

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年1月13日 (13.01.2005)

PCT

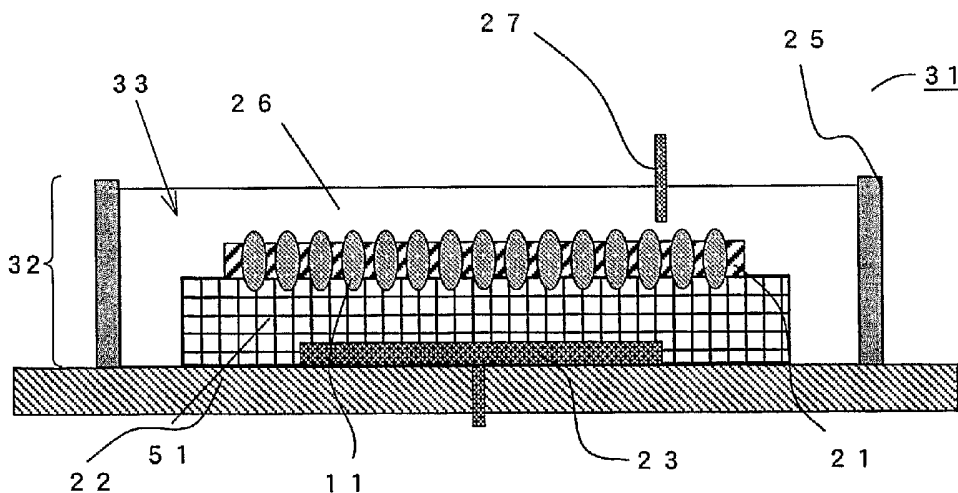
(10) 国際公開番号
WO 2005/003750 A1

- (51) 国際特許分類7: G01N 27/414, 27/416, C12Q 1/68, G01N 33/483, C12Q 1/42, C12M 1/34, C12N 15/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/009787
- (22) 国際出願日: 2004年7月2日 (02.07.2004)
- (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2003-190121 2003年7月2日 (02.07.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5718501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 行政 哲男 (YUKIMASA, Tetsuo). 夜久 英信 (YAKU, Hidenobu). 岡 弘章 (OKA, Hiroaki). 池田 信 (IKEDA, Shin). 中南 貴裕 (NAKAMINAMI, Takahiro).
- (74) 代理人: 角田 嘉宏, 外 (SUMIDA, Yoshihiro et al.); 〒6500031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所 Hyogo (JP).
- (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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

[続葉有]

(54) Title: PYROPHOSPHORIC ACID DETECTION SENSOR, METHOD OF DETECTING NUCLEIC ACID AND METHOD OF DISCRIMINATING BASE VARIETY

(54) 発明の名称: ピロリン酸検出センサ、核酸の検出方法、および塩基種判別方法



(57) Abstract: A pyrophosphoric acid detection sensor for detecting pyrophosphoric acid in a sample liquid, which comprises a sample liquid reception part for receiving the sample liquid; an H⁺ permeation restricting membrane containing H⁺ pyrophosphatase; an immobilization layer for fixing the H⁺ permeation restricting membrane; and measuring means for measuring an electrochemical change accompanying a change of hydrogen ion concentration in the immobilization layer. The above H⁺ pyrophosphatase is arranged so that it effects hydrolysis of any pyrophosphoric acid in the sample liquid, thereby inducing a change in the hydrogen ion concentration in the immobilization layer.

(57) 要約: 本発明は、試料液中のピロリン酸を検出するピロリン酸検出センサであって、前記試料液を受容する試料液受容部と、H⁺-ピロホスファターゼを有するH⁺難透過性膜と、前記H⁺難透過性膜を固定する固定層と、前記固定層の水素イオン濃度変化に伴う電気化学的変化を測定する測定手段と、を備える構成であり、前記H⁺-ピロホスファターゼは、前記試料液中のピロリン酸を加水分解し、これに伴って固定層の水素イオン濃度に変化をもたらすように配されている。



WO 2005/003750 A1



SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(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, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,

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

ピロリン酸検出センサ、核酸の検出方法、および塩基種判別方法

〔技術分野〕

- 5 本発明は、試料中のピロリン酸を簡便かつ高感度で検出するセンサ、ならびにこれを用いた核酸の検出方法および塩基種判別方法に関する。

〔技術背景〕

- ピロリン酸は、細胞内における酵素反応に深く関与していることが知られている。例えば、タンパク質の合成過程において、アミノ酸がアミノアシルアデニル酸を経由してアミノアシル tRNA を形成する反応においてピロリン酸が生成される。また、例えば、植物などに見られるデンプン合成の過程では、グルコース-1-リン酸と ATP との反応によって ADP-グルコースが生成される際に、ピロリン酸が生成される。
- 15 これら以外にも、種々の酵素反応においてピロリン酸が関与していることが知られている。従って、ピロリン酸を定量的に検出する技術は、細胞状態、あるいは上記の酵素反応等を解析する上で重要な技術である。

- 従来、ピロリン酸測定方法として、Grindleyらの化学的方法（G. B. Grindley and C.A. Nichel, *Anal. Biochem.*, vol 33, p 114 (1970) 参照）が知られている。しかし、この方法では濃硫酸を用いるので、非常に危険が伴う。

特開昭61-12300号公報では、濃硫酸などの危険な薬品を用いずに、酵素を利用した三種類のピロリン酸測定方法が開示されている。それらに関して以下に説明する。

- 25 第1の方法は、ピロリン酸をホスホエノールピルビン酸およびアデノシン-リン酸の存在下で、ピルベートオルソホスフェートジキナーゼを作用させる方法である。この反応によってピルビン酸が生成されるので、

ピルビン酸の量を測定することによってピロリン酸の量を算出することができる。なお、ピルビン酸の量を測定する方法は二種類の方法が提案されている。1つは、ラクテートデヒドロゲナーゼの触媒作用を利用してピルビン酸をNADHで還元する際に、NADHの減少を比色定量する
5 方法である。もう1つは、生成したピルビン酸にピルベートオキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素を色素に導くことによって比色定量する方法である。

第2の方法は、ピロリン酸をシチジン二リングリセロールの存在下でグリセロール-3-ホスフェートシチジルトランスフェラーゼに作用させる方法である。この反応によってグリセロール三リン酸が生成される。
10 従って、グリセロール三リン酸の生成量を測定することでピロリン酸の量を算出することができる。グリセロール三リン酸の量を測定する方法は二種類の方法が提案されている。1つは、グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼの触媒作用を利用してグリセロール三リン酸を
15 NAD(P)で酸化する際に、NAD(P)Hの増加を比色定量する方法である。もう1つは、生成したグリセロール三リン酸にグリセロール-3-ホスフェートオキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素を色素に導きこれを比色定量する方法である。

第3の方法は、ピロリン酸をシチジン二リン酸リビトールの存在下で
20 リビトール-5-ホスフェートシチジルトランスフェラーゼを作用させる方法である。この反応によってD-リビトール-5-リン酸が生成されるため、その生成量を測定することでピロリン酸量を測定することができる。D-リビトール-5-リン酸を測定する方法は、NAD(またはNADP)の存在下でリビトール-5-ホスフェートデヒドロゲナー
25 ゼを作用させてNADH(またはNADPH)の増加を比色定量する方法が提案されている。

その他にも特開2002-369698号公報には、ピロホスファタ

一ゼによりピロリン酸をリン酸に加水分解した後、プリンヌクレオシドホスホリラーゼによりリン酸をイノシンまたはキサントシンと反応させ、生じたヒポキサンチンをキサントシンオキシダーゼにより酸化してキサントシンとし、さらに酸化して尿酸を生成させ、このキサントシンオキシダーゼによる酸化過程で生じる過酸化水素をペルオキシダーゼを用いて発色剤を発色させる方法が示されている。

一方、核酸の伸長反応もピロリン酸が関与する重要な生体反応の一種である。

近年、遺伝子情報に関する技術が盛んに開発されている。医療分野では、疾患関連遺伝子を解析することにより、疾患の分子レベルでの治療が可能となってきた。また、遺伝子診断により、患者個人ごとに対応したテーラーメイド医療も可能となってきた。製薬分野においては、遺伝子情報を使用して、抗体やホルモンなどのタンパク分子を特定し、薬品として利用している。農業や食品分野などにおいても、多くの遺伝子情報を利用した製品が作り出されている。

これらの遺伝子情報の中でも、遺伝子多型は特に重要である。我々の顔や体型などが様々であるように、一人一人の遺伝子情報もかなりの部分で異なっている。これらの遺伝情報の違いのうち、塩基配列の変化が人口の1%以上の頻度で存在するものを遺伝子多型と呼んでいる。これらの遺伝子多型が、個人の顔かたちだけでなく、様々な遺伝子疾患の原因や、体質、薬剤応答性、薬剤の副作用などに関連していると言われ、現在この遺伝子多型と疾患などとの関連が急速に調べられている。

この遺伝子多型の中で、近年、特に注目されているのがSNP (Single nucleotide polymorphism) である。SNPは、遺伝子情報の塩基配列の中で、一塩基のみが異なっている遺伝子多型のことを指す。SNPはヒトゲノムDNA内に2~3百万あると言われており、遺伝子多型のマーカーとして利用しやすく、臨床への

応用が期待されている。現在では、SNP関連技術として、ゲノム中のSNPの位置同定およびSNPと疾患との関連性等の研究とともに、SNP部位の塩基を判別するSNPタイピング技術の開発が行われている。

SNPタイピングの技術は、ハイブリダイズを利用したもの、制限酵素を利用したもの、リガーゼ等の酵素を利用したもの等様々な種類のものがある。それらの技術のうち、最も簡便な技術としてプライマー伸長反応を利用するものがある。この技術では、プライマー伸長反応が起こるか否かを判定することによって、SNPタイピングを行なう。

プライマー伸長反応を利用したSNPタイピング技術の検出には、実際のDNAの増幅産物を蛍光色素を用いて検出する方法や、固定化プローブを用いる方法の他に、DNAポリメラーゼによる核酸合成の副産物であるピロリン酸を検出する方法も考案されている。この方法では、伸長反応の進行の差を検出するために、プライマー伸長反応の進行に伴って生成されるピロリン酸をATPに変換し、その後ルシフェラーゼ反応を利用してピロリン酸の量を測定する方法を用いている（J. Immunological Method, 156, 55-60, 1992参照）。

しかしながら上述した方法よるピロリン酸の測定方法においては、プライマー伸長反応においてdATPを用いる場合、dATPはATPと同様にルシフェラーゼ反応の基質になる。このため、正確なSNP部位の塩基種の判別ができない。従って、dATPの代わりにDNAポリメラーゼの基質として作用し、且つルシフェラーゼ反応の基質としては作用しない特殊なdATPアナログを用いる必要があるという課題があった。

また、他のピロリン酸の測定技術においても、複数種の酵素、試薬などを必要とし、コストが増大し、工程が複雑化してしまうという不具合がある。また、これらの測定方法においては、上記の理由からキット化および小型センサとしてのデバイス化が困難であるという課題があっ

た。

さらにこれらの方法のほとんどは光学式検出法であるため、測定装置が大型化してしまうという問題点もあった。

5 〔発明の開示〕

本発明は上記課題を解決するためになされたものであり、試料液中のピロリン酸を簡便かつ高感度でピロリン酸を検出し、かつ構成が簡便なピロリン酸検出センサ、ならびにこれを用いた核酸の検出方法および塩基種判別方法を提供することを目的とする。

- 10 これらの目的を達成するために、本発明は、試料液中のピロリン酸を検出するピロリン酸検出センサであって、前記試料液を受容する試料液受容部と、 H^+ -ピロホスファターゼを有する H^+ 難透過性膜と、前記 H^+ 難透過性膜を固定する固定層と、前記固定層の水素イオン濃度変化に伴う電気化学的変化を測定する測定手段と、を備え、前記 H^+ -ピロホ
- 15 スファターゼは、前記試料液中のピロリン酸を加水分解し、これに伴って固定層の水素イオン濃度に変化をもたらすように配されている。このような構成においては、 H^+ -ピロホスファターゼにより水素イオンの濃度変化がもたらされる固定層が、 H^+ 難透過性膜を固定する機能をも有するので、ピロリン酸検出センサを簡便に構成することができる。
- 20 上記ピロリン酸検出センサの一形態は、前記固定層がその上面又はその内部に H^+ 難透過性膜を固定する構成である。

上記ピロリン酸検出センサの一形態は、前記 H^+ 難透過性膜が膜小胞であり、前記固定層は前記 H^+ 難透過性膜をその内部に固定する構成である。

- 25 上記ピロリン酸検出センサの一形態は、前記測定手段が、前記固定層に接する水素イオン感受性電極と、前記試料液を受容した状態で前記試料液に接するように配された参照電極とを有する構成である。そして、

前記測定手段は、前記水素イオン感受性電極と前記参照電極との電位差の変化を測定するように構成することが好ましい。

上記ピロリン酸検出センサの一形態は、前記固定層が高分子ゲルまたは自己組織化単分子膜（以下、SAM膜とも称す）からなる構成である。

5 高分子ゲルは、その保持能により前記H⁺難透過性膜を固定しうる。

上記ピロリン酸検出センサの一形態は、前記固定層が水素イオン濃度の変化により酸化還元反応が生じる材料を含み、前記測定手段が前記固定層に接する分極性電極と、前記試料液を受容した状態で前記試料液に接するように配された参照電極とを有する構成である。そして、前記測定手段は、前記分極性電極と前記参照電極との間の電流の変化を測定するように構成することが好ましい。

上記ピロリン酸検出センサの一形態は、前記固定層が水素イオン濃度の変化により酸化還元反応が生じるメディエータを含む高分子ゲルまたは自己組織化単分子膜からなり、その上面に前記H⁺難透過性膜を固定する構成である。

上記ピロリン酸検出センサの一形態は、前記固定層が水素イオン濃度の変化により酸化還元反応が生じる電解重合材料からなる構成である。

また、本発明は、上記ピロリン酸検出センサを用いる、特定の塩基配列を有する核酸の検出方法であって、試料と、前記核酸に相補的に結合する相補結合領域を含む塩基配列を有するプライマーと、ヌクレオチドを含む試料液を調製する工程（a）、前記試料液を前記プライマーの伸長反応が生じる条件下におき、前記伸長反応が生じた場合にピロリン酸を生成する工程（b）、前記ピロリン酸検出センサの前記試料液受容部に前記試料液が受容された状態とする工程（c）、前記ピロリン酸検出センサの前記測定手段により前記固定層の水素イオン濃度変化に伴う電気化学的変化を測定する工程（d）、工程（d）の測定結果に基づいて前記伸長反応を検出する工程（e）、および工程（e）の検出結果に

基づいて前記核酸を検出する工程（f）を包含する。

また、本発明は、上記ピロリン酸検出センサを用いる、核酸の塩基配列中の塩基種判別方法であって、核酸と、前記核酸に相補的に結合する相補結合領域を含む塩基配列を有するプライマーと、ヌクレオチドとを含む試料液を調製する工程（a）、前記試料液を前記プライマーの伸長反応が生じる条件下におき、前記伸長反応が生じた場合にピロリン酸を生成する工程（b）、前記ピロリン酸検出センサの前記試料液受容部に前記試料液が受容された状態とする工程（c）、前記ピロリン酸検出センサの前記測定手段により前記固定層の水素イオン濃度変化に伴う電気化学的変化を測定する工程（d）、工程（d）の測定結果に基づいて前記伸長反応を検出する工程（e）、および工程（e）の検出結果に基づいて前記核酸の塩基配列中の塩基種を判別する工程（f）を包含する。

本発明の上記目的、他の目的、特徴、及び利点は、添付図面参照の下、以下の好適な実施態様の詳細な説明から明らかにされる。

15

〔図面の簡単な説明〕

図1は、植物の液胞膜に内在された状態のH⁺-ピロホスファターゼを模式的に表す図である。

図2は、第1の実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。

図3は、第2の実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。

図4は、第3の実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。

図5は、第4の実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。

図6は、第5の実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示

す断面図である。

図 7 は、ピロリン酸検出センサの構成例 1 を模式的に示す断面図である。

5 図 8 は、ピロリン酸検出センサの構成例 2 を模式的に示す断面図である。

図 9 は、ピロリン酸検出センサの構成例 3 を模式的に示す断面図である。

図 10 は、ピロリン酸検出センサの構成例 4 を模式的に示す断面図である。

10 図 11 は、検出を目的とする DNA と DNA プローブとにおいて SNP 部位が一致した場合の反応系を示す図である。

図 12 は、検出を目的とする DNA と DNA プローブとにおいて SNP 部位が一致しない場合の反応系を示す図である。

15 図 13 A は λ DNA の特定の塩基配列に完全にハイブリダイズし得る 2 種類のプライマー C およびプライマー D を表す図、図 13 B は PCR 反応液 G および H の組成を表す表を示す図、図 13 C は PCR 反応を行なった反応温度条件を表すフローチャートである。

20 図 14 A は野性型 λ DNA、変異型 λ DNA およびタイピングプライマーを表す図、図 14 B は PCR 反応液 I および J の組成を表す表を示す図、図 14 C は PCR 反応を行なった反応温度条件を表すフローチャートである。

〔発明を実施するための最良の形態〕

以下、本発明の実施形態について、図面を参照しながら説明する。

25 まず、図 1 を用いて本発明の反応原理を説明する。本発明では、ピロリン酸を定性的又は定量的に検出するために、 H^+ -ピロホスファターゼを用いる。図 1 は、植物の液胞膜に内在された状態の H^+ -ピロホスファ

ターゼを模式的に表す図である。図 1 に示すように、 H^+ -ピロホスファターゼ 11 は通常、植物等の液胞膜 13 内に存在する膜タンパク質であり、1 分子のピロリン酸 10 から 2 分子のリン酸 12 を生成する加水分解反応に伴って、水素イオンを通さない、あるいは通しにくい液胞膜 13 の外側（表面 13 a 側）から液胞膜 13 の内側（裏面 13 b 側）に向けて水素イオンを輸送する性質を有する。このため、 H^+ -ピロホスファターゼの酵素反応によって、液胞膜 13 の内部では水素イオン濃度が増大し、液胞膜 13 の外部では水素イオン濃度が減少する。

各実施形態にかかるピロリン酸検出センサでは、 H^+ -ピロホスファターゼの上記性質及び膜タンパク質であるという形態を利用して、ピロリン酸の検出を行う。すなわち、 H^+ -ピロホスファターゼを保持する膜で領域を分離し、少なくともいずれか一方の水素イオン濃度の変化を測定することにより、 H^+ -ピロホスファターゼが加水分解に寄与したピロリン酸の量を検出することができる。このように、各実施形態にかかるピロリン酸検出センサでは、 H^+ -ピロホスファターゼの作用に直接的にかかわった水素イオンの濃度変化を検出することにより、ピロリン酸の検出を行うので、簡便かつ高感度の検出が可能である。また、上述の検出を行うためには、水素イオンの輸送元の領域と、水素イオンの輸送先の領域との分離が必須要件となるが、 H^+ -ピロホスファターゼは膜タンパク質であることにより、その形態を領域の分離に利用することができる。このことは、ピロリン酸検出センサの構成の簡素化に寄与する。

各実施形態のピロリン酸検出センサを用いた検出工程においては、ピロリン酸を含む試料液を、植物細胞等から単離してきた液胞膜 13 等の H^+ 難透過性膜に内在している状態の H^+ -ピロホスファターゼに接触させる。

この後、 H^+ 難透過性膜の内側あるいは H^+ 難透過性膜の外側の水素イオン濃度の変化を測定する。このことによって、試料液中のピロリン酸

の有無あるいは量を測定し、ピロリン酸の定性的検出あるいは定量的検出を行う。

(第1の実施形態)

本実施形態は、ピロリン酸検出センサに係るものである。図2は、本
5 実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。
ピロリン酸検出センサ31は、絶縁基板22と、絶縁基板22上に固定
された溶液保持部材25によって形成される溶液保持部32と、測定手
段とを有する。溶液保持部32は、基板22上に形成された固定層51
と、前記固定層51上面に固定されたH⁺難透過性膜21と、これらが
10 構成されていない領域である試料液受容部33とからなる。測定手段は、
固定層51と接するように基板22直上に配された水素イオン感受性電
極23と、試料液受容部33に試料液26が満たされた状態で、試料液
26に接するように配された参照電極27とを有する。

H⁺難透過性膜21は、H⁺-ピロホスファターゼ11を有する。H⁺
15 難透過性膜21は、H⁺-ピロホスファターゼ11の部分を除いて水素
イオンを透過させにくい膜からなり、例えば天然の液胞膜、もしくは人
工の脂質二重膜等が利用できる。H⁺難透過性膜21において、H⁺-ピ
ロホスファターゼ11のピロリン酸を加水分解する活性部位は、試料液
受容部33側に露出している。

20 固定層51は、水素イオンを十分透過させ水分を保持し得る材料で形
成されている。また、固定層51は、その上面にH⁺難透過性膜21を
固定可能な材料で形成されている。固定層51は、その保持能を利用し
てH⁺難透過性膜21を上面に固定するゲルや、架橋反応を利用してH⁺
難透過性膜21を上面に固定するSAM膜で形成することができる。こ
25 のような材料として、アガロースゲル等の高分子ゲル、フラーレン様化
合物を含む材料、等を用いることができる。

水素イオン感受性電極23としては、通常のpHセンサとして機能で

きるものであればよく、ガラス電極、ISFET電極（ion sensitive FET、ゲートにイオン感受性膜を使用したイオン感受性FET）、LAPS（Light-Addressable Potentiometric Sensor）等が利用できる。

- 5 参照電極 27 には、標準水素電極、銀／塩化銀電極、飽和カロメル電極等が利用できる。

絶縁基板 22 と溶液保持部材 25 は、ピロリン酸の加水分解反応に影響しない材料で形成されていればよく、ガラス、シリコン、プラスチック等で形成され得る。

- 10 ピロリン酸検出センサ 31 を用いて、試料液 26 中に含まれるピロリン酸を検出する方法及びその原理について説明する。まず、試料液 26 を試料液受容部 33 に満たす。試料液 26 にピロリン酸が含まれる場合、 H^+ -ピロホスファターゼ 11 の活性により、ピロリン酸がリン酸へと加水分解され、それに伴って固定層 51 内の水素イオン濃度が上昇する。
- 15 それを、水素イオン感受性電極 23 を用いて測定することによって、測定液 26 中のピロリン酸濃度を検出することができる。具体的には、水素イオン感受性電極 23 と参照電極 27 との電位差の変化を測定することによって、固定層 51 内の水素イオン濃度変化を測定し、かかる測定結果に基づいて測定液 26 中のピロリン酸濃度を検出する。

- 20 なお、 H^+ 難透過性膜 21 は、ピロリン酸を加水分解する活性部位が固定層 51 側（内部）に露出している H^+ -ピロホスファターゼを含んでいても良い。ただし、ピロリン酸を加水分解する活性部位が内部に露出している H^+ -ピロホスファターゼを有する H^+ 難透過性膜 21 を用いる場合、固定層 51 のピロリン酸の濃度は、試料液 26 のピロリン酸
- 25 の濃度よりも低くしておくことが好ましく、固定層 51 にはピロリン酸を含まないことが最も好ましい。このことによって、固定層 51 から試料液 26 への水素イオン輸送が減少あるいは停止し、試料液 26 から固

定層 5 1 への水素イオンの輸送が優勢となって、固定層 5 1 の水素イオン濃度の変化が、試料液 2 6 中に含まれるピロリン酸によるものにはほぼ限定される。したがって、試料液 2 6 中に含まれるピロリン酸の量を正確に見積もることができる。

- 5 ピロリン酸検出センサ 3 1 は、固定層 5 1 の試料液受容部 3 3 との境界面全てが H^+ 難透過性膜 2 1 で被覆されている構成ではないので、 H^+ 難透過性膜 2 1 で被覆されていない境界部分から試料液 2 6 と固定層 5 1 との間の水素イオンの移動が可能であり、平衡状態を保つべくこの部分から水素イオンが拡散するが、拡散による水素イオンの移動は、 H^+
- 10 H^+ - ピロホスファターゼ 1 1 の活性による水素イオンの移動と比較して遅いので、水素イオン感受性電極 2 3 によって測定される水素イオンの濃度変化はほぼ H^+ - ピロホスファターゼ 1 1 の活性によるものとすることができる。

(第 2 の実施形態)

- 15 本実施形態は、ピロリン酸検出センサに係るものである。図 3 は、本実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。本実施形態のピロリン酸検出センサ 3 4 は、第 1 の実施形態のピロリン酸検出センサ 3 1 とは、固定層 5 1 が絶縁基板 2 2 直上の全領域に形成されており、固定層 5 1 と試料液受容部 3 3 との全境界領域に H^+ 難透
- 20 過性膜 2 1 が配されている点が異なるのみである。その他の構成は、第 1 の実施形態のピロリン酸検出センサ 3 1 と同じなので、説明を省略する。

(第 3 の実施形態)

- 25 本実施形態は、ピロリン酸検出センサに係るものである。図 4 は、本実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。第 1 の実施形態と異なる点は、 H^+ 難透過性膜が膜小胞 7 1 で形成されている点と、膜小胞 7 1 である H^+ 難透過性膜の固定されている位置で

ある。以下、第1の実施形態と異なる点のみ説明する。

膜小胞71はH⁺-ピロホスファターゼ11を有し、固定層51内に固定されている。固定層51は、例えばゲルの保持能によって膜小胞71を内部に固定し得る材料からなる。膜小胞71としては、細胞から単離された液胞から調製されたものを用いることができる。また、膜小胞71としては、人工的に形成した脂質二重層膜やLB膜などの水素イオンを通さない、あるいは通しにくい膜内に単離および精製したH⁺-ピロホスファターゼを内在するように再構築することによって形成されたものを用いてもよい。

- 10 膜小胞71の膜には、H⁺-ピロホスファターゼ以外のタンパク質が含まれていてもよい。但し、これらのタンパク質は、ピロリン酸と反応しない、あるいは反応性の低いタンパク質であることが好ましい。すなわち、ピロリン酸が膜小胞71の膜中にあるH⁺-ピロホスファターゼ以外のタンパク質と反応する場合、H⁺-ピロホスファターゼと反応するピロリン酸の量が減少し、それに伴ってH⁺の輸送量が減少するからである。
- 15 また、ピロリン酸とは反応せず、且つピロリン酸以外の物質との反応によって水素イオンを輸送するタンパク質が膜小胞71の膜に含まれている場合、そのタンパク質が反応する物質が試料液26中にほとんど含まれていないことが好ましい。例えば、具体的には、膜小胞71の膜には、
- 20 ピロリン酸とほとんど反応せず、且つATPとの反応によって水素イオンを輸送するタンパク質であるATPaseが含まれている場合、試料液26中にATPをほとんど含まないようにすることが好ましい。

ピロリン酸検出センサ35を用いて、試料液26中に含まれるピロリン酸を検出する方法及びその原理について説明する。まず、試料液26を試料液受容部33に満たす。試料液26中にピロリン酸が存在する場合、ピロリン酸は固定層51に拡散される。そして、固定層51に拡散されたピロリン酸は、H⁺-ピロホスファターゼ11の活性により、リン

酸へと加水分解され、それに伴って膜小胞 7 1 の内部液 2 4 の水素イオン濃度が上昇し、 H^+ -ピロホスファターゼ 1 1 の周辺では、それに伴って水素イオン濃度が減少する。 H^+ -ピロホスファターゼが水素イオン感受性電極 2 3 のごく近傍に存在したとき、水素イオン濃度の減少が水素イオン感受性電極 2 3 により測定され、試料液 2 6 中のピロリン酸濃度を測定することができる。

(第 4 の実施形態)

本実施形態は、ピロリン酸検出センサに係るものである。図 5 は、本実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。

10 ピロリン酸検出センサ 3 6 は、第 2 の実施形態とは、固定層の構成と、測定電極の構成が異なるのみである。以下、この点について説明する。

測定電極は、絶縁基板 2 2 上に形成された分極性電極 8 1 からなる。分極性電極 8 1 は、金、白金、カーボン等の通常の電気化学測定に使用できる電極で構成することができる。分極性電極 8 1 には、非常に簡便な構成の電極を利用することができる。このことは、ピロリン酸検出センサの全体構成の簡便化に寄与する。さらに、本実施形態の場合、参照電極 2 7 としては、標準水素電極、銀/塩化銀電極、飽和カロメル電極等に加え、金、白金、カーボン等の電極も利用することができ、さらなるピロリン酸検出センサの全体構成の簡便化に寄与する。

20 分極性電極 8 1 表面には、メディエータ 8 2 を含む固定層 8 3 が形成されている。固定層 8 3 としては、例えば一端にチオール基を持つ直鎖状炭素を利用した SAM 膜 (self-assembled monolayer) などが利用できる。ただし、固定層 8 3 は H^+ 難透過性膜 2 1 を固定可能な材質で形成されていればこれに限定されることなく、その保持能により H^+ 難透過性膜 2 1 を固定するゲルで形成されていても良い。メディエータ 8 2 としては、水素イオン感受性物質の酸化体を使用することができる。このように形成された固定層 8 3 上に H^+ -ピロ

ホスファターゼを含む H^+ 難透過性膜21を固定する。固定層83に上述したSAM膜を利用した場合、チオール基の架橋反応により H^+ 難透過性膜21を固定層83上面に固定することができる。 H^+ 難透過性膜21が、脂質膜である場合、固定層83および脂質膜の疎水性部分が対向し、脂質膜の親水性部分が膜表面を形成する。 H^+ -ピロホスファターゼ11は固定層83および脂質膜の疎水性部分が形成する膜の内部に固定されるが、このとき、 H^+ -ピロホスファターゼ11のピロリン酸を加水分解する活性部位は、 H^+ 難透過性膜21の外部に露出している。

ピロリン酸検出センサ36を用いて、試料液26中に含まれるピロリン酸を検出する方法及びその原理について説明する。まず、試料液26を試料液受容部33に満たす。試料液26中にピロリン酸が存在する場合、 H^+ -ピロホスファターゼ11の活性により、ピロリン酸がリン酸へと加水分解され、それに伴って固定層83内の水素イオン濃度が上昇する。このとき水素イオン感受性のメディエータ82の酸化体が存在した場合、酸化還元反応によりメディエータ82の還元体が生成される。分極性電極81にメディエータ82の酸化還元電位より十分に高い電位を加えておくことにより、メディエータ82の還元物質の濃度に応じた電流を測定することができる。よって、試料液26中のピロリン酸の濃度を検出することが可能である。

20 (第5の実施形態)

本実施形態は、ピロリン酸検出センサに係るものである。図6は、本実施形態のピロリン酸検出センサの構成を模式的に示す断面図である。本実施形態のピロリン酸検出センサ37の第4の実施形態と異なる点は、 H^+ 難透過性膜が膜小胞71で形成されている点と、膜小胞71である
25 H^+ 難透過性膜の固定されている位置と、固定層の構成である。以下、第4の実施形態と異なる点のみ説明する。

膜小胞71は H^+ -ピロホスファターゼ11を有し、固定層91内に

固定されている。固定層 9 1 は、電解重合膜からなる。電解重合膜によって膜小胞を固定する方法は、例えば重合前のモノマーと膜小胞 7 1 を混合しておき、所定の電圧を加えることで形成できる。電解重合膜を形成する電解重合材料としては電気化学的に活性なものが選択でき、例えば
5 ポリ（アニリン）、ポリ（*o*-フェニレンジアミン）、ポリ（*N*-メチルアニリン）、ポリ（ピロール）、ポリ（*N*-メチルピロール）、ポリ（チオフェン）等が使用できる。

ピロリン酸検出センサ 3 7 を用いて、試料液 2 6 中に含まれるピロリン酸を検出する方法及びその原理について説明する。まず、試料液 2 6
10 を試料液受容部 3 3 に満たす。試料液 2 6 中にピロリン酸が存在する場合、ピロリン酸が固定層 9 1 に拡散され、 H^+ -ピロホスファターゼ 1 1 の活性により、ピロリン酸がリン酸へと加水分解される。ピロリン酸の加水分解に伴って内部液 2 4 の水素イオン濃度が上昇し、 H^+ -ピロホスファターゼ 1 1 の周辺では水素イオン濃度が減少する。この水素イオン
15 濃度の変化により、固定層 9 1 である電解重合膜の酸化還元反応が起こり、その電子移動を分極性電極 8 1 で測定することによって、試料液 2 6 中のピロリン酸濃度を検出することができる。

本発明にかかるピロリン酸検出センサにおいては、図 1 を用いて説明した反応原理からわかるように、 H^+ -ピロホスファターゼを含む H^+ 難
20 透過性膜と測定電極（水素イオン感受性電極 2 3、分極性電極 8 1）との間に、水素イオンもしくは水素イオン感受性メディエータの酸化体が、イオンの状態で存在しうる場が必要である。このような場として、バルクの水溶液を用いることも可能である。しかしながら、 H^+ 難透過性膜と測定電極との間に、バルクの水溶液を存在させるためには、例えば特
25 開平 6-90736 号公報に示されているような、非常に複雑な工程を経て、センサを作製する必要がある。さらに、このように作製したセンサでは、一旦作製してしまうと水溶液中でしか保存することができず、

例えばピロリン酸検出センサをDNA検出センサとして用いた場合、その取扱方法や保存方法も極めて特殊なものとなり、作製方法の複雑さも考慮すると、例えばディスポーザブル形式の臨床検査等の使用には適さない。一方、第1～第5の実施形態のピロリン酸検出センサにおいては、

5 上述した水素イオンもしくは水素イオン感受性メディエータの酸化体が、イオンの状態で存在しうる場合は、固定層からなる。かかる固定層は、例えばSAM膜や電解重合膜で形成することができ、比較的簡便な方法でセンサを作製することができる。また、高分子ゲルを固定層としたセンサでは、水分子を保持したまま保存することが可能であるので、取扱や

10 保存が極めて簡便となる。その他の材料で固定層を形成する場合であっても、バルクの水溶液で前記場を構成する場合と比較して、取扱や保存が非常に簡便である。したがって、例えばディスポーザブル形式の臨床検査等の使用にも適したものを構成することができる。さらに、固定層の厚さをできる限り薄くすることによって、水素イオン濃度の変化率を

15 上げ、感度を向上させることも可能である。

以下、 H^+ -ピロホスファターゼを用いたピロリン酸検出センサの他の構成例を示す。

<ピロリン酸検出センサの構成例1>

図7は、ピロリン酸検出センサの一構成例を模式的に示す断面図である。第1の実施形態とは、水素イオン感受性電極23の周囲が内部液24で満たされている点と、 H^+ 難透過性膜21が水素イオン感受性電極23を覆うように絶縁基板22上に固定されている点のみが異なる。以下、第1の実施形態と異なる点のみ説明する。

20

H^+ 難透過性膜21の固定方法は、 H^+ 難透過性膜21が水素イオン感受性電極23の表面をすべて覆っていればどのような方法でもよく、例えばリポソームを利用してSAM膜に転写する方法や、LB法を用いることができる。 H^+ 難透過性膜21によって分離された溶液保持部32

25

内の領域のうちの水素イオン感受性電極 2 3 が含まれた領域には、内部液 2 4 が満たされているようにする。

ピロリン酸検出センサ 3 8 を用いて、試料液 2 6 中に含まれるピロリン酸を検出する方法及びその原理について説明する。まず、試料液 2 6
5 を試料液受容部 3 3 に満たす。試料液 2 6 にピロリン酸が含まれる場合、 H^+ -ピロホスファターゼ 1 1 の活性により、ピロリン酸がリン酸へと加水分解され、それに伴って内部液 2 4 内の水素イオン濃度が上昇する。それを、水素イオン感受性電極 2 3 を用いて測定することによって、測定液 2 6 中のピロリン酸濃度を検出することができる。

- 10 内部液 2 4 は特に限定されないが、 H^+ 難透過性膜 2 1 において、ピロリン酸の活性部位が水素イオン感受性電極 2 3 側（内側）の領域に露出している H^+ -ピロホスファターゼを含む場合、内部液 2 4 のピロリン酸の濃度は、試料液 2 6 のピロリン酸の濃度よりも低くしておくことが好ましく、内部液 2 4 にはピロリン酸を含まないことが最も好ましい。
- 15 このことによって、内部液 2 4 から試料液 2 6 への水素イオン輸送が減少あるいは停止し、試料液 2 6 から内部液 2 4 への水素イオンの輸送が優勢となって、内部液 2 4 の水素イオンの濃度の変化が、試料液 2 6 中に含まれるピロリン酸によるものにほぼ限定される。従って、試料液 2 6 中に含まれるピロリン酸の量を正確に見積もることができる。

20 <ピロリン酸検出センサの構成例 2>

図 8 は、ピロリン酸検出センサの一構成例を模式的に示す断面図である。上述の構成例 1 とは、 H^+ 難透過性膜 2 1 の固定方法のみが異なる。以下、構成例 1 と異なる点のみ説明する。

本構成例のピロリン酸検出センサ 3 9 の H^+ 難透過性膜 2 1 は、直鎖状炭素化合物 3 1 を介して絶縁基板 2 2 上に固定されている。

<ピロリン酸検出センサの構成例 3>

図 9 は、ピロリン酸検出センサの一構成例を模式的に示す断面図であ

る。上述の構成例 1 とは、 H^+ 難透過性膜 2 1 の固定方法のみが異なる。以下、構成例 1 と異なる点のみ説明する。

本構成例のピロリン酸検出センサ 4 0 の H^+ 難透過性膜 2 1 は、溶液保持部材 2 5 に両端が固定されている。

5 <ピロリン酸検出センサの構成例 4>

図 1 0 は、ピロリン酸検出センサの一構成例を模式的に示す断面図である。本構成例のピロリン酸検出センサ 4 1 において、 H^+ 難透過性膜 2 1 は、絶縁基板 2 2 に形成された貫通孔に固定されている。 H^+ 難透過性膜 2 1 の内側には水素イオン感受性電極 2 3 が備えられ、外側には
10 参照電極 2 7 が備えられている。水素イオン感受性電極 2 3 および参照電極 2 7 は、絶縁基板 2 2 上に形成されていてもよい。内部液 2 4 および試料液 2 6 は、それぞれ水素イオン感受性電極 2 3 および参照電極 2 7 に接しかつ H^+ 難透過性膜 2 1 に接し得る。 H^+ - ピロホスファターゼの方向性については、第 1 の実施形態と同様である。貫通孔への H^+ 難
15 透過性膜 2 1 の固定方法は、例えば、Langmuir-Blodgett 法を応用した公知の方法によって行うことが可能である（吉岡書店、岡田泰伸編「新パッチクランプ実験技術法」p. 2 1 4 参照）。また、絶縁基板 2 2 上への貫通孔およびウェルの形成および絶縁基板 2 2 上への電極の形成方法は、例えばシリコン基板のエッチング等により行
20 うことが可能である（特開 2 0 0 4 - 1 2 2 1 5 号公報参照）。

試料液 2 6 中のピロリン酸の検出方法及びその原理は構成例 1 と同様であるので、説明を省略する。

（第 6 の実施形態）

第 6 の実施形態は、本発明に係るピロリン酸センサを用いて特定配列
25 を持つ DNA を検出する方法である。

本実施形態においては、まず、目的とする DNA の配列に相補的な配列を持つ DNA プローブ、DNA ポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド

を含む反応系に試料が供せられる。ここで「反応系」とは、以下に説明するような一連の核酸伸長反応およびこのような反応が実施される場をいう。「反応系」には、一連の反応が実施されるのに必要な成分が存在する。「反応系」は、通常、上記成分が適切な溶媒（例えば、T r i s

5 -H C l 緩衝液、核酸伸長反応または核酸増幅反応で通常使用され得るいずれもの緩衝液（市販による入手可能なキット中の緩衝液を含む））中に溶解された溶液の形態で提供され得る。DNAポリメラーゼは、市販により入手可能な、または当業者により調製可能な、任意のDNAポリメラーゼであり得る。好ましくは、T a q ポリメラーゼが使用され得

10 るが、これに限定されない。デオキシヌクレオチドは、各デオキシヌクレオチド三リン酸（d N T Pとも称される：デオキシシトシン三リン酸、デオキシグアニン三リン酸、デオキシアデニン三リン酸、およびデオキシチミジン三リン酸を含む）であり得、通常、DNA合成の直接の前駆物質として使用され得る物質である。これにより、DNAプローブを伸

15 長させ、ここでピロリン酸がこのDNAプローブの伸長反応に伴って生成される。この反応について、化学反応式1を用いて説明する。

このDNAプローブは目的のDNAとハイブリダイズすると、反応系中に存在するDNAポリメラーゼによって、反応系中の1つのデオキシヌクレオチド（化学反応式1中、d N T P）を取り込んで伸長され、ピ

20 ロリン酸が1つ生成される。

[化学反応式1]



25 化学反応式1中、添え字のn+1は、nベースのDNAプローブがn+1ベースに伸長したことを示す。このようにして生成されたピロリン酸を、上述の各実施形態のピロリン酸検出センサを用いて検出すること

により、試料液中の特定配列を持つDNAを検出することが可能である。

具体的には、上述のいずれかのピロリン酸検出センサの試料液受容部
33にピロリン酸を含む前記試料液を満たす工程(c)、ピロリン酸検
出センサの測定手段により固定層の水素イオン濃度の変化を電気化学的
5に測定する工程(d)、工程(d)の測定結果に基づいてDNAの伸長
反応を検出する工程(e)、および工程(e)の検出結果に基づいて前
記DNAを検出する工程(f)を経て、特定配列を持つDNAを検出す
ることができる。

本実施の形態で使用されるDNAプローブは、検出を目的とされるD
10NAの配列に対して相補的な配列を有するように設計される。このDN
Aプローブは、検出を目的とされるDNAの配列とハイブリダイズした
場合に、当該DNAプローブの伸長のためのプライマーとして働く。し
たがって、DNAプローブの長さは、伸長反応のためのプライマーとし
て働くのに十分な長さである。例えば、少なくとも10塩基、少なくと
15も12塩基、少なくとも15塩基、少なくとも20塩基、少なくとも3
0塩基の長さであり得る。ハイブリダイゼーションおよびプライマー伸
長を十分に行い得、かつその調製の容易さを考慮すると、20～25塩
基の長さが好ましい。本発明の方法で使用されるDNAプローブは、検
出を目的とされるDNAに特異的にハイブリダイズし、かつ当該DNA
20プローブの伸長のためのプライマーとして働く限り、いずれの長さでも
あり得る。

DNAプローブは、試料液中の目的のDNAと特異的にハイブリダイ
ズし、かつプライマーとして働くため、検出しようとする配列が既知で
ある場合、この配列に対して完全に相補的である、すなわち、配列中の
25塩基に対して正確に対応する(A-TまたはC-Gペア)配列を有する
ように設計され得る。試料液中に目的の特定配列を有するDNAが存在
しない場合、当然のことながらDNAプローブとのハイブリダイズは起

こらない。したがって、本反応系を使用することにより、検出しようとする配列が既知または未知であるに関わらず、このDNAプローブに完全に相補的である配列の存在を検出し得る。

ハイブリダイゼーションおよび伸長反応は、DNAのハイブリダイゼーション、ならびにDNAポリメラーゼの作用によるプライマーおよびデオキシヌクレオチドによるDNAの伸長反応が行われる任意の条件下で実施され得る。DNAプローブと目的DNAとのハイブリダイゼーションは、例えば、Sambrookら(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版、第1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratoryなどの実験書に記載される方法によって行なわれ、本方法は当業者に公知である。

反応系中に含み得るDNAプローブ、ポリメラーゼ、デオキシヌクレオチドの量は、当業者によって適宜決定され得る。

また、化学反応式1に示すように、デオキシヌクレオチドが1つ伸長する度にピロリン酸が1つ生成されるので、目的の特定配列を持つDNAおよびDNAプローブの両方の長さ(ベース)が既知であれば、目的の特定配列を持つDNAを定量的に検出することが可能である。

さらに、化学反応式1の反応をPCR等の核酸増幅反応と置き換えることにより、試料中の目的の特定配列を持つDNAの量を飛躍的に増加させることができる。PCR増幅の方法は、当該分野で周知である(*PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, HA Erlich編、Freeman Press、New York、NY(1992); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis、Gelfand、Snisky、およびWhite編、Academ

ic Press, San Diego, CA (1990); Matt
i laら (1991) Nucleic Acids Res. 19:
4967; Eckert, K. A. および Kunkel, T. A. (1
991) PCR Methods and Applications
5 1: 17; PCR, McPherson, Quirk, および T
aylor, IRL Press, Oxford)。PCR等の核酸増
幅反応を用いることにより、極微量のDNAの検出も可能である。

(第7の実施形態)

本発明の第7の実施形態は、本発明に係るピロリン酸検出センサを用
10 いて測定系のDNAの塩基種を判別する方法、より具体的にはSNPを
高速にタイピングする方法である。

第7の実施形態について図11および図12を用いて説明する。図1
1は、検出を目的とするDNAとDNAプローブとにおいてSNP部位
が一致した場合の反応系を示し、図12は、検出を目的とするDNAと
15 DNAプローブとにおいてSNP部位が一致しない場合の反応系を示す。
図11および図12中、1はDNAプローブ、2は目的の特定配列を持
つDNA、3aは一致したSNP部位、3bは一致しないSNP部位、
4はDNAポリメラーゼ、そして5はdNTPを表す。

本実施形態においては、まず、目的とするDNAの配列に相補的な配
20 列を持ち、かつ3'末端がSNP部位であるDNAプローブ1、DNA
ポリメラーゼ4、デオキシヌクレオチド5を含む反応系に試料が供せら
れる。これにより、DNAプローブ1が伸長され、ここでピロリン酸が、
このDNAプローブ1の伸長反応に伴って生成される。

本実施形態で使用されるDNAプローブ1は、目的の配列に相補的で
25 あり、かつ3'末端がSNP部位であるように設計され得る。本実施形
態において、DNAプローブ1は、3'末端がSNP部位であることを
除いては、上述の第6の実施形態と同様に設計され得る。本実施形態に

において使用されるDNAポリメラーゼ4およびデオキシヌクレオチド5は、上述の第6の実施形態と同様であり得る。本実施の形態におけるハイブリダイゼーションおよび伸長の条件もまた、上述の第6の実施形態と同様であり得る。なお、本実施の形態におけるDNAプローブは、SNP部位における塩基種のタイピングが可能であればどのようなものでもよく、上記により設計されたプローブに限られるものではない。

試料液中の目的のDNA2およびDNAプローブ1の塩基配列が、SNP部位も含めて完全に相補する場合、当該DNAプローブ1は目的のDNA2にハイブリダイズし、かつ当該プローブ1のさらなる伸長のためのプライマーとして働く。この場合、図11に示されるように、反応系中に存在するDNAポリメラーゼ4によって、DNAプローブ1にデオキシヌクレオチド5が1つ伸長されて、ピロリン酸が1つ生成される。一方、試料液中の目的のDNA2およびDNAプローブ1の塩基配列が、SNP部位において相補的でない場合（たとえ他の部分において相補的であったとしても）、DNAプローブ1は、目的のDNA2とハイブリダイズは行い得るが、DNAプローブ1の3'末端がミスマッチとなるため、当該プローブ1の伸長のためのプライマーとして働かない。この場合、図12に示されるように、反応系中にDNAポリメラーゼ4および必要なデオキシヌクレオチド5が存在しても、化学反応式1の反応は起こらず、ピロリン酸は生成されない。

よって、DNAの伸長反応後の試料液中のピロリン酸を、上述の各実施形態のピロリン酸検出センサを用いて検出することにより、試料液中の目的の特定配列を持つDNA2およびDNAプローブ1は、SNP部位も含め完全に一致していると判別できる。SNP部位における多くとも4種類のプローブ1を用いれば、試料中の特定配列を持つDNA2のSNPを4種類の塩基についてタイピングすることが可能である。

なお、SNP部位における塩基の種類が既知の場合、そのタイピング

に必ずしも4種類のプローブが必要でないことは言うまでもない。

DNAの伸長反応後の試料液中のピロリン酸を、上述の各実施形態のピロリン酸検出センサを用いて検出することによりSNPをタイピングする方法は、より具体的には、上述のいずれかのピロリン酸検出センサの試料液受容部33にピロリン酸を含む前記試料液を満たす工程(c)、ピロリン酸検出センサの測定手段により固定層の水素イオン濃度の変化を電気化学的に測定する工程(d)、工程(d)の測定結果に基づいてDNAの前記伸長反応を検出する工程(e)、および工程(e)の検出結果に基づいてDNAの塩基配列中のSNP部位の塩基種を判別する工程(f)を有する。

本発明で使用される「試料液」とは、ピロリン酸を含み得るいずれの試料液をもいう。第6及び第7の実施形態においては、伸長反応によりピロリン酸が生成されるDNAを含み得る試料液である。特にDNAの検出に関する方法(第6又は第7の実施形態)においては、「試料液」は、目的とするDNAを含み得る任意の被分析物に由来し得る。このような被分析物は、目的とするDNAが疾患と関連し得る場合、疾患によって罹患された細胞、組織、器官、または血液であり得る。もちろん、本発明の方法は、臨床用途に限定されることなく、あらゆる分野において使用され得、従って、このような被分析物は、目的とするDNAが発現しているかまたはその存在が確認されている細胞、組織、器官、または血液であり得る。DNAは、このような被分析物から、フェノール抽出法およびアルコール沈殿のような常法を用いて抽出され得る。DNAの純度は反応の効率に影響を与え得、DNAの精製の手順もまた当業者に公知である。

以上説明したように、本発明によれば、ピロリン酸の高感度、高速、かつ定量的な測定が可能となるピロリン酸検出センサならびにこれを用いた拡散の検出方法および塩基種判別方法を提供する。

また、本発明によれば、DNAの伸長反応に伴って生成されるピロリン酸を測定することによって、試料中の目的DNAを標識することなく、目的の核酸の有無を定量的に測定することが出来る。さらには、目的のSNPのタイピングを、高感度かつ高速に測定することが出来る。

5 (実施例1)

本実施例は、第4の実施形態に係るピロリン酸検出センサを作製するものである。

まず、Shizuo Yoshida等の方法(Masayoshi Maeshima and Shizuo Yoshida, (1989) J. Biol. Chem. 264 (33), 20068-20073)に
10 準じて、ヤエナリ由来の液胞膜13からなる膜小胞をTris/Mesバッファー(濃度5mM、pH7.0)、sorbitol(濃度0.25M)、DTT(濃度2mM)からなる溶液中に溶かし、H⁺-ピロホスファターゼを含む液胞膜13からなる膜小胞の懸濁液とした。

15 一方、金電極(分極性電極81)を1mM n-オクタンチオール/エタノール溶液中に浸漬し、室温で4時間放置して、金電極表面にオクタンチオールのSAM膜(固定層83)を形成した。次に、オクタンチオール修飾電極を10mMチオニン水溶液中に浸漬し、室温で1時間静置して、SAM膜間にチオニン(メディエータ82)を固定化した。

20 こうして作製したチオニン/オクタンチオール修飾電極に、H⁺-ピロホスファターゼを含む膜小胞の懸濁液を滴下することによって、H⁺-ピロホスファターゼを固定層83表面に固定し、H⁺-ピロホスファターゼ電極を構成した。ピロリン酸ナトリウムの各終濃度がそれぞれ20 μM、40 μM、60 μM、80 μMおよび100 μMとなるようにピロ
25 リン酸ナトリウム溶液をH⁺-ピロホスファターゼに接触させ、H⁺-ピロホスファターゼによるピロリン酸の加水分解反応を開始した。

サンプル液中のピロリン酸ナトリウムの濃度と、参照電極27として

銀／塩化銀電極を用い、200 mVの電位をかけたときの金電極の示した電流値は、ほぼ直線関係であるという結果が得られた。このことから、本方法によりピロリン酸の量を測定できることがわかった。

(実施例2)

5 本実施例は、第1の実施形態にかかるピロリン酸検出センサを作製するものである。

まず、Masasuke Yoshida等の方法(Masa H. Sato, Masahiko Kasahara, Noriyuki Ishii, Haruo Homareda, Hideo Matsui and Masasuke Yoshida. (1994) J. Biol. Chem. 269 (9), 6725-6728)に準じ、カボチャの種から液胞膜H⁺-ピロホスファターゼの精製を行なった。

一方、0.1 gポリビニルブチラル樹脂と1 gヘキサメチレンジアミンをジクロロメタンに溶解し、室温で30分間攪拌した溶液を、ISFETのゲート電極(水素イオン感受性電極23)に滴下した後、5%グルタルアルデヒドに浸漬し、室温で24時間放置した。このようにしてISFET電極上に固定層51を形成した。そして、固定層51が形成されたISFET電極(修飾ISFET電極)を、5 mg/mlのH⁺-ピロホスファターゼ溶液に浸漬し、4℃で24時間静置し、H⁺-ピロホスファターゼをISFETのゲート電極に固定した。このH⁺-ピロホスファターゼ固定ISFET電極に対してピロリン酸ナトリウムの各終濃度がそれぞれ20 μM、40 μM、60 μM、80 μMおよび100 μMとなるようにピロリン酸ナトリウム溶液を添加し、ピロリン酸のH⁺-ピロホスファターゼによる加水分解反応を開始した。

25 サンプル液中のピロリン酸ナトリウムの濃度と、参照電極27として銀／塩化銀電極を用い、H⁺-ピロホスファターゼ固定ISFET電極のソースドレイン間に4.0 Vの電圧をかけ、ソースドレイン間の電

流値を $400 \mu\text{A}$ に保ったときのゲート電圧値は、ほぼ直線関係であるという結果が得られた。このことから、本方法によりピロリン酸の量を測定できることがわかった。

(実施例 3)

- 5 本実施例は、第 5 の実施形態のピロリン酸検出センサを作製するものである。

まず、上記実施例 2 と同様にカボチャの種由来の液胞膜 H^+ -ピロホスファターゼを精製した。

- 次に、上述した液胞膜 H^+ -ピロホスファターゼ 50 mg/ml と、 0.1 M のピロールと、 1 M の塩化カリウムとを混合し、電解重合用混合液を得た。この電解重合用混合液に、分極性電極 81 である白金電極と、参照電極 27 として銀/塩化銀電極を浸漬し、白金電極に $+1 \text{ V}$ の定電圧を 6 分間印加し、電解重合により H^+ -ピロホスファターゼ固定化ポリピロール膜修飾電極を得た。このようにして得られた H^+ -ピロホスファターゼ固定化ポリピロール膜修飾電極に対してピロリン酸ナトリウムの各終濃度がそれぞれ $20 \mu\text{M}$ 、 $40 \mu\text{M}$ 、 $60 \mu\text{M}$ 、 $80 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ となるようにピロリン酸ナトリウム溶液を添加し、ピロリン酸の H^+ -ピロホスファターゼによる加水分解反応を開始した。
- 10
- 15

- ピロリン酸ナトリウムの濃度と、参照電極 27 として銀/塩化銀電極を用い、 300 mV の電位をかけたときの H^+ -ピロホスファターゼ固定化ポリピロール膜修飾電極の示した電流は、ほぼ直線関係であるという結果が得られた。このことから、本方法によってピロリン酸の量を測定できることがわかった。
- 20

(実施例 4)

- 25 本実施例では、試料中における $\lambda \text{ DNA}$ ($\lambda \text{ DNA}$ の全塩基配列は、GenBank データベースの Accession No. V00636、J02459、M17233、X00906 を参照) の検出を行な

った。

まず、 λ DNA（宝酒造（株）製）が $10 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の濃度で蒸留水中に溶解されている試料液 26A、および蒸留水のみからなる試料液 26B を用意した。また、図 13A に示すように、 λ DNA の特定の塩基
5 配列に完全にハイブリダイズし得る 2 種類のプライマー C（配列番号：1）およびプライマー D（配列番号：2）をそれぞれ蒸留水に溶かしたプライマー溶液 E および F（いずれも $20 \mu\text{M}$ ）を用意した。

上記試料液 26A および 26B それぞれに、TAKARA La Taq（ $5 \text{ U} / \mu\text{L}$ 、宝酒造（株）製）、TAKARA La Taq の
10 専用バッファーである $2 \times \text{GC buffer I}$ （宝酒造（株）製）、dNTP mixture（各濃度 2.5 mM 、宝酒造（株）製）、ならびにプライマー溶液 E および F を添加して、図 13B に示す組成の PCR 反応液 G および H を調製した。

次に、PCR 反応液 G および H のそれぞれについて、図 13C に示す
15 反応温度条件で PCR 反応を行なった。

PCR 反応終了後、PCR 反応液 G および H のそれぞれを、上記実施
例 1 に記載の H^+ -ピロホスファターゼ電極を用いて、実施例 1 と同様に
参照電極として銀/塩化銀電極を用い、 200 mV の電位を印加して電
流を測定したところ、PCR 反応液 G の方が、PCR 反応液 H よりも明
20 らかに電流値が大きかった。つまり、PCR 反応液 G では、プライマー
伸長反応が進行したことがわかる。従って、本方法により標的核酸の検
出ができることがわかった。

（実施例 5）

本実施例では、 λ DNA の塩基配列内におけるある塩基を人為的に他
25 の塩基に置換した変異型 λ DNA を作製し、通常の λ DNA と変異 λ DNA とを判別できるか否かについて検討した。

まず、 λ DNA（宝酒造（株）製）（配列番号：3）を用いて変異型

λ DNA（配列番号：4）を作製した。変異型 λ DNA は、 λ DNA（以下、通常の λ DNA のことを野性型 λ DNA と記す）の二本鎖 DNA 配列内に存在する GC 塩基対（図中の領域 R₁）を当業者に周知の方法で人為的に AT 塩基対（図中の領域 R₂）に置換した。

- 5 次に、野性型 λ DNA および変異型 λ DNA のそれぞれを最終濃度 10 ng / μ L となるように蒸留水に溶解したものをそれぞれ野性型 λ DNA 液および変異型 λ DNA 液とした。

- 次に、上記の塩基の違いを判別するために、図 14 A に示すタイピングプライマー（配列番号：5）を用意した。続いて、タイピングプライマーを最終濃度 20 μ M となるように蒸留水に溶解したタイピングプライマー溶液を調製した。
- 10

- なお、図 14 A に示すタイピングプライマーは、野性型 λ DNA の下の段に記した一本鎖 DNA に完全にハイブリダイズする。しかし、このタイピングプライマーの 3' 末端の G は、変異 λ DNA の下の段に記した一本鎖 DNA にハイブリダイズできない。従って、このタイピングプライマーを用いてプライマー伸長反応を行なうと、野性型 λ DNA の場合は良好に反応が進行するが、変異 λ DNA の場合は反応があまり進行しない。
- 15

また、上記実施例 4 で用いたプライマー溶液 F も用意した。

- 20 次に、野性型 λ DNA 液および変異型 λ DNA 液のそれぞれについて、T a K a R a T a q（5 U / μ L、宝酒造（株）製）、および T a K a R a T a q 専用の 10 \times P C R b u f f e r（宝酒造（株）製）、および d N T P m i x t u r e（各濃度 2.5 mM、宝酒造（株）製）、およびタイピングプライマー溶液およびプライマー溶液 F を用いて、図
- 25 14 B に示す組成の P C R 反応液 I および J を調製した。

そして、P C R 反応液 I および J において、それぞれ図 14 C に示す反応温度条件で P C R 反応を行なった。

PCR反応終了後、各PCR反応液をH⁺-ピロホスファターゼを固定した修飾ISFET電極に導入した。修飾ISFET電極は、上記実施例2で用いたものと同様である。

この修飾ISFET電極を用いて、実施例2と同様に参照電極として銀/塩化銀電極を用い、H⁺-ピロホスファターゼ固定ISFET電極のソースドレイン間に4.0Vの電圧をかけ、ソースドレイン間の電流値を400 μAに保ったときのゲート電圧を測定したところ、PCR反応液Iの方が、PCR反応液Jよりも明らかに電圧値が大きかった。つまり、PCR反応液Iでは、プライマー伸長反応が進行したことがわかる。これは、反応液Jでは伸長反応が起きなかったが、変異型λDNAを含む伸長反応液IではdATPによる1塩基伸長反応が起こり、その結果、生成されるピロリン酸が修飾ISFET電極上のH⁺-ピロホスファターゼと反応し、水素イオンが修飾ISFET電極側に輸送されたためと考えられる。

従って、本実施例によれば、DNAの特定の塩基配列中の1塩基対の違いを判別できることがわかった。すなわち、本実施例は、本発明の方法が、SNP部位の塩基種の判別、突然変異による1塩基対の変異など、特定の塩基配列を判別するために非常に有効であることを示すものである。

上記説明から、当業者にとっては、本発明の多くの改良や他の実施形態が明らかである。従って、上記説明は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実行する最良の態様を当業者に教示する目的で提供されたものである。本発明の精神を逸脱することなく、その構造及び/又は機能の詳細を実質的に変更できる。

25

〔産業上の利用の可能性〕

本発明に係るピロリン酸検出センサは、例えばSNP部位の塩基種の

判別に利用することができ、従ってSNPタイピングに基づいた薬の投与といったテーラーメイド医療に有用である。また、本発明に係るピロリン酸検出センサは、DNAの塩基配列中の突然変異の解析に有用であり、かかる解析結果を創薬や臨床に利用することができる。

- 5 さらに、本発明に係るピロリン酸検出センサは、特定の塩基配列を有する核酸の検出に利用することができ、核酸の検出は、遺伝病の診断、細菌およびウイルス等による食品の汚染検査、人体への感染検査に有用である。

10 [配列表のフリーテキスト]

配列番号1の<223>: プライマー

配列番号2の<223>: プライマー

配列番号3の<223>: 二本鎖DNA

配列番号4の<223>: 二本鎖DNA

- 15 配列番号5の<223>: プライマー

請 求 の 範 囲

1. 試料液中のピロリン酸を検出するピロリン酸検出センサであって、
前記試料液を受容する試料液受容部と、
5 H⁺-ピロホスファターゼを有するH⁺難透過性膜と、
前記H⁺難透過性膜を固定する固定層と、
前記固定層の水素イオン濃度変化に伴う電気化学的変化を測定する測定手段と、を備え、
前記H⁺-ピロホスファターゼは、前記試料液中のピロリン酸を加水
10 分解し、これに伴って固定層の水素イオン濃度に変化をもたらすように配されている、ピロリン酸検出センサ。
2. 前記固定層は、その上面又はその内部にH⁺難透過性膜を固定する、請求の範囲第1項に記載のピロリン酸検出センサ。
15
3. 前記H⁺難透過性膜は膜小胞であり、前記固定層は前記H⁺難透過性膜をその内部に固定する、請求の範囲第1項に記載のピロリン酸検出センサ。
- 20 4. 前記測定手段は、前記固定層に接する水素イオン感受性電極と、前記試料液を受容した状態で前記試料液に接するように配された参照電極とを有する、請求の範囲第1項に記載のピロリン酸検出センサ。
- 25 5. 前記測定手段は、前記水素イオン感受性電極と前記参照電極との電位差の変化を測定する、請求の範囲第4項に記載のピロリン酸検出センサ。

6. 前記固定層は高分子ゲルまたは自己組織化単分子膜からなる、請求の範囲第4項に記載のピロリン酸検出センサ。

7. 前記固定層は、水素イオン濃度の変化により酸化還元反応が生じる材料を含み、

前記測定手段は、前記固定層に接する分極性電極と、前記試料液を收容した状態で前記試料液に接するように配された参照電極とを有する、請求の範囲第1項に記載のピロリン酸検出センサ。

8. 前記測定手段は、前記分極性電極と前記参照電極との間の電流の変化を測定する、請求の範囲第7項に記載のピロリン酸検出センサ。

9. 前記固定層は、水素イオン濃度の変化により酸化還元反応が生じるメダイエータを含む高分子ゲルまたは自己組織化単分子膜からなり、その上面に前記H⁺難透過性膜を固定する、請求の範囲第7項に記載のピロリン酸検出センサ。

10. 前記固定層は、水素イオン濃度の変化により酸化還元反応が生じる電解重合材料からなる、請求の範囲第7項に記載のピロリン酸検出センサ。

11. 請求の範囲第1項に記載のピロリン酸検出センサを用いる、特定の塩基配列を有する核酸の検出方法であって、該方法は以下の工程を包含する；

試料と、前記核酸に相補的に結合する相補結合領域を含む塩基配列を有するプライマーと、ヌクレオチドとを含む試料液を調製する工程(a)、前記試料液を前記プライマーの伸長反応が生じる条件下におき、前記

伸長反応が生じた場合にピロリン酸を生成する工程（b）、

前記ピロリン酸検出センサの前記試料液受容部に前記試料液が受容された状態とする工程（c）、

5 前記ピロリン酸検出センサの前記測定手段により前記固定層の水素イオン濃度変化に伴う電気化学的変化を測定する工程（d）、

工程（d）の測定結果に基づいて前記伸長反応を検出する工程（e）、
および

工程（e）の検出結果に基づいて前記核酸を検出する工程（f）。

10 12. 請求の範囲第1項に記載のピロリン酸検出センサを用いる、核酸の塩基配列中の塩基種判別方法であって、該方法は以下の工程を包含する；

核酸と、前記核酸に相補的に結合する相補結合領域を含む塩基配列を有するプライマーと、ヌクレオチドとを含む試料液を調製する工程（a）、

15 前記試料液を前記プライマーの伸長反応が生じる条件下におき、前記伸長反応が生じた場合にピロリン酸を生成する工程（b）、

前記ピロリン酸検出センサの前記試料液受容部に前記試料液が受容された状態とする工程（c）、

20 前記ピロリン酸検出センサの前記測定手段により前記固定層の水素イオン濃度変化に伴う電気化学的変化を測定する工程（d）、

工程（d）の測定結果に基づいて前記伸長反応を検出する工程（e）、
および

工程（e）の検出結果に基づいて前記核酸の塩基配列中の塩基種を判別する工程（f）。

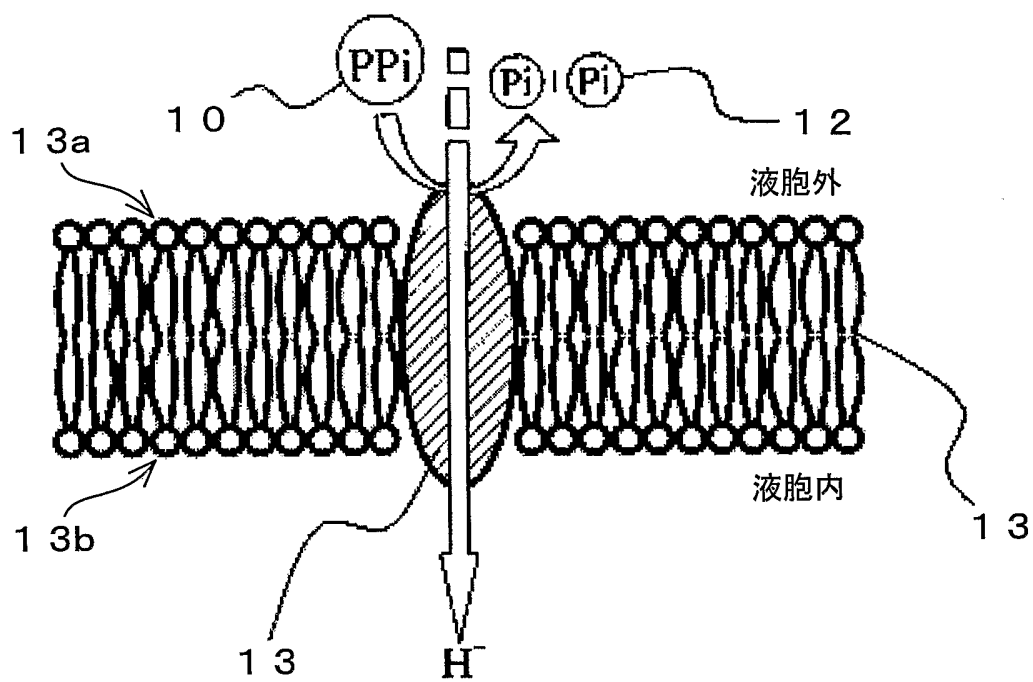


图 1

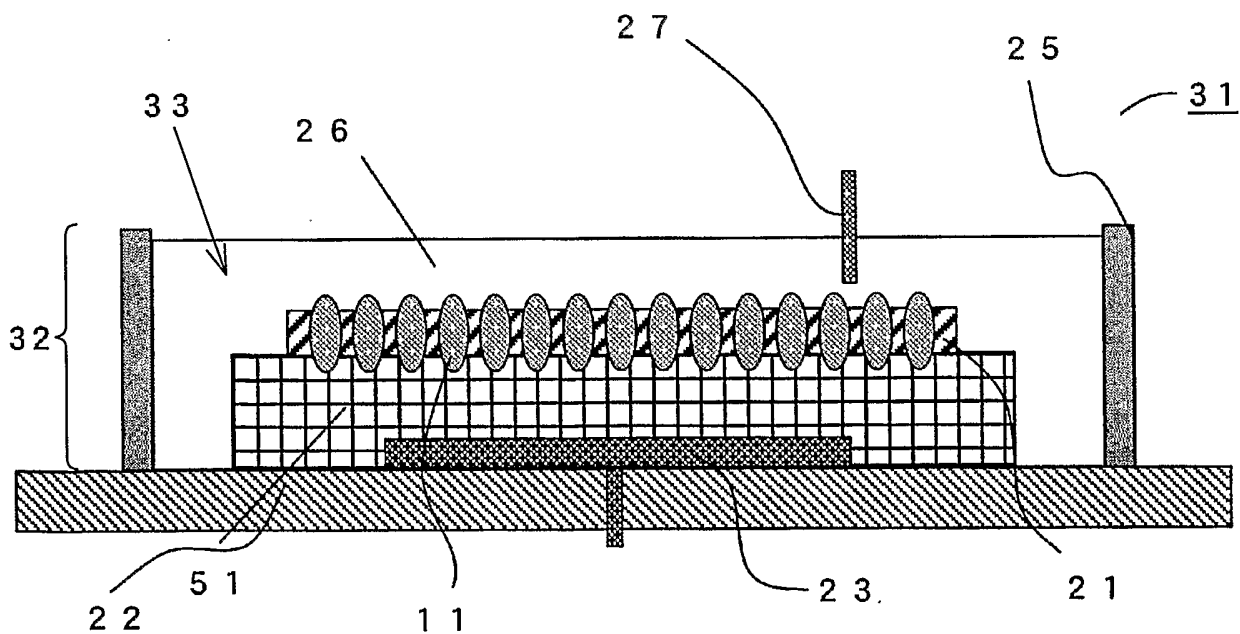


图 2

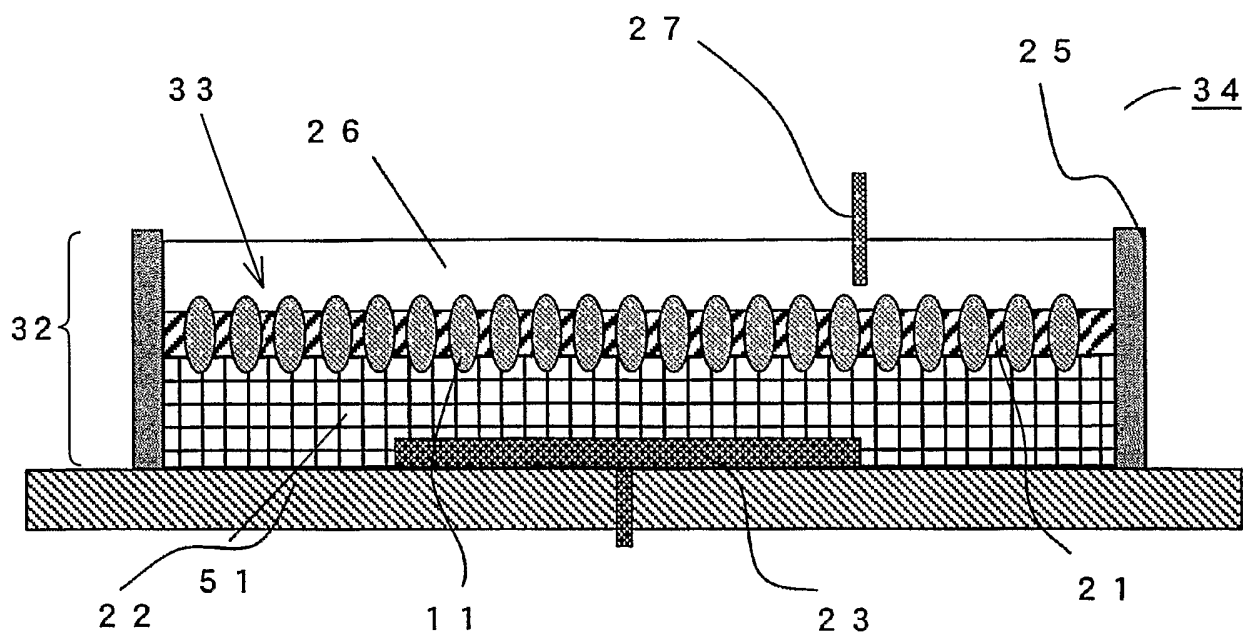


図 3

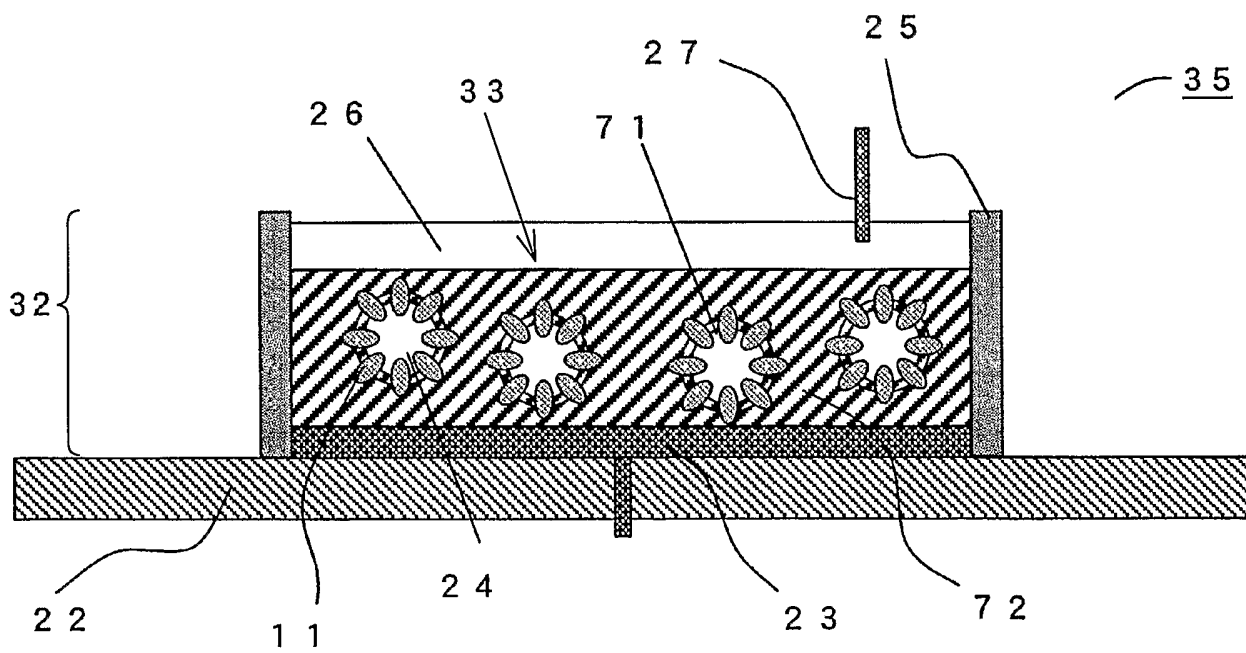


図 4

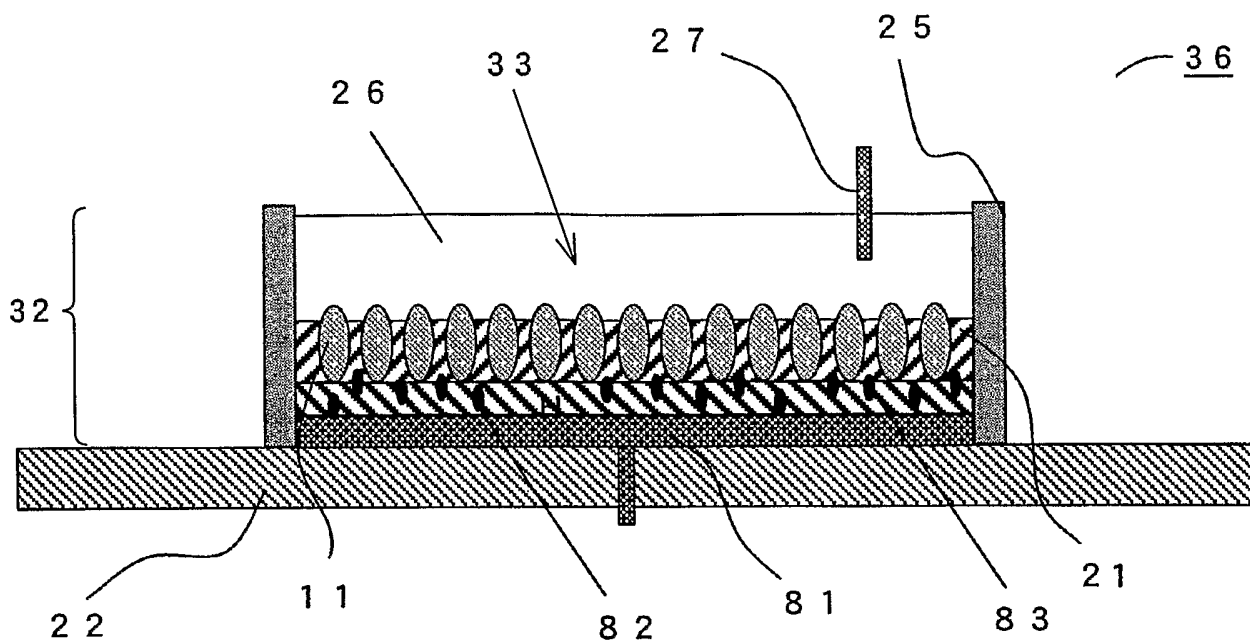


図 5

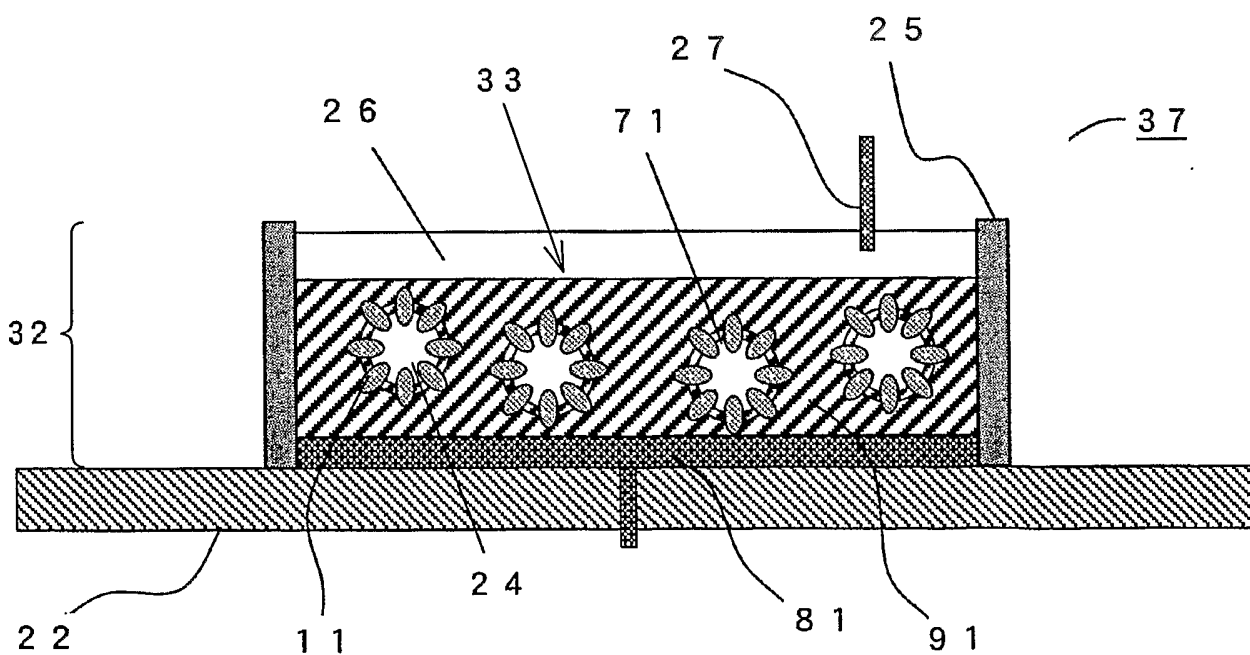


図 6

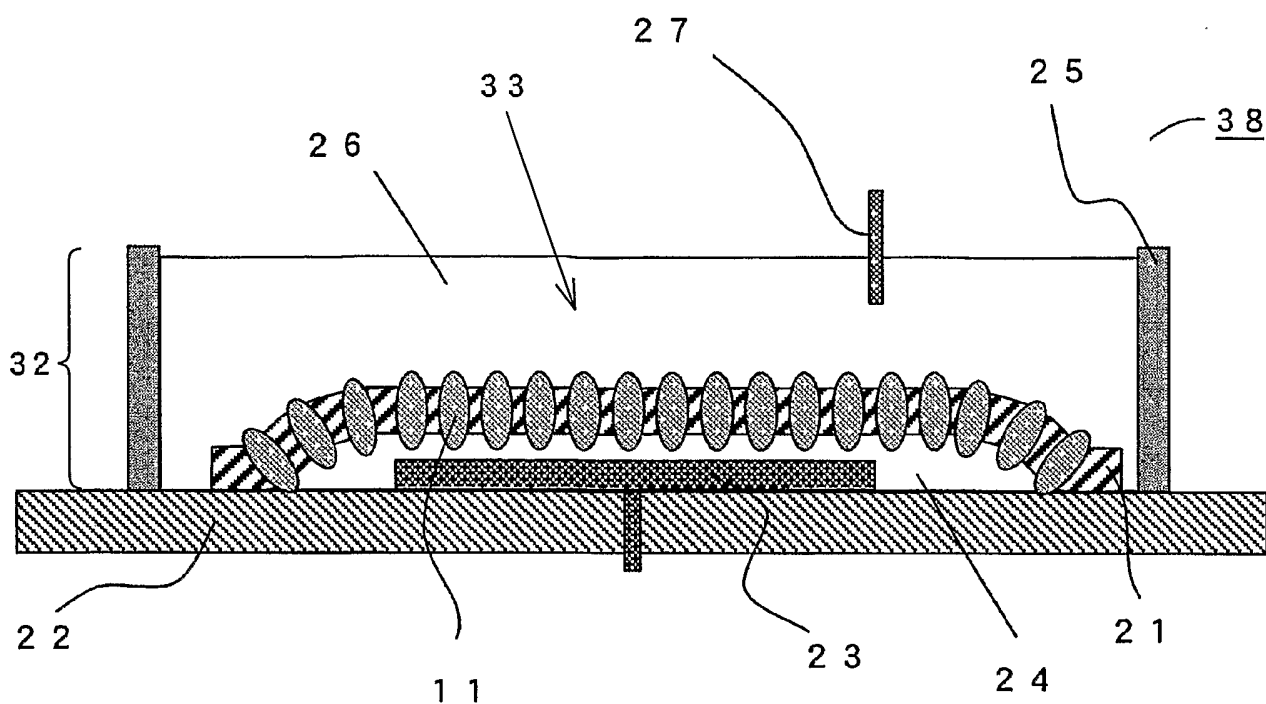


図 7

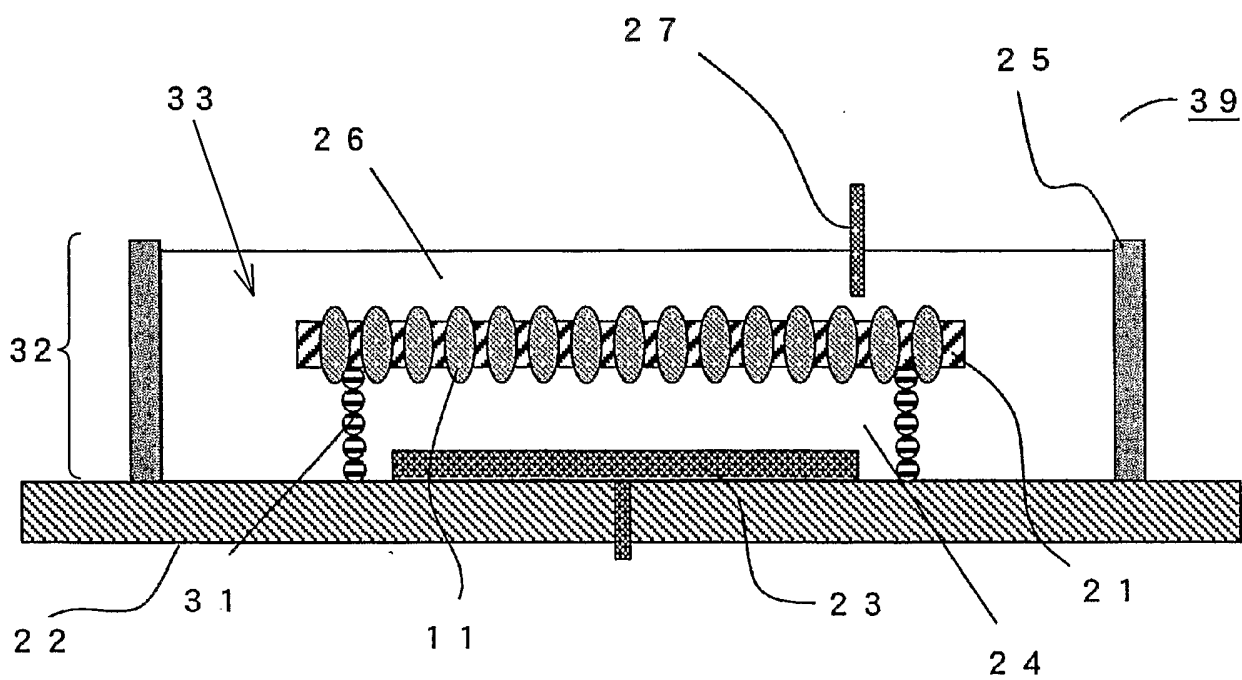


図 8

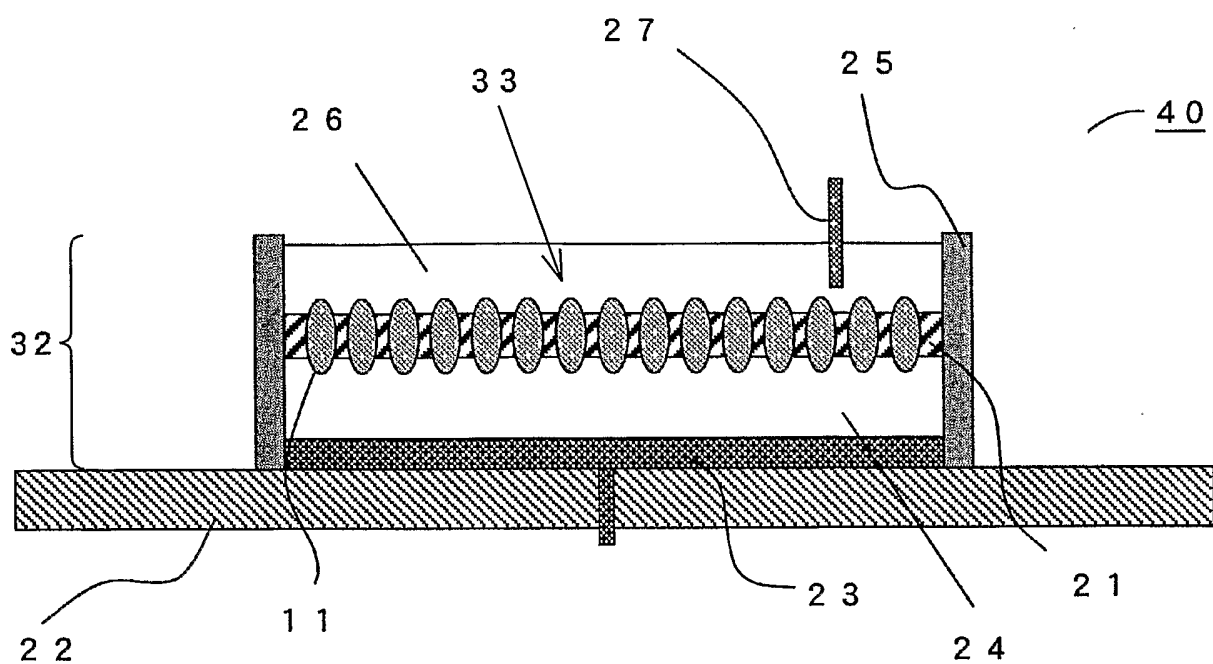


図 9

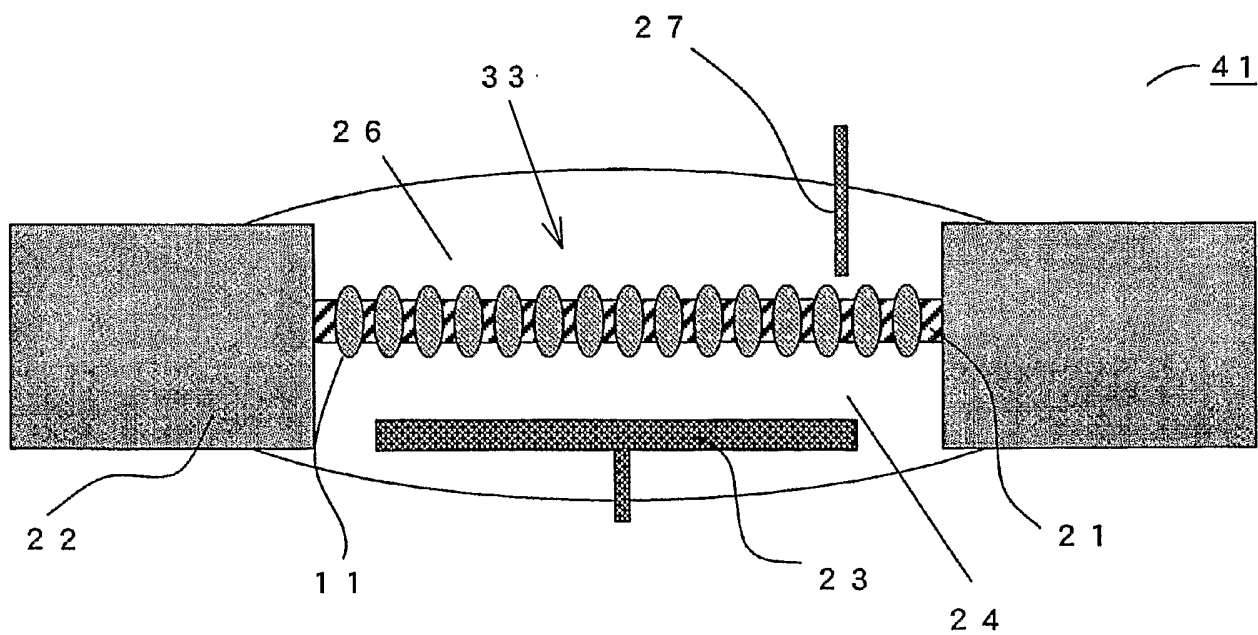


図 10

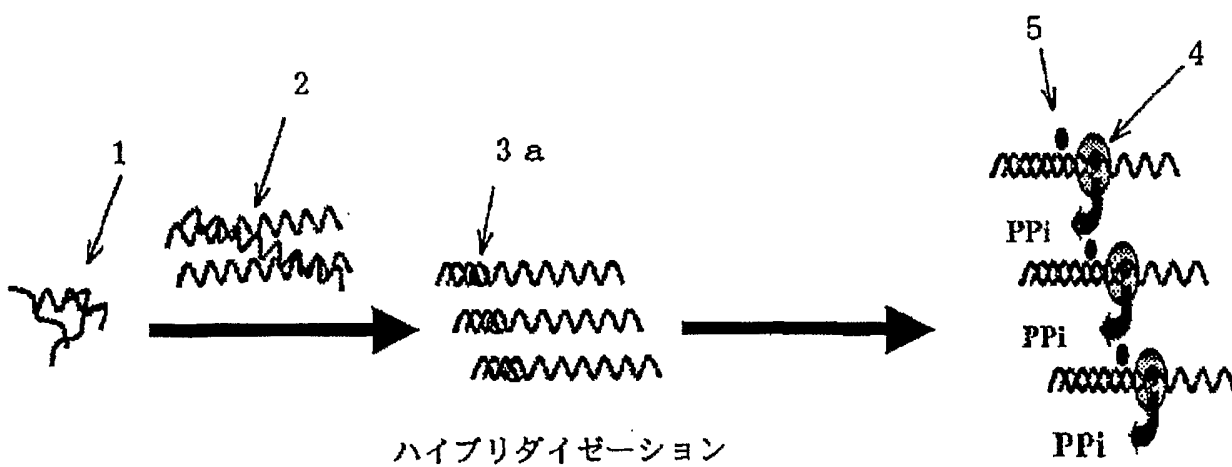


図 11

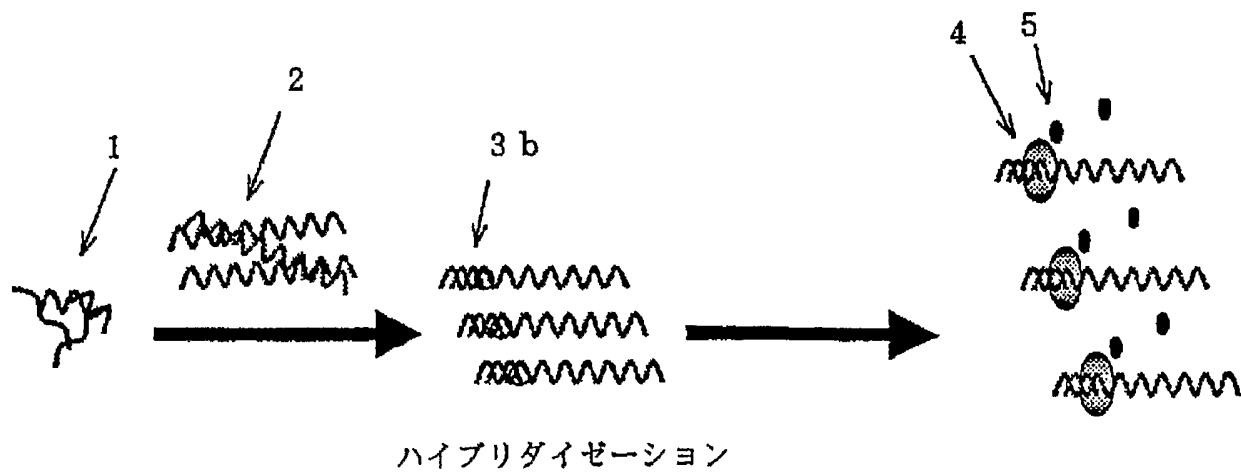


図 12

7/9

プライマーC

5' GATGAGTTTCGTGTCCGTACA AACTGG 3'
 (配列番号:1)

プライマーD

5' GAATCACGGTATCCGGCTGCGCTGA 3'
 (配列番号:2)

図13A

| | PCR反応液G | PCR反応液H |
|---------------|--------------------|--------------------|
| Takara La Taq | 0.2 μ l | 0.2 μ l |
| 2XGC buffer I | 10 μ l | 10 μ l |
| dNTP mixture | 3.2 μ l | 3.2 μ l |
| 試料液26Aあるいは26B | 4 μ l (試料液26A) | 4 μ l (試料液26B) |
| プライマー溶液E | 0.9 μ l | 0.9 μ l |
| プライマー溶液F | 0.9 μ l | 0.9 μ l |
| 蒸留水 | 0.8 μ l | 0.8 μ l |

図13B

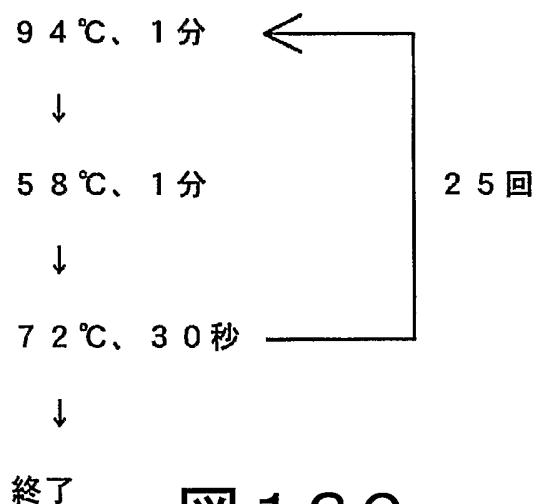


図13C

8/9

・野生型λ DNA

5' GATGAGTTCGTGTCCGTACAAC**TG** 3' (配列番号:3)
 5' CTA**CT**CAAGCACAGGCATGTTGAC 3'

R 1

・変異型λ DNA

5' GATGAGTTCGTGTCCGTACAAC**T**A 3' (配列番号:4)
 5' CTA**CT**CAAGCACAGGCATGTTGAT 3'

R 2

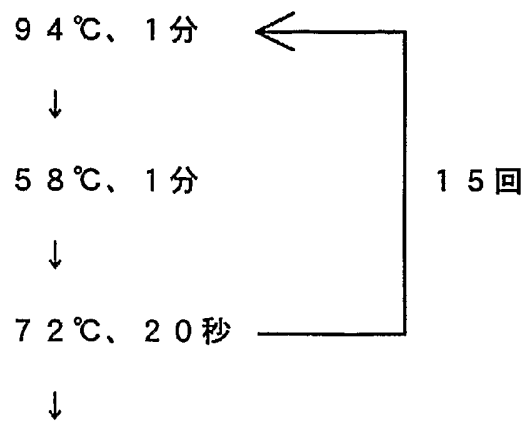
・タイピングプライマー

5' GATGAGTTCGTGTCCGTACAAC**TG** 3' (配列番号:5)

図 14A

| | PCR反応液 I | PCR反応液 J |
|----------------------------|---------------------|---------------------|
| Takara Taq | 0.1 μl | 0.1 μl |
| 10×PCR buffer | 2 μl | 2 μl |
| dNTP mixture | 1.6 μl | 1.6 μl |
| 野生型λ DNA液あるいは 変異型λ DNA液 | 2 μl (野生型λ DNA液) | 2 μl (変異型λ DNA液) |
| タイピングプライマー溶液 | 0.9 μl | 0.9 μl |
| プライマー溶液 F | 0.9 μl | 0.9 μl |
| 蒸留水 | 12.5 μl | 12.5 μl |

図 14B



終了 図 14C

参照符号一覧表

- 1 DNAプローブ
- 2 DNA
- 3 a 一致したSNP部位
- 3 b 一致しないSNP部位
- 4 DNAポリメラーゼ
- 5 dNTP
- 10 ピロリン酸
- 11 H⁺-ピロホスファターゼ
- 12 リン酸
- 13 液胞膜
- 21 H⁺難透過性膜
- 22 絶縁基板
- 23 水素イオン感受性電極
- 24 内部液
- 25 溶液保持部材
- 26 試料液
- 27 参照電極
- 31 直鎖状炭素化合物
- 32 溶液保持部
- 33 試料液受容部
- 51 固定層
- 71 膜小胞
- 72 固定層
- 81 分極性電極
- 82 メディエータ
- 83 固定層
- 91 電解重合膜

SEQUENCE LISTING

<110> Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.

<120> Sensor for detecting pyrophosphate, method of detecting nucleic acid and method of discriminating base type.

<130> 04P540W0

<150> JP2003-190121

<151> 2003-07-02

<160> 5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

gatgagttcg tgtccgtaca actgg

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

gaatcacggt atccggctgc gctga

25

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> λ phage

<220>

<223> double stranded DNA

<400> 3

gatgagttcg tgtccgtaca actg

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> mutation

<222> 24

<223> double stranded DNA

<400> 4

gatgagttcg tgtccgtaca acta

24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

gatgagttcg tgtccgtaca actg

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009787

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N27/414, G01N27/416, C12Q1/68, G01N33/483, C12Q1/42, C12M1/34, C12N15/00

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 G01N27/26-27/49, C12Q1/68, G01N33/483, C12Q1/42, C12M1/34, C12N15/00

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP 2003-174900 A (Miyagi-Ken), 24 June, 2003 (24.06.03), Full text; all drawings (Family: none) | 1-12 |
| A | JP 2002-369698 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 24 December, 2002 (24.12.02), Full text; all drawings & US 2004/18502 A | 1-12 |
| A | JP 2001-56337 A (Hitachi, Ltd.), 27 February, 2001 (27.02.01), Full text; all drawings (Family: none) | 1-12 |

 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
01 October, 2004 (01.10.04)Date of mailing of the international search report
19 October, 2004 (19.10.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009787

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP 2003-299 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 07 January, 2003 (07.01.03), Full text; all drawings (Family: none) | 1-12 |
| E,X | JP 2004-141158 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 20 May, 2004 (20.05.04), Full text; all drawings (Family: none) | 1-12 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ G01N27/414, G01N27/416, C12Q1/68, G01N33/483, C12Q1/42, C12M1/34, C12N15/00

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 G01N27/26-27/49, C12Q1/68, G01N33/483, C12Q1/42, C12M1/34, C12N15/00

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 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

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)
 J I C S T 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 |
|-----------------|---|------------------|
| A | JP 2003-174900 A(宮城県) 2003.06.24 全文、全図 (ファミリー無し) | 1-12 |
| A | JP 2002-369698 A(富士写真フィルム株式会社) 2002.12.24 全文、全図 & US 2004/18502 A | 1-12 |

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 01.10.2004 | 国際調査報告の発送日 19.10.2004 |
|--------------------------|--------------------------|

| | | | |
|---|---------------------------|-----|---------|
| 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) 黒田 浩一 | 2 J | 9 2 1 8 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3251 | | | |

| 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 | JP 2001-56337 A(株式会社日立製作所) 2001.02.27 全文、全図 (ファミリー無し) | 1-12 |
| A | JP 2003-299 A(富士写真フィルム株式会社) 2003.01.07 全文、全図 (ファミリー無し) | 1-12 |
| E, X | JP 2004-141158 A(松下電器産業株式会社) 2004.05.20 全文、全図 (ファミリー無し) | 1-12 |