

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/24905 A1

- (51) 国際特許分類: **C12N 15/11**, C12Q 1/68 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/07942
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 13 日 (13.09.2001)
- (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2000-283996 2000 年 9 月 19 日 (19.09.2000) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 浜島信之 (HAMAJIMA, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒464-8681 愛知県名古屋市中種区鹿子殿1丁目1番地 愛知県がんセンター研究所内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 川口義雄, 外(KAWAGUCHI, Yoshio et al.); 〒160-0022 東京都新宿区新宿1丁目1番11号 友泉新宿御苑ビル Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF JUDGING GENE MUTATION

(54) 発明の名称: 遺伝子変異の判別方法

(57) Abstract: A method of economically and quickly judging a mutation in a nucleic acid on gene is provided. Namely, a method of judging the presence or absence of a specific gene mutation which comprises confirming the size of DNA fragments formed by a PCR reaction with the use of four primer DNAs including a primer DNA having a nucleic acid corresponding to the mutated nucleic acid at the 3'-end, a primer DNA having a nucleic acid corresponding to the normal nucleic acid at the 3'-end, and two primer DNAs corresponding respectively to these primer DNAs.

(57) 要約:

遺伝子上の核酸の変異を安価かつ迅速に行う方法を提供する。

変異核酸に対応する核酸を 3' 末端に有するプライマー DNA

A、正常核酸に対応する核酸を 3' 末端に有するプライマー DNA

A、及びそれぞれに対峙する 2 種のプライマー DNA を含む

4 種のプライマー DNA を使用する PCR 反応で生ずる DNA

断片のサイズを確認することにより、所定の遺伝子変異の有無

を判別する方法。



WO 02/24905 A1



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 変 異 の 判 別 方 法

技術分野

本発明は、予め想定される染色体上の遺伝子変異について、この有無ならびに対立遺伝子上の型を簡便に判別する方法に関する

背景技術

従来、一定の疾病に罹患し易い体質を呈する集団や、一定の薬効が発揮されない体質を呈する集団などの存在が知られていた。近年のゲノム解析手法ならびにヒトゲノム解析の急激な進展により、これらの現象の多くが、特定遺伝子の塩基配列上に通常1塩基置換であることの多いわずかな変異（Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs）によるものであるという知見が多く蓄積されるに至った。現在もこのようなSNPsの解析が精力的に行われている。また、疾病の発症がある遺伝子の塩基配列の変異に起因すると言う事実も古くから知られていたが、先に述べたゲノム解析の進展は、疾病の原因となる遺伝子上の変異の特定についても、新たな知見を急速に増加させつつある。

ゲノム研究を臨床的な観点から考察すれば、ある個体が特定の遺伝子上に変異を有しているか否かを迅速に判別することは大変に重要な問題である。この判別によってある個体が罹患しやすい疾病を事前に知ることができれば、その疾病に対する有効な予防計画が可能となると予想される。また、このような遺伝子変異を有する者とその者に対して効果的な医薬品との相関データが蓄積されれば、係る変異を有する個体に対してより適切な医薬品あるいは治療法の開発が可能になり、また疾病原因の早期発見につながるなど、臨床医療にもたらす利点は大きいものがある。

遺伝子上の変異の有無を判別する方法として、これまでも幾つかの方法が開発されている。ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法と制限酵素による切断とを組合わせたPCR-RFLP（Erllichら、Science、252、1643頁、1991年）はその代表例である。また、ごく最近になってDNAマイクロアレイ法も開発された（Brownら、Nat. Gent.、21、33頁、1999年）。

しかし、PCR-RFLP法は、検査工程に3～24時間もの制限酵素処理を含むために、迅速な方法とは言い難い。また、

D N A マイクロアレー法はその実施コストが極めて高く、大量の検体を処理する上でコスト的に大変不利であった。従って、大量の検体を迅速かつ安価に処理することの出来る新しい遺伝子変異の判別方法の開発が望まれていた。

課題を解決するための手段

本発明者らは、P C R 法の利点をそのまま活用し、更に P C R 法の実施時に留意すべきプライマー D N A 配列設計上の制限を逆に利用することで、大量の検体を迅速かつ安価に処理することの出来る新しい遺伝子変異の識別方法 (Confronting two-pair primers PCR) を開発した。

即ち、本発明は、変異核酸に対応する核酸を 3' 末端に有するプライマー D N A、正常核酸に対応する核酸を 3' 末端に有するプライマー D N A、及びそれぞれに対峙する 2 種のプライマー D N A を含む 4 種のプライマー D N A を使用する P C R 反応で生ずる D N A 断片のサイズを確認することにより、所定の遺伝子変異の有無を判別する方法である。

本発明は、予め所望の塩基配列を有するように設計された少なくとも 2 組のプライマー D N A 配列を利用するものである。本発明の概略を、変異の有無を判別しようとする対象遺伝子の

対立遺伝子 X 上の塩基が X、対立遺伝子 Y 上の塩基 X に相当する核酸が Y と仮定した SNPs を例に、図 1 を用いて説明する。

まず、4 種のプライマー DNA として、相対する 2 組のプライマー DNA を設計する。1 組は対立遺伝子 X を増幅対象とする組であり、もう 1 組は対立遺伝子 Y を増幅対象とする組である。対立遺伝子 X 用の組のうち、1 つのプライマー DNA（アンチセンスプライマー 1 R）の 3' 末端を核酸 X に相補する核酸 X' として合成し、これと相対するセンスプライマー 1 F を合成して、これらを 1 つの組合わせとする。一方、対立遺伝子 Y 用としてその 3' 末端が核酸 Y であるセンスプライマー DNA（プライマー 2 F）を合成し、このプライマー 2 F よりさらに下流に相対して位置するアンチセンスプライマー DNA（プライマー 2 R）を合成して、これらをもう 1 つの組合わせとする。

仮に、上述の条件の下、各組のみを単独のプライマー DNA として PCR 反応を行えば、各反応後に認められる特異的な DNA 増幅物のサイズは、それぞれ a 塩基対（サイズ a）、b 塩基対（サイズ b）となる。ここで、サイズ a とサイズ b はゲル電気泳動などの適当な方法により分子量的に区別される必要が

あるが、これは所望のサイズ差が与えられるよう、任意に対象遺伝子上のプライマー D N A の位置を調節すればよい。

本発明によれば、変異が疑われる遺伝子に対して、上述の 2 組のプライマー D N A を同時に使用して P C R 反応を行い、その P C R 産物のサイズを確認することで、極めて簡便に変異の有無及び対立遺伝子間の変異型を判別することができる。

両対立遺伝子上で問題となる塩基が X X 型の場合、プライマー 1 F とアンチセンスプライマー 1 R との間の D N A は問題なく増幅され、サイズ a のバンドが確認される。一方、プライマー 2 F の 3' 末端塩基が Y であるために対立遺伝子 Y にハイブリッドしたプライマー 2 F からはポリメラーゼ反応は進まず、その結果プライマー 2 F とプライマー 2 R 間には増幅されない。プライマー 1 F とプライマー 2 R 間には問題なく P C R 反応により c 塩基対 (サイズ c) の D N A が増幅されるから、結局 P C R 反応後に確認される増幅バンドの大きさは、サイズ a とサイズ c となる。換言すれば、本発明による P C R 反応によってサイズ a 及びサイズ c の両バンドが特異的に増幅されるときは、遺伝子上の問題となる塩基は両対立遺伝子ともに X であると判別することができる。両対立遺伝子上で問題となる塩基が Y Y 型で

は、上記と同様の理論から、PCR反応後に確認されるバンドの大きさは、サイズbとサイズcのバンドとなり、このことはサイズbとサイズcのバンドが特異的に増幅されるときは、遺伝子上の問題となる塩基は両対立遺伝子ともにYであると判別できることを意味する。もし、PCR反応後にサイズa、サイズb、サイズcの3種のバンドが観察されることになれば、上述と同様の原理から、対立遺伝子X上の塩基がXで対立遺伝子Y上の塩基がYのヘテロ接合体であると判別することができる。ここで、 $c = a + b - (d - 1)$ である。ただし、dは1Rと2F両プライマーの塩基数の和である。

ここで、対立遺伝子X用として、核酸X'を3'末端に有するアンチセンスプライマー1Rの代わりに核酸Xを3'末端に有するセンスプライマー2Fとアンチセンスプライマー2Rとを組合わせ、更に対立遺伝子Y用として、核酸Yを3'末端に有するセンスプライマー2Fの代わりに核酸Y'を3'末端に有するアンチプライマー1Rとセンスプライマー1Fとを組合わせて、これらの共存下にPCR反応を行っても、本発明を実施することが出来る。この場合の転写産物の大きさも、サイズa、サイズb、サイズcとなるが、XX型の場合はサイズbと

サイズ c が、Y Y 型のときはサイズ a とサイズ c が、それぞれ確認されることになる。本発明にいう変異核酸に対応する核酸及び正常核酸に対応する核酸とは、上述の 2 例の様に変異核酸及び正常核酸またはそれらに相補する核酸を意味するものである。

本発明の P C R - C T P P 法では、上述の様に P C R 反応と P C R 産物の分子量の確認と言う 2 段階の作業で終了するものであり、P C R 産物を数時間以上かけて制限酵素処理しなければならない P C R - R F L P 法に比べて、判別に要する時間を著しく短縮することができる。また、P C R - R F L P 法では、制限酵素処理後の分画に必要とされる分子量差を有する断片が生じるよう、予め制限酵素部位を設計しなければならないという制約があり、このため、対象となる遺伝子の塩基配列によっては適切なプライマー D N A の設計が困難を伴うことがあるが、本発明の P C R - C T P P 法は係る制約が全くないので、プライマー D N A 設計の自由度においても優位である。さらに本発明の方法では、仮にプライマー 1 F とプライマー 2 R とを反応液に加え損なうなどの人為的ミスがあると c - b p の大きさのバンドは観察されないので、試験者は操作ミスを容易

に知ることができる。さらには、本発明は制限酵素によるPCR産物の切断を必要としないので、制限酵素処理に起因する種々の人為的副産物の影響を受けることがなく、判別を確実に行うことができる。

本発明のPCR-CTPP法は、DNAマイクロアレー法に對比しても利点を有する。すなわち、特殊な機器を必要とせず、また検体を大量処理するときコスト差はDNAマイクロアレー法に比べて著しく安価に済む。

本発明は、いわゆる遺伝子多形 (polymorphism) の判別に有用であるが、特定疾病の原因遺伝子やがん遺伝子の判別にも利用可能であり、また変異は置換、付加、欠失の何れであっても適用可能である。

発明の実施の形態

判別しようとする対象遺伝子を含むDNAは、患者あるいは健常人より採取した血液その他の組織から、本発明の属する分野における一般当業者が汎用する方法によってPCR反応を行い得る程度のDNAとして調製すればよく、これを試料として本発明を実施することができる。

本発明の方法で用いるプライマーDNAの設計は、3'末端

における核酸の決定と、そのプライマーDNAを用いたときに増幅されるDNA産物の分子量（塩基対数）およびPCR産物間の差が適当な大きさとなるよう留意すること以外には、各別の制約はない。DNA産物のサイズ及びPCR産物間のサイズ差は増幅物の検出方法の感度によって適当に定める事ができるが、概ね数十から数百塩基対もあれば十分であり、キャピラリー電気泳動法のような高感度の検出方法を用いる場合には、数塩基対の差であってもよい。このようなプライマーDNA設計は、本発明の属する分野における一般当業者であれば、判別しようとする遺伝子の塩基配列と変異の位置を基に何ら問題なく行うことができるものである。また、プライマーDNAの調製自体は、いわゆるDNA自動合成機その他の汎用機器や合成手法により簡便に行うことができる。

本発明におけるPCR反応も、特別な試薬や反応段階を含まない一般的な反応条件下で行うことができ、市販されているPCR反応キットやサーマルサイクラーなどの汎用機器を利用することができる。また、PCR反応は使用するプライマーDNAを全て同時に反応系に添加して行うことが好ましく、効率は低下するものの、プライマーが共存する限り各プライマー組毎

に段階的にPCR反応を行うことも可能である。

PCR産物の検出方法は、当業者が利用可能な如何なる方法でもよく、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動あるいはキャピラリー電気泳動などの電気泳動法、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）あるいはガスクロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法、質量分析計（GC-MS）などを用いることができる。より簡便な方法としてゲル電気泳動法が好ましい。

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明が実施例に記載されるものに制限されないことはいうまでもない。

実施例

実施例 1 β アドレノリセプター2（BAR-2）多形の検査

肥満及び／又は代謝不全に関与すると報告されている β アドレノリセプター2（BAR-2）の多形に関する検査を行った。この多形は、核酸塩基がCからGへと変異することにより、同リセプター蛋白質の27番目のグルタミンがグルタミン酸へと変異しているものである。

書面をもって同意を得た20人の患者から末梢血サンプル7 mlを用意した。キアゲン社製 QIAampDNA Blood Mini Kitを用いて、バフフィーコート (buffy coat) 画分から染色体DNAを抽出して、染色体DNAとして以下の検査に使用した。

正常核酸Cの対立遺伝子用センスプライマーDNAとして配列番号1のプライマーDNAを、アンチセンスプライマーDNAとして配列番号2のプライマーDNAを合成した。また、変異核酸Gの対立遺伝子用センスプライマーDNAとして配列番号3のプライマーDNAを、アンチセンスプライマーDNAとして配列番号4のプライマーDNAを合成した。先に調製した染色体DNA 30 ng ~ 100 ngを、0.15 mMのdNTP、25 pmolの各プライマーDNA、0.5ユニットのタカラ酒造製 Taq (登録商標) 酵素、15 mMのMgCl₂を含む2.5 μlの10×PCR緩衝液、及び1 μlのグリセロールを含む25 μlの反応液に加えてPCR反応を行った。反応条件は、94℃で5分間変性させ、続いて94℃で30秒、59℃で30秒、72℃で30秒のサイクルを30回行い、最後は72℃で5分間の最終延長反応を行わせるというものである。PCR産物は2%アガロースゲルとエチジウムブロマイド染色

によって可視化した。結果を図2に示す。

この方法により、279塩基対と204塩基対の2種類のPCR産物が観察される正常ホモ型(CC型)と、279塩基対、204塩基対、110塩基対の3種類のPCR産物が観察されるヘテロ型(CG型)と、279塩基対と110塩基対の2種類のPCR産物が観察される変異ホモ型(GG型)とを、それぞれ判別することが出来た。

実施例2 インターロイキン1B(IL-1B)多形の検査

IL-1Bの-31番目の核酸がCからTに変化している多形に関する検査を行った。この多形型のIL-1Bは胃がんの危険性を高めるといわれている。

正常核酸Cの対立遺伝子用センスプライマーDNAとして配列番号5のプライマーDNAを、アンチセンスプライマーDNAとして配列番号6のプライマーDNAを合成した。また、変異核酸Tの対立遺伝子用センスプライマーDNAとして配列番号7のプライマーDNAを、アンチセンスプライマーDNAとして配列番号8のプライマーDNAを合成した。実施例1で調製した染色体DNA30ng~100ngを、0.15mMのdNTP、25pmolの各プライマーDNA、0.5ユニット

のタカラ酒造製 T a q (登録商標) 酵素、15 mM の M g C l₂ を含む 2.5 μ l の 10 $\times$ P C R 緩衝液を含む 25 μ l の反応液に加えて P C R 反応を行った。反応条件は、94 $^{\circ}$ C で 5 分間変性させ、続いて 94 $^{\circ}$ C で 60 秒、54 $^{\circ}$ C で 60 秒、72 $^{\circ}$ C で 60 秒のサイクルを 25 回行い、最後は 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の最終延長反応を行わせるというものである。P C R 産物は 2% アガロースゲルとエチジウムブロマイド染色によって可視化した。この結果を図 3 に示す。

この方法により、240 塩基対と 155 塩基対の 2 種類の P C R 産物が観察される正常ホモ型 (C C 型) と、240 塩基対、155 塩基対、122 塩基対の 3 種類の P C R 産物が観察されるヘテロ型 (C T 型) と、240 塩基対と 122 塩基対の 2 種類の P C R 産物が観察される変異ホモ型 (T T 型) とを、それぞれ判別することが出来た。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の方法の原理及びスキームを模式的に表した図である。

図 2 は、実施例 1 で行った P C R 反応産物の電気泳動写真である。レーン M は 100 塩基対のサイズマーカー、レーン 2、

4、6、7、9、11、12、15、17、20が正常ヘテロ型（CC型）、レーン1、5、8、13、14、18、19がヘテロ型（CG型）、レーン3、10、16が変異ホモ型（GG型）である。

図3は、実施例2で行ったPCR反応産物の電気泳動写真である。レーンMは100塩基対のサイズマーカー、レーン13、15、18が正常ヘテロ型（CC型）、レーン1、2、4、5、7、9、10、14がヘテロ型（CT型）、レーン3、6、8、11、12、16、17、19、20が変異ホモ型（TT型）である。

請 求 の 範 囲

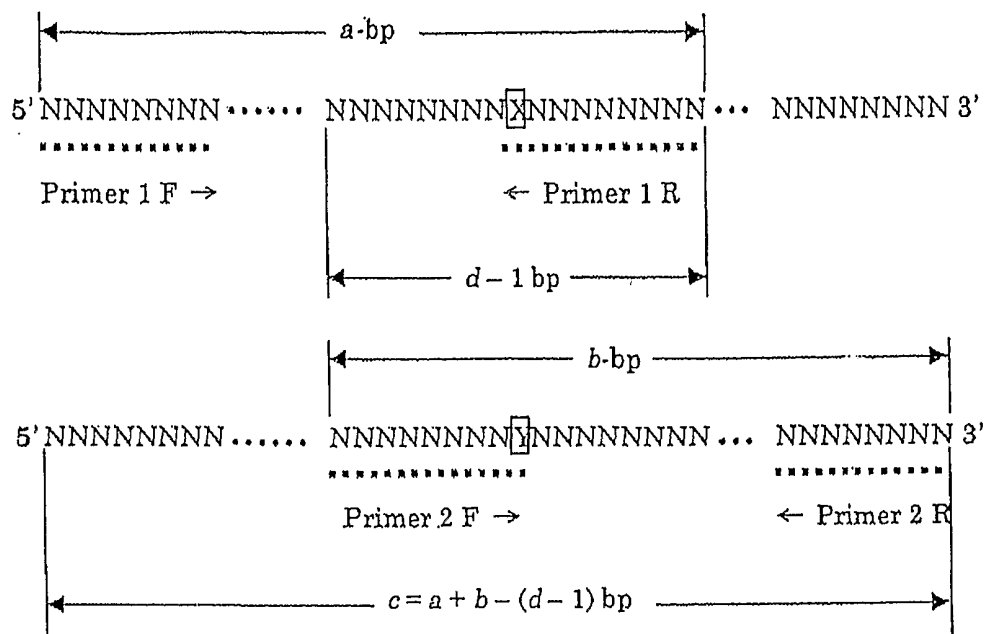
1. 少なくとも2組のプライマーDNAの共存下にPCR反応を行って生ずるDNA断片のサイズを確認することにより所定の遺伝子変異の有無を判別する方法であって、該プライマーDNAの1組は3'末端に変異核酸に対応する核酸を有するプライマーDNAとこれの対峙プライマーDNAからなり、他方の1組は3'末端に正常核酸に対応する核酸を有するプライマーDNAとこれの対峙プライマーDNAからなる、遺伝子変異の有無を判別する方法。

2. 各組の対峙プライマーDNA同士も対峙したプライマーDNAの組を構成する、請求項1に記載の方法。

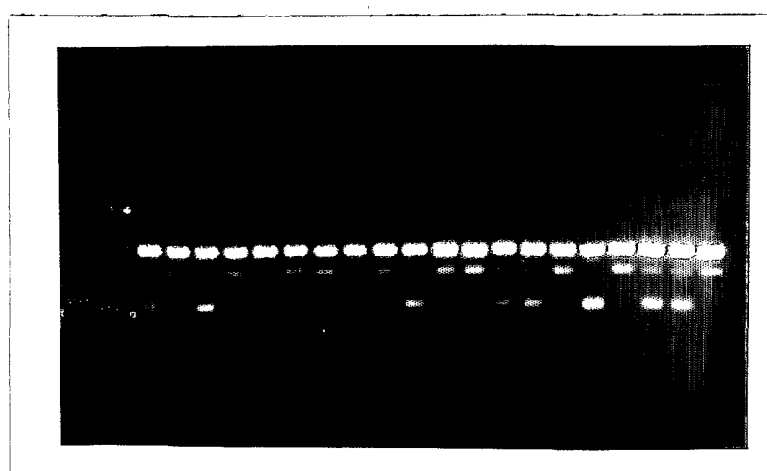
3. PCR反応で生ずるDNA断片のサイズが、互いに識別可能なサイズ差を有する請求項1又は請求項2に記載の方法。

1 / 2

第 1 図



第 2 図

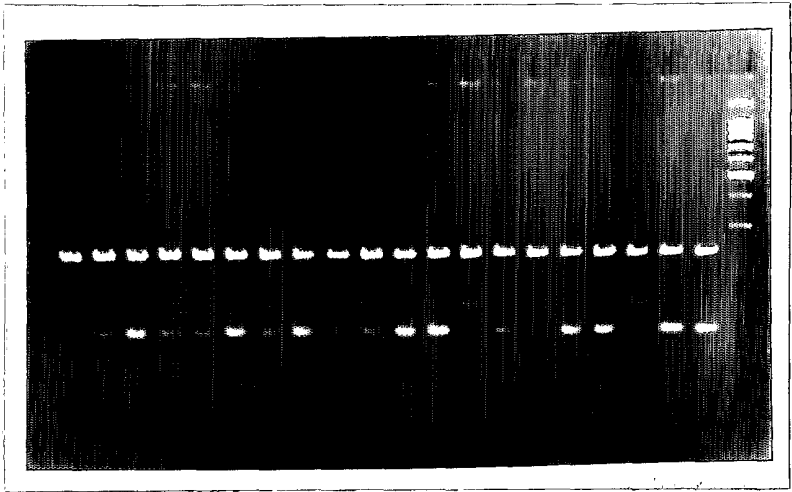


Lane

M. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

2 / 2

第 3 図



Lane
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

1/2

SEQUENCE LISTING

<110> HAMAJIMA Nobuyuki

<120> Method for the determination of genotyping

<130> SAP-679-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000283996

<151> 2000-09-19

<160> 8

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400>

ccgctgaatg aggcttcc 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400>

ccacacctcg tccctttg 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400>

accacgacgt cagcgagg 18

<210> 4

<211> 18

2/2

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400>

ggctgtgatg accagcac

18

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400>

acttctgctt ttgaaggcc

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400>

tagcacctag ttgtaagga

19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400>

agaagcttcc accaatact

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400>

ctccctcgct gtttttata

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ C12N 15/11, C12Q 1/68

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)
Int.Cl.⁷ C12N 15/00-15/90, C12Q 1/68

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	HAMAJIMA N. et al., "Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-pair Primers for Polymorphism Genotyping", Jpn. J. Cancer Res., 25 September, 2000, Vol.91, No.9, pages 865 to 868	1-3
P,X	JP 2001-137000 A (Nobuyuki HAMAJIMA), 22 May, 2001 (22.05.01), (Family: none)	1-3
X	JP 10-276779 A (Sumitomo Metal Industries, Ltd.), 20 October, 1998 (20.10.98), (Family: none)	1-3
X	JP 8-89297 A (SRL K.K.), 09 April, 1996 (09.04.96), (Family: none)	1-3
X	JP 6-167492 A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 14 June, 1994 (14.06.94), (Family: none)	1-3

☒ 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 document 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
29 November, 2001 (29.11.01)

Date of mailing of the international search report
25 December, 2001 (25.12.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07942

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 530794 A1 (Boehringer Mannheim GmbH), 10 March, 1993 (10.03.93), & DE 4129653 A1 & JP 5-244996 A & US 5605794 & US 5728530 A	1-3
A	Kenshi HAYASHI ed., "Jikken Igaku Bessatsu; Bio-manual UP Series PCR-hou no Saishin Gijutsu", Kabushiki Kaisha Youdosha, 15 October, 1996 (15.10.96), pages 33 to 34	1-3
A	BROWN P. O. et al., "Exploring the new world of the genome with DNA microarrays", Nat. Genet., (1999), Vol.21, No.1 (Suppl.), pages 33 to 37	1-3
A	ERLICH H. A. et al., "Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction", Science, (1991), Vol.252, pages 1643 to 1651	1-3

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/07942

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/11, C12Q 1/68

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. Cl⁷ C12N 15/00-15/90, C12Q 1/68

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

国際調査で使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)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (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
P, X	HAMAJIMA N. et al. Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-pair Primers for Polymorphism Genotyping. Jpn. J. Cancer Res. Sept. 25, 2000, Vol. 91, No. 9, p. 865-868	1-3
P, X	JP 2001-137000 A (浜島 信之) 22. 5月. 2001 (22. 05. 01) (ファミリーなし)	1-3

☒ 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

29. 11. 01

国際調査報告の発送日

25. 12. 01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

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)

本間 夏子

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
X	JP 10-276779 A (住友金属工業株式会社) 20.10月.1998(20.10.98) (ファミリーなし)	1-3
X	JP 8-89297 A (株式会社 エスアールエル) 9.4月.1996(09.04.96) (ファミリーなし)	1-3
X	JP 6-167492 A (大塚製薬株式会社) 14.6月.1994(14.06.94) (ファミリーなし)	1-3
X	EP 530794 A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 10.3月.1993(10.03.93) & DE 4129653 A1 & JP 5-244996 A & US 5605794 & US 5728530 A	1-3
A	林 健志編, 「実験医学別冊 バイオマニュアルUPシリーズ PCR法の最新技術」 株式会社 羊土社, 15.10月.1996(15.10.96) p. 33-34	1-3
A	BROWN P.O. et al. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nat. Genet. 1999, Vol. 21, No. 1 (Suppl.), p. 33-37	1-3
A	ERLICH H.A. et al. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. Science 1991, Vol. 252, p. 1643-1651	1-3