

(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  
2021年4月8日(08.04.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/065877 A1

(51) 国際特許分類:  
C12N 5/10 (2006.01) C12Q 1/6851 (2018.01)  
C12N 15/10 (2006.01) C12Q 1/686 (2018.01)  
C12N 15/11 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/036819

(22) 国際出願日: 2020年9月29日(29.09.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2019-178755 2019年9月30日(30.09.2019) JP  
特願 2020-127716 2020年7月28日(28.07.2020) JP

(71) 出願人: 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 松本 真一 (MATSUMOTO Shinichi); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 山本 俊輔 (YAMAMOTO Shunsuke); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 後 ▲藤 ▼昭彦 (GOTO Akihiko); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 福田 美雪 (FUKUDA Miyuki); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 平林 英樹 (HIRABAYASHI Hideki); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 大野 聖二, 外 (OHNO Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目

6番5号丸の内北口ビル21階 大野  
総合法律事務所 Tokyo (JP).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

(54) Title: QUANTITATIVE PCR METHOD AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称: 定量的PCR法およびそのためのキット

(57) Abstract: The present invention provides an improved quantitative PCR method (qPCR method) for measuring the amount of a target gene contained in human cells, the method enabling more accurate cell kinetic analysis in cell therapy, for example. This qPCR method comprises a step of adding, to a biological sample containing human cells, a predetermined amount of exogenous DNA that does not cross over with a target gene as an external standard for correcting a measured amount of the target gene.

(57) 要約: 本発明は、例えば細胞療法においてより高い精度で細胞動態を解析することを可能とする、ヒト細胞に含まれている標的遺伝子の量を測定するための、改良された定量的PCR法(qPCR法)を提供する。本発明のqPCR法は、ヒト細胞を含む生体試料に、標的遺伝子の測定量を補正するための外部標準としての、標的遺伝子と交叉しない所定量の外因性DNAを添加する工程を含む。



WO 2021/065877 A1

## 明 細 書

発明の名称： 定量的PCR法およびそのためのキット

### 技術分野

[0001] 本発明は、定量的PCR (quantitative polymerase chain reaction: qPCR) 法およびそのためのキットに関する。より詳しくは、本発明は、qPCR法において標的遺伝子の定量結果を補正するための方法およびそれを行うためのキットに関する。

### 背景技術

[0002] 遺伝子が改変された細胞を投与する治療法、例えば特定の腫瘍に対して特異的なCAR (キメラ抗原受容体) を発現したT細胞 (CAR-T細胞) を投与する細胞療法において、投与後の細胞数の生体内における動態 (細胞動態) を把握することは、治療効果および安全性 (副作用) を把握し、適切な治療方針を立てるために重要である。

[0003] 例えば、非特許文献1には、急性リンパ芽球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) および慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia: CLL) の治療のために、チサゲンレクルユーセル (Tisagenlecleucel, 開発コード CTL019)、すなわちCD19陽性B細胞を標的とするCAR-T細胞を含む製剤を投与したときの、生体内での細胞動態について記載されている。投与されたCAR-T細胞は、生体内で増殖し、一定の細胞数が保持され続けることが期待される。そのCAR-T細胞の血液中の細胞数は、治療対象であるALLおよびCLLの症状と関連して変動するが、当該製剤の毒性として引き起こされるおそれのあるサイトカイン放出症候群 (CRS) の深刻度とも関連すると考えられる。したがって、このような製剤にとって、CAR-T細胞の血液中の細胞数の動態は、治療効果と安全性の両面を評価するための重要な情報になるものと考えられる。非特許文献1では、CAR-T細胞数を反映する指標として、ゲノムDNA (gDNA) 1  $\mu$ gあたりのCAR-T遺伝子のコピー数 (copies/ $\mu$ g gDNA) が用いられて

いる。Figure 1には、当該コピー数が、細胞移植時（約 $10^3$ copies/ $\mu$ g gDNA）から数日で急激に低下し（約 $10^1$ copies/ $\mu$ g gDNA）、その後急激に上昇する（約 $10^4\sim 10^6$ copies/ $\mu$ g gDNA）様子が示されている。

## 先行技術文献

## 非特許文献

- [0004] 非特許文献1: Mueller et al., Blood 2017 130:2317-2325; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-786129>.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0005] 従来、血液等の検体から調製した生体試料中の細胞数は、例えば非特許文献1でもそうであるように、その細胞に特異的な遺伝子を標的とする定量的PCR（qPCR）法により、遺伝子のコピー数として定量されている。その際、標的遺伝子のコピー数は一般的に、ゲノムDNA（gDNA）を内部標準として、例えばゲノム中のコピー数がよく知られている遺伝子（例えばRNaseP遺伝子）の定量値から換算したgDNA量によって規格化され、gDNAの単位量あたりのコピー数として、例えば「コピー数/ $\mu$ g gDNA」といった単位を用いて表されている。
- [0006] しかしながら、そのような従来の定量方法による測定値や、その測定値に基づく細胞動態が、細胞療法の効果や安全性を評価するための指標として適切なものであるかどうかは、これまで検証されてこなかった。
- [0007] 本発明は、例えば細胞療法においてより高い精度で細胞動態を解析することを可能とする、改良されたqPCR法を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、従来の一般的なqPCR法に従い、gDNAを内部標準とし、「コピー/ $\mu$ g gDNA」の単位で表される標的遺伝子の測定値は、細胞療法で投与されるCAR-T細胞等の動態を解析するための情報として用いるには、いくつかの観点から十分な正確性を有していないおそれがあるこ

とを見出した。

[0009] その要因は、規格化のために用いられている gDNA量は様々な要因によって変動が比較的大きいと考えられることにある。例えば、細胞療法においては gDNA量が細胞療法では一般的に、患者はCAR-T細胞等の移植を受ける前に、その移植の効果を高めるために、血液中のリンパ球を枯渇させるための化学療法を受ける。その場合、血液中の gDNA量も一時的に著しく減少し、やがてリンパ球が回復するにつれ gDNA量も増加することになる。また、増殖したCAR-Tによっても gDNA量は増加することとなる。このようなことから、gRNA量は、個人（患者）間で、また同一の個人に由来していても採取時期の異なる生体試料間（サンプル間）で、必ずしも一定ではなく、変動やバラツキは比較的大きい可能性がある。内部標準とする gDNA量の変動すれば、gDNA量が常に一定と仮定した場合と比較して、gDNA量に対して相対的に表される標的遺伝子の定量値（コピー数/ $\mu\text{g}$  gDNA）も変動していることになり、CAR-T細胞の血液中での増殖や生存等の動態を正確に反映した指標とはなっていないおそれがある。

[0010] さらに、標的遺伝子の回収率の変動も、標的遺伝子のコピー数の定量値に影響していると考えられる。すなわち、DNA抽出物からの標的遺伝子の回収率（生体試料中に含まれている全DNAに含まれている真の標的遺伝子のコピー数に対する、全DNAから得られた抽出物に含まれ、かつqPCRにより増幅できた標的遺伝子のコピー数の比率）も生体試料間で変動し、gDNA量を内部標準とする場合は、その標的遺伝子の回収率の変動の影響を十分に緩和できていないおそれがある。

[0011] 本発明者らは、例えばイヌのgDNAのような外因性DNAを生体試料に添加し、その定量値を規格化に用いることにより、上記のような標的遺伝子のコピー数に対する各種の影響が抑制された、より正確な定量値が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。このような本発明によるqPCR法では、標的遺伝子にコピー数は、単位量の生体試料（例えば血液）あたりの数値として、例えば「コピー/ $\mu\text{L}$  血液」の単位で表される測定値

として得られる。

[0012] 現に、後記比較例1～3として示すように、従来のqPCR法に準じてgDNAを内部標準とした場合、標的遺伝子の定量値の真度(Accuracy)は比較的低く、確度(C.V.(Coefficient of Variation))は比較的大きいことが認められた。これに対して、後記実施例1～6として示す、外因性DNAを外部標準として用いる本発明に準じた場合は、標準遺伝子の定量値の真度および確度が上記の従来の方法よりも著しく改善されることなどから、本発明の定量方法の有用性が認められた。例えば、白血球が減少した患者由来の生体試料を模した(健常人の血液から白血球を除去した)サンプルを用いている比較例3と実施例3の対比において、上記のような本発明の優位性が具体的に示されている。

[0013] したがって、本発明は上記課題解決のための手段として、以下の[1]～[6]を提供する。

[1]

ヒト細胞に含まれている標的遺伝子の量を測定するための定量的PCR法(qPCR法)であって、

前記ヒト細胞を含む生体試料に、前記標的遺伝子の測定量を補正するための外部標準としての、前記標的遺伝子と交叉しない所定量の外因性DNAを添加する工程を含む、qPCR法。

[2]

前記qPCR法がリアルタイムPCR法であって、

前記標的遺伝子の測定量の補正が、前記標的遺伝子について測定されたCt値と、前記外因性DNAについて測定されたCt値との差( $\Delta Ct$ )を求め、その $\Delta Ct$ から前記標的遺伝子の量に換算することを含む、項1に記載のqPCR法。

[3]

前記標的遺伝子の測定量の補正が、qPCR法による前記外因性DNAの測定量と、前記生体試料への前記外因性DNAの添加量とを対比して求めら

れる回収率を反映させることを含む、項1に記載のqPCR法。

[4]

前記qPCR法がリアルタイムPCR法であって、前記標的遺伝子の測定量が前記生体試料の単位量あたりのコピー数で表される、項1に記載のqPCR法。

[5]

前記ヒトが、遺伝子改変T細胞を投与された、および／または白血球の減少を引き起こす疾患に罹患したまたは治療法を受けたヒトである、項1に記載のqPCR法。

[6]

標的遺伝子の測定量を補正するための外部標準としての、前記標的遺伝子と交叉しない所定量の外因性DNAを含む、qPCR用キット。

### 発明の効果

[0014] 外部標準として外因性DNAを用いて測定値を補正する本発明のqPCR法により、内部標準としてgDNAを用いる従来のqPCR法よりも、より高い真度および確度で標的遺伝子を定量することができる。このような本発明のqPCR法は、例えば、白血球の減少などによりgDNA量が大きく変動する患者において、標的遺伝子を含む移植細胞数の動態を正確に把握することを通じて、効果および安全性の高い治療計画を立てることなどを可能とする。

### 図面の簡単な説明

[0015] [図1A]図1Aは、実施例1における、免疫不全マウス血液を検体とする検量線サンプル（標準液）中の標的遺伝子のCt値とイヌゲノムDNA（外部標準遺伝子）のCt値との差（ $\Delta Ct$ ；縦軸）と、標的遺伝子の濃度（横軸）との関係に基づいて作成された検量線を表す。

[図1B]図1Bは、比較例1における、検量線サンプル中の標的遺伝子のCt値（縦軸）と、標的遺伝子の濃度（横軸）との関係に基づいて作成された検量線を表す。

[図2A]図2Aは、実施例2における、プールヒト血液を検体とする検量線サンプル中の標的遺伝子のCt値とイヌゲノムDNA（外部標準遺伝子）のCt値との差（ $\Delta Ct$ ；縦軸）と、標的遺伝子の濃度（横軸）との関係に基づいて作成された検量線を表す。

[図2B]図2Bは、比較例2における、プールヒト血液を検体とする検量線サンプル中の標的遺伝子のCt値とRNaseP（内部標準遺伝子）のCt値との差（ $\Delta Ct$ ；縦軸）と、標的遺伝子の濃度（横軸）との関係に基づいて作成された検量線を表す。

[図2C]図2Cは、比較例2における、個々のドナーの血液サンプルから調製したQCサンプル中の標的遺伝子コピー数の確度（縦軸、表2B参照）と、吸光度法により測定したDNA濃度（横軸）とをプロットした相関図である。

[図2D]図2Dは、実施例2（左側「External control gene」）および比較例2（右側「Internal control gene」）における、個々のドナーの血液から調製したQCサンプル中の標的遺伝子コピー数の真度をプロットした散布図である。

[図3A]図3Aは、実施例3における、ヒト血液（◆印）、白血球を除去したヒト血液（■印）および緩衝液（▲印）それぞれに標的遺伝子を含むヒト遺伝子改変T細胞を添加したサンプルについての、イヌゲノムDNA（外部標準遺伝子）を用いて作成した検量線から定量した標的遺伝子の濃度（縦軸）と、添加した細胞数（横軸）との関係を表す。

[図3B]図3Bは、比較例3における、ヒト血液（◆印）、白血球を除去したヒト血液（■印）および緩衝液（▲印）それぞれに標的遺伝子を含むヒト遺伝子改変T細胞を添加したサンプルについての、RNaseP（内部標準遺伝子）を用いて作成した検量線から定量した標的遺伝子の濃度（縦軸）と、添加した細胞数（横軸）との関係を表す。

[図4A]図4Aは、実施例6における、第1ヒト遺伝子改変T細胞を投与したゼノグラフトマウスから採取された血液検体中の標的遺伝子1について、本

発明による外部標準遺伝子（イヌゲノムDNA）を用いた定量方法によりcopies /  $\mu\text{L}$  bloodで現した結果（横軸）および内部標準遺伝子（RNaseP）を用いた定量方法によりcopies /  $\mu\text{g}$  gDNAで表した結果（縦軸）の関係を表すグラフである。丸印（●印）のプロットは $5 \times 10^6$  CAR+細胞 / 動物で投与した場合、三角印（▲印）のプロットは $10 \times 10^6$  CAR+細胞 / 動物の用量で投与した場合である。

[図4B]図4 Bは、実施例6における、第2ヒト遺伝子改変T細胞を投与したゼノグラフトマウスから採取された血液検体中の標的遺伝子2について、本発明による外部標準遺伝子を用いた定量方法によりcopies /  $\mu\text{L}$  bloodで現した結果（横軸）および内部標準遺伝子を用いた定量方法によりcopies /  $\mu\text{g}$  gDNAで表した結果（縦軸）の関係を表すグラフである。

[図4C]図4 Cは、実施例6における、第2ヒト遺伝子改変T細胞の血液サンプル中の第2ヒト遺伝子改変T細胞の数（横軸、cells /  $\mu\text{L}$  blood、フローサイトメトリーにより測定）と、標的遺伝子2の導入レベル（縦軸、copies /  $\mu\text{g}$  gDNA、内部標準遺伝子を用いた本発明の定量方法により測定）の相関関係を表すグラフである。

[図4D]図4 Dは、実施例6における、第2ヒト遺伝子改変T細胞の血液サンプル中の第2ヒト遺伝子改変T細胞の数（横軸、cells /  $\mu\text{L}$  blood、フローサイトメトリーにより測定）と、標的遺伝子2の導入レベル（縦軸、copies /  $\mu\text{L}$  blood、外部標準遺伝子を用いた本発明の定量方法により測定）の相関関係を表すグラフである。

### 発明を実施するための形態

#### [0016] − qPCR法 −

本発明によるqPCR法は、ヒト細胞に含まれている標的遺伝子の量を測定するためのものであって、ヒト細胞を含む生体試料に、前記標的遺伝子の測定量を補正するための外部標準としての、前記標的遺伝子と交叉しない所定量の外因性DNAを添加する工程を含む。

#### [0017] [標的遺伝子]

本発明における「標的遺伝子」は、特に限定されるものではなく、一般的なqPCR法により定量の対象とされている、ヒト細胞に含まれている遺伝子の中から選択することができる。

[0018] 本発明の好ましい一実施形態において、標的遺伝子は「遺伝子改変T細胞」に含まれる遺伝子である。「T細胞」には、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD8+T細胞、CD4+T細胞、腫瘍浸潤T細胞、メモリーT細胞、ナイーブT細胞、NKT細胞などが包含される。「遺伝子改変」には、CARの導入による遺伝子改変のほか、TCR（T細胞受容体）の導入による遺伝子改変なども包含される。代表的な遺伝子改変T細胞としては、CAR-T細胞、TCR-T細胞などが挙げられる。

[0019] なお、標的遺伝子は、遺伝子改変T細胞以外の「遺伝子改変免疫細胞」、例えばNK細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等に、CAR等の遺伝子を導入して改変した免疫細胞に含まれる遺伝子であってもよい。

[0020] 標的遺伝子は、例えば、CAR-T細胞等の遺伝子改変細胞を作製するために、T細胞等の宿主細胞に導入された、発現ベクターに含まれている遺伝子であってもよい。発現ベクターは、直鎖状でも環状でもよく、プラスミドなどの非ウイルスベクターでも、ウイルスベクターでも、トランスポゾンによるベクターでもよい。ウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターを挙げることができる。好ましいレトロウイルスベクターとしては、例えば、pMSGVベクター (Tamada *et al.*, ClinCancer Res 18:6436-6445(2002)) およびpMSCVベクター (タカラバイオ社製) を挙げることができる。レトロウイルスベクターを用いた場合、そのベクターに含まれる遺伝子はT細胞等の宿主細胞のゲノムへ取り込まれるため、長期間、安定的に遺伝子を発現させることが可能である。

[0021] 例えば、遺伝子改変T細胞としてCAR-T細胞を作製する場合、宿主細胞となるT細胞には基本的に、(i) がん細胞等の攻撃対象細胞の細胞表面抗原を認識する一本鎖抗体、(ii) 細胞膜貫通領域、および(iii) T細胞の活

性を誘導するシグナル伝達領域、の各部位のペプチドが、必要に応じてスペーサーを介して連結することによって構成されている、CAR発現用遺伝子が導入される。また、CAR発現用遺伝子には、必要に応じて、自殺遺伝子（遺伝子改変T細胞を投与後の治療経過に応じて、例えば攻撃対象とするがん細胞が消失した段階で、自殺遺伝子の機能を活性化する薬剤を投与することにより、生体内の遺伝子改変T細胞の数を制御することを可能とするための遺伝子）、サイトカイン／ケモカイン遺伝子、遺伝子同士をつなぐリンカー（P2A、F2A、T2A、E2A配列等）などが併用されることもある。このようなCAR発現用遺伝子およびその他の遺伝子、リンカー等を含むCAR-T細胞作製用遺伝子群を用いる場合、標的遺伝子は、CAR-T細胞作製用遺伝子群に含まれる遺伝子であることを特定することのできる塩基配列を少なくとも含んでいる部分（遺伝子またはその一部）とすることができる。遺伝子改変T細胞としてTCR-T細胞を作製する場合も同様に、標的遺伝子は、TCR遺伝子のほか、必要に応じて自殺遺伝子、サイトカイン／ケモカイン遺伝子、遺伝子同士をつなぐリンカーなどを含む、CAR-T細胞作製用遺伝子群の中から選ばれる、TCR-T細胞作製用遺伝子群であることを特定することのできる塩基配列を少なくとも含んでいる部分（遺伝子またはその一部）とすることができる。

[0022] [外因性DNA]

本発明における外因性DNAは、qPCR法における標的遺伝子の定量値を補正するための、外部標準として用いられるDNAであって、標的遺伝子と交叉しない、つまり標的遺伝子用のプライマーによって増幅しない（そのような標的配列用のプライマーを設計することができる）塩基配列を有するDNAである。逆に言えば、外因性DNAは、標的遺伝子やその他の対象細胞中または生体試料中の遺伝子と交叉しない（そのような外因性DNA用プライマーを設計することができる）塩基配列でもある必要がある。外因性DNAは、ヒトが保有していない塩基配列（遺伝子等）を含むことが望ましい。

[0023] 外因性DNAは、上記のような特性を有する塩基配列を有するDNAであれば特に限定されるものではない。代表的な外因性DNAとしては、ヒト以外の哺乳動物、好ましくは霊長類以外の哺乳動物、例えばウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウサギ、げっ歯類（マウス、ラット等）などのゲノムDNAが挙げられる。また、外因性DNA（LNAなどDNA以外の核酸を含む場合は外因性核酸）として、人工的に設計および合成した配列を含む人工核酸を用いることも可能である。

[0024] 外因性DNAは、添加量を調節しやすいようあらかじめ単離されているDNAであってもよいし、ヒト以外の哺乳動物の細胞に含まれた状態の（添加量は細胞数として調節する）DNAであってもよい。細胞に含まれている外因性DNAは、細胞に含まれている標的遺伝子と共に、細胞からDNAを抽出すればよい。

[0025] 外因性DNAの、生体試料への添加量は特に限定されるものではなく、適宜調節することができる。例えば、後述するような本発明の典型的な実施形態において、標的遺伝子のCt値と外因性DNAのCt値の差（ $\Delta Ct$ ）を算出する場合は、少なくとも外因性DNAについてCt値が求められる（所定の回数以下のPCRサイクルで、外因性DNAの増幅産物量が閾値に達する）ような添加量であればよい。

[0026] [生体試料]

本発明における「生体試料」は、一般的なqPCR法による、ヒト細胞に含まれている標的遺伝子を定量するための生体試料と同様のものを用いることができる。そのような生体試料としては、例えば、血液、脳脊髄液、骨髄、腫瘍（原発腫瘍、転移性腫瘍、がん性腹水など）、その他の標的遺伝子を含む細胞が存在する可能性がある、生体から採取された検体より調製された試料が挙げられる。

[0027] 本発明の一実施形態において、生体試料は、遺伝子改変T細胞を投与された、および／または白血球の減少を引き起こす疾患に罹患したまたは治療法を受けたヒトから採取された検体より調製されたものである。遺伝子改変T

細胞を投与された患者は、投与後の当該細胞の細胞数の動態を、本発明の qPCR法による従来よりも改善された定量値によって解析することが、特に大きな貢献をもたらす対象である。また、白血球減少症（好中球減少症、リンパ球減少症、単球減少症）の患者や、細胞療法のために白血球（リンパ球）を枯渇させる化学療法を受けた患者も、従来技術で内部標準とする gDNA量の著しい減少により、標的遺伝子の定量値が大きな影響を受けるため、本発明の qPCR法を適用することが特に好ましい対象である。

[0028] [工程]

qPCR法（定量的PCR法）は、生体試料中の遺伝子のコピー数を定量的に測定することのできる各種のPCR法を指す。そのようなqPCR法は当業者にとって周知慣用であり、その基本的な技術的事項、好ましい技術的事項などは、本発明にも適用することができる。

[0029] qPCR法の代表的な実施形態の一つとして「リアルタイムPCR法」が挙げられる。リアルタイムPCR法では、PCRによる増幅産物の増加に伴って発せられるようになる蛍光（シグナル）をリアルタイムでモニタリングし、増幅産物（シグナル）が一定水準に達するまでのサイクル数を測定し、標準試料を用いて作成された検量線を参照して、元の生体試料中の標的遺伝子のコピー数を推定する。リアルタイムPCR法の具体例としては、蛍光標識されたプローブを用いる蛍光プローブ法（例えばTaqMan法、モレキュラービーコン法、サイクリングプローブ法）や、二本鎖DNAに結合することで蛍光を発する試薬を用いるインターカレーター法が挙げられ、本発明ではどちらを用いることもできる。

[0030] qPCR法のもう一つの代表的な実施形態として「ddPCR法」（デジタルドロップレットPCR法）が挙げられる。ddPCR法は、微小区画（ウェル）中に標的遺伝子が0または1（もしくは複数）含まれるよう、生体試料を限界希釈した後にPCRを行い、全微小区画数に対する、増幅シグナルがネガティブとなった（標的遺伝子を含んでいなかった）微小区画数の割合から、生体試料中の標的遺伝子の絶対的なコピー数を推定する。この推定

の際には、複数の標的遺伝子を含んでいる微小区画が存在する可能性があることについて、ポアソン分布を用いて補正される。ddPCR法においては、検量線の作成は不要である。ddPCR法における増幅シグナルは、リアルタイムPCR法について例示したのと同様の蛍光プローブ法などに基づくものとすることができる。

[0031] qPCR法（リアルタイムPCR法、ddPCR法など）を実施するための基本的な試薬、キット、システム等も市販されており、本発明においてもそれらを用いることができる。本発明のqPCR法を実施するために必要な、標的遺伝子用および外因性DNA用それぞれの、プライマー（フォワードプライマーおよびリバースプライマー）や蛍光プローブ法を採用する場合に用いられるプローブの、塩基配列や塩基長は、標的遺伝子および外因性DNAそれぞれを特異的に増幅させることができるよう（他の遺伝子と交叉しないよう）、当業者であれば適切に設計することができる。プローブおよびプライマーは、標的配列に対して完全に相補的な配列であってもよいし、一部にミスマッチを含む配列であってもよいし、それらの配列に対して高ストリンジエンシー（ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件）でハイブリダイズ可能な範囲の相同性を有する塩基配列であってもよい。

[0032] 蛍光プローブ法を採用する場合に用いられる蛍光物質や、それとFRETペアをなすクエンチャーは、特に限定されるものではなく、当業者であれば適切に選択することができる。

[0033] 本発明のqPCR法は、生体試料に、標的遺伝子の測定量を補正するための外部標準としての、標的遺伝子と交叉しない所定量の外因性DNAを添加する工程を含み、それ以外の工程、例えば、検体からの生体試料の調製工程、ヒト細胞等からのDNAの抽出工程、PCRによる核酸増幅工程（熱変性、プライマーのアニーリング、プローブのハイブリダイゼーション、伸長反応等）などは、一般的なqPCR法と同様のものとすることができる。

[0034] qPCR法の代表例の一つであるリアルタイムPCR法では、反応生成物（合成され増幅したDNA）の量が一定量に達する、すなわち蛍光物質から

発せられる蛍光強度によって描かれる増幅曲線が所定の閾値（スレッシュホールド）と交差するまでの、PCR反応のサイクル数（Ct値）を測定し、初期の生体試料に含まれていた標的遺伝子のコピー数（濃度）が反映されている測定値として用いる。Ct値が大きいほど、当初のDNAのコピー数（濃度）は低い関係にある。PCRにおいてDNAは指数関数的に増加するので、2つのCt値の差は、対数の差、すなわち当初のDNAのコピー数の比（指数）と関連する。

[0035] 従来の典型的なリアルタイムPCR法では、内部標準とするgDNAについてのCt値によって、標的遺伝子の測定値（Ct値）および最終的な測定量（コピー数）を補正していた。すなわち、以下の[B1]～[B3]の操作が行われていた：

[B1] 内部標準とするgDNAについてCt値を測定し、標的遺伝子のCt値と内部標準のCt値との差（ $\Delta Ct(i)$ ）を算出することで、当初の測定値（Ct）を補正する；

[B2] 一方で、標的遺伝子のコピー数（濃度）が既知の複数の標準試料についてもCt値を測定し、内部標準のCt値との差（ $\Delta Ct(i_s)$ ）を算出し、複数の $\Delta Ct(i_s)$ とそれぞれに対応する既知の標的遺伝子のコピー数との関係に基づく検量線を作成する；

[B3] その検量線を参照することにより、補正された測定値（ $\Delta Ct(i)$ ）を換算し、初期の生体試料に含まれていた標的遺伝子のコピー数の、補正された測定量を求める。最終的な測定量は、例えば「コピー数/ $\mu\text{g}$  gDNA」の単位で表される。

[0036] これに対して本発明の典型的なリアルタイムPCR法では、外部標準とする外因性DNAについてのCt値によって、標的遺伝子の測定値（Ct値）および最終的な測定量（コピー数）を補正する。すなわち、以下の[A1]～[A3]の操作が行われていた：

[A1] 外部標準とする外因性DNAについてCt値を測定し、標的遺伝子のCt値と外部標準のCt値との差（ $\Delta Ct(o)$ ）を算出することで、当初の

測定値 ( $C_t$ ) を補正する；

[A2] 一方で、標的遺伝子のコピー数（濃度）が既知の複数の標準試料についても  $C_t$  値を測定し、外部標準の  $C_t$  値との差 ( $\Delta C_t(o_s)$ ) を算出し、複数の  $\Delta C_t(o_s)$  とそれぞれに対応する既知の標的遺伝子のコピー数との関係に基づき検量線を作成する；

[A3] その検量線を参照することにより、補正された測定値 ( $\Delta C_t(o)$ ) を換算し、初期の生体試料に含まれていた標的遺伝子のコピー数の、補正された測定量を求める。最終的な測定量は、生体試料の単位量（重量）あたりのコピー数で、例えば「コピー/ $\mu\text{g}$  血液」などの単位で表すことができる。

[0037] ただし、本発明による、 $q\text{PCR}$ 法における外因性DNAを用いた標的遺伝子の測定量の補正の仕方は、上記のようなリアルタイムPCR法における  $\Delta C_t$  についての補正に限定されるものではない。標的遺伝子について測定された定量値そのものを用いるよりも正確に生体試料中の標的遺伝子のコピー数を定量することができれば、その他の仕方で、例えば  $dd\text{PCR}$ 法においても、外因性DNAを外部標準として用いて補正することが可能である。

[0038] 例えば、外因性DNAについて、リアルタイムPCR法において  $C_t$  値を測定して検量線から生体試料中のコピー数に換算した結果、または  $dd\text{PCR}$ 法において生体試料中のコピー数を直接測定した結果と、実際に生体試料に添加した外因性DNAのコピー数とを対比して、両者が一致しているかを確認する、言い換えれば「回収率」（%、 $(\text{測定量}/\text{実際の添加量}) \times 100$ ）を求めることが考えられる。回収率が100%からどの程度ずれているかに応じて、必要であれば、リアルタイムPCR法または  $dd\text{PCR}$ 法等で測定した標的遺伝子の測定量をさらに補正する（ $100/\text{回収率}$ を乗じる）ことができる。このようなさらなる補正は、前述したリアルタイムPCR法における  $\Delta C_t$  に関する補正と、組み合わせて行うことも可能である。

[0039] キット

本発明による  $q\text{PCR}$ 用キットは、標的遺伝子の測定量を補正するための

外部標準としての、標的遺伝子と交叉しない所定量の外因性DNAを含み、それ以外の構成部材（例えば、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ、その他のqPCR法を実施する上で必要な試薬、器具等）は、従来のqPCR用キットと同様のものを含むことができる。プライマーおよびプローブは、標的遺伝子および外因性遺伝子に応じて、別途用意すればよい。

## 実施例

[0040] 以下の実施例および比較例で用いた、イヌゲノムDNA特異的遺伝子（MC1R）用のプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマー；標的遺伝子1（CAR-T細胞作製用の導入遺伝子1）用のプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマー；ならびに標的遺伝子2（CAR-T細胞作製用の導入遺伝子2）用のプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれの塩基配列は、下記の通りである。なお、標的遺伝子用1のプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーと、イヌゲノムDNA特異的遺伝子（MC1R）用のプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーとが、互いに交叉しない塩基配列を有するものであること；ならびに標的遺伝子用2のプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーと、イヌゲノムDNA特異的遺伝子（MC1R）用のプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーとが、互いに交叉しない塩基配列を有するものであることは、確認済みである。

MC1R用プローブ（配列番号1）

5' - GCCTTGGCTGCGCAGGCTGCTGTGGTGCAG -3'

MC1R用フォワードプライマー（配列番号2）

5' - CGCCCATGTATTACTTCATCTGTTGCC -3'

MC1R用リバースプライマー（配列番号3）

5' - CACGGCGATGGCGCCCAGGAA -3'

標的遺伝子1用プローブ（配列番号4）

5' - CGACTACAGGGCCTACT -3'

標的遺伝子1用フォワードプライマー（配列番号5）

5' - GGAGCTGAGGTCCCTGAGAAG -3'

標的遺伝子1リバースプライマー（配列番号6）

5' - CCTGGCCCCAGTAGTCGAA -3'

標的遺伝子2用プローブ（配列番号7）

5' - CTGAGGAGCGAGGATG -3'

標的遺伝子2用フォワードプライマー（配列番号8）

5' - CCGGAGTGCTGCTGATCAG -3'

標的遺伝子2リバースプライマー（配列番号9）

5' - GCTGTGCCAGATCATGCAGTA -3'

[0041] [実施例1 / 比較例1] 血液中標的遺伝子濃度（生体試料の単位量あたりのコピー数）の定量における外部標準遺伝子の有用性検討

[0042] 本実施例および本比較例に関する記載における「標的遺伝子」は「標的遺伝子1」を指す。30  $\mu$ Lの免疫不全マウス血液を検体とし、そこに、標的遺伝子を含むプラスミドを50、100、200、600、2,000、6,000、20,000、60,000、200,000、600,000、および2,000,000copies/ $\mu$ L bloodとなるように添加したサンプルを調製し、検量線サンプル（標準液）として用いた。別途、標的遺伝子を含むプラスミドを50、100、200、600、4,000、40,000、400,000、および2,000,000copies/ $\mu$ L bloodとなるように添加したサンプルを調製し、Quality control sample (QCサンプル)として用いた。これら全てのサンプルのそれぞれに、イヌゲノムDNA (Zyagen社)を外部標準遺伝子として1,200 ng添加した。これらのサンプルのそれぞれから、市販のDNA抽出試薬 (QIAamp DNA Blood Midi Kits、QIAGEN社)を用いてゲノムDNAを抽出した後、標的遺伝子およびイヌゲノムDNA特異的遺伝子 (MC1R) それぞれに対するプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いてqPCR定量を行った。qPCRは、QuantStudio 7 Flex リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific社)を用いて、95°C10分/ (95°C15秒および60°C1分)を1サイクルとする条件で40サイクル行った。

- [0043] 標的遺伝子の検量線サンプルの各濃度（コピー数）における標的遺伝子増幅曲線がThresholdと交差するときのPCRサイクル数（Ct値）と各サンプルのイヌゲノムDNAの増幅曲線に対するCt値との差（Delta Ct）と、各検量線サンプルの濃度から検量線を作成した（図1A）。標的遺伝子のコピー数が50から2,000,000 copies/ $\mu$ L bloodの範囲において、検量線の直線性が認められた。
- [0044] また、標的遺伝子のCt値と各検量線サンプルの濃度から検量線を作成した結果、標的遺伝子のコピー数が50から2,000,000 copies/ $\mu$ L bloodの範囲において、検量線の直線性が認められた（図1B）。
- [0045] Delta CtおよびCt値の検量線を用い、QCサンプル中の標的遺伝子コピー数を算出した結果を、それぞれ表1AおよびBに示す。Delta Ctの検量線によって算出された値（Observed）の真度の平均値（Accuracy, Mean）は83.0-108.1%、確度（coefficient of variation, C.V.）は2.4-17.5%と良好であったが、Ctの検量線によって算出された値の真度の平均値は46.9-92.7%、確度は5.0-26.6%であり、外部標準遺伝子を用いたDelta Ct（実施例1）の検量線による結果と比較し、Ctの検量線（比較例1）を用いた方法の定量性は低かった。以上の結果より、生体試料の単位量あたりのコピー数の定量において、外部標準遺伝子によるサンプル間の標的遺伝子コピー数の補正は有用であると考察された。
- [0046]

[表1A]

Nominal (copies/ $\mu$ L Blood)	Observed (copies/ $\mu$ L Blood)	Accuracy (%)	Mean	C.V. (%)
2000000	1837898	91.9	87.2	4.7
2000000	1716677	85.8		
2000000	1712160	85.6		
2000000	1637850	81.9		
2000000	1815645	90.8		
400000	327737	81.9	83.0	7.9
400000	297474	74.4		
400000	334024	83.5		
400000	329580	82.4		
400000	370692	92.7		
40000	35388	88.5	86.4	2.4
40000	35446	88.6		
40000	33644	84.1		
40000	34405	86.0		
40000	33856	84.6		
4000	3636	90.9	87.7	3.3
4000	3336	83.4		
4000	3591	89.8		
4000	3471	86.8		
4000	3509	87.7		
600	608	101.3	105.6	7.2
600	627	104.5		
600	703	117.2		
600	647	107.8		
600	582	96.9		
200	198	98.9	91.9	10.2
200	161	80.3		
200	185	92.4		
200	170	84.9		
200	206	102.8		
100	91	91.0	108.1	10.2
100	107	107.1		
100	117	116.5		
100	107	106.6		
100	119	119.2		
50	60	119.9	103.6	17.5
50	43	86.3		
50	49	97.9		
50	44	88.3		
50	63	125.7		

[0047]

[表1B]

Nominal (copies/ $\mu$ L Blood)	Observed (copies/ $\mu$ L Blood)	Accuracy (%)	Mean	C.V. (%)
2000000	1084625	54.2	69.6	14.3
2000000	1500596	75.0		
2000000	1617055	80.9		
2000000	1365305	68.3		
2000000	1394588	69.7		
400000	272936	68.2	78.1	10.0
400000	354987	88.7		
400000	313298	78.3		
400000	294181	73.5		
400000	325891	81.5		
40000	32609	81.5	79.3	21.6
40000	40853	102.1		
40000	35082	87.7		
40000	26104	65.3		
40000	23962	59.9		
4000	3510	87.8	84.2	5.0
4000	3561	89.0		
4000	3299	82.5		
4000	3156	78.9		
4000	3305	82.6		
600	581	96.8	92.7	18.1
600	583	97.2		
600	626	104.3		
600	613	102.1		
600	379	63.2		
200	107	53.3	46.9	11.8
200	79	39.5		
200	102	51.1		
200	88	43.8		
200	93	46.7		
100	51	51.1	64.6	22.6
100	62	62.3		
100	89	89.4		
100	58	57.8		
100	62	62.2		
50	38	76.0	59.4	26.6
50	17	33.6		
50	32	64.5		
50	33	65.1		
50	29	57.8		

[0048] [実施例2] ヒト血液中での外部標準遺伝子を用いた標的遺伝子濃度（生体試料の単位量あたりのコピー数）の定量

[0049] 本実施例に関する記載における「標的遺伝子」は「標的遺伝子1」を指す。1.8 mLの複数人の血液を混ぜ合わせたプールヒト血液を検体とし、そこに、標的遺伝子を含むプラスミドを600、2,000、6,000、20,000、60,000、200,000、2,000,000、および20,000,000コピー分添加したサンプルを調製し、検

量線サンプル（標準液）として用いた。別途、8ドナーそれぞれの血液1.8 mLに標的遺伝子を含むプラスミドを2,000コピー添加したサンプルを調製し、QCサンプルとして用いた。これら全てのサンプルのそれぞれに、イヌゲノムDNA（Zyagen社）を外部標準遺伝子として1,000 ng添加した。これらのサンプルのそれぞれから、市販のDNA抽出試薬（QIAamp DNA Blood Midi Kits、QIAGEN社）を用いてゲノムDNAを抽出した後、標的遺伝子およびイヌゲノムDNA特異的遺伝子（MC1R）に対するプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いてqPCR定量を行った。qPCRは、QuantStudio 7 FlexリアルタイムPCRシステム（Thermo Fisher Scientific社）を用いて、95°C10分 / (95°C15秒および60°C1分) を1サイクルとする条件で40サイクル行った。

[0050] 標的遺伝子のCt値とイヌゲノムDNAのCt値との差 (Delta Ct) と各検量線サンプルの標的遺伝子添加濃度から検量線を作成した (図2A)。標的遺伝子のコピー数が0.33から11,111 copies/ $\mu$ L bloodの範囲において、検量線の直線性が認められたことから、本方法により生体試料の単位量あたりのコピー数を定量的に測定できると考えられる。

[0051] この検量線を用い、8ドナーそれぞれの血液から調製したQCサンプル中の標的遺伝子コピー数を算出した結果を図2D（右側）に示す。いずれのドナーからのQCサンプルにおいても、添加濃度 (Nominal) に対しする算出された値 (Observed) の真度 (Accuracy) は87.2-114.9%、確度 (coefficient of variation, C.V.) は9.8%と良好であり、本方法の優れた定量性が示された。

[0052] [比較例2] ヒト血液中での内部標準遺伝子を用いた標的遺伝子濃度（生体試料の単位量あたりのコピー数）の定量

[0053] 本比較例に関する記載における「標的遺伝子」は「標的遺伝子1」を指す。qPCRを用いた遺伝子コピー数の定量には、一般的に、内部標準遺伝子によるサンプル間の標的遺伝子コピー数の補正（標的遺伝子のCtから内部標準遺伝子のCtを差し引くことで、サンプル間の標的遺伝子コピー数を補正する方法）が行われる。そこで、内部標準遺伝子としてRNasePを選択し、実施例2

の全てのDNA抽出液に対し、ヒトRNasePに対するプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマー (TaqMan RNase P Control Reagents Kit、Thermo Fisher Scientific社) を用いてqPCR定量を行った。qPCRは、QuantStudio 7 Flex リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific社) を用いて、95°C20秒/ (95°C1秒および60°C20秒) を1サイクルとする条件で40サイクル行った。

[0054] 標的遺伝子のCt値とRNasePのCt値との差 (Delta Ct) と各検量線サンプルの濃度から検量線を作成した (図2B)。標的遺伝子のコピー数が0.33から11,111 copies/ $\mu$ L bloodの範囲において、検量線の直線性が認められた。

[0055] 一方、8ドナーそれぞれのQCサンプル中の標的遺伝子コピー数を算出したところ、真度 (Accuracy) は73.4-159.9%、確度 (coefficient of variation, C.V.) は26.7%と、実施例2と比較し、定量性は低い結果となった (図2D (左側))。DNA抽出液中のDNA濃度を260 nmの吸光度法 (Cytation5、BioTek社) を用いて測定し、真度との相関性について検討したところ、有意な負の相関性が認められたことから、ドナー間のDNA濃度の違いにより、内部標準遺伝子に対する相対的な標的遺伝子濃度が変動することが示唆された (図2C)。これらの結果から、実施例2のように外部標準遺伝子を用いた定量の優位性が示された。

[0056] [実施例3] ヒト血液および緩衝溶液中での遺伝子改変T細胞由来標的遺伝子濃度 (生体試料の単位量あたりのコピー数) の定量

[0057] 本実施例および本比較例に関する記載における「標的遺伝子」は「標的遺伝子1」を指す。0.5 mLのヒト血液、白血球を市販の白血球除去フィルター (PLASMODIPUR、EuroProxima社) で除去したヒト血液、および緩衝溶液を検体とし、そこに4,000、40,000、400,000、および4,000,000細胞のヒト遺伝子改変T細胞をそれぞれ添加したサンプルを調製した。なお、上記のヒト遺伝子改変T細胞は、標的遺伝子を含むCAR遺伝子を、レトロウイルスベクターにより活性化したT細胞に導入することで作製したものである。別途、検量線サンプル (標準液) として、標的遺伝子を含むプラスミドを0.5 mLのヒト血液に

、375、625、1,250、3,750、12,500、37,500、125,000、1,250,000、12,500,000、および125,000,000コピー分添加したサンプルを調製した。これら全てのサンプルのそれぞれに、イヌゲノムDNA (Zyagen社) を2,000 ng/mLとなるように添加した。これらのサンプルのそれぞれから、市販のDNA抽出試薬 (QIAamp DNA Blood Midi Kits、QIAGEN社) を用いてゲノムDNAを抽出した後、標的遺伝子およびイヌゲノムDNAに対するプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いてqPCR定量を行った。qPCRは、QuantStudio 7 Flex リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific社) を用いて、95°C10分/ (95°C15秒および60°C1分) を1サイクルとする条件で40サイクル行った。

[0058] 標的遺伝子のCt値とイヌゲノムDNAのCt値との差 (Delta Ct) と各検量線サンプルの標的遺伝子添加濃度から検量線を作成し、遺伝子改変T細胞を添加したサンプル中の標的遺伝子濃度を測定した結果を図3Aに示す。いずれの検体においても、添加細胞数に比例した標的遺伝子のコピー数の増加が確認できた。また、本方法によって導き出させた標的遺伝子のコピー数は、検体の種類に関わらず同等であった。これらの結果から、本方法によって、遺伝子改変T細胞の生体内での増減による生体試料の単位量あたりの標的遺伝子コピー数の変動を定量的に測定可能であると考えられる。

[0059] [比較例3] DNA抽出液中のゲノムDNA量に対する相対的標的遺伝子コピー数の定量

[0060] 本実施例および本比較例に関する記載における「標的遺伝子」は「標的遺伝子1」を指す。遺伝子治療における標的遺伝子の定量に用いられる単位として、一般的に、ゲノムDNA量に対する標的遺伝子コピー数の割合が用いられる。そこで、実施例3で調製した遺伝子改変T細胞添加サンプルから抽出したDNA抽出液中のヒトゲノムDNAおよび標的遺伝子コピー数を測定し、ゲノムDNA量に対する標的遺伝子コピー数の割合を算出した。

[0061] 1.5、5、15、25、50、150、500、1,500、5,000、50,000、500,000、および5,000,000copies/ $\mu$ Lとなるように、DNA抽出試薬の抽出液AEに、標的遺伝

子を含むプラスミドを添加したサンプルを調製し、標的遺伝子の検量線サンプル（標準液）として用いた。また、別途、ヒトゲノムDNA（Promega社）を、AEに、5.625、56.25、562.5、5,625、56,250、112,500および225,000 pg/ $\mu$ Lとなるように添加したサンプルを調製し、ヒトゲノムDNAの含有量を測定するための検量線サンプル（標準液）として用いた。上記検量線サンプルおよび実施例3で調製した遺伝子改変T細胞添加サンプルのDNA抽出液に対し、標的遺伝子およびヒトゲノムDNA特異的な遺伝子配列（RNaseP）に対するプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いてqPCR定量を行った。qPCRは、QuantStudio 7 Flex リアルタイムPCRシステムを用いた。標的遺伝子に対するqPCR測定では、95°C10分/（95°C15秒および60°C1分）を1サイクルとする条件で40サイクル行った。ヒトゲノムDNAに対するqPCR測定では、95°C20秒/（95°C1秒および60°C20秒）を1サイクルとする条件で40サイクル行った。

[0062] 標的遺伝子の検量線サンプルの各濃度（コピー数）における標的遺伝子増幅曲線のCt値と各検量線サンプルの濃度から検量線を作成し、遺伝子改変T細胞添加サンプルのDNA抽出液中の標的遺伝子コピー数を算出した。また、ヒトゲノムDNAの検量線サンプルの各濃度（ヒトゲノムDNA量）における標的遺伝子増幅曲線のCt値と各検量線サンプルの濃度から検量線を作成し、遺伝子改変T細胞添加サンプルのDNA抽出液中のヒトゲノムDNA量を算出した。これらの結果から、遺伝子改変T細胞添加サンプルのDNA抽出液中のヒトゲノムDNA量に対する標的遺伝子コピー数の割合を計算し、添加細胞数と比較した結果を図3Bに示す。ヒト血液に遺伝子改変T細胞を添加したサンプルでは、添加細胞数に応じた標的遺伝子のコピー数の増加が確認できたが、白血球を除去したヒト血液および緩衝液サンプルでは、添加細胞数に応じた標的遺伝子のコピー数の増加は明確には認められなかった。遺伝子改変T細胞を添加した際、標的遺伝子コピー数の増加に伴い、遺伝子改変T細胞由来のヒトゲノムDNAが増加するため、ヒトゲノムDNAの含有量が未処理のヒト血液と比較し顕著に低い白血球を除去したヒト血液および緩衝液では、添加細胞数に応じた標的遺伝

子のコピー数の増加が認められなかったと考えられる。このように、ゲノムDNA量に対する標的遺伝子コピー数の割合を標的遺伝子コピー数の定量の単位として用いた場合、検体に含まれるゲノム量により、遺伝子改変T細胞の生体内での増減に対する標的遺伝子コピー数の変動が影響されうるため、遺伝子改変T細胞の生体内での増減に対する標的遺伝子コピー数の変動を、検体の種類によらず定量的に検討するには、実施例2に示したように、生体試料の単位量あたりのコピー数を測定した方が望ましいと考えられる。特に、化学療法等により血液中のゲノムDNA量が変動する場合には、本方法はより効果的な測定法であると思われる。

[0063] [実施例4] 外部標準遺伝子を用いた補正を行う、ヒト血液中の標的遺伝子の定量

本実施例に関する記載における「標的遺伝子」は「標的遺伝子1」を指す。複数人から0.5 mLずつ採取した血液を混ぜ合わせたプールヒト血液を検体とし、そこに、標的遺伝子を含むプラスミドを0.75、1.3、2.5、7.5、25、75、250、2,500、25,000および250,000 copies/ $\mu$ L blood の濃度で添加したサンプルを調製し、検量線サンプル（標準液）として用いた。また、同様のプールヒト血液検体に、標的遺伝子を含むプラスミドを7.5、200および200,000 copies/ $\mu$ L blood の濃度で添加したサンプルを調製し、QCサンプルとして用いた。これら全てのサンプルのそれぞれに、イヌゲノムDNA（Zyagen社）を外部標準遺伝子として1,000 ng添加した。これらのサンプルのそれぞれから、市販のDNA抽出試薬（QIAamp DNA Blood Midi Kits、QIAGEN社）を用いてゲノムDNAを抽出した後、標的遺伝子およびイヌゲノムDNA特異的遺伝子（MC1R）に対するプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いてqPCR定量を行った。qPCRは、QuantStudio 7 Flex リアルタイムPCRシステム（Thermo Fisher Scientific社）を用いて、95°C10分/（95°C15秒および60°C1分）を1サイクルとする条件で40サイクル行った。

[0064] 標的遺伝子のCt値とイヌゲノムDNAのCt値との差（Delta Ct）と各検量線サンプルの標的遺伝子添加濃度から検量線を作成した。作成された検量線を用

いて、QCサンプル中の標的遺伝子コピー数を測定し、Relative error (=1 - 真度) および確度を算出した。標的遺伝子コピー数を測定は3回、それぞれ異なる日に行った。結果を表2に示す。外部標準遺伝子を用いて補正を行う、本発明の定量方法のロバストネスが確認できる。

[0065]

[表2]

Nominal concentration (copies/ $\mu$ L blood)	1 <sup>st</sup> day			2 <sup>nd</sup> day			3 <sup>rd</sup> day		
	Mean observed concentration (copies/ $\mu$ L blood)	Relative error (%)	Coefficient of variation (%)	Mean observed concentration (copies/ $\mu$ L blood)	Relative error (%)	Coefficient of variation (%)	Mean observed concentration (copies/ $\mu$ L blood)	Relative error (%)	Coefficient of variation (%)
200,000	218,066.2	9.0	5.4	196,127.5	-1.9	6.9	190,866.7	-4.6	9.0
2,000	1,895.1	-5.2	10.3	1,803.6	-9.8	7.4	1,852.4	-7.4	8.1
7.5	8.1	7.4	7.0	8.2	9.4	4.4	7.3	-2.7	5.7
Slope	-3.35			-3.39			-3.33		
Intercept	8.35			8.25			8.37		
PCR efficiency (%)	98.8			97.2			99.5		
R <sup>2</sup>	1.000			0.999			1.000		

[0066] [実施例5] 外部標準遺伝子を用いた補正を行う、マウス血液中の標的遺伝子の定量

本実施例に関する記載における「標的遺伝子」は「標的遺伝子1」を指す

。30  $\mu\text{L}$ の免疫不全マウス血液を検体とし、そこに、標的遺伝子を含むプラスミドを50、200、600、2,000、6,000、20,000、60,000、200,000および2,500,000 copies/ $\mu\text{L}$  bloodとなるように添加したサンプルを調製し、検量線サンプル（標準液）として用いた。別途、標的遺伝子を含むプラスミドを50、100、200、600、4,000、40,000、400,000、および2,000,000 copies/ $\mu\text{L}$  bloodとなるように添加したサンプルを調製し、Quality control sample（QCサンプル）として用いた。これら全てのサンプルのそれぞれに、イヌゲノムDNA（Zyagen社）を外部標準遺伝子として1,200 ng添加した。これらのサンプルのそれぞれから、市販のDNA抽出試薬（QIAamp DNA Blood Midi Kits、QIAGEN社）を用いてゲノムDNAを抽出した後、標的遺伝子およびイヌゲノムDNA特異的遺伝子（MC1R）それぞれに対するプローブ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いてqPCR定量を行った。qPCRは、QuantStudio 7 Flex リアルタイムPCRシステム（Thermo Fisher Scientific社）を用いて、95°C 10分/（95°C 15秒および60°C 1分）を1サイクルとする条件で40サイクル行った。

[0067] 標的遺伝子の検量線サンプルの各濃度（コピー数）における標的遺伝子増幅曲線がThresholdと交差するときのPCRサイクル数（Ct値）と各サンプルのイヌゲノムDNAの増幅曲線に対するCt値との差（Delta Ct）と、各検量線サンプルの濃度から検量線を作成した。作成された検量線を用いて、QCサンプル中の標的遺伝子コピー数を測定し、Relative error（=1-真度）および確度を算出した。標的遺伝子コピー数を測定は3回、それぞれ異なる日に行った。結果を表3に示す。マウス血液を用いた場合は、ヒト血液を用いた場合（実施例4）よりも、遺伝子の抽出効率が低いことが示唆されているが、そのようなマウス血液を用いる場合（例えば前臨床試験段階）であっても、外部標準遺伝子を用いて補正を行う、本発明の定量方法の有用性が確認できる。

[0068]

[表3]

Nominal concentration (copies/ $\mu$ L blood)	1 <sup>st</sup> day			2 <sup>nd</sup> day			3 <sup>rd</sup> day		
	Mean observed concentration (copies/ $\mu$ L blood)	Relative error (%)	Coefficient of variation (%)	Mean observed concentration (copies/ $\mu$ L blood)	Relative error (%)	Coefficient of variation (%)	Mean observed concentration (copies/ $\mu$ L blood)	Relative error (%)	Coefficient of variation (%)
2,000,000	1,832,000	-8.4	8.8	1,834,000	-8.3	3.7	1,746,000	-12.7	4.8
400,000	360,600	-9.8	4.9	308,000	-23.0	12.4	332,000	-17.0	7.9
40,000	35,240	-11.9	6.1	32,080	-19.8	7.5	34,540	-13.6	2.4
4,000	4,086	2.2	4.0	3,712	-7.2	6.4	3,510	-12.2	3.3
600	665	10.8	8.4	573	-4.6	10.4	633	5.6	7.2
200	233	16.5	3.8	210	4.8	10.3	184	-8.0	10.2
100	117	16.8	13.5	112	12.1	18.1	108	8.2	10.3
50	60	20.3	16.9	53	6.6	19.8	52	3.6	17.5
Slope	-3.49			-3.44			-3.44		
Intercept	14.16			12.71			12.61		
PCR efficiency (%)	93.4			95.3			95.2		
R <sup>2</sup>	0.998			0.999			0.999		

[0069] [実施例 6]

標的遺伝子 1 を含むCAR遺伝子をレトロウイルスベクターにより活性化した T細胞に導入することで作製したヒト遺伝子改変 T細胞 (以下「第 1 ヒト遺伝

子改変T細胞」と呼ぶ。) 、 および標的遺伝子2を含むCAR遺伝子をレトロウイルスベクターにより活性化したT細胞に導入することで作製したヒト遺伝子改変T細胞(以下「第2ヒト遺伝子改変T細胞」と呼ぶ。)をそれぞれ作製した。

[0070] 第1ヒト遺伝子改変T細胞を、 $5 \times 10^6$  CAR+細胞/動物または $10 \times 10^6$  CAR+細胞/動物の用量で、ゼノグラフトマウスに静脈内投与した。投与の1、3、7、10、14、17、21および28日後、マウスの顎下静脈から血液を採取した。また、第2ヒト遺伝子改変T細胞を、 $10 \times 10^6$  CAR+細胞/動物の用量で、ゼノグラフトマウスに静脈内投与した。投与の1、4、8、11、15、22および29日後、マウスの顎下静脈から血液を採取した。

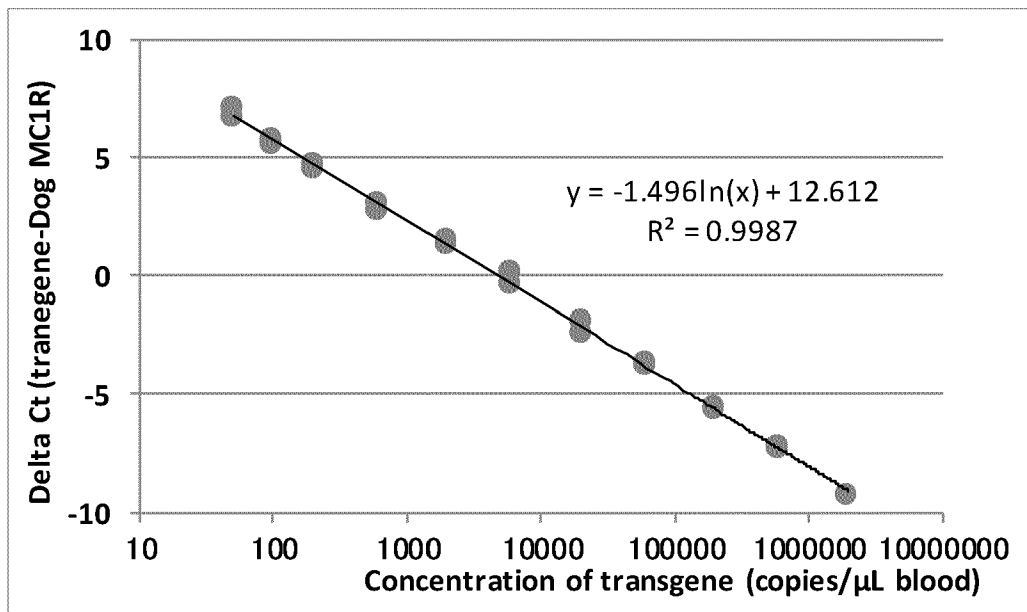
[0071] 上記の各時点(最終日を除く)で採取した血液サンプルを用いて、実施例2および比較例2と同様にして、それぞれ外部標準遺伝子(イヌゲノムDNA)および内部標準遺伝子(RNaseP)を用いて作成した検量線に基づき、実施例2および比較例2と同様の測定方法により、血液サンプル中の標的遺伝子1および2それぞれのコピー数を定量した。結果を図4A、B、CおよびDに示す。第1ヒト遺伝子改変T細胞の血液サンプルについて、標的遺伝子1のコピー数を、内部標準遺伝子を用いた定量方法により第1copies/ $\mu$ g gDNAで表した場合(縦軸)には飽和が認められるのに対し、本発明による外部標準遺伝子を用いた定量方法によりcopies/ $\mu$ L bloodで現した場合(横軸)では飽和は認められない。第2ヒト遺伝子改変T細胞の血液サンプル(図4B)についても、同様の傾向が見られる。また、第2ヒト遺伝子改変T細胞の血液サンプル中の第2ヒト遺伝子改変T細胞の数(横軸、cells/ $\mu$ L blood、フローサイトメトリーにより測定)に対する、標的遺伝子2の導入レベル(コピー数、縦軸)の相関関係は、本発明による外部標準遺伝子を用いた定量方法によりコピー数を $\mu$ L bloodあたりで現した場合(図4D)の方が、内部標準遺伝子を用いた定量方法によりコピー数を $\mu$ g gDNAあたりで表した場合(図4C)よりも明確に現れている。本発明による定量方法は、in vivoにおけるCAR-T細胞の増殖を過小評価するリスクが低い、細胞動態の評価により適し

た方法であると考えられる。

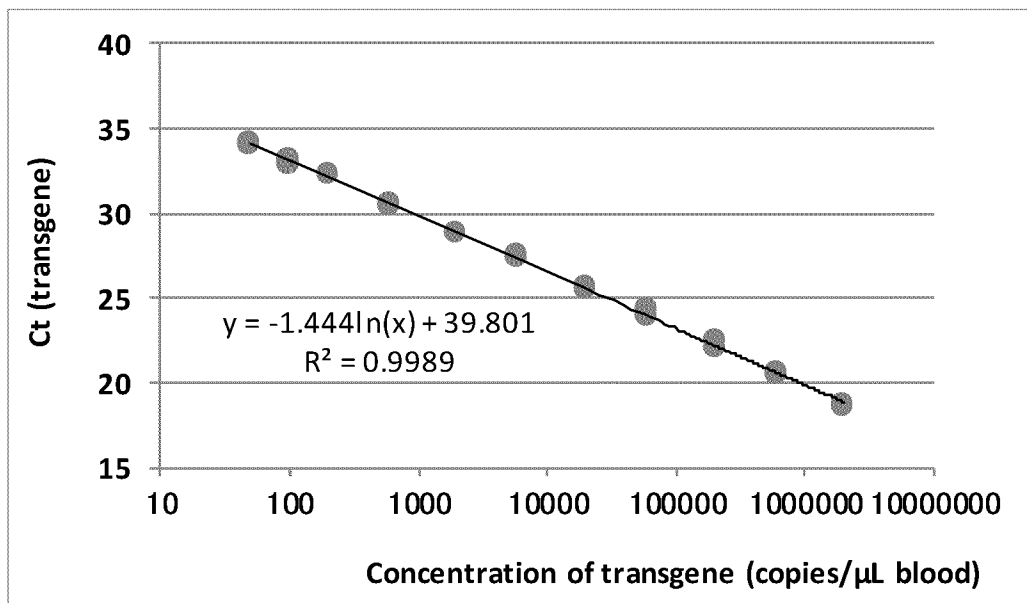
## 請求の範囲

- [請求項1] ヒト細胞に含まれている標的遺伝子の量を測定するための定量的PCR法（qPCR法）であって、  
前記ヒト細胞を含む生体試料に、前記標的遺伝子の測定量を補正するための外部標準としての、前記標的遺伝子と交叉しない所定量の外因性DNAを添加する工程を含む、qPCR法。
- [請求項2] 前記qPCR法がリアルタイムPCR法であって、  
前記標的遺伝子の測定量の補正が、前記標的遺伝子について測定されたCt値と、前記外因性DNAについて測定されたCt値との差（ $\Delta Ct$ ）を求め、その $\Delta Ct$ から前記標的遺伝子の量に換算することを含む、  
請求項1に記載のqPCR法。
- [請求項3] 前記標的遺伝子の測定量の補正が、qPCR法による前記外因性DNAの測定量と、前記生体試料への前記外因性DNAの添加量とを対比して求められる回収率を反映させることを含む、請求項1に記載のqPCR法。
- [請求項4] 前記qPCR法がリアルタイムPCR法であって、前記標的遺伝子の測定量が前記生体試料の単位量あたりのコピー数で表される、請求項1に記載のqPCR法。
- [請求項5] 前記ヒトが、遺伝子改変T細胞を投与された、および／または白血球の減少を引き起こす疾患に罹患したまたは治療法を受けたヒトである、請求項1に記載のqPCR法。
- [請求項6] 標的遺伝子の測定量を補正するための外部標準としての、前記標的遺伝子と交叉しない所定量の外因性DNAを含む、qPCR用キット。

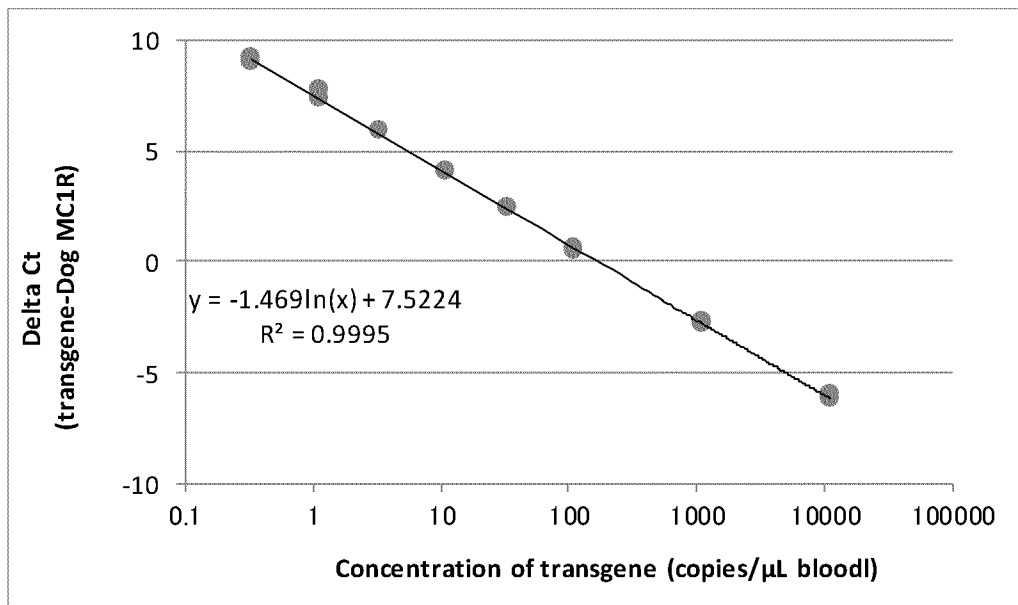
[1A]



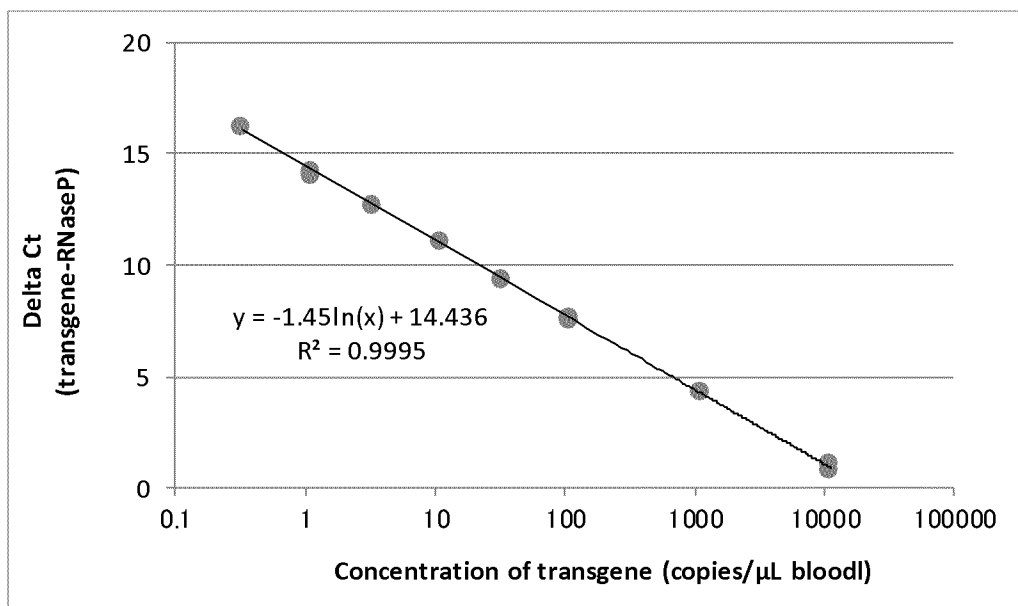
[1B]



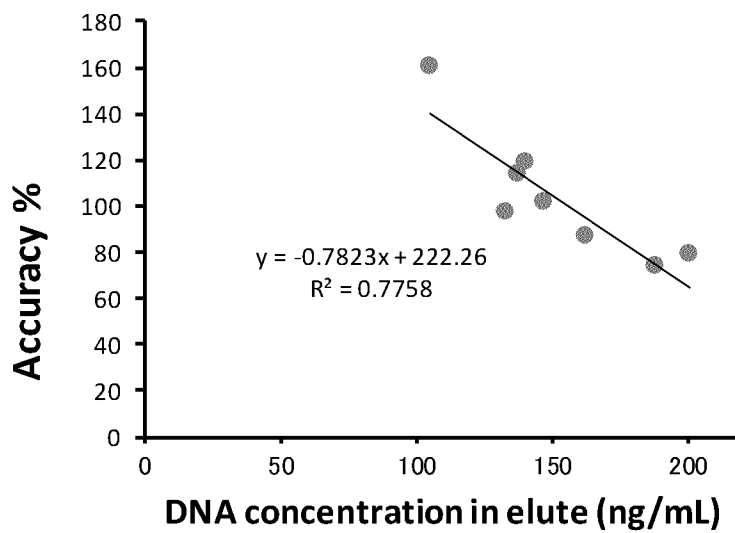
[圖2A]

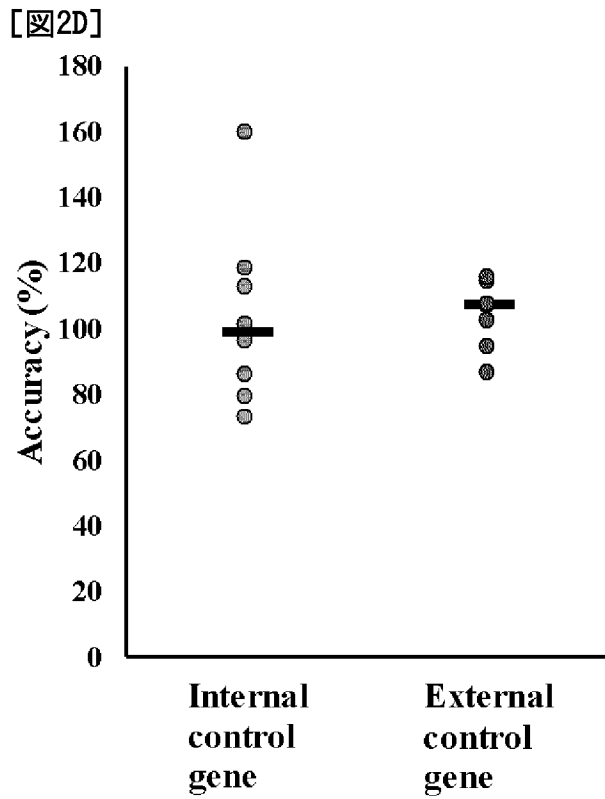


[圖2B]

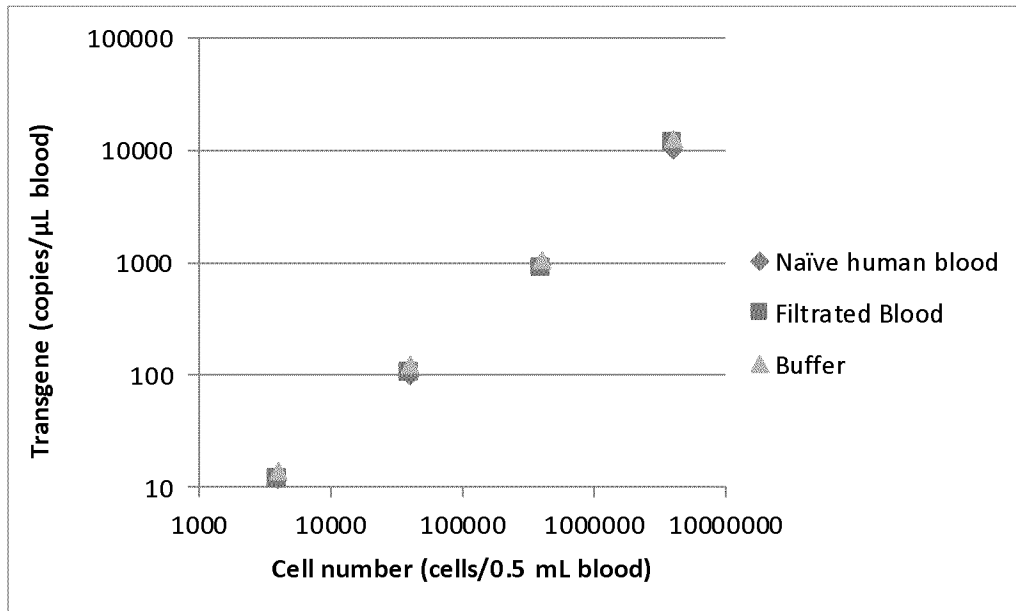


[圖2C]

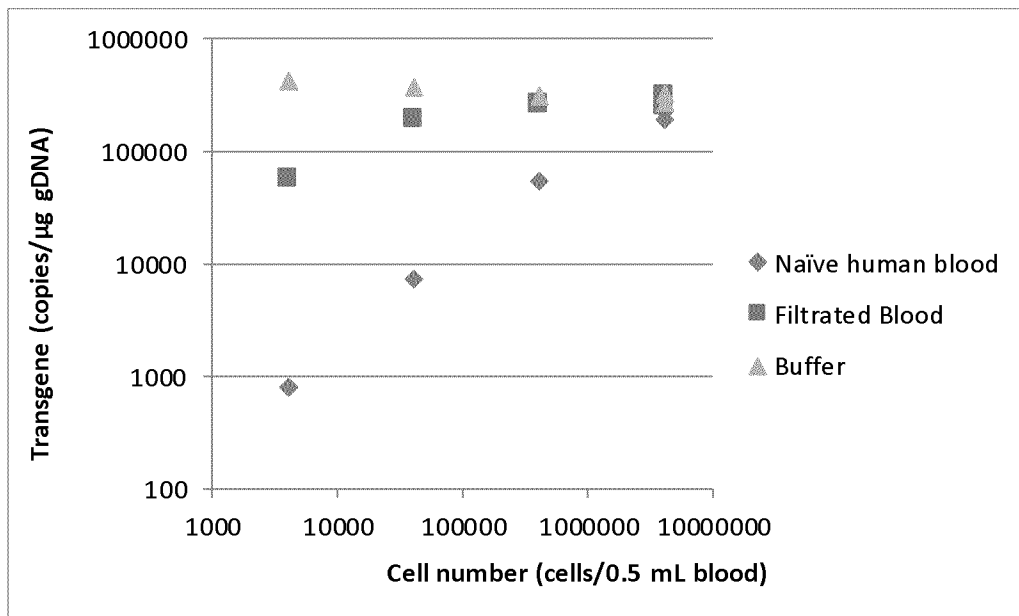




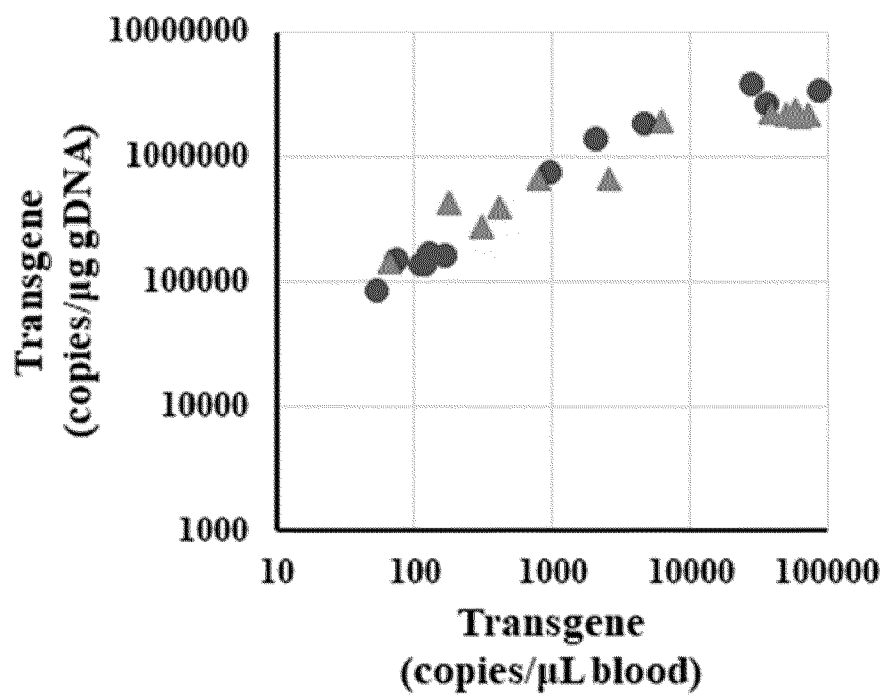
[ 3A]

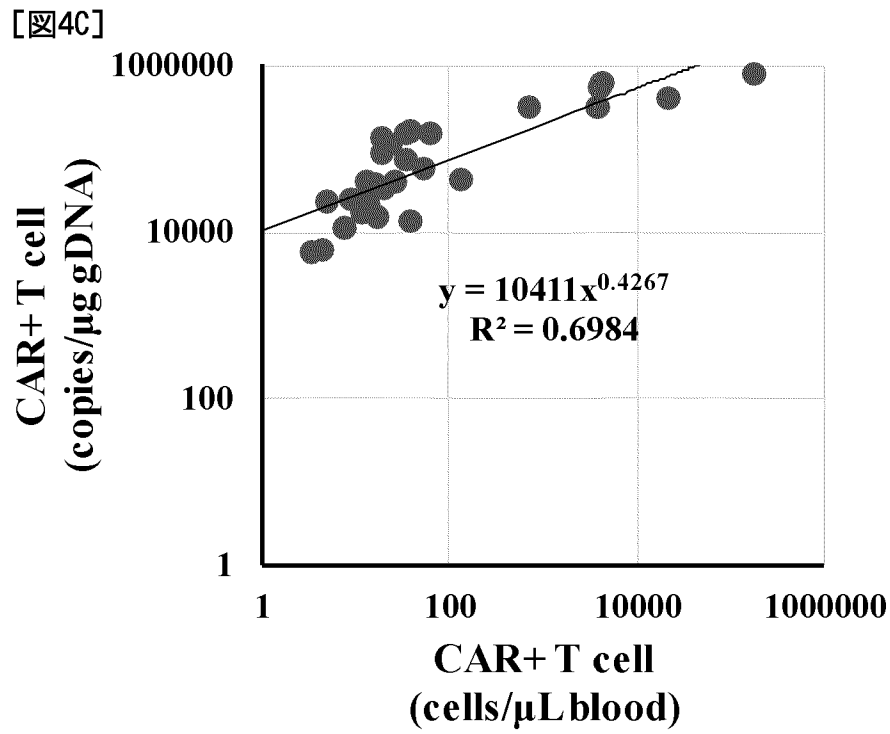
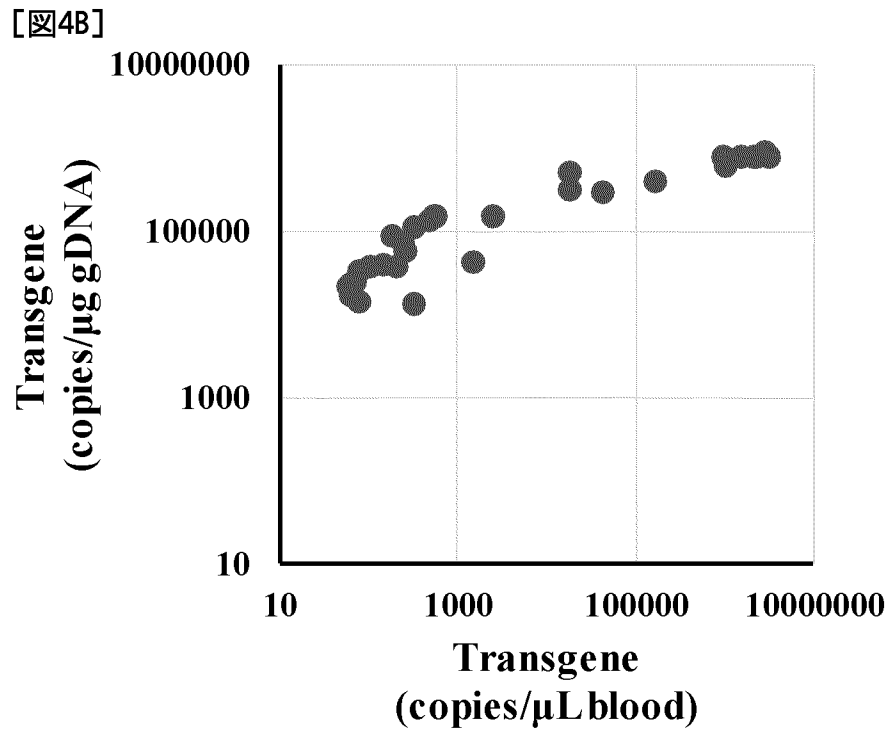


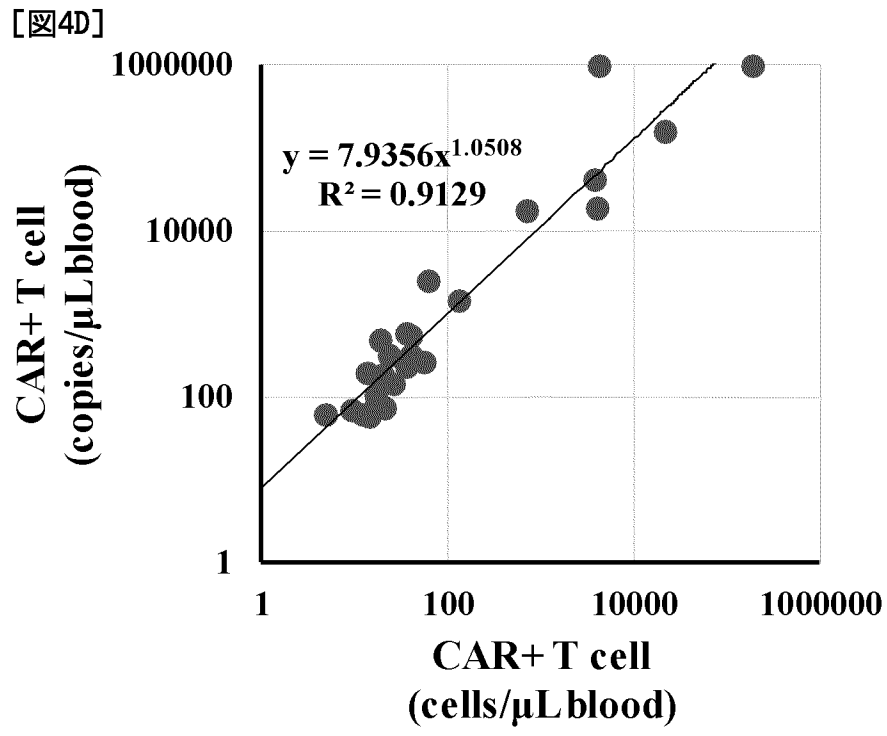
[ 3B]



[ 4A]







## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/036819

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N 5/10 (2006.01)i; C12N 15/10 (2006.01)i; C12N 15/11 (2006.01)i; C12Q 1/6851 (2018.01)i; C12Q 1/686 (2018.01)i FI: C12Q1/6851 Z; C12N5/10; C12N15/10 100Z; C12N15/11 Z; C12Q1/686 Z ZNA According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC													
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/10; C12N15/10; C12N15/11; C12Q1/6851; C12Q1/686 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020 Registered utility model specifications of Japan 1996-2020 Published registered utility model applications of Japan 1994-2020 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)													
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y</td> <td>FU, Jie et al., "Absolute Quantification of Plasmid DNA by Real-time PCR with Genomic DNA as External Standard and Its Application to a Biodistribution Study of an HIV DNA Vaccine", <i>Analytical Sciences</i>, 2009, vol. 25, pp. 675-680, DOI: 10.2116/analsci.25.675 Abstract, Experimental, Results and Discussion, Conclusions, fig. 1-3, table 3</td> <td>1, 4-6 1-6</td> </tr> <tr> <td>X Y</td> <td>YUN, James J. et al., "Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR", <i>Nucleic Acids Research</i>, 2006, vol. 34, no. 12, e85, DOI:10.1093/nar/gkl400 ABSTRACT, "Extraction of RNA and Gdna", "Calculation of gene copy number in gDNA", "Comparison between external standards", DISCUSSION</td> <td>1, 4-6 1-6</td> </tr> <tr> <td>X Y</td> <td>JP 2018-512871 A (KIM, Sung-Chun) 24 May 2018 (2018-05-24) claims, paragraphs [0038], [0041], [0052], [0124], [0235], example 7, fig. 9</td> <td>1-2, 4-6 1-6</td> </tr> </tbody> </table>		Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X Y	FU, Jie et al., "Absolute Quantification of Plasmid DNA by Real-time PCR with Genomic DNA as External Standard and Its Application to a Biodistribution Study of an HIV DNA Vaccine", <i>Analytical Sciences</i> , 2009, vol. 25, pp. 675-680, DOI: 10.2116/analsci.25.675 Abstract, Experimental, Results and Discussion, Conclusions, fig. 1-3, table 3	1, 4-6 1-6	X Y	YUN, James J. et al., "Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR", <i>Nucleic Acids Research</i> , 2006, vol. 34, no. 12, e85, DOI:10.1093/nar/gkl400 ABSTRACT, "Extraction of RNA and Gdna", "Calculation of gene copy number in gDNA", "Comparison between external standards", DISCUSSION	1, 4-6 1-6	X Y	JP 2018-512871 A (KIM, Sung-Chun) 24 May 2018 (2018-05-24) claims, paragraphs [0038], [0041], [0052], [0124], [0235], example 7, fig. 9	1-2, 4-6 1-6
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.											
X Y	FU, Jie et al., "Absolute Quantification of Plasmid DNA by Real-time PCR with Genomic DNA as External Standard and Its Application to a Biodistribution Study of an HIV DNA Vaccine", <i>Analytical Sciences</i> , 2009, vol. 25, pp. 675-680, DOI: 10.2116/analsci.25.675 Abstract, Experimental, Results and Discussion, Conclusions, fig. 1-3, table 3	1, 4-6 1-6											
X Y	YUN, James J. et al., "Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR", <i>Nucleic Acids Research</i> , 2006, vol. 34, no. 12, e85, DOI:10.1093/nar/gkl400 ABSTRACT, "Extraction of RNA and Gdna", "Calculation of gene copy number in gDNA", "Comparison between external standards", DISCUSSION	1, 4-6 1-6											
X Y	JP 2018-512871 A (KIM, Sung-Chun) 24 May 2018 (2018-05-24) claims, paragraphs [0038], [0041], [0052], [0124], [0235], example 7, fig. 9	1-2, 4-6 1-6											
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 01 December 2020 (01.12.2020)		Date of mailing of the international search report 08 December 2020 (08.12.2020)											
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.											

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2020/036819

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 2005-168408 A (EBARA CORPORATION) 30 June 2005 (2005-06-30) claims, paragraph [0003]	1-6

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2020/036819

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2018-512871 A	24 May 2018	US 2018/0094308 A1 claims, paragraphs [0035], [0038], [0049], [120], [0236], example 7, fig. 9 WO 2016/171474 A1 EP 3287530 A1 KR 10-2016-0124703 A CN 107532211 A CA 2989538 A	
JP 2005-168408 A	30 Jun. 2005	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i FI: C12Q1/6851 Z; C12N5/10; C12N15/10 100Z; C12N15/11 Z; C12Q1/686 Z ZNA		
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）） C12N5/10; C12N15/10; C12N15/11; C12Q1/6851; C12Q1/686 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 - 2020年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2020年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2020年 国際調査で利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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS/WPIDS (STN)		
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
X	FU Jie et al., Absolute Quantification of Plasmid DNA by Real-time PCR with Genomic DNA as External Standard and Its Application to a Biodistribution Study of an HIV DNA Vaccine, Analytical Sciences, 2009, Vol.25, p.675-680, DOI:10.2116/analsci.25.675 Abstract, Experimental, Results and Discussion, Conclusions, Fig.1-3, Table3	1,4-6
Y		1-6
X	YUN James J. et al., Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR, Nucleic Acids Research, 2006, Vol.34, No.12, e85, DOI:10.1093/nar/gkl400 ABSTRACT, "Extraction of RNA and gDNA", "Calculation of gene copy number in gDNA", "Comparison between external standards", DISCUSSION	1,4-6
Y		1-6
X	JP 2018-512871 A (キム・ソンチャン) 24.05.2018 (2018 - 05 - 24) 特許請求の範囲, [0038], [0041], [0052], [0124], [0235], 実施例7, 図9	1-2,4-6
Y		1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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抵触するものではなく、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	01.12.2020	国際調査報告の発送日 08.12.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  坂崎 恵美子 4N 9451  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

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	JP 2005-168408 A (株式会社荏原製作所) 30.06.2005 (2005 - 06 - 30) 特許請求の範囲, [0003]	1-6

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/036819

引用文献			公表日	パテントファミリー文献		公表日
JP	2018-512871	A	24.05.2018	US 2018/0094308	A1	
				Claims, [0035], [0038], [0049], [120], [0236], example7, Fig.9		
				WO 2016/171474	A1	
				EP 3287530	A1	
				KR 10-2016-0124703	A	
				CN 107532211	A	
				CA 2989538	A	
<hr/>						
JP	2005-168408	A	30.06.2005	(ファミリーなし)		
<hr/>						