

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3836676号  
(P3836676)

(45) 発行日 平成18年10月25日(2006.10.25)

(24) 登録日 平成18年8月4日(2006.8.4)

|                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| (51) Int. Cl.           | F I             |
| C 1 2 M 1/00 (2006.01)  | C 1 2 M 1/00 A  |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/68 A  |
| C 1 2 N 5/06 (2006.01)  | C 1 2 N 5/00 E  |

請求項の数 17 (全 12 頁)

|               |                               |           |                         |
|---------------|-------------------------------|-----------|-------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2000-551232 (P2000-551232)  | (73) 特許権者 | 500543502               |
| (86) (22) 出願日 | 平成10年5月25日(1998.5.25)         |           | アグロビオゲン・ゲゼルシャフト・ミット     |
| (65) 公表番号     | 特表2002-516669 (P2002-516669A) |           | ・ベシュレンクテル・ハフツング         |
| (43) 公表日      | 平成14年6月11日(2002.6.11)         |           | ドイツ連邦共和国、デー 8 6 5 6 7 ヒ |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP1998/003075             |           | ルガーツハウゼン、ラレッツハウゼン、タ     |
| (87) 国際公開番号   | W01999/061882                 |           | ルマンスドルフ 2 5             |
| (87) 国際公開日    | 平成11年12月2日(1999.12.2)         | (74) 代理人  | 100099623               |
| 審査請求日         | 平成16年6月22日(2004.6.22)         |           | 弁理士 奥山 尚一               |
|               |                               | (74) 代理人  | 100096769               |
|               |                               |           | 弁理士 有原 幸一               |
|               |                               | (74) 代理人  | 100107319               |
|               |                               |           | 弁理士 松島 鉄男               |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子遺伝学的診断のための組織サンプルの採取、及び初期調製のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル受け取り容器(1)と、  
 サンプル採取後に該サンプル受け取り容器内に侵入して、該サンプル受け取り容器を密封するサンプル採取手段(4)と  
 を含み、

該サンプル受け取り容器(1)は、底部(2)と側壁(3)とを有し、該サンプル受け取り容器(1)の側壁に接する、該底部から離れた領域に、導入されたサンプル採取手段を固定するための手段(5)を有し、容易に貫通可能な蓋を備え、該容器内にはDNA分解酵素から保護する手段が備えられ、

該サンプル採取手段(4)は、一回のステップでサンプルが採取され、該サンプル受け取り容器に導入されて、該サンプル受け取り容器内に侵入時に、固定のための手段(5)により所定位置に固定され、サンプル受け取り容器をサンプル受け取り容器(1)の底部(2)と側壁(3)とサンプル採取手段(4)の前端部(7)とにより規定される少なくとも1のサンプル空間(6, 6a)に分けるように形成され、

該サンプル受け取り容器(1)は耳タグと関連付けられており、該耳タグには身元証明手段が備えられており、該耳タグはアパーチャプレート(11)とスパイクプレート(10)とを含み、該耳タグは動物の同一性確認に用いることができ、該サンプル受け取り容器(1)は該耳タグの該アパーチャプレート(11)に分離可能に接続されており、該サンプル受け取り容器(1)には該耳タグと同一の身元証明手段が備えられており、該

10

20

サンプル採取手段(4)は、該耳タグの該スパイクプレート(10)に分離可能に接続されている、

動物からDNAを含有する細胞のサンプルを採取し、初期調製するための装置。

【請求項2】

前記サンプル採取手段(4)が、前記スパイクプレートのスパイク(10a)上に設置されていることを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項3】

前記タグが、識別番号である請求項1または2に記載の装置。

【請求項4】

前記サンプル採取手段(4)が、前記サンプル受け取り容器の底部に面した端部に、少なくとも1の鋭利な先端を有することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の装置。

【請求項5】

前記サンプル採取手段(4)の前記サンプル受け取り容器の底部に面した端部が、先細りになっていることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の装置。

【請求項6】

前記サンプル受け取り容器(1)の底部(2)が、容器の内部空間内に向かって突起部(8)を有し、端部(7)が該サンプル受け取り容器(1)の底部に面している前記サンプル採取手段(4)が、該突起部を受け取るのに好適であり、該サンプル採取手段(4)によって導入されたサンプル物質が該突起部(8)と該サンプル採取手段(4)との間で破砕されるように形成されている請求項1～5のいずれかに記載の装置。

【請求項7】

好適なサンプル採取手段(4)の導入後にサンプル受け取り容器(1)が2つのサンプル空間(6, 6a)に分割される様に、前記突起部(8)がサンプル受け取り容器(1)の側壁(3)に接続されている請求項6に記載の装置。

【請求項8】

前記突起部(8)が、円錐形状を含む請求項6または7に記載の装置。

【請求項9】

前記突起部(8)が、前記サンプル受け取り容器を2つの領域に分割する隔壁である請求項6～8のいずれかに記載の装置。

【請求項10】

前記サンプル受け取り容器(1)が、固定装置(9)に取り付けられている請求項1～9のいずれかに記載の装置。

【請求項11】

前記固定装置(9)が tong である請求項10に記載の装置。

【請求項12】

前記サンプル採取手段のサンプル受け取り容器(1)の底部と反対側に位置する端部が、その背面においてロッドの挿入が可能であるように形成されている請求項1～11のいずれかに記載の装置。

【請求項13】

前記DNA分解酵素から保護する手段が、塩基、プロテイナーゼK、またはモレキュラーシープである請求項1～12のいずれかに記載の装置。

【請求項14】

前記サンプル採取手段の侵入により破壊される膜であって、それによりプロテイナーゼKが好適な緩衝液に接触するようになる膜によって、該プロテイナーゼKが該緩衝液から分離されている請求項13に記載の装置。

【請求項15】

請求項1～14のいずれかに記載の装置を使用して、動物からDNAを含有する細胞を含むサンプルを採取する方法であって、該装置は、サンプル受け取り容器(1)と、サンプル採取手段(4)とを含み、一回のステップで、かつ、耳タグにより該動物にタグ付け

10

20

30

40

50

するのと同時に該サンプル採取手段の該サンプル受け取り容器の底部に面した先端部（ 7 ）でもって、該動物の耳を貫くように好適な装置で該サンプル採取手段（ 4 ）をプレスし、該サンプル受け取り容器へ導入し、そこで固定することにより好適なサンプルが採取され、その結果、該サンプル受け取り容器の底部（ 2 ）と側壁（ 3 ）と該サンプル採取手段（ 4 ）のサンプル受け取り容器（ 1 ）の底部に面した先端部（ 7 ）とにより規定されるサンプル空間（ 6 , 6 a ）が形成され、該サンプル受け取り容器は周囲に対して密閉され、該動物を識別するために、該サンプル受け取り容器（ 1 ）に、該耳タグと同じタグが備えられている方法。

【請求項 1 6】

動物の個体群をタイピングするプロセスにおける請求項 1 ～ 1 4 のいずれかに記載の装置の使用であって、サンプルが該装置を用いて採取され、研究室において解析的に分析され、分類される使用。

10

【請求項 1 7】

動物から DNA を含有する細胞を含むサンプルを採取するための、請求項 1 ～ 1 4 のいずれかに記載の装置の使用。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1】

本発明は、分子遺伝学的試験に適した組織、血液、又は有核細胞又は DNA を含有する細胞又は細胞成分のその他のサンプルを採取し、また初期調製するための装置及び方法に関する。

20

【 0 0 0 2】

多くの研究及び応用計画には、大量の組織サンプル又は DNA サンプルの採取が必要とされる。特定の状況下では、農場全体の動物の個体群（例えば、生物学的に機能的な動物の生産）又は地域的あるいは特別に特徴付けられた動物の個体群に関する情報を集めなければならない。

【 0 0 0 3】

例えば、BSE スキャンダルや、影響のない農場産の肉や製品であることを保証することに関連する問題により引き起こされた例では、全 EU において出産時または出産直後に、動物の耳にタグを付けて識別する畜牛（cattle）の強制的な識別が導入された。これらの動物には、各農場を識別する固有の数字が入っている。即ち、例えば後日屠殺場で数字を調べることにより、動物がどの農場から来たのか決定できる。

30

【 0 0 0 4】

しかし、このような耳タグは偽造されやすく、操作により交換することも可能であることから、導入された認識システムを回避することができる。従って、消費者及び中間業者は、動物が実際に表示通りの農場より来たのか確認することはできない。

【 0 0 0 5】

従って、生産者、加工業者及び販売業者からの情報を独立に確認することができる簡便な分析方法が望まれている。

【 0 0 0 6】

周知の如く、各動物は特定の DNA の変異を試験することで（「遺伝的指紋」）個別に同定することができる。法医学及び飼育動物の血統試験においては、これら最新の分子遺伝学的試験が既に分析に利用されている。動物からのサンプルは通常獣医により血液サンプルとして採取され、分析される。しかし、さらに大きい動物の個体群に関しては、この方法は重労働であり、また経済的観点から実施不可能である。

40

【 0 0 0 7】

現代の検出方法（PCR、配列決定等）を利用すれば、それらが特定の個体に由来するかが、極少量の組織サンプルからでも決定できる。試験は比較的容易に実施可能であり、信頼性は 99 . 9 % 以上である。

【 0 0 0 8】

しかし、現時点に於いてはこのような数のサンプルの分離、目的別採取、保存、分類なら

50

びに分析を実施するための経済的出費ならびに労力は多大である。

【0009】

本発明の1つの機能は、被検体からのDNAを含有するサンプルの採取が容易かつコスト的に有効に実行できる装置を提供することである。

【0010】

発明の別の機能は、組織または血液サンプルを分析研究を目的として、容易に被検体より採取できる方法を供給することである。

【0011】

本機能はサンプルを受け取る容器と、サンプル採取のためのツールとを有する、DNAを含有する細胞サンプルを採取、及び初期調製するための装置によって実施される。サンプルを採取した後、サンプル採取ツールはサンプル受け取り容器内に導入され、密封される。サンプル受け取り容器は底壁及び側壁を有し、容易に貫通可能な蓋により密閉される。底部から離れた側壁部には、導入されたサンプル採取ツールを固定する手段があり、容器内の物質はDNA分解酵素から保護される。サンプルを採取するためのツールは、サンプル受け取り容器内に導入されると、このツールを固定する手段（サンプル受け取り容器内に備えられている）が所定位置に固定し、そしてツールはサンプル受け取り容器を、サンプル受け取り容器の底部と側部の壁と、サンプル採取ツールの先端部とにより規定される、少なくとも1つのサンプル空間内に分割する。

10

【0012】

更に、前記の機能は、好適なサンプルがサンプル採取ツール先端にて採取され、これがサンプル受け取り容器内に導入され、それによりサンプル受け取り容器の底部及び側壁と、サンプル採取ツールの先端部とによって、周囲に対し密閉されるように規定された空間が形成されることを特徴とする本発明の装置の利用により行われる。

20

【0013】

以下、本発明を添付図面を参照して説明する。

【0014】

以下発明を好適なモデル及び図を参照しながらより詳細に説明する。

【0015】

発明の装置は、サンプル受け取り容器1とサンプル採取ツール2とを含む。

【0016】

サンプル受け取り容器1は底部2と側壁3とを持ち、かつフィルムまたはメンブレンのような容易に貫通可能な蓋により密閉されている。このサンプル受け取り容器1はそれ自体を別のメンブレンにより再分割することができる。その結果、使用するまで、2以上の成分をサンプル受け取り容器1内にてそれぞれ別々に分けることができ、サンプル採取ツール4がサンプル受け取り容器1内へ侵入することによってのみ、成分が互いに、及びサンプルと接触する。サンプル受け取り容器1は更に、例えば底部2の全直径に広がった突起8のような隔壁により、少なくとも2個のチャンバーに再分割することもできる。これによりサンプル採取時に少なくとも2の完全に独立したサンプルを採取することができる。

30

【0017】

好適なモデルでは、サンプル受け取り容器1は少なくともサンプル採取ツール4の先端部を受け取る。必要であれば、底部2が先細りの突起8を持つように形成することができ、サンプル採取ツール4は突起8と互いに適切にはめこむことができる。結果として、サンプル採取ツール4がサンプル受け取り容器1内に侵入すると、サンプルは強く圧砕され、サンプル受け取り容器1の底部2と側壁3とサンプル採取ツール4の先端部7とにより限定されるサンプル空間6、6a内に押し込められる。

40

【0018】

サンプル受け取り容器1は、平面アタッチメント、例えばこれを適当に締結するための、孔を持ったトング（tongue）のような固定装置9も持つことができる。即ち、例えばトングは耳タグ10、11を適用するのにプライヤーが用いられる場合には、プライヤーに固定することができる。トングは認識番号表示に好適であり、同様にイヤータグの取り付け

50

にも好適である。ラベリングは溝部に手で行うことができ、あるいはトンゲは、例えば刻印により事前印刷することができ、あるいはイヤータグ 10、11 のプレート部分に適用された認識番号と、同時かつ同一のものを印刷することもできる。

【0019】

必要であれば（例えば、手でサンプルを更に加工する場合）、サンプル受け取り容器 1 は、サンプル採取ツール 4 により密閉された後にサンプル空間 6、6a を規定するサンプル受け取り容器 1 の領域が、サンプル受け取り容器 1 の本体にネジ山により連結されており、容易にネジを外し、容易にサンプルに接触することができるよう形成することができる。

【0020】

好適な装置のモデルでは、サンプル受け取り容器 1 は、形成されたサンプル空間 6、6a が装置を破壊することなしには開放不可能な様にサンプル採取ツール 4 により密閉される。即ち、気付かれることなく採取されたサンプルを操作することが不可能なことは確実である。

【0021】

サンプル受け取り容器 1 中には組織サンプルのタンパク質成分を不活性化し、DNA を安定化する物質が存在する。

【0022】

組織サンプルのタンパク質（酵素類、DNAse 等）を不活性化し、DNA を安定化する物質は例えば以下より成るグループから選択することができる。

【0023】

タンパク質を分解するプロテイナーゼ K（例えば保管中の安定化のために凍結乾燥されている）及び（別々に充填された）タンパク質を消化するための緩衝液、強塩基、極端に吸湿性であり、それと接触する（及びそれを暖める）組織サンプルを乾燥させ、それにより不活性化するモレキュラーシーブ（例えば E. Merck 社製 0.2 nm No. 1. 05704. 0250, K230045904 624、水吸収能 > 20%）。例えば望ましくない空気中の湿気の吸収からモレキュラーシーブを保護するために、それは不活性気体であるアルゴンによりコートされ、フィルムにより密閉される。タンパク質成分の不活性化、及び DNA の安定化を支援するその他の物質。物質は、それらが長時間、例えば 1 年以上活性を維持し、さらにサンプル導入後少なくとも数ヶ月から 1 年間分析研究に適した DNA の保全性が十分保証されるように処方される。

【0024】

サンプル採取ツール 4 は、サンプルを採取してサンプル受け取り容器内に導入でき、導入後密閉されたサンプル受け取り容器 1 を密封するいずれかの形態を取ることができる。これには、円筒、円錐等の形態が含まれる。

【0025】

装置の好適なモデルでは、サンプル採取ツール 4 は使用前には互いに接続（ただし分離可能）しており、使用時に相互に分離する 2 つのパーツより構成される。これは例えば特定の破壊点を持つプラスチックの狭い架橋により実現できる。サンプル採取ツール 4 は堅牢であるか、あるいはその背面は、例えば使用時の安定化を目的としてプライヤーからのスチール製ロッドの導入が可能な、例えば中空部 12 を持つロッドの挿入が可能である。

【0026】

サンプル採取ツール 4 は複数の機能を持つ。サンプルは、例えば血液、リンパ液、または尿のような体液に単純に液浸すること、又は被検体から組織を擦過又はパンチングすることにより採取される。

【0027】

好適なモデルでは、被検体の耳が本発明の装置により穿孔される。サンプル採取ツール 4 の前端部は、耳を押し通すことで少量の組織サンプルが穿孔および破碎されるような鋭利な端部を持つように形成できる。

【0028】

10

20

30

40

50

さらに好適な装置モデルでは、サンプル採取ツールは、例えば耳タグ取り付け用のプライヤーのような好適な装置と共に使用する、サンプル採取のためのサンプル採取ツールは、耳タグが被検体の耳に押し通されると同時に使用され、その結果耳タグ取り付けとサンプル採取りが1回の作業で行われる。

【0029】

認識のために用いられる耳タグは通常2つのパーツからなる。スパイク10を持つプレート（スパイクプレート）と、スパイクプレートとほぼ同じサイズであるか、又はスパイク10aが耳の中に滑り落ちるのを防ぐのに十分な大きさを持つ限りより小型でもよいのアーチャープレート11とにより構成されている。両パーツは食物への利用に好適な組織適合性の合成材料（例えばポリウレタンBayer社製Desmopan795U）または、部分的に金属（例えばステンレススチール、真鍮、青銅等）でできている。

10

【0030】

耳タグ10、11を挿入するには、市販の耳タグ取り付け用プライヤーが利用できる。この目的に利用できるプライヤーの大部分は、必要に応じて小型の追加のパーツを加えることで極めて容易に改良することができる。その結果サンプル受け取り容器1は耳タグ10、11の挿入後もプライヤーに掛かった状態を保ち、それにより採取を容易にすることが可能である。追加のパーツは、例えばサンプル受け取り容器を持つトング9内の孔の上にある、サンプル受け取り容器を引き出すための小型のノブである。耳タグ10、11を耳内に挿入した後、必要に応じて耳タグ10、11はプライヤー中のホールドから剥脱され、ノブはサンプル受け取り容器1でトング9をプライヤー上にしっかり保持する。その後トングはノブから容易に外すことができ、それによりサンプル受け取り容器1を採取することができる。

20

【0031】

サンプル採取ツール4は挿入時にサンプル受け取り容器1を密封し、固定具5により所定位置に固定され、その結果サンプルの漏れ、及び異物侵入が防止される。

【0032】

サンプル受け取り容器1及びサンプル採取ツール4は、例えば金属のような好適な材料、またはガラスファイバーにより強化された合成材料より作ることができる。サンプル採取ツール4が合成材料により作られる場合、耳内への挿入中、プライヤー内に金属のロッドを利用することでそれを補強することができる。

30

【0033】

発明の装置により、耳タグ10、11による認識票取り付けと同時に動物からサンプルを取ることが可能であり、これは多くの追加作業又は出費なしに、ルーチンで実施される。これによる節約は極めて大きい。

【0034】

通常のサンプル受け取り容器に比した本発明の装置の更なる利点は、平坦なトングの形状を持ち、サンプルのラベルおよび認識に利用できるサンプル受け取り容器上の固定装置9である。通常、ラベリングは手を使い大きな労力をかけ、多くの場合、円筒状容器（例えばエペンドルフチューブ）の曲がった表面で行われるため、読みとりは容易でない。その結果、数字またはデータのスキャン及び自動採取は困難である。

40

【0035】

本発明のシステムは、サンプルがすべての構造の静止部分である材料から取らねばならず、従って、通常、道具（ナイフ、鋭匙、メス等）を使ってサンプルを採取する必要がある場合に特に有益である。再使用可能な道具を利用する場合、汚染の危険は極めて高く、PCR（ポリメラーゼチェーンリアクション）のような高感度試験では1細胞によっても汚染が引き起こされ、その結果誤った陽性の結果が生じる。本発明の装置を利用すれば、1回の使用パーツのみがサンプル材料に接触する。

【0036】

発明の装置はまた、例えば液体サンプル（血液、尿、唾液及びその他）を信頼性高くかつ確実に採取し、加工するのに利用することもできる。この場合、液体はサンプル受け取り

50

容器 1 の開口部、又はサンプル採取ツール 4 の全面部に適用され、続いて例えばプライヤーのような好適装置によりサンプル受け取り容器 1 内に押し込まれる。表面からのサンプル（皮膚、粘膜等）も、サンプル採取ツールの先端部が「鋭匙」のようなものであり、表面上を簡単に削ぎ／剥離する本発明の装置を利用し、清浄かつ、信頼性と確実な認識をもって採取できる。

#### 【0037】

本発明の実質的な利点は、サンプル受け取り容器 1 が耳タグ（スパイクプレート 10、アパーチャープレート 11）と同時にラベルできることである。これによりユーザーまたは動物の所有者への発送前に過誤なく同一番号 n を付けることができる。例えば、ラベリングはプラスチック製の耳タグの場合、拭いたり除去したりする程度の通常の使用では剥がれない程度に強く合成材料に結合する（黒色の）マスターミックスが利用されるプリンターにて実施することができる。更に、対応するパーツ同士は、その上に固有の番号をプリントすることができる。

10

#### 【0038】

次に、本発明の装置により集められたサンプルは中央の採取施設に集められ、そこで分析される。サンプル受け取り容器 1 の収集は、移送中の温度や期間に関する特別な配慮なしに実施することができる。サンプル受け取り容器 1 は、郵便受け、配送会社、サンプル収集業者により研究室又は保管場所まで、問題なく、リスクなしに輸送することができる。

#### 【0039】

研究室でのサンプル取り扱いでは、サンプルの一部採取、試験反応、及び分析はロボットコントロールされたシステムにより自動化することができる。サンプルの認識番号は読みとり装置（スキャナー）により登録され、さらに処理される。手入力を省くことで、誤りを無視できる程度まで低くすることができる。

20

#### 【0040】

本発明の装置により採取されたサンプルの DNA を処理または分析するためには、サンプル受け取り容器 1 は、スキャナーがサンプルの認識を記録できる様コンベアーベルトに乗せられる。続いて、カニキュレがサンプル空間 6、6a の床を通し挿入され、サンプル採取のために液が注入され、続いてその一部が採取される。次に挿入点は再度密封され、サンプル受け取り容器は保存することができる。サンプル空間 6、6a が好適な方法により当初より分割されている場合には、発明の装置内に分析に利用可能な別のサンプルが存在する。

30

#### 【0041】

DNA の単離はピペッティングロボット（Biomec 2000）、（Beckman）及びシリコン粒子（例えば InstaGene Matrix、BIO-RAD）を使った DNA 精製を利用し自動化することができる。これらサンプルの試験反応も自動化により調整することができる。

#### 【0042】

ここに記したサンプルの簡便な採取及び自動化分析のシステムは以下の利点を持つ：

#### 【0043】

消費に至るまでの全ての段階で、全ての畜牛（cattle）及びそれら畜牛の肉に関する出所及び認識を偽造されることがなく証明することができ、それにより BSE のない地域起源であることを証明することができる。有機農場で飼育された、又は自然公園で飼育された、あるいは特別なグレードの認識を持つ動物のような、目的を絞った販売プログラムをコントロールし、安定化することができる。全ての畜牛に関する輸送経路及び時間と距離の証明とモニタリング。オークション、展覧会等のいかなる時点に於いても可能な認識確認を利用した、全畜牛の誤りのない同定。誕生した全ての畜牛に関する起源の完全な証明、及び誤り又は偽造書類の発見。絶対の信頼性を持つ法医学的証拠（医学検査官による、胃内容物の既に消化された牛肉からのものも含む）。絶対の信頼性を持つ（不合格）及び疫学コントロールのモニタリング。ペットフードを含む、試験された全（加工された）食物中の牛肉混合の決定。禁止のホルモンまたは成長ホルモンの使用に関する無作為抽出試験が

40

50

行われる屠殺場での、製造元の割り出し。皮革、角、蹄、臓器、血液等のような畜牛生産からの他の製品の出所証明。直販ミルク及び乳製品に関する動物ならびに家畜の証明及び試験。全ての畜牛群及び販売経路の正確な登録。DNA多形の詳細分析、遺伝学的距離、及び遺伝的スクリーニングに利用できるサンプル。

【0044】

繁殖プログラムの最適化。遺伝的距離の測定。出生動物品種の系統的な及び掛け合わせの履歴。マーカー支援選択プログラム(MAS)の一部としての分析。特定遺伝的欠損の存在及び頻度の正確な証拠。法医学的観点より、ここに記載の装置及びここに記載の方法は、認識可能なサンプル受け取り容器に必要な操作を行うことなしに採取されたサンプルを変更(交換、偽造)することができないという利点も有している。

10

【0045】

サンプルを採取、分類することで、更なるタイピング、起源試験、遺伝的欠損のスクリーニング、集団分析、変異検出及び食物スクリーニング、病原菌診断、トランスジェニック診断、食物加工作業場の衛生状態モニタリングが多大な出費なしに可能である。

【0046】

ここに記載したシステムを利用すれば、全ての動物及び消費されるまでの動物由来の全ての製品に関する遺伝的情報を試験することが可能である。ここに記した装置を利用すると、これに通常伴うコストが大きく減少する。

【0047】

強力に加工された動物起源の食物でさえ(ソーセージ、加工肉、“Leberkas”(オープン内で焼かれる、あるいは事前に焼かれた、スパイス及びその他の添加物と共に細く粉砕された肉)、種及び個体に特異的なDNAを確立することができる。これにより、食物の異質の肉成分の汚染を検出することができる。もちろん、この方法を利用すれば、たとえ出所農場において好適(第1)なサンプルが採取されていれば、特定の食物が特定の動物に由来する(記述の如くの)ことに関する疑問について証明することができる(図3)。

20

【0048】

その為には、DNAタイピングを目的として全てのうまれたての家畜から耳の組織サンプルを採取し、タイピングセンターに送付する必要がある。マイクロサテライトプライマーを使った(自動化された)PCR DNAフィンガープリントを利用し、各動物について

30

【0049】

これらのデータはセントラルファイルに保存され、それを通じアクセスすることができる。ルーティン試験のフィンガープリント、即ちDNAタイピング後の第2サンプル送付時のフィンガープリントを初回解析時のフィンガープリントと比較することで、合致する動物を見つけることができる。この結果は通常1日以内に入手可能である。極端なケースの場合、例えば動物の輸送中、あるいは緊急時には3時間以内に迅速に結果を得ることができる。動物の番号、即ちDNAフィンガープリント及び全てのその他のデータは、登録された動物毎に呼び出すことができる。動物の所有者、即ち1人の所有者又は1人の牧夫により販売された全ての動物は蓄積することができる。このファイルを通じて、動物の親について、即ち生まれた全畜牛の登録の数年後、各親の子孫の割合及び数を見ることができる。農場の動物の完全な個体群の個別のタイピングは新規である。全ての利用者、顧客、消費者、販売業者、屠殺業者、加工業者、所有者及び検査官が、動物または動物製品の身元をチェックし、それにより起源をチェックすることができる(図4)。この試験のためには、例えば屠殺場、スーパーマーケット、既に調理された肉(例えばレストランにおいてテーブルの上にあるカツレツから)から第2サンプルを必要とするだけである。

40

【0050】

生きている動物の場合、例えば動物が承認された方法(距離)で輸送されたかチェックするのに、タイピングは同様に可能であろう。試験結果に関するこの確実性の大きさと十分に高い試験頻度は、その高い信頼性を持ち、法律的に議論の余地のない証拠、及び発見さ

50



れるリスクに対する恐れから、詐欺行為を自動的に最少まで低下させるだろう。

【0051】

将来、リスク予防、疫学コントロール、または動物中の違法残存物（ホルモン、成長ホルモン）を理由として成される、動物又は獣群の特定のグループのモニターのあらゆる段階が、既に採取されたDNAデータを利用して迅速に行うことができるだろう。

【0052】

ここに記したシステムによる個別タイピングが1国において継続的に成されれば、いずれの時点においても発生した問題（例えば動物のBSEの疑い、農場でのブタコレラの流行等）に即時的、例えば同日に対処でき、それによって諸費者に対し従来にない保護及び従来にないモニタリング試験の可能性が提供できるだろう。

10

【0053】

具体的には、例えば個別タイピングにより動物及び“選択された”製造方法による製品が真実どこから来たのかを完璧かつ疑いなく証明することができる。このことは、全ての顧客が、長期輸送及び肉が販売されたのちでも、サンプル（第2サンプル）を送付することで肉に添付された情報の試験をアレンジできることを意味する。

【0054】

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、これはクレームに記述された発明を制限するものではない。

【0055】

[実施例1]

20

[畜牛(cattle)における個別タイピング]

ウシは通常の耳タグによりマークされた。スパイクプレートのスパイクにはサンプル採取ツールが取り付けられており、これは前方の先端部に円錐状の形態を有し、底部にはスパイクプレートのスパイクを受け入れるための円筒状の底部と空洞とを有する。

【0056】

プレイヤー上には、トングと一体化するように作成されたサンプル受け取り容器は、合成フィルムnの蓋により密閉されたサンプル受け取り容器nの蓋が、アパーチャプレート

の孔と一列になる位置がアパーチャプレートに提供されるように取り付けられている。

【0057】

トングは、サンプル受け取り容器と反対側にプレイヤー上に固定するための孔を有している。

30

【0058】

スパイクプレートのサンプル採取ツールにより提供されたスパイクをウシの耳を通し押すことにより、打ち抜かれた耳のサンプルがサンプル受け取り容器内に押し込まれた。侵入後、サンプル採取ツールはサンプル受け取り容器の内壁上の突起により所定位置に固定され、これにより形成されたサンプル空間は密封された。

【0059】

サンプル受け取り容器内には採取したサンプルのDNAを分解から保護するためのモレキュラーシープ(Merck社製、0.2nm Nr. 1.05704.0250)が入っている。

40

【0060】

既知遺伝子のDNAフットプリント及びPCR分析は、半年後にサンプル受け取り容器内に存在した遺伝的物質についても問題なく実施できた。

【0061】

[実施例2]

特定の系統（例えば異物移植用の1.3Gal/Gal3陰性ブタ）の繁殖のための機能的な突然変異のスクリーニング。

自然の突然変異率によれば、単一の個体内における十分なサイズの個体群中では、ゲノム中に存在していずれの遺伝子も各種サイレント突然変異のみならず、一定の蓋然性で、対立遺伝子の不活性化をもたらす突然変異をも含む。このような例の多くでは、これは優性

50

の突然変異ではなく劣性の突然変異を含む。Hardy - Weinberg の法則によれば、突然変異による遺伝子型のこのような変化の大部分はヘテロ接合体としてマスクされている。

#### 【0062】

スクリーニング方法では、対象となるブタ集団中の適当な遺伝子座の好適な分子遺伝学的な解析を利用して、突然変異を持つ（単一の）ヘテロ接合体キャリア動物を発見することが重要である。次に、遺伝子ノックアウトを利用して作られる系と同様の、望ましく、また必要とされる遺伝子欠損を持つホモ接合陰性系をこの動物を利用して創り上げることができる。それは決してこれに劣るものではない。

#### 【0063】

提言される方法は、マーカーを持たない好適な構築体と組み換えを行った後に、ある程度の幹細胞株のスクリーニングを行うものである。差は以下の通りである。幹細胞株の細胞は全て、一回の突然変異を起こした後に変化し、または組み換えを行った細胞を除き、解析された全ての遺伝子型は異なるものである。ブタ集団のスクリーニングでは、全ての遺伝子型を解析することは困難である。それらは目標を定めて突然変異誘導されていないが、進化及び交配の過程に於いて蓄積された突然変異を有している（ヘテロ接合体の状態にある限り、それらは負の選択圧に曝されることはない）。

#### 【0064】

1.3 Gal / Gal 3 の発現には定量的な差が存在することが知られている。突然変異分析が多様な個体群中の既存の変異を発見することを目的としていることから、交配動物が分析されるだろう。新しい突然変異を無視すれば、生れたブタは交配親に存在していた変異のみを保有している。実務的には、Typi - fix システムを使った組織サンプルの保存と採取は、成功または経済的現実性にとって重要なファクターである。突然変異キャリアーを見つけるための分析では、1.3 Gal / Gal 3 を欠損している可能性のある動物を発見するためには恐らく 100,000 の遺伝子型を試験しなければならないと推定される。100,000 頭のブタから個別サンプルを安価に採取するためには、本発明のシステムが選択方法である。サンプルは研究室に輸送するだけで（郵便またはサンプル集配人により）あり、そしてそこで検査が行われる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、底部2に突起部8を持つサンプル受け取り容器1のモデルの断面図を示す。サンプル採取ツール4はサンプル受け取り容器1内にあり、これを密封する。サンプル空間6、6aから離れた場所にあるサンプル採取ツール4の側面には中空12があり、ロッドの挿入が可能である。

【図2】 図2は、スパイク10aを有するスパイクプレート10と、トング9が取り付けられたサンプル受け取り容器1を有するアパーチャプレート11との配置の断面図である。サンプル受け取り容器1はサンプル採取ツール4により密閉されており、イヤータグ10、11が適用され、同時にサンプルが採取された後の状態を表す。

【図3】 図3は、スパイクプレート10と、アパーチャプレート11とにより構成されるイヤータグ10、11の側面図であり、サンプル受け取り容器1は、好適な装置を用いて組み立てられる前にトング9と一体化する。

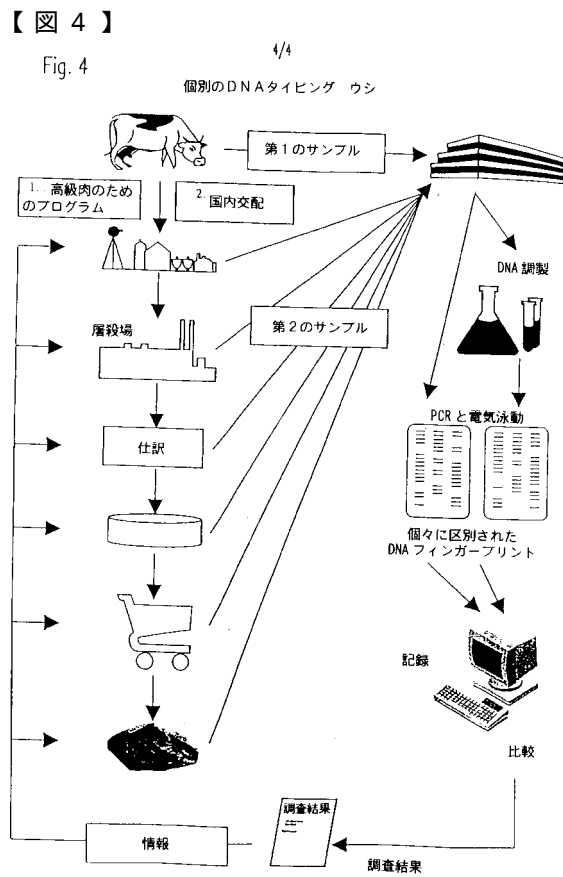
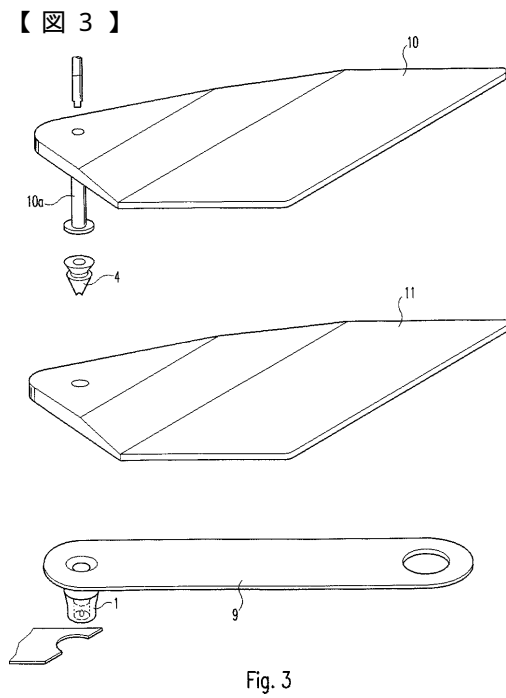
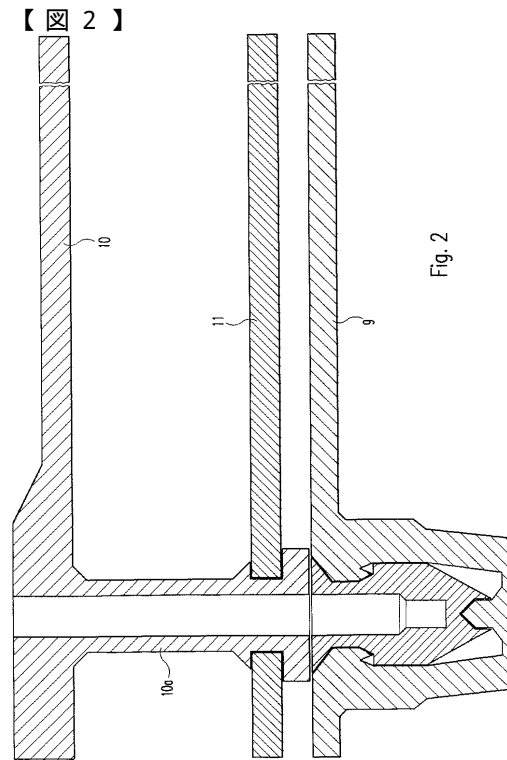
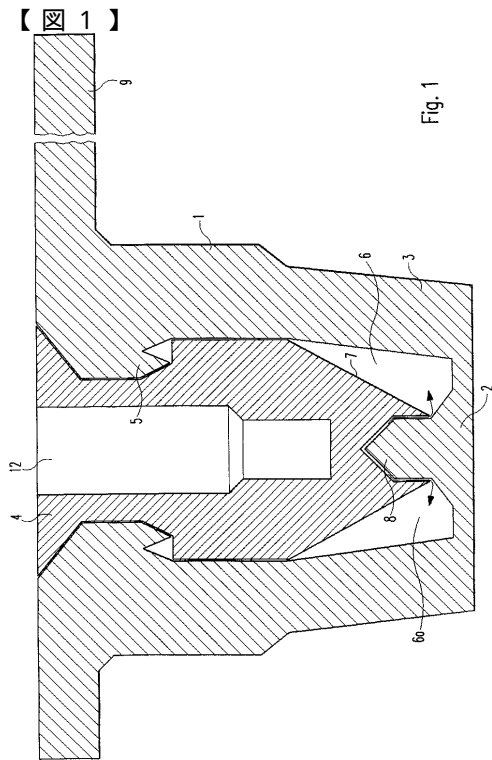
【図4】 図4は、畜牛での個別DNAタイピングの略図である。

10

20

30

40



---

フロントページの続き

(72)発明者 プレム, ゴトフリート  
ドイツ連邦共和国、デー 8 6 5 6 7 ヒルガーツハウゼン、ラレッツハウゼン、タルマンズドル  
フ 2 5

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特開平 0 8 - 2 7 8 2 3 4 ( J P , A )  
特開昭 6 1 - 0 8 1 7 4 1 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12M 1/00-3/10  
C12N 5/00-28  
C12N 15/00-90  
C12Q 1/00-70  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)