

(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
2024年10月3日(03.10.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/203579 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) C12Q 1/6844 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/010671

(22) 国際出願日: 2024年3月19日(19.03.2024)

(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 2023-055743 2023年3月30日(30.03.2023) JP

(71) 出願人: 日油株式会社 (NOF CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1506019 東京都渋谷区恵比寿四
丁目20番3号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 鈴木 裕貴 (SUZUKI, Hirotaka);
〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町
3-3 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 松
田 将 (MATSUDA, Masaru); 〒2100865 神奈
川県川崎市川崎区千鳥町3-3 日油
株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 鎌田 光宜, 外 (KAMADA, Mitsunori et
al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四
丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル
高島国際特許事務所 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: NUCLEIC ACID ADSORPTION INHIBITOR, NUCLEIC ACID SOLUTION, AND NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD

(54) 発明の名称: 核酸吸着抑制剤、核酸溶液、及び核酸増幅法

(57) Abstract: The present invention provides a nucleic acid adsorption inhibitor comprising at least one polymer selected from group A mentioned below. [Group A] A polymer A1: a polymer composed only of a constituent unit derived from a monomer a containing a phosphorylcholine group; a polymer A2: a copolymer containing a constituent unit derived from the monomer a and a constituent unit derived from a monomer b containing a carboxyl group; and a polymer A3: a copolymer containing a constituent unit derived from the monomer a and a constituent unit derived from a monomer c containing C1-20 alkoxy-carbonyl group; provided that each of the polymer A1 to polymer A3 does not contain a constituent unit containing a cationic functional group other than a phosphorylcholine group.

(57) 要約: 本発明は、下記のA群から選ばれる1以上の重合体を含む核酸吸着抑制剤を提供する: [A群] 重合体A1: ホスホリルコリン基を含む単量体aに由来する構成単位のみからなる重合体; 重合体A2: 前記単量体aに由来する構成単位、及びカルボキシ基を含む単量体bに由来する構成単位を含む共重合体; 並びに 重合体A3: 前記単量体aに由来する構成単位、及び炭素数1~20のアルコキシカルボニル基を含む単量体cに由来する構成単位を含む共重合体; 但し、重合体A1~重合体A3は、ホスホリルコリン基以外のカチオン性官能基を含む構成単位は含まない。



WO 2024/203579 A1

明 細 書

発明の名称：核酸吸着抑制剤、核酸溶液、及び核酸増幅法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸吸着抑制剤、核酸溶液、及び核酸増幅法に関する。

背景技術

[0002] DNA（デオキシリボ核酸）は核酸の一種であり、地球上の多くの生物において遺伝情報の媒体となる生体高分子である。

このようなDNAの検出、定量、塩基配列決定などの手法としては、具体的には、アガロースゲル電気泳動などのDNA検出技術や、PCR法、LAMMP法に代表される核酸増幅技術や、これらを応用した定量PCR、デジタルPCRなどの核酸定量技術、サンガー法や次世代シーケンスなどの塩基配列決定技術、またこれらをマイクロアレイやバイオチップ上で行う技術を用いる手法が例として挙げられる。

[0003] ここで、上記のいずれの応用においても、DNAの非特異的吸着がしばしば問題となる。すなわちDNAの操作、保存、移送に際して、DNAが、容器やマイクロチップ等の表面等、特にプラスチック製部材の表面に吸着し、遊離DNAの濃度低下を招くことがしばしば問題となる。

特に、DNAの検出、定量、塩基配列解析の実施に当たっては、マイクロモル〜アトモル以下の極低濃度の標的DNAを分析の対象とするうえ、余剰のDNAを取得することが困難な場合も多く、容器内壁等への吸着によるDNAのロスは重大な問題となる。

なお2本鎖DNA以外の核酸についても、上記と同様の問題が生じる。

[0004] このような背景の中で、プラスチック容器への核酸の吸着抑制を目的として、プラスチックの改質技術が様々に検討されてきた。例えば非特許文献1では、特定の改質がなされたプラスチックチューブ製品が紹介されており、当該製品を用いて核酸濃度標準の調製、及び保管を行うと、容器への核酸吸着が抑制され、核酸歩留まりが向上し、該標準を使用するアプリケーション

の精度、及び感度を向上できることが記載されている。

- [0005] また特許文献1、2には、容器やバイオチップの表面を特定のコーティング材料でコーティングして核酸吸着を抑制する技術や、特定の高分子物質を含む層の形成によって核酸吸着を抑制する技術が開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開2012-78365号公報
特許文献2：特開2006-258630号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Eppendorf PCR Consumables - Compatibility Guide for PCR and qPCR Cyclers

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] しかし、非特許文献1のようにプラスチックを改良するアプローチでは、核酸が接触する予定の全ての部材を、あらかじめ当該技術を適用した部材に置き換えておく必要があり、不便である。同様に、特許文献1及び2に記載の技術も、該核酸が接触する予定の全ての部材にあらかじめ当該技術を適用しておく必要があり、不便である。

- [0009] 本発明は、上記課題に鑑み、核酸溶液側を改良するアプローチによって核酸吸着抑制を達成する技術を提供することを目的とした。すなわち、核酸溶液に添加しておくことで該核酸が容器、部材に吸着することを抑制できる核酸吸着抑制剤、及びこれを含む核酸溶液、及び該核酸溶液を用いた核酸増幅法を提供することを目的とする。本アプローチでは、試料の特性に応じて添加濃度を調節でき自由度が高いというメリットもある。

課題を解決するための手段

- [0010] [1] 下記のA群から選ばれる1以上の重合体を含む核酸吸着抑制剤
[A群]

重合体 A 1 : ホスホリルコリン基を含む単量体 a に由来する構成単位のみからなる重合体 ;

重合体 A 2 : 前記単量体 a に由来する構成単位、及びカルボキシ基を含む単量体 b に由来する構成単位を含む共重合体 ; 並びに

重合体 A 3 : 前記単量体 a に由来する構成単位、及び炭素数 1 ~ 20 のアルコキシカルボニル基を含む単量体 c に由来する構成単位を含む共重合体 ; 但し、重合体 A 1 ~ 重合体 A 3 は、ホスホリルコリン基以外のカチオン性官能基を含む構成単位は含まない。

[0011] [2] 前記単量体 a が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン及び2-メタクリルアミドエチルホスホリルコリンからなる群から選ばれる少なくとも1つであり、好ましくは2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンである前記 [1] に記載の核酸吸着抑制剤。

[3] 前記単量体 b が、(メタ)アクリル酸及びクロトン酸からなる群から選ばれる少なくとも1つであり、好ましくは(メタ)アクリル酸であり、より好ましくはメタクリル酸である前記 [1] または [2] に記載の核酸吸着抑制剤。

[4] 前記単量体 c が、メタクリル酸の炭素数 1 ~ 20 のアルキルエステルであり、好ましくはメタクリル酸の炭素数 1 ~ 6 のアルキルエステルであり、さらに好ましくはブチルメタクリレートである前記 [1] ~ [3] のいずれか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[0012] [5] 前記重合体 A 1 の重量平均分子量が、10,000 ~ 2,000,000 であり、好ましくは100,000 ~ 2,000,000 であり、より好ましくは500,000 ~ 1,500,000 である前記 [1] ~ [4] のいずれか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[6] 前記重合体 A 2 の重量平均分子量が、50,000 ~ 2,000,000 であり、好ましくは100,000 ~ 2,000,000 であり、より好ましくは300,000 ~ 1,500,000 であり、さらに好ましくは300,000 ~ 1,000,000 である前記 [1] ~ [5] のいずれ

れか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[7] 前記重合体A3の重量平均分子量が、5,000~200,000であり、好ましくは10,000~200,000であり、より好ましくは10,000~50,000であり、さらに好ましく30,000~50,000である前記[1]~[6]のいずれか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[0013] [8] 前記重合体A2の全構成単位に対する、前記単量体aに由来する構成単位の割合が、1~99mol%であり、好ましくは5~90mol%であり、より好ましくは10~60mol%であり、さらに好ましくは20~40mol%である前記[1]~[7]のいずれか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[9] 前記重合体A2の全構成単位に対する、前記単量体bに由来する構成単位の割合が、1~99mol%であり、好ましくは10~95mol%であり、より好ましくは40~90mol%であり、さらに好ましくは60~80mol%である前記[1]~[8]のいずれか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[10] 前記重合体A2が、前記単量体aに由来する構成単位と前記単量体bに由来する構成単位のみからなる共重合体である前記[1]~[9]のいずれか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[0014] [11] 前記重合体A3の全構成単位に対する、前記単量体aに由来する構成単位の割合が、10~90mol%であり、好ましくは20~70mol%であり、より好ましくは25~50mol%である前記[1]~[10]のいずれか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[12] 前記重合体A3の全構成単位に対する、前記単量体cに由来する構成単位の割合が、10~90mol%であり、好ましくは30~80mol%であり、より好ましくは50~75mol%である前記[1]~[11]のいずれか1つに記載の核酸吸着抑制剤。

[13] 前記重合体A3が、前記単量体aに由来する構成単位と前記単

量体 c に由来する構成単位のみからなる共重合体である前記 [1] ~ [1 2] のいずれか 1 つに記載の核酸吸着抑制剤。

[0015] [1 4] 前記核酸が、2本鎖核酸であり、好ましくは2本鎖DNAである前記 [1] ~ [1 3] のいずれか 1 つに記載の核酸吸着抑制剤。

[0016] [1 5] 前記 [1] ~ [1 3] のいずれか 1 つに記載の核酸吸着抑制剤、及び核酸を含む核酸溶液。

[1 6] 核酸水溶液である前記 [1 5] に記載の核酸溶液。

[1 7] 前記核酸が、2本鎖核酸であり、好ましくは2本鎖DNAである前記 [1 5] または [1 6] に記載の核酸溶液。

[1 8] 前記 [1 5] ~ [1 7] のいずれか 1 つに記載の核酸溶液を用いた核酸増幅法。

[0017] [1 9] 核酸溶液中の核酸が、前記核酸溶液と接する部材に吸着することを抑制する方法であって、前記 [1] ~ [1 3] のいずれか 1 つに記載の核酸吸着抑制剤、前記核酸、及び溶剤を混合することを含む方法。

[2 0] 前記核酸溶液が核酸水溶液であり、及び前記溶剤が水である前記 [1 7] に記載の方法。

[2 1] 前記核酸が、2本鎖核酸であり、好ましくは2本鎖DNAである前記 [1 9] または [2 0] に記載の方法。

発明の効果

[0018] 本発明の核酸吸着抑制剤を使用すると、それが添加された溶液中に存在する遊離核酸が容器やマイクロチップ等の表面などに吸着することを抑制できる。従って、例えば核酸サンプルを検体とする各種検査において、検出感度の向上や、核酸を含む検体、標準の保存安定性改善などが期待できる。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、本明細書の各記載は、組み合わせられないことが明確である場合を除いて、互いに組み合わせることができる。

[0020] 本明細書において、段階的な数値範囲が記載されている場合、各数値範囲

の下限値及び上限値は、組み合わせることができる。例えば、「好ましくは 10～100、より好ましくは 20～90」が記載されている場合、「好ましい下限値：10」と「より好ましい上限値：90」とを組み合わせることができる（即ち、「10～90」との数値範囲も本明細書の範囲内である）。

[0021] [核酸吸着抑制剤]

本発明において「核酸吸着抑制剤」とは、核酸溶液を取り扱う容器やマイクロチップ等において、該溶液と接する部材の表面に、核酸が吸着することを抑制するために、核酸溶液に添加する剤を意味する。

[0022] 本発明の核酸吸着抑制剤は、下記の A 群から選ばれる 1 以上の重合体を含む。

[A 群]

重合体 A 1：ホスホリルコリン基を含む単量体 a に由来する構成単位のみからなる重合体；

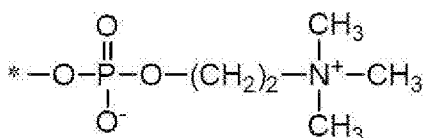
重合体 A 2：前記単量体 a に由来する構成単位、及びカルボキシ基を含む単量体 b に由来する構成単位を含む共重合体；並びに

重合体 A 3：前記単量体 a に由来する構成単位、及び炭素数 1～20 のアルコキシーカルボニル基を含む単量体 c に由来する構成単位を含む共重合体；但し、重合体 A 1～重合体 A 3 は、ホスホリルコリン基以外のカチオン性官能基を含む構成単位は含まない。

[0023] 本明細書において、「構成単位」とは、単量体に由来する、重合体中の繰り返し単位を意味する。そのため「構成単位」には、重合体中の繰り返されない構造（例えば、重合開始剤等に由来する構造）は含まれない。

[0024] 本明細書において、「ホスホリルコリン基」とは、下記式で示される 1 価の基を意味する（下記式中、*は結合位置を示す）。

[0025] [化1]



[0026] 本明細書において、「炭素数1～20のアルコキシカルボニル基」とは、炭素数1～20のアルコキシ基がカルボニル(—CO—)に結合した基を意味し、例えば、アセチル基、プロピオニル基、ブタノイル基、ペンタノイル基、ヘキサノイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル基、ノナノイル基、デカノイル基、ウンデカノイル基、ドデカノイル基、トリデカノイル基、ヘキサデカノイル基、ペンタデカノイル基、オクタデカノイル基、ノナデカノイル基、イコサノイル基等が挙げられる。

[0027] 重合体A1～A3に含まれる、単量体aに由来する構成単位における単量体aの例としては、ホスホリルコリン基を含み、単量体b及び単量体cと重合可能である限り、特に限定されないが、例えば、2-(メタ)アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-(メタ)アクリルアミドエチルホスホリルコリン、アルキルホスホリルコリンアリルエーテル、アルキルホスホリルコリンビニルエーテル等の、ホスホリルコリン基及びビニル基を含む化合物を好ましく例示することができる。

[0028] ここで、「(メタ)アクリロイルオキシ基」とは、基本的にアクリロイルオキシ基またはメタクリロイルオキシ基を意味する。複数の(メタ)アクリロイルオキシ基が存在してもよい場合、「(メタ)アクリロイルオキシ」とは、アクリロイルオキシ基および/またはメタクリロイルオキシ基を意味する。「(メタ)アクリロイルオキシ」と類似する、後述の「(メタ)アクリルアミド」、「(メタ)アクリル酸」、「(メタ)アクリレート」も、「(メタ)アクリロイルオキシ基」と同様の意味である。

[0029] 単量体aは、重合体の保存安定性及び原料入手性の観点から、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-メタクリルアミドエチルホスホリルコリンがより好ましく、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンがさらに好ましい。

単量体aは、1種のみを使用してもよく、2種以上を併用してもよい。また、単量体aは、市販品を使用することができる。

[0030] 重合体A1は、単量体aに由来する構成単位のみからなる重合体である。

なお、本明細書において、「単量体 a に由来する構成単位のみからなる重合体」とは、その全構成単位が単量体 a に由来する構成単位のみからなる重合体を意味し、「構成単位」とは、単量体に由来する重合体中の繰り返し単位を意味する。そのため「構成単位」には、重合体中の繰り返されない構造（例えば、重合開始剤等に由来する構造）は含まれない。重合体 A 1 は、1 種の単量体 a に由来する構成単位のみからなる単独重合体であっても、2 種以上の単量体 a に由来する構成単位のみからなる共重合体であってもよい。

[0031] 重合体 A 1 の重量平均分子量は特に限定されないが、核酸吸着抑制効果の観点から、10,000~2,000,000 が好ましく、100,000~2,000,000 がより好ましく、500,000~1,500,000 がさらに好ましい。

なお、本明細書において、重量平均分子量は、例えば、EcoSEC システム（東ソー株式会社製）等を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによりポリエチレングリコール換算で決定することができる。

[0032] 重合体 A 2 に含まれる、単量体 b に由来する構成単位における単量体 b の例としては、カルボキシ基を含み、単量体 a と重合可能である限り、特に限定されないが、例えば、（メタ）アクリル酸、クロトン酸、3-メチルクロトン酸、アングリカ酸、チグリニン酸、フマル酸、マレイン酸、イタコン酸、シトラコン酸などの、カルボキシ基及びビニル基を含む化合物が挙げられる。単量体 b は、重合反応の容易さの観点から、（メタ）アクリル酸、クロトン酸が好ましく、（メタ）アクリル酸がより好ましく、メタクリル酸がさらに好ましい。

単量体 b は、1 種のみを使用してもよく、2 種以上を併用してもよい。また、単量体 b は、市販品を使用することができる。

[0033] 重合体 A 2 の全構成単位に対する、単量体 b に由来する構成単位の割合は、核酸吸着抑制効果の観点から、1~99 mol% が好ましく、10~95 mol% がより好ましく、40~90 mol% がさらに好ましく、60~80 mol% がいっそう好ましい。

重合体 A 2 の全構成単位に対する、単量体 a に由来する構成単位の割合は、核酸吸着抑制効果の観点から、1～99 mol% が好ましく、5～90 mol% がより好ましく、10～60 mol% がさらに好ましく、20～40 mol% がいっそう好ましい。重合体 A 2 は、単量体 a に由来する構成単位と単量体 b に由来する構成単位のみからなる共重合体であることが特に好ましい。なお、本明細書において「単量体 a に由来する構成単位と単量体 b に由来する構成単位のみからなる共重合体」とは、その全構成単位が単量体 a に由来する構成単位と単量体 b に由来する構成単位のみからなる共重合体を意味する。

[0034] 重合体 A 2 の重量平均分子量は特に限定されないが、核酸吸着抑制効果の観点から、50,000～2,000,000 が好ましく、100,000～2,000,000 がより好ましく、300,000～1,500,000 がさらに好ましく、300,000～1,000,000 がいっそう好ましい。

[0035] 重合体 A 3 に含まれる、単量体 c に由来する構成単位における単量体 c の例としては、炭素数 1～20 のアルコキシカルボニル基を含み、単量体 a と重合可能である限り、特に限定されないが、例えば、メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、プロピル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、ペンチル（メタ）アクリレート、ヘキシル（メタ）アクリレート、ヘプチル（メタ）アクリレート、オクチル（メタ）アクリレート、ノニル（メタ）アクリレート、デシル（メタ）アクリレート、ウンデシル（メタ）アクリレート、ラウリル（メタ）アクリレート、トリデシル（メタ）アクリレート、ミリスチル（メタ）アクリレート、ペンタデシル（メタ）アクリレート、セチル（メタ）アクリレート、マルガリル（メタ）アクリレート、ステアリル（メタ）アクリレート、ノナデシル（メタ）アクリレート、アラキジル（メタ）アクリレート等の（メタ）アクリル酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；クロトン酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；3-メチルクロトン酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；ア

ングリカ酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；チグリン酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；フマル酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；マレイン酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；イタコン酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；シトラコン酸の炭素数 1～20 のアルキルエステル；といったような、カルボキシ基及びビニル基を含む化合物の炭素数 1～20 のアルキルエステルが挙げられる。これらの中で、重合体の保存安定性の観点から、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、プロピルメタクリレート、ブチルメタクリレート、ペンチルメタクリレート、ヘキシルメタクリレート、ヘプチルメタクリレート、オクチルメタクリレート、ノニルメタクリレート、デシルメタクリレート、ウンデシルメタクリレート、ラウリルメタクリレート、トリデシルメタクリレート、ミリスチルメタクリレート、ペンタデシルメタクリレート、セチルメタクリレート、マルガリルメタクリレート、ステアリルメタクリレート、ノナデシルメタクリレート、アラキシルメタクリレート等のメタクリル酸の炭素数 1～20 のアルキルエステルが好ましく、核酸吸着抑制効果の観点から、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、プロピルメタクリレート、ブチルメタクリレート、ペンチルメタクリレート、ヘキシルメタクリレート等のメタクリル酸の炭素数 1～6 のアルキルエステルがより好ましく、ブチルメタクリレートがさらに好ましい。

単量体 c は、1 種のみを使用してもよく、2 種以上を併用してもよい。また、単量体 c は、市販品を使用することができる。

[0036] 重合体 A 3 の全構成単位に対する、単量体 c に由来する構成単位の割合は、核酸吸着抑制効果の観点から、10～90 mol% が好ましく、30～80 mol% がより好ましく、50～75 mol% がさらに好ましい。

重合体 A 3 の全構成単位に対する、単量体 a に由来する構成単位の割合は、核酸吸着抑制効果の観点から、10～90 mol% が好ましく、20～70 mol% がより好ましく、25～50 mol% がさらに好ましい。重合体 A 3 は、単量体 a に由来する構成単位と単量体 c に由来する構成単位のみか

らなる共重合体であることが特に好ましい。なお、本明細書において「単量体 a に由来する構成単位と単量体 c に由来する構成単位のみからなる共重合体」とは、その全構成単位が単量体 a に由来する構成単位と単量体 c に由来する構成単位のみからなる共重合体を意味する。

[0037] 重合体 A 3 の重量平均分子量は特に限定されないが、核酸吸着抑制効果の観点から、5,000~200,000 が好ましく、10,000~200,000 がより好ましく、10,000~50,000 がさらに好ましく、30,000~50,000 がいっそう好ましい。

[0038] 重合体 A 2 及び A 3 は、本発明の効果を損なわない範囲で、上述した単量体以外の単量体（以下「他の単量体」と記載する）に由来する構成単位を含んでもよい。ただし、他の単量体はアニオン性、両性、または中性の官能基のみを含む。

その他の単量体としては、例えば、グリセリンモノ（メタ）アクリレート、ベンジル（メタ）アクリレート、イソボルニル（メタ）アクリレート等が挙げられる。

重合体 A 2 及び A 3 の全構成単位に対する、他の単量体に由来する構成単位の割合は、それぞれ、40mol%以下が好ましく、20mol%以下がより好ましく、10mol%以下がさらに好ましい。重合体 A 2 及び A 3 は、他の単量体に由来する構成単位を含まないことがいっそう好ましい。

[0039] 前記重合体が共重合体の場合、該共重合体は、ランダム共重合体、交互共重合体、ブロック共重合体、グラフト重合体、またはこれらのうち2以上の構造を有する共重合体のいずれでもよいが、重合体の製造性の観点から、ランダム共重合体が好ましい。

[0040] 重合体 A 1 ~ A 3 の調製に用いる各単量体は、市販品を使用してもよく、または公知の方法で製造してもよい。重合体 A 1 ~ A 3 は、公知の方法（例えば、国際公開第2018/216628号に記載の方法等）で製造することができる。

[0041] 本発明の核酸吸着抑制剤は、重合体 A 1 ~ A 3 による核酸吸着抑制効果を

損なわない範囲で、該重合体以外の成分を含有することができる。当該他の成分は特に制限されないが、例えば、後述の本発明の核酸溶液において「その他の成分」として例示されるものが適宜選択され得る。

[0042] 重合体 A 1 ~ A 3 は、核酸溶液中に含有させておくことで、容易に核酸吸着抑制剤として使用できる。

[0043] 本発明の核酸吸着抑制剤を核酸溶液に含有させる方法としては、調製済みの核酸溶液に重合体 A 1 ~ A 3 を添加して溶解する方法、核酸を溶解する緩衝液などの溶媒にあらかじめ本発明の核酸吸着抑制剤を溶解させておく方法、該核酸溶液を調製する容器にあらかじめ本発明の核酸吸着抑制剤を入れておき（例えば、本発明の核酸吸着抑制剤で容器内面をコートしておき）、そこに核酸溶液を入れて溶解させる方法等が考えられる。

[0044] 本発明の核酸吸着抑制剤を用いて核酸の吸着を防ぐ対象の容器、部材等の材質は、樹脂が好ましく、ポリプロピレンがより好ましい。

[0045] 前記核酸溶液中に添加する本発明の核酸吸着抑制剤の終濃度は、好ましくは 0.01 ~ 5 w/v %、より好ましくは 0.1 ~ 1 w/v %、さらに好ましくは 0.1 ~ 0.5 w/v % である。添加量が過少な場合は核酸吸着抑制効果が得られない可能性があり、過剰な場合は該核酸溶液を酵素反応などのアプリケーションに用いた場合に反応阻害などの問題が生じる可能性がある。

[0046] 本発明の核酸吸着抑制剤を適用できる核酸の種類は特に限定されないが、好ましくは 2 本鎖核酸（例、2 本鎖 DNA、2 本鎖 RNA、DNA : RNA ハイブリッド）であり、より好ましくは 2 本鎖 DNA である。

ここで、該核酸は、化学合成、*in vitro* 合成（例、逆転写反応）、PCR などで人工的に合成されたものでもよく、細胞、微生物、ウイルス等から公知の方法により調製されたものであってもよい。ここで該細胞、微生物、ウイルス等は、自然界や環境中、ヒトや動植物から採取されたものでもよく、また分離・培養されたものであってもよい。

[0047] [核酸溶液]

本発明はさらに、本発明の核酸吸着抑制剤、及び核酸を含む核酸溶液を提供する。

本発明の核酸溶液中の核酸吸着抑制剤の濃度は、前述のとおり、終濃度0.01~5 w/v%、より好ましくは0.1~1 w/v%、さらに好ましくは0.1~0.5 w/v%である。

[0048] 本発明の核酸溶液に含まれる核酸は、2本以上の分子鎖が会合した核酸が好ましく、2本鎖核酸がより好ましく、2本鎖DNAがさらに好ましい。

[0049] 該核酸は、例えば化学合成、*in vitro*合成（例、逆転写反応）、PCR等で人工的に合成されたものでもよく、ウイルス、菌体、細胞、体液、組織等、またはこれらの懸濁液、またはこれらから調製した核酸抽出液等として提供されるものでもよい。なお、該ウイルス、菌体、細胞、体液、組織等は、自然界や環境中、ヒトや動植物から採取されたものでもよく、また分離・培養されたものであってもよい。

該核酸の濃度は、該核酸を用いるアプリケーションに応じて適宜決定される。

[0050] 本発明の核酸溶液は、本発明の効果を損なわない範囲で、その他の成分を含有することができる。その他の成分としては、例えば、ポリオール、ポリエーテル、タンパク質、塩類、緩衝液、界面活性剤、溶剤、生化学試薬、色素類、防腐剤、オイル、固相担体などが挙げられる。

[0051] ポリオールとしては、例えば、グリセロール、スクロース、グルコース等が挙げられる。

ポリエーテルとしては、例えば、ポリオキシエチレングリコール等が挙げられる。

タンパク質としては、例えば、アルブミン、ゼラチン、カゼイン、酵素等が挙げられる。

[0052] 塩類としては、例えば、アミノ酸の塩、ペプチド類の塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、エチレンジアミン四酢酸等の有機酸の塩などが挙げられる。

緩衝液としては、例えば、トリス塩酸緩衝液、Good's緩衝液、グリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液、TE緩衝液、TAE緩衝液、TBE緩衝液、SSC緩衝液などが挙げられる。

界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノアルキルエーテル、アルキルベタイン等が挙げられる。

[0053] 溶剤としては、水及び有機溶剤が挙げられる。有機溶剤としては、例えば、エタノール、プロパノール、イソアミルアルコール、グリセリン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、クロロホルム、フェノール等が挙げられる。溶剤は、好ましくは水であり、本発明の核酸溶液は、好ましくは核酸水溶液である。

[0054] 生化学試薬としては、例えば、フラビン類等が挙げられる。

色素類としては、例えば、臭化エチジウムや、SYBR™ Green Iなどの核酸染色試薬、ROX™ Dye等の蛍光色素、オレンジG、プロモフェノールブルー、キシレンシアノールFFなどの着色剤等が挙げられる。

[0055] 防腐剤としては、例えば、アジ化ナトリウム、パラオキシ安息香酸製剤、デヒドロ酢酸製剤、プロクリン製剤等が挙げられる。

オイルとしては、例えば、ミネラルオイルなどが挙げられる。

固相担体としては、例えば、シリカビーズ、磁性ビーズ等が挙げられる。

[0056] [核酸増幅法]

本発明の核酸溶液は、本発明の核酸吸着抑制剤を含んだまま、酵素反応に供することができる。

酵素反応としては、例えば、ヌクレアーゼによる切断、逆転写酵素による逆転写、DNAポリメラーゼによる複製、及びこれらを応用した核酸増幅などの反応が挙げられる。本発明でいう酵素反応は好ましくはDNAまたはRNAの複製であり、より好ましくはPCRである。

[0057] [核酸吸着の抑制方法]

本発明は、核酸溶液中の核酸が、前記核酸溶液と接する部材に吸着することを抑制する方法であって、本発明の核酸吸着抑制剤、前記核酸、及び溶剤を混合することを含む方法を提供する。前記混合に特に限定は無く、例えば、（１）本発明の核酸吸着抑制剤、核酸、及び溶剤を混合してもよく、（２）核酸及び溶剤を含む溶液と、本発明の核酸吸着抑制剤とを混合してもよく、（３）本発明の核酸吸着抑制剤及び溶剤を含む溶液と、核酸吸着抑制剤とを混合してもよい。本発明の核酸吸着抑制剤、核酸、及び溶剤を混合することによって得られる核酸溶液の説明（例えば、使用する核酸の種類、本発明の核酸吸着抑制剤の濃度、及びその他の成分の説明）は、上述の本発明の核酸溶液の説明と同じである。

実施例

[0058] 以下、本発明を実施例等により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0059] [重合体の合成]

本発明の範囲内である重合体 A 1 - 1、重合体 A 2 - 1、重合体 A 3 - 1 ~ 重合体 A 3 - 3、及び本発明の範囲外である重合体 Z - 1 を以下の要領で調製した。得られた重合体は、後述の実施例及び比較例の各条件に記載の終濃度の 10 倍の濃度となるよう Water, Nuclease free (株式会社ニッポンジーン製、以下「PW」と記載) に溶解し、得られた重合体水溶液を用いた。

調製した 6 種の重合体について、表 1 にまとめた。

[0060] [合成例 1]

重合体 A 1 に該当する重合体 A 1 - 1 を以下の要領で調製した。

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (以下「MPC」と記載) 100 g を重合用ガラスフラスコに秤量し、精製水 150 g を加えて溶解し、得られた溶液に 4, 4'-アゾビス (4-シアノ吉草酸) (以下 ACVA と記載) 2.0 g を加えた。この溶液を 70℃ に加熱し、窒素雰囲気下で 6 時間攪拌することで重合を行った。得られた重合液を分画分子量 20,000 の半透膜を用いて透析精製したのち、凍結乾燥することで重合体 A 1

− 1 を得た。重合体 A 1 − 1 の重量平均分子量は、後述する条件での G P C 測定により、ポリエチレングリコール換算で 1, 0 3 0, 0 0 0 であった。

[0061] [合成例 2]

重合体 A 2 に該当する重合体 A 2 − 1 を以下の要領で調製した。

M P C 6 0 g、及びメタクリル酸（以下「M A c」と記載）4 0 g（M P C / M A c = 3 0 / 7 0（モル比））を重合用ガラスフラスコに秤量し、精製水 5 6 7 g を加えて溶解した。得られた溶液に A C V A を 5. 2 g 加えた。この溶液を 7 0 ° C に加熱し、窒素雰囲気下で 6 時間攪拌することで重合を行った。得られた重合液を分画分子量 2 0, 0 0 0 の半透膜を用いて透析精製したのち、凍結乾燥することで重合体 A 2 − 1 を得た。重合体 A 2 − 1 の重量平均分子量は、後述する条件での G P C 測定により、ポリエチレングリコール換算で 3 7 0, 0 0 0 であった。

[0062] [合成例 3]

重合体 A 3 に該当する重合体 A 3 − 1 を以下の要領で調製した。

M P C 4 7 g、及びメタクリル酸ブチル（以下「B M A」と記載）5 3 g（M P C / B M A = 3 0 / 7 0（モル比））を重合用ガラスフラスコに秤量し、エタノール（以下「E t O H」と記載）9 0 0 g を加えて溶解し、6 0 ° C に加熱した。窒素雰囲気下、得られた溶液に 2, 2' − アゾビス（イソブチロニトリル）（以下「A I B N」と記載）を 2. 4 g 加え、7 時間攪拌することで重合を行った。得られた重合液を分画分子量 3, 0 0 0 の半透膜を用いて透析精製したのち、凍結乾燥することで重合体 A 3 − 1 を得た。重合体 A 3 − 1 の重量平均分子量は、後述する条件での G P C 測定により、ポリエチレングリコール換算で 9 0, 0 0 0 であった。

[0063] [合成例 4]

重合体 A 3 に該当する重合体 A 3 − 2 を以下の要領で調製した。

M P C 7 8 g、及びメタクリル酸ステアリル（以下「S M A」と記載）2 2 g（M P C / S M A = 8 0 / 2 0）を重合用ガラスフラスコに秤量し、E t O H 6 6 7 g を加えて溶解し、6 0 ° C に加熱した。窒素雰囲気下、得

られた溶液にAIBNを3.3g加え、6時間攪拌することで重合を行った。得られた重合液を分画分子量3,000の半透膜を用いて透析生成したのち、凍結乾燥することで重合体A3-2を得た。重合体A3-2の重量平均分子量は、後述する条件でのGPC測定により、ポリエチレングリコール換算で40,000だった。

[0064] [合成例5]

重合体A3に該当する重合体A3-3を以下の要領で調製した。

MPC 57g、BMA 28g、及びグリセリンモノメタクリレート（以下「GLM」と記載）15g（MPC/BMA/GLM=40/40/20（モル比））を重合用ガラスフラスコに秤量し、エタノール409g、精製水201gを加えて溶解した。得られた溶液にAIBN 1.9gを加えた。この溶液を60℃に加熱し、窒素雰囲気下で5時間攪拌することで重合を行った。得られた重合液を分画分子量3,000の半透膜を用いて透析精製したのち、凍結乾燥することで重合体A3-3を得た。重合体A3-3の重量平均分子量は、後述する条件でのGPC測定により、ポリエチレングリコール換算で20,000であった。

[0065] [合成例6]

本発明の範囲外である重合体Z-1を以下の要領で調製した。

MPC 74g、及びN,N,N-トリメチル-N-(2-ヒドロキシ-3-メタクリロイルオキシプロピル)-アンモニウムクロライド（以下「QA」と記載）26g（MPC/QA=70/30（モル比））を重合用ガラスフラスコに秤量し、精製水525gを加えて溶解した。得られた溶液に2,2'-アゾビス（2-メチルプロピオンアミド）二塩酸塩を0.9g加えた。この溶液を70℃に加熱し、窒素雰囲気下で2時間攪拌することで重合を行った。得られた重合液を分画分子量20,000の半透膜を用いて透析精製したのち、凍結乾燥することで重合体Z-1を得た。重合体Z-1の重量平均分子量は、後述する条件でのGPC測定により、ポリエチレングリコール換算で40,000であった。

[0066] [GPC測定]

合成例1～6で得られた重合体A1-1、重合体A2-1、重合体A3-1～重合体A3-3、及び重合体Z-1のGPC測定は、以下の条件で実施した。

GPCシステム：EcoSECシステム（東ソー株式会社製）

カラム：Shodex OHpak SB-802.5HQ（昭和電工株式会社製）、及びSB-806HQ（昭和電工株式会社製）を直列に接続

展開溶媒：20mMりん酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）

検出器：示差屈折率検出器

分子量標準：EasiVial PEG/PEO（Agilent Technologies 製）

流速：0.5mL/分

カラム温度：40℃

サンプル：得られた重合体を終濃度0.1重量%となるよう展開溶媒で希釈

注入量：100μL

[0067]

[表1]

	単量体 a		単量体 b		単量体 c		その他の単量体		重量平均分子量 [$\times 10^{-3}$]
	種類	割合 [mol%]	種類	割合 [mol%]	種類	割合 [mol%]	種類	割合 [mol%]	
重合体 A 1-1	MPC	100	---	---	---	---	---	---	1030
重合体 A 2-1	MPC	30	MAc	70	---	---	---	---	370
重合体 A 3-1	MPC	30	---	---	BMA	70	---	---	90
重合体 A 3-2	MPC	80	---	---	SMA	20	---	---	40
重合体 A 3-3	MPC	40	---	---	BMA	40	GLM	20	20
重合体 Z-1	MPC	70	---	---	---	---	QA	30	40

[0068] [実験例 1]

2本鎖DNAの溶液に、合成例1～6で得られた重合体A1-1、重合体A2-1、重合体A3-1～重合体A3-3、または重合体Z-1を添加したものをプロピレンチューブに入れ、室温で静置したのち、アガロースゲル電気泳動で展開した。2本鎖DNAの定量値を対照と比較することで、溶液中のDNAの残存率を算出した。つまり、プロピレンチューブや溶液を取り扱ったマイクロチップ等の内表面に吸着せずに残ったDNAの量を比較した。

1) DNAとして、 λ -HindIII digest (タカラバイオ (株) 製) を用い、後述のDNA溶液中に終濃度10 ng/ μ Lとなるように添加した。

2) 10Xバッファーとして、400 mM Tris-HCl緩衝液(100 mM塩化ナトリウム、60 mM塩化マグネシウム、10 mM塩化カルシウム含有、pH 7.9)を調製した。

3) 表2に示す各DNA水溶液を調製し、ポリプロピレンスクリーキャップチューブ2 mL(自立型)(AS ONE社製、以下「PPチューブ」と記載)に分注した。

4) 室温で一晩静置した。

5) 電気泳動バッファーとして50X TAE((株)ニッポンジーン製)を取扱説明書に沿って希釈したもの(1X TAE)を調製し、電気泳動ゲルとしてAgarose S((株)ニッポンジーン製)1 gに対して1X TAE 100 mLの割合で加え、沸騰溶解させ、固めたもの(1%ゲル)を調製した。

6) 4)の後の各内用液に1/6倍量の6X Loading Buffer, Triple Dye((株)ニッポンジーン製)を添加して混合し、電気泳動サンプルとした。

7) 6)のサンプルをアガロースゲル電気泳動で展開した。なお、電気泳動バッファー、及びゲルは4)のものを用い、サンプルのアプライ量は5 μ Lとし、100Vで約30分間泳動した。

8) ゲルの染色は1X TAEで10,000倍希釈したMidori Green Advance(日本ジェネティクス(株)製)に約15分間浸漬することで行い、続い

て純水中に約15分間浸漬して脱色した。

9) FASdigi Compact (日本ジェネティクス (株) 製) を用いて、BlueGreen LED照射下撮像し、6.6kbpのバンドについて、ImageJ (米国国立衛生研究所) を用いて定量値を算出し、対照を100とした相対値で表した。結果を表2にまとめた。

[0069] [表2]

対照	実施例	実施例	実施例	実施例	実施例	比較例		
1	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-1		
10 μ L								
2 μ L (総濃度10ng/ μ L)								
種類	重合体	重合体	重合体	重合体	重合体	重合体		
添加量 (*1)	A1-1	A2-1	A3-1	A3-2	A3-3	Z-1		
	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L		
残部								
100 μ L								
結果	定盤値 (*2)	100	155	204	189	112	141	0

*1 いずれの共重合体も、総濃度0.1% (w/v) 添加した。

*2 対照を100とした相対値で表した。

[0070] 実施例 1-1～実施例 1-3 は、それぞれ重合体 A 1-1～重合体 A 3-1 を核酸吸着抑制剤として使用した例である。この結果より、本発明の重合体を用いることで、ポリプロピレンチューブやマイクロチップへの DNA 吸着が抑制され、DNA の残存量が増加することが分かる。

[0071] 実施例 1-4 は、重合体 A 3-2 を核酸吸着抑制剤として使用した例である。重合体 A 3-2 は、重合体 A 3-1 において、炭素数 1～20 のアルコキシカルボニル基を含む単量体 c におけるアルキル基を、ブチル（炭素数 4）からステアリル（炭素数 18）に変更した重合体の例である。この場合でも、DNA 吸着抑制効果が発現することが分かる。

[0072] 実施例 1-5 は、重合体 A 3-3 を核酸吸着抑制剤として使用した例である。重合体 A 3-3 は、重合体 A 3-1 が、さらに他の単量体を含んだ重合体の例である。この場合でも、DNA 吸着抑制効果が発現することが分かる。

[0073] [実験例 2]

実験例 1 と同様の実験を、PP チューブの代わりにラボランスクリユー管瓶 No. 2（AS ONE 社製、以下「ガラスチューブ」と記載）を使用して実施した。

- 1) 表 3 に示す各 DNA 水溶液を調製し、ガラスチューブに分注した。
- 2) その他の条件、手順は実験例 1 と同様とした。結果を表 3 に示す。

[0074]

[表3]

		対照	実施例	実施例	実施例	比較例	
		2	2-1	2-2	2-3	2-1	
組成	10Xバッファー	10 μ L					
	λ -Hind III digest	2 μ L (終濃度10 ng/ μ L)					
	重合体	種類	—	重合体 A1-1	重合体 A2-1	重合体 A3-1	重合体 Z-1
		添加量 (※3)	—	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
	PW		残部				
	総量	100 μ L					
結果	定量値 (※4)	100	119	120	122	0	

※3 いずれの共重合体も、終濃度0.1% (w/v) 添加した。

※4 対照を100とした相対値で表した。

[0075] 実施例2-1～実施例2-3、及び比較例2-1はそれぞれ、実施例1-1～実施例1-3、及び比較例1-1と同様の実験を、PPチューブの代わりにガラスチューブを使用して実施した結果である。この結果より、本発明の重合体を用いれば、容器材質がガラスの場合にも核酸吸着抑制が達成できることが分かる。

産業上の利用可能性

[0076] 本発明の核酸吸着抑制剤を核酸溶液に添加しておくだけで、該核酸が容器等において、該水溶液と接触する部材に吸着することを抑制できる。従って、例えば医療、獣医学、法医学分野の遺伝子検査において、核酸抽出を行う場合の容器等への吸着によるロス低減、すなわち回収率向上が期待でき、検出感度の改善が期待できる。また核酸を含む遺伝子検査用の検体の保存、輸送の際、容器等への吸着による有効濃度低下を抑制することで、保存安定性、輸送安定性を改善することが期待できる。

[0077] 本願は、日本で出願された特願2023-055743号を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含される。

請求の範囲

[請求項1] 下記のA群から選ばれる1以上の重合体を含む核酸吸着抑制剤：

[A群]

重合体A1：ホスホリルコリン基を含む単量体aに由来する構成単位のみからなる重合体；

重合体A2：前記単量体aに由来する構成単位、及びカルボキシ基を含む単量体bに由来する構成単位を含む共重合体；並びに

重合体A3：前記単量体aに由来する構成単位、及び炭素数1～20のアルコキシカルボニル基を含む単量体cに由来する構成単位を含む共重合体；

但し、重合体A1～重合体A3は、ホスホリルコリン基以外のカチオン性官能基を含む構成単位は含まない。

[請求項2] 請求項1に記載の核酸吸着抑制剤及び核酸を含む核酸溶液。

[請求項3] 請求項2に記載の核酸溶液を用いた核酸増幅法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/010671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12M 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/6844</i> (2018.01)i FI: C12M1/00 A; C12Q1/6844 Z According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M1/00; C12Q1/6844		
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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022/163506 A1 (NOF CORPORATION) 04 August 2022 (2022-08-04) claims 1-8, paragraphs [0013], [0108]-[0115], table 2	2-3
Y	claims 1-8, paragraphs [0013], [0108]-[0115], table 2	1
X	JP 2009-219358 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 01 October 2009 (2009-10-01) paragraphs [0014]-[0037]	1
Y	paragraphs [0014]-[0037]	1
X	JP 2009-11247 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 22 January 2009 (2009-01-22) paragraphs [0035]-[0037]	1
Y	paragraphs [0025]-[0037]	1
Y	JP 2010-197226 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 09 September 2010 (2010-09-09) paragraphs [0021]-[0022]	1
A	US 2019/0360021 A1 (NANOHELIX CO., LTD.) 28 November 2019 (2019-11-28) examples, fig. 2, paragraphs [0014], [0031]	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 23 May 2024		Date of mailing of the international search report 11 June 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/010671

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2022/163506	A1	04 August 2022	EP 4286428 A1	
				KR 10-2023-0136192 A	
				CN 117222722 A	

JP	2009-219358	A	01 October 2009	(Family: none)	

JP	2009-11247	A	22 January 2009	(Family: none)	

JP	2010-197226	A	09 September 2010	(Family: none)	

US	2019/0360021	A1	28 November 2019	WO 2019/103164 A1	
				KR 10-2019-0088559 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/00(2006.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i FI: C12M1/00 A; C12Q1/6844 Z		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12M1/00; C12Q1/6844 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 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024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)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2022/163506 A1 (日油株式会社) 04.08.2022 (2022-08-04) 請求項1～8、[0013]、[0108]-[0115]、表2	2-3
Y	請求項1～8、[0013]、[0108]-[0115]、表2	1
X	JP 2009-219358 A (住友ベークライト株式会社) 01.10.2009 (2009-10-01) [0014]-[0037]	1
Y	[0014]-[0037]	1
X	JP 2009-11247 A (住友ベークライト株式会社) 22.01.2009 (2009-01-22) [0035]-[0037]	1
Y	[0025]-[0037]	1
Y	JP 2010-197226 A (住友ベークライト株式会社) 09.09.2010 (2010-09-09) [0021]-[0022]	1
A	US 2019/0360021 A1 (NANOHELIX CO., LTD.) 28.11.2019 (2019-11-28) 実施例、図2、[0014]、[0031]	1-3
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	23.05.2024	国際調査報告の発送日 11.06.2024
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 藤井 美穂 4N 4434 電話番号 03-3581-1101 内線 3891	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/010671

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2022/163506	A1	04.08.2022	EP	4286428	A1	
				KR	10-2023-0136192	A	
				CN	117222722	A	
JP	2009-219358	A	01.10.2009	(ファミリーなし)			
JP	2009-11247	A	22.01.2009	(ファミリーなし)			
JP	2010-197226	A	09.09.2010	(ファミリーなし)			
US	2019/0360021	A1	28.11.2019	WO	2019/103164	A1	
				KR	10-2019-0088559	A	