

(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
2024年8月29日(29.08.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/176977 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/6837 (2018.01)
C12M 1/34 (2006.01) C12Q 1/6844 (2018.01)
C12N 15/12 (2006.01)

GROUP HOLDINGS, LTD.) [JP/JP]; 〒1418627
東京都品川区東五反田2丁目18
番1号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/005576

(22) 国際出願日: 2024年2月16日(16.02.2024)

(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 2023-024439 2023年2月20日(20.02.2023) JP

(72) 発明者: 津田 稔也(TSUDA Toshiya); 〒7448611
山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋
鋼鉄株式会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP).
大場 光芳(OHBA Mitsuyoshi); 〒7448611 山口
県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼鉄
株式会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP). 山野
博文(YAMANO Hirofumi); 〒7448611 山口県下
松市東豊井1296番地の1 東洋鋼鉄株式
会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP).

(71) 出願人: 東洋鋼鉄株式会社(TOYO KOHAN CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒1418260 東京都品川区東五反
田二丁目18番1号 Tokyo (JP).

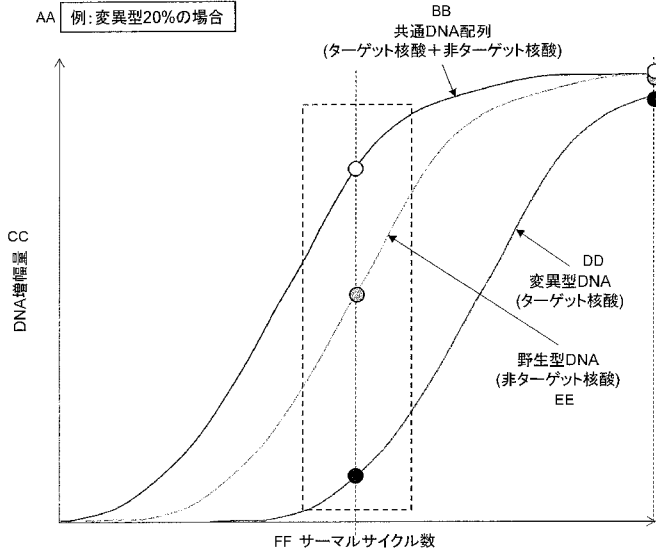
(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所
(HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都
港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ
MORIタワー32階 Tokyo (JP).

(71) 出願人 (JP についてのみ): 東洋製罐グループ
ホールディングス株式会社(TOYO SEIKAN

(54) Title: METHOD FOR TESTING GENETIC MUTATION AND DEVICE FOR TESTING GENETIC MUTATION

(54) 発明の名称: 遺伝子変異の検査方法及び検査装置

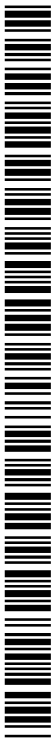
[図1]



AA Example: Case of 20% mutation
BB Common DNA sequence (target nucleic
acid + non-target nucleic acid)
CC Amount of DNA amplification
DD Mutated DNA (target nucleic acid)
EE Wild-type DNA (non-target nucleic acid)
FF Number of thermal cycles

(57) Abstract: In the present invention, genetic mutation in a testing subject is quantitatively analyzed using a nucleic acid probe. A nucleic acid fragment containing a genetic mutation is detected using a nucleic acid probe in the logarithmic amplification phase of nucleic acid amplification.

(57) 要約: 核酸プローブを用いて、検査対象の遺伝子変異を定量的に分析する。核酸増幅反応における指数関数的増幅期において、核酸プローブを用いて遺伝子変異を含む核酸断片を検出する。



WO 2024/176977 A1

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

明 細 書

発明の名称： 遺伝子変異の検査方法及び検査装置

技術分野

[0001] 本発明は、DNAチップ等に利用される核酸プローブを用いた遺伝子変異の検査方法及び検査装置に関する。

背景技術

[0002] 癌をはじめとする様々な疾患において、原因となる遺伝子変異やマーカーとなる遺伝子変異が同定されている。また、癌の予後予測に関連する遺伝子変異や、薬の副作用に関連する遺伝子変異も同定されている。例えば、一塩基バリエーション (Single Nucleotide Variant (SNV)) や、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)) は、このような遺伝子変異の典型である。

[0003] このような遺伝子変異を検査する一つのシステムとして、DNAチップ (DNAマイクロアレイとも称す) を利用したシステムが知られている。DNAチップには、検査対象の遺伝子変異に対応した核酸プローブ (野生型に対応する野生型プローブと、変異型に対応する変異型プローブ) が基板に固定された構成を有する。被検査者から採取したゲノムDNAを鋳型とし、検査対象の遺伝子変異を含む領域を挟みこむ一対のプライマーセットを用いて核酸増幅反応を行い、標識を有する核酸断片を得る。得られた核酸断片を含む溶液を所定の反応条件下でDNAチップに接触させる。溶液中に遺伝子変異を有する核酸断片が含まれていれば、変異型プローブからのシグナルを検出することができる。

[0004] 上述したような基本原理により、被検査者のゲノムDNAにおける遺伝子変異の有無を調べることができる。なお、遺伝子変異としてSNVやSNPに限らず、マイクロサテライトやDNAメチル化、キメラ遺伝子検査においても同様に、配列に対応する核酸プローブを有するDNAチップが用いられる。

[0005] ところで、DNAチップを利用したシステムでは、上述したように、核酸増幅が終了した時点（エンドポイント）での核酸断片を用いて検査対象の遺伝子変異を有するものが含まれているかを検査することができる。言い換えれば、DNAチップを利用したシステムによれば、検査対象の遺伝子変異に関して定量的な測定をするのではなく、定性評価が可能となっている。

[0006] 一方、DNAチップを利用して核酸を定量するシステムとしては、特許文献1に開示されるように、ターゲット核酸とプローブとのハイブリダイズに基づくシグナル強度を測定し、既知量のオリゴヌクレオチドとプローブとのハイブリダイズに基づくシグナル強度と比較することで、ターゲット核酸の量を補正して定量するシステムが知られている。また、特許文献2には、リアルタイムPCRによる定量分析又は定性分析と、DNAチップを用いた定性分析とを同時に単一の反応系で行う方法が開示されている。しかしこれらの先行技術では、ターゲット核酸の存在量（コピー数）を定量するための技術である。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2007-097574号公報

特許文献2：特許第5689446号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 以上のように、DNAチップ等に利用されている核酸プローブを用いた遺伝子変異の検査では、検査対象の遺伝子変異の有無を測定する、又は存在量（コピー数）を定量するに過ぎず、野生型遺伝子に対する遺伝子変異の存在割合を定量分析することはできないといった問題があった。そこで、本発明は、核酸プローブを用いて、検査対象の遺伝子変異の存在割合を定量的に分析することができる遺伝子変異の検査方法及び検査装置を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 上述した目的を達成するため、本発明者らが鋭意検討した結果、検査対象の遺伝子変異を含む核酸断片を核酸増幅反応により増幅する際、核酸増幅反応における指数関数的増幅期において、核酸プローブを用いて遺伝子変異を含む核酸断片を検出することで、当該遺伝子変異を定量的に分析できることを見だし、本発明を完成するに至った。

[0010] 本発明は以下を包含する。

(1) 検査対象の遺伝子変異を含む領域を増幅する核酸増幅反応を実施する工程と、上記核酸増幅反応の指数関数的増幅期において反応液に含まれる、上記遺伝子変異における検出対象塩基を含むターゲット核酸及び検出対象塩基に対応する非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸を、上記ターゲット核酸における検出対象塩基を含む領域に対して相補的な配列を有するターゲット核酸検出用核酸プローブと、上記非ターゲット核酸における非検出対象塩基を含む領域に対して相補的な配列を有する非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記ターゲット核酸及び上記非ターゲット核酸に共通する共通領域であって上記検出対象塩基若しくは上記非検出対象塩基を含む領域と重複しない共通領域に対して相補的な配列を有する共通プローブとを用いて検出する工程と、上記反応液に含まれるターゲット核酸を定量分析する工程とを含む、遺伝子変異の検査方法。

(2) 上記検出する工程では、上記核酸増幅反応において、反応液の一部を複数回取り出し、取り出した反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出して、検出したターゲット核酸及び非ターゲット核酸に基づいて指数関数的増幅期における検出結果とすることを特徴とする(1)記載の遺伝子変異の検査方法。

(3) 上記核酸増幅反応を実施する工程では、予め複数に取り分けた反応液についてそれぞれ異なるサーマルサイクル数まで核酸増幅反応を行い、上記検出する工程では、それぞれの反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出して、検出したターゲット核酸及び非ターゲット核酸に

に基づいて指数関数的増幅期における検出結果とすることを特徴とする（１）記載の遺伝子変異の検査方法。

（４）上記検出する工程では、上記ターゲット核酸検出用核酸プローブと、上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブとを担体に固定したDNAチップを使用することを特徴とする（１）記載の遺伝子変異の検査方法。

（５）上記定量分析する工程では、上記ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度と、上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブからのシグナル強度とに基づいて、検査対象の遺伝子変異における検出対象塩基の存在割合を算出することを特徴とする（１）記載の遺伝子変異の検査方法。

（６）上記定量分析する工程では、ターゲット核酸と非ターゲット核酸とを既知の割合で含むサンプルを複数用いて作成した検量線を用い、上記ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度と、上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブからのシグナル強度とに基づいて、検査対象の遺伝子変異における検出対象塩基の存在割合を定量することを特徴とする（１）記載の遺伝子変異の検査方法。

（７）上記定量分析する工程では、ターゲット核酸と非ターゲット核酸とを既知の割合で含むサンプルを複数用いて作成した検量線を用い、上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブからのシグナル強度が上記検量線に基づいて決められた所定の値を超えた場合に核酸増幅反応が指数関数的増幅期にあると判断することを特徴とする（１）記載の遺伝子変異の検査方法。

（８）上記定量分析する工程では、式：
$$\frac{\text{ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}}{(\text{ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度} + \text{非ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度})}$$
で算出した判定値、又は、式：
$$\frac{\text{ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}}{\text{共通プローブからのシグナル強度}}$$
で算出した判定値を用いることを

特徴とする（１）記載の遺伝子変異の検査方法。

（９）上記検出する工程は、上記非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸に対して相補的な塩基配列を含むブロッキング用核酸の存在下で行うことを特徴とする（１）記載の遺伝子変異の検査方法。

[0011] （１０）検査対象の遺伝子変異を含む領域を増幅する核酸増幅反応を行う核酸増幅反応部と、上記核酸増幅反応部から反応液が供給され、上記遺伝子変異における検出対象塩基を含むターゲット核酸における検出対象塩基を含む領域に対して相補的な配列を有するターゲット核酸検出用核酸プローブと、検出対象塩基に対応する非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸における非検出対象塩基を含む領域に対して相補的な配列を有する非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記ターゲット核酸及び上記非ターゲット核酸に共通する共通領域であって上記検出対象塩基若しくは上記非検出対象塩基を含む領域と重複しない共通領域に対して相補的な配列を有する共通プローブとを用いて少なくともターゲット核酸を検出する検出部と、上記核酸増幅反応部から反応液を分取して、分取した反応液を上記検出部に供給する送液装置とを備える遺伝子変異の検査装置。

（１１）上記送液装置は、上記検出部に供給する１回分の反応液を量り取る計量装置を備えることを特徴とする（１０）記載の検査装置。

（１２）上記核酸増幅反応部は、検査対象の遺伝子変異を含む領域を増幅する核酸増幅反応を行う複数の反応槽を備え、上記送液装置は、上記検出部に反応液を供給する流路を上記複数の反応槽間で切り換える切換装置を含み、当該切換装置により反応液を分取することを特徴とする（１０）記載の遺伝子変異の検査装置。

（１３）上記検出部は、上記ターゲット核酸検出用核酸プローブ及び上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブを担体に固定したDNAチップを搭載するDNAチップ載置部を備えることを特徴とする（１０）記載の遺伝子変異の検査装置。

（１４）上記検出部は、上記共通プローブにて、ターゲット核酸及び非タ

ーゲット核酸を検出することを特徴とする（１０）記載の遺伝子変異の検査装置。

（１５）上記送液装置は、上記核酸増幅反応部と上記検出部とを連結する流路、当該流路上に配設されたバルブ、当該流路に接続されたポンプ装置を備えることを特徴とする（１０）記載の遺伝子変異の検査装置。

（１６）上記検出部に対して、ハイブリダイズ緩衝液を供給するハイブリダイズ緩衝液タンクを備え、上記送液装置は、上記核酸増幅反応部から核酸増幅反応の反応液を上記検出部に供給するとともに、上記ハイブリダイズ緩衝液タンクからハイブリダイズ緩衝液を上記検出部に供給することを特徴とする（１０）記載の遺伝子変異の検査装置。

（１７）上記ハイブリダイズ緩衝液は、上記非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸に対して相補的な塩基配列を含むブロッキング用核酸を含むことを特徴とする（１６）記載の遺伝子変異の検査装置。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号２０２３－０２４４３９号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明に係る遺伝子変異の検査方法及び検査装置によれば、遺伝子変異に対応した核酸プローブを用いて、当該遺伝子変異を定量的に分析することができる。本発明に係る遺伝子変異の検査方法及び検査装置を適用することで、例えば、野生型に対する変異型の割合といった遺伝子変異の定量的な分析が可能となる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]野生型DNAを80%及び変異型DNAを20%の割合とした鋳型DNAを用いて核酸増幅反応を行ったときの、サーマルサイクル数を横軸とし、DNA増幅量を縦軸とした特性図である。

[図2]本発明に係る遺伝子変異の検査装置の一例を模式的に示す構成図である。

[図3]本発明に係る遺伝子変異の検査装置を用いて遺伝子変異を検査する工程

を示すフローチャートである。

[図4] J A K 2 遺伝子における V 6 1 7 F 変異について、P C R の指数関数的増幅期の反応液を用いて得られた検量線及び対数変換後検量線を示す特性図である。

[図5] M P L 遺伝子における W 5 1 5 L 変異について、P C R の指数関数的増幅期の反応液を用いて得られた検量線及び対数変換後検量線を示す特性図である。

[図6] P C R のエンドポイントの反応液を用いて作成した検量線及び対数変換後検量線を示す特性図である。

[図7] 実施例 3 で定量した変異割合と、実測した変異割合との関係を示す特性図である。

[図8] 本発明に係る遺伝子変異の検査装置の別の一例を模式的に示す構成図である。

[図9] 本発明に係る遺伝子変異の検査装置のさらに別の一例を模式的に示す構成図である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明に係る遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、検査対象の遺伝子変異を含むターゲット核酸を核酸プローブによって定量的に検出するものである。

[0015] 検査対象の遺伝子変異とは、一例として、一塩基バリエント (S N V) や一塩基多型 (S N P) であり、ゲノム D N A の所定の位置における塩基の相違を意味する。すなわち、特定の遺伝子変異については、複数の塩基が存在することとなる。このうち 1 つの塩基を以下の説明においては検出対象塩基と称し、検出対象塩基以外の塩基を非検出対象塩基と称する。

[0016] 検出対象塩基とは、例えばゲノム D N A の所定の位置における所定の核酸残基を意味しており、特に限定されないが、一塩基多型 (S N P) 等の塩基配列における特定の塩基の種類を意味している。例えば、所定の一塩基多型が A (アデニン) 又は C (シトシン) を取りうるとして、いずれか一方の塩

基、すなわち当該一塩基多型におけるA（アデニン）を検出対象塩基とすることができる。ここで、検出対象塩基としては、遺伝子多型におけるメジャーアレル及びマイナーアレルのいずれでも良いし、リスクアレルであってもなくても良い。

[0017] ここで、ターゲット核酸とは、検出対象塩基を含む核酸分子、すなわち核酸断片を意味する。ターゲット核酸は、DNAからなる核酸分子でも良いし、RNAからなる核酸分子でも良いし、DNAとRNAとを含む核酸分子（DNA-RNA複合体）でもよいし、セルフリーDNAのように断片化されたものであっても良い。また、核酸としては、アデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウラシル、並びに、ペプチド核酸（PNA）及びロックド核酸（LNA）等の人工核酸を含む意味である。

[0018] 検出対象塩基を含むターゲット核酸は、遺伝子変異を含むゲノムDNA上の所定の領域を核酸増幅法により増幅することで調製することができる。また、ターゲット核酸としては、生物個体、組織及び細胞から採取した転写産物から逆転写反応により得られるcDNAとしても良い。ターゲット核酸の塩基長としては、特に限定されないが、例えば60～1000塩基とすることができ、60～500塩基とすることが好ましく、60～200塩基とすることがより好ましい。

[0019] なお、検出対象塩基を含むターゲット核酸に対して、当該検出対象塩基に対応する非検出対象塩基を含む核酸分子（核酸断片）を非ターゲット核酸と称する。例えば、ゲノムDNAにおける所定の位置で取りうる複数の塩基のうち、1つの塩基を検出対象塩基とした場合、検出対象塩基以外の塩基を非検出対象塩基とする。より具体的に、所定の位置における一塩基多型がA（アデニン）又はC（シトシン）を取りうる場合、当該一塩基多型におけるA（アデニン）を検出対象塩基とすると、当該一塩基多型におけるC（シトシン）が非検出対象塩基ということになる。

[0020] また、例えば、所定の多型やバリエーションにおける変異型（マイナーアレルの順鎖又は逆鎖）を検出対象塩基とした場合、当該変異型を含む核酸断片を

ターゲット核酸とし、非検出対象塩基である野生型（メジャーアレルの順鎖又は逆鎖）を含む核酸断片を非ターゲット核酸とすることができる。

[0021] 非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸は、所定の遺伝子変異についてゲノムDNA上に非検出対象塩基が存在する場合、上述のように検出対象塩基を含むターゲット核酸を取得する際に同時に取得される。例えば、ターゲット核酸をポリメラーゼ連鎖反応等の核酸増幅反応により取得する場合、一方のアレルが非検出対象塩基であれば、ターゲット核酸とともに非ターゲット核酸が増幅されることとなる。

[0022] 本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、検出対象塩基を含むターゲット核酸を検出するには、ターゲット核酸において、少なくとも検出対象塩基を含む領域に対して相補的な塩基配列を有する核酸プローブを使用する。核酸プローブは、特に限定されないが、例えば10～30塩基長とすることができ、15～25塩基長とすることが好ましい。また、検出対象塩基に相補的な塩基は、核酸プローブを構成する塩基を文字列として見たときに、当該文字列の中心となる位置とすることが好ましい。なお、文字列の中心とは、偶数個の塩基からなる核酸プローブについては5'末端又は3'末端方向に1つずれている場合を含む意味である。

[0023] 特に、本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、ターゲット核酸及び非ターゲット核酸に共通する共通領域に対して相補的な配列を有する共通プローブを使用することができる。共通領域とは、ターゲット核酸及び非ターゲット核酸に共通する塩基配列の領域であって、検出対象塩基及び非検出対象塩基を含まない領域である。例えば、共通領域は、ターゲット核酸を検出する核酸プローブがハイブリダイズする領域、非ターゲット核酸を検出する核酸プローブがハイブリダイズする領域と重複しない領域とすることができる。

[0024] 本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、ターゲット核酸と核酸プローブにおける核酸分子同士の相補的な結合を意味するハイブリダイゼーションを含むならば、如何なる系にも適用することができる。すなわ

ち、本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置は、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーションに基づくことができる。特に、本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置は、担体（基板、中空繊維、微粒子を含む）に核酸プローブを固定し、固定化した核酸プローブを用いてターゲット核酸を検出（定性、定量を含む）する系に使用することが好ましい。より具体的に、本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置は、核酸プローブを基板に固定したDNAチップ（DNAマイクロアレイ）を用いた系とすることが好ましい。

[0025] 以下、本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置を、DNAチップ（DNAマイクロアレイ）を用いてターゲット核酸を検出する際に使用する系を例示的に説明する。なお、上述したターゲット核酸を検出するための核酸プローブ（ターゲット核酸検出用核酸プローブ）、非ターゲット核酸を検出するための核酸プローブ（非ターゲット核酸検出用核酸プローブ）及び共通プローブは、より好ましくは一本鎖DNAであり、例えば、核酸合成装置によって化学的に合成することで取得することができる。核酸合成装置としては、DNAシンセサイザー、全自動核酸合成装置、核酸自動合成装置等と呼ばれる装置を使用することができる。

[0026] 本例において、ターゲット核酸検出用核酸プローブ、非ターゲット核酸検出用核酸プローブ及び共通プローブは、その5'末端又は3'末端を担体上に固定化することにより、マイクロアレイの形態で用いるのが好ましい。担体の材料としては、当技術分野で公知のものを使用でき、特に制限されない。例えば、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、水銀、タングステンおよびそれらの化合物などの貴金属、およびグラファイト、カーボンファイバーに代表される炭素などの導電体材料；単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表されるシリコン材料、SOI（シリコン・オン・インシュレータ）などに代表されるこれらシリコン材料の複合素材；ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、セラミクス、フォルステライト、感光性ガラスなどの無機材料；ポリエチレ

ン、ポリプロピレン、環状ポリオレフィン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエン・スチレン共重合体、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホンなどの有機材料等が挙げられる。担体の形状も特に制限されないが、好ましくは平板状である。

[0027] なお担体として、好ましくは表面にダイヤモンドライクカーボン（DLC : Diamond Like Carbon）等のカーボン層と、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基、ホルミル基、ヒドロキシル基及び活性エステル基等の化学修飾基とを有する担体を用いる。表面にカーボン層と化学修飾基とを有する担体には、基板の表面にカーボン層と化学修飾基とを有するもの、およびカーボン層からなる基板の表面に化学修飾基を有するものが包含される。基板の材料としては、当技術分野で公知のものを使用でき、特に制限されず、上述の担体材料として挙げたものと同様のものを使用できる。

[0028] 本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、このように作製したDNAチップを用いて、被検者におけるターゲット核酸を定量的に分析することができる。具体的には、先ず、被検者由来の試料からDNAを抽出する工程と、抽出したDNAを鋳型とし、核酸増幅反応により検査対象の遺伝子変異を含む領域を増幅する工程であって、核酸増幅反応における指数関数的増幅期でDNAチップを用いて少なくともターゲット核酸を検出する工程とを含む。

[0029] 被検者は通常ヒトであり、遺伝子変異を検査する対象であり、所定の遺伝子変異が関連する疾患に罹患した患者を挙げることができる。被検者由来の試料は特に制限されない。例えば、血液関連試料（血液、血清、血漿など）、リンパ液、糞便、がん細胞、組織または臓器の破砕物および抽出物などが

挙げられる。

- [0030] まず、被検者から採取した試料からDNAを抽出する。抽出手段としては、特に限定されない。例えばブレンダー、ミキサー、ホモジナイザーと呼ばれる破碎機によって細胞を破壊し、有機溶媒（フェノール／クロロホルム）を用いて精製しても良いし、界面活性剤によって細胞を破壊し、シリカカラムに吸着させて遠心分離しても良く、シリカコーティングされた磁性ビーズにDNAを吸着させて、磁石で引き寄せてDNAを分離しても良い。
- [0031] 次に、得られたDNAを鋳型として用いて増幅反応を行い、検査対象の遺伝子変異を含む核酸領域を、好ましくはDNAを増幅させる。増幅反応としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）、ICAN（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）法等を適用することができる。増幅反応においては、増幅後の領域を識別できるように標識を付加することが望ましい。このとき、増幅された核酸を標識する方法としては、特に限定されないが、例えば増幅反応に使用するプライマーをあらかじめ標識しておく方法を使用してもよいし、増幅反応に標識ヌクレオチドを基質として使用する方法を使用してもよい。標識物質としては、特に限定されないが、放射性同位元素や蛍光色素、あるいはジゴキシゲニン（DIG）やビオチンなどの有機化合物などを使用することができる。
- [0032] また、この反応系は、核酸増幅・標識に必要な緩衝剤、耐熱性DNAポリメラーゼ、増幅する領域に特異的な一対のプライマー、標識ヌクレオチド三リン酸（具体的には蛍光標識等を付加したヌクレオチド三リン酸）、ヌクレオチド三リン酸および塩化マグネシウム等を含む反応系である。
- [0033] 核酸増幅反応は、熱変性（denaturation）、アニーリング（annealing）及び伸長（extension）の3つの工程から構成される。この3つの工程を1つのサイクルとして、複数のサイクルを繰り返すことによって、検査対象の遺伝子変異を含む核酸断片を合成することができる。この3つの工程を繰り返す手順をサーマルサイクルと呼び、3つの工程の繰り返し回数をサーマルサイ

クル数と呼ぶ。

[0034] また、核酸増幅反応は、2ステップPCRと称される、アニーリングと伸長を同一温度で行うことで、熱変性工程とアニーリング及び伸長工程の2つの工程から構成されてもよい。この場合、これら2つの工程を1つのサイクルとして繰り返すことによって、検査対象の遺伝子変異を含む核酸断片を合成することができる。この場合、これら2つの工程を繰り返す手順をサーマルサイクルと呼び、2つの工程の繰り返し回数をサーマルサイクル数と呼ぶ。

[0035] 熱変性 (denaturation) 工程は、鋳型となるDNAを含む反応液を通常90℃以上に加熱することで一本鎖DNAとする工程である。サーマルサイクルにおける初回の熱変性工程は、ゲノムDNAを鋳型とする場合には比較的長い時間 (1~5分) とすることが好ましい。また、2回目以降の熱変性工程は、二本鎖として得られた増幅産物を一本鎖とすることが目的となるため比較的短い時間 (1~90秒) とすることが好ましい。

[0036] アニーリング (annealing) 工程は、一本鎖となった鋳型のDNA及び一对のプライマーセットを含む反応液を通常40~75℃の範囲の温度とし、これらプライマーを鋳型DNAに特異的に結合 (anneal) させる工程である。なお、アニーリング工程の温度は、プライマーの配列や長さに依存して適宜設定される。通常は、使用するプライマーのT_m値の±5℃の範囲でアニーリング工程の温度を設定する。

[0037] 伸長 (extension) 工程は、プライマーが鋳型DNAにアニーリングした状態で反応液の温度を約72℃とし、耐熱性ポリメラーゼ (Taq DNAポリメラーゼ等) によるプライマーの端部から相補鎖を合成する工程である。なお、この反応では、標識を付したプライマーからの鋳型DNAの相補鎖を合成するか、標識を付加したフリーのヌクレオチドを取り込みながら鋳型DNAの相補鎖を合成する。よって、検査対象の遺伝子変異について、検出対象塩基を含むターゲット核酸、非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸が標識されることとなる。伸長工程の時間は、増幅する核酸断片の長さ、使用す

る酵素の反応性に依存して適宜設定される。

[0038] サーマルサイクルにおける指数関数的増幅期とは、サーマルサイクルにおいて増幅効率が70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上となる期間である。ここで増幅効率とは、サイクル毎に増加する核酸断片量を割合で示した値である。すなわち、増幅効率が100%であるとは、サイクル毎に増幅断片が2倍になることを意味する。よって指数関数的増幅期を規定する際、増幅効率の上限値は特に限定されず、例えば100~110%の値とすることができる。

[0039] 本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、このように定義された指数関数的増幅期における核酸増幅反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出し、これに基づいてターゲット核酸を定量的に分析することができる。ターゲット核酸を定量的に分析するには、ターゲット核酸検出用核酸プローブとターゲット核酸のハイブリダイゼーション反応を行い、ターゲット核酸検出用核酸プローブにハイブリダイズした核酸の量を、例えば標識を検出することにより測定できる。標識からのシグナルは、例えば、蛍光標識を用いた場合は、蛍光スキャナを用いて蛍光シグナル検出し、これを画像解析ソフトによって解析することによりシグナル強度を数値化することができる。

[0040] ハイブリダイゼーション反応は、好ましくはストリンジেন্টな条件下で実施する。ストリンジेंटな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、例えば、50℃で16時間ハイブリダイズ反応させた後、 $2 \times \text{SSC} / 0.2\% \text{ SDS}$ 、25℃、10分および $2 \times \text{SSC}$ 、25℃、5分の条件で洗浄する条件をさす。すなわち、本発明に係るハイブリダイゼーション用バッファー組成物には、ハイブリダイゼーション反応に必要な塩、例えばSSCや、公知のブロッキング剤、例えばSDSが含まれていても良い。

[0041] 本発明に係る遺伝子変異の検査方法及び検査装置によって、ターゲット核

酸を定量的に分析できることについて図1を用いて説明する。なお、図1は、野生型DNAを80%及び変異型DNAを20%の割合とした鋳型DNAを用いて核酸増幅反応を行い、サーマルサイクル数を横軸とし、DNA増幅量を縦軸として示している。図1に示しているように、鋳型DNAに含まれる野生型DNAと変異型DNAとの比率である80:20は、サーマルサイクルの終了時の近傍では維持されていない。よって、サーマルサイクル終了後の反応液を用いてターゲット核酸を定量的に分析することはできないことが判る。一方、図1の破線で示した範囲、すなわち、サーマルサイクルにおける指数関数的増幅期においては、鋳型DNAに含まれる野生型DNAと変異型DNAとの比率である80:20がおおよそ維持されている。したがって、サーマルサイクルにおける指数関数的増幅期においてターゲット核酸を検出することによって、ターゲット核酸の定量的な分析が可能となる。

[0042] より具体的には、指数関数的増幅期における核酸増幅反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出することで、ターゲット核酸と非ターゲット核酸の存在割合（すなわち、変異割合）を算出することができる。

[0043] 具体的には、ターゲット核酸検出用核酸プローブ及び非ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナルに基づいてターゲット核酸を定量的に分析する場合、具体的には、ターゲット核酸検出用核酸プローブ及び非ターゲット核酸検出用核酸プローブにおけるシグナル強度をそれぞれ測定し、ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度を評価するための判定値を算出する。判定値の算出例としては、例えば、式：
$$\frac{[\text{ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}]}{([\text{ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}] + [\text{非ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}]}$$
を使用する方法が挙げられる。

[0044] ところで、本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置は、上述した構成に限定されず、核酸増幅反応液中の非ターゲット核酸が、ターゲット核酸検出用核酸プローブに非特異的にハイブリダイズすることを防止するた

め、いわゆるブロッキング用核酸を使用することもできる。ブロッキング用核酸は、ターゲット核酸及び非ターゲット核酸を含む反応液と混合しておき、得られた混合液をDNAチップに接触させてターゲット核酸とターゲット核酸検出用核酸プローブとのハイブリダイゼーション反応を進行させることができる。また、ターゲット核酸及び非ターゲット核酸を含む反応液と、ブロッキング用核酸を含む溶液とをDNAチップ上にて混合して、ターゲット核酸と核酸プローブとの特異的なハイブリダイズを同時に進行させても良い。これらいずれの場合でも、ブロッキング用核酸が非ターゲット核酸にハイブリダイズすることで、非ターゲット核酸がターゲット核酸検出用プローブとハイブリダイズすることを防止できる。

[0045] ブロッキング用核酸は、非ターゲット核酸における非検出対象塩基を含む領域に対して相補的な塩基配列を有する。よって、ブロッキング用核酸は、検出対象塩基を有するターゲット核酸と核酸プローブとがハイブリダイズできる条件下において、非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸とハイブリダイズすることができる。

[0046] ブロッキング用核酸において、非検出対象塩基に対応する塩基の位置は特に限定されない。また、ブロッキング用核酸としては、特に限定されないが、核酸プローブの塩基長に対して60%以上の長さであることが好ましい。また、ブロッキング用核酸は、核酸プローブの塩基長に対して140%以下の長さであることが好ましい。例えば核酸プローブの長さが25塩基長とすると、ブロッキング用核酸の塩基長は15～35塩基長であることが好ましい。

[0047] さらに、ブロッキング用核酸は、非ターゲット核酸に含まれる非検出対象塩基以外の塩基に対応する位置にミスマッチな塩基（相補的でない塩基）を含んでいても良い。ブロッキング用核酸が15塩基長である場合、ミスマッチな塩基は1～3個とすることができ、1～2個であることが好ましい。また、ブロッキング用核酸が25塩基長である場合、ミスマッチな塩基は1～5個とすることができ、1～4個であることが好ましい。

- [0048] さらにまた、ブロッキング用核酸の濃度は、特に限定されないが、例えば、非ターゲット核酸の濃度及び/又はターゲット核酸の濃度に応じて、又はプライマー濃度に応じて適宜設定することができる。具体的にブロッキング用核酸の組成物中の濃度は、 $0.01 \sim 2 \mu\text{M}$ とすることができ、 $0.02 \sim 1.5 \mu\text{M}$ とすることが好ましく、 $0.05 \sim 1.5 \mu\text{M}$ とすることがより好ましい。
- [0049] なお、ブロッキング用核酸を使用して非ターゲット核酸と、ターゲット核酸検出用核酸プローブとの非特異的なハイブリダイズを防止した場合、非ターゲット核酸と非ターゲット核酸検出用核酸プローブとの特異的なハイブリダイズもまた阻害されることとなる。この場合、非ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度が大きく低下する。この場合、上記の式：
$$\frac{[\text{ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}]}{([\text{ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}] + [\text{非ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}])}$$
による判定値は、ターゲット核酸の定量的な分析には不十分である可能性がある。この場合、ターゲット核酸と非ターゲット核酸との総量を共通プローブで測定することが好ましい。
- [0050] 共通プローブは、上述したように、ターゲット核酸及び非ターゲット核酸に共通する共通領域に対して相補的な配列を有している。よって、共通プローブは、ブロッキング用核酸が非ターゲット核酸とハイブリダイズしていたとしても、同じ非ターゲット核酸とハイブリダイズすることができる。
- [0051] 共通プローブを使用する場合、上述した判定値を算出する式としては、
$$\frac{[\text{ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度}]}{[\text{共通プローブからのシグナル強度}]}$$
を適用することができる。この式によれば、ブロッキング用核酸の影響を排除して、ターゲット核酸と非ターゲット核酸を併せた全体に対するターゲット核酸の割合を算出することができる。
- [0052] また、予め検量線を作成しておくことでターゲット核酸について絶対定量することができる。検量線としては、様々な既知の変異割合サンプル（ターゲット核酸と非ターゲット核酸を既知の割合で含むサンプル）を用いて、指

数関数的増幅期における核酸増幅反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出し、上記式で算出した判定値から作成することができる。すなわち、検量線は、上述したように算出した判定値と、核酸増幅反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸の割合やターゲット核酸の量との関係を表している。

[0053] 検量線の作成方法としては、特に限定されないが、核酸増幅反応において予め設定したサーマルサイクル数を指数関数的増幅期とし、当該サーマルサイクル数におけるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出し、上記式で算出した判定値から検量線を作成する方法を挙げることができる。あるいは、検量線の作成方法としては、既知の変異割合サンプルを用いた核酸増幅反応で得られる増幅曲線に基づいて指数関数的増幅期（増幅曲線において直線性が高い領域）を調べ、指数関数的増幅期のサーマルサイクル数を決定し、当該サーマルサイクル数におけるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出し、上記式で算出した判定値から検量線を作成する方法を挙げることができる。

[0054] ここで、検量線は $y=x$ の一次直線となることが理想だが、種々の誤差（作業による誤差、試薬の誤差、測定機器の誤差など）によって、 $y=ax+b$ となることが多い。そのため、検量線の傾き a と切片 b をそれぞれ正規化することで、 $y=x$ に近づけることができる。

[0055] 具体的には、基準の変異割合としたサンプル（例えば、変異割合100%サンプル、以下M100サンプル）を用いて、核酸増幅反応を行い、所定の間隔（例えば3サイクル毎）で反応液を分取し、反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出する。ここでは、ターゲット核酸検出用核酸プローブによりターゲット核酸を検出し、ターゲット核酸及び非ターゲット核酸を共通プローブで検出するものとする。

[0056] まず、指数関数的増幅期を決定する方法として、ターゲット核酸検出用核酸プローブの増幅曲線から指数関数的増幅期を決定する方法が挙げられる。具体的には、予め定めた閾値に到達したサーマルサイクル数で指数関数的増

幅期を計算する方法が知られている。しかし、この方法は検出するダイナミックレンジが変わる場合においては適さない場合がある。そこで、例えば、以下の方法により指数関数的増幅期を計算する。

[0057] すなわち、まず、例えばM100サンプルから得られたターゲット核酸検出用核酸プローブで検出した核酸断片の増幅曲線により、到達した蛍光強度値をターゲット核酸検出用核酸プローブのダイナミックレンジの上限値として、いくつかの仮の蛍光強度閾値（Tentative Threshold Mutant Probe Fluorescent Intensity、以下TTh.MPFI）を設定する。そして、TTh.MPFIに最近接するサーマルサイクル数（Nearest Ct、以下Near.Ct）における判定値を算出、さらに共通プローブの仮の蛍光強度閾値（Tentative Threshold Common Probe Fluorescent Intensity、以下TTh.CPFI）を設定し、得られた検量線の直線性から真の蛍光強度閾値を決定する。この時、ターゲット核酸検出用核酸プローブのダイナミックレンジ上限値を設定しているため、M100サンプルに対してはTTh.MPFIを用いることが望ましく、M100サンプル以外の既知変異割合サンプルに対しては、TTh.CPFIを用いることが望ましい。なお、ターゲット核酸検出用核酸プローブで検出した核酸断片の増幅曲線から回帰分析等を行うことによって指数関数的増幅期を決定しても良い。

[0058] また、M100サンプルから得られた判定値の逆数は補正係数として使用することができる。この補正係数はM100サンプルを含む既知の変異割合サンプル（例えば変異割合1%サンプル、10%サンプル、50%サンプル、M100サンプルなど）から得られた判定値に乘じることで、検量線の傾き a を補正することができる。

[0059] 次に、傾き a を正規化した既知変異割合サンプルを元に、横軸に補正後判定値（判定値 \times 補正係数）、縦軸に既知変異割合をプロットした散布図を作成し、最小二乗法によって線形近似直線を得ることができる。この時、横軸の変化率と縦軸の変化率の比は一定となることから、両軸を対数化することで切片 b を正確に補正することができる。

[0060] このような手順により、傾き a と切片 b を補正することができ、種々の誤差

を正規化した検量線を得ることができる。

以下に具体例を示す。

[0061] 例えば、22～40サイクルにおいて、表1に示すような蛍光強度が検出されたものとする。表1においてMPFIはターゲット核酸検出用核酸プローブからの蛍光強度であり、CPFIは共通プローブからの蛍光強度を示している。そして、予め設定したターゲット核酸検出用核酸プローブからの仮の蛍光強度閾値 (Tentative Threshold Mutant probe Fluorescent Intensity、以下Th.MPFI) と実測したMPFIとの差分を、表1において ΔFI (絶対値) とした。

[0062] [表1]

| 温度サイクル | TTh.MPFI | MPFI | ΔFI | CPFI |
|--------|----------|------|-------------|-------|
| 22 | 5000 | 2400 | 2600 | 4000 |
| 25 | 5000 | 3400 | 1600 | 5000 |
| 28 | 5000 | 4400 | 600 | 6000 |
| 31 | 5000 | 5400 | 400 | 7000 |
| 34 | 5000 | 6400 | 1400 | 8000 |
| 37 | 5000 | 7000 | 2000 | 9000 |
| 40 | 5000 | 7000 | 2000 | 10000 |

[0063] ここでTTh.MPFI=5000と設定されているとすると、最も小さい ΔFI は400となり、この時のサーマルサイクル数を最近接温度サイクル値 (Nearest Ct、以下Near.Ct) とおくことができる。表1の例ではNear.Ct = 31となる。

[0064] 次に、Near.CtにおけるCPFIを、共通プローブからの仮の蛍光強度閾値 (Tentative Threshold Common probe Fluorescent Intensity、以下TTh.CPFI) とする。表1の例ではTTh.CPFIが7000となる。

[0065] そして、様々な既知の変異割合サンプル (ターゲット核酸と非ターゲット核酸を既知の割合で含むサンプル) について、基準の変異割合サンプルから求めたTTh.CPFI (表1の例では7000) に最も近くなるそれぞれのサンプルのNear.Ctと、そのNear.CtにおけるCPFI、及びMPFIを用いて同様に判定値を算出する。具体的には、様々な既知の変異割合サンプルについて表1と同様にCPFI及びMPFIを測定し、測定したCPFIが上記TTh.CPFI (表1の例では7000) に

近づいたNear.CtのときのMPFIを用いて判定値を算出する。

[0066] このとき、様々な既知の変異割合サンプルについて算出した判定値は、補正係数を乗じて傾きaを補正することができる。より具体的には、変異割合100%サンプルについて、[ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度]/[共通プローブからのシグナル強度]で判定値を求めた場合、補正係数=[共通プローブからのシグナル強度]/[ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度]を求める。そして、様々な既知の変異割合サンプルについて算出した判定値に当該補正係数を乗ずることで、様々な既知の変異割合サンプルについて算出した判定値から補正後の判定値を算出することができる。補正後の判定値は、変異割合100%サンプルにおける判定値が1で、その他の変異割合サンプルにおける判定値が0以上1以下の範囲に分布することとなる。

[0067] そして、得られた補正後の判定値と変異割合の値とを用いて最小二乗法により、線形近似曲線として検量線を作成することができる。

[0068] なお、Near.Ctを求める方法としては、上述した方法に限定されず、例えば、表1に示したようなMPFIと温度サイクル値との関係について近似曲線を作成する方法が挙げられる。この方法では、まず、近似曲線において、予め設定したMPFI（上述した例では5000）となる温度サイクル値（Calculated Ct、以下Calc.Ct）を求める。そして、求めたCalc.Ctに最近接する温度サイクル値をNear.Ctとすることができる。なお、近似曲線としては、回帰分析によって得られる近似曲線であれば特に限定されず、例えば、線形近似曲線、指数近似曲線、対数近似曲線、多項近似曲線、累乗近似曲線、冪乗近似曲線、移動平均曲線、シグモイド曲線を挙げることができる。

[0069] 例えば表1に示したMPFIと温度サイクル値について多項近似式を作成すると、 $y=0.0019x^6-0.3509x^5+26.64x^4-1067.4x^3+23822x^2-280506x+1361925$ となる。この式からMPFI=5000のときのCalc.Ctを逆算するとCalc.Ct=29.83となる。よって、Calc.Ctと実際の温度サイクルの差分（ ΔCt ）を算出し、 ΔCt が最も小さくなる温度サイクル値（31サイクル）をNear.Ctと設定することができる。

- [0070] 以上のようにして、予め設定したTTh, MPFI（上記の例ではTTh, MPFI=5000）のときの検量線を作成することができる。本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置は、上述のように作成した検量線を使用してもよいが、複数のTTh, MPFIを設定して同様に検量線を作成し、複数の検量線のなかから、補正後の判定値と変異割合との関係がより直線的である検量線を選択して使用することが好ましい。
- [0071] 複数のTTh, MPFIとしては、その値が等間隔となるように適宜設定することができる。例えば、16ビットのカメラによって撮影する場合の蛍光強度は65535が上限値となり、TTh, MPFIの等間隔幅としては1~65535の範囲、好ましくは5~50000の範囲、より好ましくは10~10000の幅となるように複数のTTh, MPFIを設定することができる。このような範囲の幅で設定した複数のTTh, MPFIについて検量線を作成し、より直線性の高い検量線を選択する。具体的には、得られた複数の検量線について決定係数 R^2 を算出し、決定係数 R^2 がより1に近い検量線を、より直線性の高い検量線として選択することができる。しかし、複数の露光画像を用いて、近似直線を描き、蛍光強度を外挿することもできる。このような場合、TTh, MPFIの等間隔幅も拡張されるため、拡張された最大値を上限値として、TTh, MPFIの等間隔幅を設定することもできる。
- [0072] また、本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、上述した補正後判定値と変異割合との関係を示す検量線を使用する形態に限定されず、検量線を示す式の両辺を対数変換した「対数変換後の検量線」を併せて使用することが好ましい。
- [0073] すなわち、上述のように複数のTTh, MPFIについて検量線を作成し、さらに作成した検量線に対応する対数変換後検量線も作成することが好ましい。補正後判定値と変異割合との関係を示す検量線と対数変換後検量線のセットを複数のTTh, MPFIについて作成した後、双方の検量線について直線性が高いセットを選択する。具体的には、補正後判定値と変異割合との関係を示す検量線の決定係数が所定の値（例えば、 $R^2 \geq 0.99$ ）を超えたもののうち、対応する対数変換後検量線における決定係数が最も高い検量線のセットを選択する。

本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、選択したセットに含まれる検量線を使用することができる。

[0074] 以上のように作成した検量線を使用することで、被検者におけるターゲット核酸の割合（変異割合）を分析することができる。具体的には、上述のように選択された検量線を作成する際のTTh, MPFIに対応するCPFIをTTh, CPFIとして、被検者から採取した未知の検体サンプルの変異割合定量に使用する。すなわち、被検者から採取した未知の検体サンプルを用いた核酸増幅反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を共通プローブで検出し、共通プローブで観察された蛍光強度がTTh, CPFIに最近接したときのターゲット核酸検出用核酸プローブで観察された蛍光強度（MPFI）を用いて、上記補正後判定値を算出し、検量線に基づいて変異割合を分析することができる。

[0075] 具体的には、核酸増幅反応において、反応液の一部を複数回取り出し、取り出した反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出する。そして、共通プローブで観察された蛍光強度がTTh, CPFIに最近接した反応液について観察されたMPFIを用いて、上記補正後判定値を算出し、検量線に基づいて変異割合を分析することができる。あるいは、異なるサーマルサイクル数まで核酸増幅反応を行った複数の反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出する。そして、共通プローブで観察された蛍光強度がTTh, CPFIに最近接した反応液について観察されたMPFIを用いて、上記補正後判定値を算出し、検量線に基づいて変異割合を分析することができる。

[0076] また本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置においては、1つのDNAチップで複数の遺伝子変異を検査できるように、検出対象塩基が異なる多数の核酸プローブを配置することができる。そして、複数対のプライマーセットを用いて上述した核酸増幅反応を行うことで、同時に複数種類のターゲット核酸を増幅することができる。本発明にかかる遺伝子変異の検査方法及び検査装置では、複数種類のターゲット核酸を含む反応液（指数関数的増幅期でサンプリングした反応液）を用いることで、1つのDNAチップを使用して複数の遺伝子変異についてターゲット核酸を定量的に分析するこ

とができる。

[0077] 以下、本発明にかかる遺伝子変異の検査装置について図面を参照して説明する。図2に模式的に示すように検査装置1は、検査対象の遺伝子変異を含む領域を増幅する核酸増幅反応を実施する核酸増幅反応部2と、核酸増幅反応部2から反応液が供給されるとともに当該反応液に含まれるターゲット核酸を検出する検出部3とを備えている。核酸増幅反応部2は、核酸増幅反応に必要な試薬や物質を溜める反応槽4と、反応槽4内の反応液を所定の温度に制御する第1温度制御部5を備えている。検出部3は、ターゲット核酸検出用核酸プローブ、非ターゲット核酸検出用核酸プローブ及び共通プローブ等を有するDNAチップ6を搭載するDNAチップ載置部7と、DNAチップ載置部7に搭載されたDNAチップ6に供給されるハイブリダイズ反応液を所定の温度に制御する第2温度制御部8と、DNAチップ6の各種プローブが固定された表面に対向する位置に配設された撮像部9とを備えている。検査装置1において、核酸増幅反応部2と検出部3とは、溶液が通過できる流路10を介して連結されている。なお、第1温度制御部5及び第2温度制御部8は、熱伝導性の高い金属ブロック及び当該金属ブロックを加熱/冷却する温度制御装置を備える。

[0078] また、検査装置1は、流路11を介してDNAチップ載置部7と連結されたハイブリダイズ緩衝液タンク12、流路13を介してDNAチップ載置部7と連結された洗浄液タンク14を備えている。さらに、検査装置1は、流路15を介してDNAチップ載置部7と連結された廃液槽16を備えている。さらにまた、検査装置1は、廃液槽16に流路17を介して連結されたポンプ装置18を備えている。

[0079] なお、検査装置1において、流路10、11、13及び15の途中に送液遮断バルブ19A、19B、19C及び19Dが配設されている。また、検査装置1において、反応槽4、ハイブリダイズ緩衝液タンク12、洗浄液タンク14及び廃液槽16にはそれぞれ吸気バルブ20A、20B、20C及び20Dが取り付けられている。これら送液遮断バルブ19A、19B、1

9C及び19Dにより流路を開閉することができ、ポンプ装置18の圧力を送液したい流路へと誘導する。すなわち、検査装置1は、ポンプ装置18と、送液遮断バルブ19A、19B、19C及び19Dと、吸気バルブ20A、20B、20C及び20Dとを含む送液装置を備えている。この送液装置によれば、流路10、11及び13を介して検出部3へ各種溶液を送液することができ、流路15を介して廃液槽16へ廃液を送液することができる。

[0080] 検査装置1において、送液装置は、ポンプ装置18、送液遮断バルブ19A及び吸気バルブ20Aのタイミング制御によって、核酸増幅反応部2から検出部3へと送液する反応液の液量を調整することができる。しかし、検査装置1における送液装置は、核酸増幅反応部2から検出部3へ送液する反応液を計量する計量装置を流路10上に備えるものであっても良い。送液装置は、計量装置により所定量の反応液を量り取り、量り取った反応液を流路10を介して検出部3へ送液することができる。計量装置としては、特に限定されないが、例えば、ピペットや、所定の容量を有する空間部などを挙げることができる。

[0081] また、これら送液遮断バルブ19A、19B、19C及び19Dは、温度変動に伴って反応槽4やDNAチップ載置部7内の試薬が一時的に膨張、収縮する場合、流路で繋がった別の部位に移動させることができる。送液遮断バルブとしては、特に限定されないが、疎水性あるいは親水処理を施したもの、熱などによって形状変化する素材といったものを限定されることなく使用できるが、外部応力によって物理的に開閉可能な形状が好ましく、一例としてはアクチュエータによって押さえつけるダイヤフラムバルブ、あるいは回転によって開閉される回転バルブを使用することが好ましい。

[0082] 以上のように構成された検査装置1では、上述したように、指数関数的増幅期における核酸増幅反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出し、これに基づいてターゲット核酸を定量的に分析することができる。ターゲット核酸を定量的に分析するフローチャートを図3に示す。ターゲット核酸を定量的に分析するには、先ず、反応槽4において、検査対象の

遺伝子変異を含む領域の核酸増幅反応を行う。このとき、反応槽4には、核酸増幅反応に必要な試薬類からなる反応液が充填される。反応槽4に対する反応液の充填は操作者が行っても良いし、図示しない異なる流路から反応槽4に充填されても良い。また、核酸増幅反応におけるサーマルサイクルを予め設定しておくことで、設定したサーマルサイクルに従って第1温度制御部5が反応槽4内の反応液の温度、処理時間を制御することができる。

[0083] 検査装置1では、次に、指数関数的増幅期における反応液の一部を、DNAチップ6を搭載しているDNAチップ載置部7へと送液する。具体的には吸気バルブ20A及び送液遮断バルブ19A及び19Dを開放し、その他の吸気バルブ20B、20C及び20D並びに送液遮断バルブ19B及び19Cを閉塞した状態で、ポンプ装置18を作動させることで反応槽4内の反応液をDNAチップ載置部7へ送液することができる。送液のタイミングは、核酸増幅反応の開始からサーマルサイクル数をカウントし、所定のサーマルサイクル数（指数関数的増幅期にあるサーマルサイクル数）に達した時点とすることができる。

[0084] このとき、検査装置1では、第1温度制御部5によるサーマルサイクルを一時中断し、サーマルサイクルの1つの温度域（例えば95℃）で送液が完了するまで待機するように設定することができる。

[0085] また、DNAチップ載置部7には、反応液の一部に加えて、ハイブリダイズ緩衝液タンク12からハイブリダイズ緩衝液が供給される。ハイブリダイズ緩衝液をDNAチップ載置部7に供給（送液）するには、吸気バルブ20B及び送液遮断バルブ19B及び19Dを開放し、その他の吸気バルブ20A、20C及び20D並びに送液遮断バルブ19A及び19Cを閉塞した状態で、ポンプ装置18を作動させる。これにより、ハイブリダイズ緩衝液タンク12内のハイブリダイズ緩衝液をDNAチップ載置部7へ送液することができる。なお、ハイブリダイズ緩衝液は、上述したブロッキング用核酸を含む組成とすることができる。

[0086] これにより、DNAチップ載置部7において、反応液に含まれるターゲット

ト核酸及び非ターゲット核酸と、DNAチップ6の各種プローブとのハイブリダイズが進行する。このとき、DNAチップ載置部7に供給された溶液の温度を第2温度制御部8が予め設定されたハイブリダイズ温度に調節する。また、第2温度制御部8は、必要な場合は反応前に予備加熱することもできる。なお、本例では、反応液とハイブリダイズ緩衝液とをそれぞれ異なる流路で別途送液しているが、反応液とハイブリダイズ緩衝液を混合してから混合液をDNAチップ載置部7に送液することもできる。

[0087] 次に、検査装置1では、検出部3にてプローブにハイブリダイズしたターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出する。具体的には、先ず、DNAチップ載置部7に洗浄液を送液し、DNAチップ6を洗浄する。洗浄液は、洗浄液タンク14から送液することができる。洗浄液をDNAチップ載置部7に供給（送液）するには、吸気バルブ20C及び送液遮断バルブ19C及び19Dを開放し、その他の吸気バルブ20A、20B及び20D並びに送液遮断バルブ19A及び19Bを閉塞した状態で、ポンプ装置18を作動させる。この洗浄時において、第2温度制御部8は、ハイブリダイズ反応温度よりも低い洗浄温度（例えば25℃）へ下げることができる。

[0088] なお、DNAチップ6を洗浄する際には、反応液とハイブリダイズ緩衝液との混合液を廃液槽16に廃液した後、上述のように洗浄液を送液しても良いし、上述のように洗浄液を送液することで反応液とハイブリダイズ緩衝液との混合液を廃液槽16に廃液しても良い。

[0089] そして、DNAチップ6におけるターゲット核酸検出用核酸プローブ、非ターゲット核酸検出用核酸プローブ及び共通プローブを固定した表面を撮像部9で撮像し、図示しないコンピュータにおいて画像解析ソフトにより各プローブにおけるシグナル強度を測定する。また、測定したシグナル強度に基づいて、同コンピュータにてターゲット核酸を定量的に分析することができる。

[0090] 以上のように、本発明にかかる検査装置1を利用することで、核酸増幅反応の指数関数的増幅期において、核酸増幅反応液の一部を送液してDNAチ

チップ6を用いた各プローブとのハイブリダイズ反応に基づいてターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出することができる。上述した例では、反応槽4とDNAチップ載置部7とを流路10を介して連結するとともに、ポンプ装置18と送液遮断バルブ19A、19B、19C及び19Dと吸気バルブ20A、20B、20C及び20Dといった構成により核酸増幅反応液の一部を送液していた。しかし、核酸増幅反応液の一部を送液する機構（送液装置）としては、このような構成に限定されず、駆動アームに配設したピペット装置を用いて核酸増幅反応液の一部を供給することもできる。

[0091] また、図2に示した検査装置1では、ポンプ装置18が吸引することで上述した送液動作を行っていた。しかし、検査装置1は、核酸増幅反応部2、ハイブリダイズ緩衝液タンク12及び洗浄液タンク14の上流に接続されて加圧ポンプを使用することで上述した送液動作を行うことも可能である。

[0092] また、図2に示した検査装置1では、流路11を介してDNAチップ載置部7と連結されたハイブリダイズ緩衝液タンク12から直接、DNAチップ載置部7へとハイブリダイズ緩衝液が送られていたが、直接でなく予め流路10に合流してからDNAチップ載置部7へ送られても良い。

[0093] さらに、図2に示した検査装置1では、DNAチップ6を搭載できるDNAチップ載置部7を備え、DNAチップ6を着脱可能な構成とした。しかし、検査装置1は、このような構成に限定されず、検出部3に各プローブを直接固定した構成であっても良い。

[0094] また、図2に示した検査装置1では、必要に応じて、核酸増幅反応部2の上流に、被検者由来の試料から鋳型となるDNAを抽出する核酸抽出部（図示せず）を備えていてもよい。核酸抽出部は、細胞を破壊するためのブレンダー、ミキサー、ホモジナイザーなどの破砕機や、有機溶媒（フェノール／クロロホルム）、シリカメンブレン、陰イオン交換樹脂カラム、磁性ビーズなどを含む核酸抽出装置から構成することができる。

[0095] 核酸抽出部において抽出されたDNAは、核酸増幅反応に必要な試薬類と混合され、流路を介して連結された核酸増幅反応部2に送液される。抽出さ

れたDNAと試薬類との混合操作は、DNA及び試薬類のそれぞれを反応槽4へ充填した後に行ってもよい。すなわち、DNA及び試薬類を別々に反応槽4へ充填し、反応槽4内において充填されたDNA及び試薬類を混合することができる。あるいは、予めDNA及び試薬類を混合し、得られた混合物を反応槽4へ充填するように構成してもよい。

[0096] ところで、図2に示した検査装置1では、一つの反応槽4を有する核酸増幅反応部2から核酸増幅反応液の一部を送液するものであったが、本発明を適用した検査装置はこのような構成に限定されるものではない。すなわち、図8に模式的に示すように、本発明を適用した検査装置1は、複数（図8の例では7つ）の反応槽4を有する核酸増幅反応部2を備える構成であっても良い。この場合、複数の反応槽4に対しては、1つの第1温度制御部5により一括して温度制御しても良いし、複数の第1温度制御部5によりそれぞれ個別に温度制御しても良い。

[0097] また、この場合、検査装置1は、複数の反応槽4のそれぞれに接続された流路と、当該流路上に配設され、検出部3に反応液を供給する流路を複数の反応槽4間で切り換える切換装置とを有する送液装置を備える。図8の検査装置1では、複数の反応槽4のそれぞれと検出部3とは流路10を介して連結されており、流路10の途中には送液遮断バルブ19Aが配設されている。また、各反応槽4には吸気バルブ20Aが取り付けられている。複数の反応槽4に接続されたこれらの送液遮断バルブ19A及び吸気バルブ20Aが、全体として、検出部3に反応液を供給する流路を複数の反応槽4間で切り換える切換装置として機能する。すなわち、複数の反応槽4のうち特定の反応槽に接続された送液遮断バルブ19A及び吸気バルブ20Aを適切なタイミングで開放することにより、ポンプ18の圧力を送液したい流路10へと誘導し、複数の反応槽4のうち1つの反応槽4と検出部3とを連通させることができる。なお、切換装置は、必要に応じて、それぞれの送液遮断バルブ19A及び吸気バルブ20Aの開放・閉塞のタイミングを制御するための制御装置を備えることができる。

[0098] このように構成することで、図8の検査装置1では、複数の反応槽4においてそれぞれ異なるサーマルサイクル数まで核酸増幅反応を行い、それぞれの反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出することができる。これにより、上述したように、上記補正後判定値を算出し、検量線に基づいて変異割合を分析することができる。

[0099] 図9は、本発明に係る遺伝子変異の検査装置のさらに別の一例を模式的に示す構成図である。図9の検査装置1では、図8の例と同様に、複数の反応槽4を有する核酸増幅反応部2を備えている。そして、図9の例では、被検者由来の反応液が1か所から充填され、その反応液がそれぞれの反応槽4に分配されるように構成されている。あるいは、本発明を適用した検査装置はこのような構成に限定されるものではなく、複数の反応槽4のそれぞれに、異なる被検者由来の反応液が充填されるように構成してもよい。

[0100] 図8及び図9の検査装置1におけるその他の構成は、図2に示した検査装置1と同様である。

実施例

[0101] 以下、実施例を用いて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

[0102] [実施例1]

[検量線の作成]

1. 検量線サンプルの調整

本実施例では、JAK2遺伝子におけるV617F変異と、MPL遺伝子におけるW515L変異を検査対象の変異とした。各遺伝子の変異について、変異型を有する変異型プラスミドと、野生型を有する野生型プラスミドとをFASMAC社の人工遺伝子合成サービスを通じて作製した。JAK2遺伝子の野生型プラスミドとしては、配列番号1に示した塩基配列を挿入したプラスミドを用いた。MPL遺伝子の野生型プラスミドとしては、配列番号2に示した塩基配列を挿入したプラスミドを用いた。各遺伝子の変異型プラスミドとしては、上述した変異（JAK2遺伝子のV617F変異、MPL遺伝子のW515L変異）を有する以外は同じ領域を挿入

したプラスミドを用いた。

[0103] 作製した各遺伝子に関する変異型プラスミド及び野生型プラスミドについて、予めバイオラッド社製のddPCRでコピー数を定量し、JAK2 V617F変異及びMPL W515L変異のそれぞれについて変異割合が1%、5%、20%、50%又は100%となるように混合した。そして、混合したJAK2遺伝子及びMPL遺伝子それぞれについて、変異型プラスミド及び野生型プラスミドのコピー数が $4 \times 10^3 / \mu\text{L}$ あるいは $4 \times 10^4 / \mu\text{L}$ となるようにTE緩衝液で調整したものを検量線サンプルとした。

[0104] 2. PCRの実施

調製した検量線サンプル5種類（変異割合：1%、5%、20%、50%又は100%）を用いて、JAK2遺伝子、MPL遺伝子の所定の領域をそれぞれのプライマーセットを加えて同時に増幅した。このPCRに際して表2に示すプライマーセットを設計した。なお、表2に示したプライマーセットのうち、「F」を付したフォワードプライマーに蛍光標識（IC5）を付加している。

[0105] [表2]

| プライマー名称 | 配列 (5' to 3') | 配列番号 |
|---------|-------------------------------------|--------|
| JAK2-F | GAGCAAGCTTTCTCACAAGCATTTGG | 配列番号 3 |
| JAK2-R | CTGACACCTAGCTGTGATCCTGAAACTG | 配列番号 4 |
| MPL-F | CTCCTAGCCTGGATCTCCTTGG | 配列番号 5 |
| MPL-R | ACAGAGCGAACCAAGAATGCCTGTTTAC | 配列番号 6 |

[0106] 以上のように設計したプライマーセットを表3の組成となるよう混合し、プライマーミックスを調製した。

[0107] [表3]

| 試薬名称 | 混合後濃度 (μM) |
|-----------|-------------------------|
| TE buffer | |
| JAK2-F | 1.2 |
| JAK2-R | 0.4 |
| MPL-F | 3.8 |
| MPL-R | 0.95 |

[0108] そして、検量線サンプル及びプライマーミックスを用いて表4に示す組成のPCR反応液を調製した。

[0109] [表4]

| 試薬名称 | 製造元 | 容量 (μL) |
|------------------------------|----------------------|---------|
| 10xPCR Buffer | ロッシュ・ダイアグノスティックス | 4.0 |
| 10mM dNTP mix | ロッシュ・ダイアグノスティックス | 0.8 |
| Faststart DNA taq polymerase | ロッシュ・ダイアグノスティックス | 0.4 |
| プライマーミックス | サーモフィッシャー・サイエンティフィック | 4.0 |
| 検量線サンプル | | 20.0 |
| 精製水 | | 10.8 |

[0110] 以上のように調製したPCR反応液を用いてPCRのサーマルサイクルを95℃で5分間の後、95℃で30秒、59℃で30秒及び72℃で45秒を1サイクルとして25、28、31、34、37サイクル行い、その後、72℃で10分間とし、最終的に4℃を維持した。

[0111] 3. DNAチップ

本実施例では、JAK2遺伝子におけるV617F変異、MPL遺伝子におけるW515L変異に対応する変異型プローブ（ターゲット核酸検出用核酸プローブ）とこれに対応する野生型プローブ（非ターゲット核酸検出用核酸プローブ）、及び野生型並びに変異型に共通する共通プローブを設計した。共通プローブは、増幅核酸に含まれる遺伝子変異が存在するか存在しないかに関わらず当該増幅核酸に対して特異的にハイブリダイズする。設計したプローブの塩基配列を表5に示した。

[0112] [表5]

| プローブ名称 | 配列 (5' to 3') | 配列番号 |
|----------------|-----------------------------|---------|
| JAK2 V617F 野生型 | TCTCCACAGACACATACTCC | 配列番号 7 |
| JAK2 V617F 変異型 | TCTCCACAGAAACATACTCC | 配列番号 8 |
| JAK2 共通プローブ | GGCATTAGAAAGCCTGTAG | 配列番号 9 |
| MPL W515L 野生型 | AAACTGCCACCTCAGC | 配列番号 10 |
| MPL W515L 変異型 | GGAAACTGCAACCTCAG | 配列番号 11 |
| MPL 共通プローブ | CCAGCACTAGATGCAGA | 配列番号 12 |

[0113] 4. ハイブリダイズ反応液の調整

本実施例では、PCRのサーマルサイクルを経て増幅された25サイクル、28サイクル、31サイクル、34サイクル、37サイクルの各PCR増幅産物を含む反応液30 μ Lと、ハイブリダイズ緩衝液（2.25 \times SSC/0.23%SDS/0.2nM JAK2遺伝子用ブロッカー50nM, MPL遺伝子用ブロッカー50nM（ともにサーモフィッシャー・サイエンティフィック製））15 μ Lを指定のPCRチューブ（4titude製4ti-0750/TA）に加え、泡立てないようにピペティングで数回攪拌した。JAK2遺伝子用ブロッカー及びMPL遺伝子用ブロッカーの配列を表6に示した。

[0114] [表6]

| ブロッカー名称 | 配列 (5' to 3') | 配列番号 |
|----------------|---------------------|---------|
| JAK2 遺伝子用ブロッカー | CTCCACAGACACATACTCC | 配列番号 13 |
| MPL 遺伝子用ブロッカー | AAACTGCCACCTCAGC | 配列番号 14 |

[0115] 5. ハイブリダイズ反応

上記3. で説明した各種プローブを固定化したDNAチップを、遺伝子解析装置BIOSHOT HT-32（東洋鋼鈑製）にセットしてハイブリダイズ反応を実施した。上記4. で調製した溶液を含むPCRチューブ、指定のPCRチューブに挿入するためにDNAチップを固定したDNAチップニードル、さらに、DNAチップのハイブリダイズ反応後、余分な試薬を洗浄するための洗浄液（0.1 \times SSC/0.1%SDS溶液、室温）、リンス液（1 \times SSC溶液、室温）、蛍光検出用の検出液（1 \times SSC溶液、室温）をBIOSHOT HT-32内にセットし、運転を開始した。

[0116] 自動運転により、指定のPCRチューブ内の反応液が49.5 $^{\circ}$ Cに加熱された状態で、DNAチップニードルが挿入され、ハイブリダイズ反応を30分間実行した。ハイブリダイズ反応後に、DNAチップニードルを洗浄液槽内に素早く浸漬し、DNAチップが洗浄液水面に出入りするよう30回攪拌した。洗浄後のDNAチップニードルはリンス液槽内に浸漬され、DNAチップがリンス液水面を出入りするよう80回攪拌した。

[0117] リンス後のDNAチップニードルを検出液槽にゆっくりと浸漬し、640nmの単波長レーザーの照射によって、CCDカメラに2秒間励起光を取り込んだ。

[0118] 6. 検量線の作成

本実施例において、得られた蛍光強度値はプローブがスポットされていない箇所をバックグラウンド値として事前に差し引いた値を使用した。まず変異割合100%の検量線サンプル（以下、M100）から得られた温度サイクル毎の蛍光強度値（5種類）のうち、 $TTh.MPFI_{n+1}-1000=TTh.MPFI_n$ が成り立つよう、最大値から1000ずつ最小値付近まで下げた場合の複数のTTh.MPFIを設定した。

[0119] 複数のTTh.MPFIは各々の実測値であるMPFIの差分 $\Delta MPFI$ の絶対値が最小となるNear.Ct(1)をそれぞれ算出した。そしてNear.Ctにおける判定値、および補正係数A、TTh.CPFIを設定した。なお、本実施例では、式： $[MPFI]/[CPFI]$ により判定値を算出し、M100における判定値の逆数（すなわち、 $[CPFI]/[MPFI]$ ）を補正係数Aとした。

[0120] 次に、変異割合1%、5%、20%及び50%の検量線サンプル（以下、M1、M5、M20及びM50）について、M100から得られたTTh.CPFIを用いてM1、M5、M20及びM50の実験値であるCPFIとの差分 $\Delta CPFI$ の絶対値が最小となるNear.Ct(2)を算出した。またNear.Ct(2)におけるM1、M5、M20及びM50の判定値を算出し、判定値に補正係数Aを乗じて補正後判定値をそれぞれ算出した。

[0121] X軸にM1、M5、M20、M50及びM100の補正後判定値、Y軸に既知の変異割合をプロットした散布図を作成し、最小二乗法を用いた線形近似直線Iを作成した。またX軸にM1、M5、M20、M50、M100の補正後判定値の対数変換値（Log%）、Y軸に既知の変異割合の対数変換値（Log%）をプロットした散布図を作成し、最小二乗法を用いた線形近似直線IIを作成した。

[0122] 7. 結果

代表的な例として、JAK2遺伝子におけるV617F変異について、TTh.MPFIを5000、15000、30000及び60000として得られた線形近似直線I及び線形近似直線IIを図4に示した。また、MPL遺伝子におけるW515L変異について同様に得られた線形近似直線I及び線形近似直線IIを図5に示した。さらに、比較のため、PCRのエンドポイントである37サイクルにおいて計算された判定値を用いた線形近似直線I及び線形近似直線IIを図6に示した（比較例）。これら図4～6

に示した結果を表7にまとめた。

[0123] [表7]

| | TTh.MPFI | JAK2 V617F | | | | | | MPL W515L | | | | | |
|-----|----------|------------|----|----|------------|----|----|------------|----|----|------------|----|----|
| | | 2E+03 copy | | | 2E+04 copy | | | 2E+03 copy | | | 2E+04 copy | | |
| | | n1 | n2 | n3 | n1 | n2 | n3 | n1 | n2 | n3 | n1 | n2 | n3 |
| 実施例 | 1000 | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × |
| | 5000 | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | ○ | ○ | ○○ |
| | 15000 | ○○ | ○○ | × | ○○ | ○○ | ○○ | ○○ | ○○ | ○○ | ○○ | ○○ | × |
| | 30000 | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | ○○ | × |
| | 45000 | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × |
| | 60000 | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × |
| 比較例 | Endpoint | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × | × |

[0124] 表7において、「○」は線形近似直線Iの決定係数が $R^2 \geq 0.99$ のときであり、直線性ありを意味している。また、「×」は同決定係数が $R^2 < 0.99$ のときであり、直線性なしを意味している。「○○」は線形近似直線Iの決定係数が $R^2 \geq 0.99$ のときであり、かつ線形近似直線IIの決定係数が最も高い条件を示している。表7における「○○」を付した条件であれば、判定値に基づいて変異割合を正確に算出することができる。

[0125] これら線形近似直線I及び線形近似直線IIに基づいて「○○」となるTTh.MPFI及びTTh.CPFIを真のTh.MPFI及びTh.CPFIとし、最近接温度サイクル値 (Near.Ct(1))、補正係数Aと合わせて表8 (JAK2遺伝子) 及び表9 (MPL遺伝子) に示した。また、表8及び9には、「○○」となった条件の線形近似直線I及び線形近似直線IIをそれぞれ $y=ax+b$ と表したときのa及びbの値、並びに検量線に関する R^2 の値を示した。表8及び9で決定された線形近似直線IIを検量線と設定した。

[0126]

[表8]

| | JAK2 V617F | | | | | |
|-------------------------|------------|---------|---------|------------|---------|---------|
| | 2E+03 copy | | | 2E+04 copy | | |
| | n1 | n2 | n3 | n1 | n2 | n3 |
| 真の Th.MPFI | 15000 | 15000 | 5000 | 15000 | 15000 | 15000 |
| 真の Th.CPFI | 11234 | 14987 | 4111 | 7666 | 9345 | 12671 |
| Near. Ct ₍₁₎ | 34 | 34 | 31 | 28 | 28 | 28 |
| 補正係数 A | 0.673 | 0.714 | 0.655 | 0.725 | 0.759 | 0.718 |
| I-a | 0.9963 | 1.0142 | 0.9783 | 1.0118 | 1.0131 | 1.0117 |
| I-b | -0.0119 | -0.0395 | -0.0093 | -0.0195 | -0.0234 | -0.0047 |
| I-R ² | 0.9974 | 0.9947 | 0.9921 | 0.9992 | 0.9986 | 0.9995 |
| II-a | 1.1735 | 1.1821 | 1.1422 | 1.1126 | 1.1572 | 1.1276 |
| II-b | -0.3039 | -0.3706 | -0.2551 | -0.2182 | -0.2959 | -0.2119 |
| II-R ² | 0.9881 | 0.9999 | 0.9674 | 0.9999 | 0.9973 | 0.9977 |

[0127] [表9]

| | MPL W515L | | | | | |
|------------------------|------------|---------|---------|------------|---------|---------|
| | 2E+03 copy | | | 2E+04 copy | | |
| | n1 | n2 | n3 | n1 | n2 | n3 |
| 真の Th.MPFI | 15000 | 15000 | 15000 | 15000 | 30000 | 5000 |
| 真の Th.CPFI | 18987 | 18258 | 16647 | 22026 | 26379 | 2107 |
| Near.Ct ₍₁₎ | 31 | 31 | 31 | 28 | 28 | 25 |
| 補正係数 A | 2.026 | 1.772 | 1.757 | 1.587 | 1.463 | 0.994 |
| I-a | 1.0450 | 1.0340 | 1.0271 | 1.0215 | 1.0255 | 1.0440 |
| I-b | -0.0594 | -0.0151 | -0.0178 | -0.0160 | -0.0113 | -0.0568 |
| I-R ² | 0.9942 | 0.9958 | 0.9990 | 0.9993 | 0.9965 | 0.9962 |
| II-a | 1.3994 | 1.3432 | 1.2941 | 1.2146 | 1.2127 | 1.6041 |
| II-b | -0.7540 | -0.5758 | -0.5030 | -0.3719 | -0.3593 | -1.0980 |
| II-R ² | 0.9940 | 0.9841 | 0.9855 | 0.9938 | 0.9942 | 0.9075 |

[0128] [実施例 2]

[検量線の作成]

1. 検量線サンプルの調製

本実施例では、JAK2遺伝子及びMPL遺伝子それぞれについて、変異型プラスミド及び野生型プラスミドのコピー数を $2.4 \times 10^3 / \mu\text{L}$ とした以外は実施例 1 と同様に検量線サンプルを準備した。

[0129] 2. PCRの実施

本実施例では、PCRの温度サイクルを22、25、28、31、34、37又は40サイクル行った以外は実施例1と同様にPCRを実施した。

[0130] 3. DNAチップ

DNAチップの条件は実施例1と同じとした。

[0131] 4. ハイブリダイズ反応液の調製

本実施例では、PCRのサーマルサイクルを経て増幅された22サイクル、25サイクル、28サイクル、31サイクル、34サイクル、37サイクル、40サイクルの各PCR増幅産物を含む反応液を使用した以外は実施例1と同様に反応液を調製した。

[0132] 5. ハイブリダイズ反応

ハイブリダイズ反応条件は実施例1と同じとした。

[0133] 6. 検量線の作成

本実施例においても蛍光強度はプローブがスポットされていない箇所をバックグラウンド値として事前に差し引いた値を使用した。本実施例では、変異割合100%の検量線サンプル（以下、M100）から得られた温度サイクル毎の蛍光強度値（22、25、28、31、34、37及び40サイクル）をX軸にサーマルサイクル数、Y軸に蛍光強度をプロットした散布図を作成し、最小二乗法を用いて6次多項近似式 ($y=a_6x^6+a_5x^5+a_4x^4+a_3x^3+a_2x^2+a_1x+b$) を算出した。JAK2遺伝子におけるV617F変異、MPL遺伝子におけるW515L変異のそれぞれについて算出した6次多項近似式の係数 $a_1\sim a_6$ 及び b は表10の通りである。

[0134] [表10]

| | JAK2 V617F | MPL W515L |
|----|------------|-----------|
| a6 | 0.003216 | -0.01159 |
| a5 | -0.69947 | 2.26169 |
| a4 | 59.35738 | -182.006 |
| a3 | -2549.41 | 7722.421 |
| a2 | 59059.75 | -182045 |
| a1 | -705035 | 2259475 |
| b | 3407405 | -11533009 |

[0135] そして、実施例1と同様に、まずM100について $TTh.MPFI_{n+1}-1000=TTh.MPFI_n$ が成り立つよう、最大値から1000ずつ最小値付近まで下げた場合の複数の $TTh.MPFI$ を設定し、算出した多項近似式へ代入することで、 $Calc.Ct$ を得た。得られた $Calc.Ct$ と実際の温度サイクル値との差分 ΔCt が最も小さくなる Ct を $Near.Ct(1)$ とした。実施例1と同様にして、 $Near.Ct(1)$ における判定値及び補正係数A、 $TTh.CPFI$ を設定した。

[0136] 次にM1、M5、M20、M50について、仮の $Th.CPFI$ と各々の実験値である $CPFI$ との差分 $\Delta CPFI$ の絶対値が最小となる $Near.Ct(2)$ を算出し、 $Near.Ct(2)$ における判定値を算出し、補正係数Aを乗じた。

[0137] X軸に補正後判定値、Y軸に既知の変異割合をプロットした散布図を作成し、最小二乗法を用いた線形近似直線Iを作成した。またX軸に補正後判定値の対数変換値、Y軸に既知の変異割合の対数変換値をプロットした散布図を作成し、最小二乗法を用いた線形近似直線IIを作成した。なお、比較のため、エンドポイント40サイクルの判定値で検量線を作成した。

[0138] 7. 結果

本実施例では検量線及び対数変換後検量線の図示はしないが、設定した $TTh.MPFI$ のうち、検量線に用いる判定値の組み合わせが変わった代表例を表11に示した。

[0139] [表11]

| | 仮の Th.MPFI | JAK2 V617F 1.2E+04 copy | MPL W515L 1.2E+04 copy |
|-----|---------------|----------------------------|---------------------------|
| 実施例 | 1000 | × | × |
| | 3000 | ○ | ○○ |
| | 5000 | ○ | × |
| | 11000 | ○ | × |
| | 30000 | ○○ | × |
| | 40000 | × | × |
| 比較例 | Endpoint | × | × |

[0140] 表11において、「○」は線形近似直線Iの決定係数が $R^2 \geq 0.99$ のときであり、直線性ありを意味している。また、「×」は同決定係数が $R^2 < 0.99$ のとき

であり、直線性なしを意味している。「〇〇」は線形近似直線Iの決定係数が $R^2 \geq 0.99$ のときであり、かつ線形近似直線IIの決定係数が最も高い条件を示している。表11における「〇〇」を付した条件であれば、判定値に基づいて変異割合を正確に算出することができる。

[0141] これら線形近似直線I及び線形近似直線IIに基づいて「〇〇」となるTTh, MPFI及びTTh, CPF Iを真のTh, MPFI及びTh, CPF Iとし、最近接温度サイクル値 (Near.Ct(1))、補正係数Aと合わせて表12に示した。また、表12には、「〇〇」となった条件の線形近似直線I及び線形近似直線IIをそれぞれ $y=ax+b$ と表したときのa及びbの値、並びに検量線に関する R^2 の値を示した。表12で決定された線形近似直線IIを検量線と設定した。

[0142] [表12]

| | JAK2 V617F | MPL W515L |
|------------------------|--------------|--------------|
| | 1.2E+04 copy | 1.2E+04 copy |
| 真の Th.MPFI | 30000 | 3000 |
| 真の Th.CPFI | 22373 | 4431 |
| Calc.Ct | 36.81 | 30.20 |
| Near.Ct ₍₁₎ | 37 | 31 |
| 補正係数 A | 0.724 | 1.178 |
| I-a | 1.0004 | 1.0654 |
| I-b | -0.0418 | -0.0977 |
| I-R ² | 0.9903 | 0.9919 |
| II-a | 1.2054 | 1.6121 |
| II-b | -0.4152 | -1.1561 |
| II-R ² | 0.9989 | 0.9888 |

[0143] [実施例3]

[変異割合定量試験]

1. 検量線

本実施例では、実施例2で作成した真のTh, CPF I及び対数化した検量線 (線形近似曲線II) を使用した。すなわち、JAK2遺伝子のV617F変異については、式： $y=1.2054x - 0.4152$ を適用して、Th, CPF I=22373、補正係数A=0.724とした。MPL遺伝子のW515L変異については、式： $y=1.6121x-1.1561$ を適用して、Th,

CPFI=4431、補正係数A=1.178とした。

[0144] 2. 定量用サンプルの調製

本実施例では、実施例1及び2で使用したプラスミドDNAをJAK2及びMPLの変異割合がそれぞれ0%、0.25%、0.5%、1%、2.5%、5%、10%又は100%となるように混合し、Qubit（サーモフィッシャー・サイエンティフィック製）で濃度定量し、混合したプラスミドDNAが0.04~0.4pg/ μ LとなるようにTE緩衝液を用いて希釈したものを定量用サンプルとした。

[0145] 3. PCRの実施

定量用サンプル8種類（0%、0.25%、0.5%、1%、2.5%、5%、10%、100%）を用いて、JAK2遺伝子、MPL遺伝子の所定の領域を、実施例1で使用したプライマーセットを用いて同時に増幅した。反応液の組成を表13に示した。

[0146] [表13]

| 試薬名称 | 製造元 | 容量 (μ L) |
|--------------------------------|----------------------|---------------|
| 10xPCR Buffer | ロッシュ・ダイアグノスティックス | 4.0 |
| 10mM dNTP mix | ロッシュ・ダイアグノスティックス | 0.8 |
| Faststart DNA taq polymerase | ロッシュ・ダイアグノスティックス | 0.4 |
| プライマーミックス | サーモフィッシャー・サイエンティフィック | 4.0 |
| 定量用サンプル (0.04~0.4 pg/ μ L) | | 10.0 |
| 精製水 | | 20.8 |

[0147] 以上のように調製したPCR反応液を用いてPCRのサーマルサイクルを95°Cで5分間の後、95°Cで30秒、59°Cで30秒及び72°Cで45秒を1サイクルとして22、25、28、31、34、37、40サイクル行い、その後、72°Cで10分間とし、最終的に4°Cを維持した。

[0148] 本実施例では、実施例2と同じDNAチップ及びハイブリダイズ反応液を準備し、実施例2と同条件でハイブリダイズ反応を行った。

[0149] 4. 判定値の算出

実施例2で得たTh.CPFIを閾値として、実施例3で得た実験値のCPFIとの差分 Δ CPFIが最も小さくなる温度サイクルのMPFIとCPFIの比を算出し、同じく実施例2で得た補正係数Aを乗じて判定値を算出した。すなわち、判定値=[MPFI]/[CPFI] \times 補正係数Aで求めた。得られた判定値は対数変換し、実施例2で

得た検量線に代入し変異割合へと変換した。

[0150] X軸にddPCRで測定した変異割合 (Log%)、Y軸に検量線を用いて換算した変異割合をプロットし、最小二乗法を用いて線形近似した結果を図7に示した。図7に示すように、決定係数 $R^2 \geq 0.95$ 以上となっており、非常に相関性の高い結果が得られた。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 検査対象の遺伝子変異を含む領域を増幅する核酸増幅反応を実施する工程と、
- 上記核酸増幅反応の指数関数的増幅期において反応液に含まれる、上記遺伝子変異における検出対象塩基を含むターゲット核酸及び検出対象塩基に対応する非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸を、上記ターゲット核酸における検出対象塩基を含む領域に対して相補的な配列を有するターゲット核酸検出用核酸プローブと、上記非ターゲット核酸における非検出対象塩基を含む領域に対して相補的な配列を有する非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記ターゲット核酸及び上記非ターゲット核酸に共通する共通領域であって上記検出対象塩基若しくは上記非検出対象塩基を含む領域と重複しない共通領域に対して相補的な配列を有する共通プローブとを用いて検出する工程と、
- 上記反応液に含まれるターゲット核酸を定量分析する工程とを含む、
- 遺伝子変異の検査方法。
- [請求項2] 上記検出する工程では、上記核酸増幅反応において、反応液の一部を複数回取り出し、取り出した反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出して、検出したターゲット核酸及び非ターゲット核酸に基づいて指数関数的増幅期における検出結果とすることを特徴とする請求項1記載の遺伝子変異の検査方法。
- [請求項3] 上記核酸増幅反応を実施する工程では、予め複数に取り分けた反応液についてそれぞれ異なるサーマルサイクル数まで核酸増幅反応を行い、上記検出する工程では、それぞれの反応液に含まれるターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出して、検出したターゲット核酸及び非ターゲット核酸に基づいて指数関数的増幅期における検出結果とすることを特徴とする請求項1記載の遺伝子変異の検査方法。
- [請求項4] 上記検出する工程では、上記ターゲット核酸検出用核酸プローブと

、上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブとを担体に固定したDNAチップを使用することを特徴とする請求項1記載の遺伝子変異の検査方法。

[請求項5] 上記定量分析する工程では、上記ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度と、上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブからのシグナル強度とに基づいて、検査対象の遺伝子変異における検出対象塩基の存在割合を算出することを特徴とする請求項1記載の遺伝子変異の検査方法。

[請求項6] 上記定量分析する工程では、ターゲット核酸と非ターゲット核酸とを既知の割合で含むサンプルを複数用いて作成した検量線を用い、上記ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度と、上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブからのシグナル強度とに基づいて、検査対象の遺伝子変異における検出対象塩基の存在割合を定量することを特徴とする請求項1記載の遺伝子変異の検査方法。

[請求項7] 上記定量分析する工程では、ターゲット核酸と非ターゲット核酸とを既知の割合で含むサンプルを複数用いて作成した検量線を用い、上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブからのシグナル強度が上記検量線に基づいて決められた所定の値を超えた場合に核酸増幅反応が指数関数的増幅期にあると判断することを特徴とする請求項1記載の遺伝子変異の検査方法。

[請求項8] 上記定量分析する工程では、式：
$$\frac{\text{[ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度]}}{\text{([ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度]+[非ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度])}}$$
で算出した判定値、又は、式：
$$\frac{\text{[ターゲット核酸検出用核酸プローブからのシグナル強度]}}{\text{[共通プローブからのシグナル強度]}}$$
で算出した判定値を用いることを特徴とする請求項1記載の遺伝子変異の検査方法。

[請求項9] 上記検出する工程は、上記非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸に対して相補的な塩基配列を含むブロッキング用核酸の存在下で行うことを特徴とする請求項1記載の遺伝子変異の検査方法。

[請求項10] 検査対象の遺伝子変異を含む領域を増幅する核酸増幅反応を行う核酸増幅反応部と、

上記核酸増幅反応部から反応液が供給され、上記遺伝子変異における検出対象塩基を含むターゲット核酸における検出対象塩基を含む領域に対して相補的な配列を有するターゲット核酸検出用核酸プローブと、検出対象塩基に対応する非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸における非検出対象塩基を含む領域に対して相補的な配列を有する非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記ターゲット核酸及び上記非ターゲット核酸に共通する共通領域であって上記検出対象塩基若しくは上記非検出対象塩基を含む領域と重複しない共通領域に対して相補的な配列を有する共通プローブとを用いて少なくともターゲット核酸を検出する検出部と、

上記核酸増幅反応部から反応液を分取して、分取した反応液を上記検出部に供給する送液装置と

を備える遺伝子変異の検査装置。

[請求項11] 上記送液装置は、上記検出部に供給する1回分の反応液を量り取る計量装置を備えることを特徴とする請求項10記載の検査装置。

[請求項12] 上記核酸増幅反応部は、検査対象の遺伝子変異を含む領域を増幅する核酸増幅反応を行う複数の反応槽を備え、

上記送液装置は、上記検出部に反応液を供給する流路を上記複数の反応槽間で切り換える切換装置を含み、当該切換装置により反応液を分取することを特徴とする請求項10記載の遺伝子変異の検査装置。

[請求項13] 上記検出部は、上記ターゲット核酸検出用核酸プローブ及び上記非ターゲット核酸検出用核酸プローブ又は上記共通プローブを担体に固定したDNAチップを搭載するDNAチップ載置部を備えることを特

徴とする請求項10記載の遺伝子変異の検査装置。

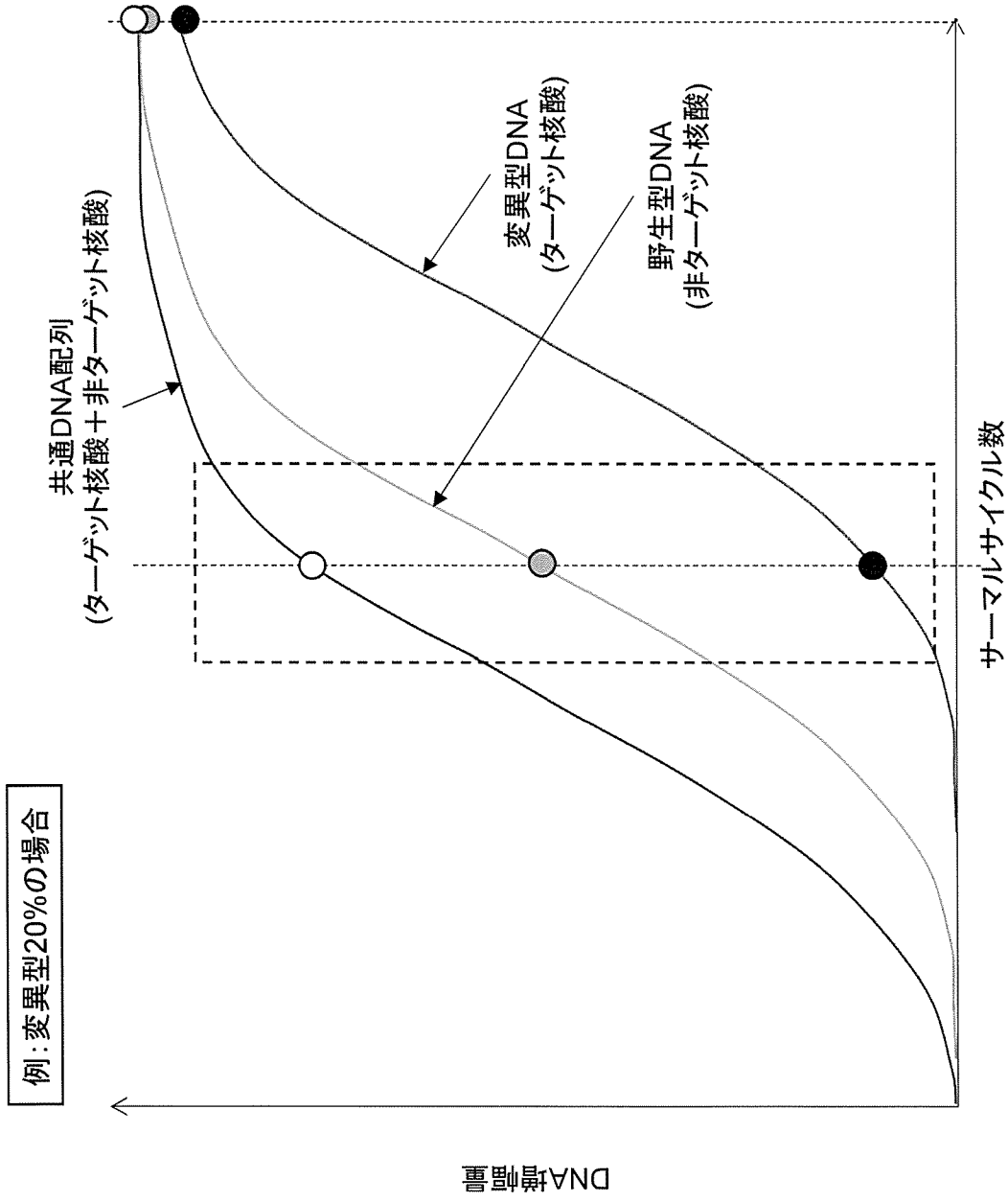
[請求項14] 上記検出部は、上記共通プローブにて、ターゲット核酸及び非ターゲット核酸を検出することを特徴とする請求項10記載の遺伝子変異の検査装置。

[請求項15] 上記送液装置は、上記核酸増幅反応部と上記検出部とを連結する流路、当該流路上に配設されたバルブ、当該流路に接続されたポンプ装置を備えることを特徴とする請求項10記載の遺伝子変異の検査装置。

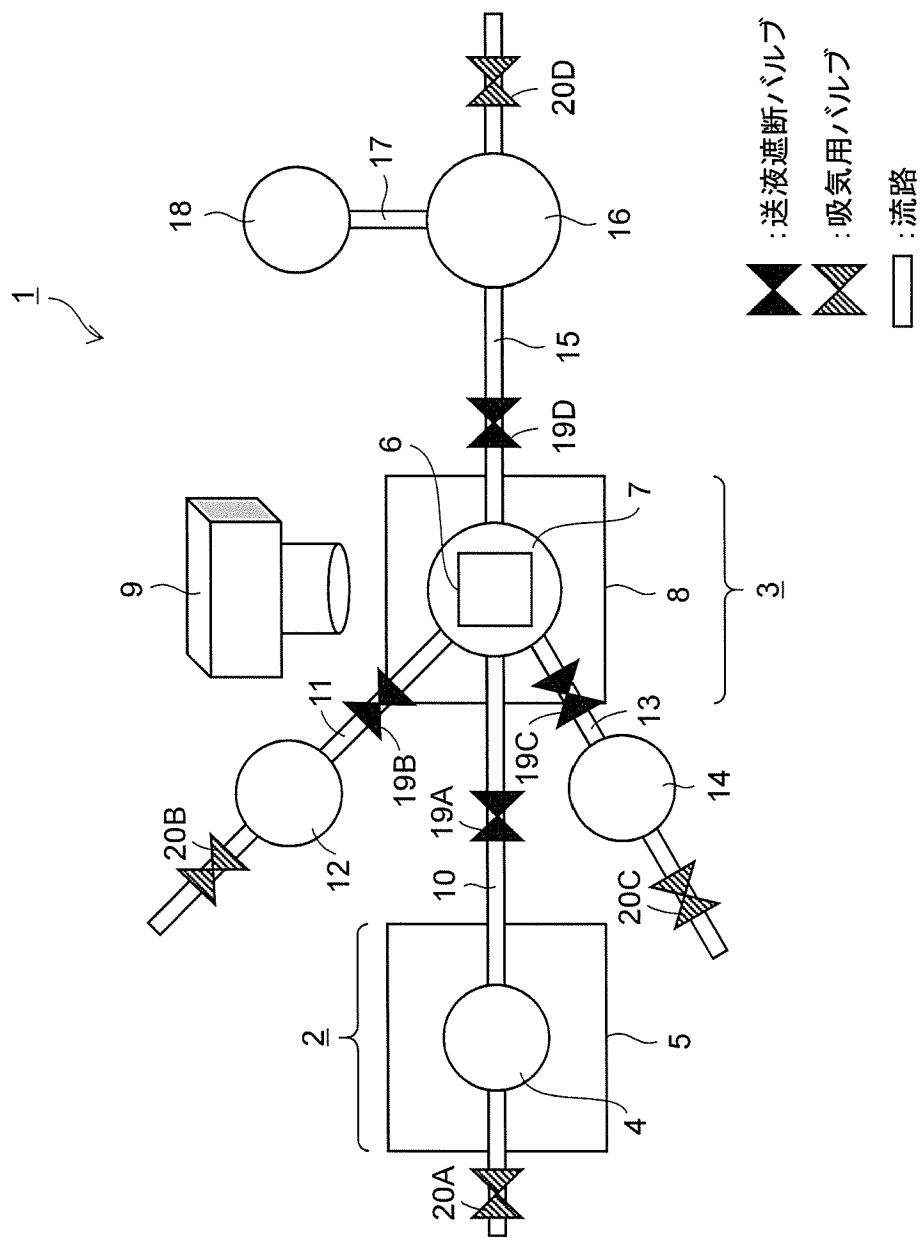
[請求項16] 上記検出部に対して、ハイブリダイズ緩衝液を供給するハイブリダイズ緩衝液タンクを備え、上記送液装置は、上記核酸増幅反応部から核酸増幅反応の反応液を上記検出部に供給するとともに、上記ハイブリダイズ緩衝液タンクからハイブリダイズ緩衝液を上記検出部に供給することを特徴とする請求項10記載の遺伝子変異の検査装置。

[請求項17] 上記ハイブリダイズ緩衝液は、上記非検出対象塩基を含む非ターゲット核酸に対して相補的な塩基配列を含むブロッキング用核酸を含むことを特徴とする請求項16記載の遺伝子変異の検査装置。

[図1]



[図2]

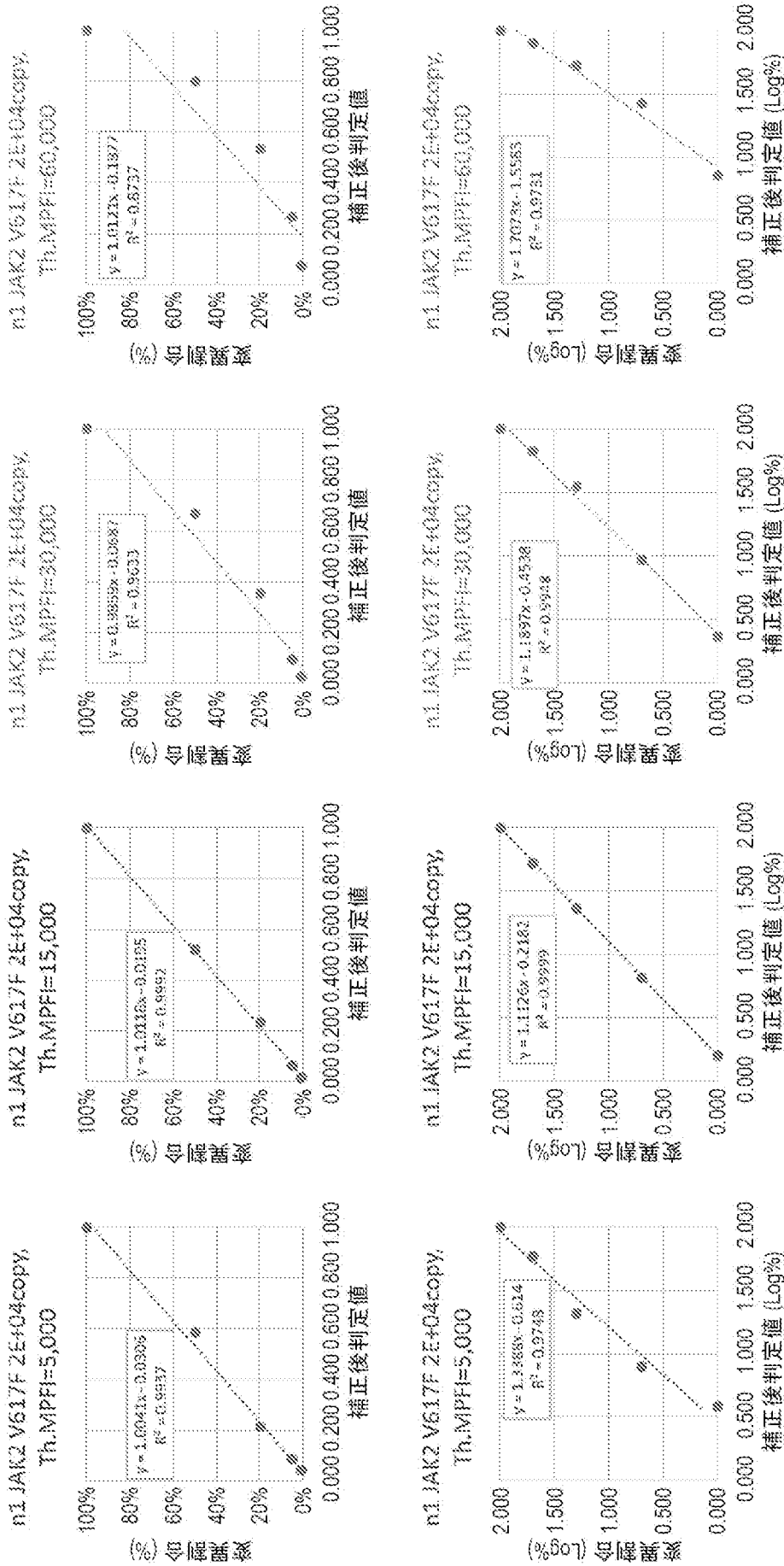


[図3]

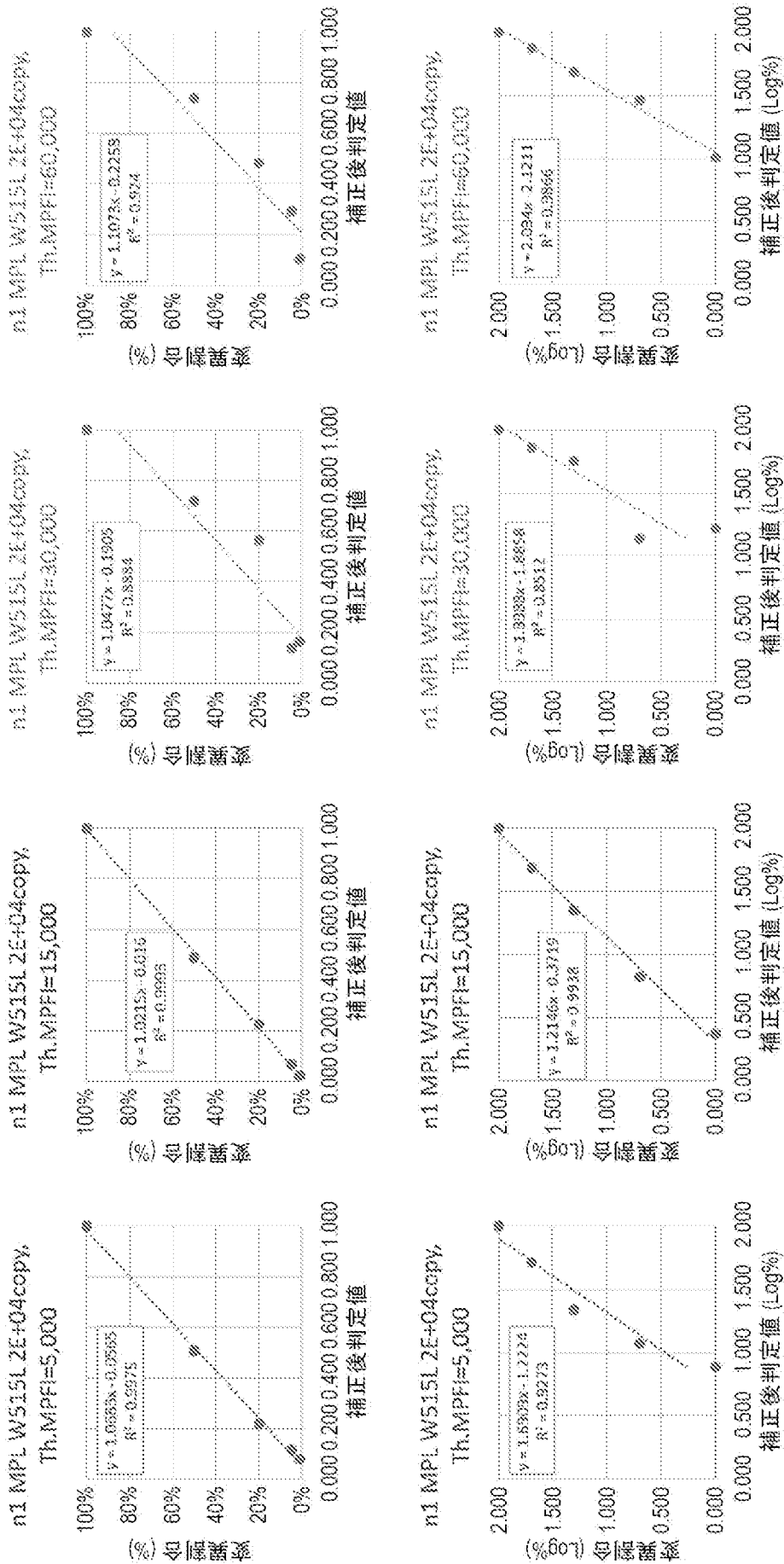


PCR中の試薬分注

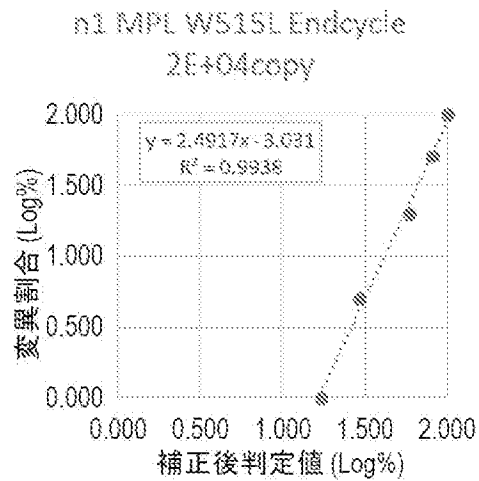
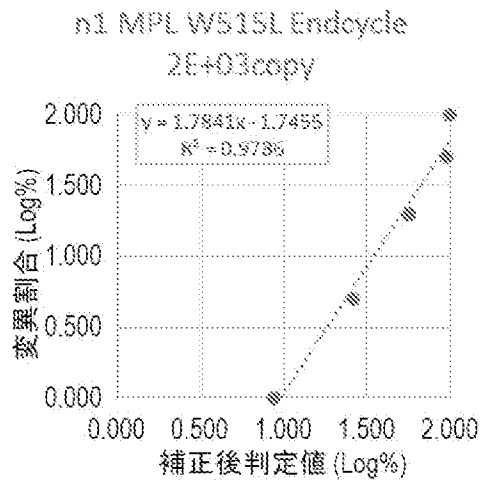
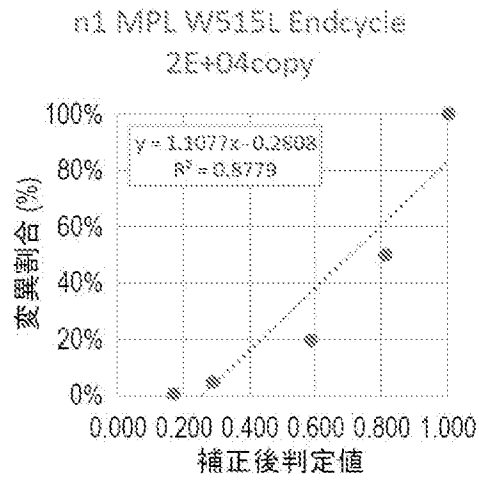
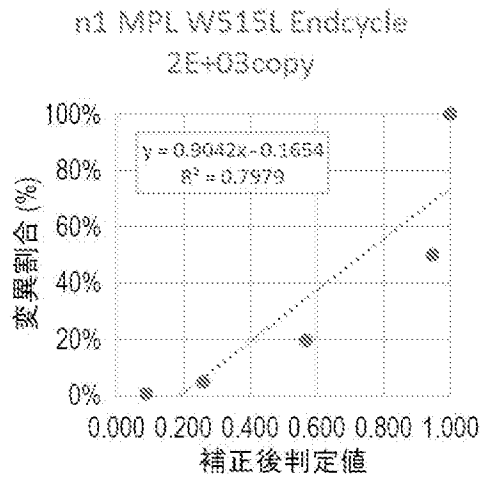
[図4]



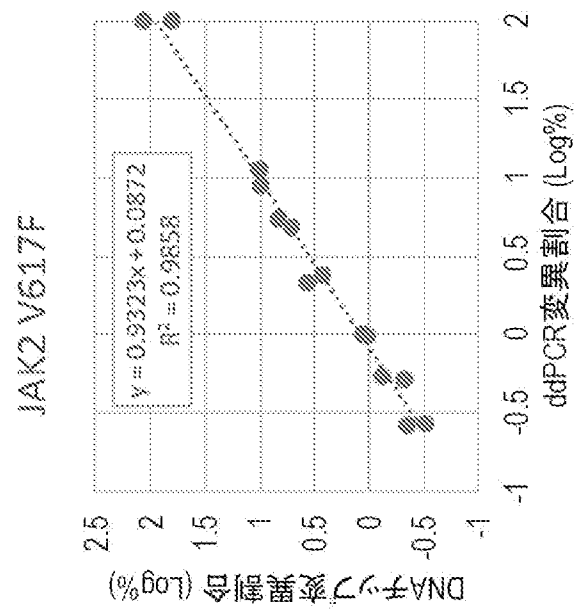
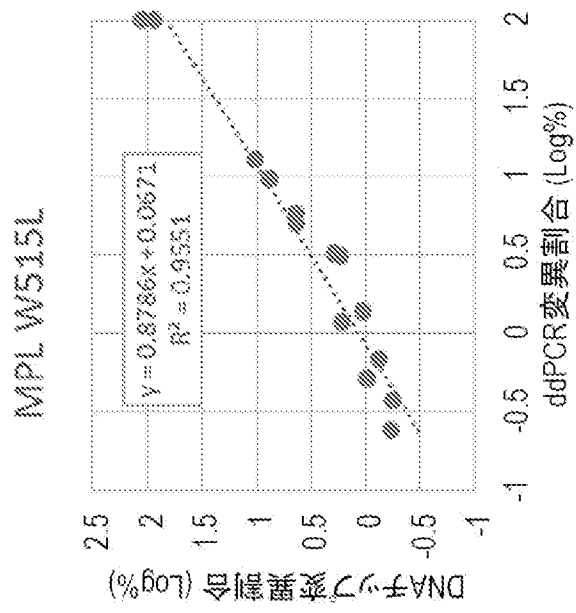
[図5]



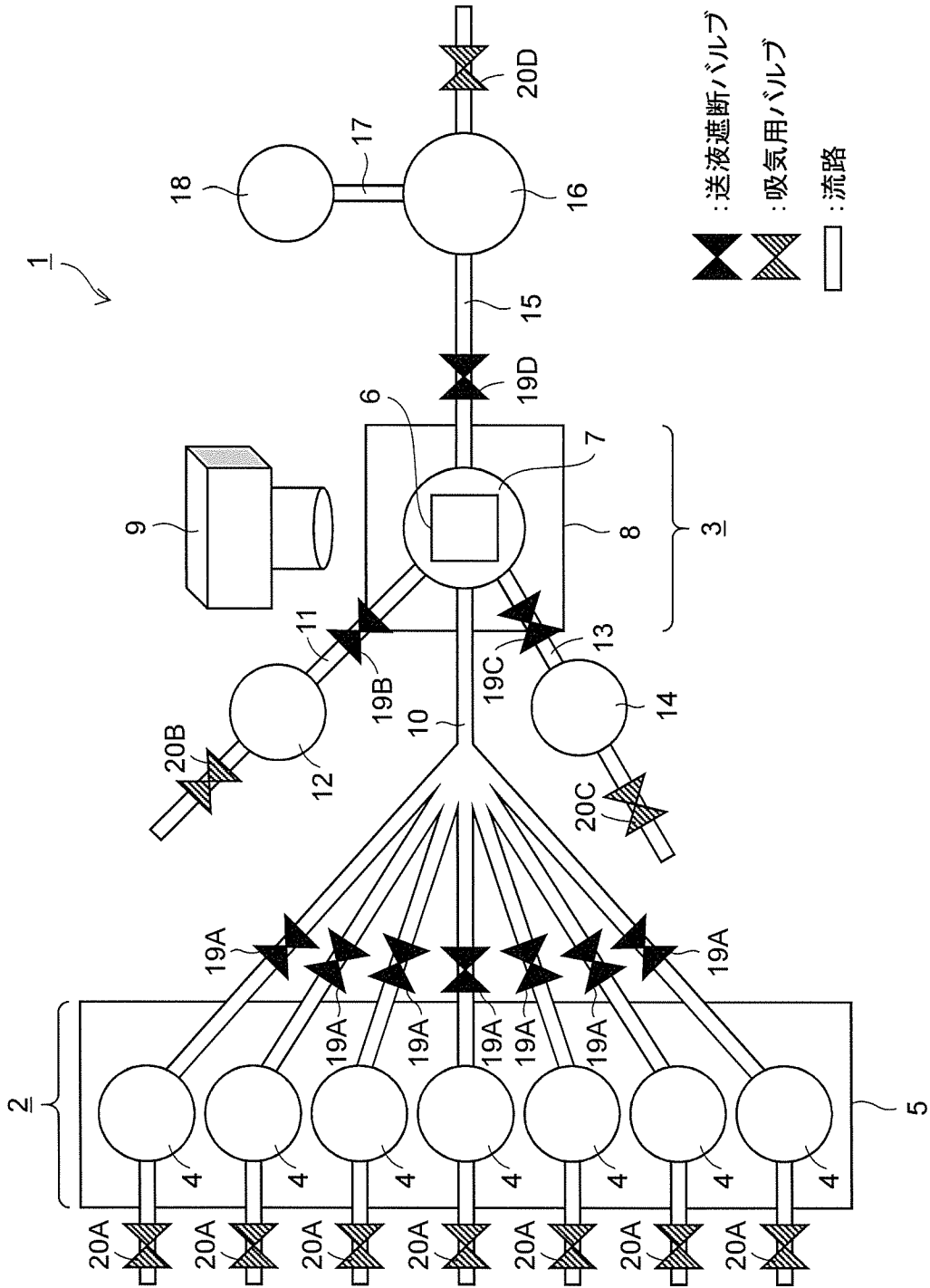
[図6]



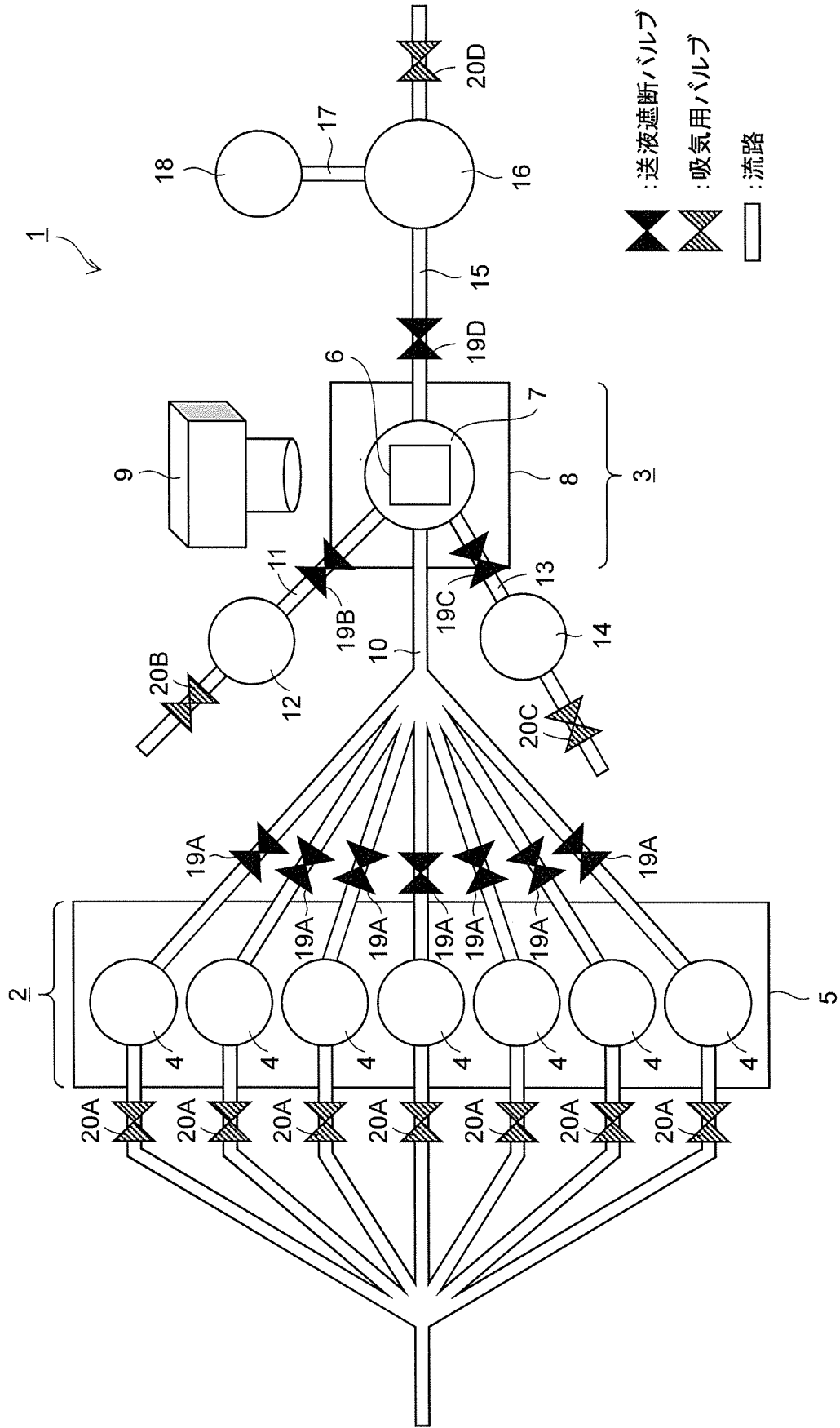
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/005576

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|--|---|--|
| <i>C12Q 1/6883</i> (2018.01)i; <i>C12M 1/34</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/12</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/6837</i> (2018.01)i; <i>C12Q 1/6844</i> (2018.01)i FI: C12Q1/6883 Z ZNA; C12Q1/6837 Z; C12M1/34 B; C12N15/12; C12Q1/6844 Z | | |
| 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) C12Q1/6883; C12M1/34; C12N15/12; C12Q1/6837; C12Q1/6844 | | |
| 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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 2019/004335 A1 (TOYO KOHAN CO., LTD.) 03 January 2019 (2019-01-03) abstract, claims, paragraphs [0042], [0074] | 1-17 |
| Y | JP 2008-306949 A (OLYMPUS CORPORATION) 25 December 2008 (2008-12-25) paragraph [0003] | 1-17 |
| Y | JP 2012-55271 A (NATIONAL AGRICULTURE & FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 22 March 2012 (2012-03-22) paragraphs [0064]-[0073] | 1-17 |
| A | WO 2016/167317 A1 (TOPPAN PRINTING CO., LTD.) 20 October 2016 (2016-10-20) claims, paragraphs [0009]-[0014] | 1-17 |
| <input 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 02 May 2024 | | Date of mailing of the international search report 14 May 2024 |
| Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/005576

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

| |
|---|
| International application No. PCT/JP2024/005576 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| WO 2019/004335 A1 | 03 January 2019 | (Family: none) | |
| JP 2008-306949 A | 25 December 2008 | (Family: none) | |
| JP 2012-55271 A | 22 March 2012 | WO 2012/032785 A1 paragraphs [0064]-[0073] | |
| WO 2016/167317 A1 | 20 October 2016 | (Family: none) | |

| | | |
|--|---|--------------------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/6883(2018.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12Q 1/6837(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i FI: C12Q1/6883 Z ZNA; C12Q1/6837 Z; C12M1/34 B; C12N15/12; C12Q1/6844 Z | | |
| 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）） C12Q1/6883; C12M1/34; C12N15/12; C12Q1/6837; C12Q1/6844 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 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024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、調査に利用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (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 |
| Y | WO 2019/004335 A1 (東洋鋼板株式会社) 03.01.2019 (2019-01-03) 要約, 特許請求の範囲, [0042], [0074] | 1-17 |
| Y | JP 2008-306949 A (オリンパス株式会社) 25.12.2008 (2008-12-25) [0003] | 1-17 |
| Y | JP 2012-55271 A (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 22.03.2012 (2012-03-22) [0064]-[0073] | 1-17 |
| A | WO 2016/167317 A1 (凸版印刷株式会社) 20.10.2016 (2016-10-20) Claims, [0009]-[0014] | 1-17 |
| <input 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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以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 | 02.05.2024 | 国際調査報告の発送日 14.05.2024 |
| 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） 中野 あい 4U 3758 電話番号 03-3581-1101 内線 3439 | |

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
特許ファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/005576

| 引用文献 | 公表日 | 特許ファミリー文献 | 公表日 |
|-------------------|------------|------------------------------------|-----|
| WO 2019/004335 A1 | 03.01.2019 | (ファミリーなし) | |
| JP 2008-306949 A | 25.12.2008 | (ファミリーなし) | |
| JP 2012-55271 A | 22.03.2012 | WO 2012/032785 A1 [0064]-[0073] | |
| WO 2016/167317 A1 | 20.10.2016 | (ファミリーなし) | |