

(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3月10日(10.03.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/050141 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/686 (2018.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12Q 1/689 (2018.01) *G01N 33/569* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/031095

(22) 国際出願日: 2021年8月25日(25.08.2021)

(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 2020-149336 2020年9月4日(04.09.2020) 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: 寺内 謙太 (**TERAUCHI Kenta**);
〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24号 東
洋紡株式会社内 Fukui (JP). 川井 千恵(**KAWAI**
Chie); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番
24号 東洋紡株式会社内 Fukui (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:** RESPIRATORY INFECTION TESTING METHOD USING MULTIPLEX PCR

(54) 発明の名称: マルチプレックスPCRによる呼吸器感染症の検査方法

(57) **Abstract:** A purpose of the present invention is to provide a testing method that uses improved multiplex PCR, the method being excellent in workability and capable of detecting, simply and with high sensitivity, target nucleic acids derived from a plurality of pathogenic microorganisms which can cause respiratory infections. The present invention provides a method for using one PCR reaction solution to test for the presence or absence of target nucleic acids derived from two or more pathogenic microorganisms that cause respiratory infections in samples, the method including the following steps: (1) a step for mixing a sample in which nucleic acids have not been isolated, and a PCR reaction solution including a DNA polymerase that is resistant to impurities; (2) a step for conducting a PCR reaction after closing the reaction vessel; and (3) a step for detecting two or more target nucleic acids by using two or more fluorescent compounds.

(57) 要約: 作業性に優れ、簡便でありながら高感度に呼吸器感染症を引き起こし得る複数の病原性微生物に由来するターゲット核酸を検出できる、改良されたマルチプレックスPCRによる検査方法を提供することを目的とする。本発明は、以下の工程を含む、試料中の呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸の有無を1つのPCR反応液で検査する方法を提供する: (1) 核酸の単離処理をおこなっていない試料と、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼを含むPCR反応液とを混合する工程、(2) 反応容器を密閉後、PCR反応を実施する工程; 及び(3) 2種類以上の蛍光化合物により、2以上のターゲット核酸の検出を行う工程。

WO 2022/050141 A1

明 細 書

発明の名称：

マルチプレックスPCRによる呼吸器感染症の検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸増幅によるウイルスなどの呼吸器感染症の病原性微生物由来の核酸の検出法に関する。より具体的には、試料から事前に核酸を単離精製することなく、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応の反応液を加えることによる病原性微生物由来の核酸の検出に関する。本発明の方法は、例えば、咽頭及び鼻腔ぬぐい液試料、唾液および喀痰試料、うがい液、涙液、血液試料、糞便試料、環境拭き取り試料等における2つ以上の病原性微生物由来の核酸を検出することが可能である。本発明は、生命科学研究、臨床診断や食品衛生検査、環境検査等にも利用できる。

背景技術

[0002] 核酸増幅法は数コピーの標的核酸を可視化可能なレベル、すなわち数億コピー以上に増幅する技術であり、生命科学研究分野のみならず、遺伝子診断、臨床検査といった医療分野、あるいは、食品や環境中の微生物検査等においても、広く用いられている。代表的な核酸増幅法は、PCR (Polymerase Chain Reaction) である。PCRは、(1) 熱処理によるDNA変性(2本鎖DNAから1本鎖DNAへの解離)、(2) 鋳型1本鎖DNAへのプライマーのアニーリング、(3) DNAポリメラーゼを用いた前記プライマーの伸長、という3ステップを1サイクルとし、このサイクルを繰り返すことによって、試料中の標的核酸を増幅する方法である。アニーリングと伸長を同温度で、2ステップで行う場合もある。

[0003] RNAを分析する場合、このPCRの前段として、鋳型RNAをcDNAに変換する逆転写(Reverse Transcription; RT)を実施する。これをRT-PCRという。このRT-PCRは、(1) RT、PCRを非連続に実施する2ステップRT-PCR、(2) RT、PCR

を、単一酵素を利用して連続して実施する一酵素系１ステップＲＴ－ＰＣＲ、（３）逆転写酵素とＤＮＡポリメラーゼの２種類の酵素を利用して、ＲＴ、ＰＣＲを連続的に実施する二酵素系１ステップＲＴ－ＰＣＲの３つに大別される。

[0004] ＰＣＲおよびＲＴ－ＰＣＲは、遺伝子検査や病原性微生物検査に広く用いられている。ウイルス検査の代表例として、病原性ＲＮＡウイルスの一つであるコロナウイルスが挙げられる。コロナウイルスは、風邪を含む呼吸器感染症を引き起こす原因ウイルスであり、風邪の流行期において約１０～３５％程度はコロナウイルスが原因と言われている。変異型ウイルスが発生することも知られており、稀にＳＡＲＳ（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルスやＭＥＲＳ（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、新型コロナウイルス感染症（ＣＯＶＩＤ－１９）コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ｎＣＯＶ－２、又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２などと呼ばれる）など致死性の重篤な呼吸器疾患を齎すものが発生することが知られている。

[0005] 呼吸器疾患の原因となる病原性微生物は数多く存在するが、疾病の症状からの原因の特定は難しいとされる。加えて、原因となっている病原性微生物により、治療法も異なるため、早期な原因の特定は、患者の治療に対する身体的な負担および致死率を低下させる意味合いにおいて、非常に重要となる。したがって、コロナウイルスをはじめとする呼吸器感染症を引き起こす病原性微生物を簡便、迅速、高感度に検出および特定することは、臨床診断、食品衛生検査、環境検査等で重要であることは言うまでもない。

[0006] 呼吸器感染症の原因となる病原性微生物の特定の迅速化の一つの方法として、一回の検査において同時に複数種の病原性微生物に対して検査する方法が挙げられる。近年、呼吸器感染症に関する遺伝子検査では、複数種の病原性微生物由来の核酸をターゲットとするマルチプレックスＰＣＲが用いられている（非特許文献１）。

[0007] また、呼吸器感染症の遺伝子検査では、咽頭および鼻腔ぬぐい液、喀痰、唾液等の生体試料から、病原性微生物由来核酸の抽出および精製を行い、精

製サンプルを遺伝子検査に供される。これら核酸の抽出および精製工程は煩雑であり、多くの作業時間を要していた。近年、インフルエンザウイルスの検出において、咽頭ぬぐい液試料を水溶性有機溶媒が含まれる前処理液と混合したウイルス抽出液を試料とする方法が知られている（特許文献1）。また、K. K a n gらは、高病原性北米産豚生殖器呼吸器症候群ウイルスRNAを豚血清サンプルから直接RT-PCRにより検出できることを報告している（非特許文献2）。RNAの抽出および精製工程を省略することで、試料中に含まれるPCRの反応阻害物質が反応液中に持ち込まれることになる。PCRの反応阻害物質は試料の種類によって大きく異なる。例えば、唾液試料中では多糖類や食べかす等の不溶性物質、咽頭および鼻腔ぬぐい液では多糖類や血液などがPCR反応阻害物質として持ち込まれる。

[0008] これまで、RNA抽出および精製工程を省略し、RT-PCRにてウイルスRNA検出できる検査キットとして、例えばノロウイルス検出キットG1／G2－高速プローブ検出－（東洋紡）などが販売されている。本検査キットでは、同種内の異なる遺伝子型であるG1型およびG2型の2種類のターゲットを同時に検出することができる。一方で、ウイルスなどの病原性微生物の不活化および核酸抽出条件や、それらに最適化されたPCR反応条件等（例えば、反応液組成や温度サイクル条件等）は種類によって大きく異なっていることも知られている。それゆえ、複数種類の病原性微生物をターゲットした場合、病原性微生物ごとに検出感度が異なる場合が多く、同時での測定は難しいとされる。

[0009] 現在、同様の呼吸器疾患の症状を呈し、症状からの診断が難しいものとしてコロナウイルス（特にSARS-nCoV-2）と、インフルエンザウイルスがある。咽頭および鼻腔ぬぐい液や唾液、糞便試料、ふき取り環境試料等より、RNAの抽出および精製工程なく、1ステップRT-PCRによって、これらのウイルスを迅速に同時に検出できる方法の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開2017-023110号公報

特許文献2：特開2012-24039号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Journal of Medical Virology, 第92巻, 2020年4月、第408-417頁.

非特許文献2：JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2005, p. 5452-5456

非特許文献3：Published Online January 29, 2020, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

非特許文献4：世界保健機関（WHO）ホームページ（Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR）

非特許文献5：国立感染症研究所ホームページ「病原体検出マニュアル2019-nCoV」（<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200217.pdf>）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の目的は、核酸増幅反応や核酸増幅産物の検出を阻害する夾雑物質や不溶性物質を含み得る試料（いわゆるクルードサンプル）を含む試料を用いる場合に、作業性に優れながら、簡便な手法で高感度に複数の病原性微生物に由来するターゲット核酸の有無を検出できる手法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意研究を行った結果、核酸の単離処理を行っておらず夾雑物質及び／又は不溶性物質を含み得る試料を、特定のD

NAポリメラーゼを含むPCR反応液と混合後、PCR反応（RT-PCR反応を含む）に供することで、2以上のターゲット核酸（例えば、ウイルスや細菌等の異なる病原性微生物に由来するターゲット核酸）をマルチプレックス検出することが可能であることを見出した。

[0014] 従来、複数種類の核酸検出用プライマーおよびプローブを反応系に含むマルチプレックスリアルタイムPCR反応において、反応系への夾雑物質の持ち込みは、非特異的な核酸増幅や核酸増幅量の減少などを引き起こすことで、著しい感度低下を引き起こすとされてきた。これは特に最適な核酸増幅・検出条件が異なり易く、反応にバイアスが生じやすい2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸を検出するマルチプレックスPCR法で影響することが懸念される。しかしながら、全く予想外のことに、夾雑耐性を有する耐熱性DNAポリメラーゼである *rTth* DNAポリメラーゼや *Haw* *k* *Z05* DNAポリメラーゼ、及びそれらの変異体等を用いれば、それらの高い反応性により、夾雑物の持ち込みにより引き起こされる検出感度の低下を克服でき、尚且つ2種類以上の蛍光化合物による2以上のターゲット核酸の検出をも可能になることを見出した。その結果、夾雑物質を含み得る試料から事前に核酸の単離精製作業を実施することなく、PCR反応液へ添加し、マルチプレックスPCR反応を行うだけで、複数種の病原性微生物由来の核酸を検出可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0015] 代表的な本願発明は、以下の通りである。

[項1] 以下の工程を含む、試料中の呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸の有無を1つのPCR反応液で検査する方法：

- (1) 核酸の単離処理をおこなっていない試料と、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼを含むPCR反応液とを混合する工程、
- (2) 反応容器を密閉後、PCR反応を実施する工程；及び
- (3) 2種類以上の蛍光化合物により、2以上のターゲット核酸の検出を行う工程。

〔項 2〕 前記工程（1）における PCR 反応液が、夾雑物耐性と逆転写活性を併せ持つ DNA ポリメラーゼを含むか、又は夾雑物耐性を有する DNA ポリメラーゼ及び逆転写酵素を含む RT-PCR 反応液である、項 1 に記載の方法。

〔項 3〕 試料が唾液試料、喀痰試料、うがい液、涙液、咽頭ぬぐい液試料、鼻腔ぬぐい液試料、糞便試料及び拭き取り検査試料からなる群より選択される少なくとも 1 種である、項 1 又は 2 に記載の方法。

〔項 4〕 試料が水、生理食塩水、緩衝液、及びスプタザイム酵素液からなる群より選択される少なくとも 1 種に懸濁された懸濁液、又はそれらの遠心上清若しくは濃縮物である、項 1～3 のいずれかに記載の方法。

〔項 5〕 夾雑物耐性を有する DNA ポリメラーゼが Family A に属する DNA ポリメラーゼである、項 1～4 のいずれかに記載の方法。

〔項 6〕 夾雑物耐性を有する DNA ポリメラーゼが、Tth、Haw k Z O 5 およびそれらの変異体からなる群から選択される少なくとも 1 種の夾雑物耐性を有する DNA ポリメラーゼであることを特徴とする、項 1～5 のいずれかに記載の方法。

〔項 7〕 前記変異体が、Tth ポリメラーゼ（配列番号 39）又は Haw k Z O 5 ポリメラーゼ（配列番号 40）のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を示すアミノ酸配列からなり、且つ、夾雑物耐性を有する DNA ポリメラーゼ活性を示すものである、項 6 に記載の方法。

〔項 8〕 前記変異体が、Tth ポリメラーゼ（配列番号 39）又は Haw k Z O 5 ポリメラーゼ（配列番号 40）のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、且つ、夾雑物耐性を有する DNA ポリメラーゼ活性を示すものである、項 6 又は 7 に記載の方法。

〔項 9〕 逆転写酵素が、モロニーマウス白血病ウイルス（MMRV）、トリ骨髓芽球症ウイルス（AMV）およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも 1 種に由来する逆転写酵素である、項 2～8 のいずれか

に記載の方法。

[項10] 蛍光化合物の少なくとも1種類が2本鎖DNA結合蛍光化合物である、項1～9のいずれかに記載の方法。

[項11] 2本鎖DNA結合蛍光化合物が、SYBR（登録商標）Green I、SYBR（登録商標）Gold、SYTO-9、SYTP-13、SYTO-82、EvaGreen（登録商標；Biotium）、LCGreen、及びLightCycler（登録商標）480 ResoLightからなる群より選択される1種以上である、項10に記載の方法。

[項12] 蛍光化合物の少なくとも1種類がハイブリダイゼーションプローブである、項1～11のいずれかに記載の方法。

[項13] ハイブリダイゼーションプローブがTaqManプローブである、項12に記載の方法。

[項14] 2種類以上の蛍光化合物が、ハイブリダイゼーションプローブ及び2本鎖DNA結合蛍光化合物の組み合わせを含む、項1～13のいずれかに記載の方法。

[項15] 呼吸器感染症の原因となる病原性微生物が、コロナウイルス、インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、クラミジア、マイコプラズマ、クレブシエラ、結核菌、百日咳菌、及び肺炎球菌からなる群より選択される少なくとも2つである、項1から14のいずれかに記載の方法。

[項16] 呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物が、異なるRNAウイルスである、項1～15のいずれかに記載の方法。

[項17] 呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物が、少なくともコロナウイルス科ウイルスを含む、項1～16にいずれかに記載の方法。

[項18] コロナウイルス科ウイルスが、SARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルス、MERS（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、及

びSARS-CoV-2コロナ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1～17のいずれかに記載の方法。

〔項19〕 呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物が、少なくともオルトミクソウイルス科ウイルスを含む、項1～18のいずれかに記載の方法。

〔項20〕 オルトミクソウイルス科ウイルスが、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、及びC型インフルエンザ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19に記載の方法。

〔項21〕 呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物が、少なくともSARS-CoV-2コロナウイルスと、A型インフルエンザウイルス及びB型ヒトインフルエンザウイルスから選択される少なくとも1つのインフルエンザウイルスとを含む、項1～20のいずれかに記載の方法。

〔項22〕 夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼを含有するPCR反応液を含むことを特徴とする、核酸の単離処理をおこなっていない試料において2種類以上の蛍光化合物で、呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸の有無を検査するために用いられる検査キット又は組成物。

〔項23〕 前記PCR反応液が、夾雑物耐性と逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを含むか、又は夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼ及び逆転写酵素を含むRT-PCR反応液である、項22に記載のキット又は組成物。

〔項24〕 夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼがFamily Aに属するDNAポリメラーゼである、項22又は23に記載のキット又は組成物。

〔項25〕 夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼが、Tth、Hwk Z05およびそれらの変異体からなる群から選択される少なくとも1種の夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼであることを特徴とする、項22～24のいずれかに記載のキット又は組成物。

〔項 2 6〕 前記変異体が、T t hポリメラーゼ（配列番号 3 9）又はH a w k Z O 5ポリメラーゼ（配列番号 4 0）のアミノ酸配列と 9 0 %以上の同一性を示すアミノ酸配列からなり、且つ、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼ活性を示すものである、項 2 5に記載のキット又は組成物。

〔項 2 7〕 前記変異体が、T t hポリメラーゼ（配列番号 3 9）又はH a w k Z O 5ポリメラーゼ（配列番号 4 0）のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、且つ、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼ活性を示すものである、項 2 5又は 2 6に記載のキット又は組成物。

〔項 2 8〕 逆転写酵素が、モロニー Maus 白血病ウイルス（MMRV）、トリ骨髄芽球症ウイルス（AMV）およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも 1 種に由来する逆転写酵素である項 2 3～2 7のいずれかに記載のキット又は組成物。

〔項 2 9〕 蛍光化合物の少なくとも 1 種類が 2 本鎖DNA結合蛍光化合物である、項 2 2～2 8のいずれかに記載のキット又は組成物。

〔項 3 0〕 2 本鎖DNA結合蛍光化合物が、SYBR（登録商標）G r e e n 1、SYBR（登録商標）G o l d、SYTO-9、SYTP-13、SYTO-82、EvaGreen（登録商標；B i o t i u m）、LCGreen、及びL i g h t C y c l e r（登録商標）480 R e s o L i g h tからなる群より選択される 1 種以上である、項 2 9に記載のキット又は組成物。

〔項 3 1〕 蛍光化合物の少なくとも 1 種類がハイブリダイゼーションプローブである、項 2 2～3 0のいずれかに記載のキット又は組成物。

〔項 3 2〕 ハイブリダイゼーションプローブがT a q M a nプローブである項 3 1に記載のキット又は組成物。

〔項 3 3〕 2 種類以上の蛍光化合物が、ハイブリダイゼーションプローブ及び 2 本鎖DNA結合蛍光化合物の組み合わせを含む、項 2 2～3 2のいずれかに記載のキット又は組成物。

発明の効果

[0016] 本発明によって、微生物の核酸の単離をおこなっておらず夾雑物質や不溶性物質を含みうる試料を、PCR反応液（RT-PCR反応液を含む）に添加後、PCR反応（RT-PCR反応を含む）するだけで、呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸の検出を行う場合でも、十分な感度で検査することが可能となる。核酸抽出および精製工程がないことで、作業工程を削減することができ、一回の検査において複数種類の呼吸器感染症の検査が同時に可能となるため、病原性微生物検査業務がさらに効率化する。病原性微生物検査業務の効率化は、患者に対して正確な治療を行えるまでの時間が短縮できるとともに、感染していても症状が顕れない被験者の検査数を増やすことができるため、感染症予防にも大いに寄与し得る。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]検体存在下におけるSARS-CoV-2コロナウイルスとインフルエンザウイルスの同時検出を行った図である。

[図2]様々なDNAポリメラーゼ変異体を利用してSARS-CoV-2コロナウイルスとインフルエンザウイルスA型の同時検出を行った図である。

[図3]様々なDNAポリメラーゼ変異体を利用してSARS-CoV-2コロナウイルスとインフルエンザウイルスB型の同時検出を行った図である。

[図4]検体存在下においてSARS-CoV-2コロナウイルスとインフルエンザウイルス（A型、B型）の3種同時検出を行った図である。

[図5]検体存在下においてSARS-CoV-2コロナウイルスとインフルエンザウイルス（A型、B型）とRSウイルスの4種同時検出を行った図である。

発明を実施するための形態

[0018] 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ない。なお、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが

理解されるべきである。

また、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。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「および／または」は、いずれか一方または両方を意味する。また本明細書において、単数形の表現は、他に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。

[0019] 本発明の一態様は、例えば、試料中の病原性微生物（ウイルス、細菌、真菌等を含む）の検査であって、試料から病原性微生物の核酸（DNA、RNA）の単離精製を行うことなく、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼを含むPCR反応液（RT-PCR反応液を含む）を、夾雑物質を含む試料に添加して呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来する異なるターゲット核酸を2種類以上の蛍光化合物により検出することを包含する病原性微生物の存在を検査するための方法である。

[0020] 本発明の試料中の2つ以上の呼吸器感染症の原因となる病原性微生物由来のターゲット核酸の有無を1つのPCR反応液で検査する方法は、少なくとも以下の工程を含むことを特徴とする。

- （1）核酸の単離処理をおこなっていない試料と、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼを含むPCR反応液とを混合する工程、
- （2）反応容器を密閉後、PCR反応を実施する工程；及び
- （3）2種類以上の蛍光化合物により、2以上のターゲット核酸の検出を行う工程。

ここで検査対象の病原性微生物由来のターゲット核酸がRNAである場合には、PCR反応としてRT-PCR反応を行うことになる。この場合、前記工程（1）のPCR反応液は、夾雑物耐性と逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを含むRT-PCR反応液、又は夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼ及び逆転写酵素を含むRT-PCR反応液とすることができる。

[0021] 前記工程（2）でRT-PCR反応を行う場合、逆転写酵素とDNAポリ

メラゼの両者を含む2酵素反応系であっても、逆転写活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼを含む1酵素反応系であってもよい。前記工程(1)～(3)は、同一容器で行われることが好ましい。すなわち、工程(1)～(3)のいずれの工程の間においても、混合液の全部または一部を別容器へ移し替えないことが好ましい。更には、工程(2)において、好ましくは工程(2)及び(3)の両方の工程においては、反応容器を密閉後、反応容器の蓋の開閉を行わないことが好ましい。また、前記工程(1)で使用する夾雑物質および不溶性物質を含みうる試料は、事前に水または緩衝液等にて懸濁した懸濁液であってよく、唾液試料等であればそのまま使用してもよく、糞便試料等の固形試料をPCR反応液に直接添加してもよい。

[0022] 本発明における検査対象は、例えば、病原性微生物由来の核酸であり得るが、特に限定されない。ここで、病原性微生物とは、ヒトを始めとする哺乳動物等の生体に感染して感染症を引き起こし得る任意の微生物をいい、細菌又は真菌等の原核生物や真核生物に限定されず、ウイルス等をも含む概念である。

[0023] 一つの実施形態において、本発明は、呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸の検出を行うことを特徴とする。ここで検査対象となる呼吸器感染症の病原体微生物の数は、2種類以上であれば特に限定されず、3種類以上、4種類以上、5種類以上であってもよい。検査対象となる呼吸器感染症の病原体微生物の数の上限は特に限定されないが、例えば、10種類以下であり得る。より精度よく高感度な検出が可能になるという観点から、好ましくは2～4種類の呼吸器感染症病原性微生物であり、更に好ましくは2～3種類の呼吸器感染症病原性微生物であり、より好ましくは2種類の呼吸器感染症病原性微生物である。

[0024] 病原性微生物としては、大腸菌(例えば、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管凝集性大腸菌(EAEC)、腸管出血性大腸菌(EHEC))；カンピロバクター属菌、ウエルシュ属菌、サルモネラ属菌、リステリア属菌、ボツリヌス属

菌、セレウス属菌、シュードモナス属菌（多剤耐性緑膿菌）、クロストリジウム属菌、レジオネラ属菌、ストレプトコッカス属菌、黄色ブドウ球菌（例えば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）、アシネトバクター属菌（例えば、薬剤耐性アシネトバクター）、腸炎ビブリオ、赤痢菌、ジフテリア菌、コレラ菌、インフルエンザ菌、肺炎球菌、百日咳菌、結核菌、らい菌、炭疽菌、ペスト菌、リケッチア、クラミジア、コクシエラ、トキソプラズマ、マイコプラズマ、クレブシエラなどが挙げられるが、特に限定されるものではない。本発明は、呼吸器感染症を引き起こし得る任意の病原性微生物の検査に用いられ得るが、特に、症状から診断が難しい結核菌、肺炎球菌、百日咳菌、クラミジア、マイコプラズマ、クレブシエラなどの呼吸器感染症の原因となる病原菌の検出は、作業性に優れて簡便な本発明の検査方法が特に有用である。

[0025] 特定の実施形態では、病原性微生物はウイルスであってもよい。本発明の対象となるウイルスとしては、DNAウイルスであって良く、RNAウイルスであっても良い。DNAウイルスとしては、ヘルペスウイルス科ウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス）；アデノウイルス科ウイルス（例えば、ヒトアデノウイルス）；ヘパドナウイルス科ウイルス（例えば、B型肝炎ウイルス）；パポバウイルス科ウイルス（例えば、乳頭種ウイルス、ポリオーマウイルス）；パルボウイルス科ウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス、ヒトパルボウイルス）；アスファウイルス科ウイルス（例えば、アフリカ豚熱ウイルス）などが挙げられるが、特に限定されるものではない。本発明は、呼吸器感染症を引き起こし得る任意の病原性微生物の検査に用いられ得るが、特に、症状から診断が難しいアデノウイルス科ウイルスなどの呼吸器感染症の原因となる病原菌の検出は、作業性に優れて簡便な本発明の検査方法が特に有用である。

[0026] RNAウイルスとしては、脂質二重膜に由来するエンベロープを持たないRNAウイルスであっても、エンベロープを持つRNAウイルスであっても良い。このような非エンベロープRNAウイルスとしては、アストロウイル

ス科ウイルス（例えば、アストロウイルス）；カリシウイルス科ウイルス（例えば、サポウイルス、ノロウイルス）；ピコルナウイルス科ウイルス（例えば、A型肝炎ウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス）；ヘペウイルス科ウイルス（例えば、E型肝炎ウイルス）；レオウイルス科ウイルス（例えば、ロタウイルス）などが挙げられ、限定されるものではないが、好ましくはカリシウイルス科ウイルス及びレオウイルス科ウイルスの検出に有用であり、より好ましくはノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスの検出に有用であり、特にノロウイルスの検出に有用である。非エンベロープウイルスの多くが糞口感染などによって消化管に感染可能で、胃酸による不活性化や胆汁酸の界面活性作用等に耐性のある、堅いキャプシド構造にRNAが保持されている。それゆえ、従来では、ノロウイルスの遺伝子検査においてはウイルスRNA抽出および精製工程を含むため、作業性に優れて簡便な本発明の検査方法は特に有用である。本発明は、呼吸器感染症を引き起こし得る任意の非エンベロープRNAウイルスの検査に用いられ得るが、特に、症状から診断が難しいピコルナウイルス科ウイルス、なかでもライノウイルスなどの呼吸器感染症の原因となる病原菌の検出は、作業性に優れて簡便な本発明の検査方法が特に有用である。

[0027] エンベロープRNAウイルスとしては、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）；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、インフルエンザウイルス）；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、パラインフルエンザウイルス、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、特に限定されるものではない。本発明は、呼吸器感染症を引き起こし得る任意のエンベロープRNAウイルスの検査に用いられ得るが、特に、症状から診断が難しい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、パラミクソウイルス科ウイルス、なかでもコロナウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルスなどの呼吸器感染症の原因となる病原菌の検出は、作業性に優れて簡便な本発明の検査方法が特に有用である。従って、本発明はこれらの中から選択される2種以上のウイルスを検査するために実施されることが好ましい。好ましくは、コロナウイルス科ウイルス及び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、コロナウイルス（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）およびインフルエンザウイルス（インフルエンザウイルスA型、B型、C型）の検出であり、特に、SARS-nCoV-2コロナウイルスと、A型インフルエンザウイルス及びB型ヒトインフルエンザウイルスから選択される少なくとも1つのインフルエンザウイルスとの検出に有用である。

[0028] コロナウイルスは、風邪を含む呼吸器感染症を引き起こす原因ウイルスであり、風邪の流行期において約10～35%程度はコロナウイルスが原因とされている。変異型ウイルスが発生することも知られており、稀にSARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルスやMERS（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）コロナウイルス（SARS-CoV-2）など致死性の重篤な呼吸器疾患を齎すものが発生することが知られている。したがって、コロナウイルスを簡便、迅速、高感度に検出することは、臨床診断、食品衛生検査、環境検査等で重要であることは言うまでもない。

[0029] コロナウイルスの病原体検査では、電子顕微鏡法、ELISAによる免疫学的抗原検出法、または核酸増幅技術を利用したウイルス遺伝子の検出法が開発されてきた。これらの検査法の中でも、高感度にコロナウイルスを検出可能な核酸増幅技術は、汎く使われている。コロナウイルスを核酸増幅法で

検出するためにいくつかの技術が開発されてきた（例えば、非特許文献2、非特許文献3、特許文献2）。

[0030] 2019年に中国湖北省武漢市にて発生が確認された変異型コロナウイルスSARS-CoV-2（SARS-nCoV-2と呼ばれることもある）においては、ウイルスゲノムRNAの解析が完了次第、核酸増幅技術を用いた検査方法が樹立された（例えば、非特許文献3、非特許文献4）。日本においても、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル2019-nCoV」にてSARS-CoV-2の検出するための方法が記載されている（非特許文献5）。これらの手法において、試料中に含まれるコロナウイルスの検出には、試料からのウイルスRNAの抽出および精製工程を伴う。ウイルスRNAの抽出および精製工程は煩雑であり、多くの作業時間を要していた。現在、コロナウイルス、特にSARS-CoV-2を含む咽頭・鼻腔ぬぐい液や唾液、喀痰、糞便試料などの生体試料やふき取り環境試料から、RNAの抽出および精製工程なく、1ステップRT-PCRによって迅速に検出できる方法の開発が望まれている。

[0031] インフルエンザウイルスは、コロナウイルス同様に呼吸器感染症を引き起こす原因ウイルスである。しばしば重篤な呼吸器疾患を引き起こすほか、合併症として気管支炎、肺炎、中耳炎、急性脳症などを引き起こすことが知られている。インフルエンザは、主にA型、B型、C型の3型があり、毎年の流行的な広がりを見せるのはA型とB型である。インフルエンザウイルス粒子表面には赤血球凝集素（HA）とノイラミニダーゼ（NA）と呼ばれる2種類の糖タンパク質が存在し、これらがヒトへの感染に関与している。HAには15種類、NAには9種類の異なる亜型が存在し、これらの様々な組み合わせを持つウイルスが広く分布している。上述した2種類の糖タンパク質の異なる亜型の組み合わせが定期的に出現するため、A型インフルエンザは数年から数十年ごとに、変異型ウイルスによる世界的な大流行が起こる。

[0032] インフルエンザウイルスおよびSARS-CoV-2コロナウイルスは同様に重篤な呼吸器疾患を引き起こし、症状が酷似していることが知られる。

ウイルス毎に治療方法が異なるため、早期に原因となるウイルスを特定する必要がある。本発明は、作業性・操作性に優れた方法でありながら、簡便に且つ高感度に呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸を検出できるため、このようなインフルエンザウイルスとコロナウイルス（SARSコロナウイルス、MERSコロナウイルス、SARS-CoV-2コロナウイルス等の重症化し易いコロナウイルス）、特にSARS-CoV-2ウイルスとインフルエンザウイルスを同時に検査することが可能であり有益である。

[0033] 本発明において用いられる試料として、例えば咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀痰、嘔吐物、唾液、うがい液、涙液、糞便（排泄便、直腸便）などが挙げられるが、特に限定されるものではなく、生体に由来するもの全般に用いることが可能である。特には、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀痰、肺吸引物、脳脊髄液、うがい液、唾液、涙液、糞便、培養細胞、培養上清からの検出に有用であり、なかでも唾液試料、喀痰試料、うがい液、涙液、咽頭ぬぐい液試料、鼻腔ぬぐい液試料、糞便試料の検出に有用である。本発明においては、これら試料を市販のRNA精製キット等を用いてRNAを単離する必要がないことを一つの特徴とするものである。前記試料は直接検出に供してもよいし、夾雑物の反応への影響を低減し、より安定した検査結果を得るために、水、生理食塩水または緩衝液に前記試料を懸濁した試料であってもよい。前記緩衝液としては、特に限定されるものではないが、ハanks緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、HEPES緩衝液、トリシン緩衝液などが挙げられる。また、粘性の強い生体試料（例えば、粘性の強い喀痰を含む試料）の場合は、特に限定されないが、スプタザイム酵素液で処理した試料であってもよい。

[0034] 前記工程（1）において、キャプシドや細胞壁などの堅牢な構造からRNAまたはDNAを抽出しやすくするために、前記試料を緩衝液や、酸またはアルカリ性溶液、有機溶媒などを含む溶液と混合した試料であって良い。前記溶液に含まれるものとして、酸性溶液としては、酸性の溶液であれば特に

限定されない。酸性溶液としては、例えば、ギ酸水溶液、酢酸水溶液、酪酸水溶液、塩酸水溶液、硝酸水溶液、硫酸水溶液、クエン酸水溶液、乳酸水溶液、リン酸水溶液、安息香酸水溶液、シュウ酸水溶液、酒石酸水溶液、アスコルビン酸水溶液、スルホン酸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。アルカリ性溶液においても、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、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液（TAPSO、POPSO、HEPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHES、CAPS）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。有機溶媒として、具体的にはエタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、トリエチルアミン、ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリックトリアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、ピリジン等が挙げられるがこれに限られるものではない。さらには、前記工程（1）において添加する試料は、前記溶液と混合後熱処理に供されたものであっても良い。熱処理の条件は、特に限定されないが、60℃以上、好ましくは70℃以上、より好ましくは80℃以上、更により好ましくは90℃以上で、1秒以上処理されたものであってよい。

[0035] 本発明における別の態様の試料としては、拭き取り検査試料である。汚染経路の解明や施設環境等の汚染状況の把握には、ふき取り検査が有用である。本発明において、拭き取り検査とは、特に限定されるものでないが、例えば綿棒等で該当区画や設備等を拭き取り、水や緩衝液に溶出し、ポリエチレングリコール（PEG）沈澱などで濃縮した試料である。具体的な拭き取り検査の要領としては、「ふきとり検体のノロウイルス検査法の改良」（h t

tp://idsc.nih.gov/iasr/32/382/dj3824.html)などが例示されるが、特に限定はされるものではなく、これに準ずる方法が広く含まれる。拭き取り箇所の例としては、まな板や包丁、ふきん、食器などの調理器具類、冷蔵庫の取手やトイレ、浴室のドアノブ、洗面所、厨房、トイレ、浴室などの蛇口、調理者の手や指、浴室、トイレ、洗面、手すり、居室などの施設などが挙げられる。また、拭き取り検査ではないが、環境検査として、下水試料の濃縮試料にも適用できる。これらの検査試料は、検査場所の汚れやほこりを多量含むことから、夾雑物や不溶性物質を含みうる試料において夾雑耐性を強化した本手法は、これらの検査に対して有益である。

[0036] 特定の実施形態において、本発明の方法は、核酸の単離処理を行っていない試料を使用することを一つの特徴とする。例えば、本発明は、各種試料から市販の核酸精製キットで核酸を単離したり、あるいはゲノム核酸を病原性微生物の構造（例えば、細胞膜、キャプシド構造）から露出させるための事前の熱処理等を行ったりしていない、未処理試料を用いることができる。手間のかかる前処理が不要となるため簡便であるという観点から、これらの未処理試料を用いることが好ましい。また、夾雑物質を除去するような分離精製を伴わない核酸抽出を行った試料であってもよい。ここで、分離精製を伴わない核酸抽出を行った試料とは、試料中で核酸を露出させた状態にすることを意味し、例えば、試料中で細胞膜やカプシド、エンベロープ等を破壊し、これらに内包されていた核酸を抽出して露出させること（但し、破壊後に残存する細胞膜やカプシド、エンベロープの断片等は除去しないこと）をいう。本発明では、このような単離精製の手間を省いて用意した試料であっても良好に核酸増幅でき、安定して複数の呼吸器感染症の検査結果を得ることが可能となる。このような分離精製を伴わない核酸抽出処理は、前記工程（１）に先立って行うことができる。

[0037] 前記工程（１）においてPCRまたはRT-PCRに供される試料に含みうる夾雑物質や不溶性物質は、糞便（排泄便、直腸便）、嘔吐物、唾液、喀

痰、うがい液、鼻腔ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、涙液、血液、拭き取り検査試料に由来するものが挙げられるが、限定されるものではなく、生体に由来するものや、環境検査試料全般に用いることが可能であり、特に糞便（排泄便、直腸便）、唾液、喀痰、うがい液、涙液、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液からの検出に有用である。含みうる不溶性物質の濃度は、検査試料によっても異なるが、濁度OD660において、PCR反応液中又はRT-PCR反応液中に例えば0.01 Abs/μL以上含まれる場合、検査感度の影響する可能性があるが、これに限定されるものではない。例えば、濁度OD660において0.05 Abs/μL以上、0.1 Abs/μL以上、0.5 Abs/μL以上、1 Abs/μL以上であり得るが、特に限定されない。また本発明の効果を奏する限り、含みうる不溶性物質の濃度の上限は特に限定されないが、例えば、5 Abs/μL以下、3 Abs/μL以下であり得るが、限定はされない。本発明によれば、このように高濁度の検査試料をPCR反応液と混合しても、2種類以上の蛍光化合物で2以上のターゲット核酸の検出を行うことが可能であり得る。

[0038] 試料からの微生物由来の核酸の精製作業は、作業の煩雑化かつ作業時間を延ばす原因となる。これに加えて、PCRチューブまたはPCRプレート等の反応容器内にPCRの反応液を分注する作業は、サンプル数に応じて数百回、または数千回となりうる作業である。連続での反応容器内への分注作業を実施は、反応容器内への分注漏れや多数回分注などのミスが起こりうる。これらのミスは正しく検査が実施できなくなるとともに、再検査等により更なる作業が生じるため、結果的に時間的、金銭的な損失を招く。本発明では、このような病原性微生物の検査において、作業現場での作業を簡略化し、迅速に検査を実施することを可能にすることで、さらなる感染拡大を未然に防ぐことにつながる。

[0039] 前記工程（2）におけるPCRサイクルは、1. 熱処理や2. 逆転写反応のステップを含んでよい。また、各ステップの前後に、ホットスタート酵素を活性化させるための熱処理工程を含んでもよい。1の熱処理工程では、ウ

イルスを破碎してウイルス内の核酸を露出させる、及び／もしくは核酸増幅反応においてホットスタート酵素を活性化させる工程を含み得る。前記熱処理工程の温度及び時間は、60℃以上であり、かつ1秒以上であればよく、好ましくは70℃、30秒以上、より好ましくは80℃、30秒以上、特に好ましくは85℃、30秒以上である。2の逆転写反応の温度は、使用する逆転写酵素の逆転写活性と、プライマー及びプローブのT_m値によって決定され、少なくとも25℃以上であればよい。より好ましくは37℃以上である。3のPCRでは、[1]熱処理によるDNA変性（2本鎖DNAから1本鎖DNAへの解離）、[2]鋳型1本鎖DNAへのプライマーのアニーリング、[3]DNAポリメラーゼを用いた前記プライマーの伸長、の3ステップを含んでいればよく、[2]と[3]を同一の温度で実施して、2ステップとしてもよい。迅速なRT-PCRを実施するためには、前記RT-PCR反応に使用するサーマルサイクラーは、前記[2]と[3]のステップの伸長時間を合わせて15秒以下、より好ましくは10秒以下の測定プログラムを設定することが望ましい。なお、本明細書において「PCRの伸長時間」とは、サーマルサイクラーでの設定温度を指す。

[0040] 前記PCR反応液に含まれるDNAポリメラーゼとしては、夾雑物耐性を持つものであれば、当該分野で公知の任意のDNAポリメラーゼを用いることができる。夾雑物耐性とは、PCR阻害物質の存在下においても、核酸増幅反応に十分なDNAポリメラーゼの高い酵素活性を有する性質を指す。夾雑物耐性を持つDNAポリメラーゼとして、特に限定されるものではないが、Tth, Bst, KOD, Pfu, Pwo, Tbr, Tfi, Tfl, Tma, Tne, Vent, DEEPVENT, HawkZ05やこれらの変異体が挙げられるが、特に限定されない。好ましくは、Tth（配列番号39）およびHawkZ05（配列番号40）又はこれらの変異体の使用である。特に好ましくはTth又はその変異体の使用である。通常夾雑耐性を有しないTaqなどのDNAポリメラーゼにおいても、アミノ酸変異により夾雑耐性を有する変異体である場合は使用することが可能である。前記PCR

反応液に含まれる前記夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼの総量は、一例として、少なくとも $4.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 以上あればよく、 $5.0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 以上であることが好ましく、 $5.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 以上であることがより好ましい。なかでも好ましくは、 $8.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 以上である。前記夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼの総量の上限は特に限定されないが、一例として、 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 以下とすることができ、 $16.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 以下であっても十分に本発明の効果を得ることができる。ポリメラーゼの量は、Bradford法もしくはNanodrop（サーモフィッシャー社）により定量した値であり、安全データシート（SDS）から概算してもよい。BSAなどのタンパク質を含む場合は、後者の方法で算出することが望ましい。非特異的反応抑制の効果を高めるため、抗DNAポリメラーゼ抗体との併用、あるいは化学修飾により熱不安定ブロック基のDNAポリメラーゼへ導入することで、PCR反応開始までのDNAポリメラーゼの酵素活性を抑制し、ホットスタートPCRへの適用ができることが好ましい。

[0041] 前記工程（1）において用いられるPCR溶液は、DNAポリメラーゼおよび必要に応じて逆転写酵素を含む。前記PCR反応液に含まれる逆転写酵素の由来としては、RNAをDNAに変換できれば特に限定されないが、MMLV（Moloney Murine Leukemia Virus）-RT、AMV-RT（Avian Myeloblastosis Virus）、HIV-RT、RAV2-RT、EIAV-RT、カルボキシドサーマス・ハイドロゲノフォルマン（Carboxydothermus hydrogenoformans）DNAポリメラーゼ）やその変異体が例示される。特に好ましい例としては、MMLV-RT、AMV-RT、またはそれらの変異体が挙げられる。

[0042] 前記工程（1）において用いられるPCR溶液は、逆転写酵素活性を併せ持つDNAポリメラーゼを含むものであっても良い。逆転写活性を有するDNAポリメラーゼとは、RNAをcDNAに変換する能力とDNAを増幅する能力を兼ね備えたDNAポリメラーゼである。逆転写活性を有するDNA

ポリメラーゼは、逆転写活性及び夾雑物耐性に加えて、耐熱性を有することが好ましい。耐熱性とは、70℃で1分以上の熱処理を実施しても、酵素活性が半分以上低下しないことをいう。由来は特に限定されるものではないが、Taq、Tth、Bst、Bca、KOD、Pfu、Pwo、Tbr、Tfi、Tfl、Tma、Tne、Vent、DEEPVENTやこれらの変異体が挙げられる。これまでに逆転写活性を有するDNAポリメラーゼとして、*Thermus aquaticus*由来のDNAポリメラーゼ（Taq）、*Thermus thermophilus* HB8由来のDNAポリメラーゼ（Tth）や*Thermus* sp Z05由来のDNAポリメラーゼ（Z05）、*Thermotoga maritima*由来のDNAポリメラーゼ（Tma）、*Bacillus caldotenax*由来のDNAポリメラーゼ（Bca）、*Bacillus stearothermophilus*由来のDNAポリメラーゼ（Bst）などが挙げられ、これらの逆転写活性と耐熱性DNAポリメラーゼ活性が失われていない変異体であってもよい。また、*Thermococcus kodakaraensis*由来のDNAポリメラーゼ（KOD）の変異体であって、逆転写活性を有するものが知られており（例えば、RTX: reverse transcription xenopolymerase）、本発明にはこのような逆転写酵素活性を併せ持つ耐熱性DNAポリメラーゼも使用できる。特に好ましくは、Tth、Z05及びこれらの変異体からなる群より選択される逆転写活性を有するDNAポリメラーゼが挙げられる。

[0043] 本明細書において、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼの変異体とは、その由来である野生型DNAポリメラーゼのアミノ酸配列に対して、例えば85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、なかでも好ましくは99%以上の配列同一性を有し、且つ、夾雑物質の存在下においても高いDNAポリメラーゼ活性を有するものをいう。逆転写活性も兼ね備えたDNAポリメラーゼである場合、夾雑物質の存在下においてもRNAをcDNAに変換する活性及びDNAを増幅す

る活性を有するものをいう。ここで、アミノ酸配列の同一性を算出する方法としては、当該分野で公知の任意の手段で行うことができる。例えば、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができ、一例として、全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）の相同性アルゴリズムBLAST（Basic local alignment search tool）<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>においてデフォルト（初期設定）のパラメータを用いることにより、アミノ酸配列の同一性を算出することが可能である。また、本発明に用いられ得る変異体は、その由来である野生型DNAポリメラーゼのアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加（以下、これらを纏めて「変異」ともいう）したアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、且つ、野生型DNAポリメラーゼと同様にRNAをcDNAに変換する活性及びDNAを増幅する活性を有するものであってもよい。ここで1又は数個とは、例えば、1～80個、好ましくは1～40個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個であり得るが、特に限定されない。

[0044] 本発明に用いられるPCR反応液には、DNAポリメラーゼの他、緩衝剤、適当な塩、マグネシウム塩又はマンガン塩、デオキシヌクレオチド三リン酸、検出対象のウイルスまたは病原性微生物由来の核酸の検出対象領域に対応するプライマー対、さらに必要に応じて添加剤を含んでいてもよい。

[0045] 本発明で使用される緩衝剤としては、特に限定されないが、トリス（Tris）、トリシン（Tricine）、ビスートリシン（Bis-Tricine）、ピシン（Bicine）などが挙げられる。硫酸、塩酸、酢酸、リン酸などでpHを6～9、より好ましくはpH7～9に調整されたものである。また、添加する緩衝剤の濃度としては、10～200mM、より好ましくは20～150mMで使用される。この際、反応に適当なイオン条件とするために、塩溶液が加えられる。塩溶液としては、塩化カリウム、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモ

ニウムなどが挙げられる。

[0046] 本発明で使用されるdNTPとしては、dATP、dCTP、dGTP、dTTPがそれぞれ0.1～0.5mM、最も一般的には0.2mM程度加えられる。dTTPの代わり及び／又は一部としてdUTPを使用することによって、クロスコンタミネーションに対する予防処置をとってもよい。クロスコンタミネーションに対する予防処置を講じる場合、Uracil-nucleoside glycosylase (UNG) を含むことが好ましい。

[0047] 更に、本発明では、PCR反応液に、2価陽イオンを含むことが好ましい。このように2価陽イオンを含むことで、より安定して高い夾雑耐性が得られ高感度な検出が可能となる。2価陽イオンとしては、特に限定されないが、マグネシウムイオン、マンガンイオン、カルシウムイオン、銅イオン、鉄イオン、ニッケルイオン、亜鉛イオン等を挙げることができる。好ましくは、2価陽イオンとして、マグネシウムイオン、マンガンイオンを含むことが好ましい。本発明において、PCR反応液にマグネシウムイオンやマンガンイオン等を添加する場合は、マグネシウムやマンガンを追加してもよいし、これらの塩を追加してもよい。マグネシウム又はその塩としては、マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム等が例示され、マンガン又はその塩としては、マンガン、塩化マンガン、硫酸マンガン、酢酸マンガンなどが例示される。このようなマグネシウム、マンガン、又はこれらの塩は、PCR反応液中に1～10mM程度加えられることが好ましい。本発明の検査方法において、一酵素系RT-PCRを実施する場合、安定的に高い感度が得られ易いという観点からは、マンガン又はその塩を含むことが好ましい。特定の実施態様では、RT-PCR反応液において1mM以上のマンガン又はその塩を含むことが好ましく、1.5mM以上のマンガン又はその塩を含むことが好ましく、2.0mM以上のマンガン又はその塩を含むことがより好ましい。また、二酵素系RT-PCRまたは逆転写反応を伴わないPCRを実施する場合、安定的に高い感度が得られ易いという観点からは、マグネシウム又はその塩を含むことが好ましい。特定の実施態

様では、PCR反応液において1 mM以上のマグネシウム又はその塩を含むことが好ましく、1.5 mM以上のマグネシウム又はその塩を含むことが好ましく、2.0 mM以上のマグネシウム又はその塩を含むことがより好ましい。

[0048] さらにPCR反応液に含まれる添加剤として、アミノ酸におけるアミノ基に3個のメチル基を付加した構造を有する第4級アンモニウム塩（以下、「ベタイン様4級アンモニウム」という）、ポリペプチド（ウシ血清アルブミン、セリシン、Blocking peptide fragment（以下BPFともいう）、ゼラチン）、グリセロール、グリコール及び界面活性剤よりなる群から選択された少なくとも1つを含んでいてもよい。

[0049] 本発明に用いられる前記ポリペプチドは、分子量が5～500 kDaである限り、特に限定されないが、好ましくは、6～400 kDaである。本明細書において、分子量を示すときは、他の意味であることが明らかでない限り、SDS-PAGEを用いて決定した値をいう。SDS-PAGEでの分子量の測定は、当該分野で一般的な手法及び装置を用い、市販される分子量マーカー等を用いて行うことができる。例えば、「分子量50 kDa」とは、SDS-PAGEで分子量を測定した際に、当業者が、通常50 kDaの位置にバンドがあると判断する範囲にあることをいう。また、本発明に用いられるポリペプチドは、上記分子量の範囲内のポリペプチドの混合物であってもよい。

[0050] 本発明に用いられる前記ポリペプチドは、本発明の効果を奏する限り特に限定されず、複数のアミノ酸がペプチド結合で連なって形成されたタンパク質をいう。また、本発明に用いられるポリペプチドは、アミノ酸が連結されたポリペプチド構造を有する限り、例えば、熱変性等により三次元構造が解かれたような熱変性ポリペプチド（例えば、ゼラチン）等であってもよい。具体的には、本発明に使用され得るポリペプチドとして、例えば、アルブミン（例えば、ウシ血清アルブミン、ラクトアルブミン、ヒト血清アルブミン、卵由来アルブミン）、ゼラチン（例えば、魚ゼラチン、豚ゼラチン）、セ

リシン、カゼイン、フィブロイン等の天然由来タンパク質（天然由来ポリペプチド）；Blocking peptide fragment（以下BPFともいう）、コラーゲン加水分解物、ポリペプトン、酵母エキス、ビーフエキストラクト等の合成・分解等により人為的に製造されたポリペプチド等を用いることができる。より一層優れた本発明の効果が奏されるという観点から、好ましくは、本発明に用いられるポリペプチドは、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、Blocking peptide fragment（以下BPF）、及び／又はセリシンである。少量でも高い効果が発揮され得るという観点から、より好ましくは、ウシ血清アルブミン、ゼラチン（なかでも魚ゼラチン）を用いるのが好適である。これらのポリペプチドは、1種類だけ使用してもよいし、2種類以上を組合わせて使用してもよい。また、これらのポリペプチドは、天然からの抽出や合成等の手段により調製してもよく、また市販品も好適に使用することができる。

[0051] 本発明において、前記ポリペプチドの使用量は、本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、例えば、前記不溶性物質を含む試料と一酵素系1ステップRT-PCR反応液とを混合した混合液中において、終濃度0.0001～200mg/mLとなるような量、好ましくは0.01～150mg/mL、より好ましくは0.1～130mg/mL、更に好ましくは0.5～100mg/mLで使用するすることができる。より優れた効果を発揮させるために好ましい量は、使用するポリペプチドの種類や所望される効果の程度等によって変動し得るが、例えば、以下のような使用量を例示することができる。

・ウシ血清アルブミンを用いる場合：PCR反応液中終濃度として、例えば0.5mg/mL以上、好ましくは1mg/mL以上、より好ましくは2mg/mL以上、更に好ましくは3mg/mL以上。上限値は特に限定されないが、例えば、10mg/mL以下とすることができる。

・ゼラチンを用いる場合：PCR反応液中終濃度として、例えば0.1mg/mL以上、好ましくは1mg/mL以上、より好ましくは5mg/mL以

上、更に好ましくは7.5 mg/mL以上、さらにより好ましくは15 mg/mL以上。上限値は特に限定されないが、例えば、50 mg/mL以下とすることができる。

・セリシンを用いる場合：PCR反応液中終濃度として、例えば1 mg/mL以上、好ましくは5 mg/mL以上、より好ましくは10 mg/mL以上、更に好ましくは20 mg/mL以上、更により好ましくは50 mg/mL以上。上限値は特に限定されないが、例えば、100 mg/mL以下とすることができる。

・BPFを用いる場合：PCR反応液中終濃度として、例えば1 mg/mL以上、好ましくは5 mg/mL以上、より好ましくは10 mg/mL以上、更に好ましくは20 mg/mL以上、更により好ましくは30 mg/mL以上。上限値は特に限定されないが、例えば、50 mg/mL以下とすることができる。

[0052] 前記PCR反応液に含まれる界面活性剤としては、トリトンX-100 (Triton X-100)、トリトンX-114 (Triton X-114)、ツイーン20 (Tween 20)、ノニデットP40、Brij 35、Brij 58、SDS、CHAPS、CHAPSO、Emulgen 420などが挙げられるが、特に限定されない。PCR反応液中の前記界面活性剤の濃度も特に限定はされないが、好ましくは0.0001%以上、より好ましくは0.002%以上、さらに好ましくは0.005%以上で、良好な検出が可能となる。上限は特に限定されないが、一例として、0.1%以下とすることができる。

[0053] 前記PCR反応液に含まれるベタイン様4級アンモニウムとしては、ベタイン (トリメチルグリシン)、カルニチンなどが挙げられるが、特に限定されるものではない。ベタイン構造は分子内に安定な正、負の両電荷を持つ化合物で、界面活性剤のような性質を示し、ウイルス構造の不安定化を引き起こすと考えられる。さらに、DNAポリメラーゼの核酸増幅を促進することが知られる。好ましい前記ベタイン様4級アンモニウム濃度は、0.1 M～

2 M、より好ましくは0.2 M～1.2 Mである。

[0054] さらに、当該技術分野でPCRまたはRT-PCRを促進することが知られる物質と組み合わせて使用することもできる。本発明において有用な促進物質とは、例えば、グリセロール、ポリオール、プロテアーゼインヒビター、シングルストランド結合タンパク質（SSB）、T4 遺伝子3'2' タンパク質、tRNA、硫黄または酢酸含有化合物類、ジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール、トリメチレングリコール、ホルムアミド、アセトアミド、エクトイン、トレハロース、デキストラン、ポリビニルピロリドン（PVP）、塩化テトラメチルアンモニウム（TMAC）、水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）、酢酸テトラメチルアンモニウム（TMAA）、ポリエチレングリコールなどが挙げられるが、これらに限定されない。さらに反応阻害を低減するように、エチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸（EGTA）、1,2-ビス(4-アミノフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸（BAPTA）のようなキレート剤を含んでいてもよい。

[0055] 一つの実施形態において、本発明の方法は、2以上のターゲット核酸を検出するマルチプレックスPCRであることを特徴とする。ここで「ターゲット核酸」とは、核酸増幅により検出することを目的とした核酸領域であり得る。例えば、2つ以上の病原性微生物に由来する核酸の有無を検査する場合は、それらの病原性微生物の各ゲノム核酸における増幅を意図する領域であり得る。また、PCR反応液がインターナルコントロール等を含む場合は、インターナルコントロール核酸における増幅を意図する領域もターゲット核酸とすることができる。本発明の方法では、対象となるターゲットの数に特に制限はないが、2箇所以上とすることができ、例えば3箇所、4箇所、5箇所以上とすることもできる。ターゲット数の上限は特に制限されないが、例えば、10箇所以下とすることができる。

[0056] 本発明に用いられるプライマー対としては、一方のプライマーが他方のプ

ライマーのDNA伸長生成物に互いに相補的である2種一対のプライマーが挙げられる。特に限定されないが、本発明では上記プライマーが2対以上含まれていることが好ましい。さらに、ターゲットとする核酸が亜型からなる場合、縮重プライマーを含んでもよい。

[0057] 実施形態において、本発明でエンベロープRNAウイルスの1種であるコロナウイルス(SARS-nCoV-2)を検出する場合、プライマー対の例としては、国立感染症研究所が発表している「病原体検出マニュアル2019-nCoV」に記載の配列(配列番号1、2、4、5)、アメリカ疾病予防管理センターが発表する「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-pCR Panel Primers and Probes」(配列番号7、8、10、11、13、14)および「Research Use Only CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay Real-Time RT-PCR Primers and Probes」(配列番号16、17)が挙げられ、本発明においても好適に使用することができるが、これに限るものではない。前記記載のプライマー配列では、配列番号1および2、4および5、7および8、10および11、13および14、16および17によりSARS-nCoV-2のヌクレオキャプシドタンパク質(N)領域を検出する。SARS-nCoV-2をはじめとするコロナウイルスの検出においては、ヌクレオキャプシド(N)領域、エンベロープタンパク質(E)領域、スパイクタンパク質(S)領域、RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)領域、Open Reading Frame(ORF)領域等の遺伝子を検出の対象とすることができるが、特にこれに限るものではない。使用するプライマーの濃度としては、RT-PCR反応液全体に対して、フォワードプライマーの濃度が0.1 μ M以上3 μ M以下であり、かつ前記リバースプライマーの濃度が0.1 μ M以上3 μ M以下であることが好ましい。より好ましくは、フォワードプライマーの濃度が0.1 μ M以上2

μM 以下であり、かつ前記リバースプライマーの濃度が $0.5\mu\text{M}$ 以上 $2\mu\text{M}$ 以下である。

[0058] 別の実施形態において、本発明でエンベロープRNAウイルスの1種であるインフルエンザウイルスを検出する場合、プライマー対の例としては、国立感染症研究所が発表している「インフルエンザ診断マニュアル（第4版）」に記載の配列（配列番号27、28、30、31）、アメリカ疾病予防管理センターが発表する「Research Use Only CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay Real-Time RT-PCR Primers and Probes」（配列番号19、20、21、22、24、25）、世界保健機関（WHO）が発表している「WHO information for the molecular detection of influenza viruses」に記載の配列（配列番号33、34、36、37）が挙げられ、本発明においても好適に使用することができるが、これに限るものではない。前記記載のプライマー配列では、配列番号27および28、19および21、20および22、33および34によりインフルエンザA型を検出し、配列番号30および31、24および25、36および37によりインフルエンザB型を検出するが、特にこれに限るものではない。使用するプライマーの濃度としては、RT-PCR反応液全体に対して、フォワードプライマーの濃度が $0.1\mu\text{M}$ 以上 $3\mu\text{M}$ 以下であり、かつ前記リバースプライマーの濃度が $0.1\mu\text{M}$ 以上 $3\mu\text{M}$ 以下であることが好ましい。より好ましくは、フォワードプライマーの濃度が $0.1\mu\text{M}$ 以上 $2\mu\text{M}$ 以下であり、かつ前記リバースプライマーの濃度が $0.5\mu\text{M}$ 以上 $2\mu\text{M}$ 以下である。

[0059] 本発明は、2種類以上の蛍光化合物を使用して、2以上のターゲット核酸を検出することを一つの特徴とする。従って本発明は、2種類以上の蛍光化合物でそれぞれ標識されたプローブを用いることができる。さらに別の態様としては、少なくとも1種類の標識されたハイブリダイゼーションプローブ

と、2本鎖DNA結合蛍光化合物とを組み合わせることで2種類以上の蛍光化合物を利用する検出方法である。このように2種類以上の蛍光化合物を利用することによって、増幅産物の分析を通常の電気泳動ではなく、蛍光シグナルのモニタリングで監視することができ、解析労力が低減される。さらには、反応容器を開放する必要がなく、コンタミネーションのリスク低減が可能である。ウイルスおよび微生物の種類や、サブタイプに対応する、それぞれのハイブリダイゼーションプローブを異なる蛍光色素で標識することによって、各標的の核酸を別々に識別することも可能である。

[0060] 2本鎖DNA結合蛍光化合物としては、例えば、SYBR（登録商標）Green I、SYBR（登録商標）Gold、SYTO-9、SYTP-13、SYTO-82（Life Technologies）、EvaGreen（登録商標；Biotium）、LCGreen（Idaho）、LightCycler（登録商標）480 ResoLight（Roche Applied Science）などが挙げられる。

[0061] 本発明において用いられるハイブリダイゼーションプローブとしては、例えば、TaqMan加水分解プローブ（米国特許第5,210,015号公報、米国特許第5,538,848号公報、米国特許第5,487,972号公報、米国特許第5,804,375号公報）、モレキュラービーコン（米国特許第5,118,801号公報）、FRETハイブリダイゼーションプローブ（国際公開第97/46707号パンフレット、国際公開第97/46712号パンフレット、国際公開第97/46714号パンフレット）などが挙げられる。

[0062] ハイブリダイゼーションプローブに用いられ得る蛍光化合物は、当該分野で公知の任意のものを使用することができ、例えば、使用したいqPCR機器に合わせて選択することができる。蛍光化合物の具体例としては、例えば、ローダミン（ROX）若しくはその誘導体（例えば、5-カルボキシ-X-ローダミン、6-カルボキシ-X-ローダミン、5-カルボキシローダミン6G（CR6G）、テトラメチルローダミン（TAMRA））、又はそれ

らの塩などのローダミン系化合物；フルオロセイン又はその誘導体（例えば、FAM（カルボキシフルオレセイン）、JOE（6-カルボキシ-4', 5'-ジクロロ-2', 7'-ジメトキシフルオレセイン）、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、TET（テトラクロロフルオレセイン）、HEX（5'-ヘキサクロロフルオレセイン-CEホスホロアミダイト））、VIC（登録商標）、BODIPY（登録商標）シリーズ、ローダミン又はその誘導体（例えば、5-カルボキシローダミン6G（CR6G）やテトラメチルローダミン（TAMRA））、Cy（登録商標）色素（例えば、Cy3、Cy5）、若しくはそれらの誘導体、又はそれらの塩等の非ローダミン系化合物等があげられるが、これらに限定されない。蛍光化合物は、必要に応じて、使用する蛍光物質にあった消光物質を使用することができる。上記のような蛍光物質に対応した消光物質としては、例えば、TAMRA（テトラメチルローダミン）、DABCYL（4-（4-ジメチルアミノフェニルアゾ）安息香酸）、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。

[0063] 実施形態において、本発明でエンベロープRNAウイルスの1種であるコロナウイルス（SARS-nCoV-2）を検出する場合、その検出用のハイブリダイゼーションプローブの塩基配列としては、国立感染症研究所が発表している「病原体検出マニュアル2019-nCoV」に記載の配列（配列番号3および6）および、アメリカ疾病予防管理センターが発表する「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-pCR Panel Primers and Probes」（配列番号9および12および15）および「Research Use Only CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay Real-time RT-PCR Primers and Probes」（配列番号18）が挙げられ、本発明においても好適に使用することができるが、こ

れに限るものではない。前記記載のプローブ配列ではSARS-nCoV-2のN領域を検出する。さらに、ターゲットとする核酸が亜型からなる場合、縮重配列を含んでもよい。SARS-nCoV-2をはじめとするコロナウイルスの検出においては、N領域、E領域、S領域、RdRp領域、ORF領域等の遺伝子を検出の対象とすることができるが、特にこれに限るものではない。蛍光標識プローブの濃度としては、 $0.01\mu\text{M}$ 以上 $1.0\mu\text{M}$ 以下であることが好ましい。より好ましくは、 $0.013\mu\text{M}$ 以上 $0.75\mu\text{M}$ 以下であり、更に好ましくは、 $0.02\mu\text{M}$ 以上 $0.5\mu\text{M}$ 以下である。

[0064] 別の実施形態において、本発明でエンベロープRNAウイルスの1種であるインフルエンザウイルスを検出する場合、その検出用のハイブリダイゼーションプローブの塩基配列としては、国立感染症研究所が発表している「インフルエンザ診断マニュアル（第4版）」に記載の配列（配列番号29、32）、アメリカ疾病予防管理センターが発表する「Research Use Only CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay Real-Time RT-PCR Primers and Probes」（配列番号23、26）、世界保健機関（WHO）が発表している「WHO information for the molecular detection of influenza viruses」に記載の配列（配列番号35、38）が挙げられ、本発明においても好適に使用することができるが、これに限るものではない。前記記載のプローブ配列では、配列番号29および23、35によりインフルエンザA型を検出し、配列番号32および26、38によりインフルエンザB型を検出するが、特にこれに限るものではない。使用する蛍光標識プローブの濃度としては、RT-PCR反応液全体に対して、 $0.01\mu\text{M}$ 以上 $1.0\mu\text{M}$ 以下であることが好ましい。より好ましくは、 $0.013\mu\text{M}$ 以上 $0.75\mu\text{M}$ 以下であり、更に好ましくは、 $0.02\mu\text{M}$ 以上 $0.5\mu\text{M}$ 以下である。

[0065] 本発明の別の一態様は、試料中のウイルスまたは病原性微生物由来の核酸を検出する検査用キットまたは組成物であって、夾雑耐性を有するDNAポリメラーゼを含有するPCR反応液を含むことを特徴とする、核酸の単離処理を行わず、夾雑物質を含みうる試料において、病原性微生物の検査を2種類以上の蛍光化合物によりマルチプレックスPCR法で行うための検査用キットまたは組成物である。

[0066] この実施態様において使用される夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼの種類や量、プライマー又はプローブの種類や量、検査に用いる試料の種類、検査対象となる病原性微生物等は、前記の検査方法において詳述したものと同様であり得る。

実施例

[0067] 以下、実施例をもって、本発明を具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0068] 試験例 1. 唾液および咽頭ぬぐい液の濁度測定

(1) 試料の調製

(1-1) 唾液の採取

SARS-CoV-2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルス陰性の唾液検体を50w/w%となるように滅菌水にて懸濁した。

(1-2) 咽頭ぬぐい液の採取

専用の綿棒を用いて咽頭をぬぐい、検体輸送用培地(VTM) 1mLに懸濁したものを咽頭ぬぐい液試料とし、濁度測定用に50w/w%となるように滅菌水にて懸濁した。

(2) 濁度(OD660)の測定

唾液懸濁液のOD660を測定した。測定結果に希釈倍率を掛け合わせ、採取した唾液の濁度を決定した。

(3) 結果

採取した唾液検体の濁度は1.03Abs、咽頭ぬぐい液の濁度は0.17Absであることを確認した。唾液および咽頭ぬぐい液を利用した以後の

検討はこれらの検体を用いた。

[0069] 試験例 2. 検体存在下における SARS-CoV-2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスのマルチプレックス検出検討

(1-1) 各ウイルス RNA の調製

SARS-CoV-2 コロナウイルス (Twist Bioscience) およびインフルエンザウイルス A 型 (Virce II)、B 型 (Virce II) の鋳型 RNA を各々 500 コピー/μL となるように滅菌水にて調製した。

(1-2) 唾液懸濁液の採取

SARS-CoV-2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスの陰性が確認されている 500 μL 唾液検体を採取した。

(1-3) 咽頭ぬぐい液の採取

専用の綿棒を用いて咽頭をぬぐった後、検体輸送用培地 (VTM) 1 mL に懸濁したものを咽頭ぬぐい液検体とした。咽頭ぬぐい液検体は SARS-CoV-2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスが陰性であることが確認されているものを利用した。

(1-4) 唾液および咽頭ぬぐい液の前処理

唾液または咽頭ぬぐい液 8 μL および前処理液 3 μL (SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi- (東洋紡) 添付品) を混合し、95℃5 分間の熱処理を行った後に、前処理済検体液とした。なお、ここで行った前処理法は核酸の単離処理を伴わない。

(2-1) 反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、2 酵素系 1 ステップ RT-PCR において、反応液中の SARS-CoV-2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルス A 型または B 型を検出した。

反応液

(SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi- (東洋紡) 添付品)

4. $2 \text{ ng} / \mu\text{L}$ rTth DNA polymerase (東洋紡)

0. $01 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ 抗Tth 抗体

0. $1 \text{ U} / \mu\text{L}$ MMLV RTase (東洋紡)

前記反応液に、後述の(2-2)に記載のプライマー・プローブ液を混合し、最終液量が $37 \mu\text{L}$ となるようにRT-PCR反応液を調製した。各前処理済検体液 $11 \mu\text{L}$ と、SARS-CoV-2コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスA型またはB型のRNA溶液を各 $1 \mu\text{L}$ ずつ添加し、 $50 \mu\text{L}$ の反応系としてRT-PCR反応を行った。

(2-2) プライマー・プローブ液

SARS-CoV-2コロナウイルス検出用のプライマーおよびプローブは、アメリカ疾病予防管理センター(CDC)発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020)に記載されているN1セットの配列(配列番号7、8、9)を利用した。インフルエンザウイルスA型は、国立感染症研究所が発表している「インフルエンザ診断マニュアル(第4版)」に記載されているプライマーおよびプローブセット(配列番号27、28、29)、インフルエンザウイルスB型は、世界保健(WHO)発行「WHO information for the molecular detection of influenza viruses」記載されているプライマーおよびプローブセット(配列番号36、37、38)を利用した。各増幅物産物の検出には、SARS-CoV-2コロナウイルスN1(Cy5チャンネル)、インフルエンザA型およびB型(FAMチャンネル)に対応するTaqMan(R)プローブを利用した。RT-PCR反応液中のプローブおよびプライマーの濃度は同文献に記載の濃度を添加した。

(4) PCR反応

PCR反応条件は、SARS-CoV-2 Detection Kit-Multi- (東洋紡)に記載の至適条件にて行った。測定機台はBi

o R a d 製 C F X 9 6 W E L L D E E P を使用した。

(5) 結果

測定結果は、B i o R a d 製 C F X M a n a g e r または C F X M a e s t r o ソフトウェアにて、閾値を 1 0 0 として C t 値および到達蛍光強度を算出した。この結果を図 1 及び表 1 に示す。唾液や咽頭ぬぐい液の存在下においても、精製 R N A を用いた場合と遜色ないレベルで、すべての条件において、S A R S - C o V - 2 コロナウイルス、インフルエンザウイルス A 型および B 型の検出を確認した。

[表1]

Ct値	検体		
	なし	唾液	ぬぐい液
SARS-CoV-2 (Cy5)	33.6	33.6	33.5
	33.5	33.3	33.1
influenza A (FAM)	32.8	32.7	32.8
	33.1	32.7	32.7

Ct値	検体		
	なし	唾液	ぬぐい液
SARS-CoV-2 (Cy5)	33.6	33.6	32.7
	33.2	33.5	32.9
influenza B (FAM)	35.1	34.3	34.0
	34.7	33.9	34.6

[0070] 試験例 3. 様々な DNA ポリメラーゼを利用した S A R S - C o V - 2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスのマルチプレックス検出検討 (2 酵素系 1 ステップ R T - P C R 反応)

(1-1) 各ウイルス RNA の調製

S A R S - C o V - 2 コロナウイルス (T w i s t B i o s c i e n c e) およびインフルエンザウイルス A 型 (V i r c e l l)、B 型 (V i r c e l l) の鋳型 RNA を各々 5 0 0 コピー / μ L となるように滅菌水にて調製した。

(1-2) 唾液懸濁液の採取

S A R S - C o V - 2 コロナウイルスの陰性が確認されている 5 0 0 μ L 唾液検体を採取した。

(1-3) 咽頭ぬぐい液の採取

専用の綿棒を用いて咽頭をぬぐった後、検体輸送用培地 (V T M) 1 m L に懸濁したものを咽頭ぬぐい液検体とした。咽頭ぬぐい液検体は S A R S - C o V - 2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスが陰性であること

が確認されているものを利用した。

(1-4) 唾液および咽頭ぬぐい液の前処理

唾液または咽頭ぬぐい液 $8\ \mu\text{L}$ および前処理液 $3\ \mu\text{L}$ (SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi- (東洋紡) 添付品) を混合し、 95°C 5 分間の熱処理を行った後に、前処理済検体液とした。なお、ここで行った前処理法は核酸の単離処理を伴わない。

(2-1) 反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、2 酵素系 1 ステップ RT-PCR において、反応液中の SARS-CoV-2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルス A 型または B 型を検出した。

反応液

(SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi- (東洋紡) 添付品)

4. $2\ \text{ng}/\mu\text{L}$ 各 DNA polymerase

0. $01\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 各抗 DNA polymerase 抗体

0. $1\ \text{U}/\mu\text{L}$ MMLV RTase (東洋紡)

前記反応液に、後述の (2-2) に記載のプライマー・プローブ液を混合し、最終液量が $37\ \mu\text{L}$ となるように RT-PCR 反応液を調製した。各前処理済検体液 $11\ \mu\text{L}$ と、SARS-CoV-2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルス A 型、または B 型の RNA 溶液を各 $1\ \mu\text{L}$ ずつ添加し、 $50\ \mu\text{L}$ の反応系として RT-PCR 反応を行った。

(2-2) プライマー・プローブ液

SARS-CoV-2 コロナウイルス検出用のプライマーおよびプローブは、アメリカ疾病予防管理センター (CDC) 発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020) に記載されている N1 セット (配列番号 7、8、9) の配列を利用した。インフルエンザウイルス A

型では、国立感染症研究所が発表している「インフルエンザ診断マニュアル（第4版）」に記載されているプライマーおよびプローブセット（配列番号27、28、29）、インフルエンザウイルスB型は、世界保健（WHO）発行「WHO information for the molecular detection of influenza viruses」に記載されているプライマーおよびプローブセット（配列番号36、37、38）を利用した。各増幅物産物の検出には、SARS-CoV-2コロナウイルスN1（Cy5チャンネル）、インフルエンザA型およびB型（FAMチャンネル）に対応するTaqMan（R）プローブを利用した。RT-PCR反応液中のプローブおよびプライマーの濃度は同文献に記載の濃度を添加した。

（3）使用したDNAポリメラーゼおよびその変異体

以下に示されるDNAポリメラーゼおよびその変異体を、記載の濃度にてそれぞれ反応に使用した。変異体に関する表記は、アミノ酸の1文字略語表記に従う。変異導入部位に関しては酵素の名称に含む数字となっており、左に変更前のアミノ酸、右に変更後のアミノ酸を記載した。例えば、「Tth変異体（M749K）」は、Tth DNA polymeraseの749位のM（メチオニン）をK（リシン）に変異させていることを意味する。

（使用酵素）

- ・ 酵素1：Taq DNA polymerase（野生型）（東洋紡）
- ・ 酵素2：Tth DNA polymerase（野生型）（東洋紡）
- ・ 酵素3：Tth変異体（Q509R）
- ・ 酵素4：Tth変異体（Q509K）
- ・ 酵素5：Tth変異体（E628K）
- ・ 酵素6：Tth変異体（M749K）
- ・ 酵素7：Tth変異体（F751Y）
- ・ 酵素8：Tth変異体（D549G）
- ・ 酵素9：Hawk Z05 DNA polymerase（Roche）

(4) PCR反応

PCR反応条件は、SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi- (東洋紡) に記載の至適条件にて行った。測定機台はBioRad製CFX96WELL DEEPを使用した。

(5) 結果

測定結果は、BioRad製CFX ManagerまたはCFX Maestroソフトウェアにて、閾値を100としてCt値および到達蛍光強度を算出した。この結果を図2、3及び表2、3 (表中、使用酵素の番号は丸付き数字で表す) に示す。増幅曲線に関しては代表的なもののみ記載した。TthDNAポリメラーゼおよびその変異体と、HawkZ05 DNAポリメラーゼでは、検体由来の夾雑物質が存在する条件下においても、SARS-CoV-2コロナウイルス、インフルエンザウイルスA型、及びインフルエンザウイルスB型の全てについて陽性として検出することができた。反面、TaqDNAポリメラーゼではすべて陰性となった。

[表2]

Ct値	検体	酵素								
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
SARS-CoV-2 (Cy5)	唾液	N/A	31.1	31.5	32.0	31.6	32.1	32.0	32.1	30.8
	ぬぐい液	N/A	31.0	32.0	33.3	32.0	31.6	32.2	31.5	32.0
FluA (FAM)	唾液	N/A	31.6	31.8	31.0	32.1	31.9	31.6	32.4	30.7
	ぬぐい液	N/A	31.9	32.6	32.1	32.2	32.4	32.1	33.0	32.2

* N/A :未検出

[表3]

Ct値	検体	酵素								
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
SARS-CoV-2 (Cy5)	唾液	N/A	32.4	32.0	31.2	31.9	31.9	31.4	31.6	31.8
	ぬぐい液	N/A	32.6	32.0	32.7	32.0	32.0	31.8	32.1	32.5
FluB (FAM)	唾液	N/A	34.4	34.3	33.6	33.5	34.4	34.2	34.3	34.2
	ぬぐい液	N/A	35.7	34.8	35.3	34.1	35.2	34.4	35.4	43.1

* N/A :未検出

[0071] 試験例4. 検体存在下におけるSARS-CoV-2コロナウイルス、インフルエンザウイルスA型およびインフルエンザB型のマルチプレックス3種同時検出検討

(1-1) 唾液懸濁液の採取

SARS-CoV-2 コロナウイルス及びインフルエンザウイルス（A型、B型）の陰性が確認されている500 μ L 唾液検体を採取した。

（1-2）咽頭ぬぐい液の採取

専用の綿棒を用いて咽頭をぬぐった後、検体輸送用培地（VTM）1 mLに懸濁したものを咽頭ぬぐい液検体とした。咽頭ぬぐい液検体はSARS-CoV-2 コロナウイルスおよびインフルエンザウイルス（A型、B型）が陰性であることが確認されているものを利用した。

（1-3）ウイルス液と唾液又は咽頭ぬぐい液の混合

ウイルス液としてAccuPlex SARS-CoV-2, Flu A/B and RSV Reference Material Kit (Seracare)を使用した。ウイルス液（各100コピー/ μ L）1 μ Lを唾液、咽頭ぬぐい液または滅菌水（コントロール）8 μ Lと混合し、検体含有ウイルス液9 μ Lとした。

（1-4）検体含有ウイルス液の前処理

検体含有前処理液9 μ Lおよび前処理液 3 μ L（SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-（東洋紡）添付品）を混合し、95℃5分間の熱処理を行った後に、前処理済検体液とした。なお、ここで行った前処理法は核酸の単離処理を伴わない。

（2-1）反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、2酵素系1ステップRT-PCRにおいて、反応液中のSARS-CoV-2 コロナウイルス、インフルエンザウイルスA型およびB型を検出した。

反応液

（SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-（東洋紡）添付品）

4. 2 ng/ μ L rTth DNA polymerase（東洋紡）

0. 01 μ g/ μ L 抗Tth 抗体

0. 1 U/ μ L MMLV RTase（東洋紡）

前記反応液に、後述の（２－２）に記載のプライマー・プローブ液を混合し、最終液量が $38\mu\text{L}$ となるようにRT-PCR反応液を調製した。各前処理済検体液 $12\mu\text{L}$ と混合し、 $50\mu\text{L}$ の反応系としてRT-PCR反応を行った。各測定は $N=2$ にて実施した。

（２－２）プライマー・プローブ液

SARS-CoV-2コロナウイルス検出用のプライマーおよびプローブは、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020)に記載されているN1、N2セットの配列（配列番号7、8、9、11、12）と国立感染症研究所が発表している「病原体検出マニュアル2019-nCoV」に記載されているN2セット配列（配列番号4）を利用した。インフルエンザウイルスA型およびB型は、CDC発行「Research Use Only CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay Primers and Probes」に記載されているプライマーおよびプローブセット（配列番号19～26）を利用した。各増幅物産物の検出には、SARS-CoV-2コロナウイルス N1、N2（Cy5チャンネル）、インフルエンザ A型（ROXチャンネル）、インフルエンザB型（HEXチャンネル）に対応するTaqMan (R) プローブを利用した。RT-PCR反応液中のプローブおよびプライマーの濃度は同文献に記載の濃度を添加した。

（３）PCR反応

PCR反応条件は、SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-（東洋紡）に記載の至適条件にて行った。測定機台はBioRad製CFX96WELL DEEPを使用した。

（４）結果

測定結果は、BioRad製CFX ManagerまたはCFX Manager

s t r o ソフトウェアにて、閾値を 100 として C t 値および到達蛍光強度を算出した。この結果を図 4 及び表 4 に示す。唾液や咽頭ぬぐい液の存在下においても、核酸の単離処理を実施せずに S A R S - C o V - 2 コロナウイルス、インフルエンザウイルス A 型、インフルエンザ B 型の 3 種類が同時に検出できることを確認した。

[表4]

Ct値	検体		
	なし	咽頭 ぬぐい液	唾液
SARS-CoV-2 (Cy5)	33.3	32.6	34.6
	33.3	33.6	35.3
インフルエンザA型 (ROX)	34.5	34.2	35.3
	34.0	35.8	35.9
インフルエンザB型 (HEX)	34.4	35.0	35.5
	34.6	35.4	36.2

[0072] 試験例 4. 検体存在下における S A R S - C o V - 2 コロナウイルス、インフルエンザウイルス A 型、インフルエンザ B 型、RS ウイルスのマルチプレックス 4 種同時検出検討

(1-1) 唾液懸濁液の採取

S A R S - C o V - 2 コロナウイルス、インフルエンザウイルス (A 型、B 型)、及び R S ウイルスの陰性が確認されている 500 μ L 唾液検体を採取した。

(1-2) 咽頭ぬぐい液の採取

専用の綿棒を用いて咽頭をぬぐった後、検体輸送用培地 (V T M) 1 mL に懸濁したものを咽頭ぬぐい液検体とした。咽頭ぬぐい液検体は S A R S - C o V - 2 コロナウイルス、インフルエンザウイルス (A 型、B 型)、R S ウイルスが陰性であることが確認されているものを利用した。

(1-3) ウイルス液と唾液および咽頭ぬぐい液の混合

ウイルス液として A c c u P l e x S A R S - C o V - 2, F l u A /

B and RSV Reference Material Kit (Seracare)を使用した。ウイルス液（各100コピー/ μL ）1 μL を唾液、咽頭ぬぐい液または滅菌水（コントロール）8 μL と混合し、検体含有ウイルス液9 μL とした。

（1－4）検体含有ウイルス液の前処理

検体含有前処理液9 μL および前処理液 3 μL （SARS-CoV-2 Detection Kit－Multi－（東洋紡）添付品）を混合し、95℃5分間の熱処理を行った後に、前処理済検体液とした。なお、ここで行った前処理法は核酸の単離処理を伴わない。

（2－1）反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、2酵素系1ステップRT-PCRにおいて、反応液中のSARS-CoV-2コロナウイルス、インフルエンザウイルスA型、インフルエンザB型、RSウイルスを検出した。

反応液

（SARS-CoV-2 Detection Kit－Multi－（東洋紡）添付品）

4. 2 ng/ μL rTth DNA polymerase（東洋紡）

0. 01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 抗Tth 抗体

0. 1 U/ μL MMLV RTase（東洋紡）

前記反応液に、後述の（2－2）に記載のプライマー・プローブ液を混合し、最終液量が38 μL となるようにRT-PCR反応液を調製した。各前処理済検体液12 μL と混合し、50 μL の反応系としてRT-PCR反応を行った。各測定はN＝2にて実施した。

（2－2）プライマー・プローブ液

SARS-CoV-2コロナウイルス検出用のプライマーおよびプローブは、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行「2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes」（

Effective: 24 Jan 2020)に記載されているN1セットの配列(配列番号7、8、9)を利用した。インフルエンザウイルスA型およびB型は、CDC発行「Research Use Only CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay Primers and Probes」に記載されているプライマーおよびプローブセット(配列番号19~26)を利用した。RSウイルスについては配列番号41、42、43のプライマーおよびプローブセットを利用した。各増幅物産物の検出には、SARS-CoV-2コロナウイルス N1 (Cy5チャンネル)、インフルエンザ A型 (ROXチャンネル)、インフルエンザ B型 (HEXチャンネル)、RSウイルス (FAMチャンネル) に対応するTaqMan (R) プローブを利用した。SARS-CoV-2およびインフルエンザウイルスに関しては、RT-PCR反応液中のプローブおよびプライマーの濃度は同文献に記載の濃度を添加した。RSウイルスに関しては、各プライマー終濃度0.3 μ M、プローブ終濃度0.2 μ Mとした。

(3) PCR反応

PCR反応条件は、SARS-CoV-2 Detection Kit - Multi (東洋紡)に記載の至適条件にて行った。測定機台はBioRad製CFX96WELL DEEPを使用した。

(4) 結果

測定結果は、BioRad製CFX ManagerまたはCFX Maestroソフトウェアにて、閾値を100としてCt値および到達蛍光強度を算出した。この結果を図5及び表5に示す。唾液や咽頭ぬぐい液の存在下においても、核酸の単離処理を実施せずにSARS-CoV-2コロナウイルス、インフルエンザウイルスA型、インフルエンザB型、RSウイルスの4種類が同時に検出できることを確認した。

[表5]

Ct値	検体		
	なし	咽頭 ぬぐい液	唾液
SARS-Cov-2 (Cy5)	34.1	33.0	34.6
	33.0	33.6	34.1
インフルエンザA型 (ROX)	34.5	35.0	35.5
	33.5	35.2	35.1
インフルエンザB型 (HEX)	35.2	35.1	35.7
	34.2	35.9	35.6
RSウイルス (FAM)	35.2	35.5	36.0
	34.4	35.7	37.0

産業上の利用可能性

[0073] 本発明は、分子生物学研究、さらに臨床検査や食品衛生管理、感染症拡大防止などを目的とした検査において、好適に用いられる。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程を含む、試料中の呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸の有無を1つのPCR反応液で検査する方法：
- (1) 核酸の単離処理をおこなっていない試料と、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼを含むPCR反応液とを混合する工程、
- (2) 反応容器を密閉後、PCR反応を実施する工程；及び
- (3) 2種類以上の蛍光化合物により、2以上のターゲット核酸の検出を行う工程。
- [請求項2] 前記工程(1)におけるPCR反応液が、夾雑物耐性と逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを含むか、又は夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼ及び逆転写酵素を含むRT-PCR反応液である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 試料が唾液試料、喀痰試料、うがい液、涙液、咽頭ぬぐい液試料、鼻腔ぬぐい液試料、糞便試料及び拭き取り検査試料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又は2に記載の方法。
- [請求項4] 試料が水、生理食塩水、緩衝液、及びスプタザイム酵素液からなる群より選択される少なくとも1種に懸濁された懸濁液、又はそれらの遠心上清若しくは濃縮物である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼがFamily Aに属するDNAポリメラーゼである、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] 夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼが、Tth、HawK Z05およびそれらの変異体からなる群から選択される少なくとも1種の夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼであることを特徴とする、請求項1～5のいずれかに記載の方法。
- [請求項7] 前記変異体が、Tthポリメラーゼ（配列番号39）又はHawK

Z O 5 ポリメラーゼ（配列番号 4 0）のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列からなり、且つ、夾雑物耐性を有する D N A ポリメラーゼ活性を示すものである、請求項 6 に記載の方法。

[請求項 8] 前記変異体が、T t h ポリメラーゼ（配列番号 3 9）又は H a w k Z O 5 ポリメラーゼ（配列番号 4 0）のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、且つ、夾雑物耐性を有する D N A ポリメラーゼ活性を示すものである、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

[請求項 9] 逆転写酵素が、モロニーマウス白血病ウイルス（M M R V）、トリ骨髄芽球症ウイルス（A M V）およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも 1 種に由来する逆転写酵素である、請求項 2 ～ 8 のいずれかに記載の方法。

[請求項 10] 蛍光化合物の少なくとも 1 種類が 2 本鎖 D N A 結合蛍光化合物である、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法。

[請求項 11] 2 本鎖 D N A 結合蛍光化合物が、S Y B R（登録商標）G r e e n 1、S Y B R（登録商標）G o l d、S Y T O - 9、S Y T P - 1 3、S Y T O - 8 2、E v a G r e e n（登録商標；B i o t i u m）、L C G r e e n、及び L i g h t C y c l e r（登録商標）4 8 0 R e s o L i g h t からなる群より選択される 1 種以上である、請求項 1 0 に記載の方法。

[請求項 12] 蛍光化合物の少なくとも 1 種類がハイブリダイゼーションプローブである、請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の方法。

[請求項 13] ハイブリダイゼーションプローブが T a q M a n プローブである、請求項 1 2 に記載の方法。

[請求項 14] 2 種類以上の蛍光化合物が、ハイブリダイゼーションプローブ及び 2 本鎖 D N A 結合蛍光化合物の組み合わせを含む、請求項 1 ～ 1 3 のいずれかに記載の方法。

[請求項 15] 呼吸器感染症の原因となる病原性微生物が、コロナウイルス、イン

フルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、クラミジア、マイコプラズマ、クレブシエラ、結核菌、百日咳菌、及び肺炎球菌からなる群より選択される少なくとも2つである、請求項1から14のいずれかに記載の方法。

[請求項16] 呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物が、異なるRNAウイルスである、請求項1～15のいずれかに記載の方法。

[請求項17] 呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物が、少なくともコロナウイルス科ウイルスを含む、請求項1～16にいずれかに記載の方法。

[請求項18] コロナウイルス科ウイルスが、SARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルス、MERS（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、及びSARS-CoV-2コロナ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1～17のいずれかに記載の方法。

[請求項19] 呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物が、少なくともオルトミクソウイルス科ウイルスを含む、請求項1～18のいずれかに記載の方法。

[請求項20] オルトミクソウイルス科ウイルスが、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、及びC型インフルエンザ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19に記載の方法。

[請求項21] 呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物が、少なくともSARS-CoV-2コロナウイルスと、A型インフルエンザウイルス及びB型ヒトインフルエンザウイルスから選択される少なくとも1つのインフルエンザウイルスとを含む、請求項1～20のいずれかに記載の方法。

[請求項22] 夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼを含有するPCR反応液を含むことを特徴とする、核酸の単離処理をおこなっていない試料にお

いて2種類以上の蛍光化合物で、呼吸器感染症の原因となる2つ以上の病原性微生物に由来するターゲット核酸の有無を検査するために用いられる検査キット又は組成物。

[請求項23] 前記PCR反応液が、夾雑物耐性と逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを含むか、又は夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼ及び逆転写酵素を含むRT-PCR反応液である、請求項22に記載のキット又は組成物。

[請求項24] 夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼがFamily Aに属するDNAポリメラーゼである、請求項22又は23に記載のキット又は組成物。

[請求項25] 夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼが、Tth、HawK Z05およびそれらの変異体からなる群から選択される少なくとも1種の夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼであることを特徴とする、請求項22～24のいずれかに記載のキット又は組成物。

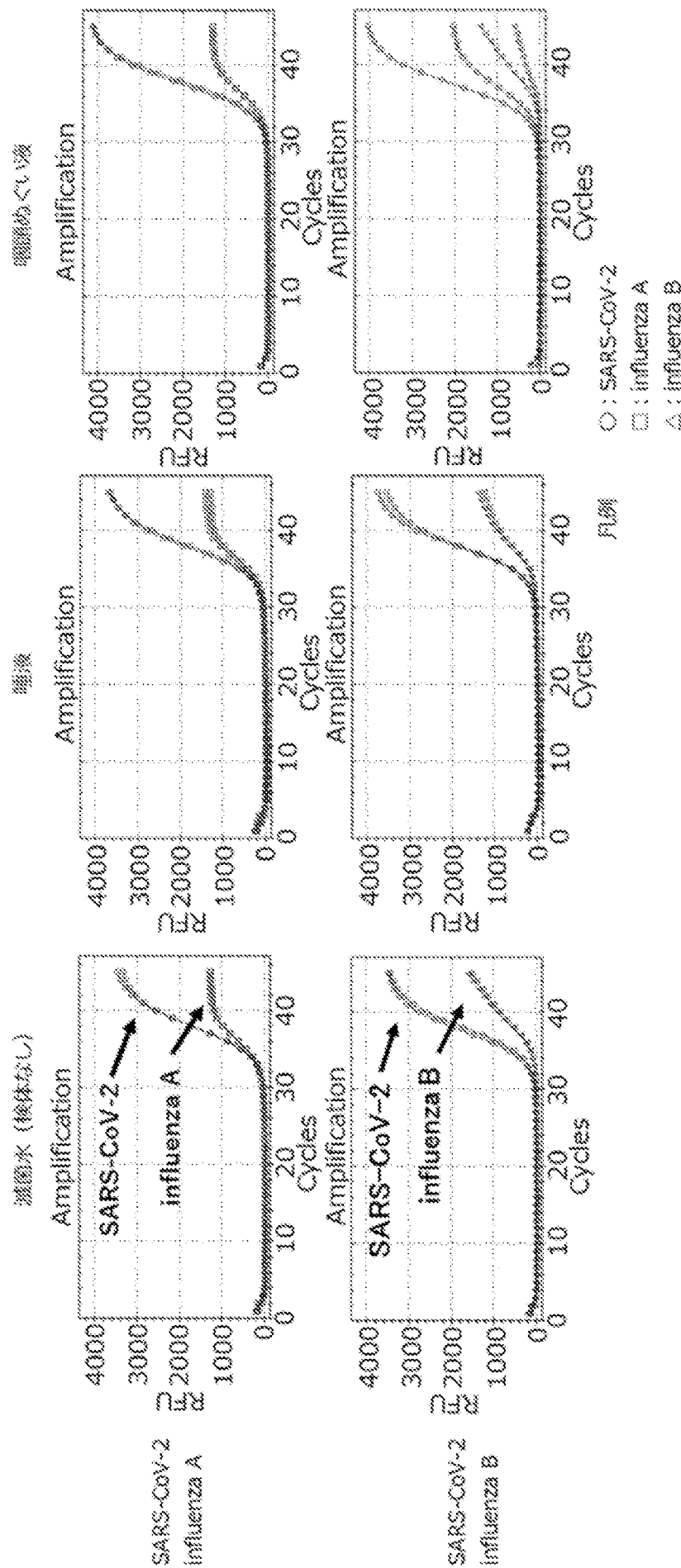
[請求項26] 前記変異体が、Tthポリメラーゼ（配列番号39）又はHawK Z05ポリメラーゼ（配列番号40）のアミノ酸配列と90%以上の同一性を示すアミノ酸配列からなり、且つ、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼ活性を示すものである、請求項25に記載のキット又は組成物。

[請求項27] 前記変異体が、Tthポリメラーゼ（配列番号39）又はHawK Z05ポリメラーゼ（配列番号40）のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、且つ、夾雑物耐性を有するDNAポリメラーゼ活性を示すものである、請求項25又は26に記載のキット又は組成物。

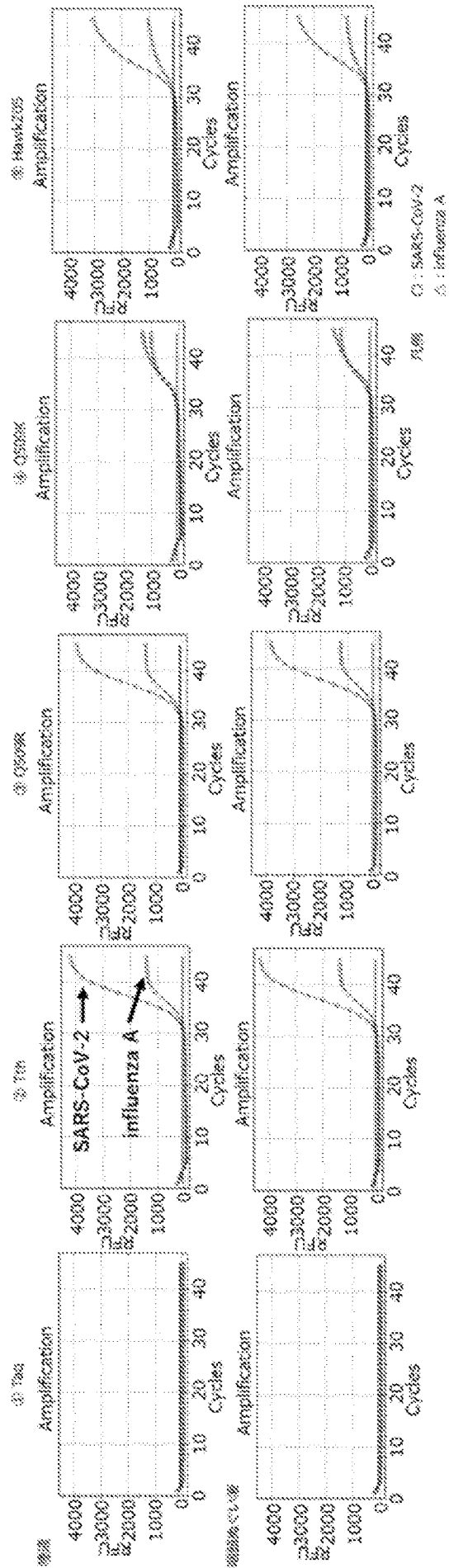
[請求項28] 逆転写酵素が、モロニー Maus 白血病ウイルス（MMRV）、トリ骨髄芽球症ウイルス（AMV）およびこれらの変異体からなる群より選択される少なくとも1種に由来する逆転写酵素である請求項23～27のいずれかに記載のキット又は組成物。

- [請求項29] 蛍光化合物の少なくとも1種類が2本鎖DNA結合蛍光化合物である、請求項22～28のいずれかに記載のキット又は組成物。
- [請求項30] 2本鎖DNA結合蛍光化合物が、SYBR（登録商標）Green I、SYBR（登録商標）Gold、SYTO-9、SYTP-13、SYTO-82、EvaGreen（登録商標；Biotium）、LCGreen、及びLightCycler（登録商標）480 ResoLightからなる群より選択される1種以上である、請求項29に記載のキット又は組成物。
- [請求項31] 蛍光化合物の少なくとも1種類がハイブリダイゼーションプローブである、請求項22～30のいずれかに記載のキット又は組成物。
- [請求項32] ハイブリダイゼーションプローブがTaqManプローブである請求項31に記載のキット又は組成物。
- [請求項33] 2種類以上の蛍光化合物が、ハイブリダイゼーションプローブ及び2本鎖DNA結合蛍光化合物の組み合わせを含む、請求項22～32のいずれかに記載のキット又は組成物。

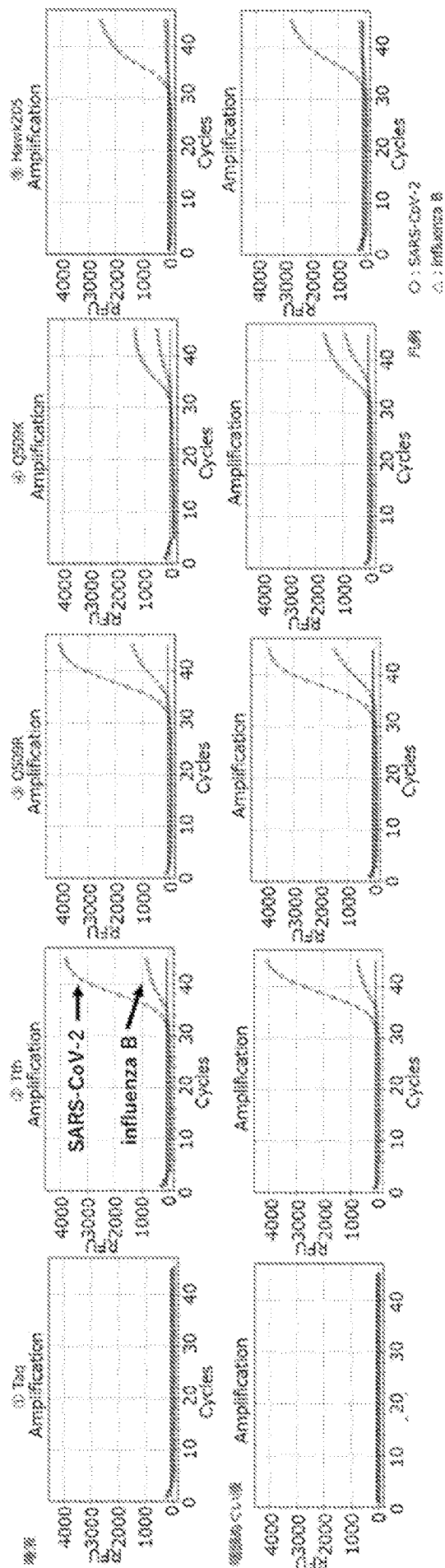
[図1]



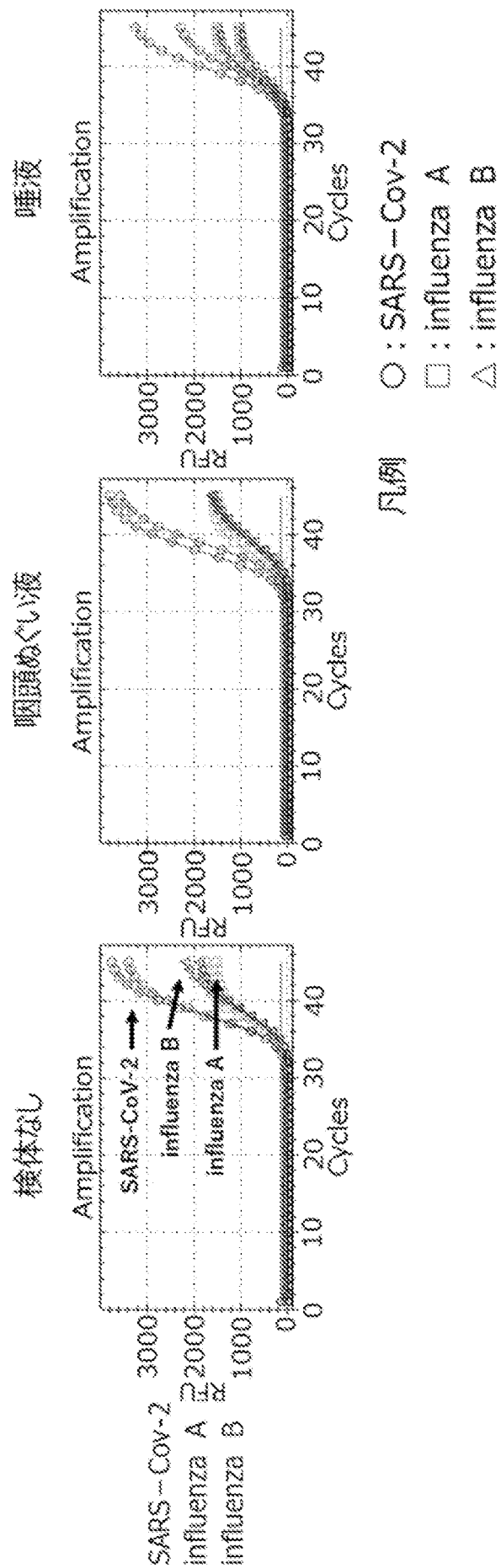
[図2]



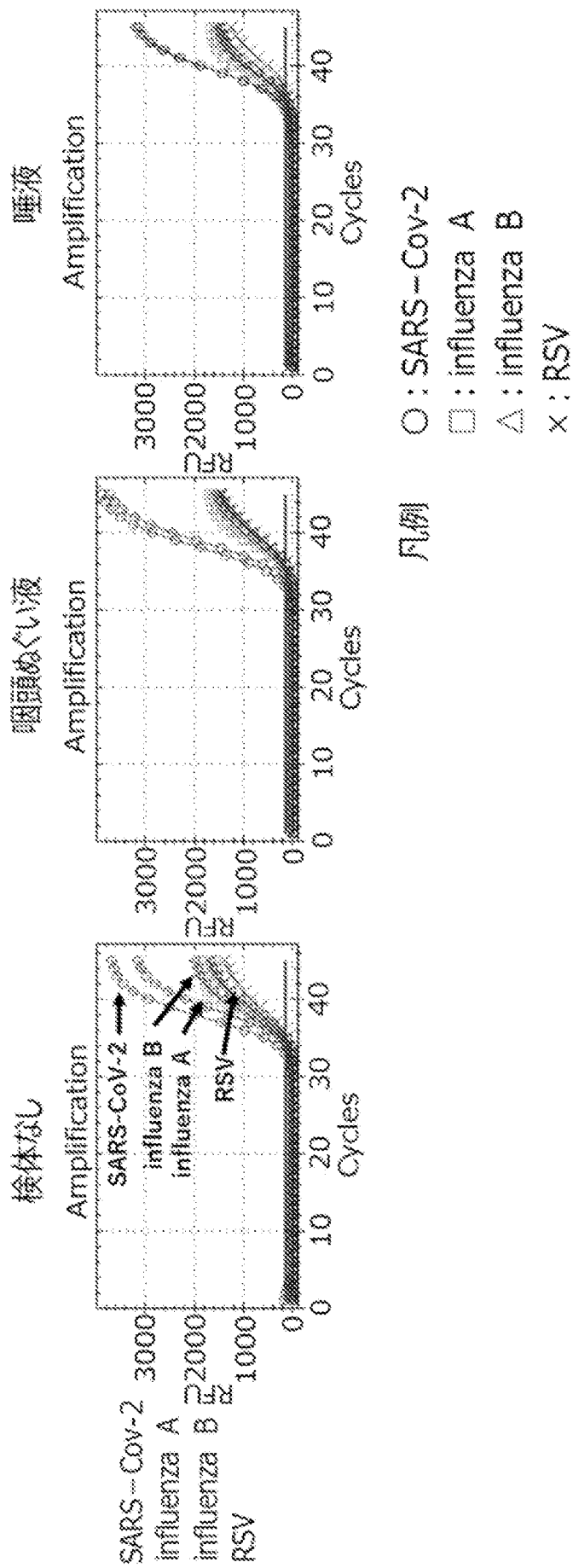
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/031095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/686(2018.01)i; **C12Q 1/689**(2018.01)i; **C12N 9/12**(2006.01)i; **G01N 33/53**(2006.01)i; **G01N 33/569**(2006.01)i
 FI: C12Q1/686 Z ZNA; G01N33/53 M; G01N33/569 G; C12N9/12; C12Q1/689 Z

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)

C12Q1/686; C12Q1/689; C12N9/12; G01N33/53; G01N33/569

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); Cplus/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 2020-18295 A (TOYO BOSEKI) 06 February 2020 (2020-02-06) claims, paragraphs [0024], [0026], [0034], [0042]-[0045], test examples	1-8, 10-16, 22-27, 29-33
Y	claims, paragraphs [0024], [0026], [0034], [0042]-[0045], test examples	1-33
Y	JP 2018-138 A (TOYO BOSEKI) 11 January 2018 (2018-01-11) claims, paragraphs [0003], [0019]-[0021], [0029], [0030], [0034]-[0036], examples	1-33
Y	JP 2020-108358 A (RICOH CO., LTD.) 16 July 2020 (2020-07-16) claims, paragraphs [0021], [0026], [0027], examples	17-21
A	JP 2017-131164 A (TOYO BOSEKI) 03 August 2017 (2017-08-03) claims, paragraphs [0019], [0020], examples	1-33
A	WO 2018/198682 A1 (TOYO BOSEKI) 01 November 2018 (2018-11-01) claims, paragraphs [0023], [0024], examples	1-33
A	JP 2020-115777 A (TOYO BOSEKI) 06 August 2020 (2020-08-06) claims, paragraphs [0019], [0020], examples	1-33

☐ 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

05 November 2021

Date of mailing of the international search report

16 November 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/JP2021/031095

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/JP2021/031095

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-18295	A	06 February 2020	(Family: none)	
JP	2018-138	A	11 January 2018	(Family: none)	
JP	2020-108358	A	16 July 2020	(Family: none)	
JP	2017-131164	A	03 August 2017	(Family: none)	
WO	2018/198682	A1	01 November 2018	(Family: none)	
JP	2020-115777	A	06 August 2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/686(2018.01)i; C12Q 1/689(2018.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i FI: C12Q1/686 Z ZNA; G01N33/53 M; G01N33/569 G; C12N9/12; C12Q1/689 Z		
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）） C12Q1/686; C12Q1/689; C12N9/12; G01N33/53; G01N33/569		
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 1971-2021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		
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 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/Biosis (STN)		
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
X	JP 2020-18295 A (東洋紡株式会社) 06.02.2020 (2020-02-06) 特許請求の範囲、段落0024、0026、0034、0042-0045、試験例	1-8, 10-16, 22-27, 29-33
Y	特許請求の範囲、段落0024、0026、0034、0042-0045、試験例	1-33
Y	JP 2018-138 A (東洋紡株式会社) 11.01.2018 (2018-01-11) 特許請求の範囲、段落0003、0019-0021、0029、0030、0034-0036、実施例	1-33
Y	JP 2020-108358 A (株式会社リコー) 16.07.2020 (2020-07-16) 特許請求の範囲、段落0021、0026、0027、実施例	17-21
A	JP 2017-131164 A (東洋紡株式会社) 03.08.2017 (2017-08-03) 特許請求の範囲、段落0019、0020、実施例	1-33
A	WO 2018/198682 A1 (東洋紡株式会社) 01.11.2018 (2018-11-01) 請求の範囲、段落0023、0024、実施例	1-33
☒ 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 05.11.2021		国際調査報告の発送日 16.11.2021
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） 齊藤 貴子 4N 4509 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	JP 2020-115777 A (東洋紡株式会社) 06.08.2020 (2020 - 08 - 06) 特許請求の範囲、段落 0 0 1 9、0 0 2 0、実施例	1-33

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/JP2021/031095

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2020-18295	A	06.02.2020	(ファミリーなし)	
JP	2018-138	A	11.01.2018	(ファミリーなし)	
JP	2020-108358	A	16.07.2020	(ファミリーなし)	
JP	2017-131164	A	03.08.2017	(ファミリーなし)	
WO	2018/198682	A1	01.11.2018	(ファミリーなし)	
JP	2020-115777	A	06.08.2020	(ファミリーなし)	