

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7432622号
(P7432622)

(45)発行日 令和6年2月16日(2024.2.16)

(24)登録日 令和6年2月7日(2024.2.7)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 Q	1/6837(2018.01)	C 1 2 Q	1/6837	Z
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A

請求項の数 10 (全24頁)

(21)出願番号	特願2021-570553(P2021-570553)	(73)特許権者	501387839 株式会社日立ハイテク 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号
(86)(22)出願日	令和2年1月16日(2020.1.16)	(74)代理人	110002572 弁理士法人平木国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/001171	(72)発明者	田中 淳子 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内
(87)国際公開番号	WO2021/144903	(72)発明者	中川 樹生 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内
(87)国際公開日	令和3年7月22日(2021.7.22)	(72)発明者	白鳥 亜希子 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内
審査請求日	令和4年6月20日(2022.6.20)	(72)発明者	植松 千宗

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNA検出方法およびDNA検出システム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

DNA検出方法であって、

複数の区画のそれぞれにDNA溶液を、1区画に1分子の第1遺伝子が入っているか、入っていないかのいずれかであるように配置する工程であって、前記DNA溶液は、前記第1遺伝子およびそのシュードジーンを含む複数種類のDNAを含有する可能性があり、前記DNA溶液は蛍光標識プローブまたはDNAインターカレーターを含有し、前記インターカレーターは2本鎖DNAと結合することによって蛍光強度が増加するものであり、前記蛍光標識プローブは前記第1遺伝子に対して相補的であり、前記第1遺伝子に結合した場合の融解温度と、前記シュードジーンに結合した場合の融解温度とが異なる、DNA溶液を配置する工程と、

10

各前記区画において核酸増幅反応を行う工程と、

前記核酸増幅反応中に、又は前記核酸増幅反応後に、各前記区画を温度変化させるとともに、前記温度変化に伴って変化する蛍光強度を各前記区画について測定する工程と、

前記温度変化に伴う前記蛍光強度の変化に基づき、各前記区画について、当該区画に配置されたDNAの二重鎖の融解温度を算出する工程と、

前記融解温度に基づき各前記区画についてDNAの種類を判別するとともに、前記DNAの各種類について区画の数をカウントする工程と、

前記DNAの各種類についてカウントされた区画の数を出力する工程と、

前記融解温度および前記カウントされた区画の数から前記第1遺伝子および前記シュー

20

ドジーンを判別する工程と、

前記第 1 遺伝子が配置された区画の数に対する、前記シュードジーンが配置された区画の数の比が、1 であるか、 $1/2$ であるか、2 であるか、0 であるか、または、いずれでもない値であるかを判定する工程と、

前記比が、所定の値に適合するか否かを判定し、適合する場合には適合することを示す情報を表示し、適合しない場合には適合しないことを示す情報を表示する工程と、を含む、DNA 検出方法。

【請求項 2】

前記蛍光標識プローブは、前記第 1 遺伝子に対応した配列を有する第 1 蛍光標識プローブを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の DNA 検出方法。

10

【請求項 3】

前記蛍光標識プローブは、前記シュードジーンに対応した配列を有する第 2 蛍光標識プローブを含むことを特徴とする、請求項 2 に記載の DNA 検出方法。

【請求項 4】

前記第 1 遺伝子の数を表示するか、前記第 1 遺伝子における変異型遺伝子の割合を表示するか、あるいは、前記第 1 遺伝子の数または前記シュードジーンの数から算出した総遺伝子数を表示する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の DNA 検出方法。

【請求項 5】

各前記区画に配置される前記 DNA 溶液は限界希釈されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の DNA 検出方法。

20

【請求項 6】

前記融解温度に基づき各前記区画について DNA の種類を判別するとともに、前記 DNA の各種類について区画の数をカウントする前記工程は、さらに所定の基準融解温度を表す情報に基づいて行われる、請求項 1 に記載の DNA 検出方法。

【請求項 7】

前記区画は、アレイ状に配列されたウェルまたはオイル中に分散するドロップレットとして構成される、請求項 1 に記載の DNA 検出方法。

【請求項 8】

前記融解温度は、前記蛍光強度の変曲点として算出される、請求項 1 に記載の DNA 検出方法。

30

【請求項 9】

DNA 検出システムであって、

複数の区画のそれぞれに DNA 溶液を、1 区画に 1 分子の第 1 遺伝子が入っているか、入っていないかのいずれかであるように配置可能なデバイスの画像を撮像する撮像装置であって、前記 DNA 溶液は前記第 1 遺伝子およびそのシュードジーンを含む複数種類の DNA を含有する可能性があり、前記 DNA 溶液は蛍光標識プローブまたは DNA インターカレーターを含有し、前記インターカレーターは 2 本鎖 DNA と結合することによって蛍光強度が増加するものであり、前記蛍光標識プローブは前記第 1 遺伝子に対して相補的であり、前記第 1 遺伝子に結合した場合の融解温度と、前記シュードジーンに結合した場合の融解温度とが異なる、撮像装置と、

40

各前記区画において核酸増幅反応を行うために、各前記区画の温度を変化させる温度調整部と、

前記第 1 遺伝子と、前記シュードジーンとのそれぞれについて、基準融解温度を表す情報を格納するデータベースと、

温度変化に伴って変化する蛍光強度を各前記区画について取得するために、前記撮像装置に画像を撮像させる撮像制御部と、

各前記区画について、当該区画に配置された前記 DNA の二重鎖の融解温度を表す情報を格納する融解温度メモリーであって、前記融解温度は、前記撮像装置により撮像された画像における、温度変化に伴う蛍光強度の変化に基づいて得られる、融解温度メモリーと、

前記データベースおよび前記融解温度メモリーを用いて、前記第 1 遺伝子が配置された

50

前記区画の数と、前記シュードジーンが配置された区画の数とをカウントする解析部であって、前記解析部は、前記DNAの種類についてカウントされた区画の数を出力し、前記融解温度および前記カウントされた区画の数から前記第1遺伝子および前記シュードジーンを判別する、解析部と、
を備え、

前記解析部は、前記第1遺伝子が配置された区画の数に対する、前記シュードジーンが配置された区画の数の比が、1であるか、1/2であるか、2であるか、0であるか、または、いずれでもない値であるかを判定し、

前記比が、所定の値に適合するか否かを判定し、適合する場合には適合することを示す情報を表示し、適合しない場合には適合しないことを示す情報を表示する、
DNA検出システム。

10

【請求項10】

前記基準融解温度を表す情報は、温度の範囲の閾値を表す情報であることを特徴とする、請求項9に記載のDNA検出システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はDNA検出方法およびDNA検出システムに関し、とくにデジタルPCRに関する。

【背景技術】

20

【0002】

従来の遺伝子検査には、PCR（特許文献2-4）やリアルタイムPCR（非特許文献1）などの手法がある。これらの手法では、検出対象となる遺伝子（本明細書で、「対象遺伝子」と称する）が微量なときに測定再現性が低下するという課題がある。

【0003】

この課題を解決する手法として、デジタルPCR（特許文献1）が開発された。デジタルPCRを用いると、限界希釈したサンプルを用いてDNAを0（無し）か1（有り）かで判定し、検出することで微量なDNAを定量できる。

【0004】

デジタルPCRの検出方法の一例を以下に示す。まず、限界希釈した検体に、PCRに必要なDNAポリメラーゼ、プライマー、蛍光標識プローブを加え、PCR反応液を調製する。PCR反応液をウェルまたはドロップレットなどの微小区画に分割する。このとき、各区画にそれぞれ、1分子の対象遺伝子が入っているか、入っていないかのいずれかであるようにする。

30

【0005】

次に、微小区画内の対象遺伝子を、PCRにより増幅する。PCR後に各微小区画の蛍光強度を測定し、閾値を超える蛍光強度をもつ微小区画の数をカウントすることにより、対象遺伝子を定量することができる。

【0006】

このようなデジタルPCRでは、限界希釈した検体を用いるため、PCRの反応を阻害する要因となる検体由来成分の影響を抑えることができる。また、検量線を必要としないため、対象とするDNAの絶対量を直接測定できる。

40

【0007】

ところで、従来のPCRでは、反応液中の反応阻害物の存在、テンプレートDNAの二次構造の形成、プライマーの設計不十分などの理由により、反応効率が低下することが知られている。

【0008】

一方、デジタルPCRでは、反応のエンドポイントにおいて測定するため、PCRの反応効率自体は測定結果に大きく影響しないとされてきた。しかし実際には、エンドポイントで測定しても各微小区画のPCR反応効率の不均一性による蛍光強度ばらつきが大きく

50

、デジタルPCRの測定再現性および測定精度を低下させていた。

【0009】

そこで、本発明者らは、デジタルPCRの測定再現性および測定精度の向上のため、各微小区画のPCR反応効率が不均一であっても、PCR増幅産物の融解温度(T_m)を測定することによって、微小区画内の対象遺伝子の判別ができる技術を開発した(特許文献5)。具体的には、例えば、PCR後、微小区画内で増幅した対象遺伝子と蛍光標識プローブとが解離する融解温度(T_m)を測定することで、PCRの反応効率が不均一であっても融解温度の違いによって対象遺伝子の遺伝子型を同定できるようになった。

【0010】

対象遺伝子の検出において、シュードジーンが存在が問題となる場合がある。生物が進化する過程では新たな遺伝子を獲得する一方で、機能を失ったシュードジーンも生まれている。シュードジーンは、ある遺伝子が進化する過程でコピーを作成し、一方は本来の機能をもたせたまま、他方を変化させ、変化した遺伝子が新しい機能を獲得せずに機能を失ったものである。このため、たとえばKRAS遺伝子とそのシュードジーンであるKRAS P1遺伝子のように両者の配列は極めて相溶性が高い。

10

【0011】

そのため、対象遺伝子にシュードジーンがある場合、対象遺伝子とそのシュードジーンの判別ができずに、シュードジーンを対象遺伝子と誤ってカウントし、対象遺伝子のコピー数が真の値よりも多くなってしまうことがある。

【0012】

従来の定量PCRでは、同じ1つの区画内に対象遺伝子とシュードジーンが存在するため、対象遺伝子とシュードジーンの配列が数塩基だけでも一致しない部分を選択してプライマーを設計すれば、対象遺伝子とシュードジーンが増幅が競合し、シュードジーンが増幅が抑制され、対象遺伝子を優先的に増幅することができる。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【文献】特表2013-521764号公開公報

【文献】米国特許第4683195号公報

【文献】米国特許第4683202号公報

【文献】米国特許第4800159号公報

【文献】特開2018-108063号公開公報

【非特許文献】

【0014】

【文献】Genome Res., 10, pp986-994, 1996

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

しかしながら、デジタルPCRでは、上記のシュードジーン判別が困難であるという課題があった。

40

【0016】

デジタルPCRでは、定量PCRと異なり、検体を添加した反応液を、1区画に1分子の対象遺伝子が入っているか、入っていないかのいずれかであるように微小な区画に分割する。このため、1区画には対象遺伝子またはシュードジーンのうち一方しか存在しない。

【0017】

したがって、対象遺伝子に対して設計されたプライマー領域に一致しない部分がシュードジーンに数塩基あったとしても、シュードジーンのみを含む微小区画では対象遺伝子との競合がないためシュードジーンが増幅してしまい、シュードジーンが対象遺伝子の偽陽性となるという課題があった。

50

【 0 0 1 8 】

対象遺伝子とシュードジーンとを判別することは、偽陽性および偽陰性を低減し、測定再現性および測定精度を向上させる上で重要である。

【 0 0 1 9 】

そこで、本発明の目的は、融解曲線分析を用いたデジタルPCRにおいて、対象遺伝子が配置された微小区画とシュードジーンが配置された微小区画とを測定装置により正確に見分け、対象遺伝子を精度よくカウントする、新たなDNA検出方法およびDNA検出システムを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 0 】

本発明者らは、融解曲線分析を用いたデジタルPCRにおいて、対象遺伝子とシュードジーンの融解温度が異なるようにプローブを設計すれば、融解温度によって対象遺伝子とシュードジーンとを別の遺伝子として判別でき、さらに2つの遺伝子のカウント数の対応関係からそれらが対象遺伝子およびそのシュードジーンであると決定できることを見出し、本発明の完成に至った。

【 0 0 2 1 】

本発明に係るDNA検出方法の一例は、

複数の区画のそれぞれにDNA溶液を配置する工程であって、前記DNA溶液は第1遺伝子およびそのシュードジーンを含む複数種類のDNAを含有する可能性があり、前記DNA溶液は蛍光標識プローブまたはDNAインターカレーターを含有する、DNA溶液を配置する工程と、

各前記区画において核酸増幅反応を行う工程と、

前記核酸増幅反応中に、又は前記核酸増幅反応後に、各前記区画を温度変化させるとともに、前記温度変化に伴って変化する蛍光強度を各前記区画について測定する工程と、

前記温度変化に伴う前記蛍光強度の変化に基づき、各前記区画について、当該区画に配置されたDNAの二重鎖の融解温度を算出する工程と、

前記融解温度に基づき各前記区画についてDNAの種類を判別するとともに、前記DNAの各種類について区画の数をカウントする工程と、

前記DNAの各種類についてカウントされた区画の数を出力する工程と、

前記融解温度および前記カウントされた区画の数から前記第1遺伝子および前記シュードジーンを判別する工程と、
を含む。

【 0 0 2 2 】

本発明に係るDNA検出システムの一例は、

複数の区画のそれぞれにDNA溶液を配置可能なデバイスの画像を撮像する撮像装置であって、前記DNA溶液は第1遺伝子およびそのシュードジーンを含む複数種類のDNAを含有する可能性があり、前記DNA溶液は蛍光標識プローブまたはDNAインターカレーターを含有する、撮像装置と、

各前記区画において核酸増幅反応を行うために、各前記区画の温度を変化させる温度調整部と、

第1遺伝子と、前記第1遺伝子のシュードジーンとのそれぞれについて、基準融解温度を表す情報を格納するデータベースと、

温度変化に伴って変化する蛍光強度を各前記区画について取得するために、前記撮像装置に画像を撮像させる撮像制御部と、

各前記区画について、当該区画に配置された前記DNAの二重鎖の融解温度を表す情報を格納する融解温度メモリーであって、前記融解温度は、前記撮像装置により撮像された画像における、温度変化に伴う蛍光強度の変化に基づいて得られる、融解温度メモリーと、

前記データベースおよび前記融解温度メモリーを用いて、前記第1遺伝子が配置された前記区画の数と、前記シュードジーンが配置された区画の数とをカウントする解析部であって、前記解析部は、前記DNAの各種類についてカウントされた区画の数を出力し、前

10

20

30

40

50

記融解温度および前記カウントされた区画の数から前記第 1 遺伝子および前記シュードジーンを判別する、解析部と、
を備える。

【発明の効果】

【0023】

本発明によって、融解曲線分析を用いたデジタルPCRにおいて、対象遺伝子が配置された微小区画とシュードジーンが配置された微小区画とを測定装置によってより正確に見分け、対象遺伝子をより精度よくカウントする、新たなDNA検出方法およびDNA検出システムが提供される。

【図面の簡単な説明】

10

【0024】

【図1】実施形態1に係るDNA検出方法の原理による測定結果の例。

【図2】2種類の異なる蛍光色素の蛍光強度を計測することによって、対象遺伝子の野生型および変異型を検出するデジタルPCRの測定結果の例。

【図3】実施形態1における蛍光測定部の模式図。

【図4】実施形態1におけるデジタルPCRシステムの模式図。

【図5】実施形態1におけるDNA検出方法において用いるデータベースの一例。

【図6】実施形態1におけるDNA検出方法において、蛍光標識プローブを用いてDNAの融解温度を測定する方法を示す模式図。

【図7】実施形態1における、温度変化に伴うウェルが含む蛍光色素の蛍光強度に係るデータの一例。

20

【図8】実施形態1における、温度変化に伴う各ウェルの蛍光強度変化から得られる融解温度に係るデータの一例。

【図9】実施形態1において各区画の遺伝子をカウントした結果を示す一例。

【図10】図3および図4の装置を用いて融解温度測定を行う方法の一実施態様を示すフローチャート。

【図11】モニターに表示される測定結果の一例。

【図12】実施形態1に係る測定結果の一例。

【発明を実施するための形態】

【0025】

30

本発明の目的、特徴、利点、およびそれらに係るアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかである。本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施形態および具体的な実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示または説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図および範囲から逸脱することなく、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【0026】

[実施形態1]

(1) DNA検出方法の原理および効果

40

図1に、実施形態1に係るDNA検出方法の原理による測定結果の例を示す。この例は、PCR増幅産物に対し、温度変化に伴う蛍光強度変化に基づいてDNA二重鎖の融解温度を算出することによって、対象遺伝子の野生型、対象遺伝子の変異型、および対象遺伝子のシュードジーンを検出する方法の代表的な実施態様において想定されるものである。

【0027】

対象遺伝子の野生型アレルを含む微小区画101と、対象遺伝子の変異型アレルを含む微小区画102と、対象遺伝子のシュードジーンを含む微小区画103とについて、蛍光強度と融解温度との関係がプロットされている。

【0028】

また、図2に、2種類の異なる蛍光色素の蛍光強度を計測することによって、対象遺伝

50

子の野生型および変異型を検出するデジタルPCRの測定結果の例を示した。

【0029】

デジタルPCRでは、DNAの変異(遺伝子型)ごとに異なる色の蛍光標識プローブを用いて、複数種類の変異を一度の測定で検出する場合がある。図2の例は、対象遺伝子の野生型アレルに対しては黄色の蛍光標識プローブを、対象遺伝子の変異型アレルに対しては緑色の蛍光標識プローブを用いた場合の結果を模式的に示した図である。対象遺伝子の野生型アレルを含む微小区画201と、対象遺伝子の変異型アレルを含む微小区画202と、対象遺伝子のシュードジーンを含む微小区画203とについて、緑色の蛍光強度と、黄色の蛍光強度との関係がプロットされている。

【0030】

ここでは、蛍光標識プローブは、PCRに用いられるプライマーペアの間に位置する配列に相補的であって、かつ、プライマーが伸長するときに、プローブが分解され、蛍光標識が蛍光を発するように構成されているものとする。具体的には、TaqMan(登録商標)プローブが例示できる。

【0031】

PCR中にDNAが増幅すると、対象遺伝子の野生型アレルを含む微小区画201では、対象遺伝子の野生型アレルに対応した黄色の蛍光標識プローブが分解され、黄色の蛍光を発する。また、対象遺伝子の変異型アレルを含む微小区画202では、対象遺伝子の変異型Aアレルに対応した緑色の蛍光標識プローブが分解され、緑色の蛍光を発する。対象遺伝子が含まれない空のドロップレットは、緑色と黄色の蛍光のどちらも検出されない(図示せず)。

【0032】

しかし、実際には図2に示すように、対象遺伝子には配列のよく似たシュードジーンが存在する場合がある。対象遺伝子に対して設計されたプライマー領域に一致しない部分がシュードジーンに数塩基あったとしても、シュードジーンを含む微小区画203では、対象遺伝子との競合がないためシュードジーンが増幅する。これによって、対象遺伝子の蛍光標識プローブが分解され、黄色の蛍光を発し、対象遺伝子の野生型アレルを含む微小区画201と分布が重なってしまうことがある。

【0033】

融解曲線分析を用いたデジタルPCRでは、蛍光標識プローブとDNAとの融解温度が遺伝子型によって異なることを利用し、遺伝子型の判別を行うことができる。図1の例は、対象遺伝子について、野生型、変異型、シュードジーンのそれぞれに対応した蛍光標識プローブを用いて、各微小区画内のDNAの融解温度を測定した結果を模式的に示した図である。

【0034】

ここで、蛍光標識プローブとしては、例えば周知のモレキュラービーコンを用いることができる。以下、モレキュラービーコンを例として、DNA検出方法を詳細に説明する。モレキュラービーコンはオリゴヌクレオチドとして構成され、対象遺伝子を増幅させるPCRに用いられるプライマーペアの間にある配列に相補的な配列を有する。また、モレキュラービーコンは、その両端に互いに相補的な配列を有し、一端には蛍光色素が、他端には消光色素(クエンチャー)が、それぞれ設けられている。

【0035】

モレキュラービーコンは、対象遺伝子とハイブリダイズすると、両端にある蛍光色素と消光色素とが離れて蛍光を発するが、温度上昇に伴って対象遺伝子から解離すると、両端の相補的な配列が互いにハイブリダイズしてステムループ構造を形成し、蛍光色素と消光色素が近づいて蛍光色素が消光する。

【0036】

対象遺伝子の野生型アレルを含む微小区画101では、対象遺伝子の野生型アレルに対応した蛍光標識プローブがPCRにより増幅したDNAにハイブリダイズして蛍光を発し、野生型アレルの蛍光標識プローブに対応した融解温度が観察される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

また、対象遺伝子の変異型アレルを含む微小区画 1 0 2 では、対象遺伝子の変異型アレルに対応した蛍光標識プローブが P C R により増幅した D N A にハイブリダイズして蛍光を発生し、変異型アレルの蛍光標識プローブに対応した融解温度が観察される。

【 0 0 3 8 】

さらに、対象遺伝子のシュードジーンを含む微小区画 1 0 3 では、対象遺伝子の野生型アレルに対応した蛍光標識プローブが P C R により増幅した D N A にミスマッチ塩基を含む形でハイブリダイズして蛍光を発生し、このミスマッチハイブリダイゼーションに対応した融解温度が観察される。

【 0 0 3 9 】

こうして、蛍光強度と、蛍光の種類（たとえば色）と、融解温度とに基づき、野生型アレルを有する対象遺伝子の有無、変異型アレルを有する対象遺伝子の有無、シュードジーンを有する対象遺伝子の有無が判断できる。

【 0 0 4 0 】

D N A の融解温度は、P C R の反応効率や蛍光測定時の平面内測定ばらつき等に左右されないため、微小区画内の D N A の遺伝子型を高精度で判別することができる。たとえば、対象遺伝子に対する各蛍光標識プローブの融解温度（ T_m ）が異なるように蛍光標識プローブの配列を決めておき、微小区画内の D N A に対し、温度変化に伴う蛍光強度変化を測定し、融解曲線分析を行い、融解温度を比較することにより、微小区画内の D N A の遺伝子型判別が可能になる。

【 0 0 4 1 】

さらに、対象遺伝子のコピー数とそのシュードジーンのコピー数との関係（たとえば比）は、それぞれの遺伝子の染色体上の位置により決まっており、たとえば双方が常染色体上に存在する場合にはそれらのコピー数は互いに等しくなる。そのため、各微小区画の D N A の遺伝子型をカウントし、対象遺伝子の野生型のコピー数および変異型のコピー数の合計と、シュードジーンのコピー数との関係が、期待される関係（たとえば 1 : 1 ）に適合するか否かを確認することにより、より高精度な遺伝子検出が可能になる。

【 0 0 4 2 】

(2) D N A 検出装置の構成例

実施形態 1 に係る D N A 検出システムは、D N A 溶液中の対象遺伝子を検出するための D N A 検出装置を備え、本明細書に記載される D N A 検出方法を実行する。本実施形態では、D N A 検出装置が単独で D N A 検出システムを構成するが、複数の装置が協働して D N A 検出システムを構成するように設計することも可能である。

【 0 0 4 3 】

D N A 検出装置は、D N A 溶液を加温するための温度調整部と、D N A 溶液から放出される蛍光の強度を測定するための蛍光測定部と、D N A 溶液の温度変化に伴う前記蛍光の強度の変化を表す融解曲線に基づいて D N A 二重鎖の融解温度を算出するコンピューターと、コンピューターから送信される情報を表示するモニターとを備える。

【 0 0 4 4 】

D N A 溶液は、どのような担体にあってもよく、例えば、オイル中のドロップレットとして提供されてもよく、プレートなどのウェル内に配置されもよい。D N A 検出装置の例として、図 3 および図 4 を用いて、蛍光測定部を有する D N A 検出装置を示す。

【 0 0 4 5 】

図 3 は、実施形態 1 における蛍光測定部の模式図であり、図 4 は、実施形態 1 におけるデジタル P C R システムの模式図である。図 3 の蛍光測定部は、限界希釈されたドロップレットまたはウェルが含む蛍光色素の色と蛍光強度を測定する。図 4 のデジタル P C R システムは、図 3 に例示される蛍光測定部と、測定データを解析するコンピューターと、結果を表示するモニターとを備え、融解曲線分析を用いる。これらの例では、蛍光測定部がドロップレットまたはウェル中の D N A 溶液が含む蛍光色素の色および蛍光強度を測定するが、本発明に係る D N A 検出装置の構成はこれに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

図 3 A に示す蛍光測定部の例では、マイクロ流路を用いてドロップレットの蛍光強度を測定する。ドロップレット 3 0 1 がマイクロ流路 3 0 3 中を矢印の方向に流れている。測定位置（図 3 A ではドロップレット 3 0 2 の位置）までドロップレットが流れると、温度調整部（図示せず）によってドロップレットが加温されつつ、光源 3 0 4 により励起光がドロップレットに照射される。光源 3 0 4 によりドロップレットに含まれる蛍光物質が励起され、発する蛍光を蛍光フィルター 3 0 5 を通してフォトマルチプルメーター 3 0 6 で検出する。フォトマルチプルメーター 3 0 6 は、複数の区画のそれぞれに DNA 溶液を配置可能なデバイスの画像を撮像する撮像装置の例である。

【 0 0 4 7 】

蛍光測定部は、光源 3 0 4 と、蛍光フィルター 3 0 5 と、フォトマルチプルメーター 3 0 6 とを備える。蛍光測定部は、蛍光色素の色ごとに別々に設けてもよいし、図 3 A に示すように 1 つの光源の励起光で 2 種類の蛍光色素を励起し、2 つの蛍光フィルターでそれぞれの蛍光を同時に検出する構成にしてもよい。

【 0 0 4 8 】

また、図 3 B および図 3 C のようにドロップレットを平面上に配列し、各ドロップレットの蛍光色素の色および蛍光強度を測定してもよい。

【 0 0 4 9 】

より具体的に説明する。例えば、複数のドロップレット 3 1 1 をドロップレット検出用カートリッジ 3 1 0 にアレイ状に配列し、温度調整部である温調ステージ 3 1 2 の上にセットする。温調ステージ 3 1 2 は、各区画において核酸増幅反応を行うために、各区画の温度を変化させる。温調ステージ 3 1 2 でドロップレット検出用カートリッジの温度を変化させ、温度変化に伴うドロップレットの蛍光強度変化を測定する。対象遺伝子を含むドロップレット 3 0 1 と、対象遺伝子を含まないドロップレット 3 0 2 とで、蛍光強度はそれぞれ異なる変化をする。

【 0 0 5 0 】

測定の手順はたとえば次のようなものである。まず、光源 3 0 4 からレンズ 3 0 8、蛍光フィルター 3 0 5 およびダイクロイックミラー 3 0 9 を通して、励起光を各ドロップレット 3 1 1 に照射する。励起光により各ドロップレット 3 1 1 に含まれる蛍光物質が励起され、発する蛍光をダイクロイックミラー 3 0 9、蛍光フィルター 3 0 5、レンズ 3 0 8 を通して CCD カメラ 3 0 7 で検出する。CCD カメラ 3 0 7 は撮像装置の例である。

【 0 0 5 1 】

図 3 A では、ドロップレットを一つずつ処理する必要があるが、多数のドロップレットを一度に処理できるという点で、図 3 B および C の装置が好ましい。また、図 3 B および C の装置では、温調ステージ 3 1 2 を DNA の増幅反応にも用いることができる点でも、図 3 A より好適である。

【 0 0 5 2 】

さらに、図 3 D のようにドロップレットの代わりにアレイ状に配列されたウェルを用いてもよい。1 ウェルに 1 つか 0 の対象遺伝子が入るように検体を添加し、ウェル内で PCR を行ってウェルの蛍光色素の色および蛍光強度を測定する。

【 0 0 5 3 】

より具体的に説明する。例えば、ウェル方式検出用のカートリッジ 3 1 3 に設けられたウェルに、検体を含む反応液を添加する。その後、ウェル内で PCR を行い、温度調整部である温調ステージ 3 1 2 の上にセットする。温調ステージ 3 1 2 によってカートリッジ 3 1 3 の温度を変化させ、温度変化に伴うウェルの蛍光強度変化を測定する。対象遺伝子を含むウェル 3 1 4 と、対象遺伝子を含まないウェル 3 1 5 とで、蛍光強度はそれぞれ異なる変化をする。

【 0 0 5 4 】

測定の手順はたとえば次のようなものである。まず、光源 3 0 4 からレンズ 3 0 8、蛍光フィルター 3 0 5 およびダイクロイックミラー 3 0 9 を通して、励起光を各ウェルに照

10

20

30

40

50

射する。励起光によりウェル内の反応液に含まれる蛍光物質が励起され、発する蛍光をダイクロイックミラー309、蛍光フィルター305、レンズ308を通してCCDカメラ307で検出する。図3Dのようにウェルを用いた場合、ドロップレットをドロップレット検出用カートリッジに配列する工程なしに、カートリッジ313内でPCRから融解曲線分析まで行える。

【0055】

温度変化に伴うウェルの蛍光強度変化を観察する際は、温調ステージ312の下に傾斜調整部（図示せず）を設けてもよい。傾斜調整部は、温調ステージ312による加熱によってカートリッジ313内に発生した気泡を除去する。これは、その後、温調ステージ312により試料の温度を下降させながら各ウェルの蛍光強度を計測する際に、気泡によって

10

【0056】

図4に示すように、蛍光測定部401で検出された蛍光データは、コンピューター402に送られる。コンピューター402において、解析部403で増幅産物の融解温度が算出され、メモリー405に保存される。このように、メモリー405は融解温度メモリーとして機能し、各区画について、当該区画に配置されたDNAの二重鎖の融解温度を表す情報を格納する。なお、後述のように、融解温度は、撮像装置（たとえばフォトマルチプルメーター306）により撮像された画像における、温度変化に伴う蛍光強度の変化に基づいて得られる。

【0057】

また、あらかじめ遺伝子の種類、融解温度、数の関係がデータベース404に準備されている。とくに、データベース404は、対象遺伝子（第1遺伝子）と、対象遺伝子のシュードジーンとのそれぞれについて、基準となる所定の融解温度（基準融解温度）を表す情報を格納する。データベース404を参照して、メモリー405の融解温度の測定値に基づいて対象遺伝子の遺伝子型を判別し、遺伝子型ごとにカウントする。

20

【0058】

カウント結果はモニター406に表示される。モニター406は出力装置の例であり、モニター406における表示処理を他の出力装置（印刷装置、不揮発性記憶装置、等）への出力処理に置き換えてもよい。

【0059】

実施形態1に係るDNA検出装置は、サンプル分割部を備えてもよい。サンプル分割部は、対象遺伝子を含有するDNA溶液を、微小区画に分割する。微小区画は、カートリッジ内にアレイ状に配列されたウェルとして構成されてもよいし、オイル中に分散するドロップレットとして構成されてもよい。区画をこのように構成することにより、限界希釈を適切に行うことができる。

30

【0060】

また、実施形態1に係るDNA検出装置は、微小区画に対してDNAを増幅するための増幅部を含んでもよい。

【0061】

(3) 融解曲線を分析する方法の例

図5は、デジタルPCRの計測に先立って準備される、遺伝子の基準融解温度を表す情報を格納するデータベースの一例を示す。図5に示すデータは、あらかじめパイロット実験などにより計測し、データベース404に保存しておくことができる。

40

【0062】

図5の例では、各遺伝子について、その遺伝子と、その遺伝子のシュードジーンとのそれぞれについて基準融解温度が格納されている。また、この例では、基準融解温度は遺伝子型ごとに格納されている。1つの遺伝子について変異型が複数定義されていてもよい。

【0063】

基準融解温度を表す情報は、この例では単一の温度を表す値として定義されているが、温度の範囲を表す情報として定義されてもよい。

50

【 0 0 6 4 】

また、この例では、基準融解温度に加え、各遺伝子の各遺伝子型について、蛍光色素の色を表す情報が格納されている。

【 0 0 6 5 】

また、この例では、各遺伝子について、対象遺伝子（遺伝子型を区別しない）の数と、そのシュードジーンの数との関係を表す情報とが格納されている。この関係は、たとえば比として表される。図5の例では、遺伝子Aについて、対象遺伝子がxコピー存在する場合に、シュードジーンがxコピー存在することが示されており、すなわち対象遺伝子の数に対するシュードジーンの数比が1であることが示されている。

【 0 0 6 6 】

対象遺伝子とそのシュードジーンのコピー数の関係は、それぞれの染色体上の位置によって決まるので、染色体上の位置関係ごとにコピー数の関係を定義してもよい。具体例を以下に示す。

【 0 0 6 7 】

まず、対象遺伝子が常染色体上にある場合について説明する。この場合に、シュードジーンが常染色体上にあると、シュードジーンの数対象遺伝子の数と等しくなる（図5の遺伝子Aはこのケースに該当する可能性がある）。シュードジーンがX染色体上にあると、女性の検体であればシュードジーンの数対象遺伝子の数と等しくなる一方、男性の検体であればシュードジーンの数対象遺伝子の数の半分となる（図5の遺伝子Bはこのケースに該当する）。シュードジーンがY染色体上にあると、女性の検体であればシュードジーン

10

20

【 0 0 6 8 】

次に、対象遺伝子がX染色体上にある場合について説明する。この場合に、シュードジーンが常染色体上にあると、女性の検体であればシュードジーンの数対象遺伝子の数と等しくなる一方、男性の検体であればシュードジーンの数対象遺伝子の2倍になる。シュードジーンがX染色体上にあると、シュードジーンの数対象遺伝子の数と等しくなる（図5の遺伝子Aはこのケースに該当する可能性もある）。シュードジーンがY染色体上にあると、女性の検体であればシュードジーンの数0になり、男性の検体であればシュードジーンの数対象遺伝子の数と等しくなる。

30

【 0 0 6 9 】

さらに、対象遺伝子がY染色体上にある場合について説明する。この場合に、女性の検体であれば対象遺伝子の数が0となる。男性の検体であって、シュードジーンが常染色体上にあると、シュードジーンの数対象遺伝子の数の2倍になる。男性の検体であって、シュードジーンがX染色体上にあると、シュードジーンの数対象遺伝子の数と等しくなる。男性の検体であって、シュードジーンがY染色体上にあると、シュードジーンの数対象遺伝子と等しくなる。

【 0 0 7 0 】

図6は、蛍光標識プローブを用いて対象遺伝子およびシュードジーン

40

【 0 0 7 1 】

図6Aのように蛍光標識プローブ602が単独で遊離して存在するときには、ステムループが形成され、蛍光色素603とクエンチャー604が近接しているため、蛍光は発しない。蛍光標識プローブ602をPCR反応が終了した検体溶液に添加すると、室温程度の温度では、図6Bのように検体溶液内で増幅したDNA601に蛍光標識プローブ602のループ部分がアニールする。これによって、蛍光色素603とクエンチャー604が離れるため、蛍光標識プローブ602は強い蛍光を発する。

【 0 0 7 2 】

50

その後、検体溶液を加熱すると、図6CのようにDNA601と蛍光標識プローブ602が解離し、再び図6Aのように蛍光標識プローブ602内でステムループが形成されるため、蛍光標識プローブ602からの蛍光強度が低下する。

【0073】

このときの融解曲線（温度変化に対する蛍光強度変化を表す曲線）をグラフにプロットした結果の一例を図6Dに示す。なお、この蛍光標識プローブは、PCRのための蛍光標識プローブと共用してもよいが、PCRのための蛍光標識プローブとは別のプローブを製作して用いてもよい。

【0074】

また、融解曲線の測定は、核酸増幅反応と並行して行ってもよく、核酸増幅反応とは独立に（例えば、核酸増幅反応完了後に）、検体溶液を昇温させることによって行ってもよい。

10

【0075】

図6Dの融解曲線において、蛍光強度を温度で微分した結果（または蛍光強度変化を温度変化で除算した結果）の微分曲線を図6Eに示す。なお図6Eでは符号を反転させている。蛍光強度の変曲点に対応する温度が、DNA二重鎖の融解温度605として算出される。図6Dの蛍光強度の変曲点における温度は、図6Eの微分曲線の最大値における温度に対応する。

【0076】

このように、融解温度は、蛍光強度の変曲点として算出することができる。このような算出方法によれば、融解温度を精度よく算出することができる。

20

【0077】

なお、対象遺伝子を検出するための蛍光標識プローブの融解温度は、公知技術に基づいて制御可能である。たとえば、プローブの配列や鎖長を変えることで制御することができる。または、Peptide Nucleic Acid (PNA) や Locked Nucleic Acid (LNA) のような人工DNAを利用することで制御することもできる。

【0078】

ここで用いる蛍光標識プローブ602において、蛍光色素603およびクエンチャー604の組み合わせは、一般的にリアルタイムPCRに用いられている組み合わせであれば特に限定されない。たとえば、蛍光色素603の例としてFAM、VIC、ROX、Cy3、Cy5など、クエンチャー604の例としてTAMRA、BHQ1、BHQ2、BHQ3などが挙げられる。

30

【0079】

蛍光標識プローブ602の配列は、対象遺伝子の野生型と、対象遺伝子の変異型と、対象遺伝子のシュドジーンとのそれぞれに特異的なものをそれぞれ用意し、これらを個別に検出してもよい。この場合には、図6Fに示すように、蛍光標識プローブ602が、対象遺伝子に対応した配列を有する第1蛍光標識プローブと、シュドジーンに対応した配列を有する第2蛍光標識プローブとを含むということができる。このような構成では、対象遺伝子とシュドジーンとをより容易に区別することができる。

40

【0080】

あるいは、対象遺伝子の野生型と、対象遺伝子の変異型とに対しては特異的な配列をそれぞれ用意し、シュドジーンに対しては対象遺伝子の野生型に特異的な配列の蛍光標識プローブをミスハイブリダイゼーションさせて検出してもよい。この場合には、図6Gに示すように、蛍光標識プローブ602が、対象遺伝子に対応した配列を有する第1蛍光標識プローブを含むということができる。このような構成では、準備する蛍光標識プローブの数を低減することができる。

【0081】

実施形態1の変形例において、蛍光標識プローブの代わりとして、DNAインターカレーターを用いることもできる。具体的な方法は、まず、DNAインターカレーターをPC

50

R 反応液に添加して検体溶液を作製し、PCRなどの核酸増幅反応を行う。室温程度の温度では、検体溶液内で増幅した2本鎖DNAにDNAインターカレーターが結合し、強い蛍光を発する。

【0082】

その後、検体溶液の温度が上昇するにつれ、検体溶液内の2本鎖DNAが解離して1本鎖DNAとなり、DNAインターカレーターが結合しなくなるため、蛍光強度が減少する。なお、温度変化に対する蛍光強度変化の測定は、核酸増幅反応とは独立に（例えば、核酸増幅反応完了後に）、検体溶液を昇温させることによって行ってもよい。

【0083】

なお、対象遺伝子の融解温度は、プライマーの設計を変えることにより、PCR増幅産物の配列や配列の鎖長に依存して制御することができる。

10

【0084】

DNAインターカレーターとしては、2本鎖DNAと結合することによって蛍光強度が増加し、2本鎖DNAの検出に用いることのできるインターカレーターを用いる。具体的には、SYBR（登録商標）Green I、SYBR Gold、PicoGreen（登録商標）、SYTO（登録商標）Blue、SYTO Green、SYTO Orange、SYTO Red、POPO（登録商標）-1、BOBO（登録商標）-1、YOYO（登録商標）-1、TOTO（登録商標）-1、JOJO（登録商標）-1、POPO-3、LOLO（登録商標）-1、BOBO-3、YOYO-3、TOTO-3、PO-Pro（登録商標）-1、YO-Pro（登録商標）-1、TO-Pro（登録商標）-1、JO-Pro（登録商標）-1、PO-Pro-3、YO-Pro-3、TO-Pro-3、エチジウムブロマイド、等が適用可能である。DNAインターカレーターが熱耐性である場合、PCR反応を行う前からウェルまたはドロップレットに添加しておくことができる。

20

【0085】

図6の原理を用いて、対象遺伝子およびシュードジーンの融解温度を分析する方法を以下に示す。

【0086】

検体と、蛍光標識プローブと、酵素類とを含むPCR反応液を微小区画に分割する。PCR処理の後に、温度を変えながら取得した蛍光画像に基づき、各区画の蛍光強度を算出し、図7に示すようにメモリー405に格納する。図7は、実施形態1においてメモリーに格納されるデータの一例を示す。このデータは、たとえば、各ウェルについて、温度変化に伴う蛍光色素の蛍光強度を解析部で解析することによって取得される。

30

【0087】

図7の例では、蛍光強度は、複数の色について測定されている。このようにすると、より精度の高い判別を行うことができる。ただし、蛍光強度は単一の色について測定されてもよい。

【0088】

次に、各区画の温度変化に対する蛍光強度変化に基づき、各区画の融解曲線を作成する。次に、各区画の融解曲線に基づき、各区画の融解温度の値を算出して、図8に示すようにメモリー405に格納する。このように蛍光強度の測定に基づいて算出された融解温度を、以下では「測定融解温度」と呼び、予め定義される基準融解温度と区別する。

40

【0089】

図9は、各区画の遺伝子をカウントした結果を示す一例である。図9に示すように、各区画に配置された遺伝子が、データベース404における対象遺伝子の野生型であるか、対象遺伝子の変異型であるか、対象遺伝子のシュードジーンであるか、またはいずれでもないかを判定する。次に、対象遺伝子の野生型の数（対象遺伝子の野生型が配置された区画の数）と、対象遺伝子の変異型の数（対象遺伝子の変異型が配置された区画の数）と、対象遺伝子のシュードジーンの数（対象遺伝子のシュードジーンが配置された区画の数）とをカウントする。

50

【0090】

次に、データベース404を参照して、対象遺伝子の数（野生型および変異型の合計数）と、シュードジーンの数との関係について判定を行う。判定は、たとえば、対象遺伝子の数に対するシュードジーンの数と測定された比が、データベース404に記録された比と適合するか否かに基づいて行われる。

【0091】

具体例として、図5に示す遺伝子Aを検出する場合には、対象遺伝子の数に対するシュードジーンの数と測定された比が1であれば適合していると判定され、1でなければ適合していないと判定される。なお、適合の判定は範囲を用いて行われてもよく、たとえば、図5に示す遺伝子Aを検出する場合には、測定された比が0.8～1.2の範囲内であれば適合していると判定し、そうでなければ適合していないと判定してもよい。

10

【0092】

なお、図5の遺伝子Aの場合には比は1または約1であるが、遺伝子によって比は異なり、1/2、1、2、0のいずれかとなる。

【0093】

測定された比が、データベース404に記録された比と適合する場合には、これらが適合することを示す情報がモニター406に表示される。適合しない場合には、これらが適合しないことを示す情報（たとえば測定エラーが発生したことを示す情報）がモニター406に表示される。これらの情報は、デジタルPCRの精度管理に反映することができる。また、測定エラーがあらかじめ設定した基準以上の頻度で発生する場合は、モニター406にアラートを表示してもよい。このアラートは、たとえば、ユーザーにデジタルPCRシステムの調整が必要であることを示す情報を含む。

20

【0094】

(4) 融解温度を測定する方法

融解温度測定を行う方法の一例を、図10のフローチャートを参考にしながら説明する。この例は、図3および図4に示す装置と、カートリッジとを用いて融解温度測定を行う方法の一実施態様である。この例では、図3Bの装置と、図3Dのウェルを備えたカートリッジと、DNAインターカレーターまたはモレキュラービーコンとが用いられる。

【0095】

まず、デジタルPCRで測定する対象の遺伝子に関するデータベース404を準備する(S1001)。次に、DNAを含む生体試料由来の検体溶液(DNA溶液)を準備する。検体溶液は、対象遺伝子(第1遺伝子)およびそのシュードジーンを含む複数種類のDNAを含有する可能性がある。この検体溶液をPCR反応液に添加する。PCR反応液は、DNAポリメラーゼと、プライマーと、DNAインターカレーターまたはモレキュラービーコンと、デオキシリボヌクレオチド類と、緩衝液とを含む。これによって、検体溶液は、蛍光標識プローブまたはDNAインターカレーターを含有するものとなる。

30

【0096】

このPCR反応液を、カートリッジ313内にアレイ状に配列されたウェルに分割する(S1002)。この工程は、複数の区画のそれぞれに検体溶液を配置する工程である。ここで、本実施形態ではデジタルPCR処理が実施される。すなわち、各区画に配置される検体溶液は限界希釈されており、これによってデジタルPCRが実行可能となっている。

40

【0097】

次に、カートリッジ313をサーマルサイクラーにセットし、サーマルサイクラーの温度制御によりPCRを行う(S1003)。これは、各区画において核酸増幅反応を行う工程である。変性工程、伸長工程およびアニーリング工程を含むサイクルを繰り返すことにより、DNAが増幅する。

【0098】

DNAインターカレーターを用いている場合には、これが増幅したDNAにインターカレートし、モレキュラービーコンを用いている場合には、これが増幅したDNAにハイブリダイズする。これによって蛍光強度が高くなる。各工程の温度、時間、サイクル数など

50

を含む反応条件は、当業者が容易に設定することができる。PCR後、温度を室温へと下げると、DNAは2本鎖を形成する。

【0099】

PCR後、蛍光画像を取得する(S1004)。詳細な手順例は以下の通りである。カートリッジ313をDNA検出装置の温調ステージ312上に置く。温調ステージ312によりカートリッジ313を温度変化させながら、蛍光測定部401が、各ウェルのDNAインターカレーターまたはモレキュラービーコンからの蛍光強度を測定する。これによって蛍光画像が取得される。

【0100】

S1004の工程は、各区画を温度変化させるとともに、温度変化に伴って変化する蛍光強度を各区画について測定する工程である。S1004の工程は、核酸増幅反応中に行われてもよいし、核酸増幅反応後に行われてもよい。

10

【0101】

S1004の工程において、コンピューター402または他の構成要素が、撮像制御部として機能してもよい。撮像制御部は、温度変化に伴って変化する蛍光強度を各区画について取得するために、撮像装置(たとえばフォトマルチプルメーター306)に画像を撮像させる。

【0102】

次に、得られた蛍光画像をコンピューター402に送り、解析部403で各微小区画の蛍光強度を算出し、メモリー405に格納する(S1005)。

20

【0103】

解析部403は、その蛍光強度データをもとに融解曲線を作成し(S1006)、その融解曲線を用いて融解温度を算出し、メモリー405に格納する(S1007)。この工程は、温度変化に伴う蛍光強度の変化に基づき、各区画について、当該区画に配置されたDNAの二重鎖の融解温度を算出する工程を含む。このようにして測定融解温度が取得される。

【0104】

また、解析部403は、データベース404の基準融解温度に関するデータを参照し、メモリー405の測定融解温度に基づいて、対象遺伝子の野生型、変異型、シュードジーンそれぞれの数をカウントする(S1008)。S1008の工程は、基準融解温度および測定融解温度に基づき各区画についてDNAの種類を判別するとともに、DNAの各種類について区画の数をカウントする工程を含む。

30

【0105】

このように、S1008において、解析部403は、データベース404およびメモリー405を用いて、対象遺伝子(第1遺伝子)が配置された区画の数と、シュードジーンが配置された区画の数とをカウントする。また、S1008において、解析部403は、検体溶液に、対象遺伝子と、対象遺伝子のシュードジーンとが含有されているか否かを判定してもよい。

【0106】

野生型、変異型、シュードジーンの区別は、基準融解温度および測定融解温度に基づいて行うことができる。たとえば、図5の遺伝子Aの場合では、測定融解温度が63であれば対象遺伝子の野生型であると判定することができる。

40

【0107】

この判定は範囲に基づいて行われてもよい。たとえば、あるウェルに係る測定融解温度が、ある遺伝型についてデータベース404に記録された基準融解温度を含む所定範囲内(たとえば基準融解温度 ± 1 以内)であれば、そのウェルにはその遺伝型の遺伝子が配置されていると判定することができる。このように幅を有する範囲を用いると、許容範囲を適切に考慮した頑強な判定を行うことができる。

【0108】

次に、解析部403は、対象遺伝子の数(野生型および変異型の合計数)とシュードジ

50

ーンの数との関係について判定を行う。すなわち、融解温度およびカウントされた区画の数から、対象遺伝子およびシュードジーンを判別する。たとえば、比が1であるか、1/2であるか、2であるか、0であるか、またはこれらのいずれでもないかを判定する。結果を出力する（S1009）。ここで、上述のように、この判定は範囲に基づいて行われてもよい。たとえば、解析部403は、S1009の工程において、対象遺伝子（第1遺伝子）が配置された区画の数に対する、シュードジーンが配置された区画の数の比が、1に対応する範囲内の値であるか、1/2に対応する範囲内の値であるか、2に対応する範囲内の値であるか、0に対応する範囲内の値であるか、または、いずれの範囲内でもない値であるかを判定する。このように、対応関係を自動的に判定することにより、装置の使用者は検体溶液の内容をより容易に把握することができる。

10

【0109】

最後に、モニター406が、カートリッジ内の対象遺伝子の数および総遺伝子数をモニターに出力する（S1010）。たとえば、DNAの各種類についてカウントされた区画の数が出力される。

【0110】

S1008において、各ウェルのDNAがポジティブである（すなわちそのウェルに遺伝子が配置されている）か、ネガティブである（すなわちそのウェルに遺伝子が配置されていない）かの判定においては、蛍光強度の情報を利用してよい。

【0111】

蛍光強度の情報として、たとえば蛍光強度の値そのものを用いることができる。あるウェルの蛍光強度が所定範囲内であれば、そのウェルはポジティブであると判定され、そうでなければそのウェルはネガティブであると判定される。

20

【0112】

または、蛍光強度の情報として、異なる温度における蛍光強度の比または差を用いてもよい。たとえば、基準融解温度よりも低温な温度での蛍光強度と、基準融解温度よりも高温な温度での蛍光強度との比あるいは差を用いることで、蛍光強度を標準化することができる。たとえば、あるウェルについてこの比または差が所定範囲内であれば、そのウェルはポジティブであると判定され、そうでなければそのウェルはネガティブであると判定される。

【0113】

たとえば、50 での蛍光強度から85 での蛍光強度を減算することにより、蛍光標識プローブ自体の蛍光の影響、すなわち、バックグラウンドの影響を除去することができる。

30

【0114】

なお、蛍光強度の範囲、基準融解温度の範囲、および対象遺伝子とシュードジーンのコピー数の対応関係（たとえば比）の範囲を決定する方法は任意に選択可能である。たとえば、あらかじめパイロット実験などを行い、その結果から統計的に作業者が決めてもよいし、DNA検出システムが自動的に決定してもよい。また、デジタルPCR測定のため、カートリッジ内の各ウェルの測定データを用いて、統計的に蛍光強度の閾値および基準融解温度の所定の範囲を決めてもよい。

40

【0115】

ウェル内のDNAの判別を統計的に行うためのデータは、次の項目のいずれかまたはすべてを含んでもよく、これら以外の項目を含んでもよい。

基準融解温度よりも低温な温度での蛍光強度

基準融解温度よりも高温な温度での蛍光強度

基準融解温度よりも高温な温度での蛍光強度に対する、基準融解温度よりも低温な温度での蛍光強度の比

基準融解温度よりも低温な温度での蛍光強度と、基準融解温度よりも高温な温度での蛍光強度との差

基準融解温度を表す特徴量

50

融解曲線の形状を表す特徴量

【0116】

用いる検体溶液は特に限定されないが、検出対象のDNAを含む試料であればよく、生体試料（動植物の体液や組織、細胞、排泄物など）または土壌サンプル（真菌や細菌などが含まれる）などが例示できる。

【0117】

体液としては、血液、唾液、髄液などが例示できる。血液中には、セルフリーDNA（cfDNA）および血中循環腫瘍DNA（ctDNA）などが含まれる。組織としては、外科手術や生検法によって得られた疾患の患部（例えば、乳房や肝臓などのがん組織）が例示できる。組織はすでに固定された組織であってもよく、例えばホルマリン固定パラフィン包埋組織切片（FFPE）でもよい。細胞としては、生検法によって採取した細胞（患部またはその付近のもの）や、血液中を循環する血中循環腫瘍細胞などが例示できる。

10

【0118】

これらの検体の前処理は特に限定されず、生体や環境などから採取後、懸濁液に添加してホモジネートしたり、あるいは溶解液で溶解させたりしたものをそのまま用いてもよいが、それらに含まれる核酸を抽出したり、精製したものを好ましい。

【0119】

ウェルに分割したPCR反応液が、PCRおよび融解曲線分析の計測中に蒸発しないように、PCR反応液の上面にオイルを添加することが望ましい。オイルはPCR反応液に不溶性もしくは難溶性であって化学的に不活性な物質が好ましく、また、PCRのような高温での温度変化に対して安定である物質が好ましい。フッ素系オイル、シリコン系オイル、炭化水素系オイルなどが使用可能である。

20

【0120】

フッ素系オイルとしては、例えばPerfluorocarbonやHydrofluoroetherなどが挙げられる。フッ素系オイルは、炭素鎖が長いほうが揮発性が低いので好ましい。シリコン系オイルとしては、例えばPolymethylsiloxaneやTrimethylsiloxysilicateなどが挙げられる。炭化水素系オイルとしては、例えばミネラルオイルや流動パラフィン、ヘキサデカンなどが挙げられる。

【0121】

オイルは、界面活性剤を添加して用いてもよい。ここで界面活性剤の種類は特に限定されないが、Tween 20、Tween 80、Span 80、Triton X-100などが適用可能である。

30

【0122】

(5) 結果の表示

図11は、モニターに表示される測定結果の一例である。この例は、がん関連遺伝子AおよびBの2種類を対象遺伝子として測定した結果を表す。この例では、がん関連遺伝子AおよびBが同数だけ検出されている。

【0123】

図11Aに示すように、がん関連遺伝子の種類および変異の種類ごとに、検体溶液に含まれるカウントされたDNAの数が表示されてもよいし、図11Bに示すように、がん関連遺伝子の種類および変異の種類ごとに、検体溶液に含まれるカウントされたDNAの割合が表示されてもよい。図11Bの例では、対象遺伝子における変異型遺伝子の割合が表示されている。

40

【0124】

図11Aのように、がん関連遺伝子の総遺伝子数が表示されてもよい（この例ではがん関連遺伝子AおよびBが同数だけ検出されている）。総遺伝子数は、対象遺伝子の野生型と変異型の合計から算出されたものであってもよいし、その値を対象遺伝子のシュードジーンの測定結果で補正した値であってもよいし、対象遺伝子の数またはシュードジーンの数から算出した値であってもよい。このような表示を行うと、装置の使用者は検体溶液の

50

内容を容易に把握することができる。

【0125】

モニターに表示される結果は、図11のような検体溶液DNAの数または割合であってもよいし、図1のような蛍光標識プローブの蛍光強度と測定融解温度との2軸で検体溶液の計測値をプロットしたグラフであってもよいし、双方を含んでいてもよい。また、蛍光標識プローブの蛍光強度または測定融解温度に対する、検体溶液のDNAの数をプロットしたヒストグラムを含んでいてもよい。

【0126】

DNAの数をカウントする際に用いる蛍光標識プローブの蛍光強度に関する範囲は、ユーザーが任意に変更可能であってもよい。また、DNAの数をカウントする際に用いる基準融解温度に関する範囲も、ユーザーが任意に変更可能であってもよい。DNA検出システムは、これらを変更するための操作を受け付け、該当範囲を変更してもよい。このようにすると、ユーザーが測定結果のグラフやヒストグラムを見て、蛍光強度および/または基準融解温度の範囲を変えて、新たな範囲内にある検体溶液のDNAの数を再度カウントすることができる。

【0127】

対象遺伝子の数または割合に加えて、シュードジーンのカウント数が表示されてもよい。また、DNA検出装置は、対象遺伝子のカウント数とシュードジーンのカウント数との対応関係が適切であるか否かについて判定を行い、結果をモニター406に表示してもよい。たとえば、対象遺伝子のカウント数に対するシュードジーンのカウント数の比が、データベース404に格納された値（または範囲）に適合するか否かを判定し、適合する場合にはこれらのカウント数が適合することを示す情報（たとえば測定が正常に行われたことを示すメッセージ）をモニター406に表示し、適合しない場合にはこれらのカウント数が適合しないことを示す情報（たとえば測定エラーが発生したことを示すメッセージ）をモニター406に表示してもよい。

【0128】

なお、上述したように、検体溶液はウェルまたはドロップレット中の溶液として扱われるので、検体溶液のDNAの数の代わりに、ウェル数やドロップレット数として表されてもよい。

【0129】

(6) プログラム

本発明の別の実施形態は、DNA検出装置にDNA検出方法を行わせるためのプログラムである。ここでDNA検出装置は、たとえば実施形態1に係るDNA検出装置であってもよく、上記セクション(2)で詳述した装置を用い、DNA検出方法として、上記セクション(1)で詳述した方法を実行する。

【0130】

また、本発明のさらに別の実施形態は、上記プログラムを格納する記録媒体である。

【0131】

[実施例]

本実施例では、蛍光標識プローブを用いて、ウェル内のDNAの融解温度を測定し、BRAF遺伝子とそのシュードジーンを判別した結果を示す。

【0132】

BRAF遺伝子は常染色体である7番染色体上に存在し、そのシュードジーンであるBRAFP1はX染色体上に存在することが知られている。本実施例に用いた検体はヒト大腸癌由来細胞株であるHCT116のゲノムDNAであり、これは男性のゲノムDNAであるため、BRAF遺伝子のシュードジーンのコピー数は野生型と変異型のコピー数の合計の半分になるはずである。

【0133】

まず、BRAF遺伝子について、野生型およびV600E変異型のゲノムDNA（最終濃度133分子/μL）を用意する。これに、PCRに必要なとなるフォワードプライマー

10

20

30

40

50

(最終濃度 $0.25 \mu\text{M}$)、リバースプライマー(最終濃度 $2.0 \mu\text{M}$)、野生型に対応した蛍光標識プローブ(最終濃度 $0.5 \mu\text{M}$)、および $1 \times$ マスターミックス(DNAポリメラーゼ、dNTPを含む)を加え、PCR反応液を調製した。このとき、蛍光標識プローブの相補DNA鎖が過剰に増幅するように、プライマーペアの濃度は非対称になるように添加した。

【0134】

プライマーおよびプローブの配列は以下のとおりである。なお、蛍光標識プローブはいずれも、両端近くに相補的な配列を有し、それらが分子内で二重鎖を形成するように設計されている。また、5'末端に蛍光色素としてCAL Fluor Red 610、3'末端にクエンチャーとしてBHQ-2が結合している。

フォワードプライマー：5' CATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGAT 3' (配列番号1)

リバースプライマー：5' TGGGACCCACTCCATCGA 3' (配列番号2)

BRAF遺伝子野生型に対応した蛍光標識プローブ：5' GGTCTAGCTACAGTGAAATC 3' (配列番号3)

【0135】

その後、各ウェルに対し、BRAF遺伝子の野生型のDNAが1個入るか、V600E変異型のDNAが1個入るか、シュードジーン(DNA)が1個入るか、またはいずれも入らないようにするため、 $15 \mu\text{L}$ のPCR反応液を入れて、PCRによりDNAを増幅した。

【0136】

PCRの反応は、 96°C で10分処理した後、サイクル(60°C , 2分の後に 98°C , 30秒)を59サイクル行い、最後に 60°C で2分処理をした。反応後、ウェルが設けられたチップを温調ステージ上で 85°C から 50°C に冷却しながら各ウェルの蛍光強度変化を観察し、融解曲線の測定および解析を行った。

【0137】

結果を図12に示す。なお蛍光色素が2色以上用いられる場合には、各色素について図12のような結果が得られる。

【0138】

図12Aは、BRAF遺伝子の野生型とそのシュードジーンを含む検体を測定した際の結果を、 85°C の蛍光強度に対する 50°C の蛍光強度の比を横軸に、測定融解温度を縦軸にプロットしたものである。測定融解温度の違いにより2つの分布に分かれ、 65°C 付近に分布をもつ集団1201(たとえば 64°C ~ 66°C の範囲内)がBRAF遺伝子の野生型を含むウェルであり、 61°C 付近に分布をもつ集団1203(たとえば 60°C ~ 62°C の範囲内)がBRAF遺伝子のシュードジーンを含むウェルである。

【0139】

図12Bは、BRAF遺伝子の野生型、V600E変異型およびシュードジーンを含む検体を測定した結果である。測定融解温度の違いにより3つの分布に分かれ、 65°C 付近に分布をもつ集団1201(たとえば 64°C ~ 66°C の範囲内)がBRAF遺伝子の野生型を含むウェルであり、 61°C 付近に分布をもつ集団1203(たとえば 60°C ~ 62°C の範囲内)がBRAF遺伝子のシュードジーンを含むウェルであり、 58°C 付近に分布をもつ集団1202(たとえば 57°C ~ 59°C の範囲内)がBRAF遺伝子のV600E変異型を含むウェルである。

【0140】

図12のそれぞれの集団のカウント数を比較すると、図12AではBRAF遺伝子のシュードジーンのカウント数がBRAF遺伝子の野生型のカウント数の半分になっており、図12BではBRAF遺伝子のシュードジーンのカウント数がBRAF遺伝子の野生型およびV600Eのカウント数の合計の半分になっていた。

【0141】

このように、デジタルPCRにおける遺伝子型の判別に測定融解温度を用いて対象遺伝

10

20

30

40

50

子およびシュードジーンのそれぞれを判別し、カウントし、あらかじめ染色体上の位置から求められたコピー数の対応関係と比べて一致していることを確認することにより、測定精度を保證することができる。

【符号の説明】

【 0 1 4 2 】

3 0 1 , 3 0 2 , 3 1 1 ... ドロップレット (区画)

3 0 3 ... マイクロ流路

3 0 4 ... 光源

3 0 5 ... 蛍光フィルター

3 0 6 ... フォトマルチプルメーター (撮像装置)

10

3 0 7 ... C C D カメラ (撮像装置)

3 0 8 ... レンズ

3 0 9 ... ダイクロイックミラー

3 1 0 ... ドロップレット検出用カートリッジ

3 1 2 ... 温調ステージ (温度調整部)

3 1 3 ... カートリッジ

3 1 4 , 3 1 5 ... ウェル (区画)

4 0 1 ... 蛍光測定部

4 0 2 ... コンピューター

4 0 3 ... 解析部

20

4 0 4 ... データベース

4 0 5 ... メモリー (融解温度メモリー)

4 0 6 ... モニター

6 0 1 ... D N A

6 0 2 ... 蛍光標識プローブ

6 0 3 ... 蛍光色素

6 0 4 ... クエンチャー

6 0 5 ... 融解温度

1 2 0 1 ... 野生型を含むウェル

1 2 0 2 ... 変異型を含むウェル

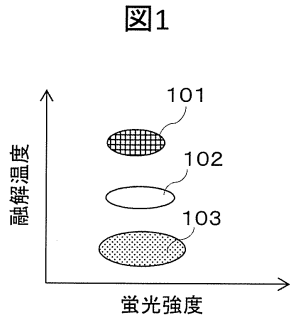
30

1 2 0 3 ... シュードジーンを含むウェル

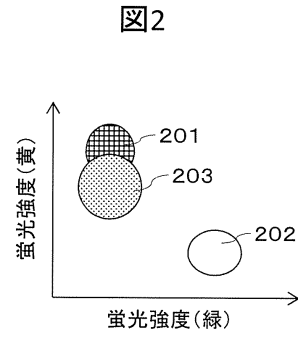
40

50

【 図面 】
【 図 1 】

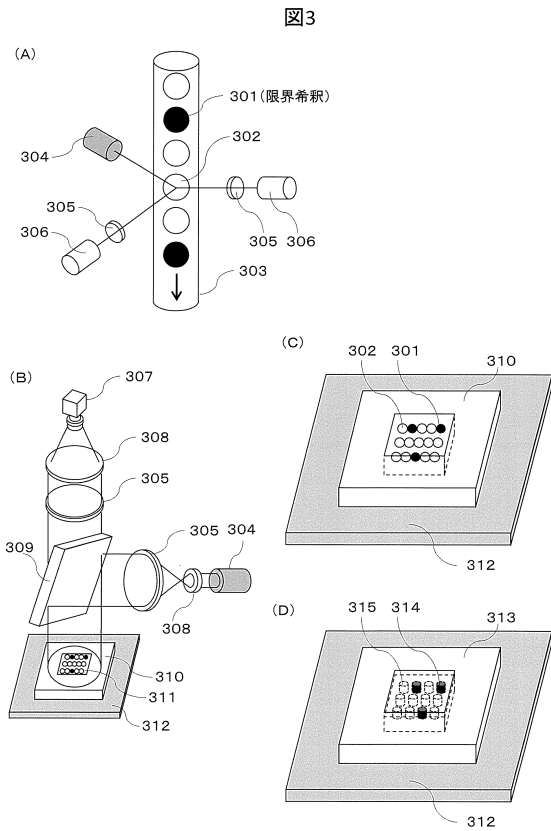


【 図 2 】

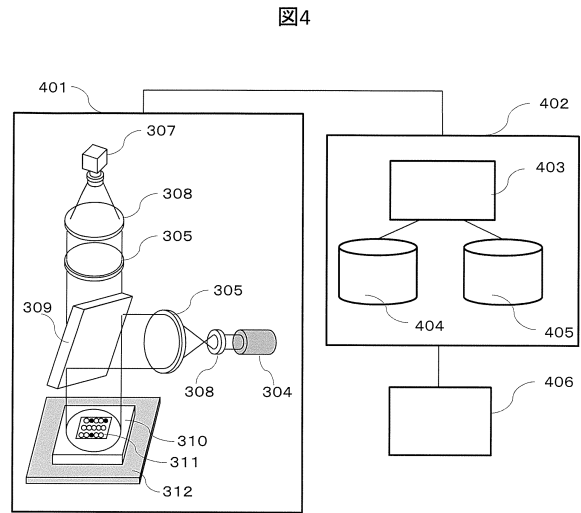


10

【 図 3 】



【 図 4 】



20

30

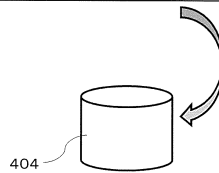
40

50

【 図 5 】

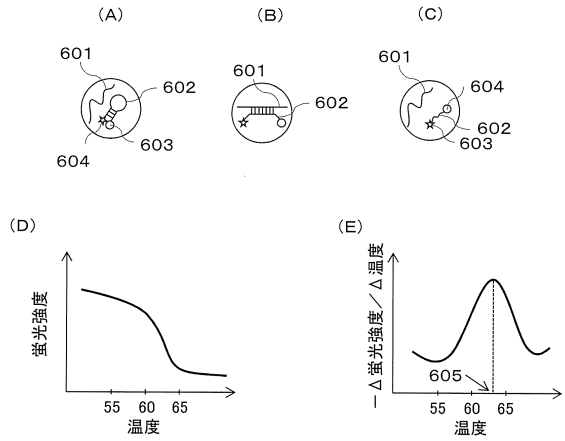
図5

遺伝子名	変異	蛍光色素の色	基準融解温度	数
遺伝子A	野生型	緑	63°C	合計xコピー
	変異a		66°C	
	変異b		70°C	
遺伝子Aのシュドジーン	-		60°C	xコピー
遺伝子B	野生型	黄	68°C	合計yコピー
	変異p		60°C	
遺伝子Bのシュドジーン	-		64°C	女性:yコピー 男性:y/2コピー
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮



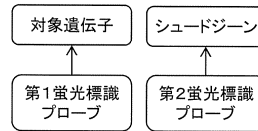
【 図 6 】

図6



10

(F)



(G)

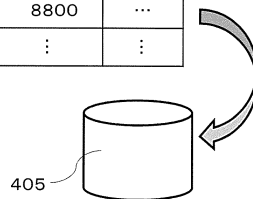


20

【 図 7 】

図7

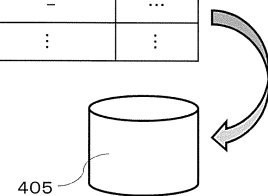
ウェル番号	温度	蛍光1(緑)	蛍光2(黄)	...
1	50°C	35000	10000	...
1	55°C	34000	10000	...
1	60°C	28000	9500	...
1	65°C	20000	9000	...
1	70°C	18000	8800	...
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮



【 図 8 】

図8

ウェル番号	蛍光1(緑)の測定融解温度	蛍光2(黄)の測定融解温度	...
1	63°C	-	...
2	70°C	-	...
3	-	68°C	...
4	-	60°C	...
5	60°C	-	...
⋮	⋮	⋮	⋮



30

40

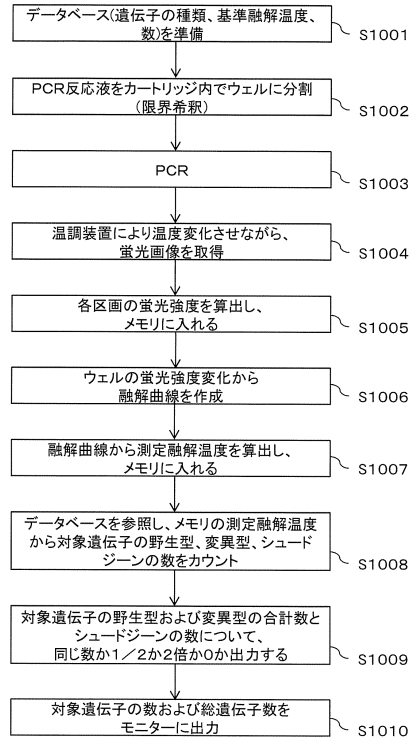
【 図 9 】

図9

遺伝子名	変異	カウント数	合計	判定
遺伝子A	野生型	1960	2000コピー	-
	変異a	30		
	変異b	10		
遺伝子Aのシュドジーン	-	2000	2000コピー	遺伝子Aと同数
遺伝子B	野生型	1800	2000コピー	-
	変異p	200		
遺伝子Bのシュドジーン	-	1000	2000コピー	遺伝子Bと同数
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

【 図 1 0 】

図10



10

20

【 図 1 1 】

図11

(A)

遺伝子	変異の種類	コピー数
がん関連遺伝子A	野生型	1960
がん関連遺伝子A	変異型a	30
がん関連遺伝子A	変異型b	10
がん関連遺伝子B	野生型	1800
がん関連遺伝子B	変異型p	200
総遺伝子数		2000

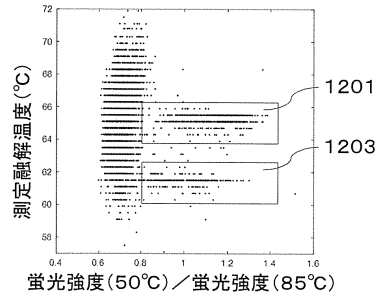
(B)

遺伝子	変異の種類	割合 (%)
がん関連遺伝子A	野生型	98.0
がん関連遺伝子A	変異型a	1.5
がん関連遺伝子A	変異型b	0.5
がん関連遺伝子B	野生型	90.0
がん関連遺伝子B	変異型p	10.0

【 図 1 2 】

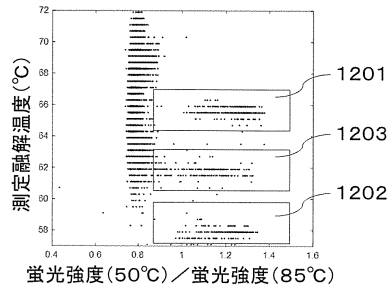
図12

(A)



30

(B)



40

50

フロントページの続き

東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 特開2019-213513(JP,A)

特表2016-519929(JP,A)

LEBLANC, M. A. et al., Hum. Genet., 2013年, Vol. 132, pp. 1223-1234

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 1/70

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

PubMed