

(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
2023年6月1日(01.06.2023)



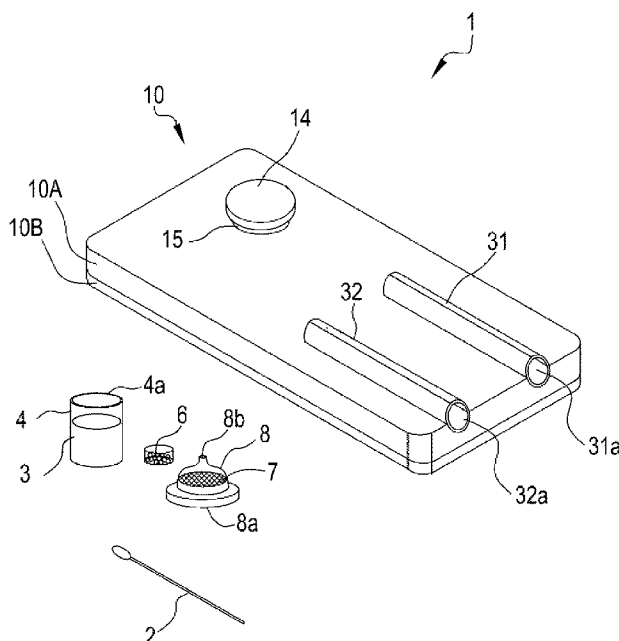
(10) 国際公開番号

WO 2023/095704 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/10 (2006.01) *C12Q 1/686* (2018.01)
C12Q 1/6806 (2018.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12Q 1/6844 (2018.01) *C12M 1/12* (2006.01)
C12Q 1/6851 (2018.01)
- (21) 国際出願番号 : PCT/JP2022/042617
- (22) 国際出願日 : 2022年11月16日(16.11.2022)
- (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 2021-191592 2021年11月25日(25.11.2021) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 濱 威史(HAMA, Takeshi); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人太陽国際特許事務所(TAIYO, NAKAJIMA & KATO); 〒1600022 東京都新宿区新宿4丁目3番17号 Tokyo (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) Title: NUCLEIC ACID TEST METHOD AND TEST KIT

(54) 発明の名称 : 核酸検査方法および検査キット



(57) Abstract: Provided are a nucleic acid test method and a test kit, each of which achieves a nucleic acid test with higher test accuracy than conventionally possible, without being limited to a specific amplification method. The nucleic acid test method comprises: an extraction step for extracting a nucleic acid from a specimen; a purification step for removing, before, during, or after the extraction step, contaminants in a liquid that is a solution which contains the specimen or a nucleic acid extract in which the nucleic acid has been extracted; an amplification step for amplifying a base sequence in



WO 2023/095704 A1

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, CV, 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, ME, 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:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

the nucleic acid extract; and a detection step for detecting the presence/absence of the base sequence after the amplification step. In the extraction step, the specimen is brought into contact with an extraction reagent including a non-ionic surfactant. The purification step includes an adsorption step for bringing the liquid into contact with a zeolite having a crystal structure of ferrierite, mordenite, an L-type, or a Y-type, so as to cause the contaminants in the liquid to be adsorbed to the zeolite.

(57) 要約: 特定の増幅方法に限定されることなく、従来よりも高い検査精度で核酸検査を実現できる核酸検査方法および検査キットを提供する。核酸検査方法は、検体から核酸を抽出する抽出工程と、抽出工程の前、途中および後のいずれかの段階で、検体を含む溶液および核酸が抽出された核酸抽出液のいずれかの液体内の夾雑物を除去する精製工程と、核酸抽出液内の塩基配列を増幅する増幅工程と、増幅工程の後に、塩基配列の有無を検出する検出工程とを含む。抽出工程は、上記検体を、ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬と接触させる工程であり、精製工程は、液体を、フェリエライト、モルデナイト、L型およびY型のいずれかの結晶構造を有するゼオライトと接触させることにより、上記液体内の夾雑物をゼオライトに吸着させる吸着工程を含む。

明 細 書

発明の名称：核酸検査方法および検査キット

技術分野

[0001] 本開示は、核酸検査方法および検査キットに関する。

背景技術

[0002] 遺伝子診断の技術において、生体から採取した検体に含まれる微量な核酸に対して検査対象の塩基配列を増幅する増幅処理を施し、検体中に検査対象の塩基配列を含む核酸が存在するか否かを検査する検査方法が知られている。増幅方法としては、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction: PCR) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法などが挙げられる。

[0003] 上記検査方法においては、一例として、まず、採取された検体の中から核酸を抽出するために、検体を抽出用試薬に投入して検体内から核酸を抽出する抽出工程が行われる。核酸は細胞内に存在するため、細胞を溶解して核酸を溶出させる必要がある。抽出工程は、抽出用試薬により細胞を溶解して核酸を溶出させる工程である。その後、検体から核酸が抽出された核酸抽出液から夾雑物を除去する精製工程が行われる。夾雑物には、検体に含まれる生体由来の夾雑物および核酸抽出の際に核酸と共に溶出されるタンパク質あるいは多糖類等の夾雑物が含まれる。このような夾雑物は、核酸の増幅を阻害する要因となるため除去される。精製工程を経た核酸抽出液は、検査対象の塩基配列を増幅させるための増幅用試薬と混合され、PCR法あるいはLAMP法等による増幅処理を施す増幅工程が行われる。その後、検査対象の塩基配列に付与されたプローブからの信号を検出することで、検査対象の塩基配列が含まれているか否かの検査が行われる。ここで、核酸とは、DNA (deoxyribonucleic acid) およびRNA (ribonucleic acid) の総称である。

[0004] 国際公開第2009/060847号では、抽出工程において、抽出用試薬として、アニオン系界面活性剤あるいはアルカリを含む抽出用試薬を用い

ること、精製工程において、核酸抽出液をゼオライトに接触させ、ゼオライトの吸着作用によって夾雑物を除去すること、さらに、増幅工程において、LAMP法を用いることが記載されている。ゼオライトを用いる精製工程は、例えば磁性粒子などを用いて夾雑物と核酸を分離させる方法と比べて、簡便であるため好ましい。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、国際公開第2009/060847号の手法を、LAMP法に代えてPCR法に適用した場合、増幅が不十分である場合があった。増幅が不十分であるため、検体内の核酸が微量である場合の検査精度が低下する場合があった。

[0006] 本開示は、上記事情に鑑みてなされたものであって、特定の増幅方法に限定されることなく、従来よりも高い検査精度で核酸検査を実現できる核酸検査方法および検査キットを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本開示の核酸検査方法は、生体から採取した検体に含まれる核酸の中に、検査対象の塩基配列が存在するか否かを検査する核酸検査方法であって、
検体から核酸を抽出する抽出工程と、
抽出工程の前、途中および後のいずれかの段階で、検体を含む溶液および核酸が抽出された核酸抽出液のいずれかの液体内の夾雑物を除去する精製工程と、
核酸抽出液内の塩基配列を増幅する増幅工程と、
増幅工程の後に、塩基配列の有無を検出する検出工程とを含み、
抽出工程は、上記検体を、ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬と接触させる工程であり、
精製工程は、液体を、フェリエライト、モルデナイト、L型およびY型のいずれかの結晶構造を有するゼオライトと接触させることにより、上記液体内の夾雑物をゼオライトに吸着させる吸着工程を含む。

- [0008] 本開示の核酸検査方法においては、精製工程は、吸着工程の後に、液体を濾過して液体内からゼオライトを除去する濾過工程を含むことが好ましい。
- [0009] 本開示の核酸検査方法においては、抽出工程において、抽出用試薬中にゼオライトを添加することにより、抽出工程と精製工程とを並行して行うことが好ましい。
- [0010] 本開示の核酸検査方法においては、抽出工程の後に、精製工程を行ってもよい。
- [0011] 本開示の核酸検査方法においては、ノニオン系界面活性剤が、ポリエチレンオキシド、グルカミンおよびベタインのうちの少なくとも1種を含むことが好ましい。
- [0012] 本開示の核酸検査方法においては、ゼオライトの結晶構造が、フェリエライト、L型およびY型のうちのいずれかであることが好ましい。
- [0013] 本開示の核酸検査方法においては、ゼオライトのカチオンが Na^+ 、 K^+ 、および H^+ のいずれかであることが好ましい。
- [0014] 本開示の核酸検査方法においては、ゼオライトの細孔径が、 0.7 nm より大きく、 1 nm より小さいことが好ましい。
- [0015] 本開示の核酸検査方法においては、ゼオライトのシリコンとアルミニウムとの比 Si/Al が、5以上、18以下であることが好ましい。
- [0016] 本開示の核酸検査方法においては、増幅工程はポリメラーゼ連鎖反応による増幅工程であることが好ましい。
- [0017] 本開示の検査キットは、生体から採取した検体に含まれる核酸の中に、検査対象の塩基配列が存在するか否かの検査に用いられる検査キットであって、
- ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬を収容する抽出容器、および核酸の増幅に用いられる増幅用試薬を収容する増幅用試薬収容部を含む複数の収容部と、複数の収容部間を接続する複数の流路とを備えたカートリッジ、
- を含む核酸検査用の検査キットであって、

抽出容器およびカートリッジの少なくとも一方に、あるいは、抽出容器に投入可能な態様で、フェリエライト、モルデナイト、L型およびY型のいずれかの結晶構造を有するゼオライトを備えた、検査キットである。

[0018] 本開示の検査キットにおいては、核酸抽出液を濾過するフィルタであって、ゼオライトよりも目の細かいフィルタを備えていることが好ましい。

[0019] フィルタは、カートリッジ内に備えられていてもよいし、カートリッジとは別に備えられていてもよい。

[0020] フィルタは、抽出容器中の液体をカートリッジに投入するまでの経路中またはカートリッジの液体の投入口に備えていてもよい。

[0021] カートリッジが、複数の収容部のうちの増幅用試薬収容部とは異なる1つの収容部にゼオライトを収容し、ゼオライトが収容された収容部から増幅用試薬収容部に至る流路中に、フィルタを備えていてもよい。

[0022] 本開示の検査キットにおいては、カートリッジが、液体を投入する投入口と、投入口を覆う着脱可能な蓋部と、投入口に対向する位置に設けられた、液体を収容可能な第1収容部と、増幅用試薬を収容する増幅用試薬収容部である第2収容部と、第1収容部と第2収容部とを接続する第1流路と、第2流路を介して第1収容部に一端が接続された第1シリンダであって、他端が外部に開口した第1シリンダと、第3流路を介して第2収容部に一端が接続された第2シリンダであって、他端が外部に開口した第2シリンダと、第1シリンダ内を移動可能に備えられた第1栓と、第2シリンダ内を移動可能に備えられた第2栓とを備え、第1栓および第2栓を外部から押圧して移動させることにより、第1収容部、第2収容部、第1流路、第2流路および第3流路を含む内部空間を加圧可能な容器であって、第1収容部および第2収容部はいずれも複数の収容部の1つであり、第1流路、第2流路および第3流路は、いずれも複数の流路の1つであってもよい。

発明の効果

[0023] 本開示の核酸検査方法および検査キットによれば、特定の増幅方法に限定されることなく、従来よりも高い検査精度で核酸検査を実現できる。

図面の簡単な説明

- [0024] [図1]一実施形態の検査キット1の概略構成を示す図である。
- [図2]図1に示すカートリッジ10の平面図である。
- [図3]図3Aは図2の3A-3A線切断端面、図3Bは図2の3B-3B線切断端面、図3Cは図2の3C-3C線切断端面である。
- [図4]一実施形態の検査装置100の概略構成を示す図である。
- [図5]図5Aは検査装置100におけるカートリッジ10と押圧機108との位置関係を示す平面図であり、図5Bは図5Aの5B-5B線断面図である。
- [図6]核酸検査方法のフローを説明するための図である。
- [図7]一実施形態の核酸検査方法における抽出工程および精製工程を説明するための図である。
- [図8]変更例1の核酸検査方法における抽出工程および精製工程を説明するための図である。
- [図9]変更例2の核酸検査方法のフローを説明するための図である。
- [図10]設計変更例のカートリッジ11の平面図である。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、本開示の核酸検査方法および検査キットの実施形態について図面を参照して説明する。本開示の核酸検査方法は、生体から採取した検体に含まれる核酸の中に、検査対象の塩基配列が存在するか否かを検査する方法である。まず、一実施形態の核酸検査方法に使用される検査キットおよび検査装置の一例を説明し、その後、一実施形態の核酸検査方法について説明する。

[0026] 「検査キット」

図1は、一実施形態の核酸検査方法に使用される検査キット1の概略構成を示す図である。

[0027] 検査キット1は、生体から採取した検体に含まれる核酸の中に、検査対象の塩基配列が存在するか否かの検査に用いられる検査キットである。具体的には、インフルエンザあるいは新型コロナウイルスなどの感染症に生体が罹

患しているか否かの検査に用いられる。

[0028] 検査キット1は、検体採取具2、抽出用試薬3を収容した抽出容器4、ゼオライト6、濾過フィルタ7を含む漏斗8、およびカートリッジ10を含む。

[0029] 生体から採取される検体とは、検査の対象の個体、より具体的には人を含む動物などの生体から採取される生物学的試料であり、例えば、血液、血清、血漿、髄液、涙液、汗、尿、便、膿、鼻汁、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、鼻腔吸引液、または喀痰等、さらには臓器、組織、粘膜、および皮膚等である。なお、検体を含む溶液とは、検体と溶媒を含んでもよいが、上記検体が液状である場合には、検体そのものであってもよい。また、輸送培地に移した液を検体として用いてもよい。

[0030] 検体採取具2は、検体を採取するための用具であり、本例においては、鼻腔拭い液を採取するためのスワブが用いられる。検体採取具2としては、上記検体に応じ適宜の採取具を備えることができる。

[0031] 抽出容器4は、検体から核酸を抽出するための抽出用試薬3を収容する。抽出用試薬3と検体とを接触させると検体から核酸が抽出される。一例として、核酸の抽出は、抽出容器4内において抽出用試薬3と検体とを接触させることにより行われる。抽出された核酸を含む抽出用試薬3を以下において核酸抽出液62と呼ぶ(図7参照)。本開示の抽出用試薬3は、界面活性剤としてノニオン系界面活性剤を含むが、アニオン系界面活性剤を含まない。

[0032] ノニオン系界面活性剤としては、ポリエチレンオキシド、グルカミンおよびベタインのうちの少なくとも1種を含むことが好ましい。なお、ノニオン系界面活性剤は、ポリエチレンオキシド、グルカミンおよびベタインのうちの2種以上を含んでいてもよい。抽出用試薬中におけるノニオン系界面活性剤の濃度は、例えば、0.1vol%~5vol%程度であり、0.1vol%~2vol%が好ましい。

[0033] ゼオライト6は、夾雑物を吸着させるために用いられる。ゼオライト6は、多孔性の結晶性アルミノ珪酸塩の総称であり、一般式は、 $MeO \cdot Al_2O$

$3 \cdot m \text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ で表される。Meは1価もしくは2価のカチオン（すなわち、陽イオン）であり、mはシリコンアルミニウム比（すなわち、 $m = \text{Si} / \text{Al}$ ）である。本実施形態において、ゼオライト6としては、フェリエライト、モルデナイト、L型およびY型のいずれかの結晶構造を有するものを用いる。ゼオライト6の結晶構造としては、フェリエライト、L型およびY型がより好ましい。ゼオライト6の大きさは、一例として、サブミリオーダーである。

- [0034] ゼオライト6において、カチオンMeは1価もしくは2価のカチオンであればよく、例えば、ナトリウムイオン (Na^+)、カリウムイオン (K^+)、水素イオン (H^+) およびアンモニウム (NH_4^+) などとすることができる。カチオンMeとしては、 Na^+ 、 K^+ 、および H^+ のいずれかであることが好ましい。
- [0035] ゼオライト6の細孔径は、一般に0.2 nm~1 nmであるが、0.7 nmより大きく、1 nmより小さいことが好ましい。
- [0036] ゼオライト6のシリコンとアルミニウムとの比mは、5以上、18以下であることが好ましい。
- [0037] 夾雑物としては、生体から検体を採取する際に検体中に含まれる、生体由来の夾雑物、および、核酸抽出時に生じる細胞壁などの夾雑物等がある。例えば、検体が鼻腔スワブである場合、鼻腔で分泌されるタンパク質等が夾雑物として挙げられる。夾雑物には、核酸増幅を阻害するものがあり、ゼオライト6は、少なくとも一種の核酸増幅を阻害する夾雑物を吸着する。
- [0038] 濾過フィルタ7は、上記ゼオライト6が添加された溶液からゼオライト6を分離するフィルタであって、ゼオライト6よりも目の細かいフィルタである。ここで、「ゼオライト6よりも目の細かいフィルタ」とは、ゼオライト6を通過させず、後述の核酸抽出液を透過する性能を有することを意味し、具体的には、ゼオライト6の粒形よりも小さい孔径のフィルタを意味する。
- [0039] 濾過フィルタ7の材質としては、セルロースアセテート、ニトロセルロース、セルロース混合エステル、ポリエーテルスルホン、PTFE (polytetra

fluoroethylene)、P V D F (Poly Vinylidene DiFluoride)、ナイロン、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン、およびグラスファイバなどが挙げられる。濾過フィルタ 7 は、一例として、目の大きさ(孔径)が概ね 50 nm から 10 μ m の精密濾過膜である。精密濾過膜としては、有形物を表面で捕捉するメンブレンフィルタ、および、有形物をフィルタ内部で捕捉するプレフィルタ(例えば、ろ紙又はデプスフィルタ)等があり、用途に応じて適宜選択される。

[0040] 漏斗 8 は、抽出容器 4 中の核酸抽出液 6 2 (図 7 参照) をカートリッジ 10 に投入するために用いられる。漏斗 8 は、注入開口 8 a と、排出開口 8 b とを備える。漏斗 8 は、注入開口 8 a から排出開口 8 b に向かって徐々に開口径が小さくなる形状を有している。漏斗 8 は、抽出容器 4 の開口部 4 a と注入開口 8 a とを嵌合させて抽出容器 4 に取り付けられる。そして、抽出容器 4 中の核酸抽出液 6 2 をカートリッジ 10 に投入する場合に、抽出容器 4 に取り付けられた漏斗 8 の注入開口 8 a が、カートリッジ 10 の投入口 1 2 (図 3 参照) に挿入される。

[0041] 本例において、濾過フィルタ 7 は、漏斗 8 の注入開口 8 a から排出開口 8 b の間に備えられている。従って、注入開口 8 a から注入された核酸抽出液 6 2 は、濾過フィルタ 7 を通過して排出開口 8 b から排出される。このように、本例において、濾過フィルタ 7 は、カートリッジ 10 とは別に備えられている。

[0042] カートリッジ 10 の詳細について説明する。図 2 は、カートリッジ 10 の平面図である。図 3 の図 3 A は、図 2 の 3 A - 3 A 線切断端面、図 3 B は図 2 の 3 B - 3 B 線切断端面、図 3 C は図 2 の 3 C - 3 C 線切断端面をそれぞれ示す。カートリッジ 10 は、例えば、クレジットカード程度の平面サイズと 1 cm 程度の厚みを有する。

[0043] 図 1 及び図 3 に示すように、カートリッジ 10 は、流路および収容部を含む流路構造の一部を構成する凹部および孔部が形成された本体部材 10 A と、流路の底面を構成する底部材 10 B とから構成されている。

- [0044] 本体部材10Aは、公知の樹脂成型プラスチック材料であれば、特に制限なく利用できるが、耐熱性および透明性の観点から、ポリカーボネート、ポリプロピレン、シクロオレフィンあるいはシリコン樹脂が好ましい。
- [0045] 底部材10Bは、例えば、薄板あるいはフィルムにより形成されている。底部材10Bとしては、公知の樹脂成型プラスチック材料であれば、特に制限なく利用できるが、本体部材10Aとの密着性の観点から、本体部材10Aと同じ材質が好ましい。
- [0046] 図1～図3に示すように、カートリッジ10は、投入口12と、蓋部14と、第1収容部16と、第2収容部18と、第1流路20と、第1シリンダ31と、第2シリンダ32と、第1栓33と、第2栓34とを備える。また、カートリッジ10は第2流路24および第3流路26をさらに備える。
- [0047] 投入口12は、液体の一例である核酸抽出液62（図7参照）を投入するための開口である。蓋部14は投入口12を覆い、投入口12の開口に着脱可能な蓋部である。本例においては、蓋部14は投入口12を形成する筒状部15に螺合可能に形成されている。
- [0048] なお、以下において、投入口12が設けられている面をカートリッジ10の上面、底部材10B側をカートリッジ10の下面と称する。ここで、本体部材10Aの上面はカートリッジ10の上面と同一であり、本体部材10Aの下面は底部材10Bの上面と接する面であり、底部材10Bの下面はカートリッジ10の下面と同一である。
- [0049] 第1収容部16は、投入口12に対向する位置に設けられており、投入口12から滴下された核酸抽出液62を収容する。第1収容部16の形状に特に制限はなく、柱状、錐状、錐台状など任意に選択することができる。
- [0050] 本カートリッジ10においては、本体部材10Aを厚み方向に貫き、本体部材10Aの表面から突出して形成された筒状部15の開口によって、投入口12が構成されており、筒状部15の本体部材10Aの内部側部分と底部材10Bとによって、第1収容部16が形成されている。
- [0051] 第2収容部18は、液体を収容可能な収容部であり、核酸抽出液62（図

7参照)と試薬42とを反応させる反応部として機能する。試薬42としては、検査対象の塩基配列を増幅するための増幅用試薬、および検査対象の塩基配列を検出するためのプローブなどが含まれる。第2収容部18は本体部材10Aの下面に設けられた凹部と、底部材10Bとによって形成されている。

[0052] 本例において、試薬42は、予め第2収容部18に収容されている。但し、試薬42は、第1収容部16から第2収容部18までの間に備えられていればよく、必ずしも、第2収容部18に収容されていなくてもよい。本例において、第2収容部18が増幅用試薬収容部を構成する。増幅用試薬としては、プライマー、ポリメラーゼ、dNTPなどの基質および塩などが挙げられる。さらに、還元剤などの添加材やバッファなどを含んでもよい。増幅対象の核酸がRNAである場合、逆転写プライマー、逆転写酵素をさらに含んでもよい。試薬42は増幅方法および検出方法に応じて適宜選択される。例えば、蛍光法により検査対象の塩基配列の検出を行う場合には、試薬42が増幅用試薬と蛍光プローブを含み得る。封入される試薬形態としては特に制限はなく、液体、固体いずれの試薬も用いられる。例えば、液体試薬を凍結乾燥して作製した粉体状の試薬や、ペレット状や粒状に成型した試薬を封入してもよい。

[0053] 第1流路20は、第1収容部16と第2収容部18とを接続する。第1収容部16に投入された核酸抽出液62は第1流路20を通過して第2収容部18に送液される。第1流路20は、本体部材10Aの下面に第1収容部16から第2収容部18に延びる線状の凹部と、底部材10Bの上面とによって形成されている。なお、第2流路24および第3流路26も同様に、本体部材10Aの下面に形成された線状の凹部と底部材10Bの上面とによって形成されている(図3参照)。

[0054] 第1シリンダ31は、第2流路24を介して第1収容部16に接続された第1シリンダ31であって、一端31bが第2流路24に連通し、他端31aが外部に開口するように設けられている。

- [0055] 第2シリンダ32は、第3流路26を介して第2収容部18に接続された第2シリンダ32であって、一端32bが第3流路26に連通し、他端32aが外部に開口するように設けられている。
- [0056] 第1シリンダ31および第2シリンダ32は、本体部材10Aの面方向に形成された筒状部であり、本体部材10Aの端から内部側に向かって形成されている。
- [0057] 第1栓33は、第1シリンダ31内を移動可能に備えられている。第2栓34は、第2シリンダ32内を移動可能に備えられている。第1栓33および第2栓34は、一例としてゴム栓であり、第1シリンダ31および第2シリンダ32内のそれぞれにおいて、外気を遮断する機能を有する。
- [0058] 第1シリンダ31は外部に開口する他端31aから、後述する押圧機の第1押圧部が挿入可能となっており、第1押圧部によって、第1栓33を第1シリンダ31内において内部空間側に押圧可能である。同様に、第2シリンダ32は外部に開口する他端32aから、後述する押圧機の第2押圧部が挿入可能となっており、第2押圧部によって、第2栓34を第2シリンダ32において内部空間側に押圧可能である。押圧機によって、押圧していない状態では、内部空間は大気圧となっている。
- [0059] カートリッジ10は、第1栓33および第2栓34を外部から押圧して移動させることにより、第1収容部16、第2収容部18、第1流路20、第2流路24および第3流路26を含む内部空間を加圧可能に構成されている。核酸抽出液62および試薬42中の気体が泡となって発生し、核酸増幅を阻害する可能性がある。第2収容部18内において、核酸抽出液62と試薬42とを混合した後に、第2収容部18内の液体を加熱する際に、内部空間を加圧することで、発泡を抑制することができ、発泡により核酸増幅が阻害されるのを抑制することができる。そのため、第2収容部18における核酸増幅工程を阻害されることなく進行させることができるので、増幅時間の遅延を生じたり、増幅不足を生じたりすることなく、検査精度を向上させることができる。

[0060] 第1収容部16に核酸抽出液62を収容し、蓋部14により投入口12を閉じた場合、カートリッジ10は、第1栓33および第2栓34によって、内部空間は密閉されている。図2に示すように、送液前の初期状態において、第1栓33は、第1シリンダ31の長さ方向の中心よりも外部に開口する他端31a側に配置されている。他方、第2栓34は、第2シリンダ32の長さ方向の中心よりも一端32b側に配置されている。この状態で、図2に示すように、第1シリンダ31内において第1栓33を外部から押圧（矢印P1）して破線矢印A1で示すように内部空間側に移動させると、内部空間が加圧されることにより、第2シリンダ32内の第2栓34が連動して破線矢印A2で示すように内部空間側から外部側へと押し出されるように移動する。第1栓33の移動に連動して第2栓34が移動することにより内部空間の圧力が調整され、第1収容部16に収容されている核酸抽出液62を、第2収容部18へと送液（矢印B）することができる。第1栓33の移動に連動して第2栓34が移動可能であるので、弱い押圧で送液が可能である。なお、第1栓33、第2栓34の移動を独立に制御して送液してもよい。

[0061] 「検査装置」

次に、上記カートリッジ10が装填され、後述する増幅工程および検出工程が実施される、一例の検査装置100について説明する。

[0062] 図4は、検査装置100の概略構成を示す図である。本検査装置100は、押圧機108と、第1加熱部112と、第2加熱部114と、検出部120と、モニタ130とを備える。また、検査装置100は、カートリッジ10を着脱可能に収容する収容部を備える。図5Aは、検査装置100におけるカートリッジ10と押圧機108との位置関係を示す平面図である。また、図5Bは、検査装置100におけるカートリッジ10と検出部120との位置関係を示す図5Aの5B-5B線断面図である。

[0063] 押圧機108は、第1押し棒101を備えた第1押圧部102と、第2押し棒103を備えた第2押圧部104と、第1押圧部102および第2押圧部104を制御する押圧制御ユニット106を備える。第1押圧部10

2 および第2押圧部104は、ステッピングモータあるいはソレノイドなどを用いたアクチュエータで第1押込み棒101および第2押込み棒103を押し込んだり、引き出したりすることができる。アクチュエータは空気圧などの動力を用いた構成でもよい。

[0064] 第1押圧部102は、カートリッジ10が設置された状態で第1押込み棒101が第1シリンダ31の外部に開口する他端31aから第1シリンダ31内に挿入可能な位置に配置される。第1押込み棒101によって、第1シリンダ31内で第1栓33を内部空間側に押圧して移動させることができる。

[0065] 第2押圧部104は、カートリッジ10が設置された状態で第2押込み棒103が第2シリンダ32の外部に開口する他端32aから第2シリンダ32内に挿入可能な位置に配置される。第2押込み棒103によって、第2シリンダ32内で第2栓34を内部空間側に押圧して移動させることができる。

[0066] カートリッジ10の第1収容部16に核酸抽出液62が投入されて、蓋部14を閉じることによって、内部空間が密閉する。このように、内部空間が密閉された状態で、第1栓33を第1押圧部102によって押圧して内部空間側に移動させることにより、カートリッジ10の第1収容部18に収容された核酸抽出液62を第2収容部18に送液することができる。

[0067] また、第1押圧部102で第1栓33を押圧し、かつ、第2押圧部104で第2栓34を押圧することで、カートリッジ10の内部空間を加圧することができる。

[0068] 第1加熱部112は、カートリッジ10の第2収容部18の底面と接触する位置に設けられている。第1加熱部112は、第2収容部18に収容された液体を加熱する。ここで、第2収容部18に収容される液体は、核酸抽出液62と試薬42との混合液である。第1加熱部112は、核酸抽出液62と試薬42との混合液を加熱して、核酸増幅を促進させる。

[0069] 第2加熱部114は、カートリッジ10の第1収容部16の底面と接触す

る位置に設けられている。第2加熱部114は、第1収容部16に収容された液体を加熱する。ここで、第1収容部16に収容される液体は、核酸抽出液62である。第2加熱部114は、前処理のために核酸抽出液62を加熱する。なお、検査装置100は、核酸抽出液62の前処理のための加熱が不要な場合には、第2加熱部114を備えていなくてもよい。

[0070] 第1加熱部112は、ペルチェ素子などを備え温調可能とされており、増幅工程における温度サイクルを実施する。他方、第2加熱部114は、第1加熱部112のような温度サイクルは不要であり、例えば、ヒーターから構成される。第1加熱部112および第2加熱部114それぞれに用いられる加熱機構は、公知の加熱機構を用いることができ、特に制限されない。

[0071] 検出部120は、第2収容部18において、核酸抽出液62中に検出対象物が含まれているか否かを検出する。検出部120は、励起光源122と、波長選択フィルタ123と、光検出器124とを備える。検出部120は、カートリッジ10の第2収容部18の上方に配置されている。励起光源122は、波長選択フィルタ123を介して、特定の波長の励起光L1を第2収容部18内に照射する。光検出器124は、励起光L1によって励起されて蛍光プローブから生じる蛍光L2を検出する。励起光L1は蛍光プローブの励起波長に応じて選択される。また、必要に応じて、強度や光量を調整するフィルタ、励起光L1を収束したり検出プローブ由来の蛍光L2を光検出器124へ集光するためのレンズ、あるいは光学系などを含んでもよい。

[0072] 励起光源122としては、LED (light emitting diode) あるいはレーザーなどが用いられる。波長選択フィルタ123は、励起光源122から発せられた光のうちプローブの励起波長に応じた波長のみを透過するフィルタである。光検出器124としては、例えばフォトダイオードあるいは光電子増倍管、またはカメラなどの撮像機器などが適用される。

[0073] モニタ130は、例えばタッチパネルディスプレイであり、タッチパネル操作で測定をスタートさせたり、検査結果を表示したりする。

[0074] 「核酸検査方法」

本開示の一実施形態の核酸検査方法を説明する。一実施形態の核酸検査方法は、図6に示すように、検体を採取する検体採取工程ST1と、抽出工程ST2と、精製工程ST3と、増幅工程ST4と、検査工程ST5とを含む。

[0075] 検体採取工程ST1は、被検者から検体を採取する工程である。なお、検体採取は、一連のフローとは別途に実施されてもよい。検体は、被検者とは異なる採取者が被検者の検体を採取してもよいし、被検者自身が採取してもよい。

[0076] 抽出工程ST2は、検体から核酸を抽出する工程である。ここでは、抽出工程ST2においては、検体60を、ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬3と接触させる。

[0077] 精製工程ST3は、検体60を含む溶液および核酸が抽出された核酸抽出液62（図6参照）のいずれかの液体内の夾雑物66（図7参照）を除去する工程である。詳細には、検体60を含む溶液および核酸抽出液62のいずれかの液体を、フェリエライト、モルデナイト、L型およびY型のいずれかの結晶構造を有するゼオライト6と接触させる。精製工程は、このように、検体60を含む溶液および核酸抽出液62のいずれかの液体をゼオライト6と接触させることにより、夾雑物66をゼオライトに吸着させる吸着工程を含む。精製工程ST3は、図6では抽出工程ST2の後工程として示しているが、抽出工程ST2の前、途中および後のいずれかの段階でなされればよい。

[0078] 増幅工程ST4は、核酸抽出液62内において、検査対象の塩基配列を増幅する工程である。

[0079] 検査工程ST5は、増幅工程ST4の後に、検査対象の塩基配列の有無を検査する工程である。

[0080] 以下に、検査キット1および検査装置100を用いた、より具体的な核酸検査方法を説明する。本検査方法では、検体採取工程ST1、抽出工程ST2および精製工程ST3を、カートリッジ10外部で行い、増幅工程ST4

および検査工程 S T 5 を、カートリッジ 1 0 を用いて実施する。

- [0081] まず、カートリッジ 1 0 外部で実施される精製工程 S T 3 までの手順を、図 7 を参照して説明する。
- [0082] 検体採取具 2 を用いて、生体から検体 6 0 が採取される（採取工程 S T 1）。具体的には、被検者の鼻腔、咽頭、口腔内部あるいは患部から検体採取具 2 を用いて検体が採取される。もしくは、鼻腔、咽頭、口腔内部の洗浄液、唾液、尿あるいは血液などの体液が検体として採取される。本例においては、検体採取具 2 としてスワブが用いられ、先端の綿部を鼻腔内に挿入することにより鼻拭い液が検体 6 0 として採取される。
- [0083] 次に、検体 6 0 から核酸 6 4 を抽出する抽出工程 S T 2 が実施される。抽出工程 S T 2 において、検体採取具 2 の検体 6 0 が付着している綿部を抽出用試薬 3 中に浸漬させる。検体 6 0 を抽出用試薬 3 中に浸漬させることにより、検体 6 0 を、ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬 3 と接触させる。検体 6 0 は抽出用試薬 3 中に混合される。抽出用試薬 3 の作用によって、検体 6 0 内の細胞が溶解されて核酸 6 4 が抽出用試薬 3 中に溶出される。これにより、核酸抽出液 6 2 が得られる。核酸抽出液 6 2 中には、核酸 6 4 の他、核酸 6 4 の増幅を阻害する夾雑物 6 6 が含まれている。夾雑物 6 6 には、検体 6 0 に含まれている生体由来の夾雑物および、核酸抽出時に生じる細胞壁等の夾雑物が含まれる。
- [0084] 次に、精製工程 S T 3 を実施する。精製工程 S T 3 は、吸着工程 S T 3 1 と濾過工程 S T 3 2 を含む。まず、抽出容器 4 の核酸抽出液 6 2 中にゼオライト 6 を添加し、核酸抽出液 6 2 中の夾雑物 6 6 をゼオライト 6 に吸着させる吸着工程 S T 3 1 を実施する。吸着工程 S T 3 1 では、核酸抽出液 6 2 中にゼオライト 6 を添加し、混合させた後、一定時間（例えば、1 0 分）静置して、夾雑物 6 6 をゼオライト 6 に吸着させる。
- [0085] その後、精製工程 S T 3 において、核酸抽出液 6 2 を濾過して核酸抽出液 6 2 中のゼオライト 6（およびゼオライト 6 に吸着した夾雑物 6 6）を除去する濾過工程 S T 3 2 を実施する。抽出容器 4 の開口部 4 a に漏斗 8 の注入

開口 8 a を嵌め合わせる。これによって、漏斗 8 に備えられている濾過フィルタ 7 が核酸抽出液 6 2 の上方に設置される。抽出容器 4 の開口部 4 a に漏斗 8 を嵌めた状態で、抽出容器 4 の天地を逆にすることで、核酸抽出液 6 2 は、濾過フィルタ 7 により濾過されて漏斗 8 の排出開口 8 b から排出される。既述の通り、濾過フィルタ 7 の目（すなわち孔径）は、ゼオライト 6 よりも小さいため、ゼオライト 6 は濾過フィルタ 7 を通過しない。したがって、ゼオライト 6 に吸着した夾雑物 6 6 もまた、濾過フィルタ 7 を通過することができない。ゼオライト 6 に吸着していない溶液および濾過フィルタ 7 の目よりも小さい核酸 6 4 は濾過フィルタ 7 を通過して、排出開口 8 b から排出される。本例では、漏斗 8 の排出開口 8 b から排出された精製済みの核酸抽出液 6 2 を、後述するカートリッジ 1 0 の投入口 1 2 からカートリッジ 1 0 に投入する。

[0086] カートリッジ 1 0 に対して精製済みの核酸抽出液 6 2 が投入された後、カートリッジ 1 0 は、検査装置 1 0 0 に装填され、検査装置 1 0 0 内において、増幅工程および検査工程が実施される。

[0087] (増幅工程)

第 1 収容部 1 6 に収容された核酸抽出液 6 2 を、第 2 加熱部 1 1 4 を用いて加熱する。加熱により、制限酵素を不活性化して抽出した核酸の分解を抑制することができる。加熱温度としては、核酸に悪影響を及ぼさない温度範囲であればよいが、例えば、5 0 °C から 9 5 °C 程度が好ましい。

[0088] 第 1 収容部 1 6 内において前処理としての加熱処理がなされた核酸抽出液 6 2 を、第 2 収容部 1 8 に向けて送液する。第 1 シリンダ 3 1 の外部に開口する他端 3 1 a から第 1 押圧部 1 0 2 の第 1 押込み棒 1 0 1 を挿入して、第 1 栓 3 3 をカートリッジ 1 0 の内部空間側に押圧して移動させる。これによって、第 1 収容部 1 6 に収容されている核酸抽出液 6 2 を第 2 収容部 1 8 へと送液することができる。この際、第 1 栓 3 3 が押し込まれて内部空間が加圧されることにより、第 2 シリンダ 3 2 内の第 2 栓 3 4 が外部側に向かって移動することにより内部空間内の圧力が調整され、弱い押圧で送液すること

ができる。

[0089] 核酸抽出液 6 2 は、第 1 収容部 1 6 から流路 2 0 を経て第 2 収容部 1 8 に送液される。第 2 収容部 1 8 には試薬 4 2 が備えられており、第 2 収容部 1 8 に核酸抽出液 6 2 が流入することで、試薬 4 2 が溶解されて、核酸抽出液 6 2 と試薬 4 2 が混合される。

[0090] 第 2 収容部 1 8 に核酸抽出液 6 2 と試薬 4 2 の混合液が送液された後、第 2 シリンダ 3 2 の外部に開口する他端 3 2 a から第 2 押圧部 1 0 4 の第 2 押込み棒 1 0 3 を挿入して、第 2 栓 3 4 を押圧して、内部空間を加圧する。この加圧状態で、第 1 加熱部 1 1 2 により第 2 収容部 1 8 内の混合液を加熱し、検査対象の塩基配列を増幅させる。なお、増幅方法は限定されるものではないが、一例として、R T (Reverse Transcription) – P C R 法、あるいは P C R 法を用いる。P C R 法を用いる場合、二本鎖 D N A を高温で一本鎖 D N A に解離させる工程 (熱変性工程)、その後温度を下げてプライマーを一本鎖 D N A に結合させる工程 (アニーリング工程)、および一本鎖 D N A を鋳型として、ポリメラーゼにより、新たに二本鎖 D N A を合成する工程 (伸長工程) を繰り返す。熱変性工程、アニーリング工程および伸長工程の温度サイクルの一例として、9 4 ° C で 1 分、5 0 ~ 6 0 ° C で 1 分、7 2 ° C で 1 ~ 5 分を 1 サイクルとして、2 0 ~ 5 0 回繰り返すものが挙げられる。また、アニーリング工程と伸長工程を 1 つの温度で行ってもよい。このような温度サイクルの一例としては、例えば、9 8 ° C で 1 分、6 0 ° C で 1 分を 1 サイクルとして、2 0 ~ 5 0 回繰り返すものが挙げられる。増幅工程における温度サイクルの温度、時間は特に制限はなく、ポリメラーゼやプライマーの性能により任意に選択される。

[0091] (検出工程)

上記の温度サイクルの 1 サイクルごとに蛍光検出を行いリアルタイムに増幅状況をモニタリングする。すなわち、本例においては、増幅工程と検出工程とを並行して実施する。蛍光検出の結果はモニタ 1 3 0 に表示する。

[0092] 核酸抽出液 6 2 内に検査対象の塩基配列が存在した場合、増幅工程でその

塩基配列が増幅され、この検査対象の塩基配列に標識される蛍光プローブに励起光が照射されることにより、蛍光が検出される。他方、核酸抽出液62内に検査対象の塩基配列が存在しない場合には、励起光を照射しても蛍光が検出されない。これによって、検査対象の塩基配列の有無を判定することができる。

[0093] 以上の通り、本実施形態の核酸検査方法では、検体60を、ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬3と接触させる抽出工程と、核酸抽出液62中の夾雑物66を除去する精製工程とを含む。また、精製工程は、検体60を含む液体もしくは核酸が抽出された核酸抽出液62のいずれかの液体を、フェリエライト、モルデナイト、L型およびY型のいずれかの結晶構造を有するゼオライトと接触させることにより、液体内の夾雑物66をゼオライト6に吸着させる吸着工程を含む。

[0094] 本発明者は、国際公開第2009/060847号に記載の手法を用い、アニオン系の界面活性剤を用いて核酸抽出を行った後に、LAMP法に代えてPCR法を用いて増幅を行うと、検査対象の塩基配列の増幅が十分に実現できない場合があることを見出した。LAMP法の一般的な反応温度は65℃程度であるのに対し、PCR法では、一般に90℃以上に加熱する工程を含む。そのため、PCR法では、増幅用試薬に含まれる酵素として、高い耐熱性を有する酵素が用いられる。アニオン系の界面活性剤を用いた場合、PCR増幅において用いられる高い耐熱性を有する酵素の活性など何らかの機能が抑制されて核酸増幅が阻害されていると推測される。これに対し、本実施形態のように、ノニオン系の界面活性剤を含む核酸抽出液を用いて核酸抽出を行うことにより、PCR増幅の阻害を抑制することができるので、検査対象の塩基配列の増幅を促進でき、高い検査精度を実現できる。

[0095] なお、PCR増幅に限らず、高い耐熱性を有する酵素を用いた増幅法において、ノニオン系の界面活性剤を用いることにより、同様の効果を得ることが可能である。一方で、本実施形態の核酸検査方法は、LAMP法等の比較的低い温度で増幅処理を行う増幅法を用いる場合にも適応することができ、

増幅法は限定されない。

- [0096] また、吸着工程において、液体（上記例では、核酸抽出液62）内の夾雑物66を特定の結晶構造を有するゼオライト6に吸着させるので、核酸抽出液62からゼオライト6を除去することにより、ゼオライト6に吸着した夾雑物66を核酸抽出液62から除去することができる。増幅工程における、検査対象の塩基配列の増幅を阻害する夾雑物を除去することができるので、増幅工程において、検査対象の塩基配列の増幅を促進でき、高い検査精度を実現できる。
- [0097] このように、本核酸検査方法は、ノニオン系の界面活性剤を用いた抽出工程、および、特定の結晶構造を有するゼオライト6に夾雑物を吸着させて、夾雑物を除去する精製工程を含む。そして、このような抽出工程および精製工程を経て得られた核酸抽出液を用いて、増幅工程が実施される。したがって、増幅工程における検査対象の塩基配列の増幅の阻害を効果的に抑制することができ、特定の増幅方法に限定されることなく、従来よりも高い検査精度で核酸検査を実現できる。
- [0098] 上記実施形態においては、増幅法としてPCR法を用いる場合について説明したが、増幅法はPCR法に限らない。増幅法としては、PCR法その他、LAMP法、NASBA（Nucleic Acid Sequence-Based Amplification）法、TRC（Transcription Reverse-transcription Concerted reaction）法、RPA（Recombinase Polymerase Amplification）法、NEAR（Nicking Enzyme Amplification Reaction）法、SDA（Strand Displacement Amplification）法あるいはHDA（Helicase-dependent Amplification）法などの公知の増幅法を用いることができる。
- [0099] 増幅法において用いられる増幅用試薬に含まれる酵素としては、RNAを鋳型として相補的DNA（cDNA）を合成する逆転写酵素とDNAやcDNAを増幅するDNAポリメラーゼがあり、増幅する対象、増幅法により適宜選択される。
- [0100] レトロウイルスなどのRNAウイルスを対象として増幅を行う場合は、増

幅処理前に逆転写酵素を用いてRNAからcDNAへの変換を行った後にcDNAを増幅する。cDNAの増幅には、PCR法を用いるRT-PCR法や、LAMP法を用いるRT-LAMP法などを行う。一方、病原微生物などの菌からDNAを抽出し増幅を行う場合は、逆転写を行わずDNAを増幅する。

- [0101] 逆転写酵素としては、AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 逆転写酵素やMMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 逆転写酵素などがあり、逆転写効率の向上や合成されるcDNAの鎖長を伸ばすために変異を導入し、RNase (ribonuclease) H活性を除くこともできる。
- [0102] DNAポリメラーゼとしては、TaqDNAポリメラーゼ、VentDNAポリメラーゼ、DeepVentDNAポリメラーゼ、KODDNAポリメラーゼ、TTxDNAポリメラーゼ、TthDNAポリメラーゼ、PfuDNAポリメラーゼなどの耐熱性DNAポリメラーゼや、BsuDNAポリメラーゼ、BstDNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼなどがある。
- [0103] また、TthDNAポリメラーゼやTTxDNAポリメラーゼのように、1つの酵素で逆転写および増幅が可能な酵素を使用してもよい。
- [0104] さらに、これらの酵素に改変を施した酵素や、抗体を結合させて室温や逆転写工程における活性を抑えた酵素を使用しても良い。
- [0105] 既に述べた通り、本開示の核酸検査方法は、PCR法などで用いられる高い耐熱性を有する酵素を用いた場合に、顕著な効果を奏する。従って、増幅工程において、PCR法を用いた場合、検査対象の塩基配列の増幅を促進でき、検査精度の向上効果が高い。
- [0106] 本実施形態の核酸検査方法においては、精製工程に、吸着工程の後に、液体を濾過して液体（ここでは、核酸抽出液62）内からゼオライトを除去する濾過工程を含む。液体からゼオライト6（および夾雑物66）を分離する方法として、濾過を用いることで、簡便に夾雑物66を除去できる。
- [0107] なお、液体内からゼオライト6を分離する方法としては、遠心分離などを

用いることも可能である。

- [0108] 抽出用試薬3が、ノニオン系界面活性剤として、ポリエチレンオキシド、グルカミンおよびベタインのうちの少なくとも1種を含む場合、増幅阻害を抑制する高い効果が得られる。これらのうち、ノニオン系界面活性剤として、ポリエチレンオキシドを含む抽出用試薬を用いた場合、増幅阻害を抑制する最も高い効果が得られる（後記表1に示す実施例参照）。
- [0109] ゼオライト6の結晶構造が、フェリエライト、L型およびY型のうちのいずれかである場合、結晶構造がモルデナイトであるゼオライトを用いた場合よりも、夾雑物の除去効果が高い（後記表1に実施例参照）。
- [0110] ゼオライト6のカチオンが Na^+ 、 K^+ 、および H^+ のいずれかである場合、 HN_4^+ をカチオンとして用いた場合より、夾雑物66の吸着性が高い。したがって、夾雑物66の除去効果が高く、増幅阻害を抑制する効果が高い（後記表1に示す実施例参照）。
- [0111] ゼオライト6の細孔径が、0.7nmより大きく、1nmより小さい場合、夾雑物66を吸着する高い吸着性が得られる。（後記表示1に示す実施例参照）。
- [0112] ゼオライト6のシリコンとアルミニウムの比 Si/Al が、5以上、18以下である場合、夾雑物66の吸着性が高い。したがって、夾雑物66の除去効果が高く、増幅阻害を抑制する効果が高い（後記表1に示す実施例参照）
- [0113] 上記実施形態の検査キット1は、ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬3を収容する抽出容器4、フェリエライト、モルデナイト、L型およびY型のいずれかの結晶構造を有するゼオライト6、およびカートリッジ10を備えている。そして、カートリッジ10は、核酸64の増幅に用いられる増幅用試薬（ここでは、増幅用試薬を含む試薬42）を収容する増幅用試薬収容部（ここでは、第2収容部18）を含む複数の収容部16、18と、複数の収容部16、18間を接続する流路20を含む複数の流路20、24、26とを備える。本構成の検査キット1を用いれば、本開示の核酸検査方法を容

易に実現することができる。

- [0114] 検査キット 1 において、ゼオライト 6 は、抽出容器 4 に投入可能な態様で備えられている。しかし、ゼオライト 6 は抽出容器 4 およびカートリッジ 10 の少なくとも一方に備えられていてもよい。
- [0115] 上記実施形態の検査キット 1 においては、核酸抽出液 6 2 を濾過するフィルタ 7 であって、ゼオライト 6 よりも目の細かい濾過フィルタ 7 を備えている。このような濾過フィルタ 7 を備えることにより、ゼオライト 6 に吸着した夾雑物 6 6 を核酸抽出液 6 2 から効率よく分離することができる。
- [0116] 検査キット 1 においては、濾過フィルタ 7 はカートリッジ 10 とは別に備えられており、具体的には、漏斗 8 に備えられている。濾過フィルタ 7 は、抽出容器 4 中の液体である核酸抽出液 6 2 をカートリッジ 10 に投入するまでの経路中に備えられていればよく、漏斗 8 に備えられた態様に限らない。また、濾過フィルタ 7 はカートリッジ 10 内に備えられていてもよい。例えば、濾過フィルタ 7 は、カートリッジ 10 の投入口 1 2 に備えられ、投入口 1 2 で濾過された核酸抽出液 6 2 がカートリッジ 10 の第 1 収容部 1 6 に供給されるように構成されていてもよい。
- [0117] 検査キット 1 は、漏斗 8 を備えることにより、核酸抽出液 6 2 を、抽出容器 4 からカートリッジ 10 へ簡便に投入することができる。しかし、検査キット 1 は漏斗 8 を備えていなくてもよい。検査キット 1 が、漏斗 8 を備えていない場合、ピペットなどを用いて抽出容器 4 から核酸抽出液 6 2 を吸い取り、核酸抽出液 6 2 を投入口 1 2 からカートリッジ 10 に投入してもよい。
- [0118] 上記実施形態の核酸検査方法においては、図 6 および図 7 に示したように、抽出工程の後に精製工程を実施する。しかし、既述の通り、精製工程は、抽出工程の前、途中および後のいずれかの段階で実施すればよい。
- [0119] 例えば、図 8 に示すように、採取工程 S T 1 1 の後、抽出工程および吸着工程を並行して実施し（工程 S T 1 2）、その後、濾過工程 S T 1 3 を実施してもよい。
- [0120] この場合、抽出容器 4 の抽出用試薬 3 中に予めゼオライト 6 を添加してお

く。ゼオライト6が添加された抽出用試薬3中に、検体採取具2の検体60が付着している綿部を浸漬させる。これにより、検体60が抽出用試薬3中に溶出され、抽出用試薬3の作用によって、細胞が溶解されて核酸64が溶出される。抽出用試薬3にはゼオライト6が添加されているので、抽出工程と並行して、検体60に含まれる夾雑物66および細胞が溶解される際に生じる夾雑物66をゼオライト6に吸着させる。

- [0121] その後、濾過工程ST13を経て精製済みの核酸抽出液62をカートリッジ10に投入する。
- [0122] 工程ST12において、抽出工程と、吸着工程とを並行して実施することにより、抽出工程の後に精製工程を実施する場合と比較して、抽出工程および精製工程に要する時間を短縮することができる。
- [0123] なお、このように、抽出工程と吸着工程とを並行して実施する場合には、検査キット1において、ゼオライト6が予め抽出容器4中に備えられていてもよい。
- [0124] また、図9に示すように、採取工程ST21の後、抽出工程ST23を実施する前に、精製工程ST22を実施してもよい。
- [0125] この場合、精製工程ST22においては、吸着工程ST221および濾過工程ST222がこの順に実施される。
- [0126] 吸着工程ST221において、検体採取具2で採取された検体60はバッファ液等の溶液中に溶出され、検体60を含むバッファ液中にゼオライト6が添加される。検体60に含まれる夾雑物66はバッファ液中においてゼオライト6に吸着される。
- [0127] 濾過工程ST222においては、吸着工程後のバッファ液を、濾過フィルタ7を用いて濾過する。
- [0128] その後、抽出工程ST23として、濾過されたバッファ液中に抽出用試薬3を添加し、核酸抽出を行う。
- [0129] このように、抽出工程ST23の前に精製工程ST22を実施する場合、ゼオライト6に吸着して除去できる夾雑物66は、生体由来の夾雑物である

。抽出工程 S T 2 3 を経ていないため、核酸抽出時に生じる夾雑物は吸着工程 S T 2 2 の際には発生していない。そのため、抽出工程 S T 2 3 の後に得られる核酸抽出液 6 2 中には、核酸抽出時に生じる夾雑物が含まれ、そのような夾雑物を含む状態で増幅工程に供される。しかしながら、増幅工程において、核酸 6 4 の増幅を阻害する主たる夾雑物 6 6 は生体由来の夾雑物であるため、抽出工程 S T 2 3 の前に精製工程 S T 2 2 を実施しても、増幅阻害を抑制する効果を得ることができる。

[0130] 但し、図 6～図 9 に示したように、精製工程は、抽出工程の後、もしくは途中で実施することが好ましい。精製工程において、抽出工程において生じた夾雑物 6 6 も除去可能であるので、増幅阻害を抑制する効果が高い。

[0131] 「カートリッジの変形例」

図 1 0 は、変形例のカートリッジ 1 1 を模式的に示す平面図である。図 1 に示すカートリッジ 1 0 と同様の構成要素には同一符号を付して、詳細な説明を省略する。

[0132] カートリッジ 1 1 は、第 1 収容部 1 6 と第 2 収容部 1 8 とを接続する第 1 流路 2 0 の途中に精製チャンバ 5 0 を備えている。第 1 流路 2 0 は第 1 収容部 1 6 と精製チャンバ 5 0 とを接続する第 1 流路第 1 部 2 0 a と、精製チャンバ 5 0 と第 2 収容部 1 8 とを接続する第 1 流路第 2 部 2 0 b とから構成されている。

[0133] 精製チャンバ 5 0 は、核酸抽出液 6 2 から夾雑物 6 6 を除去するための精製工程が実施されるチャンバである。本例において、精製チャンバ 5 0 内にゼオライト 6 が備えられている。すなわち、ゼオライト 6 は、カートリッジ 1 1 内に備えられている。そして、精製チャンバ 5 0 の第 1 流路第 2 部 2 0 b と接続する下流端に濾過フィルタ 7 が備えられている。

[0134] 図 1 に示した検査キット 1 において、漏斗 8 に濾過フィルタ 7 が備えられているが、本例においては、精製チャンバ 5 0 内に濾過フィルタ 7 が備えられている。本カートリッジ 1 1 を用いた場合、漏斗 8 に濾過フィルタ 7 は不要である。

- [0135] 図1に示すカートリッジ10を用いた場合、精製工程は、カートリッジ10に核酸抽出液62を添加する前に実施され、カートリッジ10には、精製済みの核酸抽出液62が投入される。これに対し、本カートリッジ11を備えた検査キットを用いる場合、抽出工程のみがカートリッジ11外で実施され、精製工程、増幅工程および検出工程がカートリッジ11内で実施される。
- [0136] 精製されていない核酸抽出液62がカートリッジ11に投入され、核酸抽出液62は、第1収容部16から第1流路第1部20aを経て精製チャンバ50に送液される。精製チャンバ50において核酸抽出液62は、ゼオライト6と混合され、核酸抽出液62中に夾雑物66がゼオライト6に吸着される。その後、核酸抽出液62は、濾過フィルタ7および第1流路第2部20bを介して第2収容部18に送液される。濾過フィルタ7において、核酸抽出液62は濾過され、ゼオライト6およびゼオライト6に吸着した夾雑物66は精製チャンバ50内に残され、精製された核酸抽出液62が第2収容部18に送液される。その後の増幅工程および検出工程は、カートリッジ10を用いた場合と同様である。
- [0137] 変形例のカートリッジ11を用いた場合にも、ノニオン系の界面活性剤を用いた抽出工程、および、特定の結晶構造を有するゼオライト6に夾雑物を吸着させて、夾雑物を除去する精製工程を含む核酸検査方法を実施することができる。したがって、増幅工程における検査対象の塩基配列の増幅の阻害を効果的に抑制することができ、特定の増幅方法に限定されることなく、従来よりも高い検査精度で核酸検査を実現できる。
- [0138] 既述の通り、カートリッジ11は、精製チャンバ50を備え、カートリッジ11内にゼオライト6および濾過フィルタ7を備えている。具体的には、カートリッジ11は、増幅用試薬収容部である第2収容部18とは異なる1つの収容部として、精製チャンバ50を備え、精製チャンバ50にゼオライト6を収容している。そして、精製チャンバ50から第2収容部18に至る流路中である、精製チャンバ50の端部に濾過フィルタ7を備えている。

[0139] 変形例のカートリッジ11によれば、精製工程をカートリッジ11内で実施できるので、検査を実施するユーザの手技による作業を少なくして、負担を軽減することができる。

実施例

[0140] 以下、本開示の技術のより具体的な実施例および比較例について説明する。

実施例および比較例では、核酸抽出工程において用いられる核酸抽出用試薬に含まれる界面活性剤、および、精製工程において夾雑物を吸着させる吸着剤の組み合わせを変化させた。表1および表2に示す実施例および比較例について、夾雑物の吸着性、核酸の吸着性、および、PCR増幅を実施した際の増幅率を評価した。

[0141] 実施例1～21において、界面活性剤はノニオン系界面活性剤とした。また、実施例1～21において、吸着剤は、フェライト、モデルナイト、L型およびY型のいずれかの構造を有するゼオライトとした。

実施例1～7においては、ゼオライトの結晶構造、カチオン種を異ならせた。

表1中のゼオライトの実施例8-11は、実施例2に対して、ゼオライトの濃度を異ならせた例である。実施例12-18は、実施例2に対して、界面活性剤の種類を異ならせた例であり、実施例19-21は界面活性剤の濃度を変化させた例である。

[0142] 表2に示す比較例1-3は、界面活性剤として、アニオン系界面活性剤を用いた例である。比較例4、5は、ゼオライトの構造が実施例のものと異なる。また、比較例6-14は、ゼオライト以外の吸着剤を用いた例である。比較例6-8は、吸着剤として、活性炭を用いており、活性炭の品番の項には各活性炭の特徴を記載している。具体的には、比較例6においては、シグマアルドリッチ社製の活性炭 greener alternative DARCO (登録商標), 12-20 mesh, granularを用い、比較例7においては、和光純薬社製の活性炭素(粉末, 中性)を用い、比較例8において、和光純薬社製の活性炭素(

粉末、アルカリ性)を用いた。

[0143] 表1中におけるゼオライトの細孔径 [$\times 10^{-1} \text{nm}$]、Si/Al比および比表面積 [m^2/g]は、いずれもメーカーの公称値である。表1中の「非開示」は、各吸着剤のメーカーにおいて公表されていないことを意味する。

[0144] 「吸着性評価」

(吸着剤による夾雑物の吸着性評価)

鼻腔内に存在する夾雑物としてリゾチームを用い、吸着剤によるリゾチームの吸着性を評価した。夾雑物としてのリゾチームを含む水溶液について、吸着剤を用いた精製を実施する前後におけるリゾチームの濃度の比を、吸着剤によるリゾチームの吸着率として求めた。

[0145] ーリゾチーム水溶液の調製ー

まず、下記の組成のリゾチーム水溶液を調製した。リゾチームと脱イオン蒸留水を秤量した後、ボルテックスミキサーで攪拌することによりリゾチーム水溶液を調製した。

ーリゾチーム水溶液の組成ー

リゾチーム、卵白由来(和光純薬社製) : 0.50g

脱イオン蒸留水

(ニッポンジーン社製、RNase/DNaseフリー) : 99.5g

[0146] ー吸着剤分散液調製ー

ゼオライトと水を秤量した後、ボルテックスミキサーで攪拌することにより吸着剤分散液を調製した。実施例1の吸着剤分散液であるゼオライト分散液1の組成は以下の通りである。各実施例および比較例において、ゼオライトもしくはその他の吸着剤(活性炭、スチレン系ポリマーまたはポリメタクリレート)と、脱イオン蒸留水との合計を0.85gとし、後記の混合液における吸着剤の濃度 [$\text{wt}/\text{vol}\%$]がそれぞれ表1に記載の値となるように、それぞれ吸着剤分散液を調製した。

[0147] ーゼオライト分散液1の組成ー

ゼオライトHS-320(和光純薬社製) : 0.075g

脱イオン蒸留水

(ニッポンジーン社製、R N a s e / D N a s e フリー) : 0. 7 7 5 g

[0148] ー吸着剤リゾチーム混合液の調製ー

次いで、リゾチーム水溶液と吸着剤分散液を混合することにより吸着剤リゾチーム混合液を調製した。吸着剤分散液に対して、前述のリゾチーム水溶液を添加した後、ボルテックスミキサーで攪拌することにより吸着剤リゾチーム混合液を調製した。実施例1の場合、下記重量比で、ゼオライト分散液1とリゾチーム水溶液を混合して、ゼオライトリゾチーム混合液1を調製した。その他の各実施例および比較例について、それぞれの吸着剤分散液とリゾチーム水溶液の重量比を、ゼオライトリゾチーム混合液1におけるゼオライト分散液とリゾチーム水溶液の重量比と同等とした。

[0149] ーゼオライトリゾチーム混合液1ー

ゼオライト分散液1 : 0. 8 5 g

リゾチーム水溶液 : 0. 1 5 g

[0150] 上記のようにして、リゾチーム水溶液と吸着剤分散液の混合液を作製後、混合液を10分間室温で静置した。その後、孔径0. 4 5 μ mのPES (polyethersulphone : ポリエーテルサルホン) 製シリンジフィルター (GVS社製) をセットしたテルモシリンジ (登録商標) ロック基 (テルモ社製、容量2. 5 mL) 内に混合液を添加し、手操作で濾過することにより精製処理を行った。

[0151] Qubit Protein Assays (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて吸着剤リゾチーム混合液の精製処理前後のリゾチーム濃度を測定した。具体的には、シリンジに添加する前の吸着剤リゾチーム混合液におけるリゾチーム濃度D0を測定し、吸着剤リゾチーム混合液を濾過して精製処理を行った後の溶液中におけるリゾチーム濃度D1を測定した。そして、 $(D0 - D1) / D0$ を吸着率として算出した。

[0152] 吸着性の判定は以下の基準で実施した。

A : 吸着率が80%以上

B：吸着率が50%以上80%未満

C：吸着率が20%以上50%未満

D：20%未満

実用上、C以上の吸着性が求められる。

[0153] (吸着剤による核酸の吸着性評価)

インフルエンザウイルスから抽出された核酸を用いて、下記の手順で核酸の吸着剤への吸着性を評価した。

[0154] リアルタイムPCR装置 (BioRad社製CFX96) を用いた検量線法によりゼオライト精製前後の核酸のコピー数の比を算出し、透過率とした。透過率が高いほど、吸着率が低いことを意味する。核酸は、吸着剤に吸着されず、精製処理の濾過工程において、フィルタを通過する率 (透過率) が高いことが望ましい。

[0155] まず、AmpliRun Influenza A H1 RNA Control (Virce社製) を250Copy/ μ Lに希釈した核酸水溶液を調製した。

[0156] 次に、核酸水溶液中の吸着剤の濃度が表1に示す吸着剤の濃度の値となるように、吸着剤と核酸水溶液を秤量し、ボルテックスミキサーで核酸水溶液中に吸着剤を分散させた。その後、吸着剤を分散させた核酸水溶液を10分間室温で静置した。さらにその後、この溶液を、孔径0.45 μ mのPE S製シリンジフィルター (GVS社製) をセットしたテルモシリンジ (登録商標) ロック基 (テルモ社製、容量2.5mL) 内に添加し、手操作で濾過することにより精製処理を行った。

[0157] 下記の組成のPCR反応液を調製し、前述の手順で精製した核酸水溶液を添加してRT-PCRを行った。

[0158] また、本評価のため、下記濃度のAmpliRun Influenza A H1 RNA Control (Virce社製) を用いてRT-PCRを行い、核酸コピー数とCt値の検量線を作成した。具体的には、1000Copy/ μ L、500Copy/ μ L、250Copy/ μ L、100Copy/ μ L、50Copy/ μ L、25Copy/ μ L、10Copy/ μ L、5Copy/ μ Lのそれ

それぞれの濃度の核酸水溶液を調製した。各濃度の核酸水溶液について、それぞれRT-PCRを実施し、Ct値を測定した。この結果に基づいて、Ct値と、濃度（すなわち、核酸コピー数）の関係を示す検量線を作成した。

[0159] – PCR反応液の組成 –

| | |
|---|--------|
| One Step PrimeScript RT-qPCR Mix(2×) (タカラバイオ社製) | 10 μL |
| 10 μM フォワードプライマー | 1.2 μL |
| 10 μM リバースプライマー | 1.2 μL |
| 5 μM プローブ | 0.4 μL |
| 核酸水溶液 | 1.0 μL |
| 脱イオン蒸留水 (ニッポンジーン社製、RNase/DNaseフリー) | 6.2 μL |

T o t a l 20 μL

[0160] プライマーおよびプローブとしては、国立感染研究所から公開されているA型同定用の配列（国立感染研究所が公開しているインフルエンザ診断マニュアルに開示されている配列）を参照し、MP-39-67 For、MP-183-153 Rev、MP-96-75 Probe Asとして公開された以下の配列を有するプライマーとプローブを合成した。

- ・フォワードプライマー：CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC（配列番号1）
- ・リバースプライマー：TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA（配列番号2）
- ・プローブ：ATYTGGCTTTGAGGGGGCCTG（配列番号3）

上記プローブ配列（配列番号3）の5'末端側にFAM（5'-Fluorescein CE-Phosphoramidite）を、3'末端側にMGB（Minor Groove Binder）とクエンチャーとしてNFQ（Non Fluorescent Quencher）を結合させたものプローブとして使用した。

[0161] RT-PCRの条件は以下の通りとした。

逆転写：50℃、2分⇒95℃、5分

PCR : 95℃、5秒⇔56℃、10秒、を50サイクル

[0162] 250 Copyの核酸を含む核酸水溶液に吸着剤を添加した後、精製して得られた精製後の核酸水溶液を用いて、上記RT-PCRを実施し、Ct値を測定した。得られたCt値を前述の検量線に照らし合わせて、精製後の核酸水溶液についての核酸コピー数C1を求めた。精製前のPCR反応場に存在する核酸コピー数C0は250 Copyである。精製前後の核酸コピー数の比C1/C0を透過率とした。

[0163] 吸着剤への核酸吸着性を、以下の基準で評価した。

A : 透過率が70%以上

B : 透過率が20%以上70%未満

C : 透過率が20%未満、もしくは増幅せず精製後の核酸でCt値が算出されない。

実用上、B以上の性能が求められる。

[0164] 「増幅性評価」

鼻腔内に存在する夾雑物としてリゾチーム、検体としてInfluenzaから抽出された核酸、および界面活性剤を含む検体模擬液を調製し、下記の手順でリアルタイムPCR装置（BioRad社製CFX96）にて核酸の増幅性を評価した。

[0165] ー検体模擬液の調製ー

各実施例および比較例について、それぞれ表1あるいは表2に示す界面活性剤を含む検体模擬液を調製した。実施例1に用いた検体模擬液1の組成は以下の通りである。実施例1の場合、下記に示す各溶液をボルテックスミキサーで攪拌することにより検体模擬液1を調製した。実施例2～11および比較例4～14は、実施例1と同じ検体模擬液1を用いた。なお、実施例12～21および比較例1～3については、界面活性剤以外の成分は検体模擬液1と共通とし、界面活性剤をそれぞれ表1に示す界面活性剤に置き換え、表1に示す界面活性剤濃度[vol%]となるように調製した。

[0166] ー検体模擬液1の組成ー

核酸 : AmpliRun Influenza A H1 RNA Control (1000 Copy/μL)

| | |
|--|----------|
| | 12.0 μL |
| リゾチーム（1%水希釈液） | 10.2 μL |
| 界面活性剤：Tween 20（5%水希釈液） （精製時の濃度0.5 vol%） | 24.2 μL |
| 水 | 195.6 μL |

[0167] 次いで、表1に記載の吸着剤（実施例1では、ゼオライト）および検体模擬液を表1に記載の濃度 [wt / vol%] となるように秤量し、ボルテックスミキサーで攪拌した。実施例1の場合、ゼオライトを0.0073 g 秤量し、検体模擬液を96.8 μL 添加して、ボルテックスミキサーで攪拌した。実施例1では、0.0073 g / 0.0968 ml ÷ 7.5 [wt / vol%] の濃度とした。ボルテックスミキサーで攪拌した後、10分間室温で静置した。その後、孔径0.45 μm のPES製シリンジフィルター（GVS社製）をセットしたテルモシリンジ（登録商標）ロック基（テルモ社製、容量2.5 mL）内に吸着剤が分散された検体模擬液を添加し、手操作にて濾過することにより精製処理を行った。

[0168] 次いで、下記の組成のPCR反応液を調製し、前述の精製処理を行った検体模擬液を用いてRT-PCRを行った。

[0169] ー PCR反応液の組成 ー

| | |
|--------------------------------------|--------|
| One Step PrimeScript RT-qPCR Mix(2×) | |
| （タカラバイオ社製） | 10 μL |
| 10 μM フォワードプライマー | 1.2 μL |
| 10 μM リバースプライマー | 1.2 μL |
| 5 μM プローブ | 0.4 μL |
| 検体模擬液 | 7.2 μL |
| ----- | |
| T o t a l | 20 μL |

[0170] プライマーおよびプローブとしては、核酸の吸着性の評価の場合と同様に、国立感染研究所から公開されているA型同定用の配列を参照し、MP-3

9-67 For、MP-183-153 Rev、MP-96-75 Probe Asとして公開された以下の配列を有するプライマーとプローブを合成した。

- ・フォワードプライマー：CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC（配列番号1）
- ・リバースプライマー：TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA（配列番号2）
- ・プローブ：ATYTGGGCTTTGAGGGGGCCTG（配列番号3）

上記プローブ配列（配列番号3）の5'末端側にFAM（5'-Fluorescein CE-Phosphoramidite）を、3'末端側にMGB（Minor Groove Binder）とクエンチャーとしてNFQ（Non Fluorescent Quencher）を結合させたものをプローブとして使用した。

[0171] RT-PCRの条件は以下の通りとした。

逆転写：60℃、1分⇒95℃、1分

PCR：95℃、1秒⇔60℃、6秒を50サイクル

[0172] RT-PCR後に得られた増幅曲線に対するCt値に対して以下の基準で判定した。

4：Ct値35以下

3：Ct値35より大きく37以下

2：Ct値37より大きく40以下

1：40より大きい

Ct値は小さいほど好ましく、実用上Ct値としては40以下（判定2以上）の性能が求められる。

[0173] 表1に実施例についての界面活性剤、吸着剤の条件および評価結果を纏めて示す。また、表2に比較例についての界面活性剤、吸着剤の条件および評価結果を纏めて示す。

[表1]

| | 界面活性剤 | | | | 吸着剤 | | | | | 吸着評価値 | | | | | |
|-------|-------|-------------|--|---------------|------|--------|------|------------------------------|------------------|------------------------------|------|-----------------------------|------|----|--------------|
| | 種別 | 品番 | 構造 | 濃度 [vol.%] | 種別 | 品番 | 結晶構造 | カチオン | 濃度 [wt/vol.%] | 細孔径 $\times 10^{-1}$ [nm] | S/Al | 比表面積 [m ² /g] | 分子-△ | 核酸 | PCR 増幅評価値 |
| 実施例1 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | H ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 550 | A | A | 3 |
| 実施例2 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例3 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-341 | Y型 | NH ₄ ⁺ | 7.5 | 9 | 7 | 700 | C | B | 2 |
| 実施例4 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-720 | Z型 | K ⁺ | 7.5 | 4.8 | 18 | 170 | A | A | 4 |
| 実施例5 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-642 | Z型 | Na ⁺ | 7.5 | 7 | 18 | - | B | A | 3 |
| 実施例6 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-690 | Z型 | H ⁺ | 7.5 | 7 | 240 | 450 | B | A | 2 |
| 実施例7 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-500 | L型 | K ⁺ | 7.5 | 8 | 7 | 700 | A | A | 4 |
| 実施例8 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 0.1 | 9 | 5.5 | 660 | C | A | 2 |
| 実施例9 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 0.5 | 9 | 5.5 | 660 | B | A | 3 |
| 実施例10 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 2.0 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例11 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 15.0 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例12 | ノニ> | Brij35 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例13 | ノニ> | Brij58 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例14 | ノニ> | Brij98 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例15 | ノニ> | TritonX-100 | フェニル ⁺ リン酸 [*] | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例16 | ノニ> | MEGA-8 | グリセ ⁺ | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 3 |
| 実施例17 | ノニ> | CHAPS | グリセ ⁺ | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 3 |
| 実施例18 | ノニ> | CHAPSO | グリセ ⁺ | 0.5 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 3 |
| 実施例19 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 0.1 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例20 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 1.0 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |
| 実施例21 | ノニ> | Tween20 | ネ ⁺ トリポ ⁺ リン酸 [*] | 2.0 | セライト | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 4 |

[表2]

| 比較例 | 界面活性剤 | | | | 吸着剤 | | | | | | 吸着評価 | | PCR 増強評価 | |
|-------|-------|---------|-------------|-------|-----------------|-------|----------------------------------|-------------|---------------------------|-------|-----------------------------|------------|-------------|----|
| | 種類 | 品番 | 濃度 [wt%] | 種類 | 品番 | 結晶構造 | カチオン | 濃度 [wt%] | 細孔径 $\times 10^2$ [nm] | Si/Al | 比表面積 [m ² /g] | メソ- マクロ | | 格納 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 比較例1 | ノニオン | SDS | 7.5 | 球状イオン | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 1 |
| 比較例2 | ノニオン | コニールNa | 7.5 | 球状イオン | HS-320 | Y型 | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 1 |
| 比較例3 | ノニオン | SDS | 7.5 | 球状イオン | HS-642 | 球状イオン | Na ⁺ | 7.5 | 9 | 5.5 | 660 | A | A | 1 |
| 比較例4 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | モルデナイト | A型 | Na ⁺ , K ⁺ | 7.5 | 3 | 1 | 非開示 | D | / | 1 |
| 比較例5 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | モルデナイト | X型 | Na ⁺ | 7.5 | 10 | 1.2 | 非開示 | D | / | 1 |
| 比較例6 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | ゼオライト | / | / | 7.5 | 非開示 | / | / | D | C | 1 |
| 比較例7 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | 中性 | / | / | 7.5 | 非開示 | / | / | A | C | 1 |
| 比較例8 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | 7%が性 | / | / | 7.5 | 非開示 | / | / | A | C | 1 |
| 比較例9 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | XAD-4 | / | / | 7.5 | 40 | / | 725 | D | / | 1 |
| 比較例10 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | Dowex L-493 | / | / | 7.5 | 46 | / | 1100 | D | / | 1 |
| 比較例11 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | Sepabeads SP850 | / | / | 7.5 | 76 | / | 1000 | D | / | 1 |
| 比較例12 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | Sepabeads SP700 | / | / | 7.5 | 90 | / | 1200 | D | / | 1 |
| 比較例13 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | Dialon HP-20 | / | / | 7.5 | 520 | / | 600 | D | / | 1 |
| 比較例14 | ノニオン | Tween20 | 7.5 | 球状イオン | Dialon HP-2MG | / | / | 7.5 | 340 | / | 470 | D | / | 1 |

[0174] 表1 および表2 に示す通り、実施例1～21は、ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬を用い、かつ、フェリエライト、モルデナイト、L型および

Y型のいずれかの結晶構造を有するゼオライトを用いた例である。実施例1～21は、夾雑物（ここではリゾチーム）の吸着性がC以上と高く、核酸の透過率がB以上と高く、すなわち核酸の吸着率が低く、かつ、核酸の増幅性が2以上と高く、実用上の性能を満たす結果が得られた。

[0175] アニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬を用いた比較例1～3は、吸着評価では、良好な結果が得られたにも拘わらず、核酸の増幅性が低かった。これは、アニオン系界面活性剤が核酸の増幅を阻害していることを示す結果と考えられる。

[0176] ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬を用いているが、A型あるいはX型のゼオライト、もしくはゼオライトではない吸着剤を用いた比較例4～14は、いずれも夾雑物の吸着性が低い、あるいは核酸を吸着してしまい、結果として、増幅性が低かった。

[0177] ゼオライトのカチオン種のみを変更した実施例1～3の評価結果によれば、カチオン種としては、 H^+ 、 Na^+ が、 NH_4^+ よりも吸着性評価が良好である。

[0178] ゼオライトの結晶構造のみが異なる実施例2、および実施例4～7の評価結果によれば、フェリエライト、L型およびY型がモルデナイトよりも夾雑物の吸着性が良好である。

[0179] 核酸抽出液（実施例における模擬検体液）中に添加したゼオライトの濃度のみが異なる実施例2、および実施例8～11の評価結果によれば、少なくともゼオライトの濃度が $0.1\text{ wt/vol}\%$ ～ $15.0\text{ wt/vol}\%$ の範囲で、夾雑物の吸着性の効果が得られた。吸着性の観点から、ゼオライトの濃度は、 $0.5\text{ wt/vol}\%$ 以上が好ましく、 $2\text{ wt/vol}\%$ 以上がより好ましい。

[0180] 抽出用試薬に用いられるノニオン系界面活性剤の種類（もしくは品番）のみが異なる実施例2、および実施例12～18の評価結果によれば、ポリエチレンオキシドが、他のノニオン系界面活性剤よりも増幅性阻害抑制の効果が高く、好ましい。

[0181] 核酸抽出液（実施例における模擬検体液）中の界面活性剤濃度のみが異なる実施例 2、および実施例 19～21 の評価結果によれば、界面活性剤濃度が 0.5 v o l %～2.0 v o l % の範囲で、ほぼ同等の効果が得られた。

[0182] 2021 年 11 月 25 日に出願された日本国特許出願 2021-191592 号の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] 生体から採取した検体に含まれる核酸の中に、検査対象の塩基配列が存在するか否かを検査する核酸検査方法であって、
前記検体から前記核酸を抽出する抽出工程と、
前記抽出工程の前、途中および後のいずれかの段階で、前記検体を
含む溶液および前記核酸が抽出された核酸抽出液のいずれかの液体内
の夾雑物を除去する精製工程と、
前記核酸抽出液内の前記塩基配列を増幅する増幅工程と、
前記増幅工程の後に、前記塩基配列の有無を検出する検出工程とを
含み、
前記抽出工程は、前記検体を、ノニオン系界面活性剤を含む抽出用
試薬と接触させる工程であり、
前記精製工程は、前記液体を、フェリエライト、モルデナイト、L
型およびY型のいずれかの結晶構造を有するゼオライトと接触させる
ことにより、前記液体内の夾雑物を前記ゼオライトに吸着させる吸着
工程を含む、核酸検査方法。
- [請求項2] 前記精製工程は、前記吸着工程の後に、前記液体を濾過して前記液
体内から前記ゼオライトを除去する濾過工程を含む、請求項1に記載
の核酸検査方法。
- [請求項3] 前記抽出工程において、前記抽出用試薬中に前記ゼオライトを添加
することにより、前記抽出工程と前記精製工程とを並行して行う、請
求項1または2に記載の核酸検査方法。
- [請求項4] 前記抽出工程の後に、前記精製工程を行う、請求項1または2に記
載の核酸検査方法。
- [請求項5] 前記ノニオン系界面活性剤が、ポリエチレンオキシド、グルカミン
およびベタインのうち少なくとも1種を含む、請求項1から4のい
ずれか1項に記載の核酸検査方法。
- [請求項6] 前記ゼオライトの結晶構造が、フェリエライト、L型およびY型の

うちのいずれかである、請求項1から5のいずれか1項に記載の核酸検査方法。

[請求項7] 前記ゼオライトのカチオンが Na^+ 、 K^+ 、および H^+ のいずれかである、請求項1から6のいずれか1項に記載の核酸検査方法。

[請求項8] 前記ゼオライトの細孔径が、 0.7 nm より大きく、 1 nm より小さい、請求項1から5のいずれか1項に記載の核酸検査方法。

[請求項9] 前記ゼオライトのシリコンとアルミニウムとの比 Si/Al が、5以上、18以下である、請求項1から8のいずれか1項に記載の核酸検査方法。

[請求項10] 前記増幅工程はポリメラーゼ連鎖反応による増幅工程である、請求項1から9のいずれか1項に記載の核酸検査方法。

[請求項11] 生体から採取した検体に含まれる核酸の中に、検査対象の塩基配列が存在するか否かの検査に用いられる検査キットであって、

ノニオン系界面活性剤を含む抽出用試薬を収容する抽出容器、および

前記核酸の増幅に用いられる増幅用試薬を収容する増幅用試薬収容部を含む複数の収容部と、前記複数の収容部間を接続する複数の流路とを備えたカートリッジ、

を含む核酸検査用の検査キットであって、

前記抽出容器および前記カートリッジの少なくとも一方に、あるいは、前記抽出容器に投入可能な態様でフェリエライト、モルデナイト、L型およびY型のいずれかの結晶構造を有するゼオライトを備えた、検査キット。

[請求項12] 核酸抽出液を濾過するフィルタであって、前記ゼオライトよりも目の細かいフィルタを備えた、請求項11に記載の検査キット。

[請求項13] 前記フィルタは、前記カートリッジ内もしくは前記カートリッジとは別に備えられている、請求項12に記載の検査キット。

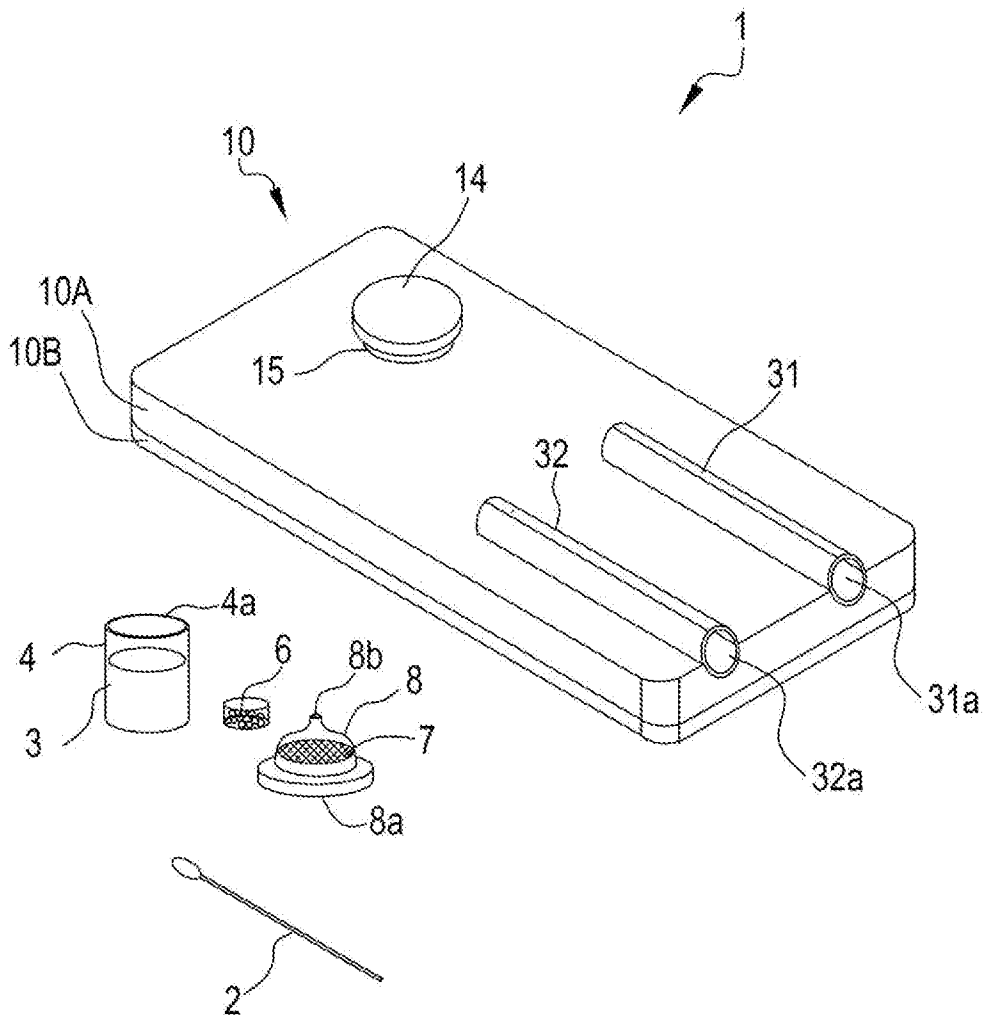
[請求項14] 前記フィルタは、前記抽出容器中の液体を前記カートリッジに投入

するまでの経路中または前記カートリッジの前記液体の投入口に備えられている、請求項13に記載の検査キット。

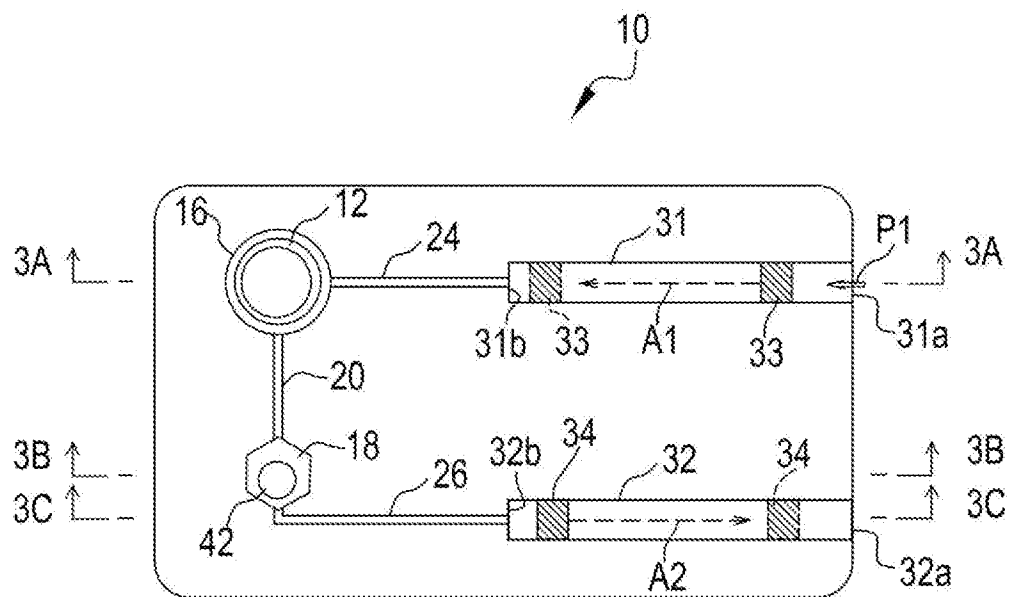
[請求項15] 前記カートリッジが、前記複数の収容部のうちの前記増幅用試薬収容部とは異なる1つの収容部に前記ゼオライトを収容し、前記ゼオライトが収容された前記収容部から前記増幅用試薬収容部に至る流路中に、前記フィルタを備えた、請求項13に記載の検査キット。

[請求項16] 前記カートリッジが、
液体を投入する投入口と、
前記投入口を覆う着脱可能な蓋部と、
前記投入口に対向する位置に設けられた、液体を収容可能な第1収容部と、
前記増幅用試薬を収容する前記増幅用試薬収容部である第2収容部と、
前記第1収容部と前記第2収容部とを接続する第1流路と、
第2流路を介して前記第1収容部に一端が接続された第1シリンダであって、他端が外部に開口した第1シリンダと、
第3流路を介して前記第2収容部に一端が接続された第2シリンダであって、他端が外部に開口した第2シリンダと、
前記第1シリンダ内を移動可能に備えられた第1栓と、
前記第2シリンダ内を移動可能に備えられた第2栓とを備え、
前記第1栓および前記第2栓を外部から押圧して移動させることにより、前記第1収容部、前記第2収容部、前記第1流路、前記第2流路および前記第3流路を含む内部空間を加圧可能な容器であって、
前記第1収容部および前記第2収容部はいずれも前記複数の収容部の1つであり、
前記第1流路、前記第2流路および前記第3流路は、いずれも前記複数の流路の1つである、請求項11から15のいずれか1項に記載の検査キット。

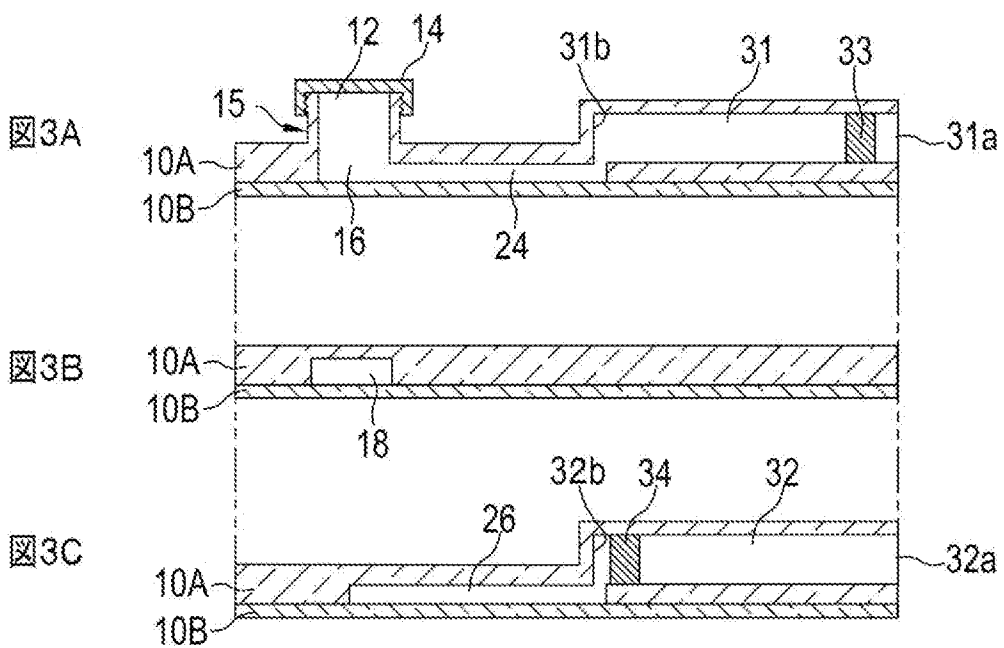
[図1]



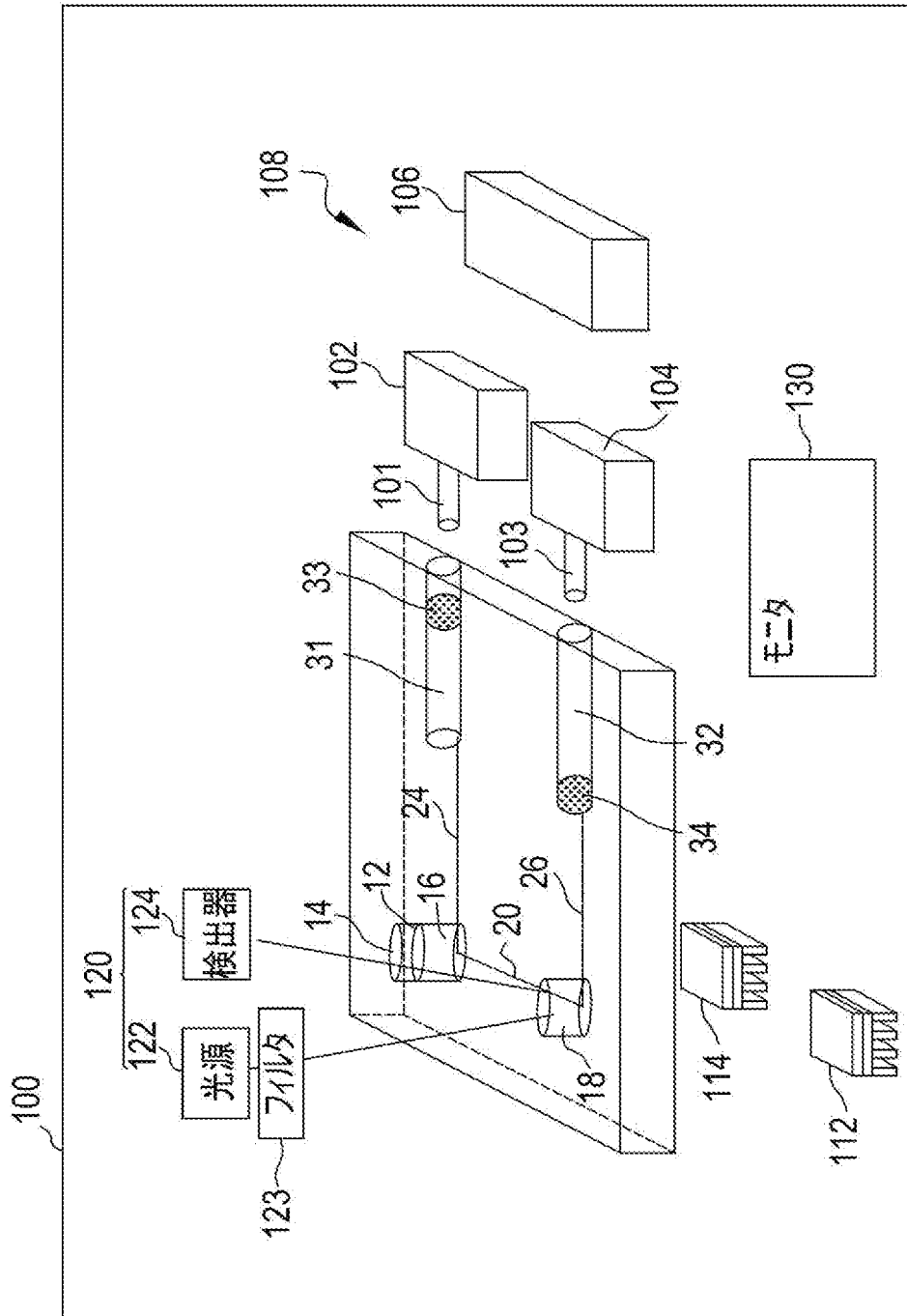
[図2]



[図3]



[図4]



[図5]

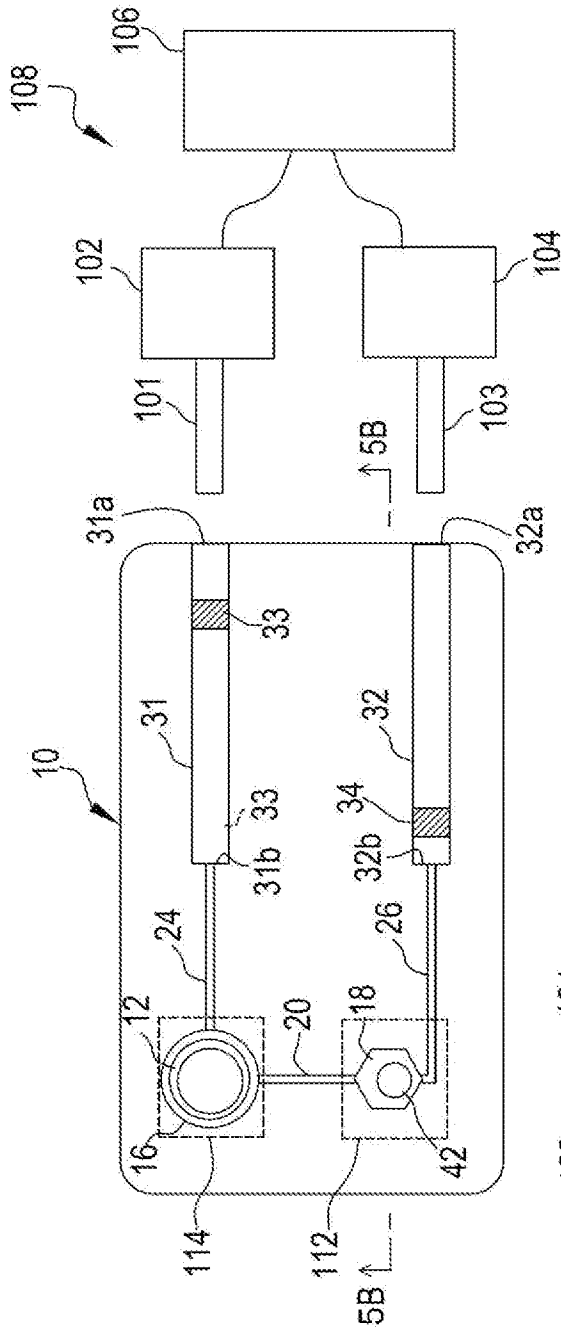


図5A

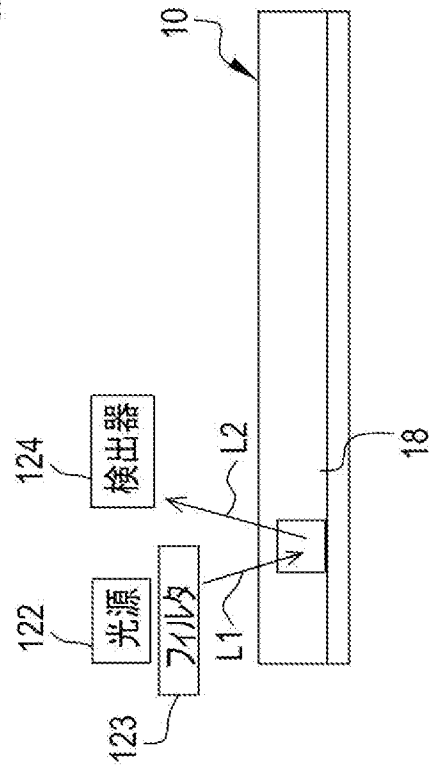
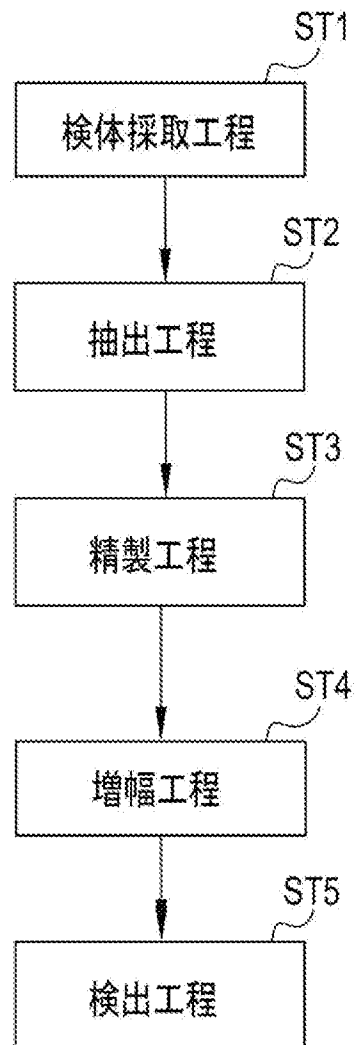
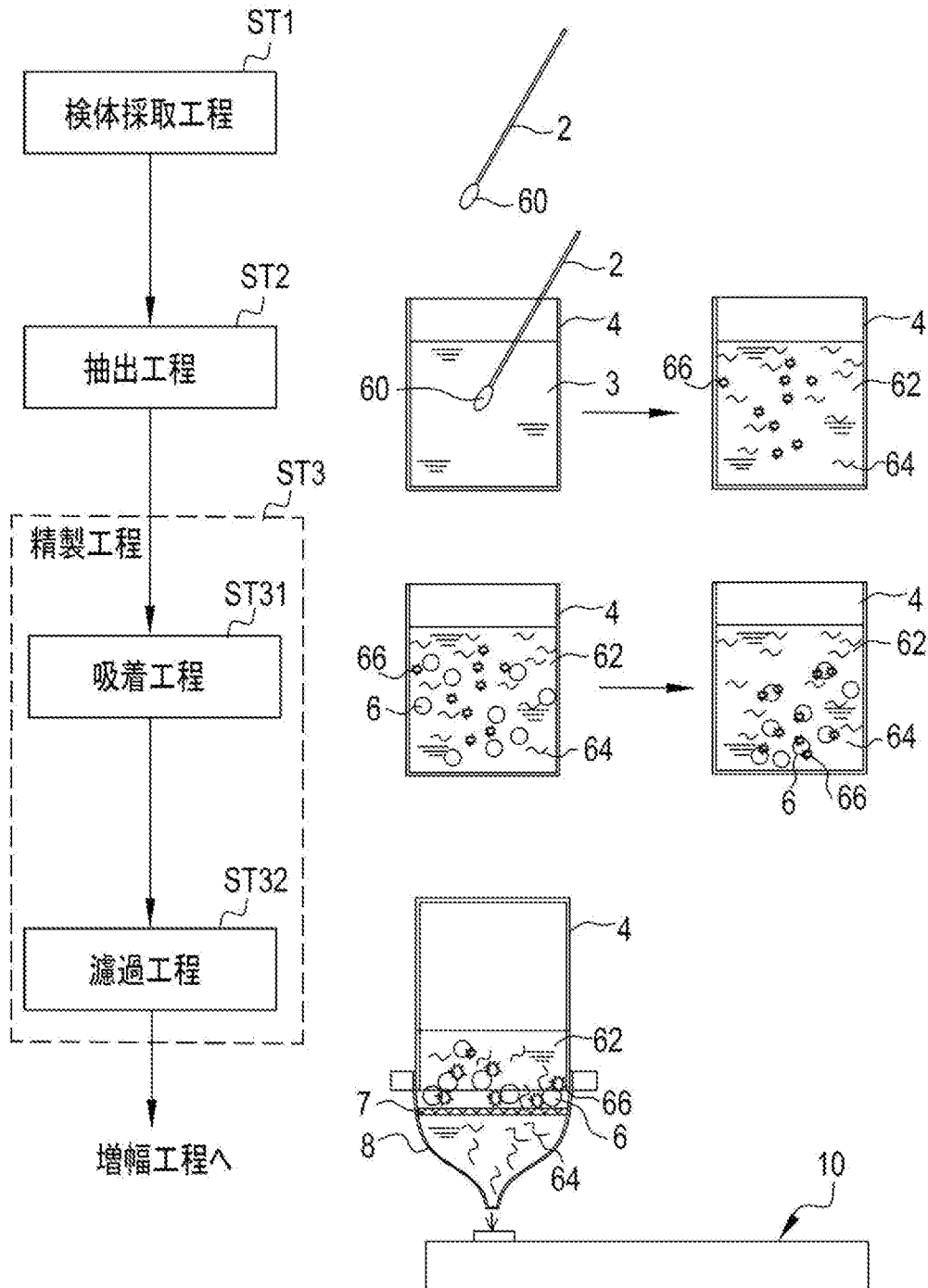


図5B

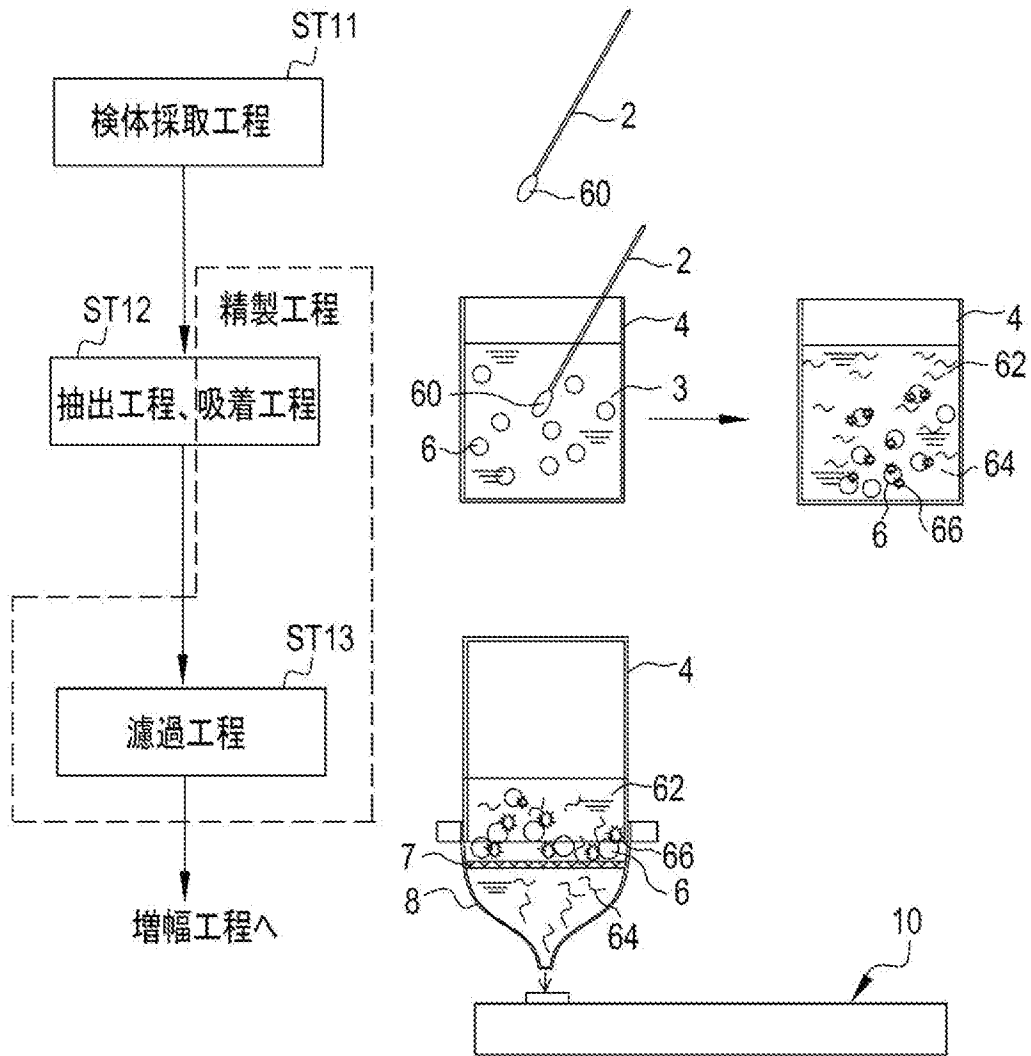
[図6]



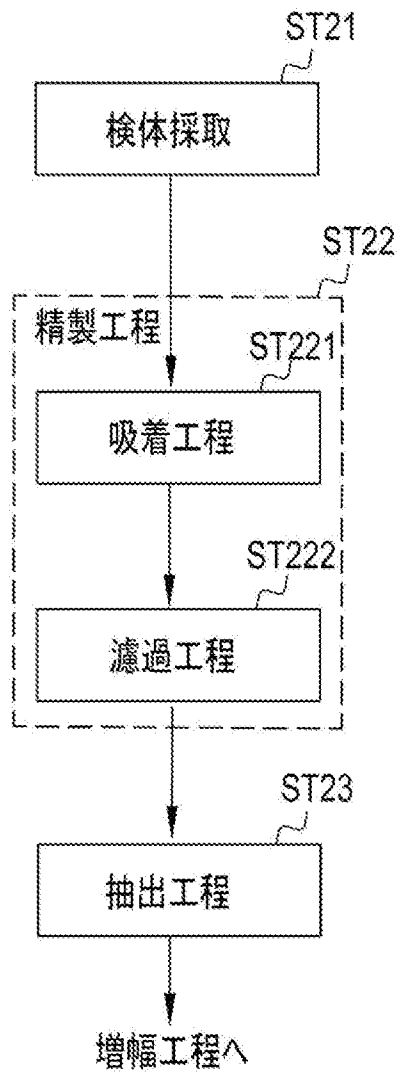
[図7]



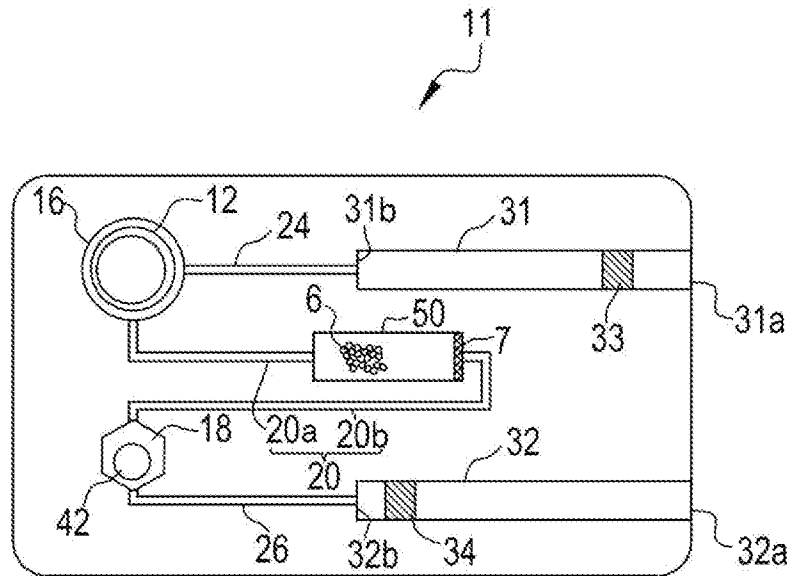
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/042617

| | | |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| <p><i>C12N 15/10</i>(2006.01)i; <i>C12Q 1/6806</i>(2018.01)i; <i>C12Q 1/6844</i>(2018.01)i; <i>C12Q 1/6851</i>(2018.01)i; <i>C12Q 1/686</i>(2018.01)i; <i>C12M 1/00</i>(2006.01)i; <i>C12M 1/12</i>(2006.01)i</p> <p>FI: C12Q1/6806 Z ZNA; C12N15/10 100Z; C12N15/10 110Z; C12N15/10 120Z; C12Q1/6844 Z; C12Q1/686 Z; C12Q1/6851 Z; C12M1/00 A; C12M1/12</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p> | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| C12N15/00-15/90; C12Q1/00-3/00; C12M1/00-3/10 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| <p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2023</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2023</p> | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | JP 2017-192341 A (KUJI, Tomoaki) 26 October 2017 (2017-10-26) paragraphs [0043]-[0098], fig. 1-5 | 1-16 |
| Y | 非イオン界面活性剤のPCR阻害抑制効果を用いたクリプトスポリジウムDNAの検出, 水環境学会誌, 2008, vol. 31, no. 9, pp. 565-568, non-official translation (Detection of Cryptosporidium DNA using PCR inhibitory effect of nonionic surfactant. Journal of Japan Society on Water Environment.) pp. 565-568 | 1-16 |
| Y | WO 2009/060847 A1 (EIKEN KAGAKU KK) 14 May 2009 (2009-05-14) paragraphs [0013]-[0015], [0071], [0072] | 1-16 |
| Y | JP 2009-82105 A (SHIMANE PREF. GOV.) 23 April 2009 (2009-04-23) paragraph [0020] | 1-16 |
| Y | JP 2007-117997 A (TORAY IND., INC.) 17 May 2007 (2007-05-17) paragraphs [0025]-[0027] | 1-16 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 27 January 2023 | | 07 February 2023 |
| Name and mailing address of the ISA/JP | | Authorized officer |
| Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan | | |
| | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/042617

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | JP 2013-21959 A (SONY CORP.) 04 February 2013 (2013-02-04) entire text | 1-16 |
| A | WO 2013/038604 A1 (SONY CORP.) 21 March 2013 (2013-03-21) entire text | 1-16 |
| A | JP 2014-30392 A (NGK INSULATORS LTD.) 20 February 2014 (2014-02-20) entire text | 1-16 |
| A | JP 2007-135504 A (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC INC.) 07 June 2007 (2007-06-07) entire text | 1-16 |

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 13ter.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 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/042617

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|-------------|----|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| JP | 2017-192341 | A | 26 October 2017 | (Family: none) | |
| WO | 2009/060847 | A1 | 14 May 2009 | US 2011/0015379 A1 | |
| | | | | paragraphs [0013]-[0015], [0096], [0097] | |
| | | | | EP 2218791 A1 | |
| | | | | CN 101849024 A | |
| JP | 2009-82105 | A | 23 April 2009 | (Family: none) | |
| JP | 2007-117997 | A | 17 May 2007 | (Family: none) | |
| JP | 2013-21959 | A | 04 February 2013 | US 2013/0020201 A1 | |
| | | | | whole sentence | |
| | | | | CN 102888394 A | |
| WO | 2013/038604 | A1 | 21 March 2013 | US 2014/0197107 A1 | |
| | | | | whole sentence | |
| | | | | EP 2757156 A1 | |
| | | | | CN 103781907 A | |
| JP | 2014-30392 | A | 20 February 2014 | (Family: none) | |
| JP | 2007-135504 | A | 07 June 2007 | (Family: none) | |

| | | |
|---|--|--------------------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/10(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/12(2006.01)i FI: C12Q1/6806 Z ZNA; C12N15/10 100Z; C12N15/10 110Z; C12N15/10 120Z; C12Q1/6844 Z; C12Q1/686 Z; C12Q1/6851 Z; C12M1/00 A; C12M1/12 | | |
| 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; C12Q1/00-3/00; C12M1/00-3/10 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| Y | JP 2017-192341 A (久慈 知明) 26.10.2017 (2017-10-26) [0043]-[0098], [図1]-[図5] | 1-16 |
| Y | 非イオン界面活性剤のPCR阻害抑制効果を用いたクリプトスポリジウムDNAの検出, 水 環境学会誌, 2008, Vol. 31, No.9, pp. 565-568 pp. 565-568 | 1-16 |
| Y | WO 2009/060847 A1 (栄研化学株式会社) 14.05.2009 (2009-05-14) [0013]-[0015], [0071]-[0072] | 1-16 |
| Y | JP 2009-82105 A (島根県) 23.04.2009 (2009-04-23) [0020] | 1-16 |
| Y | JP 2007-117997 A (東レ株式会社) 17.05.2007 (2007-05-17) [0025]-[0027] | 1-16 |
| A | JP 2013-21959 A (ソニー株式会社) 04.02.2013 (2013-02-04) 全文 | 1-16 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的な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 | 27.01.2023 | 国際調査報告の発送日 07.02.2023 |
| 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） 中村 俊之 4N 5576 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | |

| C. 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------|--|----------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| A | WO 2013/038604 A1 (ソニー株式会社) 21.03.2013 (2013 - 03 - 21) 全文 | 1-16 |
| A | JP 2014-30392 A (日本碍子株式会社) 20.02.2014 (2014 - 02 - 20) 全文 | 1-16 |
| A | JP 2007-135504 A (コニカミノルタエムジー株式会社) 07.06.2007 (2007 - 06 - 07) 全文 | 1-16 |

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:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

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/JP2022/042617

| 引用文献 | 公表日 | パテントファミリー文献 | 公表日 |
|-------------------|------------|---|-----|
| JP 2017-192341 A | 26.10.2017 | (ファミリーなし) | |
| WO 2009/060847 A1 | 14.05.2009 | US 2011/0015379 A1 [0013]-[0015], [0096]- [0097] EP 2218791 A1 CN 101849024 A | |
| JP 2009-82105 A | 23.04.2009 | (ファミリーなし) | |
| JP 2007-117997 A | 17.05.2007 | (ファミリーなし) | |
| JP 2013-21959 A | 04.02.2013 | US 2013/0020201 A1 whole sentence CN 102888394 A | |
| WO 2013/038604 A1 | 21.03.2013 | US 2014/0197107 A1 whole sentence EP 2757156 A1 CN 103781907 A | |
| JP 2014-30392 A | 20.02.2014 | (ファミリーなし) | |
| JP 2007-135504 A | 07.06.2007 | (ファミリーなし) | |