

(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
2021年7月22日(22.07.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/145384 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2018.01) C12N 15/09 (2006.01)
A01K 61/00 (2017.01) C12Q 1/6869 (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/001076
- (22) 国際出願日: 2021年1月14日(14.01.2021)
- (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 2020-003663 2020年1月14日(14.01.2020) 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: 宮田 楓(MIYATA, Kaede); 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 本田 大士(HONDA, Hiroshi); 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 山根 雅之(YAMANE, Masayuki); 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内 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, IT, JO, 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))

(54) Title: METHOD FOR SURVEYING ECOSYSTEM IN WATER ENVIRONMENT BY USING ENVIRONMENTAL RNA

(54) 発明の名称: 環境RNAを用いた水環境の生態系の調査方法

(57) Abstract: Provided is a simple and highly accurate method for surveying an ecosystem while applying less burden on the environment. A method for analyzing biological species living in a water environment. In this method, RNA included in a water environment is analyzed to quantitatively assess and comprehensively identify the biological species living in the water environment.

(57) 要約: 簡便で、環境負荷が低く、且つ正確性の高い生態系調査方法の提供。水環境に生存する生物種の解析方法。該方法では、水環境に含まれるRNAを解析することで、該水環境に生存する生物種を定量的に評価し、さらには網羅的に特定する。



WO 2021/145384 A1

明 細 書

発明の名称：環境RNAを用いた水環境の生態系の調査方法

技術分野

[0001] 本発明は、環境RNAを用いた水環境の生態系の調査方法に関する。

背景技術

[0002] 魚類や藻類などの水産資源の保全と持続的利用に対する関心が世界的に高まっている。水産資源の保全及び管理において、水産資源の存在する水環境の生態系調査は重要な役割を果たしている。水環境の生態系調査において、魚類、藻類、及び節足動物は生態系の指標となるモデル生物として長らく使用されている。しかしながら、従来の水環境の生態系調査方法、すなわち釣り、罟などで個体を捕獲する手法や、目視やカメラ撮影等の個体観察に依存した方法は、種判定に専門知識を要し、またコストと労力、及び環境への負荷がかかるうえ、網羅性及び再現性が充分とはいえない。

[0003] 生態系調査方法として、近年、バイオモニタリング技術が着目されている。特に、水や土壌などの環境サンプル中に含まれるDNA（いわゆる、環境DNA；environmental DNA、eDNA）の解析は、生態系調査に大きなブレークスルーを起こすと期待されている。例えば水環境由来のeDNAは、多くの場合、水棲生物の個体から水環境に放出されるDNAに由来すると考えられる（特許文献1）。eDNAのメタバーコーディング解析を用いた水環境中の生態系調査が試みられている。例えば、魚類のミトコンドリアDNAをターゲットとしたeDNAメタバーコーディング解析用のユニバーサルPCRプライマーのセットが開発され、魚類の定量的モニタリングに有用であることが報告されている（非特許文献1、2）。しかしながら、eDNAは安定性が高く環境中に長く存在するため、eDNAを用いた生態系調査は偽陽性（誤検出）が生じる可能性が否定できない。特に、河川や湾については、生活排水や漁港由来の魚類等のeDNAによって汚染されている可能性があるため、メタバーコーディング解析により推定された

生物種の全てが、サンプリングした環境に存在しているとは限らない。実際、水揚げされた魚に由来する eDNA が、漁港付近の海中に多く存在して eDNA 解析に深刻な影響を与えることが示されている。

[0004] 環境中に、eDNA とともに環境 RNA (environmental RNA、eRNA) が存在することを示唆する報告がある。RNA 分子は、細胞中ではその RNA に対応する DNA よりもコピー数が多い場合があるが、一般的に分解されやすいため DNA よりも環境中に残りにくいと考えられる。そのため、eRNA は、eDNA よりも環境中の生物の現在の状態を反映している可能性が期待される一方で、環境中の生物の検出マーカーとして実用できるものであるかは明らかではなかった。最近、eRNA を用いて水環境中の生物を検出する試みが報告された (非特許文献 3~6)。それらの報告では、eRNA は eDNA と同様に、特定の魚種の検出に使用でき、またメタバーコーディング解析による生態系調査が実施できたことを報告したが、検出種の組成は eDNA と大きな違いはなく、eRNA が持つ誤検出における有用性は報告されていない。

[0005] (特許文献 1) 特開 2017-99376 号公報

(非特許文献 1) Miya et al., Royal Society Open Science, 2015, 2(7):150088, doi: 10.1098/rsos.150088

(非特許文献 2) Ushio et al., Metabarcoding and Metagenomics, 2018, 2:1-15

(非特許文献 3) 釣ら、第 66 回日本生態学会大会要旨集、2019年2月20日、<http://www.esj.ne.jp/meeting/abst/66/P1-479.html>

(非特許文献 4) 中道ら、第 66 回日本生態学会大会要旨集、2019年2月20日、<http://www.esj.ne.jp/meeting/abst/66/P1-481.html>

(非特許文献 5) 姜ら、第 66 回日本生態学会大会要旨集、2019年2月20日、<http://www.esj.ne.jp/meeting/abst/66/P2-074.html>

(非特許文献 6) 伊地知ら、第 1 回日本環境 DNA 学会東京大会要旨集、2018年9月18日、28頁P55

発明の概要

[0006] 本発明は、水環境に生存する生物種の解析方法であって、
水環境に含まれるRNAを定量的に解析して、該水環境に生存する該生物種を定量的に評価すること、
を含む、方法を提供する。

図面の簡単な説明

[0007] [図1] eDNA/eRNAメタバーコーディング解析とフィールド調査との比較。a. 魚類（2観測地点の合計）、b. 魚類（新那珂橋から観測されたもの）、c. 藻類、d. 節足動物。

[図2] eDNA/eRNAメタバーコーディング解析で検出したシーケンシングリード数とフィールド調査で検出した個体数との関係。a. 魚類eDNA、b. 藻類eDNA、c. 魚類eRNA、d. 藻類eRNA。

[図3] eDNA解析とeRNA解析との間でのシーケンシングリード数の比較。a. 魚類、b. 藻類、c. 節足動物。エラーバー=SE。

[図4] eDNA/eRNAメタバーコーディング解析の偽陽性リスク評価。a-c. 魚類のデータ：FW；淡水魚、SW；海水魚、BW；汽水魚、Unknown；未同定種。d-f. 節足動物のデータ：Aquatic；水棲節足動物、Terrestrial；陸棲節足動物。* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ 。

発明の詳細な説明

[0008] 本明細書において、「水環境」とは、海、河川、湖、池、沼、干潟、氷河、養殖場、水槽、ならびにそれらの岸辺及び底、などを含む。好ましくは飼育水でない自然環境の海、河川、湖、池、沼、干潟、氷河、ならびにそれらの岸辺及び底である。

[0009] 本明細書において、「環境DNA（eDNA）」及び「環境RNA（eRNA）」とは、それぞれ水、泥、岩肌、土壌などの環境サンプル中に含まれるDNA及びRNAをいう。

[0010] 簡便で、環境負荷が低く、且つ正確性の高い生態系調査方法が求められている。

- [0011] 本発明者は、河川についての古典的な生態系調査結果と、水環境サンプル中の eRNA / eDNA を用いたメタバーコーディング解析結果とを比較することにより、eRNA メタバーコーディング解析の有用性を明らかにした。
- [0012] 本発明は、環境 RNA を用いた水環境の生態系調査方法に関する。より詳細には、本発明は、水環境に生存する生物種の解析方法を提供する。該方法は、対象とする水環境に含まれる RNA (eRNA) を網羅的及び / 又は定量的に解析することを含む。
- [0013] 本発明の方法によれば、従来のバイオモニタリング技術を用いた生態系調査方法、例えば eDNA を用いたメタバーコーディング解析と比べて、偽陽性を低減し、より正確に水環境の生態系を調べることができる。
- [0014] 本発明の方法においては、対象とする水環境に含まれる eRNA の定量解析を行うことにより、該 eRNA が由来する生物種を定量することができる。さらには eRNA を網羅的に解析して、該水環境に生存する生物種を網羅的に特定することもできる。これにより、該水環境に生存する生物種の網羅的特定、及び / 又はその量 (例えばバイオマスもしくは個体数、又はそれらの増減) の定量評価が可能になる。本発明の方法においては、eRNA のみを測定対象としてもよいが、eRNA と eDNA の両者を解析してもよい。両者の解析結果を比較することで、偽陽性を排除したより正確な生態調査や、水環境の汚染源や汚染度の分析が可能になる。
- [0015] 水環境に含まれる eRNA 及び eDNA の調製は、常法に従って行えばよい。例えば海、河川、湖、池、沼、養殖場、水槽などの表層や深部の水を採取したり、それらの底部の泥を採取したりすることによって水環境サンプルを得た後、該水環境サンプルから RNA 又は DNA を抽出すればよい。水環境サンプルからの RNA 及び DNA の抽出は、常法に従って行うことができる。例えば、サンプルをろ過した後、ろ液に含まれる RNA 又は DNA を、フェノール / クロロホルム法、AGPC (acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform ex

t r a c t i o n) 法、又は市販のRNA又はDNA抽出試薬等を用いて抽出すればよい。抽出されたRNA及びDNAは、直ちに解析に使用してもよいが、常法に従って保存（例えば−80℃下又は−20℃下で冷凍保存）されてもよい。

[0016] 抽出された水環境サンプル由来のeRNAは、RNAの形態のまま各種解析に使用されてもよいが、DNAに変換されてもよい。好ましくは、該水環境サンプル由来のeRNAは、逆転写によりcDNAに変換されたのち、各種解析に使用される。RNAの逆転写には、一般的な逆転写酵素または逆転写試薬を使用することが出来る。市販の逆転写試薬の例としては、P r i m e S c r i p t (登録商標) R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e シリーズ(タカラバイオ社)、S u p e r S c r i p t (登録商標) R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e シリーズ(Thermo Scientific社)等が挙げられる。

[0017] 抽出されたeRNAには、RNAの網羅解析に使用することができる各種方法を応用することができる。該網羅解析により、抽出されたeRNAがどの生物種に由来するものかを調べて、水環境に生存している生物種を特定する。RNAの網羅解析法としては、RNA次世代シーケンシング、RNAメタバーコーディング、などが挙げられる。このうち、RNAメタバーコーディングが好ましい。RNAメタバーコーディングは、サンプルRNAから調製したcDNAから、例えば12S rRNA、16S rRNAなどの種の判定に有用なマーカーRNAに由来するcDNAを選択的に増幅してライブラリを作製し、該ライブラリをシーケンシングし、決定された配列を各生物種の該マーカーRNAをコードするゲノム配列と照合させる方法である。種の判定に有用な領域の選択的な増幅は、魚類、節足動物、藻類等のために構築されたユニバーサルプライマー、例えば、魚類のユニバーサルプライマーであるM i F i s h (非特許文献1)、節足動物のユニバーサルプライマーであるg l n s e c t (株式会社生物技研)、光合成生物プライマー(p s b A) (株式会社生物技研)など、を用いたPCRによって行うことがで

きる。シーケンシング結果と照合させる生物種のゲノムの配列はBLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]) などのツールを用いて取得することができる。

[0018] 抽出されたeRNAの定量解析は、上記網羅解析で特定された該eRNAが由来する生物種のうちの一部に対して行うこともできるが、該特定された生物種に対して網羅的に行う、すなわち網羅的定量解析であることが好ましい。該定量解析により、上記網羅解析で特定された各生物種由来eRNAの量を調べ、水環境に生存している生物種を定量する。定量解析は、例えば、上述の次世代シーケンシングやRNAメタバーコーディングにおけるシーケンシングで得られたシーケンスリードの数を基準にして行うことができる。リード数の多さ、及びリードの種類豊富さは、サンプルに存在したeRNA種、つまりそれが由来する水環境に生存する生物種の量の多さ、及び該生物種の種数の豊富さを反映する。さらに、所定の生物種に由来するeRNAの定量値（例えばシーケンスリード数）と、実際のフィールド調査で観測された該生物種の個体数との相関関係を予め算出しておくことによって、eRNA量から該生物種の個体数を推定することも可能である。

[0019] 以上の手順で、本発明では、水環境に含まれるeRNAを用いて、採水ポイントに生存する生物種を特定し、及び／又は定量する。eRNAはeDNAより安定性が低く環境への残存が少ないため、eRNAの解析は、eDNAの解析と比べて、水環境に生存する生物種の正確な特定及び／又は定量を可能にする。これに対しeDNAは、採水ポイントに生存する生物種に加えて、外環境から混入する汚染源（例えば生活排水に含まれる食品ゴミや、漁港に水揚げされる魚類等）に含まれるDNAに由来する生物種をも検出する（後述の実施例参照）。eDNA分析の偽陽性を効率的に見極められる方法や、eDNAが含まれる汚染源を推定可能な方法は報告されていない。つまり、採水ポイントに生存する生物種のみを解析可能な指標はeRNAのみである。eRNAのメタバーコーディング解析による網羅的な生物種の特定は、eDNAを用いた場合と比べて、外環境からの汚染（例えば人間の生活排

水に含まれる食品ゴミに含まれる魚類等のDNAや、漁港由来の魚類等のDNAによる汚染)の影響を受けにくく、偽陽性が少ない(後述の実施例参照)。したがって、生物種のマーカーとしてeRNAを用いることで、より正確性の高い生態系調査(生存する生物種の特定や定量など)が可能になる。

[0020] 本発明によるeRNAの解析は、同じ水環境に含まれるeDNAの解析と組み合わせて行われてもよい。本発明においてeRNAとともにeDNAも解析する場合、該eDNAの網羅解析及び定量には、上述したRNAの網羅解析及び定量と同様の手法、例えば次世代シーケンシング、DNAメタバーコーディングなどを行うことができる。このうち、DNAメタバーコーディングが好ましい。DNAメタバーコーディングは、サンプルから抽出したDNAを用いる以外は、RNAメタバーコーディングと同様の手順で行うことができる。該eRNAとeDNAの解析結果を比較することで、水環境の生態調査に有用な情報を得ることができる。例えば、eDNA解析で特定された生物種のうち、eRNA解析によって特定されないものは、採水したポイントに生存しない生物種として特定できる。また、水環境に混入した古い死骸由来のDNAや新鮮な死骸からの大量のRNAの放出等に起因して、採水したポイントに生存しない生物種ではeDNA量とeRNA量の間に関係が生じる。したがって、後述の実施例に示すとおり、所定の生物種についてのeRNAの定量値とeDNAの定量値との比(eRNA比:eDNA比は、例えば式(1):
$$\frac{[\text{eRNA又はeDNAのリード数(いずれか少ないほう)}]}{[\text{eRNA又はeDNAのリード数(いずれか多いほう)}]}$$
と表すことができるが、これに限定されるものではない。)は、偽陽性を評価する指標として好ましい。例えば、対象の水環境に生存する生物種についての式(1)に従うeRNA比は、該水環境に生存しない生物種についてのeRNA比よりも高値になるため、eRNA比を基準に、該生物種が誤検出による偽陽性であるか否かを評価することができる。この評価を、特定された生物種群に対して網羅的に行うことで、特定した生物種群からの偽陽性の生物種の検出と排除を行うことができる。また後述の実施例に示すとおり、水環境に混入した陸

棲節足動物での eRNA 比の著しい減少は、eRNA 量 < eDNA 量の場合だけでなく eDNA 量 < eRNA 量の場合もある。そのため、eRNA 解析のみより、eDNA 解析と eRNA 解析の併用の方が、水環境に生存する生物種のより正確な特定及び／又は定量が可能である。したがって、eDNA 解析と eRNA 解析の併用は、偽陽性の少ない生態調査、又は外環境由来の生物ゴミ（例えば生活排水や漁港からの廃棄物に含まれる生物ゴミ）による水環境の汚染の評価、例えば水環境の汚染源や汚染度の分析に寄与し得る。

[0021] 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。

[0022] [1] 水環境に生存する生物種の解析方法であって、

水環境に含まれる RNA を定量的に解析して、該水環境に生存する該生物種を定量的に評価すること、
を含む、方法。

[2] 好ましくは、前記水環境に含まれる RNA を網羅的に解析して、該水環境に生存する生物種を網羅的に特定することをさらに含む、[1]記載の方法。

[3] 前記生物が、

好ましくは魚類、藻類及び節足動物を含み、

より好ましくは魚類である、

[1] 又は [2] 記載の方法。

[4] 好ましくは、前記 RNA の解析が該 RNA のメタバーコーディングによって行われる、[1] ~ [3] のいずれか 1 項記載の方法。

[5] 好ましくは、前記 RNA の定量解析が前記メタバーコーディングで得られたシーケンスリード数に基づいて行われる、[4] 記載の方法。

[6] 好ましくは、前記水環境に含まれる DNA を網羅的及び／又は定量的に解析することをさらに含む、[1] ~ [5] のいずれか 1 項記載の方法。

[7] 好ましくは、前記 DNA の解析が該 DNA のメタバーコーディングに

よって行われる、〔6〕記載の方法。

〔8〕好ましくは、前記DNAの定量解析が前記メタバーコーディングで得られたシーケンスリード数に基づいて行われる、〔7〕記載の方法。

〔9〕好ましくは、前記RNAの解析結果と前記DNAの解析結果とを比較することで、前記水環境に生存する生物種を網羅的に特定することを含む、〔6〕～〔8〕のいずれか1項記載の方法。

〔10〕好ましくは前記生物種の網羅的特定が偽陽性の生物種の識別を含む、〔9〕記載の方法。

〔11〕好ましくは、前記RNAの解析結果と前記DNAの解析結果とを比較することで、前記水環境に生存する生物種を定量的に評価することを含む、〔6〕～〔10〕のいずれか1項記載の方法。

〔12〕好ましくは、生物種についてのRNAの定量値とDNAの定量値との比を基準に偽陽性の生物種を識別する、〔10〕記載の方法。

〔13〕好ましくは、前記生物種についてのRNAの定量値とDNAの定量値との比が、下記eNA比として表される、〔11〕記載の方法。

eNA比＝〔該生物種のRNA又はDNAについてのシーケンスリード数（いずれか少ないほう）〕／〔該生物種のRNA又はDNAについてのシーケンスリード数（いずれか多いほう）〕

〔14〕前記水環境が、

好ましくは、海、河川、湖、池、沼、干潟、氷河、養殖場、水槽、ならびにそれらの岸辺及び底を含み、

より好ましくは、飼育水でない自然環境の海、河川、湖、池、沼、干潟、氷河、ならびにそれらの岸辺及び底を含む、

〔1〕～〔13〕のいずれか1項記載の方法。

実施例

[0023] 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。

[0024] 実施例1 水環境サンプル由来eDNA及びeRNAのメタバーコーディン

グ

1) eDNA及びeRNAの調製

試験に供した水環境サンプルは、2018年7月から2019年2月にかけて、日本の那珂川の中流域にある那珂川大橋（N36°32'55"、E140°19'34"）、及び新那珂橋（N36°45'26"、E140°08'30"）の2地点から採取した。河川の表層からバケツを用いて1.5Lの水を採取した。水サンプルは、直ちにSterivex™フィルターユニット（ポアサイズ0.45μm：ミリポア）を用いて濾過した。

[0025] 水サンプルからeDNA及びeRNAを抽出した。eDNAは、DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、但しキットのBuffer AL (RNaseA, Proteinase K添加) に15%ポリビニルピロドン (PVPP) 溶液を最終濃度2.5%になるように添加して、抽出した。抽出後のeDNAは、MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Biomedicals)、及びAMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製した。eRNAは、ChargeSwitch Total RNA Cell Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、推奨プロトコールに従って抽出した。該eRNAを鋳型とし、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio Inc.) を用いて推奨プロトコールに従ってcDNAを合成した。コントロールとして脱イオン水を用いて同様にeDNA及びeRNAの抽出とcDNA合成を行い、eDNA/eRNA抽出、及びcDNA合成中のクロスコンタミネーションの有無を確認した。

[0026] 2) アンプリコンライブラリの作成

12S rRNA遺伝子、16S rRNA遺伝子及びpsbA遺伝子の各部分長のアンプリコンライブラリは、魚類のプライマーであるMiFish-U及びMiFish-E33（非特許文献1）、ならびにgInsec

t 及び p s b A (株式会社生物技研) を用いて作製した。アンプリコンライブラリは、two step tailed PCR法により作成した。first PCRでは、テンプレートとして、eDNAについては1) で調製したeDNA溶液のDDWによる3倍希釈液を、cDNAについては1) で調製したcDNA溶液を用いた。各プライマーは0.5 μ Mに設定した。PCRでは、MiFish-U、MiFish-E33及びgInsectプライマーでは、95°Cで3分の後、98°Cで20秒、65°Cで15秒、52°Cで30秒からなるサイクルを35サイクル行い、次いで72°Cで5分最終伸長した。psbAプライマーでは、94°Cで2分の後、94°Cで30秒、52°Cで30秒、72°Cで30秒からなるサイクルを30サイクル行い、次いで72°Cで5分最終伸長した。first PCRは、各eDNA及びcDNA試料に対して4回行い、得られた4回分のPCR産物を1つにまとめてsecond PCRに供した。second PCRでは、MiSeqアダプタ配列及び8bpインデックス配列を含む0.5 μ Mプライマーペアを用いて、該アダプタ配列及びインデックス配列をアンプリコンの両末端に連結させた。second PCRのサイクルとしては、94°Cを2分の後、94°Cを30秒、60°Cを30秒、72°Cを30秒からなるサイクルを10~12サイクル行い、次いで72°Cで5分最終伸長した。得られた増幅産物をアンプリコンライブラリとした。

[0027] 3) MiSeqシーケンシング、アセンブリ、及びBLAST検索

得られたアンプリコンライブラリをIllumina MiSeq Reagent Kit v3 (600Cycle) for 2x300bp PE (Illumina) に供し、シーケンシングを行った。FASTX-Toolkit ([hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/])、ハノン研究所、ケンブリッジ大学) を使用して、シーケンシングで得られた各リードのプライマー配列の末端から40bpを削除した。QS20以下のリードは削除した。アセンブル後の断片長180bp、リードの断片長170bp、最低オーバーラップ長10bpでアセンブリ

ングを行った。上記条件を満たさないリードは破棄した。同一の塩基配列と判断される、すなわち97%以上の同一性を有するリードはUSEARCHを使用してアセンブリングし、BLAST検索を行った。

[0028] 実施例2 生態系調査の生物相評価におけるメタバーコーディングの性能評価

1) フィールド調査

藻類及び節足動物のフィールド調査 (Traditional Field survey; TFS) を実施した。節足動物のTFSは、水環境サンプルと同じ調査地点/季節に、「河川環境の国勢調査マニュアル」第27版 (国土交通省水管理・国土保全局河川環境課) に記載の方法に従って行った。サンプルは、網を用いた定性サンプリング及び $25\text{ cm}^2 \times 25\text{ cm}^2$ (一区画 $250\text{ }\mu\text{ m}$ 四方) のコドラートを用いた定量サンプリングで採取した。コドラートを用いた場合、各調査地点/季節において3点でサンプリングを行った。藻類のTFSは、岩着生藻類に注目した。すなわち、水環境サンプルと同じ各調査地点/季節でそれぞれ3個の石を採取し、各石の $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ から藻類を削り取った。魚類に関しては、国主導による生態調査以外の侵襲性の高い調査が禁止されているため、国土交通省による河川水辺の国勢調査に基づく河川環境データベースにおける那珂川のデータを使用した。

[0029] 2) eDNA/eRNAメタバーコーディング解析の性能評価

eDNA/eRNAメタバーコーディング解析の妥当性評価のために、魚類、藻類及び節足動物について、eDNA又はeRNAから同定した生物種数と、フィールド調査 (TFS) から同定した生物種数とを比較した。TFSにより決定した生息生物種の一群を真陽性群として定義し、以下の式に基づいてメタバーコーディングの感度 (Sensitivity) と陽性予測率 (Positive Predictivity) を計算した。

感度 (%) = { (eDNA又はeRNAメタバーコーディングで検出された真陽性群に属する生物種の数) / (真陽性群に属する生物種の総数) } × 100

陽性予測率 (%) = { (eDNA又はeRNAメタバーコーディングで検

出された真陽性群に属する生物種の数) / (eDNA又はeRNAメタバーコーディングで検出された生物種の総数) } × 100

[0030] 図1は、魚類、藻類及び節足動物についての、eDNA/eRNAメタバーコーディング解析及びTFSで検出された種を示すベン図、ならびに該eDNA/eRNA解析の感度及び陽性予測率を示すグラフである。

[0031] 魚類について、eDNA及びeRNA解析ではそれぞれ77種及び51種が検出され、それらにはTFSで検出された37種のうち20種と22種がそれぞれ含まれていた。eDNA及びeRNA解析の検出種は46種が共通した。eRNA解析の感度(59%)は、eDNA解析の感度(54%)よりわずかに高く、eRNA解析の陽性予測率(43%)は、eDNA解析の陽性予測率(26%)よりもはるかに高かった(図1a)。観測点を新那珂橋に限った場合(図1b)、eRNA解析はTFSでの検出魚類種を全て検出したが、eDNA解析は1つの種を見落としていた。この観測点での魚類種検出についてのeRNA解析の感度と陽性予測率はそれぞれ100%と20%であり、これは偽陰性が排除されたが、偽陽性やeRNA解析の検出種がTFSで検出されなかった真陽性を含む可能性があることを示す。

[0032] 藻類について、eDNA及びeRNA解析ではそれぞれ80種及び82種が検出され、それらにはTFSでの検出種数(84種)に相当した。しかし、TFSと共通して検出された種は12種のみであった。逆に、eDNA及びeRNA解析で検出された種のほぼ全て(78種)が、両解析に共通しており、eDNA及びeRNA解析の感度及び陽性予測率は類似していた(感度:14%、陽性予測率:15%)(図1c)。eDNA/eRNA解析とTFSでの結果の不一致の原因として、TFSは川の石に付着した藻類に焦点を当てたのに対し、eDNA及びeRNAは表面水から採取されたことが考えられた。

[0033] 節足動物について、eDNA及びeRNA解析ではそれぞれ44種と23種が検出され、TFSでは147種が検出された。eDNA及びeRNA解析間では21種が共通したが、eDNA及びeRNA解析とTFSに共通す

る種は3種のみであった。eDNA及びeRNA解析の感度は2%で同等であった。eRNAの陽性予測率(13%)はeDNAのそれ(7%)よりも高かった(図1d)。

[0034] 以上の結果より、水環境中にはeDNAと同様に、メタバーコーディング解析に十分な量のeRNAが存在していることが示された。藻類や節足動物の検出の感度と陽性予測率は魚類に比べて低いが、これは、藻類や節足動物に含まれる未知のゲノム配列に起因している可能性がある。藻類や水棲節足動物のゲノム配列は魚類に比べて十分に決定されておらず、また形態学的な差異では検出しづらい隠蔽種が存在する可能性もあるからである。藻類と節足動物のゲノムのさらなる解明が望まれる。

[0035] 実施例3 生態系調査におけるメタバーコーディングの性能評価

1) バイオマス量推定

eDNA/eRNA解析のバイオマスの定量評価方法としての特性を評価した。図2は、TFSで検出した各生物種の個体数(バイオマス量に依存)を、eDNA/eRNAメタバーコーディング解析で算出したシーケンシングリード数に対してプロットした散布図である。図2a、bはeDNAに対するプロットであり、図2c、dはeRNAに対するプロットである。同時期に実施した2つの観測点におけるeDNA及びeRNAメタバーコーディング解析でのシーケンシング総読み取り(リード)数の平均値を算出し、それぞれeDNA及びeRNA解析によるリード数とした。なおプロットの際には、eDNAとeRNAの両方でリード長が<10bpであった種を除外し、さらに対数スケールで描画するため全てのリード数に1を加えた。

[0036] 魚類及び藻類について、eDNA及びeRNA解析によるシーケンシングリード数は、いずれもTFSでの個体数(バイオマス量)と相関していた(魚類:eDNAとeRNAそれぞれについて、F検定: $p=2.95E^{-12}$ 及び $p=1.53E^{-12}$;スピアマンの相関係数: $\epsilon=0.49$, $p=0.03$ 及び $f=0.47$, $p=0.04$ 、及び藻類:eDNAとeRNAそれぞれについて、F検定: $p=2.91E^{-14}$ 及び $p=2.08E^{-20}$;スピアマン相関係数

: $f = 0.25$, $p = 0.55$ 及び $f = 0.26$, $p = 0.53$)。eDNAとeRNAとの相関強度は等しかった。従って、既にTFSで検出されていた魚類及び藻類においては、eRNA及びeDNAの両方が水環境に存在するバイオマスの評価指標として使用できる可能性が示された。一方、eDNAは、後述のとおり偽陽性リスクが高く、採水ポイントに生存していない生物種に対しても定量値を算出することが多かった。結果、TFSで検出されていない生物種を含めてシーケンシングリード数と個体数（バイオマス量）の相関性を解析した場合においては、eRNAの方がeDNAと比較して相関性が高くなった。したがって、フィールド調査に代わる生態系における生物種の定量評価の手法としては、eRNA解析の方がeDNA解析よりも優れていると考えられた。

[0037] 2) 偽陽性リスク評価

図3は、魚類、藻類及び節足動物について、eDNA解析とeRNA解析との間でシーケンシングリード数をプロットした散布図である。魚類、藻類及び節足動物のeRNA解析でのリード数はeDNA解析でのリード数と類似しており、正の相関が認められた。

[0038] eDNA解析とeRNA解析についての偽陽性のリスク（検出率等）を評価した。本メタバーコーディングのサンプルは河川中流から採取されたため、海水魚及び汽水魚の検出は偽陽性とみなすことができ、また陸棲節足動物の検出も偽陽性の可能性がある。本評価では、海水及び汽水魚と陸棲節足動物を偽陽性と定義し、eDNA及びeRNA解析の偽陽性リスクを調べた。さらに、eRNAとeDNAとの間のリード数の比から以下の式によりeNA比を求め、その偽陽性リスクを調べた。

$$\text{eNA比} = \left[\text{eRNA又はeDNAのリード数（いずれか少ないほう）} \right] / \left[\text{eRNA又はeDNAのリード数（いずれか多いほう）} \right]$$

さらに、eDNA解析、eRNA解析、及びeNA比の感度と特異度を以下の式に従って求め、ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線を作成し、偽陽性を排除できる

指標としての有効性を調べた。

感度 (%) = { (閾値としてのリード数を変化させていったときの eDNA 又は eRNA メタバーコーディングで検出された淡水魚又は水棲節足動物に属する生物種の数) / (eDNA 又は eRNA メタバーコーディングで検出された淡水魚又は水棲節足動物に属する生物種の数) } × 100

特異度 (%) = { (閾値としてのリード数を変化させていったときの eDNA 又は eRNA メタバーコーディングで検出された海水及び汽水魚、又は陸棲節足動物に属する生物種の数) / (eDNA 又は eRNA メタバーコーディングで検出された海水及び汽水魚、又は陸棲節足動物に属する生物種の数) } × 100

[0039] 図4 aは、淡水魚 (FW)、海水魚 (SW)、汽水魚 (BW)、及び未同定種 (Unknown) の魚類について eDNA 解析と eRNA 解析との間でシーケンシングリード数をプロットした散布図を、図4 bは、淡水魚 (FW)、及び海水魚 (SW) + 汽水魚 (BW) についての eDNA リード数、eRNA リード数及び eNA 比の箱ひげ図を、図4 cは ROC 曲線を示す。eDNA 解析では同定された一方、eRNA 解析ではリード数の検出がほとんど認められなかった36種のうち29種は、採取を行った水環境 (河川中流) には本来存在しないと考えられる海水魚 (SW) 又は汽水魚 (BW) であった。この結果から、eDNA 解析は、水環境に生存しない生物種を偽陽性として検出してしまうこと、そのため水環境に生存する生物種の正確な評価方法としては不適であることが示された。また、サンプリングを行った水環境に生存している淡水魚 (FW) の eRNA リード数及び eNA 比は、サンプリングを行った水環境には生存しない海水/汽水魚類 (SW+BW) の eNA 比よりも統計学的に有意に高い、明確に異なる分布を示した (図4 b、*p < 0.05, **p < 0.001; F 検定より非等分散であったため、スピアマンの相関検定、及びウィルコクソンの順位符号付順位和検定を行った)。ROC 分析により、eRNA 及び eNA 比が偽陽性を排除できる指標として有効性が高いことが示された一方、eDNA には偽陽性排除における有効性は認

められなかった ($eRNA : AUC = 0.88$ 、 eNA 比 : $AUC = 0.87$ 、 $eDNA : AUC = 0.59$ 、図4 b、c)。

[0040] 図4 d-fは、水棲節足動物 (Aquatic) と陸棲節足動物 (Terrestrial) について図4 a-cと同様の解析を行った結果を示している。節足動物においても同様に、 $eRNA$ 及び eNA 比が偽陽性、すなわち陸棲節足動物の誤検出を排除できる指標として有効性が高いことが示された ($eRNA : AUC = 0.68$ 、 eNA 比 : $AUC = 0.77$ 、図4 e、f)。

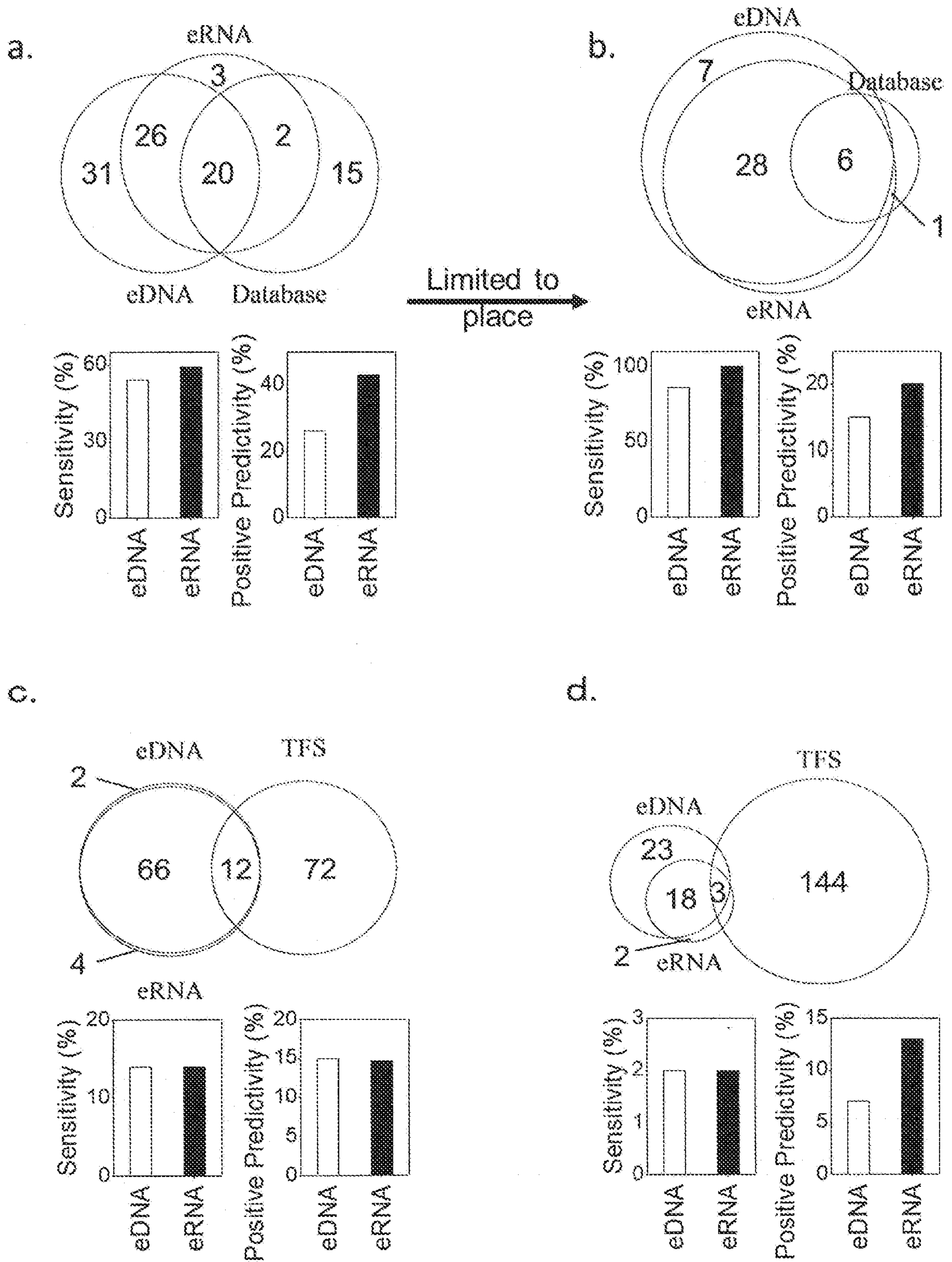
[0041] 海水／汽水魚類の eNA 比の著しい減少は、主に $eRNA$ 量 $<$ $eDNA$ 量に由来している。これは、水環境中に生存しない生物の $eDNA$ が水環境に蓄積されているが、それら生物の $eRNA$ は水環境に蓄積されることが無く分解されることにより、 $eDNA$ と $eRNA$ の存在比が異なっていることが原因と考えられた。また、河川水に混入される可能性がある魚類の核酸を含む生活排水中では、 $eDNA$ のみが残存し、既に $eRNA$ は分解されている可能性がある。一方、陸棲節足動物の eNA 比の著しい減少は、 $eRNA$ 量 $<$ $eDNA$ 量の場合と、 $eDNA$ 量 $<$ $eRNA$ 量の2つの場合があった。前者は、河川近傍で死亡した $eRNA$ の分解が進んだ個体から、 $eDNA$ をより多く含む核酸が河川水に溶出していることに起因する可能性があり、後者は、死んで間もない DNA よりも RNA 存在量が多い個体の核酸が河川水に流出した後、流動性の少ない環境で $eRNA$ の濃度が維持されていることに起因する可能性がある。いずれにせよ、外環境からの汚染源にみられる $eDNA$ と $eRNA$ の量比の変動は、 eNA 比の著しい減少として観測できるため、 eNA 比が顕著に低い生物種は水環境に生存する生物種ではない可能性が考えられる。また、定量的な評価においても、前述の通り $eDNA$ の解析では偽陽性となる生物種に対しても一定の定量値が算出されてしまうため、 $eRNA$ を用いる又は $eDNA$ と $eRNA$ を併用する評価方法が有効であると考えられた。以上の結果より、水環境に生存する魚類や節足動物の生物種を、該水環境中に生存しない種を誤検出せずに網羅的特定や定量するための

指標として、eRNA及びeNA比が有効であることが示された。

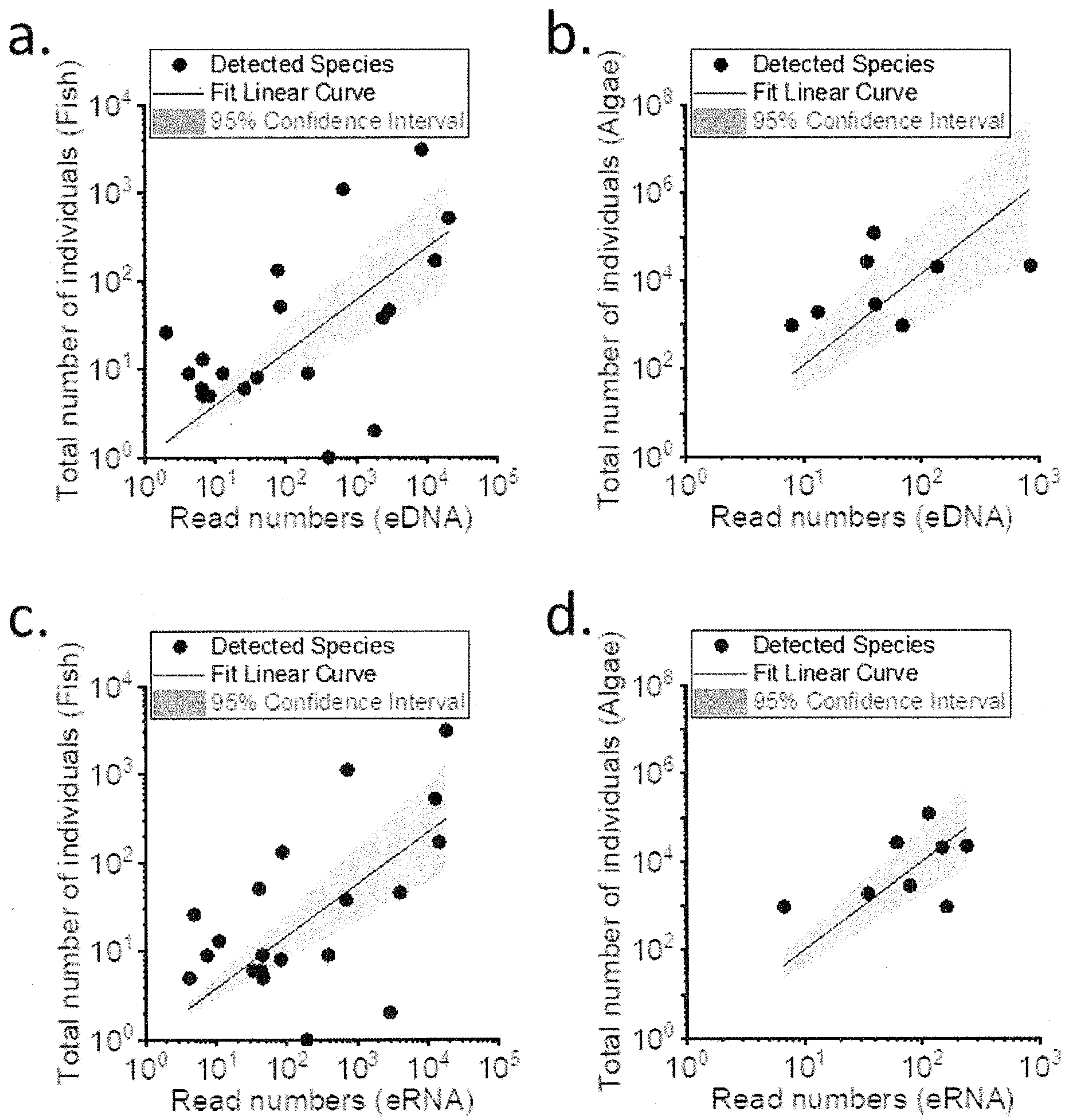
請求の範囲

- [請求項1] 水環境に生存する生物種の解析方法であって、
水環境に含まれるRNAを定量的に解析して、該水環境に生存する該生物種を定量的に評価すること、
を含む、方法。
- [請求項2] 前記水環境に含まれるRNAを網羅的に解析して、該水環境に生存する生物種を網羅的に特定することをさらに含む、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記生物が魚類、藻類及び節足動物を含む、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 前記生物が魚類である、請求項3記載の方法。
- [請求項5] 前記RNAの解析が該RNAのメタバーコーディングによって行われる、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
- [請求項6] 前記水環境に含まれるDNAを網羅的及び／又は定量的に解析することをさらに含む、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。
- [請求項7] 前記RNAの解析結果と前記DNAの解析結果とを比較することで、前記水環境に生存する生物種を網羅的に特定することを含む、請求項6記載の方法。
- [請求項8] 前記生物種の網羅的特定が偽陽性の生物種の識別を含む、請求項7記載の方法。

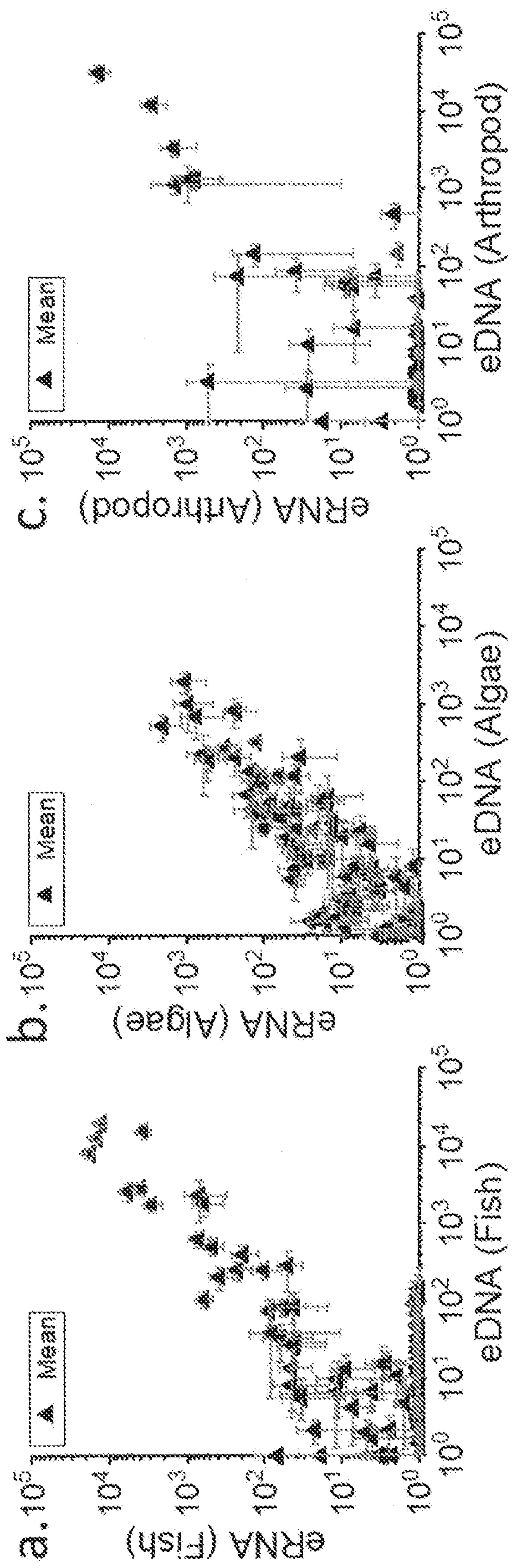
[図1]



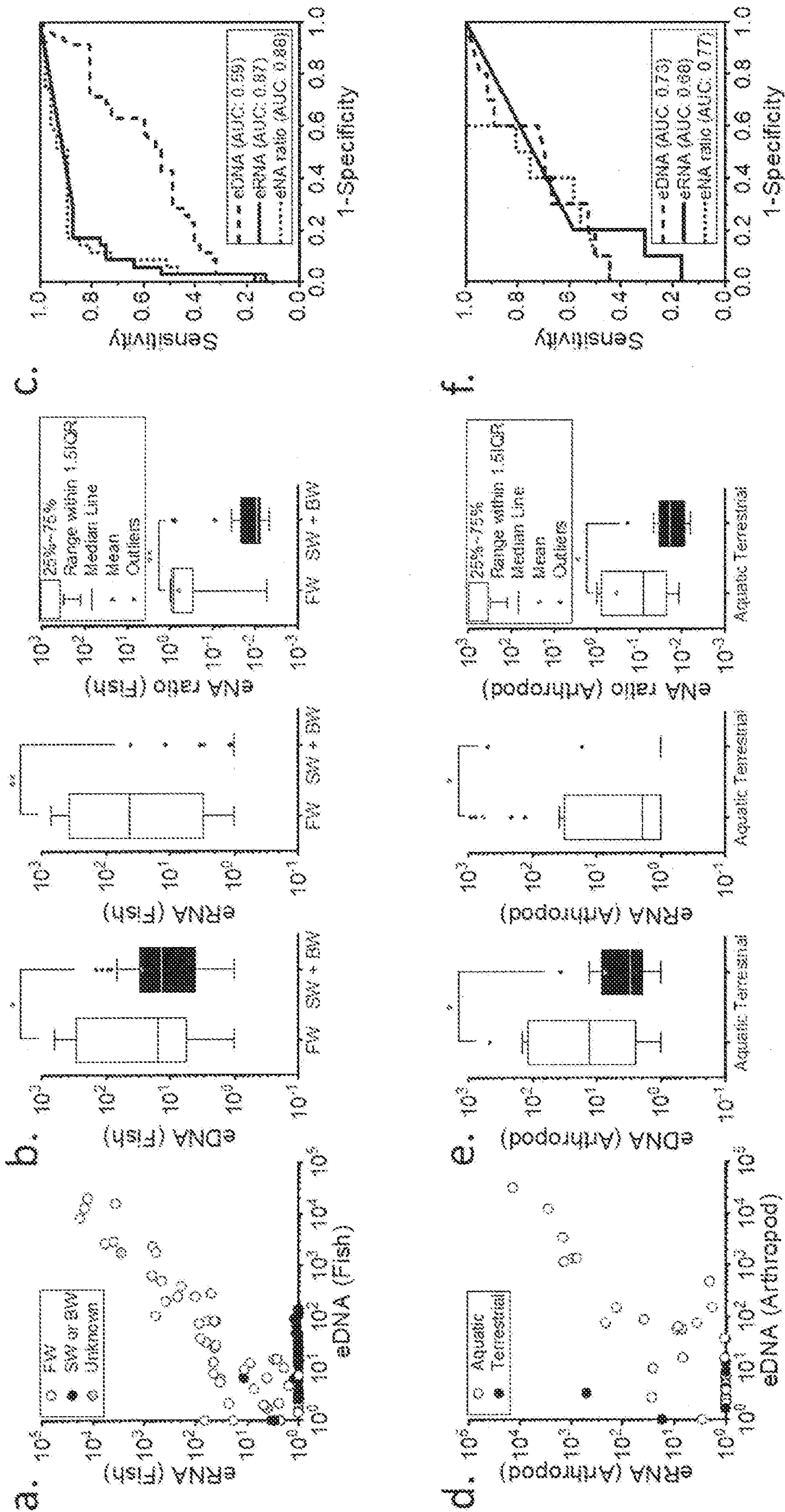
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/001076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2018.01)i; A01K 61/00(2017.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i
 FI: C12Q1/68; A01K61/00; C12Q1/6869 Z; C12N15/09 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)
 C12Q1/68; A01K61/00; C12N15/09; 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	1971-2021
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); CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	中道友規 ほか, 環境 RNA と環境 DNA による魚類の検出感度の比較とその時間変化, 日本生態学会第 66 回全国大会講演要旨, 一般講演 ポスター発表, 2019, P1-481, entire text, (NAKAMICHI, Tomoki et al., "Comparison of the sensitivities of environmental DNA and RNA as markers for species detection from water samples and their time dependencies", Lecture abstracts of the 66th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan, General lecture poster presentation)	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 16 March 2021 (16.03.2021)	Date of mailing of the international search report 30 March 2021 (30.03.2021)
---	--

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/JP2021/001076

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	姜明揚 ほか, 野外におけるコイの環境 RNA の検出, 日本生態学会第 66 回全国大会講演要旨, 一般講演 ポスター発表, 2019, P2-074, entire text, non-official translation (JIANG, Ming-Yang et al., "Detection of environmental RNA of cyprinus carpio in the field", Lecture abstracts of the 66th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan, General lecture poster presentation)	1-8
A	USHIO, M. et al., "Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing", Metabarcoding and Metagenomics, 2018, 2: e23297, abstract	1-8
A	MIYA, M. et al., "MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species", R. Soc. Open Sci., 2015, 2: 150088, abstract	1-8

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>C12Q 1/68(2018.01)i; A01K 61/00(2017.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i FI: C12Q1/68; A01K61/00; C12Q1/6869 Z; C12N15/09 Z</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) C12Q1/68; A01K61/00; C12N15/09; C12Q1/6869</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table> <p>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); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>中道友規 ほか, 環境RNAと環境DNAによる魚類の検出感度の比較とその時間変化, 日本生態学会第66回全国大会講演要旨, 一般講演 ポスター発表, 2019, P1-481 全文</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>姜明揚 ほか, 野外におけるコイの環境RNAの検出, 日本生態学会第66回全国大会講演要旨, 一般講演 ポスター発表, 2019, P2-074 全文</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>USHIO M. et al., Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing, Metabarcoding and Metagenomics, 2018, 2: e23297 要約</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>MIYA M. et al., MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species, R. Soc. Open Sci., 2015, 2: 150088 要約</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	中道友規 ほか, 環境RNAと環境DNAによる魚類の検出感度の比較とその時間変化, 日本生態学会第66回全国大会講演要旨, 一般講演 ポスター発表, 2019, P1-481 全文	1-8	A	姜明揚 ほか, 野外におけるコイの環境RNAの検出, 日本生態学会第66回全国大会講演要旨, 一般講演 ポスター発表, 2019, P2-074 全文	1-8	A	USHIO M. et al., Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing, Metabarcoding and Metagenomics, 2018, 2: e23297 要約	1-8	A	MIYA M. et al., MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species, R. Soc. Open Sci., 2015, 2: 150088 要約	1-8
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	中道友規 ほか, 環境RNAと環境DNAによる魚類の検出感度の比較とその時間変化, 日本生態学会第66回全国大会講演要旨, 一般講演 ポスター発表, 2019, P1-481 全文	1-8															
A	姜明揚 ほか, 野外におけるコイの環境RNAの検出, 日本生態学会第66回全国大会講演要旨, 一般講演 ポスター発表, 2019, P2-074 全文	1-8															
A	USHIO M. et al., Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing, Metabarcoding and Metagenomics, 2018, 2: e23297 要約	1-8															
A	MIYA M. et al., MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species, R. Soc. Open Sci., 2015, 2: 150088 要約	1-8															
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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)</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>16.03.2021</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>30.03.2021</p>															
<p>名称及びあて先</p> <p>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</p>		<p>権限のある職員 (特許庁審査官)</p> <p>市島 洋介 4B 5804</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>															