

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-526249
(P2008-526249A)

(43) 公表日 平成20年7月24日(2008.7.24)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	A 4 B 0 2 9
C 12 M 1/00 (2006.01)	C 12 N 15/00	F 4 B 0 6 3
A 61 K 31/711 (2006.01)	C 12 M 1/00	A 4 C 0 8 4
A 61 K 45/00 (2006.01)	A 61 K 31/711	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 125 頁) 最終頁に続く

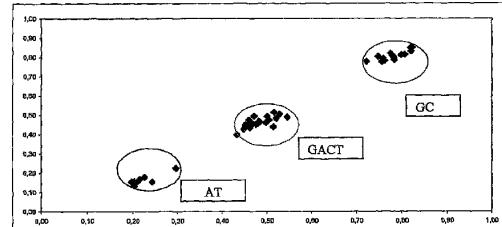
(21) 出願番号	特願2007-550872 (P2007-550872)	(71) 出願人	507237705 プロジェクト・バイオファーマ・エス・ア ー
(86) (22) 出願日	平成18年1月12日 (2006.1.12)		スペイン・ヴィスカヤ・E-48160・ デリオ・パルケ・テクノロジコ・デ・サム
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月11日 (2007.9.11)		ディオ・イバイサバル・ビデア-エディフ イチオ・801-A・2a・プランタ
(86) 國際出願番号	PCT/IB2006/000796	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(87) 國際公開番号	W02006/075254	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(87) 國際公開日	平成18年7月20日 (2006.7.20)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	P200500089	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(32) 優先日	平成17年1月13日 (2005.1.13)		
(33) 優先権主張国	スペイン(ES)		
(31) 優先権主張番号	P200502423		
(32) 優先日	平成17年10月5日 (2005.10.5)		
(33) 優先権主張国	スペイン(ES)		
(31) 優先権主張番号	60/758,192		
(32) 優先日	平成18年1月12日 (2006.1.12)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *in vitro* 遺伝子タイピングのための方法および製品

(57) 【要約】

個体の遺伝的変異を遺伝子タイピングするための *in vitro* 方法、およびその方法で用いる製品。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

個体の遺伝的変異を遺伝子タイピングするための *in vitro* 方法であって、

(a) 遺伝子タイピングする遺伝的変異を含む核酸(標的DNA)を含む試料を提供するステップと、

(b) 遺伝子タイピングする各遺伝的変異に対して少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプローブ対を提供するステップであって、

(i) 1対はプローブ1および2からなり、もう1対はプローブ3および4からなり、

(ii) 各対の1つのプローブは遺伝的変異Aにハイブリダイズすることができ、各対のもう1つのプローブは遺伝的変異Bにハイブリダイズすることができ、

(iii) 各プローブを複製物として提供し、

(iv) プローブ複製物を既知の一様分布に従って固体支持体上の位置に置くステップと、

(c) ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的DNAをプローブと接触させ、それによって核酸-プローブハイブリダイゼーション複合体を形成するステップであって、各複合体を検出可能に標識するステップと、

(d) 各プローブ複製物の位置で検出可能な標識の強度を測定し、それによって原強度値を得るステップと、

(e) 原強度値を任意選択で修正してバックグラウンドノイズを考慮し、それによって各複製物のクリーンな強度値を得るステップと、

(e)(d)または(e)からの強度データに適切なアルゴリズムを適用し、それによって各遺伝的変異について遺伝子型を決定するステップであって、アルゴリズムの適用は各プローブの各複製物の強度値から平均強度値を計算することを含み、アルゴリズムは遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABまたはBBのそれぞれを特徴づける3つの線形関数を使用するステップとを含む *in vitro* 方法。

【請求項 2】

前記遺伝的変異は一塩基多型(SNP)を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記遺伝的変異は炎症性腸疾患(IBD)、赤血球抗原または医薬有害反応と関連する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ(a)は、

- 試験する遺伝的変異を含む核酸領域を増幅すること、および任意選択で
- 増幅産物を断片化すること

をさらに含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

増幅を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して実行する、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

配列番号1～124、125～254および1317～1428に記載のものから選択される少なくとも1対のPCRプライマーの使用を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記増幅産物または断片化産物を検出可能に標識する、請求項4から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記核酸を、個体から得られた生体試料から抽出するステップをさらに含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料から抽出される核酸はDNAまたはRNAである、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

抽出されたRNAからcDNAを生成するステップをさらに含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記検出可能な標識は蛍光標識である、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記検出可能な標識の強度を、スキャナを使用して測定する、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記スキャナは蛍光共焦点スキャナである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記プローブは遺伝的変異に従って支持体上でグループ化されない、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項15】

前記支持体は長さが19~27のヌクレオチドの少なくとも1対のプローブを含む、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記支持体は、試験する遺伝的変異をプローブの中心位置に有する少なくとも1対のプローブを含む、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

ステップ(c)は、プローブとの核酸のハイブリダイゼーションの後に、固体支持体上で增幅またはライゲーション反応を実施することをさらに含む、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項18】

前記增幅反応はプライマー伸長反応またはオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA)反応を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

標識化をハイブリダイゼーションの前またはハイブリダイゼーション後増幅の間に実行する、請求項17または18に記載の方法。

【請求項20】

前記固体支持体はガラスである請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

各プローブを少なくとも6、8または10個の複製物として提供する、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項22】

前記固体支持体は少なくとも12個の遺伝的変異を遺伝子タイピングするためのプローブを含む、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記固体支持体は少なくとも100個の遺伝的変異を同定するためのプローブを含む、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記固体支持体は1つまたは複数の対照プローブをさらに含む、請求項1から23のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項25】

各プローブの平均強度値の計算は外部の強度値を削除することを含む、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記アルゴリズムは各遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型のそれぞれを特徴づける3つの線形関数(関数1、2および3)

[ここで、

関数1は遺伝子型AAを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

50

関数2は遺伝子型ABを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数3は遺伝子型BBを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

これらの線形関数は、変数比率1および2に附属する係数によって形成され、

比率1=プローブ1の平均強度値/プローブ1の平均強度値+プローブ2の平均強度値

および

比率2=プローブ3の平均強度値/プローブ3の平均強度値+プローブ4の平均強度値

であり、

プローブ1および3は遺伝的変異Aを検出し、プローブ2および4は遺伝的変異Bを検出する

10

]を使用する、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記3つの線形関数の係数を、遺伝子型AA、ABおよびBBのそれぞれを有する「n」個の対照個体の比率1および2を計算するステップと、識別分析において3つの遺伝子型のための適切な係数を得るステップとを含むトレーニング方法によって決定する、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

「n」は少なくとも3である、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

3つの遺伝子型に関する3つの関数の識別能力が100%である、請求項26から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

比率1および2を計算するステップと、その比率を線形関数1、2および3に代入するステップとを含み、最大の絶対値を有する関数が、試験する遺伝的変異に関して個体が示す遺伝子型を決定する、請求項26から29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

フィードバック最適化工程で、遺伝子タイピングする個体について計算した比率1および2を用いて、3つの線形関数の係数を再決定するステップをさらに含む、請求項26から30のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 32】

遺伝子タイピングする個体について決定された比率1および2は、3つの線形関数の係数を決定するために用いた比率1および2の範囲内にある、請求項27から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

- バックグラウンドノイズに関して共焦点蛍光スキャナを用いて測定した4n個の複製物(「n」は各プローブの複製物数)の平均蛍光強度は5よりも大きく、かつ/または
- 所与のプローブの複製物の強度値の間の変動係数は0.25未満である、

請求項26から32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

- 蛍光共焦点スキャナを用いて強度を測定すると、
- チップ上のすべてのプローブ複製物の原強度値の合計とバックグラウンドノイズの強度との比率は15を超える、かつ/または
- 所与のプローブの複製物の強度値の間の変動係数は0.25未満であり、かつ/または
- 陰性対照で得られた原シグナル強度値はバックグラウンドノイズの強度値より最大で3倍大きい、

請求項26から33のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 35】

IBDと関連するヒト遺伝的変異が、表1の変異およびその組合せによって形成される群から選択される、その変異の遺伝子タイピングのための、請求項1から34のいずれか一項に

50

記載の方法。

【請求項 3 6】

赤血球抗原と関連するヒト遺伝的変異が表2の変異およびその組合せによって形成される群から選択される、その変異の遺伝子タイピングのための、請求項1から34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

医薬有害反応と関連するヒト遺伝的変異が表3の変異およびその組合せによって形成される群から選択される、その変異の遺伝子タイピングのための請求項1から34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記固体支持体は配列番号631～960および1429～1652に記載のものから選択される配列を有するプローブを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記固体支持体は配列番号255～630に記載のものから選択される配列を有するプローブを含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記固体支持体は配列番号961～1316に記載のものから選択される配列を有するプローブを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 1】

請求項1から40のいずれか一項に記載の方法での使用に適している、固体支持体上に置かれた複数のプローブを含むDNAチップ。

【請求項 4 2】

DNAチップハイブリダイゼーション強度データから遺伝子型を得るための計算方法であって、遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABおよびBBのそれぞれを特徴づける3つの線形関数のそれぞれにおいて比率1および2を使用するステップ

[ここで、

関数1は遺伝子型AAを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数2は遺伝子型ABを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数3は遺伝子型BBを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

これらの線形関数は、変数比率1および2に附属する係数によって形成され、

比率1=プローブ1の平均強度値/プローブ1の平均強度値+プローブ2の平均強度値
および

比率2=プローブ3の平均強度値/プローブ3の平均強度値+プローブ4の平均強度値
であり、

プローブ1および3は遺伝的変異Aを検出し、プローブ2および4は遺伝的変異Bを検出し、
平均強度値は請求項1から40のいずれか一項に記載の方法によって入手可能である]
を含む、計算方法。

【請求項 4 3】

各プローブについて得られた平均強度値から比率1および2を計算するステップをさらに含む、請求項42に記載の計算方法。

【請求項 4 4】

各プローブの複製物について得られた強度値を照合し、各プローブの平均強度値を決定するステップとをさらに含む、請求項42または43に記載の計算方法。

【請求項 4 5】

プローブの複製物について得られた原強度値を修正してバックグラウンドノイズを考慮し、それによってその複製物のクリーンな強度値を得るステップをさらに含む、請求項42から44のいずれか一項に記載の計算方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 6】

前記3つの線形関数の係数を、遺伝子型AA、ABおよびBBのそれぞれを有する「n」個の対照個体の比率1および2を計算するステップと、識別分析において3つの遺伝子型のための適切な係数を得るステップとを含むトレーニング方法によって決定する、請求項42から45のいずれか一項に記載の計算方法。

【請求項 4 7】

「n」は少なくとも3である、請求項46に記載の計算方法。

【請求項 4 8】

3つの遺伝子型に関する3つの関数の識別能力が100%である、請求項42から47のいずれか一項に記載の計算方法。

10

【請求項 4 9】

フィードバック最適化工程で、遺伝子タイピングする個体について計算した比率1および2を用いて、3つの線形関数の係数を再決定するステップをさらに含む、請求項42から48のいずれか一項に記載の計算方法。

【請求項 5 0】

請求項1から40のいずれか一項に記載の方法での使用のための線形関数を導き出す方法であって、遺伝的変異に関して遺伝子型AAを有するn個の個体、遺伝子型ABを有するn個の個体および遺伝子型BBを有するn個の個体のそれぞれについて、

- (a) 遺伝的変異を含む核酸(標的DNA)を含む試料を提供するステップと、
- (b) 遺伝的変異に対して少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプローブ対(プローブ1+2およびプローブ3+4)を提供するステップであって、
 - (i) 1対はプローブ1および2からなり、もう1対はプローブ3および4からなり、
 - (ii) 各対の1つのプローブは遺伝的変異Aにハイブリダイズすることができ、各対のもう1つのプローブは遺伝的変異Bにハイブリダイズすることができ、
 - (iii) 各プローブを複製物として提供し、
 - (iv) プローブを、さらなる付着プローブを含む固体支持体上の位置に置き、それらのプローブを既知の一様分布に従って置く

ステップと、

- (c) ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で核酸試料をプローブと接触させ、それによって核酸-プローブハイブリダイゼーション複合体を形成するステップであって、各複合体を検出可能に標識するステップと、

(d) 各プローブ複製物の位置で検出可能な標識の強度を測定し、それによって原強度値を得るステップと、

(e) 原強度値を任意選択で修正してバックグラウンドノイズを考慮し、それによって各複製物のためのクリーンな強度値を得るステップと、

(f) (d)または(e)からの強度データに適切なアルゴリズムを適用するステップであって、アルゴリズムの適用は各プローブの各複製物の強度値から平均強度値を計算することを含み、アルゴリズムは遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABまたはBBのそれぞれを特徴づけることを目的とした3つの線形関数を使用するステップと、

(g) 識別分析において3つの遺伝子型群AA、ABおよびBBの間の相違を最大にする線形関数を導き出すステップ

とを含む方法。

【請求項 5 1】

前記プローブは遺伝的変異に従って支持体上でグループ化されない、請求項50に記載の方法。

【請求項 5 2】

各プローブの平均強度値の計算は外部の強度値を削除することを含む、請求項50または51に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記アルゴリズムは各遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型のそれぞれを特徴づける3つの

40

50

線形関数(関数1、2および3)

[ここで、

関数1は遺伝子型AAを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数2は遺伝子型ABを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数3は遺伝子型BBを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

これらの線形関数は、変数比率1および2に附属する係数によって形成され、

比率1=プローブ1の平均強度値/プローブ1の平均強度値+プローブ2の平均強度値

および

比率2=プローブ3の平均強度値/プローブ3の平均強度値+プローブ4の平均強度値
であり、

プローブ1および3は遺伝的変異Aを検出し、プローブ2および4は遺伝的変異Bを検出する

]

を使用する、請求項50から52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

3つの遺伝子型に関する3つの関数の識別能力が100%である、請求項50から53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

- バックグラウンドノイズに関して共焦点蛍光スキャナを用いて測定した4n個の複製物(「n」は各プローブの複製物数)の平均蛍光強度は5よりも大きく、かつ/または

- 所与のプローブの複製物の強度値の間の変動係数は0.25未満である、

請求項50から54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

蛍光共焦点スキャナを用いて強度を測定すると、

- チップ上のすべてのプローブ複製物の原強度値の合計とバックグラウンドノイズの強度との比率は15を超える、かつ/または

- 所与のプローブの複製物の強度値の間の変動係数は0.25未満であり、かつ/または

- 陰性対照で得られた原シグナル強度値はバックグラウンドノイズの強度値より最大で3倍大きい、

請求項50から55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

遺伝的変異に関して遺伝子型AAを有するn個の個体、遺伝子型ABを有するn個の個体および遺伝子型BBを有するn個の個体のそれぞれについて得られた比率1および2を用いて、請求項1から40または請求項42から49のいずれか一項に記載の方法での使用のための線形関数を導き出す計算方法であって、

(a)適切なアルゴリズムを適用するステップであって、そのアルゴリズムは遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABまたはBBのそれぞれを特徴づけることを目的とする3つの線形関数(関数1、2および3)

[ここで、

関数1は遺伝子型AAを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数2は遺伝子型ABを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数3は遺伝子型BBを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

これらの線形関数は、変数比率1および2に附属する係数によって形成され、

比率1=プローブ1の平均強度値/プローブ1の平均強度値+プローブ2の平均強度値

および

10

20

30

40

50

比率2=プローブ3の平均強度値 / プローブ3の平均強度値+プローブ4の平均強度値
であり、

プローブ1および3は遺伝的変異Aを検出し、プローブ2および4は遺伝的変異Bを検出する
]

を使用するステップと、

(b)識別分析において3つの遺伝子型群AA、ABおよびBBの間の相違を最大にする線形関数を導き出し、それによって3つの関数のそれぞれの係数を得るステップとを含み

比率1および2は請求項50から56のいずれか一項に記載の方法によって入手可能である、計算方法。

【請求項 5 8】

各プローブについて得られた平均強度値から比率1および2を計算するステップをさらに含む、請求項57に記載の計算方法。

【請求項 5 9】

各プローブの複製物について得られた強度値を照合し、各プローブの平均強度値を決定するステップをさらに含む、請求項57または58に記載の計算方法。

【請求項 6 0】

プローブの複製物について得られた原強度値を修正してバックグラウンドノイズを考慮し、それによってその複製物のクリーンな強度値を得るステップをさらに含む、請求項57から60のいずれか一項に記載の計算方法。

【請求項 6 1】

「n」は少なくとも3である、請求項57から59のいずれか一項に記載の計算方法。

【請求項 6 2】

3つの遺伝子型に関する3つの関数の識別能力が100%である、請求項57から61のいずれか一項に記載の計算方法。

【請求項 6 3】

フィードバック最適化工程で、さらなる試験個体について計算した比率1および2を用いて、3つの線形関数の係数を再決定するステップをさらに含む、請求項57から62のいずれか一項に記載の計算方法。

【請求項 6 4】

請求項42から63のいずれか一項に記載の計算方法を実行するようための、プロセッサおよびプロセッサを制御するための手段を含むコンピュータシステム。

【請求項 6 5】

コンピュータまたはコンピュータネットワーク上で実行されるときに、そのコンピュータまたはコンピュータネットワークに請求項42から63のいずれか一項に記載の計算方法を実行させるコンピュータプログラムコードを含むコンピュータプログラム。

【請求項 6 6】

コンピュータ可読媒体に格納される、請求項65に記載のコンピュータプログラム。

【請求項 6 7】

- 配列番号255～630で列挙したオリゴヌクレオチド、
- 配列番号631～960および1429～1652で列挙したオリゴヌクレオチド、
- 配列番号961～1316で列挙したオリゴヌクレオチド、ならびに
- 配列番号1～254および1317～1428のオリゴヌクレオチド

から選択される少なくとも1つのオリゴヌクレオチド。

【請求項 6 8】

配列番号1～254および1317～1428内のPCRプライマー対から選択される1対のPCRプライマー。

【請求項 6 9】

請求項68に記載の少なくとも1対のプライマーを含むPCR增幅キット。

【請求項 7 0】

配列番号255～1316および1429～1652のプローブ対から選択される、遺伝的変異の同定

10

20

30

40

50

のための1対のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 7 1】

各対は同じ遺伝的変異の同定のためのものである、請求項70に記載の少なくとも2対のプローブを含む少なくとも4つのオリゴヌクレオチドプローブのセット。

【請求項 7 2】

請求項41に記載のDNAチップを含む診断キット。

【請求項 7 3】

請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法での使用のための説明書をさらに含む、請求項72に記載のキット。

【請求項 7 4】

請求項64に記載のコンピュータシステムまたは請求項65または66に記載のコンピュータプログラムをさらに含む、請求項72または73に記載のキット。

【請求項 7 5】

赤血球抗原と関連する遺伝的変異の検出のための、請求項72から74のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7 6】

IBDと関連する遺伝的変異の検出のための、請求項72から74のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7 7】

医薬有害反応と関連する遺伝的変異の検出のための、請求項72から74のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7 8】

請求項69に記載の1対もしくは複数対のPCRプライマーまたは請求項70に記載のPCR増幅キットをさらに含む、請求項76または77に記載のキット。

【請求項 7 9】

個体のIBDまたはIBD感受性を診断する方法であって、請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法により、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイプングすることを含む方法。

【請求項 8 0】

IBDを有する個体のための治療法を選択する方法であって、

(a)請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法により、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイプングするステップと、

(b)(a)で決定された遺伝子型に基づいて適切な治療法を選択するステップとを含む方法。

【請求項 8 1】

IBDを有する個体を治療する方法であって、

(a)請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法により、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイプングするステップと、

(b)(a)で決定された遺伝子型に基づいて適切な治療法を選択するステップと、

(c)その個体に前記治療法を施すステップ

とを含む方法。

【請求項 8 2】

個体の血液型を判定する方法であって、請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法により、赤血球抗原と関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイプングすることを含む方法。

【請求項 8 3】

個体の医薬有害反応への感受性を判定する方法であって、請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法により、医薬有害反応と関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイプングすることを含む方法。

【請求項 8 4】

10

20

40

50

個体のための薬剤治療法を選択する方法であって、

(a)請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法により、医薬有害反応と関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイピングするステップと、

(b)(a)で決定された遺伝子型に基づいて適切な治療法を選択するステップとを含む方法。

【請求項 8 5】

医薬で個体を治療する方法であって、

(a)請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法により、医薬有害反応と関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイピングするステップと、

(b)(a)で決定された遺伝子型に基づいて適切な治療法を選択するステップと、

(c)その個体に前記治療法を施すステップとを含む方法。

【請求項 8 6】

特定のIBD表現型を示唆する遺伝的変異を同定する方法であって、

(a)請求項1から40または42から49のいずれか一項に記載の方法により、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して複数の個体を遺伝子タイピングするステップであって、その個体のIBD表現型は既知であるステップと、

(b)1つまたは複数の遺伝的変異について試験された個体の遺伝子型をそれらの個体の既知の表現型と比較するステップと、

(c)遺伝的変異および表現型の間に統計学的に有意な関連がある遺伝的変異を同定するステップとを含む方法。

【請求項 8 7】

(d)そのように同定された遺伝的変異を用いて疾患進行の起こりうる経過を予測するステップをさらに含む、請求項86に記載の方法。

【請求項 8 8】

(e)(d)でされた予測を用いて、外科的介入の必要性を含むその個体に最適の治療手段を示すステップをさらに含む、請求項87に記載の方法。

【請求項 8 9】

請求項86に記載の方法によって特定のIBD表現型の発現を示唆すると同定された1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体の遺伝子型を決定することによって、個体のIBD表現型の発現の可能性を予測する方法。

【請求項 9 0】

請求項41に記載のチップ、請求項64に記載のコンピュータシステム、請求項65または66に記載のコンピュータプログラム、請求項67に記載のオリゴヌクレオチド、請求項68に記載の1対または複数対のPCRプライマー、請求項69に記載のPCR增幅キット、請求項70または71に記載の1つまたは複数の対またはセットのプローブ、または請求項72から78のいずれか一項に記載のキットの使用を含む、請求項79から89のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 1】

請求項50から63のいずれか一項に記載の方法を実行するステップをさらに含む、請求項79から90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 2】

医療で使用するための、配列番号1～1652から選択される核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2005年1月13日に出願の西国特許出願P200500089、2005年10月5日に出願の西国特許出願P200502423、Simon Buelaによる2006年1月12日に出願の米国特許仮出願「ME TODOS Y PRODUCTOS PARA GENOTIPADO IN VITRO」、代理人文書番号620-411、出願番号60/_____と関連し、それらのすべての内容は本明細書で参照により完全に組み込まれている

10

20

30

40

50

。

【0002】

本発明は、生体試料の分析による*in vitro*遺伝子タイピングのための方法および製品に関する。詳細には、本発明はDNAチップに関し、また、疾患と関連するかまたは対象とする抗原の遺伝子タイピングと関係するかまたは医薬治療への抵抗性と関連する、多型または遺伝子突然変異などの遺伝的変異を検出するチップの使用に関する。本発明は、さらに、チップデータを分析するための方法、およびその方法に基づくコンピュータソフトウェアに関する。

【背景技術】

【0003】

DNAチップ 10

2001年に、ヒトゲノムプロジェクトコンソーシアムおよび私企業セレーラは、30,000の遺伝子を有するヒトゲノムの最初の完全な例を提示した。このときから、完全なゲノムの研究または大規模(ハイスループット)な研究の可能性が始まった。「マイクロアレイ」、「DNAアレイ」または「DNAバイオチップ」とも呼ばれるいわゆる「DNAチップ」は、大規模な研究のために機能的ゲノミックスが使うことができる装置である。機能的ゲノミックスは、環境要因および個体の遺伝子特性による遺伝子発現の変化を研究する。遺伝子配列はSNP(「一塩基多型」)と呼ばれる1つの特有なヌクレオチドにおける小さな個体間変異を提示し、それらはある病状を引き起こす遺伝子の発現および/または機能における変化と低い割合で関係する。DNAチップを適用する大多数の研究は遺伝子発現を研究するが、チップはSNPの検出でも用いられる。 20

【0004】

最初のDNAチップは「サザンプロット法」であり、そこでは固体支持体に結合した核酸分子を検査するために標識された核酸分子が用いられた。この支持体は、一般的にナイロン膜であった。

【0005】

2つのブレークスルーが、DNAチップの決定的な始まりとなった。固体の非多孔質支持体、例えばガラスの使用はアレイの小型化を可能にし、それによって、 cm^2 につき $>1,000$ プローブの密度での、支持体表面への多数の個々のプローブ特性の組み込みが可能になった。半導体写真平板手法の適用は、約 $20 \mu\text{m}^2$ の領域に400,000を超える各種オリゴヌクレオチドを含むDNAチップ、すなわち高密度DNAチップの生産を可能にした。 30

【0006】

一般には、DNAチップは固体支持体を含み、固体支持体は定位置で固体表面に結合したDNA、cDNAまたは固定されたオリゴヌクレオチドの形で表される各種遺伝子の配列の数百の断片を含む。支持体は、通常、顕微鏡用のガラススライド、ナイロン膜またはシリコン「チップ」である。各プローブの自動局在化が発現測定対象の遺伝子を決定するので、ヌクレオチド配列またはプローブは定位置で支持体に結合することが重要である。DNAチップは、以下のように分類することができる：

高密度DNAチップ：支持体、例えばガラススライドの表面で見られるオリゴヌクレオチドは、写真平版と呼ばれる方法によって「*in situ*」で合成されている。

低密度DNAチップ：オリゴヌクレオチド、cDNAまたはPCR增幅断片は、それらのDNA配列を支持体に印刷するロボットによって、支持体、例えばガラスの表面にナノドロップの形で沈着させられる。既存の低密度DNAチップの例は極めて少ない：チロシナーゼ遺伝子で5つの変異を検出するDNAチップ、p53およびk-ラス癌遺伝子で変異を検出するDNAチップ、肥大性心筋症を引き起こす12の変異を検出するDNAチップ、大腸菌菌株の遺伝子タイピングのためのDNAチップ、またはクリプトスパリジウムパルブム(*Cryptosporidium parvum*)または口タウイルスなどの病原体を検出するDNAチップ。 40

【0007】

遺伝子発現研究のためには、ガラスなどの固体表面に沈着させたプローブを、所与の試料から抽出されたmRNAから合成されたcDNAにハイブリダイズする。一般には、cDNAは蛍光

50

団で標識される。DNAチップ内でそれらの相補配列に結合するcDNA分子の数がより多いほど、一般的にレーザーで測定される検出蛍光シグナルの強度は大きい。この測定項目はしたがって、分析試料中のmRNA分子の数を反映し、したがって、DNAチップで表される各遺伝子の発現レベルを反映する。

【0008】

遺伝子発現DNAチップは、実験結果の標準化および複数の実験の定量的比較を可能にする対照遺伝子（しばしば「ハウスキーピング遺伝子」と呼ばれる）の発現の検出のためのプローブも一般的に含む。DNAチップでは、1つの細胞内の数百または数千の遺伝子の発現レベルを、単一の実験で測定することができる。遺伝子発現の差を研究するために同じDNAチップを用いることができるよう、検査試料のcDNAおよび対照試料のそれは2つの異なる蛍光団で標識することができる。DNA配列内の遺伝的多型、変化または変異（一般に、遺伝的変異）の検出のためのDNAチップは、固体表面、一般的にガラスを含み、その上には研究対象の遺伝的変異に相補性である多数の遺伝子配列が沈着させられる（プローブ）。プローブをアレイに適用する標準のロボットプリンターを用いて、高密度の個々のプローブ特性を得ることができ、例えば cm^2 につき600以上のプローブ特性密度を一般的に達成することができる。アレイの上へのプローブの位置決めは、印刷装置（ロボット、インクジェットプリンター、写真平板マスク、その他）で正確に制御され、プローブは格子状に整列される。アレイ上のプローブの組織化は、以降の、特定のプローブ-標的相互作用の同定を容易にする。さらに、アレイ特性を同じく格子形の、サブアレイと呼ばれることになるより小さなセクターに分けることも一般的であるが、必要というわけではない。サブアレイは一般的に32の別個のプローブ特性を含むが、より少ない（例えば16）または多い（例えば64以上）特性を各サブアレイが含むことができる。

10

20

30

【0009】

遺伝的変異を検出するために用いる1つの手法は、検査試料に由来するDNAの断片中で正常および突然変異の対立遺伝子を特異的に認識する配列へのハイブリダイゼーションを含む。一般的に、断片は例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて増幅され、例えば蛍光分子で標識される。チップ上の結合した標識断片を検出するためにレーザーを用いることができ、したがって正常な対立遺伝子がホモ接合である個体はヘテロ接合の個体から（常染色体優性条件の場合には、これらの個体はキャリヤと称される）、または突然変異対立遺伝子がホモ接合である個体から特異的に区別することができる。

【0010】

遺伝的変異を検出する他の手法は、DNAチップ自体の上で増幅反応または伸長反応を実行することを含む。

【0011】

示差ハイブリダイゼーションに基づく方法については、遺伝子タイピングのためにハイブリダイゼーションデータを分析するいくつかの方法がある。

ハイブリダイゼーションレベルの上昇：正常および突然変異の対立遺伝子に対する相補性プローブのハイブリダイゼーションレベルを比較する。

ハイブリダイゼーションレベルの低下：対照試料および検査試料の間の配列の差は、完全に相補性のオリゴヌクレオチドと参照配列とのハイブリダイゼーションレベルの低下によって特定することができる。変異ホモ接合個体では完全な消失が生じるが、ヘテロ接合個体ではわずか50%の消失である。両方の鎖で長さが「n」ヌクレオチド（「オリゴヌクレオチド」）の配列のすべての塩基を検査するためのDNAチップでは、そのヌクレオチドを除くすべての配列で前のオリゴヌクレオチドと重複する、最低「2n」のオリゴヌクレオチドが必要である。一般的に、オリゴヌクレオチドの大きさは、約25のヌクレオチドである。配列を再構築するために用いるオリゴヌクレオチドの数を増加させると、ハイブリダイゼーションレベルの変動に由来する誤差は低下する。しかし、配列の正確な変化を、この方法で特定することはできない。変異を特定するために、後のシークエンシングが必要である。

40

【0012】

50

DNAチップ自体の上で増幅または伸長を実行する場合、3つの方法が例として提示される。

【0013】

ミニシーケンシング手法では、変異特異的プライマーをスライド上に固定し、蛍光ジデオキシヌクレオチドとの伸長反応の後、DNAチップの像をスキャナで捕獲する。

【0014】

プライマー伸長手法では、2つのオリゴヌクレオチドがそれぞれ野生型および突然変異の配列の検出のために設計される。その後、1ヌクレオチドを蛍光標識して残りのヌクレオチドは非標識にして、伸長反応を実行する。いずれにせよ、出発物質はRNA試料でもPCRによって増幅されたDNA生成物でもよい。

10

【0015】

タグアレイ手法では、伸長反応は、既定の5'配列または「タグ」を運ぶ特定のプライマーを用いて溶液中で実行される。これらの配列または「タグ」に相補性のオリゴヌクレオチドによるDNAチップの利用により、伸長の反応生成物の捕獲が可能になる。これの例としては、高密度DNAチップ「Flex-flex」(Affymetrix)がある。

【0016】

遺伝子診断のためには、簡易性を考慮しなければならない。増幅反応および精製反応の必要性は、示差ハイブリダイゼーションに基づく方法と比較して、オンチップ伸長/増幅方法の短所を示す。

20

【0017】

一般的に、DNAチップ分析は、示差ハイブリダイゼーション手法を使用して行われる。しかし、示差ハイブリダイゼーションは、ガラススライド上の増幅を伴う方法ほど高い特異性および感度を生じない。この理由のために、ハイブリダイゼーション方法の特異性および感度を増加させる数値計算用アルゴリズムの開発が必要である(Cutler DJ、Zwick ME、Carrasquillo MN、Yohn CT、Tobi KP、Kashuk C、Mathews DJ、Shah N、Eichler EE、Warrington JA、Chakravarti A. Genome Research;11:1913～1925頁(2001))。

30

【0018】

多数の遺伝的変異の有無を高い感度、特異性および再現性で同時に検出する上での既存のDNAチップの問題は、ヒト疾患の臨床診断で日常用いるためのDNAチップの応用を阻害してきた。本発明者らは、DNAチップをハイブリダイゼーションシグナルの増加に基づいて遺伝子タイピングすることによって生成された実験データを、逐次的に加工および解釈する方法を開発した。この方法は特異性、感度および再現性が高レベルであり、そのことは、この方法に基づいて開発されたDNAチップの、例えば信頼できる臨床遺伝子診断のための利用を可能にする。

30

【0019】

炎症性腸疾患

炎症性腸疾患(IBD)は、腸の慢性炎症を特徴とする。この病状は、2つの臨床形態、クローン病(CD)および潰瘍性大腸炎(UC)を示す。CDは腸管の任意の領域に影響を及ぼす可能性があり腸壁の不規則な内部損傷と関連するが、UCの場合、炎症は直腸および結腸粘膜に限定されて傷害は連続的、表面的である。スペインのUCおよびCDの年発症率は、100,000人につきそれぞれ4から5症例、および1.8から2.5症例である。米国では、これらの疾患の有病率は、100,000につき200から300の数に達する可能性がある。この疾患は特にその慢性進行、発生の変貌および頻繁な外科手術の必要性を考えると、生活の質に重大な影響を及ぼす。両者の患者は、皮膚、目および関節の炎症を患う。

40

【0020】

IBDの治療法としては、免疫抑制薬、抗炎症剤、例えば腫瘍壞死因子 (TNF- α)に対する抗体、および外科手術がある。分子生物学から見たIBDの発生病理はまだ明白ではないが、原因因子としては、腸壁内の細菌感染および腸免疫応答の調節のアンバランスがあるようである。

【0021】

50

CDおよびUCは自己免疫疾患として分類され、両方とも過去に他の自己免疫病態を経験した個体でより一般的である。主に遠位性直腸炎または大腸炎を有する高年齢層において、女性の集団においてはCDの優勢が、男性の集団ではUCの優勢が見られる。

【0022】

疫学的および遺伝学的研究は、IBDに対する遺伝的感感受性因子の存在を示す証拠を提供し、IBDに関連する遺伝子の同定により発生病理、診断、位置ならびに予後診断および適切な治療に関するより深い理解がもたらされるとの期待が高まった。分離比分析などの罹患リスクを評価するための非公式の研究から出発して、遺伝的起源の証拠が提供された。CDまたはUCの患者の親類の10~20%も、これらの疾患を患った。しかし、CDおよびUCに罹る傾向は複雑であり、様々な遺伝子ならびに環境要因が関係する。IBDは、遺伝が単純なメンデル形質であるとは考えられない、複雑な遺伝病であると考えられる。ゲノムと疾患感受性との間の関連性に関する多数の研究により、1つまたは複数の遺伝的変異が罹患の高リスクもしくは低リスク、薬剤へのより良いかより悪い応答、またはより良いかより悪い予後診断をもたらす、いくつかの遺伝子が最近特定された。

10

【0023】

この理由から、IBDと関連する遺伝的変異を特徴づけるためのDNAチップの臨床応用は、診断および治療のために有益である。臨床観点からは、疾患の早期診断、予後診断および位置は、IBDの処置に関する治療決定に影響する。少なくとも2つの異なる群がこの開発の利益を受ける：

20

疾患を発症する可能性を知ることに关心のあるIBD患者の親類、および

IBD患者。炎症またはフィステルのリスクに従いパーソナライズされた療法を選択することができるよう。重症型IBDに罹患するリスクがより高いほど、より攻撃的な療法の必要性がより高い。

【0024】

IBDの診断および治療、ならびに新しい治療手法の開発に対する貢献は別として、IBDにおける炎症性反応の生理病理学の進歩も、いくつかの神経変性疾患、関節リウマチおよび乾癬などの皮膚科病態を含めて広範囲にわたる自己免疫疾患の研究で関心がもたれる。

【0025】

IBDと関連する遺伝的変異の感度、特異性および再現性の高い同時検出を可能にするDNAチップは、IBDの臨床診断で用いることができた。

30

【0026】

赤血球抗原

各人の血液は特徴的であるので、フィンガープリントとほとんど同じくらいに正確である同定手段の役割をすることができる。一卵性双生児だけが、まったく同じ血液性状を有する。血液型の決定は、特に医療分野、例えば輸血、胎児および新生児の溶血性疾患、法医学的用途および臓器移植で役立つ。

【0027】

大多数の輸血は、安全であると考えることができる。しかし、それらは時にわずかな反応を、または、ことによると重大でさらに致命的な反応を起こす。温度およびアレルギー性(過敏症)の反応が輸血の1~2%で起こるが、赤血球の破壊(溶血性血管内反応)を引き起こすより重大な不適合性が存在する。

40

【0028】

胎児および新生児の溶血性疾患(HDNF)は既知の免疫学的病態であり、胎盤を通過して胎児または新生児の赤血球に存在する父親起源の抗原を特異的に標的とする移行抗体の作用のために、胎児または新生児の生存能力は障害を受ける。EHPNはD抗原に対する抗体のためだけでなく、RH式、ABO式およびその他の抗原も関係することが確定された。

【0029】

したがって血液型の正しい遺伝子タイピングは、輸血において重要である(珍しいか稀な対立遺伝子の検出を含む)。

【0030】

50

血液型は赤血球膜および赤血球の表面に存在する同種抗原から構成され、それらはメンデル遺伝学の法則に従って親から子に伝達される。

【0031】

International Society of Blood Transfusionsは、26を超える異なるヒト血液型を分類した。そのほとんどは遺伝子レベルで定義されており、それらは、遺伝的変異をもたらす1つの特有のヌクレオチド(SNP)における多型、遺伝子欠失、変換および他の事象を含む。血液型抗原は、2つの大きな群に分類することができる。

- A. 炭水化物で決定される抗原。
- B. タンパク質で決定される抗原。

【0032】

A. 炭水化物で決定される抗原

ABO式血液型

この血液型は輸血および臓器移植における不適合性反応の大部分を引き起こすので、臨上重要である。ABO式血液型の生化学的基礎は、血液型Aの個体でのN-アセチルガラクトサミントランスフェラーゼおよび血液型Bでのガラクトシルトランスフェラーゼの活性に依存する。一方、O型に属する個体は、活性トランスフェラーゼ酵素が欠けている。ABO式血液型表現型の遺伝的基礎は、ABO式血液型遺伝子におけるグリコシルトランスフェラーゼのアミノ酸の置換である。この遺伝子は大きさが19,514塩基であり、Ga1NAcまたはUDP-Galを基質として利用する膜結合酵素をコードする。ABO式血液型遺伝子のエクソン6および7内の4つのアミノ酸変化は、それぞれ転移酵素AおよびBの基質特異性を担い、それらの内で、Gly235SerおよびLeu266Metの変化は不可欠である。O型の大多数の個体は1つの単一ヌクレオチド(A261G)の欠失を表し、それは読み替の変化を引き起こして不活性のトランスフェラーゼタンパク質の生産をもたらす。それにもかかわらず、転移酵素AまたはBの非発現をもたらすO対立遺伝子が益々増加(約20)している。A3、Ax、Ae1、B3BxおよびBe1などのABO式血液型サブグループの稀な対立遺伝子が記載されている。これらの対立遺伝子は、ABO式血液型の異なる対立遺伝子の遺伝的組換えに起因する。

【0033】

- B. タンパク質で決定される抗原

B.1. 赤血球トランスフェラーゼ分子の発現に依存する抗原。

Rh(RH)

RHの不適合性は輸血反応の大部分で起こり、新生児および胎児の溶血性疾患(HDNF)の主な原因である。RH抗原は、遺伝子RHDおよびRHCE(70kb)を含むRH遺伝子座(1p34-36.2)によってコードされる2つのタンパク質(RH CcEeおよびRH D)に由来する。おそらく、正のDハプロタイプは同じ配向性の遺伝子RHD-RHCEの構成を示すが、負のDハプロタイプは逆の配向性を示す。古いヨーロッパの集団で一般的な負のD表現型は、遺伝子RHDの欠失に起因する。これは、遺伝子RHCEおよびRHDの間の不等交叉によって生じたようである。アフリカの集団では、RHDの偽遺伝子は支配的なDの負対立遺伝子であるが、その出現頻度はアフリカ系アメリカ人およびアフリカ系カリブ人の間では減少する。遺伝子RHCEおよびRHDの間の組換えは、D抗原の部分発現を引き起こす稀なハイブリッドをもたらす。これらの普通でない抗原は、時に、臨床的に重要であることが分かった。

【0034】

タンパク質RH CcEeおよびRH Dは、それら自身と関連糖タンパク質RH(RHAG)である同等糖タンパク質(36%の同一性)とを同時発現する。この赤血球特異複合体は、おそらく、両方向アンモニア輸送と関係するヘテロ四量体である。RHAGの変異は、赤血球膜を越える輸送の欠陥、CD47の欠乏およびICAM-4の完全な欠如と関連する、RH陰性症候群の原因である。さらに、RHAG、RHBGおよびRHCGに関連した遺伝子が、それぞれ領域1q21.3および15q25で発見された。これらの遺伝子は、異なる人体組織では異なる形態で発現される。

【0035】

Kidd(JK)

Kidd(JK)抗原は、赤血球の尿素トランスポーターhUT-B1で発生する。Kidd抗原の重要性

10

20

30

40

50

は、JK(a⁻b⁻)赤血球が2Mの尿素中での溶解に抵抗性であることが発見されてから20年間、知られている。Kidd抗原の発現の分子基盤は、変化Asp280Asn(JK^{*}A-JK^{*}B)を引き起こすヌクレオチド838(G-A)のSNPである。Kiddヌル表現型、JK(a⁻b⁻)は、遺伝子SLC14A1でフレームシフト突然変異、翻訳の早期終止、不適当な遺伝子スプライシングおよび部分欠失を引き起こす変異による。

【0036】

Diego(DI)

血液型Diego(DI)の抗原は赤血球の表面で最も多い(1細胞につき1,100,000コピー数)タンパク質であり、CO₂を運ぶためおよび酸塩基ホメオスタシスに重要である。DI抗原は、遺伝子SLC4A1に存在する複数のSNPのために異なると考えられる。

10

【0037】

Colton(CO)

CO抗原(COa、CObおよびCO3)は、担体分子AQP-1によって発現される。(COa-COb)抗原は、コドン45でアラニンからバリンへの変化を起こすAQP-1内のSNPによって生成される。

【0038】

B.2 赤血球膜酵素の発現で決定される抗原。

Kell(KEL)

KEL系の抗原は、輸血において非常に重要である。K抗原は、新生児の溶血性疾患の第2の主な原因である。糖タンパク質KELは、II型膜タンパク質である。c末端の触媒領域は、強力な血管収縮薬である大きなエンドセリンを処理する。糖タンパク質KELのシステイン2はタンパク質Kxとジスルフィド架橋を形成し、このことは、KEL陰性の赤血球(Ko)がKx抗原のレベルの活性化を示す理由を説明するかもしれない。最も臨床上重要なこの系の抗原、K(KEL1)は、Asn-X.ThrN-グリコシル化を起こさせる変化Met193Thrと関連する。

20

【0039】

Dombrock(D0)

変異体D0a/D0bは、酵素ADPリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子DOK1内の、コドン265(Asn-Asp)に影響を及ぼすSNPによる。赤血球のADPリボシルトランスフェラーゼは血清のNAD⁺の排除を助けることができたが、他のタンパク質の転写後修飾に関与することも記された。RGDモチーフおよびD0bは、細胞接着に関与する。奇妙にも、対立遺伝子の変異体D0^{*}Bはアジアおよびアフリカの集団でより一般的で、その感染過程でRGDタンパク質を発現するPlasmodium falciparumの侵入に対する進化上の利点であったかもしれない。

30

【0040】

B.3. 赤血球の膜受容体の発現で決定される抗原。

Duffy(FY)

赤血球のサイトカイン受容体としての糖タンパク質FYの機能は、炎症誘発性サイトカイン情報伝達を速めることである。FY糖タンパク質は、マラリア原虫Plasmodium vivax(三日熱マラリア原虫)、したがってFY陰性の個体のための赤血球受容体である。(FY a-b-)は、この寄生虫が見られる集団(西アフリカ)で非常に一般的である。FYの3つの主な対立遺伝子が存在する。コドン42を変化させるSNPのために異なるFY^{*}A、FY^{*}BならびにFY^{*}AおよびB、一方、アフリカ人の表現型FY(a-b-)は、赤血球中のFY糖タンパク質の欠如をもたらすFY遺伝子プロモーター中のSNP(C-T)に起因する。

40

【0041】

MNS(MNS)

MNS抗原はグリコポーリンAに対して生成されるが、Ss抗原はグリコポーリンBに対して生成される。遺伝子GYPAおよびGYPBは遺伝子座4q28-31中に相前後して並ぶが、グリコポーリンCおよびDの間に関係はない。GPAのN末端領域内の2つのアミノ酸変化はM-N式血液型を担い、GPB内のアミノ酸の変化はS-s式血液型を決定する。遺伝子組換え、遺伝子変換またはSNPのために、多数のMNS対立遺伝子が存在する。

50

【0042】

臨床上重要である大多数の抗原について、ヒト血液型が遺伝子レベルで明らかにされた。それにもかかわらず、赤血球の遺伝子タイピングは、新生児および胎児の溶血性疾患の場合に主に血液型の出生前判定において、稀に実施されるだけである。

【0043】

ドナーおよびレシピエントの間の輸血適合性は、通常、血清学的手法(抗体-抗原反応)によって評価される。これらの手法の使用は誤った結果を与えることがあり、レシピエント(患者)において潜在的に有害な免疫反応を導く可能性があった。多数のいわゆる「弱い」遺伝子のためには血清学検査は存在せず、様々な場面で用いられる抗体は十分に特異的ではない。この種の問題を予防することができる唯一の方法は、ドナーおよびレシピエントの完全な分子遺伝子タイピングに基づくものである。

10

【0044】

SNP遺伝子タイピングは、これらの判定の大規模な実施、さらには既存の手法で決定することができない血液型の稀な対立遺伝子の遺伝子タイピングを可能にする。ある血液型(例えばRH)の新しい対立遺伝子の出現は継続するので、進歩して絶えず監視することができる技術を必要とする。ヒトゲノムプロジェクトは関係する血液型において多くのタンパク質で新しいSNPを同定したが、これらのSNPが血液型に関連した抗原内にあるならば血清学的に決定する必要がある。

【0045】

現在では、遺伝子の分子解析は輸血において一般的である。例えば、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)またはB型肝炎ウイルス(HBV)などのウイルスによる汚染の、PCR法による小体積の血漿からの検出は、1999年以降、欧州連合(EU)では一般的に行われていた。PCRに基づく診断は、HLA(ヒト白血球抗原)の判定において事実上血清学に代わり、骨髄移植に関係する輸血センターで常用される。

20

【0046】

ヒトゲノムプロジェクトの発見の1つは、ヒトDNAで高頻度で見られる单一对クレオチドの多型(SNP)であった。各キロベースで約1つのSNPが発見された。この発見は、例えばDNAチップを用いる、SNP遺伝子タイピングの迅速な診断の技術開発を推進した。この新技術は、血液型の遺伝子タイピングの迅速法の開発に応用することができる。

【0047】

異なる血液型のための多様な診断方法が記載された。実例として、米国特許第5804379号は、血液型KELの遺伝子型を判定するための分子診断法およびキットに関するものである。米国特許第5723293号は、血液型RHの遺伝子型を判定するための方法およびキットに関するものである。さらに、血液または血清から血液型を分類するための血清学的診断検査が記載された。同様に、血液型Duffyの新しい遺伝的変異が、この血液型を遺伝子タイピングする方法として記載された。

30

【0048】

しかし、臨床上主に関連性のある血液型のすべての対立遺伝子の変異体(稀な変異体を含める)の遺伝子タイピングのためのオープンプラットホームとなることができ、集団内での大規模診断方法として用いることができるDNAチップ技術に基づく方法は記載されていない。

40

【0049】

決定された赤血球抗原と関連する遺伝的変異の感度、特異性、再現性の高い同時検出を可能にするDNAチップは、集団内での大規模な血液赤血球抗原の遺伝子タイピングのために、したがってヒトの血液型を判定するために臨床的に用いることができた。

【0050】

薬の有害反応

いかなる医薬も病気または疾患を治療、軽減、予防または診断をする意図で開発されているが、残念なことに、これらは具体的な症例に従い最小限のものから重度のものまでのリスクを伴う、有害作用を起こす可能性もある。計算するのは困難であるが、治療のリスクは無視すべきではなく、その程度は医者および患者は知っておくべきで、薬の潜在的利

50

点はこれらのいかなるリスクも補償するとの理解にたって受け入れなければならない。

【0051】

有害反応は、通常疾患の予防、診断または治療のためにヒトに処方される投薬の投与の後に起こる、いかなる有害または望ましくない影響である。現在のコンセンサスでは、1972年にWorld Health Associationによってつくられたこの定義は、以下のように理解される。「有害反応は、疾患の予防、診断もしくは治療のためにまたは生理機能の修正のために適切な用量の薬を投与した後に現れる、いかなる望ましくない影響である。」

【0052】

先進国は使用する薬剤の安全性および有効性の監視を集中する医薬ビジランスシステムに依存し、それらは市場で用いた薬剤によって生じたことが疑われる有害反応の詳細を収集、分析する役割を担う。

10

【0053】

スペインでは、医薬品安全性監視システムの構築の最初の段階は70年代に開始され、1983年には、スペインはInternational Programme of Pharmacovigilance of Healthを組み込んだ。1992年に、FEDRA(Spanish Pharmacovigilance of Data of Adverse Reactions)と呼ばれるコンピュータデータベースが構築された。医薬産業はこのシステムに活発に協力し、さらに、The 1986 General Health ActおよびThe 1990 Medicine Actによって確立されたように、医者、薬剤師、獣医および看護士を含むすべての公衆衛生関係者は、保健衛生当局に対して彼らが知ることができた薬剤有害反応のいかなる疑いを通知し、スペインの医薬品安全性監視システムと協力する義務を負う。スペインは、1995年に活動を開始したEuropean Medical Evaluation Agencyとも協力する。FEDRAによって収集された情報から、スペインは通知率が最高である国に含まれるようであり、平均はドイツおよびフランスに類似するが、米国、アイルランド、ノルウェー、ニュージーランド、英国またはスウェーデンなどの国よりは低い。

20

【0054】

今日、高齢者が増加してより多くの医薬が特にこの年齢層に投与され、また、セルフメディケーションが増加するスペインなどの国では、有害反応の問題が重要なことが予想されるだけである。FDA(米国食品医薬品局)のCentre for Drug Evaluation and Researchは、米国で毎年その2,000,000を超える有害反応が発生し、それらは年間約100,000の死亡原因であり、肺疾患、糖尿病、エイズ、肺炎および交通事故を上回る第4の死因であることを認める。薬の処方の誤りまたは有害反応のためにイングランドおよびウェールズで死亡する患者数は増加しており、問題点は問題の程度が未知であることである。スペインでは、公立病院での死亡者百名中5名は薬剤有害反応によるものであり、入院患者の10~20%は医薬品を投与後にこの医学的災難に遭遇した。罹患者のうち、1%がその結果死亡する。

30

【0055】

2000年5月までに、登録薬剤の有害反応の約80,000の届出が、カタルーニャのCentre for Pharmaceutical Vigilanceのデータベースで記録された。これらのうち、2/3は自然発生で、プライマリーケアからのものであった。届出されたそれらの反応のうち、ほとんどは軽度または中等度であったが、12%は重大で、1%は致命的であった。50%の反応は皮膚、消化性または神経性であった。薬剤を回収する決定のほとんどは、肝性/肝臓および血液学的反応に関連する。懸念されることは、この種の反応は全体から見ればわずかな割合であるが、大多数の薬剤が回収されるということである。抗生物質は有害作用の主な原因であり、抗リウマチ剤および鎮痛剤、および心臓血管疾患を予防する薬剤がそれに続く。有害作用の検出は、回収だけでなくその薬剤の使用の変更の決定、または再製剤化もしくは特定の患者のための新しい方針の導入も引き起こす。

40

【特許文献1】西国特許出願P200500089

【特許文献2】西国特許出願P200502423

【特許文献3】米国特許仮出願60/_____

【特許文献4】米国特許第5804379号

50

【特許文献 5】米国特許第5723293号

【非特許文献 1】Cutler DJ、Zwick ME、Carrasquillo MN、Yohn CT、Tobi KP、Kashuk C、Mathews DJ、Shah N、Eichler EE、Warrington JA、Chakravarti A. Genome Research; 11:1913 ~ 1925頁 (2001)

【非特許文献 2】Eggerding FA、Iovannisci DM、Brinson E.、Grossman P.、Winn-Deen E.S. 1995 Human Mutation、5:153 ~ 65頁

【非特許文献 3】Pastinen T、Raitio M、Lindroos K、Tainola P、Peltonen L、Syvanen AC. 2000 Genome Research 10:1031 ~ 42頁

【非特許文献 4】Gasche C、Scholmerich J、Brynskov Jら、A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology、Vienna 1998. Inflamm Bowel Dis 2000;6:8 ~ 15頁 10

【非特許文献 5】Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Can J Gastroenterol. 2005年9月19日 Suppl A:5 ~ 36頁

【非特許文献 6】Sambrook et al. 1989、Molecular Cloning :a laboratory manual

【非特許文献 7】<http://www.corning.com>

【非特許文献 8】<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>

【非特許文献 9】<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0056】

DNAチップは医薬の有害反応と関連する遺伝的変異の感度、特異性、再現性の高い同時検出を可能にするので、医療を受ける患者における前記反応の予防または低減のために、臨牀上役立つ可能性がある。

【課題を解決するための手段】

【0057】

本発明者らは、遺伝子タイピングのための製品の開発に役立つ、遺伝的変異を同時に検出し、特徴づける感度、特異性、再現性の高い方法を開発した。この方法は、DNAチップの遺伝子タイピングのための元の試験的設計ならびにチップによって生成される試験データを(ハイブリダイゼーションシグナルの増加に基づいて)加工および解釈する順次方式(アルゴリズム)の開発の組合せに基づき、それは高レベルの特異性、感度および結果の再現性を保証し、続いて、例えば臨床遺伝子診断の信頼できる装置としてそのチップを用いることを可能にする。 30

【0058】

したがって、本発明は個体の遺伝的変異を遺伝子タイピングするための *in vitro* 方法を提供し、その方法は、

(a) 遺伝子タイピングする遺伝的変異を含む核酸(標的DNA)を含む試料を提供するステップと、

(b) 遺伝子タイピングする各遺伝的変異に対して少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプローブ対を提供するステップであって、

(i) 1対はプローブ1および2からなり、もう1対はプローブ3および4からなり、 40

(ii) 各対の1つのプローブは遺伝的変異Aにハイブリダイズすることができ、各対のもう1つのプローブは遺伝的変異Bにハイブリダイズすることができ、

(iii) 各プローブは複製物として提供され、

(iv) プローブ複製物を既知の一様分布に従って固体支持体上の位置に置くステップと、

(c) ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的DNAをプローブと接触させ、それによって核酸-プローブハイブリダイゼーション複合体を形成するステップであって、各複合体を検出可能に標識するステップと、

(d) 各プローブ複製物の位置で検出可能な標識の強度を測定し、それによって原強度値を得るステップと、 50

(e) 原強度値を任意選択で修正してバックグラウンドノイズを考慮し、それによって各複製物のためにクリーンな強度値を得るステップと、

(e)(d) または(e)からの強度データに適切なアルゴリズムを適用し、それによって各遺伝的変異について遺伝子型を決定するステップであって、アルゴリズムの適用は各プローブの各複製物の強度値から平均強度値を計算することを含み、アルゴリズムは遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABまたはBBのそれぞれを特徴づける3つの線形関数を使用するステップとを含む。

【 0 0 5 9 】

本発明は、

- 固体支持体上に置かれた複数のプローブを含むDNAチップであって、本発明の方法での使用に適したチップ、

- DNAチップハイブリダイゼーション強度データから遺伝子型を得るために計算方法であって、遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABおよびBBのそれぞれを特徴づける3つの線形関数のそれぞれにおける比率1および2を使用するステップを含み、

関数1は遺伝子型AAを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数2は遺伝子型ABを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数3は遺伝子型BBを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

これらの線形関数は、変数比率1および2に附属する係数によって形成され、

また、

比率1=プローブ1の平均強度値 / プローブ1の平均強度値+プローブ2の平均強度値
および

比率2=プローブ3の平均強度値 / プローブ3の平均強度値+プローブ4の平均強度値
であり、

プローブ1および3は遺伝的変異Aを検出し、プローブ2および4は遺伝的変異Bを検出し、
平均強度値は本発明の方法によって入手可能である

計算方法、

- 本発明の方法での使用のための線形関数を導き出す方法であって、遺伝的変異に関して遺伝子型AAを有するn個の個体、遺伝子型ABを有するn個の個体および遺伝子型BBを有するn個の個体のそれについて、

(a) 遺伝的変異を含む核酸(標的DNA)を含む試料を提供するステップと、

(b) 遺伝的変異に対して少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプローブ対(プローブ1+2およびプローブ3+4)を提供するステップであって、

(i) 1対はプローブ1および2からなり、もう1対はプローブ3および4からなり、

(ii) 各対の1つのプローブは遺伝的変異Aにハイブリダイズすることができ、各対のもう1つのプローブは遺伝的変異Bにハイブリダイズすることができ、

(iii) 各プローブを複製物として提供し、

(iv) プローブを、さらなる付着プローブを含む固体支持体上の位置に置き、それらのプローブを既知の一様分布に従って置くステップと、

(c) ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で核酸試料をプローブと接触させ、それによって核酸-プローブハイブリダイゼーション複合体を形成するステップであって、各複合体を検出可能に標識するステップと、

(d) 各プローブ複製物の位置で検出可能な標識の強度を測定し、それによって原強度値を得るステップと、

(e) 原強度値を任意選択で修正してバックグラウンドノイズを考慮し、それによって各複製物のためのクリーンな強度値を得るステップと、

(f)(d) または(e)からの強度データに適切なアルゴリズムを適用するステップであって、アルゴリズムの適用は各プローブの各複製物の強度値から平均強度値を計算することを

10

20

30

40

50

含み、アルゴリズムは遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABまたはBBのそれぞれを特徴づけることを目的とした3つの線形関数を使用するステップと、

(g)識別分析において3つの遺伝子型群AA、ABおよびBBの間の相違を最大にする線形関数を導き出すステップ

とを含む方法、

- 遺伝的変異に関して遺伝子型AAを有するn個の個体、遺伝子型ABを有するn個の個体および遺伝子型BBを有するn個の個体のそれについて得られた比率1および2を用いて、本発明の方法での使用のための線形関数を導き出す計算方法であって、

(a)適切なアルゴリズムを適用するステップであって、そのアルゴリズムは遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABまたはBBのそれぞれを特徴づけることを目的とする3つの線形関数(関数1、2および3)を使用し、

関数1は遺伝子型AAを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数2は遺伝子型ABを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数3は遺伝子型BBを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

これらの線形関数は、変数比率1および2に附属する係数によって形成され、

また、

比率1=プローブ1の平均強度値/プローブ1の平均強度値+プローブ2の平均強度値

および

比率2=プローブ3の平均強度値/プローブ3の平均強度値+プローブ4の平均強度値
であり、

プローブ1および3は遺伝的変異Aを検出し、プローブ2および4は遺伝的変異Bを検出するステップと、

(b)識別分析において3つの遺伝子型群AA、ABおよびBBの間の相違を最大にする線形関数を導き出し、それによって3つの関数のそれぞれの係数を得るステップとを含み、

比率1および2は本発明の方法によって入手可能である方法、

- 本発明の計算法を実行するためのプロセッサおよびプロセッサを制御するための手段を含むコンピュータシステム、

- コンピュータまたはコンピュータネットワーク上で実行させるとそのコンピュータまたはコンピュータネットワークに本発明の計算法を実行させるコンピュータプログラムコードを含む、コンピュータプログラム、

- 以下から選択される少なくとも1つのオリゴヌクレオチド：

配列番号255～630で列挙したオリゴヌクレオチド、

配列番号631～960および1429～1652で列挙したオリゴヌクレオチド、

配列番号961～1316で列挙したオリゴヌクレオチド、および

配列番号1～254および1317～1428のオリゴヌクレオチド

- 配列番号1～254および1317～1428内のPCRプライマー対から選択される1対のPCRプライマー、

- 本発明のプライマーの少なくとも1対を含むPCR増幅キット、

- 配列番号255～1316および1429～1652のプローブ対から選択される、遺伝的変異の同定のための1対のオリゴヌクレオチドプローブ、

- 本発明に従う少なくとも2対のプローブを含む少なくとも4つのオリゴヌクレオチドプローブのセットであって、各対は同じ遺伝的変異の同定のためのものであるセット、

- 本発明のDNAチップを含む診断キット、

- 個体のIBDまたはIBD感受性を診断する方法であって、本発明の方法により、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイプングすることを含む方法、

- IBDを有する個体のための治療法を選択する方法であって、

(a)本発明の方法により、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺

10

20

30

40

50

伝子タイピングするステップと、

(b)(a)で決定された遺伝子型に基づいて適切な治療法を選択するステップとを含む方法、

- IBDを有する個体を治療する方法であって、

(a)本発明の方法により、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイピングするステップと、

(b)(a)で決定された遺伝子型に基づいて適切な治療法を選択するステップと、

(c)その個体に前記治療法を施すステップ

とを含む方法、

- 個体の血液型を判定する方法であって、本発明の方法により、赤血球抗原と関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイピングすることを含む方法、

- 個体の医薬有害反応への感受性を判定する方法であって、本発明の方法により、医薬有害反応と関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイピングすることを含む方法、

- 個体のための薬剤治療法を選択する方法であって、

(a)本発明の方法により、医薬有害反応と関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイピングするステップと、

(b)(a)で決定された遺伝子型に基づいて適切な治療法を選択するステップとを含む方法、

- 医薬で個体を治療する方法であって、

(a)本発明の方法により、医薬有害反応と関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイピングするステップと、

(b)(a)で決定された遺伝子型に基づいて適切な治療法を選択するステップと、

(c)その個体に前記治療法を施すステップ

とを含む方法、

- 特定のIBD表現型を示唆する遺伝的変異を同定する方法であって、

(a)本発明の方法により、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異に関して複数の個体を遺伝子タイピングするステップであって、その個体のIBD表現型は既知であるステップと、

(b)1つまたは複数の遺伝的変異について試験された個体の遺伝子型をそれらの個体の既知の表現型と比較するステップと、

(c)遺伝的変異および表現型の間に統計学的に有意な関連がある任意の遺伝的変異を同定するステップ

とを含む方法、

- 特定のIBD表現型の発現を示唆すると同定された1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体の遺伝子型を本発明の方法によって決定することによって、個体のIBD表現型の発現の可能性を予測する方法、および

- 医療で使用するための、配列番号1～1652から選択された核酸を提供する。

【0060】

配列の簡単な説明

配列番号1～124および1317～1428は、IBDと関連する遺伝的変異を含む標的DNA領域を増幅するために適切なPCRプライマーである。

【0061】

配列番号125～254は、医薬有害反応と関連する遺伝的変異を含む標的DNA領域を増幅するために適切なPCRプライマーである。

【0062】

配列番号255～630は、既知の赤血球抗原と関連する遺伝的変異の検出に適したプローブであり、血液型の遺伝子タイピングに役立つ。

【0063】

10

20

30

40

50

配列番号631～960および1429～1652は、IBDと関連する遺伝的変異の検出に適したプローブである。

【0064】

配列番号961～1316は、医薬有害反応と関連する遺伝的変異の検出に適したプローブである。

【0065】

配列番号1653は、外部対照核酸である。

【0066】

配列番号1654～1655は、配列番号1653の外部対照核酸の検出に適したプローブである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0067】

本発明は、個体の遺伝的変異を遺伝子タイピングするための、臨床場面での使用を可能にするのに十分に感度、特異性および再現性の高い方法に関する。本発明者らは、その方法での使用のために特別に設計されたプローブを有するDNAチップ、およびそのチップによって生成されたデータを解釈および処理するための計算方法またはアルゴリズムを開発した。

【0068】

したがって、一態様では、本発明は個体の遺伝的変異を遺伝子タイピングするためのin vitro方法を含む。in vitroの体外の方法は、対象の1つまたは複数の遺伝子に存在するヒトの複数の遺伝的変異を、同時に、高い感度、特異性および再現性で遺伝子タイピングするためのものである。本発明の方法は、ヌクレオチドの変化、例えば挿入、重複および欠失の特定、ならびに所与の遺伝的変異に関する対象の遺伝子型の決定を可能にする。

【0069】

用語「遺伝的変異」または「遺伝子変異体」は、本明細書で用いるように、変異、多型および対立遺伝子の変異体を含む。変異または遺伝子変異体は、集団内の個体で、および種内の集団で見られる。

【0070】

用語「多型」は、すべての可能な配列がある集団の1%以上の割合で存在する、核酸のヌクレオチド配列中の変異を指す。特定の場合、前記変異がわずか1つのヌクレオチド(A、C、TまたはG)で起こるとき、それは一塩基多型(SNP)と呼ばれる。

【0071】

用語「遺伝子突然変異」は、すべての可能な配列がある集団の1%未満に存在する、核酸ヌクレオチド配列中の変異を指す。

【0072】

用語「対立遺伝子変異体」または「対立遺伝子」は、本明細書で区別なしで用いられ、同じ集団内の同じ遺伝子座に現れる多型を指す。

【0073】

したがって、遺伝的変異は1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、置換または挿入を含むことができる。一態様では、本方法によって遺伝子タイピングされる遺伝的変異は、SNPを含む。

【0074】

所与の遺伝子は、1つまたは複数の遺伝的変異を含むことができる。したがって、本方法は、1つまたは複数の遺伝子内の1つまたは複数の遺伝的変異の遺伝子タイピングで用いることができる。

【0075】

一般的に、個体はヒトである。

【0076】

一般的に、所与の1つの遺伝的変異について、3つの可能な遺伝子型がある。

AA:個体は、遺伝的変異Aに関してホモ接合である(例えば、野生型対立遺伝子に関してホモ接合である)。

10

20

30

40

50

BB: 個体は、遺伝的変異Bに関してホモ接合である(例えば、突然変異対立遺伝子に関してホモ接合である)。

AB: 個体は、遺伝的変異AおよびBについてヘテロ接合性である(例えば、1つの野生型および1つの突然変異対立遺伝子)。

【0077】

一態様では、本方法によって分析するSNPなどの遺伝的変異は、特定の表現型または病状と関連する。例えば、変異は個体の特定の赤血球抗原(したがってしばしば特定の血液型)と、またはIBDと、または医薬有害反応と関連してもよい。

【0078】

本方法によって評価することができるIBD関連の遺伝的変異の例としては、下の表1に記載のものがある。 10

【0079】

表1 IBDと関連する遺伝的変異

遺伝子多剤耐性タンパク質1(MDR1)の多型G2677T/A/C Ala893Ser/Thr/Pro

遺伝子多剤耐性タンパク質1(MDR1)の多型C3435T

遺伝子カスパーゼ動員ドメイン含有タンパク質15(CARD15)内の多型R702W、G908R、1007insC 20

遺伝子ミクロソームエポキシドヒドロラーゼ(EPHX1)内の多型T612C Y113H

遺伝子単球化学走性タンパク質1(MCP1)の多型(-2518)G/A

遺伝子インターロイキン10(IL10)内の多型(-1082)G/AおよびG43A(G15R)

遺伝子インターロイキン16(IL16)内の多型(-295)T/C

遺伝子Fasリガンド内の多型(-843)C/T

遺伝子核因子-B 1(NFKB1)内の多型94delATTGおよび-263A/G

遺伝子核因子-B阻害因子(NFKB1A)の3'UTR(G/A)内の多型

遺伝子シグナル伝達物質および転写活性化因子6(STAT6)内の多型G2964A

遺伝子インターロイキン18(IL18)のコドン35の多型TCA/TCC

遺伝子地中海熱遺伝子(MEFV)内の多型E474E、Q476Q、D510D、P588P、-177A/G、A165A、R202Q 30

遺伝子Discslarge、ショウジョウバエ、ホモロゲ、5(DLG5)内の多型113G/A(R30Q)

遺伝子コロニー形成刺激因子受容体1(CSFR1)の多型A2033T

遺伝子有機陽イオン輸送体(OCTN1、SLC22A4)の多型1672C/T(L503F)

有機陽イオン輸送体(OCTN2、SLC22A5)内の多型(-207G/C)

遺伝子Toll様受容体4(TLR4)内の多型Asp299GlyおよびThr399Ile

遺伝子インターロイキン1ベータ(IL1 β)内の多型(-511)A/Cおよび3954 TaqI RFLP

遺伝子スーパーオキシドジスムターゼ2(SOD2)内の多型Ala16Val

遺伝子ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体(PPARG)内の多型Pro12Ala

遺伝子細胞間接着分子1(ICAM1)内の多型K469E、R241G

遺伝子座炎症性腸疾患5(IBD5)内の多型IGR2060a_1、IGR2198a_1、IGR3096a_1

遺伝子熱ショックタンパク質70(HSP70-2)内の多型1267A/G(Gln351Gln) 40

遺伝子Toll様受容体9(TLR9)内の多型1237C/T

遺伝子メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ(MTHFR)内の多型C677T(V222A)

遺伝子インターロイキン4(IL4)内の多型(-590)C/T、(-34)C/T

遺伝子マンノース結合レクチン(MBL)内の多型Gly54Asp(A/G)、Gly57Glu(A/G)、Arg52Cys(C/T) 50

遺伝子アンギオテンシンノーゲン前駆体(AGT)内の多型(-6)A/T

遺伝子プラスミノーゲン活性化因子阻害因子(PAI)内の多型4G/5G

遺伝子腫瘍壞死因子(TNF- α)内の多型(-857C/T)、(-308G/A)、(-238G/A)

遺伝子TPMT内の多型G238C、G460A、A719G

対立遺伝子MICA*007およびMICA*008を識別する遺伝子主要組織適合複合体クラスI鎖関

連遺伝子A(MICA)の多型Trp14Gly、Thr24Ala、Met129Val、Lys173Glu、Gly175Ser	
遺伝子溶質担体ファミリー11、メンバー1(SLC11A1=NRAMP1)の対立遺伝子7に特有なプロモーター領域(-377~-222)の多型	
遺伝子CD14の多型(-159)T/C	
遺伝子CD16A=FCGR3Aの多型G4985T(Vai158Phe)	
遺伝子核内受容体サブファミリー1、I群、メンバー2(NR1I2)の多型-25385C/T	
遺伝子カスパーぜ補充ドメイン含有タンパク質8(TUCAN/CARD8/CARDINAL)の多型(T/A)(Cys10Stop)	
遺伝子B細胞内カッパL鎖遺伝子エンハンサ阻害因子(IKBL)の多型738T/C(Cys224Arg)	10
遺伝子腫瘍壞死因子レセプターサブファミリー、メンバー1B(TNFRSF1B=TNFR2)の多型G593AおよびT620C	
遺伝子マイトジエン活性化キナーゼキナーゼ1(MEKK1)の多型Asp643Asn	
対立遺伝子DQB1*0401およびDQB1*0402の同定のための遺伝子主要組織適合複合体、クラスII、DQ-1(HLA-DQ)の多型159G/A/Cおよび282C/T	
遺伝子主要組織適合複合体、クラスII、DR-1(HLA-DRB1)の対立遺伝子DR2、DR9、DRB1*0103、DR4、DR7、DRB3*0301およびDR3の同定のための多型109T/C、119T/C/G/A、122A/C/G/T、129A/G、161G/A/T、175A/T/C/G、184A/C/deIA、286C/A/T、305C/G	
遺伝子インターロイキン1受容体アンタゴニスト(IL1RN)の多型2018T/Cおよび2073C/T	
遺伝子インターロイキン1受容体、II型(IL1RB)の多型3954 C/T(TAQI)	
遺伝子Fas抗原の多型(-670)G/A	20
遺伝子カスパーぜ9(CASP9)の多型93 C/T	
遺伝子Toll様受容体1(TLR1)の多型G/C(R80T)	
遺伝子Toll様受容体2(TLR2)の多型A/G(R753G)	
遺伝子Toll様受容体6(TLR6)の多型T/C(S249P)	
遺伝子マトリックスマタロプロテイナーゼ3(MMP3)の多型5A/6A	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)の多型indel +32656	
遺伝子Discslarge、ショウジョウバエ、ホモログ、5(DLG5)内の多型DLG5_e26	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs20752817による多型	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs2975632による多型	30
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs3020207による多型	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs2075818による多型	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs2235099による多型	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs2075821による多型	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs2075822による多型	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs2907748による多型	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs5743368による多型	
遺伝子NOD-1タンパク質(NOD1=CARD4)のrs2289311による多型	
遺伝子メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ(MTHFR)の多型A1298C	
遺伝子N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)の多型Ile114Thr	40
遺伝子N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)の多型(A/G)Lys268Arg	
遺伝子エストロゲン受容体1(ESR1)のrs9340799による多型	
遺伝子エストロゲン受容体1(ESR1)のrs2234693による多型	
遺伝子地中海熱遺伝子(MEFV)の多型C/T V726A	
ビタミンD受容体(VDR)内のrs10735810による多型	
EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体3(EMR3)の多型(C/G)E127Q	
EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体1(EMR3)の多型(G/T)Q496K	
メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ1(MTHFD1)内の多型R653Q	
セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(SHMT1)内の多型1420(C/T)	
遺伝子N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)内の多型Gly286Glu	
遺伝子N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)内の多型Arg197Gln	50

遺伝子N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)内の多型191(G/A)
 遺伝子Toll様受容体5(TLR5)の多型Arg392Stop
 遺伝子細胞傷害性T細胞関連4(CTLA4)の多型A49G
 遺伝子MutL、大腸菌、ホモログ、1(MLH1)の多型D132H
 遺伝子メチオニンシンターゼレダクターゼ(MTRR)の多型66A/G
 遺伝子イノシントリホスファターゼ(ITPA)の多型94C/A
 遺伝子地中海熱遺伝子(MEFV)内の多型E148Q
 タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型、22(PTPN22)の多型R620W
 低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質5(LRP-5)内の多型3357A/G
 遺伝子細胞傷害性T細胞関連4(CTLA4)の多型C318T 10
 遺伝子ケモカイン、CCモチーフ、受容体5(CCR5)の多型rs333 32bpdel
 遺伝子インターロイキン6(IL6)の多型-174G/C
 遺伝子糖質コルチコイド受容体(GR ER22/23EK)のrs6190による多型
 遺伝子p53の多型Arg72Pro
 遺伝子Discs1large、ショウジョウバエ、ホモログ、5(DLG5)内の多型P1371Q
 遺伝子糖質コルチコイド受容体(GR ER22/23EK)のrs6189による多型
 低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質5(LRP-5)内の多型C135242T
 遺伝子低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質5(LRP-5)内の多型G121513A
 遺伝子低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質5(LRP-5)内の多型C141759T
 遺伝子低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質5(LRP-5)内の多型G138351A 20
 遺伝子プリン受容体P2X、リガンドゲートイオンチャネル、7(P2RX7)内の多型(-298)C/T
 遺伝子プリン受容体P2X、リガンドゲートイオンチャネル、7(P2RX7)内の多型(-838)G/T
 結腸の遺伝子腺腫様ポリボース (APC) 内の多型E1317Q
 遺伝子CD97(CD97)内の多型T64C

【0080】

本方法によって評価することができる特定の赤血球抗原と関連する遺伝的変異の例としては、下の表2に記載のものがある。

【0081】

表2 赤血球抗原と関連する遺伝的変異

30

遺伝子AB0のエクソン2内の多型GG87_88insG(遺伝子型04)(BC008)
 遺伝子AB0のエクソン4内の多型G188A+C189T(遺伝子型01v)(BC012)
 遺伝子AB0のエクソン6内の多型261delG(遺伝子型01/01v)(BC001)、C322T(遺伝子型05)(BC009)

遺伝子AB0のエクソン7内の多型C467T(P156L)(遺伝子型A2)(BC014)、G542A(遺伝子型08)(BC013)、T646A(遺伝子型Ax/01v)(BC015)、G703A(遺伝子型G235S)(B)(BC002)、C796A(遺伝子型L266M)(B)(BC003)、G802A(遺伝子型02)(B0004)、G803C(遺伝子型G268A)(B、cisAB-1)(BC005)、798-804insG(遺伝子型03、Ael)(BC007)、C893T(遺伝子型06)(BC010)、C927A(遺伝子型07)(BC011)、1059-1061delC(D FS354+21aa)(遺伝子型A2)(BC006)

遺伝子RHDのエクソン1内の多型C8G(S3C)(遺伝子型弱いDタイプ3)(BC040)、G48A(W16X)(遺伝子型RHD W16X)(BC046)、C121T(Q41X)(遺伝子型RHD Q41X)(BC047) 40

遺伝子RHDのエクソン2内の多型A178C、G203A、T307C(エクソンスキヤン)(BC016、BC017、BC018)、T161C(L54P)(遺伝子型DMH)(BC033)、G270A(W90X)(遺伝子型RHD W90X)(BC047)、T329C(L110P)(遺伝子型DVI)(BC028)

遺伝子RHDのエクソン3内の多型C340T(遺伝子型弱いDタイプ17)(BC043)、C410T(遺伝子型DIIIiv)(BC059)、C446A(A149D)(遺伝子型弱いDタイプ5)(BC041)、A455C(遺伝子型DIIIa、DIIIiv、DIVa)(BC060)、IVS3+1G>A(遺伝子型負の対立遺伝子)(BC049)

遺伝子RHDのエクソン4内の多型488del4負の遺伝子型対立遺伝子(BC050)、A497C(H166P)(遺伝子型DFW)(BC030)、T509C(M170T)(遺伝子型DOL)(BC027)、A514T(遺伝子型DFRI)(BC065)、T544A、G577A、A594T(遺伝子型DVI-I弱いDタイプ4)(エクソンスキヤン)、(BC019、BC

50

020、BC021)

遺伝子RHDのエクソン5内の多型G635T(G212V)(遺伝子型RHD G212V)(BC051)、T667G(遺伝子型DIIIa、弱いDタイプ4、Dva、DAR、DOL、DCS)(BC061)、G676C(遺伝子型DCS、G686A(遺伝子型DHR)(BC031)、G697C(E233Q)、(遺伝子型G712A(M238V)(DVI I、弱いDタイプ4、DV、DCS)(BC022、BC023)、A712G(遺伝子型負の対立遺伝子)(BC023)

遺伝子RHDのエクソン6内の多型T807G(遺伝子型偽遺伝子)(BC044)、T809G(遺伝子型弱いDタイプ1)(BC038)、G845A(G282D)(遺伝子型弱いDタイプ15、DIM)(BC037)、C848T(T283I)(遺伝子型DHMI)(BC029)、G854A(C285Y)(遺伝子型DIM)(BC032)、G885T(M295I)(遺伝子型負の対立遺伝子M295I)(BC053)、906insGGCT(遺伝子型負の対立遺伝子)(BC054)、G916A、A932G(コンセンサスエクソンスキャン)(BC062、BC063)、IVS6+1de14(遺伝子型負の対立遺伝子)(BC055)、遺伝子RHDのエクソン7内の多型G941T(G314V)(遺伝子型負の対立遺伝子)(BC056)、C990G(Y330X)(遺伝子型負の対立遺伝子)(BC057)、G1016A(G339E)(遺伝子型弱いDタイプ7)(BC042)、T1025C(I342T)(エクソンスキャン)(BC024)、G1048C(遺伝子型DIVa、DIVb)(BC094)、G1057A(G353R)(遺伝子型DNU)(BC034)、C1061A(A354N)(遺伝子型DII)(BC036)、G1063A(G355S)(遺伝子型DNB)(BC026)、T1073C(遺伝子型DWI)(BC035)

遺伝子RHDのエクソン8内の多型IV8+1G>A(遺伝子型負の対立遺伝子)(BC058)

遺伝子RHDのエクソン9内の多型G1154C(G385A)(遺伝子型弱いDタイプ2)(BC039)、A1193T(遺伝子型DIVb)(BC064)、G1227A(K409K)(遺伝子型K409K)(BC045)

遺伝子RHCEのエクソン1内の多型G106A(A36T)(遺伝子型Cx)(BC068)、A122G(Q41R)(遺伝子型Cw)(BC067)

遺伝子RHCEのエクソン2内の多型T307C(S103P)(遺伝子型RHc)(BC066)

遺伝子RHCEのエクソン3内の多型C410T(A137V)(BC059)

遺伝子RHCEのエクソン5内の多型C676G(P226A)(遺伝子型Ee)(BC025、BC069)、C733G(L245V)(遺伝子型VS)(BC070)

遺伝子RHCEのエクソン7内の多型G1006T(G336C)(遺伝子型VS-/VS+)(BC071)

遺伝子KELのエクソン6内の多型A697T(遺伝子型Kk)(BC073)、C698T(T193M)(遺伝子型Kk)(BC072)

遺伝子KELのエクソン8内の多型T961C(R281W)(遺伝子型KpaKpb)(BC074)、G962A(R281Q)(遺伝子型KpbKpc)(BC075)

遺伝子KELのエクソン10内の多型G1208A(S363N)(遺伝子型Kmod-1)(BC077)

遺伝子KELのエクソン17内の多型C1910T(L597P)(遺伝子型JsaJsb)(BC076)

遺伝子SLC14A1(血液型KIDD)のエクソン6内の多型I5AG>AA(遺伝子型Jknull)(BC079)

遺伝子SLC14A1(血液型KIDD)のエクソン9内の多型G838A(D280N)(遺伝子型JkaJkb)(BC078)、T871C(S291P)(遺伝子型Jknull)(BC080)

遺伝子DARC(血液型DUFFY)内の多型T-33C(遺伝子型FYGATA)(BC082)、G125A(D42G)(遺伝子型FYaFYb)(BC081)、C265T(R89C)(遺伝子型FYx)(BC083)

遺伝子GYPAのエクソン2内の多型C59T、G71A、T72G(S20L、G42E、G42E)(遺伝子型MN)(BC084、BC085)

遺伝子GYPBのエクソン4内の多型T143C(M48T)(遺伝子型Ss)(BC086)

遺伝子GYPEのエクソン3内の多型C790A(遺伝子型GpMUR MiIII)(BC089)、C850G(遺伝子型GpMUR MiIII)(BC090)

遺伝子GYPBのエクソン5内の多型C230T(遺伝子型U)(BC087)、I5+5GT(遺伝子型U)(BC088)

遺伝子SLC4A1(血液型DIEGO)のエクソン19内の多型T2561C(P854L)(遺伝子型DiaDib)(BC091)

遺伝子DOMBROCKのエクソン2内の多型A793G(遺伝子型DoaDob)(BC092)

遺伝子COLTONのエクソン1内の多型C134T(A45V)(遺伝子型CoaCob)(BC093)

【 0 0 8 2 】

本方法によって評価することができる医薬有害反応関連の遺伝的変異の例としては、以下の表3に記載のものがある。

【 0 0 8 3 】

10

20

30

40

50

表3 医薬有害反応と関連する遺伝的変異

アドレナリン作用性ベータ1受容体(ADRB1)内の多型Arg389Gly	
アドレナリン作用性ベータ2受容体(ADRB2)内の多型Arg16GlyおよびGln27Glu	
ドーパミン受容体D3(DRD3)の多型Ser9Gly	
セロトニン受容体2A(HTR2A)の多型His452TyrおよびT102C	
カテコール-0-メチルトランスフェラーゼ(COMT)の多型Val108Met	
グルタチオンSトランスフェラーゼクラス1(GSTP1)の多型Ile105Val	
アデューシン1(ADD1)の多型Gly460Trp	
DNA修復タンパク質XRCC1の多型Arg399Gln	10
チトクロームP450 1A1(CYP1A1)の多型Ile462Val	
アンギオテンシンII、タイプ1受容体(AGTR1)の多型A1166C	
プラジキニン受容体B2(BDKRB2)の多型C-58T	
アンギオテンシノーゲン(AGT)の多型Met235Thr	
チトクロームP450 2C9(CYP2C9)の多型C430T、A1075C、818delA、T1076CおよびC1080G	
チトクロームP450 2D6(CYP2D6)の多型H324P、V136V、V11M、C882G、C1038T、G4180C、A1847G、C-1584G、C100T、138insT、C1023T、G1659A、1707T/del、G1758A/T、1863ins9bp、1973insG、2539delAACT、2549A/del、2613delAGA、C2850T、G3183A、C3198G、T3277C、G4042Aおよび4125insGTGCCCACT	
チトクロームP450 2C8(CYP2C8)の多型A805T、G416A、A1196GおよびC792G	20
N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)の多型T341C、C481T、A803G、C282T、G590A、G857AおよびG191A	
チトクロームP450 2C19(CYP2C19)の多型G636A、G681A、C680T、A1G、IVS5+2T>A、T358C、G431AおよびC1297T	
グルタミン酸受容体イオンチャネル型NメチルD-アスパラギン酸塩(NMDA)2B(GRIN2B)の多型C2664T	
糖タンパク質P(ABCB1)の多型C3435T	
チオプリンS-メチルトランスフェラーゼ(TPMT)の多型A719GおよびG238C	
5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ(MTHFR)の多型C677T	
ブチルコリンエステラーゼ(BCHE)の多型Asp70GlyおよびAla539Thr	30
チトクロームP450 3A4(CYP3A4)の多型A-392G	
チトクロームP450 1A2(CYP1A2)の多型A-163C、A-3860G、G3534AおよびC558A	
チトクロームP450 3A5(CYP3A5)の多型G14690A、C3699T、G19386A、T29753CおよびG6986	
A	
セロトニントランスポーター(SLC6A4)のプロモーターの44bp欠失多型	
グルタチオンSトランスフェラーゼM3(GSTM3)の多型delAGA(allele*B)	
グルタチオンSトランスフェラーゼM1(GSTM1)の多型ヌル対立遺伝子	
グルタチオンSトランスフェラーゼn1(GSTT1)の多型ヌル対立遺伝子	
アポリポタンパク質E(APOE)の多型Cys112ArgおよびArg158Cys	
腫瘍壞死因子(TNF)の多型G-308A	40
インターロイキン10(IL10)の多型G-1082A	
【0084】	
表1~3で指摘したすべての遺伝子の配列は既知であり、GeneBank(NCBI)、GeneCard(Weizmann Institute of Sciences)およびSnpper.chip.org(Innate Immunity PGA)のウェブサイトで見られる。	
【0085】	
上記の遺伝的変異の1つまたは複数の臨床遺伝子タイピングを可能にすることによって、本方法は例えばIBDへの感受性もしくはその存在の診断、または医薬有害反応の診断で用いられる。その方法は、赤血球抗原の信頼できる判定も可能にし、血液型判定またはタイピングに役立つ。	50

【0086】

少なくとも1つの遺伝的変異が本方法で分析される。本方法は個体における複数の変異の同時遺伝子タイピングを可能にし、一般的に複数の変異が、通常、少なくとも10、12、14、16、18または20個の遺伝的変異が分析される。例えば、30、40、50、60、70、80もしくは100個の変異を、または最高200、300、400、500もしくは600個の変異を、例えば250、350もしくは450の変異を試験することができる。

【0087】

したがって、本明細書で記載されているように、本方法は表1～3のいずれか1つに記載の変異のすべて、またはそれらの表のいずれか1つに記載の変異から選択したものに関して、個体を遺伝子タイピングするために用いることができる。したがって、検出する変異は表1～3のいずれか1つを含むか、またはそれから選択することができる。

10

【0088】

本方法に従い、試験する遺伝的変異の少なくとも1つを含む核酸(標的DNA)を含む試料が提供される。核酸は、その特徴づける遺伝的変異を含む1つまたは複数の標的領域を含む。

【0089】

核酸は、核酸を含む任意の適切な生体試料から得ることができる。試料は、人体に由来する流体または組織、分泌物、細胞または細胞系から採取することができる。

【0090】

例えば、試料は人体に由来する血清、リンパ球、リンパ芽球腫細胞、線維芽細胞、血小板、単核細胞もしくは他の血液細胞を含む血液から、唾液、肝臓、腎臓、脾臓もしくは心臓から、尿または他のいかなる組織、流体、細胞もしくは細胞系から採取することができる。例えば、適切な試料は、口腔前庭からの細胞試料でよい。好ましくは、核酸は血液サンプルから得られる。

20

【0091】

一般には、核酸は従来の手法を使用して生体試料から抽出される。生体試料から抽出される核酸はDNAでもRNAでもよく、一般的には総RNAである。一般的には、研究する遺伝的変異が遺伝子のコード配列に位置している場合は、RNAが抽出される。RNAを生体試料から抽出する場合、その方法はRNAからcDNAを得るステップをさらに含む。これは、適切なプライマーを使う逆転写などの従来法を使用して実行することができる。次に、抽出したDNAまたは抽出したRNAから得られるcDNAに対して、それ以降の手法を実行する。用語DNAには、本明細書で用いるように、DNAおよびcDNAを含めることができる。

30

【0092】

一般に、試験する遺伝的変異は、例えば配列に関して既知であり、その特徴も明らかにされている。したがって、遺伝的変異を含む核酸領域は、当技術分野で既知の方法を使用して得ることができる。

【0093】

一態様では、同定する遺伝的変異を含むDNA領域(標的DNA領域)は、同定する遺伝的変異を含む増幅産物を得るために、増幅反応を受ける。増幅のために、任意の適切な手法または方法を用いることができる。一般には、その手法は、同定する遺伝的変異を含むすべてのDNA配列の(同時)増幅を可能にする。言い換えると、複数の遺伝的変異を分析する場合は、対応する標的DNA領域(変異を含む)のすべてを同時に増幅することが好ましい。単一工程(またはできるだけ少ない工程)で増幅を行うことは、方法を単純化する。

40

【0094】

例えば、多重PCRは、同定する遺伝的変異を含む標的領域を増幅することができる適切なオリゴヌクレオチドPCRプライマー対を用いて実行することができる。標的DNA領域の特異的増幅を可能にする、任意の適切なプライマー対を用いることができる。一態様では、プライマーは、可能な限り少ないPCR反応での増幅を可能にする。したがって、適切なオリゴヌクレオチドプライマー対および適切な条件を用いることによって、遺伝的変異を遺伝子タイピングするために必要な標的DNA領域のすべては、最少数の反応で遺伝子タイピ

50

ング(例えばDNAチップ)分析のために増幅することができる。赤血球抗原、IBDまたは医薬有害反応と関連する遺伝的変異を含む標的DNA領域の増幅に適したPCRプライマーは、本明細書で記載される。詳細には、表1のIBDと関連する遺伝的変異を含む標的DNA領域の増幅のためのPCRプライマーは、配列番号1~124および1317~1428で列挙される。表3の薬剤有害反応と関連する遺伝的変異を含む標的DNA領域の増幅のためのPCRプライマーは、配列番号125~254で列挙される。本方法は、これらのプライマーの1つもしくは複数、または列挙したプライマー対の1つもしくは複数の使用を含むことができる。

【0095】

一例において、増幅産物は増幅反応の間、検出可能な標識で標識することができる。目的は、分析している遺伝的変異を含む標的DNAの断片と固体支持体上に固定されたプローブとの間のハイブリダイゼーションを、後に検出することができる。標識された標的DNAのプローブへのハイブリダイゼーションの程度が高いほど、そのプローブ位置の検出可能な標識の強度は強い。

10

【0096】

増幅産物は、従来法によって標識することができる。例えば、標識されたヌクレオチドを増幅反応の間に組み込むことができ、または、標識されたプライマーを増幅のために用いることができる。

【0097】

標識化は、例えば蛍光または放射能マーカーまたは当業者に既知である他の任意のマーカーを用いて、直接的でよい。用いることができる蛍光団の例としては、例えばCy3またはCy5がある。代わりに、試料標識化のために例えばアルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼなどの酵素を用いることができる。用いることができる放射性同位体の例としては、例えば³³P、¹²⁵Iまたは、当業者に既知である他の任意のマーカーがある。一例において、増幅産物の標識化は、1つまたは複数の蛍光団で直接的または間接的に標識されたヌクレオチドを使用して実行される。別の例では、増幅産物の標識化は、1つまたは複数の蛍光団で直接的に、または間接的に標識されたプライマーを使用して実行される。

20

【0098】

標識化は、例えば化学的または酵素的方法を用いて、間接的でもよい。例えば、増幅産物は蛍光マーカーとコンジュゲートした特異結合対の1メンバー、例えばアビジンまたはストレプトアビジンを組み込むことができ、それがハイブリダイズするプローブはその特異結合対の他のメンバー、例えばビオチン(指標)に結合することができ、プローブ/標的結合シグナルの蛍光定量による測定を可能にする。別の例では、増幅産物は特異結合対の1メンバー、例えば、酵素(マーカー)と組み合わせた抗ジオキシゲニン抗体を組み込むことができ、それがハイブリダイズするプローブはその特異結合対の他のメンバー、例えばジオキシゲニン(指標)に結合することができる。プローブへの増幅産物のハイブリダイゼーションの後、酵素基質は発光性または蛍光性の生成物に変換され、シグナルは、例えばケミルミネセンスまたは蛍光分析によって読みとることができる。

30

【0099】

試験する遺伝的変異を含む核酸、例えば、(任意選択で標識した)増幅産物はさらに断片化反応を経ることができ、それによって、特定または分析する遺伝的変異を含むか含有するいくつかの断片化産物が得られる。一般的に、断片化はハイブリダイゼーション反応の効率を増加させる。断片化は、当技術分野で既知の任意の適切な方法によって、例えば増幅産物などの核酸を例えばDNA分解酵素などの適切な酵素と接触させることによって、実行することができる。

40

【0100】

核酸が、例えば増幅反応の間に予め標識されなかった場合(また、一般的に、固体支持体上でハイブリダイゼーション後増幅およびライゲーションが実行されない場合)、断片化産物を標識化することによって検出可能な標識による標識化をハイブリダイゼーション前に実行することができる。適切な標識化手法は当技術分野で既知であり、本明細書で記載されているように直接的または間接的であることができる。直接的標識化は、例えば

50

、蛍光団、酵素または放射性同位体の使用を含むことができる。間接的な標識化は、例えば蛍光団、酵素、その他を組み込む特異結合対の使用を含むことができる。例えば、増幅産物が増幅反応の間に標識されなかった場合は、断片化産物は1つまたは様々なマークー、例えば1つまたは様々な蛍光団による直接的または間接的な標識化を経ることができるが、当業者は他の既知のマークーを用いることができる。

【0101】

本方法によると、検出する遺伝的変異(標的DNA)を含む、増幅産物または断片化産物などの核酸は、適切な条件下でハイブリダイゼーションによって対応する遺伝的変異を検出することができるオリゴヌクレオチドプローブと接触させる。

【0102】

一般的に、ハイブリダイゼーション条件はプローブおよび対応する標的核酸の間の特異的ハイブリダイゼーションを可能にして特異的プローブ/標的ハイブリダイゼーション複合体を形成するが、DNAへ1つまたは複数のミスマッチを運ぶプローブの間のハイブリダイゼーションは最小化される。そのような条件は経験的に決定することができ、例えば、ハイブリダイゼーションの時間および/もしくは温度を変えることによって、ならびに/またはハイブリダイゼーションに続いて実施され、非特異性であるすべてのプローブ-DNA相互作用を排除するように設計されているアレイ洗浄工程の回数およびストリングエンサーを変えることによって決定することができる。

【0103】

その方法では、固体支持体または表面に置かれたプローブが提供される。プローブを所定のパターンに従って固体支持体上の位置に置き、「DNAチップ」を形成する。チップは、本方法で用いるために、例えばプローブの設計、検出する各遺伝的変異に対して提供されるプローブの数、および支持体上のプローブの分布に関して、いくつかの要求事項に適合しなければならないことが分かっている。これらは、本明細書で詳述する。発明者らは本方法で用いるために適切な遺伝子タイピングチップを開発し、したがって、一態様において本発明は、本明細書で記載されているように固体支持体上に置かれたか固定された複数のプローブを含むDNAチップまたは(マイクロ)アレイを提供する。

【0104】

一般に、固体支持体または固相は、試験する各遺伝的変異の検出に適切なオリゴヌクレオチドプローブを含む。チップを使用して試験する遺伝的変異の数および種類は、本明細書で記載されているように選択することができる。

【0105】

一般的に、選択されたハイブリダイゼーション条件下で遺伝的変異A(例えば野生型または正常な対立遺伝子)に特異的にハイブリダイズすることができる少なくとも1つのプローブ(プローブ1)、および遺伝的変異B(例えば突然変異対立遺伝子)に特異的にハイブリダイズすることができる1つのプローブ(プローブ2)がある。これらのプローブは、プローブ対を形成する。プローブ1は遺伝的変異Aの検出のためのものであり、プローブ2は遺伝的変異Bの検出のためのものである。一般的に、これらのプローブはAおよびB(例えば野生型および突然変異対立遺伝子)を区別するために用いることができる。

【0106】

プローブは、センスまたはアンチセンス鎖を検査することができる。一般的に、プローブ1および2は同じ核酸鎖(例えばセンス鎖またはアンチセンス鎖)を検査するが、場合によってはそれらのプローブは異なる鎖を検査することができる。一態様では、プローブ1および2は遺伝的変異の部位を除いて、同じ配列を有する。

【0107】

一例において、プローブ対内のプローブは同じ長さを有する。一部の態様では、2つ以上の対のプローブが遺伝的変異の分析のために提供され、それらのプローブのすべては同じ長さでよい。

【0108】

好みしくは1つを超えるプローブ対が、各遺伝的変異の検出のために提供される。した

10

20

30

40

50

がって、各遺伝的変異につき、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のプローブ対が提供されてもよい。一態様では、(少なくとも)2つのプローブ対が提供される。目的は、本方法で偽陽性と偽陰性の比率を低下させることである。

【0109】

例えば、所与の遺伝的変異に対して、

遺伝的変異A(例えば正常な対立遺伝子)にハイブリダイズすることができるプローブ1、遺伝的変異B(例えば突然変異対立遺伝子)にハイブリダイズすることができるプローブ2

、遺伝的変異A(例えば正常な対立遺伝子)にハイブリダイズすることができるプローブ3、
遺伝的変異B(例えば突然変異対立遺伝子)にハイブリダイズすることができるプローブ4
があってもよい。

10

【0110】

これらのプローブは、同じであるか異なる鎖を検査することができる。したがって一実施形態では、プローブ3および4はそれぞれプローブ1および2の相補性のプローブであり、相補鎖を検査するように設計されている。一態様では、各遺伝的変異の検出のために提供されるプローブは両方の鎖を検査することが好ましい。

20

【0111】

2つ以上の対のプローブを、上のような遺伝的変異の分析のために提供することができる。例えば、遺伝的変異が同じ鎖の4つの塩基のいずれか1つに存在する(例えば、3つの突然変異体の可能性がある)場合、各可能性を検出するために少なくとも1対のプローブを提供することができる。好ましくは、各可能性のために少なくとも2対のプローブが提供される。

20

【0112】

したがって、例えば、SNP G2677T/A/Cについては、G2677Tの検出のために少なくとも1対のプローブを、G2677/Aの検出のために1対を、およびG2677Cの検出のために1対を提供することができる。好ましくはこれらの置換のそれぞれのために、少なくとも2対のプローブが提供される。

30

【0113】

DNAチップで用いるために適切なオリゴヌクレオチドプローブを設計するために、当技術分野でいくつかの方法が既知である。

30

【0114】

「標準タイリング」方法を用いることができる。この方法では、一般的に4つの可能なヌクレオチドA、C、GおよびTが検査される中心位置を除いて参照配列とまったく相補性である、4つのオリゴヌクレオチドが設計される。この手法の例示的な例は、HIV-1の遺伝子タイピング用のDNAチップである(Affymetrix)。

40

【0115】

「代替タイリング」では5つのオリゴヌクレオチドが設計され、第5のものは配列内の可能な欠失を検査する。この手法の例は、p53内の変異を検出するDNAチップである(Affymetrix)。

【0116】

「ブロックタイリング」では、正常な配列にまったく相補性の4つのオリゴヌクレオチド、および突然変異体配列にまったく相補性の4つが設計される。変化するヌクレオチドは中心位置に置かれるが、4つの塩基(A、C、TまたはG)のうちの1つのミスマッチは、その調査が望まれるヌクレオチド位置の2ヌクレオチド前か後に置かれる。この手法の例は、シトクロムp450内の変異の検出のためのDNAチップである(RocheおよびAffymetrix)。

40

【0117】

さらなる例は、中心位置または0で生成される変化を特定するために、1つの位置だけではなく-4、-1、0、+1および+4の位置でハイブリッドの特異性を増加させるために「ミスマッチ」が用いられる、「代替ブロックタイリング」である。例は、1,500のSNPを検出するDNAチップである(Affymetrix)。

50

【0118】

これらの手法の任意の1つまたは複数を、本発明のためのプローブを設計するために用いることができる。好ましくは標準タイリングが、特に2対のプローブ、例えば上のような2対の相補性プローブと用いられる。したがって、オリゴヌクレオチド配列は、可変ヌクレオチドに連結する領域内の標的DNAまたは配列に相補性であることが好ましい。しかし、場合によっては、先に述べたように、1つまたは複数のミスマッチを導入することができる。

【0119】

本発明で用いるためのオリゴヌクレオチドプローブは、一般的に検査する塩基(遺伝的変異の部位)を、オリゴヌクレオチドの中央で提示する。一般にこのことはマッチしたプローブとミスマッチのプローブとの間の最良の識別を可能にするので、示差ハイブリダイゼーション方法が用いられる場合に、特にこのことがあてはまる。これらの方法では、一般的に、ハイブリダイゼーション後オンチップ增幅なしで、特異的で検出可能なハイブリダイゼーション複合体が形成される。例えば、精細な(一塩基)変異については、正常なものと突然変異対立遺伝子との間で異なる塩基は、一般的にプローブの中心位置に置かれる。挿入、欠失および重複の場合、正常なものと突然変異配列との間で異なる最初のヌクレオチドは、中心位置に置かれる。プローブの中央に突然変異を置くことは、特異性を最大にすると考えられている。

10

【0120】

ハイブリダイゼーション後オンチップ增幅(例えばライゲーションまたはプライマー伸長方法)が使用される場合、オリゴヌクレオチドプローブは一般的にプローブの3'末端で変化する塩基を提示する。OLA法が用いられる場合、ライゲーションを可能にするために、プローブ-標的複合体にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(直接的または間接的に標識される)も設計される。

20

【0121】

一般に、本発明で用いるためのプローブは、17~27のヌクレオチド、例えば19、21、23もしくは25個のヌクレオチド、または18、20、22、24もしくは26個のヌクレオチドを含むか、一部の実施形態では、それからなる(基本的に)。

【0122】

好ましくは、遺伝的変異の検出のために提供される個々のプローブは、選択されたハイブリダイゼーション条件下でそれぞれ正常なおよび突然変異の対立遺伝子に特異的にハイブリダイズすることができる。例えば、プローブ/標的複合体の融点は75~85°Cで見ることができ、ハイブリダイゼーションは1時間でよいが、より高いおよび低い温度、ならびにより長いまたはより短いハイブリダイゼーションでも十分である。

30

【0123】

各遺伝的変異(先に述べたような)の検出のために提供されるプローブは、一般的に上のような所与のハイブリダイゼーション条件下で、遺伝的変異AおよびB(例えば正常なおよび突然変異の対立遺伝子)を区別することができる。好ましくは、プローブの識別能力は、実質的に100%である。識別能力が100%でないならば、プローブは好ましくは再設計される。好ましくは、プローブ/標的複合体の融点は、75~85°Cで見られる。識別能力を試験する方法は、本明細書で記載される。

40

【0124】

一実施例では、遺伝的変異の検出のために提供されるプローブは両方の鎖を検査し、19~27の範囲のヌクレオチド長を有する。好ましくは、プローブは100%の識別能力を有し、プローブ/標的複合体の融点は75~85°Cである。

【0125】

一般的に、本方法で用いるためのプローブを得るためにいくつかのプローブが設計されて、例えばハイブリダイゼーション特異性および遺伝子変異体(例えば正常なおよび突然変異の対立遺伝子)を区別する能力について実験的に試験される。候補オリゴヌクレオチドプローブ配列は、先に述べたように設計することができる。これらは、例えば長さ、

50

鎖特異性、遺伝的変異の位置および標的DNA内の遺伝的変異に連続する配列との相補性の程度が異なることができる。プローブ対が設計されると、これらは、ハイブリダイゼーション特異性および識別能力について試験することができる。遺伝的変異AおよびB(例えば正常なおよび突然変異の対立遺伝子)を区別する特異的プローブの能力は、ハイブリダイゼーション条件、突然変異に連続する配列、および突然変異領域におけるその配列の二次構造に依存する。安定したハイブリダイゼーション条件を用いると、識別を最大にするために鎖特異性および長さなどの適切なパラメータを確立することができる。好ましくは、遺伝的変異は試験されるプローブの中心位置で維持される。

【0126】

プローブの識別能力を試験する方法は、本明細書で記載される。一般的に、下記のようにいくつかの候補プローブ対が提供されてトレーニング方法で用いられる。一般に2対のプローブ(プローブ1および2とプローブ3および4)が、その方法で試験される。例えば、両方の鎖(互いに相補性)を検査する2対のプローブを試験することができる。プローブを使用して3つの遺伝子タイピング群の間で100%の識別を得ることができない場合は、プローブは一般的に再設計される。このトレーニング方法のハイブリダイゼーション条件は、通常、安定して維持される。一般的には、プローブ/標的複合体の融点は、75～85である。

【0127】

例えば、両方の鎖(センスおよびアンチセンス)内で遺伝的変異(例えば正常な対立遺伝子)および他の遺伝的変異(例えば突然変異対立遺伝子)を検出する25ヌクレオチドのプローブから出発して、一般に平均して8つのプローブを実験的に試験して2つの明確な対を特定することができる。

【0128】

プローブは、適切なハイブリダイゼーション条件下で遺伝子変異体(例えば正常なおよび突然変異の対立遺伝子)の間で最大のハイブリダイゼーション特異性および識別能力を有するように選択される。例えば、所与の遺伝的変異の検出のためのプローブ、例えば2つのプローブ対は、一般に実質的に100%の識別能力を有する。一般的には、プローブ/標的複合体の融点は、75～85である。

【0129】

本明細書の方法を使用して、発明者らは表1のIBD関連遺伝的変異の検出に適した、オリゴヌクレオチドプローブを開発した。これらのプローブは、配列番号631～960および1429～1652で示す。プローブはプローブセット(合計133セット)に列挙し、各セットは所与の遺伝的変異の検出のためのものである。各セットには、少なくとも2対のプローブが記載される。

【0130】

発明者らは、表2の赤血球抗原関連遺伝的変異の検出に適した、オリゴヌクレオチドプローブも開発した。これらのプローブは、配列番号255～630で示す。プローブはプローブセット(合計94セット)に列挙し、各セットは所与の遺伝的変異の検出のためのものである。各セットには、少なくとも2対のプローブが記載される。

【0131】

発明者らは、表3の薬剤有害反応と関連する遺伝的変異の検出に適した、オリゴヌクレオチドプローブも開発した。これらのプローブは、配列番号961～1316で示す。プローブはプローブセット(合計89セット)に列挙し、各セットは所与の遺伝的変異の検出のためのものである。各セットには、少なくとも2対のプローブが記載される。

【0132】

一態様では、本発明は、配列番号255～630、631～960、961～1316または1429～1652で示す任意の1つまたは複数のオリゴヌクレオチドプローブ、プローブの対、またはプローブのセットに、および、本発明の遺伝子タイピング、診断または治療の方法での使用に関する。本発明は、さらに医薬での使用、例えば本明細書で記載の診断または治療の方法における使用のための、配列番号255～630、631～960、961～1316または1429～1652で示す

10

20

30

40

50

任意の1つまたは複数のオリゴヌクレオチドプローブ、プローブの対、またはプローブのセットに関する。本発明のチップは、列記されたプローブの対またはセットの1つまたは複数を含むことができる。

【0133】

一般に、プローブは支持体上に複製物として提供される。一般的に、各プローブの少なくとも4、6、8、10、12、14、16、18または20個の複製物が、特に6、8または10個の複製物が提供される。したがって、例えば支持体(またはDNAチップ)は、各遺伝的変異を検出するために用いる(少なくとも)4つのプローブのそれぞれについて10個の複製物を含むか含有することができる(すなわち40個のプローブ)。代わりに、支持体(またはDNAチップ)は、各遺伝的変異を検出するために用いる(少なくとも)4つのプローブのそれぞれについて8個の複製物を含むか含有することができる(すなわち32個のプローブ)。さらに、支持体(またはDNAチップ)は、各遺伝的変異を検出するために用いる(少なくとも)4つのプローブのそれぞれについて6個の複製物を含むか含有することができる(すなわち24個のプローブ)。プローブ複製物を使うことは、チップからのデータ解釈の歪みを最小にするのに役立ち、その方法の信頼性を改善する。

10

【0134】

一般に、支持体は1つまたは複数の対照のオリゴヌクレオチドプローブも含む。これらも上のように複製物として提供される。したがって、支持体(またはDNAチップ)は、ハイブリダイゼーション反応の陽性および/または陰性の対照として役立つ、支持体上に置かれた1つまたは複数のオリゴヌクレオチドをさらに含むことができる。ハイブリダイゼーション後増幅またはライゲーション反応をチップ上で実行する場合は、これらの反応の1つまたは複数の陽性または陰性の対照があつてもよい。

20

【0135】

一般的に、チップまたはアレイは、陽性対照プローブ、例えば標的ポリヌクレオチド分子内の配列に相補性であつてそれらとハイブリダイズすることが可能であることが知られているプローブ、外部対照DNAにハイブリダイズすることが知られているプローブ、および陰性対照プローブ、例えば標的ポリヌクレオチド分子内の配列に相補性ではなくてそれらとハイブリダイズしないことが知られているプローブを含む。チップは各標的に特異的な1つまたは複数の対照を、例えば2、3またはそれ以上の対照を有することができる。アレイのために少なくとも1つの対照があつてもよい。

30

【0136】

陽性対照は、例えばアレイの周辺部に沿って、またはアレイ全域にわたって対角線のストライプ状に合成することができる。各プローブのための逆の相補体を、陰性対照の役目を果たすようにプローブ位置の隣に合成することができる。別の例では、バックグラウンド(非特異性)ハイブリダイゼーションの測定に役立つように、他の生物種からの配列を陰性対照として用いることができる。

【0137】

上のように、支持体(またはDNAチップ)は、ハイブリダイゼーション反応の陽性および陰性の対照として役立つ、支持体上に置かれたいくつか(1つまたは複数)のオリゴヌクレオチドを含むことができる。通常、一般的にDNAチップを構成するサブアレイのそれぞれ1つ、例えば16は、いくつかの外部ハイブリダイゼーション対照が連結し、それらはグリッド内の点の位置をより容易に特定できるようにする基準点の役目を果たす。

40

【0138】

一例において、外部対照DNAのヌクレオチド配列は、以下の通りである(5' 3')。

CEH:GTCGTCAAGATGCTACCGTTAGGAGTCGTCAAGATGCTACCGTTAGGA- 配列番号1653

その検出のためのオリゴヌクレオチドの配列は、以下の通りである。

ON1:CTTGACGACTCCTGAACGG- 配列番号1654

ON2:CTTGACGACACCTGAACGG- 配列番号1655

【0139】

陽性対照プローブは、通常、すべての標的DNA試料と等しくハイブリダイズして、試験

50

プローブとの標的DNA(試料)のハイブリダイゼーションをそれと比較することができる参照シグナル強度を提供するように設計される。陰性対照は溶媒(DMSO)のみが支持体に適用されている「プランク」か、または標的、例えばヒトDNA(試験DNA)へのハイブリダイゼーションが皆無であるか最小限である選択された対照オリゴヌクレオチドを含む。プランクまたは陰性対照オリゴヌクレオチド構造物で検出されるいかなるシグナルの強度も、試料DNAおよびアレイの間の非特異的相互作用の指標であり、したがって、実際のプローブ-試料相互作用からのシグナルがそれから識別されなければならないバックグラウンドシグナルの尺度である。

【0140】

望ましくは、アレイ内の配列数は、遺伝的変異の検出に適した核酸の数が n である場合、陽性および陰性の対照の核酸の数が n' であるような数であり、 n' は一般的に0.01から0.4nである。

【0141】

一般に、支持体またはチップは遺伝子タイピングのために、特に、本方法に従って遺伝子タイピングするために適当である。一般的にチップは、少なくとも1つの、しかし好ましくは複数の遺伝的変異、一般的には少なくとも10、12、14、16、18または20の遺伝的変異の検出に適切なプローブを含む。例えば、30、40、50、60、70、80もしくは100個の変異を、または最高200、300、400、500もしくは600個の変異を、例えば250、350もしくは450の変異を試験することができる。

【0142】

遺伝的変異は、表1～3のいずれか1つに記載のものでよい。したがって、上で記載されているように、アレイは表1～3のいずれか1つに記載の変異のすべて、またはそれらの表のいずれか1つに記載の変異から選択したものに関して、個体を遺伝子タイピングするために適切なプローブを含むことができる。

【0143】

本DNAチップは、関心のある事実上いかなるヒト遺伝的変異、例えば対象とする疾患または抗原と関連するヒト遺伝的変異を検出するために、本方法と組み合わせて用いることができる。検出するそれらの遺伝的変異に適切なプローブが用いられる。対象とする疾患または抗原と関連する遺伝的変異が特定されるにつれて、それらの検出に適したプローブをチップ内に組み込むことができる。このためのプローブおよびDNAチップは、本発明の教示に従って設計することができる。

【0144】

本発明者らは対応するDNAチップを開発(設計および生産)することにより、IBD、既知のヒト赤血球抗原および医薬有害反応と関連する遺伝的変異の検出における本発明の臨床使用を設計、生産および検証した。

【0145】

したがって、特定の一実施形態において、本発明はIBDと関連する遺伝的変異の遺伝子タイピングのためのチップ(「IBD-chip」)に関する。一般的に、DNAチップは、IBDと関連する遺伝的変異の感度、特異性および再現性の良い同時検出を可能にする。そのような変異の非限定的例は、表1で示す。それにもかかわらず、その表に含まれる遺伝的変異の数は、他の遺伝的変異がその後特定され、IBDと関連づけられるにつれて、増加してもよい。したがって、チップによって検出可能な遺伝的変異は、表1に列挙したものまたはこれらから選択したものを含むか、または(基本的に)それらからなることができる。チップは、本明細書で記載されるこれらの遺伝的変異の検出に適したプローブを含む。一態様では、チップは配列番号631～960および1429～1652に記載のものから選択されるプローブを含む。これらのプローブはプローブセット(合計133セット)に列挙され、各セットは所与の遺伝的変異の検出のためのものである。各セットには、少なくとも2対のプローブが記載される。チップは少なくとも1対のプローブまたは少なくとも1セットのプローブ、または選択されたプローブセット、例えば、試験されている遺伝的変異に従い、少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130または133全セットを含むこと

10

20

30

40

50

ができる。チップは、表1の変異、または具体的に列挙されたものの代わりに、もしくはそれらに加えて、IBDと関連する他の変異の検出のための他のプローブを含むことができる。

【0146】

他の実施形態において、チップは赤血球抗原と関連する遺伝的変異の遺伝子タイピングのためのもの(「血液チップ」)である。一般的に、DNAチップは、決定された赤血球抗原と関連する遺伝的変異の感度、特異性および再現性の良い同時検出を可能にする。そのような変異の非限定的例は、表2で与えられる。それにもかかわらず、その表に含まれる遺伝的変異の数は、他の遺伝的変異がその後特定され、赤血球抗原と関連づけられるにつれて、増加してもよい。したがって、チップによって検出可能な遺伝的変異は、表2に列挙したものまたはこれらから選択したものを含むか、または(基本的に)それらからなることができる。チップは、本明細書で記載されるこれらの遺伝的変異の検出に適したプローブを含む。一態様では、チップは配列番号255～630に記載のものから選択されるプローブを含む。これらのプローブはプローブセット(合計94セット)に列挙され、各セットは所与の遺伝的変異の検出のためのものである。各セットには、少なくとも2対のプローブが記載される。チップは少なくとも1対のプローブまたは少なくとも1セットのプローブ、または選択されたプローブセット、例えば、試験されている遺伝的変異に従い、少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90または94全セットを含むことができる。チップは、表2の変異、または具体的に列挙されたものの代わりに、もしくはそれらに加えて、赤血球抗原と関連する他の変異の検出のための他のプローブを含むことができる。

10

20

30

【0147】

他の実施形態において、チップは医薬有害反応と関連する遺伝的変異の遺伝子タイピングのためのもの(「薬剤チップ」)である。一般的に、チップは、医薬有害反応と関連する遺伝的変異の感度、特異性および再現性の良い同時検出を可能にする。非限定的例は、表3で与えられる。それにもかかわらず、その表に含まれる遺伝的変異の数は、他の遺伝的変異がその後特定され、これらの有害反応と関連づけられるにつれて、増加してもよい。したがって、チップによって検出可能な遺伝的変異は、表3に列挙したものまたはこれらから選択したものを含むか、または(基本的に)それらからなることができる。チップは、本明細書で記載されるこれらの遺伝的変異の検出に適したプローブを含む。一態様では、チップは配列番号961～1316に記載のものから選択されるプローブを含む。これらのプローブはプローブセット(合計89セット)に列挙され、各セットは所与の遺伝的変異の検出のためのものである。各セットには、少なくとも2対のプローブが記載される。チップは少なくとも1対のプローブまたは少なくとも1セットのプローブ、または選択されたプローブセット、例えば、試験されている遺伝的変異に従い、少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、または89全セットを含むことができる。チップは、表3の変異、または具体的に列挙されたものの代わりに、もしくはそれらに加えて、医薬有害反応と関連する他の変異の検出のための他のプローブを含むことができる。

【0148】

IBDチップ、血液チップまたは薬剤チップは、それぞれIBD、赤血球抗原または薬剤有害反応と関連しない遺伝的変異の検出のためのオリゴヌクレオチドプローブを、さらに含むことができる。例えば、チップは他の(関連する)状態または他の(関連する)抗原と関連する、SNPなどの遺伝的変異の検出のためのプローブを含むことができる。一般的に、IBDチップ、血液チップまたは薬剤チップにおいて、それぞれIBD、赤血球抗原または薬剤有害反応と関連する遺伝的変異(例えば表1、2または3に記載のもの)の検出に適した核酸数は、アレイ内の核酸の少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上に相当する。

40

【0149】

一般に支持体またはチップは300から40000個の、例えば400から30000個または400から20000個の核酸(プローブ)を有する。チップは、1000から20000個のプローブ、例えば1000から15000個または1000から10000個または1000から5000個を有することができる。適切な

50

チップは2000から20000個、2000から10000個または2000から5000個のプローブを有することができる。例えば、チップは1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、12000、14000、16000、18000または20000個のプローブを有することができる。400から1000個のプローブ、例えば400、500、600、700、800、900または950のプローブのより小さなチップも想定される。

【0150】

一般に、本発明のアレイまたはチップは、結合(例えばハイブリダイゼーション)部位またはプローブの整然としたアレイを有する支持体または表面を含む。したがって、支持体上のプローブの配置は予め決められる。各プローブ(すなわち、各プローブ複製物)は固体支持体上の既知の所定位置に位置するので、各プローブの識別情報(すなわち、配列)はアレイ内のその位置から決定することができる。一般的に、プローブは所定のパターンで一様に分布する。

10

【0151】

好ましくは、支持体上に置かれたプローブは所定の配置を維持するが、遺伝的変異によってグループ化されず、ランダム分布を有する。一般的に、それらは同じ遺伝的変異中にもグループ化されない。所望により、このランダム分布は、常に同じであってもよい。したがって、一般的にプローブは所定パターンに従って固体支持体(アレイ)上に置かれるので、それらは、例えばDNAチップを構成する2つの領域の間で一様に分布するが、その特徴づける遺伝的変異に従ってグループ化されない。このようにアレイ全体にプローブ複製物を分布させることは、例えばアレイ全域にわたるバックグラウンドノイズの不均一分布に起因する、シグナルおよびデータ解釈の歪みを、すべて低減または排除するのに役立つ。

20

【0152】

上で説明したように、プローブはサブアレイ内の支持体上に配置することができる。

【0153】

複数のプローブが置かれる支持体は、オリゴヌクレオチドを結合することができる任意の固体支持体でよい。オリゴヌクレオチドを結合または固定することができ、DNAチップの抗体生産で用いることができる事実上いかなる支持体も、本発明で用いることができる。例えば、前記支持体は、非多孔質材料のもの、例えばガラス、シリコーン、プラスチック、または、膜もしくはフィルタのような多孔質材料(例えば、ナイロン、ニトロセルロース)、またはゲルでよい。一実施形態では、前記支持体はガラススライドなどのガラス製支持体である。

30

【0154】

マイクロアレイは、所与のポリヌクレオチド配列を含むプローブを選択した後、固体支持体または表面にそのようなプローブを固定することによって一般に調製される。プローブは、本明細書で記載されているように設計、試験および選択することができる。一般に、プローブはDNA配列を含むことができる。一部の実施形態において、プローブはRNA配列を、またはDNAおよびRNAのコポリマー配列を含むことができる。プローブのポリヌクレオチド配列は、DNAおよび/またはRNAの類似体、またはその組合せを含むこともできる。例えば、プローブのポリヌクレオチド配列は、完全なゲノムDNA、またはその部分断片であってもよい。プローブのポリヌクレオチド配列は、合成オリゴヌクレオチド配列などの合成されたヌクレオチド配列でもよい。プローブ配列は、in vivo酵素処理、in vitro酵素処理(例えば、PCR)、またはin vitroで非酵素的に合成することができる。

40

【0155】

マイクロアレイまたはチップは、いくつかの方法で実施することができる。いかように生産されても、マイクロアレイは一般的にある特性を共有する。アレイは再現性があるので、所与のアレイの複数のコピーを生産して互いと容易に比較することを可能にする。好ましくは、マイクロアレイは、結合(例えば核酸ハイブリダイゼーション)条件下で安定している材料から作製される。好ましくは、マイクロアレイは小さく、例えば、0.25～25または0.5～20cm²、例えば0.5～20cm²または0.5～15cm²、例えば1～15cm²または1～10cm²、例えば2、4、6または8cm²である。

50

【0156】

プローブは、支持体の表面にオリゴヌクレオチドを固定化する従来の手法を使用して、本支持体に結合することができる。用いる手法は、数ある因子の中でも用いる支持体の性質(多孔性(膜、微小粒子、その他)または非多孔性(ガラス、プラスチック、シリコーン、その他))によって決まる。一般には、プローブは、非共有結合の固定化手法を用いて、または、化学プロセスによる支持体へのプローブの共有結合に基づく固定化手法を用いて、支持体上に固定化することができる。

【0157】

非多孔性支持体(例えばガラス、シリコーン、プラスチック)の調製は、一般に、反応基(例えばアミノ、アルデヒド)による前処理、または特異結合対のメンバー(例えばアビジン、ストレプトアビジン)による支持体表面の被覆を必要とする。同様に、支持体上のプローブの特異的な固定化を達成するために、一般にチオール、アミノまたはビオチンなどの対応する基によって、固定化するプローブを前活性化することが望ましい。

10

【0158】

支持体上へのプローブの固定化は、従来法によって、例えば、支持体上のプローブの *in situ*合成に基づく手法(例えば写真平版、直接化学合成、その他)によって、または、例えば、対応する前合成プローブを置くロボットアームに基づく手法(例えば無接触印刷、接触印刷)によって実行することができる。

20

【0159】

一実施形態では、支持体はガラススライドであり、この場合、確立された複製物数(例えば、6、8または10個)のプローブが、ガラススライド上へのオリゴヌクレオチドの沈着によるDNAチップの自動生産のための器材(「マイクロアレイヤー」)を使用して、前処理されたガラススライドに、例えばアミノシランでコーティングされたガラススライドに印刷される。沈着は適切な条件下で、例えば、紫外線および加熱(80)による架橋により、沈着工程の間湿度を保ち温度を制御することによって、一般的に40~50%の相対湿度および一般的に20 の温度で実行される。

20

【0160】

複製物プローブは、一般的にDNAチップを構成する領域またはセクター(サブアレイ)の間に、一様に分布する。複製物数およびDNAチップ全体へのそれらの一様分布は、実験結果に影響を及ぼすことがある印刷工程に起因する変動性を最小にする。同様に、陽性および陰性のハイブリダイゼーション対照(本明細書で記載される)を、印刷してもよい。

30

【0161】

各複製物のハイブリダイゼーションシグナル、バックグラウンドノイズ、特異性、感度および再現性、ならびに印刷後のスポットされたプローブ構造物の形態の変異に起因する差に関してDNAチップの製造工程の質を制御するために、市販のDNAを用いることができる。例えば、DNAチップの印刷の品質管理として、ハイブリダイゼーションを市販のDNA(例えばk562 DNA高分子量、Promega)で実行することができる。

【0162】

第1に、印刷されたスポットの形態および大きさを分析する。対照DNAとのハイブリダイゼーションにおいて、遺伝子型の決定の信頼性を判定するための以下に記すパラメータに固執する。特にシグナル強度およびバックグラウンドノイズの間の関係、同じプローブの複製物コピーの間の平均特異性および感度および再現性。この方法は、対照DNAの正しい遺伝子型の決定を可能にする。

40

【0163】

上のように、本方法に従い、検出する遺伝的変異を含む核酸試料(標的DNA)、例えば増幅または断片化産物は、標的DNAおよび対応するプローブの間でハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、本明細書で記載されるプローブアレイと接触させる。このように、標的核酸および対応するプローブの間で、特異ハイブリダイゼーション複合体が形成される。

【0164】

50

例えば断片化産物と支持体上に置かれた対応する遺伝的変異を検出することができるプローブとのハイブリダイゼーションは、従来からの方法および装置を使用して実行することができる。1つの例では、ハイブリダイゼーションは自動ハイブリダイゼーションステーションを使用して実行される。ハイブリダイゼーションが起こるよう、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、例えば、断片化産物をプローブと接触させて置く。安定したハイブリダイゼーション条件を使うことは、本明細書で記載される遺伝的変異AおよびBの間の差、例えば野生型および突然変異体の配列の間の差を最大にするために、プローブの長さおよび配列の最適化を可能にする。

【0165】

1つの例において、この方法は示差ハイブリダイゼーションに、特にハイブリダイゼーションシグナルの増加に依存する。この方法は、標的DNAおよび対応するプローブの間の特異ハイブリダイゼーション複合体の形成を含む。したがって、野生型配列を抱える標的DNAは野生型配列を検出するように設計されたプローブにハイブリダイズするが、突然変異体配列を抱える標的DNAはその突然変異配列を検出するように設計されたプローブにハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション複合体は、本明細書で記載される手段によって検出可能に標識される(例えば、標的DNAは直接的に標識されるか、標的およびプローブはその標識がハイブリダイゼーション後にだけ検出可能な方法で標識される)。所定プローブ位置における検出可能な標識(あるとすれば)の強度を検出することによって、試料中の標的DNAの性質を判定することが可能である。この場合、本明細書で記載されるように、プローブ(対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド、ASO、とも呼ばれる)は、好ましくは中心位置で可変ヌクレオチドを有する。

【0166】

他の例では、固体支持体(チップ)上の標的DNAとプローブとのハイブリダイゼーションの後に、例えばプライマー伸長またはライゲーション、例えばオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA)技術を用いたオンチップ增幅が可能である(Eggerding FA、Iovanni sci DM、Brinson E.、Grossman P.、Winn-Deen E.S.1995 Human Mutation、5:153～65頁)。この場合、支持体上のプローブは、プローブの3'末端に変化するヌクレオチドを一般的に含む。

【0167】

30 標識化は、ハイブリダイゼーション後增幅の間に実行することができる。標識化は、例えば、蛍光団、酵素、放射性同位体、その他を使う直接的な標識化によってもよく、または、例えば、蛍光団、酵素その他を組み込む特異結合対を使う間接的な標識化によってもよく、従来法、例えば、増幅または断片化産物の標識化に関して前に指摘したようなものを用いてもよい。

【0168】

例えは「プライマー伸長」法を用いて、ハイブリダイゼーション後の増幅を行うことができる。一般的に、ハイブリダイゼーションの後、ハイブリッドオリゴヌクレオチドの伸長反応が支持体(例えばガラススライド)の上で実行される。伸長は直接的にまたは間接的に標識されたヌクレオチドで実行することができ、伸長は、オリゴヌクレオチドの3'末端が増幅産物と完全にハイブリダイズする場合にだけ起こる。

【0169】

40 プライマー伸長は遺伝子型識別のための既知の方法であり(Pastinen T、Raitio M、Lindroos K、Tainola P、Peltonen L、Syvanen AC.2000 Genome Research 10:1031～42頁)、いくつかの異なる方法で実施することができる。一般的に用いられる手法では、一組の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブが、標的配列とハイブリダイズするように設計される。プローブは、それらの3'末端ヌクレオチドがお互いに異なり、それは各プローブについて所与の位置の可能な多形ヌクレオチドの1つを相補するように設計されている。

【0170】

プローブの3'ヌクレオチドが試験配列を相補する場合は、引き続いて起こる塩基対形成

10

20

30

40

50

により、直接的または間接的に標識することができるさらなるヌクレオチドを組み込むことによってDNAポリメラーゼがオリゴヌクレオチドプライマーを伸長することができる、それによって伸長したプローブおよび伸長していないプローブの以降の同定が可能になる。伸長に成功したプローブは、それらの3'末端にSNPと相補性のヌクレオチドを抱えるので、試験試料の遺伝子型の判定が可能になる。同様の手法、例えば、増幅抵抗性突然変異系(Amplification Refractory Mutation System、ARMS)も開発されている。

【0171】

あるいは、例えばOLA法を用いて、ハイブリダイゼーション後のライゲーションを行うことができる。ハイブリダイゼーションの後、標識オリゴヌクレオチドによるハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドのライゲーション反応が、支持体(例えばガラススライド)上で実行される。支持体上のプローブの3'末端が標的DNA(例えば増幅産物)と完全にハイブリダイズする場合にだけ、ライゲーションが起こる。

10

【0172】

オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA)は、SNPを調べるための他の方法である(Eggerding FA、Iovannisci DM、Brinson E.、Grossman P.、Winn-Deen E.S.1995 Human Mutation、5:153～65頁)。OLAは、変化する塩基を含む標的DNAの隣接部分にハイブリダイズする、1対のオリゴヌクレオチドプローブを使う。多形ヌクレオチドの5'側とハイブリダイズするように設計されたプローブは、標的対立遺伝子の1つに対する対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)である。このASOの3'末端の最後の塩基は、標的DNAの多型部位に置かれる。一般的にASOは、その5'末端に、ビオチンがストレプトアビシンとともに経る高度特異的相互作用によってオリゴヌクレオチドを回収するためにその後用いることができる「フック」として機能する、ビオチン分子も有する。

20

【0173】

対の3'側または右側のオリゴマーは、共通オリゴマーである(その配列は、それを用いて試験することが望まれる2つ以上の異なる対立遺伝子に関して同一である)。共通オリゴマーは、標的DNAの多型に隣接する不变部位に置かれ、その3'末端は蛍光標識される。

【0174】

ASOが標的配列と完全に相補性であるならば、アニールされるとASOは完全にハイブリダイズしてその標的に対してフラットな状態になり、DNAリガーゼによるASOと共通オリゴマーとの共有結合を可能にする。ライゲーション反応の後、ビオチンフックを用いてASOが除去され、また、例えば、蛍光標識された共通オリゴマーも除去されて、検出可能な蛍光を生じる。

30

【0175】

ASOが標的配列と完全にマッチしない場合、ハイブリダイゼーションは不完全であり、オリゴマーの3'塩基は標的DNAと塩基対を形成せず、したがってライゲーションが阻害される。これらの状況下でビオチンフックを用いてASOを除去する場合、共通オリゴヌクレオチドは除去されないので除去した分子中に例えば蛍光などの検出可能な標識はない。

【0176】

1塩基が異なる2つの既知対立遺伝子を区別するために、3つのオリゴヌクレオチドが必要である。2つは、単一の3'末端塩基だけが互いに異なる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)である。第1のものは1つの対立遺伝子に相補性であり、第2は第2の対立遺伝子に相補性である。第3のオリゴヌクレオチドは、変化する塩基に隣接する不变配列に相補性である。

40

【0177】

ハイブリダイゼーション(および任意選択でハイブリダイゼーション後増幅)が起こると、各プローブ位置(対照プローブを含む)の検出可能な標識の強度を測定することができる。シグナルの強度(原強度値)は、各プローブでのハイブリダイゼーションの尺度である。

【0178】

各プローブ位置(各プローブ複製物)の検出可能な標識の強度は、任意の適切な手段を使用して測定することができる。選択される手段は、標識の性質による。一般に、スキヤナ

50

などの適切な装置は、ハイブリダイズして現像されたDNAチップの画像を収集する。画像は取り込まれて、定量化される。

【0179】

1つの例において、例えば蛍光標識を用いる場合、ハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイズされて開発されたDNAチップはハイブリダイゼーションが起こった部分で標識化の強度を定量化するためにスキャナに置かれる(任意選択でハイブリダイゼーション後の増幅またはライゲーションの後)。事実上任意のスキャナを用いることができるが、一実施形態では、蛍光共焦点スキャナが用いられる。この場合、DNAチップは前記装置に置かれ、レーザーによる励起のために蛍光團によって放出されるシグナルは、ハイブリダイゼーションが起こったポイントでのシグナル強度を定量化するためにスキャンされる。本発明に従って用いることができるスキャナの非限定例としては、Axon、Agilent、Perkin Elmer、その他の会社によって市販されるスキャナがある。

10

【0180】

一般に、各プローブ位置(すなわち各プローブ複製物)の検出可能な標識の強度の測定においては、バックグラウンドノイズが考慮されて除去される。バックグラウンドノイズはプローブアレイへの非特異的結合に起因し、アレイに含まれる対照によって測定することができる。バックグラウンドシグナル強度が測定されると、クリーン強度値を得るために、これを各プローブ複製物の原強度値から引くことができる。一般的に、個々の構造物の近くで検出されるシグナル強度に基づく局所のバックグラウンドは、原シグナル強度値から引かれる。このバックグラウンドは、各構造物を囲む所定領域(例えばプローブ位置に集中するX、Yまたは $Z \mu\text{m}^2$ の領域)内のシグナル強度から決定される。バックグラウンドシグナルは、一般的に「ブランク」対照(溶媒のみ)の局所シグナルから測定される。多くの場合、シグナル強度の測定で用いるスキャナなどの装置は、バックグラウンドシグナルを測定する手段となる。

20

【0181】

したがって、例えば標識が蛍光標識である場合、各プローブ複製物のために絶対蛍光値(原強度値)を集めることができ、各プローブ位置でのシグナル強度の「クリーン」値を求めるために、各プローブ複製物と関連するバックグラウンドノイズも評価することができる。

30

【0182】

標的DNAがチップにハイブリダイズされて検出可能な標識の強度がチップ上のプローブ複製物の位置で測定されると(原強度値)、チップからの強度データを個体の遺伝子型と関連させることができる方法(モデル)を提供する必要がある。

【0183】

本発明者らは、このことは適切なアルゴリズムを強度データに適用することによって可能であることを発見した。本発明者らによって開発されたアルゴリズムおよびコンピュータソフトウェアは、臨床場面での使用を可能にするために十分な感度および再現性を有する遺伝的変異の分析を可能にする。アルゴリズムは、所与の各遺伝的変異について3つの遺伝子型AA、ABおよびBBのそれぞれを特徴づける3つの線形関数を用いる。この方法は一般に、各プローブの平均強度値を計算するために、各プローブの複製物のすべての強度値を照合するものである。任意選択で、各複製物の原強度値は、(クリーンな強度値を得るために)各複製物の強度値を照合する前にバックグラウンドノイズを考慮して修正することができる。

40

【0184】

一般には、所与の遺伝的変異について、チップの分析および解釈は、

(a)遺伝的変異の検出のために提供された少なくとも4つのプローブ(プローブ1、2、3および4)のそれぞれについて、各複製物で検出可能な標識の強度(原強度値)を提供するステップであって、

プローブ1は遺伝的変異A(例えば正常な対立遺伝子)を検出し(それと特異的にハイブリダイズすることができ)、プローブ2は遺伝的変異B(例えば突然変異対立遺伝子)を検出し(

50

それと特異的にハイブリダイズすることができ)、

プローブ3は遺伝的変異A(例えば正常な対立遺伝子)を検出し(それと特異的にハイブリダイズすることができ)、プローブ4は遺伝的変異B(例えば突然変異対立遺伝子)を検出し(それと特異的にハイブリダイズすることができ)、

プローブ1および2は第1のプローブ対を形成し、プローブ3および4は第2のプローブ対を形成するステップと、

(b)各複製物の原強度値を任意選択で修正してバックグラウンドノイズを考慮し、それによってクリーンな強度値を得るステップと、

(c)各プローブの各複製物の(任意選択でクリーンな)強度値を照合し、各プローブの平均強度値を決定するステップと、

(d)比率1および2を計算するステップであって、

比率1=プローブ1の平均強度値/プローブ1の平均強度値+プローブ2の平均強度値
および

比率2=プローブ3の平均強度値/プローブ3の平均強度値+プローブ4の平均強度値
であり、

(e)3つの可能な遺伝子型AA、ABおよびBBのそれぞれを特徴づける3つの線形関数のそれぞれに比率1および2を入力するステップであって、

関数1は遺伝子型AAを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数2は遺伝子型ABを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数3は遺伝子型BBを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

これらの線形関数は、変数比率1および2に附属する係数によって形成されるステップと、

(f)3つの線形関数のうちいずれが最も高い値を有するか決定するステップと、

(g)それによって、その遺伝的変異について個体の遺伝子型を決定するステップとを含む。

【0185】

したがって、その個体の遺伝子型に対応する線形関数は、最も高い絶対値を有する。

【0186】

本発明者らは、複製物および複製物から計算される平均値の使用は本発明の信頼できる働きにとって重要であることを発見した。これらの関数を使うことは、分析速度を上げてより良い識別を可能にする。

【0187】

好ましくは、3つの遺伝子型の間の識別能力は、(約)100%である。識別が100%未満である場合、プローブは好ましくは再設計される。

【0188】

各プローブ複製物の原強度値は、上述の方法によって求めることができる。したがって、プローブ配列および複製物は本明細書で記載されるように選択することができる。ある例では、1遺伝的変異につき4つのプローブが用いられ、1プローブにつき6、8または10個の複製物が用いられる。

【0189】

一般的に、各プローブ複製物のクリーンな強度値を得るために原強度値を修正することは、バックグラウンドノイズを原値から差し引くことを含む。バックグラウンドノイズは、一般的に本明細書で記載されている適切な対照を使用して測定される。

【0190】

一般的に平均強度値を計算することは、極値または異常値を排除することを含む。したがって、各プローブ複製物からの(任意選択でクリーンな)強度値を照合する場合は、外れ値を特定してさらなる考慮から除外することができる。一実施形態では、外れ値は得られ

た値の10%から50%を、例えば、15、20、25、30、35、40または45%を占める。一実施形態では、値の40%が排除される。一実施形態では、4つのプローブが1プローブにつき6、8または10個の複製物で用いられ、極値または異常値は得られた値の10%から50%を占める。

【0191】

いくつかの適切な線形関数は、当技術分野において既知である。これらの関数は、本発明の目的のために、線形判別分析で用いることができる。

【0192】

したがって、一態様では、本発明は、上で(ステップeおよびf)既定されたような3つの線形関数の比率1および2を使用して、所与の遺伝的変異に関して遺伝子型を決定するための計算の方法またはモデル(アルゴリズム)に関するものである。したがって、この方法は、一実施形態では、比率1および2の入力から遺伝子型(AA、ABまたはBB)の出力を生むことができる。この方法は、比率1および2の一方または両方を計算することを含むことができる(ステップd)。一部の実施形態において、この方法は、各プローブの平均強度値を計算すること(ステップc)、および/または各プローブ複製物のクリーンな強度値を計算すること(ステップb)をさらに含む。したがって、モデルへの入力は、平均強度値、複製物のクリーンな強度値または複製物の原強度値の1つまたは複数を含むことができる。この方法は、各プローブ複製物の原強度値を決定すること(ステップa)をさらに含むことができる。この方法は、上のステップの1つまたは複数を含むことができる。

10

【0193】

上記の方法を実行するために、遺伝的変異に関する遺伝子型が既知である対照個体からのデータを用いるトレーニング法で、線形関数の係数を最初に決定しなければならない。トレーニングのための方法は、当技術分野において既知である。一般的にそのような方法において、出力(この場合は、遺伝子型)が既知である入力データ(この場合、一般的に比率1および2)が用いられる。係数は3つの線形方程式に無作為に代入されて、出力が計算される。その出力に基づいて1つまたは複数の係数が変更され、他の出力を生成するために入力データが再び入力される。所望の出力を最適化する係数が得られるまで、この過程は継続される。これらの最適化された係数は、次に、その方法が試験データに適用されるとき(出力がまだ知られていない場合)、線形関数で用いる。

20

【0194】

本モデルをトレーニングするために、遺伝子型AA(例えばホモ接合野生型)を有するn名の対照個体、遺伝子型AB(ヘテロ接合性)を有するn名の対照個体および遺伝子型BB(例えばホモ接合突然変異体)を有するn名の対照個体のために、比率1および2を得る。これらの比率は、上述の方法を使用して得ることができる。比率は上記のように入力され、AA、ABおよびBB群の間の差を最大にする3つの線形関数が得られるまで、係数は識別分析において変化させられる。これらの係数は、次に、モデルが未知の試験試料に用いられるとき(遺伝子型が予め定まっていない)、3つの関数で用いる。

30

【0195】

したがって一態様において、本発明は本遺伝子タイピング方法で用いるための線形関数を導き出す方法を提供する。この方法は一般的に、遺伝的変異に関して遺伝子型AA(例えばホモ接合野生型)を有するn名の対照個体、遺伝子型AB(ヘテロ接合性の)を有するn名の対照個体および遺伝子型BB(例えばホモ接合突然変異体)を有するn名の対照個体について、記載されている遺伝子タイピング方法の工程を実行することを含む。各プローブ複製物で得られた強度値を記載されているように集め、アルゴリズムを適用する。

40

【0196】

遺伝子タイピング方法で記載したように、アルゴリズムの適用は各プローブの平均強度値を計算することを含み、アルゴリズムは、所与の遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABおよびBBのそれぞれを特徴づけることを目的とした3つの線形関数を用いる。識別分析において遺伝子型の間の相違を最大にする関数が導き出されるまで、係数を反復して関数に挿入する。これにより、その方法またはアルゴリズムが作戦用途の場合(すなわち試験個体の遺伝子型を決定するためのもの)、線形関数で用いるための係数が提供される。

50

【0197】

強度データを分析するために3つの線形関数を使うアルゴリズムまたは方法は、上で記載したようなものでよい。

【0198】

場合によっては、トレーニング方法はフィードバック最適化を可能にする。かくして、試験個体の強度値および比率が得られ、これらは遺伝子タイピングされるので、強度データ、例えば比率、および遺伝子型が入力され、線形関数の係数が再計算される。

【0199】

一態様では、本発明はトレーニングのための計算方法に関する。

その方法を用いて、遺伝的変異に関して遺伝子型AAを有するn個の個体、遺伝子型ABを有するn個の個体および遺伝子型BBを有するn個の個体のそれぞれについて得られた比率1および2を用いることによって、本遺伝子タイピング方法での使用のための線形関数を導き出すことができる。比率は、上述の方法によって得ることができる。この方法は一般的には、遺伝的変異の3つの可能な遺伝子型AA、ABまたはBBのそれぞれを特徴づけることを目的とする3つの線形関数(関数1、2および3)を用いるアルゴリズムを適用するステップであって、

関数1は遺伝子型AAを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数2は遺伝子型ABを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

関数3は遺伝子型BBを有する個体を特徴づける線形関数であり、比率1および2の線形結合からなり、

これらの線形関数は、変数比率1および2に附属する係数によって形成されるステップと、

アルゴリズムを試験法で用いるとき(すなわち、遺伝子型を決定するための作戦用途の場合)に線形関数で用いることができる係数を得るために、識別分析において3つの遺伝子型群AA、ABおよびBBの間の相違を最大にする線形関数を導き出すステップとを含む。

【0200】

強度データを分析するために3つの線形関数を使うアルゴリズムまたは方法は、上で記載したようなものでよい。

【0201】

コンピュータトレーニング法は、各プローブに提供された平均強度値から比率1および2を計算すること、および/または各プローブの平均強度値を決定するためにプローブ複製物からの強度値を照合すること、および/またはバックグラウンドノイズを考慮するためにプローブ複製物の原強度値を修正し、それによって複製物のクリーン強度値を得ることをさらに含むことができる。

【0202】

一部の態様において、記載されているようにその計算法はフィードバック最適化工程も可能にする。

【0203】

一般的にトレーニングにおいて、nは3、例えば3、4、5、6、7、8、9または10である。一態様では、nは5である。場合によっては、nは10から50以上、例えば15～40、または25～35、例えば20または30でよい。

【0204】

トレーニング方法のためのプローブおよびプローブ複製物は、本明細書で記載されているように選択される。一実施形態では、各遺伝的変異につき4つのプローブが用いられ、各プローブにつき6、8または10個の複製物が用いられる。選択されると、トレーニングで用いるプローブはそのモデルが作戦用途の場合に(未知の遺伝子型を判定するために)も、用いられる。プローブを変更すると、一般的に、識別を最適化するために、モデルはその新しいプローブを用いて再トレーニングしなければならない。

10

20

30

40

50

【0205】

好ましくは、係数は、3個の遺伝子型群の間の識別が(トレーニングおよび作戦用途において)、実質的に100%であるようなものである。識別が100%でないならば、プローブは好ましくは再設計される。

【0206】

上のように、モデルはそれが作戦用途の場合、フィードバック最適化を経ることもできる。その場合、モデルは最初に個体の遺伝子型(AA、ABまたはBB)を決定するために用いられる。その個体の比率1および2を次にモデルに入力し、3個の遺伝子型群の間の識別を最適化するために、必要に応じて線形関数の係数を変化させる。このように、モデルを使用中に集めたさらなるデータは、線形関数の識別能力を最適化するために用いることができる。

10

【0207】

分析モデルまたは方法の性能および信頼性を最適化するために決定および最適化することができる、いくつかのパラメータがある。

【0208】

(i)一態様では、ある個体のために決定される比率1および2は、モデルをトレーニングする(すなわち3つの線形関数を最適化する)ために用いる比率1および2の範囲内である。所望により、これはしたがって個体の遺伝子型のための二重試験を提供することができる。

20

【0209】

(ii)一態様では、バックグラウンドノイズに関して $4n$ 個の複製物(「n」は各プローブの複製物数、例えば6、8または10)、例えば40個の複製物の平均蛍光強度は、5よりも大きい。

【0210】

(iii)一態様では、同じプローブの複製物の強度値(原強度値またはクリーン強度値)の間の変動は最低限である。例えば、所与のプローブの複製物の強度値の間の変動係数は、好ましくは0.25未満である。

【0211】

(iv)一態様では、チップ上のすべてのプローブ複製物の原強度値の合計とバックグラウンドノイズの強度との比率は、蛍光スキャナを用いると15を超える。

30

【0212】

(v)一態様では、陰性対照で得られた原シグナル強度値は、バックグラウンドノイズの強度値よりも3倍大きい。例えば、陰性対照としては、DMSO「ブランク」、および上記非ハイブリッド形成オリゴヌクレオチドを挙げることができる。バックグラウンドノイズは、いかなるプローブもスポットされていないアレイの領域に由来するシグナルであり、上記のように測定することができる。

【0213】

強度が蛍光標識の蛍光強度である場合、特に強度が共焦点蛍光スキャナによって測定される場合、好ましくは(i)から(v)のいずれか1つまたは複数が適用される。

【0214】

モデルが上の1つまたは複数を満たすことを確実にすることは、信頼性および再現性を提供するのに役立つ。(i)から(v)のいずれか1つまたは複数が、そのモデルにとって真であることができる。好ましくは、モデルは上の(i)を満たす。一実施例では、(i)、(ii)および(iii)が真である。他の実施例では、(iii)、(iv)、(v)が真である。好ましくは、モデルにとって上のすべてが真である。このことは、トレーニングおよび作戦用途の両方に適用される。

40

【0215】

上のように、試験試料から得られた実験的に導き出した比率は、既知の遺伝子型の個体から前に得られた(n)個の対照試料から得られた比率と比較することができ、nは上記した通りであり、通常>5または>10または>20である。対照試料の分析から導き出した参照比率

50

は、試験試料への遺伝子型の帰属を可能にする。これは、したがって、二重試験となることができる。

【0216】

1つの例において、本発明の分析法またはアルゴリズムは、以下の一連の工程を含む。複製物(6、8または10個の複製物)で4つのプローブ(2対のプローブ)を使用して、複製物の照合した強度から各プローブの平均強度を計算すること。2対のプローブの比率1および2を上のように計算すること(遺伝的変異AおよびBを検出するために)。得られた比率1および2を、(遺伝的変異に関して)遺伝子型AAを有する「n」名の対照患者、遺伝子型ABを有する「n」名の対照患者および遺伝子型BBを有する「n」名の対照患者(1つの実験では、「n」は5である)で計算した比率1および2を用いた識別分析において導き出した3つの線形方程式に代入すること。ならびに、どの線形関数が最大の絶対値を有するかに基づいて、その遺伝的変異(DNAチップに含まれた各遺伝的変異について)に関して患者の遺伝子型を決定すること。試験比率は、各遺伝子型を決定するために、「n」名の対照患者の比率と比較することもできる。

10

【0217】

一態様では、本発明の遺伝子タイピング方法は、
対象から提供された生体試料からDNAを抽出するステップと、
同定する遺伝的変異を含む前記核酸の領域を増幅し、任意選択で、同定する遺伝的変異を含み、任意選択で標識されたいいくつかの増幅産物を得るために、増幅反応の間にこれらの産物を標識化するステップと、

20

遺伝的変異を含むいくつかの断片化産物を得るために増幅産物を断片化し、前記産物を増幅段階の間に前もって標識しなかった場合は、同定する遺伝的変異を含む断片化産物を標識化するステップと、

同定する遺伝的変異を含む断片化産物を、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下でその遺伝的変異を検出することができるプローブとハイブリダイズするステップであって、前記プローブを支持体の上に置き、特徴づけるすべての遺伝的変異について所定のパターンに従って4つのプローブを使用し、それらは一様に分布して特徴づける遺伝的変異によってグループ化されず、4つのプローブのうち2つは1つの遺伝的変異を検出し、他の2つは別の遺伝的変異を検出し、各プローブの複製物数は10、8または6であるステップと、

30

固体支持体をスキャナに導入し、ハイブリダイゼーションが起こったポイントの強度を定量化するステップと、

4つのプローブのそれぞれの10、8または6個の複製物の照合された強度の平均から遺伝子変異体のそれぞれを遺伝子タイピングするステップであって、その方法の臨床応用を可能にする感度、特異性および再現性による突然変異のそれぞれの検出を可能にする、そのような目的のために開発されたアルゴリズムによって極値は排除され、このことは、それが、可能な遺伝子型のそれぞれを特徴づける3つの線形関数を得ることに至るという事実に基づくステップとを含む。

【0218】

上の分析および解釈は、1つの遺伝的変異に関して記載された。しかし、本チップは、一般に、同時に分析することができる複数の遺伝的変異の検出のためのプローブを含むものとする。したがって、本方法は、本明細書で記載されているような複数の遺伝的変異の同時分析を含む。

40

【0219】

他の態様では、本発明は、プロセッサ、および本発明の計算法を実行するようにプロセッサを制御するための手段を含むコンピュータシステムに関する。

【0220】

本発明は、コンピュータまたはコンピュータネットワーク上で実行されるときに、そのコンピュータまたはコンピュータネットワークに本発明の計算法を実行させるコンピュータプログラムコードを含む、コンピュータプログラムにさらに関する。コンピュータプログラムは、コンピュータ可読媒体に格納することができる。

50

【0221】

本明細書で記載されるプローブおよびチップに加えて、発明者らはIBDまたは薬剤有害反応と関連するヒト遺伝的変異を含む標的DNA領域を、例えば多重PCRによって増幅することができるオリゴヌクレオチドプライマーの設計および検証もした。これらのプライマーは、したがって、本遺伝子タイピング、診断および治療の方法で用いるための核酸の調製で役立つ。

【0222】

実施例3は、IBDと関連するヒト遺伝的変異(配列番号1～124および1317～1428)、および対応する遺伝的変異を含む標的DNA領域を増幅するプライマー対を列挙する。詳細には、これらのプライマーは、表1の遺伝的変異を含む標的DNA領域の増幅に役立つ。

10

【0223】

実施例5は、薬剤有害反応と関連するヒト遺伝的変異(配列番号125～254)、および対応する遺伝的変異を含む標的DNA領域を増幅するプライマー対を列挙する。詳細には、これらのプライマーは、表3の遺伝的変異を含む標的DNA領域の増幅に役立つ。

【0224】

列挙されたオリゴヌクレオチドプライマーは、非常に少数のPCR反応で前記標的DNA領域の特異的増幅を可能にするという長所がある。例えば、IBDと関連する遺伝的変異の検出の場合、列挙されたプライマーは最低限の多重PCR反応で表1の遺伝的変異の遺伝子タイピングに必要なすべての断片の増幅を可能にし、これらは実施例3の場合のようにIBDチップ上で分析することができる。薬剤有害反応と関連する遺伝的変異の検出の場合、列挙されたプライマーはわずか4つの多重PCR反応で表3の89個の遺伝的変異の遺伝子タイピングに必要な65個の断片の増幅を可能にし、これらは実施例5の場合のように薬剤チップ上で分析することができる。

20

【0225】

さらなる態様において、本発明は実施例3および5に列挙した各PCRプライマー(配列番号1～254および1317～1428)に関し、特に、列挙したPCRプライマー対のそれぞれ、および対応する遺伝的変異を含む標的DNA領域のPCR増幅での、例えば多重PCR反応でのそれらの利用に関する。一態様で本発明は、医療での使用、特に本遺伝子タイピング、診断または治療の方法での使用のためのこれらのプライマーまたはプライマー対のいずれか1つを提供する。

30

【0226】

本発明はさらに、列挙されたPCRプライマーの少なくとも1対を含むPCR増幅キットに関する。例えば対応する遺伝的変異を含む標的DNA領域を増幅するために、キットはさらに、例えば、(耐熱性の)ポリメラーゼ、dNTP、適切な緩衝液、さらなるプライマー、および/または取扱説明書を含むことができる。本方法で用いるために、キットは核酸試料からの標的DNA領域の増幅のために用いることができる。

40

【0227】

他の態様では、本発明は、本発明に従うDNAチップまたはアレイを含む、遺伝子タイピングまたは診断の(好ましくはin vitro)キットに関する。キットは、本発明の遺伝子タイピング方法でのチップの取扱説明書、例えば本分析法またはアルゴリズムの取扱説明書をさらに含むことができる。キットのさらなる構成要素としては、

本発明に従うコンピュータソフトウェア、コンピュータプログラムまたはコンピュータシステム、

本発明に従う1つまたは複数のPCRプライマーまたはPCRプライマー対、および/または本発明に従うPCR増幅キット
を挙げることができる。

【0228】

チップのためのプローブまたはPCRプライマーは、検出する遺伝的変異またはキットの診断目的に従って、上のように選択することができる。

【0229】

50

キットは、ハイブリダイゼーション反応の1つまたは複数の陽性および/または陰性の対照を含むことができる。

【0230】

キットは、対象とする疾患または抗原と関連する遺伝的変異の検出および分析のために用いることができる。適切なプローブは、それに応じて設計することができる。

【0231】

一態様では、キットは既知の赤血球抗原と関連する遺伝的変異、例えば本明細書で記載されるものの検出または遺伝子タイピングのためのものである。キットは、したがって、個体の血液型の判定に役立つことができる。

【0232】

他の態様では、キットはIBDと関連する遺伝的変異、例えば本明細書で記載されるものの検出または遺伝子タイピングのためのものである。キットはしたがって、本明細書で記載されているように、IBDまたはIBD感受性の診断に役立つことができる。

【0233】

他の態様では、遺伝子タイピングキットは医薬有害反応と関連する遺伝的変異、例えば本明細書で記載されるものの検出または遺伝子タイピングのためのものである。キットはしたがって、本明細書で記載されているように、有害反応感受性の診断または予測に役立つことができる。

【0234】

本発明は、さらに、本発明の遺伝子タイピング、診断または治療の方法におけるキットの使用に関する。

【0235】

本明細書で記載されているように、本方法は患者でのIBDの診断に、または患者でのIBD感受性の診断に役立つ。本方法は、IBDと関連する1つまたは複数の遺伝的変異(例えば表1に記載のもの)に関して、個体を遺伝子タイピングするために用いることができる。結果はIBDを診断するために、または予後診断のために用いることができ、(例えば、療法への応答を予測することによって)IBDの適切な治療法の決定に役立つことができる。

【0236】

IBDはいくつかの表現型を示す。例えば、クローン病の患者で観察される表現型としてはフィステルの発現、肛門周囲の疾患および臨床上重要な腸外の徴候があり、さらに、一部の患者は外科的インターベンション(腸切除術)を必要とする。潰瘍性大腸炎患者で観察される疾患表現型の例としては、汎大腸炎および臨床上重要な腸外の徴候があり、さらに、外科的インターベンションが必要な場合もある(結腸切除術)。

【0237】

IBDchipのスペインの試験(579人の患者)から得られた遺伝子データは、クローン病および潰瘍性大腸炎をそれぞれ患っている個体で、彼らの特定の遺伝子プロフィールに基づいて上述の疾患表現型が発現する可能性(高、中、低、または最小限の)を予測する明白な能力を実証した(図3~10-実施例6)。

【0238】

IBDの攻撃的な性質のため、治療の成功はしばしば、各人の必要に適合するための個別治療計画に依存する。治療は、一般的に疾患の活性炎症を制御すること、および薬剤療法を通して寛解を維持することを含む。IBDchipは、患者の個々の遺伝子プロフィールに基づいて臨床医が疾患進行の可能な経過を評価することを可能にする遺伝子タイピング手段であるとともに、最も適切な治療的インターベンションの指示を提供する。疾患の急速な進行および/または攻撃性の発現を示唆する遺伝子型は、より早期の、より詳細に監視された治療計画の必要性ならびに外科的インターベンションの必要性の可能性を示す。逆に、より重度でない疾患進行を示唆する遺伝子型は、不必要的治療および/または外科手術の使用を防ぐことができる。

【0239】

IBD患者を治療するために広範囲の薬剤が用いられ、例としては、アミノサリチル酸(例

10

20

30

40

50

えば、スルファサラジン、オルサラジン)、代謝拮抗物質(例えばメルカプトプリン、メトトレキセート)、抗リウマチ薬(例えばアザチオプリン、6-メルカプトプリン)抗生物質(シプロフロキサシン)、生物製剤(例えばインフリキシマブ)、ならびに広範囲にわたるコルチコステロイド薬剤がある。しかし、上記のように、これらの治療への個々の患者の応答は非常に多様であり、IBD患者のために最良の治療手段を選択するより良い方法が、臨床10上明らかに必要である。IBDchipの使用から得られた遺伝子データを用いることにより、コルチコステロイド治療に対する抵抗性が発現する様々な可能性(高、中、低、および最低限の)を有する個体の特定が可能になった。本明細書で記載される遺伝子タイピング方法は、類似した治験において、薬物反応に及ぼす遺伝子の影響に関して類似したパターンを決定するために用いることができる。

【0240】

本アレイおよび方法は、したがって、個々の患者において疾患進行の可能な経過を臨床医が予測する手段を提供し、また、外科的インターベンションの必要性の可能性を含めて最も適切な治療計画の選択を助ける。それらは、したがって有用な予後診断手段である。本発明に従って得られた遺伝子型情報は、症状(疾患表現型)が不明瞭である症例において、臨床上の意思決定または診断で役立つ。IBDchipまたは他の方法によって提供された遺伝情報は、無症候性個体(例えばIBD患者の直近家族)の疾患発現の可能性の判定にも役立ち、例えば提供するライフスタイルおよび食事のガイダンスを可能にし、疾患発現の可能な感受性を示す遺伝的構成を有する個体の継続監視の必要性を示す。

【0241】

一態様では、本発明はしたがって、個体でIBDもしくはIBD感受性を診断する方法に、または、上のように個体で疾患進行の可能な経過を決定する方法に関する。好ましくは、その方法は *in vitro* である。本発明はさらに、治療を選択する方法、例えば個体が本発明の方法によって診断または検査された一部の症例において、IBDを有する個体のために外科的インターベンションの必要性を判定する方法に関する。一部の態様では本発明はさらにIBDを患う個体を治療する方法に関し、治療が選択された後にその治療は個体に投与される。

【0242】

IBDと関連する特定の遺伝的変異は、特定の表現型または特定の表現型の発現を、それ故に、疾患の進行を示唆することができる。言い換えると、例えば所与の遺伝的変異の突然変異対立遺伝子Bと特定の表現型の発生/発現との間に、統計学的に有意な関連が存在する可能性がある。

【0243】

本遺伝子タイピング方法は臨床場面で複数の遺伝的変異の信頼できる遺伝子タイピングを可能にするので、これらは既知IBD表現型の個体を遺伝子タイピングするために、したがって特定のIBD表現型を示唆する遺伝的変異を同定するために用いることができる。

【0244】

したがって一態様で本発明は、上で列挙した表現型などの特定のIBD表現型を示唆する遺伝的変異を同定する方法に関する。この方法は本発明の方法によって1つまたは複数の遺伝的変異に関して複数の個体を遺伝子タイピングすることを含み、それらの遺伝的変異はIBDと関連する。一般的に、300~1000個体が遺伝子タイピングされ、例えば400、500または600の個体を遺伝子タイピングすることができる。各個体のIBD表現型は既知である。IBD表現型は任意の適切な方法で、例えばウィーン分類法(Vienna Classification)(Gasche C, Scholmerich J, Brynskov Jら、A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology、Vienna 1998. Inflamm Bowel Dis 2000;6:8~15頁)または、モントリオール分類法(Montreal Classification)(Silverberg MS、Satsangi J、Ahmad T、Arnott ID、Bernstein CN、Brant SR、Caprilli R、Colombel JF、Gasche C、Geboes K、Jewell DP、Karban A、Loftus Jr EV、Pena AS、Riddell RH、Sachar DB、Schreiber S、Steinhart AH、Targan SR、Vermeire S、Warren BF。炎症性腸疾患の統合された臨床的、分子的、および血清学的分類に向け

10

20

30

40

50

ては、Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology.Can J Gastroenterol.2005年9月19日Suppl A:5~36頁)で決定することができる。

【0245】

遺伝子型が得られたならば、そのデータは表現型データと比較されて、特定の遺伝子型および特定の表現型の間の統計学的に有意な関連が特定される。統計学的有意性を決定する方法は、当技術分野で既知である。

【0246】

特定の表現型/疾患の経過を示唆するものと特定された遺伝的変異は、次に、示唆的遺伝的変異に関して個体を遺伝子タイプングすることによって、試験個体でこれらの表現型/疾患の経過を診断するために用いることができる。したがって、個体で疾患進行の可能な経過を判断することができる。遺伝子タイプングは、試験する変異の数に従い、任意の適切な方法で実行することができる。例えば、本発明の遺伝子タイプング方法を用いることができる。代わりに、配列をベースにした、または他のチップをベースにした方法も適切であろう。

10

【0247】

したがって一態様において、本発明は、本明細書で記載の方法によって(特定のIBD表現型または疾患経過を)示唆するものと特定された1つまたは複数の遺伝的変異に関して個体の遺伝子型を判定することによって個体でIBD表現型を診断する方法、または疾患進行の可能な経過を予測する方法に関する。

20

【0248】

予測が立てられたならば、次に最も適切な治療手段を選択すること、例えば外科的インターベンションの必要性を決定することができる。

【0249】

本発明は、1つまたは複数の特定の赤血球関連抗原(例えば表2記載のもの)に関して遺伝子型を判定することによって、個体の血液型の判定にも役立つ。したがって、他の態様において、本発明は個体で血液型または血液型群を判定する方法(一態様では *in vitro*)に関する。そのような方法は、例えば、輸血、臓器移植、胎児および新生児の溶血性疾患の治療の法医学的応用で役立つことができる。

30

【0250】

本発明は、個体で医薬有害反応の可能性を判断することにさらに役立つ。したがって、他の態様において、本発明は個体で医薬有害反応感受性を診断または予測する方法(一態様では *in vitro*)に関する。本方法は、医薬有害反応と関連する1つまたは複数の遺伝的変異(例えば表3に記載のもの)に関して、本遺伝子タイプング方法によって個体の遺伝子型を判定することを含む。遺伝子タイプングの結果を用いて個体のための治療法を選択することができ、それは次に投与することができる。したがって一部の態様において、本発明はさらに、個体のために医薬による治療法を選択する方法、および選択された医薬で個体を治療する方法に関する。

30

【0251】

診断、予測および治療の方法は、本明細書で記載される本発明の遺伝子タイプング方法の実行を含む。それらの方法のいずれも、遺伝子型の判定で用いるための線形関数を導き出すために、本明細書で記載される本発明のトレーニング方法の実行を含むことができる。さらに、それらの方法は本明細書で記載される本発明のチップ、コンピュータシステム、コンピュータプログラム、オリゴヌクレオチドプローブまたはプローブの対もしくはセット、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプライマー対、PCR増幅キットまたは診断キットの使用を含むことができる。

40

【0252】

(実施例)

一般に、本明細書で述べる技法は当技術分野でよく知られているが、特にSambrook et al、1989、Molecular Cloning : a laboratory manualを参照することができる。

50

【0253】

(実施例1)

ヒトの血液型を同定するためにDNAチップを使用する、ヒト赤血球抗原と関連するヒトの遺伝的変異の検出

1.1 血液型の遺伝子タイピング用のDNAチップの設計

遺伝的変異の、感度、特異性、再現性の高い同時検出を可能にするDNAチップを設計および製造して、いくつかの赤血球抗原と関連するヒトの遺伝的変異を検出した。DNAチップを使用して測定することができる変異の例証となる例は、表2中に列挙する。

【0254】

この場合、設計および製造されるDNAチップは、その表面上に複数のプローブを含み、遺伝的変異の検出を可能にする支持体(ガラススライド)からなる。これらのプローブは、試験する赤血球抗原をコードする(増幅した)標的遺伝子配列とハイブリダイズすることができる。使用するプローブのDNA配列は以下に列挙する。一般に、遺伝子の名称、突然変異(ヌクレオチドの変化、「ins」:挿入「del」:欠失)、遺伝子型およびエクソンを示す。

【0255】

【表1】

ABOG261delG遺伝子型:ABO01/O1v[ABO遺伝子のエクソン6中の多型G261delG(遺伝子型ABO01/O1v)を検出するためのプローブ]

エクソン6

BC001OV01	CAGCCAAGGGGTACCAACGAGGACA	25	配列番号255
BC001OV02	CCAGCCAAGGGGTACCAACGAGGACA	25	配列番号256
BC001OV03	CCAGCCAAGGGGTACCAACGAGGACAT	27	配列番号257
BC001OV04	GCCAGCCAAGGGGTACCAACGAGGACAT	27	配列番号258

【0256】

【表2】

ABOG703A遺伝子型:ABOB

エクソン7

BC002OV01	ACCCCTGCACCCCGGCTTCTACGGAA	25	配列番号259
BC002OV02	ACCCCTGCACCCCGAGCTTCTACGGAA	25	配列番号260
BC002OV03	CACCCCTGCACCCCGGCTTCTACGGAAAG	27	配列番号261
BC002OV04	CACCCCTGCACCCCGAGCTTCTACGGAAAG	27	配列番号262

【0257】

【表3】

ABOC796A遺伝子型:ABOB

エクソン7

BC003OV01	AGAACCCCCCCCAGGTAGTAGAAATC	25	配列番号263
BC003OV02	AGAACCCCCCCCAGGTAGTAGAAATC	25	配列番号264
BC003OV03	AAGAACCCCCCCCAGGTAGTAGAAATCG	27	配列番号265
BC003OV04	AAGAACCCCCCCCAGGTAGTAGAAATCG	27	配列番号266

【0258】

10

20

30

40

【表4】

ABOG802A遺伝子型:ABO02

エクソン7

BC004OV01	CCCCGAAGAACCCCCCAGGTAGTA	25	配列番号267
BC004OV02	CCCCGAAGAACCTCCCCAGGTAGTA	25	配列番号268
BC004OV03	CCCGAAGAACCCCCCAGGTAGT	23	配列番号269
BC004OV04	CCCGAAGAACCTCCCCAGGTAGT	23	配列番号270

【0259】

10

【表5】

ABOG803C遺伝子型ABOB2、シスAB-1

エクソン7

BC005OV01	CCCCCGAAGAACCCCCCAGGTAGT	25	配列番号271
BC005OV02	CCCCCGAAGAACGCCCCCAGGTAGT	25	配列番号272
BC005OV03	ACCCCCGAAGAACCCCCCAGGTAGTA	27	配列番号273
BC005OV04	ACCCCCGAAGAACGCCCCCAGGTAGTA	27	配列番号274

【0260】

20

【表6】

ABOCCC1059-1061遺伝子型:ABO02

エクソン7

BC006OV01	CGGTCCCGAACCCGTGAGCGGCTGC	25	配列番号275
BC006OV02	CGGTCCCGAACCGTGAGCGGCTGCC	25	配列番号276
BC006OV03	GCGGTCCCGAACCCGTGAGCGGCTGCC	27	配列番号277
BC006OV04	GCGGTCCCGAACCGTGAGCGGCTGCCA	27	配列番号278

【0261】

30

【表7】

ABOGGGGGGG798_804insG遺伝子型:ABO03、Ael

エクソン7

BC007OV01	CCCCGAAGAACCCCCCAG	19	配列番号279
BC007OV02	CCCGAAGAACCCCCCCCAG	19	配列番号280
BC007OV03	CCCCCGAAGAACCCCCCCCAGG	21	配列番号281
BC007OV04	CCCCGAAGAACCCCCCCCAGG	21	配列番号282

【0262】

40

【表8】

ABOGG87_88insG遺伝子型:ABO04

エクソン2

BC008OV01	TGCTTGTCTTGGTCTTGTGTTGGTA	25	配列番号283
BC008OV02	TGCTTGTCTTGGGTCTTGTGTTGGGT	25	配列番号284
BC008OV03	GCTTGTCTTGGTCTTGTGTTGGGT	23	配列番号285
BC008OV04	GCTTGTCTTGGGTCTTGTGTTGGG	23	配列番号286

【0263】

50

【表9】

ABOC322T遺伝子型:ABO05

エクソン6

BC009OV01	GGAGCCTGAACCTGCTCGTTGAGGAT	25	配列番号287
BC009OV02	GGAGCCTGAACACTCGTTGAGGAT	25	配列番号288
BC009OV03	TGGAGCCTGAACCTGCTCGTTGAGGATG	27	配列番号289
BC009OV04	TGGAGCCTGAACACTCGTTGAGGATG	27	配列番号290

【0264】

10

【表10】

ABOC893T遺伝子型:ABO06

エクソン7

BC010OV01	TCGTGCCACACGGCCTCGATGCCGT	25	配列番号291
BC010OV02	TCGTGCCACACGACCTCGATGCCGT	25	配列番号292
BC010OV03	CGTGCCACACGGCCTCGATGCCG	23	配列番号293
BC010OV04	CGTGCCACACGACCTCGATGCCG	23	配列番号294

【0265】

20

【表11】

ABOC927A遺伝子型:ABO07

エクソン7

BC011OV01	CCTGAACAAGTACCTGCTGCGCCAC	25	配列番号295
BC011OV02	CCTGAACAAGTAACCTGCTGCGCCAC	25	配列番号296
BC011OV03	ACCTGAACAAGTACCTGCTGCGCCACA	27	配列番号297
BC011OV04	ACCTGAACAAGTAACCTGCTGCGCCACA	27	配列番号298

【0266】

30

【表12】

ABOG188A/C189T遺伝子型:ABO01v

エクソン4

BC012OV01	ACCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGCC	25	配列番号299
BC012OV02	ACCATCTGCAGCATGTCTCGTTGCC	25	配列番号300
BC012OV03	CCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGC	23	配列番号301
BC012OV04	CCATCTGCAGCATGTCTCGTTGC	23	配列番号302

【0267】

40

【表13】

ABOG542A遺伝子型:ABO08

エクソン7

BC013OV01	GACACGTCTGCCAGCGCTTGTAGG	25	配列番号303
BC013OV02	GACACGTCTGCTAGCGCTTGTAGG	25	配列番号304
BC013OV03	ACACGTCTGCCAGCGCTTGTAG	23	配列番号305
BC013OV04	ACACGTCTGCTAGCGCTTGTAG	23	配列番号306

【0268】

50

【表14】

ABOC467T遺伝子型:ABO A2

エクソン7

BC014OV01	GGCACCGCGGCCGGCTGGTCGGTGA	25	配列番号307
BC014OV02	GGCACCGCGGCCAGCTGGTCGGTGA	25	配列番号308
BC014OV03	GGGCACCGCGGCCGGCTGGTCGGTGAA	27	配列番号309
BC014OV04	GGGCACCGCGGCCAGCTGGTCGGTGAA	27	配列番号310

【0269】

10

【表15】

ABOT646A遺伝子型:ABO A x/O1v

エクソン7

BC015OV01	GTGGACATGGAGTTCCCGCGACCACG	25	配列番号311
BC015OV02	GTGGACATGGAGATCCCGCGACCACG	25	配列番号312
BC015OV03	CGTGGACATGGAGTTCCCGCGACCACGT	27	配列番号313
BC015OV04	CGTGGACATGGAGATCCCGCGACCACGT	27	配列番号314

【0270】

20

【表16】

RHDA178C遺伝子型:RHDDIIb

エクソン2

BC016OV01	GTGATGGCGGCCATTGGCTTGGGCT	25	配列番号315
BC016OV02	GTGATGGCGGCCATTGGCTTGGGCT	25	配列番号316
BC016OV03	TGATGGCGGCCATTGGCTTGGGCT	23	配列番号317
BC016OV04	TGATGGCGGCCATTGGCTTGGGCT	23	配列番号318

【0271】

30

【表17】

RHDG203A遺伝子型:RHDDIIb

エクソン2

BC017OV01	TCCTCACCTCGAGTTCCGGAGACA	25	配列番号319
BC017OV02	TCCTCACCTCGAATTCCGGAGACA	25	配列番号320
BC017OV03	TTCCCTCACCTCGAGTTCCGGAGACAC	27	配列番号321
BC017OV04	TTCCCTCACCTCGAATTCCGGAGACAC	27	配列番号322

【0272】

40

【表18】

RHDT307C遺伝子型:RHDDIIb

エクソン2

BC018OV01	AGCCAGTCCCTCTGGGAAGGTGG	25	配列番号323
BC018OV02	AGCCAGTCCCTCCTGGGAAGGTGG	25	配列番号324
BC018OV03	GAGCCAGTCCCTCTGGGAAGGTGG	27	配列番号325
BC018OV04	GAGCCAGTCCCTCCTGGGAAGGTGG	27	配列番号326

【0273】

50

【表19】

RHDT544A遺伝子型:RHDエクソンスキャニング
エクソン4

BC019OV01	TATTTGGGCTGTCTGTGGCCTGGT	25	配列番号327
BC019OV02	TATTTGGGCTGACTGTGGCCTGGT	25	配列番号328
BC019OV03	TTTGGGCTGTCTGTGGCCTG	21	配列番号329
BC019OV04	TTTGGGCTGACTGTGGCCTG	21	配列番号330

【0274】

10

【表20】

RHDG577A遺伝子:RHDエクソンスキャニング
エクソン4

BC020OV01	AGCCTCTACCCGAGGGAACGGAG	23	配列番号331
BC020OV02	AGCCTCTACCCAAAGGGAACGGAG	23	配列番号332
BC020OV03	GCCTCTACCCGAGGGAACGGGA	21	配列番号333
BC020OV04	GCCTCTACCCAAAGGGAACGGGA	21	配列番号334

【0275】

20

【表21】

RHDA594T遺伝子型:RHDエクソンスキャニング
エクソン4

BC021OV01	ACGGAGGATAAAAGATCAGACAGC	23	配列番号335
BC021OV02	ACGGAGGATAATGATCAGACAGC	23	配列番号336
BC021OV03	CGGAGGATAAAAGATCAGACAG	21	配列番号337
BC021OV04	CGGAGGATAATGATCAGACAG	21	配列番号338

【0276】

30

【表22】

RHDG697C遺伝子:RHDDva(kou、to、yh、sm)
エクソン5

BC022OV01	AGAAGTCCAATCGAAAGGAAGAACG	25	配列番号339
BC022OV02	AGAAGTCCAATCCAAAGGAAGAACG	25	配列番号340
BC022OV03	GAAGTCCAATCGAAAGGAAGAACG	23	配列番号341
BC022OV04	GAAGTCCAATCCAAAGGAAGAACG	23	配列番号342

【0277】

40

【表23】

RHDG712A遺伝子:RHDDva(to、yh)
エクソン5

BC023OV01	GGAAGAATGCCGTGTTCAACACC	23	配列番号343
BC023OV02	GGAAGAATGCCATGTTCAACACC	23	配列番号344
BC023OV03	GAAGAATGCCGTGTTCAACAC	21	配列番号345
BC023OV04	GAAGAATGCCATGTTCAACAC	21	配列番号346

【0278】

50

【表24】

RHDT1025C遺伝子型:RHDDAR(weakD型4.2)

エクソン7

BC024OV01	TGGAGAGATCATCTACATTGTGC	23	配列番号347
BC024OV02	TGGAGAGATCACCTACATTGTGC	23	配列番号348
BC024OV03	GGAGAGATCATCTACATTGTG	21	配列番号349
BC024OV04	GGAGAGATCACCTACATTGTG	21	配列番号350

【0279】

10

【表25】

RHDG676C遺伝子型:RHDDCS、Dva(kou、yh)

エクソン5

BC025OV01	AGTTTCAACTCTGCTCTGCTGAGAA	25	配列番号351
BC025OV02	AGTTTCAACTCTCCTCTGCTGAGAA	25	配列番号352
BC025OV03	AATTTCAACTCTGCTCTGCTGAGAAG	27	配列番号353
BC025OV04	AAGTTCAACTCTCCTCTGCTGAGAAG	27	配列番号354

【0280】

20

【表26】

RHDG1063A遺伝子型:RHDDNB

エクソン7

BC026OV01	ACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATGT	25	配列番号355
BC026OV02	ACCGTCGGAGCCAGCAATGGCATGT	25	配列番号356
BC026OV03	TACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATGTG	27	配列番号357
BC026OV04	TACCGTCGGAGCCAGCAATGGCATGTG	27	配列番号358

【0281】

30

【表27】

RHDT509C遺伝子型:RHDDFRI、DOL

エクソン4

BC027OV01	ACATGAACATGATGCACATCTACGT	25	配列番号359
BC027OV02	ACATGAACATGACGCACATCTACGT	25	配列番号360
BC027OV03	CACATGAACATGATGCACATCTACGTG	27	配列番号361
BC027OV04	CACATGAACATGACGCACATCTACGTG	27	配列番号362

【0282】

40

【表28】

RHDT329C遺伝子型:RHDDVII

エクソン2

BC028OV01	TGGTCATCACACTGTTCAGGTATTG	25	配列番号363
BC028OV02	TGGTCATCACACCGTTCAGGTATTG	25	配列番号364
BC028OV03	GGTCATCACACTGTTCAGGTATT	23	配列番号365
BC028OV04	GGTCATCACACCGTTCAGGTATT	23	配列番号366

【0283】

50

【表 2 9】

RHDC848T遺伝子型:RHDDHMi

エクソン6

BC029OV01	GCTGTGGGTACCTCGTGTAC	21	配列番号367
BC029OV02	GCTGTGGGTATCTCGTGTAC	21	配列番号368
BC029OV03	GGCTGTGGGTACCTCGTGTAC	23	配列番号369
BC029OV04	GGCTGTGGGTATCTCGTGTAC	23	配列番号370

【0 2 8 4】

10

【表 3 0】

RHDA497C遺伝子型:RHDDFW

エクソン4

BC030OV01	AGACAGACTACCACATGAACATGAT	25	配列番号371
BC030OV02	AGACAGACTACCCATGAACATGAT	25	配列番号372
BC030OV03	GACAGACTACCACATGAACATGA	23	配列番号373
BC030OV04	GACAGACTACCCATGAACATGA	23	配列番号374

【0 2 8 5】

20

【表 3 1】

RHDG686A遺伝子型:RHDDHR

エクソン5

BC031OV01	CTGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCGA	25	配列番号375
BC031OV02	CTGCTCTGCTGAAAGTCCAATCGA	25	配列番号376
BC031OV03	TGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCG	23	配列番号377
BC031OV04	TGCTCTGCTGAAAGTCCAATCG	23	配列番号378

【0 2 8 6】

30

【表 3 2】

RHDG854A遺伝子型:RHDDIM

エクソン6

BC032OV01	TGGGTACCTCGTGTACCTGATCCC	25	配列番号379
BC032OV02	TGGGTACCTCGTATCACCTGATCCC	25	配列番号380
BC032OV03	GGGTACCTCGTGTACCTGATCC	23	配列番号381
BC032OV04	GGGTACCTCGTATCACCTGATCC	23	配列番号382

【0 2 8 7】

40

【表 3 3】

RHDT161C遺伝子型:RHDDMH

エクソン2

BC033OV01	TTGGCCAAGATCTGACCGTGATGGC	25	配列番号383
BC033OV02	TTGGCCAAGATCCGACCGTGATGGC	25	配列番号384
BC033OV03	GTTGGCCAAGATCTGACCGTGATGGCG	27	配列番号385
BC033OV04	GTTGGCCAAGATCCGACCGTGATGGCG	27	配列番号386

【0 2 8 8】

50

【表34】

RHGD1057A遺伝子型:RHDDNU

エクソン7

BC034OV01	CTTGATACCGTCGGAGCCGGCAATG	25	配列番号387
BC034OV02	CTTGATACCGTCAGAGCCGGCAATG	25	配列番号388
BC034OV03	GCTTGATACCGTCGGAGCCGGCAATGG	27	配列番号389
BC034OV04	GCTTGATACCGTCAGAGCCGGCAATGG	27	配列番号390

【0289】

10

【表35】

RHDT1073C遺伝子型:RHDDWI

エクソン7

BC035OV01	CCGGCAATGGCATGTGGGTCACTGG	25	配列番号391
BC035OV02	CCGGCAATGGCACGTGGGTCACTGG	25	配列番号392
BC035OV03	CGGCAATGGCATGTGGGTCACTG	23	配列番号393
BC035OV04	CGGCAATGGCACGTGGGTCACTG	23	配列番号394

【0290】

20

【表36】

RHDC1061A遺伝子型:RHDDII、DIVIV

エクソン7

BC036OV01	ATACCGTCGGAGCCGGCAATGGCAT	25	配列番号395
BC036OV02	ATACCGTCGGAGACGGCAATGGCAT	25	配列番号396
BC036OV03	GCCGGCAATGGCATGTGGGTCACTGG	27	配列番号397
BC036OV04	GCCGGCAATGGCACGTGGGTCACTGG	27	配列番号398

【0291】

30

【表37】

RHGD845A遺伝子型:RHDweakD型15

エクソン6

BC037OV01	GCGTGGCTGTGGGTACCTCGTGTCA	25	配列番号399
BC037OV02	GCGTGGCTGTGGATACCTCGTGTCA	25	配列番号400
BC037OV03	GATACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATG	27	配列番号401
BC037OV04	GATACCGTCGGAGACGGCAATGGCATG	27	配列番号402

【0292】

40

【表38】

RHDT809G遺伝子型:RHDweakD型1、psi

エクソン6

BC038OV01	TGCAGACTTATGTGCACAGTGCAGT	25	配列番号403
BC038OV02	TGCAGACTTATGGGCACAGTGCAGT	25	配列番号404
BC038OV03	GCAGACTTATGTGCACAGTGCAGT	23	配列番号405
BC038OV04	GCAGACTTATGGGCACAGTGCAGT	23	配列番号406

【0293】

50

【表39】

RHDG1154C遺伝子型:RHDweakD型2

エクソン9

BC039OV01	GCATTTAACAGGTTGCTCCTAAA	25	配列番号407
BC039OV02	GCATTTAACAGCTTGCTCCTAAA	25	配列番号408
BC039OV03	TGCATTTAACAGGTTGCTCCTAAAT	27	配列番号409
BC039OV04	TGCATTTAACAGCTTGCTCCTAAAT	27	配列番号410

【0294】

10

【表40】

RHDC8G遺伝子型:RHDweakD型3

エクソン1

BC040OV01	ACAGGATGAGCTCTAAGTACCCGCG	25	配列番号411
BC040OV02	ACAGGATGAGCTGTAAGTACCCGCG	25	配列番号412
BC040OV03	CACAGGATGAGCTCTAAGTACCCGCG	27	配列番号413
BC040OV04	CACAGGATGAGCTGTAAGTACCCGCG	27	配列番号414

【0295】

20

【表41】

RHDC446A遺伝子型:RHDweakD型5

エクソン3

BC041OV01	TGGAGGTGACAGCTTTAGGCAACCT	25	配列番号415
BC041OV02	TGGAGGTGACAGATTTAGGCAACCT	25	配列番号416
BC041OV03	GGAGGTGACAGCTTTAGGCAACC	23	配列番号417
BC041OV04	GGAGGTGACAGATTAGGCAACC	23	配列番号418

【0296】

30

【表42】

RHDG1016A遺伝子型:RHDweakD型7

エクソン7

BC042OV01	TGGGTCTGCTTGGAGAGATCATCTA	25	配列番号419
BC042OV02	TGGGTCTGCTTGAAGAGAGATCATCTA	25	配列番号420
BC042OV03	GGGTCTGCTTGGAGAGAGATCATCT	23	配列番号421
BC042OV04	GGGTCTGCTTGAAGAGAGATCATCT	23	配列番号422

【0297】

40

【表43】

RHDC340T遺伝子型:RHDweakD型17

エクソン3

BC043OV01	TCCCCCAGTATTGGCTGGCCACCA	25	配列番号423
BC043OV02	TCCCCCAGTATTGGCTGGCCACCA	25	配列番号424
BC043OV03	CTCCCCCAGTATTGGCTGGCCACCAT	27	配列番号425
BC043OV04	CTCCCCCAGTATTGGCTGGCCACCAT	27	配列番号426

【0298】

50

【表44】

RHDT807G遺伝子型:RHDPSI

エクソン6

BC044OV01	TTTGCAGACTTATGTGCACAGTGCG	25	配列番号427
BC044OV02	TTTGCAGACTTAGGTGCACAGTGCG	25	配列番号428
BC044OV03	TTGCAGACTTATGTGCACAGTGC	23	配列番号429
BC044OV04	TTGCAGACTTAGGTGCACAGTGC	23	配列番号430

【0299】

10

【表45】

RHDG1227A遺伝子型:RHDK409KDnull

エクソン9

BC045OV01	AGTTTCTGGAAGGTAAGATTTTC	25	配列番号431
BC045OV02	AGTTTCTGGAAGGTAAGATTTTC	25	配列番号432
BC045OV03	AAGTTTCTGGAAGGTAAGATTTCA	27	配列番号433
BC045OV04	AAGTTTCTGGAAGGTAAGATTTCA	27	配列番号434

【0300】

20

【表46】

RHDG48A遺伝子型:RHDW16XDnull

エクソン1

BC046OV01	CCTGCCCTCTGGGCCCTAACACTG	25	配列番号435
BC046OV02	CCTGCCCTCTGAGGCCCTAACACTG	25	配列番号436
BC046OV03	CTGCCCTCTGGGCCCTAACACT	23	配列番号437
BC046OV04	CTGCCCTCTGAGGCCCTAACACT	23	配列番号438

【0301】

30

【表47】

RHDC121T遺伝子型:RHDQ41XDnull

エクソン1

BC047OV01	TCCTTAGAGGATCAAAAGGGGCTCG	25	配列番号439
BC047OV02	TCCTTAGAGGATAAAAGGGGCTCG	25	配列番号440
BC047OV03	CCTTAGAGGATCAAAAGGGGCTC	23	配列番号441
BC047OV04	CCTTAGAGGATAAAAGGGGCTC	23	配列番号442

【0302】

40

【表48】

RHDG270A遺伝子型:RHDW90XDnull

エクソン2

BC048OV01	TGGTGTGCAGTGGCAATCCTGCTG	25	配列番号443
BC048OV02	TGGTGTGCAGTGAGCAATCCTGCTG	25	配列番号444
BC048OV03	GGTGTGCAGTGGCAATCCTGCT	23	配列番号445
BC048OV04	GGTGTGCAGTGAGCAATCCTGCT	23	配列番号446

【0303】

50

【表49】

RHDIVS3+1G>A遺伝子型:RHDIVS3+1G>ADneg
エクソン3

BC049OV01	AATATCTTCAACGTGAGTCATGGTG	25	配列番号447
BC049OV02	AATATCTTCAACATGAGTCATGGTG	25	配列番号448
BC049OV03	ATATCTTCAACGTGAGTCATGGT	23	配列番号449
BC049OV04	ATATCTTCAACATGAGTCATGGT	23	配列番号450

【0304】

10

【表50】

RHD488del4遺伝子型:RHD488del4Dnull
エクソン4

BC050OV01	TTTATTGCAGACAGACTACCACATG	25	配列番号451
BC050OV02	TTTATTGCAGACTACCACATGAACA	25	配列番号452
BC050OV03	TTATTGCAGACAGACTACCACAT	23	配列番号453
BC050OV04	TTATTGCAGACTACCACATGAAC	23	配列番号454

【0305】

20

【表51】

RHDG635T遺伝子型:RHDG212VDnull
エクソン5

BC051OV01	CTGGCCCCCAGGCGCCCTTTCT	23	配列番号455
BC051OV02	CTGGCCCCCAGTCGCCCTTTCT	23	配列番号456
BC051OV03	TGGCCCCCAGGCGCCCTTTCT	21	配列番号457
BC051OV04	TGGCCCCCAGTCGCCCTTTCT	21	配列番号458

【0306】

30

【表52】

RHDdel711遺伝子型:RHDdel711Dnull
エクソン5

BC052OV01	AAGGAAGAATGCCGTGTTAACACCC	25	配列番号459
BC052OV02	AAGGAAGAATGCGTGTTAACACCT	25	配列番号460
BC052OV03	AGGAAGAATGCCGTGTTAACACAC	23	配列番号461
BC052OV04	AGGAAGAATGCGTGTTAACACCC	23	配列番号462

【0307】

40

【表53】

RHDG885T遺伝子型:RHDM295Idnull、weakD型11
エクソン5

BC053OV01	GCTTGCCATGGTGCTGGGT	19	配列番号463
BC053OV02	GCTTGCCATTGTGCTGGGT	19	配列番号464
BC053OV03	GGCTTGCCATGGTGCTGGGT	21	配列番号465
BC053OV04	GGCTTGCCATTGTGCTGGGT	21	配列番号466

【0308】

50

【表 5 4】

RHD906insTGGCT遺伝子型:RHD906insTGGCTDnull
エクソン6

BC054OV01	CTTGTGGCTGGGCTGATCTCCGTGCG	25	配列番号467
BC054OV02	CTTGTGGCTGGGGCTCTGATCTCC	25	配列番号468
BC054OV03	TTGTGGCTGGGCTGATCTCCGTC	23	配列番号469
BC054OV04	TTGTGGCTGGGGCTCTGATCTC	23	配列番号470

【0 3 0 9】

10

【表 5 5】

RHDIVS6+1del4遺伝子型:RHDIVS6+1del4Dnull
エクソン6

BC055OV01	AGTACCTGCCGGTAAGAAACTAGAC	25	配列番号471
BC055OV02	AGTACCTGCCGGAAACTAGACAACT	25	配列番号472
BC055OV03	GTACCTGCCGGTAAGAAACTAGA	23	配列番号473
BC055OV04	GTACCTGCCGGAAACTAGACAAAC	23	配列番号474

【0 3 1 0】

20

【表 5 6】

RHDG941T遺伝子型:RHDG314VDnull
エクソン7

BC056OV01	CTTGTCCACAGGGGTGTTGTAACCG	25	配列番号475
BC056OV02	CTTGTCCACAGGTGTTGTAACCG	25	配列番号476
BC056OV03	TTGTCCACAGGGGTGTTGTAACC	23	配列番号477
BC056OV04	TTGTCCACAGGTGTTGTAACC	23	配列番号478

【0 3 1 1】

30

【表 5 7】

RHDC990G遺伝子型:RHDY330XDnull
エクソン7

BC057OV01	CATCATGGGCTACAACCTCAGCTTG	25	配列番号479
BC057OV02	CATCATGGGCTAGAACCTCAGCTTG	25	配列番号480
BC057OV03	ATCATGGGCTACAACCTCAGCTT	23	配列番号481
BC057OV04	ATCATGGGCTAGAACCTCAGCTT	23	配列番号482

【0 3 1 2】

40

【表 5 8】

RHDIVS8+1G>A遺伝子型:RHDIVS8+1G>ADnull
エクソン8

BC058OV01	GTCTCCTGACAGGTCAGTGTGAGGC	25	配列番号483
BC058OV02	GTCTCCTGACAGATCAGTGTGAGGC	25	配列番号484
BC058OV03	TCTCCTGACAGGTCAGTGTGAGG	23	配列番号485
BC058OV04	TCTCCTGACAGATCAGTGTGAGG	23	配列番号486

【0 3 1 3】

50

【表 5 9】

RHDC410T遺伝子型:RHDDIIIV

エクソン3

BC059OV01	GGTCAACTGGCGCAGTTGGTGG	23	配列番号487
BC059OV02	GGTCAACTGGTGCAGTTGGTGG	23	配列番号488
BC059OV03	GTCAACTGGCGCAGTTGGTGG	21	配列番号489
BC059OV04	GTCAACTGGTGCAGTTGGTGG	21	配列番号490

【0 3 1 4】

10

【表 6 0】

RHDA455C遺伝子型:RHDDIIIa、DIIIc、DIIIV、DIVa

エクソン3

BC060OV01	CAGCTTAGGCAACCTGAGGATGGT	25	配列番号491
BC060OV02	CAGCTTAGGCACCTGAGGATGGT	25	配列番号492
BC060OV03	ACAGCTTAGGCAACCTGAGGATGGTC	27	配列番号493
BC060OV04	ACAGCTTAGGCACCTGAGGATGGTC	27	配列番号494

【0 3 1 5】

20

【表 6 1】

RHDT667G遺伝子型:RHDDIIIa、DVa(kou、yh)、DCS、DAR(weakD型4.2)、weakD型4、weakD型4.1、weakD型29、DIIIV、DOL

エクソン5

BC061OV01	CTGGCCAAGTTCAACTCTGC	21	配列番号495
BC061OV02	CTGGCCAAGTGTCAACTCTGC	21	配列番号496
BC061OV03	TGGCCAAGTTCAACTCTG	19	配列番号497
BC061OV04	TGGCCAAGTGTCAACTCTG	19	配列番号498

30

【0 3 1 6】

【表 6 2】

RHDG916ARHD[コンセンサス鎖]エクソンスキャニング

エクソン6

BC062OV01	GGCTGATCTCCGTGGGGGAGCC	23	配列番号499
BC062OV02	GGCTGATCTCCATCGGGGGAGCC	23	配列番号500
BC062OV03	GCTGATCTCCGTGGGGGAGCC	21	配列番号501
BC062OV04	GCTGATCTCCATCGGGGGAGCC	21	配列番号502

40

【0 3 1 7】

【表 6 3】

RHDA932GRHD[コンセンサス鎖]エクソンスキャニング

エクソン6

BC063OV01	GGGGAGCCAAGTACCTGCCGGTAAG	25	配列番号503
BC063OV02	GGGGAGCCAAGTGCCTGCCGGTAAG	25	配列番号504
BC063OV03	GGGAGCCAAGTACCTGCCGGTAA	23	配列番号505
BC063OV04	GGGAGCCAAGTGCCTGCCGGTAA	23	配列番号506

50

【0318】

【表64】

RHDA1193T遺伝子型:RHDDIVb

エクソン9

BC064OV01	GCACCTCATGAGGCTAAATAT	21	配列番号507
BC064OV02	GCACCTCATGTGGCTAAATAT	21	配列番号508
BC064OV03	AGCACCTCATGAGGCTAAATATT	23	配列番号509
BC064OV04	AGCACCTCATGTGGCTAAATATT	23	配列番号510

10

【0319】

【表65】

RHDA514T遺伝子型:RHDDFRI

エクソン4

BC065OV01	AACATGATGCACATCTACGTGTTCG	25	配列番号511
BC065OV02	AACCTGAGGCACTTCTACGTGTTCG	25	配列番号512
BC065OV03	ACATGATGCACATCTACGTGTTTC	23	配列番号513
BC065OV04	ACCTGAGGCACTTCTACGTGTTTC	23	配列番号514

20

【0320】

【表66】

RH CET307C遺伝子型:RH CERHc

エクソン2

BC066OV01	AGCCAGTCCCTTCTGGGAAGGTGG	25	配列番号515
BC066OV02	AGCCAGTCCCTCCTGGGAAGGTGG	25	配列番号516
BC066OV03	GAGCCAGTCCCTTCTGGGAAGGTGGT	27	配列番号517
BC066OV04	GAGCCAGTCCCTCCTGGGAAGGTGGT	27	配列番号518

30

【0321】

【表67】

RHCEA122G遺伝子型:RHCECw

エクソン1

BC067OV01	CTTAGAGGATCAAAAGGGGCTCG	23	配列番号519
BC067OV02	CTTAGAGGATCGAAAGGGGCTCG	23	配列番号520
BC067OV03	TTAGAGGATCAAAAGGGGCTC	21	配列番号521
BC067OV04	TTAGAGGATCGAAAGGGGCTC	21	配列番号522

40

【0322】

【表68】

RHCEG106A遺伝子型:RHCECx

エクソン1

BC068OV01	ACCCACTATGACGCTTCCTTAGAGG	25	配列番号523
BC068OV02	ACCCACTATGACACTTCCTTAGAGG	25	配列番号524
BC068OV03	TACCCACTATGACGCTTCCTTAGAGGA	27	配列番号525
BC068OV04	TACCCACTATGACACTTCCTTAGAGGA	27	配列番号526

50

【0323】

【表69】

RHCEC676G遺伝子:RHCEE/e

エクソン5

BC069OV01	AGTGTCAACTCTCCTCTGCTGAGAA	25	配列番号527
BC069OV02	AGTGTCAACTCTGCTCTGCTGAGAA	25	配列番号528
BC069OV03	AAGTGTCAACTCTCCTCTGCTGAGAAG	27	配列番号529
BC069OV04	AAGTGTCAACTCTGCTCTGCTGAGAAG	27	配列番号530

10

【0324】

【表70】

RHCEC733G遺伝子型:RHCEVS

エクソン5

BC070OV01	ACCTACTATGCTCTAGCAGTCAGTG	25	配列番号531
BC070OV02	ACCTACTATGCTGTAGCAGTCAGTG	25	配列番号532
BC070OV03	CACCTACTATGCTCTAGCAGTCAGTGT	27	配列番号533
BC070OV04	CACCTACTATGCTGTAGCAGTCAGTGT	27	配列番号534

20

【0325】

【表71】

RHCEG1006T遺伝子型:RHCEVS/V-

エクソン7

BC071OV01	TTTAGCTTGCTGGGTCTTGCTTGGA	25	配列番号535
BC071OV02	TTTAGCTTGCTGTGCTTGCTTGGA	25	配列番号536
BC071OV03	CTTCAGCTTGCTGGGTCTTGCTTGAG	27	配列番号537
BC071OV04	CTTCAGCTTGCTGTGCTTGCTTGAG	27	配列番号538

30

【0326】

【表72】

KELT698C遺伝子型:KELK/k

エクソン6

BC072OV01	AGAAGTCTCAGCATTGGTTAAAGT	25	配列番号539
BC072OV02	AGAAGTCTCAGCGTTGGTTAAAGT	25	配列番号540
BC072OV03	CAGAAGTCTCAGCATTGGTTAAAGTT	27	配列番号541
BC072OV04	CAGAAGTCTCAGCGTTGGTTAAAGTT	27	配列番号542

40

【0327】

【表73】

KELA697T遺伝子型:KELK

エクソン6

BC073OV01	AACTTTAACCGAACGCTGAGACTTC	25	配列番号543
BC073OV02	AACTTTAACCGATCGCTGAGACTTC	25	配列番号544
BC073OV03	AAACTTTAACCGAACGCTGAGACTTCT	27	配列番号545
BC073OV04	AAACTTTAACCGATCGCTGAGACTTCT	27	配列番号546

50

【0328】

【表74】

KELT961C遺伝子型:KELK_{pa}/K_{pb}

エクソン8

BC074OV01	ACTGGAACAGCCATGAAGTGATGGA	25	配列番号547
BC074OV02	ACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGA	25	配列番号548
BC074OV03	AACTGGAACAGCCATGAAGTGATGGAG	27	配列番号549
BC074OV04	AACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGAG	27	配列番号550

10

【0329】

【表75】

KELG962A遺伝子型:KELK_{pc}

エクソン8

BC075OV01	AACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGG	25	配列番号551
BC075OV02	AACTGGAACAGCTGTGAAGTGATGG	25	配列番号552
BC075OV03	AAACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGA	27	配列番号553
BC075OV04	AAACTGGAACAGCTGTGAAGTGATGGA	27	配列番号554

20

【0330】

【表76】

KELC1910T遺伝子型:KELJ_{sa}/J_{sb}

エクソン17

BC076OV01	TGGGGGCTGCCCGCCTGTGACA	23	配列番号555
BC076OV02	TGGGGGCTGCCTCGCCTGTGACA	23	配列番号556
BC076OV03	GGGGGCTGCCCGCCTGTGAC	21	配列番号557
BC076OV04	GGGGGCTGCCTCGCCTGTGAC	21	配列番号558

30

【0331】

【表77】

KELG1208A遺伝子型:KELK_{mod-1}

エクソン10

BC077OV01	AAGATCATGTGGCTCTGCAGAAAGT	25	配列番号559
BC077OV02	AAGATCATGTGGCTCTGCAGAAAGT	25	配列番号560
BC077OV03	TAAGATCATGTGGCTCTGCAGAAAGTC	27	配列番号561
BC077OV04	TAAGATCATGTGGCTCTGCAGAAAGTC	27	配列番号562

40

【0332】

【表78】

KIDDG838A遺伝子型:KIDDJ_{ka}/J_{kb}

エクソン9

BC078OV01	GCCCCATTGAGGACATCTACTTTG	25	配列番号563
BC078OV02	GCCCCATTGAGAACATCTACTTTG	25	配列番号564
BC078OV03	CCCCATTGAGGACATCTACTTT	23	配列番号565
BC078OV04	CCCCATTGAGAACATCTACTTT	23	配列番号566

50

【0 3 3 3】

【表 7 9】

KIDDイントロン5G>A遺伝子型:KIDDJknnull
エクソン6

BC079OV01	TCTTGCCCCACAGGTCTTAATAGC	25	配列番号567
BC079OV02	TCTTGCCCCACAAGTCATTAATAGC	25	配列番号568
BC079OV03	GCTATTAATGACCTGTGGGGCAAGA	25	配列番号569
BC079OV04	GCTATTAATGACTGTGGGGCAAGA	25	配列番号570

10

【0 3 3 4】

【表 8 0】

KIDDT871C遺伝子型:KIDDJknnull
エクソン9

BC080OV01	GGTTTCAACAGCTCTGGCCTGCA	25	配列番号571
BC080OV02	GGTTTCAACAGCCCTCTGGCCTGCA	25	配列番号572
BC080OV03	GGGTTTCAACAGCTCTGGCCTGCAT	27	配列番号573
BC080OV04	GGGTTTCAACAGCCCTCTGGCCTGCAT	27	配列番号574

20

【0 3 3 5】

【表 8 1】

DUFFY^G125A遺伝子型:DUFFYFYa/FYb

BC081OV01	ATGGAGACTATGGTGCCAACCTGGA	25	配列番号575
BC081OV02	ATGGAGACTATGATGCCAACCTGGA	25	配列番号576
BC081OV03	GATGGAGACTATGGTGCCAACCTGGAA	27	配列番号577
BC081OV04	GATGGAGACTATGATGCCAACCTGGAA	27	配列番号578

30

【0 3 3 6】

【表 8 2】

DUFFY^T-33C遺伝子型:DUFFYFYGATA-1
プロモーター

BC082OV01	CCTTGGCTCTTATCTTGGAAAGCACA	25	配列番号579
BC082OV02	CCTTGGCTCTTACCTTGGAAAGCACA	25	配列番号580
BC082OV03	CTTGGCTCTTATCTTGGAAAGCAC	23	配列番号581
BC082OV04	CTTGGCTCTTACCTTGGAAAGCAC	23	配列番号582

40

【0 3 3 7】

【表 8 3】

DUFFY^C265T遺伝子型:DUFFYFYx

BC083OV01	CCTCTCTCCGCTGGCAGC	19	配列番号583
BC083OV02	CCTCTCTCCGCTGGCAGC	19	配列番号584
BC083OV03	ACCTCTCTCCGCTGGCAGCT	21	配列番号585
BC083OV04	ACCTCTCTCCGCTGGCAGCT	21	配列番号586

【0 3 3 8】

【表 8 4】

MNSC59T遺伝子型:MNSMN

エクソン2GYPA

BC084OV01	GCATATCAGCATCAAGTACCACTGG	25	配列番号587
BC084OV02	GCATATCAGCATTAAGTACCACTGA	25	配列番号588
BC084OV03	CATATCAGCATCAAGTACCACTG	23	配列番号589
BC084OV04	CATATCAGCATTAAGTACCACTG	23	配列番号590

【0 3 3 9】

10

【表 8 5】

MNSG71AT72G遺伝子型:MNSMN

エクソン2GYPA

BC085OV01	CAAGTACCACTGGTGTGGCAATGCA	25	配列番号591
BC085OV02	TAAGTACCACTGAGGTGGCAATGCA	25	配列番号592
BC085OV03	TCAAGTACCACTGGTGTGGCAATGCAC	27	配列番号593
BC085OV04	TTAAGTACCACTGAGGTGGCAATGCAC	27	配列番号594

【0 3 4 0】

20

【表 8 6】

MNST143C遺伝子型:MNSS/s

エクソン4GYPB

BC086OV01	TTATAGGAGAAATGGGACAACTTGT	25	配列番号595
BC086OV02	TTATAGGAGAAACGGGACAACTTGT	25	配列番号596
BC086OV03	TTTATAGGAGAAATGGGACAACTTGTC	27	配列番号597
BC086OV04	TTTATAGGAGAAACGGGACAACTTGTC	27	配列番号598

【0 3 4 1】

30

【表 8 7】

MNSC230T遺伝子型:MNSU

エクソン5GYPB

BC087OV01	GTATTATTGGAACGATCCTCTTAAT	25	配列番号599
BC087OV02	GTATTATTGGAATGATCCTCTTAAT	25	配列番号600
BC087OV03	GGTATTATTGGAACGATCCTCTTAATT	27	配列番号601
BC087OV04	GGTATTATTGGAATGATCCTCTTAATT	27	配列番号602

【0 3 4 2】

40

【表 8 8】

MNSイントロン5+5GT遺伝子型:MNSU

エクソン5GYPB

BC088OV01	TGATAAAGGTGAGAATTCAAGTTTT	25	配列番号603
BC088OV02	TGATAAAGGTGATAATTCAAGTTTT	25	配列番号604
BC088OV03	AAAAACTGAATTCTCACCTTATCA	25	配列番号605
BC088OV04	AAAAACTGAATTATCACCTTATCA	25	配列番号606

【0 3 4 3】

50

【表 8 9】

MNSC790A遺伝子型:MNSGP.Mur(Mi.III)

エクソン3

BC089OV01	TATATGCAGATACGCACAAACGGGA	25	配列番号607
BC089OV02	TATATGCAGATAAGCACAAACGGGA	25	配列番号608
BC089OV03	TTATATGCAGATACGCACAAACGGGAC	27	配列番号609
BC089OV04	TTATATGCAGATAAGCACAAACGGGAC	27	配列番号610

【0 3 4 4】

10

【表 9 0】

MNSC850G遺伝子型:MNSMNSGP.Mur(Mi.III)

エクソン3

BC090OV01	GGGGAAACAGTTGTAACAGAAATT	25	配列番号611
BC090OV02	GGGCAAACAGTTCTAACAGAAATT	25	配列番号612
BC090OV03	AGGGGAAACAGTTGTAACAGAAATT	27	配列番号613
BC090OV04	AGGGCAAACAGTTCTAACAGAAATT	27	配列番号614

【0 3 4 5】

20

【表 9 1】

DIEGOT2561C遺伝子型:DIEGODIa/DIb

エクソン19

BC091OV01	GCCAGGGAGGCCAGCGTGGACTTCA	25	配列番号615
BC091OV02	GCCAGGGAGGCCGGCGTGGACTTCA	25	配列番号616
BC091OV03	CCAGGGAGGCCAGCGTGGACTTC	23	配列番号617
BC091OV04	CCAGGGAGGCCGGCGTGGACTTC	23	配列番号618

【0 3 4 6】

30

【表 9 2】

DOMBROCKA793G遺伝子型:DOMBROCKDOa/DOb

エクソン2

BC092OV01	ACTGCAACCAGTTCCCTCTTGGGTG	25	配列番号619
BC092OV02	ACTGCAACCAGTCCCTCTTGGGTG	25	配列番号620
BC092OV03	AACTGCAACCAGTTCCCTCTTGGGTG	27	配列番号621
BC092OV04	AACTGCAACCAGTCCCTCTTGGGTG	27	配列番号622

【0 3 4 7】

40

【表 9 3】

COLTONC134T遺伝子型:COLTONCOa/COb

エクソン1

BC093OV01	TTGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTGT	25	配列番号623
BC093OV02	TTGTCCTGGACCAACCGTCTGGTTGT	25	配列番号624
BC093OV03	TGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTG	23	配列番号625
BC093OV04	TGTCCTGGACCAACCGTCTGGTTG	23	配列番号626

【0 3 4 8】

50

【表94】

RHDG1048C遺伝子型:RHDDIVa/DIVb

エクソン7

BC094OV01	GCTGGTGCTTGATACCGTCGG	21	配列番号627
BC094OV02	GCTGGTGCTTCATACCGTCGG	21	配列番号628
BC094OV03	TGCTGGTGCTTGATACCGTCGGA	23	配列番号629
BC094OV04	TGCTGGTGCTTCATACCGTCGGA	23	配列番号630

【0349】

10

1.2 血液型の遺伝子タイピング用のDNAチップの製造

ガラススライドのプリンティングおよび加工

以前に同定した遺伝的変異を検出することができるプローブを、溶媒としてDMSOを使用して、アミノシランをコーティングした支持体(ガラススライド)にプリンティングする。温度および相対湿度を制御しながら、オリゴヌクレオチド(プローブ)のスポットターまたはプリンターを使用して、プリンティングを実施する。

【0350】

プローブと支持体(ガラススライド)の接合は、製造者(例えば、Corning Lifesciences <http://www.corning.com>)によって提供される文書に記載の通り、紫外線照射による架橋および加熱によって実施する。蒸着プロセス中の相対湿度は40~50%に、温度は約20℃に保つ。

20

【0351】

1.3 ヒトの血液型を同定するためのDNAチップの臨床的有用性の確認:赤血球抗原と関連するヒトの遺伝的変異の、感度、特異性、再現性の高い同時検出

1.3.1 ハイブリダイズさせるサンプルの調製

個体のDNAを、標準的な濾過プロトコルによって血液サンプルから抽出する。(例えば、Macherey Nagel、Qiageneからの市販のキットなど)。

30

【0352】

当該のすべてのエクソンおよびインtronは、オリゴヌクレオチドプライマーの適切な対を使用してマルチプレックスPCRによって増幅させる。ヒト赤血球抗原と関連する遺伝的変異を検出するための、PCRマルチプレックスを実施するのに有用なオリゴヌクレオチドプライマーは、例えばソフトウェア:Primer3(<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>)またはWeb Primer(<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>)を用いてGenBankにおいて記載されたのと同様に、対応する遺伝子配列を使用して当業者によって設計することができる。実際、検出する遺伝的変異が存在し得る場合に遺伝子断片の特異的な増幅を可能にする、オリゴヌクレオチドプライマーの任意の対を使用することができる。可能な場合、最小可能数のPCR反応で前記増幅の実施を可能にする、オリゴヌクレオチドプライマーの対を使用する。

30

【0353】

この場合、赤血球抗原と関連する遺伝的変異を検出するためのDNAチップを使用して、前述の(94)遺伝的変異の遺伝子タイピングに必要な36個の断片を、わずか3回のPCR反応で増幅させることができたプライマーを選択した。

40

【0354】

PCRマルチプレックス反応は、検出する遺伝的変異が存在し得る遺伝子断片の特異的な増幅を可能にする、同じ時間および温度条件下において同時に実施する。ひとたびPCRマルチプレックスが終了した後、アガロースゲル分析を使用して増幅反応が起こったことを確認する。

【0355】

次に、ハイブリダイズさせたサンプル(増幅産物)にDNaseを用いた断片化を施し、生成した断片化産物には間接的な標識を施す。末端トランスフェラーゼはヌクレオチドを加え

50

、分子対の一要素と共有結合し、例えばビオチンと互いに、これらの小さいDNA断片の末端と特異的な結合を示す。

【0356】

サンプルをDNAチップに施す前に、5分間で95℃に加熱することによってサンプルを変性させ、次いで「ChipMapキットハイブリダイゼーションバッファー」(Ventana Medical System)を加える。

【0357】

1.3.2 ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、このような使用に特異的に開発されたVentana Discovery(Ventana Medical Systems)などの、ハイブリダイゼーションステーションにおいて自動的に実施する。あるいはハイブリダイゼーションは、手作業で実施することができる。

10

【0358】

スライドのプレハイブリダイゼーションおよびプロッキングはBSAを用いて実施する。次に、Ventana9.0Europe(Ventana Medical System)のプロトコルに従い、ハイブリダイゼーション溶液(ChipMapキットハイブリダイゼーションバッファー、Ventana Medical System)をDNAチップの表面に施し、それを1時間45分に保つ。最後にスライドを、異なる洗浄溶液(ChipMapハイブリダイゼーションキットバッファー、Ventana Medical System)に施す。ひとたびハイブリダイゼーションのプロセスが終了した後、スライドの最終的な洗浄および乾燥を開始する。

20

【0359】

ハイブリダイゼーションが起こると、末端トランスフェラーゼによって増幅産物中に取り込まれた分子と特異的に結合して(例えばビオチンの取り込みの場合、ストレプトアビジン-Cy3などのストレプトアビジンと結合した蛍光団を使用することができる)、ハイブリダイゼーションが起こったプローブ位置を標識することができる、蛍光標識分子とのインキュベーションによってDNAチップが発色する。

【0360】

1.3.3.スライドのスキャニング

スライドを蛍光共焦点スキャナ、例えばAxon4100a中に置き、レーザーによって励起したときに蛍光団によって発せられるシグナルをスキャンする。

30

【0361】

1.3.4 画像の定量化

スキャナの専用ソフトウェアによって、ハイブリダイゼーションが起こった位置におけるシグナルから得た画像を定量化することができる。

【0362】

1.3.5 結果の解釈:ヒト赤血球抗原と関連するヒトの遺伝的変異に関する個体の遺伝子型の決定、および個体の血液型の同定。

異なる遺伝的変異を検出するプローブを用いて得たシグナルから、個体の遺伝子型を確定する。まず最初に、スキャナのソフトウェアが機能を果たして、各プローブに関して得た絶対的なシグナル強度値から局所のバックグラウンドノイズを差し引く。次に、それぞれの遺伝的変異を特徴づけるために使用する、4プローブのそれぞれに関する複製物をグループ分けする。4プローブのそれぞれに関する平均強度値を、複製物から照合した平均値を使用して計算して、他の考慮事項から除外することができる異常値(アウトライア)を同定する。ひとたびプローブのそれぞれに関する平均強度値を知った後、次いで2つの比率を計算する(比率1および比率2):

40

比率1=プローブ1に関する平均強度/(プローブ1に関する平均強度+プローブ2に関する平均強度)

比率2=プローブ3に関する平均強度/(プローブ3に関する平均強度+プローブ4に関する平均強度)

上式でプローブ1は遺伝的変異A(例えば通常の対立遺伝子)を検出し(それと特異的にハイブリダイズすることができ)、プローブ2は遺伝的変異B(例えば突然変異対立遺伝子)を検

50

出し(それと特異的にハイブリダイズすることができ)、プローブ3は遺伝的変異A(例えば通常の対立遺伝子)を検出し(それと特異的にハイブリダイズすることができ)、プローブ4は遺伝的変異B(例えば突然変異対立遺伝子)を検出する(それと特異的にハイブリダイズすることができる)。

【0363】

3つの考えられる遺伝子型のそれぞれ1つを特徴づける3つの線形関数において、これらの比率を代用する:

AA 関数1

AB 関数2

BB 関数3

10

【0364】

最高絶対値を表す関数により、患者の遺伝子型を決定する。

【0365】

この場合、遺伝的変異(AA、AB、BB)の3つの考えられる遺伝子型のそれぞれについて、5つの対象を分析することによって線形関数を得る。これらの結果を用いて、比率1および2を15の対象について計算する。これらの比率は、線形関数を作製するための3つの群の分類変数であり、これらを用いて2対の設計したプローブの識別能力を評価する。識別能力が100%ではない場合は、プローブを再度設計する。3つの遺伝子型のそれぞれを特徴づける新たな対象は、新たな比率1および2を構成して線形関数を完全にし、要約するとこれら3つの関数に基づくアルゴリズムの識別能力を向上させる。

20

【0366】

共焦点蛍光スキャナを使用するとき、信頼できる結果を得るために、比率1および2は群を構成するために使用する比率の範囲内にあり、バックグラウンドノイズに対する4n(例えば40)の複製物の平均蛍光強度は5より大きく、DNAチップ複製物のすべての変異係数は0.25未満であることが好ましい。

【0367】

再度、蛍光共焦点スキャナを実験において使用するとき、信頼できると考えられる完全なハイブリダイゼーションのために、プローブの蛍光強度と全DNAチッププローブのバックグラウンドノイズの比率は15を超えることが好ましい。同様に、すべての比率の平均は0.6を超えることが好ましく、かつ陰性対照はバックグラウンドノイズの3倍以下であることが好ましい。

30

【0368】

要約するとこの場合、4つのプローブ(反復10回)が各突然変異を検出するためのスライド上に現れる。これらのプローブの2つが1つの遺伝的変異(A)を検出し、他の2つは他の遺伝的変異(B)を検出する。調べる塩基はプローブの中心位置に位置する。

【0369】

遺伝的変異Aと同型の対象は遺伝的変異Bを示さないはずである。したがって、ガラス支持体から得た画像中では、遺伝的変異Bを検出するプローブは、変異Aによって示されるそれより著しく低いハイブリダイゼーションシグナルを示すはずであり、逆も然りである。この場合、ソフトウェア分析によって比率1および2は1を示すはずであり、対象は同型AAとして割り当てられるはずである。

40

【0370】

他方で、所定の遺伝的変異に関する異型対象は両方の遺伝的変異を示す。したがって、それらを検出するプローブは等しいハイブリダイゼーションシグナルを示す。ソフトウェア分析によって比率1および2は0.5を示すはずであり、対象は異型ABとして割り当てられるはずである。

【0371】

(実施例2)

血液型を遺伝子タイピングするためにDNAチップを使用する、15個体の血液ドナーの血液型の同定

50

2.1 DNA抽出

従来の方法によって血清群Aおよび0に応答した15の血液ドナーからDNAを抽出した。当該の領域の塩基配列決定による遺伝的分析によって、5ドナーが遺伝子型188G189C(血清測定値A)を有しており、他の5ドナーが遺伝子型188GA189CT(血清測定値0)を有しており、かつ残りの5ドナーは188A189Tを有していた(血清測定値0)ことを確認した。

【0372】

2.2 プローブ設計

前に記載したように(実施例1)、多型ABOG188A/C189T遺伝子型AB001vを検出するため4つのプローブを設計した:

【0373】

【表95】

10

BC012OV01	ACCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGCC	25	配列番号299
BC012OV02	ACCATCTGCAGCATGTCTCGTTGCC	25	配列番号300
BC012OV03	CCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGC	23	配列番号301
BC012OV04	CCATCTGCAGCATGTCTCGTTGC	23	配列番号302

【0374】

2.3 所定のヒト赤血球抗原と関連するヒトの遺伝的変異を検出するためのDNAチップの製造

20

実施例1.2中に記載したのと同様にマイクロアレイヤーを用いて、設計したプローブをガラススライド上にプリントイングした。

【0375】

2.4 PCRおよびサンプルの標識

当該の遺伝的変異(ABOG188A/C189T遺伝子型AB001v)を分析するためのABO遺伝子の領域を、特異的プライマーを使用してPCRマルチプレックスによって増幅させた。実施例1.3.1中に記載したのと同様に、増幅産物を断片化し標識化した。

【0376】

2.5 サンプルのハイブリダイゼーション

実施例1.3.2中に記載したのと同様に、自動式ハイブリダイゼーションステーションにおいてハイブリダイゼーションを実施した。

30

【0377】

2.6 結果の分析

スライドをスキャナ中に置いた。レーザーによって励起時に結合した蛍光団によって発せられたシグナルを測定し(実施例1.3.3)、ハイブリダイゼーションが起こった地点におけるシグナルから得た画像を定量化した(実施例1.3.4)。

【0378】

実施例1.3.5中に前に記載したアルゴリズムを使用して、結果の分析を実施した。このアルゴリズムによって、血清学的方法および塩基配列決定と比較して100%の一致で、15の対象に関するこの遺伝的変異を特徴づけることができた。

40

【0379】

図1は比率1および2の表示を示し、15の患者の特徴づけを可能にする。

【0380】

表5は、使用した4プローブの複製物の数が10であったときの、3つの遺伝子型群に関する線形関数を示す。「X」は比率1であり、「Y」は比率2であり、「0」は遺伝子型188A189Tに対応し、「1」は遺伝子型188GA189CTに対応し、かつ「2」は遺伝子型188G189Cに対応する。

【0381】

【表96】

表5

遺伝子タイピングのために使用した関数の係数

クラス	0	1	2
X	7,338994	101,6024	176,7265
Y	1227,301	603,8602	81,12664
(定数)	-499,132	-163,927	-27,3071

【0382】

10

遺伝子型188G189Cを有するドナーは、それぞれ0.77および0.82の比率1および2を有していた。線形関数にこれらの比率を代用する際に、関数2が高い絶対値を示すことが観察される。このことから我々は、4プローブのそれぞれに関して10個の複製物を使用するとき、どのようにして本発明のアルゴリズムがドナーを完全に分類することができるかを見ることができる。

【0383】

表6は、4プローブのそれぞれの8個の複製物を使用するときに得られる線形関数を示す。

【0384】

【表97】

20

表6

遺伝子タイピングのために使用した関数の係数

クラス	0	1	2
X	178,1139	272,6293	417,9721
Y	-42,2919	59,0597	132,0375
(定数)	-16,0985	-82,5103	-225,228

【0385】

30

遺伝子型188G189Cを有する同じドナーは、それぞれ0.77および0.82の同じ比率1および2を有していた。線形関数にこれらの比率を代用する際に、関数2が高い絶対値を示すことが観察される。このことから我々は、4プローブのそれぞれに関して8個の複製物を使用するとき、本発明のアルゴリズムが患者を完全に分類することができることを見ることができる。

【0386】

表7は、4プローブのそれぞれの6個の複製物を使用するときに得られる線形関数を示す。

【0387】

【表98】

40

表7

遺伝子タイピングのために使用した関数の係数

クラス	0	1	2
X	181,8305	307,0291	477,2833
Y	-51,0987	15,33189	57,86783
(定数)	-15,1285	-79,8083	-218,298

【0388】

遺伝子型188G189Cを有する同じドナーは、それぞれ0.77および0.82の同じ比率1および2を有していた。線形関数にこれらの比率を代用する際に、関数2が高い絶対値を示すこと

50

が観察される。このことから我々は、4プローブのそれぞれについて6個の複製物を使用するとき、本発明のアルゴリズムが患者を完全に分類することができるこを見ることができる。

【0389】

(実施例3)

IBDの治療に対する応答性の診断、予後および予測のためにDNAチップを使用する、炎症性腸疾患(IBD)と関連するヒトの遺伝的変異の検出

3.1 IBDと関連する遺伝的変異を遺伝子タイピングするためのDNAチップの設計

IBDと関連するヒトの遺伝的変異の、感度、特異性、再現性の高い同時検出を可能にするDNAチップを設計し製造した。遺伝的変異は、IBDに罹患する高いまたは低い危険性、治療に対する良いまたは悪い応答性、およびさらに疾患の良いまたは悪い予後と関連する。表1は、このDNAチップを使用して測定することができる、IBDと関連するヒトの遺伝的変異の例証となる例を列挙する。

【0390】

設計および製造されるDNAチップは、その表面上に複数のプローブを含み、遺伝的変異の検出を可能にする支持体(ガラススライド)からなる。これらのプローブは、IBDと関連する遺伝子の(増幅した)標的配列とハイブリダイズすることができる。使用するプローブのDNA配列は以下に列挙する。一般に、遺伝子の名称および突然変異を示す(ヌクレオチドの変化、「ins」:挿入「del」:欠失またはアミノ酸の変化):

1.-多剤耐性タンパク質(MDR-1)	G2677T/A/C	20
(Ala893Ser/Thr/Pro)このプローブは、遺伝子の多型G2677T(Ala893Ser)、G2677A(Ala893Thr)およびG2677C(Ala893Pro)を検出する		
多剤耐性タンパク質MDR-1)		
TCACCTTCCCAGCACCTTAGTTC- 配列番号631		
GAACCTAGAAGGTGCTGGGAAGGTGA- 配列番号632		
TCACCTTCCCAGGACCTTAGTTC- 配列番号633		
GAACCTAGAAGGTCCCTGGGAAGGTGA- 配列番号634		
TCACCTTCCCAGAACCTTAGTTC- 配列番号635		
GAACCTAGAAGGTTCTGGGAAGGTGA- 配列番号636		
TCACCTTCCCAGTACCTTAGTTC- 配列番号637		30
GAACCTAGAAGGTACTGGGAAGGTGA- 配列番号638		
2.-多剤耐性タンパク質(MDR-1)	C3435T	
TGCTGCCCTCACAAATCTCTTCCTGT- 配列番号639		
ACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCA- 配列番号640		
TGCTGCCCTCACGATCTCTTCCTGT- 配列番号641		
ACAGGAAGAGATCGTGAGGGCAGCA- 配列番号642		
3.-CARD15 R702W		
AAGGCCCTGCTCCGGCGCCAGGCCT- 配列番号643		
AGGCCTGGCGCCGGAGCAGGGCCTT- 配列番号644		
AAGGCCCTGCTCTGGCGCCAGGCCT- 配列番号645		40
AGGCCTGGCGCCAGAGCAGGGCCTT- 配列番号646		
4.-CARD15 G908R		
TTCAGATTCTGGGGCAACAGAGTGG- 配列番号647		
CCACTCTGTTGCCAGAAATCTGAA- 配列番号648		
TTCAGATTCTGGCGAACAGAGTGG- 配列番号649		
CCACTCTGTTGCCAGAAATCTGAA- 配列番号650		
5.-CARD15 1007insC		
TCCTGCAGGCCCTTGAAAGGAATG- 配列番号651		
CATTCCCTTCAAGGGCCTGCAGGA- 配列番号652		
TCCTGCAGGCCCTTGAAAGGAATGA- 配列番号653		50

TCATTCCTTCAAGGGCCTGCAGGA- 配列番号654		
6.-ミクロゾームエポキシドヒドロラーゼ(EPXH1)	T612C(Y113H)	
ATTCTCAACAGATAACCCTCACTTCA- 配列番号655		
TGAAGTGAGGGTATCTGTTGAGAAT- 配列番号656		
ATTCTCAACAGACACCCCTCACTTCA- 配列番号657		
TGAAGTGAGGGTGTCTGTTGAGAAT- 配列番号658		
7.-単球化学走性タンパク質1(MCP1) (-2518)G/A		
AGGCAGACAGCTGTCACCTTCCAGA- 配列番号659		
TCTGGAAAGTGACAGCTGTCTGCCT- 配列番号660		
AGGCAGACAGCTATCACTTCCAGA- 配列番号661		10
TCTGGAAAGTGATAGCTGTCTGCCT- 配列番号662		
8.-インターロイキン10(IL10) (-1082)G/A		
GCTTCTTGGGAAGGGGAAGTAGGG- 配列番号663		
CCCTACTTCCCCTCCAAAGAACG- 配列番号664		
GCTTCTTGGGAGGGGAAGTAGGG- 配列番号665		
CCCTACTTCCCCCTCCAAAGAACG- 配列番号666		
9.-インターロイキン10(IL10) G15R G43A		
GTCCTCCTGACTGGGTGAGGCCA- 配列番号667		
GTCCTCCTGACTAGGGTGAGGCCA- 配列番号668		
TGCCCTCACCCAGTCAGGAGGAC- 配列番号669		
TGCCCTCACCTAGTCAGGAGGAC- 配列番号670		20
10.-インターロイキン16(IL16) (-295)T/C		
TTGTTCCATATCATAAAGAGTCAGGG- 配列番号671		
CCCTGACTCTTATGATAGGAACAA- 配列番号672		
TTGTTCCATACAAAGAGTCAGGG- 配列番号673		
CCCTGACTCTTGTGATAGGAACAA- 配列番号674		
11.-Fasリガンド (-843)C/T		
ATGAAAACATTGTGAAATACAAAGC- 配列番号675		
GCTTGTATTCACAATGTTTCAT- 配列番号676		
ATGAAAACATTGCGAAATACAAAGC- 配列番号677		30
GCTTGTATTCGCAATGTTTCAT- 配列番号678		
12.核因子kappa-B(NF-B1) 94delATTG		
CCCCGACCATTGGGCCCGGCAGGCG- 配列番号679		
CGCCTGCCGGGCCAATGGTCGGGG- 配列番号680		
CCCCGACCATTGATTGGGCCGGCA- 配列番号681		
TGCCGGGCCCAATCAATGGTCGGGG- 配列番号682		
13.核因子kappa-B阻害剤 (NFKB1A) SNP 3'UTR(G/A)中		
TGCACACTGCCTGGCCAAAACGTC- 配列番号683		
TGCACACTGCCTAGCCCCAAAACGTC- 配列番号684		
GACGTTTGGGCCAGGCAGTGTGCA- 配列番号685		40
GACGTTTGGGCTAGGCAGTGTGCA- 配列番号686		
14.-シグナル変換物質および転写6の活性化物質(STAT6)	G2964A	
GCTCTGAGACACGCCCAACATGCC- 配列番号687		
GGCATGTTGGGCCGTGTCTCAGAGC- 配列番号688		
GCTCTGAGACACACCCCAACATGCC- 配列番号689		
GGCATGTTGGGTGTCTCAGAGC- 配列番号690		
15.-インターロイキン18(IL18) TCA/TCCコドン35中		
GCCAAAGTAATCGGATTCCAGGTT- 配列番号691		
AAACCTGGAATCCGATTACTTGGC- 配列番号692		
GCCAAAGTAATCTGATTCCAGGTT- 配列番号693		50

AAACCTGGAATCAGATTACTTGGC- 配列番号694

16.-地中海熱の遺伝子(MEFV) E474E

CTACTTCCTGGAGCAGCAAGAGCAT- 配列番号695

ATGCTCTTGCTGCTCCAGGAAGTAG- 配列番号696

CTACTTCCTGGAACAGCAAGAGCAT- 配列番号697

ATGCTCTTGCTGTTCCAGGAAGTAG- 配列番号698

17.-地中海熱の遺伝子(MEFV) Q476Q

CCTGGAGCAGCAGGAGCATTCTTT- 配列番号699

AAAGAAATGCTCCTGCTGCTCCAGG- 配列番号700

CCTGGAGCAGCAAGAGCATTCTTT- 配列番号701

AAAGAAATGCTCTGCTGCTCCAGG- 配列番号702

18.-地中海熱の遺伝子(MEFV) D510D

CGCCCTGCTCGACGCGCTGATTGGG- 配列番号703

CCCAATCAGCGCGTCGAGCAGGGCG- 配列番号704

CGCCCTGCTCGATGCGCTGATTGGG- 配列番号705

CCCAATCAGCGCATCGAGCAGGGCG- 配列番号706

19.-地中海熱の遺伝子(MEFV) P588P

GCCAATCAGCTCCGGAACTACGGAG- 配列番号707

CTCCGTAGTTCCGGAGCTGATTGGC- 配列番号708

GCCAATCAGCTCTGAAACTACGGAG- 配列番号709

CTCCGTAGTTCCAGAGCTGATTGGC- 配列番号710

20.-Discs、大きな相同体5(DLG5) 113G/A(R30Q)

TCATTCACTTGCCGGTCAGTGAGGA- 配列番号711

TCCTCACTGACCGGCAAGTGAATGA- 配列番号712

TCATTCACTTGCTGGTCAGTGAGGA- 配列番号713

TCCTCACTGACCAGCAAGTGAATGA- 配列番号714

21.-コロニ-刺激因子受容体1(CSFR1) A2033T

AAACCCCTTATTACCTAACAGC- 配列番号715

GCTGTGATTAGGTGAATAAGGGTTT- 配列番号716

AAACCCCTTATTCTCCTAACAGC- 配列番号717

GCTGTGATTAGGAGAATAAGGGTTT- 配列番号718

22.-有機力チオノ輸送体(OCTN1、SLC22A4) 1672C/T(L503F)

CTGATTGGAATCCTCACCCCTTTT- 配列番号719

AAAAAAGGGTGAGGATTCCAATCAG- 配列番号720

CTGATTGGAATCTCACCCCTTTT- 配列番号721

AAAAAAGGGTGAGGATTCCAATCAG- 配列番号722

23.-有機力チオノ輸送体(OCTN2、SLC22A5) (-207)G/C

CCAGGGAAAGGTTGCGGGCCTGGGCC- 配列番号723

GGCCCAGGCCCGAACCTTCCCTGG- 配列番号724

CCAGGGAAAGGTTCCGGGCCTGGGCC- 配列番号725

GGCCCAGGCCCGAACCTTCCCTGG- 配列番号726

24.-トル様受容体4(TLR4) (A/G) Asp299Gly

ACTACCTCGATGATATTATTGACTT- 配列番号727

AAGTCAATAATATCATCGAGGTAGT- 配列番号728

ACTACCTCGATGGTATTATTGACTT- 配列番号729

AAGTCAATAATACCATCGAGGTAGT- 配列番号730

25.-トル様受容体4(TLR4) (C/T) Thr399Ile

ATTTTGGGACAACCAGCCTAAAGTA- 配列番号731

TACTTTAGGCTGGTTGTCCCCAAAT- 配列番号732

ATTTTGGGACAATCAGCCTAAAGTA- 配列番号733

10

20

30

40

50

TACTTTAGGCTGATTGTCCCCAAAT- 配列番号734		
26.- インターロイキン1 (IL1) (-511)A/C		
GAAGAGAATCCAGAGCAGCCTGTT- 配列番号735		
AACAGGCTGCTCTGGGATTCTCTTC- 配列番号736		
GAAGAGAATCCCCGAGCAGCCTGTT- 配列番号737		
AACAGGCTGCTCGGGGATTCTCTTC- 配列番号738		
27.- スーパーオキシドジスムターゼ2(SOD2) (C/T)Ala16Val		
AGCTGGCTCCGGCTTGGGTATCT- 配列番号739		
AGATACCCCAAAGCCGGAGCCAGCT- 配列番号740		
AGCTGGCTCCGGTTTGGGTATCT- 配列番号741	10	
AGATACCCCAAACCGGAGCCAGCT- 配列番号742		
28.- ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPARG) (C/G)Pro12Ala		
TCTCCTATTGACCCAGAAAGCGATT- 配列番号743		
AATCGCTTCTGGTCAATAGGAGA- 配列番号744		
TCTCCTATTGACGCAGAAAGCGATT- 配列番号745		
AATCGCTTCTGCGTCAATAGGAGA- 配列番号746		
29.- 細胞間接着分子1(ICAM1) (A/G)K469E		
GAGGTCACCCGCAAGGTGACCGTGA- 配列番号747		
TCACGGTCACCTTGCAGGTGACCTC- 配列番号748		
GAGGTCACCCGCGAGGTGACCGTGA- 配列番号749	20	
TCACGGTCACCTCGCGGGTGACCTC- 配列番号750		
30.- 細胞間接着分子1 ICAM1 R241G		
TGTTCCCTGGACAGGCTGTTCCAG- 配列番号751		
CTGGGAACAGCCTGTCCAGGGAAACA- 配列番号752		
TGTTCCCTGGACAGGGCTGTTCCAG- 配列番号753		
CTGGGAACAGCCGTCCAGGGAAACA- 配列番号754		
31.- IBD5遺伝子座 IGR2060a_1		
CCTTGCAACCCCTGGCAAAGGTAATG- 配列番号755		
CATTACCTTGCCAGGGTTGCAAGG- 配列番号756		
CCTTGCAACCCCTCGCAAAGGTAATG- 配列番号757	30	
CATTACCTTGCGAGGGTTGCAAGG- 配列番号758		
32.- IBD5遺伝子座 IGR2198a_1		
CAGTAGACGAACGATGCAAAATACC- 配列番号759		
GGTATTTGCATCGTTCGTCTACTG- 配列番号760		
CAGTAGACGAACCATGCAAAATACC- 配列番号761		
GGTATTTGCATGGTTCGTCTACTG- 配列番号762		
33.- IBD5遺伝子座 IGR3096a_1		
CATCCTGGAGAATAGCTGAGAACCT- 配列番号763		
AGGTTCTCAGCTATTCTCCAGGATG- 配列番号764		
CATCCTGGAGAACAGCTGAGAACCT- 配列番号765	40	
AGGTTCTCAGCTGTTCTCCAGGATG- 配列番号766		
34.- 熱ショックタンパク質70(HSP70-2) 1267A/G Gln351Gln		
GAAGCTGCTGCAAGACTTCTTCAAC- 配列番号767		
GTTGAAGAAGTCTGCAGCAGCTTC- 配列番号768		
GAAGCTGCTGCAGGACTTCTTCAAC- 配列番号769		
GTTGAAGAAGTCTGCAGCAGCTTC- 配列番号770		
35.- トル様受容体 (TLR9) 1237C/T		
TCCCTCTGCCTGAAACTCCCCCAA- 配列番号771		
TTGGGGAGTTTCAGGCAGAGGGA- 配列番号772		
TCCCTCTGCCTGGAAACTCCCCCAA- 配列番号773	50	

TTGGGGAGTTCCAGGCAGAGGGA- 配列番号774

36.- メチレンテトラ葉酸リダクター (MTFHR) C677T Val222Ala

TGTCTGCGGGAGCCGATTCATCAT- 配列番号775

ATGATGAAATCGGCTCCCGCAGACA- 配列番号776

TGTCTGCGGGAGTCGATTCATCAT- 配列番号777

ATGATGAAATCGACTCCCGCAGACA- 配列番号778

37.- インターロイキン4(IL4) (-590)C/T

GGAGAACATTGTCCTCCAGTGCTGG- 配列番号779

CCAGCACTGGGGACAATGTTCTCC- 配列番号780

GGAGAACATTGTTCCCTAGTGCTGG- 配列番号781

CCAGCACTGGGGACAATGTTCTCC- 配列番号782

38.- インターロイキン4(IL4) (-34)C/T

ATAAACTAATTGCCTCACATTGTCA- 配列番号783

TGACAATGTGAGGCAATTAGTTTAT- 配列番号784

ATAAACTAATTGTCTCACATTGTCA- 配列番号785

TGACAATGTGAGACAATTAGTTTAT- 配列番号786

39.- マンノース結合レクチン (MBL) (A/G)Gly54Asp

ATGGCGTGTGATGACACCAAGGGAGA- 配列番号787

TCTCCCTTGGTGTCACTACGCCAT- 配列番号788

ATGGCGTGTGATGGCACCAAGGGAGA- 配列番号789

TCTCCCTTGGTGCATCACGCCAT- 配列番号790

40.- マンノース結合レクチン (MBL) (A/G)Gly57Glu

ATGGCACCAAGGAAGAAAAGGGGGA- 配列番号791

TCCCCCTTTCTTCCTTGGTGCCAT- 配列番号792

ATGGCACCAAGGGAGAAAAGGGGGA- 配列番号793

TCCCCCTTTCTCCCTTGGTGCCAT- 配列番号794

41.- マンノース結合レクチン (MBL) (C/T)Arg52Cys

GGCAAAGATGGCGTGTGATGGCACCA- 配列番号795

TGGTGCCATCACGCCATCTTGCC- 配列番号796

GGCAAAGATGGGTGTGATGGCACCA- 配列番号797

TGGTGCCATCACACCCATCTTGCC- 配列番号798

42.- アンギオテンシノーゲン前駆体 (AGT) (-6)A/T

CGTGACCCGGCCAGGGGAAGAACGCT- 配列番号799

CGTGACCCGGCCGGGGGAAGAACGCT- 配列番号800

AGCTTCTTCCCCTGCCGGTCACG- 配列番号801

AGCTTCTTCCCCCGGCCGGTCACG- 配列番号802

43.- プラスミノーゲン活性化因子阻害因子 (PAI1) 4G/5G

GGACACGTGGGGAGTCAGCCGTGT- 配列番号803

ACACGGCTGACTCCCCACGTGTCC- 配列番号804

GGACACGTGGGGAGTCAGCCGTGT- 配列番号805

TACACGGCTGACTCCCCACGTGTCC- 配列番号806

44.- 肿瘍壞死因子 (TNF) (-857)C/T

CCCCCCCCCTTAACGAAGACAGGGCC- 配列番号807

GGCCCTGTCTTCGTTAAGGGGGGG- 配列番号808

CCCCCCCCCTTAATGAAGACAGGGCC- 配列番号809

GGCCCTGTCTTCATTAAGGGGGGG- 配列番号810

45.- 肿瘍壞死因子 (TNF) (-308)G/A

TTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCA- 配列番号811

TGAACCCCGTCCCCATGCCCTCAA- 配列番号812

TTGAGGGGCATGAGGACGGGGTTCA- 配列番号813

10

20

30

40

50

TGAACCCCGTCCTCATGCCCTCAA- 配列番号814	
46.-腫瘍壞死因子 (TNF) (-238)G/A	
CCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAGGA- 配列番号815	
TCCTCCCTGCTCGATTCCGAGGGG- 配列番号816	
CCCCTCGGAATCAGAGCAGGGAGGA- 配列番号817	
TCCTCCCTGCTCTGATTCCGAGGGG- 配列番号818	
47.-TPMT G238C	
GTCCCCGGCTGCAAACCTGCATAA- 配列番号819	
TTATGCAGGTTGCAGACCGGGGAC- 配列番号820	10
GTCCCCGGCTGGAAACCTGCATAA- 配列番号821	
TTATGCAGGTTCCAGACCGGGGAC- 配列番号822	
48.-TPMT G460A	
TGGGATAGAGGAGCATTAGTTGCCA- 配列番号823	
TGGGATAGAGGAACATTAGTTGCCA- 配列番号824	
TGGCAACTAATGCTCCTCTATCCCCA- 配列番号825	
TGGCAACTAATGTTCCTCTATCCCCA- 配列番号826	
49.-TPMT A719G	
TCTGTAAGTAGATATAACTTTCAA- 配列番号827	
TTGAAAAGTTATATCTACTTACAGA- 配列番号828	
TCTGTAAGTAGACATAACTTTCAA- 配列番号829	20
TTGAAAAGTTATGTCTACTTACAGA- 配列番号830	
50.-MICA Trp14Gly	
ACGGTGCTGTCCTGGATGGATCTG- 配列番号831	
ACGGTGCTGTCGGGGATGGATCTG- 配列番号832	
CAGATCCATCCCAGGACAGCACCGT- 配列番号833	
CAGATCCATCCCCGGACAGCACCGT- 配列番号834	
51.-MICA Thr24Ala	
TCAGGGTTCTCGCTGAGGTACATC- 配列番号835	
TCAGGGTTCTCACTGAGGTACATC- 配列番号836	
GATGTACCTCAGCGAGAAACCCCTGA- 配列番号837	30
GATGTACCTCAGTGAGAAACCCCTGA- 配列番号838	
52.-MICA Met129Val	
GAGGAATGGACAATGCCCGACTCCT- 配列番号839	
GAGGAATGGACAGTGCCCCAGTCCT- 配列番号840	
AGGACTGGGCATTGTCCATTCCCT- 配列番号841	
AGGACTGGGCACTGTCCATTCCCT- 配列番号842	
53.-MICA Lys173Glu	
CGCGATATCTAAATCCGGCGTAG- 配列番号843	
CGCGATATCTAGAATCCGGCGTAG- 配列番号844	
CTACGCCGGATTTTAGATATGCCG- 配列番号845	40
CTACGCCGGATTCTAGATATGCCG- 配列番号846	
54.-MICA Glu175Ser	
TATCTAAATCCGGCGTAGTCCTGA- 配列番号847	
TATCTAAATCCAGCGTAGTCCTGA- 配列番号848	
TCAGGACTACGCCGGATTAGATA- 配列番号849	
TCAGGACTACGCCGGATTAGATA- 配列番号850	
55.-SLC11A1=NRAMP1 プロモーター領域 (-377 ~ -222) 中: 対立遺伝子7	
CGTGTGTGTATGTGTGTGTGT- 配列番号851	
CGTGTGTGTACGTGTGTGTGT- 配列番号852	
ACACACACACACATACACACACACG- 配列番号853	50

ACACACACACACGTACACACACACG- 配列番号 854

56 . -CD14 (-159)T/C

TTCCTGTTACGGTCCCCCTCCCTGA- 配列番号 855

TTCCTGTTACGGCCCCCTCCCTGA- 配列番号 856

TCAGGGAGGGGGACCGTAACAGGAA- 配列番号 857

TCAGGGAGGGGGCCGTAACAGGAA- 配列番号 858

57 . -CD16A=FCGR3A G4985T Val158Phe

TGCAGGGGGCTTGGGAGTAAAA- 配列番号 859

TGCAGGGGGCTTTGGGAGTAAAA- 配列番号 860

TTTTACTCCCAACAAGCCCCCTGCA- 配列番号 861

TTTTACTCCCAAAAAGCCCCCTGCA- 配列番号 862

10

58 . -NR1I2 (-25385)C/T

CAATCCCAGGTTCTCTTCTACCT- 配列番号 863

CAATCCCAGGTTCTCTTCTACCT- 配列番号 864

AGGTAGAAAAGAGAACCTGGGATTG- 配列番号 865

AGGTAGAAAAGAAAACCTGGGATTG- 配列番号 866

59 . -TUCAN/CARD8/CARDINAL (T/A) Cys10停止

GAGCCATTATTGTTCCGTGCTGTT- 配列番号 867

GAGCCATTATTGATCCGTGCTGTT- 配列番号 868

GAACAGCACGGAACAATAATGGCTC- 配列番号 869

20

GAACAGCACGGATCAATAATGGCTC- 配列番号 870

60 . -IKBL +738T/C Cys224Arg

GCAGAGGGATCCTGTCGACCCCCAC- 配列番号 871

GCAGAGGGATCCCGTCGACCCCCAC- 配列番号 872

GTGGGGTCTGACAGGATCCCTCTGC- 配列番号 873

GTGGGGTCTGACAGGATCCCTCTGC- 配列番号 874

61 . -TNFRSF1B=TNFR2 G593A

GCAGAGGCAGCGGGTTGTGGAAAGC- 配列番号 875

GCAGAGGCAGCGAGTTGTGGAAAGC- 配列番号 876

30

GCTTTCACAAACCCGCTGCCTCTGC- 配列番号 877

GCTTTCACAACTCGCTGCCTCTGC- 配列番号 878

62 . -TNFRSF1B=TNFR2 T620C

CTGCTGCCATGGCGTGTCCCTCTCG- 配列番号 879

CTGCTGCCATGGCGTGTCCCTCTCG- 配列番号 880

CGAGAGGGACACGCCATGGCAGCAG- 配列番号 881

CGAGAGGGACACACCATGGCAGCAG- 配列番号 882

63 . -MEKK1 Asp643Asn

AGTGGGAATTATCAATGGACTGCAA- 配列番号 883

AGTGGGAATTATTAATGGACTGCAA- 配列番号 884

40

TTGCAGTCCATTGATAATTCCCACT- 配列番号 885

TTGCAGTCCATTATAATTCCCACT- 配列番号 886

64 . -HLA-DQ4 159G/A/C

CACCAACGGGACGGAGCGCGTGCAG- 配列番号 887

CACCAACGGGACAGAGCGCGTGCAG- 配列番号 888

CACCAACGGGACCGAGCGCGTGCAG- 配列番号 889

CCGCACGCGCTCCGTCCGTTGGTG- 配列番号 890

CCGCACGCGCTGTCCGTTGGTG- 配列番号 891

CCGCACGCGCTGGTCCGTTGGTG- 配列番号 892

65 . -HLA-DQ4 282C/T

CGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAA- 配列番号 893

50

CGAGTACTGGAATAGCCAGAAGGAA- 配列番号894
 TTCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCG- 配列番号895
 TTCCTTCTGGCTATTCCAGTACTCG- 配列番号896

66.-HLA-DRB 109T/C

CGACCACGTTCTTGTGGCAGCTTA- 配列番号897
 TAAGCTGCCACAAGAACGTGGTCG- 配列番号898
 CGACCACGTTCCTGTGGCAGCTTA- 配列番号899
 TAAGCTGCCACAGGAAACGTGGTCG- 配列番号900

67.-HLA-DRB 119T/C/G/A

TCTTGTGGCAGCTTAAGTTGAATG- 配列番号901
 CATTCAAACCTTAAGCTGCCACAAGA- 配列番号902
 TCTTGTGGCAGCCTAAGTTGAATG- 配列番号903
 CATTCAAACCTTAGGCTGCCACAAGA- 配列番号904
 TCTTGTGGCAGCGTAAGTTGAATG- 配列番号905
 CATTCAAACCTTACGCTGCCACAAGA- 配列番号906
 TCTTGTGGCAGCATAAGTTGAATG- 配列番号907
 CATTCAAACCTTATGCTGCCACAAGA- 配列番号908

68.-HLA-DRB 122A/C/G/T

TGTGGCAGCTTAAGTTGAATGTCA- 配列番号909
 TGACATTCAAACCTTAAGCTGCCACA- 配列番号910
 TGTGGCAGCTTACGTTGAATGTCA- 配列番号911
 TGACATTCAAACGTAAGCTGCCACA- 配列番号912
 TGTGGCAGCTTAGGTTGAATGTCA- 配列番号913
 TGACATTCAAACCTAAGCTGCCACA- 配列番号914
 TGTGGCAGCTTATGTTGAATGTCA- 配列番号915
 TGACATTCAAACATAAGCTGCCACA- 配列番号916

69.-HLA-DRB 129A/G

GCTTAAGTTGAATGTCATTTCTTC- 配列番号917
 GAAGAAATGACATTCAAACCTTAAGC- 配列番号918
 GCTTAAGTTGAGTGTCAATTCTTC- 配列番号919
 GAAGAAATGACACTCAAACCTTAAGC- 配列番号920

70.-HLA-DRB 161G/A/T

CGGAGCGGGTGCAGTTGCTGGAAAG- 配列番号921
 CTTTCCAGCAACCGCACCCGCTCCG- 配列番号922
 CGGAGCGGGTGCAGTTGCTGGAAAG- 配列番号923
 CTTTCCAGCAACTGCACCCGCTCCG- 配列番号924
 CGGAGCGGGTGCAGTTGCTGGAAAG- 配列番号925
 CTTTCCAGCAACAGCACCCGCTCCG- 配列番号926

71.-HLA-DRB 175 T/C/G

TTGCTGGAAAGATGCATCTATAACC- 配列番号927
 GGTTATAGATGCATCTTCCAGCAA- 配列番号928
 TTGCTGGAAAGACGCATCTATAACC- 配列番号929
 GGTTATAGATGCGTCTTCCAGCAA- 配列番号930
 TTGCTGGAAAGAGGCATCTATAACC- 配列番号931
 GGTTATAGATGCCTCTTCCAGCAA- 配列番号932

72.-HLA-DRB 184A/C/de1A

AGATGCATCTATAACCAAGAGGGAGT- 配列番号933
 ACTCCTCTGGTTATAGATGCATCT- 配列番号934
 AGATGCATCTACCCAAGAGGGAGT- 配列番号935
 ACTCCTCTGGTGTAGATGCATCT- 配列番号936

10

20

30

40

50

AGATGCATCTATACCAAGAGGAGTC- 配列番号937	
GAECTCCTCTTGGTATAGATGCATCT- 配列番号938	
73. -HLA-DRB 286C/A/T	
AGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGA- 配列番号939	
TCTGCTCCAGGAGGTCTTCTGGCT- 配列番号940	
AGCCAGAAGGACATCCTGGAGCAGA- 配列番号941	
TCTGCTCCAGGATGTCCTTCTGGCT- 配列番号942	
AGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCAGA- 配列番号943	
TCTGCTCCAGGAAGTCCTTCTGGCT- 配列番号944	
74. -HLA-DRB 305C/G	10
AGCAGAGGGCGGGCCGCGGTGGACAC- 配列番号945	
GTGTCACCGCGGCCGCGCTTGCT- 配列番号946	
AGCAGAGGCAGGGCGCGGTGGACAC- 配列番号947	
GTGTCACCGCGCCCCGCGCTTGCT- 配列番号948	
75. -IL1RN2018 T/C エクソン2	
CCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAA- 配列番号949	
CCAACTAGTTGCCGGATACTTGCAA- 配列番号950	
TTGCAAGTATCCAGCAACTAGTTGG- 配列番号951	
TTGCAAGTATCCGGCAACTAGTTGG- 配列番号952	
76. -IL1RN2073 C/T イントロン2	20
TTGCCAGGAAAGCCAATGTATGTGG- 配列番号953	
TTGCCAGGAAAGTCAATGTATGTGG- 配列番号954	
CCACATACATTGGCTTCCTGGCAA- 配列番号955	
CCACATACATTGACTTCCTGGCAA- 配列番号956	
77. -IL1B 3954 C/T TAQI	
ACCTATCTTCTTCGACACATGGAT- 配列番号957	
ACCTATCTTCTTGACACATGGAT- 配列番号958	
ATCCCATGTGTCGAAGAAGATAGGT- 配列番号959	
ATCCCATGTGTCAAAGAAGATAGGT- 配列番号960	
78. -Fas -670 G/A	30
TCACAGACGTTCTGGAATGGAC- 配列番号1429	
TCACAGACGTTCTGGAATGGAC- 配列番号1430	
GTCCATTCCAGGAACGTCTGTGA- 配列番号1431	
GTCCATTCCAGAAACGTCTGTGA- 配列番号1432	
79. -カスパー ゼ9 C93T	
GTCCTGCTGAGCCGCGAGCTGTT- 配列番号1433	
GTCCTGCTGAGTCGCGAGCTGTT- 配列番号1434	
AACAGCTCGCGCTCAGCAGGAC- 配列番号1435	
AACAGCTCGCGACTCAGCAGGAC- 配列番号1436	
80. -TLR1 R80T(G/C)	40
TTCTCATAATAGAACCTCAGTATC- 配列番号1437	
TTCTCATAATACAATCCAGTATC- 配列番号1438	
GATACTGGATTCTATTATGAGAA- 配列番号1439	
GATACTGGATTGTATTATGAGAA- 配列番号1440	
81. -TLR2 R753G(A/G)	
CTGCAAGCTCGGAAGATAATGA- 配列番号1441	
CTGCAAGCTGCAGAACATAATGA- 配列番号1442	
TCATTATCTTCCGCAGCTTGCAG- 配列番号1443	
TCATTATCTTCTGCAGCTTGCAG- 配列番号1444	
82. -TLR6 S249P(T/C)	50

TCACCAGAGGTCCAACCTTACTG - 配列番号 1445		
TCACCAGAGGTCAACCTTACTG - 配列番号 1446		
CAGTAAGGTTGGACCTCTGGTGA - 配列番号 1447		
CAGTAAGGTTGAACCTCTGGTGA - 配列番号 1448		
83. -MMP3 5A/6A		
GATGGGGGGAAAAACCATGTCTT - 配列番号 1449		
GATGGGGGGAAAAACCATGTCT - 配列番号 1450		
AAGACATGGTTTTCCCCCATC - 配列番号 1451		
AGACATGGTTTTCCCCCATC - 配列番号 1452		
84. -NOD1(CARD4) indel +32656	10	
GCCCCGCCCCCCCCCACACACAGC - 配列番号 1453		
GCCCCGCCCCCACACACACAGCA - 配列番号 1454		
GCTGTGTGTGGGGGGGGCGGGC - 配列番号 1455		
TGCTGTGTGTGGGGGGCGGGC - 配列番号 1456		
85. -DLG5 DLG5_e26		
TGGGGTGGGCAGGGTGCAGGA - 配列番号 1457		
TGGGGTGGGCAGGGTGCAGGA - 配列番号 1458		
TCGGCGACCCCTGCCCAACCCA - 配列番号 1459		
CTCGGCGACCCCGCCCCACCCA - 配列番号 1460		
86. -NOD1 rs2075817 C/T	20	
GGAGGCAGGATCTCGTGCAGGA - 配列番号 1461		
GGAGGCAGGATCTCGTGCAGGA - 配列番号 1462		
GCCCCGACGCAACCCCCCTCC - 配列番号 1463		
GCCCCGACGCAAACCCCCCTCC - 配列番号 1464		
87. -NOD1 rs2975632 C/T		
GAAGGAAGCTCGCAACACCCCT - 配列番号 1465		
GAAGGAAGCTGTGCAACACCCCT - 配列番号 1466		
AGGGGTGTTGCGCAGCTTCCTTC - 配列番号 1467		
AGGGGTGTTGACAGCTTCCTTC - 配列番号 1468		
88. -NOD1 rs3020207 A/G	30	
GAGGTGGGTGAGCTCTTCTGT - 配列番号 1469		
GAGGTGGGTGGCTCTTCTGT - 配列番号 1470		
ACAGAAAGAGCTCACCCACCTC - 配列番号 1471		
ACAGAAAGAGCCCACCCACCTC - 配列番号 1472		
89. -NOD1 rs2075818 C/G		
TACTTCTCGCGGAAGATCGGA - 配列番号 1473		
TACTTCTCGGCCGAAGATCGGA - 配列番号 1474		
TCCGCATCTCCGCCGAGAAGTA - 配列番号 1475		
TCCGCATCTCGGCCGAGAAGTA - 配列番号 1476		
90. -NOD1 rs2235099 C/T	40	
ATCTACATGGACACCATCATGGA - 配列番号 1477		
ATCTACATGGATACCATCATGGA - 配列番号 1478		
TCCATGATGGTGTCCATGTAGAT - 配列番号 1479		
TCCATGATGGTATCCATGTAGAT - 配列番号 1480		
91. -NOD1 rs2075821 A/G		
AGTGGTCCGGCACGGGAAGACCT - 配列番号 1481		
AGTGGTCCGGCGGGGAAGACCT - 配列番号 1482		
AGGTCTCCCGTGCCGGACCACT - 配列番号 1483		
AGGTCTCCCGGCCGGACCACT - 配列番号 1484		
92. -NOD1 rs2075822 C/T	50	

CGGGAATGGCACCATGGACCAGG - 配列番号 1485	
CGGGAATGGCATCATGGACCAGG - 配列番号 1486	
CCTGGTCCATGGGCCATTCCCG - 配列番号 1487	
CCTGGTCCATGATGCCATTCCCG - 配列番号 1488	
93. -NOD1 rs2907748 C/T	
ATTCTTAGCCCCAGCTACCTGTA - 配列番号 1489	
ATTCTTAGCCTAGCTACCTGTA - 配列番号 1490	
TACAGGTAGCTGGCTAAGAAAT - 配列番号 1491	
TACAGGTAGCTAGGCTAAGAAAT - 配列番号 1492	
94. -NOD1 rs5743368 A/G	10
AGAACTTGTAGAACTTGTCA - 配列番号 1493	
AGAACTTGTGGAACTTGTCA - 配列番号 1494	
ATGACAAGTTCTAACAAAGTTCT - 配列番号 1495	
ATGACAAGTCCAAACAAGTTCT - 配列番号 1496	
95. -DLG5 ハプロタイプ A rs2289311 C/T	
CAGCAGGGTCTCGATGCCCTGC - 配列番号 1497	
CAGCAGGGTCTTGATGCCCTGC - 配列番号 1498	
GCAGGGCCATCGAGACCCTGCTG - 配列番号 1499	
GCAGGGCCATCAAGACCCTGCTG - 配列番号 1500	
96. -MTHFR A1298C	20
GACCAGTGAAGAAAGTGTCTTG - 配列番号 1501	
GACCAGTGAAGCAAGTGTCTTG - 配列番号 1502	
CAAAGACACTTCTTCACTGGTC - 配列番号 1503	
CAAAGACACTTGCTTCACTGGTC - 配列番号 1504	
97. -NAT2 Ile114Thr	
GCAGGTGACCACTGACGGCAGGA - 配列番号 1505	
GCAGGTGACCATTGACGGCAGGA - 配列番号 1506	
TCCTGCCGTCACTGGTCACCTGC - 配列番号 1507	
TCCTGCCGTCAATGGTCACCTGC - 配列番号 1508	
98. -NAT2 Lys268Arg A/G	30
AGAAAGTGTGAAAAATATTTA - 配列番号 1509	
AGAAAGTGTGAGAAATATTTA - 配列番号 1510	
TAAATATATTTTCAGCACTTCT - 配列番号 1511	
TAAATATATTCAGCACTTCT - 配列番号 1512	
99. -ESR1 rs9340799 A/G	
GAGTGTGGCTAGAGTTGGGATG - 配列番号 1513	
GAGTGTGGCTGGAGTTGGGATG - 配列番号 1514	
CATCCCAACTCTAGACCCACACTC - 配列番号 1515	
CATCCCAACTCCAGACCCACACTC - 配列番号 1516	
100. -ESR1 rs2234693 C/T	40
AATGTCCCAGCCGTTTATGCTT - 配列番号 1517	
AATGTCCCAGCTGTTTATGCTT - 配列番号 1518	
AAGCATAAAACGGCTGGGACATT - 配列番号 1519	
AAGCATAAAACAGCTGGGACATT - 配列番号 1520	
101. -MEFV V726A C/T	
GGACTACAGAGCTGGAAGCATCT - 配列番号 1521	
GGACTACAGAGTTGGAAGCATCT - 配列番号 1522	
AGATGCTTCCAGCTCTGTAGTCC - 配列番号 1523	
AGATGCTTCCAAGCTGTAGTCC - 配列番号 1524	
102. -Vit D受容体 (VDR) rs10735810 A/G	50

CCATTGCCTCCATCCCTGTAAGA - 配列番号1525	
CCATTGCCTCCGTCCCTGTAAGA - 配列番号1526	
TCTTACAGGGATGGAGGCAATGG - 配列番号1527	
TCTTACAGGGACGGAGGCAATGG - 配列番号1528	
103. -EMR3 E127Q C/G	
TTTCCTGCCCTCGGTTGTCTTG - 配列番号1529	
TTTCCTGCCCTGGGTTGTCTTG - 配列番号1530	
CAAAGACAACCGAGGGCAGGAAA - 配列番号1531	
CAAAGACAACCCAGGGCAGGAAA - 配列番号1532	
104. -EMR1 Q496K G/T	10
CTGGTGGTCTTGGAAAGAACGCT - 配列番号1533	
CTGGTGGTCTTGAAGAACGCT - 配列番号1534	
AGCGCTTCTTCCAAGACCACAG - 配列番号1535	
AGCGCTTCTTCAAAGACCACAG - 配列番号1536	
105. -MTHFD1 R653Q A/G	
CATTGCAGACCAGATCGCACTCA - 配列番号1537	
CATTGCAGACCGGATCGCACTCA - 配列番号1538	
TGAGTGCATCTGGTCTGCAATG - 配列番号1539	
TGAGTGCATCCGGTCTGCAATG - 配列番号1540	
106. -SHMT1 1420C/T	20
CAGAGGGAAGAAAGAGGCGAAGC - 配列番号1541	
CAGAGGGAAGAGAGAGAGGCGAAGC - 配列番号1542	
GCTTCGCTCTTCTTCCCTCTG - 配列番号1543	
GCTTCGCTCTCTTCCCTCTG - 配列番号1544	
107. -NAT2 857G/A Gly286Glu	
ACCTGGTATGAATCCCTTACTA - 配列番号1545	
ACCTGGTATGGATCCCTTACTA - 配列番号1545	
TAGTAAGGGATTTCATCACCAAGGT - 配列番号1547	
TAGTAAGGGATCCATCACCAAGGT - 配列番号1548	
108. -NAT2 Arg197Gln R197Q A/G	30
GCTTGAACCTCAAACAATTGAAG - 配列番号1549	
GCTTGAACCTCGAACAAATTGAAG - 配列番号1550	
CTTCAATTGTTGAGGTTCAAGC - 配列番号1551	
CTTCAATTGTTCGAGGTTCAAGC - 配列番号1552	
109. -NAT2 rs1801279 191 G/A	
AAGAAGAAACCAGGGTGGGTGGT - 配列番号1553	
AAGAAGAAACCGGGGTGGGTGGT - 配列番号1554	
ACCACCCACCCCTGGTTCTTCTT - 配列番号1555	
ACCACCCACCCCGGTTCTTCTT - 配列番号1556	
110. -TLR5 Arg392停止 C/T	40
CCTTGGATCTCCGAGACAATGCT - 配列番号1557	
CCTTGGATCTCTGAGACAATGCT - 配列番号1558	
AGCATTGTCTCGGAGATCCAAGG - 配列番号1559	
AGCATTGTCTCAGAGATCCAAGG - 配列番号1560	
111. -CTLA4 A49G	
TGAACCTGGCTACCAGGACCTGG - 配列番号1561	
TGAACCTGGCTGCCAGGACCTGG - 配列番号1562	
CCAGGTCTGGTAGGCCAGGTTCA - 配列番号1563	
CCAGGTCTGGCAGCCAGGTTCA - 配列番号1564	
112. -MLH1 D132H C/G	50

CAAGTTACTCACATGGAAAACTG - 配列番号1565	
CAAGTTACTCAGATGGAAAACTG - 配列番号1566	
CAGTTTCCATGTGAGTAAC TTG - 配列番号1567	
CAGTTTCCATCTGAGTAAC TTG - 配列番号1568	
113. -MTRR 66A/G	
GCAGAAGAAATATGTGAGCAAGC - 配列番号1569	
GCAGAAGAAATGTGTGAGCAAGC - 配列番号1570	
GCTTGCTCACATATTCCTTCTGC - 配列番号1571	
GCTTGCTCACACATTTCTTCTGC - 配列番号1572	
114. -ITPA 94C/A	10
GAGATAAGTTACATGCACTTTG - 配列番号1573	
GAGATAAGTTCCATGCACTTTG - 配列番号1574	
CAAAGTGCATGTAAACTTATCTC - 配列番号1575	
CAAAGTGCATGGAAACTTATCTC - 配列番号1576	
115. -MEFV E148Q C/G	
GCAGCCAGCCCCAGGCCGGGAGG - 配列番号1577	
GCAGCCAGCCCGAGGCCGGGAGG - 配列番号1578	
CCTCCCGGCCTGGGCTGGCTGC - 配列番号1579	
CCTCCCGGCCTCGGGCTGGCTGC - 配列番号1580	
116. -PTPN22 R620W C/T	
TTCAGGTGTCCATACAGGAAGTG - 配列番号1581	
TTCAGGTGTCCGTACAGGAAGTG - 配列番号1582	
CACTTCCTGTATGGACACCTGAA - 配列番号1583	
CACTTCCTGTACGGACACCTGAA - 配列番号1584	
117. -LDL受容体LRP-5 3357A/G	
GCCCTGGTGGTAGACAACACACT - 配列番号1585	
GCCCTGGTGGTGGACAACACACT - 配列番号1586	
AGTGTGTTGTCTACCACCAAGGGC - 配列番号1587	
AGTGTGTTGTCCACCAACCAGGGC - 配列番号1588	
118. -CTLA4 -C318T	30
ATCCAGATCCTAAAGTGAACAT - 配列番号1589	
ATCCAGATCCTTAAAGTGAACAT - 配列番号1590	
ATGTTCACTTGAGGATCTGGAT - 配列番号1591	
ATGTTCACTTAAGGATCTGGAT - 配列番号1592	
119. -CCR5 rs333 32bpdel	
TTTTCCATACATTAAAGATAGTC - 配列番号1593	
TTTTCCATACATGGCCTGCCGC - 配列番号1594	
GACTATCTTAATGTATGGAAAA - 配列番号1595	
GCGGCAGGACCATGTATGGAAAA - 配列番号1596	
120. -IL6 -174 G/C	40
TTGTGTCTGCCATGCTAAAGGA - 配列番号1597	
TTGTGTCTTGCATGCTAAAGGA - 配列番号1598	
TCCCTTAGCATGGCAAGACACAA - 配列番号1599	
TCCTTAGCATCGCAAGACACAA - 配列番号1600	
121. -GR ER22/23EK rs6190	
TGCTCAGGAGAAGGGAGATGTGA - 配列番号1601	
TGCTCAGGAGAGGGAGATGTGA - 配列番号1602	
TCACATCTCCCTCTGAGCA - 配列番号1603	
TCACATCTCCCTCTGAGCA - 配列番号1604	
122. -P53 Arg72Pro C/G	50

GGCTGCTCCCCCGTGGCCCCTG-配列番号1605	
GGCTGCTCCCCCGCGTGGCCCCTG-配列番号1606	
CAGGGGCCACGGGGGAGCAGCC-配列番号1607	
CAGGGGCCACGGGGGAGCAGCC-配列番号1608	
123. -DLG5 P1371Q A/C	
TAGCACCCCCCAAGCCAAGCAGA-配列番号1609	
TAGCACCCCCCAAGCCAAGCAGA-配列番号1610	
TCTGCTTGGCTTGGGGGTGCTA-配列番号1611	
TCTGCTTGGCTGGGGGTGCTA-配列番号1612	
124. -GR ER22/23EK rs6189	10
CTTGCTCAGGAAAGGGGAGATGT-配列番号1613	
CTTGCTCAGGAGAGGGGAGATGT-配列番号1614	
ACATCTCCCTTCTGAGCAAG-配列番号1615	
ACATCTCCCTCTCCTGAGCAAG-配列番号1616	
125. -GR ER22/23EK rs6190	
TGCTCAGGAGAAGGGAGATGTGA-配列番号1617	
TGCTCAGGAGAGGGGAGATGTGA-配列番号1618	
TCACATCTCCCTCTCCTGAGCA-配列番号1619	
TCACATCTCCCTCTCCTGAGCA-配列番号1620	
126. -LDL受容体LRP-5 C135242T	20
AGCGTGAACCCAAAAATGTGCGG-配列番号1621	
AGCGTGAACCCGAAAATGTGCGG-配列番号1622	
CCGCACATTTTGGGTTCACGCT-配列番号1623	
CCGCACATTTCGGGTTCACGCT-配列番号1624	
127. -LDL受容体LRP-5 G121513A	
CTGGGATGCTACAGAGACCAGA-配列番号1625	
CTGGGATGCTGCAGAGACCAGA-配列番号1626	
TCTGGTCTCTGTAGCATCCCCAG-配列番号1627	
TCTGGTCTCTGCAGCATCCCCAG-配列番号1628	
128. -LDL受容体LRP-5 C141759T	30
ACTGGGACCAACAGAACATCGAAGT-配列番号1629	
ACTGGGACCAATAGAACATCGAAGT-配列番号1630	
ACTTCGATTCTGTTGGTCCCAGT-配列番号1631	
ACTTCGATTCTATTGGTCCCAGT-配列番号1632	
129. -LDL受容体LRP-5 G138351A	
ACCAAGAACGCCTCAGGCACGAT-配列番号1633	
ACCAAGAACGCTTCAGGCACGAT-配列番号1634	
ATCGTGCCTGAGGCCTTCTGGT-配列番号1635	
ATCGTGCCTGAAGCCTTCTGGT-配列番号1636	
130. -P2X7 -298 C/T	40
ATGGGCATTTTCAGAATTCTCCC-配列番号1637	
ATGGGCATTTTAGAATTCTCCC-配列番号1638	
GGGAGAATTCTGAAAATGCCAT-配列番号1639	
GGGAGAATTCTAAAAATGCCAT-配列番号1640	
131. -P2X7 -838 G/T	
ACAGCAATTAGTATAGGATTCC-配列番号1641	
ACAGCAATTATTAGGATTCC-配列番号1642	
GGAATCCTATACTAAATTGCTGT-配列番号1643	
GGAATCCTATAATAAAATTGCTGT-配列番号1644	
132. -APC E1317Q C/G	50

CTAGGTCAGCTCAAGATCCTGTG-配列番号1645
 CTAGGTCAGCTGAAGATCCTGTG-配列番号1646
 CACAGGATCTTGAGCTGACCTAG-配列番号1647
 CACAGGATCTCAGCTGACCTAG-配列番号1648
 133.-CD97-T64C A/G
 GTCCCGTCTCCACAGGCTAGGCA-配列番号1649
 GTCCCGTCTCCGCAGGCTAGGCA-配列番号1650
 TGCCTAGCCTGTGGAGACGGGAC-配列番号1651
 TGCCTAGCCTGCGGAGACGGGAC-配列番号1652

【0391】

10

3.2 IBDと関連する遺伝的変異の遺伝子タイピング用のDNAチップの製造

蒸着プロセス中の相対湿度を40~50%、および温度は約20℃に保ちながら、前に記載したのと同様に(実施例1.2)紫外線照射による架橋および加熱によって、プローブをガラススライドと結合させる。

【0392】

20

3.3 IBDの診断用のDNAチップの臨床的有用性の確認:DNAチップを使用するIBDと関連するヒトの遺伝的変異の、感度、特異性、再現性の高い同時検出

3.3.1 ハイブリダイズさせるサンプルの調製

個体のDNAを、濾過プロトコルによって血液サンプルから抽出する。

【0393】

30

当該のすべてのエクソンおよびインtronは、オリゴヌクレオチドプライマーの対を使用してPCRマルチプレックスによって増幅させる。検出する遺伝的変異が存在し得る場合に遺伝子断片の特異的な増幅を可能にする、オリゴヌクレオチドの任意の適切な対を使用することができる。最小可能数のPCR反応で前記増幅を可能にする対を使用することが有利である。

【0394】

検出する遺伝子断片をPCR増幅するために使用するオリゴヌクレオチドプライマーは、以下に列挙する(およびIBDと関連する対応する遺伝的変異)。これらのオリゴヌクレオチドプライマーは、本発明の他の態様を表す。

1.-多剤耐性タンパク質(MDR-1)G2677T/A/C

30

Ala893Ser/Thr/Pro(遺伝子断片を増幅させるためのオリゴヌクレオチド「多剤耐性タンパク質MDR-1」、その中に多型G2677T/CA1a893Ser/Thrが存在する可能性がある)

配列番号1:GCATAGTAAGCAGTAGGGAGTAACA

配列番号2:TGCAATAGCAGGAGTTGTTGA

2.-多剤耐性タンパク質(MDR-1)C3435T

配列番号3:TGCTCCCAGGCTGTTTATT

配列番号4:TGTTTCAGCTGCTTGATGG

3.-CARD15 R702W

40

配列番号5:AGATCACAGCAGCCTTCCTG

配列番号6:GGATGGAGTGGAAAGTGCTTG

4.-CARD15 G908R

配列番号7:ACTGCAGAGGGAGGAGGACT

配列番号8:CACCTCAAGCTCTGGTGAT

5.-CARD15 1007insC

配列番号9:ACTGGCTAACTCCTGCAGTC

配列番号10:GAAAAACTGAGGTTGGAGA

6.-ミクロソームエポキシドヒドロラーゼ(EPXH1) T612C Y113H

配列番号11:CTCTCAACTGGGGTCCTGA

配列番号12:GGCGTTTGCAACATACCT

7.-单球化学走性タンパク質1(MCP1) (-2518)G/A

50

配列番号13:CCAGCCAAATGCATTCTCTT		
配列番号14:CACAGGGAAGGTGAAGGGTA		
8.-インターロイキン10(IL10) (-1082)G/A		
配列番号15:CAACTGGCTCCCTTACCTT		
配列番号16:ATGGAGGCTGGATAGGAGGT		
9.-インターロイキン10(IL10) G15R G43A		
配列番号17:AGAGGCCTCCCTGAGCTTAC		
配列番号18:TCTCGGAGATCTCGAAGCAT		
10.-インターロイキン16(IL16) (-295)T/C	10	
配列番号19:AACTGAAGCAATGCCAGTCC		
配列番号20:CAGAGCCAGCACCTCCTAGA		
11.-Fasリガンド (-843)C/T		
配列番号21:CTTGAGCCCAGGAGTTGAG		
配列番号22:ATCAGAGGCTGCAAACCACT		
12.-核因子kappa-B(NFKB1) 94d the ATTG		
配列番号23:TGGACCGCATGACTCTATCA		
配列番号24:GGCTCTGGCTTCCTAGCAG		
13.-核因子kappa-B阻害剤 (NFKB1A) SNP 3'UTR(G/A)中		
配列番号25:CCAGCCATCATTCCACTCT		
配列番号26:CCTGCACCCCTGTAATCCTGT		
14.-シグナル変換物質および転写6の活性化物質(STAT6) G2964A	20	
配列番号27:AGCCAATCCACTCCTTCCTT		
配列番号28:CATGCCCTAACCTGTGCTCT		
15.-インターロイキン18(IL18) TCA/TCCコドン35中		
配列番号29:ATAGAGGCCGATTCCCTTG		
配列番号30:TTCTGGAACAGAAAGATTGTCATT		
16.-地中海熱の遺伝子(MEFV) E474E		
配列番号31:GCTCCCCAGAAACAAACTGA		
配列番号32:CACCTGCAGAAGTTCCCATT		
17.-地中海熱の遺伝子(MEFV) Q476Q	30	
配列番号33:GCTCCCCAGAAACAAACTGA		
配列番号34:CACCTGCAGAAGTTCCCATT		
18.-地中海熱の遺伝子(MEFV) D510D		
配列番号35:AGGAAGCTGGAGCAGGTGTA		
配列番号36:CCATTCTGACTGGCACTCCT		
19.-地中海熱の遺伝子(MEFV) P588P		
配列番号37:TCTTCTGGAACGTGGTAGGG		
配列番号38:CTAACGAGGGGGTTCCTTGT		
20.-Discs、大きな相同意5(DLG5) 113G/A(R30Q)		
配列番号39:CGCGCGAATTACTACCTCTT	40	
配列番号40:CGTGAATGCCAGATGAACAC		
21.-コロニ-刺激因子受容体1(CSFR1) A2033T		
配列番号41:CTCCTTGCTTGCTTCCTTG		
配列番号42:AGTAGGGATGGATGGATGG		
22.-有機力チオン輸送体(OCTN1、SLC22A4) 1672C/T(L503F)		
配列番号43:CAAGAGTGCCCAGAGAGTCC		
配列番号44:TTCTCCCTAACGGCATTGGT		
23.-有機力チオン輸送体(OCTN2、SLC22A5) (-207G/C)		
配列番号45:CTTACATAGGGCGCAGCAG		
配列番号46:AGTCCCGCTGCCTTCCTA	50	

24.- トル様受容体4(TLR4)	Asp299Gly(A/G)	
配列番号47:CTCTAGAGGGCCTGTGCAAT		
配列番号48:TCAATGTGGAAACTGTCCA		
25.- トル様受容体4(TLR4)	Thr399Ile(C/T)	
配列番号49:CAACAAAGGTGGGAATGCTT		
配列番号50:TTTCAAATTGGAATGCTGGA		
26.- インターロイキン1 (IL1)	(-511)A/C	
配列番号51:AGGCAGAGAGGGAGGGAGAG		
配列番号52:AAACAGCGAGGGAGGAACTG		
27.- スーパーオキシドジスムターゼ2(SOD2)	Ala16Val C/T	10
配列番号53:GGCTGTGCTTCTCGTCTTC		
配列番号54:GGTGACGTTCAGGTTGTTCA		
28.- ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPARG)	Pro12AlaC/G	
配列番号55:AGCAAACCCCTATTCCATGC		
配列番号56:TACATAAAATGCCCGCACGTC		
29.- 細胞間接着分子1(ICAM1)	K469E(A/G)	
配列番号57:CTTGAGGGCACCTACCTCTG		
配列番号58:CATTATGACTGCGGCTGCTA		
30.- 細胞間接着分子1 ICAM1	R241G	20
配列番号59:GAATGAAATGCCCGAGAGAA		
配列番号60:ACTGTGGGTTCAACCTCTG		
31.- IBD5遺伝子座	IGR2060a_1	
配列番号61:CATACAGCACCTTCGGGTCT		
配列番号62:GGGCAGACTTGGAACTCAG		
32.- IBD5遺伝子座	IGR2198a_1	
配列番号63:CATAATCAGGGGTTGCATGA		
配列番号64:CCAGAGACACTGGGACATCA		
33.- IBD5遺伝子座	IGR3096a_1	
配列番号65:CCAAGGCCATGGTGTATAGC		
配列番号66:GTGCCACCTCCCATCTCTAA		30
34.- 熱ショックタンパク質70(HSP70-2)	1267A/G Glu351Gln	
配列番号67:CTGTTGAGGGCATCGACTT		
配列番号68:GGGGTTGATGCTCTTGTCA		
35.- トル様受容体(TLR9)	1237C/T	
配列番号69:AGTCAAAGCCACAGTCCACA		
配列番号70:CCCTGTTGAGAGGGTGACAT		
36.- メチレンテトラ葉酸リダクターゼ(MTHFR)	C677T Val222Ala	
配列番号71:GCCTCTCCTGACTGTCATCC		
配列番号72:TCACAAAGCGGAAGAACATGTG		
37.- インターロイキン4(IL4)	(-590)C/T	40
配列番号73:ACCCAAACTAGGCCTCACCT		
配列番号74:ACAGGTGGCATCTTGGAAAC		
38.- インターロイキン4(IL4)	(-34)C/T	
配列番号75:TCATTTCCCTCGGTTTCAG		
配列番号76:AGAACAGAGGGGAAGCAGT		
39.- マンノース結合レクチン(MBL)	(A/G)Gly54Asp	
配列番号77:TGGCAGCGTCTTACTCAGAA		
配列番号78:AGAACAGCCAACACGTACC		
40.- マンノース結合レクチン(MBL)	(A/G)Gly57Glu	
配列番号79:GTTCCCTTGACGTTCC		50

配列番号 80:TTGTTGGAAGAAAAGAATTGTCC		
41.-マンノース結合レクチン(MBL) (C/T)Arg52Cys		
配列番号 81:CAACCTCAGCCAGACAAGGT		
配列番号 82:CAGCCACGTGATTGTCTAGG		
42.-アンギオテンシノーゲン前駆体(AGT) (-6)A/T		
配列番号 83:GCTTCTGGCATCTGTCTTC		
配列番号 84:CCGGCTTACCTCTGCTGTA		
43.-プラスミノーゲン活性化因子阻害因子(PAI1) 4G/5G		
配列番号 85:ACCTGGTCCCCAAAAGAAAT		
配列番号 86:AAAGTTGGGGACACACAAGC		10
44.-腫瘍壊死因子 (TNF) (-857)C/T		
配列番号 87:ACCACAGCAATGGGTAGGAG		
配列番号 88:TGGTTTCAGTCTTGGCTTCC		
45.-腫瘍壊死因子 (TNF) (-308)G/A y (-238)G/A		
配列番号 89:ACCTGGTCCCCAAAAGAAAT		
配列番号 90:AAAGTTGGGGACACACAAGC		
46.-TPMT G238C		
配列番号 91:AAAACTTTGTGGGGATATGGA		
配列番号 92:CCCTCTATTTAGTCATTTGAAAACA		
47.-TPMT G460A		20
配列番号 93:CCAGGTCCACACATTCTCT		
配列番号 94:TTACCATTGCGATCACCTG		
48.-TPMT A719G		
配列番号 95:CATCCATTACATTTCAGGCTTT		
配列番号 96:GGTTGATGCTTTGAAGAACG		
49.-MICA Trp14Gly および Thr24Ala		
配列番号 97:GAGCCCCACAGTCTTCGTTA		
配列番号 98:TTTCCGTTCCCTGTCAAGTC		
50.-MICA Met129Val、Lys173Glu および Gly175Ser		
配列番号 99:GCTCTTCCTCTCCAAAACC		30
配列番号 100:CACCATGGGGGCAGTGTTC		
51.-SLC11A1=NRAMP1 プロモーター領域 (-377 ~ -222) 中: 対立遺伝子7		
配列番号 101:AACGAGGGTCTTGGAACTC		
配列番号 102:GTGTTCTGTGCCCTCCCAAGT		
52.-CD14 (-159)T/C		
配列番号 103:CACCCACCAGAGAAGGCTTA		
配列番号 104:ATCACCTCCCCACCTCTCTT		
53.-CD16A=FCGR3A G4985T Val158Phe		
配列番号 105:CCAAAAGCCACACTCAAAGAC		
配列番号 106:CTTGAGTGATGGTATGTTCA		40
54.-NR1I2 (-25385)C/T		
配列番号 107:TCACCAGGGCTGGATTAAAG		
配列番号 108:GCCTCTGGCAACAGTAAAGC		
55.-TUCAN/CARD8/CARDINAL (T/A) Cys10停止		
配列番号 109:CTGCCGAGACGGGTATACAG		
配列番号 110:GCAAATGTCTCCTGGGAATG		
56.-IKBL +738T/C Cys224Arg		
配列番号 111:TGAGTCCTTCTCAGCCTGGT		
配列番号 112:CTCTCACGCAGCTTCCCT		
57.-TNFRSF1B=TNFR2 G593A y T620C		50

配列番号113:TTCTGGGCCAAGTTCTCTA		
配列番号114:GGGGCAGGTACAGAGAGT		
58.-MEKK1 Asp643Asn		
配列番号115:CTGGAAAGTTGCCAACCA		
配列番号116:ACCCAAAGTCTGGGCTCTT		
59.-HLA-DQ4 159G/A/Cおよび282C/T(DQB1*0401およびDQB1*0402)		
配列番号117:GTTTAAGGGCATGTGCTAC		
配列番号118:AGCTCCAAGTGGTAGTTGTG		
60.-HLA-DRB 109T/C、119T/C/G/A、122A/C/G/T、129A/G、161G/A/T、175A/T/C/G、1		
84A/C/dtheA、286C/A/T、305C/G	10	
配列番号119:GCGCTTCGACAGCGACGTGGG		
配列番号120:CTCGCCGCTGCACTGTGAAG		
61.-IL1RN 2018 T/Cエクソン2および2073 C/Tイントロン2		
配列番号121:ACAAGTTCTGGGGACACAG		
配列番号122:ATTGCACCTAGGGTTGTGC		
62.-IL1B 3954 C/T TAQI		
配列番号123:TGTTCTTAGCCACCCCCACTC		
配列番号124:GTGATCGTACAGGTGCATCG		
63.-Fas -670 G/A		
配列番号1317:AGTTGGGGAGGTCTTGAAGG	20	
配列番号1318:CCTATGGCGAACATCTGTA		
64.-カスパーぜ9 C93T		
配列番号1319:GGAAGAGCTGCAGGTGGAC		
配列番号1320:GAATCGCTTAGCGAACACC		
65.-TLR1 R80T(G/C)		
配列番号1321:TCTGAGCTTGGACTTCTGACA		
配列番号1322:AGGTGGCAAGAAATCTTCA		
66.-TLR2 R753G(A/G)		
配列番号1323:TCCCATTCCGTCTTTTGAG	30	
配列番号1324:CAAATCCTCCCGCTGAG		
67.-TLR6 S249P(T/C)		
配列番号1325:ACTTTAGGGTGCTTACAACGTACT		
配列番号1326:GACTCTGACCAGGCATTTCC		
68.-MMP3 5A/6A		
配列番号1327:GCCTAACCTCTCAAAGTGC		
配列番号1328:AATTCACATCACTGCCACCA		
69.-NOD1(CARD4) indel +32656		
配列番号1329:CACTATCTCCCCGACAGC		
配列番号1330:TGGCTGTGAAGAACAGCAA		
70.-DLG5 DLG5_e26	40	
配列番号1331:GAGAAATGCCAGAACAGATCCA		
配列番号1332:AAGCAGAACCTCCCTCCAG		
71.-NOD1 rs2075817 C/T		
配列番号1333:GGCTGCGAAGTCTGTAAACC		
配列番号1334:CGCTACATGCTTCAAACCTCG		
72.-NOD1 rs2975632 C/T		
配列番号1335:GCAGCGATTACAGAAAACAT		
配列番号1336:AATGCCATGCTCCATTCTT		
73.-NOD1 rs3020207 A/G		
配列番号1337:GAGAAACCCCACAAACCAGTG	50	

配列番号 1338 : AGCGGCTACTTTCCCAAAT		
74 . -NOD1 rs2075818 C/G		
配列番号 1339 : CAGAGTCTCACCCCCACATT		
配列番号 1340 : CTCAGATCAGCAGGGAGAGG		
75 . -NOD1 rs2235099 C/T		
配列番号 1341 : TCCCTCCAGTGAGCAGGTAT		
配列番号 1342 : GCATCACCCAGGATGAAGAT		
76 . -NOD1 rs2075821 A/G		
配列番号 1343 : TCAGGTTCTTCCAGGAGTGG		
配列番号 1344 : CTGTTGGCTTGGACAAACA		10
77 . -NOD1 rs2075822 C/T		
配列番号 1345 : CGCCTCACTGTTCTCAGGT		
配列番号 1346 : AAGCTTGCACCTTGACCTC		
78 . -NOD1 rs2907748 C/T		
配列番号 1347 : TCACTTGCTGAGAACCCAGA		
配列番号 1348 : GGACCCCTGGGACTAGAGGAG		
79 . -NOD1 rs5743368 A/G		
配列番号 1349 : ACTTAATTGCCTGGGTGACG		
配列番号 1350 : GCAATTCACCAACTGATCG		
80 . -DLG5 ハプロタイプ A rs2289311 C/T		20
配列番号 1351 : CCACCTTGCTTTCTCACC		
配列番号 1352 : CTGCGTTGTGCTTGTGTTT		
81 . -MTHFR A1298C		
配列番号 1353 : TTTGGGGAGCTGAAGGACTA		
配列番号 1354 : CTTTGTGACCATTCCGGTTT		
82 . -NAT2 Ile114Thr		
配列番号 1355 : TGGTGTCTCCAGGTCAATCA		
配列番号 1356 : GGCTGATCCTTCCCAGAAAT		
83 . -NAT2 Lys268Arg A/G		
配列番号 1357 : ACTGTTGGTGGCTTCATC		30
配列番号 1358 : AGGGATCCATCACCAAGGTTT		
84 . -ESR1 rs9340799 A/G		
配列番号 1359 : AGGGTTATGTGGCAATGACG		
配列番号 1360 : ACCAATGCTCATCCCAACTC		
85 . -ESR1 rs2234693 C/T		
配列番号 1361 : CATGAACCACCATGCTCAGT		
配列番号 1362 : ACCACACTCAGGGTCTCTGG		
86 . -MEFV V726A C/T		
配列番号 1363 : AGAATGGCTACTGGGTGGTG		
配列番号 1364 : AGAGCAGCTGGCGAATGTAT		
87 . -Vit D受容体 (VDR) rs10735810 A/G		40
配列番号 1365 : TCAAAGTCTCCAGGGTCAGG		
配列番号 1366 : AGGGCGAATCATGTATGAGG		
88 . -EMR3 E127Q C/G		
配列番号 1367 : CATCCCCATTTGCTCACTTT		
配列番号 1368 : GCCTGGTCACTCTCAGTTCC		
89 . -EMR1 Q496K G/T		
配列番号 1369 : CGAGGAGTTCCAACAGGTA		
配列番号 1370 : GGCTTTGTCTCCTTGTGG		
90 . -MTHFD1 R653Q A/G		50

配列番号 1371 : TCCAGTGTTGTCCATGCTG	
配列番号 1372 : TTCCCCTGATGTTAAAAGAAACA	
91. - SHMT1 1420C/T	
配列番号 1373 : GTCAACAGTTCCCTTGGAA	
配列番号 1374 : TGGCAGGGGATAAGTACCAAG	
92. - NAT2 857G/A G1y286Glu	
配列番号 1375 : ACTGTTGGTGGGCTTCATC	
配列番号 1376 : GGGTGATACATACACAAGGGTTT	
93. - NAT2 Arg197Gln R197Q A/G	10
配列番号 1377 : CCTGCCAAAGAAGAAACACC	
配列番号 1378 : GATGAAGCCCACCAAACAGT	
94. - NAT2 rs1801279 191 G/A	
配列番号 1379 : GGGGATCATGGACATTGAAG	
配列番号 1380 : TGTGGTCAGAGCCCAGTACA	
95. - TLR5 Arg392停止C/T	
配列番号 1381 : CCTTCTGGGGAACTTTACA	
配列番号 1382 : CGCTGTAAGGTTGATCTTGG	
96. - CTLA4 A49G	
配列番号 1383 : CTGAACACCGCTCCATAAA	
配列番号 1384 : CCTCCTCCATCTTCATGCTC	20
97. - MLH1 D132H C/G	
配列番号 1385 : CCGGGATCAGGAAAGAAGAT	
配列番号 1386 : AGGGGCTTCAGTTTCCAT	
98. - MTRR 66A/G	
配列番号 1387 : TGTGTGGTATTGTTGCATTG	
配列番号 1388 : CCATGTACCACAGCTTGCTC	
99. - ITPA 94C/A	
配列番号 1389 : CTCATTGGTGGGAAGAAGA	
配列番号 1390 : CGAACTGCCTCCTGACATT	
100. - MEFV E148Q C/G	30
配列番号 1391 : GCCCAGGAGCCTGAAGAC	
配列番号 1392 : CCTTCTCTGCGTTGCTC	
101. - PTPN22 R620W C/T	
配列番号 1393 : GGCCCTCAATGAACCTCTCAA	
配列番号 1394 : GGATAGCAACTGCTCCAAGG	
102. - LDL受容体LRP-5 3357A/G	
配列番号 1395 : ACTTCACCAACATGCAGGAC	
配列番号 1396 : CAGGTCACAGCTCTCAATGC	
103. - CTLA4 -C318T	
配列番号 1397 : TGGTTAAGGATGCCAGAAG	40
配列番号 1398 : CGAAAAGACAAACCTCAAGCAC	
104. - CCR5 rs333 32bpdel	
配列番号 1399 : CTGTCGCCATGCTGTGTTT	
配列番号 1400 : GACCAGCCCCAAGATGACTA	
105. - IL6 -174G/C	
配列番号 1401 : GCCTCAATGACGACCTAAC	
配列番号 1402 : TCATGGAAAATCCCACATT	
106. - GR ER22/23EK rs6190	
配列番号 1403 : AAGAAAACCCCAGCAGTGTG	
配列番号 1404 : GCCTTTGGAAAATCAACCA	50

107. -P53 Arg72Pro C/G	
配列番号1405:GAAGACCCAGGTCCAGATGA	
配列番号1406:ACTGACCGTGCAAGTCACAG	
108. -DLG5 P1371Q A/C	
配列番号1407:CTGTCATCGACCCACTGATG	
配列番号1408:GACACAGGGAAAGGCTCACA	
109. -GR ER22/23EK rs6189	
配列番号1409:AAGAAAACCCCAGCAGTGTG	
配列番号1410:GCCTTTGGAAAATCAACCA	
110. -GR ER22/23EK rs6190	10
配列番号1411:AAGAAAACCCCAGCAGTGTG	
配列番号1412:GCCTTTGGAAAATCAACCA	
111. -LDL受容体LRP-5 C135242T	
配列番号1413:GTAGATGAAGTCCCCAGCA	
配列番号1414:GCATTGAACCCGTCTTGT	
112. -LDL受容体LRP-5 G121513A	
配列番号1415:GCACCGACATTACTGACACC	
配列番号1416:ATGAGGCTGGAGAAGAAGCA	
113. -LDL受容体LRP-5 C141759T	
配列番号1417:GAGCACGTGGTGGAGTTG	
配列番号1418:TTGTCCAAGTCCCTCCACAC	
114. -LDL受容体LRP-5 G138351A	
配列番号1419:ATGGCCACGTGCGTTGTTATT	
配列番号1420:AGCCACCTGTGCTTCTTCAC	
115. -P2X7 -298C/T	
配列番号1421:GTGTTACAGAGGATGGGCATT	
配列番号1422:GGGGCTGAATAAAGGGTTGT	
116. -P2X7 -838G/T	
配列番号1423:GAGCTACGCACATCACCAAA	
配列番号1424:GGTCCTCTTGCAATCCAGA	30
117. -APC E1317Q C/G	
配列番号1425:CAGACGACACAGGAAGCAGA	
配列番号1426:TGTCTGAGCACCACCTTTGG	
118. -CD97 -T64C A/G	
配列番号1427:GGGAAAGAGTGAGTGGGACA	
配列番号1428:CCCTGGTCTGTGTTTTA	

【0395】

マルチプレックスPCRは、検出する遺伝的変異が存在し得る遺伝子断片の特異的な増幅を可能にする、同じ時間および温度条件下において同時に実施する。ひとたびPCRマルチプレックスが終了した後、アガロースゲル分析を使用して増幅が起こったことを確認する。

【0396】

次に、ハイブリダイズさせたサンプル(増幅産物)にDNaseを用いた断片化を施し、生成した断片化産物には間接的な標識を次いで施す。末端トランスフェラーゼはヌクレオチドを加え、これは分子対の一要素と結合し、互いに特異的に結合し(例えば、ビオチンはストレプトアビシンとの後の結合を可能にする)、これらの小さいDNA断片の末端と特異的に結合する。

【0397】

サンプルをDNAチップに施す前に、5分間で95℃に加熱することによってサンプルを変性させ、次いで「ChipMapキットハイブリダイゼーションバッファー」(Ventana Medical Sy

10

20

30

40

50

stem)を加える。

【0398】

次に、実施例1のセクション1.3.2、1.3.3、1.3.4および1.3.5に記載した手順に従い、数段階のハイブリダイゼーションを実施し、スライドをスキャニングし、画像を定量化し、結果を解釈する。

【0399】

(実施例4)

DNAチップを使用する、IBDと関連するヒト遺伝的変異の9個体の遺伝子型の同定

4.1 DNA抽出

従来の方法によって9個体(患者)からDNAを抽出して、クローン病の発症と関連する遺伝子CSFR1の遺伝的変異A2033Tに関して、これらの個体中で見られる遺伝的変異を特徴づけた。塩基配列決定による当該の領域の遺伝的分析によって、3人の患者が遺伝子型AAをしており、他の3人は遺伝子型AT(異型)をしており、さらに他の3人は遺伝子型TTを有していたことを決定した。

【0400】

4.2 プローブ設計

遺伝的変異A2033TCSFR1Sを検出するために4つのプローブを設計した:

AAACCCTTATTCACTAATCACAGC- 配列番号715

GCTGTGATTAGGTGAATAAGGGTTT- 配列番号716

AAACCCTTATTCTCCTAATCACAGC- 配列番号717

GCTGTGATTAGGAGAATAAGGGTTT- 配列番号718

10

20

30

40

50

【0401】

4.3 IBDと関連するヒトの遺伝的変異を検出するためのDNAチップの製造

実施例3.2中に記載したのと同様にマイクロアレイヤーを用いて、設計したオリゴヌクレオチドをスライド上にプリントイングした。

【0402】

4.4 PCRおよびサンプルの標識

当該の遺伝的変異の分析を可能にした遺伝子CSFR1の領域を、特異的プライマー(配列番号41および配列番号42)を使用してPCRマルチプレックスによって増幅させた。実施例1.3.1中に示したのと同様に、増幅産物を断片化し標識化した。

【0403】

4.5 サンプルのハイブリダイゼーション

実施例1.3.2中に記載したのと同様に、自動式ハイブリダイゼーションステーションにおいてハイブリダイゼーションを実施した。

【0404】

4.6 結果の分析

スライドをスキャナ中に置いた。レーザーによって励起時に結合した蛍光団によって発せられたシグナルをスキャンし(実施例1.3.3)、ハイブリダイゼーションが起こった地点におけるシグナルから得た画像を定量化した(実施例1.3.4)。

【0405】

実施例1.3.5中に記載したアルゴリズムを使用して、結果の分析を実施した。このアルゴリズムを使用することによって、対象のサンプルのヌクレオチド配列分析によって得た遺伝子型と完全に一致して、試験した9対象のそれぞれに関する遺伝子型を特徴づけることができた。

【0406】

図2は比率1および2の表示を示し、9の患者の遺伝子型の特徴づけを可能にする。

【0407】

表8は、4プローブそれぞれの10の複製物を使用した場合の、3つの遺伝子型群に関して得た線形関数を示す。「X」は比率1であり、「Y」は比率2であり、「0」は遺伝子型TTに対応し、「1」は遺伝子型ATに対応し、かつ「2」は遺伝子型AAに対応する。

【0408】

【表99】

表8
遺伝子タイピングのために使用した関数の係数

クラス	0	1	2
X	427,052	863,0399	1270,836
Y	8937,156	16216,35	21969,05
(定数)	-1514,27	-5026,28	-9293,69

10

【0409】

遺伝子型AAを有するドナーは、それぞれ0.26および0.32の比率1および2を有していた。線形関数においてこれらの比率を代用する際に、関数2が高い絶対値を示すことが観察される。このことから我々は、4プローブそれぞれの10個の複製物を使用したとき、どのようにして本発明のアルゴリズムがドナーを完全に分類するかを見ることができる。

【0410】

表9は、4プローブのそれぞれの8個の複製物を使用したときに得た線形関数を示す。

【0411】

【表100】

表9
遺伝子タイピングのために使用した関数の係数

20

クラス	0	1	2
X	751,6869	1446,046	2065,363
Y	10369,47	18620,87	25204,48
(定数)	-1813,36	-5892,27	-10868,5

【0412】

遺伝子型AAを有する同じドナーは、それぞれ0.26および0.32の同じ比率1および2を有していた。線形関数においてこれらの比率を代用する際に、関数2が高い絶対値を示すことが観察される。このことから、4プローブそれぞれの8個の複製物を使用したとき、本発明のアルゴリズムにより患者が完全に分類されることを認めることができる。

30

【0413】

表10は、4プローブのそれぞれの6個の複製物を使用したときに得た線形関数を示す。

【0414】

【表101】

表10
遺伝子タイピングのために使用した関数の係数

40

クラス	0	1	2
X	227,5676	531,6475	798,1821
Y	11864,89	21269,96	28789,95
(定数)	-1992,22	-6460,62	-11889,5

【0415】

遺伝子型AAを有する同じドナーは、それぞれ0.26および0.32の同じ比率1および2を有していた。線形関数においてこれらの比率を代用する際に、関数2が高い絶対値を示すことが観察される。このことから、4プローブそれぞれの6個の複製物を使用したとき、本発明のアルゴリズムにより患者が完全に分類されることを認めることができる。

【0416】

50

(実施例5)

DNAチップを使用する、薬剤に対する有害反応と関連するヒトの遺伝的変異の検出

5.1 薬剤に対する有害反応と関連するヒトの遺伝的変異を検出するためのDNAチップの設計

有害薬剤反応を検出するためのDNAチップを設計し製造した。このチップは、薬剤に対する有害反応と関連する遺伝的変異の、感度、特異性、再現性の高い同時検出を可能にする。これらのヒトの遺伝的変異の例証となる例は、表3中に列挙する。

【0417】

この場合DNAチップは、その表面上に複数のプローブを含み、遺伝的変異の検出を可能にする支持体からなる。これらのプローブは、試験する有害反応と関連する遺伝子の(増幅した)標的配列とハイブリダイズすることができる。使用するプローブのそれぞれのDNA配列は以下に列挙する。一般に、遺伝子の名称および遺伝的変異を与える(アミノ酸の変化、ヌクレオチドの変化、「ins」:挿入「del」:欠失)]。

1. - -1- アドレナリン受容体(ADRB1)Arg389Gly(-1アドレナリン受容体の多型Arg389Glyを検出するためのプローブ)

AAGGCCTTCCAGCGACTGCTCTGCT- 配列番号961

AAGGCCTTCCAGGGACTGCTCTGCT- 配列番号962

AGCAGAGCAGTCGCTGGAAGGCCTT- 配列番号963

AGCAGAGCAGTCCCTGGAAGGCCTT- 配列番号964

2. - -2- アドレナリン受容体(ADRB2)Arg16Gly

CTGGCACCCAATGGAAGCCATGCGC- 配列番号965

CTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGC- 配列番号966

GCGCATGGCTTCCATTGGGTGCCAG- 配列番号967

GCGCATGGCTTCTATTGGGTGCCAG- 配列番号968

3. - -2- アドレナリン受容体(ADRB2)Gln27Glu

GACGTCACGCAGCAAAGGGACGAGG- 配列番号969

GACGTCACGCAGGAAAGGGACGAGG- 配列番号970

CCTCGTCCCTTGTGCTGCGTGACGTC- 配列番号971

CCTCGTCCCTTCTGCGTGACGTC- 配列番号972

4. - ドーパミンD3受容体(DRD3)Ser9Gly

AGTTCAAGGTGGCCACTCAGCTGGCT- 配列番号973

AGTTCAAGGTGGCTACTCAGCTGGCT- 配列番号974

AGCCAGCTGAGTAGGCCACCTGAAC- 配列番号975

AGCCAGCTGAGTAGGCCACCTGAAC- 配列番号976

5. - セロトニン2A受容体(HTR2A)His452Tyr

CTAGGAAAGCAGCATTCTGAAGAGG- 配列番号977

CTAGGAAAGCAGTATTCTGAAGAGG- 配列番号978

CCTCTTCAGAATGCTGCTTCCTAG- 配列番号979

CCTCTTCAGAATACTGCTTCCTAG- 配列番号980

6. - セロトニン2A受容体(HTR2A)T102C

GTTAGCTTCTCCGGAGTTAAAGTCA- 配列番号981

GTTAGCTTCTCCAGAGTTAAAGTCA- 配列番号982

TGACTTTAACCTCCGGAGAAGCTAAC- 配列番号983

TGACTTTAACCTGGAGAAGCTAAC- 配列番号984

7. - カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ(COMT)Val108Met

GATTTCGCTGGCGTGAAGGACAAGG- 配列番号985

GATTTCGCTGGCATGAAGGACAAGG- 配列番号986

CCTTGTCTTCAGGCCAGCGAAATC- 配列番号987

CCTTGTCTTCATGCCAGCGAAATC- 配列番号988

8. - グルタチオンSトランスフェラーゼクラス1(GSTP1)Ile105Val

10

20

30

40

50

CGCTGCAAATACATCTCCCTCATCT- 配列番号989	
CGCTGCAAATACGTCTCCCTCATCT- 配列番号990	
AGATGAGGGAGATGTATTCAGCG- 配列番号991	
AGATGAGGGAGACGTATTCAGCG- 配列番号992	
9. -Adducin1(ADD1)G1y460Trp	
GCTTCCGAGGAAGGGCAGAATGGAA- 配列番号993	
GCTTCCGAGGAATGGCAGAATGGAA- 配列番号994	
TTCCATTCTGCCCTTCCTCGGAAGC- 配列番号995	
TTCCATTCTGCCATTCTCGGAAGC- 配列番号996	
10. -DNA修復酵素XRCC1 Arg399Gln	10
GGCTGCCCTCCCGGAGGTAAGGCCT- 配列番号997	
GGCTGCCCTCCCAGAGGTAAGGCCT- 配列番号998	
AGGCCTTACCTCCGGGAGGGCAGCC- 配列番号999	
AGGCCTTACCTCTGGGAGGGCAGCC- 配列番号1000	
11. -シトクロムP450 1A1(CYP1A1)Ile462Val	
ATCGGTGAGACCATTGCCGCTGGG- 配列番号1001	
ATCGGTGAGACCGTTGCCGCTGGG- 配列番号1002	
CCCAGCGGGCAATGGTCTACCGAT- 配列番号1003	
CCCAGCGGGCAACGGTCTCACCGAT- 配列番号1004	
12. -アンギオテンシンII受容体、タイプ1(AGTR1)A1166C	20
TACCAAATGAGCATTAGCTACTTTT- 配列番号1005	
TACCAAATGAGCCTTAGCTACTTTT- 配列番号1006	
AAAAGTAGCTAATGCTCATTTGGTA- 配列番号1007	
AAAAGTAGCTAAGGCTCATTTGGTA- 配列番号1008	
13. -プラジキニン受容体B2(BDKRB2)C-58T	
TGCCATCTAACCATCTTTCTTCTC- 配列番号1009	
TGCCATCTAACCGTCTTTCTTCTC- 配列番号1010	
GAGAAGAAAAGATGGTTAGATGGCA- 配列番号1011	
GAGAAGAAAAGACGGTTAGATGGCA- 配列番号1012	
14. -アンギオテンシノーゲン(AGT)Met235Thr	30
GCTGCTCCCTGACGGGAGCCAGTGT- 配列番号1013	
GCTGCTCCCTGATGGGAGCCAGTGT- 配列番号1014	
ACACTGGCTCCCGTCAGGGAGCAGC- 配列番号1015	
ACACTGGCTCCCATCAGGGAGCAGC- 配列番号1016	
15. -シトクロムP450 2C9(CYP2C9)C430T	
AGCATTGAGGACCGTGTCAAGAGG- 配列番号1017	
AGCATTGAGGACTGTGTTCAAGAGG- 配列番号1018	
CCTCTTGAACACGGTCTCAATGCT- 配列番号1019	
CCTCTTGAACACAGTCCTCAATGCT- 配列番号1020	
16. -シトクロムP450 2C9(CYP2C9)A1075C	40
GTCCAGAGATACATTGACCTTCTCC- 配列番号1021	
GTCCAGAGATACCTTGACCTTCTCC- 配列番号1022	
GGAGAAGGTCAATGTATCTCTGGAC- 配列番号1023	
GGAGAAGGTCAAGGTATCTCTGGAC- 配列番号1024	
17. -シトクロムP450 2C9(CYP2C9)818delA	
TGAAAATGGAGAAGGTAAAATGTAA- 配列番号1025	
TGAAAATGGAGAGGTAAAATGTAA- 配列番号1026	
TTACATTTACCTCTCCATTTCA- 配列番号1027	
TTTACATTTACCTCTCCATTTCA- 配列番号1028	
18. -シトクロムP450 2C9(CYP2C9)T1076C	50

TCCAGAGATACATTGACCTTCTCCC- 配列番号1029
 TCCAGAGATACACTGACCTTCTCCC- 配列番号1030
 GGGAGAAGGTCAATGTATCTCTGGA- 配列番号1031
 GGGAGAAGGTCAAGTGTATCTCTGGA- 配列番号1032
 19.-シトクロムP450 2C9(CYP2C9)C1080G
 GAGATACATTGACCTTCTCCCCACC- 配列番号1033
 GAGATACATTGAGCTTCTCCCCACC- 配列番号1034
 GGTGGGGAGAAGGTCAATGTATCTC- 配列番号1035
 GGTGGGGAGAAGCTCAATGTATCTC- 配列番号1036
 20.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)H324P 10
 TGCACATCCGGAGGTAGGATCATGA- 配列番号1037
 TGCACATCCGGATGTAGGATCATGA- 配列番号1038
 TCATGATCCTACCTCCGGATGTGCA- 配列番号1039
 TCATGATCCTACATCCGGATGTGCA- 配列番号1040
 21.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)V136V
 GCGCTTCTCCGTCTCCACCTTGCAC- 配列番号1041
 GCGCTTCTCCGTCTCCACCTTGCAC- 配列番号1042
 GCGCAAGGTGGACACGGAGAAGCGC- 配列番号1043
 GCGCAAGGTGGAGACGGAGAAGCGC- 配列番号1044
 22.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)V11M 20
 GTGCCCTGGCCGTGATAGTGGCCA- 配列番号1045
 GTGCCCTGGCCATGATAGTGGCCA- 配列番号1046
 TGGCCACTATCACGCCAGGGGCAC- 配列番号1047
 TGGCCACTATCATGGCCAGGGGCAC- 配列番号1048
 23.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)C882G
 GCGGCGCCGCAACTGCAGAGGGAGG- 配列番号1049
 GCGGCGCCGCAAGTGCAGAGGGAGG- 配列番号1050
 CCTCCCTCTGCAGTTGCAGGCCGC- 配列番号1051
 CCTCCCTCTGCACTTGCAGGCCGC- 配列番号1052
 24.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)C1038T 30
 GATCCTGGTTTGGGCCGCGTTCC- 配列番号1053
 GATCCTGGTTTGGGCCGCGTTCC- 配列番号1054
 GGAACGCGGCCGAAACCCAGGATC- 配列番号1055
 GGAACGCGGCCAAACCCAGGATC- 配列番号1056
 25.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)G4180C
 CTTCCCTGGTGAGCCCATCCCCCTA- 配列番号1057
 CTTCCCTGGTGACCCCATCCCCCTA- 配列番号1058
 TAGGGGGATGGGCTACCCAGGAAAG- 配列番号1059
 TAGGGGGATGGGTCACCCAGGAAAG- 配列番号1060
 26.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)A1847G 40
 CTCCCACCCCCCAGGACGCCCTTC- 配列番号1061
 CTCCCACCCCCAAGACGCCCTTC- 配列番号1062
 GAAAGGGGCGTCCTGGGGTGGAG- 配列番号1063
 GAAAGGGGCGTCTGGGGTGGAG- 配列番号1064
 27.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)C-1584G
 CTTGGAAGAACCCGGTCTACAAA- 配列番号1065
 CTTGGAAGAACGGGTCTACAAA- 配列番号1066
 TTTGTAGAGACCGGGTCTTCCAAG- 配列番号1067
 TTTGTAGAGACCCGGTCTTCCAAG- 配列番号1068
 28.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)C100T 50

GCTGCACGCTACCCACCAGGCC- 配列番号1069	
GCTGCACGCTACTCACCAAGGCC- 配列番号1070	
GGGGGCCTGGTGGTAGCGTCAGC- 配列番号1071	
GGGGGCCTGGTAGTAGCGTCAGC- 配列番号1072	
29.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)138insT	
GCTGGGCAACCTGCTGCATGTGGAC- 配列番号1073	
GCTGGGCAACCTTGCATGTGGA- 配列番号1074	
GTCCACATGCAGCAGGTTGCCAGC- 配列番号1075	
TCCACATGCAGCAAGGTTGCCAGC- 配列番号1076	
30.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)C1023T	10
CTGTGCCCATCACCCAGATCCTGGG- 配列番号1077	
CTGTGCCCATCATCCAGATCCTGGG- 配列番号1078	
CCCAGGATCTGGTGATGGCACAG- 配列番号1079	
CCCAGGATCTGGATGATGGCACAG- 配列番号1080	
31.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)G1659A	
AGGCGCTTCTCCGTGTCACCTTGC- 配列番号1081	
AGGCGCTTCTCCATGTCCACCTTGC- 配列番号1082	
GCAAGGTGGACACGGAGAAGCGCCT- 配列番号1083	
GCAAGGTGGACATGGAGAAGCGCCT- 配列番号1084	
32.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)1707T/del	20
TCGCTGGAGCAGTGGTGACCGAGG- 配列番号1085	
TCGCTGGAGCAGGGGTGACCGAGGA- 配列番号1086	
CCTCGGTCACCCACTGCTCCAGCGA- 配列番号1087	
TCCTCGGTACCCCTGCTCCAGCGA- 配列番号1088	
33.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)G1758A	
GCCAACCACCTCCGGTGGGTGATGGG- 配列番号1089	
GCCAACCACCTCCAGTGGGTGATGGG- 配列番号1090	
CCCATCACCCACCGGAGTGGTTGGC- 配列番号1091	
CCCATCACCCACTGGAGTGGTTGGC- 配列番号1092	
34.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)G1758T	30
GCCAACCACCTCCGGTGGGTGATGGG- 配列番号1093	
GCCAACCACCTCCTGTGGGTGATGGG- 配列番号1094	
CCCATCACCCACCGGAGTGGTTGGC- 配列番号1095	
CCCATCACCCACAGGAGTGGTTGGC- 配列番号1096	
35.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)1863ins9bp	
CCCTTCGCCCAACGGTCTTGG- 配列番号1197	
CCCTTCGCCCTTCCAGGGCAACG- 配列番号1198	
CCAAGAGACCGTTGGGCGAAAGGG- 配列番号1199	
CGTTGGGCGAAAGGGCGAAAGGG- 配列番号1100	
36.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)1973insG	40
ACCTAGCTCAGGAGGGACTGAAGGA- 配列番号1101	
ACCTAGCTCAGGAGGGACTGAAGG- 配列番号1102	
TCCCTCAGTCCCTCCTGAGCTAGGT- 配列番号1103	
CCTTCAGTCCCTCCCTGAGCTAGGT- 配列番号1104	
37.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)2539delAACT	
GGATGAGCTGCTAACTGAGCACAGG- 配列番号1105	
GGATGAGCTGCTGAGCACAGGATGA- 配列番号1106	
CCTGTGCTCAGTTAGCAGCTCATCC- 配列番号1107	
TCATCCTGTGCTCAGCAGCTCATCC- 配列番号1108	
38.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)2549A/del	50

CTAACTGAGCACAGGATGACCTGGG- 配列番号1109	
CTAACTGAGCACGGATGACCTGGG- 配列番号1110	
CCCAGGTCATCCTGTGCTCAGTTAG- 配列番号1111	
TCCCAGGTCATCCGTGCTCAGTTAG- 配列番号1112	
39.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)2613delAGA	
TGGCAGAGATGGAGAAGGTGAGAGT- 配列番号1113	
TGGCAGAGATGGAGGTGAGAGTGGC- 配列番号1114	
ACTCTCACCTTCTCCATCTCTGCCA- 配列番号1115	
GCCACTCTCACCTCCATCTCTGCCA- 配列番号1116	
40.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)C2850T	10
GATGAGAACCTGCGCATAGTGGTGG- 配列番号1117	
GATGAGAACCTGTGCATAGTGGTGG- 配列番号1118	
CCACCACTATGCGCAGGTTCTCATC- 配列番号1119	
CCACCACTATGCACAGGTTCTCATC- 配列番号1120	
41.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)G3183A	
GAGATCGACGACGTGATAGGGCAGG- 配列番号1121	
GAGATCGACGACATGATAGGGCAGG- 配列番号1122	
CCTGCCCTATCACGTGTCGATCTC- 配列番号1123	
CCTGCCCTATCATGTGTCGATCTC- 配列番号1124	
42.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)C3198G	20
ATAGGGCAGGTGCGGCGACCAAGAGA- 配列番号1125	
ATAGGGCAGGTGGGGCGACCAAGAGA- 配列番号1126	
TCTCTGGTCGCCGCACCTGCCCTAT- 配列番号1127	
TCTCTGGTCGCCCCACCTGCCCTAT- 配列番号1128	
43.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)T3277C	
GCTTTGGGGACATCGTCCCCCTGGG- 配列番号1129	
GCTTTGGGGACACCGTCCCCCTGGG- 配列番号1130	
CCCAGGGGGACGATGTCCCCAAAGC- 配列番号1131	
CCCAGGGGGACGGTGTCCCCAAAGC- 配列番号1132	
44.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)G4042A	30
TCCCCCACAGGCCGCCGTGCATGCC- 配列番号1133	
TCCCCCACAGGCCACCGTGCATGCC- 配列番号1134	
AGGCATGCACGGCGGCCGTGGGG- 配列番号1135	
AGGCATGCACGGTGGCCTGTGGGG- 配列番号1136	
45.-シトクロムP450 2D6(CYP2D6)4125insGTGCCCACT	
TCGGTGCCCCACTGGACAGCCCCGGC- 配列番号1137	
TCGGTGCCCCACTGTGCCCACTGGAC- 配列番号1138	
GCCGGGGCTGTCCAGTGGGCACCGA- 配列番号1139	
GTCCAGTGGCACAGTGGCACCGA- 配列番号1140	
46.-シトクロムP450 2C8(CYP2C8) A805T	40
GATTGCTTCCTGATCAAAATGGAGC- 配列番号1141	
GATTGCTTCCTGTTCAAAATGGAGC- 配列番号1142	
GCTCCATTTGATCAGGAAGCAATC- 配列番号1143	
GCTCCATTTGAACAGGAAGCAATC- 配列番号1144	
47.-シトクロムP450 2C8(CYP2C8) G416A	
GGATGGGAAAGAGGAGCATTGAGGA- 配列番号1145	
GGATGGGAAAGAAGAGCATTGAGGA- 配列番号1146	
TCCTCAATGCTCCTCTTCCCCATCC- 配列番号1147	
TCCTCAATGCTCTTCCCCATCC- 配列番号1148	
48.-シトクロムP450 2C8(CYP2C8) A1196G	50

TTAGGAAATTCTTGTATCATGTA- 配列番号1149	
TTAGGAAATTCTCTGTCATCATGTA- 配列番号1150	
TACATGATGACAAAGAATTCCTAA- 配列番号1151	
TACATGATGACAGAGAATTCCTAA- 配列番号1152	
49.-シトクロムP450 2C8(CYP2C8) C792G	
TCGGGACTTTATCGATTGCTTCCTG- 配列番号1153	
TCGGGACTTTATGGATTGCTTCCTG- 配列番号1154	
CAGGAAGCAATCGATAAAGTCCCGA- 配列番号1155	
CAGGAAGCAATCCATAAAGTCCCGA- 配列番号1156	
50.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)T341C	10
TGCAGGTGACCATTGACGGCAGGAA- 配列番号1157	
TGCAGGTGACCACTGACGGCAGGAA- 配列番号1158	
TTCCTGCCGTCAATGGTCACCTGCA- 配列番号1159	
TTCCTGCCGTCAAGTGGTCACCTGCA- 配列番号1160	
51.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)C481T	
GGAATCTGGTACCTGGACCAAATCA- 配列番号1161	
GGAATCTGGTACTTGGACCAAATCA- 配列番号1162	
TGATTTGGTCCAGGTACCAAGATTCC- 配列番号1163	
TGATTTGGTCCAAGTACCAAGATTCC- 配列番号1164	
52.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)A803G	20
AAGAAGTGCTGAAAAATATTTAA- 配列番号1165	
AAGAAGTGCTGAGAAATATTTAA- 配列番号1166	
TTAAATATATTTTCAGCACTTCTT- 配列番号1167	
TTAAATATATTCAGCACTTCTT- 配列番号1168	
53.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)C282T	
AGGGTATTTTACATCCCTCCAGTT- 配列番号1169	
AGGGTATTTTATATCCCTCCAGTT- 配列番号1170	
AACTGGAGGGATGTAAAAATACCC- 配列番号1171	
AACTGGAGGGATATAAAATACCC- 配列番号1172	
54.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)G590A	30
CGCTTGAACCTCGAACAAATTGAAGA- 配列番号1173	
CGCTTGAACCTCAAACAATTGAAGA- 配列番号1174	
TCTTCAATTGTTCGAGGTTCAAGCG- 配列番号1175	
TCTTCAATTGTTGAGGTTCAAGCG- 配列番号1176	
55.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)G857A	
AACCTGGTGATGGATCCCTTACTAT- 配列番号1177	
AACCTGGTGATGAATCCCTTACTAT- 配列番号1178	
ATAGTAAGGGATCCATACCCAGGTT- 配列番号1179	
ATAGTAAGGGATTACATACCCAGGTT- 配列番号1180	
56.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)G191A	40
TAAGAAGAAACCGGGTGGGTGGT- 配列番号1181	
TAAGAAGAAACCAAGGGTGGGTGGT- 配列番号1182	
CACCACCCACCCCGGTTCTTCTTA- 配列番号1183	
CACCACCCACCCCTGGTTCTTCTTA- 配列番号1184	
57.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)G636A	
AAGCACCCCTGGATCCAGGTAAAGG- 配列番号1185	
AAGCACCCCTGAATCCAGGTAAAGG- 配列番号1186	
CCTTACCTGGATCCAGGGGTGCTT- 配列番号1187	
CCTTACCTGGATTCAAGGGGTGCTT- 配列番号1188	
58.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)G681A	50

TGATTATTCGGGAACCCATAAC- 配列番号1189
 TGATTATTCGGGAACCCATAAC- 配列番号1190
 GTTATGGGTTCCGGAAATAATCA- 配列番号1191
 GTTATGGGTTCCGGAAATAATCA- 配列番号1192
 59.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)C680T
 TTGATTATTCGGGAACCCATAA- 配列番号1193
 TTGATTATTCCTGGGAACCCATAA- 配列番号1194
 TTATGGGTTCCGGAAATAATCAA- 配列番号1195
 TTATGGGTTCCGGAAATAATCAA- 配列番号1196
 60.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)A1G 10
 GAGAAGGCTTCATGGATCCTTTG- 配列番号1197
 GAGAAGGCTTCAGTGGATCCTTTG- 配列番号1198
 CAAAAGGATCCATTGAAGCCTCTC- 配列番号1199
 CAAAAGGATCCACTGAAGCCTCTC- 配列番号1200
 61.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)IVS5+2T>A
 AAATGGAGAAGGTAAAATGTTAAC- 配列番号1201
 AAATGGAGAAGGAAAAATGTTAAC- 配列番号1202
 TGTAAACATTTACCTTCTCCATT- 配列番号1203
 TGTAAACATTTTCCCTCTCCATT- 配列番号1204
 62.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)T358C 20
 AATGGAAAGAGATGGAAGGAGATCC- 配列番号1205
 AATGGAAAGAGACGGAAGGAGATCC- 配列番号1206
 GGATCTCCTCCATCTCTTCCATT- 配列番号1207
 GGATCTCCTCCGTCTCTTCCATT- 配列番号1208
 63.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)G431A
 GCATTGAGGACCGTGTCAAGAGGA- 配列番号1209
 GCATTGAGGACCATGTCAAGAGGA- 配列番号1210
 TCCTCTGAACACGGTCCTCAATGC- 配列番号1211
 TCCTCTGAACATGGTCCTCAATGC- 配列番号1212
 64.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)C1297T 30
 TTTTCAGGAAAACGGATTTGTGTGG- 配列番号1213
 TTTTCAGGAAAATGGATTTGTGTGG- 配列番号1214
 CCACACAAATCCGTTTCTGAAAA- 配列番号1215
 CCACACAAATCCATTTCCTGAAAA- 配列番号1216
 65.-グルタミン酸受容体、イオン性、N-メチルD-アスパラギン酸(NMDA)2B(GRIN2B)C266
 4T
 GTTCATGGTTGCGGTGGGGAGTTC- 配列番号1217
 GTTCATGGTTGCAGTGGGGAGTTC- 配列番号1218
 GAACTCCCCACCGCAACCATGAAC- 配列番号1219
 GAACTCCCCACTGCAACCATGAAC- 配列番号1220 40
 66.-糖タンパク質P(ABCB1)C3435T
 TGCTGCCCTCACCATCTCTCCTGT- 配列番号1221
 TGCTGCCCTCACGATCTCTCCTGT- 配列番号1222
 ACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCA- 配列番号1223
 ACAGGAAGAGATCGTGAGGGCAGCA- 配列番号1224
 67.-チオプリンメチルトランスフェラーゼ(TPMT)A719G
 TTGAAAAGTTATCTACTTACAGA- 配列番号1225
 TTGAAAAGTTATGTCTACTTACAGA- 配列番号1226
 TCTGTAAGTAGATATAACTTTCAA- 配列番号1227
 TCTGTAAGTAGACATAACTTTCAA- 配列番号1228 50

67.-チオプリンメチルトランスフェラーゼ(TPMT)G238C
 GTCCCCGGTCTGGAAACCTGCATAA-配列番号1229
 GTCCCCGGTCTGCAAACCTGCATAA-配列番号1230
 TTATGCAGGTTCCAGACCGGGGAC-配列番号1231
 TTATGCAGGTTGCAGACCGGGGAC-配列番号1232
 69.-5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)C677T
 TGTCTGCGGGAGGCCGATTCATCAT-配列番号1233
 TGTCTGCGGGAGTCGATTCATCAT-配列番号1234
 ATGATGAAATCGGCTCCCGCAGACA-配列番号1235
 ATGATGAAATCGACTCCCGCAGACA-配列番号1236 10
 70.-ブチリルコリンエステラーゼ(BCHE)Asp70Gly
 GTCAGAACATAGATCAAAGTTTCC-配列番号1237
 GTCAGAACATAGGTCAAAGTTTCC-配列番号1238
 GGAAAACTTGATCTATGTTCTGAC-配列番号1239
 GGAAAACTTGACCTATGTTCTGAC-配列番号1240
 71.-ブチリルコリンエステラーゼ(BCHE)Ala539Thr
 AATATTGATGAAGCAGAACATGGGAGT-配列番号1241
 AATATTGATGAAACAGAACATGGGAGT-配列番号1242
 ACTCCCATTCTGCTTCATCAATATT-配列番号1243
 ACTCCCATTCTGTTCATCAATATT-配列番号1244 20
 72.-シトクロムP450 3A4(CYP3A4)A-392G
 GAGACAAGGGCAAGAGAGAGAGGCGAT-配列番号1245
 GAGACAAGGGCAGGAGAGAGAGGCGAT-配列番号1246
 ATCGCCTCTCTTGCCTGCCTTGTC-配列番号1247
 ATCGCCTCTCCTGCCTGCCTTGTC-配列番号1248
 73.-シトクロムP450 1A2(CYP1A2)A-163C
 AGCTCTGTGGGCACAGGACGCATGG-配列番号1249
 AGCTCTGTGGGCCAGGACGCATGG-配列番号1250
 CCATGCGTCCTGTGCCAACAGAGCT-配列番号1251
 CCATGCGTCCTGGGCCACAGAGCT-配列番号1252 30
 74.-シトクロムP450 1A2(CYP1A2)A-3860G
 CCTCCGCCTCTCGGATTCAAGCAAT-配列番号1253
 CCTCCGCCTCTCAGATTCAAGCAAT-配列番号1254
 ATTGCTTGAATCCGAGAGAGGCGGAGG-配列番号1255
 ATTGCTTGAATCTGAGAGAGGCGGAGG-配列番号1256
 75.-シトクロムP450 1A2(CYP1A2)G3534A
 CAACCATGACCCGTGAGTACATACC-配列番号1257
 CAACCATGACCCATGAGTACATACC-配列番号1258
 GGTATGTACTCACGGTCATGGTTG-配列番号1259
 GGTATGTACTCATGGTCATGGTTG-配列番号1260 40
 76.-シトクロムP450 1A2(CYP1A2)C558A
 GCCTGGGCACCTCGACCCCTACAAT-配列番号1261
 GCCTGGGCACCTAGACCCCTACAAT-配列番号1262
 ATTGTAAGGGTCAAGTGCCCAGGC-配列番号1263
 ATTGTAAGGGTCTAAGTGCCCAGGC-配列番号1264
 77.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)G14690A
 GGAGAGCACTAAGAAGTTCTAAAA-配列番号1265
 GGAGAGCACTAAAGAGTTCTAAAA-配列番号1266
 TTTTAGGAACCTTCTAGTGCTCTCC-配列番号1267
 TTTTAGGAACCTTTAGTGCTCTCC-配列番号1268 50

78.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)C3699T	
AGATATGGGACCCGTACACATGGAC- 配列番号1269	
AGATATGGGACCTGTACACATGGAC- 配列番号1270	
GTCCATGTGTACGGGTCCCATATCT- 配列番号1271	
GTCCATGTGTACAGGTCCCATATCT- 配列番号1272	
79.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)G19386A	
AAGGAGATTGATGCAGTTTGCCCA- 配列番号1273	
AAGGAGATTGATACAGTTTGCCCA- 配列番号1274	
TGGGCAAAACTGCATCAATCTCCTT- 配列番号1275	10
TGGGCAAAACTGTATCAATCTCCTT- 配列番号1276	
80.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)T29753C	
TTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAA- 配列番号1277	
TTGGCATGAGGTCTGCTCTCATGAA- 配列番号1278	
TTCATGAGAGCAAACCTCATGCCAA- 配列番号1279	
TTCATGAGAGCAGACCTCATGCCAA- 配列番号1280	
81.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)G6986A	
TTTTGTCTTCAGTATCTCTCCCT- 配列番号1281	
TTTTGTCTTCATAATCTCTCCCT- 配列番号1282	
AGGGAAGAGATACTGAAAGACAAAA- 配列番号1283	
AGGGAAGAGATATTGAAAGACAAAA- 配列番号1284	20
82.-セロトニン輸送体(SLC6A4)プロモータ-44bp欠失	
ATCCCCCCTGCACCCCCCAGCATCC- 配列番号1285	
ATCCCCCCTGCACCCCCAGCATCCC- 配列番号1286	
GGATGCTGGGGGTGCAGGGGGAT- 配列番号1287	
GGGATGCTGGGGTGCAGGGGGAT- 配列番号1288	
83.-グルタチオンS-トランスフェラーゼM3(GSTM3)deIAGA(対立遺伝子*B)	
AGGGAAAGAAGAGGATACTTCTCT- 配列番号1289	
AGGGAAAGAAGATACTTCTCTATC- 配列番号1290	
AGAGAAGTATCCTCTTCTTCCCT- 配列番号1291	
GATAGAGAAGTATCTCTTCCCT- 配列番号1292	30
84.-グルタチオンS-トランスフェラーゼM1(GSTM1)対立遺伝子[nulo?]	
CACACATTCTGGCCTTCTGCAGAT- 配列番号1293	
CACACATTCTGACCTTCTGCAGAT- 配列番号1294	
ACTGCAGAAGGCCAAGAACATGTGTG- 配列番号1295	
ACTGCAGAAGGTCAAGAACATGTGTG- 配列番号1296	
85.-グルタチオンS-トランスフェラーゼn1(GSTT1)対立遺伝子なし	
CTGCCTAGTGGGTTCACCTGCCAC- 配列番号1297	
CTGCCTAGTGGGTCACCTGCCAC- 配列番号1298	
GTGGCAGGTGAACCCACTAGGCAG- 配列番号1299	
GTGGCAGGTGACCCCCACTAGGCAG- 配列番号1300	40
86.-アポリポタンパク質E(APOE)Arg158Cys	
GACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGT- 配列番号1301	
ACACTGCCAGGCGTTCTGCAGGTC- 配列番号1302	
GACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGT- 配列番号1303	
ACACTGCCAGGCACTTCTGCAGGTC- 配列番号1304	
87.-アポリポタンパク質E(APOE)Cys112Arg	
ATGGAGGACGTGTGGCGCCGCTGG- 配列番号1305	
CCAGGCGGCCGACACGTCCCTCCAT- 配列番号1306	
ATGGAGGACGTGCGCGGCCGCTGG- 配列番号1307	
CCAGGCGGCCGCGCACGTCCCTCCAT- 配列番号1308	50

88.-腫瘍壞死因子(TNF)G-308A

TTGAGGGGCATGGGACGGGGTCA-配列番号1309

TTGAGGGGCATGAGGACGGGGTCA-配列番号1310

TGAACCCCGTCCCCATGCCCTCAA-配列番号1311

TGAACCCCGTCCCTCATGCCCTCAA-配列番号1312

89.-インターロイキン10(IL10)G-1082A

GCTTCTTGGGAAGGGGAAGTAGGG-配列番号1313

GCTTCTTGGGAGGGGAAGTAGGG-配列番号1314

CCCTACTTCCCCTCCCAAAGAAC-配列番号1315

CCCTACTTCCCCCTCCCAAAGAAC-配列番号1316

10

【0418】

5.2 薬剤に対する有害反応と関連する遺伝的変異を遺伝子タイピングするためのDNAチップの製造

5.2.1 ガラススライドのプリンティング

当該の遺伝的変異を検出することができるプローブを、溶媒としてDMSOを使用して支持体(ガラススライド)にプリンティングまたは蒸着させる。温度および相対湿度を制御しながら、オリゴヌクレオチドのスポットターまたはプリンターを用いてプリンティングを実施する。

【0419】

5.2.2 ガラススライドの加工

前に記載したのと同様に(実施例1.2)、蒸着プロセス中の相対湿度は40~50%に、温度は約20℃に保ちながら、紫外線照射による架橋および加熱によってプローブを支持体(ガラススライド)と結合させる。

20

【0420】

5.3 医薬品薬剤に対する有害反応と関連するヒトの遺伝的変異の、感度、特異性、再現性の高い同時検出用のDNAチップの臨床的有用性の確認

5.3.1 ハイブリダイズさせるサンプルの調製

濾過プロトコルによって個体の血液サンプルからDNAを抽出する。

【0421】

当該のすべてのエクソンおよびインtronは、オリゴヌクレオチドプライマーの適切な対を使用してマルチプレックスPCRによって増幅させる。検出する遺伝的変異が存在し得る場合に遺伝子断片の特異的な増幅を可能にする、オリゴヌクレオチドの任意の適切な対を使用することができる。最小可能数のPCR反応で前記増幅を可能にする対を使用することが有利である。

30

【0422】

検出する遺伝子断片をPCR増幅するために使用するオリゴヌクレオチドプライマーを、医薬品薬剤に対する有害反応と関連する対応する遺伝的変異とともにには以下に列挙する。

1.- -1-アドレナリン受容体(ADRB1)Arg389Gly(-1-アドレナリン受容体遺伝子(ADRB1)に多型Arg389Glyが存在し得る場合、断片を増幅させるためのオリゴヌクレオチド)

配列番号125:GCCTTCAACCCCATCATCTA

40

配列番号126:CAGGCTCGAGTCGCTGTC

2.- -2-アドレナリン受容体(ADRB2)Arg16GlyおよびGln27Glu(-2-アドレナリン受容体遺伝子(ADRB2)に多型Arg389Glyが存在し得る場合、断片を増幅させるためのオリゴヌクレオチド)

配列番号127:GCTCACCTGCCAGACTGC

配列番号128:GCCAGGACGATGAGAGACAT

3.-ドーパミンD3受容体(DRD3)Ser9Gly

配列番号129:CGCAGTAGGAGAGGGCATAG

配列番号130:CAAGCCCCAAAGAGTCTGAT

50

4.-セロトニン2A受容体(HTR2A)His452Tyr	
配列番号131:AGCAAGATGCCAAGACAACA	
配列番号132:CA GTGTGCCTTCCACAGTTG	
5.-セロトニン2A受容体(HTR2A)T102C	
配列番号133:AGGAGAGACACGACGGTGAG	
配列番号134:CAAGTTCTGGCTTAGACATGGAA	
6.-catecol-O-メチルトランスフェラーゼ(COMT)Val108Met	
配列番号135:GGGCCTACTGTGGCTACTCA	
配列番号136:CCCTTTTCCAGGTCTGACA	
7.-グルタチオンSトランスフェラーゼクラス1(GSTP1)Ile105Val	10
配列番号137:TGGTGGACATGGTGAATGAC	
配列番号138:GTGCAGGTTGTGTCTTGTCC	
8.-Adducin-1 (ADD1)Gly460Trp	
配列番号139:TTGCTAGTGACGGTGATTG	
配列番号140:GAGACTGCAGCAAGGGTTTC	
9.-DNA修復酵素XRCC1 Arg399Gln	
配列番号141:TGTCTCCCCTGTCTCATTCC	
配列番号142:ATTGCCAGCACAGGATAAG	
10.-シトクロムP450 1A1(CYP1A1)Ile462Val	
配列番号143:CTCACCCCTGATGGTGCAT	20
配列番号144:TTTGGAAAGTGCTCACAGCAG	
11.-アンギオテンシンII受容体、タイプ1(AGTR1)A1166C	
配列番号145:GAGAACATTCCCTCTGCAGCAC	
配列番号146:TGTGGCTTGCTTTGTCTTG	
12.-プラジキニン受容体(BDKRB2)C-58T	
配列番号147:GAGCAATGTCTGGCTTCTCC	
配列番号148:CCAGGGAGAGAACATTGGAA	
13.-アンギオテンシノーゲン(AGT)Met235Thr	
配列番号149:AGGCTGTGACAGGATGGAAG	
配列番号150:GGTGGTCACCAGGTATGTCC	30
14.-シトクロムP450 2C9(CYP2C9)C430T	
配列番号151:CCTGGGATCTCCCTCCTAGT	
配列番号152:CCACCCCTGGTTTTCTCAA	
15.-シトクロムP450 2C9(CYP2C9)A1075C、T1076CおよびC1080G	
配列番号153:CCACATGCCCTACACAGATG	
配列番号154:TCGAAAACATGGAGTTGCAG	
16.-シトクロムP450 2C9(CYP2C9)818delA	
配列番号155:CCGGGAACTCACAACAAATTAA	
配列番号156:CACAAATTACAAGCAGTCACA	
17.-シトクロムP450 2D6 31G>A、100C>Tおよび138insT	40
配列番号157:CAGGTATGGGGCTAGAAGCA	
配列番号158:ACCTGGTCGAAGCAGTATGG	
18.-シトクロムP450 2D6 883G>C、1023C>T、1039C>T	
配列番号159:GATCCTGGCTTGACAAGAGG	
配列番号160:TCCCACGGAAATCTGTCTCT	
19.-シトクロムP450 2D6 1659G>A、1661G>C、1707T>del、1758G>Aおよび1758G>T	
配列番号161:GTGGGGCTAATGCCTTCAT	
配列番号162:CTTCCCAGTTCCGCTTT	
20.-シトクロムP450 2D6 1846G>Aおよび1863ins9bp	
配列番号163:GTGGGTGATGGGCAGAAG	50

配列番号164:GAGGGTCGTCGTACTCGAAG	
21.-シトクロムP450 2D6 1973insG	
配列番号165:AGCCGTGAGCAACGTGAT	
配列番号166:CTGCAGAGACTCCTCGGTCT	
22.-シトクロムP450 2D6 2539delAACT、2549A>del、2613delAGA	
配列番号167:CAAGGTCCTACGCTTCCAAA	
配列番号168:GATGCACTGGTCCAACCTTT	
23.-シトクロムP450 2D6 2850C>Tおよび2935A>C	
配列番号169:GGAACCCCTGAGAGCAGCTT	10
配列番号170:GGTGTCCCAGCAAAGTTCAT	
24.-シトクロムP450 2D6 3183G>A、3198C>Gおよび3277T>C	
配列番号171:GGAGGCAAGAAGGGAGTGTCA	
配列番号172:CGATGTCACGGGATGTCATA	
25.-シトクロムP450 2D6 4042G>Aおよび4125insGTGCCCACT	
配列番号173:GGAGTCTTGCAGGGGTATCA	
配列番号174:TCACCAGGAAAGCAAAGACA	
26.-シトクロムP450 2C8(CYP2C8)C792GおよびA805T	
配列番号175:GAACACCAAGCATCACTGGA	
配列番号176:GATGTTAGTGCAGGCCATA	
27.-シトクロムP450 2C8(CYP2C8) G416A	20
配列番号177:CTCACAAACCTTGCAGGAATT	
配列番号178:CTTCAAATCTCCCTCCACCA	
28.-シトクロムP450 2C8(CYP2C8) A1196G	
配列番号179:ACCTGCTGAGAAAGGCATGA	
配列番号180:TTCCAGGGCACAAACCATAAT	
29.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)191G>Aおよび282C>T	
配列番号181:CCATGGAGTTGGGCTTAGAG	
配列番号182:CCATGCCAGTGCTGTATTTG	
30.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)T341C	30
配列番号183:TGGTGTCTCCAGGTCAATCA	
配列番号184:GGCTGATCCTCCAGAAAT	
31.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)C481T	
配列番号185:TGACGGCAGGAATTACATTG	
配列番号186:TGTTTCTTCTTGGCAGGAGA	
32.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)A803G	
配列番号187:ACTGTTGGTGGGCTTCATC	
配列番号188:AGGTTTGGGCACGAGATT	
33.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)G590A	
配列番号189:CCTGCCAAGAACGAAACACC	
配列番号190:GATGAAGCCCACCAAACAGT	40
34.-N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)G857A	
配列番号191:ACTGTTGGTGGGCTTCATC	
配列番号192:GGGTGATACATACACAAGGGTTT	
35.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)G636A	
配列番号193:ACCCTGTGATCCCACTTCA	
配列番号194:TGTACTTCAGGGCTTGGTCA	
36.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)C680TおよびG681A	
配列番号195:CAACCAGAGCTTGGCATATTG	
配列番号196:TAAAGTCCCGAGGGTTGTTG	
37.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)A1G	50

配列番号197:TAGTGGGCCTAGGTGATTGG	
配列番号198:TTTCCAATCACTGGGAGAGG	
38.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)IVS5+2T>A	
配列番号199:CAACCCTCGGGACTTTATTG	
配列番号200:CAAGCATTACTCCTTGACCTGTT	
39.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)T358C	
配列番号201:CCCAGTGTCACTCCTCTT	
配列番号202:GTCCTCAATGCTCCTCTTCC	
40.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)G431A	10
配列番号203:GAATCGTTTCAGCAATGGAA	
配列番号204:GTATGTTCACCCACCCCTTGG	
41.-シトクロムP450 2C19(CYP2C19)C1297T	
配列番号205:TCACCGAACAGTTCTTGCAT	
配列番号206:GTCAAGGTCTTGGGTCAA	
42.-グルタミン酸受容体、イオン性、N-メチルD-アスパラギン酸(NMDA)2B(GRIN2B)C266	
4T	
配列番号207:GCAGGATGTTGGAGTGTGTG	
配列番号208:GCAATTATTGGTGGGAGAGTG	
43.-糖タンパク質P(ABCB1)C3435T	
配列番号209:TGCTCCCAGGCTGTTATT	20
配列番号210:TGTTTCAGCTGCTTGATGG	
44.-チオプリンメチルトランスフェラーゼ(TPMT)A719G	
配列番号211:GGTTGATGCTTTGAAGAACG	
配列番号212:CATCCATTACATTTCAGGCTTT	
45.-チオプリンメチルトランスフェラーゼ(TPMT)G238C	
配列番号213:AAACACTTTGTGGGGATATGGA	
配列番号214:AAACCTCTATTTAGTCATTGAAAACA	
46.-5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)C677T	
配列番号215:TCCCTGTGGTCTCTTCATCC	
配列番号216:CAAAGCGGAAGAACATGTGTCA	30
47.-ブチリルコリンエステラーゼ(BCHE)Asp70Gly	
配列番号217:AAAGCCACAGTCTCTGACCAA	
配列番号218:GGTGCTGGAATCCATACATT	
48.-ブチリルコリンエステラーゼ(BCHE)Ala539Thr	
配列番号219:GAGAAAATGGCTTTGTATTG	
配列番号220:TGATTTTCCAGTCCATCATGT	
49.-シトクロムP450 3A4(CYP3A4)A-392G	
配列番号221:CAGGGGAGGAAATGGTTACA	
配列番号222:TGGAGCCATTGGCATAAAAT	
50.-シトクロムP450 1A2(CYP1A2)A-163C	40
配列番号223:AGAGAGCCAGCGTTCATGTT	
配列番号224:CTGATGCGTGTCTGTGCTT	
51.-シトクロムP450 1A2(CYP1A2)A-3860G	
配列番号225:GAGTGCAGTGGTGCGATCT	
配列番号226:TGAGGCCAGGAGTTCAAGAC	
52.-シトクロムP450 1A2(CYP1A2)G3534A	
配列番号227:GGTGGAGGTAGGAGAACAC	
配列番号228:CTGCTGAACCTGCACACATT	
53.-シトクロムP450 1A2(CYP1A2)C558A	
配列番号229:CCTCATCCTCCTGCTACCTG	50

配列番号230:GAGGCAGTCTCCACGAACTC
 54.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)G14690A
 配列番号231:GCCTACAGCATGGATGTGA
 配列番号232:TGGAATTGTACCTTTAAGTGG
 55.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)C3699T
 配列番号233:TCACAATCCCTGTGACCTGA
 配列番号234:GGGGCATTTTACTGATGGA
 56.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)G19386A
 配列番号235:TGAAACCACCAGCAGTGTTC
 配列番号236:AAAATTCTCCTGGGGAGTGG
 57.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)T29753C
 配列番号237:ACCCCTAACATGTAACTCTGTGG
 配列番号238:TTTGAAGGAGAAGTTCTGAAGGA
 58.-シトクロムP450 3A5(CYP3A5)G6986A
 配列番号239:CACCCAGCTAACGAATGCT
 配列番号240:CCAGGAAGCCAGACTTTGAT
 59.-セロトニン輸送体(SLC6A4)プロモーター-44bp欠失
 配列番号241:ACCCCTAACATGTCCCTACTGC
 配列番号242:GGAGATCCTGGGAGAGGTG
 60.-グルタチオンS-トランスフェラーゼM3(GSTM3)delAGA(対立遺伝子*B)
 配列番号243:TTCTGGGAAATTCTCATGG
 配列番号244:TCAGGTTTGGGAACTCATCC
 61.-グルタチオンS-トランスフェラーゼM1(GSTM1)対立遺伝子なし
 配列番号245:ATGGTTTGCAGGAAACAAGG
 配列番号246:AAAGCAGGAGATGAAGTCCT
 62.-グルタチオンS-トランスフェラーゼn1(GSTT1)対立遺伝子なし
 配列番号247:GGCAGCATAAGCAGGACTTC
 配列番号248:GTTGCTCGAGGACAAGTTCC
 63.-アポリポタンパク質E(APOE)Arg158CysおよびCys112Arg
 配列番号249:GCACGGCTGTCCAAGGA
 配列番号250:GCGGGCCCCGGCCTGGT
 64.-腫瘍壞死因子(TNF)G-308A
 配列番号251:ACCTGGTCCCCAAAAGAAAT
 配列番号252:AAAGTTGGGACACACAAGC
 65.-インターロイキン10(IL10)G-1082A
 配列番号253:CACACACACACACAAATCCAAG
 配列番号254:GATGGGGTGGAAAGAAGTTGA

【0423】

マルチプレックスPCRは、検出する遺伝的変異が位置する遺伝子断片の特異的な増幅を可能にする、同じ時間および温度条件下において同時に実施する。マルチプレックスPCRの後、反応のアガロースゲル分析を実施して、増幅反応が成功したかどうかを測定する。

【0424】

次に、ハイブリダイズさせたサンプル(増幅産物)にDNaseを用いた断片化を施し、生成した断片化産物には間接的な標識を施す。末端トランスフェラーゼはヌクレオチドを加え、これは特異的に相互作用する分子対の一要素、(例えば、化学的に標識したストレプトアビジン分子との後の結合用のビオチン)、これらの小さいDNA断片の末端と結合する。

【0425】

サンプルをDNAチップに施す前に、5分間で95℃に加熱することによってサンプルを変性させ、次いでChipMapキットハイブリダイゼーションバッファー(Ventana Medical System)を加える。

10

20

30

40

50

【0426】

次に、実施例1のセクション1.3.2、1.3.3、1.3.4および1.3.5に記載した手順に従い、数段階のハイブリダイゼーションを実施し、スライドをスキャニングし、画像を定量化し、結果を解釈する。

【0427】

(実施例6)

炎症性腸疾患に罹患する個体中の疾患の進行および療法に対する応答性を予測するためのIBDチップの施用

疾患の進行およびコルチコステロイド治療に対する応答性の予測におけるIBDチップの値を、炎症性腸疾患(IBD)を有する579の個体から得た血液サンプルを使用した臨床確認の結果に基づいて評価し、その中の335個体がクローン病に罹患しており、244個体が潰瘍性大腸炎に罹患していた。すべてのサンプルは、少なくとも5年のIBDの病歴を有する個体由来のものであった。

【0428】

疾患の進行の予測は、所与の疾患の表現型または療法に対する応答性の発現の確率を定義する、陽性尤度比(LR+、感度/[1-特異性]として測定)に基づく。10以上のLR+値は所定の表現型が発現する確率が高いことを示し、5以上であるが10未満のLR+値は所定の表現型が発現する確率が適度であることを示し、2以上であるが5未満の値は所定の表現型が発現する確率が低いことを示し、1以上であるが2未満の値は所与の表現型が発現する確率が最小であることを示す。

【0429】

図3～10は、分析した8つの表現型それぞれについてDNAチップを用いて得た遺伝子型のデータに基づく、所定の表現型の発現と関連するそれぞれの確率(疾患の予測)を示す。図3～7はクローン病と関連する表現型の発現に関する確率を示し、図8～10は潰瘍性大腸炎と関連する表現型の発現と関連する確率を示す。図11～13は、IBDに罹患した個体においてコルチコステロイド治療に対する耐性が発現する危険と関連する確率を示す。

【図面の簡単な説明】

【0430】

【図1】遺伝子型188G189Cの5名、遺伝子型188GA189CTの5名および遺伝子型188A1189Tの5名からなる15名の献血者の試験における比率1および2を表す図である(実施例2)。

【図2】CSFR1遺伝子中の遺伝的変異A2033Tにおける、遺伝子型AAの3名、遺伝子型ATの3名および遺伝子型TTの3名からなる9名の患者の試験における比率1および2を表す図である(実施例4)。

【図3】(実施例6)本発明に従うDNAチップで得られた遺伝子型データに基づく、分析した8つのIBD表現型それぞれについての判定された表現型の発現と関連するそれぞれの可能性(疾患予後診断)を示す図である(クローン病と関連する表現型の発現の可能性を示す図である)。

【図4】(実施例6)本発明に従うDNAチップで得られた遺伝子型データに基づく、分析した8つのIBD表現型それぞれについての判定された表現型の発現と関連するそれぞれの可能性(疾患予後診断)を示す図である(クローン病と関連する表現型の発現の可能性を示す図である)。

【図5】(実施例6)本発明に従うDNAチップで得られた遺伝子型データに基づく、分析した8つのIBD表現型それぞれについての判定された表現型の発現と関連するそれぞれの可能性(疾患予後診断)を示す図である(クローン病と関連する表現型の発現の可能性を示す図である)。

【図6】(実施例6)本発明に従うDNAチップで得られた遺伝子型データに基づく、分析した8つのIBD表現型それぞれについての判定された表現型の発現と関連するそれぞれの可能性(疾患予後診断)を示す図である(クローン病と関連する表現型の発現の可能性を示す図である)。

【図7】(実施例6)本発明に従うDNAチップで得られた遺伝子型データに基づく、分析した

10

20

30

40

50

8つのIBD表現型それぞれについての判定された表現型の発現と関連するそれぞれの可能性(疾患予後診断)を示す図である(クローリン病と関連する表現型の発現の可能性を示す図である)。

【図8】(実施例6)本発明に従うDNAチップで得られた遺伝子型データに基づく、分析した8つのIBD表現型それぞれについての判定された表現型の発現と関連するそれぞれの可能性(疾患予後診断)を示す図である(潰瘍性大腸炎と関連する表現型の発現と関連する可能性を示す図である)。

【図9】(実施例6)本発明に従うDNAチップで得られた遺伝子型データに基づく、分析した8つのIBD表現型それぞれについての判定された表現型の発現と関連するそれぞれの可能性(疾患予後診断)を示す図である(潰瘍性大腸炎と関連する表現型の発現と関連する可能性を示す図である)。

【図10】(実施例6)本発明に従うDNAチップで得られた遺伝子型データに基づく、分析した8つのIBD表現型それぞれについての判定された表現型の発現と関連するそれぞれの可能性(疾患予後診断)を示す図である(潰瘍性大腸炎と関連する表現型の発現と関連する可能性を示す図である)。

【図11】(実施例6)IBDに罹患した個体におけるコルチコステロイド治療に対する抵抗性が発現するリスクと関連する可能性を示す図である。

【図12】(実施例6)IBDに罹患した個体におけるコルチコステロイド治療に対する抵抗性が発現するリスクと関連する可能性を示す図である。

【図13】(実施例6)IBDに罹患した個体におけるコルチコステロイド治療に対する抵抗性が発現するリスクと関連する可能性を示す図である。

10

20

【図1】

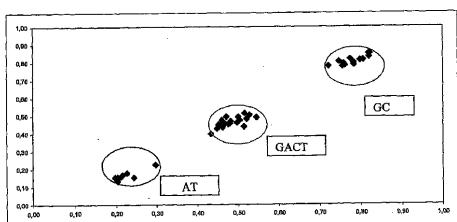


Figure 1

【図2】

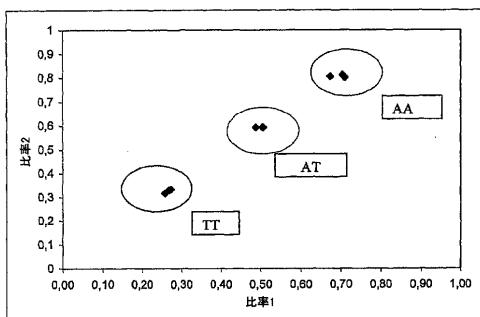


Figure 2

【図3】

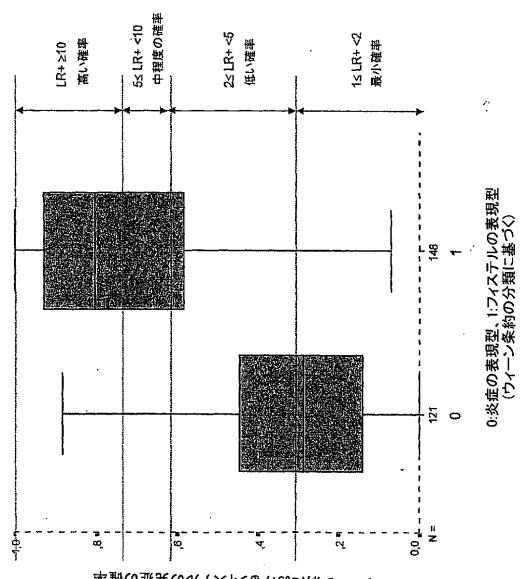


Figure 3

0:炎症の表現型、1:イヌルの表現型
(マイクロン染色の分類に基づく)

〔 図 4 〕

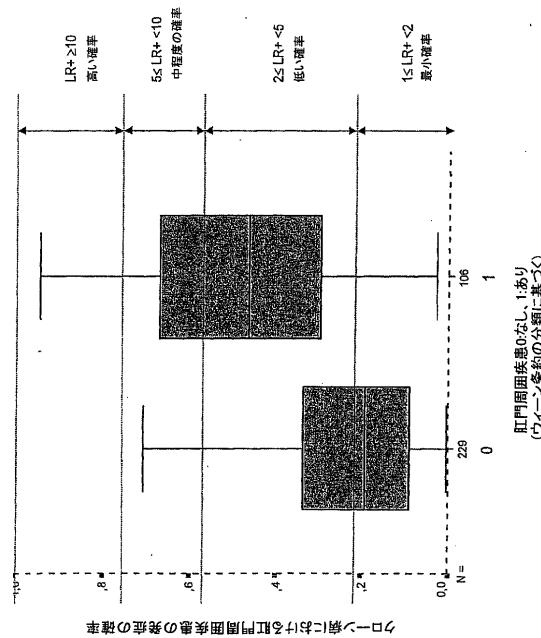


Figure 4

【 四 5 】

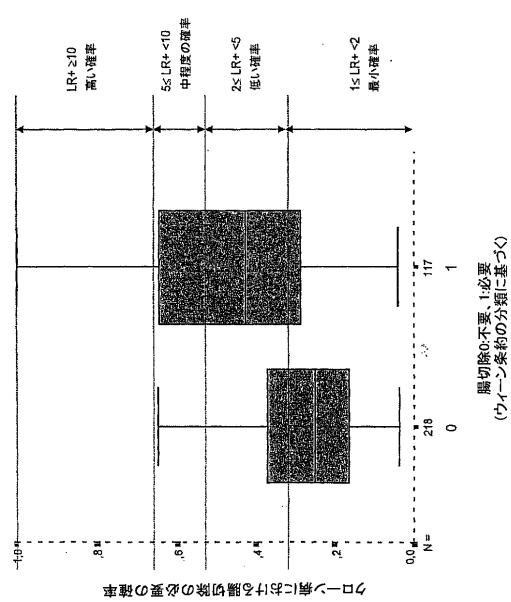


Figure 5

(义 6)

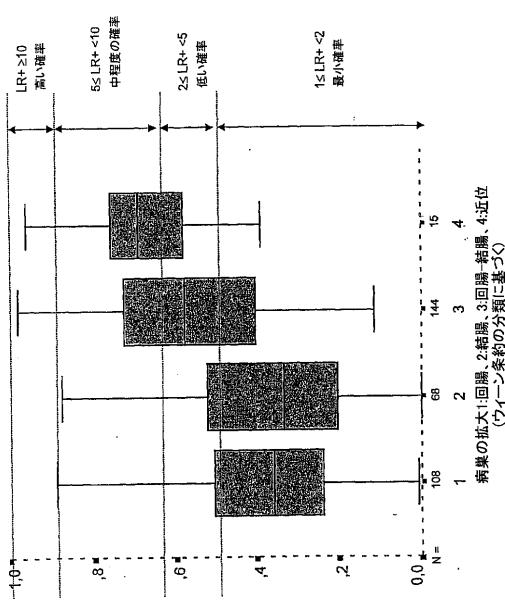


Figure 6

(义 7)

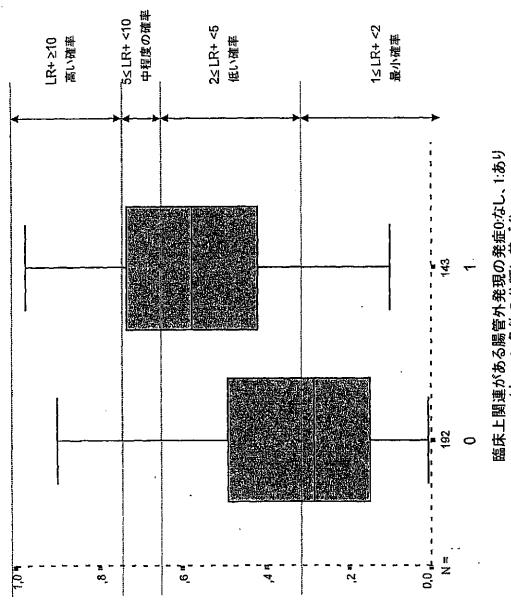
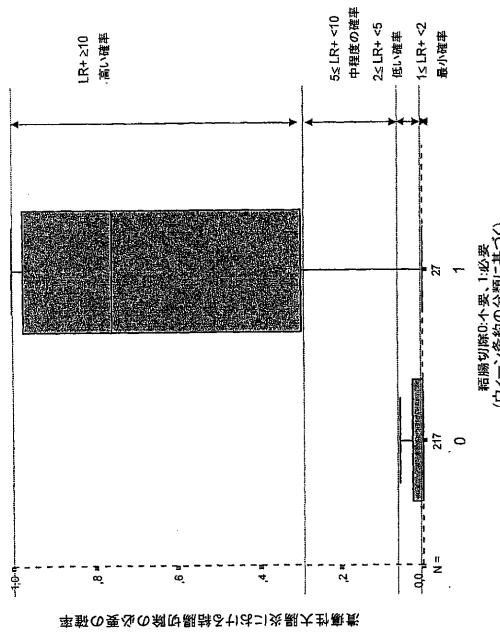
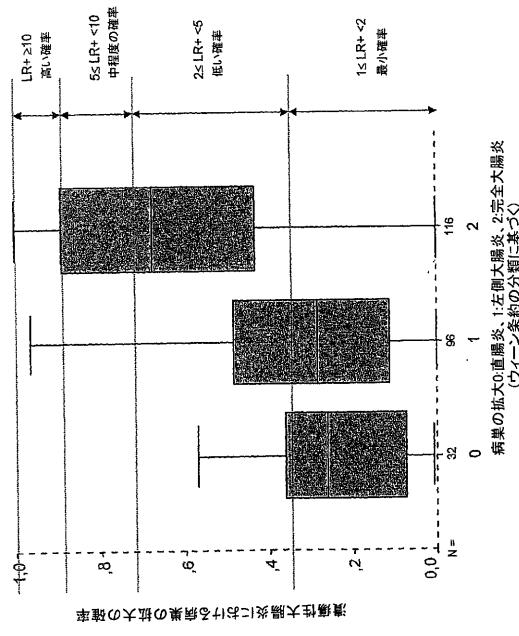


Figure 7

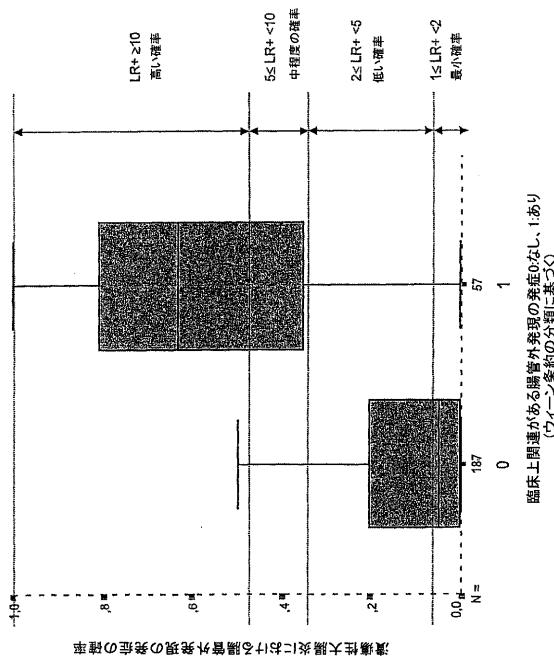
【図 8】



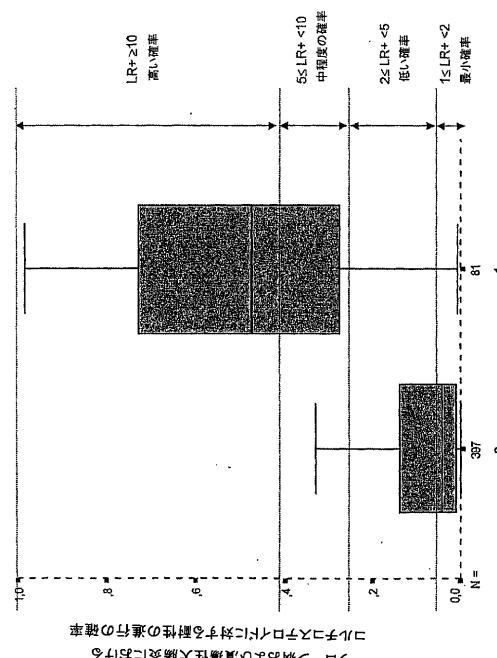
【図 9】



【図 10】



【図 11】



0:コルチコステロイドに対する耐性なし、1:コルチコステロイド耐性の進行

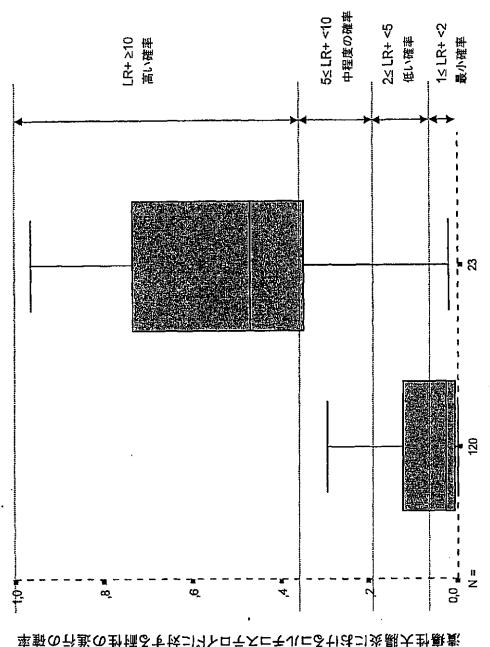
Figure 8

Figure 9

Figure 10

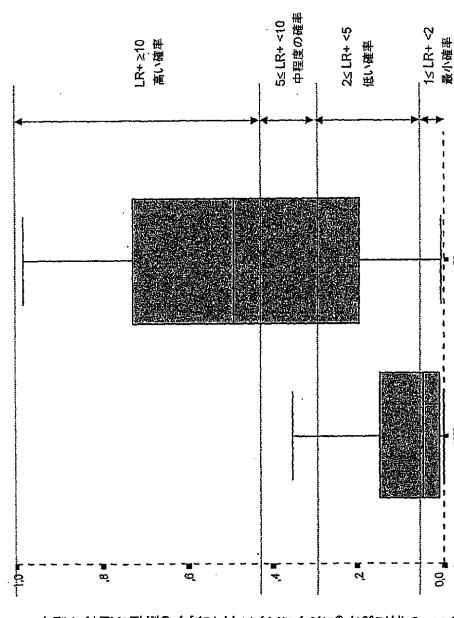
Figure 11

【図 1 2】



0:コルチコステロイドに対する耐性なし、1:コルチコステロイド耐性の進行

【図 1 3】



0:コルチコステロイドに対する耐性なし、1:コルチコステロイド耐性の進行

【配列表】

2008526249000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/IB2006/000796									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68											
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) C12Q											
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">KOZAL M.J. ET AL.: "EXTENSIVE POLYMORPHISMS OBSERVED IN HIV-1 CLADE B PROTEASE GENE USING HIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 2, no. 7, July 1996 (1996-07), pages 753-759, XP000941131 ISSN: 1078-8956 abstract; figure 3</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-40, 50-56, 79-91</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—/—</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;"></td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	KOZAL M.J. ET AL.: "EXTENSIVE POLYMORPHISMS OBSERVED IN HIV-1 CLADE B PROTEASE GENE USING HIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 2, no. 7, July 1996 (1996-07), pages 753-759, XP000941131 ISSN: 1078-8956 abstract; figure 3	1-40, 50-56, 79-91	—/—		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	KOZAL M.J. ET AL.: "EXTENSIVE POLYMORPHISMS OBSERVED IN HIV-1 CLADE B PROTEASE GENE USING HIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 2, no. 7, July 1996 (1996-07), pages 753-759, XP000941131 ISSN: 1078-8956 abstract; figure 3	1-40, 50-56, 79-91									
—/—											
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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											
Date of the actual completion of the international search 14 September 2006		Date of mailing of the international search report 04.01.2007									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Barz, Wolfgang									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2006/000796

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HACIA J.G. ET AL.: "DETECTION OF HETEROZYGOUS MUTATIONS IN BRCA1 USING HIGH DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS AND TWO-COLOUR FLUORESCENCE ANALYSIS" NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, vol. 14, no. 4, 1 December 1996 (1996-12-01), pages 441-447, XP000615885 ISSN: 1061-4036 abstract; figures 1,2	1-40, 50-56, 79-91
X	CHEE M. ET AL.: "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 274, 25 October 1996 (1996-10-25), pages 610-614, XP002022508 ISSN: 0036-8075 abstract; figure 1	1-40, 50-56, 79-91
X	SAPOLSKY R.J. ET AL.: "High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, US, vol. 14, no. 5-6, February 1999 (1999-02), pages 187-192, XP004158703 ISSN: 1050-3862 abstract; figure 2	1-40, 50-56, 79-91
X	CUTLER D.J. ET AL.: "High-throughput variation detection and genotyping using microarrays" GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, WOODBURY, NY, US, vol. 11, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 1913-1925, XP002311211 ISSN: 1088-9051 cited in the application abstract; figure 1	1-40, 50-56, 79-91
X	WO 01/29269 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 26 April 2001 (2001-04-26) the whole document	1-40, 50-56, 79-91
A	WO 00/58516 A (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH; AFFYMETRIX, INC) 5 October 2000 (2000-10-05) abstract	1-40, 50-56, 79-91

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2006/000796

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple Inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-40, 42-66, and 79-91

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2006/000796

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-40, 42-66, and 79-91

In vitro and computational genotyping methods, computer systems and programs for said methods, as well as diagnosis and treatment methods using said methods.

Invention 2: claims 41, 67-69, 72-78, and 92

Oligonucleotide primer having SEQ ID NO:1, oligonucleotide pairs and DNA chips comprising said primer, kits comprising said primer pairs or DNA chips.

Inventions 3-367: claims 41, 67-69, 72-78, and 92

Same as invention 2, but having a sequence selected from SEQ ID NO:s 2-254 or 1317-1428.

Invention 368: claims 41, 67, 70-78, and 92

Oligonucleotide probe having SEQ ID NO:255, probe pairs DNA chips comprising said probe, kits comprising said probe pairs or DNA chips, as well as sets comprising at least 4 of said probes.

Inventions 369-1653: claims 41, 67, 70-78, and 92

Same as invention 2, but having a sequence selected from SEQ ID NO:s 256-1316 and 1429-1652.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2006/000796

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0129269	A 26-04-2001	AU	784861 B2	06-07-2006
		AU	2468501 A	30-04-2001
		CA	2356207 A1	26-04-2001
		EP	1287162 A2	05-03-2003
WO 0058516	A 05-10-2000	CA	2366459 A1	05-10-2000
		EP	1165839 A2	02-01-2002
		JP	2002539849 T	26-11-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 4 0 B 30/02 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 4 0 B 30/02	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ラウレアーノ・シモン・ブエラ
スペイン・ヴィスカヤ・E - 4 8 1 6 0 ・デリオ・パルケ・テクノロジコ・デ・サムディオ・イバ
イサバル・ビデア・エディフィチオ・8 0 1 - A・2 a・プランタ・プロジェニカ・バイオファー
マ・エス・アー内
- (72)発明者 アントニオ・マルティネス・マルティネス
スペイン・ヴィスカヤ・E - 4 8 1 6 0 ・デリオ・パルケ・テクノロジコ・デ・サムディオ・イバ
イサバル・ビデア・エディフィチオ・8 0 1 - A・2 a・プランタ・プロジェニカ・バイオファー
マ・エス・アー内
- (72)発明者 ディエゴ・テヘドール・ヘルナンデス
スペイン・ヴィスカヤ・E - 4 8 1 6 0 ・デリオ・パルケ・テクノロジコ・デ・サムディオ・イバ
イサバル・ビデア・エディフィチオ・8 0 1 - A・2 a・プランタ・プロジェニカ・バイオファー
マ・エス・アー内
- (72)発明者 エリサ・ヒメネス・ウリベ
スペイン・ヴィスカヤ・E - 4 8 1 6 0 ・デリオ・パルケ・テクノロジコ・デ・サムディオ・イバ
イサバル・ビデア・エディフィチオ・8 0 1 - A・2 a・プランタ・プロジェニカ・バイオファー
マ・エス・アー内
- (72)発明者 モニカ・ロペス・マルティネス
スペイン・ヴィスカヤ・E - 4 8 1 6 0 ・デリオ・パルケ・テクノロジコ・デ・サムディオ・イバ
イサバル・ビデア・エディフィチオ・8 0 1 - A・2 a・プランタ・プロジェニカ・バイオファー
マ・エス・アー内
- (72)発明者 マルタ・アルティエダ・オセナルデ
スペイン・ヴィスカヤ・E - 4 8 1 6 0 ・デリオ・パルケ・テクノロジコ・デ・サムディオ・イバ
イサバル・ビデア・エディフィチオ・8 0 1 - A・2 a・プランタ・プロジェニカ・バイオファー
マ・エス・アー内
- (72)発明者 ロナ・ヘルナンデス・ガルシア
スペイン・ヴィスカヤ・E - 4 8 1 6 0 ・デリオ・パルケ・テクノロジコ・デ・サムディオ・イバ
イサバル・ビデア・エディフィチオ・8 0 1 - A・2 a・プランタ・プロジェニカ・バイオファー
マ・エス・アー内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA04 CA09 CA11 HA12 HA19

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QA12 QA17 QQ12 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25

QS34

4C084 AA16 NA14 ZA332 ZA682 ZA892 ZA962
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA68 ZA89 ZA96

专利名称(译)	用于invitro基因分型的方法和产品		
公开(公告)号	JP2008526249A	公开(公告)日	2008-07-24
申请号	JP2007550872	申请日	2006-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	项目尼卡生物制药上课啊		
申请(专利权)人(译)	Purojenika生物制药上课啊		
[标]发明人	ラウレアーノ・シモン・ブエラ アントニオ・マルティネス・マルティネス ディエゴ・テヘドール・ヘルナンデス エリサ・ヒメネス・ウリベ モニカ・ロペス・マルティネス マルタ・アルティエダ・オセナルデ ロレナ・ヘルナンデス・ガルシア		
发明人	ラウレアーノ・シモン・ブエラ アントニオ・マルティネス・マルティネス ディエゴ・テヘドール・ヘルナンデス エリサ・ヒメネス・ウリベ モニカ・ロペス・マルティネス マルタ・アルティエダ・オセナルデ ロレナ・ヘルナンデス・ガルシア		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12M1/00 A61K31/711 A61K45/00 A61P1/04 A61P17/00 A61P27/02 A61P19/02 G01N33/53 G01N37/00 C40B30/02		
CPC分类号	A61P1/04 A61P17/00 A61P19/02 A61P27/02 C12Q1/6837 C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q1/6888 C12Q2600/156 C12Q2600/16 Y02A90/26		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12N15/00.F C12M1/00.A A61K31/711 A61K45/00 A61P1/04 A61P17/00 A61P27/02 A61P19/02 G01N33/53.M G01N37/00.102 C40B30/02		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA12 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA12 4B063/QA17 4B063/QQ12 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA16 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA682 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA33 4C086/ZA68 4C086/ZA89 4C086/ZA96		
代理人(译)	渡边 隆 村山彥		
优先权	2005000089 2005-01-13 ES 2005002423 2005-10-05 ES 60/758192 2006-01-12 US		
其他公开文献	JP2008526249A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于对个体的遗传变异进行基因分型的体外方法，以及用于该方法的产品。

