(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4058508号
(P4058508)

(45)発行日　平成20年3月12日(2008.3.12)　(24)登録日　平成19年12月28日(2007.12.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	21/78	C
G01N 27/447	(2006.01)	G01N	27/26	301A
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	P

請求項の数 8　(全 27 頁)

(21)出願番号　特願平11-294257
(22)出願日　平成11年10月15日(1999.10.15)
(65)公開番号　特開2001-112499(P2001-112499A)
(43)公開日　平成13年4月24日(2001.4.24)
審査請求日　平成15年6月25日(2003.6.25)

(73)特許権者　590001452
国立がんセンター総長
東京都中央区築地５丁目１番１号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(72)発明者　富田　裕之
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目２８０番地
株式会社　日立製作所　中央研究所内
(72)発明者　村川　克二
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目２８０番地
株式会社　日立製作所　中央研究所内
(72)発明者　宮原　裕二
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目２８０番地
株式会社　日立製作所　中央研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】遺伝子検査方法及び遺伝子検査装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

被検査者から採取したサンプルからゲノムＤＮＡ断片及びＲＮＡ断片を得る第１の工程と，

逆転写酵素反応により前記ＲＮＡ断片の相補ＤＮＡ断片を得る第２の工程と，

前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片を鋳型として同一のプライマーセットを用いて同一の系内でＰＣＲ増幅反応を行ない，前記ゲノムＤＮＡ断片の標的領域に由来する第１のＰＣＲ増幅産物と前記相補ＤＮＡ断片の前記標的領域と同じ標的領域に由来する第２のＰＣＲ増幅産物を得る第３の工程と，

前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２のＰＣＲ増幅産物の量を前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに計測する第４の工程と，

前記第１のＰＣＲ増幅産物の一方の対立遺伝子の量に対する他方の対立遺伝子の量の比である第１の比と、前記第２のＰＣＲ増幅産物の一方の対立遺伝子の量に対する他方の対立遺伝子の量の比である第２の比を求める第５の工程と，

前記第１の比に対する前記第２の比の比である第３の比を求めてＰＣＲ効率の差で補正する第６工程と，

前記第３の比に基づいて遺伝子異常の有無を判定する第７の工程とを含むことを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項２】

請求項１に記載の遺伝子検査方法に於いて，前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２のＰ

ＣＲ増幅産物の末端を平滑化処理する工程をさらに含むことを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項３】

請求項１又は２に記載の遺伝子検査方法に於いて，前記ＰＣＲ増幅反応の条件を，前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片の両鋳型に対して同一とすることを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項４】

請求項１～３のいずれか１項に記載の遺伝子検査方法に於いて，前記第４の工程を１本鎖ＤＮＡ高次構造多型解析法によって検出された対立遺伝子ごとに前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２の増幅産物の量を計測することによって行なうことを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項５】

請求項１～４のいずれか１項に記載の遺伝子検査方法に於いて，前記第３の工程に於けるＰＣＲ増幅反応に蛍光標識したプライマーを用い，前記第３の工程に於いて得られた前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２のＰＣＲ増幅産物を電気泳動し，前記蛍光標識からの蛍光を検出して前記第４の工程に於ける計測を行なうことを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項６】

請求項５に記載の遺伝子検査方法に於いて，前記第５の工程は，次式：

【数１】

$$S1\,(DNA)\ /\ S2\,(DNA)$$

〔式中，Ｓ１（ＤＮＡ）及びＳ２（ＤＮＡ）は，前記第１のＰＣＲ増幅産物の泳動バンドの面積値を，前記ゲノムＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに表わしたものである。〕

又は次式：

【数２】

$$S2\,(DNA)\ /\ S1\,(DNA)$$

〔式中，Ｓ１（ＤＮＡ）及びＳ２（ＤＮＡ）は前記と同義である。〕

で表される前記第１の比と，次式：

【数３】

$$S1\,(cDNA)\ /\ S2\,(cDNA)$$

〔式中，Ｓ１（ｃＤＮＡ）及びＳ２（ｃＤＮＡ）は，前記第２のＰＣＲ増幅産物の泳動バンドの面積値を，前記相補ＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに表わしたものである。〕

又は次式：

【数４】

$$S2\,(cDNA)\ /\ S1\,(cDNA)$$

〔式中，Ｓ１（ｃＤＮＡ）及びＳ２（ｃＤＮＡ）は前記と同義である。〕

で表される前記第２の比を求めることを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項７】

請求項５に記載の遺伝子検査方法に於いて，前記第５の工程は，次式：

【数５】

$$P1\,(DNA)\ /\ P2\,(DNA)$$

〔式中，Ｐ１（ＤＮＡ）及びＰ２（ＤＮＡ）は，前記第１のＰＣＲ増幅産物の泳動バンドのピーク値を，前記ゲノムＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに表わしたものである。〕

又は次式：

【数６】

$$P2(DNA)／P1(DNA)$$

〔式中，Ｐ１（ＤＮＡ）及びＰ２（ＤＮＡ）は前記と同義である。〕
で表される第１の比と，次式：
【数７】

$$P1(cDNA)／P2(cDNA)$$

〔式中，Ｐ１（ｃＤＮＡ）及びＰ２（ｃＤＮＡ）は，前記第２のＰＣＲ増幅産物の泳動バンドのピーク値を，前記相補ＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに表わしたものである。〕
又は次式：
【数８】

$$P2(cDNA)／P1(cDNA)$$

〔式中，Ｐ１（ｃＤＮＡ）及びＰ２（ｃＤＮＡ）は前記と同義である。〕
で表される第２の比を求めることを特徴とする遺伝子検査方法。
【請求項８】
請求項６または７に記載の遺伝子検査方法に於いて，前記第１の比及び前記第２の比を数値又はグラフで表示する工程をさらに含むことを特徴とする遺伝子検査方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は，被検査者の尿，喀痰，便，スワブ，全血，血漿，生検組織，髄液，膿，患部洗浄液等の細胞から抽出した核酸(ＤＮＡ，ＲＮＡ)を用いて，癌その他の疾病に関連する遺伝子変異を，遺伝子発現の量的異常として安価，簡便に検知する遺伝子検査法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
遺伝子の変異，特に遺伝子の挿入，欠失等を検査するために，ＰＣＲで遺伝子を増幅し，サザンブロッティング法等で遺伝子の断片の有無を検出する方法，断片の大きさを比較する方法が従来使用されていた。しかし，サザンブロッティング法は，検出に際し十分な検体量が必要なので，最近では，１本鎖ＤＮＡ高次構造多型解析法（ＳＳＣＰ：Single Strand Conformation Polymorphism），ＡＳＯ法（Allele Specific Oligo-nucleotide)，RNase A mismatch cleavage法，ＤＧＧＥ法（Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)，塩基配列決定法等が，広く使用されている。
【０００３】
１塩基のみの置換，欠失，挿入が癌の素因や原因の１つとなることが知られており，点突然変異の検出が要求されている。１本鎖ＤＮＡ高次構造多型解析法(ＳＳＣＰ)では，変性した１本鎖ＤＮＡ断片が非変性ゲル内でとる高次構造の１塩基の違いによる変化を，ポリアクリルアミドゲル電気泳動での移動度の差として検出する（Oritaら，Proc.Natl.Acad.Sci.，vol.86，2766-2779（1989））。ＡＳＯ法では，１塩基対のミスマッチによりハイブリッド形成ができないことを利用して変異を検出する（Wallaceら，Nucleic Acid Res.，vol.9，879-895（1981））。RNase A mismatch cleavage法では，ＲＮＡ－ＤＮＡ又はＲＮＡ－ＲＮＡハイブリッドのミスマッチを生じた箇所でＲＮＡプローブを酵素ＲＮａｓｅＡにより切断して，変異を検出する（Myersら，Nature，vol.313，495-498（1985））。ＤＧＧＥ法では，変性剤濃度勾配ゲルでミスマッチをもつＤＮＡ断片がミスマッチをもたない断片と異なる移動度を示すことを利用して変異を検出する（FischerとLerman，Cell，vol.16，191-200（1979））。
【０００４】
塩基配列決定法では，単離したＤＮＡ断片の塩基配列をダイデオキシターミネーション法

により直接決定する（Sangerら，Proc.Natl.Acad.Sci.，vol.7，5463-5467（1977））。得られる情報量は塩基配列決定法が最も多いが，操作が煩雑で時間を要する難点がある。

【０００５】

ＳＳＣＰ法は，結果の再現性が良く，変異の有無を迅速に検出できるので近年広く採用されている。通常，検体から得られるＤＮＡ量は少ないので，ＰＣＲにより解析対象の領域を増幅して得たＤＮＡ断片をＳＳＣＰ法で解析するＰＣＲ－ＳＳＣＰ法が用いられる（Oritaら，Genomics，vol.5，874-879（1989））。Ｓｕｇａｎｏらは，ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法を消化器癌，膀胱癌の遺伝子診断に適用した（Suganoら，Int.J.Cancer，vol.74，403-406（1997））。ｍＲＮＡを検体から抽出して逆転写酵素反応により，ｍＲＮＡから相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を得たのち，ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法を行なうＲＴ－ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法が，遺伝子発現の有無及び発現量の定量方法として近年採用されている（Murakamiら，Oncogene，vol.6，37-42（1991））。

【０００６】

なお，遺伝子発現量は，単位質量あたり，例えば，１μｇの全ＲＮＡ又はポリＡ　ＲＮＡから発現するｍＲＮＡ数と定義される。ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法によりゲノムＤＮＡの遺伝子の塩基配列に変異を持つＤＮＡを分離できる。一方，ｍＲＮＡから得たｃＤＮＡを用いてＲＴ－ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法により，遺伝子の塩基配列の変異，遺伝子発現の異常を検出できる。遺伝子発現の異常は，例えば，遺伝子の上流の発現制御領域の塩基配列の変異，メチル化の異常等に起因する。ＲＴ－ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法では，ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法によって得られない情報が得られる。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】

ＰＣＲにより微量なＤＮＡを増幅するため，ＲＴ－ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法は少ない検体量で実行できる。しかし，ＰＣＲの増幅効率が，反応機器の差，耐熱性ＤＮＡポリメラーゼの種類や製品間差により頻繁に変化することがよく知られている。０≦ｒ≦１，ｎをＰＣＲサイクル数とする時，ＰＣＲでの増幅率Ｃは，$Ｃ＝(１＋ｒ)^{n}$で表される。原理的にはｒ＝１であるが，ｒの値は，実際にはＰＣＲ反応の温度プロファイル，ＤＮＡポリメラーゼの特性（例えば，酵素の複製能），ＤＮＡの配列長さ，プライマーの配列，プライマー濃度とＤＮＡ濃度との比，等の種々の要因により敏感に変化する。場合によりｒは０．６～０．８程度の値をとることもあり，ｒの値が少しでも異なると，ｎは一般に３０程度の値であるので，ＰＣＲでの増幅率Ｃは数倍から数十倍異なってしまう。また，ｍＲＮＡから逆転写酵素反応によりｃＤＮＡを生成する効率が，逆転写酵素の種類，反応温度，プライマー，鋳型ＲＮＡの塩基配列により変化することも周知である。

【０００８】

ＰＣＲを用いた定量的解析方法として，競合的ＰＣＲ(Gillilandら，Proc.Natl.Acad.Sci.，vol.87，2725-2729，1990），カイネティクＰＣＲ(Wangら，Proc.Natl.Acad.Sci.，vol.86，9717-9721，1989），タックマン(ＴａｑＭａｎ)ＰＣＲ（Gelfandら，USP5210015（1993））が開発されている。競合的ＰＣＲでは，ＤＮＡ量を定量するために濃度既知のＤＮＡを内部標準として使用し，内部標準ＤＮＡを系統的に希釈して添加し検体と同時に増幅する。ＰＣＲ増幅産物をゲル電気泳動で分離し，エチジウムブロミド染色法により内部標準ＤＮＡと検体ＤＮＡのコピー数を比較する。競合的ＰＣＲでは，内部標準ＤＮＡの希釈の回数を大とする程，ＤＮＡ量の定量精度が向上する。しかし，希釈系の回数に比例して必要な検体量が増加し，作業量が増大する問題がある。カイネティックＰＣＲではＰＣＲを対数増幅期で停止する。対数増幅期では，ＰＣＲ増幅産物の数が検体ＤＮＡ数と比例すると考えられる。予め，複数の濃度のＤＮＡをＰＣＲにより増幅して得られるＰＣＲ増幅産物量をプロットし検量線（直線となる）を作成しておく。検量線の作成時と同一条件で濃度未知のＤＮＡ検体をＰＣＲにより増幅し，検量線を用いて検体ＤＮＡ量を定量する。カイネティックＰＣＲでは，ＰＣＲが飽和しないようにＰＣＲサイクル数を少なくするので，ＰＣＲ増幅産物の最終濃度が低くなる問題がある。但し，蛍光標識プライマー，レーザ蛍光ＤＮＡシーケンサの使用により，少量のＰＣＲ増幅産物の検出はできる。タック

マンＰＣＲは，カイネティックＰＣＲと蛍光標識プライマーとを組み合わせた方法であり，ＰＣＲサイクル毎の増幅産物量をＰＣＲ実行中に蛍光標識によりモニターできる。タックマンＰＣＲでは，いわば検量線を同時に作成でき，検量線を予め作成する必要がない。しかし，耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ等の酵素に費用がかかり，ＰＣＲ反応の各反応槽に光ファイバーを挿入した装置を用いるのでランニングコストが高くなる問題がある。

【０００９】

競合的ＰＣＲ，カイネティックＰＣＲ，タックマンＰＣＲは，優れた方法であるが，予め濃度既知のＤＮＡを内部標準として複数用意する必要がある。検体数の何倍もの内部標準ＤＮＡを用意することは，検査時の手間とコストを上昇させる問題につながる。競合的ＰＣＲ，カイネティックＰＣＲ，タックマンＰＣＲでは，ＰＣＲの増幅効率の，反応機器の差，耐熱性ＤＮＡポリメラーゼの種類や製品間差によるバラツキを含み，求められた遺伝子発現量には誤差が含まれる。シミュレーションによると，競合的ＰＣＲでは７％から３００％の誤差が生じうる（Raeymaekers，Anal.Biochem.，vol.214，582-585（1993））。一般に，競合的ＰＣＲ等の従来法では，遺伝子発現量の測定結果には３０％～５０％程度のバラツキがあるとされている。

【００１０】

更に，癌抑制遺伝子やＤＮＡ修復酵素遺伝子の２つのアレルの一方に，生殖細胞性変異をもつ個体（保因者）では，腫瘍発生の頻度が上昇し若年発症が増え多重癌，多発癌の増加が知られており，検査の効率向上が求められている。本発明は，従来技術の問題を解決するため，定量性，再現性に優れ，自動化に適した遺伝子検査法及び遺伝子検査装置を提供することを目的とする。

【００１１】

【課題を解決するための手段】

ヒト正常細胞の常染色体は２倍体であり，父親及び母親に由来する２つの対立遺伝子（アレル）がある。２つのアレルに塩基配列の違いがあり多型である場合，遺伝子に関してヘテロ接合(Heterozygote)であるという。多型を利用して２つのアレルを識別することが可能である。癌細胞で染色体の全体や一部分が欠損し，父親又は母親に由来する何れか一方のアレルが欠失した場合には，正常細胞ＤＮＡで認められたヘテロ接合性が，癌細胞では認められない（ヘテロ接合性の消失（Loss of heterozygosity：ＬＯＨ）。実際，ｐ５３，ＡＰＣ遺伝子等の癌抑制遺伝子が存在する染色体部位のＬＯＨが様々な癌で高頻度に認められる。高頻度の癌の発生は，対応する正常遺伝子が存在しないため，細胞の癌化を抑制できないためと考えられ，ＬＯＨ解析は癌化の分子機構の解明，癌のＤＮＡ診断に既に応用されている。

【００１２】

塩基配列多型が遺伝子のエクソンに存在すれば，２つのアレルに由来するｍＲＮＡをも識別できる。ｍＲＮＡは，特にゲノム刷り込み現象（Genomic imprinting）等が生じない場合，通常２つのアレルから等量ずつ転写されると考えられている。しかし，遺伝子の上流の塩基配列多型や変異が，遺伝子の発現制御に影響を与えたり，また，ｍＲＮＡの３’末端の塩基配列の相違が，ｍＲＮＡ分子の安定性に変化を与えることにより，「アレル間の遺伝子発現の差」をもたらす可能性が考えられる。従って，「アレル間の遺伝子発現の差」の検出は，塩基配列多型や変異の生理的，病因的意義を解明する全く新しいアプローチの１つとなると考えられる。現在まで，「アレル間の遺伝子発現の差」を統計的に明確にする試みはない。しかし，ヒト全ゲノム解読プロジェクトの進行に伴い，塩基配列多型に関する情報が蓄積されるので，「アレル間の遺伝子発現の差」の統計的解析は有効になると期待される。特に，アミノ酸置換を伴うミスセンス変異により生じ，病因的意義が不明なタンパク質が，数多くの癌や遺伝病の解析から見出されつつあるが，アミノ酸置換を伴うミスセンス変異の解明に貢献することが期待できる。

【００１３】

また，点突然変異やフレームシフト変異により，遺伝子のコード領域に終止コドンが生じる場合，ｍＲＮＡの発現の減少が知られている。従って，ｍＲＮＡのアレル間の遺伝子発

現に著しい相違が認められた場合，遺伝子の不活性化を含めた病因的状態を鋭敏に反映した結果と考えられ，遺伝子の変異の有無を検査する簡便な方法となりうると考えられる。ヒトゲノムＤＮＡには，各アレル間，個人間，集団間で様々な塩基配列の差異があることが知られている。塩基配列の差異の大部分は病因的意義がないので，変異ではなく塩基配列多型と呼ばれる。塩基配列多型には，１塩基対が置換して生じた１塩基多型(ＳＮＰ)，２塩基～４塩基対程度の短い反復配列の反復数の相違によるマイクロサテライト多型，数十塩基対単位で反復数，塩基配列が異なるＶＮＴＲ多型（Variable Number of Tandem Repeat)が知られている。１塩基多型は，ヒトＤＮＡに平均千塩基対に１つ以上あると予測されており，ヒトゲノム全体を網羅するマーカーとして利用価値が高い。最近特に，種々の疾患，薬剤に対する感受性に関連し，個体差を生じる原因の１つとして，遺伝子のエクソン領域の１塩基多型（SNP in cDNA：ｃＳＮＰ)が注目されている。１本鎖ＤＮＡ高次構造多型解析法(ＳＳＣＰ)では，ＰＣＲ等で増幅した２本鎖ＤＮＡ断片を，フォルムアミドの存在下で１本鎖ＤＮＡ断片に熱変性した後，非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離すると，１本鎖ＤＮＡ断片は，ＤＮＡ断片の塩基配列に特有の高次構造をとるため，相補的な１本鎖ＤＮＡ断片は互いに異なる移動度を示す。１塩基の置換だけでなく塩基の欠失，挿入でも１本鎖ＤＮＡの高次構造，移動度が変化するので，ゲル電気泳動で置換，欠失，挿入が検出でき異常ＤＮＡ断片が分離できる。

【００１４】

そこで，本発明の遺伝子検査方法では，（１）被検査者から採取したサンプルからゲノムＤＮＡ断片及びＲＮＡ断片を得て，（２）逆転写酵素反応により前記ＲＮＡ断片の相補ＤＮＡ断片を得て，（３）前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片を鋳型としてＰＣＲ増幅反応を行ない，前記ゲノムＤＮＡ断片の標的領域に由来する第１のＰＣＲ増幅産物と前記相補ＤＮＡ断片の標的領域に由来する第２のＰＣＲ増幅産物を得て，（４）前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２のＰＣＲ増幅産物の量を前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに計測し，（５）前記計測結果に基づいて対立遺伝子間の発現の差を検出し，（６）前記検出結果に基づいて遺伝子異常の有無を判定する。

【００１５】

すなわち，本発明の遺伝子検査方法は，被検査者から採取したサンプルからゲノムＤＮＡ断片及びＲＮＡ断片を得る第１の工程と，逆転写酵素反応により前記ＲＮＡ断片の相補ＤＮＡ断片を得る第２の工程と，前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片を鋳型としてＰＣＲ増幅反応を行ない，前記ゲノムＤＮＡ断片の標的領域に由来する第１のＰＣＲ増幅産物と前記相補ＤＮＡ断片の標的領域に由来する第２のＰＣＲ増幅産物を得る第３の工程と，前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２のＰＣＲ増幅産物の量を前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに計測する第４の工程と，前記計測結果に基づいて対立遺伝子間の発現の差を検出する第５の工程と，前記検出結果に基づいて遺伝子異常の有無を判定する第６の工程とを含むことを特徴とする。

【００１６】

本発明の遺伝子検査方法の好ましい実施形態では，前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２のＰＣＲ増幅産物の末端を平滑化処理する工程をさらに含む。

また，本発明の遺伝子検査方法の好ましい実施形態では，前記ＰＣＲ増幅反応の条件を，前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片の両鋳型に対して同一とする。

【００１７】

また，本発明の遺伝子検査方法の好ましい実施形態では，前記第４の工程を１本鎖ＤＮＡ高次構造多型解析法によって行なう。

また，本発明の遺伝子検査方法の好ましい実施形態では，前記第３の工程に於けるＰＣＲ増幅反応に蛍光標識したプライマーを用い，前記第３の工程に於いて得られた前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２のＰＣＲ増幅産物を電気泳動し，前記蛍光標識からの蛍光を検出して前記第４の工程に於ける計測を行なう。

【００１８】

また，本発明の遺伝子検査方法の好ましい実施形態では，前記第１のＰＣＲ増幅産物の泳動バンドのシグナル強度（ピーク値又は面積値）を，鋳型としたゲノムＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに「Ａ１(ＤＮＡ)」及び「Ａ２(ＤＮＡ)」と表し，第２のＰＣＲ増幅産物の泳動バンドのシグナル強度（ピーク値又は面積値）を，鋳型とした相補ＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに「Ｂ１(ｃＤＮＡ)」及び「Ｂ２(ｃＤＮＡ)」と表し，次式：

【００１９】

【数１７】

ｋ＝Ａ２(ＤＮＡ)／Ａ１(ＤＮＡ))

又は次式：

【００２０】

【数１８】

ｋ'＝Ａ１(ＤＮＡ)／Ａ２(ＤＮＡ)

から第１の指標を求め，次式：

【００２１】

【数１９】

Ｂ２(ｃＤＮＡ）／Ｂ１(ｃＤＮＡ)

又は次式：

【００２２】

【数２０】

Ｂ１(ｃＤＮＡ）／Ｂ２(ｃＤＮＡ)

から第２の指標を求め，第１の指標と第２の指標とを比較することにより対立遺伝子間の発現の差を検出する。

また，本発明の遺伝子検査方法の好ましい実施形態では，「アレル（対立遺伝子）間の遺伝子発現の差」を，次式：

【００２３】

【数２１】

α＝｜（Ｂ２(ｃＤＮＡ)／Ｂ１(ｃＤＮＡ)－Ａ２(ＤＮＡ)／Ａ１(ＤＮＡ)｜

又は次式：

【００２４】

【数２２】

α'＝｜（Ｂ１(ｃＤＮＡ)／Ｂ２(ｃＤＮＡ)－Ａ１(ＤＮＡ)／Ａ２(ＤＮＡ)｜

により定義し，「アレル（対立遺伝子）間の遺伝子発現の比」を，次式：

【００２５】

【数２３】

｛１＋（α／ｋ）｝

＝｛（Ｂ２(ｃＤＮＡ）／Ｂ１(ｃＤＮＡ)｝／｛Ａ２(ＤＮＡ)／Ａ１(ＤＮＡ)｝

又は次式：

【００２６】

【数２４】

｛１＋（α'／ｋ'）｝

＝｛（Ｂ１(ｃＤＮＡ）／Ｂ２(ｃＤＮＡ)｝／｛Ａ１(ＤＮＡ)／Ａ２(ＤＮＡ)｝

により定義し，「アレル（対立遺伝子）間の遺伝子発現の差」及び「アレル（対立遺伝子）間の遺伝子発現の比」を第１の指標及び第２の指標として，第１の指標と第２の指標とを比較することにより対立遺伝子間の発現の差を検出する。

【００２７】

また，本発明の遺伝子検査方法の好ましい実施形態では，前記第１の指標及び前記第２の指標を数値又はグラフで表示する工程をさらに含む。

本発明の遺伝子検査装置は，蛍光標識で標識された核酸断片を電気泳動する複数の電気泳動路と，前記複数の電気泳動路にレーザを照射する手段と，前記レーザの照射により前記蛍光標識から発する蛍光を検出する手段と，電気泳動分離された前記核酸断片の電気泳動

パターンを解析する手段と，前記解析結果を表示する表示装置とを有する遺伝子検査装置である。

【００２８】

本発明の遺伝子検査装置の好ましい実施形態では，前記表示装置は，標的遺伝子部位の名称，プライマーの塩基配列，対立遺伝子の塩基配列，前記対立遺伝子間での塩基配列の違い，前記対立遺伝子の各々に由来するゲノムＤＮＡ断片の泳動バンドのシグナル強度，前記対立遺伝子の各々に由来するｃＤＮＡ断片の泳動バンドのシグナル強度，前記対立遺伝子の各々に由来するゲノムＤＮＡ断片の泳動バンドのシグナル強度の比，前記対立遺伝子の各々に由来するｃＤＮＡ断片の泳動バンドのシグナル強度の比，前記対立遺伝子間での遺伝子発現の差，前記対立遺伝子間での遺伝子発現の比，並びに前記遺伝子発現の差及び比の統計的有意差からなる群から選ばれる何れか１つ以上を，文字，数値又はグラフで表示するものである。

【００２９】

本発明の遺伝子検査方法は，検査試料として末梢血リンパ球を用い，検査対象をｐ５３，ＢＲＣＡ１，ＢＲＣＡ２等の癌抑制遺伝子や，ｈＭＳＨ２，ｈＭＬＨ１等のＤＮＡミスマッチ修復酵素遺伝子のエクソンの多型をもつＤＮＡ断片とする時，家族性腫瘍の保因者をスクリーニングする新しい検査法として使用でき，正確な検査に多大な貢献をなす。本発明の遺伝子検査方法では，特定の遺伝子に異常が有るか否かを，迅速に再現性良くスクリーニングできる。異常が認められた被検査者は，遺伝子の塩基配列を解析し変異を同定する等の更に精密な検査を受ける。また，変異の同定だけでは変異の生理的意義が不明な症例に対しても，遺伝子発現の異常という視点から変異の生理的意義を解明できる。本発明の遺伝子検査方法によるスクリーニング法は，現在までに知られていない。本発明遺伝子検査方法は，癌の他，様々な生活習慣病の発症に関連する遺伝子の変異のスクリーニングにも利用できる。また，より広く塩基配列多型に基づく個体差の研究にも応用できる。

【００３０】

【発明の実施の形態】

以下，本発明の遺伝子検査方法を詳細に説明する。なお，本願明細書では，ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅したＤＮＡ断片を「ゲノムＤＮＡ断片」，相補ＤＮＡを鋳型として増幅したＤＮＡ断片を「相補ＤＮＡ断片」又は「ｃＤＮＡ断片」と呼ぶことがある。

【００３１】

第１の工程では，被検査者から採取したサンプルからゲノムＤＮＡ断片及びＲＮＡ断片を得る。被検査者から採取するサンプルは特に限定されず，例えば，被検査者の尿，喀痰，便，スワブ，全血，血漿，生検組織，髄液，膿，患部洗浄液等のサンプルを用いることができる。ゲノムＤＮＡ断片及びＲＮＡ断片は，同一サンプルから採取する。サンプルからのゲノムＤＮＡ断片及びＲＮＡ断片の採取方法は特に限定されず，常法に従えば良い。ＤＮＡ採取方法としては，例えばプロテイナーゼＫ・フェノール・クロロホルム法等のＤＮＡ抽出方法を用いることができる。また，血液や生検組織を用いて直接ＰＣＲを行ない，増幅ＤＮＡを得る方法（Mercierら，Nucleic Acid Res.，vol.18，5908，1990,またはPanaccioら，Nucleic Acid Res.，vol.21，4656，1993）を用いることもできる。ＲＮＡ採取方法としては，例えばグアニジン・チオシアネート法等のＲＮＡ抽出方法を用いることができる。採取するＲＮＡは，全細胞ＲＮＡ，ポリＡ　ＲＮＡの何れであってもよい。

【００３２】

第２の工程では，逆転写酵素反応により前記ＲＮＡ断片の相補ＤＮＡ断片を得る。逆転写酵素反応は常法に従って行なうことができる。逆転写酵素反応で用いる酵素としては，至適反応温度が高いSuper script II逆転写酵素又はTth DNA polymeraseが好ましいが，AMV逆転写反応酵素，MoMuLV逆転写酵素等でも良い。逆転写酵素反応に用いるプライマーは，Oligo dTプライマー，６塩基程度のランダムプライマー，又は２０塩基～３０塩基程度の特異プライマーの何れでも良く，これらの２つ以上を組み合わせても良い。

【００３３】

第３の工程では，前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片を鋳型としてＰＣＲ増幅

反応を行ない，前記ゲノムＤＮＡ断片の標的領域に由来する第１のＰＣＲ増幅産物と前記相補ＤＮＡ断片の標的領域に由来する第２のＰＣＲ増幅産物を得る。ここで，「標的領域」とはＰＣＲにより増幅しようとする領域を意味し，ゲノムＤＮＡ断片の標的領域と相補ＤＮＡ断片の標的領域とは同一の領域である。標的領域としては，ゲノムＤＮＡ断片のエクソン内のいかなる領域を選択してもよいが，多型を示す領域を選択することが好ましい。多型を示す領域としては，例えば，１塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism：ＳＮＰ)を示す領域を用いることができる。ゲノムＤＮＡ断片の標的領域に由来する第１のＰＣＲ増幅産物は，ゲノムＤＮＡ断片を鋳型とし，標的領域の両末端にハイブリダイズするプライマーを用いてＰＣＲを行なうことにより得ることができる。相補ＤＮＡ断片の標的領域に由来する第２のＰＣＲ増幅産物は，相補ＤＮＡを鋳型とし，標的領域の両末端にハイブリダイズし得るプライマーを用いてＰＣＲを行なうことにより得ることができる。ＰＣＲに用いるプライマーは，第４の工程に於ける電気泳動パターンの検出を容易かつ精度よく行なうために標識（例えば，蛍光標識）しておくことが好ましい。ＰＣＲの条件（例えば，変性，解合，伸長反応の温度と時間，ＰＣＲサイクル数等）は，「ゲノムＤＮＡ断片」を得る場合と「相補ＤＮＡ断片」を得る場合とで同一の条件とするのが好ましく，通常は同一の増幅反応器でＰＣＲを行なう。ＰＣＲサイクル数は，可能な限り同一とするのが好ましいが，増幅前の鋳型濃度がゲノムＤＮＡと相補ＤＮＡとで著しく異なる場合（例えば，１０分の１以下又は１０倍以上）には，「ゲノムＤＮＡ断片」を得るＰＣＲサイクル数と「ｃＤＮＡ断片」を得るＰＣＲサイクル数とが数サイクル程度異なっても良い。なお，第３工程では，ＰＣＲ以外の増幅方法，例えばＬＣＲ法，ＮＡＳＢＡ法等の既知の増幅方法を用いても良い。

【００３４】

ＰＣＲ増幅産物は，その末端を平滑化処理しておくことが好ましい。この処理は必須ではないが，本発明の遺伝子検査方法における精度を向上させる点から実行することが望ましい。平滑化処理は，例えば，クレノーフラグメント等の３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を持つ酵素で処理することにより行なうことができる。

【００３５】

第４の工程では，前記第１のＰＣＲ増幅産物及び前記第２のＰＣＲ増幅産物の量を前記ゲノムＤＮＡ断片及び前記相補ＤＮＡ断片が由来する対立遺伝子ごとに計測する。ＰＣＲ増幅産物の量を対立遺伝子ごとに計測する方法としては，例えば，ＰＣＲ増幅産物を電気泳動分離して得られる電気泳動パターンに基づいて計測する方法，オリゴヌクレオチドチップ等を用いたプローブハイブリダイゼーション法により計測する方法を例示でき，好ましい方法としてはＳＳＣＰ法を例示できる。ＳＳＣＰ法によれば，ＤＮＡ断片中の１塩基の相違を検出できる。第３の工程に於いて，蛍光標識したプライマーを用いる場合には，ＰＣＲ増幅産物を電気泳動して蛍光標識からの蛍光を検出し，電気泳動時間（分）を横軸にとり，蛍光強度（相対値）を縦軸にとることにより，図５に示すような電気泳動パターンを得ることができる。ＰＣＲ増幅産物の塩基配列が相違すれば，その電気泳動パターンも相違するので，ヘテロ接合性を示す対立遺伝子の各々に由来するＰＣＲ増幅産物は異なる電気泳動パターンを示す（図５参照）。従って，電気泳動パターンに基づいてＰＣＲ増幅産物の量を対立遺伝子ごとに計測することができる。図２～４に示すＳＳＣＰ法によるゲノムＤＮＡの解析では，父親由来のアレルと母親由来のアレルの「ゲノムＤＮＡ断片」の電気泳動パターンが，ゲノムＤＮＡのアレルの電気泳動パターンに相当し，一方，父親由来のアレルと母親由来のアレルの各々から転写された「相補ＤＮＡ断片」の電気泳動パターンが，ＲＮＡの発現パターンを表わす電気泳動パターンに相当する。

【００３６】

第５の工程では，前記計測結果に基づいて対立遺伝子間の発現の差を検出する。相補ＤＮＡ断片のＰＣＲ増幅産物の量が対立遺伝子ごとに相違している場合，その相違は対立遺伝子間の発現の差に起因していると考えられる。なぜなら，各対立遺伝子に由来する相補ＤＮＡ断片のＰＣＲ増幅産物は同一のＰＣＲ増幅反応条件下で得られるので，ＰＣＲ増幅産物の量の差は，鋳型となる相補ＤＮＡ断片の量の差，すなわち対立遺伝子間のｍＲＮＡ発

現量の差に起因していると考えられるからである。一方，鋳型となるゲノムＤＮＡ断片の量は，ＬＯＨがない正常細胞では対立遺伝子間で等しいと考えられるので，ゲノムＤＮＡ断片のＰＣＲ増幅産物の量は対立遺伝子間で等しいと考えられる。従って，「ゲノムＤＮＡ断片」の対立遺伝子間の比を基準として，対立遺伝子ごとの「相補ＤＮＡ断片」の比を正確に算出できる。

【００３７】

第６の工程では，前記検出結果に基づいて遺伝子異常の有無を判定する。対立遺伝子間の発現の差が検出された場合には，遺伝子異常ありと判定することができる。一方，対立遺伝子間の発現の差が検出されない場合には，遺伝子異常なしと判定することができる。

【００３８】

具体的には，各対立遺伝子に由来する「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル間でのシグナル強度の比と，各対立遺伝子に由来する「相補ＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル間でのシグナル強度の比とが，一定値を超えて異なる場合には，対立遺伝子間の遺伝子発現に関して異常があり，一定値を超えない場合には，対立遺伝子間の遺伝子発現に関して異常なしと判定することができる。

【００３９】

以下では，図を用いて本発明の遺伝子検査方法をより詳細に説明する。

図１は，本発明の遺伝子検査方法の手順例を示すフローである。

図２及び図３は，１塩基多型を用いて遺伝子の異常を検査する場合の検査例を説明する図であり，図２は正常遺伝子の場合の検査例を説明する図，図３は異常遺伝子が示唆される場合の検査例を説明する図である。

【００４０】

図２（Ａ）は，正常遺伝子と正常遺伝子の転写産物との関係を説明する図である。図２（Ｂ）は，「ゲノムＤＮＡ断片」及び「ｃＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度を示す図である。ゲノムＤＮＡで父親由来のアレル１と母親由来のアレル１’のＤＮＡ断片が１塩基多型を示す場合，例えば，図２に示すように，父親由来のアレル１の１塩基対がＡＴ対を持ち，母親由来のアレル１’のアレル１のＡＴ対に対応する１塩基対がＧＣ対を持つとする。図２に示すように，正常細胞の１対の常染色体は，父親と母親から各々１本ずつ染色体を受け継ぐので，アレル１とアレル１’との比は，１：１である。正常細胞ではヘテロ接合性の消失（ＬＯＨ）はない。アレル１とアレル１’とが同等に発現すると，アレル１由来のｍＲＮＡとアレル１’由来ｍＲＮＡとの比は，１：１となる。アレル１由来の「ｃＤＮＡ断片」とアレル１’由来の「ｃＤＮＡ断片」を得る反応に於いて，逆転写酵素反応，及びＰＣＲの効率が同等の場合には，アレル１由来の「ｃＤＮＡ断片」１とアレル１’由来の「ｃＤＮＡ断片」２との比も，１：１となる。

【００４１】

図３（Ａ）は，遺伝子発現に差があり異常遺伝子が示唆される場合の遺伝子と遺伝子の転写産物との関係を説明する図，図３（Ｂ）は，「ゲノムＤＮＡ断片」，「ｃＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度を示す図である。図３（Ａ）に示すように，母親由来のアレル１’に変異２がある場合，しばしばアレル間の遺伝子発現にも差異が生じる。変異２は，遺伝子の上流の発現制御領域の塩基配列の変異やメチル化の異常，遺伝子のコード領域の終止コドンを生じる変異，ｍＲＮＡの３’末端の非翻訳領域の塩基配列の異常等を指す。

【００４２】

一般に診断の目的で，遺伝子の発現制御領域の全てについて塩基配列やメチル化の異常の有無を検索して遺伝子の変異の意義を確定することは，非常に困難である。しかし，原因の如何に拘らず一方のアレルの発現が，他のアレルの発現と比較して著しく低下している場合には，結果的に遺伝子の不活化が生じていると判定できる。一方のアレルの発現が，他のアレルの発現と比較して著しく低下している場合，「ｃＤＮＡ断片」でのアレル１とアレル１’の比と，「ゲノムＤＮＡ断片」でのアレル１とアレル１’の比とが，一致しないことが高い頻度で予測される。正常遺伝子の場合には，図２（Ｂ）に示すように，アレ

ル１とアレル１’との比が，アレル１由来の「ｃＤＮＡ断片」とアレル１’由来の「ｃＤＮＡ断片」との比に等しくなるが，異常遺伝子の存在が示唆される場合，図３（Ｂ）に示すように，アレル１とアレル１’との比が，アレル１由来の「ｃＤＮＡ断片」：アレル１’由来の「ｃＤＮＡ断片」との比と等しくならず，遺伝子異常を遺伝子発現の異常として検出できる。アレル１由来の「ｃＤＮＡ断片」とアレル１’由来の「ｃＤＮＡ断片」との比を決定する際，従来のＲＴ－ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法等を使用する場合を考える。従来のＲＴ－ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法では，反応器の差，ＤＮＡポリメラーゼの種類や製品間差により測定結果がばらつく。また，検査対象の細胞が，癌化しＬＯＨが生じている可能性もある。従って，アレル１由来の「ｃＤＮＡ断片」とアレル１’由来の「ｃＤＮＡ断片」との比が，１：１でない結果が得られた場合，得られた比が，遺伝子発現の異常を反映している結果なのか，ＰＣＲ反応のバラツキによる結果なのか，細胞の癌化によるＬＯＨによる結果なのか，あるいはこれらの複合的な結果なのかが判定できない。競合的ＰＣＲでは，ＰＣＲ反応のバラツキによる差に関してのみ補正する。競合的ＰＣＲでは，鋳型である検体中のＤＮＡと予め濃度既知の内部標準ＤＮＡ断片とを，増幅の際に同一セットのプライマーで競合させ反応条件による差異を補正する。

【００４３】

本発明の遺伝子検査方法では，図２及び図３に示すように，多型－１と多型－２を含むＤＮＡ断片を増幅の際に競合させるが，両ＤＮＡ断片の鎖長も塩基配列も１塩基を除き同じなので，公知の競合的ＰＣＲによる方法と同様，又は競合的ＰＣＲによる方法以上に定量性を向上できる。ＬＯＨがない正常細胞のゲノムＤＮＡでは，アレル１とアレル１’との比が，１：１であるので，解析の結果得られたアレル１とアレル１’との比を基準（１：１の比である）として，アレル１由来の「ｃＤＮＡ断片」とアレル１’由来の「ｃＤＮＡ断片」との比を正確に出せる。即ち，濃度既知の内部標準ＤＮＡを用意しないで良い点，２つのアレルを理想的な内部標準とする点で，公知の競合的ＰＣＲより優れている。

【００４４】

電気泳動パターンに於いて，アレル１由来の「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度をＡ１，アレル１’由来の「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度をＡ２，アレル１由来の「相補ＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度をＢ１，アレル１’由来の「相補ＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度をＢ２とする。Ａ１としてピーク値Ｐ１（ＤＮＡ）又は面積値Ｓ１（ＤＮＡ）を，Ａ２としてピーク値Ｐ２（ＤＮＡ）又は面積値Ｓ２（ＤＮＡ）を，Ｂ１としてピーク値Ｐ１（ｃＤＮＡ）又は面積値Ｓ１（ｃＤＮＡ）を，Ｂ２としてピーク値Ｐ２（ｃＤＮＡ）又は面積値Ｓ２（ｃＤＮＡ）を，それぞれ使用する。Ａ１とＡ２との比をｋとする（式（Ｉ））。ｋには，両アレルに於けるＰＣＲの鎖伸長効率の差等も含まれる。正常細胞でＰＣＲ時の鎖伸長効率が両アレルで等しい場合は，ｋ＝１である。ｋの値は，「ｃＤＮＡ断片」を得る増幅でも基本的に同様と考えられるので，αを「アレル間の遺伝子発現の差」に由来するシグナル強度の変化として定義すると，Ｂ２は式（II）より推定できる。

【００４５】

【数２５】

ｋ＝（Ａ２／Ａ１）　…（Ｉ）

【００４６】

【数２６】

Ｂ２＝Ｂ１（α＋ｋ）　…（II）

本発明の遺伝子検査方法では，（Ａ２／Ａ１）と（Ｂ２／Ｂ１）とを比較する。（Ａ２／Ａ１）と（Ｂ２／Ｂ１）との差から，「アレル間の遺伝子発現の差」（α）を求めることができる（式（III））。（Ａ２／Ａ１）と（Ｂ２／Ｂ１）との比から，「アレル間の遺伝子発現の比」が｛１＋（α／ｋ）｝として求めることができる（式（Ⅳ））。

【００４７】

【数２７】

α＝|（Ｂ２／Ｂ１）－（Ａ２／Ａ１）| …（III）

【００４８】
【数２８】
｛１＋（α／ｋ）｝＝（Ｂ２／Ｂ１）／（Ａ２／Ａ１）　…（IV）
本発明の遺伝子検査方法は，「アレル間の遺伝子発現の差」(α)を高精度検出すると共に，検査上有意義なｋ，「アレル間の遺伝子発現の比」｛１＋（α／ｋ）｝のデータも併せて求める点でユニークであり，公知の競合的ＰＣＲより優れている。なお，（式（I））～（式（IV））に於いて，Ａ２とＡ１，Ｂ２とＢ１を，各々入れ換えて（式（V））～（式（VIII））によりｋ’，α’，｛１＋（α’／ｋ’）｝を求めてｋ，α，｛１＋（α／ｋ）｝の代わりに使用しても良い。
【００４９】
【数２９】
ｋ’＝Ａ１／Ａ２　…（V）
【００５０】
【数３０】
Ｂ１＝Ｂ２（α’＋ｋ’）…（VI）
【００５１】
【数３１】
α’＝|（Ｂ１／Ｂ２）－（Ａ１／Ａ２）|…（VII）
【００５２】
【数３２】
｛１＋（α’／ｋ’）｝＝（Ｂ１／Ｂ２）／（Ａ１／Ａ２）　…（VIII）
【００５３】
２つのアレルが両方とも発現した場合のシグナル強度を１００とすると，理論上，片方のアレルのみが発現した場合のシグナル強度は５０，両アレルとも発現しない場合のシグナル強度は０である。競合的ＰＣＲ等の従来法で求めた遺伝子発現量の測定結果には，３０％～５０％程度のバラツキがあるが，３０％～５０％程度のバラツキがあると，２つのアレルが両方とも発現した場合と片方のアレルのみが発現した場合とを正確に区別すること，片方のアレルのみが発現した場合と両アレルが発現しない場合とを区別することが難しい。アレル間の遺伝子発現に統計的に有意な違いがあるという報告は，ゲノム刷り込み現象による片側アレルのみの発現等の特殊な例を除いて現在までにない。特殊な例を除いて，アレル間の遺伝子発現の統計的に有意な違いがあるという報告がない理由の１つは，検出精度が不足していたためである。なお，本発明の遺伝子検査方法に於ける検出のバラツキは１０％以下で平均数％である（後述）。本発明の遺伝子検査方法は，塩基配列多型に限らず，癌特異的変異をもつ遺伝子を対象として適用できる。
【００５４】
図４は，本発明の遺伝子検査方法を，塩基配列多型をもたず片側のアレルに変異を持つ癌細胞に適用した検査例を説明する図であり，図４（Ａ）は，正常遺伝子と正常遺伝子の転写産物との関係を説明する図，図４（Ｂ）は，癌細胞等の異常遺伝子と異常遺伝子の転写産物との関係を説明する図，図４（Ｃ）は，正常遺伝子の場合の「ゲノムＤＮＡ断片」，「ｃＤＮＡ断片」の存在量を示す図，図４（Ｄ）は，異常遺伝子の場合の「ゲノムＤＮＡ断片」，「ｃＤＮＡ断片」の存在量を示す図である。正常遺伝子の場合は塩基配列多型がないため，２つのアレルを識別できない。しかし，対象領域に癌に特異的な変異３がある場合は，しばしば遺伝子の発現にも異常が起こりｍＲＮＡ量が減少するので，逆転写酵素反応で得られるｃＤＮＡも減少する。「ゲノムＤＮＡ断片」の電気泳動パターンと「ｃＤＮＡ断片」の電気泳動パターンとの比較から，「ゲノムＤＮＡ断片」と「ｃＤＮＡ断片」との比が有意に異なるので変異の意義を確定できる。本実施形態では，同一の検査試料からゲノムＤＮＡとＲＮＡの両方を採取し解析するので，ゲノムＤＮＡ，ＲＮＡの何れか一方を試料として用いる場合と比較して被検査者の侵襲は変わらない。
【００５５】
ゲル電気泳動法は，ゲルの組成，ゲル固化温度，時間等に鋭敏に影響されるが，本実施形

態のように，２アレルの面積値やピーク値の比を指標とする場合，得られる結果データのバラツキは極めて小さくなる。本実施形態の結果を使用する検査では誤診断が少なくなる点で従来法の検査法よりも優れる。「ゲノムＤＮＡ断片」と「ｃＤＮＡ断片」とを異なる蛍光標識で標識し，同一レーンで泳動分離すると，レーン間のバラツキを減少でき，より高精度の計測ができる。

【００５６】

本発明の遺伝子検査方法が適用され，蛍光標識で標識された核酸断片を電気泳動する複数の電気泳動路と，複数の電気泳動路にレーザを照射する手段と，レーザの照射により蛍光標識から発する蛍光を検出する手段と，電気泳動分離された核酸断片の電気泳動パターンを解析する手段と，解析結果を表示する表示装置とを有する蛍光検出型遺伝子検査装置の表示装置には，好ましくは，標的遺伝子部位の名称，プライマーの塩基配列，対立遺伝子（アレル１及びアレル１’）の塩基配列，対立遺伝子（アレル１とアレル１’）間での塩基配列の違い，対立遺伝子（アレル１及びアレル１’）の各々に由来する「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度，対立遺伝子（アレル１及びアレル１’）の各々に由来する「ｃＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度，対立遺伝子（アレル１及びアレル１’）の各々に由来する「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度の比（すなわち，アレル１由来の「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度とアレル１’由来の「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度との比），対立遺伝子（アレル１及びアレル１’）の各々に由来する「相補ＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度の比（すなわち，アレル１由来の「相補ＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度とアレル１’由来の「相補ＤＮＡ断片」の泳動バンドのシグナル強度との比），対立遺伝子発現の差及び比の統計的有意差（例えば，「アレル間の遺伝子発現の差」（α（式III））），「アレル間の遺伝子発現の比」（｛１＋（α／ｋ）｝（式IV））のうち何れか１つ以上を文字，数値，グラフの何れかで表示する。なお，シグナル強度としては，ＤＮＡ断片の泳動バンドのピーク面積値，又はピーク値を用いることができる。

【００５７】

【実施例】

以下，実験例により本発明をさらに詳細に説明する。

１．　ＤＮＡの採取

１．１　血液からのＤＮＡ採取

（１）被検査者の全血５ｍＬ（ミリリットル）に０．５％食塩水を加え，全血中の赤血球を低浸透圧により破裂させ，（２）（１）の溶液を遠心して赤血球を取り除き，白血球細胞を得る。（３）白血球細胞にＬｙｓｉｓ　ｂｕｆｆｅｒ５ｍＬ(最終濃度１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ，０．０１ｍＭ　ＥＤＴＡ，０．５％ＳＤＳ，１００μｇ／ｍＬ　ＲＮａｓｅ)を加え，３７℃で１時間保温する。（４）Ｌｙｓｉｓ　ｂｕｆｆｅｒにプロテアーゼＫ（最終濃度５０μｇ／ｍＬ）を加え５５℃で１晩反応させる。（５）（４）の溶液に飽和フェノールを等量加え室温で振とうした後，３０００ｒｐｍで１０分間遠心し，（６）遠心後上層を回収する。（７）フェノールクロロホルムを（６）の上層と等量加え室温で振とうした後３０００ｒｐｍで１０分間遠心し，上層を回収する。（８）クロロホルムを（７）の上層と等量加え室温で振とうした後３０００ｒｐｍで１０分間遠心し，上層を回収する。（９）（８）で回収した上層をエタノール沈殿してＤＮＡを採取する。

１．２　組織からのＤＮＡ採取

組織摘出後速やかに組織を液体窒素で凍結して保存し，使用時に組織を破砕し１．１の（３）以降の手順に従いＤＮＡを採取する。

【００５８】

２．　ＲＮＡの採取

２．１　血液からのＲＮＡ採取

（１）被検査者の全血５ｍＬに０．５％食塩水を加え全血中の赤血球を低浸透圧により破裂させ，（２）（１）の溶液中の赤血球を取り除いて白血球細胞を得る。（３）組織５０ｍｇに対し５００μＬ（マイクロリットル）の細胞融解溶液Ｄ（４Ｍグアニジニウムチオ

シアネート，２５ｍＭクエン酸ナトリウム（ｐＨ７．０），０．５％サルコシル，０．１Ｍ　２－メルカプトエタノール）を加え混和する。（４）５０μＬの２Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ４．０）を（３）の溶液に加え混和，遠心を繰り返す。（５）５００μＬのＲＮＡフリー飽和フェノールと，１００μＬクロロホルム／イソアミルアルコール（４９：１）を（４）の溶液に加え，（６）混和した後氷上で１５分静置する。（７）１００００ｒｐｍで４℃，２０分間，（６）の溶液を遠心し，（８）上層を回収する。（９）１ｍＬのエタノールを（８）で回収した上層に加えて２０℃，１時間沈殿させる。（１０）１００００ｒｐｍで４℃，２０分間，（９）の溶液を遠心して，（１１）上層を捨て沈殿を３００μＬの細胞融解溶液Ｄで融解する。（１２）１ｍＬのエタノールを（１１）の融解溶液に加えて２０℃，１時間再沈殿させる。（１３）１００００ｒｐｍで４℃，１５分間，（１２）の溶液を遠心して，（１４）上層を捨て沈殿を７５％の氷冷エタノールで洗い５分間遠心する。（１５）５０μＬの０．１％ジエチルピロカーボネート液を（１４）の沈殿に加えＲＮＡを溶解し，（１６）－７０℃で溶解したＲＮＡを保存する。

２．２　組織からのＲＮＡ採取

組織摘出後速やかに組織を液体窒素で凍結し組織ホモジナイズして，２．１の（３）以降の手順に従いＲＮＡを採取する。

【００５９】

３．　逆転写酵素（ＲＴ）反応

（１）（１Ａ）ＲＮＡ溶液（１μｇ／μＬ）１．０μＬ，（１Ｂ）ＲＴプライマー（５０ｎＭ）１．０μＬ，（１Ｃ）１０×逆転写酵素緩衝液１．４μＬ，（１Ｄ）イオン交換水６．６μを混合して合計１０μＬの混合液を得る。（２）混合液を９５℃，２分間加熱し，（３）混合液を５５℃，１時間反応させ，（４）混合液を遠心する。（５）（５Ａ）（４）の混合液１　１０．０μＬ，（５Ｂ）ジチオトレイトール（１００ｍＭ）１．４μＬ，（５Ｃ）４ｄＮＴＰ混合溶液（各５ｍＭ）１．４μＬ，（５Ｄ）ＲＮａｓｉｎ（４０Ｕ／μＬ）０．７μＬ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ社），（５Ｅ）Ｓｕｐｅｒ　ｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ逆転写酵素（２００Ｕ／μＬ）０．５μＬ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ社）を混合して，合計１４．０μＬの混合液を得る。（６）混合液を３７℃，１時間保温し，（７）混合液を８０℃，５分間加熱し，（８）混合液２を遠心し氷上で静置する。

【００６０】

４．　ＰＣＲ

（１）（１Ａ）ゲノムＤＮＡ，又はｃＤＮＡ（０．５μｇ／μＬ）1μＬ，（１Ｂ）ＰＣＲプライマー（フォワード，１０ｎｍｏｌ／ｍＬ）０．２５μＬ，（１Ｃ）蛍光ラベルＰＣＲプライマー（リバース，１０ｎｍｏｌ／ｍＬ)０．２５μＬ，（１Ｄ）ＭｇＣｌ２（２５ｍＭ）０．４μＬ，（１Ｅ）４ｄＮＴＰ混合液（２．５μｍｏｌ／ｍＬ)０．８μＬ，（１Ｆ）Ｔａｑポリメラーゼ（５Ｕ／μＬ）０．０５μＬ，（１Ｇ）１０×ＰＣＲ緩衝液１μＬ，（１Ｈ）再蒸留水６．２５μＬを混合して合計１０μＬの混合液を得る。但し，プライマーの蛍光ラベルとしてＣｙ５（アマシャムファルマシア社）を用いた。（２）混合液を，例えば，９４℃で５分間の変性の後，９４℃で３０秒，６０℃で３０秒，７２℃で１分間のＰＣＲサイクルを３０回行ない遺伝子を増幅する。次いで，７２℃で８分の伸長反応を行ない，合計１０μＬのＰＣＲ増幅産物を得る。

５．　平滑化処理

１０μＬのＰＣＲ増幅産物に１．０Ｕのクレノーフラグメントを加え３７℃で３０分間反応させる。

【００６１】

６．　塩基配列多型の検出（ＳＳＣＰ法）

（１）平滑化処理したＰＣＲ増幅産物に５～１０倍量のフォルムアミド染色液を加える。フォルムアミド染色液の組成は９０％フォルムアミド，２０ｍＭ　ＥＤＴＡ，０．０５％ブロモフェノルブルーである。（２）（１）の溶液を９０℃，５分間加熱し熱変性させる。（３）非変性１５％アクリルアミドゲルを用いて蛍光検出型ＤＮＡシーケンサで，ＰＣＲ増幅産物を電気泳動により分離する。蛍光検出型ＤＮＡシーケンサには，アマシャムフ

ァルマシア社のＡＬＦ　Ｅｘｐｒｅｓｓを用いた。泳動緩衝液としてトリスーグリシン緩衝液（２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ，１９２ｍＭグリシン）を用いた。泳動温度を２０℃とし，３０Ｗの一定電力で泳動し，泳動時間は６時間とした。「ゲノムＤＮＡ断片」と「ｃＤＮＡ断片」とを同一のゲルで泳動した。蛍光標識をレーザ励起して得られる蛍光を光センサーで検出し，泳動開始後の時間（泳動時間）と光センサーでの検出光量との関係を記録した。

【００６２】

７．　「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動パターンと「ｃＤＮＡ断片」の泳動パターンの比較

図５は本発明の遺伝子検査方法で得られる電気泳動パターンの例を示す図であり，図５（Ａ）は，正常サンプルの泳動パターンの例を示す図，図５（Ｂ）は，異常サンプルの泳動パターンの例を示す図である。図５に示す例では，ＢＲＣＡ１遺伝子のエクソン１１の１塩基多型を対象とした。なお、ＢＲＣＡ１遺伝子は血液等の全身で発現しており、該遺伝子は健常人、家族性乳ガン患者の白血球細胞から抽出したＤＮＡ又はＲＮＡから調製できる。図５（Ａ），図５（Ｂ）の横軸は泳動時間，縦軸は蛍光標識したプライマーからの蛍光量（カウント数）を示す。アレル１由来の「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンド４１の面積値をＳ１(ＤＮＡ)，ピーク値をＰ１（ＤＮＡ），アレル１’由来の「ゲノムＤＮＡ断片」の泳動バンド４２の面積値をＳ２(ＤＮＡ)，ピーク値をＰ２（ＤＮＡ），アレル１由来の「ｃＤＮＡ断片」の泳動バンド４３の面積値をＳ１(ｃＤＮＡ)，ピーク値をＰ１（ｃＤＮＡ），アレル１’由来の「ｃＤＮＡ断片」の泳動バンド４４の面積値をＳ２(ｃＤＮＡ)，ピーク値をＰ２（ｃＤＮＡ）とする。なお，ＡＬＦ　Ｅｘｐｒｅｓｓ付属の解析ソフトウェア（アレルリンク）のＰｅａｋ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ機能をデフォルト設定で用いてＤＮＡバンドの面積値，ピーク値を得た。図５（Ａ）に示す正常人のサンプルでは，Ｓ２(ＤＮＡ)／Ｓ１(ＤＮＡ)とＳ２(ｃＤＮＡ)／Ｓ１(ｃＤＮＡ)とは±８％以内で合致し，図５（Ｂ）に示す，アレル間で遺伝子発現の差があると思われる異常サンプルでは，Ｓ２(ＤＮＡ)／Ｓ１(ＤＮＡ)とＳ２(ｃＤＮＡ)／Ｓ１(ｃＤＮＡ)とは，明らかに合致しなかった。図５（Ａ），図５（Ｂ）の結果から，同様の結果が，Ｐ２（ＤＮＡ）／Ｐ１（ＤＮＡ）とＰ２（ｃＤＮＡ）／Ｐ１（ｃＤＮＡ）との比較で得られた。図５（Ｂ）の示す例では，図３に示す例のようにアレル間での遺伝子発現の差の存在が示唆された。図５（Ａ），図５（Ｂ）を得る際に用いたプライマーは，ＢＲＣＡ１遺伝子のエクソン１１の領域の一部を増幅する配列番号１，配列番号２のプライマーである。また，ＢＲＣＡ１遺伝子のエクソン１１の別の領域を増幅する配列番号３，配列番号４等のプライマーを用いても同様の結果が得られた。

【００６３】

ＴＴＧＴＣＡＡＴＣＣＴＡＧＣＣＴＴＣＣＡＡＧＡＧ　　（配列番号１）
ＴＴＴＴＧＣＣＴＴＣＣＣＴＡＧＡＧＴＧＣＴＡＡＣ　　（配列番号２）
ＧＣＡＡＣＴＧＧＡＧＣＣＡＡＧＡＡＧＡＧＴＡＡＣ　　（配列番号３）
ＴＴＴＧＣＡＡＡＡＣＣＣＴＴＴＣＴＣＣＡＣＴＴＡ　　（配列番号４）

【００６４】

８．　ＰＣＲが結果に与える影響

図６は本発明の遺伝子検査方法に於けるＰＣＲサイクル数の影響を示す図であり，図６（Ａ）は，ＰＣＲサイクル数とＤＮＡコピー数の関係を示す図，図６（Ｂ）は，ＰＣＲサイクル数と「アレル間の遺伝子発現の比」との関係を示す図である。ｐ５３遺伝子のエクソン４の１塩基多型を対象とした。なお、ｐ５３遺伝子は血液等の全身で発現しており、該遺伝子は健常人の白血球細胞から抽出したＤＮＡ又はＲＮＡから調製できる。図６（Ａ），図６（Ｂ）に示す例で用いたプライマーは，ｐ５３遺伝子のエクソン４の領域を増幅する配列番号５，配列番号６のプライマーである。

ＡＧＣＴＣＣＣＡＧＡＡＴＧＣＣＡＧＡＧ　　（配列番号５）
ＣＴＧＧＧＡＡＧＧＧＡＣＡＧＡＡＧＡＴＧ　　（配列番号６）

【００６５】

図６（Ａ），図６（Ｂ）に示す例では，正常人のサンプル（ＤＮＡ，ｃＤＮＡ）を鋳型と

して用い９４℃５分間の変性の後，９４℃３０秒，６０℃３０秒，７２℃１分間のＰＣＲサイクルを，２２，２４，２６，２８，３０，３２，３４，３６回行った。図６（Ａ）の横軸はＰＣＲサイクル数を，縦軸は蛍光標識したプライマーからの蛍光量（カウント数）である。ＤＮＡコピー数は蛍光カウント数に比例するので縦軸はＤＮＡコピー数を示す。２２回～２８回が指数増幅期５１，３０回以上で飽和期５２となった。図６（Ｂ）に示す黒丸５３が｛（Ｓ２（ｃＤＮＡ）／Ｓ１（ｃＤＮＡ））／（Ｓ２（ＤＮＡ）／Ｓ１（ＤＮＡ））｝の値を示し，×印５４が｛（Ｐ２（ｃＤＮＡ）／Ｐ１（ｃＤＮＡ））／（Ｐ２（ＤＮＡ）／Ｐ１（ＤＮＡ））｝の値を示す。図６（Ｂ）では，全ての点が０．９３～１．１０の範囲にある。正常人サンプルでは遺伝子発現のアレル間の差は大きくなく，両者の比は１に近いと考えられ，図６（Ｂ）の結果は妥当である。競合的ＰＣＲ，カイネティックＰＣＲ等の従来法では，指数増幅期５１でのみ定量性が保証されているが，両アレルの比較を行なう本実施例では，飽和期５２でも妥当な検査結果が得られる。従って，ＤＮＡ，ｃＤＮＡサンプル量が少ない場合には，ＰＣＲサイクル数を増やせば良いので少量のサンプルでも感度良い測定が行なえる。また，ＤＮＡサンプル量とｃＤＮＡサンプル量とが異なり，例えば，ｃＤＮＡサンプル量がＤＮＡサンプル量の１０分の１程度である場合には，図６（Ｂ）の結果から，ｃＤＮＡのＰＣＲサイクル数をＤＮＡのＰＣＲサイクル数より２回～３回増やして良いことが分かる。図６（Ｂ）に示す結果から，本発明の遺伝子検査方法により得られる結果が，ＰＣＲサイクル数によりあまり影響を受けないことが分かる。即ち，「アレル間の遺伝子発現の比」（｛１＋（α／ｋ）｝）（式Ⅳ）は，ＰＣＲサイクル数を変化させても数％以内で同じとなる。

【００６６】

図７は，本発明の遺伝子検査方法に於けるＰＣＲプロトコルの影響を示す図である。図７に示す結果は，図６（Ａ），図６（Ｂ）の場合と同一のサンプルを用いた。図７に示すＰＣＲプロトコル（変成，解合，伸長反応の各々の温度と時間の組みあわせ）１～４は以下の通りである。

【００６７】

ＰＣＲプロトコル１：９４℃で５分間の変性の後，９４℃で３０秒，６０℃で３０秒，７２℃で１分間のＰＣＲサイクルを３０回行った。

ＰＣＲプロトコル２：９４℃で５分間の変性の後，９４℃で３０秒，６０℃で３０秒，７２℃で３０秒のＰＣＲサイクルを３０回行った。

ＰＣＲプロトコル３：９４℃で５分間の変性の後，９４℃で３０秒，５５℃で３０秒，７２℃で１分間のＰＣＲサイクルを３０回行った。

ＰＣＲプロトコル４：９４℃で５分間の変性の後，９４℃で３０秒，５５℃で３０秒，７２℃で３０秒のＰＣＲサイクルを３０回行った。

【００６８】

図７に於いて，「アレル間の遺伝子発現の比」（｛１＋（α／ｋ）｝）（式Ⅳ）は，Ｈ２／Ｈ１＝｛Ｓ２（ｃＤＮＡ）／Ｓ１（ｃＤＮＡ）｝／｛Ｓ２（ＤＮＡ）／Ｓ１（ＤＮＡ）｝により，Ａ２／Ａ１＝｛Ｐ２（ｃＤＮＡ）／Ｐ１（ｃＤＮＡ）｝／｛Ｐ２（ＤＮＡ）／Ｐ１（ＤＮＡ）｝により各々示されている。図７では，複数回の測定に関する「アレル間の遺伝子発現の比」の平均値と標準偏差（±の後に示す数値）を示す。ＰＣＲプロトコル１～４に於いて，｛Ｓ２（ｃＤＮＡ）／Ｓ１（ｃＤＮＡ）｝／｛Ｓ２（ＤＮＡ）／Ｓ１（ＤＮＡ）｝は０．９６～１．０８にあり，｛Ｐ２（ｃＤＮＡ）／Ｐ１（ｃＤＮＡ）｝／｛Ｐ２（ＤＮＡ）／Ｐ１（ＤＮＡ）｝は０．９５～１．０９にある。ＰＣＲプロトコル１～４の間で，「アレル間の遺伝子発現の比」のバラツキは，面積値を用いる時，６．１％，６，２％，９．２％，９．５％であり，ＰＣＲプロトコル１～４の間での「アレル間の遺伝子発現の比」＝１からの最大バラツキは９％であり，図７に示す結果から，鋳型のＤＮＡやｃＤＮＡが増幅される範囲の条件では，本発明の遺伝子検査方法により得られる結果が，ＰＣＲプロトコルにあまり影響を受けず，最大でも１０％であることが分かった。

【００６９】

９．ＲＴ－ＰＣＲ間と，サンプル間の結果のバラツキ

図８は，本発明の遺伝子検査方法に於いて３回の独立の試行したＲＴ－ＰＣＲにより得られた結果のバラツキを示す図である。図８に示す例では，各々の試行では別チューブの逆転写酵素（Ｓｕｐｅｒ　ｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ逆転写酵素）を用い，ｐ５３遺伝子のエクソン４の１塩基多型を対象とした。図８に示す例で用いたプライマーは，ｐ５３遺伝子のエクソン４の領域を増幅する配列番号５，配列番号６のプライマーである。図８に示す例では，ＰＣＲプロトコル１を使用した。図８に示す，「アレル間の遺伝子発現の比」（｛１＋（α／ｋ）｝）（式IV）は，図７と同様の表記で示されている。図８に示す例で使用したサンプルは，図７に示す例で使用したサンプルと同一である。図８に示すように，３回の独立な試行１，２，３により得られた結果のバラツキは，面積値を用いる時，２．８％，２，０％，６．１％であり，数％以下である。また，「アレル間の遺伝子発現の比」＝１からの最大バラツキは９％ある。同一サンプルでの独立な試行で得られた結果のバラツキ数％以下は，ＰＣＲプロトコルの差によるバラツキ最大１０％よりも小さい。

【００７０】

図９は，本発明の遺伝子検査方法による異なる３サンプルの測定結果のバラツキを示す図である。図９に示す，「アレル間の遺伝子発現の比」（｛１＋（α／ｋ）｝）（式IV）は，図７と同様の表記でされている。図６，図７，図８の例で使用したサンプルと，図９に示すサンプルＮｏ．１とは同一サンプルであり，ＰＣＲプロトコル１を使用した。図９に示すように，「アレル間の遺伝子発現の比」のバラツキは，面積値を用いる時，サンプルＮｏ．１，２，３で，２．０％，５．７％，６．３％であり，３サンプル共にバラツキは数％以下であり，妥当な結果が得られた。従って，図６～図９に示す結果から，同一のＰＣＲプロトコルの条件による本発明の遺伝子検査方法では，数％以下のバラツキの結果が得られる。

【００７１】

１０．　検査結果の表示例

図１０は，本発明の遺伝子検査方法により得られた個人検診時の検査結果を表示する表示画面の例を示す図である。図１０（Ａ）は，検査された個人の遺伝子座毎に，横軸を泳動時間，縦軸を蛍光強度とし電気泳動パターンの表示画面の例である。図１０（Ｂ）は，図１０（Ａ）に示す遺伝子座毎の電気泳動パターンの泳動バンドを解析し，泳動バンドのピーク値（Ｈ１，Ｈ２），面積値（Ａ１，Ａ２）の計算結果，比を数値として表示する表示画面の例である。図１０（Ｂ）に示す表示画面の例では，表示画面の第１行左列から右列に向かって，遺伝子座－１の，Ｈ１＝Ｐ１（ＤＮＡ），Ｈ２＝Ｐ２（ＤＮＡ），Ｈ２／Ｈ１＝Ｐ２（ＤＮＡ）／Ｐ１（ＤＮＡ），Ａ１＝Ｓ１（ＤＮＡ），Ａ２＝Ｓ２（ＤＮＡ），Ａ２／Ａ１＝Ｓ２（ＤＮＡ）／Ｓ１（ＤＮＡ）が表示され，第２行左列から右列に向かって，遺伝子座－１の，Ｈ１＝Ｐ１（ｃＤＮＡ），Ｈ２＝Ｐ２（ｃＤＮＡ），Ｈ２／Ｈ１＝Ｐ２（ｃＤＮＡ）／Ｐ１（ｃＤＮＡ），Ａ１＝Ｓ１（ｃＤＮＡ），Ａ２＝Ｓ２（ｃＤＮＡ），Ａ２／Ａ１＝Ｓ２（ｃＤＮＡ）／Ｓ１（ｃＤＮＡ）が表示される。以下同様に，遺伝子座－２，遺伝子座－３について表示がなされる。

【００７２】

図１０（Ｃ）は，図１０（Ｂ）のＨ２／Ｈ１＝Ｐ２（ＤＮＡ）／Ｐ１（ＤＮＡ），Ａ２／Ａ１＝Ｓ２（ＤＮＡ）／Ｓ１（ＤＮＡ），Ｈ２／Ｈ１＝Ｐ２（ｃＤＮＡ）／Ｐ１（ｃＤＮＡ），Ａ２／Ａ１＝Ｓ２（ｃＤＮＡ）／Ｓ１（ｃＤＮＡ）を，遺伝子座毎に棒グラフで表示する表示画面の例である。遺伝子発現が正常であれば，理想的には，上記の４つの比は１．０である。図１０（Ｃ）に示す表示画面のグラフの縦軸は上記の４つの比を示す。集団検診等で得られた結果から，正常人では，例えば，０．８と１．２の間に４つの比が入ると予め分かっている場合，正常と異常の境界値を点線で表示する。図１０（Ｃ）に示す表示画面の例では，遺伝子座－１，－３のグラフで境界線を越えているので，遺伝子座－１，－３に遺伝子発現の異常が示唆されることが一目でわかる。図１０（Ｄ）は，遺伝子座毎の「アレル間の遺伝子発現の差」(α)（式III），「アレル間の遺伝子発現の比」（｛１＋（α／ｋ）｝）（式IV）を数値で提示する。

【００７３】

図１１は，本発明の遺伝子検査方法により得られた集団検診時の検査結果を表示する表示画面の例を示す図である。図１１（Ａ）に示す表示画面は，複数の被検査者（サンプル）のある遺伝子座を検査した結果得られたサンプル毎の，図１０（Ｂ）に示す例と同様の表示画面である。図１１（Ｂ）に示す表示画面の例の横軸は，Ｈ２／Ｈ１＝Ｐ２（ＤＮＡ）／Ｐ１（ＤＮＡ）又はＡ２／Ａ１＝Ｓ２（ＤＮＡ）／Ｓ１（ＤＮＡ）を示し，縦軸は，Ｈ２／Ｈ１＝Ｐ２（ｃＤＮＡ）／Ｐ１（ｃＤＮＡ）又はＡ２／Ａ１＝Ｓ２（ｃＤＮＡ）／Ｓ１（ｃＤＮＡ）を示す。各サンプルを検査して得られた上記の比を，点（ドット）として表示する。遺伝子発現が正常であれば，理想的には，各ドットの座標値は（１．０，１．０）である。検査の結果得られる多数の点は（１．０，１．０）近傍にある。検査対象サンプル中に，遺伝子発現の異常を持つサンプルがあれば，遺伝子発現の異常を持つサンプルのドットは（１．０，１．０）から外れた位置に表示され，一目で異常サンプルを発見できる。例えば，（１．０，１．０）から外れたドットをマウス等のポインティングデバイスでクリックして異常サンプルのより詳細な検査結果を参照できる。

【００７４】

図１１（Ｃ）は，図１１（Ｂ）に示す表示画面で，（１．０，１．０）より外れた位置に表示され，ポインティングデバイスでクリックして指定された異常サンプルと，異常サンプルを除く母集団との統計的有意差を，例えば，ｔ検定，Ｆ検定で計算した結果を表示する。大量サンプルを検査した際の統計処理の結果を示す表示画面の例である。異常サンプル，母集団に関する平均値，分散，標準偏差，標準誤差，ｔ検定では，平均値の差，分散比，自由度，ｔ値，ｐ値，Ｆ検定では，分散比，自由度，Ｆ値，ｐ値が表示される。ｔ検定，Ｆ検定の何れかの結果を表示して良いことはいうまでもない。

【００７５】

１１．　プローブハイブリダイゼーションを本発明の遺伝子検査方法に適用する例

図１２は，ＤＮＡ－ＤＮＡハイブリダイゼーション法を本発明の遺伝子検査方法に適用した実施例を示す図である。先ず，チューブ１１０－１，１１０－２のＰＣＲ用バッファー１１１中でゲノムＤＮＡとｃＤＮＡをＰＣＲ増幅する。例えば，チューブ１１０－１でゲノムＤＮＡを，チューブ１１０－２でｃＤＮＡを増幅する。次に，増幅した「ゲノムＤＮＡ断片」１１４と「ｃＤＮＡ断片」１１７を加熱処理等により１本鎖に変性する。１本鎖に変性した後，ゲノムＤＮＡのアレル１と特異的にハイブリダイゼーションするＤＮＡプローブ１１２と，ゲノムＤＮＡのアレル１’と特異的にハイブリダイゼーションするＤＮＡプローブ１１３を，チューブ１１０－１に加える。ＤＮＡプローブ１１２とＤＮＡプローブ１１３は，予め発光波長が１０ｎｍ以上異なる蛍光物質で各々標識されている。蛍光物質の励起波長近傍の波長を持つ光をチューブ１１０－１に照射し，生じる蛍光をディテクターで検出する。ＤＮＡプローブ１１２由来の蛍光強度がＳ１（ＤＮＡ）に，ＤＮＡプローブ１１３由来の蛍光強度がＳ２（ＤＮＡ）に相当する。同様に，ｃＤＮＡのアレル１と特異的にハイブリダイゼーションするＤＮＡプローブ１１５と，ｃＤＮＡのアレル１’と特異的にハイブリダイゼーションするＤＮＡプローブ１１６を，チューブ１１０－２に加える。ＤＮＡプローブ１１５とＤＮＡプローブ１１６も，予め発光波長が１０ｎｍ以上異なる蛍光物質で各々標識されている。蛍光物質の励起波長近傍の波長を持つ光をチューブ１１０－２に照射し，生じる蛍光をディテクターで検出する。ＤＮＡプローブ１１５由来の蛍光強度がＳ１（ｃＤＮＡ）に，ＤＮＡプローブ１１６由来の蛍光強度Ｓ２（ｃＤＮＡ）に相当する。Ｓ２(ＤＮＡ)／Ｓ１(ＤＮＡ)とＳ２(ｃＤＮＡ)／Ｓ１(ｃＤＮＡ)とを比較できる。本発明の遺伝子検査方法は，プローブハイブリダイゼーションを用いても実行できる。

【００７６】

以上説明したように，本発明の遺伝子検査方法は，「対立遺伝子間の遺伝子発現の差」，又は「対立遺伝子間の遺伝子発現の比」を指標に，遺伝子異常の有無の検出や塩基配列多型の意義の解明を可能にする新しい観点からの遺伝子検査方法である。本発明の遺伝子検査方法は，ゲノムＤＮＡのエクソン領域の塩基配列多型を利用して，ヘテロ接合性を示すアレルの各々に由来するｍＲＮＡを分離し，ｍＲＮＡの量的差異を，ＲＴ－ＰＣＲ－ＳＳ

ＣＰにより定量する。本発明の遺伝子検査方法では，ＤＮＡヘテロ接合性を同一の工程で調べ，ｍＲＮＡの量的差異と比較する。ＤＮＡのヘテロ接合性とｍＲＮＡの量的差異とが有意に異なる時に異常と判断する。泳動パターンの面積値又はピーク値の比を比較の指標として使用するので，得られる結果データのバラツキは極めて小さくなり，誤診判断を低下できる。本発明の遺伝子検査方法では，同一のＰＣＲプロトコルの条件下で，数％以下のバラツキの結果が得られ，ヘテロ接合性を示すアレル間の遺伝子発現の違いに基づいた診断が可能になる。

【００７７】

【発明の効果】

本発明の遺伝子検査方法では，「アレル間の遺伝子発現の差」，又は「アレル間の遺伝子発現の比」を指標として，遺伝子異常の有無の検出を可能にし，ＤＮＡ塩基配列の決定法のみでは判定できなかった遺伝子の異常の意義を明確にできる。試料調整，ＰＣＲ増幅に起因するバラツキを小さくできるので，定量性，再現性に優れており，自動化に適した遺伝子検査方法及び遺伝子検査装置を提供できる。

【００７８】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 National Cancer Center Research Institute and HITACH,LTD.

〈120〉 Gene Inspection method

〈130〉 H900478

〈160〉 6

〈210〉 1
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 DNA primer used for PCR.

〈400〉 1
ttgtcaatcc tagccttcca agag 24

〈210〉 2
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 DNA primer used for PCR.

〈400〉 2
ttttgccttc cctagagtgc taac 24

〈210〉 3
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 DNA primer used for PCR.

〈400〉 3
gcaactggag ccaagaagag taac 24

〈210〉 4
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 DNA primer used for PCR.

〈400〉 4
tttgcaaaac cctttctcca ctta 24

〈210〉 5
〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 DNA primer used for PCR.

〈400〉 5
agctcccaga atgccagag 19

〈210〉 6
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

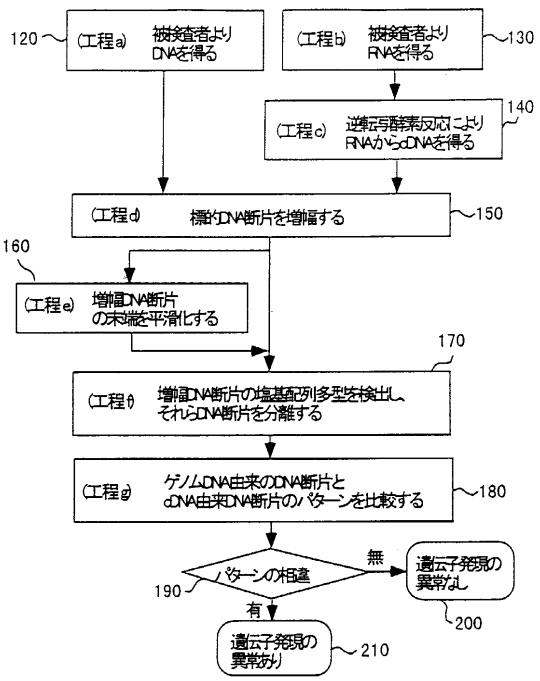
〈220〉
〈223〉 DNA primer used for PCR.

〈400〉 6
ctgggaaggg acagaagatg 20

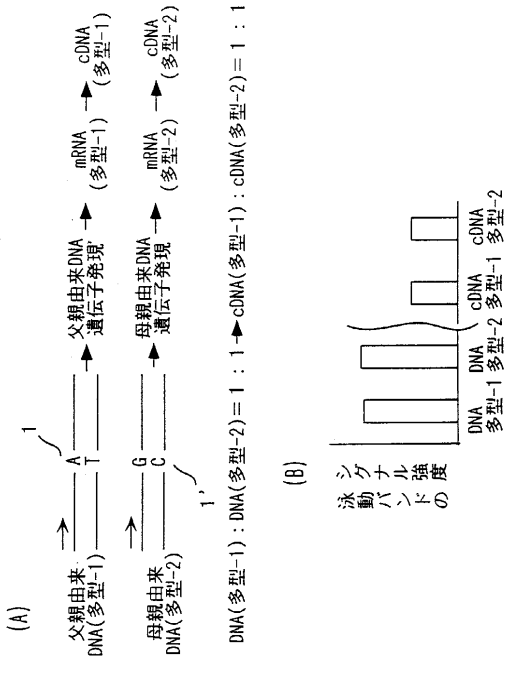
【００７９】
【配列表フリーテキスト】
（１）配列番号１の配列に関する他の関連する情報の記録
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー。
（２）配列番号１の配列に関する他の関連する情報の記録
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー。
（３）配列番号１の配列に関する他の関連する情報の記録
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー。
（４）配列番号１の配列に関する他の関連する情報の記録
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー。
（５）配列番号１の配列に関する他の関連する情報の記録
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー。
（６）配列番号１の配列に関する他の関連する情報の記録
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー。
【図面の簡単な説明】
【図１】本発明の遺伝子検査方法の手順例を示すフローである。
【図２】本発明の遺伝子検査方法に於いて１塩基多型を用いて遺伝子の異常を検査する図であり，正常遺伝子の場合の検査例を説明する図である。
【図３】本発明の遺伝子検査方法に於いて１塩基多型を用いて遺伝子の異常を検査する図であり，異常遺伝子が示唆される場合の検査例を説明する図である。
【図４】本発明の遺伝子検査方法を，塩基配列多型をもたず片側のアレルに変異を持つ癌細胞に適用した検査例を説明する図である。
【図５】本発明の遺伝子検査方法で得られる電気泳動パターンの例を示す図である。
【図６】本発明の遺伝子検査方法に於けるＰＣＲサイクル数の影響を示す図である。
【図７】本発明の遺伝子検査方法に於けるＰＣＲプロトコルの影響を示す図である。

【図８】本発明の遺伝子検査方法に於いて３回の独立の試行したＲＴ－ＰＣＲにより得られた結果のばらつきを示す図である。
【図９】本発明の遺伝子検査方法による異なる３サンプルの測定結果のばらつきを示す図である。
【図１０】本発明の遺伝子検査方法により得られた個人検診時の検査結果を表示する表示画面の例を示す図である。
【図１１】本発明の遺伝子検査方法により得られた集団検診時の検査結果を表示する表示画面の例を示す図である。
【図１２】プローブハイブリダイゼーション法を本発明の遺伝子検査方法に適用した実施例を示す図である。
【符号の説明】
１…１塩基多型を持つ父親由来のアレル，１’…１塩基多型を持つ母親由来のアレル，２…異常箇所（転写開始・調節領域の異常），３…癌に特異的な変異，４１…アレル１由来のゲノムＤＮＡ断片の泳動バンド，４２…アレル１’由来のゲノムＤＮＡ断片の泳動バンド，４３…アレル１由来のｃＤＮＡ断片の泳動バンド，４４…アレル１’由来のｃＤＮＡ断片の泳動バンド，５１…指数増幅期，５２…飽和期，５３…「Ｓ２（ＤＮＡ）／Ｓ１（ＤＮＡ）」又は「Ｓ２（ｃＤＮＡ）／Ｓ１（ｃＤＮＡ）」，５４…「Ｐ２（ＤＮＡ）／Ｐ１（ＤＮＡ）」又は「Ｐ２（ｃＤＮＡ）／Ｐ１（ｃＤＮＡ）」，１１０－１…ＰＣＲ反応チューブ，１１０－２…ＰＣＲ反応チューブ，１１１…ＰＣＲ用バッファー，１１２…ゲノムＤＮＡのアレル１と特異的にハイブリダイゼーションするＤＮＡプローブ，１１３…ゲノムＤＮＡのアレル１’と特異的にハイブリダイゼーションするＤＮＡプローブ，１１４…ゲノムＤＮＡ断片，１１５…ｃＤＮＡのアレル１と特異的にハイブリダイゼーションするＤＮＡプローブ，１１６…ｃＤＮＡのアレル１’と特異的にハイブリダイゼーションするＤＮＡプローブ，１１７…ｃＤＮＡ断片。

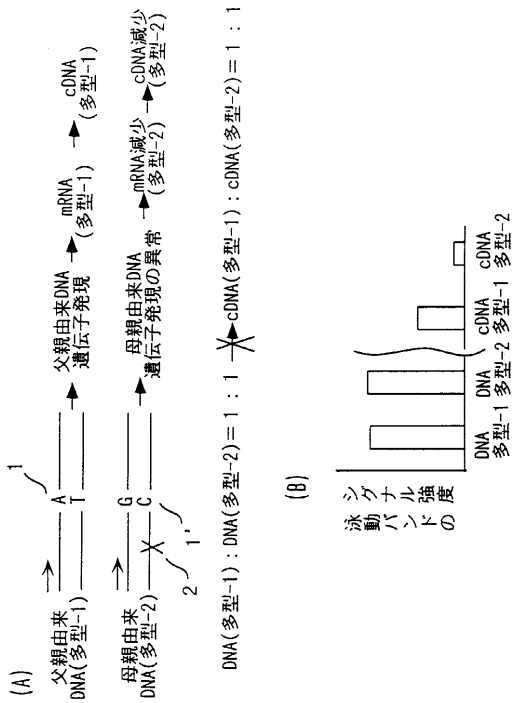
【図１】



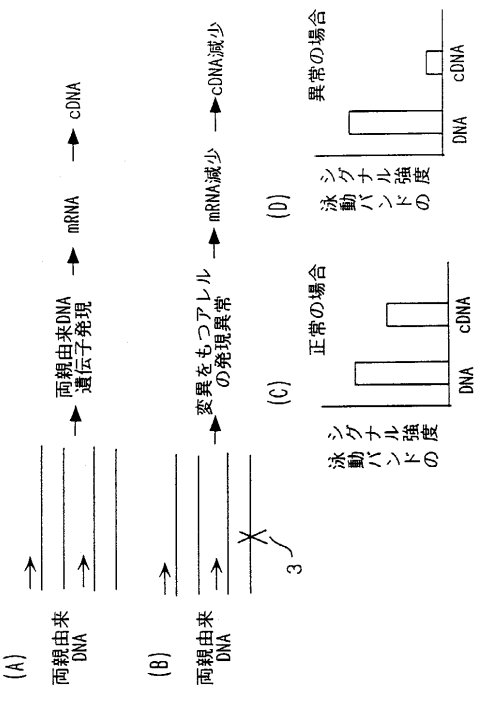
【図２】



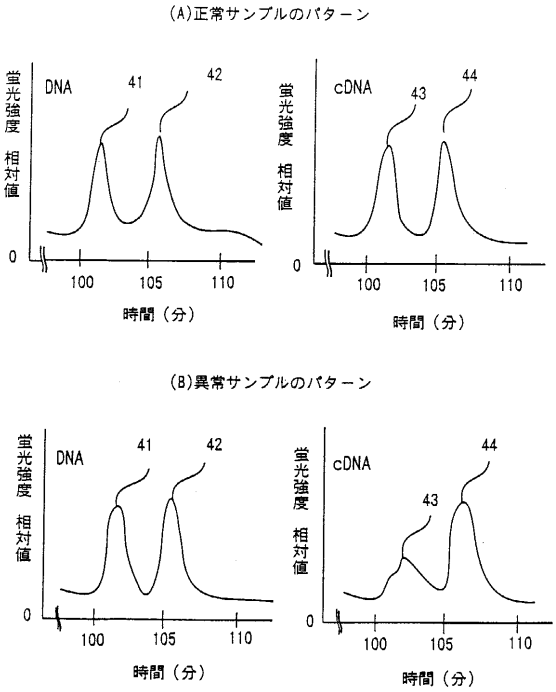
【図３】


(A)
父親由来 DNA(多型-1)
母親由来 DNA(多型-2)
父親由来DNA 遺伝子発現
母親由来DNA 遺伝子発現の異常
mRNA (多型-1)
mRNA減少 (多型-2)
cDNA (多型-1)
cDNA減少 (多型-2)
DNA(多型-1):DNA(多型-2)＝1:1
cDNA(多型-1):cDNA(多型-2)＝1:1
(B)
泳動バンドの シグナル強度
DNA 多型-1
DNA 多型-2
cDNA 多型-1
cDNA 多型-2

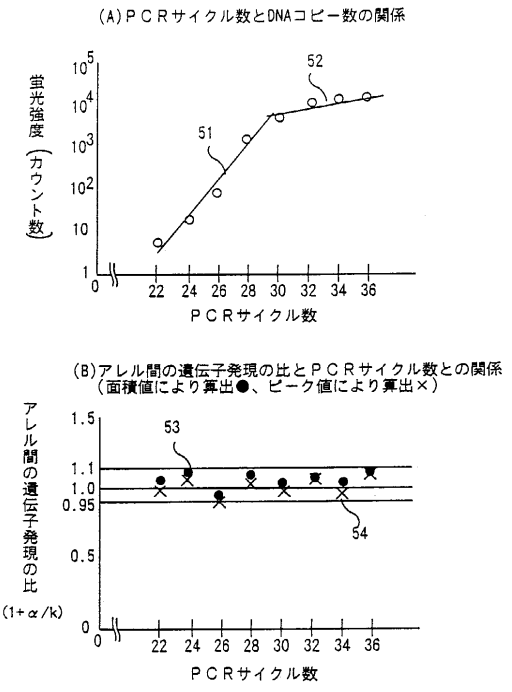
【図４】


(A)
両親由来 DNA
両親由来DNA 遺伝子発現
mRNA
cDNA
(B)
両親由来 DNA
変異をもつアレル の発現異常
mRNA減少
cDNA減少
(C)
正常の場合
泳動バンドの シグナル強度
DNA
cDNA
(D)
異常の場合
泳動バンドの シグナル強度
DNA
cDNA

【図５】


(A)正常サンプルのパターン
DNA
cDNA
41
42
43
44
蛍光強度 相対値
0
100
105
110
時間（分）
(B)異常サンプルのパターン
DNA
cDNA
41
42
43
44
蛍光強度 相対値
0
100
105
110
時間（分）

【図６】


(A)ＰＣＲサイクル数とDNAコピー数の関係
蛍光強度 (カウント数)
10^5
10^4
10^3
10^2
10
1
0
51
52
22
24
26
28
30
32
34
36
ＰＣＲサイクル数
(B)アレル間の遺伝子発現の比とＰＣＲサイクル数との関係
（面積値により算出●、ピーク値により算出×）
アレル間の遺伝子発現の比 (1+α/k)
1.5
1.1
1.0
0.95
0.5
0
53
54
22
24
26
28
30
32
34
36
ＰＣＲサイクル数

【図７】

アレル間の遺伝子発現の比（1+α/k）の
ＰＣＲプロトコル条件による違い*

	アレル間の遺伝子発現の比（1+α/k）	
PCR プロトコル	泳動バンドの ピーク値により算出	泳動バンドの 面積値により算出
1	1.01±0.09	0.99±0.06
2	0.98±0.08	0.97±0.06
3	1.08±0.09	1.09±0.10
4	0.96±0.08	0.95±0.09

＊サンプルNo.1を用いた。

【図８】

ＰＣＲとＲＴ反応を３回行った際の、
アレル間の遺伝子発現の比（1+α/k）のばらつき*

	アレル間の遺伝子発現の比（1+α/k）	
PCRとRT反応	泳動バンドの ピーク値により算出	泳動バンドの 面積値により算出
試行１	1.08±0.01	1.09±0.03
試行２	0.96±0.04	0.98±0.02
試行３	1.01±0.01	0.99±0.06

＊サンプルNo.1、PCRプロトコル１を用いた。

【図９】

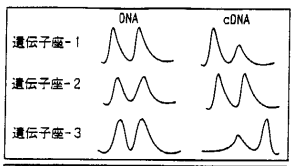
アレル間の遺伝子発現の比（1+α/k）の
サンプルによる違い*

	アレル間の遺伝子発現の比（1+α/k）	
サンプル	泳動バンドの ピーク値により算出	泳動バンドの 面積値により算出
No. 1	0.96±0.04	0.98±0.02
No. 2	1.07±0.04	1.06±0.06
No. 3	0.98±0.08	0.95±0.06

＊増幅ステッププロトコル１を用いた。

【図１０】

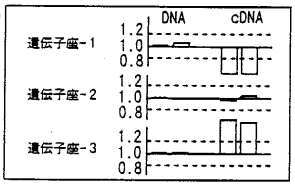
(A)



(B)

	ピーク値			面積値		
	H1	H2	H2/H1	A1	A2	A2/A1
DNA	78.1	78.2	1.00	4358	4398	1.01
cDNA	78.1	35.5	0.45	4427	2004	0.45
DNA	40.1	40.2	1.00	3526	3499	0.99
cDNA	36.2	36.4	1.01	3838	3921	1.02
DNA	95.3	96.0	1.01	5010	5019	1.00
cDNA	15.1	60.2	3.99	800	3150	3.94

(C)



(D)

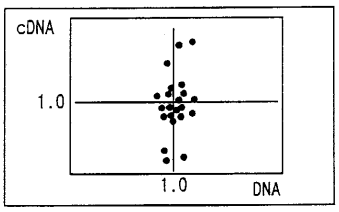
	α	1+α／k
遺伝子座-1	0.56	0.45
遺伝子座-2	0.03	1.03
遺伝子座-3	2.93	3.93

【図１１】

(A)

サンプル NO.		ピーク値			面積値		
		H1	H2	H2/H1	A1	A2	A2/A1
1	DNA	78.1	78.2	1.00	4358	4398	1.01
	cDNA	78.1	35.5	0.45	4427	2004	0.45
2	DNA	40.1	40.2	1.00	3526	3499	0.99
	cDNA	36.2	36.4	1.01	3838	3921	1.02
3	DNA	95.3	96.0	1.01	5010	5019	1.00
	cDNA	15.1	60.2	3.99	800	3150	3.94

(B)



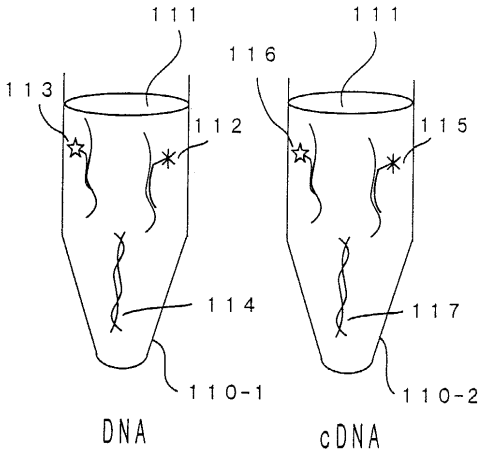
(C)

群情報	平均	分散	標準偏差	標準誤差
ｻﾝﾌﾟﾙ-1	○○	××	○○○	×××
母集団	○○	××	○○○	×××

F検定	分散比	自由度	F値	p値
	○○	×××	○○	××

t検定	平均値の差	自由度	t値	p値
	○○○	××	○○	××

【図１２】



フロントページの続き

(72)発明者 村上 善則
東京都中央区築地５丁目１番１号 国立がんセンター内
(72)発明者 関谷 剛男
東京都中央区築地５丁目１番１号 国立がんセンター内

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 International journal of cancer. 1999 Oct 8, Vol.83, No.2, p.192-196
International journal of cancer. 1997, Vol.74, No.4, p.403-406
PCR methods and applications. 1992, Vol.2, No.1, p.10-13
Ｓ．Ｂ．Ｐｒｉｍｒｏｓｅ 著, 壇上稲穂 訳, 藤山秋佐夫 監訳, ゲノム解析ベーシック－シークエンシングから応用まで, シュプリンガー・フェアラーク東京, １９９６年 ９月 ５日, ｐ．１－１３
Human molecular genetics. 1999, Vol.8, No.10, p.1821-1832
Nucleic acids research. 1998, Vol.26, No.1, p.285-287
Current opinion in genetics & development. 1997, Vol.7, No.3, p.416-423
Gene. 1999 Jul, Vol.234, No.2, p.177-186
島田和典 他, Molecular Medicine Series 遺伝子診断 －その原理と応用－, 南江堂, １９９４年 ９月２０日, ｐ．７７－８５
今井浩三 他 編, 癌の新しい遺伝子診断と治療, 株式会社 医薬ジャーナル社, １９９６年１月 １日, 初版, ｐ．１２－１３
平井久丸 編, 臨床医のための実験医学シリーズ１３ 遺伝子診断, 羊土社, １９９３年１０月２０日, 初版, ｐ．１２－２３
Nature genetics. 1999 Sep, Vol.23, No.1, p.41-46

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12Q 1/68
C12N 15/00-15/90
JSTPlus(JDream2)
JMEDPlus(JDream2)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq