(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
2020年9月17日(17.09.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/184551 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/6848* (2018.01)
C12N 15/10 (2006.01) *C12Q 1/6869* (2018.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/010248

(22) 国際出願日： 2020年3月10日(10.03.2020)

(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 2019-046275 2019年3月13日(13.03.2019) 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). 国立研究開発法人理化学研究所(**RIKEN**) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP).

(72) 発明者: 山越 奈々 (**YAMAKOSHI, Nana**); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町１０番２４号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 林 哲太郎 (**HAYASHI, Tetsutaro**); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 二階堂 愛(**NIKAIDO, Itoshi**); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(**SAEGUSA & PARTNERS**); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町１－７－１ 北浜コニシビル Osaka (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, 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：
— 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)）

(54) **Title:** PRODUCTION AND AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS

(54) 発明の名称： 核酸の生成および増幅

(57) **Abstract:** Provided are: a composition and a method for inhibiting the reverse transcription of a ribosomal RNA. The composition for inhibiting the reverse transcription of the ribosomal RNA comprises at least one nucleic acid polymer selected from the group consisting of: inosinic acid polymer, cytidylic acid polymer, guanylic acid polymer, adenylic acid polymer, thymidylic acid polymer, uridylic acid polymer, deoxyinosinic acid polymer, deoxycytidylic acid polymer, deoxyguanylic acid polymer, deoxyadenylic acid polymer, deoxythymidylic acid polymer, and deoxyuridylic acid polymer.

(57) 要約：リボソーマルＲＮＡの逆転写を抑制するための組成物及び方法を提供する。リボソーマルＲＮＡの逆転写を抑制するための組成物は、イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類の核酸ポリマーを含有する。

WO 2020/184551 A1

明　細　書

発明の名称 ： 核酸の生成および増幅

技術分野

[0001] 本発明は、核酸の生成及び増幅に関する。例えば、本発明はリボ核酸（ＲＮＡ）鋳型からの核酸の生成及び増幅のために有用な組成物及び方法、具体的には、特定の核酸ポリマーを用いて、逆転写反応による核酸の生成及び増幅を行うための組成物及び方法に関する。本発明の組成物及び方法は、例えば、リボソーマルＲＮＡの逆転写抑制のため、即ちリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成抑制のために使用される。

背景技術

[0002] リボソーマルＲＮＡは、生体内ＲＮＡの約８～９割を占めるともいわれる。遺伝子発現量の解析では通常、発現しているＲＮＡを逆転写反応によりｃＤＮＡに変換し、そのｃＤＮＡに基づき遺伝子解析を行うことが一般的である。この逆転写反応の際に、生体内ＲＮＡの大半を占めるリボソーマルＲＮＡが逆転写され増幅されると、本来、逆転写して増幅させたいＲＮＡの発現解析においてノイズを発生させる。また近年では、ＲＮＡを鋳型として大量の核酸増幅産物を得ることができるＲＴ－ＲａｍＤＡ法などの新たな技術が開発されている（特許文献１参照）。このようにＲＮＡを鋳型として大量の核酸増幅産物を得ることができるＲＴ－ＲａｍＤＡ法等において、リボソーマルＲＮＡの逆転写反応が一旦起こってしまうと、それが鎖置換反応で等温線形増幅するために、解析を望むＲＮＡの量が相対的に減少することとなり影響が大きい。このため、逆転写反応を行う核酸解析法においてリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制することが望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第２０１６／０５２６１９号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] リボソーマルＲＮＡの逆転写を抑制するための手段の提供が１つの目的である。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、鋳型ＲＮＡの逆転写によりＤＮＡを合成する方法において、特定の核酸ポリマーを用いると、リボソーマルＲＮＡの逆転写を抑制し、リボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制することができることを見出した。本発明者らは、当該知見に基づいてさらに検討を重ね、本発明の完成に至った。

[0006] すなわち、本発明は、以下の態様を包含する。

項１．

鋳型ＲＮＡの逆転写によりＤＮＡを合成する方法において、イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類の核酸ポリマーを用いて、リボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する方法。

項２．

前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリチミジル酸、ポリウリジル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸、ポリデオキシチミジル酸、ポリデオキシウリジル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも１種のホモポリマーである、項１に記載の方法。

項３．

前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニ

ル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも１種のホモポリマーである、項１又は２に記載の方法。

項４．

前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリデオキシイノシン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも１種のホモポリマーである項１～３のいずれかに記載の方法。

項５．

前記核酸ポリマーが、全長が３０～１００００塩基長である前記核酸ポリマーを含む、項１～４のいずれかに記載の方法。

項６．

前記逆転写が、ランダムプライマーを用いて行われる、項１～５のいずれかに記載の方法。

項７．

前記ランダムプライマーの塩基配列が、リボソーマルＲＮＡの塩基配列と完全に相補的でない、項６に記載の方法。

項８．

前記逆転写が、ＲＴ－ＰＣＲ法又はＲＴ－ＲａｍＤＡ法において行われる、項１～７のいずれかに記載の方法。

項９．

イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類の核酸ポリマーを含有する、リボソーマルＲＮＡの逆転写を抑制する（又は鋳型ＲＮＡの逆転写によるＤＮＡ合成においてリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する）ための組成物。

項９Ａ．

リボソーマルＲＮＡの逆転写を抑制する（又は鋳型ＲＮＡの逆転写によるＤＮＡ合成においてリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する）ための、イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類の核酸ポリマーの使用。

項１０．

イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類の核酸ポリマーを含有し、次世代シーケンシングに用いる逆転写反応物を調製するための逆転写反応組成物。

項１１．

前記逆転写が、ＲＴ－ＰＣＲ法又はＲＴ－ＲａｍＤＡ法において行われる、項９又は１０に記載の組成物、又は項９Ａに記載の使用。

項１２．

前記核酸ポリマーが、全構成単位中、イノシン酸、シチジル酸、グアニル酸、デオキシイノシン酸、デオキシシチジル酸、デオキシグアニル酸、これらの誘導体、及びこれらの塩からなる群より選択されるヌクレオチド由来の構成単位を６０モル％以上含む、項１～８のいずれかに記載の方法、項９～１１のいずれかに記載の組成物、又は項９Ａに記載の使用。

項１３．

前記核酸ポリマーが、全構成単位中、イノシン酸、シチジル酸、グアニル酸、デオキシイノシン酸、デオキシシチジル酸、デオキシグアニル酸、これ

らの誘導体、及びこれらの塩からなる群より選択されるヌクレオチド由来の構成単位を９０モル％以上含む、項１～８及び１２のいずれかに記載の方法、項９～１２のいずれかに記載の組成物、又は項９Ａに記載の使用。

項１４．

前記核酸ポリマーが、全構成単位中、イノシン酸、デオキシイノシン酸、これらの誘導体、及びこれらの塩からなる群より選択されるヌクレオチド由来の構成単位を６０モル％以上含む、項１～８及び１２～１３のいずれかに記載の方法、項９～１３のいずれかに記載の組成物、又は項９Ａに記載の使用。

項１５．

前記核酸ポリマーが、全構成単位中、イノシン酸、デオキシイノシン酸、これらの誘導体、及びこれらの塩からなる群より選択されるヌクレオチド由来の構成単位を９０モル％以上含む、項１～８及び１２～１４のいずれかに記載の方法、項９～１４のいずれかに記載の組成物、又は項９Ａに記載の使用。

項１６．

前記鋳型ＲＮＡが細胞から抽出されたＲＮＡである、項１～８及び１２～１５のいずれかに記載の方法。

項１７．

核酸ポリマー（但し、プライマーではない）の存在下、鋳型ＲＮＡを逆転写することによりＤＮＡを製造する方法であって、前記核酸ポリマーが、イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類である、方法。

項１８．

前記鋳型ＲＮＡが細胞から抽出されたＲＮＡである、項１７に記載の方法。

項１９．

イノシン酸ポリマーを含有する逆転写用組成物（但し、チオシアン酸グアニジンを含有する逆転写用組成物を除く）。

項２０．

イノシン酸ポリマーの濃度が、１ｎｇ／μＬ未満である、項１９に記載の組成物。

項２１．

ＲＴ－ＰＣＲ法又はＲＴ－ＲａｍＤＡ法に用いられる、項１９又は２０に記載の組成物。

項２２．

キットの形態である、項９～１５及び１９～２１のいずれかに記載の組成物。

発明の効果

[0007] 本発明の核酸ポリマーを用いることにより、リボソーマルＲＮＡの逆転写を抑制、又はリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図１は、実施例１～４で使用したポリイノシン酸カリウム塩の塩基長分布を試薬キットＤＮＡ－１２０００（株式会社島津製作所製）で測定した結果（参考値）を示す図である。

[図2]図２は、実施例４で使用したポリアデニル酸カリウム塩の塩基長分布を試薬キットＤＮＡ－１２０００（株式会社島津製作所製）で測定した結果（参考値）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] ＜鋳型ＲＮＡの逆転写によりＤＮＡを合成する方法において、核酸ポリマーを用いてリボソーマルＲＮＡ（ｒＲＮＡ）由来のＤＮＡ合成を抑制する方法

≧

１．核酸ポリマー

核酸ポリマーとしては、イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも一種が好ましい。なかでも、より一層効果的にｒＲＮＡの逆転写を抑制又はｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制できるという観点から、イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、及びデオキシグアニル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、イノシン酸ポリマー及び／又はデオキシイノシン酸ポリマーがとりわけ好ましい。本発明では、上記のような核酸ポリマーを二種以上使用してもよく、例えば、イノシン酸ポリマーとシチジル酸ポリマーとを組み合わせて用いたり、デオキシイノシン酸ポリマーとシチジル酸ポリマーとを組み合わせて用いることができる。核酸ポリマーを二種以上使用する場合、そのうちの一種の核酸ポリマーはイノシン酸ポリマー又はデオキシイノシン酸ポリマーであることが好ましい。

以下、各ポリマーについて、詳細に説明する。

[0010] （１）イノシン酸ポリマー

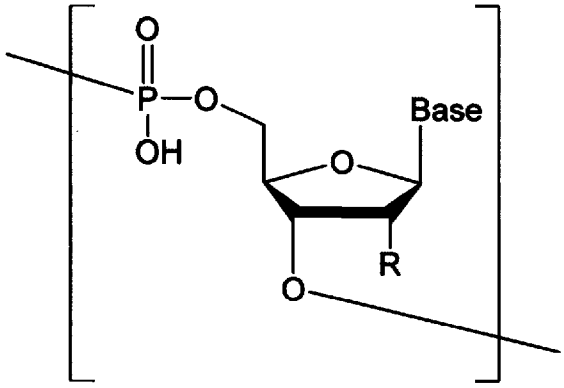
イノシン酸ポリマーは、イノシン酸ホモポリマー（ポリイノシン酸）、イノシン酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。また、イノシン酸ホモポリマー（ポリイノシン酸）とシチジル酸ホモポリマー（ポリシチジル酸）とがアニールしたポリ（Ｉ：Ｃ）等と呼ばれる二本鎖の核酸ポリマーが当該分野で公知である。本発明では、上記二本鎖の核酸ポリマーのように、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がイノシン酸ポリマー（例えば、ポリイノシン酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、イノシン

酸ポリマーに含まれる。

イノシン酸コポリマーは、イノシン酸（ＩＭＰ）由来の構成単位と、ＩＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。

ＩＭＰなどのヌクレオチド由来の構成単位とは、下記式で表されるような、ヌクレオチドで構成される単位を意味する：

[化1]



（式中、Ｒは水素原子又はヒドロキシルであり、Ｂａｓｅはイノシン、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル等の核酸塩基である。）

ＩＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ＩＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、デオキシイノシン酸（ｄＩＭＰ）、シチジル酸（ＣＭＰ）、デオキシシチジル酸（ｄＣＭＰ）、グアニル酸（ＧＭＰ）、デオキシグアニル酸（ｄＧＭＰ）、アデニル酸（ＡＭＰ）、デオキシアデニル酸（ｄＡＭＰ）、チミジル酸（ＴＭＰ）、デオキシチミジル酸（ｄＴＭＰ）、ウリジル酸（ＵＭＰ）、デオキシウリジル酸（ｄＵＭＰ）、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ｄＩＭＰがより好ましい。

上記「誘導体」は、元のポリマーの基本骨格を保持しつつ、構造の一部が改変されたものをいう。改変には、例えば、酸化、還元、原子の置換、官能

基の導入などが含まれる。上記「誘導体」としては、元のポリマーの構成単位の少なくとも一部において、塩基部分に官能基（例えば、フッ素原子、臭素原子、ヨウ素原子、低級アルキル基（例えば、メチル基、エチル基等のＣ１～６アルキル基）、アミノ基、メルカプト基、これら２種以上の組合せ）が導入されたもの、及び／又は、リン酸部分がチオリン酸部分に置き換わったものが好ましい。

上記「塩」としては、アルカリ金属塩が好ましく、ナトリウム塩、カリウム塩がより好ましい。

イノシン酸ポリマーにおいて、ＩＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ＩＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

イノシン酸ポリマーにおいて、ＩＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ＩＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり得る。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0011] （２）シチジル酸ポリマー

シチジル酸ポリマーは、シチジル酸ホモポリマー（ポリシチジル酸）、シチジル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。また、イノシン酸ホモポリマー（ポリイノシン酸）とシチジル酸ホモ

ポリマー（ポリシチジル酸）とがアニールしたポリ（Ｉ：Ｃ）等と呼ばれる二本鎖の核酸ポリマーが当該分野で公知である。本発明では、上記二本鎖の核酸ポリマーのように、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がシチジル酸ポリマー（例えば、ポリシチジル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、シチジル酸ポリマーに含まれる。

シチジル酸コポリマーは、ＣＭＰ由来の構成単位と、ＣＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ＣＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ＣＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

シチジル酸ポリマーにおいて、ＣＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ＣＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

シチジル酸ポリマーにおいて、ＣＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以

上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ＣＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり、例えば１００個未満、９５個以下、又は９０個以下であってもよい。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0012] （３）グアニル酸ポリマー

グアニル酸ポリマーは、グアニル酸ホモポリマー（ポリグアニル酸）、グアニル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がグアニル酸ポリマー（例えば、ポリグアニル酸）である、二本鎖の核酸ポリマーも、グアニル酸ポリマーに含まれる。

グアニル酸コポリマーは、ＧＭＰ由来の構成単位と、ＧＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ＧＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ＧＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

グアニル酸ポリマーにおいて、ＧＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、

より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ＧＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

グアニル酸ポリマーにおいて、ＧＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ＧＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり、例えば１００個未満、９５個以下、又は９０個以下であってもよい。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0013] （４）アデニル酸ポリマー

アデニル酸ポリマーは、アデニル酸ホモポリマー（ポリアデニル酸）、アデニル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がアデニル酸ポリマー（例えば、ポリアデニル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、アデニル酸ポリマーに含まれる。

アデニル酸コポリマーは、ＡＭＰ由来の構成単位と、ＡＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ＡＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ＡＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される

少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

アデニル酸ポリマーにおいて、ＡＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ＡＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

アデニル酸ポリマーにおいて、ＡＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ＡＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり得る。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0014] （５）チミジル酸ポリマー

チミジル酸ポリマーは、チミジル酸ホモポリマー（ポリチミジル酸）、チミジル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がチミジル酸ポリマー（例えば、ポリチミジル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、チミジル酸ポリマーに含まれる。

チミジル酸コポリマーは、ＴＭＰ由来の構成単位と、ＴＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ＴＭＰ以外のヌクレオチ

ドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ＴＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

チミジル酸ポリマーにおいて、ＴＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ＴＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

チミジル酸ポリマーにおいて、ＴＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ＴＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり、例えば１００個未満、９５個以下、又は９０個以下であってもよい。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0015] （６）ウリジル酸ポリマー

ウリジル酸ポリマーは、ウリジル酸ホモポリマー（ポリウリジル酸）、ウリジル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がウリジル酸ポリマー（例えば、ポリウリジル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、ウリジル酸ポリマーに含まれる。

ウリジル酸コポリマーは、ＵＭＰ由来の構成単位と、ＵＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ＵＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ＵＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

ウリジル酸ポリマーにおいて、ＵＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ＵＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

ウリジル酸ポリマーにおいて、ＵＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以

上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ＵＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり得る。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0016] （７）デオキシイノシン酸ポリマー

デオキシイノシン酸ポリマーは、デオキシイノシン酸ホモポリマー（ポリデオキシイノシン酸）、デオキシイノシン酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がデオキシイノシン酸ポリマー（例えば、ポリデオキシイノシン酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、デオキシイノシン酸ポリマーに含まれる。

デオキシイノシン酸コポリマーは、ｄＩＭＰ由来の構成単位と、ｄＩＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ｄＩＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ｄＩＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰがより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

デオキシイノシン酸ポリマーにおいて、ｄＩＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モ

ル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ｄＩＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

デオキシイノシン酸ポリマーにおいて、ｄＩＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ｄＩＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり得る。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0017] （８）デオキシシチジル酸ポリマー

デオキシシチジル酸ポリマーは、デオキシシチジル酸ホモポリマー（ポリデオキシシチジル酸）、デオキシシチジル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がデオキシシチジル酸ポリマー（例えば、ポリデオキシシチジル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、デオキシシチジル酸ポリマーに含まれる。

デオキシシチジル酸コポリマーは、ｄＣＭＰ由来の構成単位と、ｄＣＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ｄＣＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ｄＣＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、

ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

デオキシシチジル酸ポリマーにおいて、ｄＣＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ｄＣＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

デオキシシチジル酸ポリマーにおいて、ｄＣＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ｄＣＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり、例えば１００個未満、９５個以下、又は９０個以下であってもよい。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0018] （９）デオキシグアニル酸ポリマー

デオキシグアニル酸ポリマーは、デオキシグアニル酸ホモポリマー（ポリデオキシグアニル酸）、デオキシグアニル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がデオキシグアニル酸ポリマー（例えば、ポリデオキシグアニル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、デオキシグアニル酸ポリマーに含ま

れる。

デオキシグアニル酸コポリマーは、ｄＧＭＰ由来の構成単位と、ｄＧＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ｄＧＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ｄＧＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、及びＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

デオキシグアニル酸ポリマーにおいて、ｄＧＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ｄＧＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

デオキシグアニル酸ポリマーにおいて、ｄＧＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等とも表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ｄＧＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、好ましくは６５００個以下、より好ましくは

６０００個以下であり、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり、例えば１００個未満、９５個以下、又は９０個以下であってもよい。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0019] （１０）デオキシアデニル酸ポリマー

デオキシアデニル酸ポリマーは、デオキシアデニル酸ホモポリマー（ポリデオキシアデニル酸）、デオキシアデニル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がデオキシアデニル酸ポリマー（例えば、ポリデオキシアデニル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、デオキシアデニル酸ポリマーに含まれる。

デオキシアデニル酸コポリマーは、ｄＡＭＰ由来の構成単位と、ｄＡＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ｄＡＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ｄＡＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、及びＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

デオキシアデニル酸ポリマーにおいて、ｄＡＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上

、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ｄＡＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

デオキシアデニル酸ポリマーにおいて、ｄＡＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等とも表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、更に好ましくは６０個以上、更により好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ｄＡＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり得る。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0020] （１１）デオキシチミジル酸ポリマー

デオキシチミジル酸ポリマーは、デオキシチミジル酸ホモポリマー（ポリデオキシチミジル酸）、デオキシチミジル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がデオキシチミジル酸ポリマー（例えば、ポリデオキシチミジル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、デオキシチミジル酸ポリマーに含まれる。

デオキシチミジル酸コポリマーは、ｄＴＭＰ由来の構成単位と、ｄＴＭＰ以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ｄＴＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ｄＴＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ＵＭＰ、ｄＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰか

らなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

デオキシチミジル酸ポリマーにおいて、ｄＴＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ｄＴＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

デオキシチミジル酸ポリマーにおいて、ｄＴＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等とも表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、好ましくは６０個以上、より好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ｄＴＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり得る。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0021] （１２）デオキシウリジル酸ポリマー

デオキシウリジル酸ポリマーは、デオキシウリジル酸ホモポリマー（ポリデオキシウリジル酸）、デオキシウリジル酸コポリマー、これらの誘導体、及びこれらの塩を包含する意味で用いる。本発明では、二本鎖のうち少なくとも一方の鎖がデオキシウリジル酸ポリマー（例えば、ポリデオキシウリジル酸）である二本鎖の核酸ポリマーも、デオキシウリジル酸ポリマーに含まれる。

デオキシウリジル酸コポリマーは、ｄＵＭＰ由来の構成単位と、ｄＵＭＰ

以外のヌクレオチド由来の構成単位とを有するポリマーである。ｄＵＭＰ以外のヌクレオチドは、特に限定はなく、リボヌクレオチドであってもデオキシリボヌクレオチドであってもよい。ｄＵＭＰ以外のヌクレオチドの例としては、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、ｄＡＭＰ、ＴＭＰ、ｄＴＭＰ、ＵＭＰ、これら２種以上の組合せなどが挙げられる。これらのうち、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、ＡＭＰ、及びｄＡＭＰからなる群より選択される少なくとも一種が好ましく、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、及びｄＧＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましく、ＩＭＰ及びｄＩＭＰからなる群より選択される少なくとも一種がより好ましい。

上記「誘導体」及び「塩」としては、上記「（１）イノシン酸ポリマー」に記載したものと同様のものが挙げられる。

デオキシウリジル酸ポリマーにおいて、ｄＵＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、例えば５０モル％超、好ましくは６０モル％以上、より好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。また、ｄＵＭＰ由来の構成単位は、全構成単位中、１００モル％（即ち、ホモポリマー）であってもよいし、例えば９９．９モル％以下、又は９９モル％以下であってもよい。

デオキシウリジル酸ポリマーにおいて、ｄＵＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数（塩基長等としても表現され得る）は、例えば３０個以上、好ましくは４０個以上、より好ましくは５０個以上、好ましくは６０個以上、より好ましくは７０個以上であり、例えば１００個以上、１５０個以上であってもよい。また、ｄＵＭＰ由来の構成単位の繰り返しの数は、例えば１００００個以下、８０００個以下、５０００個以下、３０００個以下、１０００個以下であり得る。繰り返しは、連続であっても断続であってもよく、好ましくは連続である。

[0022] 好適な一実施態様において、上記核酸ポリマーは、全構成単位中、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、ＣＭＰ、ｄＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＧＭＰ、これらの誘導体、及びこれらの塩からなる群より選択されるヌクレオチド由来の構成単位を、例えば６０モル％以上、好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上含む、核酸ポリマーである。上限値は特に限定されないが、例えば、全構成単位中、これらの構成単位が１００モル％であってもよいし、９９．９モル％以下、又は９９モル％以下の核酸ポリマーであってもよい。

より好適な一実施態様において、上記核酸ポリマーは、全構成単位中、ＩＭＰ、ｄＩＭＰ、これらの誘導体、及びこれらの塩からなる群より選択されるヌクレオチド由来の構成単位を、例えば６０モル％以上、好ましくは６５モル％以上、より好ましくは７０モル％以上、より好ましくは７５モル％以上、より好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上含む、核酸ポリマーである。上限値は特に限定されないが、例えば、全構成単位中、これらの構成単位が１００モル％であってもよいし、９９．９モル％以下、又は９９モル％以下の核酸ポリマーであってもよい。

[0023] 好適な一実施態様において、上記核酸ポリマーは、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリチミジル酸、ポリウリジル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸、ポリデオキシチミジル酸、ポリデオキシウリジル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも一種である。

より好適な一実施態様において、上記核酸ポリマーは、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデ

ニル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも一種である。

より好適な一実施態様において、上記核酸ポリマーは、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも一種である。

より好適な一実施態様において、上記核酸ポリマーは、ポリイノシン酸、ポリデオキシイノシン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも一種である。

[0024] 上記核酸ポリマーは、全長が２５～１５０００塩基長である上記核酸ポリマー、好適には３０～１００００塩基長である上記核酸ポリマー、より好適には全長が４０～９０００塩基長である上記核酸ポリマー、より好適には全長が５０～８０００塩基長である上記核酸ポリマーを含むことが好ましく、例えば１００～５０００塩基長であってもよい。例えば、全長が２５～１５０００塩基長、３０～１００００塩基長、４０～９０００塩基長、５０～８０００塩基長、又は１００～５０００塩基長である上記核酸ポリマーの含有量は、それぞれ、上記核酸ポリマー全体に対して、例えば７０モル％以上、好ましくは８０モル％以上、より好ましくは８５モル％以上、より好ましくは９０モル％以上、より好ましくは９５モル％以上である。

即ち、上記核酸ポリマーは、種々の塩基長の核酸ポリマーの混合物であってもよく、例えば、実質的に２５～１５０００塩基長の範囲で分布するような核酸ポリマーの混合物であってもよいし、実質的に３０～１００００塩基長の範囲で分布するような核酸ポリマーの混合物であることが好ましく、実質的に４０～９０００塩基長の範囲で分布するような核酸ポリマーの混合物であることがより好ましく、実質的に５０～８０００塩基長の範囲で分布するような核酸ポリマーの混合物であることが更に好ましく、例えば、実質的に１００～５０００塩基長の範囲で分布するような核酸ポリマーの混合物を用いることもできる。「実質的に塩基長Ａ～Ｂの範囲で分布する」とは、塩基長Ａ～Ｂの核酸ポリマーが、例えば、核酸ポリマー全体の７０モル％以上

を占めることをいう。

核酸ポリマーは、例えば、３０～３０００塩基長付近にピーク（又は平均値又は最頻値）を有するような分布を示す核酸ポリマーの混合物であってもよいし、５０～１５００塩基長付近にピーク（又は平均値又は最頻値）を有するような分布を示す核酸ポリマーの混合物であってもよいし、６０～１０００塩基長付近にピーク（又は平均値又は最頻値）を有するような分布を示す核酸ポリマーの混合物であることが好ましく、７０～８００塩基長付近にピーク（又は平均値又は最頻値）を有するような分布を示す核酸ポリマーの混合物を用いることもできる。「付近」とは、下限値及び／又は上限値が１０％増減してもよいことを意味する。

上記核酸ポリマーの全長は、例えば３０塩基以上、好ましくは４０塩基以上、より好ましくは５０塩基以上、更に好ましくは６０塩基以上、更により好ましくは７０塩基以上であり、例えば１００塩基以上、１５０塩基以上であってもよい。このように、上記核酸ポリマーの全長は、プローブ又はプライマーとして設計される塩基長よりも長いことが好ましい。また、上記核酸ポリマーの全長は、例えば１００００塩基以下であってもよいし、更に８０００塩基以下であってもよいし、例えば５０００塩基以下であってもよい。

[0025] 核酸ポリマーは、オリゴヌクレオチドの合成に用いることのできる任意の方法、例えば、リン酸トリエステル法、Ｈ－ホスホネート法、チオホスホネート法などにより合成することができる。また、天然物を使用してもよいし、市販品も好適に使用することができる。市販品としては、例えば、ポリイノシン酸カリウム塩（Ｓｉｇｍａ社製）、ポリアデニル酸カリウム塩（Ｓｉｇｍａ社製）、ポリイノシン酸カリウム塩（サンタクルーズ社製）等の市販の核酸ポリマーを用いることができる。

[0026] ２．鋳型ＲＮＡの逆転写によりＤＮＡを合成する方法

鋳型ＲＮＡの逆転写によりＤＮＡを合成する方法は、特に制限されず、従来より公知の各種の方法を採用することができる。当該方法は、典型的には、逆転写酵素等の逆転写活性を有するタンパク質を含む逆転写用組成物（又

は逆転写反応用溶液）をインキュベーションする工程を含む。

[0027] ２－１．逆転写用組成物

逆転写用組成物は、例えば、上記核酸ポリマー、鋳型ＲＮＡ、プライマー、デオキシリボヌクレオチド、及び逆転写酵素を含む。また、逆転写用組成物は、ＤＮＡポリメラーゼ等の他の成分等も任意に含み得る。

逆転写用組成物において、上記核酸ポリマーの濃度は、ｒＲＮＡの逆転写を抑制し、ｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する点から、例えば０．１ｎｇ／μｌ以上、好ましくは０．２ｎｇ／μｌ以上、より好ましくは１ｎｇ／μｌ以上、更に好ましくは１．５ｎｇ／μｌ以上であり、例えば２ｎｇ／μｌ以上、３ｎｇ／μｌ以上、４ｎｇ／μｌ以上、５ｎｇ／μｌ以上であってもよい。また、上記核酸ポリマーの濃度は、例えば、５０ｎｇ／μｌ以下であってもよく、好ましくは２５ｎｇ／μｌ以下、より好ましくは２０ｎｇ／μｌ以下であり、例えば１０ｎｇ／μｌ以下、５ｎｇ／μｌ以下、３ｎｇ／μｌ以下、２．５ｎｇ／μｌ以下、２ｎｇ／μｌ以下、１ｎｇ／μｌ以下、１ｎｇ／μｌ未満であってもよい。このような低濃度の核酸ポリマーを用いる場合であっても、本発明によればｒＲＮＡの逆転写を抑制し、ｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制することができる。

上記核酸ポリマーの含有量は、逆転写用組成物に含まれるＲＮＡ（ｒＲＮＡを含む）の総量１００質量部に対して、例えば１００～５００００質量部、好ましくは１０００～１００００質量部、より好ましくは１０００～５０００質量部である。

[0028] （１）鋳型ＲＮＡ

鋳型ＲＮＡとしては、組織や細胞から抽出されたＲＮＡ（例えば、フェノールクロロホルム抽出等の当該分野で公知の任意の抽出手段により処理された抽出ＲＮＡ）、組織や細胞からの抽出処理後に更に精製されたＲＮＡ（例えば、エタノール沈殿、カラム精製等の当該分野で公知の任意の精製手段により処理された精製ＲＮＡ）等の任意のＲＮＡであり得るが、なかでも細胞から抽出されたＲＮＡを用いることが好ましい。細胞から抽出されたＲＮＡ

は、通常、鋳型ＲＮＡとなるｍＲＮＡ等の他にｒＲＮＡが不可避的に混入するが、上記核酸ポリマーの存在下ではｒＲＮＡの逆転写が抑制されるため、細胞から抽出されたＲＮＡをそのまま鋳型ＲＮＡとして使用しても、鋳型ＲＮＡを特異的に逆転写することができる。すなわち、細胞から抽出されたＲＮＡからｒＲＮＡを除去する工程を省略することができる。

ＲＮＡを抽出する細胞の種類は特に制限されず、いかなる種類の細胞であってもよい。細胞の個数は、セルソーターにより適宜調整することができる。例えば、少数（例えば１～１００個、好ましくは１～１０個、より好ましくは１又は２個、より好ましくは１個）の細胞から抽出されたＲＮＡを使用することもできる。

細胞からＲＮＡを抽出する方法は、通常、細胞溶解剤を含む細胞溶解用組成物を用いて、細胞を溶解する工程を含む。

細胞溶解剤としては、例えば、界面活性剤、カオトロピック剤などが挙げられる。界面活性剤には、アニオン性界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム）、カチオン性界面活性剤（例えば、臭化セチルトリメチルアンモニウム）、ノニオン性界面活性剤（例えば、オクチルフェノールエトキシレート、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート）、及び両イオン性界面活性剤（例えば、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸）が含まれる。カオトロピック剤としては、例えば、尿素、過塩素酸リチウム塩などのリチウム塩が挙げられる。細胞溶解剤は、通常、水（好ましくはヌクレアーゼフリー水）に溶解され、水溶液の形態で使用される。

細胞溶解用組成物は、プロテアーゼ（例えば、プロテアーゼＫ）、ＲＮａｓｅ阻害剤、これら２種以上の組合せを含んでいてもよい。

細胞溶解用組成物は、上記核酸ポリマーを含んでいても含んでいなくてもよい。上記核酸ポリマーを含む細胞溶解用組成物を用いて細胞から抽出したＲＮＡを鋳型ＲＮＡとして使用する場合、逆転写用組成物には、別途上記核

酸ポリマーを添加しなくてもよい。

細胞溶解用組成物の詳細については、米国特許出願公開公報2011／0111463（参照することによりその全体が明細書に組み込まれる）等に記載されている。

逆転写用組成物において、ＲＮＡ（ｒＲＮＡを含む）の濃度は、例えば１～１００００ｐｇ／μｌ、好ましくは１０～１０００ｐｇ／μｌ、より好ましくは１～１００ｐｇ／μｌである。

[0029] （２）プライマー

プライマーとしては、鋳型ＲＮＡに対する特異的なプライマー、オリゴｄＴプライマー、ランダムプライマー、これら２種以上の組合せが挙げられる。これらのうち、オリゴｄＴプライマーやランダムプライマーは、特定の配列に特異的なプライマーよりも、任意のＲＮＡにアニールし易い傾向があり、ｒＲＮＡからのＤＮＡ合成を誘発しやすい。本発明によれば、このようなオリゴｄＴプライマーやランダムプライマーを用いる場合であっても、ｒＲＮＡからのＤＮＡ合成を効果的に抑制することができる。かかる観点から、本発明は、オリゴｄＴプライマー及び／又はランダムプライマーを用いる逆転写反応を行う場合に有益であり、オリゴｄＴプライマー及びランダムプライマーの組合せを用いて逆転写反応を行う場合に特に有益である。オリゴｄＴプライマーとランダムプライマーのモル比は、例えば１：５～１：１５、好ましくは１：８～１：１２である。

ランダムプライマーとしては、例えば、完全ランダムプライマー、ＮＳＲ（Not So Random）プライマーが挙げられる。

完全ランダムプライマーとは、種々の塩基配列を有するプライマーの混合物であり、各塩基配列は完全にランダムな塩基配列である。完全ランダムプライマーは、ｒＲＮＡ配列と完全に一致する（又は完全に相補的な）配列を含み得る。完全ランダムプライマーとしては、完全ランダムペンタマー、完全ランダムヘキサマー、完全ランダムヘプタマー、完全ランダムオクタマー、これらの組合せなどが例示できる。例えば、完全ランダムヘキサマーは、

４種類のヌクレオチド（Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ）で可能な全ての塩基配列（4^6種類）の混合物であってもよい。

ＮＳＲプライマーとは、完全ランダムプライマーから、ｒＲＮＡ配列と完全に相補的な配列を有するプライマーを除去したものである。除去するｒＲＮＡ配列としては、例えば、１８Ｓ ｒＲＮＡ配列、２８Ｓ ｒＲＮＡ配列、１２Ｓ ｒＲＮＡ配列、１６Ｓ ｒＲＮＡ配列、これらの組合せが挙げられる。

ＮＳＲプライマーとしては、例えば、完全ランダムヘキサマーからｒＲＮＡ配列と完全に相補的な配列を有するヘキサマーを除外したものが挙げられる。また、完全ランダムペンタマー、完全ランダムヘプタマー、完全ランダムオクタマーなどのプライマーセットからｒＲＮＡ配列と完全に相補的な配列を有するものを除外したものをＮＳＲプライマーとすることもできる。

このようなＮＳＲプライマーを使うことにより、mRNA等を解析して感度を改善させることができる。

ＮＳＲプライマーの詳細については、1) Amour et al., Digital transcriptome profiling using selective hexamer priming for cDNA synthesis, Nature Methods, Vol. 6, No. 9, 2009, pp. 647-649、2) Ozsolak et al., Digital transcriptome profiling from attomole-levelRNA samples, Genome Research, Vol. 20, 2010, pp. 519-525、3) 米国特許出願公開公報2010／0029511（参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）等に記載されている。

ＮＳＲプライマーは、その塩基配列がｒＲＮＡの塩基配列と完全に相補的でないように設計されているものの、一部のプライマーはｒＲＮＡと結合し得、逆転写産物には、鋳型ＲＮＡ由来のＤＮＡにｒＲＮＡ由来のＤＮＡが混入し得る。しかし、上記核酸ポリマーを用いることにより、ｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制できる。その理由は、理論によって拘束されるわけではないが、上記核酸ポリマーが、ＮＳＲプライマー等のプライマーとｒＲＮＡの結合を競合阻害することが理由の一つとして推測される。

プライマーの長さは、アニーリングの観点から、例えば５塩基以上、好ましくは６塩基以上であり、合成の観点から、例えば３０塩基以下、好ましくは２５塩基以下、より好ましくは２０塩基以下である。

逆転写用組成物において、プライマーの濃度は、特に制限されないが、例えば１～１０μM、好ましくは２～６μM、より好ましくは３～５μMである。

[0030] （３）デオキシリボヌクレオチド

デオキシリボヌクレオチドとしては、デオキシリボヌクレオシドトリホスフェートが好ましい。デオキシリボヌクレオチドトリホスフェートとしては、例えば、デオキシシチジントリホスフェート（ｄＣＴＰ）、デオキシグアノシントリホスフェート（ｄＧＴＰ）、デオキシアデノシントリホスフェート（ｄＡＴＰ）、デオキシチミジントリホスフェート（ｄＴＴＰ）、デオキシウリジントリホスフェート（ｄＵＴＰ）、これらの誘導体、これら２種以上の組合せが挙げられる。これらのうち、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＡＴＰ、及びｄＴＴＰの混合物、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＡＴＰ、及びｄＵＴＰの混合物、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、及びｄＵＴＰの混合物等が好ましい。

[0031] （４）逆転写酵素

逆転写酵素は、逆転写活性（ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性）を有する任意のタンパク質（酵素）をいい、特に制限されないが、逆転写酵素活性を示すポリメラーゼが好ましい。また、逆転写酵素は、ＲＮａｓｅ Ｈ活性が低いか、又はＲＮａｓｅ Ｈ活性がないものが好ましい。逆転写酵素の例としては、例えば、トリ骨髄芽球ウイルス(Avian Myeloblastosis Virus)逆転写酵素(AMV-RT)、モロニーネズミ白血病ウイルス(Moloney Murine Leukemia Virus)逆転写酵素(MMLV-RT)、ヒト免疫ウイルス(Human Immunovirus)逆転写酵素(HIV-RT)、EIRV-RT、RAV2-RT、C.ヒドロゲノホルマンス(C.hydrogenogormans)DNAポリメラーゼ、rTthDNAポリメラーゼ、スーパースクリプト(SuperScript)I、スーパースクリプト(SuperScript)II、これらの変異体、及びこれら

の誘導体が挙げられる。これらのうち、MMLV-RTが好ましい。

[0032] （５）ＤＮＡポリメラーゼ

逆転写用組成物は、下記のＤＮＡポリメラーゼを含んでいてもよいし、含まなくてもよい：

Ｔａｑ、Ｔｂｒ、Ｔｆｌ、Ｔｒｕ、Ｔｔｈ、Ｔｌｉ、Ｔａｃ、Ｔｎｅ、Ｔｍａ、Ｔｉｈ、Ｔｆｉ、Ｐｆｕ、Ｐｗｏ、Ｋｏｄ、Ｂｓｔ、Ｓａｃ、Ｓｓｏ、Ｐｏｃ、Ｐａｂ、Ｍｔｈ、Ｐｈｏ、ＥＳ４、ＶＥＮＴ（商標）、ＤＥＥＰＶＥＮＴ（商標）、これらの変異体

[0033] （６）ＲＮａｓｅ阻害剤

逆転写用組成物は、ＲＮａｓｅ阻害剤を含んでいてもよい。ＲＮａｓｅ阻害剤は、特に制限されず、例えば、ヒト胎盤由来、ラット肺由来、又はブタ肝臓由来のタンパク質が挙げられる。

[0034] （７）添加剤

逆転写用組成物は、添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、例えば、緩衝剤、塩、これら２種以上の組合せが挙げられる。

緩衝剤としては、例えば、トリス（Ｔｒｉｓ）、トリシン（Ｔｒｉｃｉｎｅ）、ビス－トリシン（Ｂｉｓ－Ｔｒｉｃｉｎｅ）、ヘペス（Ｈｅｐｅｓ）、モプス（Ｍｏｐｓ）、テス（Ｔｅｓ）、タプス（Ｔａｐｓ）、ピペス（Ｐｉｐｅｓ）、ギャプス（Ｃａｐｓ）、これら２種以上の組合せが挙げられる。緩衝剤は、通常、水（好ましくはヌクレアーゼフリー水）に溶解され、水溶液の形態で使用される。

塩としては、例えば、塩化物（例えば、塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化マンガン）、酢酸塩（例えば、酢酸リチウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、酢酸マンガン）、硫酸塩（例えば、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン）、これら２種以上の組合せが挙げられる。

[0035] ２－２．インキュベーション

逆転写用組成物のインキュベーションの条件は、鋳型ＲＮＡの逆転写が進

行する限り特に制限されず、当該分野において知られている、いずれの条件も採用することができる。インキュベーションの温度は、例えば３０～６５℃、好ましくは３５～６０℃である。インキュベーションの時間は、例えば５～１２０分、好ましくは１０～６０分である。

[0036] ２－３．鋳型ＲＮＡの逆転写がＲＮＡを鋳型としてｃＤＮＡを増幅させる増幅逆転写法（ＲＴ－ＲａｍＤＡ法とも言う）において行われる場合

ＲＴ－ＲａｍＤＡ法とは、鋳型ＲＮＡ、プライマー、ＤＮＡ鎖特異的ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッド鎖分解酵素、ＲＮａｓｅ　Ｈマイナス型逆転写酵素、及び基質を含む混合物をインキュベートする工程を含む、核酸の増幅方法である。ＲＴ－ＲａｍＤＡ法では、ＲＮａｓｅ　Ｈマイナス型逆転写酵素のＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性により鋳型ＲＮＡの相補鎖ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を合成し、ＲＮＡとｃＤＮＡとのハイブリッド鎖のうちのｃＤＮＡ鎖をＤＮＡ鎖特異的ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッド鎖分解酵素により無作為に切断し、前記の切断部位が起点となり、ＲＮａｓｅ　Ｈマイナス型逆転写酵素の鎖置換活性により３’側のｃＤＮＡ鎖がＲＮＡから剥がされ、ＲＮａｓｅ　Ｈマイナス型逆転写酵素により剥がされた部分に新たなｃＤＮＡ鎖が合成される。ＲＴ－ＲａｍＤＡ法の詳細については、米国特許出願公開公報2017／0275685（参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）等に記載されている。

[0037] 鋳型ＲＮＡの逆転写がＲＴ－ＲａｍＤＡ法において行われる場合、逆転写用組成物は、ＤＮＡ鎖特異的ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッド鎖分解酵素を含む。

[0038] ＤＮＡ鎖特異的ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッド鎖分解酵素は、ＲＮＡとＤＮＡとのハイブリッド鎖中のＤＮＡ鎖を切断する活性を有する酵素であることが好ましい。当該酵素としては、例えば、二本鎖特異的ＤＮＡ分解酵素、非特異的ＤＮＡ分解酵素を使用することができる。

[0039] 二本鎖特異的分解酵素（二本鎖特異的ヌクレアーゼ；ＤＳＮとも言う）は、原核生物又は真核生物に由来する酵素を使用することができるが、好まし

くは、甲殻類由来の二本鎖特異的ＤＮＡ分解酵素又はその改変体を使用することができる。具体的な例としては、以下のものが挙げられる。

・ Ｓｏｌｅｎｏｃｅｒａ ｍｅｌａｎｔｈｏ（ナミクダヒゲエビ）ＤＮａｓｅ

・ Ｐｅｎａｅｕｓ ｊａｐｏｎｉｃｕｓ（クルマエビ）ＤＮａｓｅ

・ Ｐａｒａｌｉｔｈｏｄｅｓ ｃａｍｔｓｃｈａｔｉｃｕｓ（タラバガニ）ＤＳＮ

・ Ｐａｎｄａｌｕｓ ｂｏｒｅａｌｉｓ（ホッコクアカエビ）ｄｓＤＮａｓｅ

・ Ｃｈｉｏｎｏｅｃｅｔｅｓ ｏｐｉｌｉｏ（ズワイガニ）ＤＳＮ

・ その他のＤＳＮホモログ

二本鎖特異的ＤＮＡ分解酵素は、好ましくは、６０℃未満でもＤＮＡ分解活性を有する酵素である。上記の中では、エビ由来の二本鎖特異的ＤＮＡ分解酵素又はその改変体が好ましい。

二本鎖特異的ＤＮＡ分解酵素としては、市販品を使用することができる。市販品としては、dsDNase（ArcticZymes社）、Hl-dsDNase（ArcticZymes社）、dsDNase（Thermo scientific社）、Shrimp DNase、Recombinant（affymetrix社）、Atlantis dsDNase（Zymo Research社）、Thermolabile Nuclease（Roche社）などを挙げることができる。

[0040] 非特異的ＤＮＡ分解酵素としては、ＲＮＡとＤＮＡとのハイブリッド鎖のＤＮＡ鎖を切断する活性を有し、ＲＮＡとＤＮＡとのハイブリッド鎖のＲＮＡ鎖、一本鎖ＲＮＡを切断する活性を実質的に有さず、好ましくは、一本鎖ＤＮＡを切断する活性がＲＮＡとＤＮＡとのハイブリッド鎖のＤＮＡ鎖を切断する活性に比較して低くなる酵素を挙げることができる。非特異的ＤＮＡ分解酵素は、好ましくは、６０℃未満でもＤＮＡ分解活性を有する酵素である。このような非特異的ＤＮＡ分解酵素としては、市販品を使用することもでき、例えば、ＤＮａｓｅＩ（Thermo Fisher社製、DNaseI）等を用いることが可能である。 非特異的ＤＮＡ分解酵素は、原核生物又は真核生物に由来

する酵素を使用することができるが、好ましくは、ほ乳類由来の非特異的ＤＮＡ分解酵素又はその改変体、より好ましくはウシ由来の非特異的ＤＮＡ分解酵素又はその改変体を使用することができる。

[0041] 上記改変体とは、天然由来のアミノ酸配列を改変することによって得られる酵素を意味する。具体的には、天然由来のアミノ酸配列と８０％以上（好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる酵素、並びに天然由来のアミノ酸配列において１又は数個（例えば、１～１０個、好ましくは１～５個、より好ましくは１～３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る酵素である。

[0042] 鋳型ＲＮＡの逆転写がＲＴ－ＲａｍＤＡ法において行われる場合、逆転写用組成物は、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質を含んでいてもよい。一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質は、通常、ＤＮＡ鎖特異的ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッド鎖分解酵素とともに使用される。一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質としては、例えば、Ｔ４ジーン３２プロテイン、ＲｅｃＡ、ＳＳＢ（Single-Stranded DNA Binding Protein）、これら２種以上の組合せが挙げられる。

[0043] 鋳型ＲＮＡの逆転写がＲＴ－ＲａｍＤＡ法において行われる場合、逆転写用組成物のインキュベーションは、等温条件で行ってもよいし、熱サイクル条件で行ってもよい。

[0044] （１）等温条件

インキュベーションを等温条件で行う場合、例えば２５℃以上５０℃未満の間の所定の温度、好ましくは３０～４５℃の間の所定の温度、より好ましくは３５～４０℃の間の所定の温度、例えば３７℃で所定の時間（例えば５～１８０分、好ましくは１０～１５０分）行うことができる。

２５℃以上５０℃未満の間の所定の温度でのインキュベーションは、２以上の段階に分けて行ってもよい。例えば２５℃以上３０℃未満の間の所定の温度で５～１５分、次いで３０℃以上３５℃未満の間の所定の温度で５～１５分、次いで３５℃以上５０℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば

５～６０分）インキュベーションしてもよい。

２５℃以上５０℃未満の間の所定の温度でのインキュベーションの後、例えば５０℃以上１００℃未満の間の所定の温度でインキュベーションしてもよい。５０℃以上１００℃未満の間の所定の温度でのインキュベーションは２以上の段階に分けて行ってもよい。例えば５０℃以上８０℃未満の間の所定の温度で５～１５分、次いで８０～９０℃の間の所定の温度で５～１５分インキュベーションしてもよい。

[0045] （２）熱サイクル条件

インキュベーションを熱サイクル条件で行う場合、例えば２０℃以上３０℃未満の間の所定の温度Ｔ１（例えば２５℃）と３０～４５℃の間の所定の温度Ｔ２（例えば３７℃）とを組み合わせて、Ｔ１で所定の時間（例えば１～３分、一例として２分）とＴ２で所定の時間（例えば１～３分、一例として２分）とを１サイクルとして、これを好ましくは１０～４０サイクル、より好ましくは１５～３５サイクル繰り返して行ってもよい。なお、上記の熱サイクルに先立って、例えば２５℃以上３０℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば５～１５分）、次いで３０℃以上３５℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば５～１５分）、次いで３５℃以上５０℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば１～５分）インキュベーションしてもよい。また、上記の熱サイクルの後、例えば５０℃以上８０℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば５～１５分）、次いで８０～９０℃の間の所定の温度で所定の時間（例えば５～１５分）インキュベーションしてもよい。

[0046] ２－４．鋳型ＲＮＡの逆転写がＲＴ－ＰＣＲ法において行われる場合

鋳型ＲＮＡの逆転写がＲＴ－ＰＣＲ法において行われる場合、逆転写用組成物のインキュベーションは、２－２．に記載された条件で行うことができ、その後、必要に応じて逆転写酵素を失活してもよい。逆転写の失活方法は、特に限定されるわけではないが、例えば、９０～１００℃で所定時間（例えば１～１０分）インキュベーションする方法であってもよい。

[0047] 鋳型ＲＮＡの逆転写がＲＴ－ＰＣＲ法において行われる場合、鋳型ＲＮＡ

の逆転写によりＤＮＡを合成する方法は、上記インキュベーションされた逆転写用組成物（逆転写産物とも言う）に含まれるＤＮＡを増幅する工程を含む。ＤＮＡを増幅する工程は、典型的には、ＤＮＡ増幅用組成物を熱サイクル条件でインキュベーションする工程を含む。

[0048] ＤＮＡ増幅用組成物には、逆転写産物をそのまま含有させてもよく、逆転写産物を水、好ましくはヌクレアーゼフリー水で希釈したものを含有させてもよい。例えば逆転写産物の質量が１／２０～１／３０になるように希釈してもよい。

ＤＮＡ増幅用組成物は、逆転写産物に加えて、例えば、プライマー、デオキシリボヌクレオチド、及びＤＮＡポリメラーゼを含む。また、上記２－１．に記載した逆転写用組成物がＤＮＡポリメラーゼ等のＤＮＡ増幅反応に必要な成分を含んでいる場合には、その逆転写用組成物はそのままＤＮＡ増幅用組成物となり得、両組成物は相互に互換可能に呼称され得る。

プライマーとしては、ＤＮＡ（ＲＮＡから逆転写されたＤＮＡを含む）に対して特異的なプライマー（フォワードプライマー、リバースプライマー）が好ましい。

デオキシリボヌクレオチド及びＤＮＡポリメラーゼは、上記２－１．（３）及び（５）に記載したものと同様のものを使用することができる。

ＤＮＡ増幅用組成物は、抗ＤＮＡポリメラーゼ抗体、反応緩衝剤、金属イオン（マグネシウムイオンなど）、蛍光色素、蛍光標識したプローブ、これら２種以上の組合せを含んでいてもよい。

[0049] 熱サイクル条件でのインキュベーションは、例えば８０℃以上１００℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば１０～３０秒）と５０～７０℃の間の所定の温度で所定の時間（例えば３０秒～２分）とを１サイクルとして、これを好ましくは１０～５０サイクル、より好ましくは１５～４０サイクル繰り返して行ってもよい。

[0050] ３．核酸ポリマーを用いてｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する方法

上記核酸ポリマーを用いてｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する方法は、

典型的には、上記核酸ポリマーの存在下で鋳型ＲＮＡを逆転写する工程を含む。この工程により、鋳型ＲＮＡが特異的に逆転写され、鋳型ＲＮＡ由来のＤＮＡを特異的に合成でき、ｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制することができる。ｒＲＮＡは、好ましくは、１８Ｓ ｒＲＮＡ、２８Ｓ ｒＲＮＡ、１２Ｓ ｒＲＮＡ、１６Ｓ ｒＲＮＡ、又はこれら２種以上の組合せである。逆転写の条件は、上記２－１．～２－４．に記載したとおりである。

[0051] ＜ｒＲＮＡの逆転写を抑制する（又はｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する）ための核酸ポリマー含有組成物、ｒＲＮＡの逆転写を抑制する（又はｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する）ための核酸ポリマーの使用＞

ｒＲＮＡの逆転写を抑制するための組成物は、上記核酸ポリマーを含有することが好ましい。また、ｒＲＮＡの逆転写を抑制するため、上記核酸ポリマーを使用することが好ましい。ｒＲＮＡの逆転写は、少なくともｒＲＮＡを含むＲＮＡ試料の逆転写であれば、特に制限されず、鋳型ＲＮＡ及びｒＲＮＡを含むＲＮＡ試料の逆転写であってもよい。鋳型ＲＮＡ及びｒＲＮＡを含むＲＮＡ試料は、細胞や組織から抽出されたＲＮＡ、細胞や組織からの抽出処理後に更に精製されたＲＮＡ等であってもよいが、好ましくは細胞から抽出されたＲＮＡである。このＲＮＡは、上記２－１．（１）に記載したものと同様のものを使用することができる。

逆転写の条件は、例えば、上記２－２．～２－４．に記載した条件と同様の条件を採用することができる。

ｒＲＮＡの逆転写を抑制するための組成物は、上記核酸ポリマーに加え、上記２－１．、２－２．、及び２－３．に記載したような成分（特に、逆転写に必要な成分）を含んでいてもよい。

ｒＲＮＡの逆転写を抑制するための組成物は、各成分の混合物の形態であってもよく、各成分を別々に備えたキットの形態であってもよい。

[0052] ＜次世代シーケンシングに用いる逆転写反応物を調製するための逆転写反応組成物＞

次世代シーケンシング（ＮＧＳ解析：ｎｅｘｔ－ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ

ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ、次世代シーケンサー解析等ともいう）に用いる逆転写反応物を調製するための逆転写反応組成物は、上記核酸ポリマーを含有することが好ましい。次世代シーケンシングとは、典型的には、数百万から数十億もの膨大なシーケンシング反応を同時に実施できる配列決定技術をいう。次世代シーケンシングとしては、例えば、エマルジョンＰＣＲやブリッジＰＣＲ等の増幅技術や１分子観察等の高感度検出技術を用いて並列的に配列解析する方法が挙げられる。次世代シーケンシングを行う装置（シークエンサー）としては、特に限定されないが、例えば、ＭｉＳｅｑ、ＨｉＳｅｑ、ＮｏｖａＳｅｑ（イルミナ社）；Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｖ２．０、Ｉｏｎ　Ｐｒｏｔｏｎ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）；ＭｉｎＩＯＮ、ＰｒｏｍｅｔｈＩＯＮ（ナノポア社）等が挙げられる。次世代シーケンシングについては、例えば米国特許出願公開公報2014／178438（参照することによりその全体が明細書に組み込まれる）等に記載されている。

本発明によれば、次世代シーケンシング等の大量の遺伝子発現解析においてノイズとなり得るｒＲＮＡからの逆転写反応物を効果的に抑制することが可能となる。ＮＧＳ解析では、１回の解析で得られるリード数に限りがあることが多く、無駄なｒＲＮＡ由来のＤＮＡのリードを減らすことが重要である。本発明によれば、解析を意図しないｒＲＮＡ由来のＤＮＡのリードを減らすことができ、有用なリード数（ｒＲＮＡ以外のリード数：遺伝子情報量）を増加させることできるので優れており、更にはＮＧＳ解析回数を減らすことも繋がりうるのでコスト面でも有益である。従って、本発明に従って調製された、ｒＲＮＡを含み得るＲＮＡ試料からの逆転写反応物は、次世代シーケンシングに供するのに好適である。ｒＲＮＡを含み得るＲＮＡ試料は、鋳型ＲＮＡ及びｒＲＮＡを含むＲＮＡ試料の逆転写であってもよい。鋳型ＲＮＡ及びｒＲＮＡを含むＲＮＡ試料は、細胞や組織から抽出されたＲＮＡ、細胞や組織からの抽出処理後に更に精製されたＲＮＡ等であってもよいが、好ましくは細胞から抽出されたＲＮＡである。このＲＮＡは、上記２－１．

（１）に記載したものと同様のものを使用することができる。

逆転写の条件は、例えば、上記２－２．～２－４．に記載した条件と同様の条件を採用することができる。

次世代シーケンシングに用いる逆転写反応物を調製するための逆転写反応組成物は、上記核酸ポリマーに加え、上記２－１．、２－２．、及び２－３．に記載したような成分（特に、逆転写に必要な成分）を含んでいてもよい。

次世代シーケンシングに用いる逆転写反応物を調製するための逆転写反応組成物は、各成分の混合物の形態であってもよく、各成分を別々に備えたキットの形態であってもよい。

実施例

[0053] 以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0054] 実施例１：ＲＴ－ＰＣＲ法におけるイノシン酸ポリマーによるｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成抑制（精製ＲＮＡ　１０ｐｇ）

本実施例では、ＲＴ－ＰＣＲ法におけるイノシン酸ポリマーによるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成量を確認する目的で、以下の試験を行った。

サンプル溶液に、イノシン酸ポリマーとしてポリイノシン酸カリウム塩（イノシン酸ホモポリマー（これをポリＩとも言う）のカリウム塩）を添加し、逆転写反応により１本鎖ｃＤＮＡの合成を行った。その後、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）にて、ポリイノシン酸カリウム塩の有無によるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成量の比較を行った。具体的には、以下の手法により行った。

本実施例で用いる核酸断片サンプルは、ＮＩＨ３Ｔ３細胞をＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を用いて精製したＲＮＡ１０ｐｇを用いた。

このＲＮＡ１０ｐｇの逆転写反応のために、本実施例で使用したサンプル溶液に含まれる成分とそのサンプル溶液中の終濃度を以下の表１に示す。

[表1]

終濃度	成分
１００ｍＭ	Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）
１０ｍＭ	塩化マグネシウム
５０ｍＭ	塩化カリウム
１ｍＭ	ｄＡＴＰ
１ｍＭ	ｄＴＴＰ
１ｍＭ	ｄＧＴＰ
１ｍＭ	ｄＣＴＰ
０．４μＭ	オリゴ(ｄＴ)１８プライマー
４μＭ	ランダムヘキサマープライマー
１Ｕ／μｌ	逆転写酵素(東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
０．５Ｕ／μｌ	ＲＮａｓｅ阻害剤(東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
０または５ｎｇ／μｌ	ポリイノシン酸カリウム塩*(Sigma社製、酵素合成品)

＊：ポリイノシン酸カリウム塩の塩基長分布について、試薬キットＤＮＡ－１２０００（株式会社島津製作所製）を用い、マイクロチップ電気泳動装置（同社製）で分析したところ、ポリイノシン酸カリウム塩は、図１に示すようにピーク塩基長が約４５０塩基長であり、約１５０～８０００塩基長のポリイノシン酸を含むことが分かった（参考値）。

[0055] 精製ＲＮＡを上記組成に添加したサンプル溶液を用いて、逆転写反応を行った。この反応は３７℃１０分間反応させ、次いで９５℃５分間反応を行うことで１本鎖ｃＤＮＡを合成した。

その後、以下の定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）にてＤＮＡ量の比較を行った。

逆転写反応液をｎｕｃｌｅａｓｅ　ｆｒｅｅ　ｗａｔｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ社）で希釈し、１／２５量をｑＰＣＲ反応に用いた。ｑＰＣＲはＳｔｅｐＯｎｅ　Ｐｌｕｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いて、以下の条件で行った。

ｑＰＣＲ反応用溶液［２０μｌ（ＴＨＵＮＤＥＲＢＩＲＤ（商標）　ＳＹＢＲ　ｑＰＣＲ　Ｍｉｘ　（ＴＯＹＯＢＯ社）、６ｐｍｏｌ　フォワードプライマー、６ｐｍｏｌ　リバースプライマー、２μｌ　希釈逆転写反応液、

ｎｕｃｌｅａｓｅ　ｆｒｅｅ　ｗａｔｅｒ］を９５℃１分処理して酵素を活性化したのち、９５℃１５秒の変性及び６０℃１分の伸長反応を４０サイクル行った。

[0056] 融解曲線分析は、９５℃１５秒、６０℃１５秒、及び９５℃１５秒で行った。

標的遺伝子としてメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）であるβａｃｔｉｎ、Ｈｐｒｔ－１、長鎖非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）であるＮｅａｔ－１、及び１８Ｓ　リボソーマルＲＮＡであるＲｎ１８ｓを使用した。

[0057] 各遺伝子のプライマーは、以下のとおりである。

βａｃｔｉｎ（ｍＲＮＡ）

フォワードプライマー：CAGCTGAGAGGGAAATCGTG（配列番号１）　リバースプライマー：CGTTGCCAATAGTGATGACC（配列番号２）

Ｎｅａｔ－１（ｌｎｃＲＮＡ）

フォワードプライマー：GATCGGGACCCCAGTGACCT（配列番号３）　リバースプライマー：AGCTTTCCCCAACACCCACA（配列番号４）

Ｈｐｒｔ－１（ｍＲＮＡ）

フォワードプライマー：TCAGTCAACGGGGGACATAAA（配列番号５）　リバースプライマー：GGGGCTGTACTGCTTAACCAG（配列番号６）　Ｒｎ１８ｓ（リボソーマルＲＮＡ）

フォワードプライマー：CTCAACACGGGAAACCTCAC（配列番号７）　リバースプライマー：CGCTCCACCAACTAAGAACG（配列番号８）

[0058] その結果を表２に示す。

[表2]

	Ct値				平均Ct値		ΔCt
標的遺伝子	ポリI（添加なし）		ポリI（5ng/ul）		ポリI（添加なし）	ポリI（5ng/ul）	
βactin（mRNA）	24.9	24.6	25.3	25.2	24.7	25.3	0.6
Neat−1（lncRNA）	28.6	28.1	29.4	29.7	28.4	29.6	1.2
Hprt−1（mRNA）	31.7	29.8	31.2	30.6	30.7	30.9	0.2
Rn18s（リボソーマルRNA）	18.6	17.8	22.6	22.3	18.2	22.4	4.2

ポリイノシン酸カリウム塩を添加した条件の平均Ct値からポリイノシン酸カリウム塩を添加していない条件の平均Ct値を引いたものをΔCtとした。

[0059] ｍＲＮＡであるβａｃｔｉｎ及びＨｐｒｔ－１、並びにｌｎｃＲＮＡであるＮｅａｔ－１におけるポリイノシン酸カリウム塩の有無によるＣｔ値の差（ｍＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ由来のＤＮＡ合成量の差）に比べて、リボソーマルＲＮＡであるＲｎ１８ｓにおけるポリイノシン酸カリウム塩の有無によるＣｔ値の差が大きくなった。このことから、Ｒｎ１８ｓは、他のＲＮＡに比べて、ポリイノシン酸カリウム塩を添加することでＣｔ値が遅くなり（大きくなり）、リボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成量が低減することが確認された。

よって、イノシン酸ポリマーにより、逆転写が通常望まれないリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成が抑制されることが確認された。

[0060] 実施例２：ＲＴ－ＲａｍＤＡ法におけるイノシン酸ポリマーによるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成抑制（精製ＲＮＡ　１０ｐｇ）

本実施例では、ＲＴ－ＲａｍＤＡ法におけるイノシン酸ポリマーによるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成量を確認する目的で、以下の試験を行った。

サンプル溶液にポリイノシン酸カリウム塩を添加し、ＲＴ－ＲａｍＤＡ法

により１本鎖ｃＤＮＡの合成を行い、クレノウフラグメントの２本鎖ｃＤＮＡを生成した。その後Ｎｅｘｔｅｔａ（ｉｌｌｕｍｉｎａ社）を用いてライブラリーを調製し、ＭｉＳｅｑ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ　ｖ３（１５０Ｃｙｃｌｅｓ）（ｉｌｌｕｍｉｎａ社）を用いてＭｉＳｅｑ（ｉｌｌｕｍｉｎａ社）によりＮＧＳ（次世代シーケンシング）を実施した。手順は取扱い説明書に従った。解析はｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｂａｓｅｓｐａｃｅ　ＴｏｐＨａｔ（ｉｌｌｕｍｉｎａ社）を用い、リード中のリボソーマルＲＮＡの割合を算出した。手順は取扱い説明書に従った。

具体的には、以下の手法により行った。

本実施例で用いる核酸断片サンプルは、ＮＩＨ３Ｔ３細胞をＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を用いて精製したＲＮＡ１０ｐｇを用いた。

このＲＮＡ１０ｐｇをＲＴ－ＲａｍＤＡ法に供するために、本実施例で使用したサンプル溶液に含まれる成分とそのサンプル溶液中の終濃度を以下の表３に示す。なお、ＮＳＲプライマー（ヘキサマー）は、Sigma社カスタムオリゴにて合成し、Ozsolak et al., Digital transcriptome profiling from attomole-levelRNA samples, Genome Research, Vol. 20, 2010, pp. 519-525に記載されたプライマー組成となるように混合して用いた。

[表3]

終濃度	成分
１００ｍＭ	Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）
１０ｍＭ	塩化マグネシウム
５０ｍＭ	塩化カリウム
１ｍＭ	ｄＡＴＰ
１ｍＭ	ｄＴＴＰ
１ｍＭ	ｄＧＴＰ
１ｍＭ	ｄＣＴＰ
０．４μＭ	オリゴ(ｄＴ)１８プライマー
４μＭ	ＮＳＲプライマー（ヘキサマー）
１Ｕ／μｌ	逆転写酵素(東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
０．５Ｕ／μｌ	ＲＮａｓｅ阻害剤(東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
０．２Ｕ／μｌ	ＤＮａｓｅＩ(Thermo Fisher 社製、DNaseＩ)
５０ｎｇ／μｌ	Ｔ４ジーン３２プロテイン
０、１、または３ｎｇ／μｌ	実施例１で使用したポリイノシン酸カリウム塩

[0061] 精製ＲＮＡを上記組成に添加したサンプル溶液を用いて、ＲＴ－ＲａｍＤＡ法を行った。この方法では２５℃１０分、３０℃１０分、３７℃３０分、５０℃５分、及び８５℃５分で反応を行った。

その結果を表４に示す。

[表4]

	Number of Reads	% Total Aligned	% Abundant	% Abundant /% Total Aligned
1ng/μl ポリイノシン酸カリウム塩	713,069	83.65%	23.86%	28.52%
3ng/μl ポリイノシン酸カリウム塩	878,539	74.96%	16.78%	22.39%
ポリイノシン酸カリウム塩添加なし	943,238	88.95%	41.68%	46.86%

表４のＮｕｍｂｅｒ ｏｆ Ｒｅａｄｓは得られた総リードの数である。％Ｔｏｔａｌ Ａｌｉｇｎｅｄは総リード中のリボソーマルＲＮＡを含むリファレンスゲノム（ＵＣＳＣ ｍｍ１０）と一致したリードの割合を示しており、％ＡｂｕｎｄａｎｔはリボソーマルＲＮＡの割合を示す。％Ａｂｕｎｄａｎｔ／％Ｔｏｔａｌ Ａｌｉｇｎｅｄはリファレンスゲノムと一致したリード中のリボソーマルＲＮＡの割合を示す。

[0062] ポリイノシン酸カリウム塩を添加した条件では添加していない条件に比べ、％Ａｂｕｎｄａｎｔ／％Ｔｏｔａｌ　Ａｌｉｇｎｅｄの割合が低下しており、リボソーマルＲＮＡの割合が減少している。

よって、イノシン酸ポリマーにより、ＲＴ－ＲａｍＤＡ法におけるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成が抑制されていることが確認された。

[0063] 実施例３：ＲＴ－ＲａｍＤＡ法におけるイノシン酸ポリマーによるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成抑制（ＮＩＨ３Ｔ３細胞）

本実施例では、ＲａｍＤＡ反応におけるイノシン酸ポリマーによるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成量を確認する目的で、以下の試験を行った。

サンプル溶液にポリイノシン酸カリウム塩を添加し、ＲＴ－ＲａｍＤＡ法により１本鎖ｃＤＮＡの合成を行い、クレノウフラグメントの２本鎖ｃＤＮＡを生成した。その後Ｎｅｘｔｅｔａ（ｉｌｌｕｍｉｎａ社）を用いてライブラリーを調製し、ＭｉＳｅｑ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ　ｖ３（１５０Ｃｙｃｌｅｓ）（ｉｌｌｕｍｉｎａ社）を用いてＭｉＳｅｑ（ｉｌｌｕｍｉｎａ社）によりＮＧＳ（次世代シーケンシング）を実施した。手順は取扱い説明書に従った。解析はｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｂａｓｅｓｐａｃｅ　ＴｏｐＨａｔ（ｉｌｌｕｍｉｎａ社）を用い、リード中のリボソーマルＲＮＡの割合を算出した。手順は取扱い説明書に従った。

具体的には、以下の手法により行った。

本実施例で用いる細胞サンプルは、以下の組成にて調製を行った。

ＮＩＨ３Ｔ３細胞はトリプシン溶液（ナカライテスク社）を用いて３７℃２分反応させ、１細胞へ乖離した。解離後は直ちにＰＢＳ（－）へ置換し反応を止めた。ＦＡＣＳ　Ｍｅｌｏｄｙセルソーター（ＢＤ社）を用いて死細胞蛍光マーカー色素のＰＩ陰性細胞を生細胞分画とし、この分画から４０細胞を３μｌの以下に示すＬｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒに分取した。分取後は直ちに遠心を行い、－８０℃にて保存した。逆転写反応に使用する際は、融解後に１１７μｌのＬｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒを加え、４０倍希釈した細胞溶解液３μｌを１細胞溶解液として用いた。

Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ

０．１ｍｇ／ｍｌ　プロテアーゼＫ

０．５％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００

０または５ｎｇ／ｕｌ　実施例１で使用したポリイノシン酸カリウム塩

１Ｕ／ｕｌ　ＲＮａｓｅ阻害剤（東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor）

[0064] この１細胞溶解液をＲＴ－ＲａｍＤＡ法に供するために、本実施例で使用したサンプル溶液に含まれる成分とそのサンプル溶液中の終濃度を以下の表５に示す。

[表5]

終濃度	成分
１００mM	Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）
１０mM	塩化マグネシウム
５０mM	塩化カリウム
１mM	ｄＡＴＰ
１mM	ｄＴＴＰ
１mM	ｄＧＴＰ
１mM	ｄＣＴＰ
０．４μM	オリゴ(ｄＴ)１８プライマー
４μM	実施例２で使用したＮＳＲプライマー（ヘキサマー）
１Ｕ／μｌ	逆転写酵素(東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
０．５Ｕ／μｌ	ＲＮａｓｅ阻害剤(東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
０．２Ｕ／μｌ	ＤＮａｓｅＩ(Thermo Fisher 社製、DNaseＩ)
５０ｎｇ／μｌ	Ｔ４ジーン３２プロテイン

[0065] １細胞溶解液３μｌを７０℃２分で熱処理を行い、上記組成のサンプル液６μｌに添加し、ＲＴ－ＲａｍＤＡ法を行った（反応液中のポリイノシン酸カリウム塩の終濃度は０または１．６７ｎｇ／μｌ）。この方法では２５℃１０分、３０℃１０分、３７℃３０分、５０℃５分、及び８５℃５分で反応を行った。

その結果を表６に示す。

[表6]

	Number of Reads	% Total Aligned	% Abundant	% Abundant /% Total Aligned
ポリイノシン酸カリウム塩添加なし	852993	89.21%	38.36%	43.00%
5ng/μl ポリイノシン酸カリウム塩	712267	87.71%	24.28%	27.68%

ポリイノシン酸カリウム塩を添加した条件では添加していない条件に比べ、％Ａｂｕｎｄａｎｔ／％Ｔｏｔａｌ　Ａｌｉｇｎｅｄの割合が低下しており、リボソーマルＲＮＡの割合が減少している。

よって細胞溶解液にポリイノシン酸カリウム塩を含むことで、ＲＴ－ＲａｍＤＡ法のサンプル溶液にもポリイノシン酸カリウム塩が添加されることになり、ポリイノシン酸カリウム塩によりリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成が抑制されることが確認された。

[0066] 実施例４：ＲＴ－ＰＣＲ法におけるイノシン酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、及びデオキシチミジル酸ポリマーによるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成抑制（ＮＩＨ３Ｔ３細胞）

本実施例では、ＲＴ－ＰＣＲ法における４種類の核酸ポリマー（イノシン酸ポリマーとしてポリイノシン酸カリウム塩；デオキシグアニル酸ポリマーとしてポリデオキシグアニル酸；アデニル酸ポリマーとしてポリアデニル酸カリウム塩；デオキシチミジル酸ポリマーとしてポリデオキシチミジル酸）によるリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成量を確認する目的で、以下の試験を行った。

細胞溶解液中に核酸ポリマーを添加し、逆転写反応により１本鎖ｃＤＮＡの合成を行った。その後、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）にてＤＮＡ合成量の比較を行った。具体的には、以下の手法により行った。

本実施例で用いる細胞サンプルは、以下の組成にて調製を行った。

ＮＩＨ３Ｔ３細胞はトリプシン溶液（ナカライテスク社）を用いて３７℃２分反応させ、１細胞へ乖離した。解離後は直ちにＰＢＳ（－）へ置換し反応を止めた。ＦＡＣＳ　Ｍｅｌｏｄｙセルソーター（ＢＤ社）を用いて死細

胞蛍光マーカー色素のＰＩ陰性細胞を生細胞分画とし、この分画から１０細胞を３μｌの以下に示すＬｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒに分取した。分取後は直ちに遠心を行い、－８０℃にて保存した。逆転写反応に使用する際は、融解後に熱処理を行い、３μｌを１０細胞溶解液として用いた。

Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ

０．１ｍｇ／ｍｌ　プロテアーゼＫ

０．1%　ノニデット-４０

１Ｕ／μｌ　ＲＮａｓｅ阻害剤（東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor）

[0067] この細胞溶解液の逆転写反応のために、本実施例で使用したサンプル溶液に含まれる成分とそのサンプル溶液中の終濃度を以下の表７に示す。

[表7]

終濃度	成分
１００mM	Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）
１０mM	塩化マグネシウム
５０mM	塩化カリウム
１mM	ｄＡＴＰ
１mM	ｄＴＴＰ
１mM	ｄＧＴＰ
１mM	ｄＣＴＰ
０．４μM	オリゴ(ｄＴ)１８プライマー
４μM	実施例２で使用したＮＳＲプライマー（ヘキサマー）
１Ｕ／μｌ	逆転写酵素(東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
０．５Ｕ／μｌ	ＲＮａｓｅ阻害剤(東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
０、０．２、２、または２０ｎｇ／μｌ	実施例１で使用したポリイノシン酸カリウム塩、 ポリデオキシグアニル酸(約70塩基長) （北海道システムサイエンス社製、化学合成品）、 ポリアデニル酸カリウム塩*(Sigma社製、P9403、酵素合成品)、またはポリデオキシチミジル酸(約70塩基長) （北海道システムサイエンス社製、化学合成品）

＊：ポリアデニル酸カリウム塩の塩基長分布について、試薬キットＤＮＡ－１２０００（株式会社島津製作所製）を用い、マイクロチップ電気泳動装置（同社製）で分析したところ、ポリアデニル酸カリウム塩は、図２に示すように、ピーク塩基長が約３００塩基長であり、約１００～５０００塩基長の

ポリアデニル酸を含むことが分かった（参考値）。

[0068] １０個の細胞の細胞溶解液３μｌを７０℃２分で熱処理を行い、上記組成に添加し、逆転写反応を行った。この反応は３７℃１０分間反応させ、次いで９５℃５分間反応を行うことで１本鎖ｃＤＮＡを合成した。

その後、以下の定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）にてＤＮＡ増幅量の比較を行った。

逆転写反応液をｎｕｃｌｅａｓｅ ｆｒｅｅ ｗａｔｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ社）で希釈し、１／２５量をｑＰＣＲ反応に用いた。ｑＰＣＲはＳｔｅｐＯｎｅ Ｐｌｕｓ （Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いて、以下の条件で行った。ｑＰＣＲ反応用溶液［２０μｌ（ＴＨＵＮＤＥＲＢＩＲＤ（商標） ＳＹＢＲ ｑＰＣＲ Ｍｉｘ（ＴＯＹＯＢＯ社）、６ｐｍｏｌ フォワードプライマー、 ６ｐｍｏｌ リバースプライマー、２μｌ 希釈逆転写反応液、 ｎｕｃｌｅａｓｅ ｆｒｅｅ ｗａｔｅｒ）を９５℃１分で酵素を活性化したのち、９５℃１５秒の変性及び６０℃１分の伸長反応を４０サイクル行った。融解曲線分析は、９５℃１５秒、６０℃１５秒、及び９５℃１５秒で行った。標的遺伝子としてβａｃｔｉｎ（ｍＲＮＡ）及びＲｎ１８ｓ（１８Ｓ リボソーマルＲＮＡ）を使用した。

その結果を表８に示す。

[表8]

		—	ポリイノシン酸カリウム塩			ポリデオキシグアニル酸			ポリアデニル酸カリウム塩			ポリデオキシチミジル酸	
	添加量	添加なし	0.2ng/μl	2ng/μl	20ng/μl	0.2ng/μl	2ng/μl	20ng/μl	0.2ng/μl	2ng/μl	20ng/μl	0.2ng/μl	2ng/μl
Ct値	βactin	26.6	27.4	26.5	27.5	25.9	26.5	27.5	26.2	26.5	26.9	26.3	26.5
	Rn18s	19.7	21.8	23.2	27.2	21.6	23.6	25.8	20.8	22.2	23.5	21.3	21.8
ΔCt値	βactin	-	0.7	-0.2	0.9	-0.7	-0.1	0.9	-0.5	-0.2	0.2	-0.3	-0.1
	Rn18s	-	2.1	3.5	7.5	1.9	3.8	6.0	1.1	2.5	3.8	1.6	2.1

各核酸ポリマーを添加した条件の平均Ct値から各核酸ポリマーを添加していない条件の平均Ct値を引いたものをΔCtとした。

[0069] ｍＲＮＡであるβａｃｔｉｎにおける核酸ポリマーの有無によるＣｔ値の

差（ｍＲＮＡ由来のＤＮＡ合成量の差）に比べて、リボソーマルＲＮＡであるＲｎ１８Ｓにおける核酸ポリマーの有無によるＣｔ値の差は大きくなった。このことから、Ｒｎ１８Ｓは、他のＲＮＡに比べて、ポリイノシン酸カリウム塩やポリデオキシグアニル酸を添加することで大幅にＣｔ値が遅くなり（大きくなり）、ｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成が抑制されることが明らかになった。またポリイノシン酸カリウム塩やポリデオキシグアニル酸の添加量を増加することでｒＲＮＡのＤＮＡ合成がより一層抑制されることが確認された。ポリアデニル酸カリウム塩においても、ポリイノシン酸カリウム塩やポリデオキシグアニル酸を用いる場合に比べると多少劣るものの、Ｃｔ値が遅くなり（大きくなり）、ｒＲＮＡ由来のＤＮＡ合成が抑制された。ポリデオキシチミジル酸においては他の核酸ポリマーに比べ、Ｃｔ値の遅れは小さいが、わずかにＣｔ値が遅くなることが確認された。

よって核酸ポリマーの添加によって逆転写が通常望まれないリボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成が抑制されることが確認された。

請求の範囲

[請求項1] 鋳型ＲＮＡの逆転写によりＤＮＡを合成する方法において、イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類の核酸ポリマーを用いて、リボソーマルＲＮＡ由来のＤＮＡ合成を抑制する方法。

[請求項2] 前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリチミジル酸、ポリウリジル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸、ポリデオキシチミジル酸、ポリデオキシウリジル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも１種のホモポリマーである、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも１種のホモポリマーである、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリデオキシイノシン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも１種のホモポリマーである請求項１～３のいずれかに記載の方法。

[請求項5] 前記核酸ポリマーが、全長が３０～１００００塩基長である前記核酸ポリマーを含む、請求項１～４のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 前記逆転写が、ランダムプライマーを用いて行われる、請求項１～５のいずれかに記載の方法。

[請求項7] 前記ランダムプライマーの塩基配列が、リボソーマルＲＮＡの塩基配列と完全に相補的でない、請求項６に記載の方法。

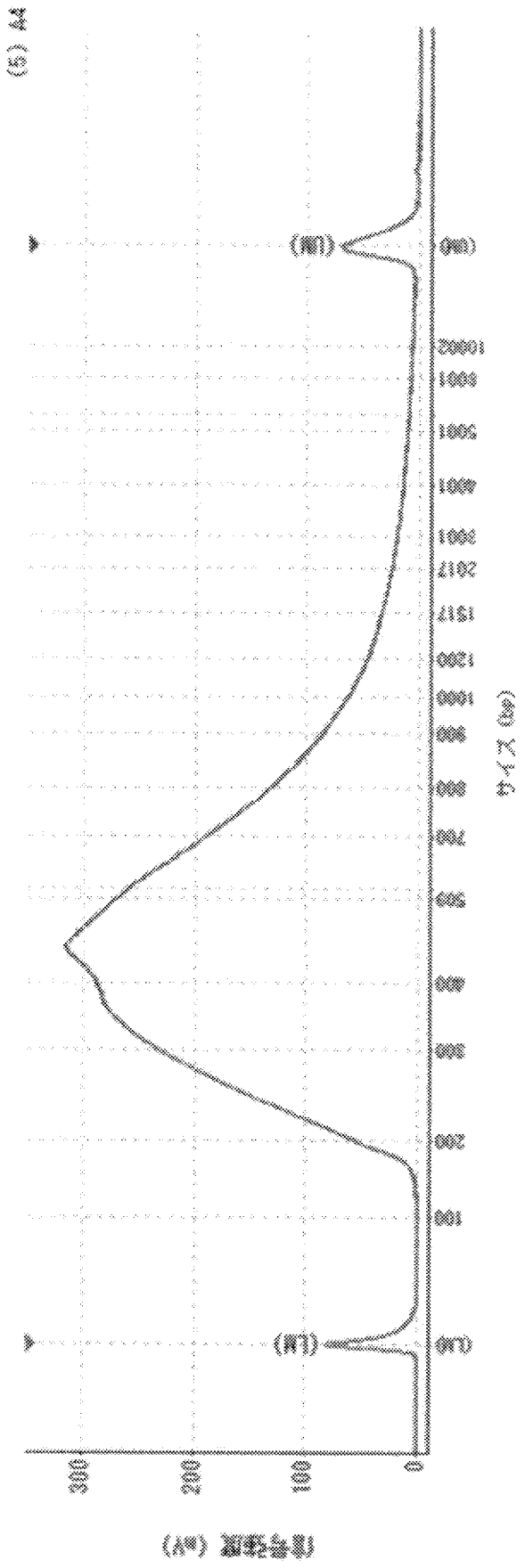
[請求項8] 前記逆転写が、ＲＴ－ＰＣＲ法又はＲＴ－ＲａｍＤＡ法において行われる、請求項１～７のいずれかに記載の方法。

[請求項9] イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類の核酸ポリマーを含有する、リボソーマルＲＮＡの逆転写を抑制するための組成物。

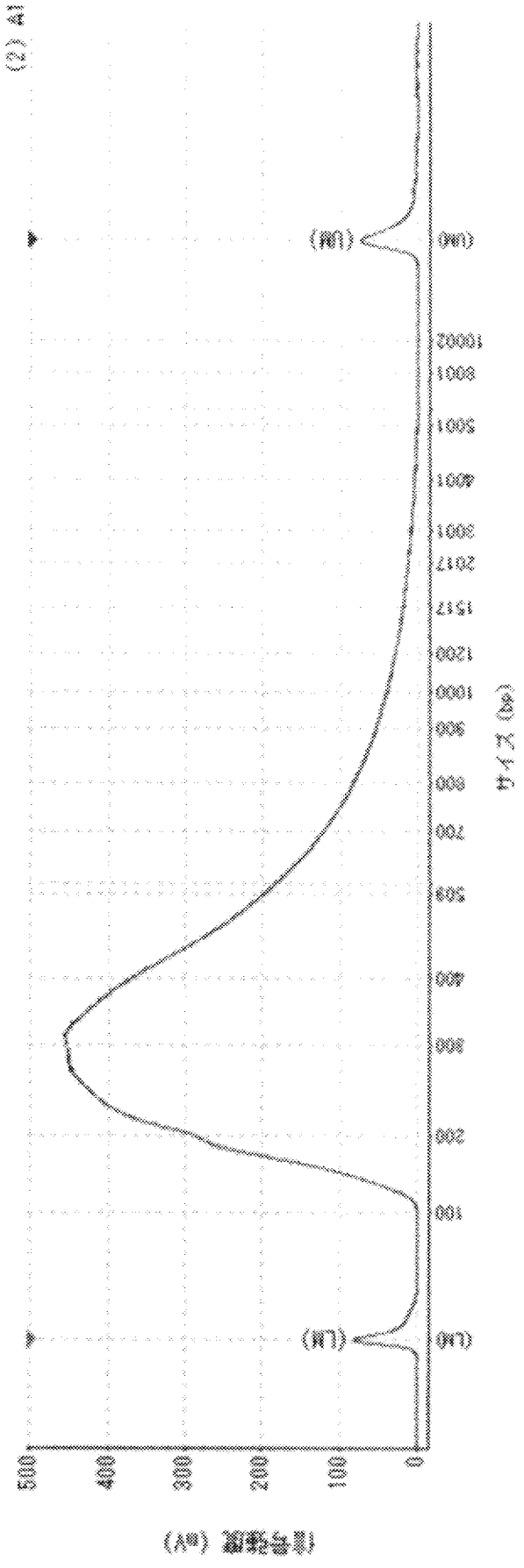
[請求項10] イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも１種類の核酸ポリマーを含有し、次世代シーケンシングに用いる逆転写反応物を調製するための逆転写反応組成物。

[請求項11] 前記逆転写が、ＲＴ－ＰＣＲ法又はＲＴ－ＲａｍＤＡ法において行われる、請求項９又は１０に記載の組成物。

[図1]



[図2]


(2) 4)
(UM)
(LM)
10002
9001
8001
7001
6001
5001
4001
3001
2017
1517
1200
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
サイズ (bp)
500
400
300
200
100
0
(蛍光強度 (a.u.))

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/010248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12Q 1/6848(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i
FI: C12Q1/6848 Z ZNA; C12Q1/6869 Z; C12N15/09 Z; C12N15/10 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)
C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/6848; C12Q1/6869

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/070604 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 04.06.2009 (2009-06-04) claims 1-15, paragraphs [0039]-[0042]	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 28 May 2020 (28.05.2020)	Date of mailing of the international search report 09 June 2020 (09.06.2020)
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
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/010248

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2009/070604 A1	04 Jun. 2009	JP 2011-504754 A claims 1-15, paragraphs [0040]-[0043] US 2009/0137008 A1 EP 2212430 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/010248

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12Q 1/6848(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i
FI: C12Q1/6848 Z ZNA; C12Q1/6869 Z; C12N15/09 Z; C12N15/10 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））

C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/6848; C12Q1/6869

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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	WO 2009/070604 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 04.06.2009 (2009-06-04) 請求項1-15, 段落39-42	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	国際調査報告の発送日
28.05.2020	09.06.2020

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）

野村　英雄 4B 4155

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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/JP2020/010248

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2009/070604 A1	04.06.2009	JP 2011-504754 A 請求項1-15，段落40-43 US 2009/0137008 A1 EP 2212430 A1	