

(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2月3日(03.02.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/024934 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/686 (2018.01) C12Q 1/6888 (2018.01)
C12N 9/12 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/027383

(22) 国際出願日: 2021年7月21日(21.07.2021)

(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 2020-128551 2020年7月29日(29.07.2020) JP

(71) 出願人: 東洋紡株式会社(TOYOBO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜
二丁目2番8号 Osaka (JP).

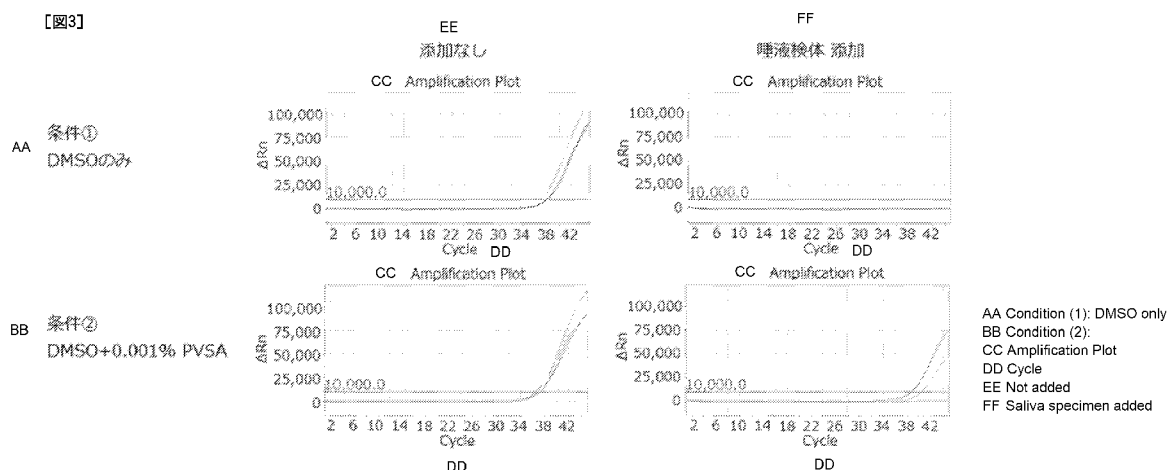
(72) 発明者: 山越 奈々 (YAMAKOSHI Nana);
〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24

号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 岡山 旦
(OKAYAMA Tadashi); 〒9148550 福井県敦賀
市東洋町10番24号 東洋紡株式会
社内 Fukui (JP). 寺内 謙太(TERAUCHI Kenta);
〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24
号 東洋紡株式会社内 Fukui (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,

(54) Title: IMPROVED METHOD FOR DETECTING VIRUS

(54) 発明の名称: 改良されたウイルスの検出方法



(57) Abstract: The present invention provides a method and a kit for making it possible to detect the presence/absence of virus RNA by one-step RT-PCR, in which the RNA is not isolated from a specimen, and a sample that has been subjected to only a simple thermal pre-treatment is added to a reaction solution. In particular, provided is a means for detecting, at a high sensitivity, the presence of a coronavirus in a specimen. A method for testing the presence of an RNA virus according to one embodiment of the present invention comprises steps (1) to (4): (1) a step for preparing a liquid mixture that contains a specimen which has not been subjected to RNA purification, an anionic polymer, and a polar organic solvent; (2) a step for heating the liquid mixture; (3) a step for adding, to the liquid mixture which has been heated, a 1-step RT-PCR reaction solution that includes (i) a reverse transcriptase and a DNA polymerase or (ii) a DNA polymerase having reverse transcription activity; and (4) a step for performing 1-step RT-PCR reaction after tightly sealing the reaction container.

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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 本発明は、試料からRNAの単離を行うことなく、熱処理による簡便な前処理のみおこなったサンプルを反応液に加え、1ステップRT-PCRによりウイルスのRNAの有無の検出を可能とする方法およびキットを提供する。特に試料中のコロナウイルスの存在を高感度に検出する手段を提供する。一実施形態において、本発明は、以下の(1)から(4)の工程を包含する、RNAウイルスの存在を検査する方法である: (1) RNAの精製を行っていない試料と、アニオン性ポリマーと、極性有機溶媒とを含む混合液を調製する工程、(2) 前記混合液を加熱する工程、(3) 加熱後の前記混合液に、(i) 逆転写酵素およびDNAポリメラーゼまたは(ii) 逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を添加する工程、(4) 反応容器を密閉後、1ステップRT-PCR反応を実施する工程。

明 細 書

発明の名称：改良されたウイルスの検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸増幅によるRNAウイルスの検出法に関する。より具体的には、試料から核酸の単離・精製をすることなく、試料とアニオン性ポリマーと極性有機溶媒とを含む混合液を調製後に熱処理を行い、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の反応液を加えることによる、RNAウイルスの検出に関する。本発明により、例えば、唾液、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀痰をはじめとする生体由来試料、糞便試料、血液試料、環境拭き取り試料等に含まれるRNAウイルスを高感度にて検出することが可能である。本発明は、生命科学研究、臨床診断や食品衛生検査、環境検査等に利用できる。

背景技術

[0002] ウイルスはゲノム核酸としてデオキシリボ核酸を持つDNAウイルスと、リボ核酸を持つRNAウイルスに大別される。ウイルスは世代時間が短いため、突然変異率が高いことで知られているが、特にRNAウイルスは変異しやすいとされている。このようなウイルスの変異は宿主への感染性や、感染した際の症状の種類や重篤度に大きな影響を与えることが知られている。そのため、変異したウイルスであっても迅速・的確に検出する手法を開発することは、感染症の拡大防止や封じ込めに重要である。

[0003] コロナウイルスは、風邪を含む呼吸器感染症を引き起こす原因ウイルスであり、風邪の流行期において約10～35%程度はコロナウイルスが原因と言われている。変異型ウイルスが発生することも知られており、稀にSARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルスやMERS（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）コロナウイルス（SARS-nCoV-2）など致死性の重篤な呼吸器疾患を齎すものが発生することが知られている。したがって、コロナウイルスを簡便、迅

速、高感度に検出することは、臨床診断、食品衛生検査、環境検査等で重要であることは言うまでもない。

[0004] コロナウイルスの病原体検査では、電子顕微鏡法、E L I S Aによる免疫学的抗原検出法、または核酸増幅技術を利用したウイルス遺伝子の検出法が開発されてきた。これらの検査法の中でも、高感度にコロナウイルスを検出可能な核酸増幅技術は、汎く使われている。コロナウイルスを核酸増幅法で検出するためにいくつかの技術が開発されてきた（例えば、非特許文献1、非特許文献2、特許文献1）。

[0005] 2019年に中国湖北省武漢市にて発生が確認された変異型コロナウイルスSARS-nCoV-2においては、ウイルスゲノムRNAの解析が完了次第、核酸増幅技術を用いた検査方法が樹立された（例えば、非特許文献3、非特許文献4）。日本においても、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル2019-nCoV」にてSARS-nCoV-2の検出するための方法が記載されている（非特許文献5）。これらの手法において、試料中に含まれるコロナウイルスの検出には、試料からのウイルスRNAの抽出および精製工程を伴う。ウイルスRNAの抽出および精製工程、なかでも精製工程は煩雑であり、多くの作業時間を要していた。近年、インフルエンザウイルスの検出において、咽頭ぬぐい液試料を水溶性有機溶媒と界面活性剤が含まれる前処理液と混合したウイルス抽出液を試料とする方法が知られている（特許文献2、特許文献3）。また、K. Kangらは、高病原性北米産豚生殖器呼吸器症候群ウイルスRNAを豚血清サンプルから直接RT-PCRにより検出できることを報告している（非特許文献6）。これらの手法では、RNAの抽出および精製工程を省略することで、試料中に含まれるRT-PCRの反応阻害物質が反応液中に持ち込まれることになる。RT-PCRの反応阻害物質は試料の種類によって大きく異なる。例えば、唾液試料中では多糖類や消化酵素であるRNaseなどのPCR反応阻害物質が多量に持ち込まれる。加えて、ウイルスの不活化およびRNAの抽出条件はウイルス種によって大きく異なっていることも知られているが、先行技術文献においては

、コロナウイルスに対する効果については全く言及がなされていない（特許文献2、特許文献3）。現在、コロナウイルス、特にSARS-nCoV-2コロナウイルスを含む咽頭・鼻腔ぬぐい液や唾液、喀痰、糞便試料などの生体試料やふき取り環境試料から、RNAの精製工程なく、1ステップRT-PCRによって簡便・迅速に検出できる方法の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2012-24039号公報

特許文献2：特開2017-023110号公報

特許文献3：特開2016-182112号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2005, p. 5452-5456

非特許文献2：J Virol Methods. 2004 Sep 1; 120(1):33-40.

非特許文献3：Published Online January 29, 2020, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

非特許文献4：世界保健機関（WHO）ホームページ（Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR）

非特許文献5：国立感染症研究所ホームページ「病原体検出マニュアル2019-nCoV」（<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200217.pdf>）

非特許文献6：J. Animal Science And Biotechnology, 第5巻、2014年、第45頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、かかる従来技術の課題を背景になされたものである。すなわち、例えば唾液などの消化酵素や夾雑物質を多量に含むような試料から、ウイルスRNA、特にエンベロープを持つウイルスのRNA、なかでもコロナウイルスのRNAについて、事前に精製を行うことなく、1ステップRT-PCRにより、簡便、迅速、高感度な検出を可能とすることである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意研究を行った結果、ウイルスRNAの精製を行っていない試料において、アニオン性ポリマーと極性有機溶媒とを混合後、熱処理を行った後に、1ステップRT-PCRに供することで、試料中に含まれ得るRNAウイルス（例えば、コロナウイルス、特にSARS-nCoV-2）を検出できることを見出し、本発明に到達した。

[0010] 代表的な本願発明は、以下の通りである。

項1. 試料中のRNAウイルスの検査方法であって、以下の工程を含むことを特徴とする検査方法。

（1）RNAの精製を行っていない試料と、アニオン性ポリマーと、極性有機溶媒とを含む混合液を調製する工程、

（2）前記混合液を加熱する工程、

（3）加熱後の前記混合液に、（i）逆転写酵素およびDNAポリメラーゼまたは（ii）逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を添加する工程、

（4）反応容器を密閉後、1ステップRT-PCR反応を実施する工程。

項2. 工程（1）において、混合液中の極性有機溶媒の含有率が20%以上である項1に記載の検査方法。

項3. 工程（1）において、混合液中のアニオン性ポリマーの含有率が0.00001%以上である項1又は2に記載の検査方法。

項4. 工程（1）において、混合液が界面活性剤を実質的に含まないことを

特徴とする項 1 から項 3 のいずれかに記載の検査方法。

項 5. 工程 (1) において混合液を調製後、工程 (2) を実施するまでの時間が 5 分以内である項 1 から 4 のいずれかに記載の検査方法。

項 6. 工程 (2) における加熱条件が、70℃ 1 秒以上であることを特徴とする項 1 から 5 のいずれかに記載の検査方法。

項 7. 試料が糞便、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀痰、肺吸引物、脳脊髄液、うがい液、唾液、涙液、培養細胞、培養上清、及び環境中の拭き取り検査試料からなる群より選択される少なくとも 1 種である項 1 から 6 のいずれかに記載の検査方法。

項 8. 試料が水、生理食塩水、緩衝液若しくはスプタザイム酵素液に懸濁された懸濁液、又はそれらの遠心上清若しくは濃縮物である項 1 から 7 のいずれかに記載の検査方法。

項 9. RNA ウイルスがエンベロープを持つ RNA ウイルスであることを特徴とする項 1 から項 8 のいずれかに記載の検査方法。

項 10. エンベロープを持つ RNA ウイルスが、フラビウイルス科ウイルス；トガウイルス科ウイルス；コロナウイルス科ウイルス；オルトミクソウイルス科ウイルス；ラブドウイルス科ウイルス；ブニヤウイルス科ウイルス；パラミクソウイルス科ウイルス；及びフィロウイルス科ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする項 9 に記載の検査方法。

項 11. エンベロープを持つ RNA ウイルスがコロナウイルス科ウイルスである項 1 から 10 のいずれかに記載の検査方法。

項 12. コロナウイルス科ウイルスが SARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルス、MERS（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、SARS-nCoV-2 コロナウイルスである項 11 に記載の検査方法。

項 13. RNA ウイルスがエンベロープを持たない RNA ウイルスであることを特徴とする項 1 から項 12 のいずれかに記載の検査方法。

項 14. エンベロープを持たない RNA ウイルスが、アストロウイルス科ウイルス；カリシウイルス科ウイルス；ピコルナウイルス科ウイルス；ヘペウ

イルス科ウイルス；及びレオウイルス科ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする項13に記載のウイルスの検査方法。

項15．極性有機溶媒が、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、ピリジン、トリエチルアミンジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリクトリアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、およびアセトニトリルよりなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする項1から14のいずれかに記載の検査方法。

項16．アニオン性ポリマーが、スルホン酸基、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基、及びホスホン酸基からなる群より選択される少なくとも1種のアニオン性官能基を有するモノマーを重合して得られるポリマーである項1から項15のいずれかに記載の検査方法。

項17．アニオン性ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸、カラギーナン、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、デルマタン硫酸、ポリビニルスルホン酸、ポリビニルホスホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸／スルホン酸共重合体、ポリアクリル酸／マレイン酸共重合体およびこれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種のアニオン性ポリマーである項1から16のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項18．DNAポリメラーゼが、Taq、Tthおよびそれらの変異体よりなる群から選択されるいずれかであることを特徴とする項1から17のいずれかに記載の検査方法。

項19．逆転写酵素の由来が、モロニー Maus 白血病ウイルス（MMRV）、トリ骨髄芽球症ウイルス（AMV）およびこれらの変異体からなる群より選択されるいずれかであることを特徴とする項1から18のいずれかに記載の検査方法。

項 20. 工程 (4) における 1 ステップ R T - P C R 反応液が、アミノ酸におけるアミノ基に 3 個のメチル基を付加した構造を有する第 4 級アンモニウム塩 (以下、「ベタイン様 4 級アンモニウム」という)、ウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも 1 つをさらに含むことを特徴とする項 1 から 19 のいずれかに記載の検査方法。

項 21. ベタイン様 4 級アンモニウム塩が、ベタインまたは L - カルニチンである項 20 に記載のウイルスの検査方法。

項 22. アニオン性ポリマー、極性有機溶媒、(i) 逆転写酵素及び D N A ポリメラーゼ又は (i i) 逆転写酵素活性を有する D N A ポリメラーゼを含む 1 ステップ R T - P C R 反応液を含むことを特徴とする R N A ウイルスの検査用キット。

項 23. ベタイン様 4 級アンモニウム塩、ウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも 1 つをさらに含む項 22 に記載の検査用キット。

項 24. 検出対象の R N A ウイルスの検出領域に対応するプライマー対をさらに含むことを特徴とする項 22 または 23 に記載のウイルスの検査用キット。

項 25. 検出対象の R N A ウイルスの検出領域に対応するハイブリダイゼーションプローブをさらに含むことを特徴とする項 22 から 24 いずれかに記載のウイルスの検査用キット。

項 26. R N A ウイルスがエンベロープを持つことを特徴とする項 22 から 25 のいずれかに記載のウイルスの検査キット。

項 27. エンベロープを持つ R N A ウイルスが、フラビウイルス科ウイルス；トガウイルス科ウイルス；コロナウイルス科ウイルス；オルトミクソウイルス科ウイルス；ラブドウイルス科ウイルス；ブニヤウイルス科ウイルス；パラミクソウイルス科ウイルス；及びフィロウイルス科ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする項 26 に記載のウイルスの検査用キット。

項 28. エンベロープを持つ RNA ウイルスがコロナウイルスである項 26 又は 27 のいずれかに記載のウイルスの検査用キット。

項 29. コロナウイルス科ウイルスが SARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルス、MERS（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、SARS-nCoV-2であることを特徴とする項 27 又は項 28 に記載のウイルスの検査用キット。

項 30. RNA ウイルスがエンベロープを持たないことを特徴とする項 22 から 25 のいずれかに記載のウイルスの検査キット。

項 31. エンベロープを持たない RNA ウイルスが、アストロウイルス科ウイルス；カリシウイルス科ウイルス；ピコルナウイルス科ウイルス；ヘペウイルス科ウイルス；及びレオウイルス科ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする項 30 に記載のウイルスの検査用キット。

発明の効果

[0011] 本発明によって、試料から核酸の単離・精製をすることなく、試料と、アニオン性ポリマーと、極性有機溶媒とを含有する試薬とを混合後に熱処理を行い、1ステップ RT-PCR 反応液に添加するだけで、精製工程を経ない試料中に含まれ得る RNAse 等の夾雑物質による影響を高度に低減でき、試料中の RNA ウイルスの有無を検出することが可能になる。この結果、検査業務がさらに効率化することから、検査数を増やすことができ、感染症予防にも寄与する。また、ウイルス RNA の精製工程が省略化され作業が簡易になることで、サンプル間でのコンタミリスク等を低減することができる。これにより、偽陽性発生リスクも抑えることができ、検査業務の精度を更に高めることができる。また、作業者が感染性のあるサンプルを取り扱う作業工程が減少することで、作業者への感染リスクも低減することができる。

[0012] 更に、本発明では 2019 年に発生した SARS-nCoV-2 コロナウイルスを含みうる試料においても、同様に優れた効果が奏され得る。また、本発明によれば、血液、糞便（排泄便、直腸便）、嘔吐物、尿、痰、リンパ

液、血漿、射精液、肺吸引物、脳脊髄液、咽頭拭い液、鼻腔拭い液、うがい液、唾液、涙液を含む生体由来試料、環境拭き取り試料、培養細胞または培養上清を含む試料等の夾雑物を多く含む試料からの、コロナウイルスの高感度の検出も可能とする。本発明は、生命科学研究、臨床診断や食品衛生検査、環境検査等にも利用できる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1] R N a s e 存在下における、アニオン性ポリマーを含む極性有機溶媒を用いたウイルス R N A の検出結果を示す図である。

[図2] R N a s e 存在下における、アニオン性ポリマーを含む極性有機溶媒を用いた不活化ウイルスの検出結果を示す図である。

[図3] 唾液検体存在下における、アニオン性ポリマーを含む極性有機溶媒を用いたウイルス R N A の検出結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の実施形態を示しつつ、本発明についてさらに詳説するが、本発明はこれらに限定されない。なお、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

また、本明細書中に記載された非特許文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。本明細書中の「～」は「以上、以下」を意味し、例えば明細書中で「X～Y」と記載されていれば「X以上、Y以下」を示す。また本明細書中の「および／または」は、いずれか一方または両方を意味する。また本明細書において、単数形の表現は、他に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。

[0015] 本発明の一態様は、試料中の R N A ウイルスの検査であって、試料からウイルス R N A の精製を実施することなく、試料とアニオン性ポリマーと極性有機溶媒とを含む混合液を調製後に熱処理を行い、逆転写酵素および D N A ポリメラーゼ、または逆転写活性を有する D N A ポリメラーゼを含む 1 ステップ R T - P C R 試薬を添加することを包含する、R N A ウイルスの存在の

有無を検査するための方法である。

[0016] 好ましい実施形態では、本発明の試料中のウイルス検査方法は、少なくとも以下の工程が含むことを特徴とする：

(1) RNAの精製を行っていない試料と、アニオン性ポリマーと、極性有機溶媒とを含む混合液を調製する工程、

(2) 前記混合液を加熱する工程

(3) 前記熱処理後の混合液に、(i) 逆転写酵素およびDNAポリメラーゼまたは(ii) 逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を添加する工程、

(4) 反応容器を密閉後、1ステップRT-PCR反応を実施する工程。

前記工程(1)から(4)は、同一容器で行われることが好ましい。すなわち、工程(1)から(4)の間においては、混合液の全部または一部を別容器へ移し替えないことが好ましい。工程(1)および(2)の混合液の全量を工程(3)(4)に供してもよいし、その一部を別の容器に移し替えて工程(3)(4)を実施しても良い。

[0017] 本発明において検査対象となるRNAウイルスは、脂質二重膜に由来するエンベロープを持つRNAウイルスであっても、エンベロープを持たないRNAウイルスであっても良い。特定の好ましい実施形態では、本発明はエンベロープを持つRNAウイルスについて、未精製試料からの高感度な検査を可能にする効果に優れている。エンベロープを持つRNAウイルス(「エンベロープRNAウイルス」ともいう)としては、フラビウイルス科ウイルス(例えば、C型肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ジカウイルス、豚熱ウイルス)；トガウイルス科ウイルス(例えば、風疹ウイルス、チクングニアウイルス)；コロナウイルス科ウイルス(例えば、SARSコロナウイルス、MERSコロナウイルス、SARS-nCoV-2コロナウイルス)；オルトミクソウイルス科ウイルス(例えば、インフルエンザウイルス)；ラブドウイルス科ウイルス(例えば、狂犬病ウイルス)；ブニヤウイルス科ウイルス(例えば、クリミヤ・コンゴ熱ウイルス、ハンタウイルス)；パラミクソ

ウイルス科ウイルス（例えば、麻疹ウイルス、ヒトRSウイルス）；フィロウイルス科ウイルス（例えば、エボラウイルス）、などが挙げられるが、特に限定されるものではない。より一層確実に高い本発明の効果が得られ易いという観点から、好ましくは、コロナウイルス科ウイルスの検出に有用であり、より好ましくはSARSコロナウイルス、MERSコロナウイルス、SARS-nCoV-2コロナウイルスの検出に有用であり、なかでもSARS-nCoV-2コロナウイルス（SARS-CoV-2とも呼ばれる）の検出に有用である。

[0018] 本発明はエンベロープを持たないRNAウイルス（「非エンベロープRNAウイルス」ともいう）の検査にも利用することができ、このようなエンベロープを持たないRNAウイルスとしては、アストロウイルス科ウイルス（例えば、アストロウイルス）；カリシウイルス科ウイルス（例えば、サポウイルス、ノロウイルス）；ピコルナウイルス科ウイルス（例えば、A型肝炎ウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス）；ヘペウイルス科ウイルス（例えば、E型肝炎ウイルス）；レオウイルス科ウイルス（例えば、ロタウイルス）などが挙げられ、限定されるものではないが、好ましくはカリシウイルス科ウイルス及びレオウイルス科ウイルスの検出に有用であり、より好ましくはノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスの検出に有用であり、更に好ましくはノロウイルス、ロタウイルスの検出に有用であり、特にノロウイルスの検出に有用である。

[0019] 本発明において用いられる試料として、例えば咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀痰、糞便（排泄便、直腸便）、嘔吐物、唾液などが挙げられるが、特に限定されるものではなく、生体に由来するもの全般に用いることが可能である。特には、糞便、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀痰、肺吸引物、脳脊髄液、うがい液、唾液、涙液、培養細胞、培養上清からの検出に有用である。これらの試料中には、夾雑物として、プロテアーゼ及び核酸分解酵素（RNase、DNase）等の消化酵素が多量に含まれている他、糞便には大

腸菌由来のタンパク質及び核酸等のPCR反応阻害物質が多量含まれていることが特徴として挙げられる。RT-PCR反応に用いる酵素やプライマー及び核酸プローブ等の反応液構成物は、試料中に含まれる夾雑物の影響により、消化または失活してしまい、検出感度が低下することが知られている。また、試料中に含まれる核酸分解酵素は、ウイルスから露出された核酸を消化してしまうことで、感度を低下させてしまったり、検出不可にして偽陰性の判定結果を生じさせるおそれがある。本発明においては、これら試料を市販のRNA精製キットでRNAを単離・精製することなく、アニオン性ポリマーと極性有機溶媒とを含む混合液中にて、事前の熱処理を行うことでRNAをウイルス構造から露出させ、RT-PCR反応に用いることを特徴とするものである。前記試料は直接検出に供してもよいし、夾雑物の反応への影響を低減し、より安定した検査結果を得るために、水、生理食塩水または緩衝液に前記試料を懸濁した試料であってもよい。さらに、糞便など特に夾雑物の多い試料では、遠心分離し、その上清を使用してもよい。あるいは、フィルターろ過を実施してもよい。前記緩衝液としては、特に限定されるものではないが、ハンクス緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、HEPES緩衝液、トリシン緩衝液などが挙げられる。また、粘性の強い生体試料（例えば、粘性の強い喀痰を含む試料）の場合は、特に限定されないが、スプタザイム酵素液で処理した試料であってもよい。

[0020] 本発明における別の態様の試料としては、培養細胞または培養上清を含む試料である。ウイルスの分離には、細胞を利用した分離培養が有効である。分離培養後の培養上清、および培養細胞中にはウイルスが含まれるため、本発明における試料となりうる。分離培養に利用される細胞の種類としては、MDCK細胞、hCK細胞、Ver o E 6 / TMPRSS2細胞、CHO細胞、HEK-293細胞、BHK-21細胞、Sf9細胞および Sf 21細胞などが挙げられる。細胞を融解または破砕した際の細胞破砕液に、核酸分解酵素を多く含むことが知られているU937細胞等を含む試料に有効であるが、特に限定されるものではなく、これに準じる方法が広く含まれる。

[0021] 本発明における別の態様の試料としては、環境中の拭き取り検査試料である。汚染経路の解明や施設環境等の汚染状況の把握には、ふき取り検査が有用である。本発明において、拭き取り検査とは、特に限定されるものでないが、例えば綿棒等で該当区画や設備等を拭き取り、水や緩衝液に溶出し、ポリエチレングリコール（PEG）沈澱などで濃縮した試料である。具体的な拭き取り検査の要領としては、「ふきとり検体のノロウイルス検査法の改良」（<http://idsc.nih.gov/jp/iasr/32/3822/dj3824.html>）などが例示されるが、特に限定はされるものではなく、これに準ずる方法が広く含まれる。拭き取り箇所の例としては、まな板や包丁、ふきん、食器などの調理器具類、冷蔵庫の取手やトイレ、浴室のドアノブ、洗面所、厨房、トイレ、浴室などの蛇口、調理者の手や指、浴室、トイレ、洗面、手すり、居室などの施設などが挙げられる。また、拭き取り検査ではないが、環境検査として、下水試料の濃縮試料にも適用できる。

[0022] 本発明において、極性とは分子内に存在する電子的な偏りを指し、分子内の正電荷と負電荷の重心が一致しない分子を極性分子という。極性分子により構成された溶媒を極性溶媒という。極性溶媒の中でも、有機化合物により構成された極性有機溶媒を用いることにより、核酸やタンパク質のような生体分子の高次構造を不安定化することができる。この性質を利用することで、ウイルスの構造タンパク質の疎水結合などを弱め、キャプシド構造を不安定化するような効果を奏するものである。上述した通り、ウイルスに対する極性有機溶媒によるキャプシド構造の不安定化効果は、ウイルスの種類によっても異なることが知られている。これはウイルスが保有するキャプシドタンパク質やエンベロープの性質の違いにより、疎水性結合などの強さが異なるからであると考えられる。

[0023] 前記極性有機溶媒として、具体的にはエタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、トリエチルアミン、ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリックトリアミド、

ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、ピリジン等が挙げられるがこれに限られるものではない。好ましくは、メタノール、トリエチルアミン、ジメチルスルホキシド、アセトンである。また、これら極性有機溶媒を2つ以上含む混合溶液であっても良い。該極性有機溶媒のキャプシドタンパク質の変性剤としての下限の濃度としては、極性有機溶媒や他の添加剤の種類にもよるが、キャプシドタンパク質が変性される濃度であれば特に限定されるものではなく、また、ウイルスの種類によりキャプシドタンパク質やエンベロープが異なるため、極性有機溶媒の実効濃度は各ウイルス毎に異なっているが、通常は検体量に対する極性有機溶媒の実効濃度が10%以上100%未満、より好ましくは30%以上90%以下、さらに好ましくは50%以上85%以下である。例えば、前記工程(1)における混合液中の極性有機溶媒の含有率が20%以上とすること、好ましくは25%以上、より好ましくは30%以上とすることにより上記極性有機溶媒の実効濃度を達成することが可能であり得る。前記工程(1)における混合液中の極性有機溶媒の含有率の上限は、本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、例えば90%以下、好ましくは80%以下、より好ましくは75%以下とするのがよい。なお、本発明において2種以上の極性有機溶媒を組み合わせる場合は、それらの総量が上記含有率の範囲内になるようにして調整することが好ましい。

[0024] 前記極性有機溶媒は、通常はPCRの阻害剤としても知られる。そのため、前記極性有機溶媒の中でも、タンパク質の変性に必要な濃度とPCRへの持込み許容濃度の相違が小さいものを選択することで、極性有機溶媒、試料、1ステップRT-PCR反応液と順次添加することで、キャプシドタンパク質の変性から1ステップRT-PCR反応まで同一容器で、途中で容器を開閉することなく簡便に検出操作が進められる。このような極性有機溶媒の例として、特に好ましくはジメチルスルホキシドが挙げられる。例えば、工程(1)でジメチルスルホキシド1 μ Lと試料1 μ Lを混合し、工程(3)

で1ステップRT-PCR液48 μ Lを加えた場合、反応液中に持ち込まれるジメチルスルホキシドの濃度は2%である。2%のジメチルスルホキシドはRT-PCR液の持ち込まれても許容される濃度である。本発明に好適に使用され得る極性有機溶媒（ジメチルスルホキシド）の量は、上記と同様に容易に算出することができる。

[0025] 前記極性有機溶媒は、1種以上の界面活性剤、還元剤、キレート剤、金属塩と組み合わせて用いてもよいし、これらの界面活性剤などを実質的に含まないものであってもよい。特定の実施形態では、例えば、工程（1）における混合液が界面活性剤を実質的に含まないものであってもよい。本発明によれば、このように界面活性剤を実質的に含まない状態で前処理を行っても、試料中のRNAウイルスを高感度に検出することが可能である。また界面活性剤は、その種類によってはRT-PCR反応を阻害する場合もあり得るため、界面活性剤を実質的に含まないことが望ましい。ここで実質的に含まないとは、RNAウイルスから核酸抽出し得るような濃度で界面活性剤を含まないことをいい、例えば、工程（1）の混合液中における界面活性剤の濃度が0.001%以下、好ましくは0.0001%以下、より好ましくは0.00001%以下であり、なかでも、工程（1）の混合液が界面活性剤を全く含まないことが好ましい。

[0026] アニオン性ポリマーは、アニオン性モノマーを主とする重合によって形成されたポリマーである。例えば、本発明に用いるアニオン性ポリマーは、スルホン酸基、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基、及びホスホン酸基からなる群より選択される少なくとも1種のアニオン性官能基を有するモノマーを主として重合して得られるポリマーであり、好ましくは、スルホン酸基をモノマーとして重合して得られるポリマーである。RNAやDNAをはじめとする核酸分子もアニオン性ポリマーである。試料中に含まれる核酸分解酵素はアニオン性ポリマーである核酸分子と結合し、消化を行う。理論に束縛されることは望まないが、本発明においては、核酸分解酵素にて消化されることのないアニオン性ポリマーを反応液系に添加することで、標的とする核酸

分子の消化を抑える効果を奏することが期待される。

[0027] 前記アニオン性ポリマーとして、本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、代表的なものとして、核酸ポリマー（ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸）、多糖類（カラギーナン、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、デルマタン硫酸）、ポリビニルスルホン酸、ポリビニルホスホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸／スルホン酸共重合体、ポリアクリル酸／マレイン酸共重合体などが挙げられる。

[0028] 前記アニオン性ポリマーは、塩の形態であってもよい。例えば、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩）等であってもよく、水和物塩であってもよい。好ましくは、アルカリ金属塩であり、より好ましくはナトリウム塩、カリウム塩であり、更に好ましくはナトリウム塩であり得る。

[0029] 前記アニオン性ポリマーの平均分子量は、本発明の効果を奏する限り特に限定されない。なお、本明細書において平均分子量は重量平均分子量をいう。アニオン性ポリマーの平均分子量は、構成単位であるモノマーの分子量および重合度によるところがあるが、例えば1,000以上、好ましくは5,000以上、更に好ましくは10,000以上、更により好ましくは50,000以上であって良い。また、アニオン性ポリマーの平均分子量の上限値も本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、例えば、5,000,000以下、好ましくは1,000,000以下、より好ましくは5,000,000以下であり得る。

[0030] 特定の実施形態において、前記工程（1）の混合液中におけるアニオン性ポリマーの含有率は、0.00001%（v/v%）以上であることが好ましく、0.0001%以上であることがより好ましく、0.001%以上であることが更に好ましい。前記工程（1）におけるアニオン性ポリマーの含

有率の上限値は、本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、例えば、0.5%以下、より好ましくは0.1%以下、更により好ましくは0.01%以下とすることができる。このような濃度でアニオン性ポリマーを含有することにより、精製工程を経ていない試料中でウイルスから露出したRNAが消化されてしまうのを効果的に防ぐことができ、及び／又は当該試料に含まれる夾雑物質等のPCR阻害物質による影響を効果的に防ぐことができ、結果としてウイルスRNAの検出感度の低下を高度に抑制することができる。工程（3）の1ステップRT-PCR反応液に持ち込まれるアニオン性ポリマーの含有率は、RT-PCR反応を阻害しない限り特に限定されないが、例えば、0.05%以下であり得、更に具体的には0.01%以下としてもよく、例えば、0.00001～0.001%としてもよい。

[0031] 一つの実施形態において、本発明のRNAウイルスの検査方法は、前記工程（1）において混合液を調製後、工程（2）を実施するまでの時間を5分以内とすることが好ましい。このように工程（1）終了後から工程（2）開始までの時間を短時間とすることで、より迅速なRNAウイルスの検査が可能になる。前記工程（1）において混合液を調製後、工程（2）を実施するまでの時間は、特に限定されないが、5分以下であることが好ましく、4分以下であることがより好ましく、3分以下であることがより好ましく、2分以下であることが更に好ましく、1分以下であってもよい。前記工程（1）において混合液を調製後、工程（2）を実施するまでの時間の下限値は特に限定されないが、例えば、10秒以上、好ましくは30秒以上とすることができる。本発明では、工程（1）における前処理時間がこのように短時間であっても、エンベロープやキャプシドに内包されたRNAの露出を誘導することができ、1ステップRT-PCRでのRNAの検出を可能にできる。

[0032] 一つの実施形態において、本発明のRNAウイルス検査方法で実施する工程（2）の加熱条件は、70℃以上であり得る。好ましくは、80℃以上、より好ましくは90℃以上、例えば95℃で実施することにより、より一層効果的に本発明の効果をを得ることができる。工程（2）の加熱条件の上限値

は特に限定されないが、例えば100℃であり得る。また、工程（2）の加熱条件は、上記加熱温度で1秒以上加熱することが好ましい。特定の好ましい実施形態では、30秒以上加熱するのがよく、1分以上加熱するのがよく、3分以上加熱するのがよい。上限値は本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、例えば10分以下にすることで迅速なRNAウイルスの検査が可能になる。例えば、一つの好ましい態様として、工程（2）における加熱条件は70℃1秒以上としてもよいし、他の好ましい態様として80℃又は90℃で1秒以上の加熱条件としてもよい。

[0033] 検体からのウイルス由来RNA精製作業は、煩雑であり作業時間を伸ばす原因となる。これに加えて、ウイルス含有検体の入った反応容器の移し替えや遠心分離作業等は、ウイルス及びウイルス由来RNAの飛散リスクが生じる。ウイルスの飛散は作業者の安全及び健康を脅かすものであると同時に、検査作業環境の汚染を意味する。飛散したRNAウイルスは作業場においてエアロゾル化するため、同時に検査している他のサンプルの汚染リスクおよび作業者の感染リスクが問題となっている。このため、検体からのウイルス由来RNA精製のないRT-PCRを用いたウイルスの存在の有無を検査方法は、作業の単純化以上の意義を持っている。

[0034] 前記混合液に添加される1ステップRT-PCR溶液は、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼを含む。逆転写酵素活性を併せ持つDNAポリメラーゼである、Tth DNAポリメラーゼやTaq DNAポリメラーゼなどを使用することが好ましい。より好ましくは、二種の酵素の使用、逆転写酵素とDNAポリメラーゼの少なくとも2種類の酵素の使用である。

[0035] 前記1ステップRT-PCR反応液に含まれる逆転写酵素の由来としては、RNAをDNAに変換できれば特に限定されないが、MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)-RT、AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus)、HIV-RT、RAV2-RT、EIAV-RT、カルボキシドサーマス・ハイドロゲノフォルマン (Carboxydothermus hydrogen

o f o r m a m) DNAポリメラーゼ) やその変異体が例示される。特に好ましい例としては、MMLV-RT、AMV-RT、またはそれらの変異体が挙げられる。

[0036] 前記1ステップRT-PCR反応液に含まれるDNAポリメラーゼとしては、Taq、Tth、Bst、KOD、Pfu、Pwo、Tbr、Tfi、Tfl、Tma、Tne、Vent、DEEPVENTやこれらの変異体が挙げられるが、特に限定されない。より好ましくは、Taq、Tth又はこれらの変異体の使用である。特に好ましくはTth又はその変異体の使用である。さらに、非特異的反応抑制の効果を高めるため、抗DNAポリメラーゼ抗体との併用、あるいは化学修飾により熱不安定ブロック基のDNAポリメラーゼへ導入することで、逆転写反応の間、DNAポリメラーゼの酵素活性を抑制され、ホットスタートPCRへの適用ができることが好ましい。

[0037] 本明細書において、DNAポリメラーゼの変異体とは、その由来である野生型DNAポリメラーゼのアミノ酸配列に対して、例えば85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、なかでも好ましくは99%以上の配列同一性を有し、且つ、野生型DNAポリメラーゼと同様にDNAを増幅する活性、及び必要に応じてRNAをcDNAに変換する活性を有するものをいう。ここで、アミノ酸配列の同一性を算出する方法としては、当該分野で公知の任意の手段で行うことができる。例えば、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができ、一例として、全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）の相同性アルゴリズムBLAST（Basic local alignment search tool）<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>においてデフォルト（初期設定）のパラメータを用いることにより、アミノ酸配列の同一性を算出することが可能である。また、本発明に用いられ得る変異体は、その由来である野生型DNAポリメラーゼのアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加（以下、これらを

纏めて「変異」ともいう)したアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、且つ、野生型DNAポリメラーゼと同様にRNAをcDNAに変換する活性及びDNAを増幅する活性を有するものであってもよい。ここで1又は数個とは、例えば、1～80個、好ましくは1～40個、よりこのましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、更により好ましくは1～3個であり得るが、特に限定されない。

[0038] 本発明に用いられる1ステップRT-PCR反応液には、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼの他、緩衝剤、適当な塩として、マグネシウム塩又はマンガン塩、デオキシヌクレオチド三リン酸、検出対象のウイルスRNAの検出対象領域に対応するプライマー対を含み、さらに必要に応じて添加剤を含んでいてもよい。

[0039] 本発明で使用される緩衝剤としては、特に限定されないが、トリス(Tris)、トリシン(Tricine)、ビスートリシン(Bis-Tricine)、ピシン(Bicine)などが挙げられる。硫酸、塩酸、酢酸、リン酸などでpHを6～9、より好ましくはpH7～8に調整されたものである。また、添加する緩衝剤の濃度としては、10～200mM、より好ましくは20～150mMで使用される。この際、反応に適当なイオン条件とするために、塩溶液が加えられる。塩溶液としては、塩化カリウム、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウムなどが挙げられる。

[0040] 本発明で使用されるdNTPとしては、dATP、dCTP、dGTP、dTTPがそれぞれ0.1～0.5mM、最も一般的には0.2mM程度加えられる。dTTPの代わり及び／又は一部としてdUTPを使用することによって、クロスコンタミネーションに対する予防処置をとってもよい。マグネシウム塩としては、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、マンガン塩としては、塩化マンガン、硫酸マンガン、酢酸マンガンなどが例示され、1～10mM程度加えられることが好ましい。

[0041] さらに1ステップRT-PCR反応液に含まれる添加剤としては、アミノ酸

におけるアミノ基に3個のメチル基を付加した構造を有する第4級アンモニウム塩（以下、「ベタイン様4級アンモニウム」という）、ウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも1つを含むことが好ましい。

[0042] 前記ベタイン様4級アンモニウム塩としては、ベタイン（トリメチルグリシン）、L-カルニチンなどが挙げられるが、アミノ酸におけるアミノ基に3個のメチル基を付加した構造を有する第4級アンモニウム塩であれば、特に限定されるものではない。ベタイン様4級アンモニウム塩が有する構造は分子内に安定な正、負の両電荷を持つ化合物で、界面活性剤のような性質を示し、ウイルス構造の不安定化を引き起こすものと考えられる。さらに、DNAポリメラーゼの核酸増幅を促進することが知られる。好ましい前記ベタイン様4級アンモニウム塩濃度は0.1M～2Mであり、より好ましくは0.2M～1.2Mである。

[0043] 前記1ステップRT-PCR反応液に含まれるウシ血清アルブミンとしては、好ましくは少なくとも0.5mg/ml以上、より好ましくは少なくとも1mg/ml以上である。夾雑物の多い試料では、ウシ血清アルブミンの濃度が好ましくは2mg/ml以上、さらに好ましくは3mg/ml以上で、良好な検出が可能となる。

[0044] 前記1ステップRT-PCR反応液に含まれるゼラチンは、ウシや豚などの動物の皮膚や骨、腱、あるいは魚の鱗や皮に由来し、PCR酵素の安定化に寄与すると考えられている。使用濃度としては、PCR増幅を安定化する一方で、蛍光検出を妨げない程度が好ましい。好ましくは1～5%、さらに好ましくは1～2%である。特にゼラチンの由来については限定されるものではないが、ウシや豚由来よりも魚由来のものの方が、ゼリー強度が低く、反応液のハンドリングがよい点で好ましい。

[0045] さらに、当該技術分野でRT-PCRを促進することが知られる物質と組み合わせて使用することもできる。本発明において有用な促進物質とは、例えば、グリセロール、ポリオール、プロテアーゼインヒビター、シングル

ストランド結合タンパク質（SSB）、T4 遺伝子 32 タンパク質、tRNA、硫黄または酢酸含有化合物類、ジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール、トリメチレングリコール、ホルムアミド、アセトアミド、ベタイン、エクトイン、トレハロース、デキストラン、ポリビニルピロリドン（PVP）、塩化テトラメチルアンモニウム（TMAC）、水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）、酢酸テトラメチルアンモニウム（TMAA）、ポリエチレングリコール、トリトンX-100（TritonX-100）、トリトンX-114（TritonX-114）、ツイーン20（Tween20）、ノニデットP40、Brj 58などが挙げられるが、これらに限定されない。さらに反応阻害を低減するように、エチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル)-N, N, N', N'-四酢酸（EGTA）、1, 2-ビス(ο-アミノフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸（BAPTA）のようなキレート剤を含んでもよい。

[0046] 本発明の方法において、前記工程（3）において1ステップRT-PCR反応液が、ターゲット領域に対応する1以上のプライマー対をさらに含むことが好ましい。本発明に用いられるプライマー対としては、検出対象のRNAウイルスの検出領域（ターゲット領域）に対応するプライマー対であり、一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に互いに相補的である2種一对のプライマーが挙げられる。また、別の態様として、上記プライマーが2対以上含まれる、いわゆるマルチプレックスPCRも挙げられる。さらに、ターゲットとする核酸が垂型からなる場合、縮重プライマーを含んでもよい。本発明でエンベロープRNAウイルスの1種であるコロナウイルス（SARS-nCoV-2）を検出する場合、プライマー対の例としては、国立感染症研究所が発表している「病原体検出マニュアル2019-nCoV」に記載の配列（配列番号1、2、4、5）、アメリカ疾病予防管理センターが発表する「2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）Real-time rRT-pCR Panel

Primers and Probes」(配列番号7、8、10、11、13、14)が挙げられ、本発明においても好適に使用することができるが、これに限るものではない。前記記載のプライマー配列では、配列番号1および2、配列番号4および5、配列番号7および8、配列番号10および11、配列番号13および14によりSARS-nCoV-2のヌクレオキャプシドタンパク質(N)領域を検出する。SARS-nCoV-2をはじめとするコロナウイルスの検出においては、ヌクレオキャプシド(N)領域、エンベロープタンパク質(E)領域、スパイクタンパク質(S)領域、RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)領域、Open Reading Frame(ORF)領域等の遺伝子を検出の対象とすることができるが、特にこれに限るものではない。使用するプライマーの濃度としては、RT-PCR反応液全体に対して、フォワードプライマーの濃度が0.1 μ M以上3 μ M以下であり、かつ前記リバースプライマーの濃度が0.1 μ M以上3 μ M以下であることが好ましい。より好ましくは、フォワードプライマーの濃度が0.1 μ M以上2 μ M以下であり、かつ前記リバースプライマーの濃度が0.5 μ M以上2 μ M以下である。

[0047] 本発明は、別の態様としては、さらに、少なくとも1種類の標識されたハイブリダイゼーションプローブまたは2本鎖DNA結合蛍光化合物を含む検出方法である。これによって、増幅産物の分析を通常の電気泳動ではなく、蛍光シグナルのモニタリングで監視することができ、解析労力が低減される。さらには、反応容器を開放する必要がなく、コンタミネーションのリスク低減が可能である。ウイルスのサブタイプに対応する、それぞれのハイブリダイゼーションプローブを異なる蛍光色素で標識することによって、ウイルスのサブタイプを識別することも可能である。

[0048] 2本鎖DNA結合蛍光化合物としては、例えば、SYBR(登録商標) Green I, SYBR(登録商標) Gold、SYTO-9、SYTP-13、SYTO-82(Life Technologies), EvaGreen(登録商標; Biotium)、LCGreen(Idaho

), LightCycler (登録商標) 480 ResoLight (Roche Applied Science) などが挙げられる。

[0049] 本発明において用いられるハイブリダイゼーションプローブとしては、例えば、TaqMan加水分解プローブ（米国特許第5,210,015号公報、米国特許第5,538,848号公報、米国特許第5,487,972号公報、米国特許第5,804,375号公報）、モレキュラービーコン（米国特許第5,118,801号公報）、FRETハイブリダイゼーションプローブ（国際公開第97/46707号パンフレット、国際公開第97/46712号パンフレット、国際公開第97/46714号パンフレット）などが挙げられる。エンベロープRNAウイルスの1種であるコロナウイルス（SARS-nCoV-2）検出用のプローブの塩基配列としては、アメリカ疾病予防管理センターが発表する「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-pCR Panel Primers and Probes」（配列番号9、12、15）および国立感染症研究所が発表している「病原体検出マニュアル2019-nCoV」に記載の配列（配列番号3、6）が挙げられ、本発明においても好適に使用することができるが、これに限るものではない。前記記載のプローブ配列ではSARS-nCoV-2のN領域を検出する。さらに、ターゲットとする核酸が亜型からなる場合、縮重配列を含んでもよい。SARS-nCoV-2をはじめとするコロナウイルスの検出においては、N領域、E領域、S領域、RdRp領域、ORF領域等の遺伝子を検出の対象とすることができるが、特にこれに限るものではない。蛍光標識プローブの濃度としては、0.01 μ M以上1.0 μ M以下であることが好ましい。より好ましくは、0.013 μ M以上0.75 μ M以下であり、更に好ましくは、0.02 μ M以上0.5 μ M以下である。

[0050] 本発明の別の一態様は、試料中のウイルスRNAの検査用キットであって、極性有機溶媒およびアニオン性ポリマーを含む前処理液、並びに逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ（あるいは逆転写活性を有するDNAポリメラ

ーゼ)、1ステップRT-PCR反応液を含むことを特徴とするエンベロープRNAウイルスの検査用キットである。本発明のウイルスの検査用キットは、少なくとも極性有機溶媒、アニオン性ポリマーを含む試薬、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、および1ステップRT-PCR反応液を含む。本発明のウイルスの検査用キットは、極性有機溶媒とアニオン性ポリマーの両方を含有する試薬を含むものであってもよいし、極性有機溶媒とアニオン性ポリマーとを別々の試薬として含むものであってもよい。検査作業をより簡便に行えるという観点から、好ましくは、極性有機溶媒とアニオン性ポリマーの両方を含有する試薬として提供されることが望ましく、本発明の好適なキットでは、この両方を含有する試薬を含む態様で提供される。1ステップRT-PCR反応液には、ベタイン様4級アンモニウム塩、ウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンのうちの少なくとも1つを含むことが好ましい。検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するプライマー対、さらには検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するハイブリダイゼーションプローブを含むことが好ましい。本発明のキットは、上記のような各種成分を同じ容器に封入したもの又は別々の容器に封入したものを、例えば一つの包装体に梱包し、当該キットの使用法に関する情報を含む態様で提供することができる。本発明のキットを使用することにより、迅速、簡便に試料中のRNAウイルスの有無について検査することが可能となる。

実施例

[0051] 以下、実施例をもって、本発明を具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0052] 試験例1. RNaseによるRT-PCR阻害に対するアニオン性ポリマーの効果

(1) 反応液の調製

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、1ステップRT-PCRにて、RNase A存在下における反応液中のコロナウイルスRNAを検出し

た。検出試薬として、前処理液以外は、SARS-CoV-2 Detection Kit -N1 set-（東洋紡）を用いた。なお、本試薬の添付品である検出のためのプライマー・プローブは、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes」（Effective: 24 Jan 2020）に記載されているN1セットであり、プローブは蛍光標識としてFAM、消光基としてBHQ1（Black hole quencher）を修飾したものを使用した。

RT-PCR反応液（43 μ L）

反応液：30 μ L

酵素液：5 μ L

プライマー・プローブ液：5 μ L

RNase free water：3 μ L

（2）鋳型RNAおよびRNase Aの添加と前処理

100% ジメチルスルホキシド3 μ Lに、RNase free waterまたは1 ng/ μ L RNase A（ナカライテスク）を1 μ L添加し、これにRNase free waterまたは、ポリビニルスルホン酸ナトリウム（PVSA）を終濃度0.001%となるように1 μ L混合した。その後、AcroMetrix Coronavirus 2019（COVID-19）RNA Control（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を最終濃度50コピー／反応～5コピー／反応となるように2 μ Lを混合し、直ちに混合液7 μ Lをサーマルサイクラーにて95℃5分間の熱処理を行った。

（3）反応液の添加

前工程にて熱処理後の混合液7 μ Lに、（1）にて調製したRT-PCR反応液43 μ Lを添加して、50 μ L反応系にてRT-PCRを実施した。

（4）RT-PCR反応条件 StepOne plus（サーモフィッ

ャーサイエンティフィック)を使用して、以下の温度サイクルでリアルタイムPCR反応を実施した。

42℃ 5分(逆転写条件)

95℃ 10秒(熱変性)

95℃ 1秒-50℃ 3秒-55℃ 10秒 50サイクル(PCR-蛍光読み取り)

(5) 結果

測定結果は、StepOne plus(サーモフィッシャーサイエンティフィック)付属の解析ソフトウェアにて、閾値を10,000としてCt値を算出した。この結果を下記の表1及び図1に示す。この結果に示されるように、RNase Aを添加すると、PVSAが存在しない条件では、50~5コピーすべてにおいて未検出となった。反面、PVSA存在下においては、50コピー~5コピーが検出可能となった。

[表1]

Ct値		1	2	3
PVSA		なし	なし	+0.001%
RNase A		なし	1ng	1ng
RNA (コピー数)	50	34.4	N/A	37.6
	50	35.6	N/A	36.5
	10	36.5	N/A	38.5
	10	38.0	N/A	39.3
	5	38.9	N/A	39.4
	5	38.4	N/A	39.7

[0053] 試験例2. 不活化ウイルスを用いたアニオン性ポリマーの効果検討

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、1ステップRT-PCRにて、RNase A存在下における反応液中の不活化コロナウイルスを検出した。検出試薬として、前処理液以外は、SARS-CoV-2 Detection Kit -N1 set-(東洋紡)を用いた。なお、本試薬の

添付品である検出のためのプライマー・プローブは、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行「2019–Novel Coronavirus (2019–nCoV) Real–time RT–PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020) に記載されているN1セットであり、プローブは蛍光標識としてFAM、消光基としてBHQ1 (Black hole quencher) を修飾したものを使用した。

RT–PCR反応液 (41 μ L)

反応液: 30 μ L

酵素液: 5 μ L

プライマー・プローブ液: 5 μ L

RNase free water: 1 μ L

(2) 不活化ウイルスおよびRNase Aの添加と前処理

100% ジメチルスルホキシド3 μ Lに、RNase free waterまたは100 ng/ μ L RNase A (ナカライテスク) を1 μ L添加し、これにRNase free waterまたは、ポリビニルスルホン酸ナトリウム (PVSA) を終濃度0.001%となるように1 μ L混合した。その後、不活化されたコロナウイルス検体として、AccuPlex SARS–CoV–2 Reference Material Kit (Seracare) 添付のPositive controlを最終濃度20コピー/反応となるように4 μ Lを混合し、直ちに混合液9 μ Lをサーマルサイクラーにて95°C 5分間の熱処理を行った。

(3) 反応液の添加

前工程にて熱処理後の混合液9 μ Lに、(1)にて調製したRT–PCR反応液41 μ Lを添加して、50 μ L反応系にてRT–PCRを実施した。

(4) RT–PCR反応条件

StepOne plus (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用して、以下の温度サイクルでリアルタイムPCR反応を実施した。

4 2℃ 5 分（逆転写条件）

9 5℃ 1 0 秒（熱変性）

9 5℃ 1 秒－5 0℃ 3 秒－5 5℃ 1 0 秒 5 0 サイクル（PCR－蛍光読み取り）

（５）結果

測定結果は、StepOne plus（サーモフィッシャーサイエンティフィック）付属の解析ソフトウェアにて、閾値を10,000としてCt値を算出した。この結果を下記の表2及び図2に示す。この結果に示されるように、RNase Aを添加すると、PVSAが存在しない条件では、不活化ウイルス20コピー（n=4）すべてにおいて未検出となった。反面、PVSA存在下においてはすべて検出可能となった。

[表2]

Ct値		1	2	3	4
PVSA		なし		+0.001%	
RNase A		0ng	100ng	0ng	100ng
SARS-CoV-2 (コピー数)	20	36.1	N/A	36.3	38.8
	20	37.1	N/A	37.0	39.1
	20	36.7	N/A	35.6	37.7
	20	36.3	N/A	36.1	36.8

[0054] 試験例3. 唾液検体を用いた検討

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、1ステップRT-PCRにて、唾液検体存在下における反応液中の不活化コロナウイルスを検出した。検出試薬として、前処理液以外は、SARS-CoV-2 Detection Kit -N1 set-（東洋紡）を用いた。なお、本試薬の添付品である検出のためのプライマー・プローブは、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行「2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes」（Effective: 24 J

an 2020)に記載されているN1セットであり、プローブは蛍光標識としてFAM、消光基としてBHQ1 (Black hole quencher)を修飾したものを使用した。

RT-PCR反応液 (41 μ L)

反応液 : 30 μ L

酵素液 : 5 μ L

プライマー・プローブ液 : 5 μ L

RNase free water : 1 μ L

(2) 唾液検体の添加と不活化ウイルスの前処理

100% ジメチルスルホキシド3 μ Lに、RNase free waterまたは唾液1 μ L添加し、これにRNase free waterまたは、ポリビニルスルホン酸ナトリウム (PVSA)を最終濃度0.001%となるように1 μ L混合した。その後、不活化されたコロナウイルス検体として、AccuPlex SARS-CoV-2 Reference Material Kit (Seracare)添付のPositive controlを最終濃度20コピー／反応となるように4 μ Lを混合し、直ちに混合液9 μ Lをサーマルサイクラーにて95℃5分間の熱処理を行った。

(3) 反応液の添加

前工程にて熱処理後の混合液9 μ Lに、(1)にて調製したRT-PCR反応液41 μ Lを添加して、50 μ L反応系にてRT-PCRを実施した。

(4) RT-PCR反応条件

StepOne plus (サーモフィッシャーサイエンティフィック)を使用して、以下の温度サイクルでリアルタイムPCR反応を実施した。

42℃ 5分 (逆転写条件)

95℃ 10秒 (熱変性)

95℃ 1秒－50℃ 3秒－55℃ 10秒 50サイクル (PCR－蛍光読み取り)

(5) 結果

測定結果は、StepOne plus（サーモフィッシャーサイエンティフィック）付属の解析ソフトウェアにて、閾値を10,000としてCt値を算出した。この結果を下記の表3及び図3に示す。この結果に示されるように、RNase Aを添加すると、PVSAが存在しない条件では、不活化ウイルス20コピー（n=4）すべてにおいて未検出となった。反面、PVSA存在下においてはn=4中で3サンプルにおいて検出が確認された。

[表3]

Ct値		1	2	3	4
PVSA		なし	+0.001%	なし	+0.001%
唾液		なし	なし	あり	あり
SARS-CoV-2 (コピー数)	20	37.8	37.0	N/A	38.8
	20	38.0	36.5	N/A	40.4
	20	36.8	36.6	N/A	N/A

産業上の利用可能性

[0055] 本発明は、分子生物学研究、さらに臨床検査や食品衛生管理などを目的とした検査において、好適に用いられる。

請求の範囲

- [請求項1] 試料中のRNAウイルスの検査方法であって、以下の工程を含むことを特徴とする検査方法。
- (1) RNAの精製を行っていない試料と、アニオン性ポリマーと、極性有機溶媒とを含む混合液を調製する工程、
- (2) 前記混合液を加熱する工程、
- (3) 加熱後の前記混合液に、(i) 逆転写酵素およびDNAポリメラーゼまたは(ii) 逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を添加する工程、
- (4) 反応容器を密閉後、1ステップRT-PCR反応を実施する工程。
- [請求項2] 工程(1)において、混合液中の極性有機溶媒の含有率が20%以上である請求項1に記載の検査方法。
- [請求項3] 工程(1)において、混合液中のアニオン性ポリマーの含有率が0.00001%以上である請求項1又は2に記載の検査方法。
- [請求項4] 工程(1)において、混合液が界面活性剤を実質的に含まないことを特徴とする請求項1から請求項3のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項5] 工程(1)において混合液を調製後、工程(2)を実施するまでの時間が5分以内である請求項1から4のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項6] 工程(2)における加熱条件が、70℃1秒以上であることを特徴とする請求項1から5のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項7] 試料が糞便、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀痰、肺吸引物、脳脊髄液、うがい液、唾液、涙液、培養細胞、培養上清、及び環境中の拭き取り検査試料からなる群より選択される少なくとも1種である請求項1から6のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項8] 試料が水、生理食塩水、緩衝液若しくはスプタザイム酵素液に懸濁された懸濁液、又はそれらの遠心上清若しくは濃縮物である請求項1から7のいずれかに記載の検査方法。

- [請求項9] RNAウイルスがエンベロープを持つRNAウイルスであることを特徴とする請求項1から請求項8のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項10] エンベロープを持つRNAウイルスが、フラビウイルス科ウイルス；トガウイルス科ウイルス；コロナウイルス科ウイルス；オルトミクソウイルス科ウイルス；ラブドウイルス科ウイルス；ブニヤウイルス科ウイルス；パラミクソウイルス科ウイルス；及びフィロウイルス科ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする請求項9に記載の検査方法。
- [請求項11] エンベロープを持つRNAウイルスがコロナウイルス科ウイルスである請求項1から10のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項12] コロナウイルス科ウイルスがSARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルス、MERS（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、SARS-nCoV-2コロナウイルスである請求項11に記載の検査方法。
- [請求項13] RNAウイルスがエンベロープを持たないRNAウイルスであることを特徴とする請求項1から請求項12のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項14] エンベロープを持たないRNAウイルスが、アストロウイルス科ウイルス；カリシウイルス科ウイルス；ピコルナウイルス科ウイルス；ヘペウイルス科ウイルス；及びレオウイルス科ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする請求項13に記載のウイルスの検査方法。
- [請求項15] 極性有機溶媒が、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、ピリジン、トリエチルアミンジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリックトリアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、およびアセトニトリルよりなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項1から14のいずれかに記載の検査方法。

- [請求項16] アニオン性ポリマーが、スルホン酸基、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基、及びホスホン酸基からなる群より選択される少なくとも1種のアニオン性官能基を有するモノマーを重合して得られるポリマーである請求項1から請求項15のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項17] アニオン性ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸、カラギーナン、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、デルマタン硫酸、ポリビニルスルホン酸、ポリビニルホスホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸／スルホン酸共重合体、ポリアクリル酸／マレイン酸共重合体およびこれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種のアニオン性ポリマーである請求項1から16のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項18] DNAポリメラーゼが、Taq、Tthおよびそれらの変異体よりなる群から選択されるいずれかであることを特徴とする請求項1から17のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項19] 逆転写酵素の由来が、モロニー Maus 白血病ウイルス（MMRV）、トリ骨髄芽球症ウイルス（AMV）およびこれらの変異体からなる群より選択されるいずれかであることを特徴とする請求項1から18のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項20] 工程（4）における1ステップRT-PCR反応液が、アミノ酸におけるアミノ基に3個のメチル基を付加した構造を有する第4級アンモニウム塩（以下、「ベタイン様4級アンモニウム」という）、ウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも1つをさらに含むことを特徴とする請求項1から19のいずれかに記載の検査方法。
- [請求項21] ベタイン様4級アンモニウム塩が、ベタインまたはL-カルニチン

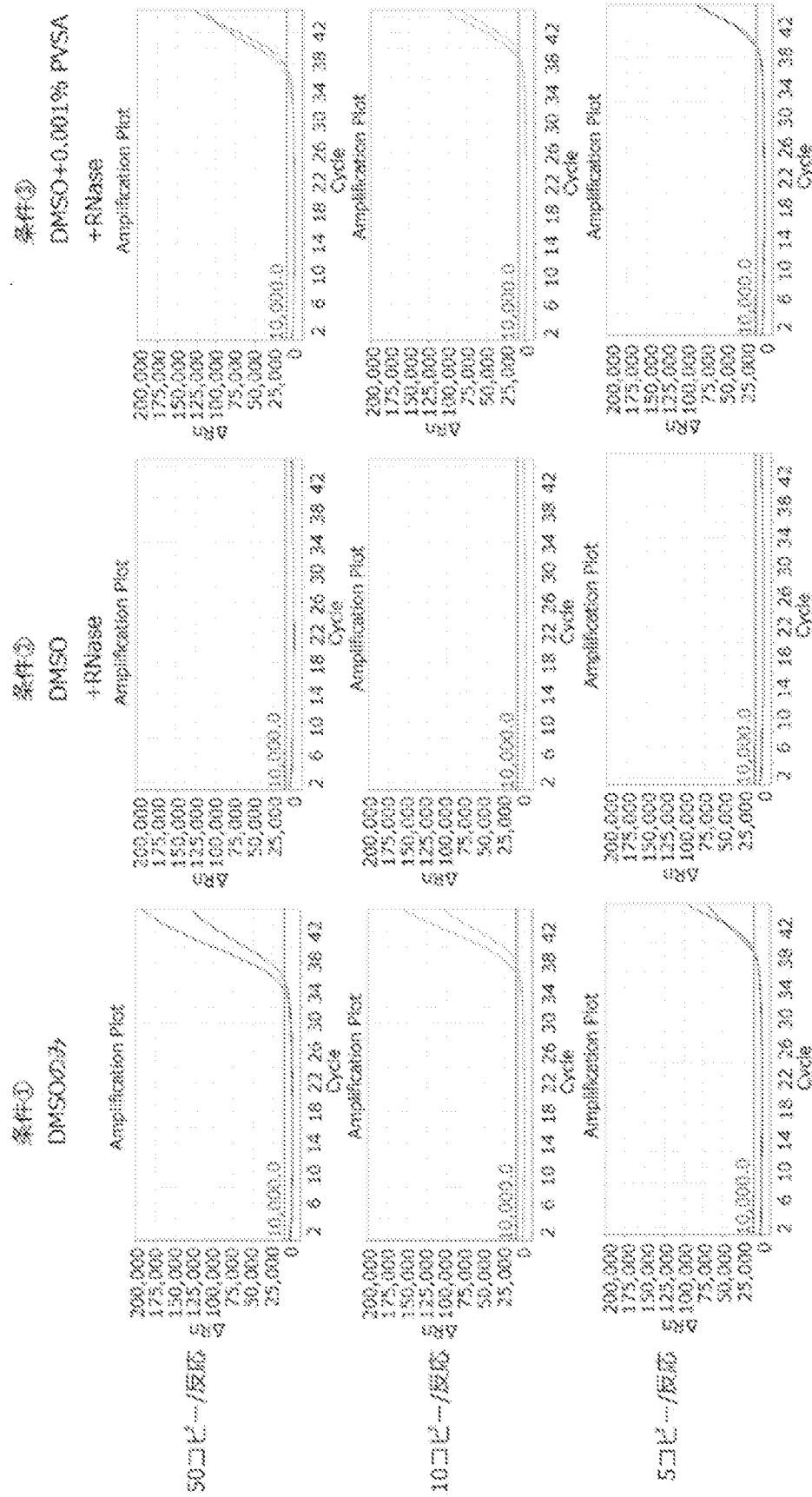
である請求項20に記載のウイルスの検査方法。

- [請求項22] アニオン性ポリマー、極性有機溶媒、(i) 逆転写酵素及びDNAポリメラーゼ又は(ii) 逆転写酵素活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を含むことを特徴とするRNAウイルスの検査用キット。
- [請求項23] ベタイン様4級アンモニウム塩、ウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも1つをさらに含む請求項22に記載の検査用キット。
- [請求項24] 検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するプライマー対をさらに含むことを特徴とする請求項22または23に記載のウイルスの検査用キット。
- [請求項25] 検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するハイブリダイゼーションプローブをさらに含むことを特徴とする請求項22から24いずれかに記載のウイルスの検査用キット。
- [請求項26] RNAウイルスがエンベロープを持つことを特徴とする請求項22から25のいずれかに記載のウイルスの検査キット。
- [請求項27] エンベロープを持つRNAウイルスが、フラビウイルス科ウイルス；トガウイルス科ウイルス；コロナウイルス科ウイルス；オルトミクソウイルス科ウイルス；ラブドウイルス科ウイルス；ブニヤウイルス科ウイルス；パラミクソウイルス科ウイルス；及びフィロウイルス科ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする請求項26に記載のウイルスの検査用キット。
- [請求項28] エンベロープを持つRNAウイルスがコロナウイルスである請求項26又は27のいずれかに記載のウイルスの検査用キット。
- [請求項29] コロナウイルス科ウイルスがSARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルス、MERS（中東呼吸器症候群）コロナウイルス、SARS-nCoV-2であることを特徴とする請求項27又は請求項28に記載のウイルスの検査用キット。

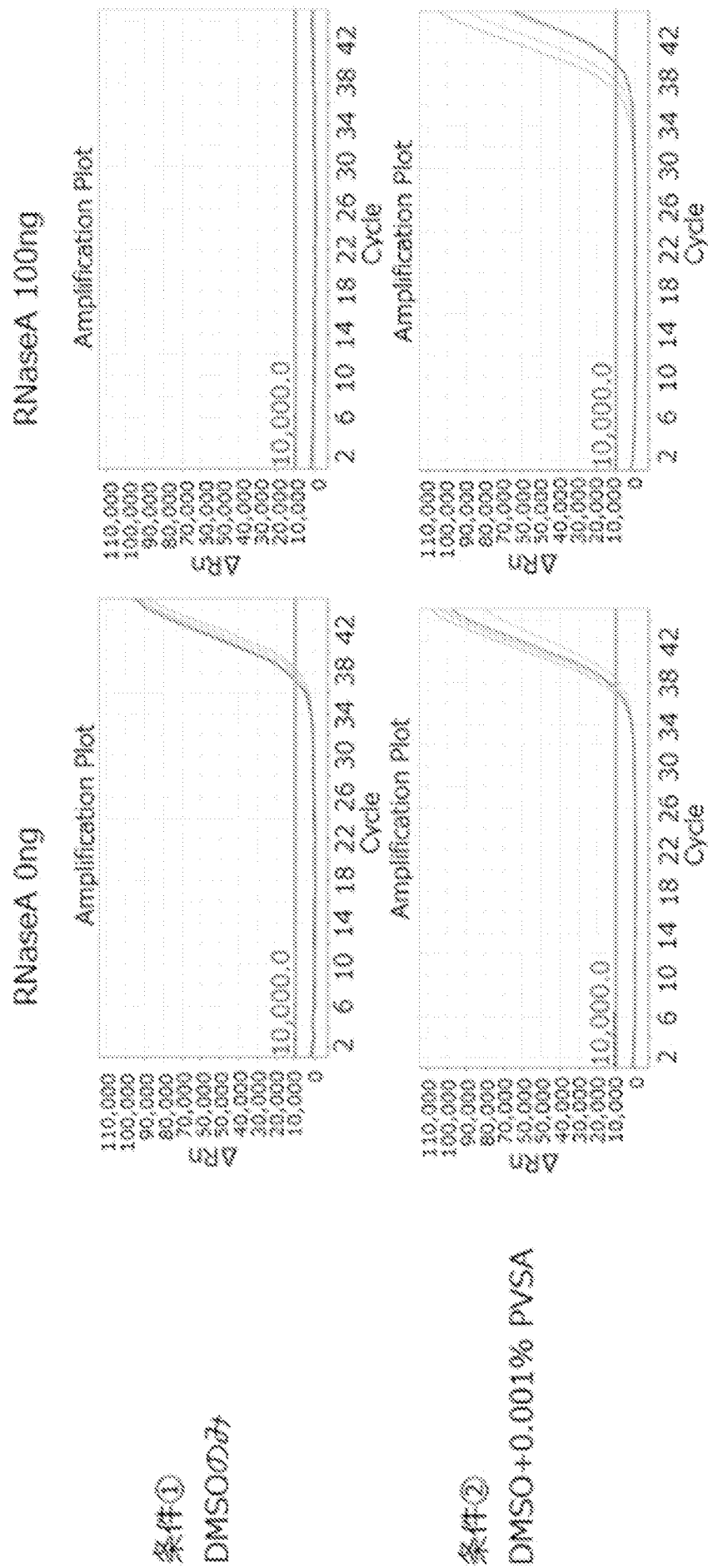
[請求項30] RNAウイルスがエンベロープを持たないことを特徴とする請求項22から25のいずれかに記載のウイルスの検査キット。

[請求項31] エンベロープを持たないRNAウイルスが、アストロウイルス科ウイルス；カリシウイルス科ウイルス；ピコルナウイルス科ウイルス；ヘペウイルス科ウイルス；及びレオウイルス科ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする請求項30に記載のウイルスの検査用キット。

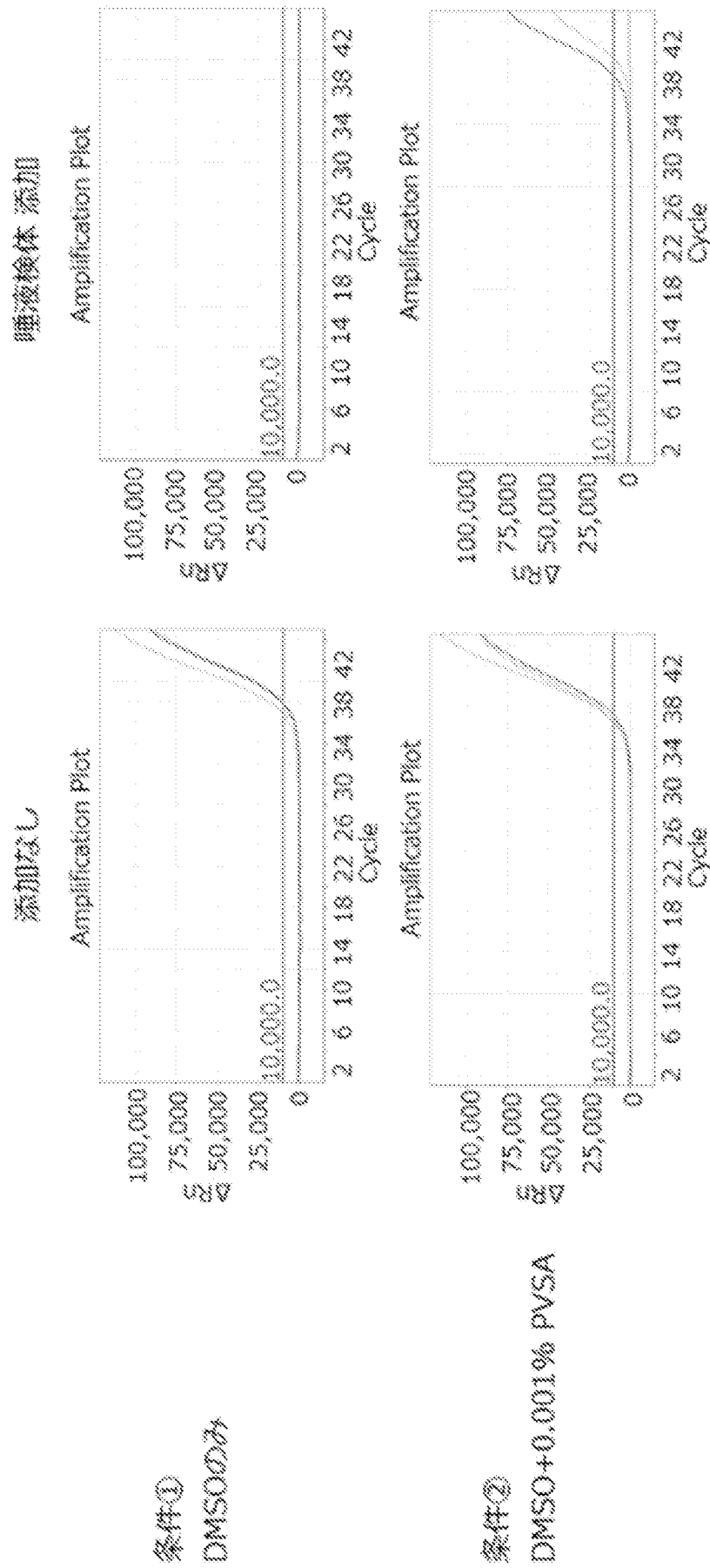
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/686(2018.01)i; **C12N 9/12**(2006.01)i; **C12Q 1/6806**(2018.01)i; **C12Q 1/6888**(2018.01)i; **C12N 15/09**(2006.01)n
FI: C12Q1/686 Z ZNA; C12N9/12; C12Q1/6806 Z; C12Q1/6888 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)

C12Q1/68-1/6897; C12N15/09; C12N9/12

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); Cplus/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.
X	WO 2018/198682 A1 (TOYO BOSEKI) 01 November 2018 (2018-11-01) claims 1, 10-14, 16-20, paragraphs [0026]-[0027], [0041]	22-25, 29-31
Y		1-31
Y	EARL, Conner C. et al., Polyvinylsulfonic acid: A Low-cost RNase inhibitor for enhanced RNA preservation and cell-free protein translation, Bioengineered, 2018, Vol. 9, pp. 90-97 abstract	1-31
Y	PFAENDER, Stephanie et al., Mechanisms of methods for hepatitis C virus inactivation, Appl. Environ. Microbiol., 2015, Vol. 81, pp. 1616-1621 abstract	1-3, 5-31
Y	WO 2010/026730 A1 (NBC INC.) 11 March 2010 (2010-03-11) paragraph [0003]	1-3, 5-31
Y	WO 2013/068107 A1 (QIAGEN GMBH) 16 May 2013 (2013-05-16) claims 1, 4, 7, 9, 13-14, p. 7, line 14-26, p. 20, line 35 to p. 21, line 17, p. 25, line 21-22	1-31
Y	JP 2016-182112 A (TOSOH CORPORATION) 20 October 2016 (2016-10-20) claims 1-2, 5-7, paragraphs [0005], [0020], [0036]	1-31



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

24 September 2021

Date of mailing of the international search report

05 October 2021

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027383**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2017-209036 A (TOYO BOSEKI) 30 November 2017 (2017-11-30) claims 1, 10-13	1-31
Y	JP 2018-138 A (TOYO BOSEKI) 11 January 2018 (2018-01-11) claims 1, 11-14	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027383

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/027383

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2018/198682	A1	01 November 2018	(Family: none)	
WO	2010/026730	A1	11 March 2010	US 2011/0195108	A1
				paragraph [0003]	
				EP 2332554	A1
				CN 102196812	A
				KR 10-2011-0054035	A
				JP 2014-231525	A
WO	2013/068107	A1	16 May 2013	EP 2776577	A1
JP	2016-182112	A	20 October 2016	(Family: none)	
JP	2017-209036	A	30 November 2017	(Family: none)	
JP	2018-138	A	11 January 2018	(Family: none)	

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; C12N 9/12(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6888(2018.01)i; C12N 15/09(2006.01)n FI: C12Q1/686 Z ZNA; C12N9/12; C12Q1/6806 Z; C12Q1/6888 Z; C12N15/09 Z		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/68-1/6897; C12N15/09; C12N9/12		
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 1971-2021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		
国際調査で利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), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2018/198682 A1 (東洋紡株式会社) 01.11.2018 (2018-11-01) 請求項 1、10-14、16-20、[0026] - [0027]、[0041]	22-25, 29-31
Y		1-31
Y	EARL, Conner C. et al., Polyvinylsulfonic acid: A Low-cost RNase inhibitor for enhanced RNA preservation and cell-free protein translation, Bioengineered, 2018, Vol. 9, pp. 90-97 要約	1-31
Y	PFAENDER, Stephanie et al., Mechanisms of methods for hepatitis C virus inactivation, Appl. Environ. Microbiol., 2015, Vol. 81, pp. 1616-1621 要約	1-3, 5-31
Y	WO 2010/026730 A1 (NBC株式会社) 11.03.2010 (2010-03-11) [0003]	1-3, 5-31
☒ 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、一般的な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 24.09.2021		国際調査報告の発送日 05.10.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 西 賢二 4B 5803 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	WO 2013/068107 A1 (QIAGEN GMBH) 16.05.2013 (2013 - 05 - 16) 請求項 1、4、7、9、13 - 14、第7頁第14 - 26行、第20頁第35行 - 第21頁第17行、第25頁第21 - 22行	1-31
Y	JP 2016-182112 A (東ソー株式会社) 20.10.2016 (2016 - 10 - 20) 請求項 1 - 2、5 - 7、[0005]、[0020]、[0036]	1-31
Y	JP 2017-209036 A (東洋紡株式会社) 30.11.2017 (2017 - 11 - 30) 請求項 1、10 - 13	1-31
Y	JP 2018-138 A (東洋紡株式会社) 11.01.2018 (2018 - 01 - 11) 請求項 1、11 - 14	1-31

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

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/JP2021/027383

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2018/198682	A1	01.11.2018	(ファミリーなし)	
WO	2010/026730	A1	11.03.2010	US 2011/0195108	A1
				[0 0 0 3]	
				EP 2332554	A1
				CN 102196812	A
				KR 10-2011-0054035	A
				JP 2014-231525	A
WO	2013/068107	A1	16.05.2013	EP 2776577	A1
JP	2016-182112	A	20.10.2016	(ファミリーなし)	
JP	2017-209036	A	30.11.2017	(ファミリーなし)	
JP	2018-138	A	11.01.2018	(ファミリーなし)	