

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年4月28日(28.04.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/085530 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/40 (2006.01) *C12Q 1/37* (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01) *C12Q 1/6806* (2018.01)
C12N 15/45 (2006.01) *C12Q 1/686* (2018.01)
C12N 15/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/037851

(22) 国際出願日: 2021年10月13日(13.10.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2020-175466 2020年10月19日(19.10.2020) JP

(71) 出願人: 東洋紡株式会社(Toyobo Co., Ltd.)
[JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜
二丁目2番8号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 川嶋 洋介 (KAWASHIMA Yosuke);
〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24
号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 上倉 佳子
(UEKURA Yoshiko); 〒9148550 福井県敦賀市
東洋町10番24号 東洋紡株式会社内 Fukui
(JP). 前野 光生(MAENO Mitsuo); 〒5308230 大
阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 東洋紡
株式会社内 Osaka (JP). 杉山 明生(SUGIYAMA
Akio); 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜二丁
目2番8号 東洋紡株式会社内 Osaka (JP). 鈴
木 広道(SUZUKI Hiromichi); 〒3050031 茨城県
つくば市我妻三丁目1番1号 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

(54) **Title:** PRETREATMENT METHOD FOR PREPARING SAMPLE TO BE SUPPLIED FOR METHOD FOR DETECTING FOREIGN NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 外来性核酸を検出する方法に供する試料の調製のための前処理方法

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a simple method for preparing a sample to be supplied for a method for detecting foreign nucleic acid. The present invention provides a pretreatment method for a sample to be supplied for a method for detecting foreign nucleic acid, the method comprising: (A) a step for preparing a mixture solution containing a sample and a serine protease; (B) a step for causing an enzymatic reaction by the serine protease in the mixture solution prepared in step (A); (C) a step for heating the mixture solution in which the enzymatic reaction has taken place in step (B); and (D) a step for mixing an alkaline solution and the mixture solution that has undergone the heating in step (C).

(57) 要約: 外来性核酸の検出方法に供する試料の簡便な調製方法を提供することを目的とする。本発明は、(A) 試料とセリンプロテアーゼを含む混合液を調製する工程、(B) 前記工程(A)で調製した混合液においてセリンプロテアーゼによる酵素反応を行う工程、(C) 前記工程(B)で酵素反応を行った混合液を加熱する工程、及び(D) 前記工程(C)で加熱処理を行った混合液とアルカリ性溶液とを混合する工程を含む、外来性核酸を検出する方法に供される試料の前処理方法を提供する。



WO 2022/085530 A1

明 細 書

発明の名称：

外来性核酸を検出する方法に供する試料の調製のための前処理方法

技術分野

[0001] 本発明は、外来性核酸を検出する方法に供する試料の調製のための前処理方法に関する。より具体的には、検体試料から迅速、簡便に核酸を抽出し、核酸増幅法に供するのに適した試料を調製するための方法及び当該試料を用いた核酸検出方法等に関する。

背景技術

[0002] 生体試料に含まれる微生物を検出することは臨床診断などにおいて重要である。そこで、生体試料中の核酸をPCR等で増幅し、増幅した核酸を検出し、微生物を特定する方法が行われている。しかし、生体試料中には核酸のほかに様々な生体由来物質が含まれているため、生体試料を精製することなく核酸増幅を実行すると増幅阻害や検出阻害が生じ、ほとんどの場合、正しい測定結果が得られない。そこで、生体試料中に含まれる微生物を検出する際に、生体試料をそのまま検出に供するのではなく、生体試料に前処理を加えることが一般的である。

[0003] 前処理としては、例えば核酸以外の成分をほぼ除去できる核酸精製が行われている（特許文献1）。しかしながら、核酸精製は、操作が非常に複雑、操作時間が長い、有機溶媒を使用する、試薬コストが高いという課題があった。

[0004] また、別の前処理としてタンパク質分解酵素であるプロテイナーゼKを用いて生体試料中の夾雑物を分解させる方法も用いられている。プロテイナーゼKは一部の界面活性剤の存在下では酵素活性が向上することが知られている（非特許文献1）。また、界面活性剤自身にもタンパク質や脂質などの生体成分を溶解する作用があるため、プロテイナーゼKと界面活性剤を併用して試料を処理する方法も知られている（非特許文献2）。また、界面活性剤

の代わりにカオトロピック塩あるいは尿素のようなタンパク質変性剤を使用する方法も存在する（特許文献2）。

[0005] しかしながら、前記のような方法で前処理が行われた試料を分析に用いる場合に、残存した界面活性剤やタンパク質変性剤が分析結果に影響を及ぼす懸念がある。とりわけPCR等の核酸増幅法においては、多量の界面活性剤やタンパク質変性剤がDNAポリメラーゼを変性させ、核酸増幅を著しく阻害しうる。また、酵素活性を有したプロテイナーゼKが前処理後の試料中に多量に残存した場合には、試料と核酸増幅試薬とを混合した際にプロテイナーゼKの働きによって核酸増幅試薬中のDNAポリメラーゼが分解され、核酸増幅を著しく阻害しうることを懸念される。

[0006] 以上から、煩雑な操作を行わず、かつ安定的な核酸増幅を可能にする、更なる有用な試料の前処理法の開発が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2016-67291号公報

特許文献2：特開2020-65459号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：非イオン界面活性剤によるプロテアーゼの活性上昇の速度論的研究 小ノ澤 他 日本家政学会誌 1990 Vol. 41 No. 11
1061～1070

非特許文献2：A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. in Bovine Semen. Masri et al. Can J Vet Res 1997 61 15～20

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、かかる従来技術の課題を背景になされたものである。すなわち

、本発明の目的は、特定のタンパク質分解酵素を用いた簡便な前処理法によって安定的に核酸増幅が可能な試料を調製する方法の提供である。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者等は鋭意研究の結果、セリンプロテアーゼによる処理後に加熱を行い、その後アルカリ性溶液を添加する工程を加えることで、核酸増幅法に適した分析用試料の提供が可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。即ち、本発明の概要は以下の通りである。

[0011] [項1] 以下の工程（A）～（D）を含む、外来性核酸を検出する方法に供される試料の前処理方法：

（A）試料とセリンプロテアーゼとを含む混合液を調製する工程、

（B）前記工程（A）で調製した混合液においてセリンプロテアーゼによる酵素反応を行う工程、

（C）前記工程（B）で酵素反応を行った混合液を加熱する工程、及び

（D）前記工程（C）で加熱処理を行った混合液とアルカリ性溶液とを混合する工程。

[項2] 前記工程（A）で用いられる試料が、生体試料であるか、又は、生体試料と水、生理食塩水、液体培地、及び緩衝液からなる群より選択される少なくとも1種の溶媒との混合物である、項1に記載の方法。

[項3] 前記生体試料がヒト由来の生体試料である、項2に記載の方法。

[項4] 前記緩衝液が、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、ハンクス液、及びグッドバッファーからなる群より選択される少なくとも1種である、項2または3に記載の方法。

[項5] 前記工程（B）における酵素反応が、前記混合液を50～70℃で1～10分間反応させることにより行われる、項1～4のいずれかに記載の方法。

[項6] 前記工程（C）における加熱が、90～100℃で1～10分間の加熱処理である、項1～5のいずれかに記載の方法。

〔項 7〕 前記工程（C）の加熱処理を行った混合液を、工程（B）における反応温度よりも低い温度まで冷却してから工程（D）を行う、項 1～6 のいずれかに記載の方法。

〔項 8〕 前記セリンプロテアーゼがプロティナーゼ K である、項 1～7 のいずれかに記載の方法。

〔項 9〕 前記工程（D）において、アルカリ性溶液を添加後の混合液中のアルカリ濃度が 1～30 mM である、項 1～8 のいずれかに記載の方法。

〔項 10〕 前記アルカリ性溶液が水酸化カリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化リチウム水溶液、水酸化マグネシウム水溶液、水酸化カルシウム水溶液、水酸化バリウム水溶液、炭酸カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、炭酸マグネシウム水溶液、及び炭酸カルシウム水溶液からなる群より選択される少なくとも 1 種である、項 1～9 のいずれかに記載の方法。

〔項 11〕 前記工程（A）において、試料 1 μ L に対してセリンプロテアーゼが 1 μ g～4 μ g となる比率で混合する、項 1～10 のいずれかに記載の方法。

〔項 12〕 前記工程（A）において、試料 1 μ L に対してセリンプロテアーゼが 0.03 U～0.12 U となる比率で混合する、項 1～11 のいずれかに記載の方法。

〔項 13〕 前記外来性核酸が、エンベロープ型ウイルスの核酸である、項 1～12 のいずれかに記載の方法。

〔項 14〕 前記エンベロープ型ウイルスが、コロナウイルス科ウイルス、オルトミクソウイルス科ウイルス、フラビウイルス科ウイルス、トガウイルス科ウイルス、ブニヤウイルス科ウイルス、パラミクソウイルス科ウイルス、及びフィロウイルス科ウイルスからなる群より選択される少なくとも 1 種である項 13 に記載の方法。

〔項 15〕 項 1～14 のいずれかに記載の前処理方法を行った試料を核酸増幅用試薬と混合し、試料に含まれる外来性核酸の増幅を行う工程を包

含する、試料中の外来性核酸の検出方法。

[項 1 6] 増幅された核酸を検出する工程を更に包含する、項 1 5 に記載の方法。

[項 1 7] 前記検出工程が融解曲線解析によって行われる、項 1 6 に記載の方法。

[項 1 8] セリンプロテアーゼ及びアルカリ性溶液を含む、項 1 ～ 1 4 のいずれかに記載の前処理方法を行うためのキット。

[項 1 9] 核酸増幅用試薬を含む、項 1 5 ～ 1 8 のいずれかに記載の試料中の外来性核酸の検出方法を行うためのキット。

発明の効果

[0012] 本発明により、核酸検出法に適した試料を簡便に調製することが可能になる。調製された試料は、更なる核酸精製処理を行わずに、直接核酸増幅に供されてもよく、試料中の外来性核酸が良好な感度で増幅され検出され得る。本発明は例えば、生体試料中に含まれる細菌やウイルス等の微生物の外来性核酸を検出するために用いる生体試料の前処理方法として好適である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例 1 における融解曲線解析の結果を示す図である（No. 1 の結果）。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の実施形態を示しつつ、本発明についてさらに詳説するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、本明細書中に記載された非特許文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。また本明細書中の「～」は「以上、以下」を意味し、例えば明細書中で「X～Y」と記載されていれば「X以上、Y以下」を示す。また本明細書中の「及び／又は」は、いずれか一方または両方を意味する。

[0015] [試料の前処理方法]

本発明の実施態様の一つは、外来性核酸を検出する方法に供される試料を前処理する方法である。本発明の方法は、少なくとも以下の工程（A）～（

D) を含むことを特徴とする。

(A) 試料とセリンプロテアーゼを含む混合液を調製する工程、

(B) 前記工程 (A) で調製した混合液においてセリンプロテアーゼによる酵素反応を行う工程、

(C) 前記工程 (B) で酵素反応を行った混合液を加熱する工程、及び

(D) 前記工程 (C) で加熱処理を行った混合液とアルカリ性溶液とを混合する工程。

[0016] [試料]

前記工程 (A) における試料とは、外来性核酸の有無を確認することが望まれる任意の試料であり得る。例えば、生体試料、環境試料等であり得るがこれらに限定されない。好ましくは、生体試料である。生体試料は、生体から採取した試料をそのまま用いてもよいし、生体試料と生体試料と水（例えば、精製水、蒸留水、イオン交換水、純水等）、生理食塩水、液体培地、及び緩衝液からなる群より選択される少なくとも 1 種の溶媒との懸濁液又は溶解液等の混合物（例えば、生体試料と精製水の混合物、生体試料と生理食塩水の混合物、生体試料と液体培地の混合物、生体試料と緩衝液の混合物等）も生体試料として用いることができる。

[0017] 本明細書において生体試料は、生体由来の試料であれば特に限定されないが、例えば動植物組織、体液、排泄物、細胞が挙げられる。より具体的には、口腔内擦過物、咽頭拭い液、鼻腔拭い液、鼻咽頭拭い液、鼻腔吸引液、喀痰、気管支洗浄液、肺胞洗浄液、直腸拭い液、膣分泌物、子宮頸管粘液、尿道擦過物、便懸濁液、血液、血漿、血清、血液培養液、尿、唾液、羊水、膿、髄液、胸水、組織切片、皮膚、吐瀉物、糞便、鼓膜切開液、胃洗浄液、腸洗浄液、臓器抽出液、組織抽出液分離培養コロニー、カテーテル洗浄液などが挙げられ、1 種単独又は 2 種以上組み合わせて使用できる。好ましい生体試料又はその懸濁液若しくは溶解液は、口腔内擦過物、咽頭拭い液、鼻腔拭い液、鼻咽頭拭い液、鼻腔吸引液、喀痰、唾液、気管支洗浄液、及び肺胞洗浄液からなる群から選択される少なくとも 1 種である。

- [0018] また、生体試料は、例えばヒト又は非ヒト動物由来の試料である。非ヒト動物としては非ヒト哺乳動物が挙げられ、例えばイヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギなどであり、好ましくはイヌ、ネコなどである。好ましくはヒト由来の試料である。
- [0019] 生体からの試料の採取方法は、特に制限されず、試料の種類、大きさ、目的に応じて公知の方法を用いることができる。例えば綿棒、スワブ、白金耳、スポイト、へら、さじなどの採取具を用いた採取方法である。
- [0020] 生体から生体試料を採取後、生体試料が直ちに劣化する場合、採取後検出までに長時間を要する場合などには、採取した生体試料を、例えば生体由来物を希釈、保存等する目的で、液体に混合し、懸濁物などの液状形態とすることもできる。本発明においては生体試料と水（例えば、精製水、蒸留水、イオン交換水、純水等）、生理食塩水、液体培地、及び緩衝液からなる群より選択される少なくとも1種の溶媒との懸濁液又は溶解液等の混合物も、前記工程（A）における試料として用いられる。
- [0021] 前記液体培地とは、液体状の培地であれば特に制限されない。一例を挙げるとLB培地、ブイヨン培地、最少培地、ウイルス輸送液（VTM）、汎用輸送培地（UTM）、アミーズ培地、キャリア・ブレア培地、スチュアート培地、DMEM、MEM、またはこれら液体培地の改良品が挙げられる。
- [0022] 前記緩衝液とは、緩衝能を有する液体であれば特に制限されず、生化学や分子生物学の分野で一般的に緩衝液として用いられるものであれば、本発明において緩衝液として用いることができる。前記緩衝液は好ましくは、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、ハンクス液、グッドバッファーである。
- [0023] また、試料を本発明の工程（A）に供する前に、簡単な操作を加えることは本発明の範囲内である。簡単な操作としては、生体試料を遠心して夾雑物を沈降させ、上清のみを回収して本発明の前処理法に供する試料とすること、あるいは生体試料を遠心して下層または沈殿のみを残すことで試料成分や試料に含まれる細菌やウイルス等を濃縮させたものを、本発明の前処理法に

供する試料とすること、生体試料と前記液体培地および／または前記緩衝液と混合後に遠心を行い上清あるいは下層または沈殿を回収し、本発明の前処理法に供する試料とすること、などが例示されるが、これらに限定されない。

[0024] 本発明において用いられるセリンプロテアーゼは、活性中心にセリン残基を有するものとして周知のタンパク質分解酵素である。セリンプロテアーゼは、サブチリシン様セリンプロテアーゼ、キモトリプシン様セリンプロテアーゼ等に分類され、そのいずれも本発明に用いられ得るが、好ましくはサブチリシン様セリンプロテアーゼである。サブチリシン様セリンプロテアーゼとしては、例えば、プロテイナーゼKを好ましい例として挙げることができるが、これに限定されない。

[0025] 本発明において用いられるプロテイナーゼKとは *Tritirachium album* (*Engyodontium album*) に由来するセリンプロテアーゼである。本発明で用いるプロテイナーゼKは、*Tritirachium album* から直接抽出されたものであってもよいし、あるいは遺伝子組換え技術を用いて産生させたもの（例えば、同一の宿主細胞又は別の宿主細胞から組換え発現させて得たもの）であってもよい。本発明において用いられるプロテイナーゼKの性状も特に限定されず、液体、固体のいずれも使用可能である。好ましくは液状に調製されたプロテイナーゼKである。なお、本明細書において、プロテイナーゼKは、プロテアーゼK、Proteinase K または PK とも互換可能に表記されうる。

[0026] 本発明における工程（A）は前記試料とセリンプロテアーゼを混合する工程である。本工程により前記試料とセリンプロテアーゼとの混合液が調製される。本発明において用いられるセリンプロテアーゼの量は、本発明の効果を奏し得る限り特に限定されない。一つの実施形態において、好ましくは、工程（A）のセリンプロテアーゼ（例えば、プロテイナーゼK）の試料に対する割合は、試料 1 μL に対してセリンプロテアーゼが 0.01 μg ~ 15 μg となる比率で混合するのがよく、さらに好ましくは 0.1 μg ~ 10 μg

gとなる比率で混合するのがよく、より好ましくはセリンプロテアーゼが1 μg ~ 4 μg となる比率で混合するのがよい。更に他の実施形態において、好ましくは、工程（A）のセリンプロテアーゼ（例えば、プロテイナーゼK）の試料に対する割合は、試料1 μL に対してセリンプロテアーゼが0.015 U ~ 0.3 Uとなる比率で混合するのがよく、より好ましくはセリンプロテアーゼが0.03 U ~ 0.12 Uの割合であるとなる比率で混合するのがよい。工程（A）において、このような比率で混合することにより、より高感度な核酸検出が可能となる分析用試料を調製することが可能となる。

[0027] 本発明においては、工程（A）を終えた後、工程（B）を開始する前に、試料とセリンプロテアーゼとの混合液を遠心し上清を回収する作業を追加してもよい。例えば混合液中に固形物がある場合、該作業により液性部分のみを回収し、回収した液体（混合液）の一部または全部を工程（B）に提供することができる。

[0028] 前記の通り、従来、プロテイナーゼKを用いたタンパク質分解工程においてはしばしば界面活性剤やカオトロピック塩あるいは尿素と併用することで、試料の処理効率を高める試みがなされていた。一方、本発明の試料処理法においては、試料の処理効率を高める目的での界面活性剤、カオトロピック塩、尿素の併用は必ずしも行わなくてよいというメリットがある。しかしながら、セリンプロテアーゼ（プロテイナーゼK）を保管もしくは安定化する目的で少量の界面活性剤を含むセリンプロテアーゼ溶液を使用しても、本発明の範囲内である。

[0029] 本発明における工程（B）は、セリンプロテアーゼによる酵素反応を行う工程である。本工程により、試料中のタンパク質の一部又は全部をセリンプロテアーゼにより分解する。この工程は通常、使用するセリンプロテアーゼが活性を発揮する温度に加温することで実施される。例えば、セリンプロテアーゼとしてプロテイナーゼKを使用する場合、本工程で加温する際の温度はプロテイナーゼKが酵素活性を発揮しうる温度であれば特に制限されず、例えば、25 ~ 75℃であり、好ましくは37 ~ 75℃であり、より好まし

くは50～70℃であり、さらに好ましくは55～65℃である。該温度に加温する時間は特に制限されないが、好ましくは1～15分間であり、より好ましくは1～10分間であり、さらに好ましくは3～10分間である。また、工程（B）において加温を伴う場合、その温度は必ずしも特定の温度で固定する必要はなく、セリンプロテアーゼが活性を発揮する温度の範囲内であれば変化させてもよい。

[0030] 本発明における工程（C）は、前記工程（B）で酵素反応を行った混合液を加熱する工程である。本工程で加熱することにより、セリンプロテアーゼの一部または全部が失活すること、その他試料中に含まれていた核酸分解酵素やたんぱく質分解酵素の一部または全部が失活すること、試料中の微生物やウイルス等の一部または全部が死滅することが期待される。ただし、本工程では全てのタンパク質、微生物やウイルス等が死滅する必要はなく、本工程において酵素の失活や微生物等の死滅が発生するかどうかを計測することは要求されない。本工程における加熱温度は、工程（B）にて混合液が晒される温度よりも高温であれば特に制限されないが、好ましくは80～100℃であり、より好ましくは90～100℃であり、さらに好ましくは95～100℃である。加熱する時間は特に制限されないが、好ましくは1～15分間であり、より好ましくは1～10分間であり、さらに好ましくは3～10分間である。また、工程（C）における加熱の温度は必ずしも特定の温度で固定する必要はなく、変化させてもよい。

[0031] 本発明においては、工程（C）を終えた後で前記混合液を冷却する工程を追加してもよい。冷却する温度は特に制限されないが、工程（B）において加温を行う場合は該加温温度未満に冷却することが望ましい。例えば、55℃より低い温度まで、好ましくは50℃より低い温度まで、より好ましくは37℃より低い温度まで、更に好ましくは25℃より低い温度まで冷却することが好ましい。ここで冷却する時間は特に限定されず、例えば、1～15分間、好ましくは1～10分間、より好ましくは3～10分間であり得る。なお、本工程を終えた後の試料の温度を計測する必要はなく、工程（B）に

おける加温温度よりも低い温度まで低下したと触覚的に又は経験的に判断できる程度でよい。本工程の冷却方法は特に制限されず、室温での静置、冷蔵庫あるいは冷凍庫での静置、氷上での静置、インキュベーターやウォーターバス等の変温装置を用いた冷却、およびこれらの類似の任意の方法で可能である。

[0032] 本明細書における工程（D）で用いられるアルカリ性溶液はアルカリ性の溶液であれば特に限定されない。アルカリ性溶液としては、例えば水酸化カリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化リチウム水溶液、水酸化マグネシウム水溶液、水酸化カルシウム水溶液、水酸化バリウム水溶液、炭酸カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、炭酸マグネシウム水溶液、炭酸カルシウム水溶液などが挙げられ、1種単独又は2種以上組み合わせて使用できる。本発明の効果がより確実に得られ易いという観点から、好ましいアルカリ性溶液は、水酸化カリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、及び水酸化リチウム水溶液からなる群より選択される少なくとも1種である。より好ましいアルカリ性溶液は、水酸化カリウム水溶液及び／又は水酸化ナトリウム水溶液である。

[0033] 本明細書において、アルカリ濃度は体積モル濃度（M又はmol/L）であり、アルカリ性溶液1L中に含まれるアルカリ性物質（例えば、上記のような水酸化カリウム及び／又は水酸化ナトリウムなどのアルカリ性物質の総量）のモル量で規定できる。

[0034] 本発明における工程（D）において、アルカリ性溶液を添加後の混合液中のアルカリ濃度は、本発明の効果を奏する限り特に限定されない。より一層高い効果を得られ易いという観点から、工程（D）におけるアルカリ性溶液添加後の混合液中のアルカリ濃度は、例えば、0.1～50mMであるのがよく、好ましくは、0.5～40mM、より好ましくは1～30mM、さらに好ましくは5～30mM、さらにより好ましくは10～30mM、なかでも好ましくは15～30mM、特に好ましくは20～30mMであるのがよい。

- [0035] 工程（D）においてアルカリ性溶液を混合する方法は特に限定されず、工程（A）～（C）を経た試料とセリンプロテアーゼの混合液が入った容器にアルカリ性溶液をマイクロピペット等で添加してもよいし、あらかじめ別の容器にアルカリ性溶液を分注しておき、そこに前記混合液を加えてもよく、これらの添加順序は問わない。またアルカリ性溶液を添加した後で攪拌を行ってもよい。攪拌を行う場合は、混合液とアルカリ性溶液とを十分に混和できる限り、その方法は特に制限されず、転倒攪拌、ボルテックスミキサーによる攪拌などが可能である。攪拌強度や時間等の攪拌条件は技術常識に基づいて、当業者が適宜設定できる。
- [0036] 本発明の実施態様の一つは、前記工程（A）～（D）を含む方法で前処理された試料を分析用試料として核酸増幅用試薬と混合し、試料に含まれる外来性核酸の増幅を行う工程を包含する、試料中の外来性核酸の検出方法である。
- [0037] 本明細書において、「核酸増幅用試薬と混合し」とは、工程（D）を終えた後で、カラムによる核酸精製や有機溶媒による夾雑物の除去など、前処理された試料から核酸をさらに分離精製する工程を行わずに核酸増幅用試薬と混合することを指す。ただし、前処理された試料の一部を核酸増幅試薬と混合するために必要な量だけ別のチューブに移すなどの核酸の分離精製を伴わない工程は行ってもよく、この工程を含む態様も本発明の範囲内である。
- [0038] 前記外来性核酸とは、試料に由来しない任意の核酸であって、試料中に通常含まれるかどうか不明な外来性由来の核酸を指す。具体的には、試料が生体試料である場合は、その生体試料の由来となる生物種以外に由来する核酸である。例えば、生体試料がヒト由来であれば、ヒト以外の生物種の核酸を外来性核酸と称する。外来性核酸の由来については特に制限されず、例えば、細菌、ウイルス、ファージ、真菌、寄生虫、アメーバなどが挙げられる。より好ましくは細菌、ウイルスであり、さらに好ましくはウイルスである。本発明は、このような外来性核酸の検出に好適であり、本発明の方法により外来性核酸が検出された場合、それは試料中に外来性核酸の由来となる生

物あるいは核酸そのものが含まれていたことを意味し得る。

[0039] 本発明は、任意の外来性核酸の検出において用いられ得るが、好ましくはウイルス、なかでもエンベロープ型ウイルスの検出に好適である。エンベロープ型ウイルスは、脂質二重層で構成されるエンベロープにゲノム核酸が内包されたウイルスである。エンベロープ型ウイルスとしては、例えば、コロナウイルス科ウイルス（例えば、SARSコロナウイルス、MERSコロナウイルス、SARS-CoV-2コロナウイルス）；オルトミクソウイルス科ウイルス（例えば、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、C型インフルエンザウイルス）；フラビウイルス科ウイルス（例えば、C型肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ジカウイルス、豚熱ウイルス）；トガウイルス科ウイルス（例えば、風疹ウイルス、チクングニアウイルス）；ラブドウイルス科ウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）；ブニヤウイルス科ウイルス（例えば、クリミヤ・コンゴ熱ウイルス、ハンタウイルス）；パラミクソウイルス科ウイルス（例えば、麻疹ウイルス、ヒトRSウイルス）；フィロウイルス科ウイルス（例えば、エボラウイルス）、などが挙げられるが、特に限定されない。感度良好な検出が得られ易いという観点から、本発明は、好ましくは、コロナウイルス科ウイルス又はオルトミクソウイルス科ウイルスの検出であり、より好ましくはSARSコロナウイルス、MERSコロナウイルス、SARS-CoV-2コロナウイルス、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、C型インフルエンザウイルスの検出において有用である。

[0040] 前記方法において核酸の増幅に用いられる方法は公知の核酸増幅法を用いることができる。そのような核酸増幅法としてはPCR法、LAMP法、LCR法、TMA法、SDA法、RT-PCR法、RT-LAMP法、NASBA法、TRC法、TMA法等が挙げられる。これらの技術は既に当該技術分野において確立されており、目的に合わせて方法を選択することができる。より確実に高い効果が得られ易いという観点から、本発明で行う核酸増幅法はPCR法（RT-PCR法を含む）が好ましいが、これに限定されない

。

[0041] 前記方法に用いられる核酸増幅用試薬は、核酸増幅に必要な成分が入った試薬であれば内容物は特に制限されない。内容物としては通常、DNAポリメラーゼ、核酸プライマー、dNTPs、マグネシウムイオン等が含まれる。他には、対象となる核酸の種類や検出法等に応じて、増幅された核酸の検出に必要な核酸プローブまたはインターカレーター、逆転写酵素、各種の添加剤、緩衝液等を含むことも好ましい。また、核酸増幅用試薬は一つまたは複数の構成成分ごとに分割して封入された形状で提供されてもよく、その場合は二つ以上の試薬と前記分析用試料とを混合する形で用いられる。

[0042] 本発明において前記核酸増幅用試薬の形状は特に制限されないが、好ましくは液状の核酸増幅用試薬である。

[0043] 本発明の実施態様の一つは、前記核酸の検出方法が、核酸増幅の後で増幅された核酸を検出する工程をさらに包含する方法である。

[0044] この検出する工程の態様は特に限定されず、当該分野で公知の任意の方法で実施することができる。より確実に高い効果が得られ易いという観点から、本発明では、リアルタイムPCR法（リアルタイムRT-PCR法を含む）による検出または融解曲線解析法が好ましい。また、検出においては核酸増幅産物を特異的に検出可能な核酸プローブを使用することが好ましい。

[0045] 一つの実施形態において、融解曲線解析では、例えば、グアニンとの相互作用により消光する蛍光消光色素で標識されたプローブ（グアニン消光プローブともいう）を用いることが好ましい。このような蛍光消光色素としては、例えば、4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸（BODIPY-FL）、カルボキシローダミン6G、TAMRA、ローダミン6G、テトラブロモスルホンフルオレセイン（TBSF）、及び2-オキソ-6,8-ジフルオロ-7-ジヒドロキシー-2H-1-ベンゾピラン-3-カルボン酸（Paciflic Blue）等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0046] 別の実施形態において、リアルタイムPCR法（リアルタイムRT-PCR

R法を含む)により検出する場合は、一方の末端を蛍光物質で標識し、他方の末端を消光物質で標識したプローブを用いることが好ましい。このような蛍光物質としては、例えば、ローダミン系化合物；フルオロセイン系化合物（例えば、FAM（カルボキシフルオレセイン）等が挙げられ、また消光物質としては、例えば、BHQ1（BHQ：Black Hole Quencher（登録商標））、BHQ2、BHQ3等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0047] 本発明の更なる実施形態は、前記工程（A）～（D）を含む外来性核酸を検出する方法に供される試料の前処理方法を行うためのキットである。本キットは、前記工程（A）～（D）を実施する際に使用する試薬の一部又は全部を含むものであり、例えば、セリンプロテアーゼ及び／又はアルカリ性溶液を含むものであり、その両方を含むことが特に好ましい。

[0048] 本発明の別の実施態様は、前記（A）～（D）の工程を経て前処理が行われた試料を分析用試料として核酸増幅用試薬と混合して核酸増幅を行うための核酸増幅用試薬を含む、試料中の外来性核酸の検出方法を行うためのキットである。前記キットは前記核酸増幅用試薬を含むキットであれば構成物は特に制限されない。例えば、核酸増幅用試薬中にさらに増幅された核酸を検出するために必要な成分を含んでもよい。

[0049] 更に別の実施態様は、前記工程（A）～（D）を含む前処理方法と、それにより得られた分析用試料を用いて試料中の外来性核酸の検出を行う方法の両方に用いるためのキットである。本キットは、例えば、セリンプロテアーゼ、アルカリ性溶液、及び／又は核酸増幅用試薬等を含み得るがこれらに限定されず、目的に応じて更なる成分を適宜含んでもよい。

[0050] 前記のような前処理方法を行うためのキット、外来性核酸の検出を行うためのキット、及びそれらを両方行うためのキットは、特定の外来性核酸の存在を検出又は定量することができる遺伝子検査試薬及び／又は使用方法等を説明する使用説明書等を任意に含むことができる。例えば、核酸増幅用試薬の構成成分を二つ以上に分けて別々の容器に封入したものまたは構成成分の

すべてを一つの容器に封入したもの、例えば一つの包装体に梱包し、当該キットの使用方法に関する情報を含む態様で提供することができる。また、陽性コントロール液や陰性コントロール液を含めることもできる。

実施例

[0051] 以下、本発明の実施例に基づき具体的に説明する。本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0052] [実施例 1：前処理法および処理済み試料に対する核酸増幅法の効果確認]

(1) 試料の調製

SARS-CoV-2 陰性の唾液検体 $30\mu\text{L}$ と 10mM Tris-HCl (pH 7.5) $55\mu\text{L}$ 、NATtrol SARS-CoV-2 (recombinant) Stock (ZEPTOMETRIX 社) $15\mu\text{L}$ を 1.5mL チューブにて混合し、疑似的な SARS-CoV-2 陽性試料 $100\mu\text{L}$ を作成した。なお、NATtrol SARS-CoV-2 (recombinant) Stock とは細菌細胞内に人工的に合成された SARS-CoV-2 遺伝子を封入し、エンベロープ型ウイルスである SARS-CoV-2 を模したサンプルに相当する。

(2) 前処理法

上記試料に対し本発明の前処理法を行った。具体的には、試料にプロテイナーゼ K 溶液 (20mg/mL 、関東化学製) を PK 量加えた混合液を調製し、温度 T_1 で M_1 分間加温した。その後温度 T_2 で M_2 分間加熱した。加熱が終了した混合液は氷冷し、十分に温度が冷却されたことを確認してから、混合液のうち $25\mu\text{L}$ を採取して、 0.5mL チューブに分注した。分注後のチューブに所定濃度の水酸化ナトリウム水溶液または水酸化カリウム水溶液を $25\mu\text{L}$ 添加した。

前処理法の各パラメータ (PK 量、 T_1 、 M_1 、 T_2 、 M_2) は表 1 に記載した通りである。また、水酸化ナトリウム水溶液又は水酸化カリウム水溶液を添加後の混合液中のアルカリ濃度も表 1 に並記した。

[0053] (3) 逆転写、核酸増幅、融解曲線解析、及び判定

上記の通り前処理を行った各試料をそれぞれ下記試薬に添加して、下記条件によりSARS-CoV-2の検出を行った。逆転写、核酸増幅（PCR）および融解曲線解析には東洋紡製GENECUBE（登録商標）を使用した。判定は、融解曲線解析にてピークが得られた場合に陽性と判定した。

[0054] [表1]

No.	PK量 (μ g)	T1 ($^{\circ}$ C)	M1 (分間)	T2 ($^{\circ}$ C)	M2 (分間)	アルカリ 種類	アルカリ 濃度 (mM)
1	200	65	5	95	5	NaOH	5
2	200	65	5	95	5	NaOH	30
3	200	65	5	95	5	KOH	15
4	200	65	10	95	10	NaOH	10
5	200	65	10	95	10	KOH	20
6	140	65	10	95	10	NaOH	15
7	300	65	5	95	5	KOH	30
8	200	58	5	90	5	KOH	20

[0055] 試薬

KOD Mix（ジーンキューブ（R）テストベーシック、東洋紡製）3 μ L

PPD Mix（ジーンキューブ（R）テストベーシック、東洋紡製）1 μ L

IC Mix（ジーンキューブ（R）テストベーシック、東洋紡製）1 μ L

10 μ M 配列番号1で示されるプライマー 0.25 μ L

10 μ M 配列番号2で示されるプライマー 1.5 μ L

10 μ M 配列番号4で示されるプローブ（3'末端をBODIPY-FLで標識） 0.125 μ L

5 U/ μ L 逆転写酵素（東洋紡製） 0.5 μ L

試料4 μ L

[0056] 逆転写、核酸増幅および融解曲線解析

42 $^{\circ}$ C・2分

97℃・15秒

(以上1サイクル)

97℃・1秒

58℃・3秒

63℃・5秒

(以上50サイクル)

94℃・30秒

39℃・30秒

40℃～75℃(0.09℃/秒で温度上昇)

[0057] (3) 結果

図1はNo. 1の前処理済み分析用試料を測定した結果である。SARS-CoV-2の検出を示す明確な検出ピークが得られており、生体試料に混合したSARS-CoV-2 Stockの細菌細胞(エンベロープを模したサンプル)が本発明の前処理法によって処理され、露出したSARS-CoV-2遺伝子が検出されたことが分かる。

また、No. 1～8の検出結果を表2として示す。いずれの前処理済み分析用試料を測定してもSARS-CoV-2陽性となっており、プロテイナーゼKの量、温度T1、時間M1、温度T2、時間M2、アルカリ水溶液の種類、そしてアルカリ濃度の各要素を変化させても本発明の効果が奏されることが明らかとなった。

[0058]

[表2]

No.	測定結果	蛍光値
1	陽性	44.40
2	陽性	47.62
3	陽性	47.39
4	陽性	45.49
5	陽性	49.21
6	陽性	49.97
7	陽性	47.32
8	陽性	49.61

[0059] [実施例2：リアルタイムRT-PCRによる前処理済み試料からの核酸検出]

(1) 試料の調製

実施例1で前処理を行った試料No. 1～8の残余を用いた。また、陰性対照として精製水を試料として用いた。

(2) リアルタイムRT-PCRおよび及び判定

上記試料をそれぞれ下記試薬に添加して、下記条件によりSARS-CoV-2の検出を行った。リアルタイムRT-PCRにはRotor-Gene Q (QIAGEN社)を使用した。判定は、増幅曲線の立ち上がりが認められCtが算出された場合に陽性とした。

[0060] 試薬

以下の試薬を含む溶液を調製した。

2X Reaction Buffer (THUNDERBIRD (R) PROBE One-Step qRT-PCR Kit、東洋紡製) 10 μ L

DNA Polymerase (同上、東洋紡製) 1 μ L
RT Enzyme Mix (同上、東洋紡製) 1 μ L
10 μ M 配列番号1で示されるプライマー 1 μ L
10 μ M 配列番号2で示されるプライマー 1 μ L
10 μ M 配列番号3で示されるプローブ (5' 末端をFAMで標識、3' 末端をBHQ1で標識) 0.25 μ L
精製水 1.75 μ L
試料 5 μ L

[0061] リアルタイムRT-PCR

50°C・15分

95°C・2分

(以上1サイクル)

95°C・3秒

55°C・30秒 蛍光検出

(以上45サイクル)

[0062] (3) 結果

下記の表3は、上記の条件でリアルタイムRT-PCRを行い、結果をまとめた表である。No. 1～8の全ての前処理済み分析用試料で増幅曲線の立ち上がりが認められ、Ctが算出された。また、陰性対照である精製水では増幅は認められなかった。以上から、本発明の前処理法で処理した試料から、更なる核酸の精製処理を必要とせずに、リアルタイムPCRまたはリアルタイムRT-PCRによる核酸の検出が可能であることを確認した。

[0063]

[表3]

N o .	測定結果	C t
1	陽性	2 7 . 3 6
2	陽性	2 6 . 5 1
3	陽性	2 6 . 2 2
4	陽性	2 6 . 2 6
5	陽性	2 5 . 9 1
6	陽性	2 5 . 6 0
7	陽性	2 5 . 8 3
8	陽性	2 6 . 2 6
精製水	陰性	なし

[0064] [実施例3：鼻咽頭検体の前処理]

(1) 試料の調製

SARS-CoV-2 感染症患者からスワブで採取された鼻咽頭ぬぐい液を汎用輸送培地UTM (COPNA社) に懸濁したものを生体試料とした。

(2) 前処理法

前記生体試料100 μ LにプロテイナーゼK溶液(20mg/mL、関東化学製)を10 μ L(約6U)加えた混合液を調製した。該混合液を65℃で5分間加温し、その後95℃で5分間加熱した。加熱後の混合液の温度が十分低下してから、混合液50 μ Lを分取し、アルカリ終濃度が約20mMとなるように水酸化カリウム水溶液と混和した。以上の処理を行った試料を測定用試料とした。

(2) 逆転写、核酸増幅、融解曲線解析、及び判定

上記の測定用試料を下記試薬に添加して、下記条件によりSARS-CoV-2の検出を行った。逆転写、核酸増幅および融解曲線解析には東洋紡製GENECUBE（登録商標）を使用した。判定は、融解曲線解析にてピークが得られた場合に陽性と判定した。

[0065] 試薬

KOD Mix（ジーンキューブ（R）テストベーシック、東洋紡製）3 μ L

PPD Mix（ジーンキューブ（R）テストベーシック、東洋紡製）1 μ L

IC Mix（ジーンキューブ（R）テストベーシック、東洋紡製）1 μ L

10 μ M 配列番号1で示されるプライマー 0.25 μ L

10 μ M 配列番号2で示されるプライマー 1.5 μ L

10 μ M 配列番号4で示されるプローブ（3'末端をBODIPY-FLで標識） 0.125 μ L

5 U/ μ L 逆転写酵素（東洋紡製） 0.5 μ L

試料4 μ L

[0066] 逆転写、核酸増幅および融解曲線解析

42°C・2分

97°C・15秒

（以上1サイクル）

97°C・1秒

58°C・3秒

63°C・5秒

（以上50サイクル）

94°C・30秒

39°C・30秒

40°C～75°C（0.09°C/秒で温度上昇）

[0067] (3) 結果

融解曲線解析の結果、図1と同様にSARS-CoV-2遺伝子の検出を表すピークが認められた。以上から、本発明の前処理は臨床検体に由来する試料にも有効であり、更なる核酸精製を必要とせずに、生体試料である鼻咽頭検体からSARS-CoV-2を高感度に検出できることが示された。

[0068] [実施例4：喀痰検体の前処理]

(1) 試料の調製

喀痰約100 μ Lとリン酸緩衝生理食塩水270 μ Lを混合したものを生体試料とした。

(2) 前処理法

前記生体試料約370 μ Lに試料にプロテイナーゼK溶液(20mg/mL、関東化学製)を30 μ L(約18U)加えた混合液を調製した。該混合液を13000 $\times$ gで3分間遠心し、遠心上清のうち100 μ Lを別のチューブに移した。これを65 $^{\circ}$ Cで5分間加温し、その後95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。加熱後の混合液の温度が十分低下してから、混合液50 μ Lを分取し、アルカリ終濃度が約20mMとなるように水酸化カリウム水溶液と混和した。該混和液にDx SARS-CoV-2 Standard (Bio-Rad社)を終濃度が約2.5コピー/ μ Lとなるよう添加した。これを測定用試料とした。

(2) 逆転写、核酸増幅、融解曲線解析、及び判定

上記の測定用試料を下記試薬に添加して、実施例3と同様にして逆転写、核酸増幅、融解曲線解析を行った。

[0069] (3) 結果

融解曲線解析の結果、図1と同様にSARS-CoV-2遺伝子の検出を表すピークが認められた。以上から、本発明の前処理法により処理された喀痰は、核酸増幅および検出を阻害しなくなることが明らかになった。すなわち、本発明の方法により、更なる核酸精製を必要とせずに、生体試料である喀痰からSARS-CoV-2を検出できることが確認された。

産業上の利用可能性

[0070] 本発明の前処理法を用いることで生体試料を迅速かつ簡便に処理し、試料中に含まれる外来性核酸を露出されることが可能である。かつ、露出させた外来性核酸を含む測定用試料に対してそのまま核酸増幅を行うことが可能であるため、本発明を利用することで迅速な遺伝子検査が可能になる。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程（A）～（D）を含む、外来性核酸を検出する方法に供される試料の前処理方法：
- （A）試料とセリンプロテアーゼを含む混合液を調製する工程、
- （B）前記工程（A）で調製した混合液においてセリンプロテアーゼによる酵素反応を行う工程、
- （C）前記工程（B）で酵素反応を行った混合液を加熱する工程、及び
- （D）前記工程（C）で加熱処理を行った混合液とアルカリ性溶液とを混合する工程。
- [請求項2] 前記工程（A）で用いられる試料が、生体試料であるか、又は、生体試料と水、生理食塩水、液体培地、及び緩衝液からなる群より選択される少なくとも1種の溶媒との混合物である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記生体試料がヒト由来の生体試料である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記緩衝液が、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、ハンクス液、及びグッドバッファーからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項2または3に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程（B）における酵素反応が、前記混合液を50～70℃で1～10分間反応させることにより行われる、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] 前記工程（C）における加熱が、90～100℃で1～10分間の加熱処理である、請求項1～5のいずれかに記載の方法。
- [請求項7] 前記工程（C）の加熱処理を行った混合液を、工程（B）における反応温度よりも低い温度まで冷却してから工程（D）を行う、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

- [請求項8] 前記セリンプロテアーゼがプロテイナーゼKである、請求項1～7のいずれかに記載の方法。
- [請求項9] 前記工程（D）において、アルカリ性溶液を添加後の混合液中のアルカリ濃度が1～30 mMである、請求項1～8のいずれかに記載の方法。
- [請求項10] 前記アルカリ性溶液が水酸化カリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化リチウム水溶液、水酸化マグネシウム水溶液、水酸化カルシウム水溶液、水酸化バリウム水溶液、炭酸カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、炭酸マグネシウム水溶液、及び炭酸カルシウム水溶液からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1～9のいずれかに記載の方法。
- [請求項11] 前記工程（A）において、試料1 μ Lに対してセリンプロテアーゼが1 μ g～4 μ gとなる比率で混合する、請求項1～10のいずれかに記載の方法。
- [請求項12] 前記工程（A）において、試料1 μ Lに対してセリンプロテアーゼが0.03 U～0.12 Uとなる比率で混合する、請求項1～11のいずれかに記載の方法。
- [請求項13] 前記外来性核酸が、エンベロープ型ウイルスの核酸である、請求項1～12のいずれかに記載の方法。
- [請求項14] 前記エンベロープ型ウイルスが、コロナウイルス科ウイルス、オルトミクソウイルス科ウイルス、フラビウイルス科ウイルス、トガウイルス科ウイルス、ブニヤウイルス科ウイルス、パラミクソウイルス科ウイルス、及びフィロウイルス科ウイルスからなる群より選択される少なくとも1種である請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 請求項1～14のいずれかに記載の前処理方法を行った試料を核酸増幅用試薬と混合し、試料に含まれる外来性核酸の増幅を行う工程を包含する、試料中の外来性核酸の検出方法。
- [請求項16] 増幅された核酸を検出する工程を更に包含する、請求項15に記載

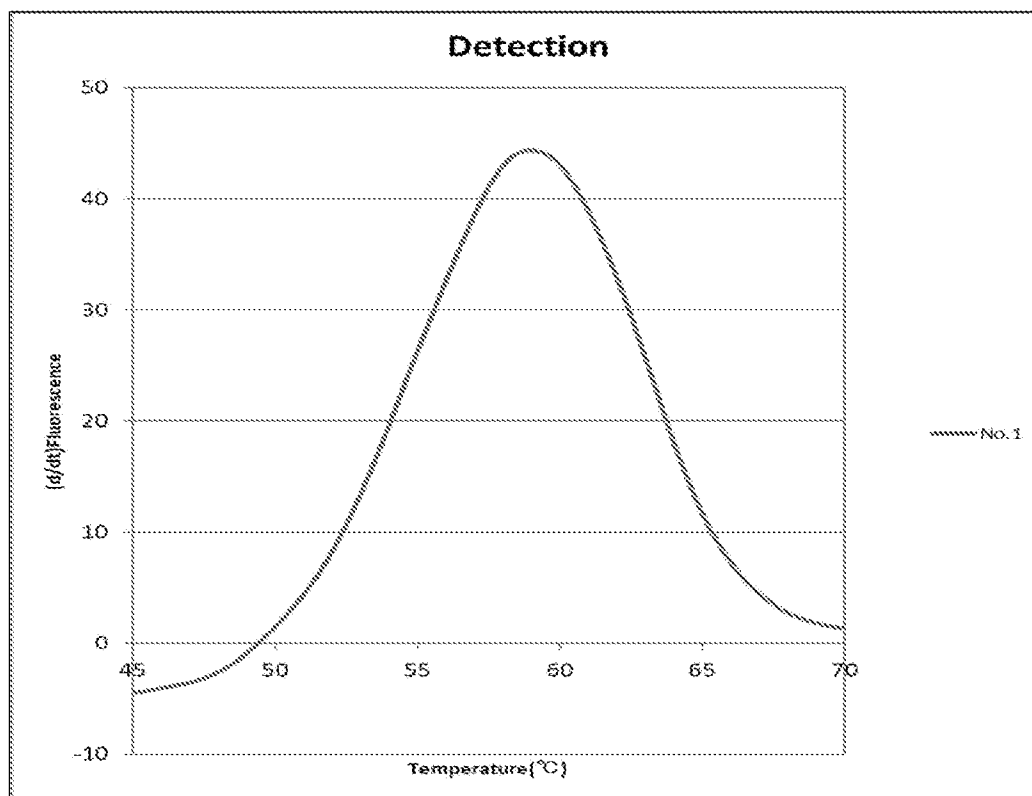
の方法。

[請求項17] 前記検出工程が融解曲線解析によって行われる、請求項16に記載の方法。

[請求項18] セリンプロテアーゼ及びアルカリ性溶液を含む、請求項1～14のいずれかに記載の前処理方法を行うためのキット。

[請求項19] 核酸増幅用試薬を含む、請求項15～18のいずれかに記載の試料中の外来性核酸の検出方法を行うためのキット。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/037851

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/40(2006.01)n; *C12N 15/44*(2006.01)n; *C12N 15/45*(2006.01)n; *C12N 15/50*(2006.01)n; ***C12Q 1/37***(2006.01)i;
C12Q 1/6806(2018.01)i; ***C12Q 1/686***(2018.01)i
 FI: C12Q1/6806 Z ZNA; C12Q1/686 Z; C12Q1/37; C12N15/44; C12N15/45; C12N15/40; C12N15/50

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)

C12N15/00-15/90; C12Q1/68-1/6897

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-332562 A (ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, INC.) 07 December 1999 (1999-12-07) claim 1, paragraphs [0002], [0018], examples	1-19
X	JP 2011-188856 A (SAMSUNG TECHWIN CO., LTD.) 29 September 2011 (2011-09-29) paragraphs [0124]-[0126], examples	1-9, 11-19
A		10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 December 2021

Date of mailing of the international search report

14 December 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/037851

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/037851

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	11-332562	A	07 December 1999	EP 953635 A1 claim 1, paragraphs [0002], [0019], examples JP 2010-259443 A EP 2267127 A1 CA 2270023 A1	
JP	2011-188856	A	29 September 2011	US 2011/0236891 A1 paragraphs [0128]-[0130], examples JP 2011-188855 A US 2011/0223598 A1 CN 102242189 A KR 10-2011-0102841 A KR 10-2011-0102842 A CN 102260735 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/40(2006.01)n; C12N 15/44(2006.01)n; C12N 15/45(2006.01)n; C12N 15/50(2006.01)n; C12Q 1/37(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i FI: C12Q1/6806 Z ZNA; C12Q1/686 Z; C12Q1/37; C12N15/44; C12N15/45; C12N15/40; C12N15/50														
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/00-15/90; C12Q1/68-1/6897 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2021年													
日本国実用新案登録公報	1996-2021年													
日本国登録実用新案公報	1994-2021年													
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 11-332562 A (オルソクリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド) 07.12.1999 (1999-12-07) 請求項1、[0002]、[0018]、実施例</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2011-188856 A (三星テクウィン株式会社) 29.09.2011 (2011-09-29) [0124] - [0126]、実施例</td> <td>1-9, 11-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	JP 11-332562 A (オルソクリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド) 07.12.1999 (1999-12-07) 請求項1、[0002]、[0018]、実施例	1-19	X	JP 2011-188856 A (三星テクウィン株式会社) 29.09.2011 (2011-09-29) [0124] - [0126]、実施例	1-9, 11-19	A		10
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X	JP 11-332562 A (オルソクリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド) 07.12.1999 (1999-12-07) 請求項1、[0002]、[0018]、実施例	1-19												
X	JP 2011-188856 A (三星テクウィン株式会社) 29.09.2011 (2011-09-29) [0124] - [0126]、実施例	1-9, 11-19												
A		10												
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。														
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献														
国際調査を完了した日 02.12.2021		国際調査報告の発送日 14.12.2021												
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 竹内 祐樹 4B 5082 電話番号 03-3581-1101 内線 3448												

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/037851

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	11-332562	A	07.12.1999	EP 953635 A1	
				請求項 1、[0002]、	
				[0019]、実施例	
				JP 2010-259443 A	
				EP 2267127 A1	
JP	2011-188856	A	29.09.2011	CA 2270023 A1	
				US 2011/0236891 A1	
				[0128] - [0130]、実施例	
				JP 2011-188855 A	
				US 2011/0223598 A1	
				CN 102242189 A	
				KR 10-2011-0102841 A	
				KR 10-2011-0102842 A	
				CN 102260735 A	