

(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
2018年1月11日(11.01.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/008319 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/021040
(22) 国際出願日: 2017年6月7日(07.06.2017)
(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:
PCT/JP2016/070343 2016年7月8日(08.07.2016) JP

(71) 出願人: 花王株式会社(KAO CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場
町一丁目14番10号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 井上 高良 (INOUE, Takayoshi);
〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽26
06 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP).
八谷 輝 (HACHIYA, Akira); 〒3213497 栃木
県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株
会社研究所内 Tochigi (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務
所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA
PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区
日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴
人形町ビル 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, 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, 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, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, 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: METHOD FOR PREPARING NUCLEIC ACID SAMPLE

(54) 発明の名称: 核酸試料の調製方法

(57) Abstract: Provided is a method with which a nucleic acid sample can be less invasively collected from a subject. The method for preparing a nucleic acid derived from a skin cell of a subject comprises separating a nucleic acid from a lipid, on a skin surface, collected from a subject.

(57) 要約: 低侵襲性に被験体から核酸試料を採取することができる方法の提供。被験体から採取された皮膚表上脂質から核酸を分離することを含む、被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製方法。



WO 2018/008319 A1

明 細 書

発明の名称：核酸試料の調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸試料の調製方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、解析技術の急速な発展に伴い、様々な生体試料中の分子（核酸、タンパク質、代謝物等）を詳細に解析することが可能となった。さらに、これらの分子解析によりヒトの生体内の現在、さらには将来の生理状態を調べる技術の開発も進んでいる。なかでも、核酸分子を用いた解析は、網羅的な解析方法が確立されていることから一度の解析で豊富な情報を得られること、および一塩基多形やRNA機能などに関する多くの研究報告に基づいて解析結果の機能的な紐付けが容易であることといった利点を有する。

[0003] 低侵襲もしくは非侵襲的に回収された生体試料中の核酸分子を用いた疾患等の診断および予測技術は、世界中の多くの研究機関が開発を進めており、飛躍的にその応用化が進展している。なかでも汎用されているのは、DNAもしくはRNAを用いた診断技術である。DNAを用いた診断技術は、一般に、唾液もしくは口腔内の細胞を採取し、そこに含まれるゲノムDNA中の一塩基多形を解析することで、将来の疾患リスクや自身の体質を診断する方法である。一方で、RNAを用いた診断技術は、血液、尿などの生体試料に含まれるRNAの発現情報を基に、現在の生体内における疾患の有無を診断する方法である（非特許文献1）。

[0004] 生体の様々な組織の中でも、皮膚は、外界と接していることから、侵襲性低く生体試料を採取できる組織として注目されている。従来、皮膚からの非侵襲的なもしくは低侵襲的な核酸の採取法としては、テープを用いた角層剥離や抜去毛の利用が報告されている（非特許文献2、特許文献1）。しかしながら、角層剥離による核酸採取には、専用のテープが必要なこと、採取量が微量であること、および採取した核酸から表皮由来の発現情報しか得られ

ないこと、などの欠点がある。また抜去毛からの核酸採取には、毛抜去の際に痛みを伴うこと、および採取した核酸から毛包由来の発現情報しか得られないこと、などの欠点がある。また、皮膚からの非侵襲的な核酸の採取法として、湿らせたコットンスワブ（綿球）で皮膚表面を拭うことによりヒト皮膚サンプルを採取し、RNAプロファイリングを行なうことが報告されている（非特許文献3）。この報告において採取されるヒト皮膚サンプルは、その採取方法から皮膚表面上に存在する脂質ではないと判断される。

[0005] （特許文献1）特開2005-192409号公報

（非特許文献1）Crit Rev Clin Lab Sci, 2014, 51, 200-231

（非特許文献2）J Invest Dermatol, 2006, 126, 2234-2241

（非特許文献3）Forensic Sci Int Genet, 2012, 6(5):565-577

発明の概要

[0006] 一態様において、本発明は、被験体から採取された皮膚表上脂質から核酸を分離することを含む、被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製方法を提供する。

別の一態様において、本発明は、前記方法で調製した核酸を解析することを含む、核酸の解析方法を提供する。

さらなる態様において、本発明は、被験体の皮膚表上脂質の採取用具を含む、被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製用キットを提供する。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]各種生体試料中に含まれるRNA。

[図2]各種生体試料由来RNAにおけるmRNA発現。

[図3]SSLにおける表皮、汗腺、毛包、真皮および皮脂腺のマーカー遺伝子の発現量。

[図4]次世代シーケンサーとリアルタイムPCRとの発現量解析結果の相関性。

発明の詳細な説明

[0008] 低侵襲的に、かつ採取者や場所を選ばずに、被験体から核酸試料を採取す

ることができる方法の開発が望まれる。さらに、皮膚およびその他の様々な組織や器官に由来する情報を得ることができるような核酸試料を得ることができればなお望ましい。

[0009] 本発明者は、皮膚表上に存在する脂質のなかに被験体の皮膚細胞に由来する核酸が含まれていること、当該核酸が、表皮だけでなく、皮脂腺、毛包等の他の組織における遺伝子発現プロファイルをも反映していることを見出した。よって本発明者は、当該脂質中の核酸を解析することによって、簡便かつ非侵襲的に、かつより包括的に、被験体の遺伝子解析や状態診断などを行うことが可能になることを見出した。

[0010] 本発明は、簡便かつ非侵襲的に被験体の核酸を調製する方法およびそのための用具を提供する。本発明によれば、被験体から簡便かつ非侵襲的に核酸試料を採取することができる。本発明により調製された核酸は、被験体の皮膚に関する遺伝子発現解析およびその他の遺伝子情報の解析、被験体の皮膚に関する機能解析、被験体の皮膚状態の解析（例えば、皮膚ガンの診断）、さらには被験体の皮膚以外の部位または全身の状態の解析（例えば、各種疾患の診断）などのための試料として有用である。

[0011] （核酸の調製方法）

一態様において、本発明は、被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製方法を提供する。一実施形態において、本発明による被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製方法は、被験体から採取された皮膚表上脂質から核酸を分離することを含む。

[0012] 本明細書において、「皮膚表上脂質（skin surface lipids；SSL）」とは、皮膚の表上に存在する脂溶性画分をいい、皮脂と呼ばれることもある。一般に、SSLは、皮膚表上にある皮脂腺等の外分泌腺から分泌された分泌物を主に含み、皮膚表面を覆う薄い層の形で皮膚表上に存在している。

[0013] 本明細書において、「皮膚」とは、特に限定しない限り、体表の表皮、真皮、毛包、ならびに汗腺、皮脂腺およびその他の腺などの組織を含む領域の

総称である。

[0014] 本発明の方法における被験体は、皮膚上にSSLを有する生物であればよい。被験体の例としては、ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含む哺乳動物が挙げられ、好ましくはヒトである。好ましくは、該被験体は、自身の核酸の解析を必要とするかまたは希望するヒトまたは非ヒト哺乳動物である。また好ましくは、該被験体は、皮膚における遺伝子発現解析、または核酸を用いた皮膚もしくは皮膚以外の部位の状態の解析を必要とするかまたは希望するヒトまたは非ヒト哺乳動物である。

[0015] 被験体から採取されたSSLは、該被験体の皮膚細胞で発現した核酸を含み、好ましくは該被験体の表皮、皮脂腺、毛包、汗腺、および真皮のいずれかで発現した核酸を含み、より好ましくは該被験体の表皮、皮脂腺、毛包、および汗腺のいずれかで発現した核酸を含む。したがって、本発明の方法により調製される被験体の皮膚細胞に由来する核酸は、好ましくは被験体の表皮、皮脂腺、毛包、汗腺および真皮から選択される少なくとも1部位由来の核酸であり、より好ましくは表皮、皮脂腺、毛包および汗腺から選択される少なくとも1部位由来の核酸である。

[0016] 本発明の方法により調製される被験体の皮膚細胞に由来する核酸は、DNA、RNAなど特に限定されないが、好ましくはRNAである。RNAとしては、mRNA、tRNA、rRNA、small RNA（例えば、microRNA (miRNA)、small interfering RNA (siRNA)、Piwi-interacting RNA (piRNA) など）、long intergenic non-coding (linc) RNA、などが挙げられる。mRNAは、タンパク質をコードするRNAであり、多くは1000nt以上の長さを有する。miRNA、siRNA、piRNAおよびlincRNAは、タンパク質をコードしないnon-coding (nc) RNAである。miRNAは、ncRNAのうち、長さ19-30nt程度の小さなRNAである。lincRNAは、mRNA同様にpoly-Aをもつ長いnon-coding RNAであり

、200 nt以上の長さを有する（非特許文献1）。より好ましくは、本発明の方法において調製される核酸は、200 nt以上の長さを有するRNAである。さらに好ましくは、調製される核酸は、mRNAおよびlincRNAからなる群より選択される少なくとも1種である。

[0017] 一実施形態において、本発明の方法は、被験体のSSLを採取することをさらに含んでもよい。SSLが採取される皮膚の部位としては、頭、顔、首、体幹、手足等の身体の任意の部位の皮膚、アトピー、ニキビ、炎症、腫瘍等の疾患を有する皮膚、創傷を有する皮膚、などが挙げられるが、特に限定されない。また、SSLが採取される皮膚の部位は、好ましくは、手のひら、背部、足の裏、又は指の皮膚を含まない。

[0018] 被験体の皮膚からのSSLの採取には、皮膚からのSSLの回収または除去に用いられているあらゆる手段を採用することができる。好ましくは、後述するSSL吸収性素材、SSL接着性素材、または皮膚からSSLをこすり落とす器具を使用することができる。SSL吸収性素材又はSSL接着性素材としては、SSLに親和性を有する素材であれば特に限定されず、例えばポリプロピレン、パルプ等が挙げられる。皮膚からのSSLの採取手順のより詳細な例としては、あぶら取り紙、あぶら取りフィルム等のシート状素材へSSLを吸収させる方法、ガラス板、テープ等へSSLを接着させる方法、スパーテル、スクレイパー等によりSSLをこすり落として回収する方法、などが挙げられる。SSLの吸着性を向上させるため、脂溶性の高い溶媒を予め含ませたSSL吸収性素材を用いてもよい。一方、SSL吸収性素材が水溶性の高い溶媒や水分を含んでいると、SSLの吸着が阻害されるため好ましくない。SSL吸収性素材は、乾燥した状態で用いることが好ましい。

[0019] 採取したSSLからの核酸の分離には、生体試料からの核酸の抽出または精製に通常使用される方法、例えば、フェノール/クロロホルム法、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法、またはTRIzol

o l (登録商標)、R N e a s y (登録商標)などのカラムを用いた方法、シリカをコーティングした特殊な磁性体粒子を用いる方法、S o l i d P h a s e R e v e r s i b l e I m m o b i l i z a t i o n 磁性体粒子を用いる方法、I S O G E N 等の市販のDNAもしくはRNA抽出試薬による抽出などを用いることができる。

[0020] (核酸の解析方法)

本発明の方法により調製された被験体の皮膚細胞に由来する核酸は、核酸を用いる各種の解析または診断に使用することができる。したがって、本発明はまた、上記本発明による核酸の調製方法により調製した核酸を解析することを含む、核酸の解析方法を提供する。本発明により調製されたSSL中の核酸を用いて行うことができる解析や診断の例としては、以下が挙げられる：

(i) 被験体の皮膚に関する遺伝子発現解析およびその他の遺伝子情報の解析、ならびにそれらの解析に基づく被験体の皮膚に関する機能解析、など；

(ii) 被験体の皮膚状態の解析、例えば、皮膚の健康状態の評価もしくは将来予測、皮膚疾患の診断もしくは予後診断、皮膚外用剤の効能評価、皮膚ガンの診断もしくは予後診断、皮膚の微細変化の評価、など；

(iii) 被験体の皮膚以外の部位または全身の状態の解析、例えば、全身的な健康状態の評価もしくは将来予測、および神経疾患、心血管疾患、代謝性疾患、ガン等の各種疾患の診断もしくは予後診断、など。

[0021] SSL中の核酸を用いた解析や診断のより詳細な例を以下に示す。

遺伝子発現解析

後述する実施例に示すとおり、SSLは、被験体由来のmRNA等の高分子量RNAを豊富に含んでいたが、一方、尿、血清、唾液、角層といった従来一般的に使用されている生体試料には、高分子量のRNAはほとんど存在していなかった(実施例1～3)。SSLは、被験体から非侵襲的に採取することができるmRNAの供給源であり、遺伝子発現解析用の生体試料として有用である。さらに、SSL中のmRNAは、皮脂腺、毛包および表皮の

遺伝子発現プロファイルを反映していることから（実施例4）、SSLは、皮膚、特に皮脂腺、毛包および表皮の遺伝子発現解析用の生体試料として好適である。

[0022] 病理学的診断

最近の報告によれば、ガン細胞で発現が変化するRNA群の中の約63%がタンパク質をコードするmRNAである（Cancer Res. 2016, 76, 216-226）。したがって、mRNAの発現状態を測定することにより、ガン等の疾患による細胞の生理状態の変化をより忠実に捉えることができ、より正確な身体状態の診断が可能になると考えられる。SSLは、mRNAを豊富に含んでおり、さらにガンとの関連性が報告されているSOD2のmRNAを含む（Physiol Genomics, 2003, 16, 29-37; Cancer Res, 2001, 61, 6082-6088）。したがって、SSLは、皮膚ガン等のガンの診断もしくは予後診断用の生体試料として有用である。

[0023] 近年、肥満、アルツハイマー、乳がん、心疾患等の皮膚以外の組織での疾患を有する患者において皮膚中の分子の発現が変動すること、したがって“皮膚は体内の健康状態の窓（window to body's health）”ということができると報告されている（Eur J Pharm Sci. 2013, 50, 546-556）。したがって、SSL中のmRNAの発現状態を測定することで、被験体の皮膚以外の部位における生理状態、または全身的な生理状態を解析できる可能性がある。

[0024] non-coding RNA解析

近年、細胞の遺伝子発現におけるmiRNA、lincRNA等のnon-coding（nc）RNAの関与が着目され、盛んに研究が進められている。また従来、尿や血清中のmiRNAを用いた非侵襲もしくは低侵襲的なガン等の診断方法が開発されている（例えば、Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105, 10513-10518; Urol Oncol, 2010, 28, 655-661）。SSLから調製されるmiRNA、lincRNA等のncRNAを、上記研究や診断のための試料に用いることができる。

[0025] 核酸マーカーのスクリーニングまたは検出

SSLから調製した核酸を試料として、疾患もしくは状態の核酸マーカーのスクリーニングや検出を行うことができる。本明細書において、疾患もしくは状態の核酸マーカーとは、その発現が、所与の疾患もしくは状態の判定またはそのリスク判定のための指標となる核酸をいう。好ましくは、核酸マーカーはRNAマーカーであり、該RNAは、好ましくはmRNA、miRNA、もしくはlincRNAである。該核酸マーカーがターゲットとする疾患もしくは状態としては、例えば、各種皮膚疾患、皮膚の健康状態（光老化、乾燥、水分もしくは油分量、肌のハリ、くすみなど）；ならびに、上記「病理学的診断」の項で述べた、皮膚ガン等のガン、および肥満、アルツハイマー、乳がん、心疾患等の皮膚以外の組織での疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。核酸の発現の解析は、Real-time PCR、マイクロアレイ、次世代シーケンサーを用いたRNA発現解析等の公知の手段に従って行うことができる。

[0026] 一例は、疾患もしくは状態の核酸マーカーの選択方法である。該方法では、所定の疾患もしくは状態またはそのリスクを有する集団を被験体として、本発明の核酸の調製方法に従って、被験体の皮膚細胞に由来する核酸を調製する。該集団から調製された核酸について、その発現（発現レベル等）を、対照の発現と比較する。該対照としては、該所定の疾患もしくは状態またはそのリスクを有さない集団、およびそれに基づく統計学的データなどが挙げられる。対照と比べて異なる発現を示す核酸を、該所定の疾患もしくは状態のマーカーまたはその候補として選択することができる。

[0027] 別の一例は、疾患もしくは状態の核酸マーカーの検出方法、または該マーカー検出に基づく疾患もしくは状態、またはそのリスクの判定方法である。該方法では、所定の疾患もしくは状態、またはそのリスクの判定を所望または必要とする被験体から、本発明の核酸の調製方法に従って、被験体の皮膚細胞に由来する核酸を調製する。次いで、調製された核酸から所定の疾患もしくは状態の核酸マーカーを検出する。該核酸マーカーの有無や発現量に基

づいて、被験体の該疾患もしくは状態、またはそのリスクを判定する。

[0028] (核酸の調製用キット)

さらなる一態様において、本発明は、被験体のSSLの採取用具を含む、被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製用キットを提供する。SSLの採取用具としては、例えば、SSL吸収性もしくは接着性素材、皮膚からSSLをこすり落とす器具、などが挙げられる。該SSL吸収性素材は、好ましくはポリプロピレン等の材料から製造された、可撓性のシート状素材である。該SSL吸収性素材の好ましい例としては、あぶら取り紙、あぶら取りフィルム等が挙げられる。該SSL吸収性素材は、水溶性溶媒や水分を含まない乾燥状態であることが好ましい。該SSL接着性素材は、好ましくはシート状もしくは板状であり、必要に応じて、その表面にSSLを接着させるためのpoly-L-lysine等の接着剤が塗布されていてもよい。該SSL接着性素材の好ましい例としては、ガラス板、テープ等が挙げられる。該SSLをこすり落とす器具の好ましい例としては、スパーテル、スクレイパー等が挙げられる。

[0029] 本発明による核酸の調製用キットは、上記採取用具で採取したSSLから核酸を分離するための試薬をさらに含んでいてもよい。当該試薬としては、生体試料からのDNAもしくはRNAの抽出または精製に通常使用される試薬を用いることができる。

[0030] 本発明の例示的实施形態として、以下の物質、製造方法、用途、方法等をさらに本明細書に開示する。但し、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

[0031] [1] 被験体から採取された皮膚表上脂質から核酸を分離することを含む、被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製方法。

[2] 好ましくは、前記被験体の皮膚表上脂質を採取することをさらに含む、[1]記載の方法。

[3] 好ましくは、前記核酸が表皮、皮脂腺、毛包、汗腺および真皮から選択される少なくとも1部位由来の核酸であり、より好ましくは、前記核酸が

表皮、皮脂腺、毛包および汗腺から選択される少なくとも1部位由来の核酸である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔4〕好ましくは、前記核酸がRNAである、〔1〕～〔3〕のいずれか1項記載の方法。

〔5〕好ましくは、前記RNAが200nt以上の長さである、〔4〕記載の方法。

〔6〕好ましくは、前記RNAがmRNAおよびlincRNAからなる群より選択される少なくとも1種である、〔4〕又は〔5〕記載の方法。

〔7〕好ましくは、前記皮膚表上脂質の採取が皮膚表上脂質吸収性素材、皮膚表上脂質接着性素材、または皮膚から皮膚表上脂質をこすり落とす器具を用いて行われる、〔1〕～〔6〕のいずれか1項記載の方法。

〔8〕好ましくは、前記皮膚表上脂質が、頭、顔、首、体幹もしくは手足の皮膚、疾患を有する皮膚、または創傷を有する皮膚における皮膚表上脂質である、〔1〕～〔7〕のいずれか1項記載の方法。

〔9〕好ましくは、前記皮膚表上脂質が、手のひら、背部、足の裏、又は指の皮膚の皮膚表上脂質を含まない、〔1〕～〔8〕のいずれか1項記載の方法。

〔10〕〔1〕～〔9〕のいずれか1項記載の方法で調製した核酸を解析することを含む、核酸の解析方法。

〔11〕所定の疾患もしくは状態またはそのリスクを有する集団を被験体として、〔1〕～〔9〕のいずれか1項記載の方法により核酸を調製すること、

調製された核酸の発現を対照と比較すること、
を含む、該所定の疾患もしくは状態の核酸マーカーの選択方法。

〔12〕〔1〕～〔9〕のいずれか1項記載の方法により被験体の核酸を調製すること

調製された核酸から、所定の疾患もしくは状態の核酸マーカーを検出すること、

を含む、所定の疾患もしくは状態の核酸マーカーの検出方法。

〔１３〕被験体の皮膚表上脂質の採取用具を含む、被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製用キット。

〔１４〕好ましくは、前記採取用具が皮膚表上脂質吸収性素材、皮膚表上脂質接着性素材、または皮膚から皮膚表上脂質をこすり落とす器具である、〔１３〕記載のキット。

〔１５〕好ましくは、採取した皮膚表上脂質から核酸を分離するための試薬をさらに含む、〔１３〕又は〔１４〕記載のキット。

〔１６〕前記核酸が、好ましくは表皮、皮脂腺、毛包、汗腺及び真皮から選択される少なくとも１部位由来の核酸であり、より好ましくは表皮、皮脂腺、毛包および汗腺から選択される少なくとも１部位由来の核酸である、〔１３〕～〔１５〕のいずれか１項記載のキット。

〔１７〕好ましくは、前記核酸がRNAである、〔１３〕～〔１６〕のいずれか１項記載のキット。

実施例

[0032] 以下、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0033] 実施例１ 各種生体試料中のRNAの解析

皮膚の角層、皮膚表上脂質（SSL）、血清、尿、および唾液中のRNAを解析した：

角層は、非特許文献２に記載された方法に従って、アクリルテープ（２．５ｃｍ×３．０ｃｍ）を用いて、被験者の額の角層を同一部位から深さ方向に連続で４枚採取した後、RNAを抽出した；

SSLは、あぶら取りフィルム（３Ｍジャパン）を用いて、被験者の顔全体から回収した。次いであぶら取りフィルムを適当な大きさに切断し、TRIzol（登録商標）試薬（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）を用いて、付属のプロトコルに準じてRNAを抽出した；

ヒト血清、尿および唾液は、コスモバイオ社から購入した。唾液は、その

中に混在するムチンと口腔内細胞を除去するために、15000 rpmで5分間遠心した後、上清を新しいチューブに移して試料として用いた。これらの血清、尿、唾液試料から、Trizol（登録商標）LS試薬（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）を用いて、付属のプロトコルに準じてRNAを抽出した；

次いで、抽出されたRNAを、Agilent RNA6000ピコキット（アジレント・テクノロジー株式会社）を用いて解析した。

[0034] 結果を図1に示す。SSL中のRNAは、細菌に由来する23Sおよび16SのrRNAに加えて、ヒトに由来する28S rRNA、及び真菌とヒトに由来すると考えられる18S rRNAを含んでいた。角層は、ピークがまったく観察されなかったことから、RNAがほとんど存在していないと推定された。血清、尿、唾液から抽出したRNAからは、低分子量のRNA（Small RNA）のピークが確認されたが、これは血清、尿、唾液にmiRNA等の低分子量のRNAが存在しているという従来の報告（非特許文献1）と一致する。

[0035] 実施例2 SSL中に含まれる各生物種由来のRNAの割合

SSL中に含まれる各生物種由来のRNAの割合を算出するために、SSL中における細菌に共通して存在するrRNAの配列、真菌に共通して存在するrRNAの配列、およびヒトのrRNAの配列のそれぞれのコピー数を、Real-time PCRによる絶対定量法により求めた。

[0036] 細菌の16S rRNAは、Staphylococcus epidermidis JCM2414株の16S rRNA領域をpUC118にクローニングした。真菌の26S rRNAは、Malassezia globosa CBS7874株の26S rRNA領域をpUC118にクローニングした。ヒトの18S rRNAは、ヒト18S rRNA領域をpcDNA3.1にクローニングした。これらのプラスミドDNAをReal-time PCRの標準試料として使用した。PCRプライマーは、細菌については16S rRNAの共通配列（Appl Environ Microbiol, 201

2, 78, 5938-5941)、真菌については26S rRNAの共通配列(PLoS One, 2012, e32847)、ヒトについては18S rRNAの配列の情報を基に設計した(表1)。

[0037] [表1]

Primer name	Sequence (5'-3')	SEQ ID: No.	Probe type	Target
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1	SYBR	All bacteria (16S rRNA)
519R	GWATTACCGCGGCKGCTG	2	Green	
NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG	3	SYBR	All fungi (26S rRNA)
NL-4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	4	Green	
TaqMan probe (Hs99999901_s1)	Unknown		FAM	Human (18S rRNA)

[0038] 3名の被験者から採取したSSL中のRNAを、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (ライフテクノロジーズジャパン株式会社)を用いて逆転写し、得られたcDNAを鋳型としたReal-time PCRにより、SSL中の各生物種のrRNAのコピー数を算出した。その結果、実施例1の結果と同様に、SSLのRNAにはbacteria、fungiおよびhuman由来のrRNAが含まれており、その中でもhumanのrRNAが大きな割合を占めることが明らかとなった(表2)。

[0039] [表2]

Subjects	Copy number		
	Bacteria (16S rRNA)	Fungi (26S rRNA)	Human (18S rRNA)
No.1	2.9E+05	n.d.	1.2E+06
No.2	2.7E+06	5.6E+04	3.7E+07
No.3	2.0E+06	1.4E+04	9.4E+06

n.d.: not detected

[0040] 実施例3 各種生体試料におけるmRNAの検出

ユビキタスに発現しているGAPDHとSOD2のmRNAを指標に、実

施例 1 で用いた各種生体試料における mRNA の有無を評価した。

実施例 1 で抽出した各種生体試料の RNA を、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いて逆転写し、得られた cDNA を鋳型として RT-PCR を行った。陽性コントロールとして、ヒト表皮細胞から単離した RNA を用いた。RT-PCR では、Advantage 2 PCR Kit (タカラバイオ) および表 3 に示すプライマーを用い、PCR プログラム (95℃、5 分間→[95℃、15 秒→60℃、30 秒→72℃、30 秒]×35 サイクル→72℃、7 分間) に従って、GAPDH および SOD2 の cDNA を増幅した。PCR 後、2% アガロースゲルと TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いて電気泳動を行い、目的のバンドを検出した。

[0041] [表3]

Primer name	Sequence (5'-3')	SEQ ID: No.	Product size (bp)
GAPDH-F	CCCTTCATTGACCTCAACTAC	5	349
GAPDH-R	AGTGAGCTTCCCGTTCAGCT	6	
SOD2-F	CCCTTCATTGACCTCAACTAC	7	257
SOD2-R	AGTGAGCTTCCCGTTCAGCT	8	

[0042] 結果を図 2 に示す。GAPDH と SOD2 のいずれについても、SSL では、陽性コントロールと同等の位置にバンドが検出され、mRNA の存在が確認された。したがって、SSL は、mRNA を含んでおり、皮膚の遺伝子発現解析用の生体試料として利用可能であることが示された。一方、角層、血清、尿および唾液では、GAPDH および SOD2 のいずれのバンドも確認できなかった。

[0043] さらに、SSL中にmRNAが検出されたSOD2は、細胞にとって有害なsuper oxide anionを過酸化水素へ変換する酵素であり、ガンとの関連性が報告されている。この遺伝子のヘテロ欠損型のマウスでは、全身組織のDNAダメージの蓄積が多いこと、酸化ストレスを誘導したときに野生型よりも死亡率が上昇すること、さらにガンの発生率が、野生型よりも上昇することが報告されている(Physiol Genomics, 2003, 16, 29-37)。一方、SOD2を皮膚で過剰発現させたマウスでは、皮膚に酸化ストレスを加え続けたときでも皮膚ガンの発生率が野生型よりも減少することが報告されている(Cancer Res, 2001, 61, 6082-6088)。したがって、SOD2 mRNAを含むSSLは、皮膚ガン等のガンの発症リスクまたは予後診断のための生体試料としても期待される。

[0044] 実施例4 次世代シーケンサーを用いたSSL中RNAの網羅的遺伝子発現解析

(1) SSLを試料とした網羅的遺伝子発現解析の実施可能性について検証した。3名の被験者の顔面からあぶら取りフィルムを用いてSSLを採取し、テクニカルエラーを検証するためにそれを2等分した後に、それぞれからRNAを抽出した。抽出したRNAを用いて、次世代シーケンサーIon Protonシステム(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)による遺伝子発現の網羅的解析を実施した。すなわち、採取したRNAから、Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)のプロトコルに従ってライブラリーを作製し、それを用いてIon Chefシステム(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)によるエマルジョンPCRを実施した。得られたPCR産物をIon PI Chipにローディングし、Ion Protonシステムを用いてシーケンスを行って、表皮、汗腺、真皮、毛包、皮脂腺のマーカー遺伝子にマッピングされたリード数を算出した。マーカー遺伝子は、文献情報に基づいて選抜した(Int J Mol Med, 2014, 34, 997-1003; J Invest Dermatol, 1997, 108, 324-329; J In

vest Dermatol, 2002, 119, 1137-1149 ; Development ; 2013, 140, 4870-4880)。

[0045] 結果を図3に示す。SSLからは、表皮、汗腺、毛包および皮脂腺のマーカ遺伝子が検出された。また真皮のマーカ遺伝子もわずかに検出された。このことから、SSLには、主に表皮、汗腺、毛包および皮脂腺に由来するRNA分子、さらにわずかであるが真皮に由来するRNA分子が含まれていることが明らかとなった。

[0046] (2) 上記(1)で得られた次世代シーケンサーによる解析結果の信頼性を、mRNAの定量方法として最も信頼性が高いリアルタイムPCRにより検証した。(1)で調製したRNA試料からSuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCRを用いてcDNAを合成し、リアルタイムPCRにより次世代シーケンサーで検出された代表的な遺伝子としてIL-8、GAPDHおよびPLIN2の遺伝子発現を定量し、(1)でのシーケンサーによる解析結果と比較した。IL-8、GAPDHおよびPLIN2の遺伝子発現はいずれも、次世代シーケンサー解析とリアルタイムPCR解析との間で有意な正の相関を示し、次世代シーケンサーによる解析結果の信頼性を裏付けた(図4)。

[0047] 実施例5 皮膚表上脂質中のRNA解析

前述した非特許文献3で報告されている湿らせたスワブで採取されたヒト皮膚サンプルと本願の皮膚表上脂質との比較を行った。

[0048] (試料採取)

額の真ん中から左右それぞれ3cm×5cmの範囲を採取範囲とし、片側からあぶら取りフィルム(ポリプロピレン、3cm×5cm、3Mジャパン)を用いて、もう片側からPBSを染み込ませて湿らせたカルチャースワブ(カルチャースワブEZ、ポリウレタン、日本BD)を用いて、採取範囲内全面を一定の力を加えながら、こすり付ける作業を3回繰り返すことにより皮膚表上物質を採取した。

[0049] (脂質量の評価)

採取した試料の脂質量は、皮膚表上脂質の主要な成分であるトリグリセリド量を指標として評価した。採取に用いたあぶら取りフィルムは適当な大きさに切断し、一方採取に用いたカルチャースワブは先端部分を回収して、それぞれB l i g h - D y e r法を用いて脂質を抽出した。具体的には、クロロホルム、メタノール、p h o s p h a t e b u f f e r e d s a l i n e (P B S) をサンプルに添加した後に、十分に振とうを行い脂質を抽出した。抽出物にさらにクロロホルムとP B Sを添加し、十分に振とうを行った後に遠心分離機により有機相と水相に分離し、有機相を回収した。有機相を30℃の温度下で窒素ガスを吹付けて乾固させた後、1% T r i t o n X - 1 0 0 (S i g m a A l d r i c h) を含むP B S溶液1 mLに溶解し、試料溶液を調製した。また、採取に用いていないあぶら取りフィルム及びカルチャースワブを同様に処理して、ブランクの試料溶液を調製した。S e r u m T r i g l y c e r i d e Q u a n t i f i c a t i o n K i t (C E L L B I O L A B S , I N C) を用いて、添付のプロトコルに従い、570 nmの吸光度を測定し、それぞれの試料溶液のトリグリセリド量を定量した。

[0050] トリグリセリド量の定量結果を表4に示す。あぶら取りフィルムで皮膚表上脂質を採取した場合、試料溶液中のトリグリセリド濃度は100 μ M以上であったのに対し、湿らせたコットンスワブで皮膚表上物質を採取した場合、試料溶液中の試料溶液中のトリグリセリド濃度は検出限界である10 μ M以下であり、ブランクとの差はなかった。従って、湿らせたコットンスワブで採取される皮膚表上物質には、実質的に皮膚表上脂質に由来する成分は含まれないことを示している。

[0051]

[表4]

試料	吸光度 (570nm)	トリグリセリド濃度 (μ M)
あぶら取りフィルム(ブランク)	0.047	<10
あぶら取りフィルム(試料)	0.1655	117.8
カルチャースワブ(ブランク)	0.055	<10
カルチャースワブ(試料)	0.055	<10

[0052] (ヒトRNA分子の解析)

前記に従い額の左右からあぶら取りフィルム又はPBSで湿らせたカルチャースワブで皮膚表上物質を採取した。あぶら取りフィルムについては適当な大きさに切断し、カルチャースワブについては先端部分を回収して、それぞれRNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)を用いて、付属のプロトコルに準じてRNAを抽出した。抽出されたRNAはエタノール沈殿し、10 μ Lの水に溶解した。抽出したRNAを用いて、次世代シーケンサーIon S5/XLシステム(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)による遺伝子発現の網羅的解析を実施した。すなわち、採取したRNAからIon AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)のプロトコルに従ってライブラリーを作製し、それを用いてIon chefシステム(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)によるエマルジョンPCRを実施した。得られたPCR産物をIon 540 Chipにローディングし、Ion S5/XLシステムを用いてシーケンシングを実施した。

[0053] あぶら取りフィルム及びカルチャースワブで採取したそれぞれの皮膚表上物質中のRNAの網羅的な発現解析を実施した結果、一つの遺伝子に対して10リード以上の配列断片が検出できたヒト遺伝子の数は、あぶら取りフィルム採取物にだけ確認されたものとして5294遺伝子であったのに対し、カルチャースワブ採取物にだけ確認されたものとしてわずか132遺伝子で

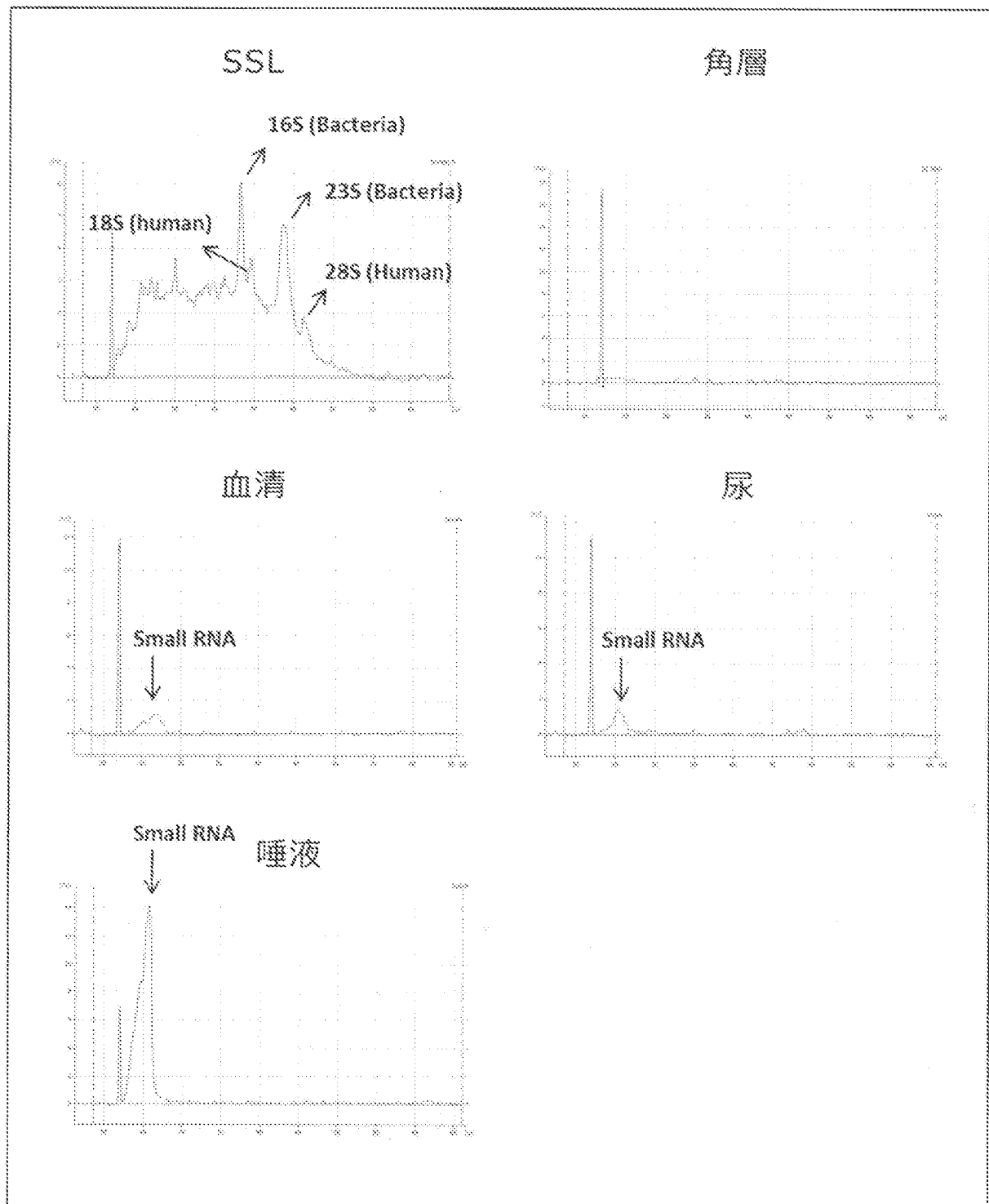
あり、あぶら取りフィルム採取物及びカルチャースwab採取物に共通して確認されたものとして625遺伝子であった。この結果より、皮膚表上脂質を実質的に含まない湿らせたカルチャースwabで採取された皮膚表上物質と比較して、あぶら取りフィルムで採取された皮膚表上脂質には、多種多様なRNA分子が含まれており、被験体の遺伝子解析や状態診断を行う上で皮膚表上脂質は非常に有用であることが示された。

請求の範囲

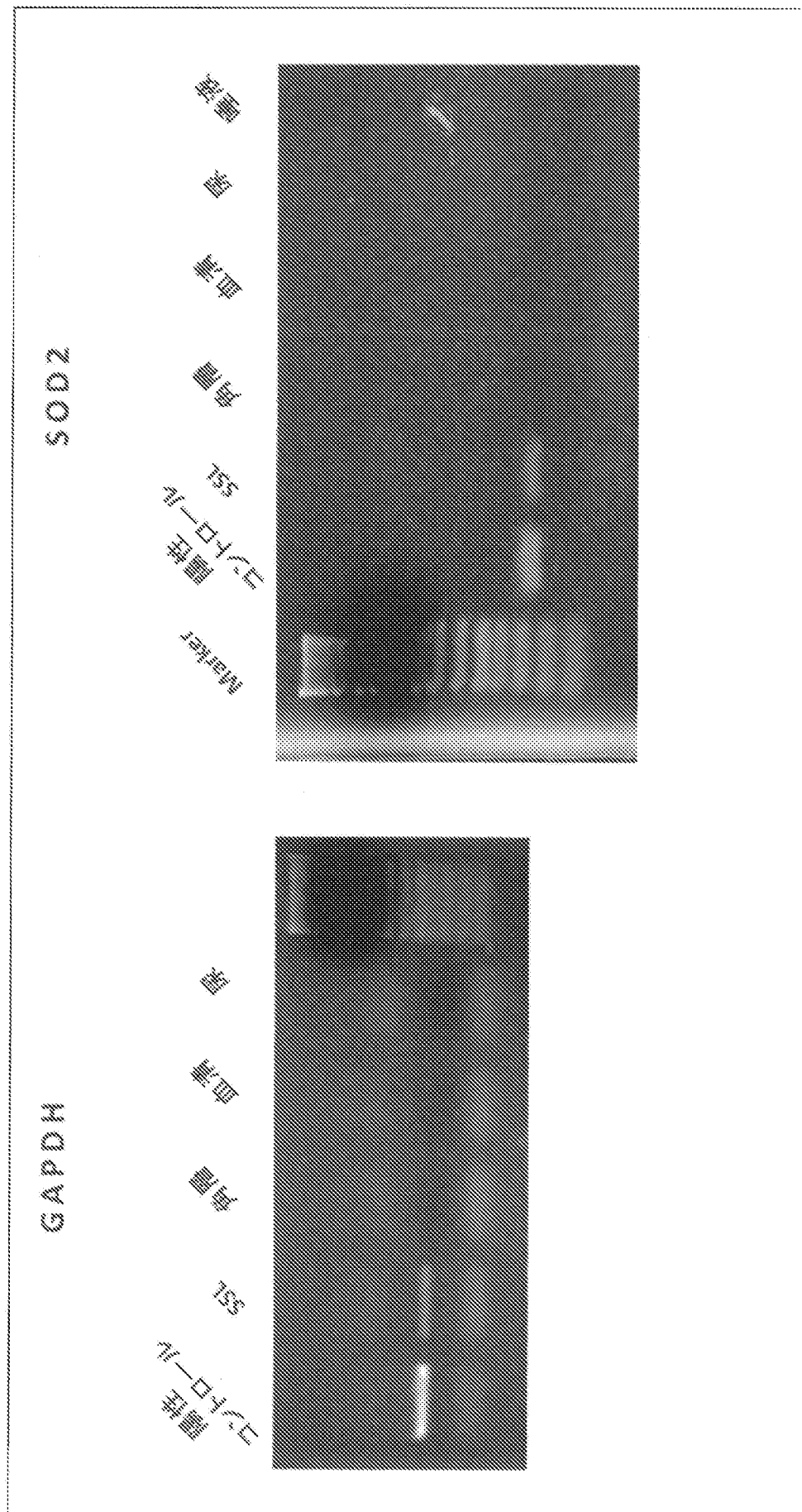
- [請求項1] 被験体から採取された皮膚表上脂質から核酸を分離することを含む、被験体の皮膚細胞に由来する核酸の調製方法。
- [請求項2] 前記被験体の皮膚表上脂質を採取することをさらに含む、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記皮膚表上脂質が手のひら、背部、足の裏、又は指の皮膚の皮膚表上脂質を含まない、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 前記核酸がRNAである、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
- [請求項5] 前記RNAが200nt以上の長さである、請求項4記載の方法。
- [請求項6] 前記RNAがmRNAおよびlincRNAからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項4又は5記載の方法。
- [請求項7] 前記被験体の核酸が、表皮、皮脂腺、毛包および汗腺からなる群より選択される少なくとも1部位由来の核酸である、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれか1項記載の方法で調製した核酸を解析することを含む、核酸の解析方法。
- [請求項9] 所定の疾患もしくは状態またはそのリスクを有する集団を被験体として、請求項1～7のいずれか1項記載の方法により核酸を調製すること、
調製された核酸の発現を対照と比較すること、
を含む、該所定の疾患もしくは状態の核酸マーカーの選択方法。
- [請求項10] 請求項1～7のいずれか1項記載の方法により被験体の核酸を調製すること
調製された核酸から、所定の疾患もしくは状態の核酸マーカーを検出すること、
を含む、所定の疾患もしくは状態の核酸マーカーの検出方法。
- [請求項11] 被験体の皮膚表上脂質の採取用具を含む、被験体の皮膚細胞に由来

する核酸の調製用キット。

[図1]



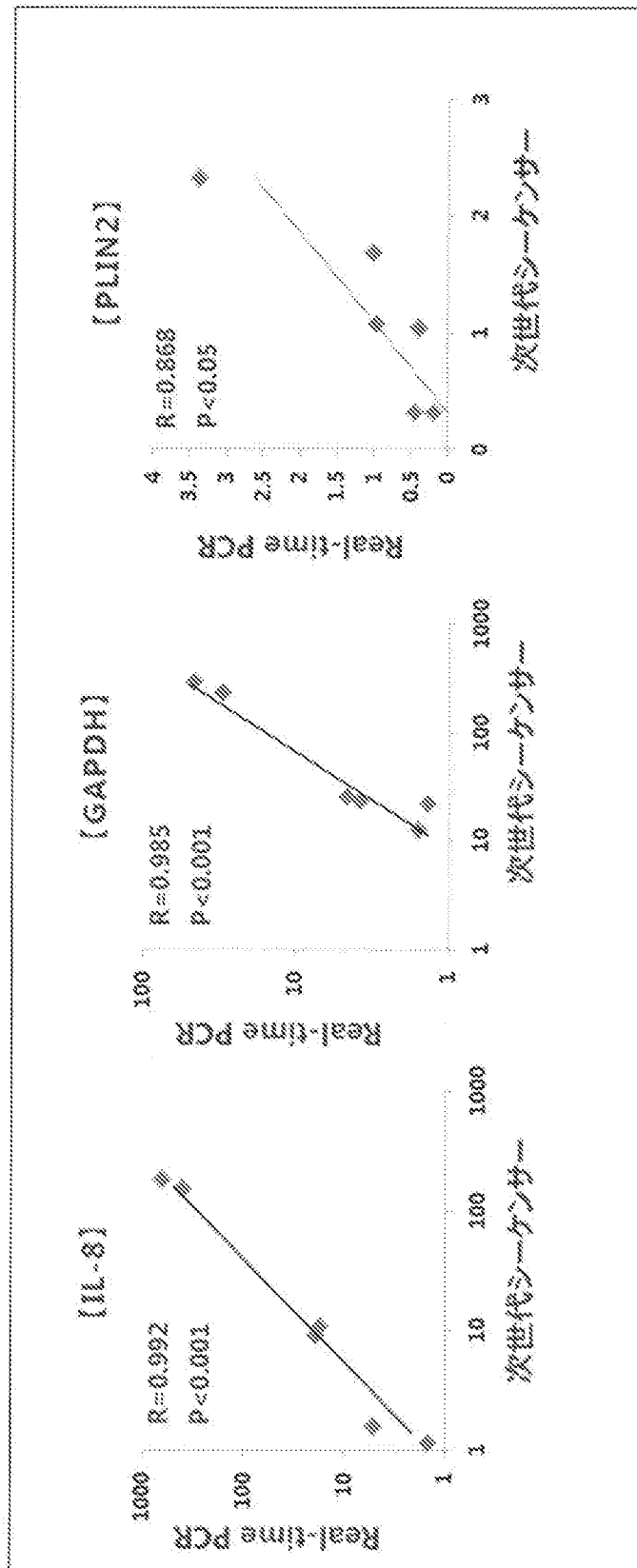
[図2]



[図3]

No.1			No.2		No.3		
KRT1	11	5	654	632	48	117	表皮
KRT10	123	64	12406	10273	1608	752	
FLG	305	412	19539	14853	1307	744	
IVL	156	241	22111	34504	1361	1484	
KRT7	8	12	0	0	101	82	汗腺
KRT8	38	63	102	33	72	56	
KRT14	792	625	12269	8612	3887	3296	
KRT15	65	33	166	1363	128	176	
KRT18	4	14	311	98	15	22	
KRT19	12	0	0	141	145	125	
KRT17	3573	3587	132437	112625	14693	15910	毛包
KRT75	23	16	762	166	74	89	
KRT79	262	213	14203	14838	1791	784	
KRT16	1044	467	17549	10389	4022	3169	
COL1A1	32	20	0	0	54	30	真皮
ELN	0	0	0	0	0	0	
COL3A1	0	0	0	0	0	0	
FBN1	38	20	9	1	0	3	
ACSL1	28221	27112	6525	2666	12416	11829	皮脂腺
PPARD	1492	2070	3406	4886	2077	2409	
PLIN2	2729	3047	9543	8372	5518	4950	
ELOVL5	5099	6610	2538	2412	4414	4490	
FASN	58	78	1396	544	268	251	

[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/021040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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)

C12Q1/68, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JST7580(JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN),
DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LINDENBERGH A et al., A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact trace, Forensic. Sci. Int. Genet., 2012, Vol.6, No.5, pp.565-577	1-11
A	JP 2010-115178 A (Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.), 27 May 2010 (27.05.2010), claims (Family: none)	1-11

☒ 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
29 June 2017 (29.06.17)

Date of mailing of the international search report
11 July 2017 (11.07.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/021040

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-528699 A (LABORATOIRES EXPANSIONS), 01 October 2015 (01.10.2015), claims & US 2015/0285787 A1 & EP 2872647 A1 & WO 2014/009566 A1 claims	1-11
A	JP 2015-518705 A (Moderna Therapeutics, Inc.), 06 July 2015 (06.07.2015), paragraph [0169] & US 2013/0259924 A1 & EP 2833892 A1 & WO 2013/151666 A2 [000240]	1-11
A	US 2010/0285463 A1 (KRONENBERG F), 11 November 2010 (11.11.2010), paragraph [0054] & WO 2009/003654 A2	1-11
A	US 2014/0274789 A1 (KELLER A), 18 September 2014 (18.09.2014), paragraph [0047] & WO 2013/020926 A1 & EP 2742148 A1	1-11
A	WO 2014/082083 A1 (CARIS SCIENCE, INC.), 30 May 2014 (30.05.2014), claims & US 2015/0301058 A1 & EP 2922861 A1	1-11
A	Hikaru WATANABE et al., "Hito Hifu Saikinso Kaiseki ni yoru Kojin Tokutei", Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 2015, vol.88, p.4T21L-05(3P0814)	1-11
A	JP 2015-512255 A (The Regents of the University of California), 27 April 2015 (27.04.2015), examples & US 2015/0086581 A1 & EP 2825676 A1 & WO 2013/142378 A1 examples	1-11
A	KWOK HF et al., DNA in amphibian and reptile venom permits access to genomes without specimen sacrifice., Genomics Insights, 2008, Vol.1, pp.17-24	1-11
A	BENSON NR et al., An analysis of select pathogenic messages in lesional and non- lesional psoriatic skin using non-inva, J. Invest. Dermatol., 2006, Vol.126, No.10, pp.2234-2241	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/021040

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RALLA B et al., Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 2014, Vol.51, No.4, pp.200-231	1-11
A	Naoko KITO et al., "Gaibunpisen Tokuitekina microRNA no Profiling", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program·Yoshishu, 2014, vol.37, 2P-0017	1-11
A	RENVOISE A et al., Helcobacillus massiliensis gen. nov., sp. nov., a novel representative of the family Dermabacteracea, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2009, Vol.59, Pt.9, pp.2346-2351	1-11
A	JP 2005-192409 A (Shiseido Co., Ltd.), 21 July 2005 (21.07.2005), claims (Family: none)	1-11
A	TKACHENKO A et al., An assay to screen bacterial adhesion to mucus biomolecules., Lett. Appl. Microbiol., 2013, Vol.56, No.1, pp.79-82	1-11
A	JP 2016-509471 A (Mindera Corp.), 31 March 2016 (31.03.2016), claims & US 2014/0287942 A1 & EP 2931356 A1 & WO 2014/093934 A1 claims	1-11
A	ROBERTSON LS et al., Expression analysis and identification of antimicrobial peptide transcripts from six North American, Dis. Aquat. Organ., 2013, Vol.104, No.3, pp.225-236	1-11
A	GUO W et al., Skin secretion and shedding is a good source for non-destructive genetic sampling in the Chinese gia, Z. Naturforsch. C, 2013, Vol.68, No.3-4, pp.164-168	1-11
A	WO 2016/191644 A1 (LUCIGEN CORP.), 01 December 2016 (01.12.2016), page 13 (Family: none)	1-11
A	WO 2016/172598 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC.), 27 October 2016 (27.10.2016), claims (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)

JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)

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	LINDENBERGH A et al., A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact trace, Forensic. Sci. Int. Genet., 2012, Vol.6, No.5, pp.565-577	1-11
A	JP 2010-115178 A (日本メナード化粧品株式会社) 2010.05.27, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-11

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.06.2017

国際調査報告の発送日

11.07.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

西村 亜希子

4 N

3 4 3 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2015-528699 A (ラボラトワール エクспанシアンス) 2015.10.01, 特許請求の範囲 & US 2015/0285787 A1 & EP 2872647 A1 & WO 2014/009566 A1, Claims	1-11
A	JP 2015-518705 A (モデルナ セラピューティクス インコーポレイ テッド) 2015.07.06, 段落[0169] & US 2013/0259924 A1 & EP 2833892 A1 & WO 2013/151666 A2, [000240]	1-11
A	US 2010/0285463 A1 (KRONENBERG F) 2010.11.11, [0054] & WO 2009/003654 A2	1-11
A	US 2014/0274789 A1 (KELLER A) 2014.09.18, [0047] & WO 2013/020926 A1 & EP 2742148 A1	1-11
A	WO 2014/082083 A1 (CARIS SCIENCE, INC.) 2014.05.30, Claims & US 2015/0301058 A1 & EP 2922861 A1	1-11
A	渡邊日佳流ほか, ヒト皮膚細菌叢解析による個人特定, 日本生化学 大会, 2015, Vol. 88, p. 4T21L-05 (3P0814)	1-11
A	JP 2015-512255 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オ ブ カリフォルニア) 2015.04.27, 実施例 & US 2015/0086581 A1 & EP 2825676 A1 & WO 2013/142378 A1, Examples	1-11
A	KWOK HF et al., DNA in amphibian and reptile venom permits access to genomes without specimen sacrifice., Genomics Insights, 2008, Vol. 1, pp. 17-24	1-11
A	BENSON NR et al., An analysis of select pathogenic messages in lesional and non-lesional psoriatic skin using non-inva, J. Invest. Dermatol., 2006, Vol. 126, No. 10, pp. 2234-2241	1-11
A	RALLA B et al., Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 2014, Vol. 51, No. 4, pp. 200-231	1-11
A	鬼頭奈央子ほか, 外分泌腺特異的な microRNA のプロファイリング, 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2014, Vol. 37, 2P-0017	1-11

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	RENVOISE A et al., <i>Helcobacillus massiliensis</i> gen. nov., sp. nov., a novel representative of the family Dermabacteracea, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2009, Vol.59, Pt.9, pp.2346-2351	1-11
A	JP 2005-192409 A (株式会社資生堂) 2005.07.21, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-11
A	TKACHENKO A et al., An assay to screen bacterial adhesion to mucus biomolecules., Lett. Appl. Microbiol., 2013, Vol.56, No.1, pp.79-82	1-11
A	JP 2016-509471 A (マインデラ コーポレイション) 2016.03.31, 特許請求の範囲 & US 2014/0287942 A1 & EP 2931356 A1 & WO 2014/093934 A1, Claims	1-11
A	ROBERTSON LS et al., Expression analysis and identification of antimicrobial peptide transcripts from six North American, Dis. Aquat. Organ., 2013, Vol.104, No.3, pp.225-236	1-11
A	GUO W et al., Skin secretion and shedding is a good source for non-destructive genetic sampling in the Chinese gia, Z. Naturforsch. C, 2013, Vol.68, No.3-4, pp.164-168	1-11
A	WO 2016/191644 A1 (LUCIGEN CORPORATION) 2016.12.01, p.13 (ファミリーなし)	1-11
A	WO 2016/172598 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC.) 2016.10.27, Claims (ファミリーなし)	1-11