(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年8月4日(04.08.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/163507 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/686 (2018.01) *C12N 15/50* (2006.01)
C08F 130/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/002103

(22) 国際出願日： 2022年1月21日(21.01.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-012402 2021年1月28日(28.01.2021) JP

(71) 出願人: 日油株式会社 **(NOF CORPORATION)** [JP/JP]; 〒1506019 東京都渋谷区恵比寿四丁目２０番３号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 近藤 聖奈 **(KONDO, Seina)**; 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町３－３ 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 鈴木 裕貴 **(SUZUKI, Hirotaka)**; 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町３－３ 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 松田 将 **(MATSUDA, Masaru)**; 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町３－３ 日油株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 高島 一 **(TAKASHIMA, Hajime)**; 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** COMPOSITION FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION

(54) 発明の名称： 核酸増幅用の組成物

(57) **Abstract:** The present invention provides a composition for nucleic acid amplification which contains a polymer which contains a constituent unit derived from 2-(meth)acryloyloxyethyl phosphorylcholine.

(57) 要約：本発明は、２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位を含む重合体を含む核酸増幅用の組成物を提供する。

WO 2022/163507 A1

明　細　書

発明の名称 ： 核酸増幅用の組成物

技術分野

[0001]　本発明は、核酸増幅用の組成物に関する。

背景技術

[0002]　核酸増幅法は、目的遺伝子を増幅する方法であり、分子生物分野の研究や、臨床診断分野、科学捜査等に利用されている技術である。目的遺伝子を増幅するための核酸増幅法として、ＰＣＲ（Polymerase Chain Reaction）法が知られている。ＰＣＲ法は、核酸を高感度に検出できるため、感染症の診断、ウイルスの検出等に利用されている。

[0003]　上記のＰＣＲ法は、新型コロナウイルスの検出に採用され大きな注目を集めている。非特許文献１によると、新型コロナウイルス（2019-nCoV）の遺伝子領域２か所、open reading flame 1a（ORF1a）および spike（S）を特異的に検出する２ステップＲＴ－ＰＣＲ法、あるいはTaqMan プローブを用いたリアルタイム１ステップＲＴ－ＰＣＲ法による遺伝子検査により新型コロナウイルス（2019-nCoV）が同定される。

[0004]　新型コロナウイルスによる感染症の流行による試験検体数の増加に伴い、より早い結果の開示が求められている。そこで、検査操作性の観点からＰＣＲ反応液の調製工程を減らすことが求められている。しかし、保存安定性の観点から試験直前に使用する組成物を調製する必要があった。前記組成物の安定性を向上させる安定化剤として、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、ゼラチンおよび非イオン性界面活性剤が知られている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：国立感染症研究所　病原体検出マニュアル　２０１９－ｎＣｏＶ　Ｖｅｒ．２．９．１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、核酸増幅法（例えばＰＣＲ法）に用いられる組成物の保存安定性を向上させることである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らが鋭意研究を行った結果、２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位を含む重合体を使用すれば、核酸増幅法（例えばＰＣＲ法）に用いられる組成物の保存安定性を向上させ得ることを見出した。この知見に基づく本発明は、以下の通りである。

[0008] ［１］ ２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位を含む重合体を含む核酸増幅用の組成物。

［２］ 前記重合体の濃度が、０．０００１～１０ｗ／ｖ％である前記［１］に記載の核酸増幅用の組成物。

［３］ ＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法に用いられる前記［１］または［２］に記載の核酸増幅用の組成物。

［４］ ＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法が、リアルタイムＰＣＲ法またはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法である前記［３］に記載の核酸増幅用の組成物。

［５］ リアルタイムＰＣＲ法またはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法が、１ステップＲＴ－リアルタイムＰＣＲ試薬を用いるリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法である前記［４］に記載の核酸増幅用の組成物。

［６］ 核酸が、ＲＮＡウイルス由来のＲＮＡである前記［１］～［５］のいずれか一つに記載の核酸増幅用の組成物。

［７］ ＲＮＡウイルス由来のＲＮＡが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２由来のＲＮＡである前記［６］に記載の核酸増幅用の組成物。

[0009] ［８］ さらにプライマーを含む前記［１］～［７］のいずれか一つに記載の核酸増幅用の組成物。

［９］ プライマーが、１０～４０塩基の長さのオリゴヌクレオチドである前記［８］に記載の核酸増幅用の組成物。

［１０］　プライマーの濃度が、０．０１～１０μＭである前記［８］または［９］に記載の核酸増幅用の組成物。

[0010]　［１１］　前記［1］～［１０］のいずれか一つに記載の核酸増幅用の組成物と、増幅される核酸を含む試料とを混合して核酸増幅用の反応液を調製することを含む核酸増幅法。

［１２］　ＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法である前記［１１］に記載の核酸増幅法。

［１３］　リアルタイムＰＣＲ法またはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法である前記［１２］に記載の核酸増幅法。

［１４］　１ステップＲＴ－リアルタイムＰＣＲ試薬を用いるリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法である前記［１３］に記載の核酸増幅法。

［１５］　核酸が、ＲＮＡウイルス由来のＲＮＡである前記［１１］～［１４］のいずれか一つに記載の核酸増幅法。

［１６］　ＲＮＡウイルス由来のＲＮＡが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２由来のＲＮＡである前記［１５］に記載の核酸増幅法。

発明の効果

[0011]　本発明によれば、保存安定性に優れた核酸増幅用の組成物が得られる。

発明を実施するための形態

[0012]　以下、本発明を詳細に説明する。

なお、本明細書において、段階的な数値範囲が記載されている場合、各数値範囲の下限値および上限値は、組み合わせることができる。例えば、「好ましくは１０～１００、より好ましくは２０～９０」が記載されている場合、「好ましい下限値：１０」と「より好ましい上限値：９０」とを組み合わせることができる（即ち、「１０～９０」との数値範囲も本明細書の範囲内である）。

[0013]　［核酸増幅用の組成物］

本発明は、２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位を含む重合体（以下「本発明の重合体」と記載することがあ

る）を含む核酸増幅用の組成物（以下「本発明の組成物」と記載することがある）に関する。本発明の重合体は、１種のみを使用してもよく、２種以上を併用してもよい。なお、以下では「２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン」を「単量体（１）」と記載することがあり、「単量体（１）に由来する構成単位」を「構成単位（１）」と記載することがある。

[0014] 本明細書において、「２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン」とは、基本的に「２－アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンまたは２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン」を意味する。複数の２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンが存在してもよい場合、「２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン」とは、「２－アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンおよび／または２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン」を意味する。「２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン」と類似する他の用語も、「（２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン」と同様の意味である。２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンは、市販品を使用することができる。

[0015] 本明細書において、「２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位」とは、２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに含まれる（メタ）アクリロイル基の炭素－炭素二重結合が反応して形成される構造を有する構成単位を意味する。他の単量体に由来する構成単位も、前記と同様の意味である。

[0016] 本明細書において「核酸増幅用の組成物」とは、核酸増幅法に用いられる組成物を意味する。核酸増幅法は、特には限定されていないが、例えば、Polymerase Chain Reaction（ＰＣＲ）法、Loop mediated isothermal Amplification（ＬＡＭＰ）法、Transcription Mediated Amplification（ＴＭＡ）法、Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids（ＩＩＣＡＮ）法、Strand Displacement Amplification（ＳＤＡ）法、Ligase Chain Reaction (LCR) 法、Nucleic Acid Seqence-Based Amplificat ion（ＮＡＳＢＡ）法などが挙げられる。核酸増幅法は、好ましくはＰＣＲ法である。

[0017] 核酸増幅法は、好ましくはＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法（逆転写ＰＣＲ法）である。即ち、本発明の組成物は、好ましくはＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法に用いられる。ＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法は、好ましくはリアルタイムＰＣＲ法またはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法であり、より好ましくは１ステップＲＴ－リアルタイムＰＣＲ試薬を用いるリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法である。ここで、１ステップＲＴ－リアルタイムＰＣＲ試薬とは、逆転写反応とＰＣＲ反応とを連続または並行して一工程で行い、ＰＣＲ産物を経時的に測定するために用いられる試薬を意味し、例えば、逆転写酵素活性を併せ持つ耐熱性ＤＮＡポリメラーゼと蛍光ＤＮＡ染色試薬または蛍光プローブを含むＰＣＲ試薬等が挙げられる。増幅される核酸は、好ましくはＲＮＡウイルス由来のＲＮＡであり、より好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２由来のＲＮＡである。

[0018] 本発明の重合体は、２－アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位からなる単独重合体、２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位からなる単独重合体、または２－アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位および２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位からなる共重合体のいずれでもよい。前記共重合体は、ランダム共重合体でもよく、ブロック共重合体でもよく、ランダム部分およびブロック部分の両方を含む共重合体でもよい。

[0019] 本発明の重合体が構成単位（１）以外の構成単位を含まない場合、本発明の重合体は、好ましくは２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位からなる単独重合体（即ち、２－アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位からなる単独重合体または２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位からなる単独重合体）であり、より好ましくは２－メタクリロイルオキシエチル

ホスホリルコリンに由来する構成単位からなる単独重合体である。

[0020] 本発明の重合体は、２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（単量体（１））に由来する構成単位（構成単位（１））に加えて、単量体（１）とは異なる他の単量体に由来する他の構成単位を含む共重合体でもよい。他の単量体は、１種のみを使用してもよく、２種以上を併用してもよい。前記共重合体は、ランダム共重合体でもよく、ブロック共重合体でもよく、ランダム部分およびブロック部分の両方を含む共重合体でもよい。

[0021] 他の構成単位としては、例えば、ヒドロキシ基を含有しないアルキル（メタ）アクリレート（以下「単量体（２）」と記載することがある。）に由来する構成単位（以下「構成単位（２）」と記載することがある）が挙げられる。アルキル（メタ）アクリレートのアルキルは、ヒドロキシ基以外の置換基を有していてもよい。前記置換基としては、例えば、ハロゲン原子、エポキシ基、メトキシ基等のアルコキシ基、フェニル基等のアリール基、フェノキシ基等のアリールオキシ基、テトラヒドロフラニル基等の複素環基等が挙げられる。単量体（２）は、１種のみを使用してもよく、２種以上を併用してもよい。即ち、本発明の重合体は、１種またはそれ以上の構成単位（２）を含んでいてもよい。

[0022] 単量体（２）としては、例えば、メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、プロピル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、ペンチル（メタ）アクリレート、ヘキシル（メタ）アクリレート、ヘプチル（メタ）アクリレート、オクチル（メタ）アクリレート、ノニル（メタ）アクリレート、デシル（メタ）アクリレート、ウンデシル（メタ）アクリレート、ドデシル（メタ）アクリレート、トリデシル（メタ）アクリレート、テトラデシル（メタ）アクリレート、ペンタデシル（メタ）アクリレート、セチル（メタ）アクリレート、ヘプタデシル（メタ）アクリレート、ステアリル（メタ）アクリレート、ベンジル（メタ）アクリレート、フェノキシエチル（メタ）アクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレート、グリシジル（メタ）アクリレート等が挙げられる。これらの中で

、ブチル（メタ）アクリレート、ステアリル（メタ）アクリレートおよびベンジル（メタ）アクリレートが好ましく、ブチルメタクリレート、ステアリルメタクリレートおよびベンジルメタクリレートがより好ましい。単量体（２）は、市販品を使用することができる。

[0023] 本発明の重合体が構成単位（１）および構成単位（２）を含む場合、安定化作用の観点から、構成単位（１）および構成単位（２）の合計１００モル（即ち、重合に使用した単量体（１）および単量体（２）の合計１００モル）に対して、構成単位（１）の量（即ち、重合に使用した単量体（１））は、好ましくは５～９５モル、より好ましくは２０～８０モル、さらに好ましくは６０～８０モルであり、構成単位（２）の量（即ち、重合に使用した単量体（２））は、好ましくは５～９５モル、より好ましくは２０～８０モル、さらに好ましくは２０～４０モルである。

[0024] 他の構成単位としては、例えば、ヒドロキシ基含有アルキル（メタ）アクリレート（以下「単量体（３）」と記載することがある。）に由来する構成単位（以下「構成単位（３）」と記載することがある）が挙げられる。また、単量体（３）は、１種のみを使用してもよく、２種以上を併用してもよい。即ち、本発明の重合体は、１種またはそれ以上の構成単位（３）を含んでいてもよい。

[0025] 単量体（３）中のヒドロキシ基の数は、好ましくは２以上、より好ましくは２～５である。単量体（３）としては、例えば、グリセリンモノ（メタ）アクリレート、トレイトールモノ（メタ）アクリレート、エリトリトールモノ（メタ）アクリレート、キシリトールモノ（メタ）アクリレート、アラビトールモノ（メタ）アクリレート、マンニトールモノ（メタ）アクリレート、ガラクチトールモノ（メタ）アクリレート、ソルビトールモノ（メタ）アクリレート等が挙げられる。これらの中で、グリセリンモノ（メタ）アクリレートが好ましく、グリセリンモノメタクリレートがより好ましい。

[0026] 単量体（３）は、市販品を使用してもよく、公知の方法で製造してもよい。例えば単量体（３）は、（メタ）アクリル酸またはその誘導体（例えば酸

塩化物）と、３個以上のヒドロキシ基を有する多価アルコールとのエステル化反応によって製造することができる。エステル化反応は周知であり、当業者であれば、その条件を適宜設定して行うことができる。

[0027] 本発明の重合体が構成単位（１）および構成単位（３）を含む場合、安定化作用の観点から、構成単位（１）および構成単位（３）の合計１００モル（即ち、重合に使用した単量体（１）および単量体（３）の合計１００モル）に対して、構成単位（１）の量（即ち、重合に使用した単量体（１））は、好ましくは５～９５モル、より好ましくは２０～８０モルであり、構成単位（３）の量（即ち、重合に使用した単量体（３））は、好ましくは５～９５モル、より好ましくは２０～８０モルである。

[0028] 本発明の重合体が構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）を含む場合、安定化作用の観点から、構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）の合計１００モル（即ち、重合に使用した単量体（１）、単量体（２）および単量体（３）の合計１００モル）に対して、構成単位（１）の量（即ち、重合に使用した単量体（１））は、好ましくは５～９０モル、より好ましくは１０～８０モル、さらに好ましくは３０～５０モルであり、構成単位（２）の量（即ち、重合に使用した単量体（２））は、好ましくは５～９０モル、より好ましくは１０～８０モル、さらに好ましくは３０～５０モルであり、構成単位（３）の量（即ち、重合に使用した単量体（３））は、好ましくは５～９０モル、より好ましくは１０～８０モル、さらに好ましくは１０～４０モルである。

[0029] 本発明の重合体は、前述の構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）とは異なる単量体（以下「単量体（４）」と記載することがある）に由来する構成単位（以下「構成単位（４）」と記載することがある）を含んでいてもよい。単量体（４）は、１種のみを使用してもよく、２種以上を併用してもよい。即ち、本発明の重合体は、１種またはそれ以上の構成単位（４）を含んでいてもよい。

[0030] 単量体（４）としては、例えば、アリル（メタ）アクリレート等のアルケ

ニル（メタ）アクリレート；シクロヘキシル（メタ）アクリレート等のシクロアルキル（メタ）アクリレート；イソボルニル（メタ）アクリレート等の（メタ）アクリル酸とモノテルペンアルコールとのエステル；スチレン、メチルスチレン、クロロメチルスチレン等のスチレン系単量体；メチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系単量体；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系単量体等が挙げられる。

[0031] 本発明の重合体中の構成単位（４）の量は、全構成単位に対して、好ましくは４０モル％以下であり、より好ましくは２０モル％以下である。本発明の重合体は、構成単位（４）を含まないことがより好ましい。

[0032] 本発明の重合体は、好ましくは１種の構成単位（１）からなる単独重合体、構成単位（１）および構成単位（２）からなる共重合体、並びに構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）からなる共重合体からなる群から選ばれる少なくとも一つであり、より好ましくは１種の構成単位（１）からなる単独重合体、構成単位（１）および構成単位（２）からなる共重合体、または構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）からなる共重合体である。なお、本明細書中、「１種の構成単位（１）からなる単独重合体」とは、その全ての構成単位（繰返し単位）が１種の構成単位（１）からなる単独重合体を意味し、「構成単位（１）および構成単位（２）からなる共重合体」とは、その全ての構成単位（繰返し単位）が構成単位（１）および構成単位（２）からなる共重合体を意味し、「構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）からなる共重合体」とは、その全ての構成単位（繰り返し単位）が構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）からなる共重合体を意味する。他の同様の表現も、同様の意味である。

[0033] 本発明の重合体の重量平均分子量は特に限定されないが、好ましくは５，０００～２，０００，０００、より好ましくは１０，０００～１，５００，０００である。なお、この重量平均分子量は、例えば、ＥｃｏＳＥＣシステム（東ソー株式会社製）等を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによりポリエチレングリコール換算で決定することができる。

[0034] 本発明の共重合体は、公知の方法（例えば、国際公開２０１８／２１６６２８号に記載の方法等）により製造することができる。

[0035] 核酸増幅用の組成物中の本発明の重合体の濃度は、安定性作用の観点から、好ましくは０．０００１ｗ／ｖ％以上、より好ましくは０．０００５ｗ／ｖ％以上、さらに好ましくは０．００１０ｗ／ｖ％以上、特に好ましくは０．０１０ｗ／ｖ％以上、最も好ましくは０．１０ｗ／ｖ％以上であり、好ましくは１０ｗ／ｖ％以下、より好ましくは５ｗ／ｖ％以下、さらに好ましくは１．０ｗ／ｖ％以下である。なお、２種以上の本発明の重合体を使用する場合、前記濃度は、２種以上の本発明の重合体の濃度の合計を意味する。以下の他の成分について記載された濃度または量も、２種以上の該成分を使用する場合、前記濃度または量は、２種以上の該成分の濃度または量の合計を意味する。

[0036] ＜本発明の重合体の好適な例＞

本発明の重合体の好適な例としては、以下の本発明の重合体（Ｉ）および本発明の重合体（ＩＩ）が挙げられる。

[0037] （本発明の重合体（Ｉ））

本発明の重合体（Ｉ）は、以下の単独重合体（Ｉ－１）、共重合体（Ｉ－２）および共重合体（Ｉ－３）からなる群から選ばれる少なくとも一つであり、好ましくは以下の単独重合体（Ｉ－１）、共重合体（Ｉ－２）または共重合体（Ｉ－３）である：

２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位（１）からなる単独重合体（Ｉ－１）；

２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位（１）と、

ブチル（メタ）アクリレート、ステアリル（メタ）アクリレートまたはベンジル（メタ）アクリレートに由来する構成単位（２）と

からなり、並びに構成単位（１）および構成単位（２）の合計１００モルに対して、構成単位（１）の量が５～９５モルであり、および構成単位（２）

の量が５～９５モルである共重合体（Ｉ－２）；並びに

２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位（１）と、　ブチル（メタ）アクリレート、ステアリル（メタ）アクリレートまたはベンジル（メタ）アクリレートに由来する構成単位（２）と

グリセリンモノ（メタ）アクリレートに由来する構成単位（３）と

からなり、並びに構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）の合計１００モルに対して、構成単位（１）の量が５～９０モルであり、構成単位（２）の量が５～９０モルであり、および構成単位（３）の量が５～９０モルである共重合体（Ｉ－３）。

[0038] 本発明の重合体（Ｉ）において、共重合体（Ｉ－２）中の構成単位（１）の量が２０～８０モルであり、および構成単位（２）の量が２０～８０モルであり、並びに共重合体（Ｉ－３）中の構成単位（１）の量が１０～８０モルであり、構成単位（２）の量が１０～８０モルであり、および構成単位（３）の量が１０～８０モルであることが好ましい。なお、共重合体（Ｉ－２）中の前記構成単位の量の基準は構成単位（１）および構成単位（２）の合計１００モルであり、並びに共重合体（Ｉ－３）中の前記構成単位の量の基準は構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）の合計１００モルである。

[0039] 本発明の重合体（Ｉ）において、共重合体（Ｉ－２）中の構成単位（１）の量が６０～８０モルであり、および構成単位（２）の量が２０～４０モルであり、並びに共重合体（Ｉ－３）中の構成単位（１）の量が３０～５０モルであり、構成単位（２）の量が３０～５０モルであり、および構成単位（３）の量が１０～４０モルであることがより好ましい。なお、共重合体（Ｉ－２）中の前記構成単位の量の基準は構成単位（１）および構成単位（２）の合計１００モルであり、並びに共重合体（Ｉ－３）中の前記構成単位の量の基準は構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）の合計１００モルである。

[0040] （本発明の重合体（ＩＩ））

本発明の重合体（ＩＩ）は、以下の単独重合体（ＩＩ－１）、共重合体（ＩＩ－２）および共重合体（ＩＩ－３）からなる群から選ばれる少なくとも一つであり、好ましくは以下の単独重合体（ＩＩ－１）、共重合体（ＩＩ－２）または共重合体（ＩＩ－３）である：

２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位（１）からなる単独重合体（ＩＩ－１）；

２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位（１）と、

ブチルメタアクリレート、ステアリルメタクリレートまたはベンジルメタクリレートに由来する構成単位（２）と

からなり、並びに構成単位（１）および構成単位（２）の合計１００モルに対して、構成単位（１）の量が２０～８０モルであり、および構成単位（２）の量が２０～８０モルである共重合体（ＩＩ－２）；並びに

２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位（１）と、

ブチルメタクリレート、ステアリルメタクリレートまたはベンジルメタクリレートに由来する構成単位（２）と

グリセリンモノメタクリレートに由来する構成単位（３）と

からなり、並びに構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）の合計１００モルに対して、構成単位（１）の量が１０～８０モルであり、構成単位（２）の量が１０～８０モルであり、および構成単位（３）の量が１０～８０モルである共重合体（ＩＩ－３）。

[0041] 本発明の重合体（ＩＩ）において、共重合体（ＩＩ－２）中の構成単位（１）の量が６０～８０モルであり、および構成単位（２）の量が２０～４０モルであり、並びに共重合体（ＩＩ－３）中の構成単位（１）の量が３０～５０モルであり、構成単位（２）の量が３０～５０モルであり、および構成単位（３）の量が１０～４０モルであることが好ましい。なお、共重合体（ＩＩ－２）中の前記構成単位の量の基準は構成単位（１）および構成単位（

２）の合計１００モルであり、並びに共重合体（ＩＩ－３）中の前記構成単位の量の基準は構成単位（１）、構成単位（２）および構成単位（３）の合計１００モルである。

[0042] ＜他の成分＞

本発明の組成物は、前記重合体を、必要に応じて核酸増幅に用いる他の成分とともに、水などの溶媒に溶解することで調製できる。即ち、本発明の組成物は、好ましくは前記重合体および水（並びに必要に応じて他の成分）を含む組成物である。

[0043] 核酸増幅に用いる他の成分としては、ＰＣＲに代表される公知の核酸増幅に用いられる公知の成分を使用することができる。そのような成分としては、例えば、ｐＨ緩衝液、金属塩、核酸合成酵素、プライマー、ジデオキシヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）等が挙げられる。他の成分は、いずれも１種のみを使用してもよく、２種以上を併用してもよい。

[0044] ｐＨ緩衝液としては、例えば、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）溶液、Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ（トリスヒドロキシメチルアミノメタン－塩酸）溶液、ＴＡＥ（トリス－酢酸－ＥＤＴＡ）溶液、ＴＥ（トリス－ＥＤＴＡバッファー）溶液が挙げられる。

[0045] 金属塩としては、例えば、塩化マグネシウム、酢酸マンガン（ＩＩ）、硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム等が挙げられる。

核酸合成酵素としては、例えば、ＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素等が挙げられる。

[0046] プライマーとしては、例えば、１０～４０塩基の長さのオリゴヌクレオチドが挙げられる。前記オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは１５～３０塩基、より好ましくは１７～２５塩基である。前記オリゴヌクレオチドは、公知の方法により設計・調製することができる。前記オリゴヌクレオチドは、フルオロセイン等から形成された蛍光を発する基を有していてもよい。

[0047] プライマーは、１種のみを使用してもよく、２種のプライマーを１対として用いてもよく、複数の領域を同時に増幅するために複数のプライマーを用

いてもよい。本発明の組成物中のプライマー濃度は、好ましくは０．０１～１０μM、より好ましくは０．０５～５．０μM、さらに好ましくは０．１～３．０μMである。

[0048] ジデオキシヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）としては、例えば、デオキシアデノシン三リン酸（ｄＡＴＰ）、デオキシグアノシン三リン酸（ｄＧＴＰ）、デオキシチミジン三リン酸（ｄＴＴＰ）、デオキシシチジン三リン酸（ｄＣＴＰ）が挙げられる。

[0049] さらなる他の成分としては、ウシ血清アルブミン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ベタイン、ホルムアミド、ゼラチン、グリセロール、ポリエチレングリコール、スペルミジン、Ｔ４　Ｇａｎｅ　３２　プロテイン、４－（１，１，３，３－テトラメチルブチル）フェニル－ポリエチレングリコール、ｔｅｒｔ－オクチルフェノキシポリエトキシエタノール、ポリエチレングリコールｔｅｒｔ－オクチルフェニルエーテル、尿素等が挙げられる。

[0050] ［核酸増幅法］

本発明は、本発明の組成物と、増幅される核酸を含む試料とを混合して核酸増幅用の反応液を調製することを含む核酸増幅法も提供する。本発明の核酸増幅法における本発明の重合体および本発明の組成物の説明は、前述の通りである。また、核酸増幅法の説明も、特段の記載がない限り、前述の通りである。

[0051] 本発明の核酸増幅法で用いる試料は、増幅される核酸を含む。試料は、好ましくは、水と、増幅される核酸とを含む試料液である。試料は、１種の核酸を含んでいてもよく、２種以上の核酸を含んでいてもよい。試料中の核酸の濃度は、核酸増幅の目的に応じて適宜決定されるが、濃度調製が可能な場合には、好ましくは１～１０^{20}ｃｏｐｙ／μＬ、より好ましくは１～１０^{10}ｃｏｐｙ／μＬ、さらに好ましくは１～１０^{5}ｃｏｐｙ／μＬ、特に好ましくは１～５００ｃｏｐｙ／μＬ、最も好ましくは１～１００ｃｏｐｙ／μＬである。増幅される核酸は、好ましくはＲＮＡウイルス由来のＲＮＡであり、

より好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２由来のＲＮＡである。

[0052] 本発明の拡散増幅法において、試料の使用量は、本発明の組成物の使用量１μＬに対して、好ましくは痕跡量～１μＬ、より好ましくは０．０１～１μＬ、さらに好ましくは０．２～０．４μＬである。

[0053] 本発明の核酸増幅法は、好ましくはＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法であり、より好ましくはリアルタイムＰＣＲ法またはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法であり、さらに好ましくは１ステップＲＴ－リアルタイムＰＣＲ試薬を用いるリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法である。

実施例

[0054] 以下、本発明を実施例等によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0055] ［重合体の合成］

［合成例１］

単量体（1）として２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（以下「ＭＰＣ」と略称することがある）４０．０ｇを重合用ガラスフラスコに秤量し、精製水６０．０ｇを加えて単量体（1）を溶かし、得られた溶液に重合開始剤としてアゾビスイソブチロニトリル０．３１ｇを加えた。反応容器内を充分に窒素置換した後、攪拌下、７０℃で６時間加温することで重合を行った。得られた反応液を氷冷し、ジエチルエーテルに滴下することで重合体を沈殿させた。沈殿物を濾別し、ジエチルエーテルで洗浄した後、真空乾燥し、白色粉末状の単独重合体（以下「重合体１」と記載する）を得た。重合体１の重量平均分子量は、後述する条件でのゲル濾過クロマトグラフィー（以下「ＧＰＣ」と略称することがある）測定により、ポリエチレングリコール換算で１，０３０，０００であった。

[0056] ［合成例２］

単量体（1）としてＭＰＣおよび単量体（2）としてブチルメタクリレート（以下「ＢＭＡ」と略称することがある）を、単量体（1）／単量体（2）＝８０／２０（モル比）となるように反応容器に仕込んだこと以外は合成

例１と同様にして、ランダム共重合体（以下「重合体２」と記載する）を得た。重合体２の重量平均分子量は、後述する条件でのＧＰＣ測定により、ポリエチレングリコール換算で６００，０００であった。

[0057] ［合成例３］

単量体（１）としてＭＰＣ、単量体（２）としてＢＭＡおよび単量体（３）としてグリセリンモノメタクリレート（以下「ＧＬＭ」と略称することがある）を、単量体（１）／単量体（２）／単量体（３）＝４０／４０／２０（モル比）となるように反応容器に仕込んだこと以外は合成例１と同様にして、ランダム共重合体（以下「重合体３」と記載する）を得た。重合体３の重量平均分子量は、後述する条件でのＧＰＣ測定により、ポリエチレングリコール換算で２２，０００であった。

[0058] ［合成例４］

単量体（１）としてＭＰＣおよび単量体（２）としてステアリルメタクリレート（以下「ＳＭＡ」と略称することがある）を、単量体（１）／単量体（２）＝８０／２０（モル比）となるように反応容器に仕込んだこと以外は合成例１と同様にして、ランダム共重合体（以下「重合体４」と記載する）を得た。重合体４の重量平均分子量は、後述する条件でのＧＰＣ測定により、ポリエチレングリコール換算で４３，０００であった。

[0059] ［合成例５］

単量体（１）としてＭＰＣおよび単量体（２）としてベンジルメタクリレート（以下「ＢＮＭ」と略称することがある）を、単量体（１）／単量体（２）＝８０／２０（モル比）となるように反応容器に仕込んだこと以外は合成例１と同様にして、共重合体（以下「重合体５」と記載する）を得た。重合体５の重量平均分子量は、後述する条件でのＧＰＣ測定により、ポリエチレングリコール換算で２４０，０００であった。

[0060] ［ＧＰＣ測定］

合成例１～５で得られた重合体１～５のＧＰＣ測定は、以下の条件で実施した。

ＧＰＣシステム：ＥｃｏＳＥＣシステム（東ソー株式会社製）

カラム：Ｓｈｏｄｅｘ　ＯＨｐａｋ　ＳＢ－８０２．５ＨＱ（昭和電工株式会社製）、およびＳＢ－８０６ＨＱ（昭和電工株式会社製）を直列に接続

展開溶媒：２０ｍＭりん酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ　７．４）

検出器：示差屈折率検出器

分子量標準：EasiVial PEG/PEO (Agilent Technologies 製)

流速：０．５ｍＬ／分

カラム温度：４０℃

サンプル：得られた重合体を終濃度０．１重量%となるよう展開溶媒で希釈

注入量：１００μＬ

[0061] 合成例１～５で使用した単量体およびそのモル比、並びに得られた重合体の重量平均分子量を、下記表１にまとめる。

[0062] [表1]

	単量体（1）	単量体（2）	単量体（3）	単量体のモル比	重量平均分子量
重合体１	MPC	－	－	100/0/0	1,030,000
重合体２	MPC	BMA	－	80/20/0	600,000
重合体３	MPC	BMA	GLM	40/40/20	22,000
重合体４	MPC	SMA	－	80/20/0	43,000
重合体５	MPC	BNM	－	80/20/0	240,000

単量体のモル比＝単量体（1）／単量体（2）／単量体（3）
MPC：２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン
BMA：ブチルメタクリレート
SMA：ステアリルメタクリレート
BNM：ベンジルメタクリレート
GLM：グリセリンモノメタクリレート

[0063] ［実施例１～５］

SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit（富士フイルム和光純薬株式会社製）を用いて、以下の添加量で重合体添加前の溶液（以下「溶液Ａ」）を調製した。溶液Ａの構成は、下記表２の通りである。

[0064]

[表2]

試薬名	添加量
5x Reaction Buffer	4 μL
4.2 mmol/L dNTPs	4 μL
50 mmol/L Manganese(II) Acetate	1 μL
Hot Start Reverse Transcription DNA Polymerase	0.25 μL
Distilled Water, Nuclease-free	0.55 μL
Fw Primer NIID_2019-nCOV_N_F2	1 μL
Rv Primer NIID_2019-nCOV_N_R2	1.4 μL
TaqMan Probe NIID_2019-nCOV_N_P2	0.8 μL
合計	13 μL

試薬：SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit（富士フィルム和光純薬株式会社製）の構成品

添加量：１ウェルあたりの添加量

[0065]　実施例１～５では、それぞれ、０．５ｗ／ｖ％の重合体１～５の水溶液を、１ウェルあたり２μＬずつ、表２に示す組成の溶液Ａへ添加し、１５μＬの核酸増幅用の組成物を調製した（組成物中の各重合体の濃度：０．０６７ｗ／ｖ％）。

[0066]　前記キットに添付の Positive Control RNA, N set No.2(N2)を使用して、核酸の濃度が１０ｃｏｐｙ／μＬである試料液を調製した。得られた試料液を１ウェルあたり５μＬの量で核酸増幅用の組成物に添加して、ＰＣＲ反応液を調製した（ＰＣＲ反応液中の各重合体の濃度：０．０５０ｗ／ｖ％）。ｑＰＣＲ装置である StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems製）を用いて、ＰＣＲ法を行い、ＰＣＲ反応液のエンドポイントの蛍光強度を測定した。温度プログラムは、下記表３の通りである。

[0067] [表3]

ステップ	反応条件	
1	90℃, 30秒	
2	60℃, 5分	
3	95℃, 1分	
4	95℃, 3秒	60 ｻｲｸﾙ
5	60℃, 10秒	
6	4℃	

[0068] 核酸増幅用の組成物を３５℃で２時間インキュベートした後に、前記試料液を核酸増幅用の組成物に添加したこと以外は上記と同様にして、ＰＣＲ反応液のエンドポイントの蛍光強度を測定した。

[0069] インキュベートしなかった核酸増幅用の組成物を用いて得られた蛍光強度（測定数３回）の平均値（以下「インキュベート前の蛍光強度の平均値」と記載する）およびインキュベートした核酸増幅用の組成物を用いて得られた蛍光強度（測定数３回）の平均値（以下「インキュベート後の蛍光強度の平均値」と記載する）を用いて、下記式：

蛍光強度比＝インキュベート後の蛍光強度の平均値／インキュベート前の蛍光強度の平均値

から蛍光強度比を算出した。結果を下記表４に記載する。

[0070] ［比較例１］

比較例１では、表２に示す組成の溶液ＡへDistilled Water, Nuclease-freeを１ウェルあたり２μＬずつ添加して得られた組成物を核酸増幅用の組成物として用いたこと以外は、実施例１～５と同様にして蛍光強度比を算出した。結果を下記表４に記載する。

[0071] [表4]

	使用した重合体	蛍光強度比
比較例１	―	0.14
実施例１	重合体１	0.34
実施例２	重合体２	0.16
実施例３	重合体３	0.54
実施例４	重合体４	0.74
実施例５	重合体５	0.34

[0072] 表４に示すように、重合体１～５を使用した実施例１～５の蛍光強度比は、前記重合体を使用しない比較例１のものよりも高かった。これらの結果から、２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位を含む重合体を含む核酸増幅用の組成物は、保存安定性に優れることが分かる。

[0073] ［実施例６～８］

実施例６～８では、５ｗ／ｖ％の重合体１～３の水溶液を、１ウェルあたり２μＬずつ、表２に示す組成の溶液Ａへ添加し、１５μＬの核酸増幅用の組成物を調製したこと以外は、実施例１～５と同様にして蛍光強度比を算出した（組成物中の各重合体の濃度：０．６７ｗ／ｖ％、ＰＣＲ反応液中の各重合体の濃度：０．５０ｗ／ｖ％）。結果を下記表５に記載する。

[0074] [表5]

	使用した重合体	蛍光強度比
実施例６	重合体１	0.38
実施例７	重合体２	0.87
実施例８	重合体３	0.76

[0075] 表４および５に示すように、重合体１～３を使用した実施例６～８の蛍光強度比は、前記重合体を使用しない比較例１のものよりも高かった。これらの結果から、２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位を含む重合体を含む核酸増幅用の組成物は、保存安定性に優れることが分かる。

[0076] ［実施例９］

実施例９では、０．５ｗ／ｖ％の重合体１の水溶液を、１ウェルあたり２μＬずつ、表２に示す組成の溶液Ａへ添加し、１５μＬの核酸増幅用の組成物を調製した（組成物中の重合体１の濃度：０．０６７ｗ／ｖ％）。この核酸増幅用の組成物を４℃で１および３ヵ月間インキュベートし、核酸の濃度が４０ｃｏｐｙ／μＬである試料液を調製し、実施例１～５と同様にして、１ヵ月インキュベート後の蛍光強度比および３ヵ月インキュベート後の蛍光強度比を算出した（ＰＣＲ反応液中の重合体１の濃度：０．０５０ｗ／ｖ％）。結果を下記表６に記載する。

[0077] ［比較例２］

比較例２では、表２に示す組成の溶液ＡへDistilled Water, Nuclease-freeを１ウェルあたり２μＬずつ添加して得られた組成物を核酸増幅用の組成物

として用いたこと以外は、実施例９と同様にして、１ヵ月インキュベート後の蛍光強度比および３ヵ月インキュベート後の蛍光強度比を算出した。結果を下記表６に記載する。

[0078] [表6]

	使用した重合体	蛍光強度比	
		4℃で１ヶ月インキュベート後	4℃で３ヶ月インキュベート後
比較例２	―	0.80	0.28
実施例９	重合体１	1.00	0.78

[0079] 表６に示すように、重合体１を使用した実施例９の蛍光強度比は、前記重合体を使用しない比較例２のものよりも高かった。これらの結果から、２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位を含む重合体を含む核酸増幅用の組成物は、保存安定性に優れることが分かる。

産業上の利用可能性

[0080] 本発明の組成物は、保存安定性に優れる。本発明の組成物は、遺伝子検査、微生物検査、ウイルス検査等のための核酸増幅法（特にＰＣＲ法）に好適に用いることができる。

[0081] 本願は、日本で出願された特願２０２１－１２４０２号を基礎としており、その内容は本願明細書に全て包含される。

請求の範囲

[請求項1] ２－（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する構成単位を含む重合体を含む核酸増幅用の組成物。

[請求項2] 前記重合体の濃度が、０．０００１～１０ｗ／ｖ％である請求項１に記載の核酸増幅用の組成物。

[請求項3] ＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法に用いられる請求項１または２に記載の核酸増幅用の組成物。

[請求項4] ＰＣＲ法またはＲＴ－ＰＣＲ法が、リアルタイムＰＣＲ法またはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法である請求項３に記載の核酸増幅用の組成物。

[請求項5] リアルタイムＰＣＲ法またはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法が、１ステップＲＴ－リアルタイムＰＣＲ試薬を用いるリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法である請求項４に記載の核酸増幅用の組成物。

[請求項6] 核酸が、ＲＮＡウイルス由来のＲＮＡである請求項１～５のいずれか一項に記載の核酸増幅用の組成物。

[請求項7] ＲＮＡウイルス由来のＲＮＡが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２由来のＲＮＡである請求項６に記載の核酸増幅用の組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. **PCT/JP2022/002103**

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/686(2018.01)i; ***C08F 130/02***(2006.01)i; ***C12N 15/50***(2006.01)i
FI: C12Q1/686 Z; C08F130/02; C12N15/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/686; C08F130/02; C12N15/50

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 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Japio-GPG/FX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2019/0360021 A1 (NANOHELIX CO., LTD.) 28 November 2019 (2019-11-28) claims, 1-13, paragraphs [0014]-[0016] claims, 1-13, paragraphs [0014]-[0016]	1-5 1-7
Y	YANG, W. et al. Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse transcription RT-LAMP method. medRxiv. 03 March 2020, [retrieved on 01 April 2022], Retrieved from the Internet: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.02.20030130v2.full.pdf abstract, fig. 1	1-7
Y	YU, L. et al. Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform: iLACO. medRxiv. 24 February 2020, [retrieved on 01 April 2022], Retrieved from the Internet: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.20.20025874v1.full.pdf abstract, table 1, p. 7, 1st paragraph	1-7
Y	KITAGAWA, Y. et al. Evaluation of rapid diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19) using loop-mediated isothermal amplification. Journal of Clinical Virology. 2020, vol. 129, 104446, pp. 1-3 abstract, p. 1, right column, 2nd paragraph to p. 2, left column, 3rd paragraph	1-7

☐ 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	Date of mailing of the international search report
01 April 2022	**12 April 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2019/0360021 A1	28 November 2019	WO 2019/103164 A1 claims 1-13, paragraphs [0014]-[0016]	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2022/002103

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/686(2018.01)i; C08F 130/02(2006.01)i; C12N 15/50(2006.01)i
FI: C12Q1/686 Z; C08F130/02; C12N15/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q1/686; C08F130/02; C12N15/50

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　１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０２２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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Japio-GPG/FX

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 Y	US 2019/0360021 A1 (NANOHELIX CO., LTD.) 28.11.2019 (2019－11－28) 請求項１－１３、［００１４］－［００１６］ 請求項１－１３、［００１４］－［００１６］	1-5 1-7
Y	YANG, W., et al., Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse transcription RT-LAMP method., medRxiv, 2020.03.03, [retrieved on 2022-04-01], Retrieved from the Internet:, https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.02.20030130v2.full.pdf 要約、図1	1-7
Y	YU, L., et al., Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform: iLACO., medRxiv, 2020.02.24, [retrieved on 2022-04-01], Retrieved from the Internet:, https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.20.20025874v1.full.pdf 要約、表1、第７頁第１段落	1-7

☑ 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
01.04.2022	12.04.2022

名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）
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	福澤　洋光 4N 3963 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2022/002103

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	KITAGAWA, Y., et al., Evaluation of rapid diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19) using loop-mediated isothermal amplification., Journal of Clinical Virology, 2020, Vol.129, 104446, pp.1-3 要約、第１頁右欄第２段落－第２頁左欄第３段落	1-7

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/002103

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2019/0360021 A1	28.11.2019	WO 2019/103164 A1 請求項１－１３、［１４］－［１６］	