

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 3 月 16 日 (16.03.2006)

PCT

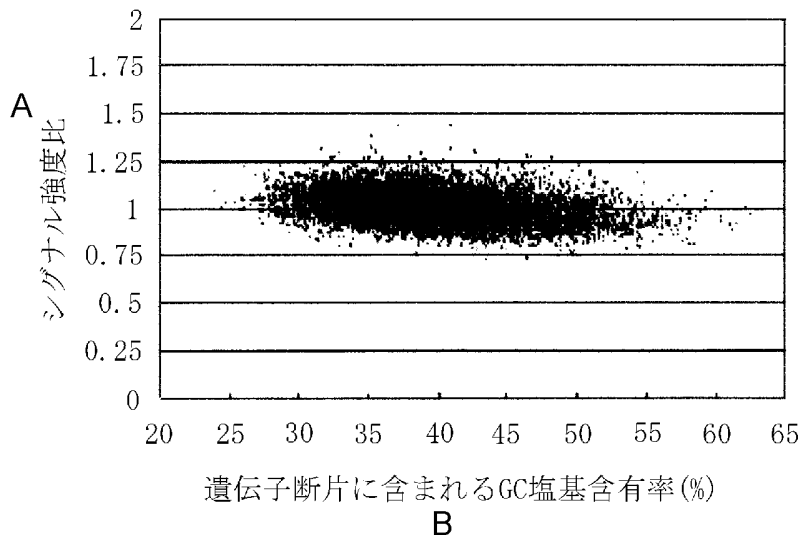
(10) 国際公開番号
WO 2006/028152 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *G06F 19/00* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/016451
- (22) 国際出願日: 2005 年 9 月 7 日 (07.09.2005)
- (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2004-260328 2004 年 9 月 7 日 (07.09.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO)
[JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号
Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 油谷 浩幸 (ABU-
RATANI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区
本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo
(JP). 西村 邦裕 (NISHIMURA, Kunihiro) [JP/JP]; 〒
1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大
学法人東京大学内 Tokyo (JP). 石川 俊平 (ISHIKAWA,
Shumpei) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目
3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 河村
大輔 (KOMURA, Daisuke) [JP/JP]; 〒1138654 東京都
文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学
内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 新保 斎 (SHIMBO, Itsuki); 〒1120005 東京都
文京区水道 1-2-10-905 つばめ特許事務所
Tokyo (JP).

/ 続葉有 /

(54) Title: METHOD OF ANALYZING GENE COPY AND APPARATUS THEREFOR

(54) 発明の名称: 遺伝子コピーの解析方法及び装置



A... SINGAL INTENSITY RATIO

B... GC BASE CONTENT (%) IN GENE FRAGMENT

(57) Abstract: It is intended to provide a method of correcting the amount of genomic DNA in chromosomes which is measured by using a probe complementary to the genomic DNA. This object can be achieved by a method characterized in that an experimentally determined amount of genomic DNA is corrected by using a correction factor which is calculated from correction trend values in a plural number of experimental operations in measuring the chromosomal genomic DNA amount.

(57) 要約: 本発明は、ゲノムDNAに相補的なプローブを用いて測定した染色体のゲノムDNA量を補正する方法を提供することを目的としている。これを解決するために、染色体ゲノムDNA量の測定における複数の実験工程に係る補正傾向値、当該傾向値から算

/ 続葉有 /



WO 2006/028152 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

遺伝子コピーの解析方法及び装置

技術分野

- [0001] 本発明は、遺伝子コピーの解析方法及び装置に関し、特に細胞の染色体のゲノムDNA量及びゲノムDNA量比の測定値の補正、染色体の遺伝子コピー数の同定、同補正及び検出方法によるハプロタイプの同定、並びに染色体の遺伝子欠損及び異常増幅に関する測定結果を視覚的に理解し易く表示する技術に係るものである。

背景技術

- [0002] 近年、DNAマイクロアレイ技術は、主に癌診断を目的として、染色体の任意の部位でのゲノムDNA量を分析するのに広く利用されており、例えば非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4などに記載されている。

ここで、染色体のゲノムDNA量とは、染色体遺伝子のなかの特定部位のゲノムDNA量をいい、遺伝子コピー数に依存するものである。正常細胞では、通常ゲノムDNAは両親由来のアレルが1コピーずつで計2コピーであるが、癌などの疾患においてはゲノムのなかの、遺伝子コピー数の増減が認められる。

- [0003] 正常細胞と疾患細胞における染色体のゲノムDNA量や遺伝子コピー数の検出には、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) を利用したCGH (Comparative genome hybridization) マイクロアレイ法を始め、様々なマイクロアレイを用いた方法が開発されている(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4)。癌などの疾患における染色体遺伝子に対する変異をより詳細に分析するには、染色体のアレルごとのゲノムDNA量の変化を検出しなければならない。

特に、LOH (loss of heterozygosity) の分析では、染色体のいずれのアレル、すなわち母方または父方由来のものであるかを理解することができる(非特許文献5、非特許文献6)。

さらに、染色体のゲノムDNA量の分析では、オリゴヌクレオチドを用いたゲノムタイピングマイクロアレイを利用した方法も報告されている(非特許文献7)。

- [0004] しかしながら、従来の方法において、全ゲノムの一部をPCRで増幅したものを分析

する工程 (Representational analysis) は、多くの実験条件や個々の実験状況によって、無視できないノイズデータを含んでしまうという欠点がある。

したがって、染色体のゲノムDNA量や遺伝子コピー数の検出方法においては、より精度の高いデータを得るためにこれらのノイズデータの補正が必要となる。また、これまでの染色体のゲノムDNA量の検出方法において、染色体のアレルごとのゲノムDNA量を分析した報告はなく、アレルごとのゲノムDNA量や遺伝子コピー数を検出することで、より精度の高いデータが得られるとともに、当該データからハプロタイプの検出が可能となる。

[0005] 非特許文献1:Ishkanian,A.S. et al Nat Genet, 36, 299-303 (2004)

非特許文献2:Pinkel, D. et al. Nature Genetic 20, 207-211(1998)

非特許文献3:Pollack, J.R. et al Nature Genetic 23 ,41-46(1999)

非特許文献4:Lucito,R. et al. Genome Research 13, 2291-2305 (2003)

非特許文献5:Robinson, W.P. Bioessays. 22, 452-9 (2000)

非特許文献6:Murthy, S.K. Mod Pathol. 15, 1241-50 (2002)

非特許文献7:Bignell, G.R. et al. Genome Resesrch 14, 287-295(2004)

非特許文献8:Kennedy, G.C. Nature Biotechnology 21, 1233-7 (2003)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は上記の背景技術に鑑みて創出されたものであり、染色体のゲノムDNA量やゲノムDNA量比に係る測定値を好適な方法により補正し、これらの精度を高めることを目的とし、ひいてはアレル毎のゲノムDNA量や遺伝子コピー数の同定、ハプロタイプの同定等の遺伝子コピー数の解析に寄与する技術を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、マイクロアレイなどを利用した染色体のゲノムDNA量を測定する方法において、測定結果を不安定にする要因として、DNAの抽出条件、染色体の遺伝子を増幅する工程、増幅したPCR産物をアレイ上のプローブにハイブリダイゼーションを行う工程、及び蛍光シグナルをスキャンニングする工程といった特定実験条件であることを見出した。

これらの実験条件に対する補正を行うことで、染色体のゲノムDNA量を測定する方法における補正方法を完成した。また、染色体のゲノムDNA量を補正することにより、当該測定結果を染色体の遺伝子コピー数に変換できることを見出した。本発明はこの知見を基にして完成されたものである。すなわち本発明は、以下のとおりである。

[0008] 請求項1に記載の発明は、遺伝子コピーの解析方法において、染色体のゲノムDNA量(以下、ゲノムDNA量と呼ぶ。)、又は2つの異なる若しくは同一の細胞の染色体のゲノムDNA量の比(以下、ゲノムDNA量比と呼ぶ。)、のいずれかの値(以下、測定値と呼ぶ。)を補正する方法を提供する。

該方法において、所定のゲノムDNA量、又はゲノムDNA量比を測定する測定値測定工程に続いて、補正傾向値算出手段により、各補正パラメータ値に対するゲノム量若しくはゲノム量比の測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットし、そのプロット値をスムージングすることにより、測定値に関する所定のパラメータに係る補正傾向値を算出する補正傾向値算出工程と、補正因子算出手段により、補正傾向値から補正因子を算出する補正因子算出工程と、測定値補正演算手段により、測定値を当該補正因子で補正演算する測定値補正演算工程とを含むことを特徴とする。

[0009] ここで、測定値に対して所定の演算処理を施した値とは、たとえば測定値から遺伝子コピー数の違いによる測定値の違いなど、測定結果を不安定にする要因以外の要素を取り除いた値を意味する。該処理はたとえば染色体における領域的なシグナル比もしくはコピー数の概算値を計算し、それで個々のプローブにおけるシグナル比を割る操作を含む。

[0010] 請求項2に記載の発明は、前記測定値が、ゲノムDNAに相補的なプローブ(以下、プローブと呼ぶ)を用いて測定されたゲノムDNA量、又はゲノムDNA量比であって、補正因子算出工程において、補正傾向値から各補正基準値における補正因子を算出することを特徴とするものである。補正基準値とは、各補正パラメータ値のうち、任意のプローブに対応する各補正パラメータ値をいい、同補正基準値での補正傾向値から補正因子を算出することができる。補正因子とは、測定されたゲノムDNA量のデータを補正するための値である。

- [0011] 請求項3に記載の発明は、遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、染色体の遺伝子を特定の制限酵素で切断した各々の遺伝子断片の長さに対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系に各補正パラメータ値に対してプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、遺伝子断片の長さに係る補正傾向値を算出することを特徴とするものである。
- [0012] 請求項4に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、染色体の遺伝子を特定の制限酵素で切断した各々の遺伝子断片に含まれるG及びC塩基の比率に対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系に各補正パラメータ値に対してプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、GC塩基含有率に係る補正傾向値を算出することを特徴とする。
- [0013] 請求項5に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、染色体の遺伝子を特定の制限酵素で切断した各々の遺伝断片に対して、連続する20塩基乃至220塩基の範囲から選ばれる特定の長さを有する固定枠を前記遺伝子の端から1塩基ごとに移動させながら得られる、当該固定枠に対応する遺伝子断片に含まれるG及びC塩基の比率の最大値に対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系に各補正パラメータ値に対してプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、当該固定枠のGC塩基含有率に係る補正傾向値を算出することを特徴とするものである。
- [0014] 請求項6に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、プローブの塩基配列の有するG及びC塩基の比率もしくはハイブリダイゼーション・フリーエネルギーに対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系に各補正パラメータ値に対してプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、ハイブリダイゼーションに係る補正傾向値を算出することを特徴とするものである。
- [0015] 請求項7に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、プローブのゲノム上の位置の広い領域、好ましくは周辺2000

塩基から1000000塩基の領域の塩基配列の有するG及びC塩基の比率に対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、プローブ周辺のゲノム配列におけるGC塩基含有率に係る補正傾向値を算出することを特徴とする。

[0016] 請求項8に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法において、前記補正傾向値算出工程において、各々の染色体の特定部位を検出する完全に相補的なゲノムDNAに相補的なプローブセットのシグナル強度の中間値に対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系に各補正パラメータ値に対してプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、対照サンプルのシグナル強度に係る補正傾向値を算出することを特徴とする。

[0017] 請求項9に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法において、前記補正傾向値算出工程が、最小二乗平均法を用いて各プロットの平均曲線を求め、当該平均曲線について、多項式を用いて近似することにより、各補正傾向値を算出する工程を含むことを特徴とする。

[0018] 請求項10に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正因子算出工程が、前記各補正傾向値から対応する各プローブにおける補正因子を算出する方法が、下記式に基づいて算出される工程を含むことを特徴とする。

$$(\text{式}) \text{補正因子} = A + \sum_k (B_k X_k + C_k X_k^2 + D_k X_k^3 \dots)$$

あるいは

$$(\text{式}) \text{補正因子} = \exp(A + \sum_k (B_k X_k + C_k X_k^2 + D_k X_k^3 \dots))$$

ここで、上記多項式は3次項まで記載しているが、1次項($B_k X_k$)以上の任意の項数が利用でき、たとえば補正因子 $=A + \sum_k B_k X_k$ 、あるいは補正因子 $=\exp(A + \sum_k B_k X_k)$ でもよい。また、多項式の次数を情報量基準、特にここではBayesian Information Criterionもしくはそれに準ずる基準によって決定することも可能である(非特許文献9に記載)。また、式中のA～D・・・は平均曲線の係数(補正傾向)値、 X_k は $k=1 \sim 6$ がそれぞれ請求項3ないし8に係る補正パラメータ値である。

非特許文献9: Schwarz, G. The Annals of Statistics 6, 461-464(1993)

[0019] 請求項11に記載の発明は、遺伝子コピーの解析方法において、染色体の遺伝子

コピー数を同定する方法が、請求項1ないし10に係る測定値の補正演算結果値を用い、プロット手段により、物理的な順で並べた染色体の位置に対する補正演算結果値を座標系にプロットした場合に階段状に示されるデータを、抽出手段が抽出する工程、遺伝子コピー数同定手段が、該補正演算結果値が同一階位に属する2以上の連続する染色体の位置における当該補正演算結果値の平均値が最低である領域を遺伝子コピー数0の領域とする工程、遺伝子コピー数同定手段が、前記平均値の次に低い領域を遺伝子コピー数1の領域とする工程を含み、染色体の遺伝子コピー数を同定することを特徴とする遺伝子コピーの解析方法を提供する。

[0020] 請求項12に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法における染色体の遺伝子コピー数を同定した結果を表示する方法が、画像処理手段により、第1染色体から第22染色体、X染色体及びY染色体の全部又はその一部について染色体形状様の再現画像を画像表示手段に表示すると共に、該再現画像上に、染色体の遺伝子コピー数が増減している領域を対応づけて視覚的に遺伝子コピー数が当該領域で増減していることを表示することを特徴とする。

[0021] 請求項13に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法において、ハプロタイプを同定する方法が、請求項1ないし10に係る測定値の補正演算結果値を用い、プロット手段により、物理的な順で並べた染色体の位置に対する補正演算結果値を座標系にプロットした場合に階段状に示されるデータを、抽出手段が抽出する工程、ハプロタイプ同定手段が、該補正演算結果値が同一階位に属する2以上の連続する複数の染色体の位置をハプロタイプと同定する工程を含みハプロタイプを同定することを特徴とする。

[0022] 請求項14に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法におけるハプロタイプを同定した結果を表示する方法が、画像処理手段により、第1染色体から第22染色体、X染色体及びY染色体の全部又はその一部について染色体形状様の再現画像を画像表示手段に表示すると共に、該再現画像上に、特定のハプロタイプが存する領域を対応づけて視覚的に当該特定ハプロタイプが当該領域に存することを表示することを特徴とするものである。

[0023] 請求項15に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法における測定値測定工

程において、プローブがSNPsを識別することができるゲノムタイピングマイクロアレイであり、染色体アレルごとに染色体のゲノムDNA量を測定することを特徴とする。

[0024] 請求項16に記載の発明は、前記遺伝子コピーの解析方法において、前記測定値が、遺伝子を増幅することにより測定されたゲノムDNA量であって、補正因子算出工程において、複数のパラメータに係る補正傾向値がある場合にはこれらを合算して補正因子を算出することを特徴とする。

[0025] 本発明は遺伝子コピーの解析装置を提供することもできる。すなわち、請求項17に記載の発明は、遺伝子コピーの解析装置であって、染色体のゲノムDNA量、又は2つの異なる若しくは同一の細胞の染色体のゲノムDNA量の比、のいずれかの値(以下、測定値と呼ぶ。)を測定した結果を入力する入力手段と、該測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットし、そのプロット値をスムージングすることにより、所定のパラメータに係る補正傾向値を算出する補正傾向値算出手段と、補正傾向値から補正因子を算出する補正因子算出手段と、測定値を当該補正因子で補正演算する測定値補正演算手段とを備えることにより、測定値を補正することを特徴とする。

発明の効果

[0026] 本発明により、遺伝子コピーの解析方法、特にマイクロアレイなどを利用した染色体のゲノムDNA量を測定する方法における測定結果の補正方法、当該補正処理後の測定結果により染色体の遺伝子コピー数を検出方法、及び染色体の遺伝子の欠損または異常増幅を視覚的に理解され易く表示する方法が提供される。

本発明に係る補正方法は、マイクロアレイなどを利用した染色体のゲノムDNA量の測定結果のバイアスを著しく減少させ、測定結果の安定性・信頼性を増すことを示す。

[0027] また、当該補正方法による染色体のゲノムDNA量を、遺伝子コピー数に変換することにより、初めて染色体の遺伝子コピー数の絶対値を検出できることが示された。当該補正方法による結果から、ハプロタイプの新しい同定方法をも提供することができる。

さらに、本発明の表示方法を提供することで、それぞれの染色体上における特定の

遺伝子の欠損及び異常増幅を、視覚的に理解し易いように伝えることができる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]本発明による遺伝子コピーの解析方法における測定値の補正の処理図である。

[図2]本発明による遺伝子コピーの解析装置の構成図である。

[図3]遺伝子断片の長さに対するシグナル強度比(ダウン症の染色体ゲノムDNA量/正常の染色体ゲノムDNA量)を示したグラフである。

[図4]遺伝子断片の長さに対するシグナル強度比(同一のH1437細胞の染色体のゲノムDNA量)を示したグラフである。

[図5]遺伝子断片に含まれるGC含有量とシグナル強度比(ダウン症の染色体ゲノムDNA量/正常の染色体ゲノムDNA量)の関係を示したグラフである。

[図6]遺伝子断片に含まれるGC含有量とシグナル強度比(同一のH1437細胞の染色体のゲノムDNA量)の関係を示したグラフである。

[図7]遺伝子断片の特定領域におけるCG含有量に対するシグナル強度比(ダウン症の染色体ゲノムDNA量/正常の染色体ゲノムDNA量)を示したグラフである。

[図8]遺伝子断片の特定領域におけるCG含有量に対するシグナル強度比(同一のH1437細胞の染色体のゲノムDNA量)を示したグラフである。

[図9]プローブの遺伝子配列自体の有するハイブリダイゼーション・フリーエネルギー(Kcal/mol)に対するシグナル強度比(ダウン症の染色体ゲノムDNA量/正常の染色体ゲノムDNA量)を示すグラフである。

[図10]プローブの遺伝子配列自体の有するハイブリダイゼーション・フリーエネルギー(Kcal/mol)に対するシグナル強度比(同一のH1437細胞の染色体のゲノムDNA量)を示すグラフである。

[図11]プローブの周辺40000塩基のゲノム領域のGC塩基含有量に対するシグナル強度比(肝癌細胞の染色体ゲノムDNA量/正常末梢血細胞の染色体ゲノムDNA量)を示すグラフである。

[図12]Prefect Match(PM)のプローブセットのシグナル強度の中間値(log scaled)に対するシグナル強度比(ダウン症の染色体ゲノムDNA量/正常の染色体ゲノムDNA

量)を示すグラフである。

[図13]本願の補正前の染色体位置ごとのシグナル強度比(ダウン症の染色体ゲノムDNA量/正常の染色体ゲノムDNA量)を示すグラフである。

[図14]図12に示されるグラフを本願の補正方法で処理したグラフである。

[図15]染色体のアレル別のゲノムDNA量及び遺伝子コピー数分析(Alelic dosage analysis)をした結果のグラフである。

[図16]全ゲノムにおけるアレルごとのゲノムDNA量及び遺伝子コピー数を分析した結果を示すグラフである。

[図17]本発明の表示方法による染色体遺伝子の欠損及び異常増幅の表示を示す図である。

[図18]本願の補正前の染色体位置ごとのシグナル強度比(同一のH1437細胞の染色体のゲノムDNA量)を示すグラフである。

[図19]図17に示されるグラフを本願の補正方法で処理したグラフである。

[図20]本願補正方法による結果と、BACをスポットしたCGHアレイの結果の比較を示すグラフである。

[図21]本願補正方法による結果と、BACをスポットしたCGHアレイの結果の比較を、染色体の位置の順ごとに示すグラフである。

[図22]第8染色体及び第9p染色体における癌細胞と正常細胞の染色体遺伝子のシグナル強度比を示すグラフである。

符号の説明

- [0029] 1:遺伝子コピーの解析装置、2:中央演算処理装置(CPU)、3:メモリ、4:ハードディスク、5:表示装置、6:GC塩基対含有量の比率の高い部分、7:遺伝子コピー数の高いアレル、8:遺伝子コピー数の低いアレル、9:ハプロタイプを示す領域

発明を実施するための最良の形態

- [0030] 以下、本発明を詳細に説明する。図1は本発明による遺伝子コピーの解析方法のうち、染色体のゲノムDNA量又は2つの異なる若しくは同一の細胞の染色体のゲノムDNA量の比を補正する方法についての処理図である。また、図2は本発明に係る遺伝子コピーの解析装置(1)の構成図である。本装置(1)は汎用のパーソナルコンピュー

タ等によって実現されるものであり、中央演算処理装置(CPU)(2)と連動動作するメモリ(3)、ハードディスク(4)、表示画面を備えた表示装置(5)等から成る。

[0031] 1. マイクロアレイを用いた染色体のゲノムDNA量の測定(測定値測定工程)

最初に、本装置(1)に入力するためのゲノムDNA量の測定を行う。マイクロアレイを用いた染色体のゲノムDNA量の測定について説明する。

第一に、サンプルの調整方法について説明するが、以下の方法や手順、材料や容量などは特に限定されるものではない。

まず、任意の細胞や組織から染色体遺伝子を抽出する。染色体遺伝子の抽出方法は、細胞抽出液をタンパク質分解酵素で処理して、細胞内のタンパク質や染色体を構成するタンパク質を分解した後に、フェノール・クロロホルム処理をして、タンパク質を分離し、水層にある部分(DNAを含む部分)を取り出すことが挙げられる。次いで、抽出された染色体遺伝子を任意の制限酵素で切断する。制限酵素の処理方法は、特に限定されないが、ここでは、染色体遺伝子を制限酵素XbaIで切断した。

[0032] 次いで、制限酵素XbaIで切断された遺伝子フラグメント(断片)のそれぞれに対して、アダプター分子を結合させる。アダプター分子は、制限酵素の切断部位を含み、さらに任意の遺伝子配列を有するオリゴヌクレオチドである。このアダプター分子と遺伝子フラグメントのLigation反応を行い、遺伝子フラグメントにアダプター分子を結合させる。次いで、アダプター分子に対応する特異的なプライマーを使用して、PCR法により遺伝子を増幅させる。PCR反応で増幅した遺伝子断片は、全ゲノムDNAの約20%程度までの遺伝子に対応する。前記のPCR法で増幅した遺伝子フラグメントの量は、ゲノムDNAの遺伝子コピー数に応じて変化する。PCR法で増殖するゲノムDNAの遺伝子コピー数が多ければ、それに応じて増幅された遺伝子フラグメントの量も多くなる。

[0033] 次いで、PCRで増幅した遺伝子フラグメントに対して、蛍光ラベルを行う。蛍光ラベルに用いる蛍光物質は特に限定されず、また蛍光ラベルの代わりに放射性物質でラベルすることなどが挙げられる。

[0034] 第二に、蛍光ラベルしたPCR産物と、オリゴヌクレオチドのプローブからなるアレイとハイブリダイゼーションを行う。オリゴヌクレオチドマイクロアレイは、特に種類は限定さ

れない。ゲノムタイピングすることができるアレイを利用した場合には、染色体のアレルごとに分けて、染色体遺伝子の欠損や異常増幅を検出することができる。さらに、特定のアレルが父方又は母方由来であるかの情報を考慮することで、染色体遺伝子の欠損等がいずれの由来のものであるかを検出することができる。プローブごとのシグナル強度を定量的に測定することで、特定のプローブに対応する遺伝子領域のゲノムDNA量を検出することができる。

[0035] また、特定の遺伝子のみのゲノムDNA量を測定する場合には、アダプター分子の代わりに測定したい遺伝子に対する特異的なプライマー遺伝子を用いて、PCR法などで増幅させてもよく、RT-PCR法やLAMP法など特定遺伝子を増幅し、この遺伝子産物の量を定量的に測定することで、染色体のゲノムDNA量を測定する方法も挙げられる。この場合には、以下で述べるプローブとのハイブリダイゼーションの工程を必要としない。

[0036] 測定値としては、ゲノムDNA量でもよいし、2つの異なる若しくは同一の細胞の染色体のゲノムDNA量の比(ゲノムDNA量比)でもよい。ゲノムDNA量比もそれぞれのゲノムDNA量は上記と同様の方法により測定を行う。以下、ゲノムDNA量比を中心に説述するが、ゲノムDNA量についても同様に本発明を適用することができる。

[0037] 2. 測定値を補正する方法(補正傾向値の算出工程)

本願発明は、染色体ゲノムDNA量を求める測定工程で生じるバイアスの傾向を数値化した補正因子を利用して、得られた測定値の生データ(一次データ)におけるバイアスを減少させる補正方法を提供する。すなわち、同補正方法は、染色体のゲノムDNA量又はゲノムDNA量比を求める測定工程における各種の測定条件または測定結果を用いる。補正は、各染色体位置に対するプローブごとのデータ値で行う。

[0038] 一次データは真に染色体のゲノムDNA量を反映させる成分と、PCR工程など測定条件で影響されるノイズ成分とから成るが、本補正方法では、このノイズ成分を除去することを特徴とする。ノイズ成分の除去は、一次データを「補正基準値」及び「補正傾向値」から計算された「補正因子」で除する、又は一次データから「ノイズ成分」を減じることなどが挙げられる。

[0039] また、補正因子やノイズ成分は、以下に説明する6つの補正パラメータに係る「補正

基準値」及び「補正傾向値」の全部または一部を用いて算出することが挙げられる。「補正傾向値」については、ゲノムDNA量の測定値に関する所定のパラメータに係る補正傾向値をいい、各補正パラメータにおける測定値、あるいは該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットし、そのプロット値から平均化曲線にスムージングさせ、その平均化曲線の係数から求めることが挙げられる。「補正傾向値」は、なるべく広範囲な染色体の部位を測定できる複数のプローブから求めることが望ましい(図3などを参照)。

- [0040] 「補正基準値」とは、各補正パラメータ値のうち、任意のプローブに対応する各補正パラメータ値をいい、同補正基準値での補正傾向値から補正因子を算出することができる。「補正因子」とは、測定されたゲノムDNA量のデータを補正するための値であり、補正パラメータの1または1以上から算出することのできる、プローブごとに対応する値である。
- [0041] ここで補正傾向値は、一次データを最小二乗平均法(least square method)やその他の平均化曲線を求める周知の方法で同曲線にスムージングさせ、その曲線を任意の関数(多項式(polynomial approximation))に当てはめることで求める。平均化曲線へのスムージング時には、一次データの異常値(他の一次データと比して平均化曲線から特に離れているもの)を除外して求めてもよい。
- [0042] バイアスを生じさせる「補正パラメータ」とは以下の6つである。ここで、バイアスとは、測定値に「バラツキ」や「ゆらぎ」を生じさせ、測定値を不安定にするものをいう。第1のパラメータは制限酵素で切断した遺伝子断片の長さである。本実施工程では、まず細胞の染色体を抽出・精製した後に制限酵素XbaIで染色体を切断するが、その際に切断された遺伝子断片の長さをいう。ここで、代表的な制限酵素としてXbaIを挙げたが、BamI、XhoIなど制限酵素の種類は制限されない。同パラメータは、PCR法で遺伝子を増幅する過程でバイアスを生じさせるものであると予想される。
- [0043] これを示す例として、図3又は図4を示す。これらは、遺伝子断片の長さに対するシグナル強度比を示したグラフである。遺伝子断片は、染色体遺伝子を制限酵素XbaIで切断したそれぞれの遺伝子断片である。図3の縦軸は、シグナル強度比を示し、ダウン症候群の染色体の遺伝子増幅量/健常人の染色体の遺伝子増幅量の比であ

る。横軸は、遺伝子断片の長さを示す。図4は、同一のH1437細胞から得たものを用いている。測定値は、同一の細胞を別々に実験したデータを比較した。シグナル強度比は、H1437細胞の遺伝子増幅量／H1437細胞の遺伝子増幅量である。横軸は、制限酵素で切断した遺伝子断片の長さを示し、縦軸は、シグナル強度比を示している。

[0044] 図3又は図4の座標系の各プロット値から平均化曲線にスムージングさせ、遺伝子断片の長さに係る平均化曲線の係数から求めることが挙げられる。ここでの「補正基準値」は、横軸の各遺伝子断片の長さをいい、この補正基準値及び補正傾向値から任意の遺伝子断片に係る補正因子データを導出することができる。

[0045] 遺伝子断片の長さによるバイアスは、固定的なバイアス値が見られるものとして、補正因子を固定値としてもよいし、また実験ごとにバイアス値が変動するものとして、個々にバイアス値を測定して決定してもよい。ここで、同バイアスは、遺伝子断片の長さに完全に依存するものでなく、僅かに他の理由に起因するバイアスも含まれると考えられるからである。

[0046] 第2のパラメータは、前記制限酵素で切断された遺伝子断片に含まれるGC塩基対含有量の比率(%)である。上記第1のパラメータにいう制限酵素で切断した遺伝子断片の塩基数を、当該遺伝子断片に含まれるGCの塩基対ペア数で除して、100を乗じることで算出する。遺伝子断片は2本鎖となっているので、どちらかの遺伝子鎖に注目して、塩基G(グアニン)及び塩基C(シトシン)の数を算出してもよいし、逆に塩基A(アデニン)及び塩基T(チミン)の数を算出から、遺伝子断片全体の塩基数からACの塩基数を減じて求めてもよい。

[0047] これを示す例として、図5及び図6を示す。図5は制限酵素XbaIで切断した遺伝子フラグメントにおけるGC含有量とシグナル強度比の関係を示したグラフである。シグナル強度比は、ダウン症候群の染色体の遺伝子増幅量／健常人の染色体の遺伝子増幅量である。

横軸は、遺伝子断片におけるGC塩基含有量を示し、縦軸は、シグナル強度比を示している。また、図6は、同一のH1437細胞の染色体のゲノムDNA量を示すグラフである。測定値は、同一の細胞を別々に実験したデータを比較して得た。シグナル強

度比は、H1437細胞の遺伝子増幅量／H1437細胞の遺伝子増幅量である。横軸は、染色体位置に対するプローブの一部を示し、縦軸は、シグナル強度比を示している。

[0048] 図5及び図6の座標系の各プロット値から平均化曲線にスムージングさせ、GC含有量に係る平均化曲線の係数から求めることが挙げられる。ここでの「補正基準値」は、遺伝子断片のGC含有量をいい、この補正基準値及び補正傾向値から任意のGC含有量での補正因子データを導出することができる。

[0049] 第一及び第二のパラメータは、PCR法で遺伝子を増幅する過程でバイアスを生じさせるものと予想される。遺伝子断片に含まれるGC塩基対含有量の比率によるバイアスは、固定的なバイアス値が見られるものとして、補正因子を固定値としてもよいし、また測定ごとにバイアス値が変動するとして、個々にバイアス値を測定して決定してもよい。同バイアスは、GC塩基対含有量の比率に依存するものでなく、僅かに他の理由によるバイアスも含まれると考えられるからである。

なお、ここでは、全ての遺伝子配列情報は、Human Genome Build 34(from July 2003 UCSC genome build)(非特許文献10に記載)から得ているが、遺伝子配列情報は、その他の遺伝子配列データベースを利用してもよく、また、ゲノムの遺伝子配列を独自で決定してもよい。

[0050] 非特許文献10:<http://genome.ucsc.edu/>

[0051] 第3のパラメータは、特定領域におけるGC塩基対含有量の比率(%)である。ここで、特定領域とは、制限酵素で切断した遺伝子断片のなかで、GC塩基対含有量の比率が最も高い100bp(base pair)の連続領域をいう。特定領域におけるGC塩基対含有量の比率(%)とは、100bpの固定枠を任意の制限酵素断片の遺伝子に対して、同遺伝子断片の端から1塩基毎にずらして、その中に含まれるGC含有量をそれぞれ求めて、最もGC塩基対含有量の高い特定領域における、GC塩基対含有量(%)を算出する。

[0052] 算出方法は、第2のパラメータに記載した方法により求める。また、この特定領域は、必ずしも100bpに限定されることなく、20bp乃至220bpの範囲での塩基数としてもよい。同因子は、PCR法で遺伝子を増幅する過程でバイアスを生じさせるものと予想さ

れる(図7、図8)。

- [0053] これを示す例として、図7及び図8を示す。図7は、遺伝子断片の特定領域におけるGC含有量に対するシグナル強度比を示したグラフである。縦軸は、シグナル強度比を示し、ダウン症候群の染色体の遺伝子増幅量／健常人の染色体の遺伝子増幅量である。横軸は、同断片に対して、特定領域における100bp内のGC含有量の最大値を百分率で示した。矢印に示す部位よりもGC含有量の高い領域は、ランダムなデータが見られる。このような当該ランダムなシグナル強度比が示される領域は、データ取得の過程で排除してもよい。また、図8は、同一の細胞(H1437細胞)を別々に実験したデータを比較して得た。縦軸は、図7と同様にシグナル強度比を示し、H1437細胞の遺伝子増幅量／H1437細胞の遺伝子増幅量である。横軸は、図7と同様に特定領域のGC含有量を百分率で示した。
- [0054] 図7又は8の座標系の各プロット値から平均化曲線にスムージングさせ、特定領域のGC含有量に係る平均化曲線の係数から求めることが挙げられる。ここでの「補正基準値」は、特定領域のGC含有量をいい、この補正基準値及び補正傾向値から任意のGC含有量での補正因子データを導出することができる。
- [0055] 特定領域に含まれるGC塩基対含有量の比率によるバイアスは、固定的なバイアス値として、補正因子を固定値としてもよいし、また実験ごとにバイアス値が変動するとして、個々にバイアス値を測定して決定してもよい。ここで、同バイアスは、GC塩基対含有量の比率に依存するものでなく、僅かに他の理由によるバイアスも含まれると考えられる。GC塩基対含有量の比率(%)が高い部分(6)は、測定値が近似式の曲線から大幅に離れるので除外してもよい(図7)。
- [0056] 第4のパラメータは、プローブの塩基配列自体の有するハイブリダイゼーション・フリーエネルギー(Kcal/mol)である。このハイブリダイゼーション・フリーエネルギーの算出方法は、特に限定されないが、ここではOligoScreenTMを用いて算出した。また、GC塩基含有量を指標とした計算方法を用いて、ハイブリダイゼーション・フリーエネルギーを算出してもよい。ハイブリダイゼーション・フリーエネルギーは、プローブと相補的な遺伝子のハイブリダイゼーションやその洗浄の工程にバイアスを生じさせるものと予想されている。

[0057] これを示す例として図9及び図10を挙げる。図9は、プローブの遺伝子配列自体の有するハイブリダイゼーション・フリーエネルギー (Kcal/mol) に対するシグナル強度比を示すグラフである。シグナル強度比は、ダウン症候群の染色体の遺伝子増幅量／健常人の染色体の遺伝子増幅量である。横軸は、プローブの遺伝子配列自体の有するハイブリダイゼーション・フリーエネルギー (Kcal/mol) を示し、縦軸は、シグナル強度比を示している。

また、図10は、同一の細胞 (H1437細胞) を別々に実験したデータを比較して得た。縦軸は、シグナル強度比を示し、H1437細胞の遺伝子増幅量／H1437細胞の遺伝子増幅量である。横軸は、プローブの遺伝子配列自体の有するハイブリダイゼーション・フリーエネルギー (Kcal/mol) を示す。

[0058] 図9又は10の座標系の各プロット値から平均化曲線にスムージングさせ、ハイブリダイゼーション・フリーエネルギーに係る平均化曲線の係数から求めることが挙げられる。ここでの「補正基準値」は、各ハイブリダイゼーション・フリーエネルギー値をいい、この補正基準値及び補正傾向値から任意のハイブリダイゼーション・フリーエネルギー値での補正因子データを導出することができる。

[0059] 第5のパラメータは、プローブのゲノム上の位置の広い領域、好ましくは周辺2000塩基から1000000塩基の領域の塩基配列の有するG及びC塩基の比率である。遺伝子断片は2本鎖となっているので、どちらかの遺伝子鎖に注目して、塩基G (グアニン) 及び塩基C (シトシン) の数を算出してもよいし、逆に塩基A (アデニン) 及び塩基T (チミン) の数を算出から、遺伝子断片全体の塩基数からACの塩基数を減じて求めてもよい。

[0060] これを示す例として、図11を示す。図11はプローブの周辺40000塩基の領域の塩基配列の有するG及びC塩基の比率とシグナル強度比の関係を示したグラフである。シグナル強度比は、肝癌細胞の染色体の遺伝子増幅量／正常末梢血細胞の染色体の遺伝子増幅量である。横軸は、プローブの周辺40000塩基のゲノム領域のGC塩基含有量を示し、縦軸は、シグナル強度比を示している。

[0061] 図11の座標系の各プロット値から平均化曲線にスムージングさせ、プローブの周辺40000塩基のゲノム領域のGC塩基含有量に係る平均化曲線の係数から求めることが

挙げられる。ここでの「補正基準値」は、プローブの周辺40000塩基のゲノム領域のGC含有量をいい、この補正基準値及び補正傾向値から任意のプローブの周辺40000塩基のゲノム領域のGC塩基含有量での補正因子データを導出することができる。

- [0062] 第5のパラメータは一部は遺伝子DNAの抽出過程におけるバイアスを生じさせると予想される、また広い遺伝子領域におけるDNA複製の速度差による同一細胞内でコピー数のバイアスを生じさせるとも予想される(非特許文献11に記載)。プローブの周辺40000塩基のゲノム領域のGC塩基含有量の比率によるバイアスは、固定的なバイアス値が見られるものとして、補正因子を固定値としてもよいし、また測定ごとにバイアス値が変動するとして、個々にバイアス値を測定して決定してもよい。同バイアスは、プローブの周辺40000塩基のゲノム領域のGC塩基含有量の比率に依存するものでなく、僅かに他の理由のバイアスも含まれると考えられるからである。

なお、ここでは、全ての遺伝子配列情報は、Human Genome Build 34(from July 2003 UCSC genome build)(非特許文献10に記載)から得ているが、遺伝子配列情報は、その他の遺伝子配列データベースを利用してもよく、また、ゲノムの遺伝子配列を独自で決定してもよい。

- [0063] 非特許文献11:Woodfine K. et al Cell Cycle 4, 172-6 (2005)

- [0064] 第6のパラメータは、Perfect Match(PM)のプローブセットのシグナル強度の中間値(log scaled)である。対照サンプルのシグナル強度を意味し、特定の染色体部位(特定のSNP部位)を検出する複数のプローブのシグナル強度の中間値をいう。この中間値は、最高値の値及び最低値の値を排除した後に求めても良い。

- [0065] これを示す例として図12を挙げる。図12は、Perfect Match(PM)であるプローブセットのシグナル強度の中間値に対するシグナル強度を示すグラフである。この中間値とは、特定の染色体部位(特定のSNP部位)を検出する複数のプローブのシグナル強度の中間値をいう。縦軸は、シグナル強度比を示し、ダウン症候群の染色体の遺伝子増幅量/健常人の染色体の遺伝子増幅量である。横軸は、Perfect Match(PM)であるプローブセットのシグナル強度の中間値を示す。

- [0066] 図12の座標系の各プロット値から平均化曲線にスムージングさせ、プローブセットのシグナル強度の中間値に係る平均化曲線の係数から求めることが挙げられる。ここ

での「補正基準値」は、各プローブセットのシグナル強度の中間値をいい、この補正基準値及び補正傾向値から任意のプローブセットのシグナル強度の中間値での補正因子データを導出することができる。

[0067] 3. 染色体のゲノムDNA量の測定結果を補正する方法(補正因子の算出工程)

本発明における遺伝子コピー数の解析方法における計測値の補正にあたっては以上の6つの補正パラメータに係る「補正基準値」及び「補正傾向値」の全部又は一部のデータを用いて、プローブごとの「補正因子」を算出する。後述するように、各プローブにおける複数の補正パラメータに係る「補正傾向値」及び「補正基準値」から、プローブにおける「補正因子」を導出することができる。

[0068] 次に、あるプローブにおける一次データについて、同プローブでの補正因子を用いて補正することにより、一次データについて補正をすることができる。この補正因子を用いて一次データを補正するには、以下で説明するように、一次データを補正因子で除する方法、一次データを補正因子で減じる方法など挙げられる。

[0069] 以下、複数の測定工程における補正傾向値及び補正基準値から総合的な補正因子を求める方法について説明する。複数の測定工程とは、上述の6つの補正パラメータに関する全部又は一部をいう。ここでは例示的に、三次関数の多項式で上記の6つの補正因子のうち上記第5のパラメータにあるプローブの周辺40000塩基のゲノム領域のGC塩基含有量を除く5つを用いて総合的な補正因子(5つの補正要件に係るバイアス予想値・Expected data)を示した。

ここで、多項式は、一次関数など他の次数の関数で求めても良い。また、補正パラメータもX1からX5の全てを用いることが望ましいが、任意の補正パラメータのみを用いても良い。

[0070] (数1)
$$\text{Expected data} = A + \sum_k (B_k X_k + C_k X_k^2 + D_k X_k^3)$$

数1において、Kは、補正要件の1から5でそれぞれ以下の値を取る。また、B、C及びDは、三次関数の係数を示し、Aは同関数の切片を示す。

X1とは、XbaIで切断した遺伝子断片の長さ(bp)、X2とは、前記制限酵素で切断された遺伝子断片に含まれるGC塩基対含有量の比率(%)、ここで高いGC含有量を示す領域は、データを除外して、曲線にスムージングしてもよい。

X3とは、特定領域におけるGC塩基対含有量の比率(%)、X4とは、プローブの遺伝子配列自体の有するハイブリダイゼーション・フリーエネルギー (Kcal/mol)。

X5とは、Perfect Match(PM)のプローブセットのシグナル強度の中間値(log scaled)。対照サンプルのシグナル強度を意味し、特定の染色体部位(特定のSNP部位)を検出する複数のプローブのシグナル強度の中間値をいう。この中間値は、最高値の値及び最低値の値を排除した後にも良い。

[0071] なお、使用するマイクロアレイに応じて、X1、X2、X3、X4は固定する値を取るが、X5、A、B、C、Dは測定ごとに変動する値であり、一回の測定ごとに特異的なもので、測定ごとに個別に計算することが望ましい。ただし、X5以外の値については、各プローブに固定的なものとしてもよい。

[0072] 本発明に係る測定値と補正の結果を示す図を図13及び図14に示す。図13は、ダウン症候群の染色体の健常人の染色体に対する本願の補正前のシグナル強度比を示すグラフである。ここで、シグナル強度比は、ダウン症候群の染色体の遺伝子増幅量／健常人の染色体の遺伝子増幅量である。第21番染色体を中心とした物理的な遺伝子位置ごとの順に、10Kのマッピングを可能とするプローブセットのアレイを使用した。縦軸が、補正前のシグナル強度比を示し、横軸が第21番染色体の周辺における物理的な遺伝子位置を示している。

[0073] 図14は、図13に示されるグラフを本願の補正方法で処理したグラフである。当該補正処理により、シグナル強度比のデータのバラツキ及びゆらぎ(fluctuations)が著しく減少し、ダウン症候群の患者の第21番染色体領域でシグナル強度比が明確に増大していることが示されている(矢印で示した領域)。シグナル強度比は、ダウン症候群の染色体の遺伝子増幅量／健常人の染色体の遺伝子増幅量である。縦軸が、シグナル強度比を示し、横軸が第21番染色体の周辺における物理的な遺伝子位置を示している。

[0074] 4. 染色体の遺伝子コピー数を同定する方法

また、本願発明における補正方法に特定工程を追加することによる、染色体の遺伝子コピー数の絶対値を求める方法を提供する。本発明の補正方法で、ゲノムDNA量の強度比を補正すると、測定値のバイアスが減少して、明瞭な階段状の測定値となる

ことが示される。この階段状の連続した測定値のうち、最小のシグナル強度比の平均値を「0」と定めることで、シグナル強度比と各染色体の領域における遺伝子コピー数の絶対値に変換することができる。

[0075] 図15は、アレル別のゲノムDNA量及び遺伝子コピー数分析 (Allelic dosage analysis) をした結果のグラフである。図は、各プローブに対する癌患者の染色体の遺伝子増幅量／健常人の染色体の遺伝子増幅量を示した。いずれかのアレルでの最小のシグナル強度比を、1細胞当たりの遺伝子コピー数を「0」と定義することにより、個々の染色体領域における遺伝子コピー数の絶対数を算出することができる。

縦軸(左側)は、シグナル強度比を示し、縦軸(右側)は、本発明で定義した1細胞当たりの遺伝子コピー数の絶対値を表した。遺伝子コピー数の高いアレルは、太線(7)で示し、遺伝子コピー数の低いアレルは、細線(8)で示している。

[0076] 図16は、図15と同条件での全ゲノムにおけるアレルごとのゲノムDNA量を分析した結果を示すグラフである。このグラフは、アレルごとのシグナル強度比を示している。いずれかのアレルでの最小のシグナル強度比を、1細胞当たりの遺伝子コピー数を「0」と定義することにより、個々の染色体領域における遺伝子コピー数の絶対数を算出することができる。

縦軸(左側)は、シグナル強度比を示し、縦軸(右側)は、本発明で定義した細胞当たりの遺伝子コピー数の絶対値を表した。横軸は、全ゲノムの物理的な遺伝子位置を順に示したものである。遺伝子コピー数の高いアレルは、太線(7)で示し、遺伝子コピー数の低いアレルは、細線(8)で示している。X染色体におけるLOHが片方のアレルで明確に示されている(矢印)。

[0077] この処理をまとめると次の通りである。すなわち、階段状の連続した測定値のうち、最小のシグナル強度比の平均値を「0」とし、この「0」に比較して次に高い連続したシグナル強度の平均値を「1」として、次いで、「2」「3」と求めていく。これにより、シグナル強度比の値から、遺伝子コピー数の絶対値を検出することができる。

[0078] 染色体での最小のシグナル強度比を求めるには、比較対照の一方が、健常人であることが望ましい。ほぼ全領域の染色体でシグナル強度比を求めると、ほとんどの染色体の遺伝子コピー数は、0、1、2または3のいずれかの値となることが示された。

また、染色体の遺伝子コピー数の検出をする場合には、本願発明による補正方法の他に、アレルごとのゲノムDNA量の測定をすることができるゲノムタイピングマイクロアレイを用いることが必要である。

[0079] 5. 染色体上のハプロタイプの同定方法

さらには、本発明により、染色体のハプロタイプの検出する方法にも利用することができる。ここで、ハプロタイプとは、親から遺伝する際に染色体の遺伝子は適当なブロック単位で遺伝するが、その際の連続した遺伝子のブロックのことをハプロタイプと呼んでいる。このハプロタイプには、複数のSNPsが含まれていることが一般的である。

[0080] 染色体のゲノムDNA量を測定する際に、マイクロアレイをアレルごとの測定を可能とするゲノムタイピングマイクロアレイとすることで、染色体のハプロタイプの検出ができる。同マイクロアレイでは、アレイ上に通常1つのSNPを有するプローブが配置されており、ハプロタイプの最小の構成成分を有しているからである。また、本発明の補正方法により測定値で処理することにより、信頼性の高い検出ができる。

[0081] 本発明の補正方法で、染色体のゲノムDNA量のデータを補正することで、上述したように明瞭な階段状の染色体ゲノムDNA量または遺伝子コピー数が求められ、同じシグナル強度比である連続した染色体上のセグメントを見出すことができ、より信頼性の高いハプロタイプの検出ができる。同じシグナル強度比である連続した染色体(アレル)上のセグメント(ブロック)は、単一のハプロタイプであると定義される(図15、図16)。

例えば、図15に示されるシグナル強度比が2つのアレルが異なる連続している領域(9)は、遺伝子のハプロタイプを示していると予測される。横軸は、染色体遺伝子の物理的な遺伝子位置を示している。縦軸は、シグナル強度比を示している。

[0082] 6. 染色体の遺伝子の欠損及び異常増幅を表示する方法

本発明により、染色体の位置ごとの染色体の遺伝子コピー数を求めることができる。その表示方法としては、図15及び図16に示すように、縦軸に染色体のゲノムDNA量(シグナル強度比)または遺伝子コピー数をとり、横軸に染色体の位置(Locus)に対応するプローブを染色体の物理的順序で表すことが一般的であった。

[0083] 本発明では、染色体をその長さなどの染色体形状様に応じて第1染色体から第22

染色体、X染色体及びY染色体の全部又はその一部を画面等に表示して、染色体の遺伝子コピー数が欠損している領域を対応づけて欠損させ、また遺伝子コピー数の異常増幅は、当該領域に対応づけて、その遺伝子コピー数に応じて増幅があることを示す表示方法が挙げられる(図17)。また、遺伝子コピー数の数に応じて、染色体の対応する領域の色彩を濃くするなどの変調をつけることも挙げられる。図17に示される長い染色体は、第4番染色体を示し、短い染色体は、第18番染色体を示す。

[0084] 7. 染色体上のハプロタイプを表示する方法

上述したように、本発明により染色体上にあるハプロタイプをも検出することができる。このハプロタイプの表示についても、遺伝子コピー数のグラフで示すことが挙げられるが、また、染色体をその長さなどの染色体形状様に応じて第1染色体から第23染色体、X染色体及びY染色体の全部又はその一部を画面等に表示して、染色体のハプロタイプごと領域を対応づけて当該領域ごとに異なる着色をすることにより、空間情報として第三者に伝えるように表示する方法が挙げられる。

実験例1

[0085] 以下、本発明を以下の実験例1を用いてさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実験例に限定されることはない。

本実験例では、ダウン症候群の責任遺伝子である第21番染色体を用いて実験した。ダウン症候群の患者の第21番染色体は、健常人の同染色体と比較して遺伝子コピー数が増加していることが知られている。

[0086] ダウン症候群の患者の第21番染色体と健常人の同染色体と比較した。図13は、健常人及びダウン症候群の患者のゲノムを上述した方法で、アレイ上にあるプローブごとのシグナル強度をそれぞれ求め、ダウン症候群の患者におけるシグナル強度を健常人におけるシグナル強度で除した比率を算出したものである。図12に示したグラフでは、染色体の特定の部位ごとに、染色体の遺伝子コピー数に依存するシグナル強度比を表しているが、シグナルノイズが多いため、必ずしもシグナル強度比が染色体の遺伝子コピー数に依存しているデータではないことが示される。

[0087] 一次データを本願発明に係る補正方法で処理すると、図14に示すように、一次データの有するデータの「ゆらぎ」や「バラツキ」が著しく減少することが示された。また、

補正前の一次データの表す平均値データと、本願補正方法で補正した二次データの表す平均値データには、ほとんど差異がないことが示された(図13と図14)。第21番染色体及びその他の染色体における、一次データのシグナル強度比のメディアン及びSDは、それぞれ 1.30 ± 0.39 及び 1.00 ± 0.28 であった。一方、本願補正方法による補正処理後の第21番染色体及びその他の染色体における二次データは、それぞれ 1.29 ± 0.18 及び 0.99 ± 0.09 であった。

- [0088] 他の実験例では、同一のH1437細胞を用いて、別々に実験したデータから染色体のゲノムDNA量比を測定する実験を行った。補正前の測定データ(図18)と補正後の測定データ(図19)を示した。これらの図の縦軸はシグナル強度比を示し、H1437細胞の遺伝子増幅量／H1437細胞の遺伝子増幅量であり、横軸は、染色体位置に対するプローブの一部を示す。

図18と図19は、中間値及びそのSD値は、 1.00 ± 0.08 と 1.00 ± 0.06 となり、シグナル強度の値は変えず、そのデータのバラツキのみを減少させることが示された。

実験例2

- [0089] 次に、本願での補正方法(GIM; Genome Imbalance Map)による結果と、従来から利用されているBAC (Bacterial artificial chromosome)をスポットしたCGH (Comparative genomic hybridization)アレイ(Genosensor array 300, Vysis)の結果を比較した。実験例2として以下に示す。2つの方法で、高いコピーレンジから低いコピーレンジにかけて良好な相関関係が見られたが、相関関係のない部位も、一部の染色体の部位で見られた(図20)。この理由は、本願補正方法で用いるSNPタイピングアレイと比較して、BACプローブが約200Kbと長いため、この距離のなかで、遺伝子コピー数が異なっても、遺伝子コピー数が平均化されてしまい、異なる遺伝子コピー数が算出されたと考えられる。

- [0090] また、男性と女性の染色体の遺伝子コピー数を比較する実験を行ったところ、X染色体における1つの遺伝子コピー数の差異については、本願補正方法(GIM)によるデータがBACをスポットしたCGHアレイと比較してより明確に区別できることが示された。

X染色体とそれ以外の常染色体でのシグナル強度比(アジアン $\pm$ SD)を求めると、GI

M法では、 $0.99 \pm 0.09 / 0.63 \pm 0.08$ であるのに対して、BACアレイでの測定では、 $1.00 \pm 0.09 / 0.71 \pm 0.14$ になる。X染色体の遺伝子コピー数のアジアンは、0.71で、常染色体のものと、0.29の差のみであり(GIM法の場合には、0.36の差がある)、SD値も0.14と、GIM法の0.08に比して大きい。したがって、本願のGIM法は、X染色体では、BAXでスポットしたCGH法よりも、明確に遺伝子コピー数を区別することができる(図21)。

実験例3

[0091] 実験例3として、癌細胞における遺伝子コピー数の検出を挙げる。すなわち、本発明の補正方法を癌細胞のゲノムDNA量及び遺伝子コピー数を求めることを適用した。細胞は、H1395肺がん細胞株と正常細胞から得た染色体を用いて、全染色体遺伝子のゲノムDNA量を測定した。

図22は、第8染色体及び第9p染色体における癌細胞と正常細胞の染色体遺伝子のシグナル強度比を示している。シグナル強度比は、癌患者の染色体の遺伝子増幅量／健常人の染色体の遺伝子増幅量である。すなわちゲノムDNA量の比を表している。

図中左側の矢印の8q24は、c-myc癌遺伝子の増幅が見とれられる部位を示し、同右側の矢印は未知のゲノム増殖領域を示している。縦軸の右側の目盛りは、遺伝子コピー数を算出した結果を示す。(図16を参照)

[0092] 正常細胞と特定の癌細胞から得た染色体のゲノムDNA量の比を求め、これを本発明の補正方法で補正することにより、特定の染色体領域で遺伝子が欠損または異常増幅している遺伝子コピー数を示すことができる。これにより、癌やその他の遺伝子疾患の診断方法に応用できるほか、疾患細胞の遺伝子コピー数を特定することにより、疾患関連遺伝子の同定をすることができる。また、アレル別に染色体のゲノムDNA量を求めることにより、染色体の遺伝子コピー数の異常が、父方また母方のいずれかの由来であるかも同定することができる(図15、16、22)。

請求の範囲

- [1] 遺伝子コピーの解析方法において、
染色体のゲノムDNA量(以下、ゲノムDNA量と呼ぶ。)、又は2つの異なる若しくは同一の細胞の染色体のゲノムDNA量の比(以下、ゲノムDNA量比と呼ぶ。)、のいずれかの値(以下、測定値と呼ぶ。)を補正する方法が、
所定のゲノムDNA量、又はゲノムDNA量比を測定する測定値測定工程に続いて、
補正傾向値算出手段により、各補正パラメータ値に対するゲノム量、ゲノム量比の測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットし、そのプロット値をスムージングすることにより、測定値に関する所定の補正パラメータに係る補正傾向値を算出する補正傾向値算出工程と、
補正因子算出手段により、補正傾向値から補正因子を算出する補正因子算出工程と、
測定値補正演算手段により、測定値を当該補正因子で補正演算する測定値補正演算工程と
を含むことを特徴とする遺伝子コピーの解析方法。
- [2] 前記測定値が、ゲノムDNAに相補的な複数のプローブ(以下、プローブと呼ぶ)を用いて測定されたゲノムDNA量、又はゲノムDNA量比であって、
補正因子算出工程において、補正傾向値から各補正基準値における補正因子を算出することを特徴とする請求項1に記載の遺伝子コピーの解析方法。
- [3] 前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、
染色体の遺伝子を特定の制限酵素で切断した各々の遺伝子断片の長さに対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、遺伝子断片の長さに係る補正傾向値を算出する
ことを特徴とする請求項1又は2のいずれかに記載の遺伝子コピーの解析方法。
- [4] 前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、
染色体の遺伝子を特定の制限酵素で切断した各々の遺伝子断片に含まれるG及びC塩基の比率に対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した

値を座標系にプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、GC塩基含有率に係る補正傾向値を算出する

ことを特徴とする請求項1ないし3のいずれかに記載の遺伝子コピーの解析方法。

- [5] 前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、染色体の遺伝子を特定の制限酵素で切断した各々の遺伝断片に対して、連続する20塩基乃至220塩基の範囲から選ばれる特定の長さを有する固定枠を前記遺伝子の端から1塩基ごとに移動させながら得られる、当該固定枠に対応する遺伝子断片に含まれるG及びC塩基の比率の最大値に対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、当該固定枠のGC塩基含有率に係る補正傾向値を算出する

ことを特徴とする請求項1ないし4いずれかに記載の遺伝子コピーの解析方法。

- [6] 前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、ゲノムDNAに相補的なプローブの塩基配列の有するG及びC塩基の比率もしくはハイブリダイゼーション・フリーエネルギーに対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、ハイブリダイゼーションに係る補正傾向値を算出することを特徴とする請求項1ないし5のいずれかに記載の遺伝子コピーの解析方法。

- [7] 前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正傾向値算出工程において、プローブのゲノム上の位置の広い領域、好ましくは周辺2000塩基から1000000塩基の領域の塩基配列の有するG及びC塩基の比率に対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットして、そのプロット値をスムージングすることによって、ハイブリダイゼーションに係る補正傾向値を算出することを特徴とする請求項1ないし6のいずれかに記載の遺伝子コピーの解析方法。

- [8] 前記遺伝子コピーの解析方法において、前記補正傾向値算出工程において、各々の染色体の特定部位を検出するプローブセット中のゲノムDNAに完全に相補的なプローブセットのシグナル強度の中間値に対する測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットして、そのプロット値をスムージング

することによって、対照サンプルのシグナル強度に係る補正傾向値を算出することを特徴とする請求項1ないし7のいずれかに記載の遺伝子コピーの解析方法。

- [9] 前記遺伝子コピーの解析方法において、
前記補正傾向値算出工程が、少なくとも最小二乗平均法を用いて各プロットの平均曲線を求め、当該平均曲線について、多項式を用いて近似することにより、各補正傾向値を算出する工程を含むことを特徴とする請求項1ないし8のいずれかに記載の遺伝子コピーの解析方法。
- [10] 前記遺伝子コピーの解析方法における前記補正因子算出工程が、
前記各補正傾向値から対応する各プローブにおける補正因子を算出する方法が、下記式、
(式) 補正因子 = $A + \sum_k (B_k X_k + C_k X_k^2 + D_k X_k^3 \dots)$
あるいは
(式) 補正因子 = $\exp(A + \sum_k (B_k X_k + C_k X_k^2 + D_k X_k^3 \dots))$
(上記多項式において1次項以上の任意の項数が利用できる。式中のA～D・・・は平均曲線の係数、 X_k は $k=1\sim 6$ がそれぞれ請求項3ないし8に係る補正パラメータ値)に基づいて算出される工程を含むことを特徴とする請求項9に記載の遺伝子コピーの解析方法。
- [11] 前記遺伝子コピーの解析方法における測定値測定工程において、
プローブがSNPsを識別することができるゲノムタイピングマイクロアレイであり、染色体アレルごとに染色体のゲノムDNA量を測定することを特徴とする請求項1ないし10のいずれかに記載の遺伝子コピーの解析方法。
- [12] 遺伝子コピーの解析方法において、
染色体の遺伝子コピー数を同定する方法が、請求項1ないし10に係る測定値の補正演算結果値を用い、
プロット手段により、物理的な順で並べた染色体の位置に対する補正演算結果値を座標系にプロットした場合に階段状に示されるデータを、抽出手段が抽出する工程、
遺伝子コピー数同定手段が、該補正演算結果値が同一階位に属する2以上の連

続する染色体の位置における当該補正演算結果値の平均値が最低である領域を遺伝子コピー数0の領域とする工程、遺伝子コピー数同定手段が、前記平均値の次に低い領域を遺伝子コピー数1の領域とする工程を含み、染色体の遺伝子コピー数を同定することを特徴とする遺伝子コピーの解析方法。

- [13] 前記遺伝子コピーの解析方法における染色体の遺伝子コピー数を同定した結果を表示する方法が、

画像処理手段により、第1染色体から第22染色体、X染色体及びY染色体の全部又はその一部について染色体形状様の再現画像を画像表示手段に表示すると共に、

該再現画像上に、染色体の遺伝子コピー数が増減している領域を対応づけて視覚的に遺伝子コピー数が当該領域で増減していることを表示することを特徴とする請求項11に記載の遺伝子コピーの解析方法。

- [14] 前記遺伝子コピーの解析方法において、

ハプロタイプを同定する方法が、請求項1ないし14に係る測定値の補正演算結果値を用い、

プロット手段により、物理的な順で並べた染色体の位置に対する補正演算結果値を座標系にプロットした場合に階段状に示されるデータを、抽出手段が抽出する工程、

ハプロタイプ同定手段が、該補正演算結果値が同一階位に属する2以上の連続する複数の染色体の位置をハプロタイプと同定する工程を含みハプロタイプを同定する

ことを特徴とする遺伝子コピーの解析方法。

- [15] 前記遺伝子コピーの解析方法におけるハプロタイプを同定した結果を表示する方法が、

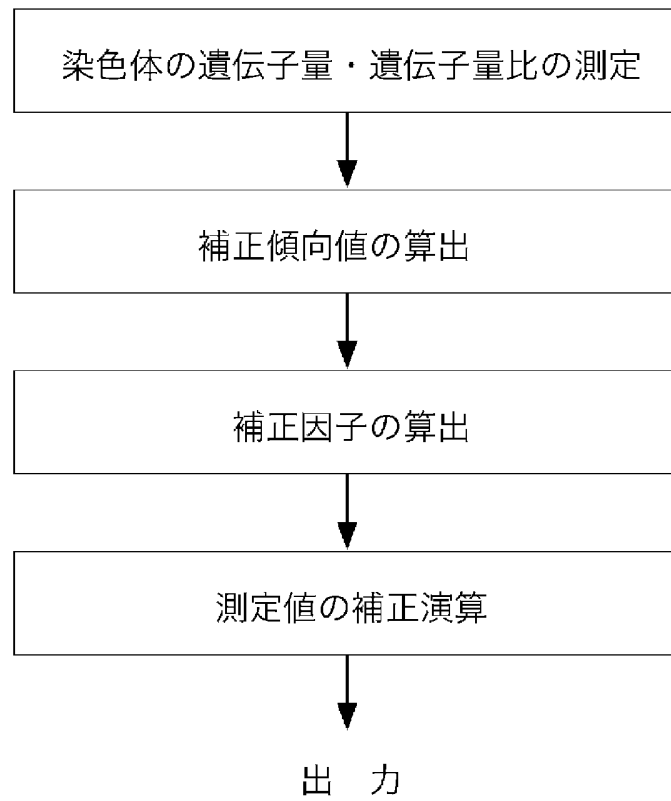
画像処理手段により、第1染色体から第22染色体、X染色体及びY染色体の全部又はその一部について染色体形状様の再現画像を画像表示手段に表示すると共に、

該再現画像上に、特定のハプロタイプが存する領域を対応づけて視覚的に当該特

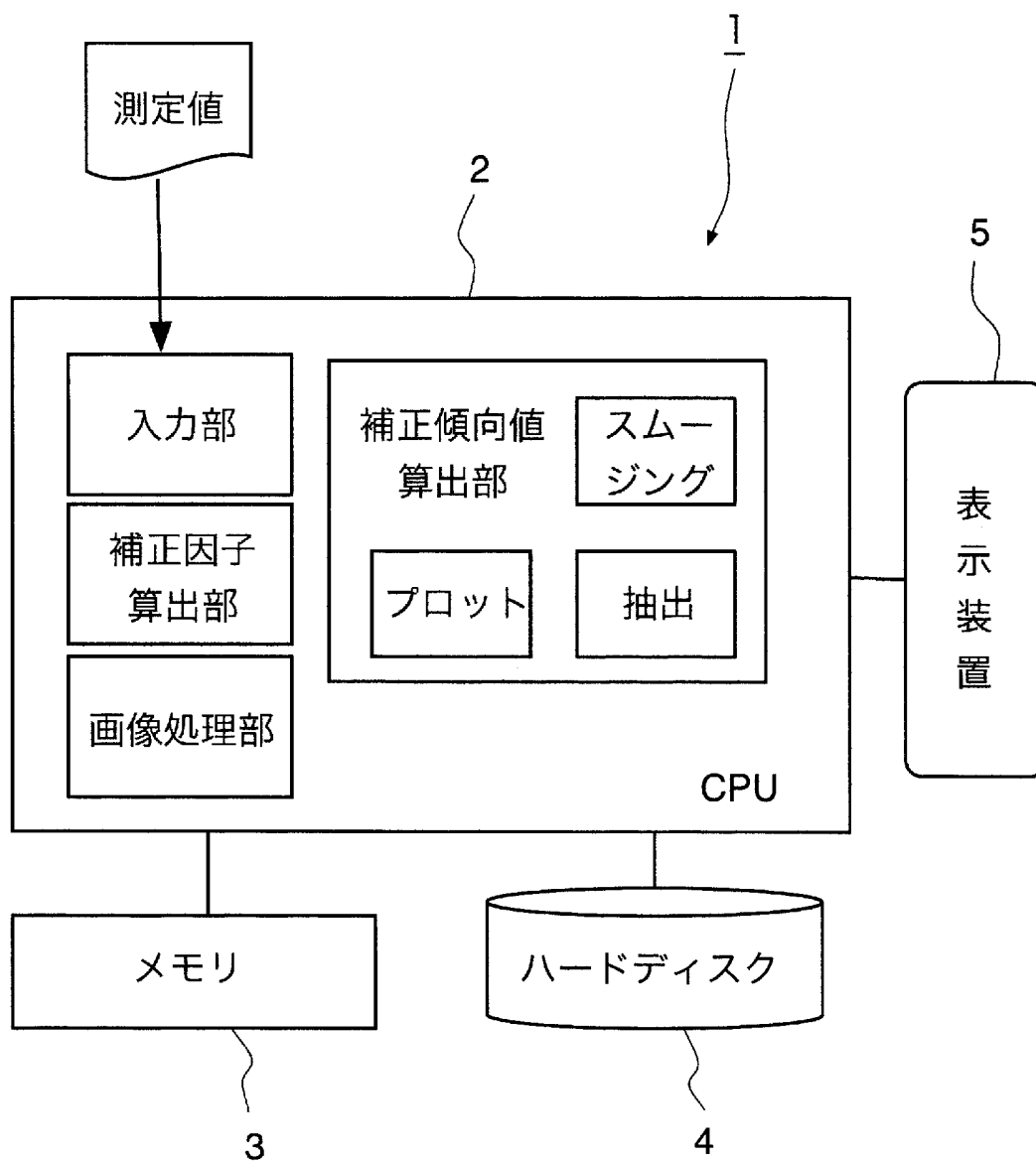
定ハプロタイプが当該領域に存することを表示することを特徴とする請求項13に記載の遺伝子コピーの解析方法。

- [16] 前記遺伝子コピーの解析方法において、
前記測定値が、遺伝子を増幅することにより測定されたゲノムDNA量であって、
補正因子算出工程において、複数のパラメータに係る補正傾向値がある場合には
これらを合算して補正因子を算出する請求項1、3、4、5、6又は9のいずれかに記載
の遺伝子コピーの解析方法。
- [17] 染色体のゲノムDNA量、又は2つの異なる若しくは同一の細胞の染色体のゲノムDNA量の比のいずれかの値(以下、測定値と呼ぶ。)を測定した結果を入力する入力手段と、
該測定値、又は該測定値に対して所定の演算処理を施した値を座標系にプロットし、そのプロット値をスムージングすることにより、所定のパラメータに係る補正傾向値を算出する補正傾向値算出手段と、
補正傾向値から補正因子を算出する補正因子算出手段と、
測定値を当該補正因子で補正演算する測定値補正演算手段と
を備えることにより、測定値を補正することを特徴とする遺伝子コピーの解析装置。

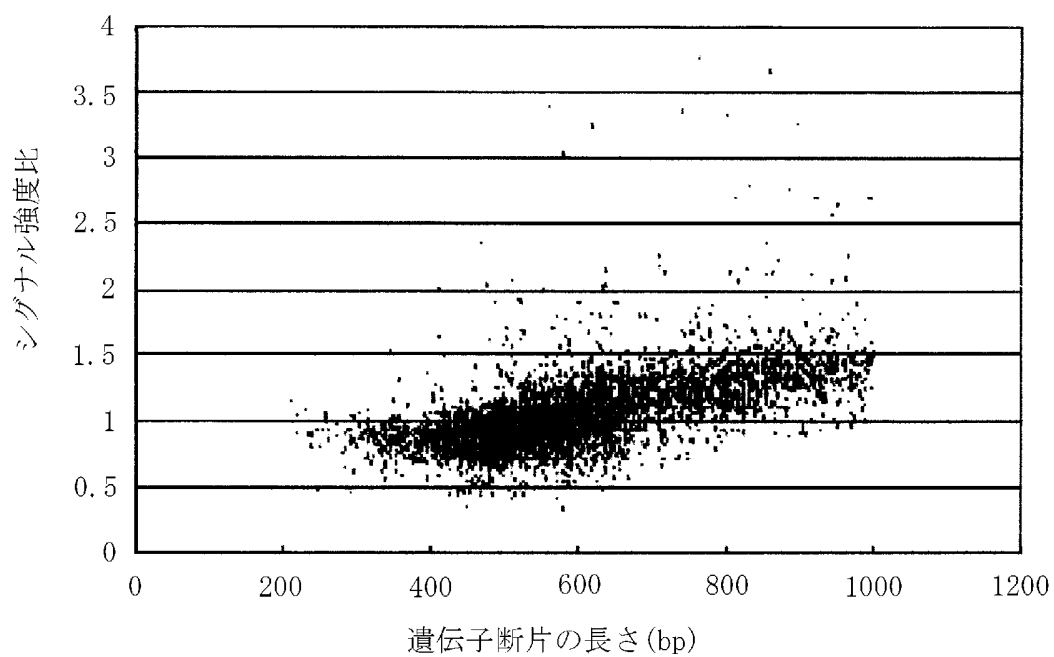
[図1]



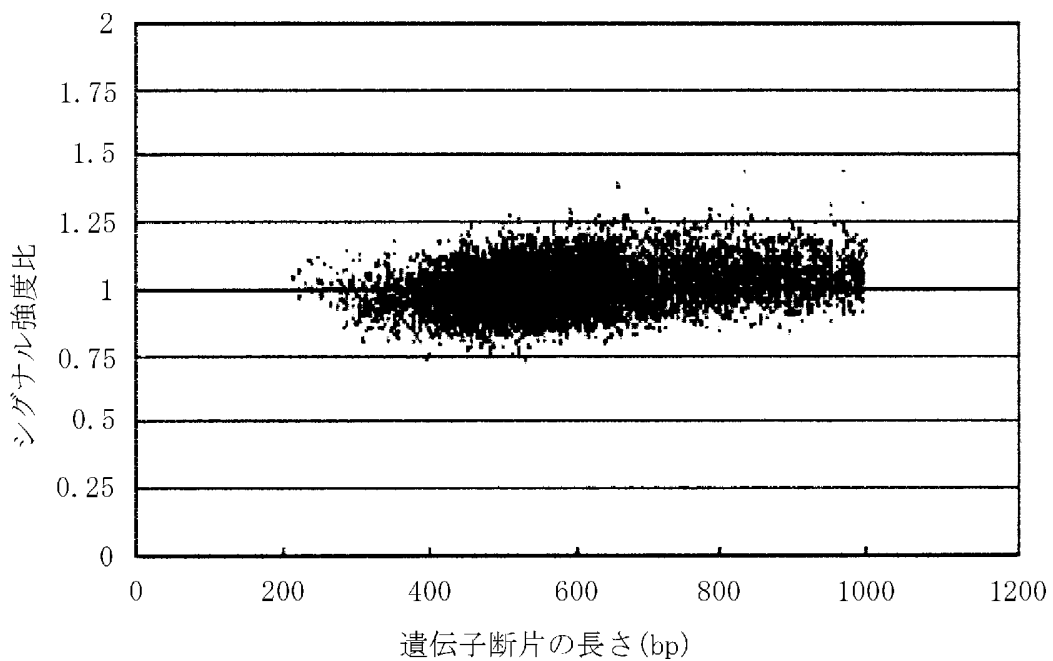
[図2]



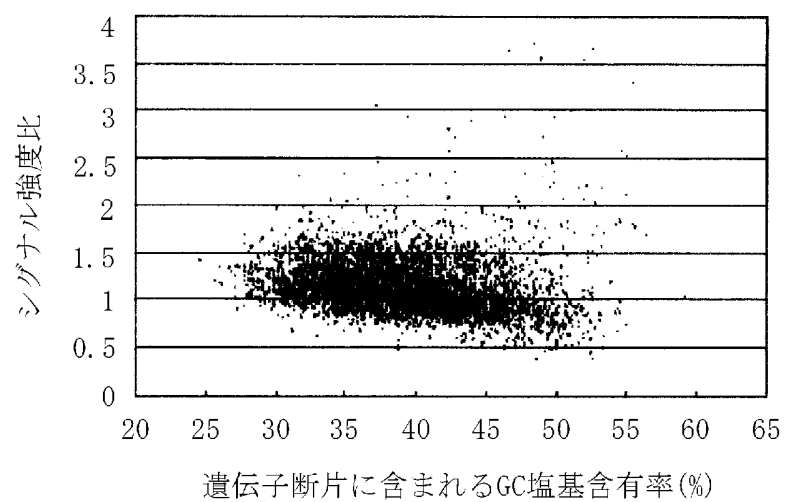
[図3]



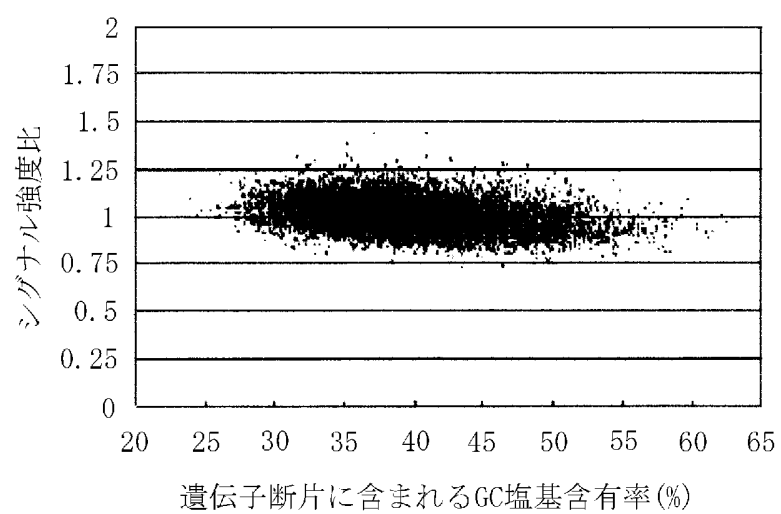
[図4]



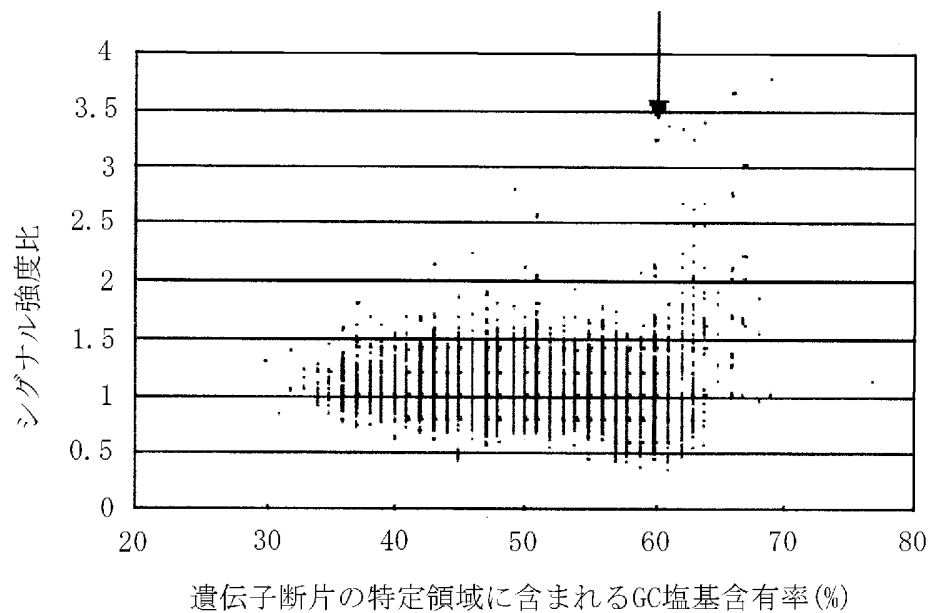
[図5]



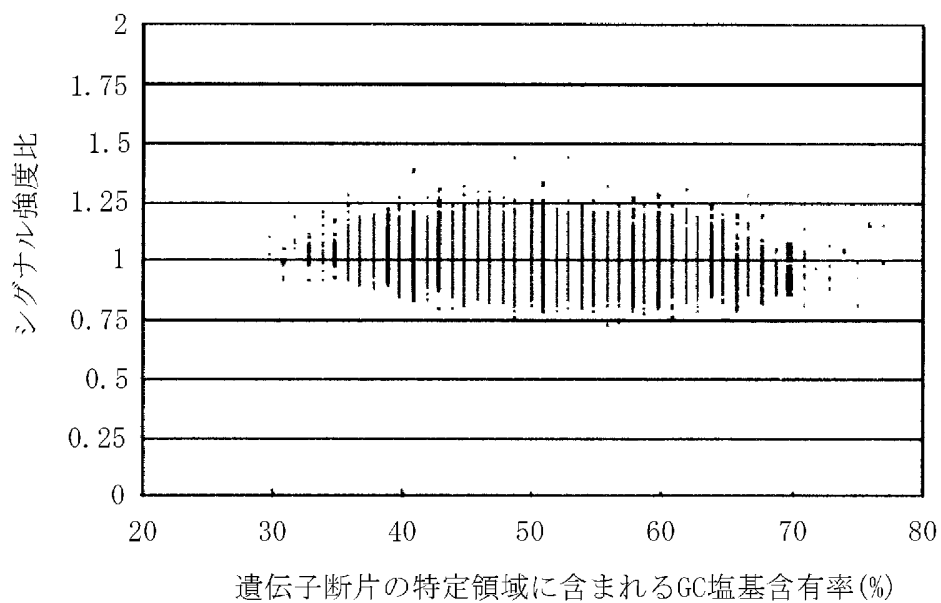
[図6]



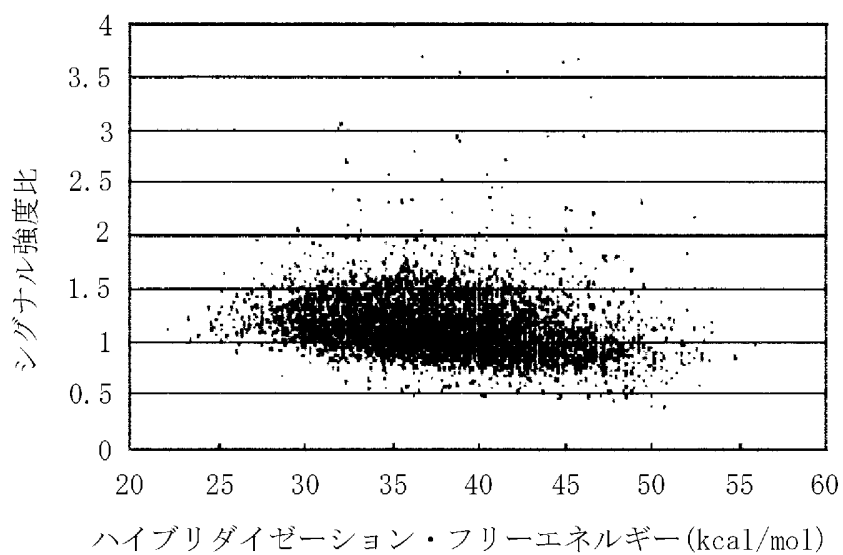
[図7]



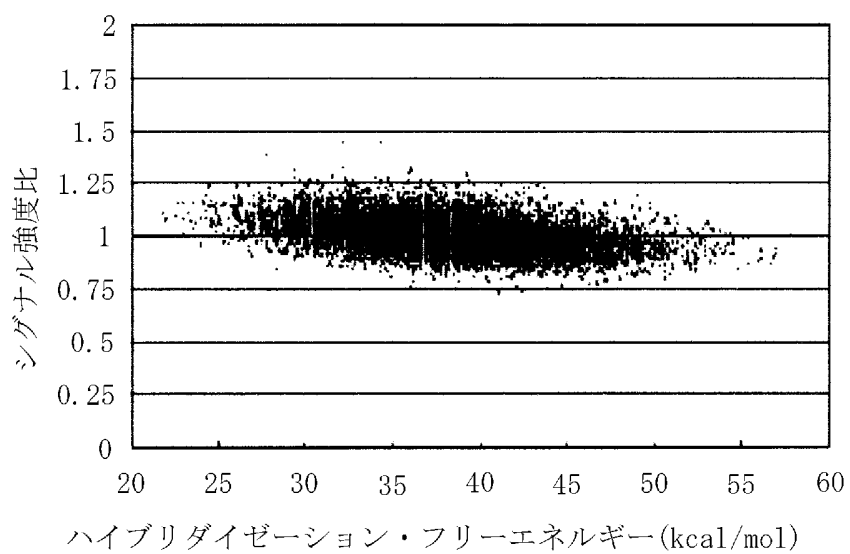
[図8]



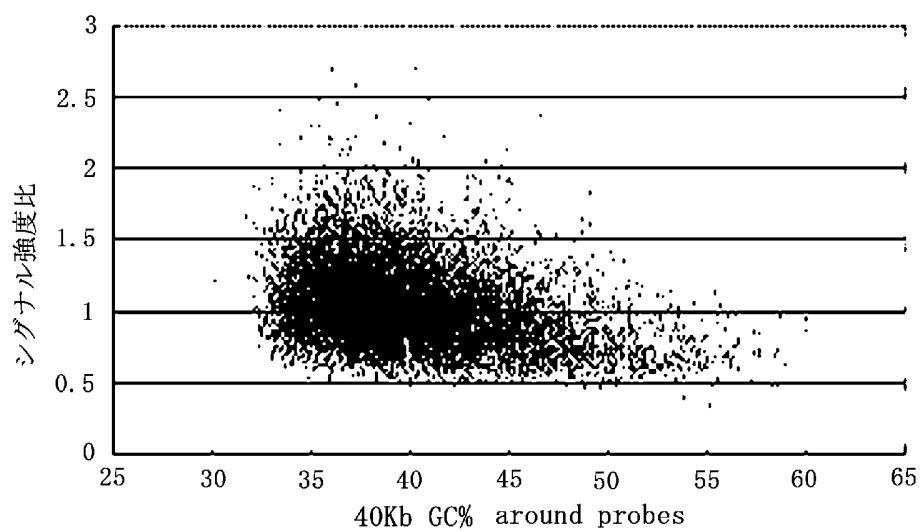
[図9]



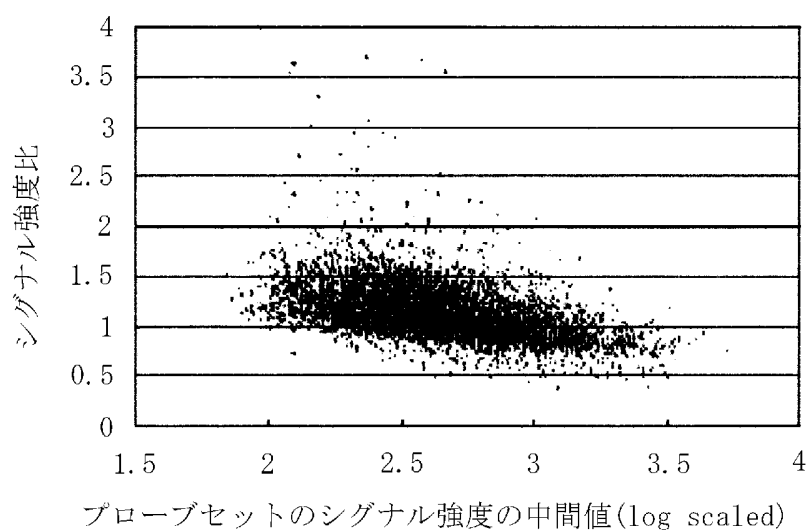
[図10]



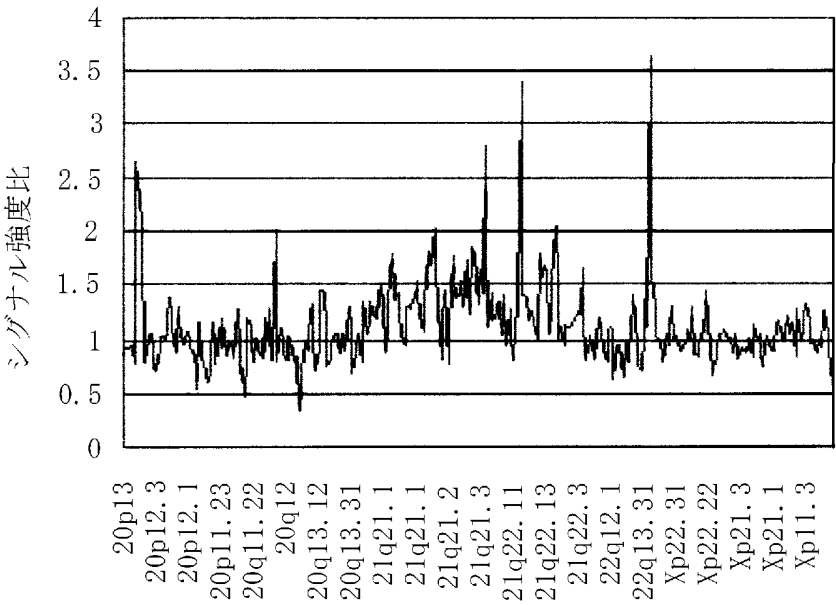
[図11]



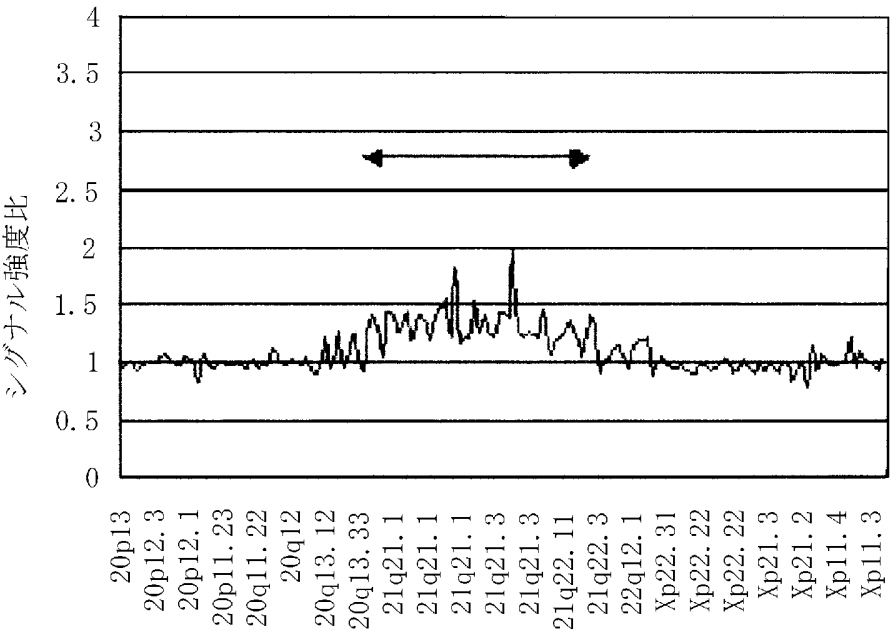
[図12]



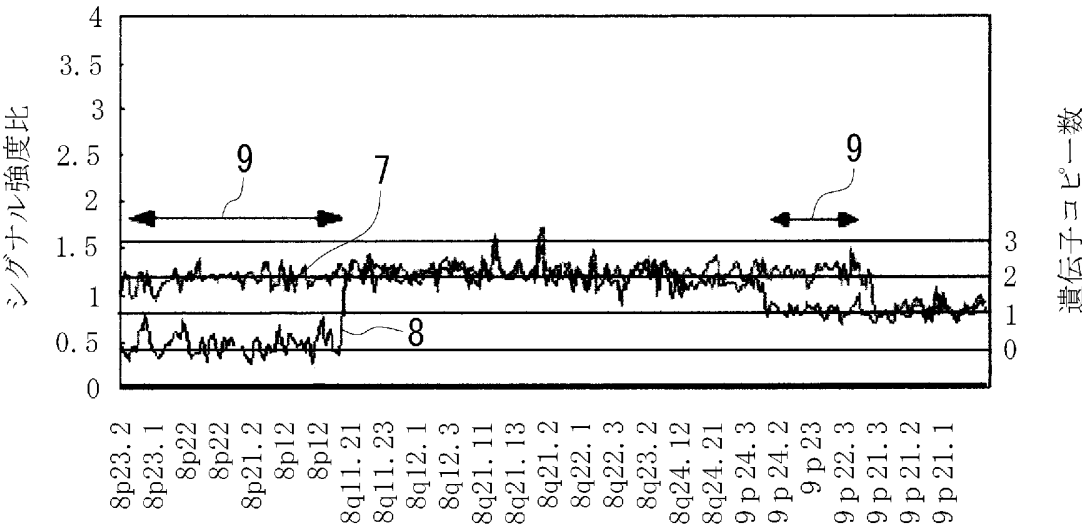
[図13]



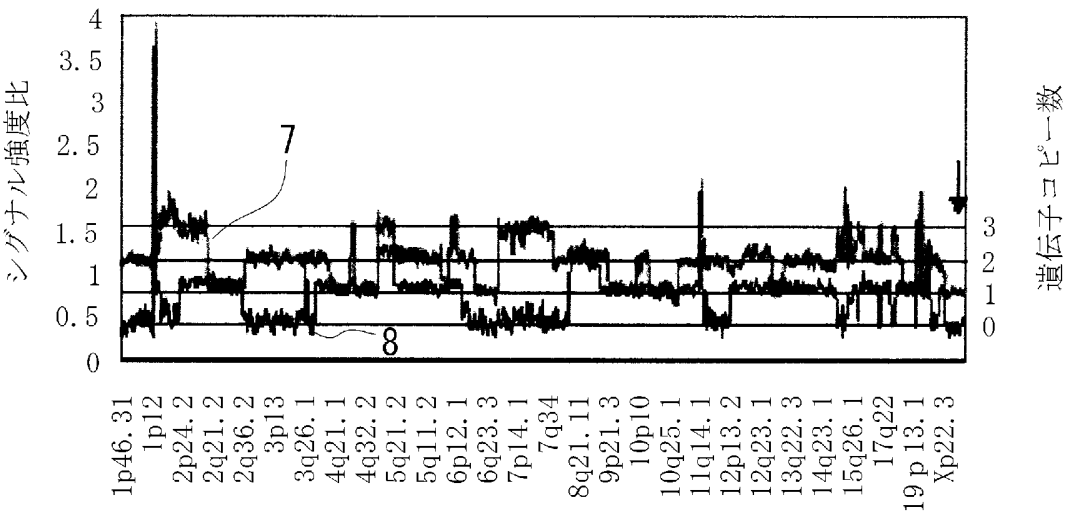
[図14]



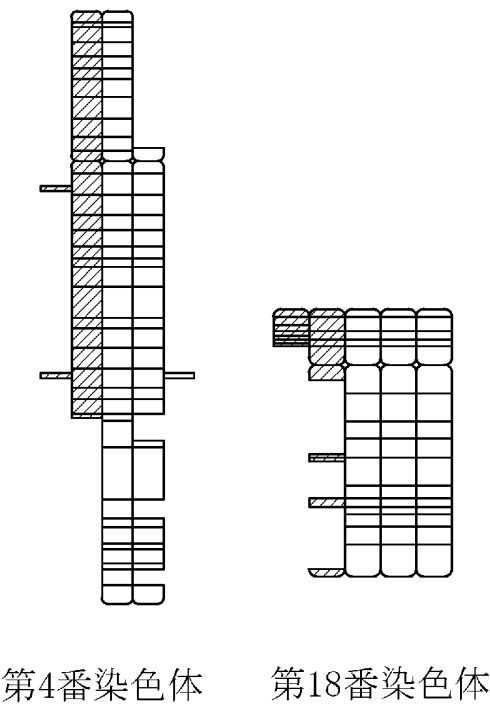
[図15]



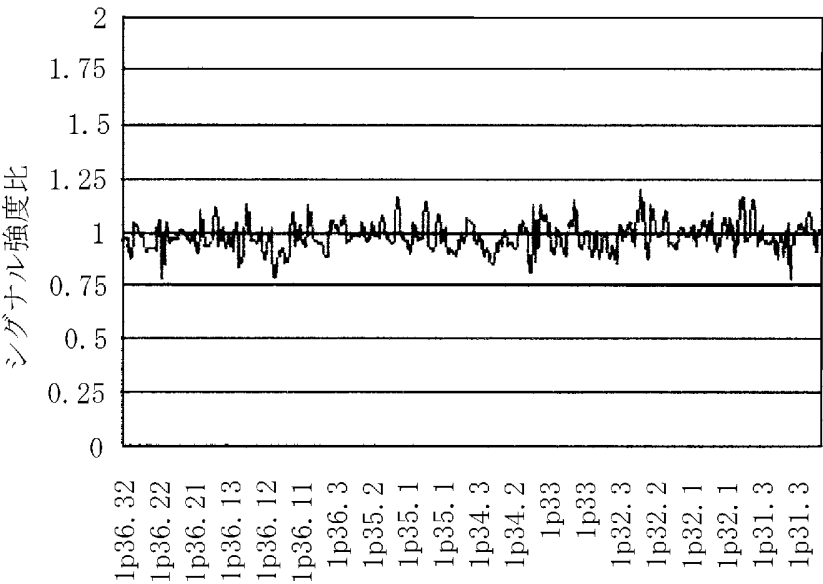
[図16]



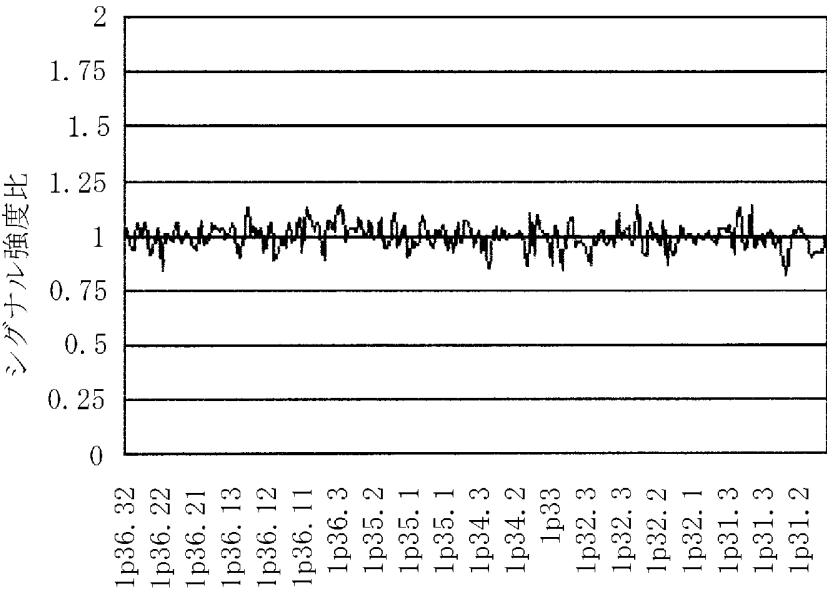
[図17]



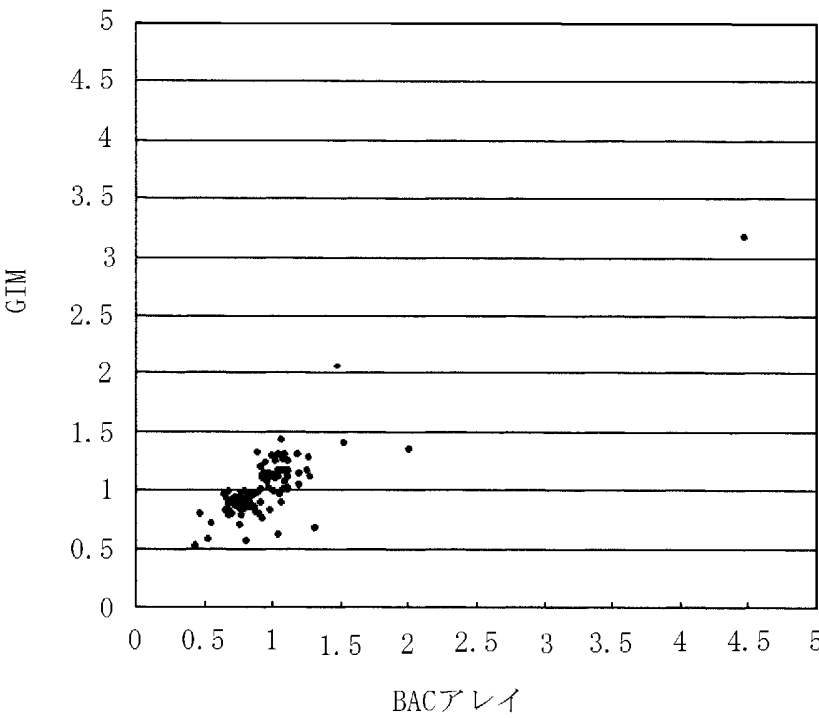
[図18]



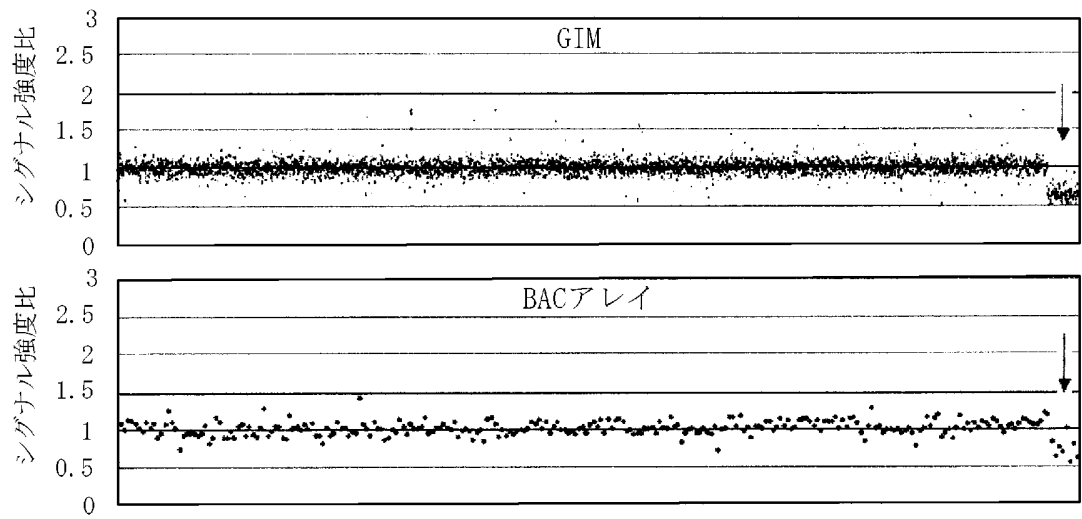
[図19]



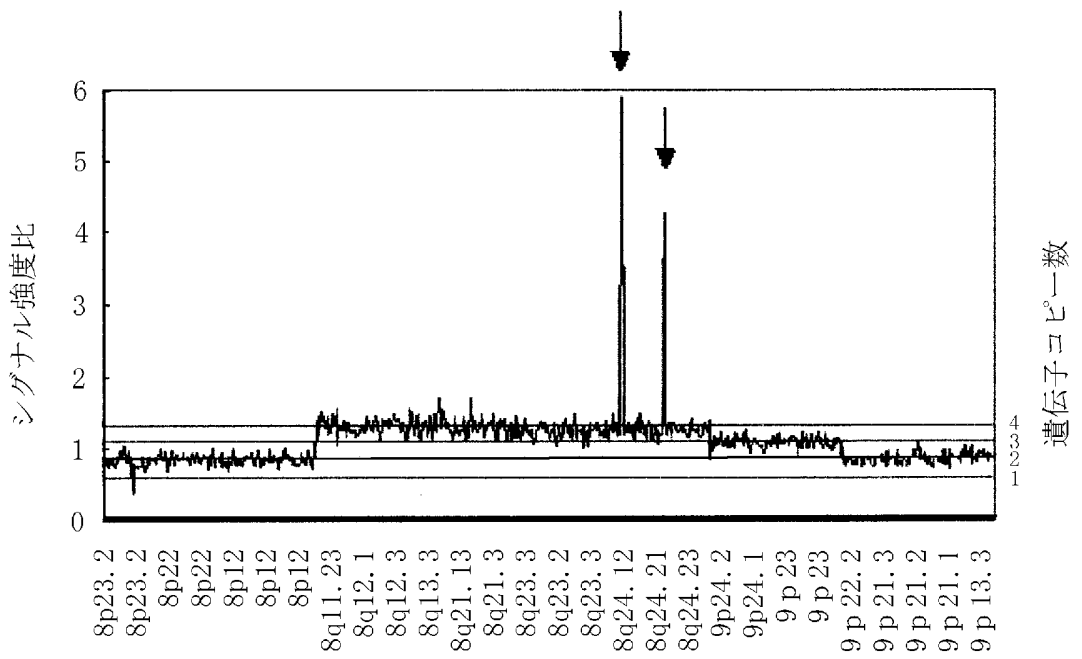
[図20]



[図21]



[図22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01), **C12M1/00**(2006.01), **G06F19/00**(2006.01),
C12N15/09(2006.01)

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)

C12Q1/68(2006.01), **C12M1/00**(2006.01), **G06F19/00**(2006.01),
C12N15/09(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/062450 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.), 31 July, 2003 (31.07.03), Full text & EP 1474530 A2 & US 2005/0064426 A1 & JP 2005-517157 A	1-17
A	US 6365353 B1 (METASYSTEMS HARD AND SOFTWARE GmbH), 02 April, 2002 (02.04.02), Full text & DE 19743301 A1 & WO 99/16901 A1 & EP 1019544 A1	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"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
 25 November, 2005 (25.11.05)

Date of mailing of the international search report
 06 December, 2005 (06.12.05)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016451

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kerr M.K. et al., Analysis of variance for gene expression microarray data., J.Comput. Biol., 2000, 7(6), p.819-37	1-17
A	Jong K. et al., 'Chromosomal breakpoint detection in human cancer.', In Applications of evolutionary computing., Lecture notes in computer science., Vol.2611, Springer-Verlag GmbH., 2003, pages 54 to 65	1-17
P,A	Kunihiro NISHIMURA et al., "Genomic Copy Su Ijo Kenshutsu no tameno Kashika", The Virtual Reality Society of Japan Dai 9 Kai Taikai Ronbunshu, 2004, September, 8, p. 393-6	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68 (2006.01), C12M1/00 (2006.01), G06F19/00 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68 (2006.01), C12M1/00 (2006.01), G06F19/00 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)

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	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005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)

BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

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 請求の範囲の番号
A	WO 2003/062450 A2(SYNGENTA PARTICIPATIONS AG)2003.07.31 全文 & EP 1474530 A2 & US 2005/0064426 A1 & JP 2005-517157 A	1-17
A	US 6365353 B1(METASYSTEMS HARD AND SOFTWARE GmbH)2002.04.02 全文 & DE 19743301 A1 & WO 99/16901 A1 & EP 1019544 A1	1-17

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.11.2005

国際調査報告の発送日

06.12.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡邊 潤也

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3131

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Kerr M.K. et al., Analysis of variance for gene expression microarray data. J. Comput. Biol., 2000, 7(6), p. 819-37	1-17
A	Jong K. et al., 'Chromosomal breakpoint detection in human cancer.' In Applications of evolutionary computing., Lecture notes in computer science., Vol.2611, Springer-Verlag GmbH, 2003, p. 54-65	1-17
PA	西村邦裕, 他 4 名, ゲノムコピー数異常検出のための可視化, 日本バーチャルリアリティ学会第 9 回大会論文集, 2004 Sep. 8, p. 393-6	1-17