(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
2012 年 9 月 13 日(13.09.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/121225 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/055601

(22) 国際出願日: 2012 年 3 月 5 日(05.03.2012)

(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 2011-048183 2011 年 3 月 4 日(04.03.2011) JP
特願 2011-174105 2011 年 8 月 9 日(09.08.2011) JP
特願 2012-026491 2012 年 2 月 9 日(09.02.2012) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島３丁目２番４号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮本 重彦 (MIYAMOTO Shigehiko) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 友野 潤 (TOMONO Jun) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 高橋 孝治 (TAKAHASHI Koji) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 佐野 創太郎 (SANO Sotaro) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 直原 啓明 (JIKIHARA Takaaki) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事務所 (YASUTOMI & Associates); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原３丁目５番３６号 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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)）

WO 2012/121225 A1

(54) **Title**: NUCLEIC ACID DETECTION METHOD, AND DEVICE AND KIT FOR USE IN SAME

(54) 発明の名称 : 核酸の検出方法及びその方法に用いるデバイス、キット

(57) **Abstract**: The invention addresses the problem of preventing the problems of cost and handleability, and the contamination or exposure of a sample, which are problematic in the analysis of an amplified nucleic acid. According to the invention, a sample containing a nucleic acid and a nucleic acid detection reagent are mixed in a closed system. At this time, the nucleic acid is mixed with the detection reagent after being amplified in the same closed system without the system being opened. As a means therefor, for example, a device in which the detection reagent is shielded by a coating material or the like is used.

(57) 要約: 本発明の課題は、増幅核酸の分析において問題となっている、費用や操作性、サンプルのコンタミや汚染の防止である。本発明は、核酸を含有する試料と核酸の検出試薬とを閉鎖系内で混合する。その際、核酸は同一閉鎖系内で増幅後、開放されることなく検出試薬と混合される。そのための手段として、例えば、コーティング材等により検出試薬が遮蔽されたデバイスが用いられる。

明　細　書

発明の名称 ：

核酸の検出方法及びその方法に用いるデバイス、キット

技術分野

[0001] 本発明は、核酸の検出方法、及び、その方法に用いるデバイス、キットに関する。

背景技術

[0002] 組織、血液、唾液、尿等の生体試料を使った遺伝子臨床検査、食品や植物等の遺伝子分析を行う際には、標的核酸を効率よく分析するためにＰＣＲ（ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｃｈａｉｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ）法、ＬＡＭＰ（ｌｏｏｐ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）法などの核酸増幅法が利用されている。これらの方法は、微量のターゲットを検出するために有効である。しかし、増幅反応後の核酸を含む溶液は、回収して別の検出操作に移す必要があり、その際に反応容器を開放する必要があるため、核酸を含むサンプルが外部に飛散したり別の反応液が混入して擬陽性の結果が出たりするおそれがある。また、増幅核酸の検出には特殊な装置や熟練した検査技術が求められる。そのため、臨床検査やベッドサイド等、試料の採取現場での検査は普及しておらず、検査は受託センターや専門の研究機関での実施に限定されているのが実状である。

[0003] 増幅核酸の検出法としては、増幅反応後の溶液をアガロース電気泳動で分離後、蛍光性インターカレーターで染色し、特異的な蛍光を観察する方法が最も一般的に用いられている（非特許文献１）。しかし、蛍光で検出するためには、プライマーやインターカレーター等の高価な化合物、並びに、ＵＶ照射装置等の励起装置やゲル撮影装置等の高価な機器を必要とする。また、増幅核酸の電気泳動は、長時間の泳動工程を必要とする。

[0004] 核酸増幅方法として、ＬＡＭＰ法は、反応に温度サイクルが必要なく、等温で進行し、ＰＣＲ法と比較して増幅量が多いという利点がある。特に、蛍光

によらずにＬＡＭＰ法の増幅核酸を検出する方法として、反応の副生成物であるピロリン酸が不溶性のマグネシウム塩を生じることを利用した、白濁の検出や、蛍光金属指示薬による反応液中のマグネシウム濃度変化の検出が知られている（特許文献１、非特許文献２）。しかしながら、これらの検出方法においても、増幅の有無を確実に視認することはできないため、濁度計やＵＶ照射装置等の機械を必要とするのが実情である。

[0005] 以上の問題を解決するために、これまでにいくつかの試みがなされてきた。例えば、核酸の増幅と検出を単一の容器中で行えるデバイスが報告されている（特許文献２）。しかし、高価な標識プライマーを使用し、検出試薬を別途添加する必要が有る等、手間のかかるものであった。あるいは、あらかじめ乾燥させた核酸増幅試薬を容器に添加しておくことで、操作を簡便化し、かつ、閉鎖系で核酸増幅が行えるデバイスも報告されている（特許文献３）。しかし、検出の際には反応容器を開放する必要があり、検出までを一貫して閉鎖系で行うことはできなかった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第４６８３８１１号

特許文献2：特開２００３－３８１６１号公報

特許文献3：特開２００９－２０１４５８号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，ｖｏｌ．１，６．１５（１９８９）

非特許文献2：Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｖｏｌ．３，Ｎｏ．５，ｐ８７７－８８２（２００８）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、核酸増幅法によって増幅された核酸を、可視光で、反応終了後た

だちに容器内で検出可能な核酸検出法、および、核酸の増幅から検出までを、容器の閉鎖系を開放することなく行える検出用デバイスを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は鋭意検討の結果、可視光で核酸を検出するための試薬を閉鎖系となる反応容器やその蓋に予め仕込んでおくことで、核酸増幅後の溶液に反応容器を開放すること無く溶かし込めるため、サンプルの飛散や汚染を防ぐことができ、核酸の増幅を簡便かつ短時間に可視光で検出が可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] つまり、本発明は、核酸と検出試薬とを閉鎖系内で接触させる工程、および核酸および／または検出試薬の呈色を可視光で判定する工程を含む、核酸の検出方法に関する。

[0011] さらに、前記接触工程の前または後に、核酸を増幅する工程を含むことが好ましい。

[0012] 検出試薬が固体であることが好ましい。

[0013] 検出試薬がロイコ型色素を含むことが好ましい。

[0014] ロイコ型色素がトリアリールメタン系色素であることが好ましい。

[0015] トリアリールメタン系色素が、クリスタルバイオレットまたはゲンチアナバイオレットであることが好ましい。

[0016] 検出試薬が求核剤および／または安定化剤を含有することが好ましい。

[0017] 求核剤が、水素化ホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、アスコルビン酸、２－メルカプトエタノール、ＤＬ－ジチオスレイトール、１－チオグリセロール、システイン、トリブチルホスフィン、アミノエタンチオール、およびトリス２－カルボキシエチルホスフィンからなる群から選ばれる１以上の求核剤であることが好ましい。

[0018] 安定化剤が、αシクロデキストリン、βシクロデキストリン、γシクロデキ

ストリン、およびアスコルビン酸からなる群から選ばれる１以上の安定化剤であることが好ましい。

[0019] 核酸の増幅がＬＡＭＰ法により行われることが好ましい。ＬＡＭＰ法においてピロリン酸除去酵素を使用することが好ましい。ピロリン酸除去酵素が耐熱性のピロホスファターゼであることが好ましい。

[0020] また、本発明は、検出試薬を保持する検出試薬保持部、および、前記試薬保持部を備えた蓋部および／または反応容器を有する、核酸の検出用デバイスまたはキットに関する。

[0021] さらに、蓋部および／または反応容器が核酸増幅試薬を保持することが好ましい。

[0022] 検出試薬がコーティング材で核酸から遮蔽されていることが好ましい。

[0023] また、本発明は、前記の核酸の検出用デバイスまたはキットを有する装置に関する。

発明の効果

[0024] 本発明によれば、核酸の増幅から可視光での検出までを簡便にかつ閉鎖系内で一貫して行うことができ、サンプルの飛散や汚染等も防ぐことができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]（ａ）：検出デバイス（蓋型－張り出しタイプＩ）の概略図である。（ｂ）：（ａ）を開口部側から見た概略図である。（ｃ）：（ａ）を（ｂ）で示されたＸ－Ｘ’で切断し、開口部を上にして横から見た概略図である。

[図2]（ａ）：検出デバイス（蓋型－張り出しタイプＩＩ）の概略図である。（ｂ）：（ａ）を開口部側から見た概略図である。（ｃ）：（ａ）を（ｂ）で示されたＸ－Ｘ’で切断し、開口部を上にして横から見た概略図である。

[図3]（ａ）：検出デバイス（蓋型－凹タイプ）の概略図である。（ｂ）：（ａ）を開口部側から見た概略図である。（ｃ）：（ａ）を（ｂ）で示されたＸ－Ｘ’で切断し、開口部を上にして横から見た概略図である。

[図4]検出デバイス（蓋型－一時遮蔽タイプ）を、開口部を上にして横から見た概略図である。

[図5]図１の検出デバイス（蓋型－張り出しタイプＩ）を連結させたデバイスの概略図である。

[図6]図１から図５で示された検出デバイス（蓋型）を使用した核酸検出工程を示した図である。

[図7]検出デバイス（蓋型－反応容器一体型）の概略図である。

[図8]図７で示された検出デバイス（蓋型－反応容器一体型）を使用した核酸検出工程を示した図である。

[図9]（ａ）：検出デバイス（反応容器型Ｉ）の概略図である。（ｂ）：（ａ）を（ａ）で示されたＹ－Ｙ’で切断し、横から見た試薬保持部の概略図である。（ｃ）～（ｄ）：（ａ）の亜型検出デバイス（反応容器型ＩＩ）を（ｂ）と同様に横から見た試薬保持部の概略図である。

[図10]検出デバイス（反応容器型－一時遮蔽タイプ）の試薬保持部の概略図である。

[図11]図１０で示された検出デバイス（反応容器型－一時遮蔽タイプ）を使った核酸検出工程を示した図である。

[図12]検出デバイス（蓋型）を使用した核酸検出工程を示した図である。

[図13]検出デバイス（反応容器型）を使用した核酸検出工程を示した図である。

[図14]検出試薬を用いた場合のＬＡＭＰ反応液の波長５９０ｎｍにおける吸光度の経時的変化を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

[0026] 以下、本発明を詳細に記載する。

本発明は、核酸と検出試薬とを閉鎖系内で接触させる工程、および核酸および／または検出試薬の呈色を可視光で判定する工程を含む、核酸の検出方法に関する。

[0027] 本発明における核酸とは、核酸増幅法により得られた増幅核酸、二本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＲＮＡ、ＤＮＡとＲＮＡのハイブリッド鎖、およびＰＮＡなどの人工核酸の二本鎖が含まれるが、一本鎖核酸であっても良い。例えば、一本

鎖ＲＮＡを逆転写酵素によりＤＮＡに逆転写し、このＤＮＡを鋳型として二本鎖核酸を増幅すれば、間接的にＲＮＡを検出できるからである。

[0028] 核酸は、試料に含まれているものであってもよい。試料には、核酸増幅法により得られた増幅核酸、核酸を含む生体成分、例えば微生物や動物細胞、植物細胞からの抽出液、あるいは食品からの抽出液が含まれる。生体成分から抽出されたＤＮＡやプラスミドＤＮＡも含まれる。

[0029] 核酸と検出試薬との接触は、核酸および／または検出試薬を呈色させるものであればよい。例えば、核酸を含む溶液と液体の検出試薬を混合させてもよいし、核酸を含む溶液と個体の検出試薬を接触させてもよい。

[0030] 閉鎖系とは、核酸の増幅及び検出の各工程間で核酸を含有する試料の添加や除去が行われず、一貫して閉ざされた系を意味する。ただし、完全な機密状態である必要はなく、例えば容器内で核酸と検出試薬とを接触させるために容器を上下反転等した場合に、核酸や検出試薬が漏出しなければ、本発明における閉鎖系に該当する。閉鎖系内で核酸と検出試薬を接触させることにより、異なる核酸同士の混入による誤検出や核酸の飛散による汚染を防止できる。さらに、接触工程の前または後に、核酸を増幅する工程を含む場合には、当該増幅工程、接触工程、および可視光で判定する工程を閉鎖系で行うことにより、感度の高い増幅方法を利用した場合でも、誤検出や汚染を防止し、迅速に可視光で判定することができる。

[0031] 核酸および／または検出試薬の呈色を可視光で判定する工程では、核酸と検出試薬との接触により生じた物質を、紫外線のような可視光ではない光を照射することなく、一般的な実験室における照明のような可視光下で観察し、核酸の存在を判定する。可視光であれば、紫外線照射する場合のように特別な装置は必要でなく、簡便に観察することができる。

[0032] 呈色の可視光での判定は目視により行うことができる。色素と核酸が結合した場合の呈色の変化、核酸と結合していない色素の呈色の変化を、可視光で目視で観察し、色素の呈色の有無に基づき、核酸の存在の有無を確認できる。

[0033] ここで、呈色の変化として、可視光下で色の種類が変化すること（可視光波長）、又は、色の濃淡が変化すること（反射率）などが挙げられるが、可視光で判定できるものであればこれらに限定されない。色の種類の変化としては、例えば、赤紫色から水色への変化、及び黄色から赤紫色への変化が挙げられる。

[0034] また、呈色の可視光での判定は、試料溶液の可視光領域の吸光度を測定することによっても行える。判定を目視により行うか吸光度を測定するかにかかわらず、核酸と検出試薬に照射する光、及び観察する光の波長は、いずれも可視光の波長である。可視光の波長は３８０ｎｍ～８００ｎｍであることが好ましく、４００ｎｍ～７８０ｎｍであることがより好ましく、４５０ｎｍ～７５０ｎｍであることがさらに好ましい。測定波長は可視光の波長の範囲内で、使用する色素によって適宜設定すればよい。また、吸光度測定により、試料中の核酸濃度を定量することも可能である。

[0035] その他、色素と核酸による不溶性の沈殿物を生じる場合、フィルターやメンブレンを用いて、又は遠心分離により沈殿物を回収し、沈殿物の量から核酸の量を判断することも可能である。

[0036] 本発明において、核酸検出後の着色した検体液を他の分子生物学的な操作にそのまま使用することも可能である。そのような分子生物学的な操作には、制限酵素反応、シーケンス反応、ＰＣＲの様な酵素反応や、電気泳動による確認操作等が含まれる。

[0037] 核酸と検出試薬との接触工程の前または後に、核酸を増幅する工程を含むことが好ましい。核酸の増幅は、ＰＣＲ法に代表される核酸配列を増幅させる手法であればよく、特に限定されるものではない。核酸配列を増幅させる手法としては、例えば、ＰＣＲ法以外に、ＬＣＲ（Ｌｉｇａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ）法、ＳＤＡ（Ｓｔｒａｎｄ Ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）法、ＲＣＡ（Ｒｏｌｌｉｎｇ Ｃｉｒｃｌｅ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）法、ＣＰＴ（Ｃｙｃｌｉｎｇ Ｐｒｏｂｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）法、Ｑ－Ｂｅｔａ Ｒｅｐｌｉｃａｓｅ Ａ

ｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ法、ＩＣＡＮ（Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ ａｎｄ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ ｐｒｉｍｅｒ－ｉｎｉｔｉａｔｅｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ）法、ＬＡＭＰ（Ｌｏｏｐ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｏｎ ｏｆ ＤＮＡ）法、ＮＡＳＢＡ（Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｂａｓｅｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ）法、及びＴＭＡ（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｍｅｄｉａｔｅｄ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ）法等の公知の方法が例示できるが、これらに限定されるものではない。

[0038] Ｑ－Ｂｅｔａ Ｒｅｐｌｉｃａｓｅ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ法、ＲＣＡ法、ＮＡＳＢＡ法、ＳＤＡ法、ＴＭＡ法、ＬＡＭＰ法、ＩＣＡＮ法などは一定温度で増幅反応を行う方法であり、その他のＰＣＲ法やＬＣＲ法などは温度サイクリングで増幅反応を行うものである。

[0039] また、ＲＮＡを逆転写酵素等によりＤＮＡに逆転写し、このＤＮＡを鋳型として二本鎖核酸を増幅すれば、間接的にＲＮＡを検出することも可能となる。

[0040] 核酸増幅方法としてＬＡＭＰ法を用いた場合、反応に温度サイクルが不要で簡便であり、増幅核酸量が多いというメリットがある。また、ＬＡＭＰ法において反応効率を向上させる目的でピロリン酸除去酵素の存在下で増幅反応を行うことも可能である。ピロリン酸除去酵素としては、ピロリン酸をモノリン酸に分解するピロホスファターゼや、ピロリン酸とアデノシン５’－ホスフォリン酸を結合するＡＴＰスルフリラーゼが挙げられる。本発明では、特に、耐熱性のピロホスファターゼが好ましい。

[0041] 検出試薬とは、核酸の検出試薬であり、核酸に結合する色素を含む。さらに、一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応する物質を含んでいてもよい。

[0042] 色素とは、可視光の吸収により呈色する物質のことを指す。核酸に結合する色素としては、核酸に結合できれば特に制限されないが、例えば、トリフェ

ニルメタン系色素、チアジン系色素、オキサジン系色素、アジン系色素、フェナジン系色素、キサンテン系色素、フェナントリジウム系色素、アゾ系色素、ラクトン系色素、サルトン系色素、インジゴイド系色素、シアニン系色素、オキソノール系色素、スチリル系色素、ポリフィリン系色素、チオキサンテン系色素、スクワリリウム系色素、クロコニウム系色素、アズレニウム系色素、ジチオール金属塩系色素、ナフトキノン系色素、アントラキノン系色素、インドフェノール系色素、クマリン系色素、ケトクマリン系色素、ピリリウム塩系色素、チオピリリウム塩系色素、チアゾール系色素、キノリン系色素、ベンゾフェノン系色素、チオベンゾフェノン系色素およびこれらの混合物が挙げられる。

[0043] 好ましくはトリフェニルメタン系色素、チアジン系色素、オキサジン系色素、アジン系色素、フェナジン系色素、キサンテン系色素、フェナントリジウム系色素、アゾ系色素、インジゴイド系色素、ラクトン系色素、サルトン系色素およびこれらの混合物である。

[0044] トリフェニルメタン系色素としては、例えば、メチルグリーン、マラカイトグリーン、クリスタルバイオレット、パラロザニリン、ゲンチアナバイオレットＢ、ゲンチアナバイオレットＲ、ナイトブルー、ビクトリアブルーＢ、ビクトリアブルーＲ、ビクトリアブルー４Ｒ、ビクトリアブルーＢＯ、ロゾール酸、フクシン、酸性フクシン、塩基性フクシン、ニューフクシン、ブロモチモールブルー、ブロモクレゾールグリーンフェノールフタレイン、ブロモフェノールブルー、パテントブルーバイオレット、フェノールレッド、ピグメントブルー１、ピグメントバイオレット３、ベンジルバイオレット、ペンタメチルパラロザニリン、ファストグリーンＦＣＦ、エチルバイオレット、グリーンＳ、ローズアニリン、アシッドブルー７、アズールブルーＧ、ソロクロムシアニンＲ、アシッドブルー１４７、ライトグリーンＳＦイエロー、ライトグリーンＳＦ、エチルグリーン、アニリンルー、メチルバイオレット、クロムバイオレットＣＧが挙げられる。

[0045] チアジン系色素としては、例えば、トルイジンブルーＯ、メチレンブルー、

チオニン、アズールＡ、チオールＣが挙げられる。

[0046] オキサジン系色素としては、例えば、ブリリアントクレシルブルー、ナイルブルー、ガロシアニン、ベーシックブルー３が挙げられる。

[0047] アジン系色素としては、例えば、アニリンブラック、アセチレンブラック等が挙げられる。

[0048] フェナジン系色素としては、例えば、ニュートラルレッド、ヤヌスグリーンＢ、ベーシックレッド２、サフラニンＢが挙げられる。

[0049] キサンテン系色素としては、例えば、フルオレセイン、ローダミン、ピロニンＹが挙げられる。

[0050] フェナントリジウム系色素としては、例えば、エチジウムブロマイドが挙げられる。

[0051] アゾ色素としては、例えば、ビスマルクブラウン、ニューコクシン、ベーシックレッド２９が挙げられる。インジゴイド系色素としては、例えば、インジゴカルミンなどが挙げられる。

[0052] 検体への検出試薬の添加量は、呈色を可視光で判定できれば特に限定されるものではないが、通常１０％以下であり、好ましくは１％以下であり、さらに好ましくは０．１％以下である。

[0053] これらの色素のなかでも、核酸との結合により色調が変化する性質を有し、かつ、構造変化に伴い色調が変化する性質を有していることが好ましいが、いずれか一方のみを有していてもよい。また、これらの色素は一種でも使用でき、二種以上を組み合わせても使用できる。

[0054] 核酸との結合により色調が変化する性質を有する色素としては、例えば、トルイジンブルーＯやメチルグリーン、ブリリアントクレシルブルー、ゲンチアナバイオレットＢ、ビクトリアブルーＢ等が挙げられる。具体的にはトルイジンブルーＯは二本鎖核酸が存在しない場合は濃紺であるが、核酸と結合することで水色へと変化し、メチルグリーンは核酸が存在しない場合は水色であるが、核酸と結合することで青緑色へと変化する。また、ブリリアントクレシルブルーは核酸が存在しない場合は濃青色であるが、核酸と結合する

ことで青緑色へと変化する。

[0055] 一方、構造変化に伴って色調が変化する色素としては、プロトン化状態の違いや酸化還元状態の違いなどで異なる色調に変化するｐＨ応答性色素や酸化還元応答性色素などが挙げられる。構造変化には共役構造の変化や、置換基の導入や変換、プロトン化状態の違いなどが含まれる。

[0056] ｐＨ応答性色素とは、ｐＨ指示薬等にみられるような、溶液中の水素イオン濃度（ｐＨ）に応じて色調を変える色素を意味する。これらの中には、酸性からアルカリ性にすることで、フェノールフタレインのように無色から赤紫へと変化するものや、メチルオレンジのように赤色から橙色へと変化するものが含まれる。

[0057] 酸化還元応答性色素とは、例えば、酸塩基指示薬や酸化還元指示薬に用いられるような色素が挙げられ、酸化状態と還元状態で色調が変化する色素を意味する。例えば、メチレンブルーやメチルグリーンは酸化型では青色を呈するが、還元型では無色となる。一方、トルイジンブルーＯは酸化型では青色を呈するが、還元型では、赤紫色を呈する。

[0058] 構造変化に伴い色調が変化する性質を有する色素を用いた場合、二本鎖核酸に結合した色素と比較して、一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応する物質を添加する工程を追加することで、核酸の有無による色調のコントラストを増強し可視光による検出を容易にすることが可能である。つまり、二本鎖核酸と結合した色素に由来する色調以外を変化させ、又は消して無色にすることで、二本鎖核酸の有無による色調のコントラストが増強される。上記工程により、二本鎖核酸と結合はするが、二本鎖核酸との結合による色調の変化が少ない、或いは、結合はするが色調の変化が全くない色素を使用する場合でも、色素がｐＨ応答性あるいは酸化還元応答性を有していれば、二本鎖核酸増幅の判定が可能となる。

[0059] 例えば、メチルグリーンは二本鎖核酸と結合した際の色調の変化を目視で判別しにくい。しかし、一本鎖核酸と結合したメチルグリーンおよび核酸と結合していないメチルグリーンと優先的に反応する物質を添加することで、二

本鎖核酸と結合していないメチルグリーン由来の水色を消すことができる。この方法により、着色されている場合は二本鎖核酸が存在し、無色の場合は二本鎖核酸が存在しないというように、核酸の有無を容易に判定することが可能となる。

[0060] もう一つの例として、トルイジンブルーＯは二本鎖核酸と結合すると、濃紺から青色へと変化する。さらに、一本鎖核酸と結合したトルイジンブルーＯ、および核酸と結合していないトルイジンブルーＯと優先的に反応する物質を添加することで、二本鎖核酸と結合していないトルイジンブルー由来の濃紺色を赤紫色へと変化させ、青色の場合は二本鎖核酸が存在し、赤紫色の場合は二本鎖核酸が存在しないというように、核酸の有無を容易に判定することが可能となる。

[0061] さらにもう一つの例として、ゲンチアナバイオレットＢは二本鎖核酸と結合した際の色調の変化を目視で判別しにくい。しかし、一本鎖核酸と結合したゲンチアナバイオレットＢ、および核酸と結合していないゲンチアナバイオレットＢと優先的に反応する物質を添加することで、二本鎖核酸と結合していないゲンチアナバイオレットＢ由来の青紫色を消すことができ、青紫色の場合は二本鎖核酸が存在し、無色の場合は二本鎖核酸が存在しないというように、核酸の有無を容易に判定することが可能となる。

[0062] さらにもう一つの例として、ビクトリアブルーＢは中性溶液中では二本鎖核酸と結合した際の色調の変化を判別しにくい。しかし、中性以上のアルカリ領域のｐＨ環境下では二本鎖核酸と結合していないビクトリアブルーＢ由来の青色が淡赤色へと変化するので、青色の場合は二本鎖核酸が存在し、淡赤色の場合は二本鎖核酸が存在しないというように、核酸の有無を容易に判定することが可能となる。

[0063] 本工程により色調のコントラストの増強効果を得ようとする場合、使用する色素は特に限定されるものではないが、二本鎖核酸と結合しない場合に、色素の構造変化に依存して呈色が有色から無色へ、又は無色から有色へと変化する色素であってもよい。また、例えば青色から赤色へというように、色調

が変化する色素であってもよい。このうちでも、核酸の有無の判定が容易であるという理由から、色素の構造変化に依存して呈色が有色から無色へ、又は無色から有色へと変化する色素であることが好ましい。

[0064] 一本鎖核酸に結合した色素、および核酸と結合していない色素と優先的に反応する物質は、色素の構造を変化し呈色を変化させる物質であることが好ましく、例えば、求核剤、酸化剤、還元剤、酸、塩基、ｐＨ緩衝剤が挙げられる。

[0065] 酸化還元応答性色素を用いる際は、一本鎖核酸に結合した色素、および核酸と結合していない色素と優先的に反応して色調を変化させる物質として、酸化剤、及び還元剤等が挙げられる。

[0066] 上記酸化剤は、酸化作用を有するものであれば特に制限はないが、過酸化水素、過マンガン酸カリウム、塩素酸カリウム、二クロム酸カリウム、臭素酸ナトリウム、臭素酸カリウム、ハロゲン、濃硫酸、硝酸、次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素、クロラミン、四酸化オスミウム、ジメチルスルホキシド、メタクロロ過安息香酸などが含まれる。

[0067] 同様に還元剤は、還元作用を有するものであれば特に制限はないが、水素化ホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、アスコルビン酸、２－メルカプトエタノール、ＤＬ－ジチオスレイトール、１－チオグリセロール、システイン、トリブチルホスフィン、アミノエタンチオール、トリス２－カルボキシエチルホスフィン、およびその誘導体などが含まれる。

[0068] また、ｐＨ応答性色素を用いる際は、一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応して色調を変化させる物質として、酸、および塩基を使用することができる。

[0069] 酸としては、塩酸、硫酸、硝酸等の鉱酸や酢酸、ギ酸、シュウ酸、クエン酸、乳酸等の有機酸が好適に用いられるが、これに限定されるものではない。好ましくは塩酸、硫酸、酢酸、クエン酸であり、特に好ましくは塩酸、酢酸

である。

[0070] 塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、アンモニア、トリエチルアミン等が好適に用いられるが、これに限定されるものではない。好ましくは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸水素ナトリウムであり、特に好ましくは水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウムである。

[0071] 求核剤としては、例えば、亜硫酸ナトリウム等の亜硫酸イオン含有物、亜硫酸水素ナトリウム等の亜硫酸水素イオン含有物、硝酸ナトリウム等の硝酸イオン含有物、亜硝酸ナトリウム等の亜硝酸イオン含有物、ナトリウムシアニド等のシアニドイオン含有物、ハロゲン化物イオン、窒素求核剤、硫黄求核剤、アルカリ金属アルコキシド、アルカリ金属水酸化物、ヒドリド求核剤等の求核剤が使用可能である。

[0072] 上記の「ハロゲン化物イオン」としては、例えば、フッ化物イオン、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン等が挙げられる。

[0073] 上記の「窒素求核剤」としては、例えば、アンモニア、メチルアミン、ｎ－プロピルアミン、ジメチルアミン、ベンジルアミン、Ｎ－メチルベンジルアミン、アニリン、ｎ－ヘプチルアミン、１－アミノデカン、１，３－ジアミノプロパンなどのアミン系求核剤；アセチルアミド等のアミド系求核剤；ジアセチルイミド、ジホルミルイミド、フタルイミド、フタルイミドの金属塩等のイミド系求核剤；ベンゼンスルホニルアミド、ｐ－ニトロベンゼンスルホニルアミド、ｏ－ニトロベンゼンスルホニルアミド、ｍ－ニトロベンゼンスルホニルアミド、ｐ－トルエンスルホニルアミド等のスルホニルアミド系求核剤等が挙げられる。

[0074] 上記の「硫黄求核剤」としては、例えば、チオール、ジスルフィド、またはチオ尿素が挙げられる。

[0075] 上記の「アルカリ金属アルコキシド」としては、例えば、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、カリウム第３級ブトキシド等が挙げられる。

[0076] 上記の「アルカリ金属水酸化物」としては、例えば、水酸化ナトリウム、水

酸化カリウム等が挙げられる。

[0077] 上記の「ヒドリド求核剤」とは、求核剤として水素供与することができる試薬を意味し、例えば、トリアセトキシヒドロほう酸ナトリウム、水素化ほう素ナトリウム、テトラヒドロほう酸リチウム、ピリジンボラン錯体、テトラヒドロフランボラン錯体、２－ピコリンボラン錯体、硫化ジメチル－ボラン錯体、シアノ水素化ほう素ナトリウム、水素化トリエチルほう素リチウム、水素化リチウムアルミニウム、Ｒｅｄ－Ａｌ〔水素化ビス（２－メトキシエトキシ）アルミニウムナトリウム〕、Ｌ－Ｓｅｌｅｃｔｒｉｄｅ〔水素化トリ（ｓｅｃ－ブチル）ほう素リチウム〕、Ｋ－Ｓｅｌｅｃｔｒｉｄｅ〔水素化トリ（ｓｅｃ－ブチル）ほう素カリウム〕、ＤＩＢＡＬ－Ｈ（水素化ジイソブチルアルミニウム）等が挙げられる。

[0078] 求核剤としては、具体的には、水素化ホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、アスコルビン酸、２－メルカプトエタノール、ＤＬ－ジチオスレイトール、１－チオグリセロール、システイン、トリブチルホスフィン、アミノエタンチオール、およびトリス２－カルボキシエチルホスフィンからなる群から選ばれる１以上の求核剤が好ましい。

[0079] また、一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応して色調を変化させる物質としてｐＨ緩衝剤を使用し、検体のｐＨ変化により色調を変化させることもできる。

[0080] ｐＨ緩衝剤としては、検体のｐＨを変化させるものであれば特に限定されないが、ＭＥＳ、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ、ＡＤＡ、ＰＩＰＥＳ、ＡＣＥＳ、ＭＯＰＳＯ、ＢＥＳ、ＭＯＰＳ、ＴＥＳ、ＨＥＰＥＳ、ＤＩＰＳＯ、ＴＡＰＳＯ、ＰＯＰＳＯ、ＨＥＰＰＳＯ、ＥＰＰＳ、Ｔｒｉｃｉｎｅ、Ｔｒｉｓ、Ｂｉｃｉｎｅ、ＴＡＰＳ、ＣＨＥＳ、ＣＡＰＳＯ、ＣＡＰＳ等のグッド緩衝液、グリシン、リン酸、フタル酸、クエン酸、バルビツール酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、炭酸が好適に用いられる。

[0081] 一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応して色調を変化させる物質の具体的な添加量は、色素及び前記物質の種類によって変わるので一律に定めることはできないが、当業者が、可視光での判定が最も容易となる添加量を実験的に決定することができる。例えば、色素と反応する物質の量は、色素量の１０００モル当量以下が好ましく、１００モル当量以下がより好ましい。

[0082] 本発明の方法により核酸増幅産物を検出する場合には、色素、及び一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応する物質を添加してコントラストを増強してもよい。また、該色素を予め添加した状態で増幅反応を行い、反応後に閉鎖空間にて本発明の検出デバイスを用いて、一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応する物質を添加し、コントラストを増強することも可能である。

[0083] また、一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応する物質は１種のみでも使用でき、２種以上組み合わせても使用できる。さらには、一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応する物質が、核酸を含む検体に当初から含まれる場合には、色素との反応工程のみでも核酸検出が可能である。

[0084] また、色素、及び一本鎖核酸に結合した色素および核酸と結合していない色素と優先的に反応する物質は混合した状態で使用することも可能である。

[0085] 検出試薬は、ロイコ型色素を含むものであってもよい。ロイコ型色素とは、無色または淡色の色素であり、顕色剤との反応や、光等の物理刺激によりその構造を変化し呈色を示す色素を意味する。ロイコ型色素の顕色剤としては、酸化剤やアルコールなどが知られているが、本発明の検出方法では、多重鎖核酸が顕色剤として機能する。

[0086] ロイコ型色素としては、核酸との相互作用により実質的に呈色する性質を有する色素であれば特に限定されず、例えば、トリアリールメタン系色素、キサンテン系色素、キノリン系色素、フェノチアジン系色素、フェノキサジン系色素およびこれらの混合物が挙げられる。

[0087] 本発明において核酸検出に使用可能なロイコ型色素としては、トリアリールメタン系色素、フェノチアジン系色素、フェノキサジン系色素が挙げられ、このうちトリアリールメタン系色素を使用することが好ましい。

[0088] トリアリールメタン系色素の具体例として、メチルグリーン、マラカイトグリーン、クリスタルバイオレット、パラロザニリン、ゲンチアナバイオレットＢ、ゲンチアナバイオレットＲ、ナイトブルー、ビクトリアブルーＢ、ビクトリアブルーＲ、キノリン系の４－（ｐ－ジメチルアミノスチリル）キノリンが挙げられる。このうち、クリスタルバイオレット、およびゲンチアナバイオレットＢのロイコ型誘導体がより好ましい。なお、ロイコ型色素としてゲンチアナバイオレットを使用する場合には、非共役型のゲンチアナバイオレットのみが、本発明におけるロイコ型色素に該当する。求核剤とは別に核酸と接触する、共役型のゲンチアナバイオレットは、ロイコ型色素には該当しない。

[0089] フェノチアジン系色素の具体例として、フェノチアジン、ベンゾイルロイコメチレンブルーが挙げられる。

[0090] フェノキサジン系色素の具体例として、フェノキサジンなどのロイコ型誘導体が挙げられる。

[0091] 本発明において、ロイコ型色素は発色型色素から変換することも可能である。発色型色素とは、ロイコ型色素に顕色剤を反応させた際の発色状態にある色素を意味する。例えば、トリアリールメタン系の発色型色素に求核剤を反応させることで、ロイコ型色素に変換できる。この場合、単一のトリアリールメタン系色素を用いても、使用する求核剤を変えれば、異なる構造を有するロイコ型色素が得られる。

[0092] 増幅された核酸をロイコ型色素を用いて検出する際は、核酸増幅反応前の反応液にロイコ型色素を添加しておくことが好ましいが、核酸増幅反応後の反応液に混合してもよい。

[0093] また、核酸増幅を行う検体にロイコ型色素を単独で添加しても良いし、ロイコ型色素と安定化剤との混合物を添加することも可能である。安定化剤とは

、ロイコ型色素が発色することを防ぐ化合物を意味し、例えば、アミン、チオール化合物、αシクロデキストリン、βシクロデキストリン、γシクロデキストリン等の包接化合物、アスコルビン酸等の酸化防止剤等が挙げられるが、発色を防止できればこれらに限定されない。安定化剤は単独で添加しても良いし、複数を組み合わせて添加しても良い。

[0094] さらに、ロイコ型色素を直接多重鎖核酸に添加するのではなく、発色型色素を求核剤等で処理しロイコ型色素に変更後、検体に添加しても良いし、発色型色素と求核剤の混合物を検体に添加してもよい。例えば、クリスタルバイオレットと亜硫酸ナトリウムとを混合してロイコ型に変換後、この混合物を用いて多重鎖核酸を検出可能である。発色型色素と求核剤等の発色型をロイコ型に変換する薬剤との混合液の使用は、ロイコ型色素が不安定で単離困難である場合に特に有効である。

[0095] 検出試薬は固体であってもよい。検出試薬が固体であるとは、検出に用いる試薬が熱風、真空、蒸気、バレル、スピン、吸引等の手法で水分を飛ばすことによって固化されていることを意味し、ハンドリングのし易さでメリットを有することもある。検出試薬に液体を使用すると遮蔽等に困難を伴う場合も有るからである。

[0096] 検出試薬はコーティング材で核酸から遮蔽されていてもよい。核酸から遮蔽されているとは、検出試薬が一時的に核酸を含有する試料等から遮蔽されている状態を意味する。核酸検出時に熱や圧力などの物理的刺激によって検出試薬が核酸に露出されることで、核酸と検出試薬が接触し、呈色を生じることが可能になる。

[0097] なお、コーティング材としては、検出試薬を一時的に遮蔽できるものであれば特に制限はないが、例えば、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなどのポリマー樹脂、パラフィンなどの油脂、アガロース、ジェランガム、カラギーナン、キサンタンガム、クラスターデキストリン、ヒアルロン酸などの糖類、ゼラチンやコラーゲンなどのタンパク質などが挙げられる。

[0098] 本発明は、また、検出試薬を保持する検出試薬保持部、および、前記試薬保

持部を備えた蓋部および／または反応容器を有する、核酸の検出用デバイスまたはキットに関する。

[0099] 検出デバイスを構成する蓋部および／または反応容器は閉鎖系を形成し得るものであれば特に制限はない。例えば、反応容器の開口部を密閉する蓋部と、反応容器の上部と蓋部を結合する接合部とを、一体に成型してなるもの（蓋型－反応容器一体型検出デバイス及び反応容器型検出デバイス）、もしくは反応容器の蓋部（蓋型検出デバイス）が挙げられる。

[0100] 反応容器は、液体を保持でき、蓋等で密閉可能なものであれば形態に特に制限はないが、例えば、ＰＣＲや遺伝子操作等で用いられるチューブ型、プレート型、フィルム型、チップ型であってよく、市販のものを使用することも可能である。反応容器の口径、大きさや肉厚等は、核酸の増幅反応等の機構、或いは、使用する装置の大きさに合わせて適宜調整してもよい。また、反応容器は単独で使用してもよいが、複数本、例えば４本、８本、１２本など、複数本が連結されていてもよい。

[0101] 蓋部は、対応する反応容器の開口部を密閉できるものであれば特に制限はなく、押し込んで密閉できるタイプのもの、シール、フィルム、スクリューキャップなどが挙げられ、市販のものを使用することも可能である。

[0102] 蓋部は、反応容器の開口部に適合し、開口部の周縁より下方に続くチューブの内壁面に対して好適な密閉性が得られるように形成された筒状のシール部と、この筒状のシール部の端部に外周全体にわたって形成され、前記反応容器の縁部と密に当接し、それに対して好適に密閉し、閉鎖系が得られるように形成された外周部とを有することが好ましい。筒状のシール部は、反応チューブの開口部と接合させた際に密着性が高まるようにデザインされることが好ましい。

[0103] 蓋部や反応容器の材質は、特に制限されないが、プラスチック製であることが好ましい。プラスチックは射出成型などの公知慣用の方法により、チューブ容器を成型することができ、安価に大量生産することができる。プラスチックとして、例えば、ポリエチレン系樹脂、ポリプロピレン系樹脂、その他

ポリオレフィン系樹脂、ポリエステル系樹脂、フッ素系樹脂、シリコン系樹脂等が挙げられる。

[0104] 検出試薬保持部は、蓋部および／または反応容器の内側に固定され、核酸を検出するための検出試薬を保持する。検出試薬保持部は、蓋部と反応容器のいずれかに固定されていてもよく、両方に固定されていてもよい。また、反応容器と蓋部における、検出試薬保持部の固定位置は、核酸溶液に接触できる位置であれば特に制限はなく、使用する反応容器や蓋部の構造にあわせて、適宜調整されることが望ましい。

[0105] 蓋部および／または反応容器は、核酸増幅試薬を保持することが好ましい。核酸増幅試薬としては、ＬＡＭＰ法やＰＣＲ法等の核酸増幅に使用される試薬が挙げられる。例えば、蓋部に検出試薬を保持し、反応容器にＰＣＲ試薬（ポリメラーゼ等）を保持するというように、検出試薬と核酸増幅試薬を別の位置に保持することも可能である。

[0106] 検出試薬保持部は、検出時に閉鎖系内で核酸と検出試薬が接触できれば、どのような形状で形成されていても良い。例えば、蓋部または反応容器の形状を変えることで試薬を保持するための構造を設けることが挙げられ、その場合、反応容器または蓋部の内壁からチューブ容器内部に向けて張り出して形成される場合（張出しタイプ）、あるいは、内壁から内壁内部に向かって凹部が形成されている場合（凹タイプ）などが挙げられる。また、形状を変化させないフラットな表面をもつタイプも挙げられる。また、反応容器または蓋部に検出試薬を一時的に遮蔽する構造（一時遮蔽タイプ）を設けることも可能であり、この場合、熱などの物理的刺激によって遮蔽を解除し、検出試薬を核酸と接触させることができる。またフィルター、ろ紙、カプセル、リングなど、蓋部や反応容器以外の材料に検出試薬を保持させることも可能である。

[0107] 張出しタイプとは、蓋部または反応容器の内壁面より内部に向かって検出試薬保持部が張り出したものである。張出し部の数は、特に制限はないが、好ましくは１、もしくは２個配置されていることが望ましい。また張出しタイ

プの上から見た形は、特に制限はないが好ましくは円形であり、蓋部または反応容器の横断面からみた形状は、例えば短冊状、容器内部に向かって張り出した先端がとがっている三角形状、先端が平らである台形状、先端が丸みを帯びているドーム状、あるいは先端が容器内壁に向かってくびれている凹面状などが挙げられる。また、蓋部または反応容器の内部を分割するような構造をとることも可能である。検出試薬保持部の大きさは使用する蓋部や反応容器の構造に合わせて、適宜調整されることが望ましい。

[0108] 凹タイプとは、蓋部または反応容器の内壁上に検出試薬保持部として窪みを形成させたものである。窪みの数は特に制限はないが、好ましくは１、もしくは２個配置されていることが望ましい。また凹タイプの上から見た形は、特に制限はないが好ましくは円形であり、蓋部または反応容器の横断面からみたとき、例えば短冊状、容器内部に向かって張り出した先端がとがっている三角形状、先端が平らである台形状、先端が丸みを帯びているドーム状、あるいは先端が容器内壁に向かってくびれている凹面状などが挙げられる。またこの凹タイプは前述の張り出しタイプと組み合わせて利用することも可能である。

[0109] 検出試薬保持部の形状、大きさや数は、蓋部や反応容器の製造の容易さとともに、乾燥試薬の接着のしやすさや、試薬を容器内で乾燥・固形化させた際の凹凸形状への入り込みやすさ、挟まれやすさ等を様々に考慮して決定される。

[0110] 一時遮蔽タイプは、蓋部、または、反応容器に、検出試薬を一時的に核酸から遮蔽する構造を有する。遮蔽するための構造は、検出試薬を一時的に遮蔽できれば特に制限はないが、例えば、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなどのポリマー樹脂、パラフィンなどの油脂、アガロース、ジェランガム、カラギーナン、キサンタンガム、クラスターデキストリン、ヒアルロン酸などの糖類、ゼラチンやコラーゲンなどのタンパク質などをコーティング材として使用する構造が挙げられる。核酸検出前には検出試薬を核酸から遮蔽し、核酸検出時に熱などの物理的刺激によって検出試薬を核酸に露

出させ、核酸と接触させる構造が挙げられる。なお、この一時遮蔽タイプは前記の張出しタイプまたは凹タイプの構造と組み合わせた試薬保持部とすることも可能であり、また蓋部や反応容器にそれらの構造を持たないものでも設置することができる。

[0111] 以下、図面を参照して本発明の検出デバイスのいくつかの形態を説明する。

[0112] 図１に、蓋型－張り出しタイプＩである検出デバイスの外観（ａ）、（ａ）の開口部側からみた平面図（ｂ）、及び（ｂ）のＸ－Ｘ’線に沿って切断した縦断面図（ｃ）を示す。蓋型－張り出しタイプＩは底部１、開口部２と筒状の胴部３及び試薬保持部４を形成する壁部５からなる。胴部は反応容器に差し込む際の密閉性が高まるように底部から開口部にかけて径が広くなっており、その高さは反応容器の長さ以下であることが好ましい。また、検出試薬保持部の形状は、検出試薬を保持できる構造であれば特に制限はないが、前述のように例えば短冊状、反応容器内部に向かって張り出した先端がとがっている三角形状、先端が平らである台形状、先端が丸みを帯びているドーム状、あるいは先端が容器内壁に向かってくびれている凹面状などが挙げられる。壁部や径は検出試薬を保持できる高さであれば特に制限はないが、長さは胴部の長さ以下、径は開口部の径以下が望ましい。

[0113] 図２に、蓋型－張り出しタイプＩＩである検出デバイスの外観（ａ）、（ａ）の開口部側からみた平面図（ｂ）、及び（ｂ）のＸ－Ｘ’線に沿って切断した縦断面図（ｃ）を示す。蓋型－張り出しタイプＩＩは図１の蓋型－張り出しタイプＩと同じく、底部、開口部、胴部及び試薬保持部を形成する壁部からなる。ただし、試薬保持部は蓋型－張り出しタイプＩとは異なり、壁部５は胴部内部を少なくとも２分割するように設けられており、その高さは検出試薬を保持できる高さであれば特に制限はないが、胴部の長さ以下であることが好ましい。

[0114] 図３に、蓋型－凹タイプである検出デバイスの外観（ａ）、（ａ）の開口部側からみた平面図（ｂ）、及び（ｂ）のＸ－Ｘ’線に沿って切断した縦断面図（ｃ）を示す。蓋型－凹タイプは図１～２に示した検出デバイスと同じく

、底部、開口部、胴部及び試薬保持部を形成する壁部からなる。試薬保持部４は開口部から底部に向かって窪みを形成しており、その深さや径は検出試薬を保持できる長さであれば特に制限はないが、深さは底部の厚さ以下であることが好ましく、径は開口部の長さ以下であることが好ましい。

[0115] さらには、試薬保持部の張出しタイプと凹タイプを組み合わせた試薬保持部を有する蓋型検出デバイスも作製可能である。

[0116] 図４に、蓋型－一時遮蔽タイプである検出デバイスの断面図を示す。この場合、検出試薬はコーティング材によってコーティングされている。また、一時遮蔽タイプの試薬保持は張出しタイプや凹タイプと組み合わせて形成させることも可能である。

[0117] 図７に、蓋型－張り出しタイプＩである検出デバイスの外観を示す。図１～図３では反応容器とは独立した、蓋部からなる検出デバイスを示したが、図７のように試薬保持部を有する蓋部と反応容器が一体化したものであってもよい。この一体型を連結することもでき、連結した場合には複数検体の同時並行処理が簡便となる。

[0118] 図９に、反応容器型Ｉである検出デバイスの外観（ａ）、（ａ）のＹ－Ｙ’線に沿って切断した縦断面図（ｂ）、凹タイプの試薬保持部を有する反応容器型デバイスの縦断面図（ｃ）、及び張出しタイプの試薬保持部を有する反応容器型デバイスの縦断面図（ｄ）を示す。凹タイプ（ｃ）は反応容器の底方向に向かって窪みを形成しており、その深さや径は検出試薬を保持できる長さであれば特に制限はないが、深さは反応容器厚以下、径は反応容器の底の径以下であることが好ましい。また張り出しタイプ（ｄ）は反応容器の開口面方向に向かって壁部が形成され、検出試薬を保持できる高さであれば特に制限はないが、反応容器の長さ以下であることが望ましい。

[0119] 図１０に、反応容器型－一時遮蔽タイプである検出デバイスの断面図を示す。この場合、検出試薬は反応容器のフラットな内面の試薬保持部に前記のコーティング材によってコーティングされている。また、一時遮蔽タイプの試薬保持は張出しタイプや凹タイプと組み合わせて形成させることも可能であ

る。

[0120] 検出デバイスは、１つで使用することも可能であり、連結部を介して２つ以上連結した状態で使用することも可能である。連結する場合、複数の核酸増幅反応を並行して行った後の増幅産物の検出が簡便にできる。連結する個数は、使用の場面に応じて自由に選ぶことが可能で、一例としては、図５に、図１の検出デバイスの蓋部を８つ連結した蓋型検出デバイスの外観を示している。連結部は、複数の蓋部同士、接合部同士、反応容器同士、あるいはそれらの組み合わせを連結するように形成されているが、好ましくは蓋部同士、もしくは反応容器同士を連結するように形成されてなることが望ましい。このとき連結部は、反応容器の開口部に設けられた縁部で連結するように形成されてよく、あるいは、反応容器の筒状の胴部で連結するように形成されていてもよい。

[0121] 試薬保持部への検出試薬、色素、及び修飾物質の固定化は以下の方法で行う。なお、修飾物質は、検出試薬に含まれる色素以外の成分であって、求核剤の他に、安定化剤、及びコーティング剤等を意味する。求核剤としては、コントラスト増強のための酸化剤、還元剤、酸、塩基、ｐＨ緩衝剤、或いは発色型色素をロイコ型に変換する物質が挙げられる。

[0122] まず、修飾物質を溶媒に溶かした溶液を試薬保持部に添加し、乾燥させ、固定する。乾燥方法は特に限定されず、風乾や加熱、減圧乾燥等が適応可能であり、これらの方法を組み合わせて実施することもできる。なお、この際の溶媒は修飾物質が溶解できるものであれば良く、例えば、水、エタノール、メタノール、イソプロパノール等が挙げられる。また、これに乾燥後の修飾物質の剥離や脱落を防止する目的でポリマー等の基材を添加することもでき、例えばポリビニルアルコールなどを添加しても良い。この際のポリマー等の基材の量は、乾燥時に核酸の呈色が確認できる量で調整することができ、好ましくは０．１ｍｇ以下であり、より好ましくは０．０１ｍｇ以下である。さらには粘性をもった液状のゾル、固体となったゲルにして保持させることもできる。また、乾燥後の修飾物質の溶解性を向上させる目的で、溶解補

助剤等を添加しても良く、例えば、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００やＴｗｅｅｎ２０などの界面活性剤やシクロデキストリン、βーグルカン等が挙げられる。この際の修飾物質量は、乾燥時に核酸の呈色が確認できる量で調整することができ、例えば色素量の１０００モル当量以下が好ましく、１００モル当量以下がより好ましい。

[0123] なお、核酸を含む溶液に修飾物質が含まれている場合には色素のみを固定する場合もある。また修飾物質と色素の固定の順番に制限はない。さらには修飾物質溶液と色素溶液の混合液を使用し、一度に固定することも可能である。

[0124] 一時遮蔽タイプの試薬保持部をもつ検出デバイスを作製する際のコーティングは以下の方法で行う。

[0125] まず、前述のコーティング材を溶融し、乾燥後の検出試薬上に添加し、冷却して固定する。または、コーティング材を溶媒に溶解し、乾燥後の検出試薬上に添加し、乾燥により固定する。この際のコーティング材は検出試薬を安定にカバーでき、加熱などの物理的処理により検出試薬を放出可能であれば特に制限はないが、例えば固形パラフィン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、アガロース・ジェランガム・カラギーナン・キサンタンガム・ヒアルロン酸などであり、好ましくはパラフィン、ポリビニルアルコールである。

[0126] なお、この試薬保持部には、検出試薬と共に核酸増幅に必要な各種試薬を保持させてもよい。各種試薬には前述の核酸増幅法を行うための目的核酸を増幅するためのプライマー、ＤＮＡポリメラーゼ、核酸増幅反応に用いられる緩衝液や制限酵素等が含まれる。この場合、検出試薬と増幅用試薬は蓋部と反応容器別々に保持させることができ、また試薬保持部の壁部や一時遮蔽タイプでそれぞれを遮蔽することもできる。

[0127] 次に、図面を参照して、検出デバイスを用いた核酸検出法について説明する。

[0128] 図６は、蓋型検出デバイス（ａ）を用いた核酸検出工程を示している。核酸

溶液又は核酸増幅反応液を反応容器に添加し、検出試薬を保持した検出デバイスで蓋をした後（ｂ）、必要に応じて核酸増幅反応などの反応を行う（ｃ）。その後、検出デバイスを上下反転などさせるなどして、検出試薬と核酸を含む溶液と接触させ、試薬を核酸溶液に溶解させ、核酸を着色する（ｄ）及び（ｅ）。その際、ボルテックスなどの攪拌処理を行うことで効率よく溶解させることも可能である。また、掌サイズの超小型ＰＣＲ装置を用いてＰＣＲ反応を行った場合、増幅反応後に装置自体を逆さにすることで、反応溶液と検出試薬を接触させ、検出することも可能である。

[0129] 図８は、蓋型－反応容器一体型検出デバイス（ａ）を用いた核酸検出工程を示している。検出試薬を保持した検出デバイスに核酸溶液又は核酸増幅反応液を添加し蓋をする（ｂ）。その後は、前述の蓋型検出デバイスと同様な処理を行う。

[0130] 図１１は、一時遮蔽タイプの試薬保持部を持つ反応容器型検出デバイス（ａ）を用いた工程を示している。核酸溶液又は核酸増幅反応液を検出試薬を保持した反応容器に添加した後（ｂ）、蓋をする。必要に応じて核酸増幅反応などの反応を行った後（ｃ）、加熱などの処理によりコーティング材内の検出試薬を核酸溶液に溶解させる。この際の加熱温度は、コーティング材が物理的に変化し検出試薬が核酸溶液と接触できれば特に制限はないが、好ましくは４０℃以上であり、より好ましくは６０℃以上である。

[0131] 図１２は、蓋型検出デバイス（ａ）を用いた核酸検出工程を示している。容器内で増幅反応液を調製し（ｂ）、検出試薬を保持した蓋をした後（ｃ）、検出デバイスを上下反転などさせるなどして、検出試薬と反応液を接触させ、試薬を溶解させる（ｄ）。その際、ボルテックスなどの攪拌処理を行うことで効率よく溶解させることも可能である。その後、遠心機等を用いてスピンダウンを行い、蓋部に付着した溶液を容器内に集め、増幅反応を行う。

[0132] 図１３は、反応容器型検出デバイス（ａ）を用いた工程を示している。増幅反応溶液を容器内で調製し、反応容器内に保持した検出試薬を溶解させる（ｂ）。または、別の容器内で調製した反応溶液を、検出デバイスに添加して

もよい。その後、熱サイクル等により増幅反応を行う。

[0133] 次に図６、８、１１、１２および１３の工程（ｅ）以降の可視光での検出工程について述べる。

[0134] 工程（ｅ）での反応により生じた物質を可視光下で観察し、核酸の存在を可視光で判定する際には、紫外線のような可視光ではない光を照射することなく、一般的な実験室における照明のような可視光下で観察する。可視光であれば、紫外線照射する場合のように特別な装置は必要でなく、簡便に観察することができる。

[0135] なお、該検出デバイスを使用すれば図６、８、１１、１２および１３の（ｃ）から（ｅ）及び検出工程を全自動で行うことができる。全自動とは、本発明の検出デバイスで反応と検出段階を自動で行う工程を含むことを示す。

[0136] 例えば図６の蓋型検出デバイス及び図８の蓋型－反応容器一体型検出デバイスでは、核酸溶液又は核酸増幅反応液を検出試薬を保持した反応容器に添加した後（ｂ）、蓋をする。これ以降の工程は温度調節ができ、必要であれば振動や振とう、反応容器の反転ができる装置を用いて自動で実施することができる。必要に応じて核酸増幅反応などの反応を行った後（ｃ）、検出デバイスを振とうや反転などをすることによって、蓋部の検出試薬と核酸を含む溶液を接触させ、着色させることができる。さらに必要に応じて装置に組み込まれた可視光によって着色の有無や着色度を計測、場合によってはそのデータを解析することができる。

[0137] 図１１の一時遮蔽タイプの試薬保持部を持つ反応容器型検出デバイスを用いた工程において、核酸溶液又は核酸増幅反応液を検出試薬を保持した反応容器に添加した後（ｂ）、蓋をする。これ以降の工程は前述の装置で自動で実施する。必要に応じて核酸増幅反応などの反応を行った後（ｃ）、加熱などの処理によりコーティング材内の検出試薬を核酸溶液に溶解させて着色させることができる。さらに必要に応じて可視光によって着色の有無や着色度を計測することができる。

[0138] 本発明において、核酸検出後の着色した検体液を他の分子生物学的な操作に

そのまま使用することも可能である。そのような分子生物学的な操作には、制限酵素反応、シーケンス反応、ＰＣＲの様な酵素反応や、電気泳動による確認操作等が含まれる。

[0139] 本発明には、前述の可視光での検出用デバイスと、試薬や器具等を組み合わせたキットも含まれる。キットとは、前述の検出デバイスに加え、各種試薬や器具等を備えた形態を指す。各種試薬には前述の核酸増幅法を行うための目的核酸を増幅するためのプライマー、ＤＮＡポリメラーゼ、核酸増幅反応に用いられる緩衝液や増幅した核酸を処理するための制限酵素、シークエンス用の試薬等が含まれる。また抗原、抗体、色素、酵素、基質等を使用することにより、本発明のキットを免疫反応や生化学反応の測定、免疫蛍光法による微量検出にも用いることができる。

[0140] 本発明には、前記の可視光での検出用デバイスまたはキットを有する装置も含まれる。装置は、検体を自動的に処理し塩基配列等を解析する装置であって、本発明の検出デバイスを含む装置である。核酸精製装置や核酸増幅装置に本発明の可視光での検出用デバイスを組み込んで核酸の有無を判定したり、ＤＮＡ自動解析装置に組み込むことによって、ＰＣＲで増幅・ラベルされたサンプルのみを選別して解析を行う等、操作の確実性向上が期待できる。

実施例

[0141] 以下、実施例により本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0142] （実施例１）

（ｉ）蓋型－凹タイプの試薬保持部を持った蓋型検出デバイスの作製

回転ヤスリを使用して、０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の蓋部の内側に直径０．５ｍｍの窪みを２箇所作製し、試薬保持部とした。一方の試薬保持部に、色素溶液（０．２％　ゲンチアナバイオレットＢのエタノール溶液）を、他方に還元剤溶液（３．２％　亜硫酸ナトリウム／１％　ポリビニルアルコール水溶液）をそれぞれ１μｌ添加後、減圧下乾燥することで、核酸検出試薬を保持した反応容器とした。

[0143] （ｉｉ）ＰＣＲ増幅産物の検出

鋳型としてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を用い、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対が増幅するように以下のプライマーＦ：５’－ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ－３’およびプライマーＲ：５’－ＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ－３’を設計した。

[0144] プライマーＦとプライマーＲを各１５ｐｍｏｌと、１０ｎｇのｐＵＣ１９とを実施例１で作製した反応容器に入れ、ＥｘＴａｑ　ＰＣＲキット（タカラバイオ社製）の説明書に従い、５０μｌのＰＣＲ反応液を調製した。その後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（アプライドバイオシステム社製））にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒のサイクルを３５回行い、目的の約３３０ｂｐの増幅を行い、ポジティブコントロールとした。また、ＥｘＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを添加しないで同様の反応を行い、ネガティブコントロールとした。

[0145] ＰＣＲ反応後の容器を転倒混和し、反応溶液にて蓋部の検出試薬を溶解後、反応溶液の色調を目視にて確認した。その結果、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示し、反応容器の蓋を開閉することなく核酸増幅の有無を確認することが可能であった。

[0146] （ｉｉｉ）ＡＭＰ法増幅産物の検出

「Ｌｏｏｐａｍｐ（Ｒ）サルモネラ検出試薬キット」（栄研化学社製）を使用し、上記工程（ｉ）で作製した反応容器内にＬＡＭＰ法による核酸増幅反応液を調製した。１０μｌのＣｏｎｔｒｏｌ　ＤＮＡ　Ｓａｌと４０μｌのマスターＭｉｘ（Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘ．ＳａｌとＢｓｔ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを容量比で２０：１の割合で別途混合したもの）を混合し、６５℃で１時間反応後、さらに、８５℃で２０分反応することで、核酸が増幅された反応液（ポジティブコントロール）を調製した。また、１０μｌの蒸留水と４０μｌのＲｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘ．Ｓａｌを混合し、６５

℃で１時間反応後、さらに、８５℃で２０分反応することで、核酸が増幅されていない反応液（ネガティブコントロール）を調製した。

[0147] 反応後の容器を転倒混和し、反応溶液にて蓋部の検出試薬を溶解後、反応溶液の色調を目視にて確認した。その結果、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示した。このことから反応容器の蓋を開閉することなく核酸増幅の有無を確認することが可能であることが確認できた。

[0148] （実施例２）

（ｉ）凹タイプの試薬保持部をもった反応容器型検出デバイスの作製

回転ヤスリを使用して、０．２　ｍｌのＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の蓋部の内側に直径０．５ｍｍの窪みを１箇所作製し、試薬保持部とした。試薬保持部に還元剤溶液（３．２％　亜硫酸ナトリウム／１％　ポリビニルアルコール水溶液）を１μｌ添加後、減圧乾燥した。さらに、色素溶液（０．２％　ゲンチアナバイオレットＢのエタノール溶液）１μｌを、試薬保持部に添加後、減圧乾燥することで核酸検出試薬を保持した反応容器とした。

[0149] （ｉｉ）ＰＣＲおよびＬＡＭＰ法増幅産物の検出

上記工程（ｉ）で作製した反応容器を使用した以外は、実施例１の工程（ｉｉ）～（ｉｉｉ）と同様の方法で、ＰＣＲ増幅産物およびＬＡＭＰ法増幅産物を調製した。反応後の容器を転倒混和し、反応溶液にて蓋部の検出試薬を溶解後、反応溶液の色調を目視にて確認した。その結果、ＰＣＲおよびＬＡＭＰ法による核酸増幅産物が有る場合のみ、反応溶液は青色に着色し、増幅の有無を容易に目視で確認することが可能であった。

[0150] （実施例３）

（ｉ）凹タイプの試薬保持部をもった反応容器型検出デバイスの作製

回転ヤスリを使用して、０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の蓋部の内側に直径０．５ｍｍの窪みを１箇所作製し、試薬保持部とした。試薬保持部に核酸検出試薬（０．１％　ゲンチアナバイオレットＢ／０．８％　亜硫酸ナトリウム／０．７５％　ベータシクロデキストリン／３５％　イ

ソプロパノール）を２μｌ添加後、減圧乾燥することで核酸検出試薬を保持した反応容器とした。

[0151] （ｉｉ）ＰＣＲおよびＬＡＭＰ法増幅産物の検出

上記工程（ｉ）で作製した反応容器を使用した以外は、実施例１の工程（ｉｉ）～（ｉｉｉ）と同様の方法で、ＰＣＲ増幅産物およびＬＡＭＰ法増幅産物を調製した。反応後の容器を転倒混和し、反応溶液にて蓋部の検出試薬を溶解後、反応溶液の色調を目視にて確認した。その結果、ＰＣＲおよびＬＡＭＰ法による核酸増幅産物が有る場合のみ、反応溶液は青色に着色し、増幅の有無を容易に目視で確認することが可能であった。

[0152] （実施例４）

（ｉ）一時遮蔽タイプの試薬保持部をもった蓋型検出デバイスの作製

回転ヤスリを使用して、０．２　ｍｌのＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の蓋部の内側に直径０．５ｍｍの窪みを２箇所作製し、試薬保持部とした。一方の窪みに、色素溶液（０．２％　ゲンチアナバイオレットＢのエタノール溶液）を、他方に還元剤溶液（３．２％　亜硫酸ナトリウム／１％　ポリビニルアルコール水溶液）をそれぞれ１μｌ添加後、減圧下乾燥した。次に、溶融したパラフィンワックス（融点７０℃～８０℃）をその上に滴下し、冷却固化することで、蓋部の検出試薬にパラフィンコートを施した反応容器を作製した。

[0153] （ｉｉ）ＬＡＭＰ法増幅産物の検出

上記工程（ｉ）で作製した反応容器を使用して、実施例１の工程（ｉｉｉ）と同様方法でＬＡＭＰ法反応液（ポジティブコントロール、ネガティブコントロール）を作製した。その後、それぞれのサンプルを６５℃で１時間反応後、さらに８５℃で２０分反応した。反応終了後、蓋部を９８℃で１分間加温し、パラフィンを溶解した。次いで、反応容器を転倒混和し、反応溶液にて蓋部の検出試薬を溶解後の反応溶液の色調を目視にて確認した。その結果、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示した。このことから反応容器の蓋を開閉することなく核

酸増幅の有無を確認することが可能であることが確認できた。

[0154] （実施例５）

（ｉ）一時遮蔽タイプの試薬保持部をもった反応容器型検出デバイスの作製

０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の本体底部に還元剤溶液（３．２％　亜硫酸ナトリウム／１％　ポリビニルアルコール水溶液）を１μｌ添加後、減圧乾燥した。さらに、色素溶液（０．２％　ゲンチアナバイオレットＢのエタノール溶液）１μｌを、試薬保持部に添加後、減圧乾燥した。次に、溶融したパラフィンワックス（融点７０℃～８０℃）を滴下し、冷却固化することで、パラフィンコートを施した反応容器を作製した。

[0155] （ｉｉ）ＬＡＭＰ法増幅産物の検出

上記工程（ｉ）で作製した反応容器を使用して、実施例１の工程（ｉｉｉ）と同様の方法でＬＡＭＰ法反応液（ポジティブコントロール、ネガティブコントロール）を作製した。その後、それぞれのサンプルを６５℃で１時間反応後、さらに８５℃で２０分反応した。なお、この６５℃と８５℃の処理は同一の装置を用いてプログラミングにより自動で行った。反応後の反応溶液の着色を観察したところ、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示しており、ＬＡＭＰ法による核酸増幅の有無を蓋の開閉をすることなく、容易に目視で確認することが可能であった。

[0156] （実施例６）

（ｉ）核酸検出試薬を保持したプレートシールの作製

９６ウェルＰＣＲプレート用のプレートシール（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）の各ウェルの中心部に相当する位置に、還元剤溶液（３．２％　亜硫酸ナトリウム／１％　ポリビニルアルコール水溶液）を各１μｌ添加後、減圧乾燥した。さらに、色素溶液（０．２％　ゲンチアナバイオレットＢのエタノール溶液）を各１μｌ添加後、減圧乾燥した。

[0157] （ｉｉ）ＰＣＲ増幅産物の検出

９６ウェルＰＣＲプレートと上記工程（ｉ）のプレートシールを利用したこ

と以外、実施例１の工程（ｉｉ）と同様の方法で、ＰＣＲ反応液を調製した。

[0158] ＰＣＲ反応後のプレートを転倒混和し、反応溶液にて蓋部の検出試薬を溶解後、反応溶液の色調を目視にて確認した。その結果、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示し、反応容器の蓋を開閉することなく核酸増幅の有無を確認することが可能であった。

[0159] （実施例７）

（ｉ）一時遮蔽タイプの試薬保持部をもった反応容器型検出デバイスの作製（ＰＣＲ試薬）

０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の反応容器底部に実施例１の工程（ｉ）で用いたＰＣＲ用の試薬（鋳型のｐＵＣ１９を除く）を添加し、減圧乾燥した。次に、溶融したパラフィンワックス（融点７０℃～８０℃）を滴下し、冷却固化することで、乾燥ＰＣＲ試薬をパラフィンコートでカバーを施した反応容器を作製した。またその蓋部に還元剤溶液（３．２％　亜硫酸ナトリウム／１％　ポリビニルアルコール水溶液）を１μｌ添加後、減圧乾燥した。さらに、その上に色素溶液（０．２％　ゲンチアナバイオレットＢのエタノール溶液）１μｌを添加後、減圧乾燥した。次に、溶融したパラフィンワックス（融点７０℃～８０℃）をその上に滴下し、冷却固化することで、蓋部の検出試薬にパラフィンコートを施した反応容器を作製した。結果、反応容器にはパラフィンコート済みのＰＣＲ試薬、蓋部にはパラフィンコート済みの検出試薬を保持させた検出デバイスを作製した。

[0160] （ｉｉ）ＰＣＲ増幅産物の検出

上記工程（ｉ）で作製した反応容器にｐＵＣ１９を含む５０μｌの水溶液を添加し、実施例１の工程（ｉｉ）と同様方法で増幅反応を実施した。ＰＣＲ反応後の容器を転倒混和し、反応溶液にて蓋部の検出試薬を溶解後、反応溶液の色調を目視にて確認した。その結果、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示し、反応容器の

蓋を開閉することなく核酸増幅の有無を確認することが可能であった。

[0161] （実施例８）市販チューブを用いた蓋型検出デバイスの作製

（ｉ）０．２ｍｌの蓋部が丸みを帯びたＰＣＲチューブドームキャップ（ワトソン社製）の蓋部の底に還元剤溶液（３．２％　亜硫酸ナトリウム／１％　ポリビニルアルコール水溶液）を１μｌ添加後、減圧乾燥した。さらに、色素溶液（０．２％　ゲンチアナバイオレットＢのエタノール溶液）１μｌを、試薬保持部に添加後、減圧乾燥した。次に、溶融したパラフィンワックス（融点７０℃～８０℃）を滴下し、冷却固化することで、パラフィンコートを施した反応容器を作製した。

[0162] （ｉｉ）ＬＡＭＰ法増幅産物の検出

上記工程（ｉ）で作製した反応容器を使用して、実施例１の工程（ｉｉｉ）と同様方法でＬＡＭＰ法反応液（ポジティブコントロール、ネガティブコントロール）を作製した。その後、それぞれのサンプルを６５℃で１時間反応後、さらに８５℃で２０分反応した。なお、この６５℃と８５℃の処理は同一の装置を用いてプログラミングにより自動で行った。反応後の反応溶液の着色を観察したところ、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示しており、ＬＡＭＰ法による核酸増幅の有無を蓋の開閉をすることなく、容易に目視で確認することが可能であった。

[0163] （実施例９）

（ｉ）一時遮蔽タイプの試薬保持部をもった反応容器型検出デバイスの作製

８連のＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の蓋部に核酸検出試薬（０．０６８％　ゲンチアナバイオレットＢ／０．４％　亜硫酸ナトリウム／０．２４％　ベータシクロデキストリン／１．２％　ポリビニルアルコール（重合度５００）／１．２％　クラスターデキストリン／２０％　エタノール）を５μｌ添加後、減圧乾燥した。

[0164] （ｉｉ）ＬＡＭＰ法増幅産物の検出

上記工程（ｉ）で作製した反応容器を使用して、実施例１の工程（ｉｉｉ）

と同様方法でＬＡＭＰ法反応液（ポジティブコントロール、ネガティブコントロール）を作製した。その後、それぞれのサンプルを６５℃で１時間反応後、さらに８５℃で２０分反応した。なお、この６５℃と８５℃の処理は同一の装置を用いてプログラミングにより自動で行った。反応後の反応溶液の着色を観察したところ、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示しており、ＬＡＭＰ法による核酸増幅の有無を蓋の開閉をすることなく、容易に目視で確認することが可能であった。

[0165] （実施例１０）

（ｉ）一時遮蔽タイプの試薬保持部をもった反応容器型検出デバイスの作製

８連のＰＣＲ用チューブの蓋（アイビス社製）に核酸検出試薬（０．１％ゲンチアナバイオレットＢ／２％　亜硫酸ナトリウム／１．２％　ベータシクロデキストリン／４０％　エタノール）を１μｌ添加後、減圧乾燥した。次に、２％のポリビニルアルコール（重合度１０００）の４０％エタノール溶液をその上に滴下し、減圧乾燥することで、蓋部の検出試薬にポリビニルアルコールコートを施した反応容器を作製した。

[0166] ８連のＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の反応容器底部に実施例１の工程（ｉｉｉ）で用いたＬＡＭＰ用のマスターＭｉｘ（Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘ．ＳａｌとＢｓｔ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを容量比で２０：１の割合で混合したもの）を添加し、減圧乾燥した。結果、反応容器にはＬＡＭＰ試薬、蓋部にはポリビニルアルコールコート済みの検出試薬を保持させた８連型の検出デバイスを作製した。

[0167] （ｉｉ）ＬＡＭＰ法増幅産物の検出

上記工程（ｉ）で作製した反応容器を使用して、実施例１の工程（ｉｉｉ）と同様方法でＬＡＭＰ法反応液（ポジティブコントロール、ネガティブコントロール）を作製した。その後、それぞれのサンプルを６５℃で１時間反応後、さらに８５℃で２０分反応した。なお、この６５℃と８５℃の処理は同一の装置を用いてプログラミングにより自動で行った。反応後の反応溶液の

着色を観察したところ、ネガティブコントロールは無色であったのに対し、ポジティブコントロールは青色の呈色を示しており、ＬＡＭＰ法による核酸増幅の有無を蓋の開閉をすることなく、容易に目視で確認することが可能であった。

[0168]（実施例１１）

ＬＡＭＰ法の検出

「Ｌｏｏｐａｍｐ　ＤＮＡ増幅試薬キット」（栄研化学社製）を使用し、添付のプロトコールを一部改変して、次の通りＬＡＭＰ法による核酸増幅反応液を調製した。０．２ｍｌのマイクロチューブに、１２．５μｌのＲｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘ、２．５μｌのＰｒｉｍｅｒ　Ｍｉｘ、１μｌのＢｓｔ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ、６μｌの蒸留水、および１μｌの核酸検出試薬（０．１％ゲンチアナバイオレットＢ、２．１％亜硫酸ナトリウム、１．５％βシクロデキストリン）を加えた。さらに、陽性コントロールとして２μｌのＰｏｓｉｔｉｖｅ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　ＤＮＡを、陰性コントロールとして２μｌの蒸留水を添加して全量を２５μｌとした。反応液をボルテックスにより良く混合し、スピンダウンを行った。マイクロチューブを６３℃で６０分インキュベートし増幅反応を行った後、８０℃で５分間インキュベートし反応を停止した。

[0169] 増幅反応後の溶液の色調を目視にて確認した結果、陰性コントロールはほぼ無色であったのに対し、陽性コントロールは青色の呈色を示した。このことから、本検出試薬はＬＡＭＰ法の反応時に、反応液中に共存しても反応を大きく阻害することなく、反応終了後の溶液を観察するだけで核酸増幅の有無を判別可能であることが確認できた。

[0170]（実施例１２）

ピロホスファターゼを添加したＬＡＭＰ法の検出

ピロホスファターゼにより増幅反応の副生成物であるピロリン酸の生成を抑えた核酸増幅反応として、実施例１１のＲｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘの替わりに「Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ」（ＯｐｔｉＧｅｎｅ社

製）を使用してＬＡＭＰ法の反応液を調製した。陽性コントロール、陰性コントロールを６３℃で３０分インキュベートし増幅反応を行った後、８０℃で５分間インキュベートし反応を停止した。

[0171] 増幅反応後の溶液の色調を目視にて確認した結果、陰性コントロールはほぼ無色であったのに対し、陽性コントロールは青色の呈色を示した。また、ピロホスファターゼによりピロリン酸を分解することで反応性が向上し、着色に要する時間を短縮することが可能であった。

[0172] （実施例１３）

蓋型検出デバイスの作製とＬＡＭＰ反応の検出

回転ヤスリを使用して、０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の蓋部の内側に直径０．５ｍｍの窪みを作製し、試薬保持部とした。試薬保持部に検出試薬（０．１％ゲンチアナバイオレットＢ、２．１％亜硫酸ナトリウム、１．５％βシクロデキストリン）を１μｌ添加後、減圧下乾燥することで、核酸検出試薬を保持した反応容器とした。

[0173] この反応容器を使用して、検出試薬を添加する以外は実施例１１と同様の方法でＬＡＭＰ反応溶液を調製した。反応容器を転倒混和することで、反応液と試薬保持部に保持した検出試薬を接触させて、完全に溶解した。スピンダウンを行った後、反応容器を６３℃で６０分インキュベートし増幅反応を行った後、８０℃で５分間インキュベートし反応を停止した。

[0174] 増幅反応後の溶液の色調を目視にて確認した結果、陰性コントロールはほぼ無色であったのに対し、陽性コントロールは青色の呈色を示した。

[0175] （実施例１４）

（ｉ）蓋型検出デバイスの作製

ＬＡＭＰ法の反応試薬（１４ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、４μＭ　ＦＩＰ、４μＭ　ＢＩＰ、０．５μＭ　Ｆ３、０．５μＭ　Ｂ３、４０Ｕ　Ｂｓｔ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ）を調製した。調製した反応試薬を０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブ（アイビス社製）の本体部に１０μｌずつ分注した。同じチューブの蓋部の内側に検出試薬（０．１％ゲンチアナバイオレットＢ、２．１

％亜硫酸ナトリウム、１．５％βシクロデキストリン、０．１５％アスコルビン酸）を１μｌずつ分注した。分注した反応試薬と検出試薬を減圧下乾燥することで、ＬＡＭＰ反応試薬と検出試薬を保持した反応容器とした。

[0176] （ｉｉ）反応容器型検出デバイスの作製

上記工程（ｉ）の反応試薬と検出試薬を予め混合した溶液１０μｌを、ＰＣＲ用チューブの本体部に分注し、減圧下乾燥することでＬＡＭＰ反応試薬と検出試薬を保持した反応容器とした。

[0177] （ｉｉｉ）ＬＡＭＰ法の検出

上記工程（ｉ）～（ｉｉ）で作製した反応容器内に、緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ　８．８）、１０ｍＭ　塩化カリウム、１０ｍＭ　硫酸アンモニウム、８ｍＭ　硫酸マグネシウム、０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０）を加えることでＬＡＭＰ反応溶液とし、Ｍ１３ｍｐ１８ＤＮＡを１００コピー／チューブとなるように加えた物を陽性コントロール、添加していないものを陰性コントロールとした。反応溶液を転倒混和することで良く混合し、スピンダウンした後、６３℃で６０分間ＬＡＭＰ反応を行った。

[0178] いずれの反応容器を用いた場合にも、陽性コントロールのみが着色し、標的の遺伝子を検出することが可能であった。

[0179] （実施例１５）

ＬＡＭＰ反応による吸光度の経時的変化（リアルタイム測定）

反応容器として石英セル（光路長１ｃｍ）を用い、以下の通りＬＡＭＰ反応液を調製した。５０μｌのＲｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘ、１０μｌのＰｒｉｍｅｒ　Ｍｉｘ、４μｌのＢｓｔ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ、１μｌのピロホスファターゼ、３０μｌの蒸留水、および４μｌの核酸検出試薬（０．１％ゲンチアナバイオレットＢ、２．１％亜硫酸ナトリウム、１．５％βシクロデキストリン）を石英セルに加え良く撹拌した。さらに、陽性コントロールとして１μｌのＰｏｓｉｔｉｖｅ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　ＤＮＡを、陰性コントロールとして１μｌの蒸留水を添加して全量を１００μｌとした。石英セルを６３℃で６０分加温し、この間、経時的に５９０ｎｍの吸光度を測

定した。また、バックグラウンド値として、蒸留水に検出試薬のみを添加して同様の測定を行った。

[0180] 図１４にバックグランド値を差し引いたそれぞれの結果を示す。その結果、陰性コントロールでは吸光度に変化が見られなかったが、陽性コントロールでは約１０分より吸光度の上昇が見られ、約２５分でプラトーに達した。以上の結果から、本検出試薬の吸光度を経時的に観察することにより、ＬＡＭＰ反応による核酸増幅をモニタリングできることが明らかとなった。

符号の説明

[0181] １　底部

２　胴部

３　開口部

４　検出試薬保持部

５　壁部

請求の範囲

［請求項1］ 核酸と検出試薬とを閉鎖系内で接触させる工程、および
核酸および／または検出試薬の呈色を可視光で判定する工程を含む、核酸の検出方法。

［請求項2］ さらに、前記接触工程の前または後に、核酸を増幅する工程を含む、請求項１に記載の核酸の検出方法。

［請求項3］ 検出試薬が固体である、請求項１または２に記載の核酸の検出方法。

［請求項4］ 検出試薬がロイコ型色素を含む、請求項１～３のいずれかに記載の核酸の検出方法。

［請求項5］ ロイコ型色素がトリアリールメタン系色素である、請求項４に記載の核酸の検出方法。

［請求項6］ トリアリールメタン系色素が、クリスタルバイオレットまたはゲンチアナバイオレットである、請求項５に記載の核酸の検出方法。

［請求項7］ 検出試薬が求核剤および／または安定化剤を含有する、請求項４～６のいずれかに記載の核酸の検出方法。

［請求項8］ 求核剤が、水素化ホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、アスコルビン酸、２－メルカプトエタノール、ＤＬ－ジチオスレイトール、１－チオグリセロール、システイン、トリブチルホスフィン、アミノエタンチオール、およびトリス２－カルボキシエチルホスフィンからなる群から選ばれる１以上の求核剤である、請求項７に記載の核酸の検出方法。

［請求項9］ 安定化剤が、αシクロデキストリン、βシクロデキストリン、γシクロデキストリン、およびアスコルビン酸からなる群から選ばれる１以上の安定化剤である、請求項７に記載の核酸の検出方法。

［請求項10］ 核酸の増幅がＬＡＭＰ法により行われる、請求項２に記載の核酸の検出方法。

［請求項11］ ＬＡＭＰ法においてピロリン酸除去酵素を使用する、請求項１０に記載の核酸の検出方法。

［請求項12］ ピロリン酸除去酵素が耐熱性のピロホスファターゼである、請求項１１に記載の核酸の検出方法。

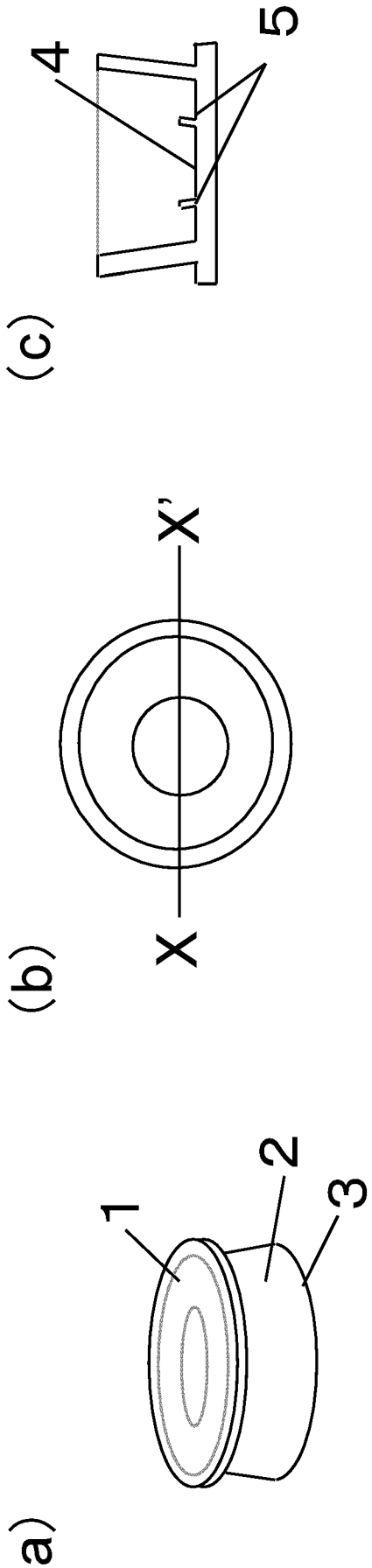
［請求項13］ 検出試薬を保持する検出試薬保持部、および、前記検出試薬保持部を備えた蓋部および／または反応容器を有する、核酸の検出用デバイスまたはキット。

［請求項14］ さらに、蓋部および／または反応容器が核酸増幅試薬を保持する、請求項１３に記載の核酸の検出用デバイスまたはキット。

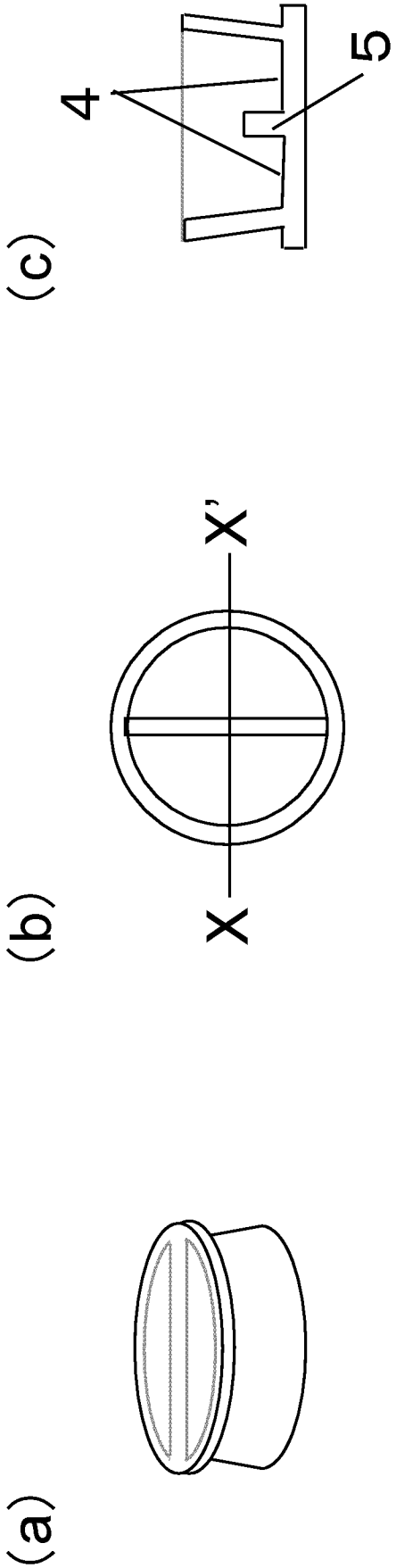
［請求項15］ 検出試薬がコーティング材で核酸から遮蔽されている、請求項１３または１４に記載の核酸の検出用デバイスまたはキット。

［請求項16］ 請求項１３～１５のいずれかに記載の核酸の検出用デバイスまたはキットを有する装置。

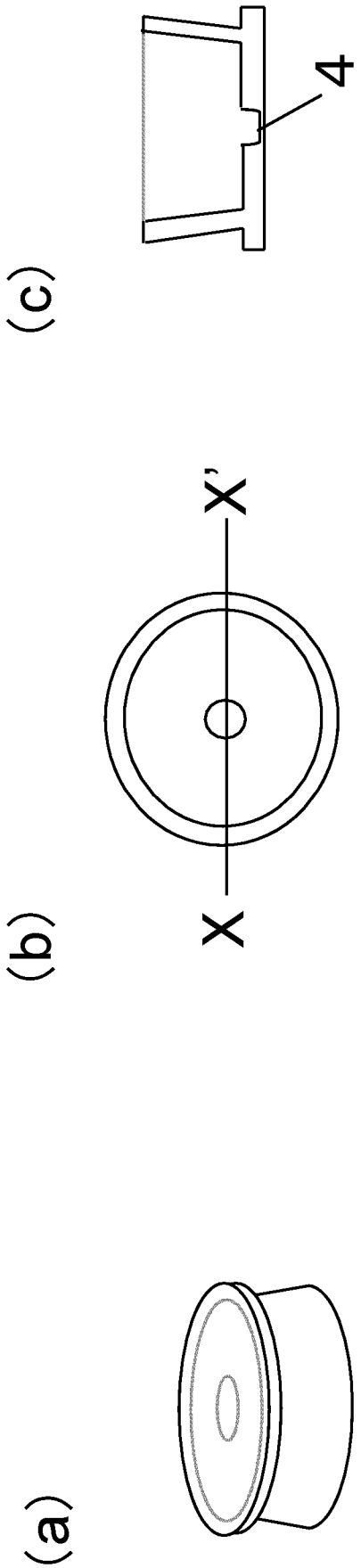
[図1]



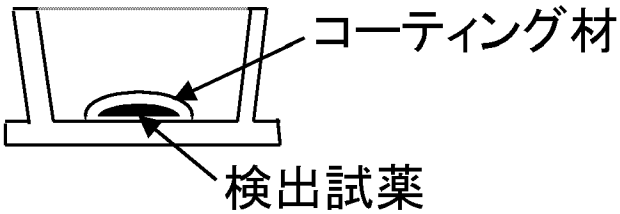
[図2]



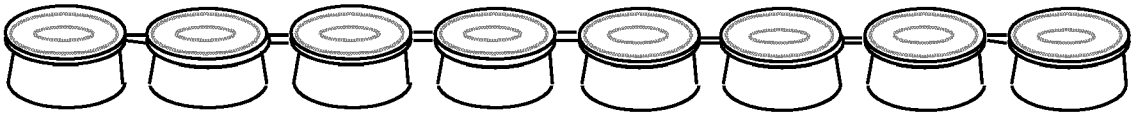
[図3]



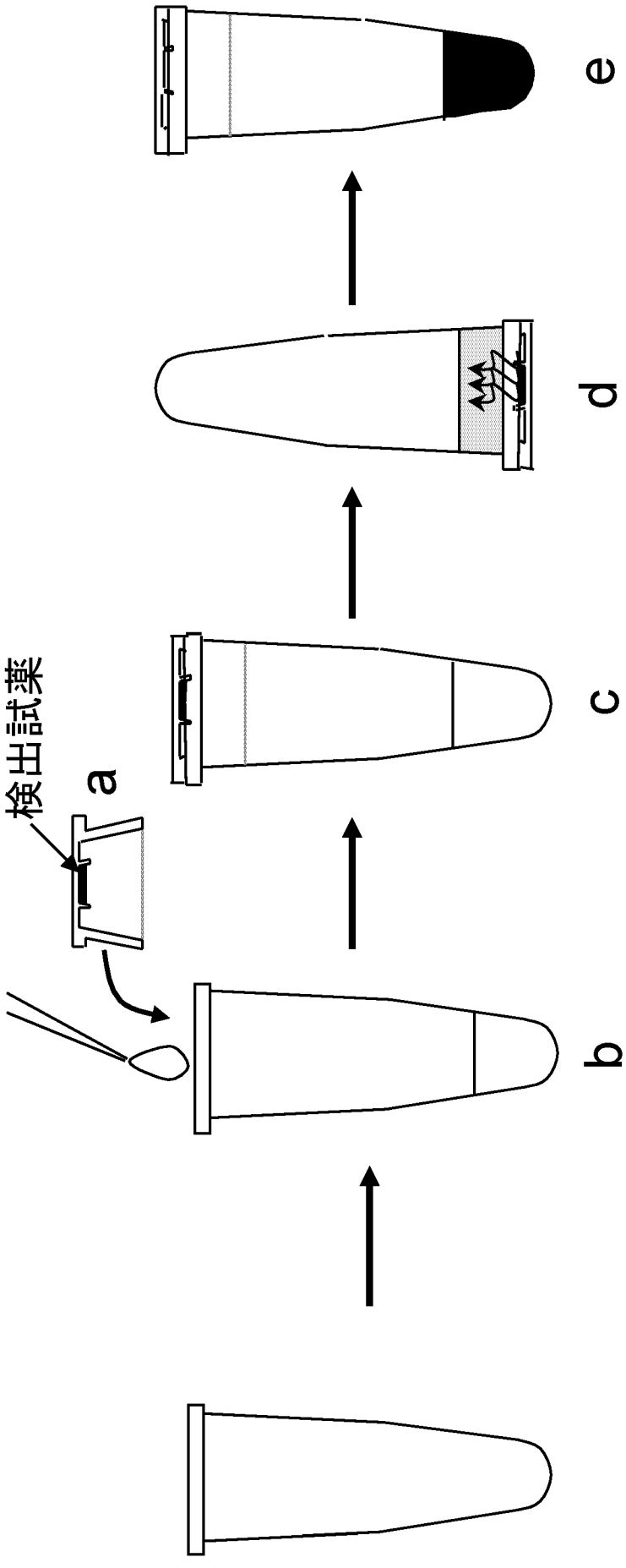
[図4]



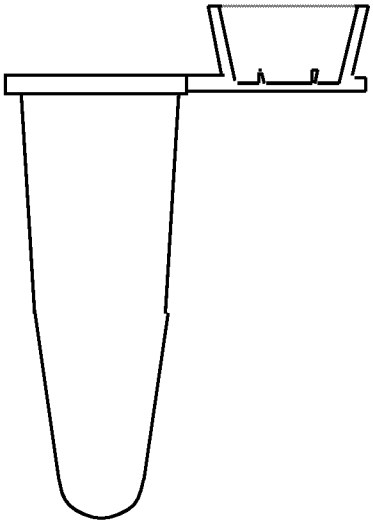
[図5]



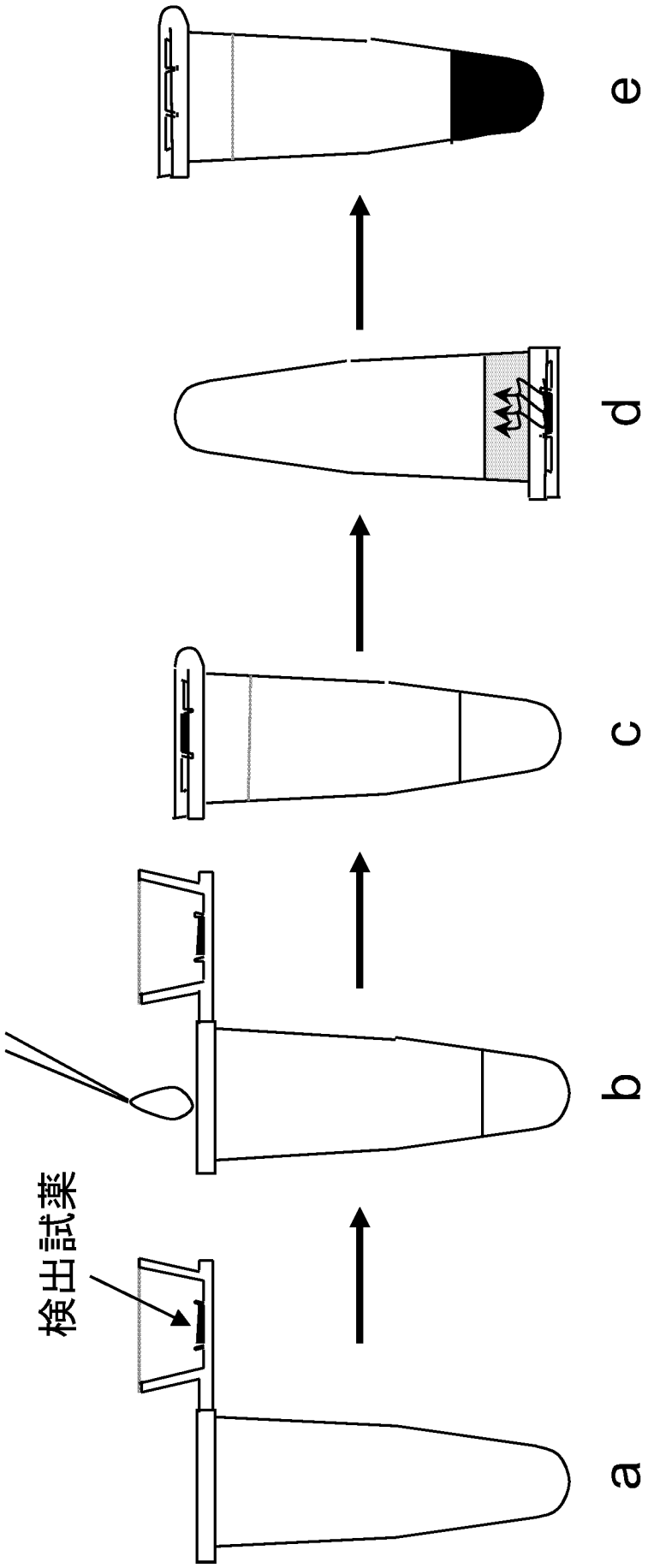
[図6]



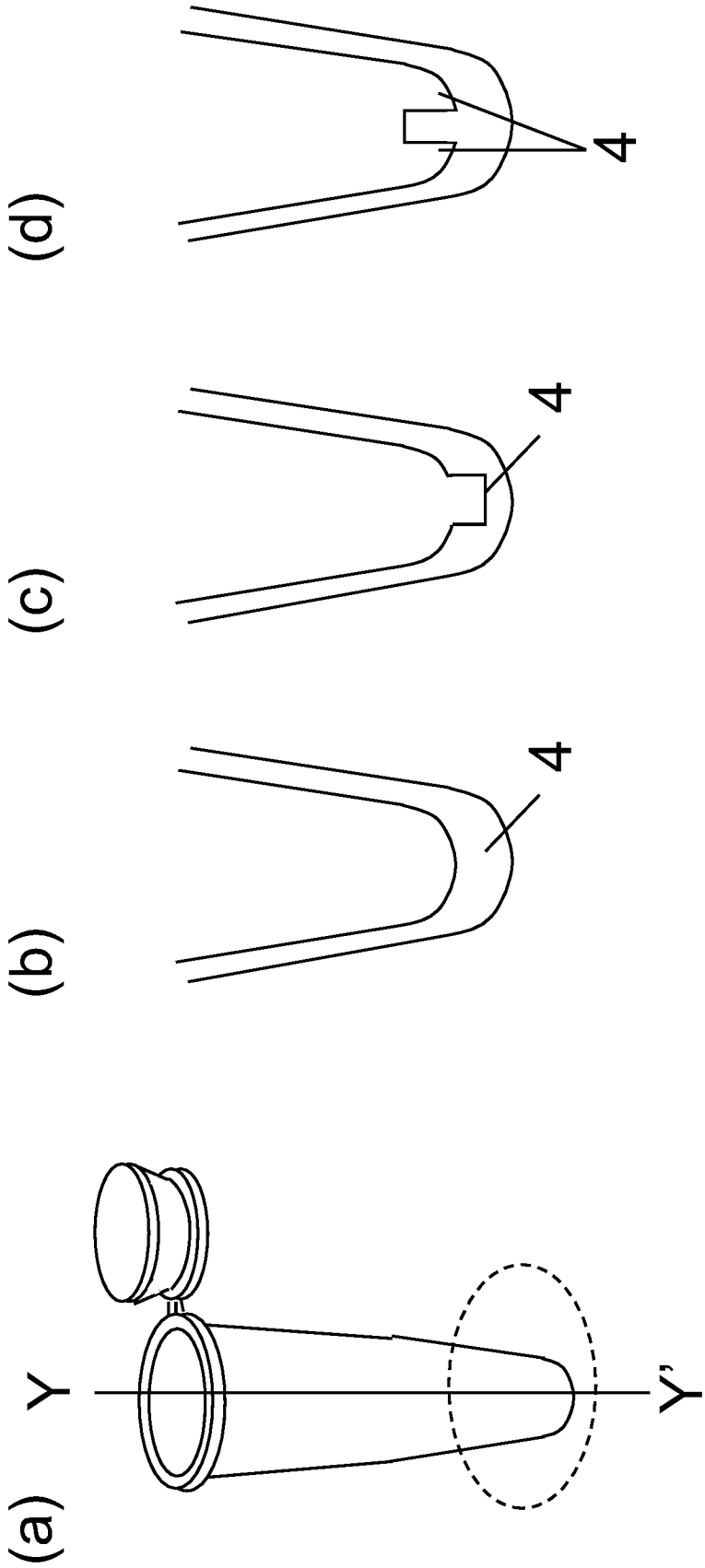
[図7]



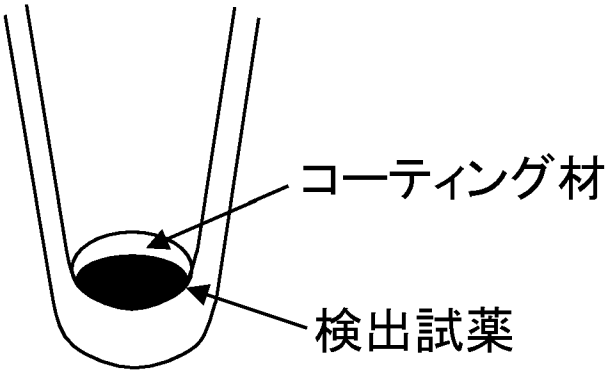
[図8]



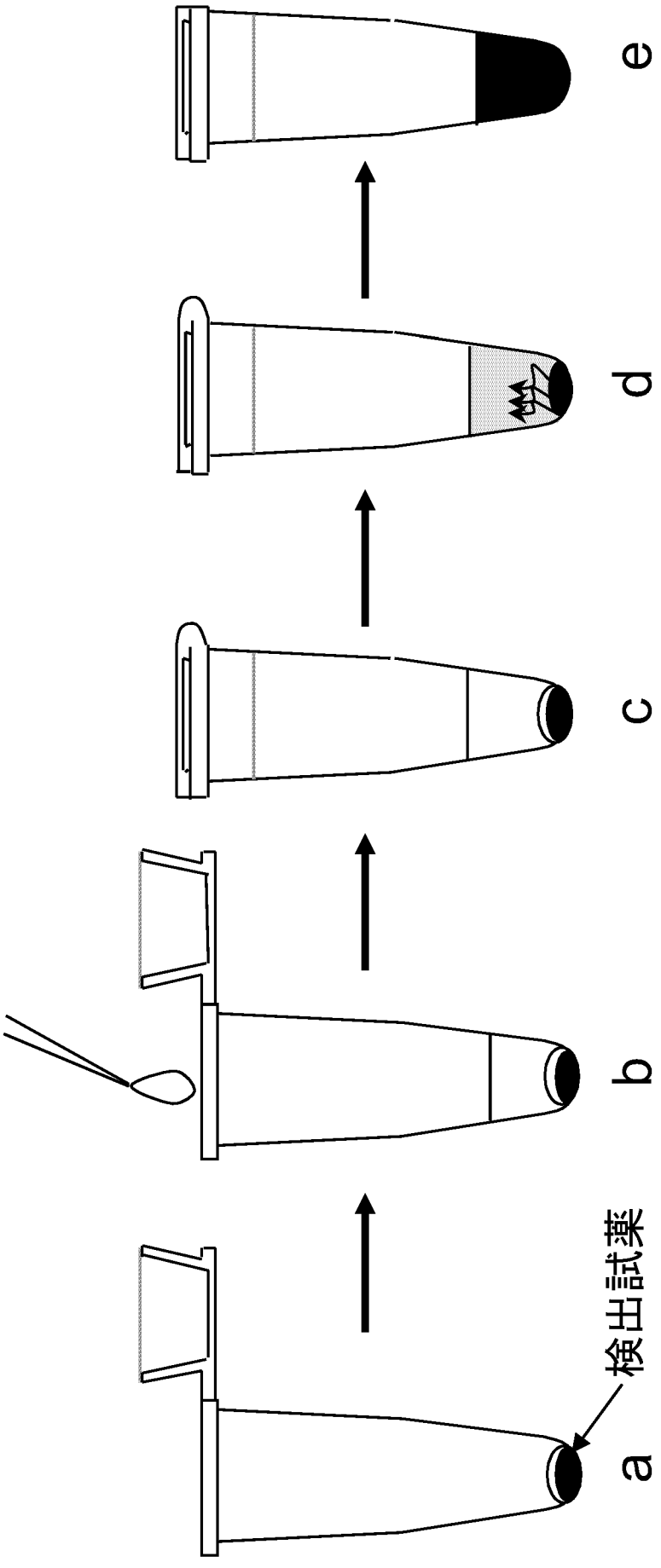
[図9]



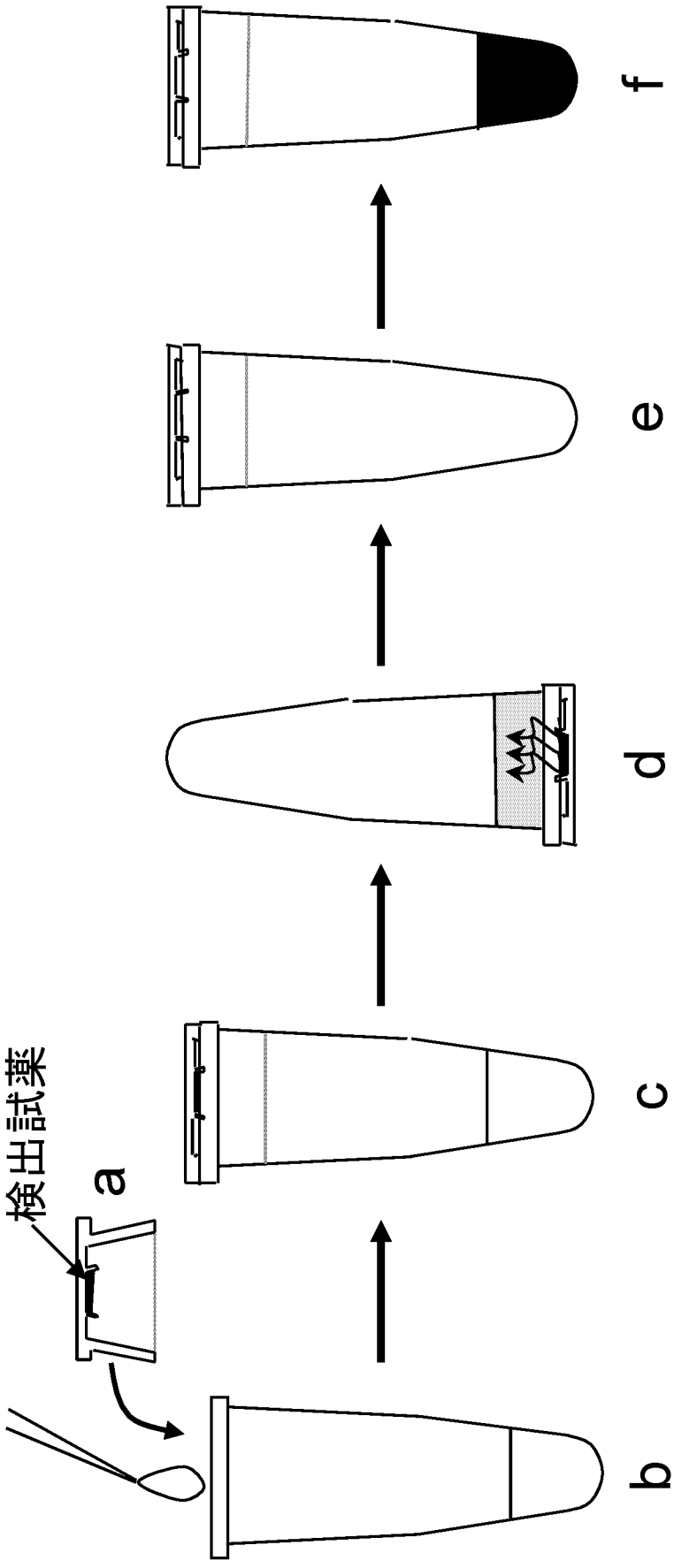
[図10]



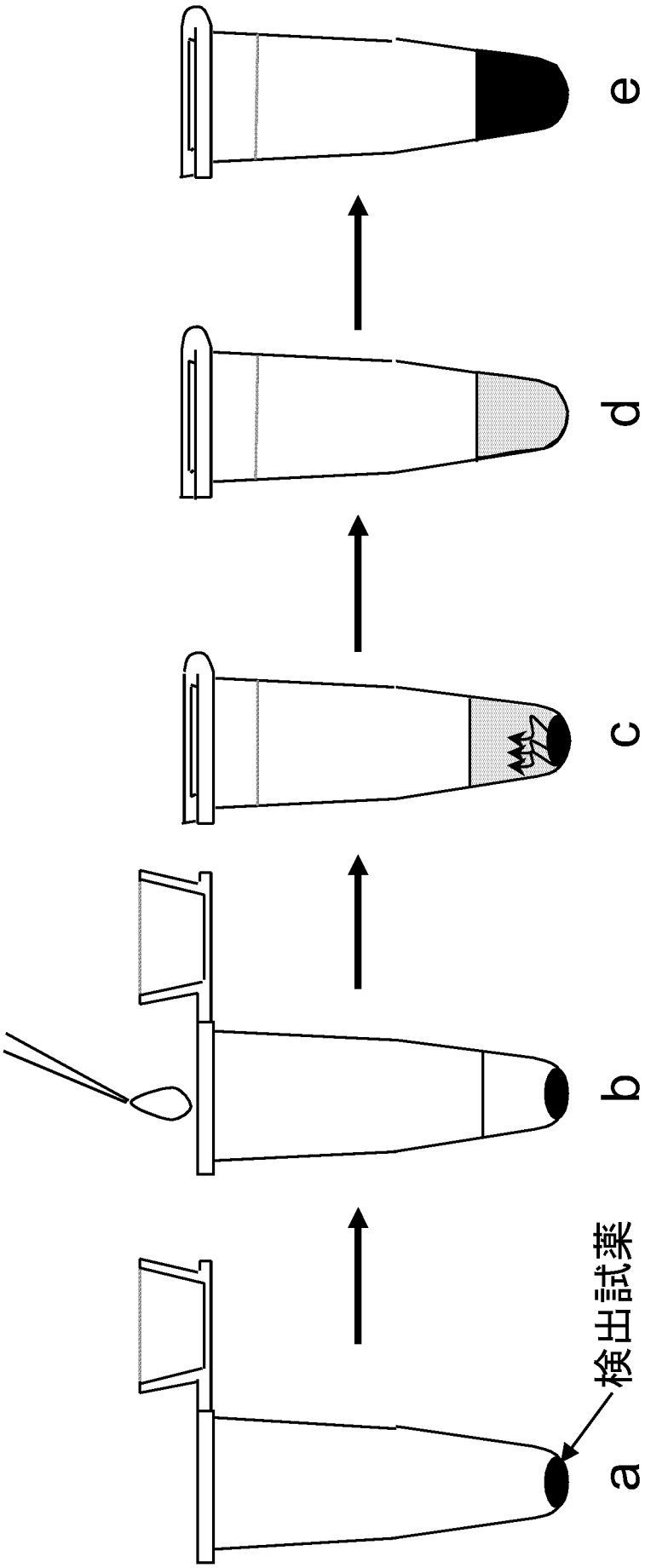
[図11]



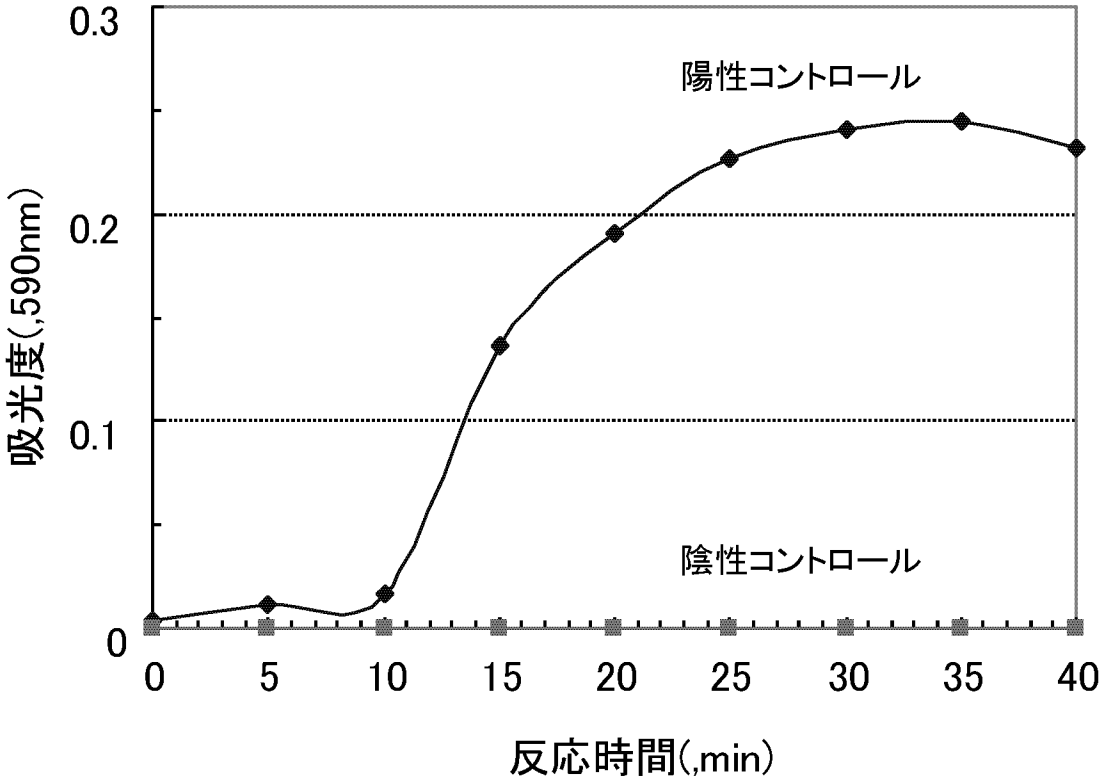
[図12]



[図13]



[図14]


0.3
0.2
0.1
0
吸光度(,590nm)
陽性コントロール
陰性コントロール
0
5
10
15
20
25
30
35
40
反応時間(,min)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/055601

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01)i, *C12M1/34*(2006.01)i, *G01N33/50*(2006.01)i, *C12N15/09*(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)
C12Q1/68, C12M1/34, G01N33/50, C12N15/09

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Loopamp Tanjun Herpes Virus (HSV-1/2) Kenshutsu Shiyaku Kit, Manual, Eiken Chemical Co., Ltd., 2010, entire text	1-3,10,13,14 /1-16
Y	WO 2010/106997 A1 (Kaneka Corp.), 23 September 2010 (23.09.2010), entire text & US 2011/0117549 A1 & CA 2745766 A	1-16
Y	OptiGene-sha Toon Zofuku Keiko Sokutei Sochi GenieII Jizen Yoyaku Campaign, Catalog, Nippon Gene Co., Ltd., 2010, entire text	11,12
X/Y	JP 2009-201458 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 10 September 2009 (10.09.2009), entire text (Family: none)	13-15/13-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 April, 2012 (24.04.12)	15 May, 2012 (15.05.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０５５６０１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(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.　C12Q1/68, C12M1/34, G01N33/50, 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

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(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(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	Loopamp 単純ヘルペスウイルス(HSV-1/2)検出試薬キット，マニュアル，栄研化学株式会社，2010，全文	1-3,10,13,14/1-16
Y	WO 2010/106997 A1 (株式会社カネカ) 2010.09.23，全文 & US 2011/0117549 A1 & CA 2745766 A	1-16
Y	OptiGene 社 等温増幅蛍光測定装置 GenieII 事前予約キャンペーン，カタログ，株式会社ニッポン・ジーン，2010，全文	11,12

☑　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	国際調査報告の発送日
２４．０４．２０１２	１５．０５．２０１２

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｎ　３５３４
柴原　直司
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

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	JP 2009-201458 A (栄研化学株式会社) 2009.09.10, 全文 (ファミリーなし)	13-15/13-16