（真菌プライマーＦおよび真菌プライマーＲによるＰＣＲ産物）を使用した。

【００５１】

（４）ドットブロットハイブリダイゼーション

実施例１の（１）～（３）の操作で得られたＰＣＲ反応液をナイロン膜（Ｈｙｂｏｎｄ Ｎ＋ 、アマシャム社製）に滴下し、０．４Ｎ ＮａＯＨで核酸を変性させてナイロン膜に固定した。この膜を中和後、ハイブリダイゼーションバック（ＢＲＬ社製） に移し、上記各アルカリ性ホスファターゼ標識核酸プローブ液（プローブ１～７）をそれぞれ含むハイブリダイゼーションバッファー（５ｘＳＳＣ、０．５％ウシ血清アルブミン、０．５％ポリビニルピロリドン、１％ドデシル硫酸ナトリウム）を加えてポリシーラーでシールし、プローブ６は５０℃で、他のプローブは４２℃で１５分間ハイブリダイゼーションを行った。

【００５２】

それぞれの膜をハイブリダイゼーションバッグから取り出し、洗浄液１（２ｘＳＳＣ、１％ドデシル硫酸ナトリウム）で５０℃、１０分間振盪して洗浄した。更に洗浄液２（１ｘＳＳＣ、０．５％ ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）で室温、１０分間振盪して洗浄した。最後に洗浄液３（１ｘＳＳＣ）で室温、５分間振盪して洗浄した。

【００５３】

膜を新しいハイブリダイゼーションバッグに移し、基質液（０．１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１Ｍ ＮａＣｌ、０．１Ｍ $MgCl_2$、０．３ｍｇ／ｍｌニトロブルーテトラゾリウム、０．３ｍｇ／ｍｌブロムクロロインドフェリルホスフェート（ｐＨ７．５））を加えてポリシーラーでシールし、３７℃で１時間インキュベートした。

【００５４】

（４）結果

アルカリ性ホスファターゼにより生じる紫色色素のスポットを目視判定した。スポットが確認できたものを陽性とした。

【００５５】

この結果、プローブ１はカンジダ・アルビカンス、プローブ２はカンジダ・ルシタニエ、プローブ３はカンジダ・クルゼイ、プローブ５はクリプトコッカス・ネオフォルマンス、そしてプローブ７はニュウモシスチス・カリニと特異的に反応して同程度の紫色色素のスポットが確認され、陽性と判定されたのに対して、その他の真菌はいずれもスポットが見られず、すべて陰性と判定された。

【００５６】
次に、プローブ４はカンジダ・グラブラータおよびサッカロマイセス・セレビシエと特異的に反応した。また、プローブ６はアスペルギルス属およびペニシリウム属と反応し陽性と判定された。
【００５７】
従って、本発明のオリゴヌクレオチドを標識プローブに用いて、真菌の検出や真菌の菌種の同定が可能であることが判明した。さらに、実施例１の（１）～（３）の操作で得られるＰＣＲ反応液１種類で、その後のハイブリダイゼーション操作により多種類の真菌の菌種を同定し得る。これは、高価な試薬および酵素が必要なＰＣＲ反応を、各菌種毎ではなく１回で行えることを意味し、検査費用の低減とさらなる検査時間の短縮を可能にする。この方法により、従来、培養などで数日から数週間かかっていた真菌の検出および真菌の菌種の同定を１日以内に終わらせ得る。
【００５８】
【発明の効果】
本発明により、直接的で簡便、迅速かつ確実な真菌の検出および真菌の菌種の同定が可能となった。本発明の配列またはその相補配列の一部または全部を有するオリゴヌクレオチドをＤＮＡ増幅反応のプライマーまたは直接検出用のプローブ、あるいはその組合せとして用い、従来、数日から数週間かかっていた培養およびその後の生化学的試験などに比べて、時間を大幅に短縮し、簡便で、かつ再現性のある確実な結果が得られ、さらに核酸増幅などにより、血液および喀痰などの臨床検体から直接検出し得るので、その臨床的意義は大きい。
【００５９】
【配列表】
【００６０】
【配列番号：１】

配列の長さ：687
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..687
　特徴を決定した方法：
　他の特徴：真菌１８ＳｒＲＮＡの遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列

```
ACTTTCGATG GTAGGATAGT GGCCTACCAT GGTGGCAACG GGTAACGGGG AATTAGGGTT   60
CGATTCCGGA GAGGGAGCCT GAGAAACGGC TACCACATCC AAGGAAGGCA GCAGGCGCGC  120
AAATTACCCA ATCCCGACAC GGGGAGGTAG TGACAATAAA TACTGATACG GGGCTCTTTT  180
GGGTCTCGTA ATTGGAATGA GTACAATCTA AATCCCTTAA CGAGGAACAA TTGGAGGGCA  240
AGTCTGGTGC CAGCAGCCGC GGTAATTCCA GCTCCAATAG CGTATATTAA AGTTGTTGCA  300
GTTAAAAAGC TCGTAGTTGA ACCTTGGGTC TGGCTGGCCG GTCCGCCTCA CCGCGAGTAC  360
TGGTCCGGCT GGACCTTTCC TTCTGGGGAA CCTCATGGCC TTCACTGGCT GTGGGGGGAA  420
CCAGGACTTT TACTGTGAAA AAATTAGAGT GTTCAAAGCA GGCCTTTGCT CGAATACATT  480
AGCATGGAAT AATAGAATAG GACGTGCGGT TCTATTTTGT TGGTTTCTAG GACCGCCGTA  540
ATGATTAATA GGGATAGTCG GGGGCGTCAG TATTCAGCTG TCAGAGGTGA AATTCTTGGA  600
TTTGCTGAAG ACTAACTACT GCGAAAGCAT TCGCCAAGGA TGTTTTCATT AATCAGGGAA  660
CGAAAGTTAG GGGATCGAAG ACGATCA                                       687
```

【００６１】
【配列番号：２】

配列の長さ：19
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..19
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：カンジダ・アルビカンス１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
ACTTTCGATG GTAGGATAG　19

【００６２】
【配列番号：３】
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：カンジダ・アルビカンス１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
TGATCGTCTT CGATCCCCTA　20

【００６３】
【配列番号：４】

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：カンジダ・アルビカンス１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
CTGAGAAACG GCTACCACAT　20

【００６４】
【配列番号：５】
配列の長さ：19
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..19
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：アスペルギルス・フミガタス１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
CAGAAGGAAA GGTCCAGCC　19

【００６５】
【配列番号：６】

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：カンジダ・アルビカンス１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
GTAGCCATTT ATGGCGAACC　20

【００６６】
【配列番号：７】
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：カンジダ・ルシタニエ１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
AGCAATAAGA GGAGGACTGT　20

【００６７】
【配列番号：８】

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：カンジダ・クルゼイ１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
TATGGTAAGC ACTGTTGCGG　20

【００６８】
【配列番号：９】
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：カンジダ・グラブラータ１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
CAAGTCCTTG TGGCTTGGCG　20

【００６９】
【配列番号：１０】

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：クリプトコッカス・ネオフォルマンス１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
GTGGTCCTGT ATGCTCTTTA　20

【００７０】
【配列番号：１１】
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：アスペルギルス・フミガタス１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
ATGGCCTTCA CTGGCTGTGG　20

【００７１】
【配列番号：１２】

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：両形態
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列の特徴
　存在位置：1..20
　特徴を決定した方法：S
　他の特徴：ニュウモシスチス・カリニ１８ＳｒＲＮＡ遺伝子の配列と相補的な配列を有する。
配列
GAAGTTGTGT GCACTGGCGC　20

フロントページの続き

審査官　小石　真弓

(56)参考文献　特開平０５－３３９４００（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－３３９３３９（ＪＰ，Ａ）
J. Med. Microbiol.，１９９４年　５月，40，358-364
Clin. Immunol. Newslett.，１９９２年，Vol.12，65-80
Mycoses，１９９４年　４月，37，79-84
J. clin. Microbiol.，１９９３年，31，904
J. Med. Vet. Mycol.，１９９３年，65-75

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12N 15/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)