

(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  
2016年3月10日(10.03.2016)



(10) 国際公開番号  
**WO 2016/035812 A1**

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/074927
- (22) 国際出願日: 2015年9月2日(02.09.2015)
- (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 2014-179111 2014年9月3日(03.09.2014) JP
- (71) 出願人: 株式会社ミズホメディ (MIZUHO MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒8410048 佐賀県鳥栖市藤木町5番地の4 Saga (JP).
- (72) 発明者: 山川一富(YAMAKAWA, Kazutomi). 長野隆志(NAGANO, Takashi).
- (74) 代理人: 平野一幸(HIRANO, Kazuyuki); 〒8100001 福岡県福岡市中央区天神四丁目1-23-203 平野特許事務所 Fukuoka (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: PRETREATMENT METHOD AND NUCLEIC ACID EXTRACTION KIT USED IN SAID METHOD

(54) 発明の名称: 前処理方法及びそれに用いられる核酸抽出キット

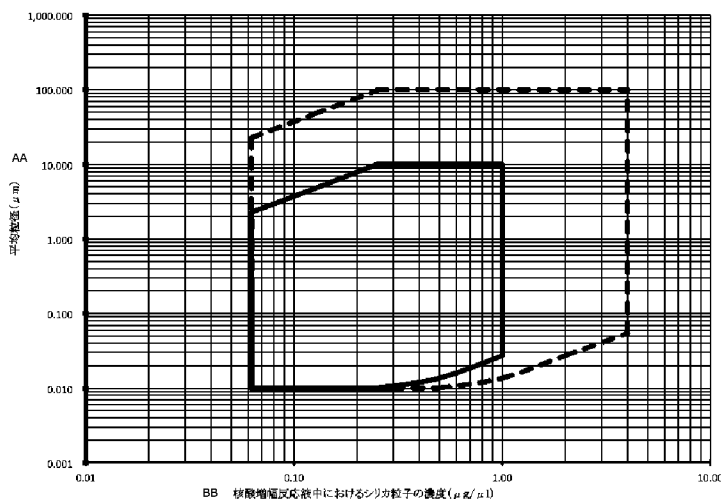


FIG. 1:  
AA Average particle diameter (μm)  
BB Concentration of silica particles in nucleic acid amplification reaction solution (μg/μl)

(57) Abstract: Provided is a method whereby it becomes possible to carry out a pretreatment for gene testing in a POCT mode. A pretreatment method according to the present invention comprises: bringing a material to be treated, an extraction solution for extracting a nucleic acid contained in the material to be treated, silica particles and a filtering material into contact together to cause a composite material composed of the nucleic acid and the silica particles to be supported on the filtering material; and delivering the composite material-supported filtering material to a nucleic acid amplification step in which a nucleic acid amplification reaction solution is used. In the pretreatment method, a drying step and an elution step, which are normally carried out in advance of the nucleic acid amplification step, can be eliminated by keeping the particle diameters of the silica particles and the concentration of the silica particles in the nucleic acid amplification reaction solution in specified range, respectively. The specified range for the concentration of the silica particles is 0.0625 to 4 μg/μl, the specified range for the average particle diameter of the

silica particles is 0.01 to 100 μm, and the surface area of the silica particles, which is determined from the average particle diameter, is  $1 \times 10^4$  to  $1 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ .

(57) 要約:

[続葉有]



遺伝子検査の前処理をPOCT化できる方法を提供する。本前処理方法は、処理対象と、処理対象に含まれる核酸を抽出する抽出液と、シリカ粒子と、濾過材とを接触させ、濾過材に核酸とシリカ粒子との複合体を担持させ、核酸増幅反応液を用いる核酸増幅工程へ送出する前処理方法であって、シリカ粒子の粒径及び核酸増幅反応液中におけるシリカ粒子の濃度を一定範囲内とすることにより、核酸増幅工程に先立つ乾燥工程及び溶出工程を不要とする。一定範囲は、シリカ粒子濃度が $0.0625 \sim 4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ である。

## 明 細 書

### 発明の名称：前処理方法及びそれに用いられる核酸抽出キット 技術分野

[0001] 本発明は、核酸増幅工程に先立ち、固相抽出法を用いて核酸を抽出する前処理方法に関する。なお、核酸増幅工程は、標的とする核酸の塩基配列を検出又は同定するためのものである。更に詳しくは、本発明は、特別な理化学機器なしにPOCT化を実現できるものである。

[0002] POCTとは、Point of Care Testingの略であり、被検者の傍らで、あるいは被検者自らが行う検査である。これによれば、検査時間を短縮し、その場で被検者自身が結果を確認できる。日本臨床検査自動化学会は、POCTガイドラインにおいて、POCTを、「迅速かつ適切な診療・看護、疾病の予防、健康管理などの医療の質、QOL（Quality of life）および満足度の向上に資するための検査」と定義する。

### 背景技術

[0003] 近年、生命科学分野の発展は著しく、DNA及びRNAなどの核酸の解析技術は、広く利用されている。

[0004] 核酸の解析技術は、生物学分野（生物種の同定や起源の研究など）、医療分野（病気の診断など）及び日常生活に近い分野（食糧の安全性の確認など）において広く利用されている。

[0005] 医療分野における病気の診断、特に、早期の感染症の迅速診断において、核酸の解析技術のうちPCR法や等温核酸増幅法などを使用して標的核酸（例えば、自己に存在しない外来遺伝子の特徴的な遺伝子配列やその他の特定配列など）を増幅し解析する技術（以下「遺伝子検査」という。）は、従来の感染症診断技術である培養検査や免疫検査（抗原又は抗体などを使用した検査）などと比べて高感度である。

[0006] 遺伝子検査を用いると、ヒトに感染症を引き起こす原因となるほとんどの

細菌、真菌、原虫、及び、ウイルスなどの原因微生物を、検出又は同定することが可能である。

[0007] 故に、遺伝子検査は、感染症の早期診断に有用な検査方法と考えられており、基幹病院など検査室を持つ大きな病院、衛生研究所、大学や企業などの研究施設、その他の人員が充実した施設など、専用の検査室又は実験室を持つ施設において頻用されている。

[0008] 株式会社富士経済は、「2012臨床検査市場No. 3細菌・遺伝子・POC・病理検査」において「遺伝子検査市場は、2013年度以降も年率2～3%程度の拡大推移が予想される。」と指摘しており、遺伝子検査市場は感染症早期診断の観点のみでなく、経済活動の観点からもその重要度を増すと考えられる。

[0009] 一般の人が受診する機会の多い医療施設、例えば、町の個人病院又は診療所などにおいて、遺伝子検査はほとんど利用されていない。

[0010] その理由は、次のようなものである。第1に、遺伝子検査は、その実施前に試薬調製や核酸の抽出の操作のように煩雑で手間がかかり、施設の負担が大きい。

[0011] 第2に、遺伝子検査を行うには、核酸の抽出のために遠心機やマイクロペットなどの理化学機器や自動化機器が必要になり、初期投資費及び維持管理費が高額となる。

[0012] 第3に、施設内の医師や看護師などが、遺伝子検査に十分に習熟しているとは言えない。

[0013] その一方、POCTに対応した検査キットであって遺伝子検査に関係しないもの（例えば、標識抗体法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、及び、イムノクロマトグラフィー法などによるもの）は、上記のような施設でも広く利用されている。厚生労働省が平成21年12月に発表した集計によれば、インフルエンザ抗原迅速検査キットの生産実績は、前シーズンの生産出荷数が約1300万テストにのぼっている。

[0014] 核酸を標的とする遺伝子検査は、免疫検査より感度が高く、感染症におけ

る早期の迅速診断に非常に有効である。

[0015] 残念ながら、遺伝子検査に使用できる P O C T キット乃至それに準ずるキットは、現在に至るも存在しない。

[0016] このため、小さな施設では、遺伝子検査を行えず、検体を回収し、外部施設による検査にゆだねており、遺伝子検査結果を迅速に得ることはできない。

[0017] 遺伝子検査に使用できる P O C T キット及びそのための方法を開発できれば、小さな施設であっても迅速な遺伝子検査結果を得られることになり、有用性が極めて高い。

[0018] 現在の遺伝子検査法は、大きく次の 3 つの工程に分割できる。第 1 の工程（前処理）では、検体を採取した後、検体中でタンパク質の殻や膜などに抱合された核酸を露出させ、有機溶媒や固相担体などを用いてタンパク質などの夾雑物を洗浄又は分離を行い、核酸のみを単離する。

[0019] 第 2 の工程（標的核酸の増幅）では、分離した核酸を鋳型にして P C R 反応や L A M P 反応などの核酸増幅反応法を用いて標的核酸を増幅する。

[0020] 第 3 の工程（検出及び解析）では、増幅反応中又は反応後に、増幅した標的核酸又はそれに結合するマーカーなどを使用して、定性又は定量する。

[0021] 第 1 の工程を容易にするための自動化機器が存在する。

[0022] しかしながら、第 1 の工程の自動化機器は、高額であるなどの理由から、現在でもあまり普及していない。

[0023] 現実には、自動化機器よりも比較的安価に実施することが可能な用手法により前処理が行われることが多い。

[0024] しかしながら、用手法は、遠心機やマイクロピペットなどの機器の使い方やサンプルの扱い方などの手技の習熟を必要とするなど、実施者に対して操作の負担が重い。

[0025] この用手法を簡便化し P O C T 化できる手法やキットは知られていない。

[0026] 自動化機器において用いられる固相抽出法の代表的なものの 1 つに、B o o m らが報告した方法（以下「B O O M 法」と言う。）（非特許文献 1、特

許文献 1 参照。) がある。

[0027] B O O M 法は、カオトロピック剤の存在下で核酸がシリカビーズに吸着する現象であるカオトロピック効果（非特許文献 2）を基本原理にした、生体試料から核酸を単離するための固相抽出法である。

[0028] この方法によれば、固相担体から核酸を溶出することなく固相担体ごと核酸を P C R 反応液へ添加すること（特許文献 2）もでき、溶出工程の一部を簡略化することもできるが、検査室などの核酸の抽出を実施する環境が整備されていることが前提となる。

[0029] 特許文献 3 は、次のように記載している。即ち、「本発明の目的は、生物材料から有機溶媒を使用することなく、簡便に、短時間に、さらに安全に、かつ再現性よくリボ核酸を抽出する方法並びにそのための試薬を提供することである。リボ核酸の場合、デオキシリボ核酸とは異なり、固相担体に吸着させた後、エタノール等の有機溶媒を全く含まない低塩濃度緩衝液にて洗浄しても、容易に固相担体から溶離せず、加熱することによって初めて溶離が促進される。本発明における第 2 の工程は、第 1 の吸着工程によりリボ核酸が吸着した固相担体を、カオトロピック物質等を除く目的で、低塩濃度緩衝液からなる洗浄液にて洗浄する工程である。ここでいう低塩濃度緩衝液からなる洗浄液とは、エタノール等の有機溶媒及びカオトロピック物質を全く含まない緩衝液を指し、緩衝液としてはトリス系緩衝液が好ましいが、特に限定されない。また、低塩濃度とは、この緩衝液が第 3 の溶出工程に残留した場合においても、R T - P C R 反応などの酵素反応に影響を与えない程度の塩濃度を指し、単なる水も含まれる。本発明においては、1 0 0 m M 以下の緩衝液が好ましい。また、この溶液は界面活性剤を含有しても良く、p H は特に限定されない。また、本発明では加熱により溶出を促進させることが必要である。加熱温度は、リボ核酸に悪影響を及ぼさない程度であれば、特に限定されないが、5 0 ~ 7 0 ° C が好ましい。加熱時間は、3 0 秒 ~ 1 0 分間程度である。このようにして溶出したリボ核酸は、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、逆転写酵素等を使用した酵素反応に直

接使用することができる（一部省略）。」

[0030] 特許文献4は、「しかしながら、本発明者らは、(3)の溶出工程で、80℃以上で、水または低塩濃度水溶液で核酸を溶出することによって、DNAが抽出できることを見出し、本発明の完成に至った。」と記載する。

[0031] これらの文献に記載の方法は、次のような欠点を有し、POCT化しがたい。即ち、第1に、例えば、数 $\mu$ l～数百 $\mu$ l程度の溶液を分取又は添加し、正確なピペット操作によりコンタミネーションを防ぎ、危険な試薬を取扱わねばならず、高難度で煩雑な操作が必要である。

[0032] 第2に、塩又は有機溶媒を含有した洗浄液で複数回洗浄し、乾燥により有機溶媒を確実に取り除く必要がある。さらに、過度の乾燥による核酸と吸着担体の固着に注意しつつ乾燥操作を実施しなければならず、時間及び労力が多大となる。

[0033] 第3に、遠心機やマイクロピペットを用いた操作や、使用する機器の設置場所又は作業スペースを必要とし、実施環境を整えるための初期費用が嵩む。

[0034] 特許文献1：特許第2680462号

特許文献2：特開平10-72485

特許文献3：特許第3812696号

特許文献4：特開2014-30364号

非特許文献1：R Boom et al.、J. Clin. Microbiol.、28(3)、495-503(1990)

非特許文献2：B Vogelstein and D Gillespie、PNAS、76(2)、615-619(1979)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0035] 以上の背景に鑑み、本発明は、遺伝子検査の前処理をPOCT化できる方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0036] 第1の発明に係る前処理方法は、処理対象と、処理対象に含まれる核酸を抽出する抽出液と、シリカ粒子と、濾過材とを接触させ、濾過材に核酸とシリカ粒子との複合体を担持させ、核酸増幅反応液を用いる核酸増幅工程へ送出する前処理方法であって、シリカ粒子の粒径及び核酸増幅反応液中におけるシリカ粒子の濃度を一定範囲内とすることにより、核酸増幅工程に先立つ乾燥工程及び溶出工程を不要とする。
- [0037] 第2の発明に係る前処理方法では、第1の発明に加え、一定範囲は、シリカ粒子濃度が $0.0625 \sim 4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ である。また、第3の発明に係る前処理方法では、第1の発明に加え、一定範囲は、シリカ粒子濃度が $0.0625 \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が $0.01 \sim 10 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積が $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ である。
- [0038] 第4の発明に係る前処理方法では、第1の発明に加え、抽出液に処理対象を添加し、処理対象に含まれる核酸を抽出する抽出工程と、抽出された核酸にシリカ粒子を接触させて、核酸とシリカ粒子との複合体を得ると共に複合体を濾過材に接触させる吸着工程と、濾過材を精製水で洗浄し、洗浄された濾過材を核酸増幅工程に送出する洗浄工程とを含む。また、第5の発明に係る前処理方法では、第1の発明に加え、濾過材を核酸増幅工程に送出するに先立ち、濾過材と複合体とを分離し、分離された複合体を核酸増幅工程に送出する。
- [0039] 第6の発明に係る前処理方法では、第4の発明に加え、吸着工程と洗浄工程とを一度に行う。第7の発明に係る前処理方法では、第4の発明に加え、抽出工程と吸着工程とを一度に行う。また、第8の発明に係る前処理方法では、第4の発明に加え、抽出工程と吸着工程と洗浄工程とを一度に行う。
- [0040] 第9の発明に係る前処理方法では、第1の発明に加え、抽出液に処理対象を添加し、処理対象に含まれる核酸を抽出する抽出工程と、シリカ粒子を担持する濾過材に、抽出された核酸を接触させて、核酸とシリカ粒子との複合

体を得ると共に複合体を濾過材に担持させる吸着工程と、濾過材を精製水で洗浄し、洗浄された濾過材を核酸増幅工程に送出する洗浄工程とを含む。第10の発明に係る前処理方法では、第9の発明に加え、濾過材を核酸増幅工程に送出するに先立ち、濾過材と複合体とを分離し、分離された複合体を核酸増幅工程に送出する。また、第11の発明に係る前処理方法では、第9の発明に加え、吸着工程と洗浄工程とを一度に行う。

### 発明の効果

[0041] 本発明の方法によれば、次のような効果がある。第1に、遺伝子検査における核酸の抽出工程が、簡単、容易、安全、迅速、且つ、安価になり、POCT化を実現可能となる。

[0042] 第2に、安全且つ簡便で容易な操作の組合せにより、従来法よりも処理時間の大幅な短縮を実現し、その上、安価なコストでの核酸の抽出を実施できる。その理由は、洗浄工程の洗浄液として精製水を使用するため、複数の試薬溶液を準備し使い分ける必要がなく簡単な上に、有機溶媒を不要として安全であるためである。

[0043] 第3に、有機溶媒が不要であるから、固相担体の乾燥操作及び核酸の溶出工程も不要となる。要するに、洗浄工程後、ただちに核酸増幅反応へ移行できる。加えて、溶液の移動回数を極力少なくできるから、周辺環境への核酸飛散やクロスコンタミネーションなどのリスクを低減できる。

### 図面の簡単な説明

[0044] [図1]本発明の一定範囲を示すグラフ

[図2]本発明の実施の形態1における前処理方法の各工程図

[図3]本発明の実施の形態2における前処理方法の各工程図

[図4]本発明の実施の形態3における前処理方法の各工程図

[図5]本発明の実施の形態4における前処理方法の各工程図

[図6]本発明の実施の形態5における前処理方法の各工程図

[図7]本発明の実施の形態6における前処理方法の各工程図

### 符号の説明

- [0045] 2 漏斗部  
3 濾過材  
4 第1吸水材  
5 第2吸水材  
6 調整部材  
7 筐体  
10 チューブ  
11 抽出液  
12 処理対象  
13 核酸  
14 シリカ粒子  
15 複合体  
16 精製水

### 発明を実施するための最良の形態

[0046] (発明の概要)

まず、実施の形態の説明に先立ち、発明の要点を述べる。本発明者らは、前述の課題を解決すべく、従来法に多く見られた「核酸の抽出に使用した試料から可能な限り多量の核酸試料を回収する方法」から決別し、核酸増幅反応1テストに最低限必要な核酸量を確保する方法に着目し、上記課題を解決するために鋭意検討を行った。

[0047] 検討の結果、本発明者らは、核酸の前処理方法において、(a)カオトロピック剤、塩、酸、アルカリ、界面活性剤、有機溶媒、酵素、フレンチプレス、熱、及び、超音波などの通常当業者が考えうる方法により処理対象から核酸を抽出する工程（以下「抽出工程」と言う。）を行った後、(b)抽出した核酸を固相担体に吸着させる工程（以下「吸着工程」と言う。）を行い、(c)精製水を用いて固相担体に吸着した夾雑物を洗浄する工程（以下「洗浄工程」と言う。）を行い、(d)洗浄工程後、ただちに核酸を固相担体ごと核酸増幅反応液へ添加することで、核酸増幅工程が実施できることを見

出し、発明を完成させた。

[0048] 更に、本発明者らは、この発明の方法を応用して、濾過材と吸水材を内包した濾過装置と固相担体とを組合せて用いることで、P O C Tが行われるような場所においても核酸の抽出が実施可能であることを見出し、精製水での洗浄と担体ごと核酸増幅反応に添加する方法からなるP O C Tで実施可能な核酸の抽出キットを完成させた。

[0049] (発明の実施の形態)

以下、詳細な検討を示す前に、本発明における結論部分を先に述べる。

[0050] 本発明によれば、前処理方法において、洗浄工程後、ただちに核酸増幅反応を実施することが可能である。

[0051] 核酸が吸着した固相担体と洗浄液などの液体を分離する方法は、遠心分離や遠心カラムを用いた分離、更に、濾過分離などの方法を用いることができる。当然、磁性体を含むシリカ粒子を使用すれば、磁力を用いた分離も可能である。

[0052] 本発明において、固相担体は、シリカ粒子である。

[0053] 本発明によれば、前処理方法における吸着工程で吸着した核酸とシリカ粒子（以下「核酸+シリカ複合体」と言う。）を、洗浄工程後、ただちに核酸増幅反応試薬液と接触させ、核酸増幅反応を開始できる。

[0054] 図1は、本発明の一定範囲を示すグラフである。結論を先に言うと、核酸増幅反応液中に存在するシリカ粒子は、図1の点線内の範囲が好ましい。図1において、横軸は核酸増幅反応液中におけるシリカ粒子濃度であり、縦軸はシリカ粒子の平均粒径である。

[0055] 具体的には、好ましい一定範囲は、シリカ粒子濃度が $0.0625 \sim 4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ （図2の点線で囲まれた範囲）である。

[0056] さらに好ましい一定範囲は、シリカ粒子濃度が $0.0625 \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が $0.01 \sim 10 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積

が  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7 \mu\text{m}^2$  (図2の実線で囲まれた範囲) である。

[0057] 本発明における試料(処理対象)とは、核酸を含有する可能性がある物質であれば良く、例えば、感染症の診断時に採取された検体試料である。

[0058] 感染症の検体試料とは、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、泌尿器系材料(各種尿検体)、生殖器系材料、糞便、血液などの感染症が疑われた際に採取する検体である。

[0059] 核酸とは、DNA(dsDNA、ssDNA)、RNA(dsRNA、ssRNA)などの核酸増幅反応の鋳型となりうると当業者が考えうるもので、原因微生物に由来する核酸や、検体試料を産する生物に由来する内在性の核酸も含みうる。

[0060] 更に、感染症の診断時に採取された検体試料だけではなく、様々な場所にてサンプリングされる核酸を含有した試料に対する利用も含みうる。

[0061] 例えば、食品検査(食中毒原因菌などや、組換え遺伝子検出)、農場での作物の感染症検査、及び、飲み水や工場などでの水質検査などに利用することが考えられる。

[0062] しかしながら、これらは例示であり、本発明は、これのみに限定されているわけではない。

[0063] 本発明における核酸試料は、 $1 \mu\text{g}$ 以下の核酸量を処理することを想定しており、核酸増幅反応液へは、 $1 \text{ ng} \sim 100 \text{ ng}$ 、好ましくは $1 \text{ pg} \sim 10 \text{ ng}$ 程度の核酸量を持込むことを想定している。

[0064] 本発明において、吸着工程は、カオトロピック剤、塩、酸、アルカリ、界面活性剤、有機溶媒、酵素、フレンチプレス、熱、及び、超音波などを用いた核酸の抽出方法により得られた核酸含有溶液に、直接、又は、その溶液を希釈又は置換した後、その溶液中にシリカ粒子を添加することで実施する。

[0065] 前処理における吸着工程を抽出工程と同時に実施することもできる。

[0066] 本発明において、洗浄工程に用いる洗浄液は、精製水である。この精製水とは、様々な手法で精製された水であるが、通常当業者が考える核酸増幅反

応を実施する際に試薬調製にも利用可能な水を含む。例えば、有機溶媒を含有せず、高濃度の塩などの核酸増幅反応阻害物質を含まない水である（以下「精製水」と言う）。

[0067] 本発明において、洗浄工程は、吸着工程後、適量の精製水による洗浄で実施される。洗浄回数は、限定されないが、1～数回洗浄すれば良い。

[0068] 洗浄工程後、核酸＋シリカ複合体は、ただちに核酸増幅反応試薬液へ添加される。

[0069] しかしながら、吸着工程において、溶媒に精製水を用いた場合、又は、吸着工程後に得られた核酸含有溶液を精製水を用いて希釈又は溶液置換した場合において、洗浄工程を省くことが可能である。

[0070] 本発明において、濾過分離の濾過材は、メンブレンフィルターなどの通常当業者が選択するものの内、核酸の吸着が少なく、前述したシリカ粒子を濾過できるポアサイズを保持するものならば良い。

[0071] 例えば、ポリ乳酸、セルロース、PTFEなどを原料とした膜、メンブレンフィルター、織布、不織布などが挙げられる。

[0072] 形態も、膜状のものに限定されず、袋状、筒状のものなどを濾過に利用できる形態ならば可能である。

[0073] 例えば、メルク（日本ミリポア）社製のオムニポア（商標）メンブレンフィルター（JCWP）などが好適である。

[0074] 本発明において、濾過分離は、吸水材を内包した濾過装置を用いることでPOCTのような条件下での核酸の抽出に対応することができる。

[0075] 吸水材を内包した濾過装置とは、洗浄液などの溶液の流れが一方向で、その上、使用した溶液を内部に設置した吸水材により吸水し、外部へ液体の飛散を抑制する装置である。

[0076] 本発明は、実施の形態及び実施例に特に説明が無い場合には、当業者にとって標準的な技術に準じて実施した。

[0077] 例えば、Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL FOURTH EDITION (Green and

Sambrook、Cold Spring Harbor Laboratory Press)、細胞工学別冊バイオ実験イラストレイテッドシリーズ(学研メディカル秀潤社)、又は、改訂第3版遺伝子工学実験ノート(田村隆明／編、上下巻、羊土社)などに記述された方法を参考にして実施した。

[0078] 更に、市販されている試薬や機器を用いる場合には、特に説明を記述しない場合には、付属のプロトコルに準じて行った。

[0079] 下記に示す、実施例は、本発明を詳細に説明するための発明の一態様の例示であり、発明を限定するものではない。

[0080] (実施例1)

＜材料及び方法＞

(精製水)

本実施例における精製水は、Direct-Q(登録商標)5UV超純水製造装置(メルク株式会社)から得られた超純水を利用した。

[0081] [表1]

| シリカ粒子<br>番号 | シリカ粒子<br>(品名、製品番号、カタログ番号など)   | 製造又は販売会社              |
|-------------|-------------------------------|-----------------------|
| 1           | : 30925-12                    | ナカライテスク株式会社           |
| 2           | : Microsilica(登録商標) Grade 971 | エルケムジャパン株式会社          |
| 3           | : SIO07PB                     | 株式会社 高純度化学研究所         |
| 4           | : s5631                       | シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社   |
| 5           | : HS-301                      | 新日鉄住金マテリアルズ株式会社マイクロン社 |
| 6           | : SIO14PB                     | 株式会社 高純度化学研究所         |
| 7           | : SIO08PB                     | 株式会社 高純度化学研究所         |
| 8           | : NanoSilica Powder Grade 999 | エルケムジャパン株式会社          |
| 9           | : SR-NP(200P)                 | エムテック化学株式会社           |
| 10          | : SR-NP1(200P1)               | エムテック化学株式会社           |
| 11          | : TECNAPOW-SIO2-100G          | エア・ブラウン株式会社(TECNAN社)  |
| 12          | : 二酸化ケイ素, 99.9%               | 和光純薬工業株式会社            |

[0082] (固相担体)

本実施例における固相担体は、シリカ粒子である。(表1)に、使用したシリカ粒子の品名、製品番号、カタログ番号などの製品を識別できる情報と

、製造又は販売会社の情報を示す。カタログや製品に添付されていた試験成績書などの情報から、平均粒径が大きなものから順番に番号を付して示してある。しかしながら、（表１）は、実施例で使用したシリカ粒子を単に例示しているのみで、本発明におけるシリカ粒子を限定するものではない。

[0083] （核酸試料）

本実施例における核酸試料は、マイコプラズマ肺炎の病原体である *Mycoplasma pneumoniae* 由来 p1 遺伝子を検出対象とした。

核酸試料は、*Mycoplasma pneumoniae* 由来 p1 遺伝子の断片を、常法を用いて pUC57 プラスミド DNA に組み込みクローニングすることで、作製した。

[0084] 作製した核酸試料は、TE 緩衝液を用いて 3 pg/μl の濃度に調製した。

[0085] 調製後、核酸試料は、リアルタイム定量 PCR 時の検量線作成の為に標準試料などとして利用した。

[0086] 調製した核酸試料の一部は、分取した後、TE 緩衝液を用いて更に希釈して、3 pg/50 μl の濃度に調製し、核酸の抽出を実施する際の出発材料として利用した。

[0087] （プライマー及びプローブ）

プライマーは、Ievenらの報告（The Journal of Infectious Diseases、1996；173；1445－52）に記載されていた、「P1 アドヘシン遺伝子に対するプライマーセット（5'－GCCACCCCTCGGGGGCAGTCAG－3' 及び 5'－GAGTCGGGATTCCCCGCGGAGG－3'）」を使用した。

[0088] プローブは、前述のプライマーセットの増幅産物から、特異的な領域を選択し、当業者が通常使用する方法で作製した。

[0089] プローブの作製は、日鉄住金環境株式会社 J－BIO21 センターに QProbe（登録商標）の受託合成を依頼することで行った。

[0090] （その他の試薬類の準備及び調製）

その他の試薬類の調製は、通常市販されている物を利用し、常法通りに調製をした。

[0091] B O O M法を再現又は一部を再現する場合の細胞溶解液は、「溶解用緩衝液 L 6」を使用した。

[0092] 「溶解用緩衝液 L 6」は、特許文献 1 に記載された方法に準じて調製した。

[0093] (核酸増幅反応及びその解析方法)

核酸増幅反応は、1 チューブあたり 20  $\mu$  l の反応液量で、リアルタイム定量 P C R を行った。

[0094] 装置は、L i g h t C y c l e r (登録商標) n a n o s y s t e m (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いた。

[0095] 反応プロファイルは、初期変性プログラムとして 95℃ : 120 秒、増幅プログラムとして 95℃ : 10 秒、68℃ : 10 秒、及び、72℃ : 10 秒を 40 サイクルで実施した。

[0096] 熱融解プログラムは、68℃ から 95℃ を選択した。

[0097] リアルタイム定量 P C R は、インターカレーター法とプローブ法を用いて実施した。

[0098] インターカレーター法は、色素として、20×E v a G r e e n (登録商標) D y e (B i o t i u m i n c. ) を、プローブ法は、Q P r o b e (登録商標 ; 日鉄住金環境株式会社) を用いて実施した。

[0099] 反応終了後、得られた増幅曲線が供試した D N A 由来の目的産物であるかの確認は、熱融解プログラムの結果から行った。

[0100] 実施例において、核酸増幅反応は、特に記載しない場合にはインターカレーター法を用いて実施した。

[0101] インターカレーター法において、増幅曲線の解析は、装置専用の解析ソフトウェアの「A u t o m a t i c Q u a n t i f i c a t i o n」を選択し、検量線から P C R 効率や  $R^2$  の値が正常の範囲かを常法通り確認した後、得られた C t 値と定量値から行った。

[0102] 一方、QProbeのような消光するタイプのプローブ法の解析は、LightCycler nanosystemに備え付けの解析法が対応していなかったため、特許第4724380号に記載された方法に準じて、生データから、直接解析を行い、Ct値と定量値から行った。

[0103] 解析に利用したデータは、複数個の同条件のサンプルから得られたデータを平均したものを使用した。

[0104] 以下、事項1～5の細目について、具体的に説明する。各事項では、技術的な課題、対応策、結果及び考察を示す。

事項1：洗浄液を精製水に変更した実施の影響

事項2：シリカ粒子を添加することの核酸増幅反応への影響

事項3：シリカ粒子の添加量の変化による核酸増幅反応への影響

事項4：シリカ粒子の使用量による核酸の吸着能と核酸増幅反応への影響

事項5：吸着工程におけるカオトロピック剤の影響及び簡易な濾過装置を用いた際の実施

[0105] (事項1)

事項1では、BOOM法（特許文献1に記載されているプロトコルY（以下「プロトコルY」と言う。）において、洗浄工程の洗浄液として使用される「L2」、「70%エタノール」、及び、「アセトン」を、全て精製水に変更したり、その他の条件をプロトコルYに準じて実施することが可能か調査した。

[0106] プロトコルYの「出発材料」として、3pg/50μlの濃度に調製した核酸試料を用いた。

[0107] シリカ粒子として（表1）のシリカ粒子番号4を使用し、特許文献1の材料及び方法に記載された「シリカ粗材（SC）の懸濁液」に準じて調製した。

[0108] 抽出後、得られた溶出液の2μlを分取して、18μlのPCR試薬液に添加し、全量が20μlのPCR反応液になるように調製した。

[0109] 調製したPCR反応液にリアルタイム定量PCRを適用し、定量値を得た

。

[0110] 得られた定量値を25倍して、1チューブあたりで回収できた核酸量とし、それらの平均を求めた。

[0111] 出発材料に含有されていた核酸量3pgを100%とした場合のパーセンテージを求め、回収率(%)とした。

[0112] [表2]

|      | DNA回収率(%)             |                       |
|------|-----------------------|-----------------------|
|      | 1チューブあたりの<br>平均回収率(%) | 溶出液10μlあたりの<br>回収率(%) |
| 項目1  | 1.99                  | 0.40                  |
| 従来例  | 78.59                 | 15.72                 |
| 陽性対照 | 100.00                | 20.00                 |

[0113] (表2)には、1チューブあたりの平均回収率(%)と、溶出液10μlあたりの回収率(%)とが示されている。

[0114] (表2)において、陽性対象は、出発材料に含有していた3pgを100%回収した場合の値を、参考として記載している。

[0115] 従来例として、BOOM法をプロトコルYに準じて実施した。

[0116] 得られた定量値に基づき、事項1と同様に回収率(%)を求めた。(表2)には、1チューブあたりの平均回収率(%)と、溶出液10μlあたりの回収率(%)とが、事項1の結果とともに併記されている。

[0117] (表2)から、洗浄液を全て精製水に変更した場合は、従来例では78.59%だった回収率が、事項1では1.99%と、顕著に核酸の回収率が低下することが分かる。

[0118] 即ち、単純に洗浄液を精製水に変更することは、一般の溶出操作と同様の意味を持ち、シリカ粒子に吸着した核酸まで洗い流れてしまうことが改めて確認できる。

[0119] データを示してはいないが、出発材料が3pgと少量の核酸を扱う場合、出発材料をμg単位で扱う時よりも回収率が低下する傾向があった。

[0120] 事項1においてPCR反応液は、最大で10μlまでの溶出液を添加することが可能と推測でき、それでも3pgの0.40%である約12fgしか

核酸増幅反応液中へ持ち込むことができないと推論される。

[0121] 一方、従来例は、同様に考察すると、3 pgの15.72%である約470 fgを持ち込める。

[0122] 以上から、BOM法のプロトコルYにおいて、単純に洗浄液を水に変更するだけでは、十分な核酸量を得ることができないことが分かる。

[0123] (表2)における従来例の結果は、3 pgの核酸量を含有した出発材料から、5～15%前後回収できるならば、1テストの核酸増幅反応においては十分に検出可能な量であることを示している。

[0124] 本発明において、低濃度の核酸溶出液が得られた場合において、エタノール沈殿法や濃縮カラムなどによる濃縮操作又は溶液置換などの操作は、操作の煩雑さが増してしまうため、選択しにくい。

[0125] 以上の結果から、BOM法の洗浄工程の洗浄液を精製水に単純に置換えて実施する方法は、出発材料の核酸量が少ない場合や低濃度の核酸溶出液が得られた場合には、不十分であると考察できる。

[0126] 一方、精製水による洗浄が可能ならば、様々な利点が得られる。

[0127] 従来例に示したBOM法などでは、純粋な核酸溶液を得るために、夾雑物を取り除く、又は、吸着に利用した塩を取り除くために、複数の洗浄液で複数回の洗浄操作を行い、加えて、乾燥操作を行うなど、煩雑で手間のかかる操作が必要である。

[0128] 精製水による洗浄が可能なら、これらの操作を大幅に省ける。加えて、核酸+シリカ複合体は湿潤状態で次の核酸の増幅工程に持ち込めるため、乾燥によるシリカ粒子への核酸の固着の強化を心配する必要がない。さらに、単純な操作での核酸を抽出できるから、遺伝子検査などの操作に習熟していない実施者に対しても容易な操作を提供できるし、乾燥操作による核酸の固着を心配する必要がないため、核酸吸着能が高い小さなシリカ粒子も有効に利用できる。

[0129] 小さな粒径を持つシリカ粒子を有効に利用することができるならば、固相担体としてのシリカ粒子は、使用量を大幅に減らせる。

## [0130] (事項2)

事項2では、全量 $20\mu\text{l}$ のリアルタイム定量PCR反応液を用いた反応系において、シリカ粒子( $5\mu\text{g}/\text{tube}$ )と核酸試料( $3\text{pg}/\text{tube}$ )を添加して得られたCt値を比較することで、シリカ粒子を添加することの核酸増幅反応への影響を調査した。

[0131] Ct値の比較対照のため、陽性対照(シリカ粒子( $0\mu\text{g}/\text{tube}$ )、核酸試料( $3\text{pg}/\text{tube}$ ))と、陰性対照(シリカ粒子( $0\mu\text{g}/\text{tube}$ )、核酸試料( $0\text{pg}/\text{tube}$ ))を準備した。

[0132] 陽性対照においては、Ct値の基準とするため、得られたCt値から平均値を求め、その値を100%とした。各シリカ粒子から得られたCt値は同様に平均値を求め、陽性対照の平均値で割り、100を掛けることで、Ct値の変化割合(%)とした。

[0133] 事項2では、事項1とは異なり、全てのシリカ粒子を市販されている状態のまま(例えば、使用する粒子の粒径の範囲を揃える操作や表面の修飾など、市販された状態のシリカ粒子から改質操作を実施せずに)で用い、設定した使用量を分取しやすい適当な濃度でシリカ粒子懸濁液を調製して使用した。

## [0134] (事項3)

事項3では、事項2に準じ、各シリカ粒子の添加量の変化による核酸増幅反応への影響を調査した。

[0135] シリカ粒子を、PCRチューブあたりに $10\mu\text{g}$ 、 $20\mu\text{g}$ 、及び、 $40\mu\text{g}$ を添加して、全量 $20\mu\text{l}$ のリアルタイム定量PCR反応液を調製して実施した。

[0136]

[表3]

| シリカ粒子<br>番号 | Ct値の変化割合(%)                         |                                     |                                     |                                     |
|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|             | 5 $\mu$ g/tube                      | 10 $\mu$ g/tube                     | 20 $\mu$ g/tube                     | 40 $\mu$ g/tube                     |
|             | 0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l <sup>反応</sup> | 0.50 $\mu$ g/ $\mu$ l <sup>反応</sup> | 1.00 $\mu$ g/ $\mu$ l <sup>反応</sup> | 2.00 $\mu$ g/ $\mu$ l <sup>反応</sup> |
| 1           | 101.3                               | 100.8                               | 100.8                               | 100.7                               |
| 2           | 101.2                               | 101.0                               | 100.8                               | 100.9                               |
| 3           | 101.2                               | 100.9                               | 99.5                                | 102.0                               |
| 4           | 102.6                               | 113.3                               | n/a                                 | n/a                                 |
| 5           | 102.2                               | 102.2                               | 102.7                               | 105.0                               |
| 6           | 102.1                               | 102.5                               | 102.3                               | 103.5                               |
| 7           | 101.9                               | 107.7                               | 116.4                               | 158.3                               |
| 8           | 105.2                               | 111.3                               | 133.6                               | n/a                                 |
| 9           | 106.3                               | 119.2                               | 154.1                               | n/a                                 |
| 10          | 101.3                               | 102.1                               | 104.2                               | 113.5                               |
| 11          | 110.4                               | 147.5                               | n/a                                 | n/a                                 |
| 12          | 104.3                               | 115.6                               | 132.4                               | n/a                                 |
| 陽性対照        | 100.0                               | 100.0                               | 100.0                               | 100.0                               |
| 陰性対照        | 150.9                               | 136.9                               | 132.4                               | 130.0                               |

[0137] (表3)は、事項2及び事項3の結果をまとめて示す。

[0138] 事項2については、(表3)を縦方向に比較することで、同じ使用量条件下での使用した各シリカ粒子の違いを観察できる。

[0139] 事項3については、(表3)の各シリカ粒子を横方向に比較することで、そのシリカ粒子がリアルタイム定量PCR反応液中に存在する量の変化により、リアルタイム定量PCR反応へ及ぼす影響を観察できる。

[0140] (表3)において、「n/a」とあるのはデータが無いことを、「※1」とあるのはリアルタイム定量PCR反応液 $\mu$ lあたりのシリカ粒子量( $\mu$ g)を、それぞれ示す。

[0141] 事項2の結果(5  $\mu$ g/tube)は、シリカ粒子がリアルタイム定量PCR反応液1  $\mu$ lあたりに0.25  $\mu$ gが含有しているだけでも、リアルタイム定量PCR反応に大きな影響(Ct値の変化が10%を超える)を及ぼすものがあることを示す。

[0142] 使用したもののうち、Ct値の変化割合が2%以下に抑えられているものもあるなど、ほとんどCt値のバラツキの範囲内であると評価しても良いものもあった。この結果を参考にして、事項3に進んだ。

[0143] 事項3では、事項2の結果を受けて、シリカ使用量を増加させて比較した

。

- [0144] 事項3の結果は、核酸吸着能が高い平均粒径の小さなシリカ粒子ほど使用量の増加とともにCt値の変化割合が大きくなる傾向があり、平均粒径の大きな粒子はあまり変化が観察されない傾向があることを示す。
- [0145] 事項1の従来例のシリカ粒子の使用量は、BOM法のプロトコルYを再現した「シリカ粗材（SC）の懸濁液」の場合で約30～50%のシリカ粒子懸濁液となった。それゆえ、抽出を実施する際に1チューブに存在したシリカ粒子量は、約12～20mg程度と推測される。
- [0146] 使用したシリカ粒子の差異を考慮して少なく見積もっても、BOM法を再現するには1mg程度のシリカ粒子が必要と考察される。
- [0147] 特許文献2では、核酸が吸着したまま固相担体を懸濁液にした後、2/5量を直接添加してPCR反応を実施している。
- [0148] その際、PCR反応液中に存在するシリカ粒子は、BOM法では少なくとも200μg程度のシリカ粒子が50μlのPCR反応液（4.00μg/μl）に存在していた。
- [0149] しかしながら、事項2及び事項3では、多くても40μgのシリカ粒子が20μlのリアルタイム定量PCR反応液（2.00μg/μl）に存在していた。
- [0150] 事項2及び事項3の結果から、BOM法では使用した固相担体の全てを次の操作に持込む場合、シリカ粒子の使用量が多いため核酸増幅反応を強く阻害する可能性があると考えられる。
- [0151] BOM法は、固相担体量が多いため、核酸を溶出するか、溶出しなければ一部の担体を分取して、使用量を調製する必要があるなど、1μg以下の核酸量を含む出発材料を扱うにはやや無駄が多い方法であると言えよう。また、分取する操作が必要で、煩雑であるため、核酸の抽出などの核酸の取扱いに習熟していない実施者に対して難度の高い操作が要求される。
- [0152] BOM法は、感染症の迅速診断などのように検体中に含有される核酸量が1ag～500ng程度の場合や、簡便で迅速な操作が求められている場

合、又は、単純で解り易い操作が求められている場合などには、利用し難いと考えられる。

[0153] 事項 2、3 の結果から、核酸の抽出は、シリカ粒子量を調整して、必要な核酸量を確保しつつ、更に、核酸増幅反応を阻害せず又はほとんど阻害しない使用範囲を限定することができるならば、単純で容易な操作のみで迅速に実施可能であると考察される。

[0154] (事項 4)

事項 4 では、例示したシリカ粒子が、実際に前処理に利用できるかを調査する。洗浄工程までは、事項 1 に準じて実施する。

[0155]  $40\ \mu\text{l}$  の精製水中に、 $1.25\ \mu\text{g}$ 、 $2.5\ \mu\text{g}$ 、 $5\ \mu\text{g}$ 、 $10\ \mu\text{g}$ 、 $20\ \mu\text{g}$ 、 $40\ \mu\text{g}$ 、及び、 $80\ \mu\text{g}$  のシリカ粒子が含有されるようにシリカ懸濁液を調整した。

[0156] 洗浄工程後、ただちに  $5\ \mu\text{l}$  精製水で核酸+シリカ複合体を懸濁し、核酸+シリカ複合体の懸濁液を得た。

[0157] 核酸+シリカ複合体懸濁液の全量を  $15\ \mu\text{l}$  のリアルタイム定量 PCR 反応試薬へ添加して、リアルタイム定量 PCR 反応を行った。

[0158] 反応終了後、各使用量条件下における各シリカ粒子の定量値は、平均を求めた。

[0159] 求めた平均の定量値は、出発材料から直接得られた定量値の平均を  $100\%$  とした場合に対するパーセンテージを求め、回収率とした。

[0160]

[表4]

| シリカ粒平均粒径<br>子 ( $\mu\text{m}$ ) <sup>※2</sup> | 前処理後の回収率                                              |                                                      |                                                     |                                                     |                                                     |                                                     |                                                     |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                               | 1.25 $\mu\text{g}$<br>/tube                           | 2.5 $\mu\text{g}$<br>/tube                           | 5 $\mu\text{g}$<br>/tube                            | 10 $\mu\text{g}$<br>/tube                           | 20 $\mu\text{g}$<br>/tube                           | 40 $\mu\text{g}$<br>/tube                           | 80 $\mu\text{g}$<br>/tube                           |
|                                               | 0.0625 $\mu\text{g}$<br>/ $\mu\text{l}$ <sup>※1</sup> | 0.125 $\mu\text{g}$<br>/ $\mu\text{l}$ <sup>※1</sup> | 0.25 $\mu\text{g}$<br>/ $\mu\text{l}$ <sup>※1</sup> | 0.50 $\mu\text{g}$<br>/ $\mu\text{l}$ <sup>※1</sup> | 1.00 $\mu\text{g}$<br>/ $\mu\text{l}$ <sup>※1</sup> | 2.00 $\mu\text{g}$<br>/ $\mu\text{l}$ <sup>※1</sup> | 4.00 $\mu\text{g}$<br>/ $\mu\text{l}$ <sup>※1</sup> |
| 1                                             | 74.000                                                | n/a                                                  | n/a                                                 | -                                                   | -                                                   | -                                                   | -                                                   |
| 3                                             | 5.366                                                 | n/a                                                  | n/a                                                 | +                                                   | -                                                   | ++                                                  | +                                                   |
| 4                                             | 3.450                                                 | +                                                    | n/a                                                 | ++                                                  | +                                                   | -                                                   | -                                                   |
| 5                                             | 2.550                                                 | n/a                                                  | +                                                   | +++                                                 | ++                                                  | +++                                                 | +                                                   |
| 6                                             | 1.900                                                 | n/a                                                  | +                                                   | ++                                                  | ++                                                  | +++                                                 | ++                                                  |
| 7                                             | 0.670                                                 | -                                                    | n/a                                                 | ++                                                  | +                                                   | +                                                   | -                                                   |
| 8                                             | 0.400                                                 | -                                                    | -                                                   | +                                                   | +                                                   | -                                                   | -                                                   |
| 9                                             | 0.286                                                 | ++                                                   | +++                                                 | ++                                                  | +                                                   | -                                                   | -                                                   |
| 10                                            | 0.229                                                 | ++                                                   | n/a                                                 | ++                                                  | -                                                   | -                                                   | -                                                   |
| 11                                            | 0.014                                                 | +++                                                  | +                                                   | ++                                                  | -                                                   | -                                                   | -                                                   |
| 12                                            | 0.012                                                 | ++                                                   | n/a                                                 | +                                                   | -                                                   | -                                                   | -                                                   |

+++ : 20%以上～  
 ++ : 10%以上～20%未満  
 + : 5%以上～10%未満  
 - : ～5%未満

[0161] 回収率は、5%以上を評価対象として評価し、評価基準と共に（表4）にまとめた。

[0162] （表4）において、「n/a」とあるのはデータ無し、「※1」とあるのはリアルタイム定量PCR反応液1  $\mu\text{l}$ あたりのシリカ粒子量（ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）を示す。「※2」とあるのはシリカ粒子の平均粒径を示し、購入した製品に添付された検査成績書によるもの、あるいは検査成績書が添付されていない場合はカタログやホームページ等に公開されている平均粒径を記載してある。

[0163] 事項4における回収率は、精製水を用いた洗浄工程を行う前処理方法においてシリカ粒子の性質を総合して評価するためのものであり、前処理工程から増幅反応工程においてシリカ粒子が及ぼす影響を表す。

[0164] 例えば、前処理において、吸着工程ではシリカ粒子の核酸吸着能を、洗浄工程では精製水に曝された場合の核酸保持能などを、それぞれ示す。

[0165] 核酸増幅反応において、リアルタイム定量PCR反応の阻害率、及び、リアルタイム定量PCR反応における蛍光検出の阻害率などを総合して評価したものとなる。

[0166] 回収率は、（表4）に示した「+」の数が多いものほどより良い。

- [0167] 10%以上の結果（「++、+++」）は、1.25～2.5  $\mu\text{g}$ /チューブの条件下では粒径が0.3  $\mu\text{m}$ 近辺からそれ以下の粒径の範囲に、5  $\mu\text{g}$ /チューブの条件下では粒径が0.01～3  $\mu\text{m}$ の範囲で、10～20  $\mu\text{g}$ /チューブの条件下では粒径が1～5.3  $\mu\text{m}$ の範囲で、40  $\mu\text{g}$ /チューブの条件下では粒径が1.9  $\mu\text{m}$ 近辺の範囲で観察された。
- [0168] 一方、80  $\mu\text{g}$ /チューブの条件下では、実施した条件の範囲で良好な結果を示したものは観察されなかった。
- [0169] 事項4では、固相担体であるシリカ粒子の使用量と粒径との関係から、結果が大きく異なる場合があることが示された。
- [0170] つまり、シリカ粒子の使用量を調製して使用することで、精製水を洗浄液として使用し、更に、使用した全ての核酸+シリカ複合体を核酸増幅反応試薬に添加しても、核酸増幅反応1テストに必要な核酸量を十分に確保することができ、更に、核酸増幅反応を阻害するなどの影響を及ぼさないことが示唆された。
- [0171] 事項4において、良好な結果を示した粒径の多くは、既にBOM法など多くの方法で、特に好適な条件とされている1～10  $\mu\text{m}$ の粒径を持つものであった。
- [0172] なお、BOM法などの従来法（例えば、特許文献1～4）は、0.05  $\mu\text{m}$ ～500  $\mu\text{m}$ の範囲のシリカ粒子を使用可能と記載しているが、特許文献1に「実際に、シリカ粒子のNA含有量は粒子が小さければ小さいほど高いが、特にNA含有量の高い出発材料の場合、及びNA分子が比較的長い場合は、過度に小さいシリカ粒子を使用すると、形成されるNA-シリカ複合体をそれ以上有効に再分散することができなくなる。換言するならば、結合したNAを純粋な形で複合体から回収することができない。」（「NA」は核酸を意味する）と記載されており、小さな粒径の使用を避けているものと考えられる。加えて、「シリカ粗材（SC）の懸濁液」の調製時に、1  $\mu\text{m}$ 以下の粒子を可能な限り除く操作も行っている。
- [0173] しかしながら、事項4では、平均粒径が1  $\mu\text{m}$ 以下のシリカ粒子において

も良好な結果が得られることが分かった。

[0174] 本発明者らは、事項 2、3、及び、4 を、インターカレーター法を用いた再現実験及び Q P r o b e を用いたプローブ法での再現実験を繰り返して行うことで、C t 値の変化割合が少なくリアルタイム定量 P C R 反応に及ぼす影響が少なく、且つ、高い回収率が得られ良好な結果を示したシリカ粒子の粒径と使用量の関係を調査した。

[0175] その結果、図 1 に示すように、本発明者らは、核酸増幅工程にも影響を及ぼさず且つ十分な核酸量を確保できるシリカ粒子の使用範囲（一定範囲）を特定することに成功した。。

[0176] 繰り返しになるが、好ましい一定範囲は、図 1 の点線で示すように、シリカ粒子濃度が  $0.0625 \sim 4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が  $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積が  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8 \mu\text{m}^2$  である。

[0177] さらに好ましい一定範囲は、図 1 の実線で示すように、シリカ粒子濃度が  $0.0625 \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が  $0.01 \sim 10 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積が  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7 \mu\text{m}^2$  である。

[0178] 以上の結果を得た本発明者らは、カオトロピック効果による核酸とシリカ粒子の吸着現象だけではなく、シリカ粒子の構造がもたらす静電気力や分子間力などの他の現象が有効であるという仮説を立てた。

[0179] 本発明者らは、この仮説の真偽を確かめるため、カオトロピック剤などの塩、その他の静電気力を高める塩、あるいは有機溶媒などを一切含めずに、抽出を有効に実施できるかどうか調査した。

[0180] 本発明者らは、カオトロピック剤などの塩、その他の静電気力を高める塩、あるいは有機溶媒などを一切使用しなくとも抽出を有効に実施できるという結果を得た。但し、カオトロピック塩を使用する場合に比べると、若干回収率が落ちているが、実用上十分な結果が得られた。更に、濾過分離を併用すると、抽出がより効果的になる点が判明した。

[0181] （事項 5）

事項５では、吸着工程におけるカオトロピック剤の影響を調査し、図２（e）に示す簡易な濾過装置を用いて実際にＰＯＣＴ化できるかどうか検討した。

[0182] 図２（e）に示すように、この濾過装置は、矩形箱状をなす筐体７と、筐体７の上部中央に固着される漏斗部２とを備え、筐体７の内部に、濾過材３、第１吸水材４、第２吸水材５及び調整部材６とからなる層構造体とを備える。

[0183] 筐体７としては、市販のプラスチック製箱のように、加工が容易な部材を用いると良い。本例では、筐体７として、株式会社良品計画製のＰＰ小型石鹼ケース（商品番号４７６９７６８１、約６４ｍｍ×５２ｍｍ×２０ｍｍ）を用いたが、勿論、これは単なる例示であり、種々変更しても本発明の保護範囲に包含される。

[0184] 漏斗部２は、処理対象を含む液を滴下し、無駄なく濾過材３へ導くための部材であり、滴下が容易であれば省略しても良い。漏斗部２としては、例えば、マイクロピペットのチップや、検査薬などに多く見られる形状のノズル部などを流用してもよい。

[0185] 本例では、筐体７の上面に５ｍｍ程度の孔を開設し、その孔に漏斗部２の下端部をねじ込むことにより、漏斗部２を筐体７に固着した。

[0186] 本例の層構造体は、次の濾過材３、第１吸水材４、第２吸水材５及び調整部材６とからなる。

[0187] 濾過材３として、本例では、メルク（日本ミリポア）社製のオムニポアメンブレンフィルター（ＪＣＷＰ）を、カールクラフト社製のワンホールパンチ（孔径７ｍｍ）で打ち抜いた円状の膜片を用いた。濾過材３の直径は５～７ｍｍ程度、濾過材３のポアサイズは１～１０μｍ程度が適当である。

[0188] 濾過材３は、漏斗部２の下端部などから溶液１が漏出しない程度に十分に密着させて設置する必要がある。

[0189] 第１吸水材４として、本例では、アドバンテック社製の生産用濾紙（Ｎｏ．６０）を２５．０ｍｍ×２５．０ｍｍに切断し、濾過材３の直下に１枚設

置した。

- [0190] 第2吸水材5として、GEヘルスケア・ジャパン株式会社製のWhatmanガラス繊維濾紙角形グレードGF/Dを25.0mm×25.0mmに切断し、第1吸水材4の下方に2枚設置した。
- [0191] さらに、調整部材6として、第2吸水材5の下方に、プラスチックの板を重ねたが、調整部材6は省略できる場合もある。
- [0192] 事項5の吸着工程において、50μlの出発材料を、1.5mlチューブに分取した600μlの精製水に添加し、そこへ、40μlのシリカ粒子懸濁を添加し、直ぐに転倒混和（5秒間）した後、室温にて5分間放置し、再度、転倒混和（5秒間）した。その後、均質化させた核酸とシリカ粒子を含有した溶液を、図2（e）に示す濾過装置の漏斗部2に全量を滴下して、濾過分離を行った（1～2分程度）。濾過分離後、核酸+シリカ複合体を得た。事項5で使用したシリカ粒子懸濁液は、精製水に（表1）に示したシリカ粒子番号6を添加して、1.75μg/μlの濃度に調製することで準備した。
- [0193] 洗浄工程は、得られた核酸+シリカ複合体に600μlの精製水に添加することで行った。
- [0194] 洗浄工程後、核酸+シリカ複合体は、濾過材ごと全てをピンセットで回収し、ただちに68μlリアルタイム定量PCR反応試薬に添加（核酸+シリカ複合体と濾過材の体積を約2μl分として、全量で70μlのリアルタイム定量PCR反応液を調製）して、核酸増幅反応に使用した。
- [0195] 同様に、陽性対照は、出発材料を50μl精製水に変更して事項5を行い、抽出後得られたシリカ粒子と濾過材を核酸増幅反応試薬に添加し、更に、3pg核酸試料を直接添加して、全量70μlのリアルタイム定量PCR反応液を調製した。
- [0196] 陰性対照は、事項5からシリカ粒子を除いた実施を陰性対照1（固相担体無し）、陽性対照から核酸試料を除いた実施を陰性対照2（核酸試料無し）とした。

[0197] [表5]

|        | 回収率(%) |       |
|--------|--------|-------|
|        | 平均     |       |
| 項目 5   | 37.76  | 26.00 |
|        | 34.13  |       |
|        | 21.32  |       |
|        | 10.80  |       |
| 陰性対照 1 | 2.13   | 1.28  |
|        | 0.43   |       |
| 陰性対照 2 | 0.99   | 0.52  |
|        | 0.05   |       |
| 陽性対照   | 100.00 |       |

[0198] これらの結果は、事項 4 と同様に回収率を求め、求めた回収率とその平均を（表 5）に示した。

[0199] 事項 5 における回収率は、平均 26%と本発明者らが予想した回収率よりも高い結果となった。

[0200] この結果は、市販されているシリカ基質を保持した前処理用ミニカラムに溶出操作後も残留していると考えられている 5 – 10%の核酸量（Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL FOURTH EDITION (Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)、Vol. 1、p 4 を参照）よりも、残留し溶出されていない核酸量（本発明では回収率）が 2 倍以上も高い数値である。

[0201] 陰性対照 1 では、残留し溶出されていない核酸量（本発明では回収率）は、回収率が平均 1.28%と低く、シリカ粒子が存在しなければ、核酸増幅反応の鋳型として十分な核酸量を得ることが難しいことが示された。

- [0202] これらの結果から、本方法が核酸を固相担体から溶出させる働きを持つ精製水などの溶液に曝されても核酸を溶出し難いため、十分な核酸量を保持できていたことが分かる。
- [0203] 1 テストの核酸増幅反応液中において、本方法は、保持した核酸を核酸増幅反応に利用できる形態にできることが示された。
- [0204] 本方法は、カオトロピック効果に頼った吸着工程を必要としないため、検体試料の状態に合わせて多様な前処理方法を選択できる。
- [0205] B O O M法プロトコルYでは、1つのサンプルのみを処理する場合でも最低でも30分程度かかっていた時間を、本方法では約17分程度に短縮することができた。
- [0206] 以上の結果から、本方法は、従来法と比較して、簡単、容易、安全、迅速、且つ安価な前処理方法であることが明らかであり、遺伝子検査の前処理をP O C T化できる。
- [0207] 本発明の濾過装置を用いると、従来まで必要と考えられていた理化学機器（例えば、乾燥操作に使用する、例えば、ヒートブロックなどの装置や、遠心装置やマイクロピペットなどの基本的な理化学機器）をほとんど用いることなく実施でき、機器の有無による実施環境の制限を取り除くことができる。
- [0208] 従来まで必要と考えられていた理化学機器は、高額なものが多く、機器を揃えるなどの初期投資費は免疫検査のP O C Tキットと比較すると多大である。
- [0209] 本発明は、これらの使用を避けることが可能なため、核酸の抽出の実施コストを低く抑えることができる。
- [0210] 本発明は、洗浄工程の簡便化及び溶出工程の省略により操作手順を単純化し、核酸の抽出に習熟していない実施者に対しても、十分に実施可能な程度に簡便である。
- [0211] 以上の検討を踏まえると、次に述べる各実施の形態における前処理方法を実施できることが理解されよう。勿論、以上何度も述べた一定範囲の条件を

満たすことが前提となる。

[0212] (実施の形態 1)

図 2 は、本発明の実施の形態 1 における前処理方法の各工程図である。実施の形態 1 は、基本形である。

[0213] <抽出工程>

まず、図 2 (a) に示すように、抽出液 11 を入れたチューブ 10 に処理対象 12 を添加する。小時間静置すると、処理対象の核酸を被覆する成分（例えば、細胞膜や細胞壁等）が抽出液 11 により破壊され、図 2 (b) に示すように核酸 13 と夾雑物（例えば、細胞膜片等）とが抽出液 11 に混在する核酸含有溶液となる。

[0214] <吸着工程>

次に、図 2 (c) に示すように、チューブ 10 の核酸含有溶液に、シリカ粒子 14 を添加し、核酸 13 とシリカ粒子 14 とを吸着させる。その結果、核酸 13 とシリカ粒子 14 との複合体 15 が形成される。

[0215] この溶液を、図 2 (d) に示すように、濾過装置の漏斗部 2 に滴下し、濾過材 3 等により濾過し、図 2 (e) に示すように、濾過材 3 上に複合体 15 を回収する。

[0216] <洗浄工程>

図 2 (f) に示すように、濾過材 3 上に回収された複合体 15 に精製水 16 を滴下し、洗浄する。そして、図 2 (g) に示すように、濾過材 3 を濾過装置から取り外すと、図 2 (h) に示すように、そのままあるいは、濾過材 3 と複合体 15 とを分離して複合体 15 のみを、次の核酸増幅工程へ排出する。

[0217] (実施の形態 2)

図 3 は、本発明の実施の形態 2 における前処理方法の各工程図である。実施の形態 2 は、実施の形態 1 を変形したものであり、吸着工程と洗浄工程とを一度に行うものである。

[0218] 実施の形態 2 は、うがい液、唾液、涙液などの処理対象に使用できると考

えられる。これらの処理対象は、抽出液に精製水を用いることができるため、核酸増幅反応を阻害する物質（タンパク質、脂質、塩、有機溶剤等）の含有量が比較的少ないと考えられるためである。

[0219] <抽出工程>

抽出工程（図3（a）～図3（b））は、実施の形態1と同様である。

[0220] <吸着工程+洗浄工程>

実施の形態1とは異なり、洗浄工程において精製水16による洗浄は行わない。その代わりに、溶液を、図3（d）に示すように、濾過装置の漏斗部2に滴下し、濾過材3等により濾過する際に、抽出液10自体で洗浄を行う。その他は、実施の形態1と同様である。

[0221] （実施の形態3）

図4は、本発明の実施の形態3における前処理方法の各工程図である。実施の形態3は、実施の形態1を変形したものであり、抽出工程と吸着工程とを一度に行うものである。

[0222] 即ち、図4（a'）に示すように、チューブ10に抽出液11のみならず、一定範囲を満たすようにシリカ粒子14を予め添加しておく。そこに、処理対象12を添加し、チューブ10内において、核酸13の抽出のみならず、抽出された核酸13とシリカ粒子14とを吸着させ、複合体15を形成する。

[0223] その他の点は、実施の形態1と同様である。

[0224] （実施の形態4）

図5は、本発明の実施の形態4における前処理方法の各工程図である。実施の形態4は、実施の形態1を変形したものであり、抽出工程と吸着工程と洗浄工程とを一度に行うものである。

[0225] 実施の形態4は、吸着工程と洗浄工程とを一度に行う点で実施の形態2と同様であるから、うがい液、唾液、涙液などの処理対象に使用できると考えられる。これらの処理対象は、抽出液に精製水を用いることができるため、核酸増幅反応を阻害する物質（タンパク質、脂質、塩、有機溶剤等）の含有

量が比較的少ないと考えられるためである。

[0226] まず、図5（a'）において、チューブ10に抽出液11のみならず、一定範囲を満たすようにシリカ粒子14を予め添加しておく。そこに、処理対象12を添加し、チューブ10内において、核酸13の抽出のみならず、抽出された核酸13とシリカ粒子14とを吸着させ、複合体15を形成する。

[0227] さらに、実施の形態1とは異なり、洗浄工程において精製水16による洗浄は行わない。その代わりに、溶液を、図5（d）に示すように、濾過装置の漏斗部2に滴下し、濾過材3等により濾過する際に、抽出液10自体で洗浄を行う。その他は、実施の形態1と同様である。

[0228] （実施の形態5）

図6は、本発明の実施の形態5における前処理方法の各工程図である。実施の形態5は、次のような要素を有する核酸抽出キットを使用すると好適に実施できる。即ち、抽出液11は、処理対象12に含まれる核酸を抽出する。濾過材3には、シリカ粒子14が配置される。第1吸水材4は、濾過材3に重ねて配置され、濾過材3に滴下される抽出液から吸水を行う。ここで、シリカ粒子14の粒径及び核酸増幅反応液中におけるシリカ粒子14の濃度は、上記一定範囲内とされ、この核酸抽出キットは、濾過材3が洗浄された後乾燥工程及び溶出工程を経ず直ちに核酸増幅工程へ移動できるように構成されている。

[0229] ＜抽出工程＞

まず、図6（a）に示すように、抽出液11を入れたチューブ10に処理対象12を滴下添加する。小時間静置すると、処理対象の核酸を被覆する成分（例えば、細胞膜や細胞壁等）が抽出液11により破壊され、図6（b）に示すように核酸13と夾雑物（例えば、細胞膜片等）とが抽出液11に混在する核酸含有溶液となる。

[0230] ＜吸着工程＞

実施の形態5では、実施の形態1とは異なり、図2（e'）に示すように、濾過装置の濾過材14にシリカ粒子14を配置しておくものであり、シリ

カ粒子 1 4 を溶液に添加しない。

[0231] しかしながら、チューブ 1 0 の核酸含有溶液を漏斗部 2 に滴下すれば、核酸 1 3 とシリカ粒子 1 4 とが吸着する。その結果、核酸 1 3 とシリカ粒子 1 4 との複合体 1 5 が形成される。

[0232] その他は、実施の形態 1 と同様である。

[0233] (実施の形態 6)

図 7 は、本発明の実施の形態 6 における前処理方法の各工程図である。実施の形態 6 は、実施の形態 5 を変形したものであり、吸着工程と洗浄工程とを一度に行うものである。

[0234] 吸着工程と洗浄工程とを一度に行う点において実施の形態 2 と共通するため、実施の形態 6 は、精製水が使用されるうがい液、唾液、涙液などの処理対象に使用できると考えられる。これらの処理対象は、抽出液中に核酸増幅反応を阻害する物質（タンパク質、脂質、塩、有機溶剤等）の含有量が比較的少なく、抽出液中で核酸を遊離できると考えられるためである。

[0235] その他は、実施の形態 5 と同様である。

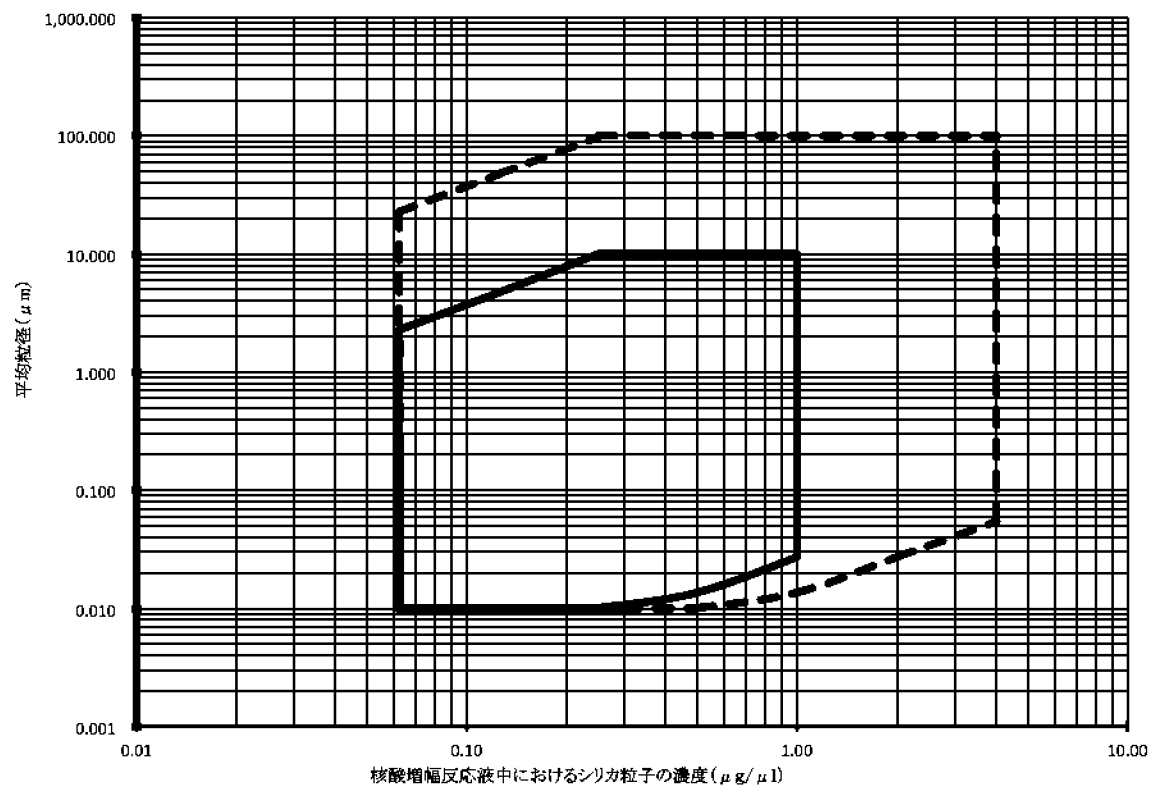
### 請求の範囲

- [請求項1] 処理対象と、前記処理対象に含まれる核酸を抽出する抽出液と、シリカ粒子と、濾過材とを接触させ、前記濾過材に前記核酸と前記シリカ粒子との複合体を担持させ、核酸増幅反応液を用いる核酸増幅工程へ送出する前処理方法であって、
- 前記シリカ粒子の粒径及び前記核酸増幅反応液中における前記シリカ粒子の濃度を一定範囲内とすることにより、前記核酸増幅工程に先立つ乾燥工程及び溶出工程を不要とすることを特徴とする前処理方法。
- [請求項2] 前記一定範囲は、シリカ粒子濃度が $0.0625 \sim 4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ である、請求の範囲第1項記載の前処理方法。
- [請求項3] 前記一定範囲は、シリカ粒子濃度が $0.0625 \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が $0.01 \sim 10 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる表面積が $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ である、請求の範囲第1項記載の前処理方法。
- [請求項4] 前記抽出液に前記処理対象を添加し、前記処理対象に含まれる核酸を抽出する抽出工程と、
- 前記抽出された核酸に前記シリカ粒子を接触させて、前記核酸と前記シリカ粒子との複合体を得ると共に前記複合体を前記濾過材に接触させる吸着工程と、
- 前記複合体と前記濾過材とを精製水で洗浄し、洗浄された前記複合体と前記濾過材とを前記核酸増幅工程に送出する洗浄工程とを含む請求の範囲第1項記載の前処理方法。
- [請求項5] 前記濾過材を前記核酸増幅工程に送出するに先立ち、前記濾過材と前記複合体とを分離し、前記分離された複合体を前記核酸増幅工程に送出する請求の範囲第4項記載の前処理方法。

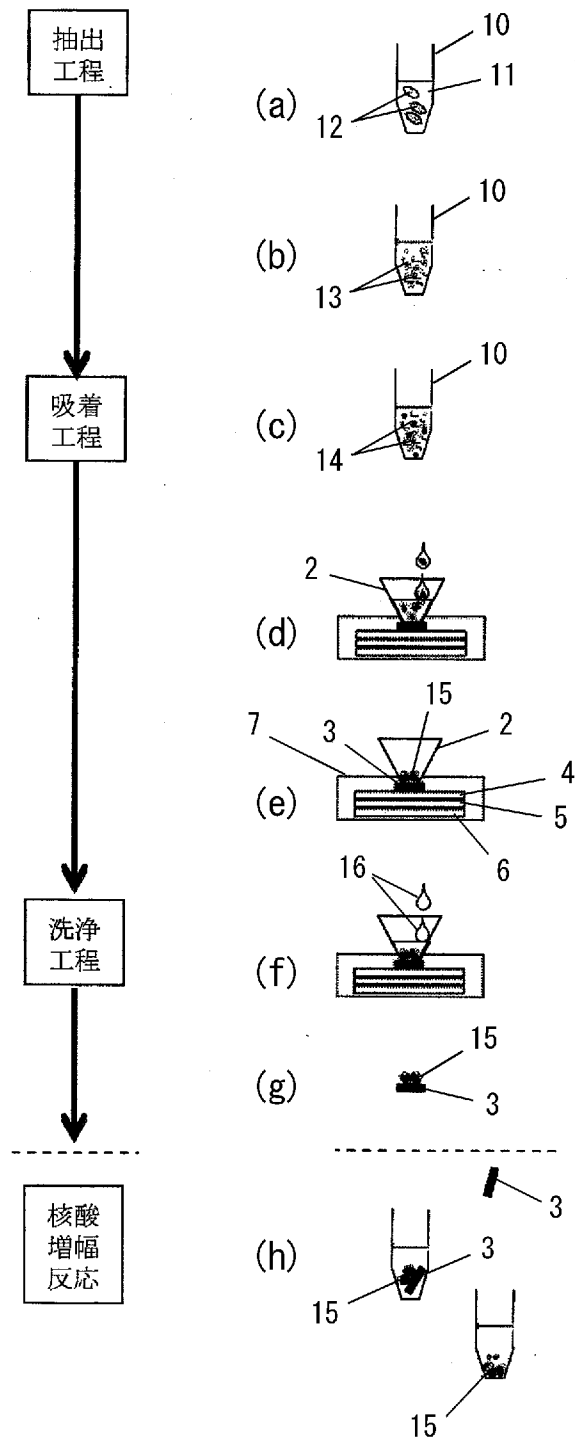
- [請求項6] 前記吸着工程と前記洗浄工程とを一度に行う請求の範囲第4項記載の前処理方法。
- [請求項7] 前記抽出工程と前記吸着工程とを一度に行う請求の範囲第4項記載の前処理方法。
- [請求項8] 前記抽出工程と前記吸着工程と前記洗浄工程とを一度に行う請求の範囲第4項記載の前処理方法。
- [請求項9] 前記抽出液に前記処理対象を添加し、前記処理対象に含まれる核酸を抽出する抽出工程と、  
前記シリカ粒子を担持する濾過材に、前記抽出された核酸を接触させて、前記核酸と前記シリカ粒子との複合体を得ると共に前記複合体を前記濾過材に担持させる吸着工程と、  
前記複合体と前記濾過材とを精製水で洗浄し、洗浄された前記複合体と前記濾過材とを前記核酸増幅工程に送出する洗浄工程とを含む請求の範囲第1項記載の前処理方法。
- [請求項10] 前記濾過材を前記核酸増幅工程に送出するに先立ち、前記濾過材と前記複合体とを分離し、前記分離された複合体を前記核酸増幅工程に送出する請求の範囲第9項記載の前処理方法。
- [請求項11] 前記吸着工程と前記洗浄工程とを一度に行う請求の範囲第9項記載の前処理方法。
- [請求項12] 処理対象に含まれる核酸を抽出する抽出液と、  
シリカ粒子が配置される濾過材と、  
前記濾過材に重ねて配置され、前記濾過材に滴下される前記核酸が抽出された前記抽出液から吸水を行う吸水材とを備える核酸抽出キットであって、  
前記シリカ粒子の粒径及び核酸増幅反応液中における前記シリカ粒子の濃度を一定範囲内とすることにより、前記濾過材が洗浄された後乾燥工程及び溶出工程を経ず直ちに核酸増幅工程へ移動できるように構成されており、

前記一定範囲は、シリカ粒子濃度が $0.0625 \sim 4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、平均粒径が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ 、且つ、平均粒径から求められる面積が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ であることを特徴とする核酸抽出キット。

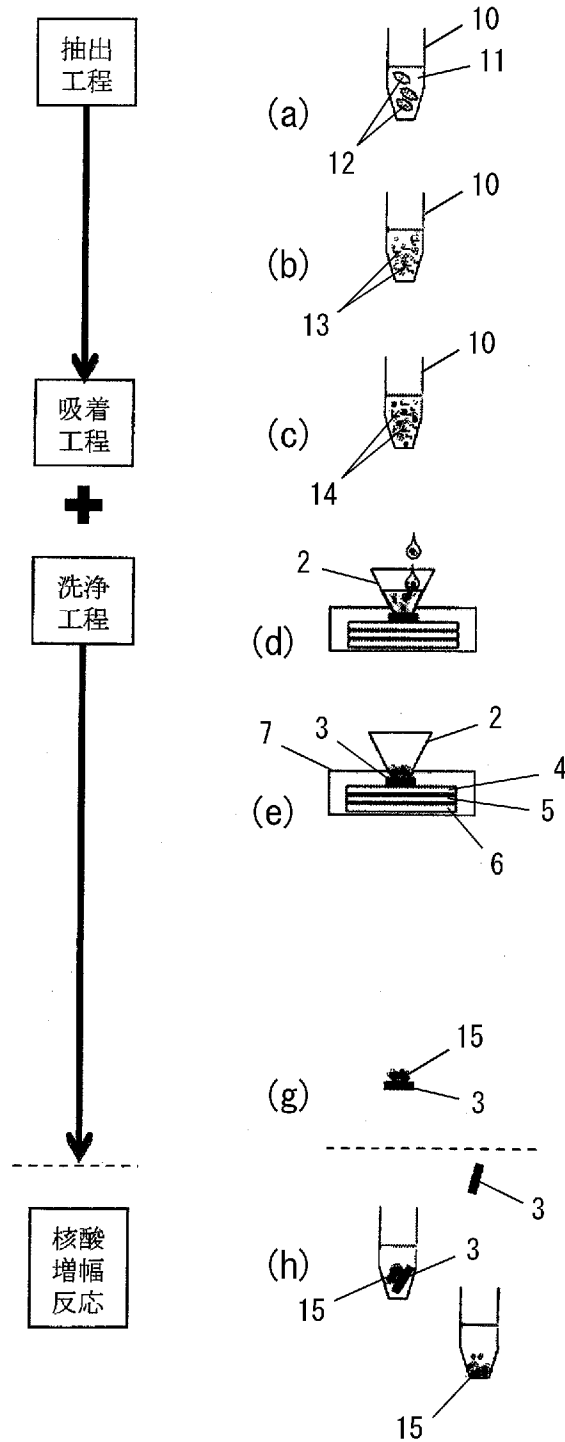
[図1]



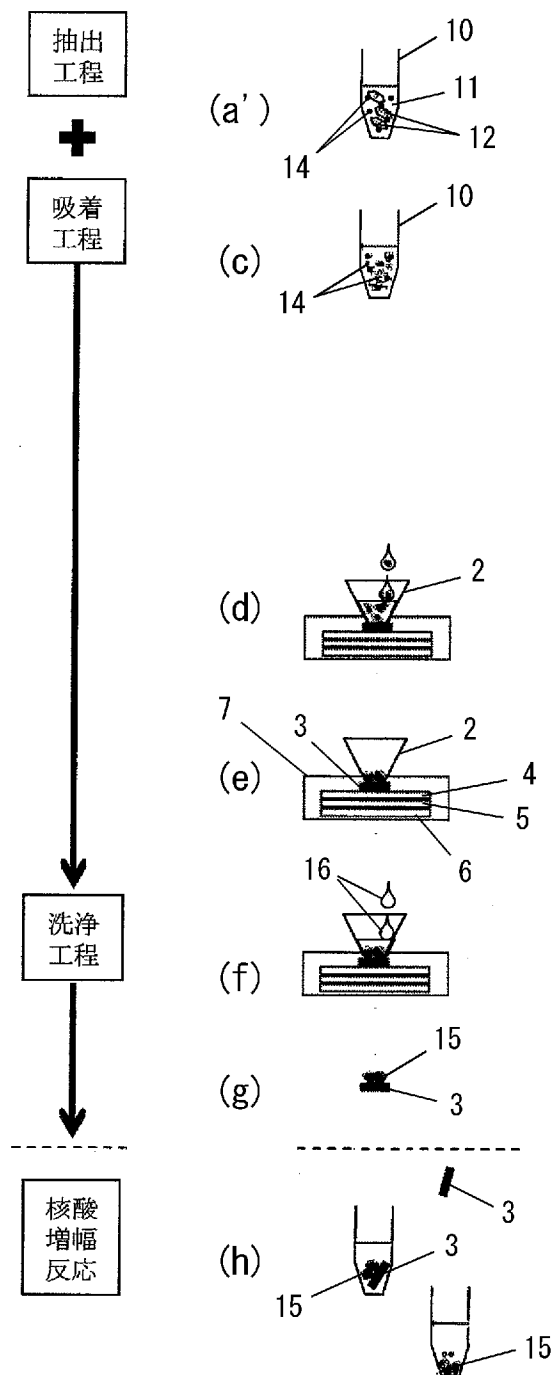
[図2]



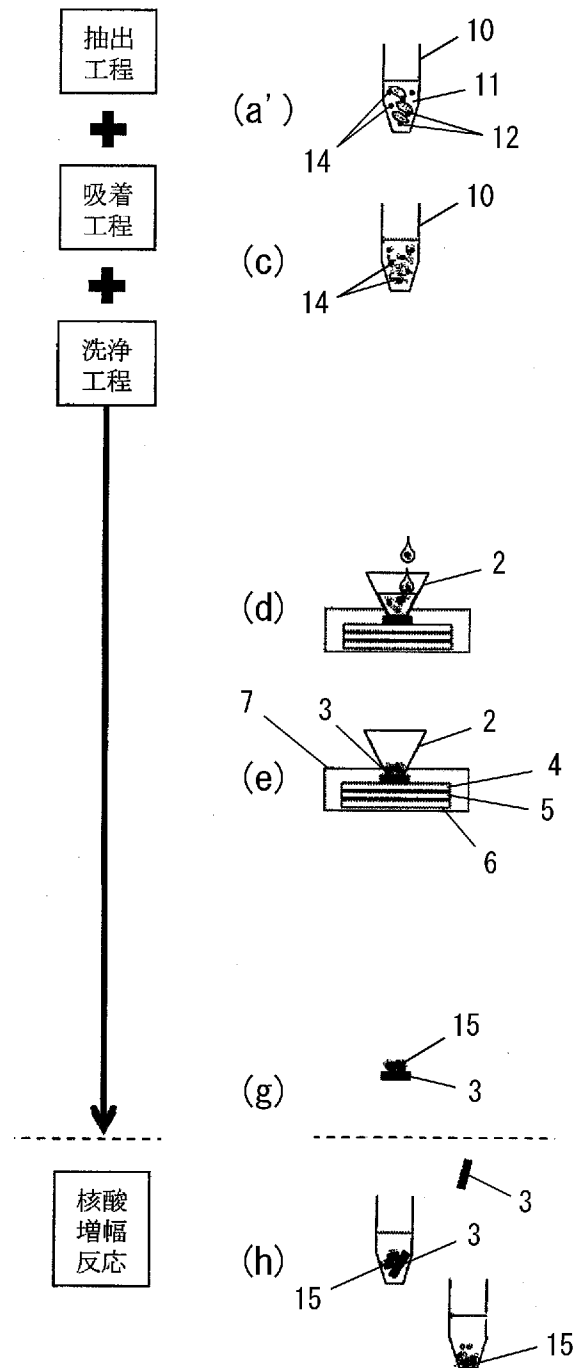
[図3]



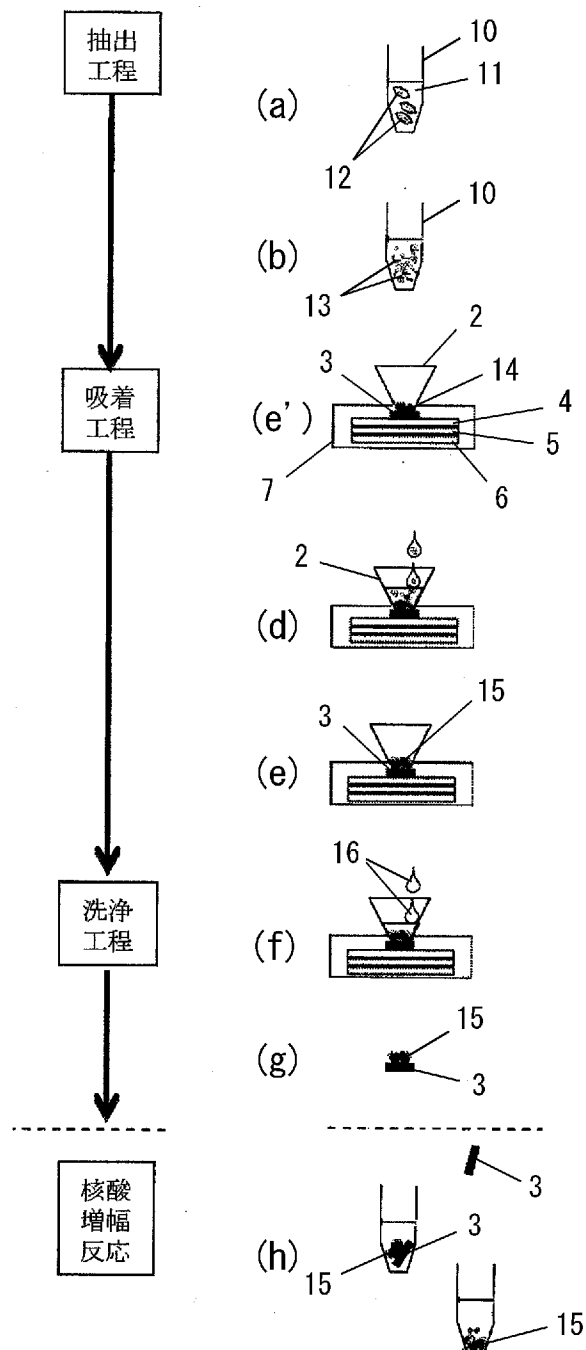
[図4]



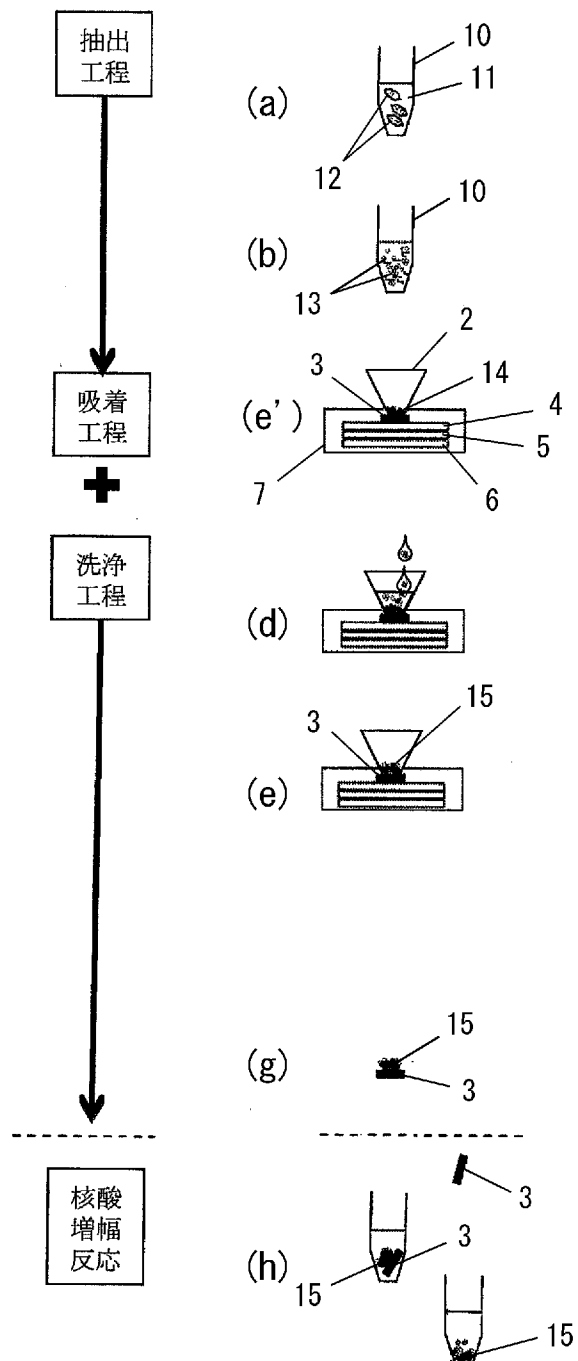
[図5]



[図6]



[図7]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/074927

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09

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

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2015 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2015 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2015 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | JP 2005-514036 A (F. Hoffmann-La Roche AG.),<br>19 May 2005 (19.05.2005),<br>claims<br>& US 2004/0014070 A1 & WO 2003/057910 A2<br>& EP 1466018 A | 1-12                  |
| Y         | JP 2005-253464 A (Eiken Chemical Co., Ltd.),<br>22 September 2005 (22.09.2005),<br>abstract; claims<br>(Family: none)                             | 1-12                  |
| Y         | JP 2014-030364 A (Seiko Epson Corp.),<br>20 February 2014 (20.02.2014),<br>table 1<br>(Family: none)                                              | 4-11                  |

☒ 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  
16 November 2015 (16.11.15)

Date of mailing of the international search report  
01 December 2015 (01.12.15)

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/JP2015/074927

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | JP 11-146783 A (Toyobo Co., Ltd.),<br>02 June 1999 (02.06.1999),<br>claims<br>(Family: none)                                        | 4-11                  |
| A         | JP 10-155481 A (The Institute of Physical and<br>Chemical Research),<br>16 June 1998 (16.06.1998),<br>& US 5916775 A & EP 814156 A2 | 1-12                  |

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 5 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)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Y               | JP 2005-514036 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー)<br>2005. 05. 19, 特許請求の範囲<br>& US 2004/0014070 A1 & WO 2003/057910 A2 & EP 1466018 A | 1-12           |
| Y               | JP 2005-253464 A (栄研化学株式会社) 2005. 09. 22,<br>要約, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)                                                         | 1-12           |
| Y               | JP 2014-030364 A (セイコーエプソン株式会社) 2014. 02. 20, 表 1<br>(ファミリーなし)                                                             | 4-11           |

☒ 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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 6 . 1 1 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 1 . 1 2 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)  
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5  
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

福岡 信子

4 N

3 5 3 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                        |                |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| Y                     | JP 11-146783 A (東洋紡績株式会社) 1999. 06. 02,<br>特許請求の範囲 (ファミリーなし)           | 4-11           |
| A                     | JP 10-155481 A (理化学研究所) 1998. 06. 16,<br>& US 5916775 A & EP 814156 A2 | 1-12           |