

WO 2009/145303 A1

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2009年12月3日(03.12.2009)



PCT



(10) 国際公開番号

WO 2009/145303 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

6500023 兵庫県神戸市中央区栄町通4丁目1番
11号 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2009/059876

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日:

2009年5月29日(29.05.2009)

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語:

日本語

添付公開書類:

(26) 国際公開の言語:

日本語

— 国際調査報告(条約第21条(3))

(30) 優先権データ:

特願 2008-141665 2008年5月29日(29.05.2008) JP

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): シスメックス株式会社(SYSEMEX CORPORATION)
[JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸
通1丁目5番1号 Hyogo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 櫻山 佳代
(HIYAMA, Kayo) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市
中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
Hyogo (JP). 中林 一樹
(NAKABAYASHI, Kazuki) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫
県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 大友 泰
裕(OTOMO, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神
戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シス
メックス株式会社内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人サンクレスト国際特許事
務所(SunCrest Patent and Trademark Attorneys); 〒

(54) Title: PRIMER FOR DETECTION OF TYROSINASE mRNA

(54) 発明の名称: チロシナーゼのmRNAを検出するためのプライマー

(57) Abstract: Disclosed are a means and a method for detecting TYR mRNA. Specifically disclosed is a primer for detecting TYR mRNA. The primer has a first sequence on the 5'-terminal side and a second sequence on the 3'-terminal side, wherein the first sequence is a polynucleotide sequence having a length of 10 to 30 nucleotides and capable of hybridizing with a strand complementary to a first region that is a part of the sequence depicted in SEQ ID NO:1 and the second sequence is a polynucleotide sequence having a length of 10 to 30 nucleotides and capable of hybridizing with a second region that is located in the 3'-terminal side region from the first region in the sequence depicted in SEQ ID NO:1.

(57) 要約: 本発明は、TYR mRNAを検出する手段及び方法を提供する。TYR mRNA検出用プライマーとして、5'末端側に第一配列、3'末端側に第二配列を含み、第一配列は、10~30ヌクレオチドの長さを有し、配列番号1の一部の領域である第一領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、第二配列は、10~30ヌクレオチドの長さを有し、配列番号1において第一領域よりも3'末端側に位置する第二領域にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であるプライマーを用いる。

明 細 書

発明の名称：

チロシナーゼのmRNAを検出するためのプライマー

技術分野

[0001] 本発明は、チロシナーゼ（以下、「TYR」という）のmRNAを検出するするために用いられるプライマーに関する。さらに詳しくは、試料中のTYR mRNAの検出に好適なプライマー、プライマーセット及びTYR mRNAの検出方法に関する。

背景技術

[0002] TYRは、動物や植物の細胞で発現し、チロシンを酸化してメラニンを合成する反応を触媒する酵素の一種である。近年の研究により、TYRは、メラノーマのリンパ節転移を検出するための分子マーカーとして有用であることが分かってきた。例えば、非特許文献1には、生体から採取したリンパ節から測定試料を調製し、測定試料中のTYRのmRNAをRT-PCRによって検出することによって、メラノーマのリンパ節転移の有無を判定できることが開示されている。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：エブラハムセン(Abrahamsen)ら、「センチネル節におけるメラノーマmRNAマーカーの定量：シングルステップリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応アッセイの前臨床評価(Quantification of Melanoma mRNA Markers in Sentinel Nodes:Pre-Clinical Evaluation of a Single-Step Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay)」、2004年8月、第6巻、第3号、p. 253-259

発明の概要

[0004] 上述の通り、TYRのmRNAは、メラノーマ等のがんの検出のための分子マーカーとして有用である。しかしながら、非特許文献1に記載の技術は

、検出の際に、高感度に標的核酸を検出することができるR T - P C Rが用いられているため、例えば、がん細胞のリンパ節への微小転移をも検出できるが、検出までに非常に時間（2～4時間程度）がかかっていた。

[0005] 本発明は、従来の技術よりも短時間でT Y R m R N Aを検出することができる、T Y R m R N A検出用プライマー、T Y R m R N A検出用プライマーセット、T Y R m R N A検出用試薬キット及びT Y R m R N Aの検出方法を提供することを目的とする。

[0006] すなわち、本発明は、

[1] 試料中のチロシナーゼのm R N Aを検出するためのチロシナーゼm R N A検出用プライマーであって、

5'末端側に第一配列、3'末端側に第二配列を含んでなり、

前記第一配列が、

(a 1) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、

(b 1) 配列番号1の一部の領域である第一領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、

前記第二配列が、

(c 1) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、

(d 1) 配列番号1において第一領域よりも3'末端側に位置する第二領域にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、

前記第二領域が、

(i) 配列番号1の901及び902番目のヌクレオチド；又は

(ii) 配列番号1の1118及び1119番目のヌクレオチド；

を含む領域であるチロシナーゼm R N A検出用プライマー、

[2] 試料中のチロシナーゼのm R N Aを検出するためのチロシナーゼm R N A検出用プライマーセットであって、

第一プライマー、第二プライマー、及び第三プライマーを含み、

前記第一プライマーが、請求項1記載のプライマーであり、

前記第二プライマーが、5'末端側に第三配列、3'末端側に第四配列を

含み、

前記第三配列が、

(a 2) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、

(b 2) 前記配列番号1の第一領域よりも5'末端側に位置する第三領域にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、

前記第四配列が、

(c 2) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、

(d 2) 前記配列番号1の第三領域よりも5'末端側に位置する第四領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、

前記第三プライマーが、前記配列番号1の第四領域よりも5'末端側に位置する第五領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列からなるプライマーであるチロシナーゼmRNA検出用プライマーセット、

[3] 前記[2]記載のプライマーセットと、

dNTPsと、

mRNAを錆型としてDNAを合成する作用と鎖置換を行ないながらDNAを錆型にDNAを合成する作用とを備えた酵素、またはRNA依存性DNAポリメラーゼおよびDNA依存性DNAポリメラーゼとを含むチロシナーゼmRNA検出用試薬キット、

[4] 試料と、前記[2]記載のプライマーセットと、RNA依存性DNAポリメラーゼとを反応させて、前記試料中のチロシナーゼmRNAからcDNAを合成する工程、

前記プライマーセットと、DNA依存性DNAポリメラーゼと、前記工程で合成されたcDNAとを反応させて、前記cDNAを増幅する工程、及び前記工程で増幅されたcDNAを検出することにより、前記試料中のチロシナーゼmRNAを検出する工程

を含む、チロシナーゼmRNAの検出方法、並びに

[5] 試料と、前記[2]記載のプライマーセットと、RNAを錆型としてDNAを合成する作用と鎖置換を行ないながらDNAを錆型にDNAを合

成する作用とを備えた酵素とを反応させて、前記試料中のチロシナーゼ mRNA を鑄型として cDNA を合成するとともに、この cDNA を鑄型として当該 cDNA をさらに合成して増幅する工程、及び
前記工程で増幅された cDNA を検出することにより、前記試料中のチロシナーゼ mRNA を検出する工程
を含む、チロシナーゼ mRNA の検出方法
に関する。

[0007] 本発明の TYR mRNA 検出用プライマー、TYR mRNA 検出用プライマーセット、TYR mRNA 検出用試薬キット及び TYR mRNA の検出方法によれば、短時間で TYR mRNA を検出することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1] プライマーと、プライマーがハイブリダイズする領域とを示した模式図である。

発明を実施するための形態

[0009] [プライマー及びプライマーセット]

まず、TYR mRNA を検出するための TYR mRNA 検出用プライマーを説明する。

[0010] なお、本明細書において、「検出する」とは、標的とする物質である TYR mRNA が試料中に存在するか否かを判定することだけでなく、試料中の TYR mRNA を定量することをも含む。

[0011] 本明細書において、「プライマー」とは、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法 (米国特許第 6 4 1 0 2 7 8 号公報及び米国特許第 6 9 7 4 6 7 0 号公報参照) 等の核酸増幅技術において、増幅対象となる核酸の特定の領域にハイブリダイズし、ポリメラーゼによる増幅反応の起点となることのできる機能 (以下、「プライマー機能」という) を有するポリヌクレオチドをいう。検出対象となる核酸は mRNA であるため、逆転写反応を含む核酸増幅反応 (例えば、RT-LAMP 法等) により検出することができる。

- [0012] 「ハイブリダイズ」とは、ストリンジエントな条件下で、ポリヌクレオチドの塩基同士の相補性に基づいて、あるポリヌクレオチドの一部又は全部の配列が別のポリヌクレオチドの一部又は全部の配列に水素結合を介して結合することをいう。
- [0013] 「ストリンジエントな条件」とは、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを行なう際に当業者が一般的に用いる条件であって、本実施形態のプライマーが T Y R m R N A 又はその c D N A にハイブリダイズすることができる条件であれば特に限定されない。ハイブリダイゼーション時のストリンジエンシーは、温度、塩濃度、プライマーの鎖長、プライマーの G C 含量及びハイブリダイゼーション緩衝液中のカオトロピック剤の濃度の関数であることが知られている。ストリンジエントな条件としては、例えば、Sambrook, J. et al., 1998, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York に記載された条件等を用いることができる。より具体的には、「50% ホルムアミド、5 × S S C (150 mM NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.6、5 × デンハーツ溶液、10% デキストラン硫酸、及び 20 μg/ml の核酸を含む溶液中、ハイブリダイゼーション温度 42°C」を例示することができるが、これに限定されない。
- [0014] T Y R m R N A のヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示される配列に対応する配列である。なお、m R N A にはチミンは存在せず、代わりにウラシルが含まれるが、配列番号 1 では便宜上ウラシルをチミン (t) として表記してある。この配列は、GenBankデータベースにAccession No. NM_000372として登録されている。
- [0015] 本発明の一実施形態（実施形態 1）に係るプライマーは、試料中のチロシナーゼの m R N A を検出するための T Y R m R N A 検出用プライマーであつて、
5' 末端側に第一配列、3' 末端側に第二配列を含み、
前記第一配列が、

- (a 1) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、
- (b 1) 配列番号1の一部の領域である第一領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、
前記第二配列が、
- (c 1) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、
- (d 1) 配列番号1において第一領域よりも3'末端側に位置する第二領域にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、
前記第二領域が、
- (i) 配列番号1の901及び902番目のヌクレオチド；又は
(ii) 配列番号1の1118及び1119番目のヌクレオチド；
を含む領域であることを特徴としている。

- [0016] 本実施形態1のプライマーは、特に、RT-LAMP法を用いたTYR mRNAの検出に好適に用いられるプライマーである。本実施形態1のプライマーによれば、5'末端側に前記第一配列、3'末端側に前記第二配列を含んでいるため、TYR mRNAを効率よく、かつ再現性よく検出することができる。
- [0017] 前記RT-LAMP法においては、まずは逆転写反応(RT反応)によつてTYR mRNAからcDNAが合成され、続いて合成されたcDNAがLAMP反応により増幅される。
かかるRT-LAMP法を用いたTYR mRNAの検出では、本実施形態1のプライマーとして、例えば、図1に模式的に示されるように、TYR mRNAの一部の領域(図1中、「R1c」)の相補領域(図1中、「R1」)にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列である第一配列を5'末端側に有し、TYR mRNAにおいて前記領域R1cよりも下流(3'末端側)に位置する領域(図1中、「R2c」)にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列である第二配列を3'末端側に有するポリヌクレオチドからなるプライマーを用いることができる。

- [0018] 前記第一配列及び第二配列は、本実施形態1のプライマーと当該プライマ

一がハイブリダイズする領域との間のハイブリダイゼーションの特異性の観点から、それぞれ独立して、好ましくは10ヌクレオチド以上の長さであり、T Y R mRNAの検出に際して、操作が容易なハイブリダーゼーション温度を確保する観点から、好ましくは30ヌクレオチド以下の長さである。

- [0019] 本実施形態1のプライマーにおいては、第一配列と第二配列とは直接連結されていてもよく、介在配列を介して連結されていてもよい。介在配列としては、T Y R mRNAやT Y R cDNAとは関連性の低い配列であることが好ましい。例えば、5'-tttt-3'等が挙げられる。介在配列の長さは、1~50ヌクレオチドであることが好ましく、1~40ヌクレオチドであることがより好ましい。
- [0020] 本実施形態1のプライマーは、前記RT-LAMP法で用いられるプライマーのうち、リバースインナープライマー（以下、「RIP」という）として機能することができる。
- [0021] RT-LAMP法を用いてT Y R mRNAを検出するためには、前記実施形態1のプライマー（RIP）と、フォワードインナープライマー（以下、「FIP」という）と、F3プライマーとを用いることができる。本発明には、これらのプライマーを含むT Y R mRNA検出用プライマーセットも包含される。
- [0022] 本発明の一実施形態に係るT Y R mRNA検出用プライマーセットは、試料中のチロシナーゼのmRNAを検出するためのT Y R mRNA検出用プライマーセットであって、
第一プライマー、第二プライマー、及び第三プライマーを含み、
前記第一プライマーが、前記実施形態1のプライマーであり、
前記第二プライマーが、5'末端側に第三配列、3'末端側に第四配列を含み、
前記第三配列が、
(a) 10~30ヌクレオチドの長さを有し、
(b) 前記配列番号1の第一領域よりも5'末端側に位置する第三領域

にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、

前記第四配列が、

(c 2) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、

(d 2) 前記配列番号1の第三領域よりも5'末端側に位置する第四領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、

前記第三プライマーが、前記配列番号1の第四領域よりも5'末端側に位置する第五領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列からなるプライマーであることを特徴としている。

[0023] 本実施形態のプライマーセットによれば、前記第一プライマー、第二プライマー、及び第三プライマーを含むため、TYR mRNAを高い効率で、迅速に、かつ再現性よく検出することが可能になる。

[0024] 本実施形態のプライマーセットは、前記配列番号1の第二領域よりも3'末端側に位置する第六領域にハイブリダイズ可能である第四プライマーをさらに含んでいてもよい。また、本実施形態のプライマーセットは、前記配列番号1の前記第三領域と前記第四領域との間に位置する第七領域にハイブリダイズする第五プライマーをさらに含んでいてもよい。さらに、本実施形態のプライマーセットは、前記配列番号1の前記第一領域と第二領域との間に位置する第八領域の相補領域にハイブリダイズする第六プライマーをさらに含んでいてもよい。

[0025] 以下、図1に基づいて、前記プライマーおよびプライマーセットをさらに説明する。

図1は、プライマーと、プライマーがハイブリダイズする領域とを示した模式図である。なお、図1中、F1、F2、L、F1c、R1c、R2c及びR3cの各領域は、TYR mRNA上の領域であり、F3c、F2c、F1c、R1、M、R2及びR3の各領域は、TYR mRNAの相補鎖であるTYR cDNA上の領域である。また、F1とF1c、F2とF2c、F3とF3c、R1とR1c、R2とR2c、及びR3とR3cは、それぞれ相補的である。これらの領域は、TYR mRNAの検出効率、再現性等

を考慮して選択される。

- [0026] 図1において、RIPは前記第一プライマー、FIPは前記第二プライマー、F3プライマーは前記第三プライマー、R3プライマーは前記第四プライマー、ループプライマーFは前記第五プライマー、ループプライマーRは前記第六プライマーにそれぞれ対応している。
- [0027] FIP(第二プライマー)は、TYR mRNAの相補鎖であるTYR cDNAの領域F1(F1cの相補領域)にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列である第三配列を5'末端側に有し、TYR cDNAの領域F2cにハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列である第四配列を3'末端側に有するポリヌクレオチドである。第三配列と第四配列とは、直接連結されていてもよく、前記介在配列を介して連結されていてもよい。また、FIPにおいて、第三配列及び第四配列の長さは、前記第一配列及び第二配列の長さと同様である。
- [0028] F3プライマー(第三プライマー)は、TYR cDNAのF2cよりも下流(3'末端側)に位置する領域F3cにハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドからなる。
- [0029] さらに、本発明のプライマーセットは、FIP、RIP及びF3プライマーに加えて、R3プライマーを含んでいてもよい。このR3プライマーは、TYR mRNAのR2cよりも下流(3'末端側)に位置する領域R3cにハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドからなる。
- [0030] さらに、本発明のプライマーセットは、ループプライマーを含んでいてもよい。ループプライマーとしては、TYR mRNAにおいてF2とF1との間に位置する領域Lにハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドであるループプライマーF、TYR cDNAにおいてR1とR2との間に位置する領域Mにハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドであるループプライマーR等が挙げられる。本発明のプライマーセットは、これらのループプライマーF及びRの一方又は両方を含んでいてもよい。
- 本発明のプライマーセットがループプライマーF及びRの片方又は両方を含

むものである場合、かかるプライマーセットによれば、LAMP反応によるcDNAの増幅をより迅速に行なうことが可能となる。

[0031] F3プライマー、R3プライマー、ループプライマーF及びRの鎖長は、プライマー機能を発現するに十分な長さであれば特に限定されない。核酸合成反応を触媒する公知のポリメラーゼが認識するプライマーの鎖長は、5ヌクレオチド以上であることから、前記各プライマーの鎖長は、それぞれ、好ましくは5～100ヌクレオチドである。また、プライマーのヌクレオチド配列とプライマーがハイブリダイズする領域との間の特異性を考慮すると、前記各プライマーの鎖長は、好ましくは10ヌクレオチド以上、プライマーのハイブリダイゼーション温度を考慮すると、好ましくは30ヌクレオチド以下である。また、FIP及びRIPの鎖長は、20～200ヌクレオチドが好ましく、20～60ヌクレオチドがより好ましい。

[0032] 本発明のプライマーセットでは、上述のプライマーのうち、少なくとも一つがTYR mRNAのエキソンジャンクションを含む領域にハイブリダイズすることが好ましい。TYR遺伝子は、9個のエキソンからなり、エキソンとエキソンとの間にはイントロンが介在している。細胞内でTYR遺伝子からmRNAが合成される際はスプライシングによってイントロンが除去され、エキソン同士が直接連結される。このエキソンとエキソンとが連結されたつなぎ目の部分をエキソンジャンクションという。例えば、ゲノムではエキソン1とエキソン2とはイントロンによって隔離されているが、mRNA合成において前記イントロンは除去されるためmRNAではエキソン1の3'末端とエキソン2の5'末端とは隣接している。配列番号1は5個のエキソンからなるため、配列番号1には、以下の4個のエキソンジャンクション（エキソンジャンクション1～4）がある。

エキソン1と2とのエキソンジャンクション1：配列番号1の901番目と902番目との結合部分

エキソン2と3とのエキソンジャンクション2：配列番号1の1118番目と1119番目との結合部分

エキソン3と4とのエキソンジャンクション3：配列番号1の1266番目と1267番目との結合部分

エキソン4と5とのエキソンジャンクション4：配列番号1の1448番目と1449番目との結合部分

[0033] エキソンジャンクションを含む領域にハイブリダイズ可能なプライマーは、T Y R 遺伝子のm R N Aにはハイブリダイズするが、T Y R 遺伝子のゲノムD N Aにはハイブリダイズする可能性は極めて低い。このようなプライマーによれば、R T - L A M P 反応によるm R N A検出の際に非特異的に核酸を増幅してしまうことを防止することが可能となる。

[0034] また、R T - L A M P 反応の反応機序（米国特許第6 4 1 0 2 7 8号公報及び米国特許第6 9 7 4 6 7 0号公報参照）によると、試料中のT Y R m R N Aに最初にハイブリダイズするのは、R I P の第二配列からなるポリヌクレオチド部分であると考えられる。したがって、本発明のプライマーセットでは、上述のプライマーのうち、R I P の第二配列からなるポリヌクレオチド部分がエキソンジャンクションを含む領域にハイブリダイズすることがより好ましい。すなわち、前記領域R 2 cがエキソンジャンクションを含むことがより好ましい。これにより、反応の初期の段階で非特異的に核酸を増幅してしまうことを避けることができる。

[0035] T Y R m R N Aと、試料中の他の遺伝子に由来するm R N Aとの間の相同意性や、検出速度、検出の再現性等の観点から、本発明のプライマーセットは、好ましくは上記のエキソンジャンクションのうちエキソンジャンクション1又は2を含む領域にハイブリダイズするプライマー、より好ましくはエキソンジャンクション2を含む領域にハイブリダイズするプライマーを含む。

[0036] 本実施形態のプライマーと、このプライマーがハイブリダイズするT Y R m R N Aの特定の領域とは、互いに完全に相補的である必要はなく、両者は、互いにハイブリダイズできる程度の相補性を有していればよい（このことは、米国特許第4 8 0 0 1 5 9号公報にも記載されている）。すなわち、

プライマー機能を有するポリヌクレオチドであれば、このプライマーは、上記特定の領域と完全な相補性を有する配列に置換、欠失、挿入、付加等のような変異を1又は複数個、すなわち、数個有するポリヌクレオチドであってもよい。この変異を有するポリヌクレオチドは、変異を有していないポリヌクレオチドに対して80%以上の相同性を有していることが好ましく、90%以上の相同性を有していることがより好ましく、95%以上の相同性を有していることがさらに好ましい。

- [0037] RT-LAMP反応では、プライマーが目的の核酸であるT Y R m R N Aにハイブリダイズした後、ポリメラーゼの作用によってプライマーの3'末端を起点として核酸合成が行なわれる。このため、プライマーの3'末端部分とT Y R m R N Aとの間の相補性が高いほど、核酸合成反応が進行しやすくなることが考えられる。したがって、本発明のプライマーは、好ましくは3'末端の3ヌクレオチドが、当該プライマーのハイブリダイズする領域と完全に相補的なポリヌクレオチドであり、より好ましくは3'末端の5ヌクレオチドが完全に相補的なポリヌクレオチドである。
- [0038] なかでも、T Y R m R N Aの検出に際して、特異性を向上させる観点から、前記第二配列が、3'末端に、前記第二領域の配列に完全に相補的な連続した3ヌクレオチドからなる配列を含んでいることが好ましく、前記第二領域の配列に完全に相補的な連続した5ヌクレオチドからなる配列を含んでいることがより好ましい。
- [0039] F3、F2、F1、R1c、R2c、R3c、L及びMの各領域は、配列番号1に示されるT Y R m R N Aの配列中に設定される。以下に、これらの領域の具体例を挙げる。
- [0040] (F1)

795～817番目の領域

1005～1024番目の領域

1015～1036番目の領域

1016～1040番目の領域

1031～1054番目の領域

[0041] (F2)

731～751番目の領域

963～977番目の領域

964～986番目の領域

971～992番目の領域

972～992番目の領域

986～1008番目の領域

[0042] (F3)

703～722番目の領域

931～953番目の領域

945～962番目の領域

950～962番目の領域

966～985番目の領域

[0043] (R1c)

825～848番目の領域

1026～1049番目の領域

1041～1062番目の領域

1044～1064番目の領域

1044～1068番目の領域

1057～1080番目の領域

[0044] (R2c)

886～908番目の領域

1110～1133番目の領域

1114～1131番目の領域

1114～1133番目の領域

[0045] (R3c)

917～936番目の領域

1135～1153番目の領域

1138～1155番目の領域

1138～1156番目の領域

1141～1160番目の領域

1142～1161番目の領域

[0046] (L)

752～776番目の領域

981～1004番目の領域

982～1004番目の領域

982～1006番目の領域

986～1010番目の領域

987～1011番目の領域

988～1011番目の領域

988～1012番目の領域

989～1011番目の領域

989～1012番目の領域

989～1013番目の領域

990～1012番目の領域

990～1013番目の領域

990～1014番目の領域

992～1015番目の領域

993～1016番目の領域

994～1016番目の領域

995～1016番目の領域

995～1018番目の領域

996～1018番目の領域

1000～1019番目の領域

1001～1020番目の領域

1003～1022番目の領域
1004～1022番目の領域
1005～1024番目の領域
1006～1024番目の領域
1008～1027番目の領域
1009～1027番目の領域
1009～1028番目の領域
1010～1029番目の領域

[0047] (M)

860～884番目の領域
1063～1087番目の領域
1065～1089番目の領域
1066～1090番目の領域
1067～1089番目の領域
1067～1090番目の領域
1068～1091番目の領域
1068～1092番目の領域
1069～1091番目の領域
1069～1092番目の領域
1069～1093番目の領域
1070～1093番目の領域
1070～1094番目の領域
1073～1097番目の領域
1074～1098番目の領域
1075～1099番目の領域
1082～1104番目の領域
1083～1105番目の領域
1084～1105番目の領域

1085～1107番目の領域

[0048] 本発明においては、前記プライマーは、上記の各領域に基づき設計することができる。以下に、各プライマーの具体例を挙げる。なお、配列の後の括弧内の記載は、各プライマーが T Y R m R N A の配列（配列番号 1）のどの領域と同じ配列であるか、又は相補的であるかを示したものである。

[0049] (F3 プライマー)

配列番号 2 : 5'-AATGGAACGCCGAGGGA-3' (950-967番目の領域と同じ配列)

配列番号 3 : 5'-GACCTTACGGCGTAATCCT-3' (966-985番目の領域と同じ配列)

)

配列番号 4 : 5'-TATGCAATGGAACGCCG-3' (945-962番目の領域と同じ配列)

配列番号 5 : 5'-CAGCCATCAGTCTTATGCAATG-3' (931-953番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 : 5'-TCTGCCTTGGCATAGACTCT-3' (703-722番目の領域と同じ配列)

)

[0050] (FIP)

配列番号 7 : 5'-CAAACTCAGGCAAAATTCTACATCTACGGCGTAATCCTGGAAACC-3'

(1031-1054番目の領域の相補配列と971-992番目の領域と同じ配列とを連結した配列)

配列番号 8 : 5'-CAAACTCAGGCAAAATTCTACATCGGAAACCATGACAAATCCAGAAC-3'

(1031-1054番目の領域の相補配列と986-1008番目の領域と同じ配列とを連結した配列)

配列番号 9 : 5'-TACATCAGCTGAAGAGGGGAGCAGGGACCTTACGGC-3'

(1015-1036番目の領域の相補配列と963-977番目の領域と同じ配列とを連結した配列)

配列番号 10 : 5'-CAAACTCAGGCAAAATTCTACATCTACGGCGTAATCCTGGAAACC-3'

(1031-1054番目の領域の相補配列と972-992番目の領域と同じ配列とを連結した配列)

配列番号 11 : 5'-AGAGGGGAGCCTTGGGTTCAAGGGACCTTACGGC-3'

(1005–1024番目の領域の相補配列と963–977番目の領域と同じ配列とを連結した配列)

配列番号 1 2 : 5' –ATTCTACATCAGCTGAAGAGGGAGGGGACCTTACGGCGTAATCCTG–3'

(1016–1040番目の領域の相補配列と964–986番目の領域と同じ配列とを連結した配列)

配列番号 1 3 : 5' –GTCACACTTTCTGCATCCCGCCCGGTGGAACAAAGAAATCCAG–3'

(795–817番目の領域の相補配列と731–751番目の領域と同じ配列とを連結した配列)

[0051] (R I P)

配列番号 1 4 : 5' –CCAATATGAATCTGGTTCATGGAGTGGACTAGCAAATCCTTCC–3'

(1057–1080番目の領域と同じ配列と、1114–1133番目の領域の相補配列とを連結した配列)

配列番号 1 5 : 5' –TTTGCCTGAGTTGACCCAATAGGACTAGCAAATCCTTCC–3'

(1041–1062番目の領域と同じ配列と、1114–1131番目の領域の相補配列とを連結した配列)

配列番号 1 6 : 5' –GCCTGAGTTGACCCAATATGGTGGACTAGCAAATCCTTCC–3'

(1044–1064番目の領域と同じ配列と、1114–1133番目の領域の相補配列とを連結した配列)

配列番号 1 7 : 5' –CAGCTGATGTAGAATTTGCCTGAGTGGACTAGCAAATCCTTCC–3'

(1026–1049番目の領域と同じ配列と、1114–1133番目の領域の相補配列とを連結した配列)

配列番号 1 8 : 5' –GCCTGAGTTGACCCAATATGAATCGTGGACTAGCAAATCCTTCCAGTG–3'

(1044–1068番目の領域と同じ配列と、1110–1133番目の領域の相補配列とを連結した配列)

配列番号 1 9 : 5' –CAGATGAGTACATGGGAGGTCAGCAGACAATCTGCCAAGAGGAGAAG–3'

(825–848番目の領域と同じ配列と、886–908番目の領域の相補配列とを連結した配列)

結した配列)

[0052] (R 3 プライマー)

配列番号 20 : 5'-GAGGCATCCGCTATCCCA-3' (1138-1155番目の領域の相補配列)

配列番号 21 : 5'-TTTGAGAGGCATCCGCTATC-3' (1141-1160番目の領域の相補配列)

配列番号 22 : 5'-GGCATCCGCTATCCCAGTA-3' (1135-1153番目の領域の相補配列)

配列番号 23 : 5'-AGAGGCATCCGCTATCCCA-3' (1138-1156番目の領域の相補配列)

配列番号 24 : 5'-CTTGAGAGGCATCCGCTAT-3' (1142-1161番目の領域の相補配列)

配列番号 25 : 5'-TGGCTGTTGTACTCCTCCAA-3' (917-936番目の領域の相補配列)

[0053] (ループプライマー F)

配列番号 26 : 5'-GCCTTGGGGTTCTGGATTGTCA-3' (994-1016番目の領域の相補配列)

配列番号 27 : 5'-CTGAAGAGGGGAGCCTGGG-3' (1009-1028番目の領域の相補配列)

配列番号 28 : 5'-GCCTTGGGGTTCTGGATTGTCA-3' (993-1016番目の領域の相補配列)

配列番号 29 : 5'-TGAAGAGGGGAGCCTGGG-3' (1009-1027番目の領域の相補配列)

配列番号 30 : 5'-GGAGCCTTGGGGTTCTGGAT-3' (1000-1019番目の領域の相補配列)

配列番号 31 : 5'-GCCTTGGGGTTCTGGATTGTCA-3' (995-1016番目の領域の相補配列)

配列番号 32 : 5'-GGGTTCTGGATTGTCA-TGGTTCC-3' (986-1010番目の領域の

相補配列)

配列番号 3 3 : 5'-GGGAGCCTGGGGTTCTGGA-3' (1001-1020番目の領域の相補配列)

配列番号 3 4 : 5'-GAGCCTGGGGTTCTGGATTTGT-3' (996-1018番目の領域の相補配列)

配列番号 3 5 : 5'-GCTGAAGAGGGGAGCCTGG-3' (1010-1029番目の領域の相補配列)

配列番号 3 6 : 5'-TCTGGATTTCATGGTTCCAGGA-3' (982-1006番目の領域の相補配列)

配列番号 3 7 : 5'-GAGCCTGGGGTTCTGGATTTGTC-3' (995-1018番目の領域の相補配列)

配列番号 3 8 : 5'-TGGGGTTCTGGATTTGTCAATGGT-3' (989-1012番目の領域の相補配列)

配列番号 3 9 : 5'-GGGGTTCTGGATTTGTCAATGGTTC-3' (987-1011番目の領域の相補配列)

配列番号 4 0 : 5'-TGAAGAGGGGAGCCTGGGG-3' (1008-1027番目の領域の相補配列)

配列番号 4 1 : 5'-CTTGGGGTTCTGGATTTGTCAATGGT-3' (990-1014番目の領域の相補配列)

配列番号 4 2 : 5'-TGGGGTTCTGGATTTGTCAATGGT-3' (990-1012番目の領域の相補配列)

配列番号 4 3 : 5'-AGGGGAGCCTGGGGTTCT-3' (1004-1022番目の領域の相補配列)

配列番号 4 4 : 5'-AGAGGGGAGCCTGGGGTTC-3' (1005-1024番目の領域の相補配列)

配列番号 4 5 : 5'-TTGGGGTTCTGGATTTGTCAATGGT-3' (990-1013番目の領域の相補配列)

配列番号 4 6 : 5'-AGAGGGGAGCCTGGGGTT-3' (1006-1024番目の領域の相補

配列)

配列番号 4 7 : 5'-TGGATTTGTCATGGTTCCAGGAT-3' (981-1004番目の領域の相補配列)

配列番号 4 8 : 5'-GGGGTTCTGGATTTGTCATGGTT-3' (988-1012番目の領域の相補配列)

配列番号 4 9 : 5'-GGGGTTCTGGATTTGTCATGGTT-3' (989-1011番目の領域の相補配列)

配列番号 5 0 : 5'-CCTTGGGGTTCTGGATTTGTCATG-3' (992-1015番目の領域の相補配列)

配列番号 5 1 : 5'-TGGATTTGTCATGGTTCCAGGA-3' (982-1004番目の領域の相補配列)

配列番号 5 2 : 5'-GGGGTTCTGGATTTGTCATGGTT-3' (988-1011番目の領域の相補配列)

配列番号 5 3 : 5'-TTGGGGTTCTGGATTTGTCATGGTT-3' (989-1013番目の領域の相補配列)

配列番号 5 4 : 5'-AGGGGAGCCTGGGGTTCTG-3' (1003-1022番目の領域の相補配列)

配列番号 5 5 : 5'-TGAAGTTTCATCTCCTGTCAGCTT-3' (752-776番目の領域の相補配列)

[0054] (ループプライマーR)

配列番号 5 6 : 5'-AAAGCTGCCAATTTCAGCTTAG-3' (1082-1104番目の領域と同じ配列)

配列番号 5 7 : 5'-AGCTGCCAATTTCAGCTTAGA-3' (1084-1105番目の領域と同じ配列)

配列番号 5 8 : 5'-GCTGCCAATTTCAGCTTAGAAA-3' (1085-1107番目の領域と同じ配列)

配列番号 5 9 : 5'-AAGCTGCCAATTTCAGCTTAGA-3' (1083-1105番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 0 : 5' -ATCTGGTCCATGGATAAAGCTGCC-3' (1066-1090番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 1 : 5' -AATCTGGTCCATGGATAAAGCTGC-3' (1065-1089番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 2 : 5' -CTGGTCCATGGATAAAGCTGCCAA-3' (1068-1092番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 3 : 5' -TGGTTCCATGGATAAAGCTGCCAA-3' (1069-1092番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 4 : 5' -GGTTCCATGGATAAAGCTGCCAAT-3' (1070-1093番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 5 : 5' -TCCATGGATAAAGCTGCCAATTCA-3' (1073-1097番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 6 : 5' -CTGGTTCCATGGATAAAGCTGCCA-3' (1068-1091番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 7 : 5' -TCTGGTCCATGGATAAAGCTGCC-3' (1067-1090番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 8 : 5' -TGAATCTGGTCCATGGATAAAGCT-3' (1063-1087番目の領域と同じ配列)

配列番号 6 9 : 5' -TGGTTCCATGGATAAAGCTGCCA-3' (1069-1091番目の領域と同じ配列)

配列番号 7 0 : 5' -CATGGATAAAGCTGCCAATTTCAGC-3' (1075-1099番目の領域と同じ配列)

配列番号 7 1 : 5' -GGTTCCATGGATAAAGCTGCCAATT-3' (1070-1094番目の領域と同じ配列)

配列番号 7 2 : 5' -CCATGGATAAAGCTGCCAATTTCAG -3' (1074-1098番目の領域と同じ配列)

配列番号 7 3 : 5' -TCTGGTCCATGGATAAAGCTGC-3' (1067-1089番目の領域と同じ配列)

配列番号 7 4 : 5'-TGGTTCCATGGATAAAGCTGCCAAT-3' (1069-1093番目の領域
と同じ配列)

配列番号 7 5 : 5'-CCTAACTTACTCAGCCCAGCATCAT-3' (860-884番目の領域と
同じ配列)

[0055] 上記のプライマーのうち、配列番号 1 9 に示されるヌクレオチド配列から
なるプライマーは、エキソンジャンクション 1 を含む領域にハイブリダイズ
可能である。

配列番号 1 4 ~ 1 8 のプライマーは、エキソンジャンクション 2 を含む領
域にハイブリダイズ可能である。

[0056] 上記のプライマーは、増幅領域に応じて F 3 プライマー、F I P、R I P
及び R 3 プライマーを適宜組み合わせて 4 種類のプライマーを含むプライマ
ーセットとして用いることができる。また、さらにループプライマー F 及び
R を組み合わせて 6 種類のプライマーを含むプライマーセットとして用いる
ことができる。このようなプライマーセットの具体例を下記表 1 に示す。

[0057]

[表1]

$\text{F}^3\text{-}\text{J}^7\text{-}\text{セリト}$	$\text{F}^3\text{-}\text{J}^7\text{-}\text{RIP}$	$\text{R}^3\text{-}\text{J}^7\text{-}\text{RIP}$	$\text{F}^3\text{-}\text{J}^7\text{-}\text{RIP}$	$\text{R}^3\text{-}\text{J}^7\text{-}\text{RIP}$	$\text{F}^3\text{-}\text{J}^7\text{-}\text{RIP}$	$\text{R}^3\text{-}\text{J}^7\text{-}\text{RIP}$	$\text{F}^3\text{-}\text{J}^7\text{-}\text{RIP}$
1	2	7	14	20	26	56	24
2	3	8	14	20	27	57	25
3	2	7	14	20	28	58	26
4	3	8	14	20	29	57	27
5	2	7	14	20	30	59	28
6	2	7	14	20	31	57	29
7	4	9	15	21	32	60	30
8	4	9	16	22	32	61	31
9	2	7	14	20	33	57	32
10	2	10	14	23	27	57	33
11	2	7	14	20	34	57	34
12	2	10	14	23	35	57	35
13	4	9	16	22	36	60	36
14	4	9	16	22	36	62	37
15	2	7	14	20	37	58	38
16	4	9	15	21	38	63	39
17	4	9	16	22	39	64	40
18	4	9	15	21	39	60	41
19	4	9	16	22	32	65	42
20	4	9	16	22	39	60	43
21	2	10	14	23	40	57	44
22	4	9	15	21	41	66	45
23	4	9	15	21	42	60	

[0058] 逆転写酵素及び鎖置換型DNAポリメラーゼは、公知のものを用いることができる。また、これら二種類の酵素（逆転写酵素及び鎖置換型DNAポリメラーゼ）の代わりに、RNAを鑄型としてDNAを合成する作用と鎖置換を行ないながらDNAを鑄型にDNAを合成する作用とを備えた一種類の酵素を用いてもよい。

[0059] さらに、酵素反応に好適な条件を与える緩衝剤をも用いることが好ましい

。

上述の物質はそれぞれ別々の容器に収容することができるが、逆転写酵素及び鎖置換型DNAポリメラーゼを同一の容器に収容してもよい。また、dNTPs、緩衝剤、及び各種プライマーのうち少なくとも二種類の物質を同一の容器に収容してもよい。これらの試薬をユーザに提供する際は、上記の試薬の一部又は全部を含む試薬キットとして提供してもよい。

[0060] [TYR mRNAの検出方法及びTYR mRNA検出用試薬キット]

つぎに、TYR mRNAの検出方法を説明する。本発明のTYR mRNAの検出方法は、

上述のプライマーセットと、RNA依存性DNAポリメラーゼ及びDNA依存性DNAポリメラーゼとを用いること（下記「実施形態1の検出方法」）、または

上述のプライマーセットと、RNAを鑄型としてDNAを合成する作用と鎖置換を行ないながらDNAを鑄型にDNAを合成する作用とを備えた酵素とを用いること（下記「実施形態2の検出方法」）

により実施することができる

[0061] 前記実施形態1の検出方法は、

(I-1) 試料と、上述のプライマーセットと、RNA依存性DNAポリメラーゼとを反応させて、前記試料中のチロシナーゼmRNAからcDNAを合成する工程、

(II-1) 前記プライマーセットと、DNA依存性DNAポリメラーゼと、前記工程(I-1)で合成されたcDNAとを反応させてcDNAを増幅する工程、

(III-1) 前記工程(II-1)で増幅されたcDNAを検出することにより、前記試料中のチロシナーゼmRNAを検出する工程、
を含む方法である。

[0062] また、前記実施形態2の検出方法は、

(I-2) 試料と、上述のプライマーセットと、RNAを鑄型としてDN

Aを合成する作用と鎖置換を行ないながらDNAを鑄型にDNAを合成する作用とを備えた酵素とを反応させて、前記試料中のチロシナーゼmRNAを鑄型としてcDNAを合成するとともに、このcDNAを鑄型として当該cDNAをさらに合成して増幅する工程、及び

(II-2) 前記工程で増幅されたcDNAを検出することにより、前記試料中のチロシナーゼmRNAを検出する工程
を含む方法である。

[0063] 実施形態1及び2の検出方法は、高い効率で、正確にかつ短時間でT_YR mRNAを検出する観点から、RT-LAMP法を用いて行なうことが好ましい。

[0064] 前記実施形態1の検出方法において、RT-LAMP法を用いる場合、上述のプライマーセットと、RNA依存性DNAポリメラーゼ（以下、「逆転写酵素」という）と、鎖置換活性を有するDNA依存性DNAポリメラーゼ（以下、「鎖置換型DNAポリメラーゼ」という）と、dNTPs（dATP、dGTP、dTTP及びdCTPを含む）と、試料とを混合して、反応させることにより試料中のT_YR mRNAを検出することができる。したがって、この場合、前記工程（I-1）及び（II-1）は、1ステップで行なわれる。

[0065] 一方、前記実施形態2の検出方法において、RT-LAMP法を用いる場合、上述のプライマーセットと、RNAを鑄型としてDNAを合成する作用と鎖置換を行ないながらDNAを鑄型にDNAを合成する作用とを備えた酵素と、dNTPsと、試料とを混合して、反応させることにより試料中のT_YR mRNAを検出することができる。

[0066] 逆転写酵素及び鎖置換型DNAポリメラーゼは、公知のものを用いることができる。

[0067] さらに、実施形態1の検出方法の工程（I-1）及び（II-1）及び実施形態2の検出方法の工程（I-2）では、各工程における酵素反応に好適な条件を与える緩衝剤をも用いることが好ましい。

- [0068] T Y R m R N A 検出に供される試料としては、生体から採取した組織（リンパ節、リンパ液、血液等）や便等が例示される。
- [0069] 実施形態 1 の検出方法において、R T - L A M P 法を用いる場合、T Y R m R N A の検出は、増幅工程〔前記工程（I - 1）及び（II - 1）〕及び検出工程〔前記工程（III - 1）〕を経て行なわれる。
- [0070] まず、生体から採取した T Y R m R N A を含む試料と、上述のプライマーセット、逆転写酵素、d N T P s 及び鎖置換型 D N A ポリメラーゼとを混合する。そして、得られた混合物を一定の温度（例えば、65°C）まで加温して R T 反応及び L A M P 反応を行ない、T Y R m R N A を鑄型として T Y R c D N A を合成するとともに、この T Y R c D N A を鑄型として当該 T Y R c D N A をさらに合成して増幅する〔前記工程（I - 1）及び（II - 1）〕。
- [0071] R T 反応及び L A M P 反応の機序は、以下の通りである。
まず、反応液中の T Y R m R N A の領域 R 2 c に R I P の第二配列がハイブリダイズする。その後、逆転写酵素によって R I P の 3' 末端から T Y R m R N A を鑄型として T Y R c D N A が合成される。これにより、R I P から伸長した T Y R c D N A (R I P 伸長鎖) と T Y R m R N A とからなる二本鎖核酸が合成される。
- [0072] 次に、T Y R m R N A の領域 R 3 c に R 3 プライマーがハイブリダイズする。その後、鎖置換型 D N A ポリメラーゼによって、T Y R m R N A を鑄型として、R 3 プライマーの 3' 末端から、既に T Y R m R N A と結合している R I P 伸長鎖が剥がされながら（置換されながら）、T Y R c D N A が合成される。
- [0073] 前記 R I P 伸長鎖は、一本鎖の状態になっており、T Y R m R N A と相補的な配列を有するため、R I P 伸長鎖には T Y R m R N A の領域 F 2 に相補的な領域 F 2 c が含まれている。この R I P 伸長鎖の領域 F 2 c に F I P の第四配列がハイブリダイズする。
- [0074] その後、F I P の 3' 末端から鎖置換型 D N A ポリメラーゼによって R I

P伸長鎖を鋳型としてDNA合成が行なわれる。ここで合成されたDNAは、5'末端に第三配列（領域F1にハイブリダイズするポリヌクレオチドの配列）を持っているため、第三配列からなるポリヌクレオチドは、このDNA上の領域F1にハイブリダイズしてステムループ構造を形成する。また、このDNAは、3'末端に第一配列の相補配列（領域R1cにハイブリダイズする配列）を持っているため、第一配列の相補配列は、このDNA上の領域R1cにハイブリダイズしてステムループ構造を形成する。したがって、このDNAは5'末端と3'末端の両方でステムループ構造を形成したダンベル構造となる。

[0075] 前記ダンベル構造のDNA（ダンベルDNA）は、3'末端から当該ダンベルDNA中の他の部分を鋳型として5'末端側のステムループ構造が解かれながら鎖置換型DNAポリメラーゼにより伸長され、伸長鎖が得られる。この伸長鎖は、5'末端、3'末端及びこれらの中央にそれぞれ互いに相補的な配列を有するため、伸長鎖内では、3つのステムループ構造が形成される。さらに、前記伸長鎖は、3'末端から当該伸長鎖中の他の部分を鋳型としてステムループ構造を解きながら鎖置換型DNAポリメラーゼにより伸長される。この反応が実質的に等温下で繰り返されることにより、分子内に特定の配列を複数有する核酸が合成される（反応の詳細は米国特許第6410278号公報及び米国特許第6974670号公報参照）。

[0076] このようにして得られた増幅産物中の核酸の大部分は、dsDNA（二本鎖DNA）であるため、検出工程〔前記工程（II-1）〕では、この増幅産物を蛍光インターラーカー、例えば、エチジウムプロマイド、SYBR（登録商標）GREEN I、Pico Green（登録商標）等で蛍光染色し、紫外線を照射することによって蛍光を生じさせることにより、当該増幅産物を検出することができる。

[0077] 蛍光染色は、増幅反応後〔前記工程（II-1）後〕の反応液に蛍光色素を添加することによって行なってもよく、あらかじめ反応液に蛍光色素を添加し、蛍光色素の存在下で核酸増幅を実施することにより行なってもよい。検

出工程〔前記工程（III-1）〕では、蛍光が検出されるか否かにより、試料中にT Y R m R N Aが存在しているか否かを判定することができる。また、増幅反応後〔前記工程（II-1）後〕の反応液の蛍光強度を測定することによって増幅産物の定量を行なうことができ、この定量結果に基づいて試料に含まれるT Y R m R N Aを定量することも可能である。特に、蛍光色素の存在下で核酸増幅を行なう場合は、反応液の蛍光強度の増大をリアルタイムに測定し、一定の蛍光強度に達するまでの時間を測定することによって、試料中のT Y R m R N Aの量に換算することもできる（リアルタイムRT-PCR法、リアルタイムRT-LAMP法等）。

[0078] また、前記工程（II-1）におけるLAMP反応では、副産物として水に不溶なピロリン酸マグネシウムが生成する。前記ピロリン酸マグネシウムは核酸増幅が進むにつれて増加し、この増加に伴って反応液が白濁する。そのため、i) 反応液の濁りを目視により確認すること、ii) 反応液の吸光度や散乱光強度を測定して濁度を測定すること、又はiii) 反応液を有色のフィルターで濾過し、フィルター上の残渣を確認することにより、標的核酸を検出することができる（国際公開第01/83817号を参照）。反応液の吸光度や散乱光強度を測定して濁度を測定する場合、前記蛍光色素を用いた場合と同様に、濁度変化をリアルタイムでモニターすることによって閉鎖系DNAの増幅と濁度の増加が追跡可能である。したがって、検出工程〔前記工程（III-1）〕では、反応液が白濁するか否かで、試料中にT Y R m R N Aが存在しているか否かを判定することができる。また、増幅産物の濁度を測定することによって増幅産物の定量を行なうことができ、定量結果に基づいて試料に含まれるT Y R m R N Aを定量することも可能である。濁度の増大をリアルタイムに測定する場合は、一定の濁度に達するまでの時間（以下、増幅立ち上がり時間とする）を測定し、この時間を試料中のT Y R m R N Aの量に換算することも可能である。

[0079] 一方、実施形態2の検出方法においては、工程（I-2）は、前記実施形態1の検出方法における増幅工程〔前記工程（I-1）及び（II-1）〕に

対応する増幅工程である。かかる工程（I-2）では、前記工程（I-1）及び（II-1）における二種類の酵素（逆転写酵素および鎖置換型DNAポリメラーゼ）の代わりに、RNAを鑄型としてDNAを合成する作用と鎖置換を行ないながらDNAを鑄型にDNAを合成する作用とを備えた一種類の酵素が用いられるなどを除き、前記工程（I-1）及び（II-1）と同様に行なうことができる。

- [0080] また、実施形態2の検出方法では、工程（II-2）は、前記実施形態1の検出方法における検出工程〔前記工程（III-1）〕と同様に行なうことができる。
- [0081] 本発明においては、前記工程（I-1）、工程（II-1）及び工程（I-2）で用いられる試薬をmRNA検出用試薬キットとして提供することができる。かかるmRNA検出用試薬キットは、上述したプライマーセットと、dNTPsと、RNAを鑄型としてDNAを合成する作用と鎖置換を行ないながらDNAを鑄型にDNAを合成する作用とを備えた酵素、又はRNA依存性DNAポリメラーゼ及びDNA依存性DNAポリメラーゼとを含むものである。
- [0082] 上述の各試薬はそれぞれ別々の容器に収容されていてもよい。また、逆転写酵素及び鎖置換型DNAポリメラーゼは、同一の容器に収容されていてもよい。また、dNTPs、緩衝剤、及び各種プライマーのうち少なくとも二種類の試薬が、同一の容器に収容されていてもよい。
- [0083] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明は、かかる実施例により限定されるものではない。

[0084] (実施例1)

表1に示されるプライマーセット1～45を用いてTYR mRNAを検出できるか否かを以下の通り検証した。

[0085] (1) 試料調製

5×10¹⁰コピー／μLのTYR mRNAをRNaseフリーの超純水にて段階希釈し、2. 5×10³コピー／μLのTYR mRNA試料を調製

した。

[0086] (2) 反応液の調製

表1に示されるF3プライマー、FIP、RIP及びR3プライマーを、下記組成となるように、緩衝液〔10mM トリスHCl (pH 8.0)〕に添加し、プライマーミックスを調製した。

16 μM FIP

16 μM RIP

1 μM F3プライマー

1 μM R3プライマー

12 μM ループプライマーF

12 μM ループプライマーR

10mM トリスHCl (pH 8.0)

[0087] また、下記組成となるように、各試薬を混合し、RT-LAMP反応用緩衝液を調製した。

53mM トリスHCl (pH 8.8)

1. 8× Thermopol buffer

(New England Biolabs製)

1. 43mM dNTPs (Invitrogen製)

5. 36mM MgSO₄ [ナカライトスク(株) 製]

8. 93mM DTT [和光純薬(株) 製]

2体積% Tergitol (Sigma製)

[0088] 次に、下記組成となるように、各試薬を混合し、酵素液 (3.04 μL) を調製した。

10 U/μL AMV逆転写酵素 (Promega製) 0.14 μL

8 U/μL BstDNAポリメラーゼ

(New England Biolabs製) 2.27 μL

40 U/μL RNase inhibitor

(Promega製) 0.63 μL

[0089] 下記組成となるように、各試薬を混合し、 $25\mu\text{L}$ の反応液を調製した。
なお、反応液は、45種類のプライマーセットそれぞれについて調製された
。

R T - L A M P 反応用緩衝液	14.0 μL
酵素液	3.0 μL
プライマーミックス	5.0 μL
10 mM トリスHCl (pH 8.0)	1.0 μL
R N A試料	2.0 μL

[0090] 45種類の反応液のそれぞれに対応するネガティブコントロール (NC) として $2.0\mu\text{L}$ のR N A試料の代わりに超純水 $2.0\mu\text{L}$ を添加したNC用反応液(45種類)も調製した。

[0091] (3) 検出及び検出結果

45種類のプライマーセットのいずれかを含む反応液を収容したチューブを、あらかじめ 65°C に加温しておいたリアルタイム濁度測定装置〔テラメックス社製、商品名：LA-200〕にセットした。その後、 65°C で前記チューブ内の反応液をインキュベーションし、LAMP反応を行なった。反応開始から反応液の濁度が 0.1 に達するまでの時間を測定した。ネガティブコントロールの測定は、1回行なった。また、R N A試料を含む反応液の測定は、3回行なった($n=3$)。ネガティブコントロールの場合の測定結果及びR N A試料を含む反応液の場合の測定結果の平均値を、表2に示す。表中、「NC」は、ネガティブコントロールの場合の測定結果を示す。また、表中、「- (ハイフン)」は60分以内に濁度が 0.1 に達しなかったことを示す。

[0092]

[表2]

プライマー セット	NC (分)	測定結果 (分)	プライマー セット	NC (分)	測定結果 (分)
1	-	10.33	24	-	13.60
2	-	10.57	25	-	13.60
3	-	10.63	26	-	14.13
4	-	10.70	27	-	14.20
5	-	10.83	28	-	14.57
6	-	10.97	29	-	14.77
7	-	11.00	30	-	14.77
8	-	11.03	31	-	15.47
9	-	11.03	32	-	15.53
10	-	11.17	33	-	15.57
11	-	11.17	34	-	15.87
12	-	11.30	35	-	15.87
13	-	11.37	36	-	16.07
14	-	11.37	37	-	16.30
15	-	11.50	38	-	16.33
16	-	11.53	39	-	16.50
17	-	11.60	40	-	17.10
18	-	11.67	41	-	17.10
19	-	11.83	42	-	17.77
20	-	12.17	43	-	19.63
21	-	12.20	44	-	24.80
22		12.73	45		30.40
23		13.43			

[0093] 表2に示される結果から、ネガティブコントロールの場合、60分以内に

、非特異的な核酸增幅が起こらず、T Y R mRNAの存在を検出すること
ができないことがわかる。しかしながら、RNA試料を含む反応液の場合、
60分以内に反応液の濁度が0.1に達したため、本発明の一実施形態に係
るプライマーセット1～45のいずれを用いた場合であっても、T Y R m
RNAを迅速に検出できることがわかった。

請求の範囲

- [請求項1] 試料中のチロシナーゼのmRNAを検出するためのチロシナーゼmRNA検出用プライマーであって、
5'末端側に第一配列、3'末端側に第二配列を含んでなり、
前記第一配列が、
(a 1) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、
(b 1) 配列番号1の一部の領域である第一領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、
前記第二配列が、
(c 1) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、
(d 1) 配列番号1において第一領域よりも3'末端側に位置する第二領域にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、
前記第二領域が、
(i) 配列番号1の901及び902番目のヌクレオチド；又は
(ii) 配列番号1の1118及び1119番目のヌクレオチド；
を含む領域である、プライマー。
[請求項2] (A 1) 配列番号14～19の何れかに記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；又は
(B 1) 前記(A 1)のポリヌクレオチドにおいて一個又は複数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を有し、核酸增幅反応においてプライマー機能を有するポリヌクレオチド
からなる、請求項1記載のプライマー。
[請求項3] 配列番号1の886～908番目の領域；
配列番号1の1110～1133番目の領域；
配列番号1の1114～1131番目の領域；及び
配列番号1の1114～1133番目の領域
のいずれかにハイブリダイズする、請求項1記載のプライマー。

[請求項4] 前記第二配列が、3'末端に、前記第二領域の配列に完全に相補的な連続したヌクレオチドからなる配列を含んでいる、請求項1記載のプライマー。

[請求項5] 試料中のチロシナーゼのmRNAを検出するためのチロシナーゼmRNA検出用プライマーセットであって、
第一プライマー、第二プライマー、及び第三プライマーを含み、
前記第一プライマーが、請求項1記載のプライマーであり、
前記第二プライマーが、5'末端側に第三配列、3'末端側に第四配列を含み、
前記第三配列が、
(a 2) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、
(b 2) 前記配列番号1の第一領域よりも5'末端側に位置する第三領域にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、
前記第四配列が、
(c 2) 10～30ヌクレオチドの長さを有し、
(d 2) 前記配列番号1の第三領域よりも5'末端側に位置する第四領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列であり、
前記第三プライマーが、前記配列番号1の第四領域よりも5'末端側に位置する第五領域の相補鎖にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドの配列からなるプライマーである、チロシナーゼmRNA検出用プライマーセット。

[請求項6] 前記第二プライマーが、
(A 2) 配列番号7～13の何れかに記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；又は
(B 2) 前記(A 2)のポリヌクレオチドにおいて1個又は複数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を有し、核酸增幅反応においてプライマー機能を有するポリヌクレオ

チド

からなり、

前記第三プライマーが、

(A 3) 配列番号 2～6 のいずれかに記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；又は

(B 3) 前記 (A 3) のポリヌクレオチドにおいて 1 個又は複数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を有し、核酸増幅反応においてプライマー機能を有するポリヌクレオチド

からなる、請求項 5 記載のプライマーセット。

[請求項7]

前記第二プライマーが、

配列番号 1 の 731～751 番目の領域；

配列番号 1 の 963～977 番目の領域；

配列番号 1 の 964～986 番目の領域；

配列番号 1 の 971～992 番目の領域；

配列番号 1 の 972～992 番目の領域；及び

配列番号 1 の 986～1008 番目の領域；

のいずれかの領域の相補領域にハイブリダイズする請求項 5 記載のプライマーセット。

[請求項8]

前記第三プライマーが、

配列番号 1 の 703～722 番目の領域；

配列番号 1 の 931～953 番目の領域；

配列番号 1 の 945～962 番目の領域；

配列番号 1 の 950～962 番目の領域；及び

配列番号 1 の 966～985 番目の領域；

のいずれかの領域の相補領域にハイブリダイズする請求項 5 記載のプライマーセット。

[請求項9]

前記配列番号 1 の第二領域よりも 3' 末端側に位置する第六領域に

ハイブリダイズ可能である第四プライマーをさらに含む、請求項 5 記載のプライマーセット。

- [請求項10] 前記第四プライマーが、
(A 4) 配列番号 20～25 のいずれかに記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；又は
(B 4) 前記 (A 4) のポリヌクレオチドにおいて 1 個又は複数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を有し、核酸増幅反応においてプライマー機能を有するポリヌクレオチド
からなる、請求項 9 記載のプライマーセット。

- [請求項11] 前記第四プライマーが、
配列番号 1 の 917～936 番目の領域；
配列番号 1 の 1135～1153 番目の領域；
配列番号 1 の 1138～1155 番目の領域；
配列番号 1 の 1138～1156 番目の領域；
配列番号 1 の 1141～1160 番目の領域；及び
配列番号 1 の 1142～1161 番目の領域；
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 9 記載のプライマーセット。
。

- [請求項12] 前記配列番号 1 の前記第三領域と前記第四領域との間に位置する第七領域にハイブリダイズする第五プライマーをさらに含む請求項 5 記載のプライマーセット。

- [請求項13] 前記第五プライマーが、
(A 5) 配列番号 26～55 のいずれかに記載のポリヌクレオチド；又は
(B 5) 前記 (A 5) のポリヌクレオチドにおいて 1 個又は複数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を有し、核酸増幅反応においてプライマー機能を有するポリヌクレオチド

チド。

からなる、請求項 1 2 記載のプライマーセット。

- [請求項14] 前記第五プライマーが、
配列番号 1 の 752～776 番目の領域；
配列番号 1 の 981～1004 番目の領域；
配列番号 1 の 982～1004 番目の領域；
配列番号 1 の 982～1006 番目の領域；
配列番号 1 の 986～1010 番目の領域；
配列番号 1 の 987～1011 番目の領域；
配列番号 1 の 988～1011 番目の領域；
配列番号 1 の 988～1012 番目の領域；
配列番号 1 の 989～1011 番目の領域；
配列番号 1 の 989～1012 番目の領域；
配列番号 1 の 989～1013 番目の領域；
配列番号 1 の 990～1012 番目の領域；
配列番号 1 の 990～1013 番目の領域；
配列番号 1 の 990～1014 番目の領域；
配列番号 1 の 992～1015 番目の領域；
配列番号 1 の 993～1016 番目の領域；
配列番号 1 の 994～1016 番目の領域；
配列番号 1 の 995～1016 番目の領域；
配列番号 1 の 995～1018 番目の領域；
配列番号 1 の 996～1018 番目の領域；
配列番号 1 の 1000～1019 番目の領域；
配列番号 1 の 1001～1020 番目の領域；
配列番号 1 の 1003～1022 番目の領域；
配列番号 1 の 1004～1022 番目の領域；
配列番号 1 の 1005～1024 番目の領域；

配列番号 1 の 1006 ~ 1024 番目の領域；
配列番号 1 の 1008 ~ 1027 番目の領域；
配列番号 1 の 1009 ~ 1027 番目の領域；
配列番号 1 の 1009 ~ 1028 番目の領域；及び
配列番号 1 の 1010 ~ 1029 番目の領域
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 12 記載のプライマーセット。

[請求項15] 前記配列番号 1 の前記第一領域と第二領域との間に位置する第八領域の相補領域にハイブリダイズする第六プライマーをさらに含む、請求項 5 記載のプライマーセット。

[請求項16] 前記第六プライマーが、
(A 6) 配列番号 56 ~ 75 のいずれかに記載のポリヌクレオチド；
又は
(B 6) 前記 (A 6) のポリヌクレオチドにおいて 1 個又は複数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を有し、核酸增幅反応においてプライマー機能を有するポリヌクレオチド
からなる、請求項 15 記載のプライマーセット。

[請求項17] 前記第六プライマーが、
配列番号 1 の 860 ~ 884 番目の領域；
配列番号 1 の 1063 ~ 1087 番目の領域；
配列番号 1 の 1065 ~ 1089 番目の領域；
配列番号 1 の 1066 ~ 1090 番目の領域；
配列番号 1 の 1067 ~ 1089 番目の領域；
配列番号 1 の 1067 ~ 1090 番目の領域；
配列番号 1 の 1068 ~ 1091 番目の領域；
配列番号 1 の 1068 ~ 1092 番目の領域；
配列番号 1 の 1069 ~ 1091 番目の領域；

配列番号 1 の 1069 ~ 1092 番目の領域；
配列番号 1 の 1069 ~ 1093 番目の領域；
配列番号 1 の 1070 ~ 1093 番目の領域；
配列番号 1 の 1070 ~ 1094 番目の領域；
配列番号 1 の 1073 ~ 1097 番目の領域；
配列番号 1 の 1074 ~ 1098 番目の領域；
配列番号 1 の 1075 ~ 1099 番目の領域；
配列番号 1 の 1082 ~ 1104 番目の領域；
配列番号 1 の 1083 ~ 1105 番目の領域；
配列番号 1 の 1084 ~ 1105 番目の領域；及び
配列番号 1 の 1085 ~ 1107 番目の領域
のいずれかの領域の相補領域にハイブリダイズする、請求項 15 記載
のプライマーセット。

[請求項18] 請求項 5 記載のプライマーセットと、
dNTPs と、
RNA を鑄型として DNA を合成する作用と鎖置換を行ないながら
DNA を鑄型に DNA を合成する作用とを備えた酵素、又は RNA 依
存性 DNA ポリメラーゼ及び DNA 依存性 DNA ポリメラーゼと
を含んでなるチロシナーゼ mRNA 検出用試薬キット。

[請求項19] 前記第二プライマーが、
(A 2) 配列番号 7 ~ 13 の何れかに記載のヌクレオチド配列から
なるポリヌクレオチド；又は
(B 2) 前記 (A 2) のポリヌクレオチドにおいて 1 個又は複数個
のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列
を有し、核酸增幅反応においてプライマー機能を有するポリヌクレオ
チド
からなり、
前記第三プライマーが、

(A 3) 配列番号 2 ~ 6 のいずれかに記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；又は

(B 3) 前記 (A 3) のポリヌクレオチドにおいて 1 個又は複数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されたヌクレオチド配列を有し、核酸増幅反応においてプライマー機能を有するポリヌクレオチド

からなる、請求項 1 8 記載のチロシナーゼ mRNA 検出用試薬キット。

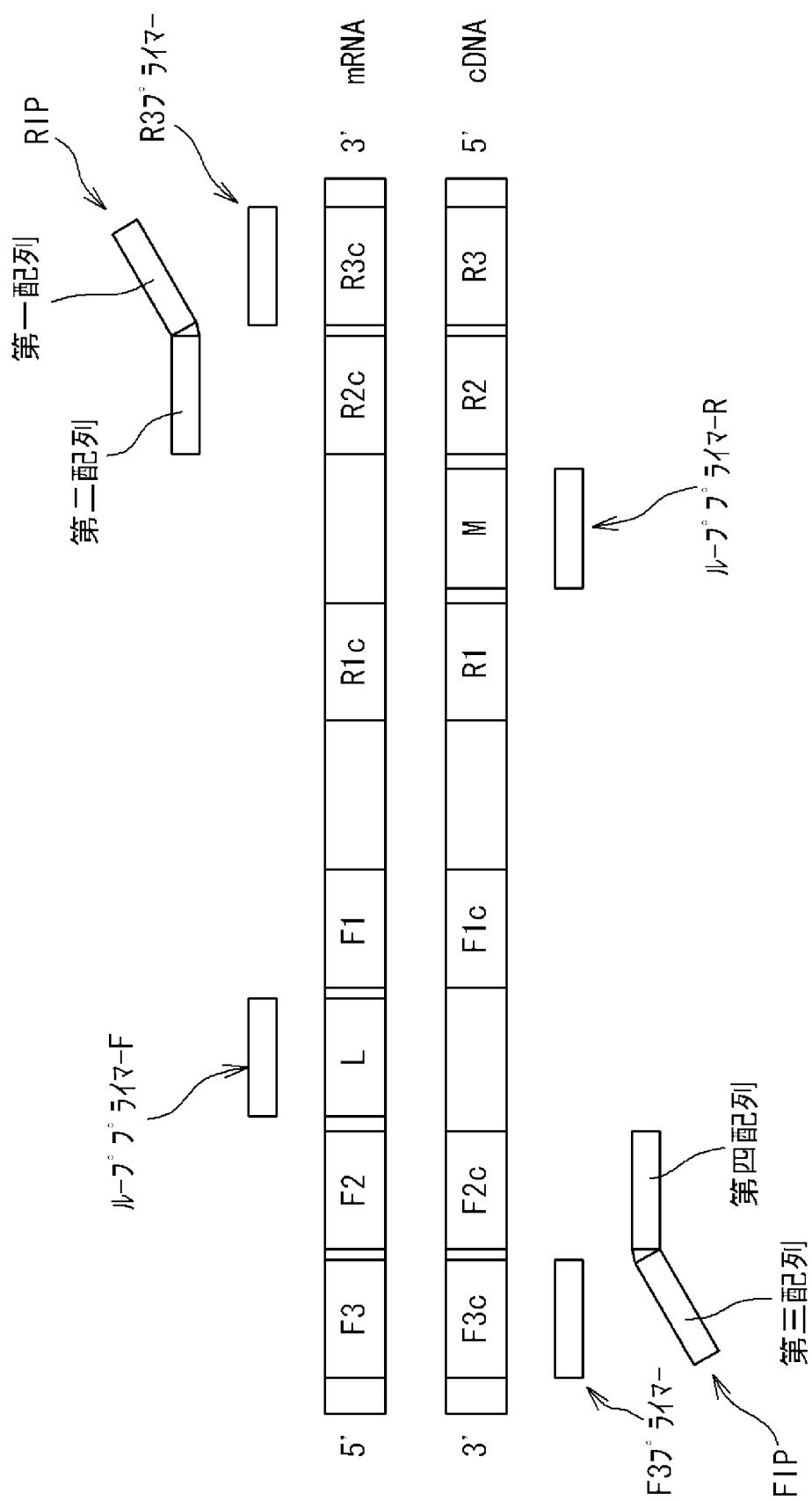
[請求項20] 試料と、請求項 5 記載のプライマーセットと、RNA 依存性 DNA ポリメラーゼとを反応させて、前記試料中のチロシナーゼ mRNA から cDNA を合成する工程、

前記プライマーセットと、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼと、前記工程で合成された cDNA とを反応させて、前記 cDNA を増幅する工程、及び

前記工程で増幅された cDNA を検出することにより、前記試料中のチロシナーゼ mRNA を検出する工程
を含む、チロシナーゼ mRNA の検出方法。

[請求項21] 試料と、請求項 5 記載のプライマーセットと、RNA を錆型として DNA を合成する作用と鎖置換を行ないながら DNA を錆型に DNA を合成する作用とを備えた酵素とを反応させて、前記試料中のチロシナーゼ mRNA を錆型として cDNA を合成するとともに、この cDNA を錆型として当該 cDNA をさらに合成して増幅する工程、及び
前記工程で増幅された cDNA を検出することにより、前記試料中のチロシナーゼ mRNA を検出する工程
を含む、チロシナーゼ mRNA の検出方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09 (2006.01) i, C12Q1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
*Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009*

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6153388 A (UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA), 28 November, 2000 (28.11.00), Summary; examples (Family: none)	1-21
Y	JP 2002-512202 A (Arch Development Corp., Genetics Institute Inc.), 23 April, 2002 (23.04.02), Examples & US 6080399 A & EP 1071450 A2 & WO 1999/053949 A2	1-21
Y	JP 8-140699 A (Pola Chemical Industries Inc.), 04 June, 1996 (04.06.96), Full text; summary; examples (Family: none)	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 June, 2009 (17.06.09)

Date of mailing of the international search report
30 June, 2009 (30.06.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059876

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-154088 A (Sysmex Corp.), 03 June, 2004 (03.06.04), Examples & US 2004/0175729 A1	1-21
Y	Hiroshi TAKANO et al., "Atarashii Idenshi Zofukuho: LAMP-ho, Bio Venture", 01 July, 2001 (01.07.01), Vol.1, pages 109 to 115	1-21
Y	Tsugunobu NOTOMI et al., "Shinki Idenshi zofukuho (LAMP-ho) no Genri to Oyo", Bio Industry, 12 February, 2001 (12.02.01), Vol.18, pages 15 to 23	1-21

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTplus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	US 6153388 A (UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA) 2000.11.28, 要旨、 実施例（ファミリーなし）	1-21
Y	JP 2002-512202 A (アーチ・デヴェロップメント・コーポレイション、ジェネティックス・インスチチュート・インコーポレーテッド) 2002.04.23, 実施例 & US 6080399 A & EP 1071450 A2 & WO 1999/053949 A2	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17. 06. 2009	国際調査報告の発送日 30. 06. 2009
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 竹川 寛子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 4154

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 8-140699 A (ポーラ化成工業株式会社) 1996. 06. 04, 全文、要旨、実施例 (ファミリーなし)	1 - 2 1
Y	JP 2004-154088 A (シスメックス株式会社) 2004. 06. 03, 実施例 & US 2004/0175729 A1	1 - 2 1
Y	高野弘他, 新しい遺伝子增幅法 : LAMP 法, Bio ベンチャー, 2001. 07. 01, Vol. 1, p. 109-115	1 - 2 1
Y	納富継宣他, 新規遺伝子增幅法 (LAMP 法) の原理と応用, Bio Industry, 2001. 02. 12, Vol. 18, p. 15-23	1 - 2 1