

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年9月22日(22.09.2016)



(10) 国際公開番号

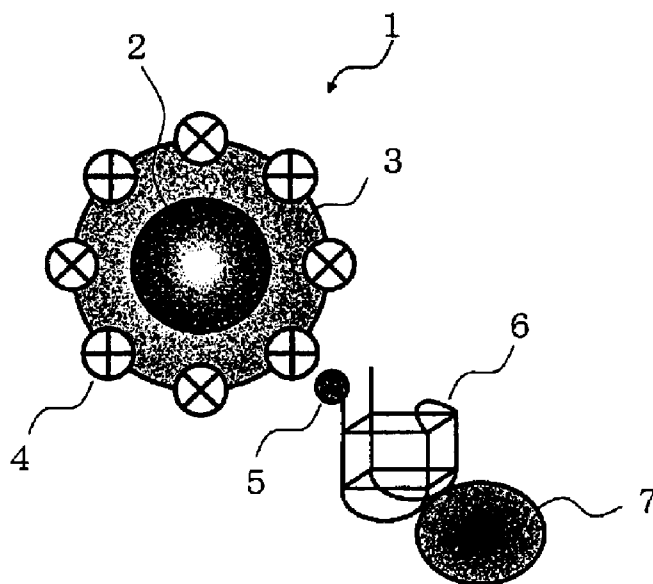
WO 2016/148090 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/057870
- (22) 国際出願日: 2016年3月11日(11.03.2016)
- (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 2015-051077 2015年3月13日(13.03.2015) JP
- (71) 出願人: 静岡県公立大学法人(SHIZUOKA PREFECTURAL UNIVERSITIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒4228021 静岡県静岡市駿河区小鹿二丁目2番1号 Shizuoka (JP). JNC株式会社(JNC CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008105 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 関川 貴寛(SEKIKAWA Takahiro); 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田5-2-1 静岡県立大学内 Shizuoka (JP). 謝 小毛(XIE Xiaomao); 〒2908551 千葉県市原市五井海岸5番地の1 JNC石油化学株式会社 市原研究所内 Chiba (JP). 大西 徳幸(OONISHI Noriyuki); 〒2908551 千葉県市原市五井海岸5番地の1 JNC石油化学株式会社 市原研究所内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人栄光特許事務所(EIKOH PATENT FIRM, P.C.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目7番13号 虎ノ門イーストビルディング10階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (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).

[続葉有]

(54) Title: GENE EXAMINATION METHOD USING STIMULATION-RESPONSIVE MAGNETIC NANOPARTICLES

(54) 発明の名称: 刺激応答性磁性ナノ粒子を用いた遺伝子検査方法



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for easily examining genes regardless of the classification of a test sample and without using a reagent that requires cautious handling. The present invention relates to a gene examination method wherein nucleic acid is collected from a test sample and nucleic acid amplification is performed. The gene examination method includes steps (1)-(4). (1) A step wherein stimulation-responsive magnetic nanoparticles and a conjugate of a target nucleic acid and of an adsorption material that includes a substance that has affinity for said nucleic acid are generated in an aqueous solution that includes a test sample, (2) a step wherein the conjugate is agglomerated under conditions under which the stimulation-responsive magnetic nanoparticles agglomerate, (3) a step wherein the agglomerated conjugate is collected by means of a magnet, and (4) a step wherein nucleic acid amplification is performed on the collected conjugate in the presence of a non-ionic surfactant.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/148090 A1



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))

本発明は、被検試料の種別を問わず、また慎重な取り扱いを有する試薬を使わずに簡便に、遺伝子検査を行う方法を提供することを課題とする。本発明は、被検試料中の核酸を回収し、核酸増幅を行う遺伝子検査方法であって、以下の工程 (1) ~ (4) を含む遺伝子検査方法に関する。(1) 刺激応答性磁性ナノ粒子及び標的の核酸に対する親和性物質を有する吸着材と前記核酸との結合体を、被検試料を含む水溶液中で生成させる工程 (2) 刺激応答性磁性ナノ粒子が凝集する条件下におき、前記結合体を凝集させる工程 (3) 凝集した結合体を磁石で回収する工程 (4) 回収した結合体を、非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行う工程

明 細 書

発明の名称： 刺激応答性磁性ナノ粒子を用いた遺伝子検査方法 技術分野

[0001] 本発明は、刺激応答性磁性ナノ粒子を用いた遺伝子検査方法に関する。

背景技術

[0002] 核酸を含む試料から核酸を精製することによって、遺伝子の解析や同定をすることは、衛生検査、臨床検査、および研究の分野において頻繁に行われている。

[0003] 例えば、種々の動物の消化管に寄生する原虫であるクリプトスポリジウムのオーシストは強い塩素耐性を示すために、しばしば水道を介した集団下痢症を引き起こしている。このことからクリプトスポリジウムは、臨床上あるいは公衆衛生学的に現在最も注目される原虫となっている。

[0004] クリプトスポリジウムの検出は、通常、顕微鏡下での目視により行われているが、かかる方法は、操作が煩雑で迅速性が低く、かつ検出率も低いため、検出に多大な労力を必要とする。

従って、近年、クリプトスポリジウムの研究にも遺伝子学的手法が用いられるようになり、種の同定や型別を比較的容易に行うことができるようになってきている。

[0005] また、近年、遺伝子工学の発展により種々の生物の遺伝子配列が解明されつつあり、これら解明された遺伝子の機能、生物学的な役割を解明することは重要である。さらに、このような遺伝子の機能解析において、生物の各組織内でいかなる遺伝子が発現されているかを知ることは極めて重要である。例えば、こうした組織内での遺伝子発現を解析する手法の一つとして、組織からmRNAを回収し、そのmRNAを解析することが行われている。

[0006] 従来、環境・生体試料等からの核酸を分離する方法として磁気ビーズ法が用いられている（特許文献1、非特許文献1、2）。磁気ビーズ法に用いられる磁性微粒子は、磁気ビーズに磁気分離能を持たせるために、粒径をマイ

クロサイズに設計した磁性微粒子（例えば、ダイナビーズ（Dyna beads）（登録商標））が用いられている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：日本国特開平9－19292号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：クリプトスポリジウム症を中心とした原虫性下痢症の診断マニュアル，平成15年度，国立感染症研究所

非特許文献2：水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について（平成24年3月2日付け健水発0302号 厚生労働省健康局水道課長通知）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] しかしながら、特許文献1に記載の磁性微粒子を用いて磁気ビーズ法を利用して核酸（DNA／RNA）の回収をした場合、核酸増幅を実施する前に、核酸と磁性微粒子とを分離することにより核酸の精製を行う必要があり、作業が煩雑となっていた。

[0010] そこで本発明は、被検試料の種別を問わず、また慎重な取り扱いを有する試薬を使わずに簡便に標的の核酸（DNA／RNA）の回収を行うことができ、且つ、得られた核酸を、その後の核酸分離または核酸精製等の煩雑な工程を必要とすることなく、そのまま逆転写反応及び／又は核酸増幅を行うことができる、新規な遺伝子検査方法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

[0011] 本発明者らは、標的の核酸に対する親和性物質が結合している刺激応答性磁性ナノ粒子を用いて核酸を回収し、非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行うことで、刺激応答性磁性ナノ粒子を含んだ状態で逆転写反応及び／又は核酸増幅試験に課すことができることを見出し、本発明を完成するに

至った。

具体的には、本発明は以下の構成を有する。

[0012] 1. 被検試料中の核酸を回収し、核酸増幅を行う遺伝子検査方法であって、以下の工程（１）～（４）を含む遺伝子検査方法。

（１）刺激応答性磁性ナノ粒子及び標的の核酸に対する親和性物質を有する吸着材と前記核酸との結合体を、被検試料を含む水溶液中で生成させる工程

（２）刺激応答性磁性ナノ粒子が凝集する条件下におき、前記結合体を凝集させる工程

（３）凝集した結合体を磁石で回収する工程

（４）回収した結合体を、非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行う工程

2. 前記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン誘導体である前記１に記載の遺伝子検査方法。

3. 前記ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート及びポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも１である前記２に記載の遺伝子検査方法。

4. 前記核酸増幅を行う工程における、前記非イオン性界面活性剤の濃度が、０．１～５質量％である、前記１～３のいずれか１に記載の遺伝子検査方法。

5. 前記核酸増幅を行う工程で使用する核酸増幅酵素が、Taqポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、又はAacポリメラーゼのいずれかであることを特徴とする、前記１～４のいずれか１に記載の遺伝子検査方法。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、被検試料の種別を問わず、また慎重な取り扱いを有する試薬を使わずに簡便に標的の核酸（DNA／RNA）の回収を行うことができる。さらに、得られた核酸を、その後の核酸分離または核酸精製等の煩雑な工程を必要とすることなく、そのまま逆転写反応及び／又は核酸増幅を行

うことができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図 1 は、本発明の一実施形態に係る方法における吸着材の概略構成図である。

[図2]図 2 は、非イオン性界面活性剤添加による、T M－A Cの濃度がP C R阻害軽減効果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の一実施形態について説明する。

本発明は、被検試料中の核酸を回収し、核酸増幅を行う遺伝子検査方法であって、以下の工程（１）～（４）を含む遺伝子検査方法である。

（１）刺激応答性磁性ナノ粒子及び標的の核酸に対する親和性物質を有する吸着材と前記核酸との結合体を、被検試料を含む水溶液中で生成させる工程

（２）刺激応答性磁性ナノ粒子が凝集する条件下におき、前記結合体を凝集させる工程

（３）凝集した結合体を磁石で回収する工程

（４）回収した結合体を、非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行う工程

[0016] 以下、各工程について説明する。

（１）刺激応答性磁性ナノ粒子及び標的の核酸に対する親和性物質を有する吸着材と前記核酸との結合体を、被検試料を含む水溶液中で生成させる工程

[0017] 本発明の遺伝子検査方法は、被検試料から核酸を回収し、当該核酸を増幅することにより、遺伝子検査を行うものである。本発明においては、まず、被検試料から核酸を回収する工程を有する。本工程は、核酸回収の第１段階として、吸着材と核酸の結合体を生成させる工程である。

[0018] （被検試料）

被検試料としては特に限定されず、例えば、動物（ヒトを含む）、植物、微生物（原虫、原生動物等も含む）等の生物を対象とすることが可能である

。また、被検試料としては、例えば、クリプトスポリジウムのようなオーシストを形成した原虫等であっても、本発明の被検試料として適用することができる。被検試料としては他にも、ウイルス、細菌、真菌等が挙げられる。

[0019] (核酸)

本発明における、「核酸」とは、DNA、RNA及びこれらの誘導体を含む概念として用いられているものである。

例えば、動物由来の被検試料からの核酸としては、血清、血漿等の血液成分からの血中遊離DNA、ウイルスDNA等のDNA、血中遊離メッセンジャーRNA、ウイルスRNA等のRNA、原虫・細菌由来のDNA、リボソームRNA、メッセンジャーRNA等が挙げられる。

[0020] (吸着材)

本発明において吸着材は、核酸を回収するために用いることができる。吸着材は、刺激応答性磁性ナノ粒子及び核酸に対する親和性物質を有し、両者が結合してなるものである。

[0021] (刺激応答性磁性ナノ粒子)

本発明においては、被検試料を含む水溶液中の核酸の回収に刺激応答性磁性ナノ粒子を使用する。刺激応答性磁性ナノ粒子を使用することによって、後述する核酸増幅の際に、核酸と刺激応答性磁性ナノ粒子とを分離することによる核酸の精製を行う必要がなく、簡易に検出対象の検出を行うことができる。

[0022] 本発明で用いられる刺激応答性磁性ナノ粒子は、刺激応答性ポリマーと磁性物質（磁性微粒子）とを用いて得られる。この刺激応答性ポリマーは、外的な刺激に応答して構造変化を起こし、凝集及び分散を調整できる磁性ナノ粒子である。刺激の種類は、特に限定されないが、温度、光、酸、塩基、pH若しくは電気等の様々な物理的、または化学的信号が挙げられる。

[0023] 特に、刺激応答性ポリマーとしては、温度変化によって凝集及び分散可能な温度応答性ポリマーが使用できる。なお、温度応答性ポリマーとしては、下限臨界溶液温度（以下、LCSTとも称する）を有するポリマーや、上限

臨界溶液温度（以下「UCST」とも称する）を有するポリマーが挙げられる。

[0024] 本発明で用いることのできる下限臨界溶液温度を有するポリマーとしては、例えば、N-*n*-プロピルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N、N-ジメチルアクリルアミド、N-アクリロイルピロリジン、N-アクリロイルピペリジン、N-アクリロイルモルホリン、N-*n*-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N、N-ジメチルメタクリルアミド、N-メタクリロイルピロリジン、N-メタクリロイルピペリジン、N-メタクリロイルモルホリン等のN置換（メタ）アクリルアミド誘導体からなるポリマー；ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール部分酢化物、ポリビニルメチルエーテル、（ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン）ブロックコポリマー、ポリオキシエチレンラウリルアミン等のポリオキシエチレンアルキルアミン誘導体；ポリオキシエチレンソルビタンラウレート等のポリオキシエチレンソルビタンエステル誘導体；（ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル）アクリレート、（ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル）メタクリレート等の（ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル）（メタ）アクリレート類；及び（ポリオキシエチレンラウリルエーテル）アクリレート、（ポリオキシエチレンオレイルエーテル）メタクリレート等の（ポリオキシエチレンアルキルエーテル）（メタ）アクリレート類等のポリオキシエチレン（メタ）アクリル酸エステル誘導体等が挙げられる。更に、例えば、これらのポリマー及びこれらの少なくとも2種のモノマーからなるコポリマーが挙げられる。また、例えば、N-イソプロピルアクリルアミドとN-*t*-ブチルアクリルアミドのコポリマーが挙げられる。

[0025] （メタ）アクリルアミド誘導体を含むポリマーを使用する場合、このポリマーにその他の共重合可能なモノマーを、下限臨界溶液温度を有する範囲で共重合してもよい。本発明では、なかでも、N-*n*-プロピルアクリルアミ

ド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N、N-ジメチルアクリルアミド、N-アクリロイルピロリジン、N-アクリロイルピペリジン、N-アクリロイルモルホリン、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N、N-ジメチルメタクリルアミド、N-メタクリロイルピロリジン、N-メタクリロイルピペリジン、N-メタクリロイルモルホリンからなる群から選ばれる少なくとも1種のモノマーからなるポリマー又はN-イソプロピルアクリルアミドとN-t-ブチルアクリルアミドのコポリマーが好ましく利用できる。

[0026] 本発明で用いることのできる上限臨界溶液温度を有するポリマーとしては、例えば、アクロイルグリシンアミド、アクロイルニペコタミド、アクリロイルアスパラギンアミド及びアクリロイルグルタミンアミド等からなる群から選ばれる少なくとも1種のモノマーからなるポリマーが挙げられる。また、これらの少なくとも2種のモノマーからなるコポリマーであってもよい。これらのポリマーには、アクリルアミド、アセチルアクリルアミド、ビオチノールアクリレート、N-ビオチニル-N'-メタクロイルトリメチレンアミド、アクロイルザルコシンアミド、メタクリルザルコシンアミド、アクロイルメチルウラシル等、その他の共重合可能なモノマーを、上限臨界溶液温度を有する範囲で共重合してもよい。

[0027] また、本発明では刺激応答性ポリマーとして、pH変化によって凝集及び分散可能なpH応答性ポリマーが利用できる。

このようなpH応答性ポリマーとしては、例えば、カルボキシル、リン酸、スルホニル、アミノ等の基を官能基として含有するポリマーが挙げられる。より具体的には、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、マレイン酸、ビニルスルホン酸、ビニルベンゼンスルホン酸、ホスホリルエチル（メタ）アクリレート、アミノエチルメタクリレート、アミノプロピル（メタ）アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミドまたはこれらの塩を共重合成分として含むポリマーが挙げられる。

[0028] 磁性物質である磁性微粒子は、例えば、多価アルコールとマグネタイトとで構成される。

[0029] 多価アルコールは、構成単位に水酸基を少なくとも2個有し、且つ鉄イオンと結合可能なアルコール構造体であれば特に限定されない。例えば、デキストラン、ポリビニルアルコール、マンニトール、ソルビトール及びシクロデキストリンが挙げられる。例えば日本国特開2005-82538号公報には、デキストランを用いた微粒子状の磁性物質の製造方法が開示されている。また、グリシジルメタクリレート重合体のようにエポキシを有し、開環後多価アルコール構造体を形成する化合物も使用できる。

[0030] このような多価アルコールを用いて調製された微粒子状の磁性物質（磁性微粒子）は、良好な分散性を有するように、その平均粒径が0.9 nm以上1000 nm未満であることが好ましい。平均粒径は、特に目的とする検出対象の検出感度を高めるためには、2.9 nm以上200 nm未満であることが好ましい。また、磁性微粒子の平均粒径が前記範囲であることによって、液体中での分散性が良好となる。その結果、核酸増幅試験の際に反応液中で磁性微粒子が沈降せず適度に分散し、効率よく逆転写反応や核酸増幅試験を行うことができる。

[0031] （親和性物質）

本発明で用いられる親和性物質としては、核酸に対して結合するものであれば特に限定されるものではない。例えば、核酸、アプタマー、カチオン性官能基を有する物質（例えば、1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、4級アンモニウム基またはグアニジノ基を有する物質）、アニオン性官能基を有する物質、標的物質と相互作用する蛋白質（例えば、酵素、レセプター）、キレート剤などが挙げられる。

[0032] （刺激応答性磁性ナノ粒子と親和性物質との結合）

刺激応答性磁性ナノ粒子と親和性物質との結合方法は、特に限定されない。例えば、刺激応答性磁性ナノ粒子側（例えば刺激応答性ポリマー部分）及び親和性物質側の双方に、互いに親和性の物質（例えば、ビオチン及びスト

レプトアビジンまたはアビジン)を結合させ、これら物質を介して刺激応答性磁性ナノ粒子と親和性物質を結合させる。

[0033] 具体的には、刺激応答性ポリマーへのビオチンの結合は、国際公開第2001/009141号に記載されているように、ビオチン等をメタクリルやアクリル等の重合性官能基と結合させて付加重合性モノマーとし、他のモノマーと共重合することにより行い、そこにストレプトアビジンを固定化する。また、親和性物質へのビオチン等の標識は常法に従って行う。ビオチンで標識された親和性物質とストレプトアビジン固定化刺激応答性ポリマーとを混合すると、ビオチンとストレプトアビジンとの結合を介して、刺激応答性ポリマー及び親和性物質が結合する。

[0034] 具体的には、図1に示されるように、刺激応答性磁性ナノ粒子1は微粒子状の磁性物質2を含み、この磁性物質2の表面に刺激応答性ポリマー3が結合されている。刺激応答性ポリマー3にはストレプトアビジン4が結合しており、ビオチン5を介して検出対象7に対する親和性物質6が結合する。

[0035] なお、本明細書では、刺激応答性ポリマーと微粒子状の磁性物質とが結合した材料を刺激応答性磁性ナノ粒子と記し、その刺激が熱の場合には、熱応答性磁性ナノ粒子と記している。

[0036] 微粒子状の磁性物質と刺激応答性ポリマーとの結合は、反応性官能基を介して結合する方法や、磁性物質中の多価アルコール上の活性水素又は多価アルコールに重合性不飽和結合を導入してグラフト重合する方法等の当技術分野で周知の方法で行ってよい(例えば、ADV. Polym. Sci., Vol. 4, p111, 1965や、J. Polymer Sci., Part-A, 3, p1031, 1965参照)。

[0037] (水溶液中における吸着材と前記検出対象の結合体の生成)

上述した吸着材と核酸との結合体は、水溶液中で吸着材と核酸を任意の方法で混合させることによって、吸着材中の親和性物質と核酸が結合し、吸着材と核酸の結合体が生成する。親和性物質と核酸との結合は、特異的な結合ないし吸着を意味し、必ずしも共有結合である必要はなく、イオンの、生

学的親和性（アフィニティー）を利用した結合であってもよい。

[0038] 混合操作は、適当なバッファー中で、吸着材と核酸が接触し得るならば特に制限はない。例えば、核酸を含む被検試料及び吸着材が供されたチューブを軽く転倒攪拌または振とうさせる程度で十分であり、例えば市販のボルテックスミキサー等を用いて混合する操作等が挙げられる。

[0039] （２）刺激応答性磁性ナノ粒子が凝集する条件下におき、結合体を凝集させる工程

本工程は核酸回収の第２段階として、工程（１）において核酸と吸着材の結合体を得られた後、刺激応答性ポリマーが凝集する条件下におき、結合体を凝集させる工程である。

[0040] 刺激応答性ポリマーが凝集する条件とするには、例えば熱応答性ポリマーを用いた場合、混合物の入った容器を熱応答性ポリマーの凝集する温度の恒温槽に移せばよい。熱応答性ポリマーには、上限臨界溶液温度を有するポリマーと、下限臨界溶液温度を有するポリマーの２種類がある。

[0041] 例えば、LCSTが37℃である下限臨界溶液温度を有するポリマーを用いた場合には、混合物の入った容器を37℃以上の恒温槽に移すことで、熱応答性ポリマーを凝集させることができる。また、UCSTが5℃である上限臨界溶液温度を有するポリマーを用いた場合には、混合物の入った容器を5℃未満の恒温槽に移すことで、熱応答性ポリマーを凝集させることができる。

[0042] ここで、下限臨界溶液温度及び上限臨界溶液温度は例えば以下のように決定する。まず、試料を吸光光度計のセルに入れ、1℃／分の速度で試料を昇温する。この間、550nmにおける透過率変化を記録する。ここで、ポリマーが透明に溶解しているときの透過率を100%、完全に凝集したときの透過率を0%としたとき、透過率が50%になるときの温度をLCSTとして求める。UCSTの場合は、1℃／分の速度で試料を冷却し、以下、LCST同様の方法で求める。

[0043] また、pH応答性ポリマーを用いた場合、混合物の入った容器に酸溶液又

はアルカリ溶液を加えればよい。具体的には、pH応答性ポリマーが構造変化を起こすpH範囲の外にある分散している混合物の入った容器に、酸溶液又はアルカリ溶液を加え、容器内をpH応答性ポリマーが構造変化を起こすpH範囲に変更すればよい。例えば、pH5以下で凝集、pH5超で分散するpH応答性ポリマーを用いた場合、pH5超で分散している混合物の入った容器に、pHが5以下になるように酸溶液を加えればよい。また、pH10以上で凝集、pH10未満で分散するpH応答性ポリマーを用いた場合、pH10未満で分散している混合物の入った容器に、pHが10以上になるようにアルカリ溶液を加えればよい。pH応答性ポリマーが構造変化を起こすpHは、特に限定されないが、pH4～10が好ましく、pH5～9であることがさらに好ましい。

[0044] また、光応答性ポリマーを用いた場合、混合物の入った容器にポリマーを凝集できる波長の光を照射すればよい。凝集させるための好ましい光は、光応答性ポリマーに含まれる光応答性官能基の種類及び構造により異なるが、一般に波長190～800nmの紫外光又は可視光が好適に使用できる。このとき、強度は0.1～1000mW/cm²が好ましい。

[0045] なお、光応答性ポリマーは、測定精度を向上できる点で、濁度の測定に用いられる光が照射された際に分散を生じにくいもの、換言すれば凝集するものであることが好ましい。光応答性ポリマーとして、濁度の測定に用いられる光が照射された際に分散を生じるものを用いる場合、照射時間を短縮することで測定精度を向上できる。

[0046] (3) 凝集した結合体を磁石で回収する工程

本工程は検出対象回収の最終段階として、工程(2)で凝集した結合体を磁石で分離し、検出対象を回収する工程である。磁性粒子を含有する結合体に磁力を付加することで、凝集した結合体を混合液中から分離し、回収する。これにより、結合体が非凝集状態の磁性物質を含む夾雑物から分離され、検出対象の回収が可能となる。

[0047] 例えば、核酸と吸着材との結合を適当なチューブ内で行った場合、チュー

ブの側壁に磁石を外側から近づけることによって吸着材をチューブの側壁近傍に保持しつつ、チューブ内から上澄み部分となる液体を排出することによって、核酸が結合した吸着材を分離することができる。

[0048] 核酸が結合した吸着材の分離に用いる磁石等の磁力は、用いる磁性物質の有する磁力の大きさによって異なる。磁力は、目的の磁性物質を磁集可能な程度の磁力を適宜使用できる。磁石の素材としては、例えば、上述した磁性物質の素材で構成されたものを使用することができる。例えば、ネオジム磁石（株式会社二六製作所製）等が利用できる。ネオジム磁石の磁力は、3800 Gauss以上が好ましい。

[0049] （４）回収した結合体を、非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行う工程

本工程は、上記工程で回収された結合体中の核酸を試料として核酸増幅を行う工程である。上述したように、吸着材中の刺激応答性磁性ナノ粒子は、反応液中の刺激応答性磁性ナノ粒子の濃度が高いと、逆転写反応や核酸増幅を阻害する。そのためこれまでは逆転写反応や核酸増幅試験の前に核酸と磁性微粒子とを分離することにより核酸の精製を行う必要があった。しかしながら本発明では、非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行うことによって、刺激応答性磁性ナノ粒子による逆転写反応及び核酸増幅の阻害を軽減することができる。

[0050] 上述したように、本工程では、検出対象の検出感度の向上のため、上記工程で回収された核酸をそのまま試料として核酸増幅を行うことが可能である。核酸がRNAである場合には、逆転写反応を行いDNAとしてから核酸増幅試験を行う。逆転写反応は、上記工程（１）～（３）で得られたRNAを鋳型として、従来の公知の任意の方法を採用することができる。

[0051] また、核酸増幅の方法としては、任意の方法を使用することができ、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）、LAMP法、鎖置換増幅、逆転写酵素鎖置換増幅、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写LAMP法、核酸配列に基づく増幅、転写媒介性増幅およびローリングサークル型増幅法、

S m a r t A m p、法逆転写 S m a r t A m p 法等が挙げられる。

[0052] 通常、DNAの増幅は、PCR法により行うことが一般的である。PCRの方法としては、上記工程で得られたDNA、またはRNAの逆転写反応により得られるDNAを鋳型として、従来の公知の任意のPCR方法を採用することができる。本発明においては、PCR増幅時の核酸増幅酵素が、T a qポリメラーゼ、B s tポリメラーゼ、又はA a cポリメラーゼのいずれかである場合には、特に、好適に利用可能である。

[0053] (非イオン性界面活性剤)

本工程では、非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行うことによって、刺激応答性磁性ナノ粒子による逆転写反応や核酸増幅の阻害を軽減することができる。

[0054] 非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行うことによって、刺激応答性磁性ナノ粒子による逆転写反応や核酸増幅の阻害を軽減することができる詳細は定かではないが、刺激応答性磁性ナノ粒子表面のポリマーに非イオン性界面活性剤が作用して、ミセルを形成することによるものと推測される。

[0055] 本発明で使用できる非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン誘導体が挙げられる。ポリオキシエチレン誘導体としては、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラート (T w e e n 2 0)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート (T w e e n 8 0)、ポリオキシエチレン (1 0) オクチルフェニルエーテル (T r i t o n X - 1 0 0) 等が挙げられる。中でも、粘性が低くて扱いやすいという観点から、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラート、ポリオキシエチレン (1 0) オクチルフェニルエーテル (T r i t o n X - 1 0 0) が好ましい。

[0056] また、逆転写反応や核酸増幅を行う際には、非イオン性界面活性剤の濃度を、好ましくは0.1～5質量%、より好ましくは0.5～5質量%とするように希釈する。上記範囲であることによって、刺激応答性磁性ナノ粒子による核酸増幅阻害を軽減することができる。

[0057] また、逆転写反応や核酸増幅試験を好適に行うため、核酸試料中に残存す

る刺激応答性ナノ粒子は、好ましくは0.1～1質量%、より好ましくは0.1～0.5質量%である。上記範囲であることによって、刺激応答性磁性ナノ粒子による核酸増幅阻害を軽減することができる。

実施例

[0058] 本発明を以下の実施例等により説明するが、これらによって制限されるものではない。

但し、「%」は「質量%」を示す。

[0059] [実施例1]

(1) オーシスト回収用磁性ナノ粒子 (TM-AC) の作製

アビジンが結合している熱応答性磁性ナノ粒子 (Therma-Max LA Avidin, 4 g/L, JNC株式会社) 1 mL と C. parvum オーシストに特異的なビオチン化モノクローナル抗体 (Crypt-a-Glo biotin reagent キット (20 倍濃縮), Water borne 社) 20 μ L を混合・結合させて、オーシスト回収用磁性ナノ粒子 (Therma-Max-Anti-Cryptosporidium: TM-AC) を作製した。

[0060] (2) リアルタイムPCRの実施

TM-ACの終濃度を0.1%に調製し、DNA試料とともに、リアルタイムPCRを行った。

<DNA試料>

クリプトスポリジウムのDNA試料として、人工合成DNA (C. parvum 18S rDNA gene, 192bp) (tttta tggagggtt gtatttatta gataaagaac caata taatt ggtgactcat aataacttta cggatcacat taaatgtgac atatcattca agtttctgac ctatcagctt tagacggtag ggtattggcc taccgtggca atgacgggta acgggggaatt aggggttcgat tccggagagg gagcctga:配

列番号1)が挿入されたDNAプラスミド溶液(ユーロフィンジェノミクス社)を用いた。

[0061] <PCR条件>

PCRはクリプトスポリジウム18S rDNA遺伝子に特異的なプライマーセット forward: 5' - GGAAGGGTTGTATTTA TTAGATAAAGAACC-3' (配列番号2)、reverse: 5' - CTCCTCTCCGGAATCGAA-3 (配列番号3) (各5 μ M) 0.8 μ LとTaqManプローブ: TCTGACCZATCAGC TT (配列番号4) (1 μ M) 2.0 μ L、PCR試薬Premix EX Taq (タカラバイオ株式会社) 10 μ L、Tween 20 (Tween 20 (登録商標)、Molecular Biology Grade、Promega製)、リアルタイムPCR (LightCycler Nano, ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて行った。Tween 20は終濃度が5%となるよう調整した。陽生対照 (5×10^6 copies/mL) の添加量は2 μ L、PCRの反応液量は20 μ Lで行った。

PCR条件は「Hold; 1 cycle (95°C、30s), 2 Step PCR; 45 cycles (60°C、30s, 95°C、10s)」で行った。Ct値 (Threshold Cycle) はLightCycler Nano ソフトウェアで解析した。

[0062] [比較例1]

比較例1は、PCR時にTween 20を添加しなかったこと以外は、実施例1と同様に試験を行った。

[実施例2、比較例2]

実施例2は、TM-ACの終濃度を0.5%に調製したこと以外は、実施例1と同様に試験を行った。比較例2は、TM-ACの終濃度を0.5%に調製し、PCR時にTween 20を添加しなかったこと以外は、実施例1と同様に試験を行った。

[対照例1、対照例2]

対照例 1 は、TM-AC の終濃度を 0 % としたこと以外は、実施例 1 と同様に試験を行った。対照例 2 は、TM-AC の終濃度を 0 % とし、PCR 時に Tween 20 を添加しなかったこと以外は、実施例 1 と同様に試験を行った。

[0063] TM-AC による PCR 阻害を評価した結果を図 1（白四角：Tween 20 添加なし）に示す。縦軸の Ct 値は PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数を表している。PCR 増幅産物の量が多いほど Ct 値は小さくなり、増幅されない場合は検出されない。比較例 1 の TM-AC 添加濃度 0.1 % の Ct 値は対照例 1（TM-AC 添加 0 %）とほぼ同じであったことから、PCR が阻害されていないことがわかる。しかし、比較例 2 の TM-AC 添加 0.5 % では増幅速度が大幅に遅れ Ct 値は 25.2 となった。この結果より、PCR チューブ（反応液 20 μ L）に TM-AC を 0.1 μ L 添加した場合（TM-AC 終濃度 0.5 %）、PCR が阻害されることがわかる。

[0064] TM-AC と Tween 20（終濃度 5 %）を PCR チューブに同時に添加した結果を図 1（黒四角：Tween 20 添加あり）に示す。対照例 2 の TM-AC 添加 0 % からわかるように、5 % Tween 20 による PCR 阻害はみられなかった。実施例 2 の 0.5 % TM-AC と 5 % Tween 20 を同時添加した時の Ct 値は 21.0 であることから、Tween 20 が PCR 阻害を軽減したことがわかる。この結果より、Tween 20 を添加することによって、TM-AC 0.1 μ L を PCR チューブに直接投入（TM-AC 終濃度 0.5 %）し、阻害なく PCR を行うことができることがわかった。

[0065] 本発明は前記実施形態に限定されるものではなく、本発明の目的を達成できる範囲での変形、改良等は本発明に含まれるものである。

[0066] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお本出願は、2015 年 3 月 13 日付で出願された日本特許

出願（特願 2015-051077）に基づいており、その全体が引用により援用される。

産業上の利用可能性

[0067] 本発明の遺伝子検査方法によれば、環境・生体試料から標的の微生物、特にクリプトスポリジウムの検出を迅速かつ簡易に行うことができ、且つ、得られた核酸試料を、その後の核酸精製等の煩雑な工程を必要とすることなく、そのまま逆転写反応及び／又は核酸増幅試験に課しても悪影響を与えないため、例えば臨床検査や公衆衛生検査において有用である。

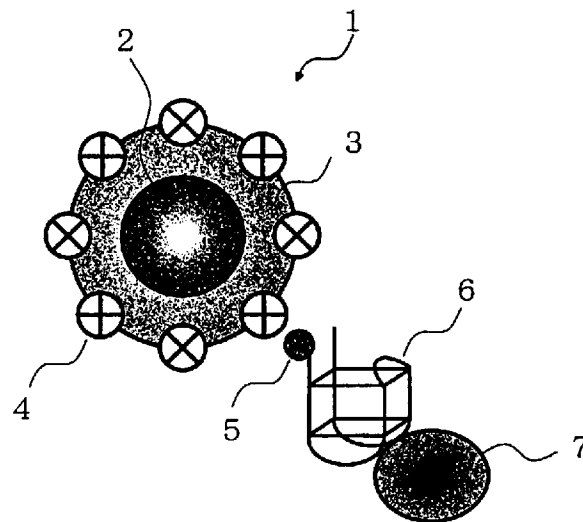
符号の説明

- [0068]
- 1 刺激応答性磁性ナノ粒子
 - 2 磁性物質
 - 3 刺激応答性ポリマー
 - 4 ストレプトアビジン
 - 5 ビオチン
 - 6 親和性物質
 - 7 検出対象

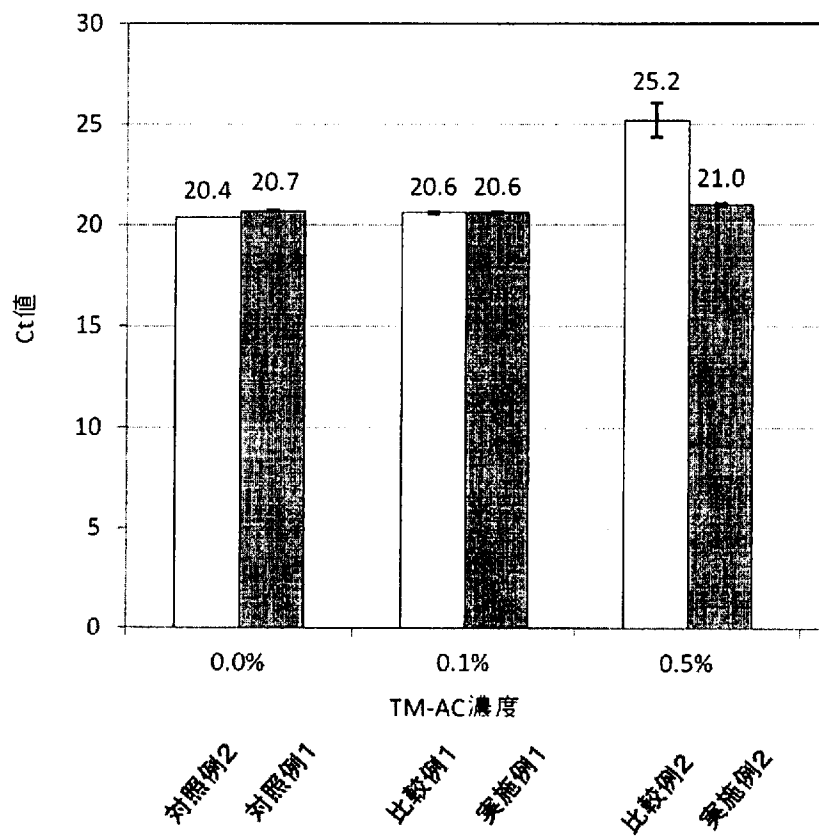
請求の範囲

- [請求項1] 被検試料中の核酸を回収し、核酸増幅を行う遺伝子検査方法であって、以下の工程（１）～（４）を含む遺伝子検査方法。
- （１）刺激応答性磁性ナノ粒子及び標的の核酸に対する親和性物質を有する吸着材と前記核酸との結合体を、被検試料を含む水溶液中で生成させる工程
- （２）刺激応答性磁性ナノ粒子が凝集する条件下におき、前記結合体を凝集させる工程
- （３）凝集した結合体を磁石で回収する工程
- （４）回収した結合体を、非イオン性界面活性剤の存在下で核酸増幅を行う工程
- [請求項2] 前記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン誘導体である請求項１に記載の遺伝子検査方法。
- [請求項3] 前記ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート及びポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルからなる群より選ばれる少なくとも１である請求項２に記載の遺伝子検査方法。
- [請求項4] 前記核酸増幅を行う工程における、前記非イオン性界面活性剤の濃度が、０．１～５質量％である、請求項１～３のいずれか１項に記載の遺伝子検査方法。
- [請求項5] 前記核酸増幅を行う工程で使用する核酸増幅酵素が、Taqポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、又はAacポリメラーゼのいずれかであることを特徴とする、請求項１～４のいずれか１項に記載の遺伝子検査方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057870

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-171853 A (Chisso Corp.), 06 August 2009 (06.08.2009), paragraph [0054]; example 2 (Family: none)	1-5
Y	KONDOH Akihiko, Development of the thermoresponsive magnetic nanoparticle and its deployment in the biotechnology field, Nanoparticle Technology Handbook, 2nd Edition, ISBN 978-0-444-56336-1, 2012, p.531-538, particularly, page 532, left column, 3rd line from the bottom to right column, line 4, page 535, right column, lines 3 to 14	1-5

☒ 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
30 May 2016 (30.05.16)

Date of mailing of the international search report
07 June 2016 (07.06.16)

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/JP2016/057870

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-516468 A (Life Technologies, Inc.), 12 December 2000 (12.12.2000), claims; page 23, 1st paragraph; examples 1, 2 & US 2001/0041334 A1 & WO 1998/006736 A1 claims; page 15, lines 16 to 25; examples 1, 2 & EP 942917 A1	1-5
A	WEYANT R.S., Effect of Ionic and Nonionic Detergents on the Taq Polymerase, BioTechniques, 1990, vol.9,no.3, p.308-309	1-5
P,X	Takahiro SEKIKAWA et al., "Netsu Otosei Jisei Nano Ryushi o Mochiita Cryptosporidium Idenshi Kensaho no Kaihatsu", Dai 49 Kai Japan Society on Water Environment Nenkai Koenshu, 16 March 2015 (16.03.2015), page 407, entire text	1-5

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, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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/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
Y	JP 2009-171853 A (チッソ株式会社) 2009.08.06, 段落0054, 実施例2 (ファミリーなし)	1-5
Y	KONDOH Akihiko, Development of the thermoresponsive magnetic nanoparticle and its deployment in the biotechnology field, Nanoparticle Technology Handbook, 2nd Edition, ISBN 978-0-444-56336-1, 2012, p.531-538, 特に、532頁左欄下から3行～右欄4行, 535頁右欄3～14行	1-5

☒ 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

30.05.2016

国際調査報告の発送日

07.06.2016

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）

田中 晴絵

4 B

9739

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
Y	JP 2000-516468 A (ライフ テクノロジーズ, インコーポレイテッド) 2000.12.12, 特許請求の範囲, 23頁第1段落, 実施例1, 2 & US 2001/0041334 A1 & WO 1998/006736 A1, 特許請求の範囲, 15頁16～25行, 実施例1, 2 & EP 942917 A1	1 - 5
A	WEYANT R.S., Effect of Ionic and Nonionic Detergents on the Taq Polymerase, BioTechniques, 1990, vol.9, no.3, p.308-309	1 - 5
P X	関川貴寛外, 熱応答性磁性ナノ粒子を用いたクリプトスポリジウム遺伝子検査法の開発, 第49回日本水環境学会年会講演集, 2015.03.16, 407頁, 全文	1 - 5