

(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
2019年6月27日(27.06.2019)



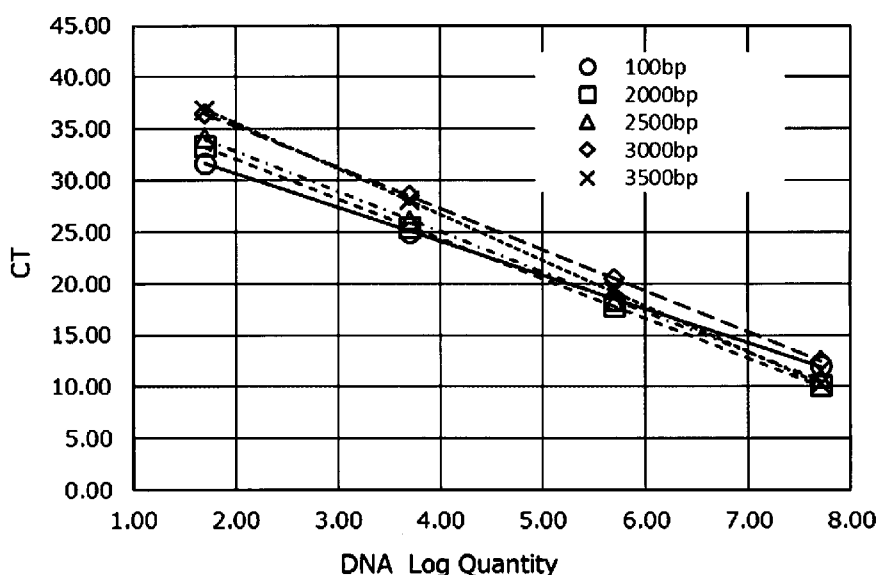
(10) 国際公開番号

WO 2019/124306 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/686* (2018.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *C12Q 1/70* (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01) *C12M 1/42* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/046335
- (22) 国際出願日: 2018年12月17日(17.12.2018)
- (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 2017-245023 2017年12月21日(21.12.2017) JP
- (71) 出願人: D I C株式会社(DIC CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1748520 東京都板橋区坂下3丁目35番58号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松田 智昌 (MATSUDA Toshiaki);
〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C株式会社 総合研究所内 Chiba (JP). 猪熊 立規(INOKUMA Tatsunori); 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C株式会社 総合研究所内 Chiba (JP). ノッカー アンドレアス (NOCKER Andreas); 45476 ミュールハイム・アン・デア・ルール モーリツシュトラッセ 26 I WW ラインニッシュェーヴェストファーレン インスティトゥート フォア ヴァスエフォーション ゲマインヌツィガ ゲーエムベーハー内 Muelheim an der Ruhr (DE).
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外 (TANAI Sumio et al.);
〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(54) Title: METHOD FOR MEASURING ACTIVITY OF DNA VIRUS OR UNICELLULAR ORGANISM, AND METHOD FOR MEASURING STERILIZING POWER OF ACTIVE ENERGY RAY IRRADIATION DEVICE

(54) 発明の名称: D N A ウィルスまたは単細胞生物の活性測定方法、及び、活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法



(57) Abstract: The present invention provides a method for measuring the activity of a DNA virus or a unicellular organism, the method being characterized by having: 1) a step for preparing a target nucleic acid held by a DNA virus or a unicellular organism; 2) a step for preparing a primer in which an amplification range by PCR using the target nucleic acid as a template is a length of 1500-2800bp; 3) a step for performing quantitative PCR using the target nucleic acid and the primer; and 4) a step for converting a result of the quantitative PCR to the activity ability of a DNA virus or a unicellular organism. The present invention also provides a method for measuring the sterilizing power of an active

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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))
- 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))

energy ray irradiation device.

(57) 要約: 本発明は、1) DNAウイルスまたは単細胞生物の保有する標的核酸を用意する工程と、2) 標的核酸を鋳型としたPCRによる増幅範囲が1500-2800bpの長さとなるプライマーを用意する工程と、3) 標的核酸とプライマーを用いて定量PCRを行う工程と、4) 定量PCRの結果をDNAウイルスまたは単細胞生物の活性能に変換する工程とを有することを特徴とする、DNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法を提供するものである。また本発明は、活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法を提供するものである。

明 細 書

発明の名称：

DNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法、及び、活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、DNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法、及び、活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法に関する。

本願は、2017年12月21日に、日本に出願された特願2017-245023号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 病原性を有するウイルスや細菌等の単細胞生物の殺菌・消毒は、衛生環境の維持に置いて大変重要である。特に飲料水や環境水の殺菌・消毒は、人々の健康に直結する為、厳密に行われる必要がある。従来は、塩素剤等の薬剤投与が多く用いられているが、薬剤の残留が生態系への影響やアレルギー等の原因となるという課題があった。そこで、近年紫外線や放射線といった活性エネルギー線照射を行い核酸に損傷を与える殺菌・消毒処理が多く利用されるようになってきた。特に、耐塩素性を有するクリプトスポリジウムなどの原虫対策に、活性エネルギー線照射処理が期待されている。

[0003] しかし、ウイルスや単細胞生物の殺菌に用いる活性エネルギー線照射装置については、各種課題が存在する。例えば、活性エネルギー線照射装置の照射線量については、装置や光源の設定や照射量測定装置等である程度の検証は可能である。しかし、実際の殺菌力については、照射時間や照射装置内での滞留時間、照射場所等でバラつきがあるため、実際の装置が保有する殺菌力の検証は、培養法により、生菌や病原性の確認を行う必要があり、判定までに時間がかかってしまうという大きな課題が存在していた。

[0004] また、殺菌対象であるウイルスや単細胞生物についても、殺菌・消毒処理がきちんと行われたかどうかの検証には、多くの課題があった。たとえば処

理前後で顕微鏡観察したとしても、形態変化が無い場合があるため、ウイルスや単細胞生物が病原性を保持しているのかどうか判別できなかった。また、菌量やウイルス量を測定するのに定量PCRを用いる場合があるが、従来の一般的な定量PCRでは核酸の損傷の有無に関係なく増幅反応が進む場合があるため、核酸の損傷有無に伴う不活化の効果を判定しにくかった。よって、殺菌・消毒処理の正確な検証、つまり、ウイルスや単細胞生物の保有する活性能の測定を行うには、やはり培養法により生菌や病原性の確認を行う必要があり、判定までに時間がかかってしまうという大きな課題があった。

[0005] 核酸の損傷率を知るために、非特許文献1では、PCRを利用して核酸の損傷率をPCRの増幅産物が40ー70bpと3000ー4000bpとなる2つのリアルタイムPCRの結果から、標的核酸の損傷率を求める方法が開示されている。しかし、PCRを2回行う手間がある上、増幅産物が3000bpを越える場合、PCR増幅エラーが起こりやすくなるという課題があった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 非特許文献1: Oliver Rothfuss, "Nucleic Acids Research", 2014, Vol. 42, No. 6, e41

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、簡便かつスピーディーにDNAウイルスまたは単細胞生物の活性を測定する方法を提供することにある。

また、本発明の課題は、簡便かつスピーディーに活性エネルギー線照射装置の殺菌力を測定する方法を提供するものである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは鋭意検討の結果、定量PCRの増幅範囲を1500ー280

0 b pとすることで、定量PCRの結果をウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法として使用できることを見出した。

[0009] すなわち本発明は、1) DNAウイルスまたは単細胞生物の保有する標的核酸を用意する工程と、2) 標的核酸を鋳型としPCRによる増幅範囲が1500-2800 b pの長さとなるプライマーを用意する工程と、3) 標的核酸とプライマーを用いて定量PCRを行う工程と、4) 定量PCRの結果をDNAウイルスまたは単細胞生物の活性能に変換する工程とを有することを特徴とする、DNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法を提供するものである。

[0010] また本発明は、さらに、標的核酸をエンドヌクレアーゼ処理する工程を有するウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法を提供するものである。

[0011] また本発明者らは鋭意検討の結果、定量PCRの増幅範囲を1500-2800 b pとすることで、定量PCRの結果を活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法として使用できることを見出した。

[0012] すなわち本発明は、1) 活性エネルギー線照射装置を用いて、DNAに活性エネルギー線照射処理し、処理DNAを得る工程と、2) 得られた処理DNAに対し、PCRによる増幅範囲が1500-2800 b pの長さとなるプライマーを用意する工程と、3) 処理DNAとプライマーを用いて定量PCRを行う工程と、4) 定量PCRの結果を活性エネルギー線による殺菌力に変換する工程とを有することを特徴とする、活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法を提供するものである。

発明の効果

[0013] 本発明の活性測定方法を用いることで、DNAウイルスまたは単細胞生物の活性が簡便に測定可能となる。

また、本発明の活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法を用いることで、活性エネルギー線照射装置の実質的な殺菌力を簡便に測定することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]参考例1－5において、PCRによって求められた検量線を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] <DNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法>

本発明は、1) DNAウイルスまたは単細胞生物の保有する標的核酸を用意する工程と、2) 標的核酸を鋳型としたPCRによる増幅産物が1500－2800bpの長さとなるプライマーを用意する工程と、3) 標的核酸とプライマーを用いて定量PCRを行う工程と、4) 定量PCRの結果をDNAウイルスまたは単細胞生物の活性能に変換する工程とを有することを特徴とする、DNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法を提供するものである。

本方法により、定量PCRでDNAウイルスまたは単細胞生物の活性を測定することが出来る。ここでいう活性とは、DNAウイルスまたは単細胞生物の増殖能力のことをいう。

[0016] 1) DNAウイルスまたは単細胞生物の保有する標的核酸を用意する工程
<DNAウイルスまたは単細胞生物>

本発明の活性測定方法では、DNAウイルスまたは単細胞生物の保有する標的核酸を定量PCRにて増幅させる。このとき、標的核酸はDNA（デオキシリボ核酸）である。

[0017] DNAウイルスとしては、核酸としてDNAを有するウイルスであれば良い。

病原性があるものも無いものも活性測定可能であるが、公衆衛生上の観点から病原性を有するウイルスの活性測定が培養せずとも可能であることは有用である。

DNAウイルスとしては、たとえばラムダファージ、ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス、JCウイルス、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、B型肝炎ウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、パルボウイルス、EBウイルス、M13ファージ、T2ファージ、T4ファージ、T5ファージ

、T6ファージ、T7ファージ等が挙げられる。

[0018] 単細胞生物としては、原核単細胞生物でも真核単細胞生物でも構わない。

1細胞で1活性を有するものであると、活性測定がより正確となる。

単細胞生物としては、細菌、原虫、藻類、繊毛虫、鞭毛虫、孢子、等が挙げられる。好ましくは細菌、原虫である。

病原性があるものも無いものも活性測定可能であるが、公衆衛生上の観点から病原性を有する単細胞生物の活性測定が、培養せずとも可能であることは有用である。

[0019] 細菌としては、例えば、大腸菌、レジオネラ菌、赤痢菌、コレラ菌、カンピロバクター、エルシニア菌、チフス菌、ジフテリア菌、連鎖球菌、炭疽菌、破傷風菌、ブルセラ属菌、緑膿菌、サルモネラ菌、ペスト菌、結核菌、腸炎ビブリオ、リステリア菌、ブドウ球菌、ボツリヌス菌、セレウス菌、ウェルシュ菌、ペスト菌、マイコプラズマ等が挙げられる。

[0020] 原虫としては例えば、クリプトスポリジウム、ジアルジア、アメーバ、マラリア、トキソプラズマ、サイクロスポラ、ミクロスポリディア、イソスポラ、ネグレリア、バウムチア、リーシュマニア、トリパノソーマ、トリコモナス、バベシア、ランブル鞭毛虫、バランチジウム、ゾウリムシ等が挙げられる。

[0021] <標的核酸>

DNAウイルスまたは単細胞生物が保有する標的核酸を、定量PCRするために用意する。具体的には、ウイルス殻や細胞壁といった外殻の一部または全部を破壊すればよい。標的核酸は抽出して単離しても良いし、外殻から開放された状態のまま使用しても構わない。

外殻の破壊方法は公知慣用の方法を用いればよい。浸透圧法、酵素処理法、界面活性剤処理法、凍結融解法、超音波処理、磨砕処理等の方法を用いることが出来る。市販のDNA抽出キットを用いても構わない。

標的核酸は、ゲノムDNAであっても、プラスミドDNAであっても、細胞小器官DNAであってもよい。1細胞1コピーである場合、活性測定がよ

り正確である為、ゲノムDNAであることが好ましい。

[0022] <エンドヌクレアーゼ処理>

本発明は、1500-2800bpという長い増幅範囲のPCRを行うことで、DNAのエラーの有無を測定するものである。このとき、鋳型となる標的核酸はそのまま用いても良いが、エンドヌクレアーゼ処理をすることで、DNAが負ったエラーを明確化し、定量PCRの結果をより正確に測定できる為、併用することが好ましい。

エンドヌクレアーゼとしては、例えば、Endonuclease I、I、Tma Endonuclease III、Endonuclease VII、Endonuclease IV、Endonuclease V、T4PDG、S1 Nucleaseを用いることが出来る。

[0023] 2) 標的核酸を鋳型としたPCRによる増幅産物が1500-2800bpの長さとなるプライマーを用意する工程

定量PCRを行う為のプライマーは、標的核酸を鋳型とするように設計する。このとき、PCRによる増幅産物が1500-2800bpとなるように調整することが本発明の特徴である。増幅産物が1500bp未満であると、DNAエラーがあり活性を有さないDNAであっても、PCRで増幅してしまう可能性がある。2800bpより大きい場合、PCR自体のエラーが多くなり増幅産物がうまく得られない場合がある。

増幅産物としては、好ましくは1500-2500bpであり、特に好ましくは1700-2200bpである。

定量PCR用のプライマーは、フォワードとリバースのセットで設計する。このとき、標的核酸中で増幅エラーが起きないように、配列特異性のあるプライマーとするのが好ましい。

[0024] 3) 標的核酸とプライマーを用いて定量PCRを行う工程

得られた標的核酸とプライマーとを用いて定量PCRを行う。定量PCRとしては、公知慣用の方法を用いればよく、アガロースゲル電気泳動法、インターカレーター法、蛍光プローブ法等が挙げられる。正確性から、標的範

囲にアニールするプローブを併用する蛍光プローブ法が好ましい。インターカレーター法や蛍光プローブ法であれば、リアルタイム定量PCRを行うことが出来るので、スピーディーな測定が可能であることから好ましい。

[0025] 得られた増幅産物量は、標準品からの検量線で求めることが出来る。標準品は、配列が相同するDNA断片であっても良いし、異なる配列であっても構わない。増幅産物とほぼ同じ長さの標準品について、濃度を振ったサンプルの蛍光濃度を測定することで、検量線を描くことができる。

[0026] PCRの条件としては、公知慣用の方法を用いればよい。例えばDNAウイルスの標的核酸を増幅する場合の一例として、Holding Stageは95℃ x 3min、Cycling Stageは95℃ x 3sec、65-66℃ x 90secを40サイクルという条件が挙げられる。

[0027] 4) 定量PCRの結果をDNAウイルスまたは単細胞生物の活性能に変換する工程

本方法に依ると、定量PCRの結果はDNAウイルスまたは単細胞生物の活性能として扱うことが出来る。

具体的には、定量PCRの結果を以下の式で活性能とすることが出来る。

サンプル1ml当たりの活性能 (U/ml) = (サンプル中のDNAコピー数) / (サンプルml数)

サンプル中のDNAコピー数は、増幅範囲とほぼ同等のbp数を有する標準品を鋳型として定量PCRを行い、検量線を作製し参照することで求めることが出来る。

[0028] 本発明の活性測定方法は、定量PCRの結果をそのままDNAウイルスまたは単細胞生物の活性能に変換することが出来る。これは、1500-2800bpという特定の長さを有する増幅範囲のPCRを行うことで、損傷のないDNAを正確に測定できるからである。

[0029] 本方法での活性測定が正確であることは、定量PCRから得られるDNAコピー数と、培養法等のバイオアッセイで得られる生菌数とが相関することで証明が出来る。

例えば、紫外線（UV）照射前後での活性低下を、定量PCRと培養法で比較すればよい。

[0030] <活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法>

本発明は、1) 活性エネルギー線照射装置を用いて、DNAに活性エネルギー線照射処理し、処理DNAを得る工程と、2) 得られた処理DNAに対し、PCRによる増幅範囲が1500-2800bpの長さとなるプライマーを用意する工程と、3) 処理DNAとプライマーを用いて定量PCRを行う工程と、4) 定量PCRの結果を活性エネルギー線による殺菌力に変換する工程とを有することを特徴とする、活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法も提供するものである。

本方法により、活性エネルギー線照射装置の殺菌力を測定することが出来る。ここでいう殺菌力とは、活性エネルギー線照射によりDNAに損傷を与える能力のことを言う。

[0031] 1) 活性エネルギー線照射装置を用いて、DNAに活性エネルギー線照射処理し、処理DNAを得る工程

本工程では、殺菌力を測定したい活性エネルギー線照射装置を用いて、DNAに活性エネルギー線を照射し、処理DNAを得る。

活性エネルギー線としては、DNAに損傷を与えるエネルギー線であれば良く、放射線（エックス線、ガンマ線、電子線等）、紫外線、赤外線等が挙げられる。産業上良く使用されているのは紫外線である。

[0032] 本測定方法では、DNAを用意し活性エネルギー線を照射した処理DNAを得る。

DNAとしては特に限定は無く、生物やウイルスから抽出して得られるDNAを用いてもよいし、PCR増幅産物を用いてもよいし、合成DNAを用いてもよい。環境への影響から、好ましくは、病原性のないDNA断片であ

る。

処理前DNAのbp数としては、その後のPCRの増幅範囲以上であれば良いが、電気泳動を行う場合には、鋳型と増幅産物のコンタミネーションが起きないように、DNA増幅範囲よりも1.5倍程度以上鎖長が長いほうが好ましい。

[0033] DNAに対し活性エネルギー線照射処理を行うのにあたって、特に方法に限定は無い。開放シャーレ等を用いるオープン環境で活性エネルギー線を照射するか、活性エネルギー線を透過できる材質の容器やライン中にDNAを入れ、活性エネルギー線を照射すればよい。例えばシャーレ、マイクロチューブ、試験管、バッグ等の容器に入っているDNAに活性エネルギー線を照射しても良いし、管にDNA液を通液したラインに対し活性エネルギー線を照射しても構わない。

活性エネルギー線を照射する場合、線量と照射時間については適宜調整すればよい。

[0034] 2) 得られた処理DNAに対し、PCRによる増幅範囲が1500-2800bpの長さとなるプライマーを用意する工程

3) 処理DNAとプライマーを用いて定量PCRを行う工程

本2) 3)の工程については、DNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法の2) 3)工程と同様に行うことができる。

[0035] 4) 定量PCRの結果を活性エネルギー線による殺菌力に変換する工程

本工程では、定量PCRで得られた結果を元に、活性エネルギー線による殺菌力を計算する。

定量PCRの結果から、照射により傷がついていないDNA数を導き出すことができる。殺菌力を示したい場合、活性エネルギー線照射前後でコピー数の比を表すことで、殺菌力とすることができる。

殺菌力(%) = [1 - (活性エネルギー線照射後のDNAコピー数 / 活性エネルギー線照射前のDNAコピー数)] * 100

[0036] 本発明の殺菌力測定方法は、定量PCRの結果をそのまま活性エネルギー線照射装置の殺菌能に変換することが出来る。これは、1500-2800bpという特定の長さを有する増幅範囲のPCRを行うことで、損傷のないDNA、すなわち殺菌できなかったDNAを正確に測定できるからである。

[0037] 本方法での活性測定が正確であることは、処理前DNAとして生菌を用いた上で本法を行い、定量PCRから得られるDNAコピー数と、培養法等のバイオアッセイで得られる生菌数とが相関することで証明が出来る。

例えば、紫外線（UV）照射前後での活性低下を、定量PCRと培養法で比較すればよい。

[0038] <定量PCR>

前記活性測定方法およびまたは殺菌力測定方法において、このように正確な結果を得る為には、定量PCRの増幅範囲が1500-2800bpである必要がある。PCRの増幅範囲が1500bpより小さい場合、本方法での残活性がバイオアッセイの結果よりも高くなるため使用できず、2800bpより大きい場合は、本方法での残活性がバイオアッセイの結果よりも低くなるため使用できないからである。

増幅産物としては、好ましくは1500-2500bpであり、特に好ましくは1700-2200bpである。

[0039] このように、本発明の測定方法は、定量PCRを用いることで簡単かつスピーディーにDNAウイルスまたは単細胞生物の活性を測定することが出来る。本方法を利用することで、水や土壌、食品や生体由来物質等から、目的のDNAウイルスまたは単細胞生物量を簡便に測定することが出来るため、産業上非常に有用である。

また、本発明の殺菌力測定方法は、定量PCRを用いることで簡単かつスピーディーに活性エネルギー線照射装置の殺菌力を測定することができる。

特に、顕微鏡等を用いた形態観察では活性が判別できない、活性エネルギー線照射後の残活性量を測定することに適している。

実施例

[0040] 以下、本発明を実施例にて詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

[0041] <定量PCR条件>

定量PCRについては以下の条件にて行った。

[0042] ・PCR装置 Step One Plus Real-Time PCR System (ライフテクノロジーズジャパン製)

・PCRキット TaqMan Fast Advanced Master Mix (ライフテクノロジーズジャパン製)

[0043] ・PCR条件

Holding Stage 95℃ x 3min

Cycling Stage (40サイクル)

(100bp) 95℃x3sec、60℃x20sec

(2000bp) 95℃x3sec、65℃x90sec

(>2000bp) 95℃x3sec、65℃x120sec

[0044] <紫外線照射条件>

・紫外線光源 : LED (30-50mW; UVMAX260-FW-50, Sensor Electronic Technology Inc.)

・ウイルスサンプル : 1×10^{10} copies/mL (TE緩衝液、pH8.0)

[0045] <DNA抽出及び酵素処理>

・DNA抽出キット : QIAGEN MinElute Virus Spin Kit (株式会社キアゲン製)

・酵素 : エンドヌクレアーゼ T4PDG (NEW ENGLAND BioLabs Inc. No. M0308S)

・酵素処理条件 : T4PDGの力価が40U/1g DNAとなるように、10×T4PDG Reaction Buffer、BSA (最終濃度0.1mg/mL)、Nuclease free waterで調製し

た。酵素反応は37℃で2時間行った。

[0046] <培養法（プラークアッセイ）>

プラークアッセイ（スポットアッセイ）は次のようにして行った。約9 mLのソフトアガーを大腸菌培養液300 µLと混合し、平板上に注ぎ、乾燥させた。次に試料であるファージ懸濁液各1 µLを平板上にスポットし、37℃で一晩インキュベートしてスポットを観察した。ファージに感染性があれば、スポットの周りにプラークが観察される。

[0047] <DNAウイルスの活性測定方法>

（参考例1～5） 定量PCR用の検量線作成及びPCR正確性の確認
鋳型としてラムダファージを用いて、定量PCRの検量線を作成した。
用いたプライマーは以下のとおりである。

[0048] ・ウイルス : ラムダファージ (Gelman Culture Collection, No. 4499)

[0049] ・PCRプライマー

増幅範囲: 100 bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号1)

Reverse Primer GCCACATCCACCGACTTT
T (配列番号2)

蛍光Probe FAM-ACTAATGGGCGTGGCT-MGB (配
列番号3)

[0050] 増幅範囲: 2000 bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号4)

Reverse Primer GCCACATCCACCGACTTT
T (配列番号5)

蛍光Probe FAM-CCGTCTACGGAAGC-MGB (配
列番号6)

[0051] 増幅範囲：2500bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号7)

Reverse Primer CATACATCGCCTTCACAA
TGG (配列番号8)

蛍光Probe FAM-ATCTGACCGAAGCGCA-MGB (配
列番号9)

[0052] 増幅範囲：3000bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号10)

Reverse Primer GAGCCTATCCAGTCGCAG
TTC (配列番号11)

蛍光Probe FAM-ACAGGAAGAACTTGCCG-MGB (配
列番号12)

[0053] 増幅範囲：3500bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号13)

Reverse Primer GATGCCGTTTCATGACCTG
AT (配列番号14)

蛍光Probe FAM-AATATGCCGGTTATCACG-MGB
(配列番号15)

[0054] 各プライマー、プローブで得られたDNA濃度とThreshold Cycle (CT) との関係、すなわち検量線を図1に示す。CT=30の場合のDNA数を検量線から求めると、表1の通りとなった。増幅範囲が1000bpのときを1とすると、2500bpでは3.3であるのに対し、3000bpでは13.3、3500bpでは11.3と10倍以上の値となった。これは、増幅範囲が2500bp以下では検出するためのDNA量が3倍以内であるのに対し、増幅範囲が3000bpを超えると、検出するため

のDNAが100bpの10倍以上必要であることを示している。

[0055] [表1]

表1	増幅範囲	CT値				CT=30のとき	
		DNA量				DNA量	100bpを1としたDNA量比
		5.0E+07	5.0E+05	5.0E+03	5.0E+01		
参考例1	100bp	12.04	18.405	25.03	31.73	159.8	1.0
参考例2	2000bp	10.15	17.82	25.41	33.35	350.1	2.2
参考例3	2500bp	10.78	18.28	26.07	34.11	527.4	3.3
参考例4	3000bp	12.50	20.48	28.52	36.47	2092.3	13.1
参考例5	3500bp	10.22	19.27	28.12	36.82	1804.2	11.3

[0056] 活性能測定および培養法との比較

(参考例6・実施例1～4・比較例1及び2) ラムダファージ

DNA源として、ラムダファージ (Gelman Culture Collection, No. 4499) を使用して、紫外線を照射し ($40 \text{ mJ} / \text{cm}^2$)、紫外線照射ファージを得た。

得られた紫外線照射ファージから処理DNA抽出し、当該処理DNAを鋳型として用いて、定量PCRをインターカレート法にて行い、活性測定を行った。また、処理DNAに対し、さらに前述の方法にて、エンドヌクレアーゼによる酵素処理を行ったサンプルを調製した。

また、培養法 (プラークアッセイ) での活性測定を行い、本発明の活性測定方法と比較した。

[0057] ・ウイルス : ラムダファージ (Gelman Culture Collection, No. 4499)

・紫外線照射量 : $40 \text{ mJ} / \text{cm}^2$

[0058] 用いたプライマーは以下のとおりである。

増幅範囲 : 100bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号16)

Reverse Primer GCCACATCCACCGACTTT
T (配列番号17)

[0059] 増幅範囲：1600bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号18)

Reverse Primer CGTAAACTCCACCCTTCG
TC (配列番号19)

[0060] 増幅範囲：2000bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号20)

Reverse Primer AGCTTGGGCGATGACTGA
G (配列番号21)

[0061] 増幅範囲：2500bp

Forward Primer TAACACGCTCACCATGAA
GC (配列番号22)

Reverse Primer CATACATCGCCTTCACAA
TGG (配列番号23)

[0062] プラークアッセイ (スポットアッセイ) は次のようにして行った。約9mLのソフトアガーを大腸菌培養液300μLと混合し、平板上に注ぎ、乾燥させた。次に試料であるファージ懸濁液の希釈系列を調製し、各1μLを平板上にスポットし、37℃で一晩インキュベートしてスポットを観察した。ファージに感染性があれば、スポットの周りにプラークが観察される。

[0063] ラムダファージにおける定量PCR及びプラークアッセイの結果を以下表2-1に示す。

紫外線 (UV) 照射後の残活性能については、以下の式で求めた。

$$\text{qPCRによる残活性能} [\%] = \frac{\text{UV照射後のDNAコピー数}}{\text{UV照射前のDNAコピー数}} \times 100$$

$$\text{プラーク法による残活性能} [\%] = \frac{\text{UV照射後のDNAプラーク数}}{\text{UV照射前のDNAプラーク数}} \times 100$$

[0064] [表2]

表 2 - 1	DNA源	紫外線照射量 mJ/cm ²	定量PCR 増幅範囲	UV前 DNAコピー 数 (U/ml)	UV処理後 DNAコピー 数 (U/ml)	残活性能 (%)	UV処理後 コピー数比 ブランクアッセイ /定量PCR	殺菌力 (%)
			bp					
参考例 6	ラムダ ファージ	40	ブランク アッセイ	1.0×10^{10}	2.2×10^7	0.22	—	99.78
比較例 1			100	3.6×10^{10}	2.2×10^{10}	61	0.001	39.00
実施例 1			1600	8.1×10^9	2.1×10^8	2.50	0.10	97.50
実施例 2			2000	1.0×10^{10}	2.1×10^7	0.21	1.05	99.79
実施例 3			2500	1.0×10^{10}	2.0×10^7	0.2	1.10	99.80
比較例 2	ラムダ ファージ 酵素処理	40	100	3.6×10^{10}	2.0×10^{10}	56	0.001	44.00
実施例 4			1600	8.1×10^9	6.3×10^7	0.77	0.35	99.23

[0065] 増幅範囲が100bpの場合は、酵素処理してもブランクアッセイ/qPCR比は変化しないが、増幅範囲を長くした1600bpではqPCRのみよりも酵素処理を組合せた方がブランクアッセイ/qPCR比は1に近くなることがわかった。

[0066] (参考例7および8・実施例5および6) T5およびM13

参考例6および実施例4において、ラムダファージに代えて、T5ファージ(Gelman Culture Collection, No. 16353)およびM13ファージ(Takara 3118)でも同様の試験を行い、結果を表2-2に示す。なお、紫外線照射量は10mJ/cm²とした。定量PCRでの増幅範囲は2000bpのみとした。使用したプライマーを以下に示す。

[0067] T5ファージ用プライマー

増幅範囲: 2000bp

Forward Primer TAACTGCCCAAATGCTT

CC (配列番号 24)

Reverse Primer AATTCTGGAGCAATCCAT

CG (配列番号 25)

[0068] M13 ファージ用プライマー

増幅範囲 : 2000 bp

Forward Primer GCGTTGGCCGATTCATTA

A (配列番号 26)

Reverse Primer TCACTGCCCGCTTTCCA (

配列番号 27)

[0069] [表3]

表 2-2	DNA源	紫外線照射量 mJ/cm ²	定量PCR 増幅範囲	UV前 DNAコピー 数 (U/ml)	UV処理後 DNAコピー 数 (U/ml)	残活性 (%)	UV処理後 コピー数比 ブランクアッセイ /定量PCR	殺菌力 (%)
			bp					
参考例 7	T5	10	ブランク アッセイ	2.0×10^{10}	1.6×10^5	0.001	—	99.999
実施例 5	T5 酵素処理		2000	1.0×10^{10}	3.9×10^5	0.0039	0.41	99.9961
参考例 8	M13		ブランク アッセイ	2.1×10^{10}	4.6×10^2	2.1×10^{-6}	—	99.9999979
実施例 6	M13 酵素処理		2000	1.9×10^{10}	1.1×10^3	5.7×10^{-6}	0.42	99.9999949

[0070] (参考例 9-12) 遺伝子損傷と測定の正確性の確認

・ pBR322 DNAの酵素処理 (分解)

pBR322 DNA (NEW ENGLAND BioLabs) を 5 μ g、制限酵素 Hinf I (タカラバイオ製) 50 units、制限酵素に添付されている 10 $\times$ H Buffer を 10 μ L 測りとり、水で全量が 100 μ L となるよう調製し、37 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした。

[0071] ・ 酵素処理後の pBR322 DNA の精製

インキュベート後、TE 緩衝液 (pH 8.0) で反応液中の DNA 量を 2×10^9 copies/ μ L に調整し、Agencourt AMP

ure XP (Beckman Coulter) と磁気プレートを用い、Agencourt AMPure XP に添付の取扱い説明書記載の方法に準じて、DNA の精製を行った。

[0072] (定量PCRによる測定)

制限酵素で処理した pBR322 DNA と、制限酵素で処理していない pBR322 DNA を任意の割合で混合して、定量PCRを行った。

この時、増幅範囲には、制限酵素Hinf I の認識部位が含まれていることから、制限酵素で処理した pBR322 のDNA を鋳型とする場合には、理論上定量PCRでは検出されない。よって、定量PCRが正確に行われるのであれば、制限酵素で処理したDNA と処理しないDNA をある一定の濃度で混合した場合、定量PCRの結果は、理論上の混合比と同等となるはずである。

ただし、定量PCRの増幅部位が長すぎる、あるいは短すぎる場合には、定量PCRの検出精度が悪くなることから、理論値とのずれが生じてしまう。

[0073] 酵素処理DNA と未処理DNA の混合割合と定量PCRによる測定値、および理論値を表3に示す。

[0074] 増幅範囲：2500bp

Forward Primer GCTACTTGGAGCCACTATCGACTA (配列番号28)

Reverse Primer CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG (配列番号29)

蛍光Probe FAM-TCCTGTCGTTGAGGACC-MGB (配列番号30)

[0075]

[表4]

表 3	pBR322 DNA		コピー/mL	
	未処理	酵素処理	理論値	実測値
参考例 9	100	0	1×10^9	1.1×10^9
参考例 10	10	90	1×10^8	1.3×10^8
参考例 11	1	99	1×10^7	1.3×10^7
参考例 12	0.1	99.9	1×10^6	1.1×10^6

[0076] 表 3 から明らかなとおり、本発明の測定方法を用いると、定量 P C R の結果は、制限酵素で処理した D N A と処理しない D N A の理論上の混合比と同等となり、定量 P C R の結果が正確であることが確かめられた。

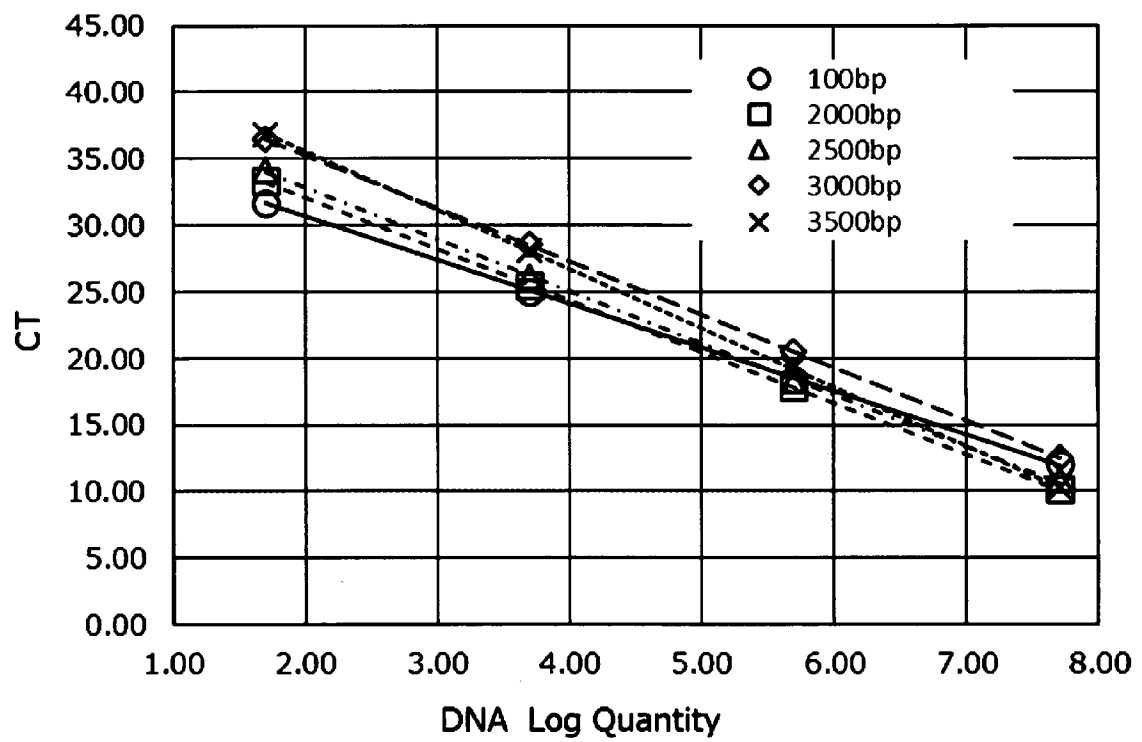
産業上の利用可能性

[0077] 本発明の活性測定方法や殺菌力測定方法は、ウイルスや単細胞生物の培養を待たずとも、D N A ウイルスまたは単細胞生物の活性や活性エネルギー線照射装置の殺菌力を測定することが可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 1) DNAウイルスまたは単細胞生物の保有する標的核酸を用意する工程と、
2) 標的核酸を鋳型としたPCRによる増幅産物が1500-2800bpの長さとなるプライマーを用意する工程と、
3) 標的核酸とプライマーを用いて定量PCRを行う工程と、
4) 定量PCRの結果をDNAウイルスまたは単細胞生物の活性に変換する工程とを有することを特徴とする、
DNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法。
- [請求項2] さらに、標的核酸をエンドヌクレアーゼ処理する工程を有する、請求項1に記載のDNAウイルスまたは単細胞生物の活性測定方法。
- [請求項3] 1) 活性エネルギー線照射装置を用いて、DNAに活性エネルギー線照射処理し、処理DNAを得る工程と、
2) 得られた処理DNAに対し、PCRによる増幅範囲が1500-2800bpの長さとなるプライマーを用意する工程と、
3) 処理DNAとプライマーを用いて定量PCRを行う工程と、
4) 定量PCRの結果を活性エネルギー線による殺菌力に変換する工程とを有することを特徴とする、
活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法。
- [請求項4] さらに、活性エネルギー線照射処理後に得られた処理DNAをエンドヌクレアーゼ処理する工程を有する、請求項3に記載の活性エネルギー線照射装置の殺菌力測定方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/046335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/34(2006.01)i,
C12Q1/686(2018.01)i, C12Q1/70(2006.01)i, C12M1/42(2006.01)n

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)

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/02, C12Q1/34, C12Q1/686, C12Q1/70, C12M1/42

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	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	POEPPING, C. et al., "Evaluation of DNA damage reversal during medium-pressure UV disinfection", Water Research, 2014, vol. 56, pp. 181-189, entire text, in particular, pp. 182-185, column 2.	1, 3 1-4
X Y	RUDI, K. et al., "Different length (DL) qPCR for quantification of cell killing by UV-induced DNA damage", International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010, vol. 7, pp. 3376-3381, entire text, in particular, pp. 3377-3378	1, 3 1-4



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
25 February 2019 (25.02.2019)

Date of mailing of the international search report
05 March 2019 (05.03.2019)

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/JP2018/046335

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	BANIHASHEMI, A. et al., "Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable <i>Campylobacter</i> and <i>Salmonella</i> ", <i>Journal of Applied Microbiology</i> , 2012, vol. 113, pp. 863-873, page 864, right column to page 866, page 869, fig. 3	1, 3 1-4
X Y	US 5891682 A (FLORIDA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 06 April 1999, columns 5-14 (Family: none)	3 1-4
Y	松尾陽一郎 他, 放射線による DNA 損傷の定量評価に対する検討, 日本保健物理学会第 50 回研究発表会・日本放射線安全管理学会第 16 回学術大会合同大会要旨集, 2017, p. 211, entire text, non-official translation (MATUO, Yoichiro et al., "Review on quantitative evaluation of DNA damage by radiation", Abstracts of Joint Meeting: the 50th Annual Meeting of Japan Health Physics Society and the 16th Annual Meeting of Japanese Society of Radiation Safety Management)	1-4
Y	AYTAY, S. et al., "Development of a sensitive PCR inhibition method to demonstrate HBV nucleic acid inactivation", <i>Transfusion</i> , 2004, vol. 44, pp. 476-484, entire text, in particular, pp. 477-480	1, 2
Y	BESPALOV, V. A. et al., "Improved method for measuring the ensemble average of strand breaks in genomic DNA", <i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i> , 2001, vol. 38, pp. 166-174, entire text, in particular, page 168, fig. 1	2, 4
P, X P, Y	NOCKER, A. et al., "Assessment of UV-C-induced water disinfection by differential PCR-based quantification of bacterial DNA damage", <i>Journal of Microbiological Methods</i> , 2018, vol. 149, pp. 89-95, available online 31 March 2018, entire text, in particular, pp. 90-92	1, 3 2, 4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/34(2006.01)i, C12Q1/686(2018.01)i,
C12Q1/70(2006.01)i, C12M1/42(2006.01)n

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))

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/02, C12Q1/34, C12Q1/686, C12Q1/70, C12M1/42

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	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (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 Y	POEPPING, C. et al., Evaluation of DNA damage reversal during medium-pressure UV disinfection, Water Research, 2014, Vol.56, p.181-189, 全体。特に、第182頁～第185頁 2. 欄	1,3 1-4
X Y	RUDI, K. et al., Different length (DL) qPCR for quantification of cell killing by UV-induced DNA damage, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010, Vol.7, p.3376-3381, 全体。特に、第3377頁～第3378頁	1,3 1-4

☑ 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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

25.02.2019

国際調査報告の発送日

05.03.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

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)

上村 直子

4 B

4508

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	BANIHASHEMI, A. et al., Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable Campylobacter and Salmonella, Journal of Applied Microbiology, 2012, Vol.113, p.863-873, 第864頁右欄～第866頁、第869頁F i g u r e 3	1,3 1-4
X Y	US 5891682 A (FLORIDA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 1999.04.06, c o l u m n 5～c o l u m n 14 (ファミリーなし)	3 1-4
Y	松尾陽一郎 他, 放射線によるDNA損傷の定量評価に対する検討, 日本保健物理学会第50回研究発表会・日本放射線安全管理学会第16回学術大会合同大会 要旨集, 2017, p.211, 全体	1-4
Y	AYTAY, S. et al., Development of a sensitive PCR inhibition method to demonstrate HBV nucleic acid inactivation, Transfusion, 2004, Vol.44, p.476-484, 全体。特に、第477頁～第480頁	1,2
Y	BESPALOV, V. A. et al., Improved method for measuring the ensemble average of strand breaks in genomic DNA, Environmental and Molecular Mutagenesis, 2001, Vol.38, p.166-174, 全体。特に、第168頁F i g . 1	2,4
P, X P, Y	NOCKER, A. et al., Assessment of UV-C-induced water disinfection by differential PCR-based quantification of bacterial DNA damage, Journal of Microbiological Methods, 2018, Vol.149, p.89-95, Aailable online 31 March 2018、全体。特に、第90頁～第92頁	1,3 2,4