

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年3月3日(03.03.2022)



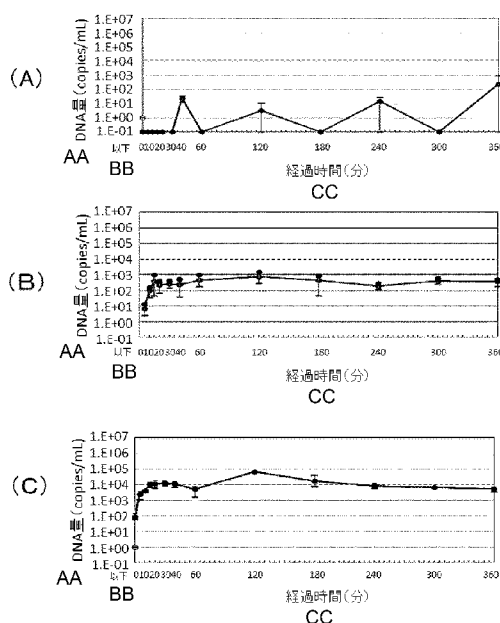
(10) 国際公開番号

WO 2022/045009 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/6851 (2018.01) C12Q 1/686 (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/030610
- (22) 国際出願日: 2021年8月20日(20.08.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2020-141283 2020年8月24日(24.08.2020) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 Yamaguchi (JP). 日本工営株式会社(NIPPON KOEI CO., LTD.)
- [JP/JP]; 〒1028539 東京都千代田区麹町5丁目4番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 赤松 良久(AKAMATSU Yoshihisa); 〒7558611 山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 中尾 遼平(NAKAO Ryohei); 〒7558611 山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 今村 史子(IMAMURA Fumiko); 〒1028539 東京都千代田区麹町5丁目4番地 日本工営株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 藤本 昌平(FUJIMOTO Shohei); 〒7550033 山口県宇部市琴芝町一丁目1番63号 防長ビル2階 Yamaguchi (JP).

(54) Title: COMPOSITION FOR FLUID TRACING AND FLUID TRACING METHOD

(54) 発明の名称: 流体を追跡するための組成物及び流体の追跡方法



AA DNA amount (copies/ml)
BB And under
CC Elapsed time (minutes)

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a composition for fluid tracing that contains a tracer having few adverse effects upon the environment, and having improved stability and recovery efficiency. Provided as a solution is a composition for fluid tracing that is characterized by containing a tracer comprising as constituent components nucleic acid molecules and holders holding the nucleic acid molecules, and a fluid tracing method using the composition.

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

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 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))

(57) 要約: 本発明の課題は、環境への悪影響が少なく、安定性及び回収効率が向上した追跡子を含有する流体を追跡するための組成物を提供することである。解決手段としては、核酸分子と前記核酸分子を保持する保持体を構成成分として含む追跡子を含有することを特徴とする流体を追跡するための組成物及び前記組成物を用いた流体の追跡方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：流体を追跡するための組成物及び流体の追跡方法 技術分野

[0001] 本発明は、流体を追跡するための組成物及び流体の追跡方法に関する。より詳しくは、本発明は、核酸分子及び保持体を構成成分として含む追跡子を含有する流体を追跡するための組成物、核酸分子及び保持体を構成成分として含む追跡子を用いた流体の追跡方法に関する。

背景技術

[0002] 地下水や地表水などを対象とした流体追跡は、環境汚染や地下水資源の調査、地盤や土地利用の評価などにおいて実施される。地下水などの水源域、涵養量、流動経路、流向、流速などを測定する一般的な方法は、地面に掘削した垂直方向の孔に地下水と識別可能な追跡子を投入し、観測地点である他の掘削した孔から揚水した地下水中に含まれる追跡子を水理試験装置で計測するものである。観測された追跡子の分布や挙動は、流体の流動を可視化するうえで有効である。

[0003] 追跡子は、流体に影響を与えずに流体と同様の動きを示し、安定で容易に検出できるものが望ましい。追跡子としては、例えば、特許文献1には溜池漏水調査に用いる塩化ナトリウム、特許文献2には地下水流動特性の検討に用いるウランなどの蛍光染料が開示されている。しかしながら、これらの物質を用いることは環境面への悪影響が懸念される。

[0004] また、特許文献3には、流体の存在を判定するため使用するヘアピン構造とダングリング末端を含むDNAトレーサーが開示されている。しかしながら、特許文献3に記載の発明は地下の岩体に超高压の水を注入して亀裂を生じさせる水圧破壊による地下水の汚染のトレースが目的であるため、超高压に耐えるためにヘアピン構造やダングリング末端という複雑なDNA構造を必須としていた。また、流体からDNAトレーサーを効率よく回収するための工夫は特にされていなかった。

[0005] さらに、非特許文献1には、シリカにトレーサーとしてDNAを内包させる方法が開示されている。しかしながら、シリカは缶石を作りやすく、水処理において処理装置の水質低下や蒸留効率の低下への影響が懸念されるという問題があった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開昭60-018737号公報

特許文献2：特開2011-220980号公報

特許文献3：特表2015-523073号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Gediminas Mikutis et al., Environ. Sci. Technol 2018, 52, 12142-12152

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] DNAトレーサーは、蛍光塗料や塩化ナトリウムなどを含まないので環境への悪影響が少ない。しかしながら、DNAトレーサーは、流体を移動する追跡子として安定性が低いことや、DNAの回収効率が悪いという問題がある。そのため、流体を追跡するうえで追跡子自体の安定性及び回収効率が改善された流体を追跡するための組成物の開発が望まれている。

したがって、本発明の課題は、環境への悪影響が少なく、安定性及び回収効率が向上した追跡子を含有する流体を追跡するための組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、上記課題について鋭意検討した結果、有機化合物である核酸分子を保持体で保持することにより、核酸分子の安定性が改善するとともに、測定試料における核酸分子の回収効率が向上した流体を追跡するための組成物とすることができることを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は、以下の〔１〕～〔１０〕を提供する。

〔１〕 核酸分子と前記核酸分子を保持する保持体を構成成分として含む追跡子を含有することを特徴とする流体を追跡するための組成物。

〔２〕 前記核酸分子は、DNA分子、RNA分子、DNA及びRNAのキメラ核酸分子からなる群から選択される少なくとも一つであることを特徴とする上記〔１〕に記載の組成物。

〔３〕 前記保持体は、リボソームであることを特徴とする上記〔１〕又は〔２〕に記載の組成物。

〔４〕 前記リボソームの平均粒子径が $1\mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする上記〔３〕に記載の組成物。

〔５〕 前記核酸分子を保持する前記リボソームの製造後、 15°C 以上で２時間以上静置又は攪拌されたものであることを特徴とする上記〔３〕又は〔４〕に記載の組成物。

〔６〕 前記核酸分子は、配列番号１～３のいずれかに示される塩基配列を含むことを特徴とする上記〔１〕～〔５〕のいずれか一項に記載の組成物。

〔７〕 前記流体は、地下水、地表水、下水又は雨水であることを特徴とする上記〔１〕～〔６〕のいずれか一項に記載の組成物。

〔８〕 前記組成物を投入する供給源から得られた流体を含有することを特徴とする上記〔１〕～〔７〕のいずれか一項に記載の組成物。

〔９〕 (１) 上記〔１〕～〔８〕のいずれか一項に記載の組成物を準備する工程A、

(２) 前記組成物を流体の供給源に投入する工程B、

(３) 前記供給源と異なる観測地点における流体の試料を準備する工程C、

(４) 前記流体の試料に含まれる核酸分子を測定する工程D、
の工程を有することを特徴とする流体の追跡方法。

〔１０〕 前記工程Dにおける核酸分子の測定は、PCR法を用いることを特徴とする上記〔９〕に記載の追跡方法。

[0011] また、本発明の他の態様としては、流体を追跡するための組成物の製造方法であって、核酸分子と前記核酸分子を保持するリポソームを構成成分として含む追跡子を含む組成物を 15℃以上で 2 時間以上静置又は攪拌することを特徴とする前記方法である。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、核酸分子と保持体を追跡のための構成成分としているため、流体を追跡するうえで安定性が高く、回収効率が向上し、かつ蛍光塗料や塩化ナトリウムなどを含まない環境への悪影響が少ない追跡子を含有する組成物を提供することができる。また、前記組成物を用いることにより、環境への悪影響が少ない流体の追跡方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図 1 はリポソームに含有する DNA 量の安定性について示す図である。

(A) 精製水中における DNA の安定性を示したものである。(B) 地下水における DNA の安定性を示したものである。

[図2]図 2 は流体を追跡するための組成物の移動を確認するための水路試験の概略説明図である。(A) 水路試験で用いる試験装置を示したものである。

(B) 上流側水槽を流体で満たす工程を示したものである。(C) 管路が流体で満たされている状態を示したものである。(D) 上流側水槽に流体を追跡するための組成物を投入する工程を示したものである。(E) 流体を追跡するための組成物を含む流体が上流側水槽から管路を流れる状態を示したものである。(F) 流体を追跡するための組成物を含む流体が上流側水槽から下流側水槽に到達した状態を示したものである。(G) 流体を追跡するための組成物を含む流体が上流側水槽から下流側水槽に到達し、水位が平衡に達した状態を示したものである。

[図3]図 3 は下流側水槽における DNA 量の経時変化について示す図である。

(A) リポソーム化していない核酸分子を用いたものである。(B) 核酸分子を含有するリポソームを用いたものである。(C) 核酸分子含有リポソームの作製後、20℃で 4 時間ほど静置したものを用いたものである。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明に係る流体を追跡するための組成物（以下、「本件組成物」ともいう）及び当該組成物を用いた流体の追跡方法（以下、「本件追跡方法」ともいう）の実施形態を詳細に説明する。

なお、実施形態に記載する本件組成物及び本件追跡方法については、本発明を説明するために例示したに過ぎず、これに制限されるものではない。

[0015] [定義]

本明細書中において、「流体」とは、静止状態においてせん断応力が発生しない連続体である液体、気体、液体と気体の混合物を意味する。流体の具体例としては、地下水、河川、湖沼若しくは湧き水などの地表水などの陸水、下水管路を流下する下水などの下水、管路を流下する雨水などの雨水、大気などが挙げられ、油は含まれない。

本明細書中において、「供給源」とは、流体の移動元を意味する。

本明細書中において、「ヌクレオチド」とは、糖デオキシリボース、リボース、塩基、及びリン酸基を含む化合物を意味する。「塩基」には、天然化合物であるアデニンやグアニン、イノシンを含むプリン塩基、チミンやシトシン、ウラシルを含むピリミジン塩基が包含される。

[0016] [流体を追跡するための組成物]

本件組成物は、有機化合物である核酸分子と核酸分子に対する保持体を構成成分として含む追跡子を含有することを特徴とする流体を追跡するためのものである。これにより、核酸分子の安定性又は回収効率が向上するとともに、環境を汚染することなく追跡可能な組成物を提供することができる。

まず、組成物を構成する各成分について、詳細に説明する。なお、各成分の含有量について、特に断りがない場合は組成物における含有量を示す。

[0017] (核酸分子)

核酸分子は、ヌクレオチドがホスホジエステル結合で連なった有機高分子化合物である。核酸分子は、検出可能なものであれば、特に制限されるものではない。核酸分子としては、例えば、一本鎖DNA分子、一本鎖RNA分

子、二本鎖DNA分子、二本鎖RNA分子、DNA及びRNAのキメラ核酸分子、ロックド核酸、及びそれらの修飾体などが挙げられる。また、核酸分子は、天然型でも非天然型でもよい。さらに、直鎖状でも環状でもよい。好ましい核酸分子としては、安定性の観点から合成した二本鎖DNA分子である。また、核酸分子は測定対象の核酸と非測定対象の核酸を含有してもよい。非測定対象の核酸としては、プラスミドベクター、ウイルスベクターなどを挙げることができる。

[0018] 核酸分子の修飾は、特に制限されるものではない。核酸分子の修飾としては、例えば、ヌクレオチドを構成している糖又はリン酸骨格などの修飾が挙げられる。

ヌクレオチドの糖部の修飾の具体例としては、例えば、2'-O-メチルRNA、2'-O-(2-メトキシ)エチルRNA、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ核酸、架橋型核酸(LNA/BNA)などが挙げられる。また、ヌクレオチドの糖部をペプチドに置換したペプチド核酸、モルフォリノに置き換えたモルフォリノ核酸なども包含する。

リン酸骨格の修飾の具体例としては、例えば、ホスホロチオエート体、ホスホロジチオエート体などが挙げられる。

また、これらの核酸分子は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせ用いてもよい。これらの核酸分子については、流体の性質などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0019] 核酸分子の塩基長は、特に制限されるものではない。核酸分子の塩基長としては、例えば、60塩基以上5000塩基以下である。下限値としては、70塩基以上、80塩基以上、90塩基以上、100塩基以上、300塩基以上、500塩基以上、1000塩基以上であってもよい。一方、上限値としては、4000塩基以下、3000塩基以下である。また、核酸分子をPCR法によって測定する場合には、PCR法による測定対象の核酸、すなわちPCR法によって増幅される核酸の塩基長としては、30塩基以上1000塩基以下を挙げることができ、下限値としては、70塩基以上、80塩基

以上、90塩基以上であってもよい。一方、上限値としては、500塩基以下、300塩基以下、150塩基以下、130塩基以下、110塩基以下であってもよい。

[0020] また、PCR法による測定対象の核酸が2回以上繰り返し配置されてもよい。さらに、PCR法による測定対象の核酸の5'末端及び／又は3'末端に、上記PCR法による測定対象以外の核酸を配置してもよい。かかる核酸を配置することによって、PCR法による測定対象の核酸が流体中に何らかの影響で分解されてもPCR法による測定対象の核酸の分解を防ぎやすくすることが可能となる。上記PCR法による測定対象以外の核酸長としては下限としては30塩基以上、50塩基以上、100塩基以上、500塩基以上、1000塩基以上、2000塩基以上を挙げることができる。また、PCR法による測定対象の核酸を、ベクターを用いて大腸菌などの微生物によって増幅して調製した場合には、核酸分子として上記ベクターを構成する核酸を含有してもよい。

[0021] 測定対象の核酸としては、例えば、魚類の核DNAのITS1領域、又はミトコンドリアDNAのシトクロムb領域を挙げることができ、具体的にはコイ (*Cyprinus carpio*) の核DNAのITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) 領域における表1の配列番号1で示される塩基配列、アユ (*Plecoglossus altivelis*) のミトコンドリアDNAのシトクロムb領域における表1の配列番号2で示される塩基配列、ゼニタナゴ (*Acheilognathus typus*) のミトコンドリアDNAのシトクロムb領域における表1の配列番号3で示される塩基配列からなる核酸などが挙げられる。

[0022]

[表1]

配列番号	塩基配列
1	ACCGTGGGTTCAAAGACCCC CCGTAACAGGGGGCGCCCGT CCGGGGTCACGACCCCCCTT ATTTTTCAAAACCCCTGT GTGCGGCATGGCCTCGAAAA
2	CCTAGTCTCCCTGGCTTTAT TCTCTCCCAACCTTCTCGGG GACCCGGACAACCTTCACGGC AGCCAACCCCTCGTTACAC CCCCTCACATTAAGCCTGAG TGATACTTCCTTTTCGCCTA CGCCATTCTAC
3	GCGTTGTTCTCCCCCAATTT ACTAGGCGACCCAGAAAACT TCACCCCGCAAACCCACTT GTTACTCCCCCCCACATCAA ACCCGAGTGATACTTTCTGT TCGCCTACGCCATTTTA

[0023] (保持体)

保持体は、核酸分子を封入、内封、結合、吸着する物質である。保持体は、核酸分子を保持できるものであれば、特に制限されるものではない。保持体としては、例えば、リポソーム、ミセル、マイクロカプセル、ウイルス粒子、無機物粒子、土壌などが挙げられる。好ましい保持体としては、核酸分子の安定性や回収効率の観点から、リポソームである。

また、これらの保持体は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせで用いてもよい。これらの保持体については、流体の性質や流動性などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

なお、内封とは、核酸分子全体が保持体内部に存在している状態、又は核酸分子の一部が保持体内部に存在している状態を包含する。つまり、保持体内部に核酸分子の一部が存在する場合、核酸分子の残りの部分は、保持体を貫通又は隙間を介して保持体外部に存在することになる。

[0024] 保持体の粒子径は、特に制限されるものではなく、保持体の種類に応じて適宜調整可能である。保持体の粒子径としては、例えば、10 nm以上700 μ m以下である。下限値としては、より好ましくは200 nm以上、更に好ましくは500 nm以上、特に好ましくは1 μ m以上、更に好ましくは5 μ m以上である。一方、上限値としては、より好ましくは500 μ m以下、更に好ましくは300 μ m以下、特に好ましくは100 μ m以下である。保持体の粒子径を10 nm以上とすることにより、核酸分子を測定試料として

回収又は濃縮し易くすることができる。また、保持体の粒子径を $700\mu\text{m}$ 以下とすることにより、孔隙が狭い環境においても流体と同様の動きを示すことができる。

[0025] 保持体の平均粒子径は、特に制限されるものではなく、保持体の種類に応じて適宜調整可能である。保持体の平均粒子径としては、例えば、 50nm 以上 $200\mu\text{m}$ 以下である。下限値としては、より好ましくは 500nm 以上、更に好ましくは $1\mu\text{m}$ 以上、特に好ましくは $10\mu\text{m}$ 以上である。一方、上限値としては、より好ましくは $100\mu\text{m}$ 以下、更に好ましくは $80\mu\text{m}$ 以下、特に好ましくは $60\mu\text{m}$ 以下である。

[0026] 保持体の粒子径又は平均粒子径を上記範囲とすることにより、流体と同様の動きを示すとともに、核酸分子に対する保持能を高めることができるほか、核酸分子を測定試料として回収又は濃縮が容易となる。また、例えば流体が地下水の場合には、保持体は単一の粒子径のものでもよいが、所定の幅の粒子径の分布をもつ保持体の混合物としてもよい。かかる混合物とすることで、幅広い分布の間隙幅を有する地下環境においても保持体の追跡がより可能となる。具体的には、例えば保持体の粒子径の分布における幅の下限が $1\mu\text{m}$ 以上、 $10\mu\text{m}$ 以上、又は $30\mu\text{m}$ 以上であり、上限が $100\mu\text{m}$ 以下、 $70\mu\text{m}$ 以下、 $50\mu\text{m}$ 以下を挙げることができる。

[0027] リポソームは、脂質二重膜を有する球状の小胞である。リポソームは、核酸分子を保持できるものであれば、特に制限されるものではない。リポソームとしては、例えば、巨大単層リポソーム（GUV：Giant Unilamellar Vesicle）、小型単層リポソーム、多重層リポソームなどが挙げられ、粒子径の大きい巨大単層リポソームであることが好ましい。

核酸分子を封入、内封、結合、又は吸着したリポソームの製造方法は、核酸分子存在下で当業者に公知の方法で行えばよく、特に制限されるものではない。リポソームの製造方法としては、例えば、超音波処理法、逆相蒸発法、凍結融解法、脂質溶解法、噴霧乾燥法などが挙げられる。また、リポソ-

ムは、エクストルーダーなどを用いて孔径の小さいフィルターを通過させることで、特定範囲の粒子径に調節してもよいし、粒子径のばらつきを調整しなくてもよい。

[0028] リポソームの構成成分は、脂質二重膜を有する小胞を形成することができる。特に制限されるものではない。リポソームの構成成分としては、例えば、リン脂質、カチオン性脂質、コレステロール類などが挙げられる。また、これらの脂質やコレステロール類は、ポリエチレングリコール修飾、糖鎖修飾、水素添加などされていてもよい。

[0029] リン脂質の具体例としては、例えば、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンなどのホスファチジルコリン類、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンなどのホスファチジルエタノールアミン類、ジパルミトイルホスファチジルセリン、ジステアロイルホスファチジルセリンなどのホスファチジルセリン類、ジパルミトイルホスファチジン酸、ジステアロイルホスファチジン酸などのホスファチジン酸類、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール、ジステアロイルホスファチジルイノシトールなどのホスファチジルイノシトール類、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチンなどの天然リン脂質などが挙げられる。

[0030] カチオン性脂質の具体例としては、例えば、1, 2-ジオレオイルオキシ-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP)、ジオクタデシルジメチルアンモニウムクロリド、N-2, 3-ジオレイルオキシプロピル-N, N, -トリメチルアンモニウム、ジドデシルアンモニウムブロミド、1, 2-ジミリストイルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウム、2, 3-ジオレオイルオキシ-N-[2 (Sペルミンカルボキサミド) エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパナミウムトリフルオロアセテイトなどが挙げられる。

[0031] コレステロール類の具体例としては、例えば、コレステロール、3 β -[

N-（ジメチルアミノエタン）カルバモイル] コレステロール、N-トリメチルアンモニオエチルカルバモイルコレステロールなどが挙げられる。

脂質に修飾するポリエチレングリコールの分子量は、特に制限されるものではなく、例えば、1000Da、2000Da、5000Da、10000Da、20000Da、30000Da、40000Daなどが挙げられる。

また、これらのリポソーム構成成分は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせ用いてもよい。これらのリポソーム構成成分については、核酸分子や流体の性質などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0032] リポソームにおけるリン脂質、カチオン性脂質、コレステロール類の含有量は、特に制限されるものではない。リン脂質の含有量としては、例えば、リポソーム全体を100質量部として、10質量部以上100質量部以下である。下限値としては、より好ましくは30質量部以上、更に好ましくは50質量部以上、特に好ましくは70質量部以上である。一方、上限値としては、より好ましくは95質量部以下、更に好ましくは92質量部以下、特に好ましくは90質量部以下である。カチオン性脂質の含有量としては、例えば、リポソーム全体を100質量部として、0質量部以上80質量部以下である。下限値としては、より好ましくは10質量部以上、更に好ましくは20質量部以上、特に好ましくは30質量部以上である。一方、上限値としては、より好ましくは70質量部以下、更に好ましくは60質量部以下、特に好ましくは50質量部以下である。コレステロール類の含有量としては、例えば、リポソーム全体を100質量部として、0質量部以上50質量部以下である。下限値としては、より好ましくは5質量部以上、更に好ましくは8質量部以上、特に好ましくは10質量部以上である。一方、上限値としては、より好ましくは40質量部以下、更に好ましくは30質量部以下、特に好ましくは20質量部以下である。

[0033] ミセルは、両親媒性物質が会合した球状の分子集合体であり、環境、医療、医薬品、食品などの技術分野において許容されるものであれば、特に制限

されるものではない。また、ミセルの製造方法は、核酸分子存在下で当業者に公知の方法で行えばよく、特に制限されるものではない。

両親媒性物質としては、例えば、ポリアルキレングリコールやポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミドなどの親水性ブロック及びポリエステルやポリ無水物、ポリアミノ酸、ポリオルトエステル及びポリホスファゼンなどの疎水性ブロックの共重合体などが挙げられる。

両親媒性物質の具体例としては、例えば、ポリエチレングリコールーポリアスパラギン酸、ポリエチレングリコールーポリグルタミン酸、およびポリエチレングリコールーポリ（５－アミノペンチルーアスパラギン酸）、ポリエチレングリコールーポリリジン、ポリエチレングリコールーポリアルギニン、ポリエチレングリコールーポリエステル、ポリエチレングリコールーポリウレタン、ポリエチレングリコールーポリアクリラート、ポリエチレングリコールーポリメタクリラートなどの両親媒性ブロック共重合体が挙げられる。

また、これらの両親媒性物質は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせ用いてもよい。これらの両親媒性物質については、流体や核酸分子の性質などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0034] 親水性ブロックの分子量は、特に制限されるものではない。親水性ブロックの分子量としては、例えば、200Da以上50000Da以下である。下限値としては、より好ましくは500Da以上、更に好ましくは800Da以上、特に好ましくは1000Da以上である。一方、上限値としては、より好ましくは20000Da以下、更に好ましくは10000Da以下、特に好ましくは5000Da以下である。

疎水性ブロックの分子量は、特に制限されるものではない。疎水性ブロックの分子量としては、例えば、50Da以上50000Da以下である。下限値としては、より好ましくは200Da以上、更に好ましくは500Da以上、特に好ましくは1000Da以上である。一方、上限値としては、より好ましくは20000Da以下、更に好ましくは10000Da以下、特

に好ましくは5000Da以下である。

[0035] マイクロカプセルは、高分子化合物が球状の膜を形成したものであり、環境、医療、医薬品、食品などの技術分野において許容されるものであれば、特に制限されるものではない。また、マイクロカプセルの製造方法は、核酸分子存在下で当業者に公知の方法で行えばよく、特に制限されるものではなく、例えば、界面重合法、コアセルベーション法、界面沈澱法、液中乾燥法などが挙げられる。

高分子化合物としては、例えば、エチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ乳酸、ポリビニルピリジン、ポリメタクリル酸、ポリN-イソプロピルアクリルアミド、ポリスチレンスルホン酸塩、ポリアリルアミン、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、ポリジアリルジメチルー塩化アンモニウム、ポリピロール、ポリメタクリル酸メチル、ポリスチレン、ポリテトラヒドロフラン、ポリフタルアルデヒド、ポリヘキシルビオローゲン、ポリレーリジン、ポリレーアルギニン、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）などが挙げられる。

また、これらの高分子化合物は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせ用いてもよい。これらの高分子化合物については、流体や核酸分子の性質などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0036] ウイルス粒子は、核酸分子を内封するウイルスカプシドからなる粒子であり、病原性がなく、環境、医療、医薬品、食品などの技術分野において許容されるものであれば、特に制限されるものではない。ウイルス粒子としては、例えば、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス粒子、アデノウイルス粒子、バキュロウイルス粒子、パルボウイルス粒子、ヘルペスウイルス粒子、ポックスウイルス粒子、シンドビスウイルス粒子、セムリキ森林ウイルス粒子、ワクシニアウイルス粒子、レトロウイルスなどが挙げられる。

また、これらのウイルス粒子は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせ用いてもよい。これらのウイルス粒子については、流体や核酸分子の性質などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0037] 無機物粒子は、核酸分子に対する保持能を有する無機化合物の粒子であり、環境、医療、医薬品、食品などの技術分野において許容されるものであれば、特に制限されるものではない。無機物粒子としては、例えば、ガラス粒子、ハイドロキシアパタイト粒子、ゼオライト粒子、活性炭粒子などが挙げられる。

また、これらの無機物粒子は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせ用いてもよい。これらの無機物粒子については、流体や核酸分子の性質などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0038] 土壌は、核酸分子に対する吸着能を有する火山灰土などの土壌であれば、特に制限されるものではない。土壌に含まれる成分としては、例えば、黒ボク土、ベントナイト、アロフェンなどの自然由来で環境への悪影響が少ない鉱物が挙げられる。

[0039] 追跡子は、さらに、アミノ酸、タンパク質、糖、無機化合物、高分子化合物、磁性体などを含有しても良い。

[0040] 保持体としてリボソームを用いる場合には、本件組成物を製造後に直ちに使用してもよいが、核酸分子がリボソームに安定的に保持される観点から、一定の条件で静置又は攪拌した後に使用してもよい。

[0041] 核酸分子を保持したリボソームの静置又は攪拌する際の時間は、特に制限されるものではない。核酸分子を保持したリボソームの静置又は攪拌する際の時間としては、例えば、2時間以上である。下限値としては、より好ましくは3時間以上、更に好ましくは4時間以上、特に好ましくは5時間以上である。

核酸分子を保持したリボソームを静置又は攪拌する際の温度は、特に制限されるものではない。核酸分子を保持したリボソームを静置又は攪拌する際の温度としては、本発明を実施する際の気温や流体の温度に応じて適宜調整可能であるが、例えば、15℃以上30℃以下である。下限値としては、16℃以上、17℃以上、18℃以上、19℃以上、20℃以上、21℃以上、22℃以上であってもよい。上限値としては、27℃以下、25℃以下で

あってもよい。核酸分子を保持したリボソームの静置又は攪拌する時間、温度を上記範囲とすることにより、リボソームにおける核酸分子に対する保持能を安定化することができる。

一定の条件で静置又は攪拌における時間及び温度条件の具体例としては、20℃以上で2時間、20℃以上で3時間、又は20℃以上で4時間を挙げることができる。なお、上記一定の条件で静置又は攪拌した後の核酸が保持されたリボソームを含む組成物の構造は極めて複雑であり、その構造を解析することは技術的に不可能であるか、又は、その構造を特定する作業を行うことに著しく過大な経済的支出や時間を要する。そのため、本件組成物の説明において「核酸分子を保持する前記リボソームの製造後、20℃以上で2時間以上静置又は攪拌されたものである」と記載することには、いわゆる「不可能・非実際的事情」が存在する。

[0042] 核酸分子を保持したリボソームの静置又は攪拌は、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液などの緩衝液、地下水、地表水、下水、雨水、水、蒸留水、又はこれらの混合物等の水溶液中で行ってもよい。緩衝液を用いる場合には、pH 4～9、好ましくはpH 6～8、より好ましくはpH 7～7.7を挙げることができる。

[0043] 静置又は攪拌した核酸分子を保持したリボソームは、その後必要に応じて15℃以下で静置又は保存して用いてもよい。また、本件組成物は、使用時まで冷蔵保存又は凍結保存してもよい。

(その他の成分)

[0044] 本件組成物は、地下水、地表水、下水、雨水、水、蒸留水、又はこれらの混合物等の水溶液を含んでもよく、また、かかる水溶液中に分散されていてもよい。地下水としては、流体の供給源の環境における地下水を好適に挙げることができる。

[0045] 以上の特徴により、本件組成物は、環境への悪影響が小さい核酸分子と核酸分子に対する保持体を構成成分として含む追跡子を含有することにより、核酸分子の安定性や回収効率が向上し、かつ環境への悪影響が少ない追跡子

を含有する組成物とすることが可能である。

[0046] [流体の追跡方法]

本発明の流体の追跡方法は、（１）本発明である流体を追跡するための組成物を準備する工程Ａ、（２）前記組成物を流体の供給源に投入する工程Ｂ、（３）前記供給源と異なる観測地点における流体の試料を準備する工程Ｃ、（４）前記流体の試料に含まれる核酸分子を測定する工程Ｄの工程を有することを特徴とする方法である。これにより、流体の追跡に対するうえでの安定性及び核酸分子の回収効率が向上するとともに、環境を汚染することなく安全に追跡可能な方法を提供することができる。

まず、本件追跡方法を構成する各工程について、詳細に説明する。

[0047] （流体を追跡するための組成物の準備）

工程Ａは、流体を追跡するための組成物を準備するための工程である。これにより、流体の追跡方法で用いる流体を追跡可能な組成物を準備することができる。

流体を追跡するための組成物は、特に制限されるものではなく、例えば、上記「流体を追跡するための組成物」の項の説明を充足するものであればよい。

[0048] （流体を追跡するための組成物の投入）

工程Ｂは、準備した流体を追跡するための組成物を流体の供給源に投入するための工程である。

流体を追跡するための組成物を流体の供給源に投入する方法は、特に制限されるものではなく、環境資源調査、環境汚染調査、建築、土木などの技術分野及びその基礎研究分野において使用されている通常的手段を用いることができる。

流体の供給源は、流体を追跡するための組成物を投入できれば、特に制限されるものではない。流体の供給源としては、例えば、地面に掘削した孔に存在する地下水、地表水、下水、雨水、井戸水、湧き水、人工構造物における漏水などが挙げられる。

[0049] (観測地点における流体試料の準備)

工程Cは、供給源と異なる観測地点における流体の試料を準備するための工程である。これにより、観測地点の流体に含まれる核酸分子を測定するための試料を確保することができる。

観測地点における流体の試料を準備する方法は、特に制限されるものではなく、環境資源調査、環境汚染調査、建築、土木などの技術分野及びその基礎研究分野において使用されている通常の手段を用いることができる。

観測地点における流体の回収方法は、本発明の核酸分子を保存できるものであれば、特に制限されるものではない。流体の回収方法としては、例えば、流体の揚水、堆積物の採取、土壌からの流体の抽出などが挙げられる。

なお、核酸分子の検出感度を向上するために、測定前に測定試料をフィルターなどで処理することにより、核酸分子の回収又は濃縮などを行ってもよい。本件組成物に含有する追跡子は、核酸分子よりも大きいため回収効率が高く、効果的な濃縮処理を行うことができる。

核酸分子の回収又は濃縮にフィルターを用いる場合は、用いる保持体の平均粒子径に応じて適宜調整可能であるが、孔径が0.2～2.0 μm 、具体的には、0.5 μm 、0.7 μm 、1.0 μm のものが好ましい。

[0050] (核酸分子の測定)

工程Dは、観測地点における流体の試料に含まれる核酸分子を測定するための工程である。これにより、観測地点における本件組成物の存在を確認することができる。

核酸分子の測定方法は、特に制限されるものではなく、環境、医療、医薬品、食品などの技術分野及びその基礎研究分野において使用されている通常の手段を用いることができる。

核酸分子の測定方法としては、例えば、核酸数を増幅するPCR (Polymerase Chain Reaction) 法、電気泳動法、吸光分析法、蛍光分析法、高速液体クロマトグラフィー同位体希釈質量分析法、誘導結合プラズマ発光分析法、誘導結合プラズマ質量分析法などを利用する方

法が挙げられる。

また、これらの核酸分子の測定方法は、単独で用いてもよいし、二種以上を組み合わせて用いてもよい。これらの核酸分子の測定方法については、核酸分子の性質などに応じて公知のものから適宜設定すればよい。

[0051] 以上の特徴により、本件追跡方法は、環境への悪影響が小さい核酸分子と核酸分子に対する保持体を構成成分として含む追跡子を用いることにより、核酸分子の安定性や回収効率が向上し、かつ環境を汚染することなく追跡可能な方法を提供することが可能である。

実施例

[0052] 以下、本発明の実施例について述べるが、本発明はこれらの実施例のみに制限されるものではなく、本発明の技術的思想内において様々な変形が可能である。

[0053] [実施例 1]

実施例 1 では、後述の実施例 2 の水路試験で用いる核酸分子封入リポソームを作製した。また、作製した核酸分子封入リポソームの特性を解析した。

[0054] (核酸分子封入リポソームの作製)

核酸分子封入リポソームを含有する試料は、核酸分子及び 20 mL の 20 mM リン脂質 (1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (DOPC) : 1, 2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム) プロパン (DOTAP) = 2 : 1 (モル比)) 含有リン酸緩衝液 (pH 7.2) を原料として核酸分子封入リポソームを作製した (橋本電子工業株式会社に作製依頼)。上記核酸分子は、3.8 ng のコイ (*Cyprinus carpio*) の核 DNA の ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) 領域における表 2 の配列番号 1 で示される塩基配列からなる核酸 (ユーロフィンジェノミクス株式会社にて合成) を pMD-21 ベクターに組み込み、大腸菌 JM109 に形質転換して培養した後、大腸菌からベクターを回収し、かかる回収したベクターを制限酵素 BamHI で処理して直鎖状 DNA としたものをを用いた。

なお、作製した核酸分子封入リボソームは巨大単層リボソーム（GUV）であり、製造後のろ過により粒子径は、 $1\ \mu\text{m}$ から $35\ \mu\text{m}$ の範囲に分布したものをを用いた。

[0055] [表2]

配列番号	塩基配列
1	ACCGTGGGTTCAAAGACCCC CCGTAACAGGGGGCGCCCCGT CCGGGGTCACGACCCCCCTT ATTTTTTCCAAAACCCCTGT GTGCGGCATGGCCTCGAAAA

[0056] （核酸分子封入リボソームにおける核酸封入率の測定）

作製した核酸分子封入リボソームを含有する試料を透析チューブ（F l o a t - A - L y z e r G2、MWCO：1000kD、P/N：G235037、SPECTRUM LABORATORIES, INC.）を用いて48時間透析し、未封入の核酸分子を取り除いた。リボソームにおける核酸分子の封入率は、透析した試料と透析前の試料の260nmにおける吸光度を分光光度計（U-2800A、日立ハイテクサイエンス）で測定（橋本電子工業株式会社にて測定）して、下記の式1より百分率として算出した。

[0057] [数1]

$$\text{封入率 (\%)} = \frac{\text{透析後のリボソーム封入DNAの吸光度 (A}_{260})}{\text{透析前のリボソーム封入DNAの吸光度 (A}_{260})} \times 100 \dots\dots \text{式1}$$

[0058] （核酸分子封入リボソームの安定性試験）

試験水は、精製水又は地下水（日本工営株式会社中央研究所内の井戸より採水）に、核酸分子封入リボソームを含有する試料を添加して、核酸分子濃度が 2.0×10^6 コピー/ μl となるように調整して500mLとした。分析用試料は、10℃環境下に保管した各試験水から、0時間、0.5時間、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間経過時に3検体5mLずつ採水した。採水した分析用試料は、粒子保持径 $0.7\ \mu\text{m}$ （GF/F）のガラスフィルター（GF/F47mm、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社）でろ過して、5

μ l の 10%ベンザルコニウム水溶液で処理した。

分析用試料に含まれるDNA量は、表3のプライマーセットを用いたPCR法によりコイの核DNAのITS1領域を増幅した後に、DNA検出装置（Piko Real Real-Time PCR System、Thermo Fisher Scientific社）で測定した。PCR法の条件は、50℃で2分、95℃で10分処理した後に、95℃で15秒と60℃で1分での処理を55サイクルし、50℃で1分、30℃で30秒処理した。

なお、プローブは配列番号6に示される塩基配列からなる核酸の5'末端に蛍光物質FAM、3'末端に消光物質であるTAMRAが連結したプローブを用いた。

[0059] [表3]

配列番号	塩基配列	プライマーセット
4	5'-TTCAAAGACCCCCCGTAAC-3'	フォワードプライマー
5	5'-GCCATGCCGCACACA-3'	リバースプライマー
6	5'-TCACGACCCCTTATTTTTTCCAAAACC-3'	プローブ

[0060] （結果1：核酸分子封入リポソームにおける核酸封入率）

核酸分子封入リポソームを含有する試料において、核酸分子の封入率を3回測定した結果、核酸分子の84.6%が、リポソームに封入されたことが示された。つまり、3.8ngの核酸分子のうち3.2ngがリポソームに封入されたことが確認できた。

[0061] （結果2：核酸分子封入リポソームの安定性）

図1は、精製水又は地下水中におけるリポソームに含有するDNA量の安定性について示したものである。

図1（A）に示すように、精製水中に添加した核酸分子封入リポソームは、96時間にわたり安定して核酸分子を保持していることが示された。また、図1（B）に示すように、地下水中に添加した核酸分子封入リポソームは、図1（A）に示した精製水中と同様に安定して核酸分子を保持しているこ

とが示された。このことから、本発明の核酸分子封入リポソームは、精製水であっても、不純物が含まれている地下水であっても十分な安定性を発揮することが認められた。

[0062] 以上の結果から、本発明の核酸分子封入リポソームは、安定性を有することが明らかとなった。

[0063] [実施例 2]

実施例 2 では、実施例 1 で作製した核酸分子封入リポソームが、流体を追跡できるか検討した。

[0064] (水路試験)

水路試験は、図 2 (A) に示す試験装置を用いた。試験装置は、流体の供給源に相当するアクリル樹脂製の上流側水槽と、観測地点に相当するアクリル樹脂製の下流側水槽を内径 8 cm、長さ 100 cm のアクリル樹脂製の管路で連結したものである。管路には、粒径 2 ~ 3 mm の珪砂を 6.9 kg 詰めた。管路の間隙率は 52.7 % である。各水槽の大きさは、32 cm × 37 cm × 45 cm である。

試験装置の準備として、管路上流端の蓋を外した状態で、上流側水槽へ水道水を注水し (図 2 (B))、管路下流端が浸水する水位で管路上流端に蓋をした (図 2 (C))。次に、上流側水槽に実施例 1 で作製した核酸分子封入リポソームを含有する試料を添加して、核酸分子濃度が 1.0×10^6 コピー / μ l となるように調整した (図 2 (D))。

水路試験は、管路上流端の蓋を外し、上流側水槽から下流側水槽に流体を流動させた (図 2 (E) ~ (G))。分析用試料は、管路上流端の蓋を外してから 0 分、5 分、10 分、15 分、20 分、30 分、40 分、50 分、60 分、120 分、180 分、240 分、300 分、360 分、420 分経過時に、下流側水槽の試験水を 3 検体 100 mL ずつ採水した。採水した分析用試料は、0.1 mL の 10 % ベンザルコニウム水溶液で処理した。なお、水路試験は、10 °C 又は 20 °C の環境下で行った。また、上流側水槽と下流側水槽の水位は、120 分から 180 分の間に均等となった。

分析用試料に含まれるDNA量の測定方法は、実施例1の（核酸分子封入リポソームの安定性試験）の項の説明と同様である。

[0065] 対照群は、リポソームに封入しない核酸分子を含有する試料を、核酸分子濃度が 1.0×10^6 コピー/ μ lとなるように上流側水槽へ添加して、上記と同様に水路試験を行った。

対照群として使用した核酸分子は、アユ（*Plecoglossus altivelis*）のミトコンドリアDNAのシトクロムb領域における表4の配列番号2で示される塩基配列からなる核酸（ユーロフィンジェノミクス株式会社にて合成）をpMD-21ベクターに組み込み、大腸菌JM109に形質転換して培養した後に大腸菌からベクターを回収して制限酵素BamHIで処理した直鎖状DNAからなる核酸分子を用いた。また、対照群のDNA量の測定方法について、表5のプライマーセットを用いたこと以外は、実施例1の（核酸分子封入リポソームの安定性試験）の項の説明と同様である。なお、プローブは配列番号9に示される塩基配列の5'末端に蛍光物質FAM、3'末端に消光物質であるTAMRAが連結したプローブを用いた。

[0066] [表4]

配列番号	塩基配列
2	CCTAGTCTCCCTGGCTTTAT TCTCTCCCAACCTCTCSCGG GACCCGGGACAACTTCACGGC AGCCAACCCCTCGTTACAG CCCTCAGATTAAAGCCTGAG TGATACITCCITTTCCCTA CGCCATTCTAC

[0067] [表5]

配列番号	塩基配列	プライマーセット
7	5'-CCTAGTCTCCCTGGCTTTATTCTCT-3'	フォワードプライマー
8	5'-GTAGAAATGGCGTAGGCGAAAA-3'	リバースプライマー
9	5'-ACTTCACGGCAGCCAACCCCC-3'	プローブ

[0068] （結果）

図3は、下流側水槽におけるDNA量の経時変化を示したものである。

図3（A）、（B）に示すように、リポソームに封入しない核酸分子と核酸分子封入リポソームを比較すると、核酸分子はリポソームに封入することにより、下流側水槽で検出されるDNA量が多くなるとともに、安定して検出できることが示された。

[0069] また、図3（C）は、核酸分子封入リポソームとして、核酸分子封入リポソームの作製後、更にリポソーム含有溶液を予めくみ置きした上流側水槽の水で希釈し、室温（20℃）で4時間静置したものを用いた際の水路試験の結果である。

図3（B）、（C）に示すように、核酸分子封入リポソームの作製後に静置処理をしたものと、未処理の核酸分子封入リポソームを比較すると、核酸分子封入リポソームを静置処理することにより、下流側水槽で検出されるDNA量が上昇することが示された。

[0070] 以上の結果から、本発明の核酸分子封入リポソームは、リポソーム化されていない核酸分子に比して、流体に対する追跡能が顕著に向上することが明らかとなった。

産業上の利用可能性

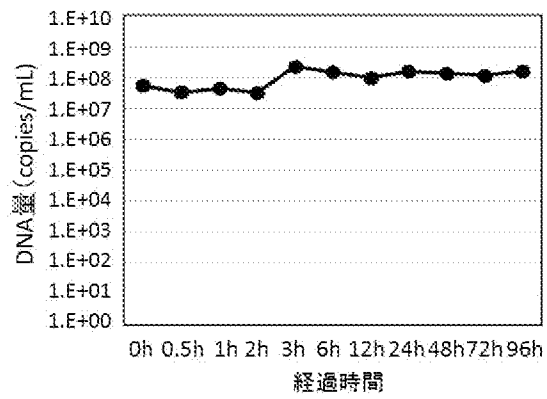
[0071] 本発明の流体を追跡するための組成物及び流体の追跡方法によって、流体の追跡調査における追跡能及び環境に対する安全性を向上することができる。これにより、環境汚染の調査、地盤や土地利用の評価、人工構造物の漏水試験、管路（下水管路及び雨水管路）や地下水等の流達範囲や流達時間の測定、換気状況や効率の評価などを効果的に実施することができる。

請求の範囲

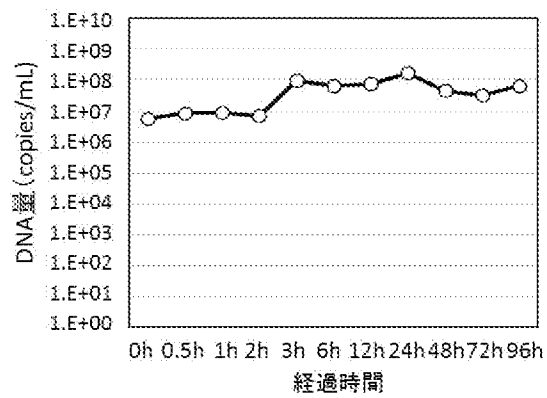
- [請求項1] 核酸分子と前記核酸分子を保持する保持体を構成成分として含む追跡子を含有することを特徴とする流体を追跡するための組成物。
- [請求項2] 前記核酸分子は、DNA分子、RNA分子、DNA及びRNAのキメラ核酸分子からなる群から選択される少なくとも一つであることを特徴とする請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記保持体は、リボソームであることを特徴とする請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記リボソームの平均粒子径が $1\ \mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする請求項3に記載の組成物。
- [請求項5] 前記核酸分子を保持する前記リボソームの製造後、 15°C 以上で2時間以上静置又は攪拌されたものであることを特徴とする請求項3又は4に記載の組成物。
- [請求項6] 前記核酸分子は、配列番号1～3のいずれかに示される塩基配列を含むことを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項7] 前記流体は、地下水、地表水、下水又は雨水であることを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項8] 前記組成物を投入する供給源から得られた流体を含有することを特徴とする請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項9] (1) 請求項1～8のいずれか一項に記載の組成物を準備する工程A、
(2) 前記組成物を流体の供給源に投入する工程B、
(3) 前記供給源と異なる観測地点における流体の試料を準備する工程C、
(4) 前記流体の試料に含まれる核酸分子を測定する工程D、
の工程を有することを特徴とする流体の追跡方法。
- [請求項10] 前記工程Dにおける核酸分子の測定は、PCR法を用いることを特徴とする請求項9に記載の追跡方法。

[図1]

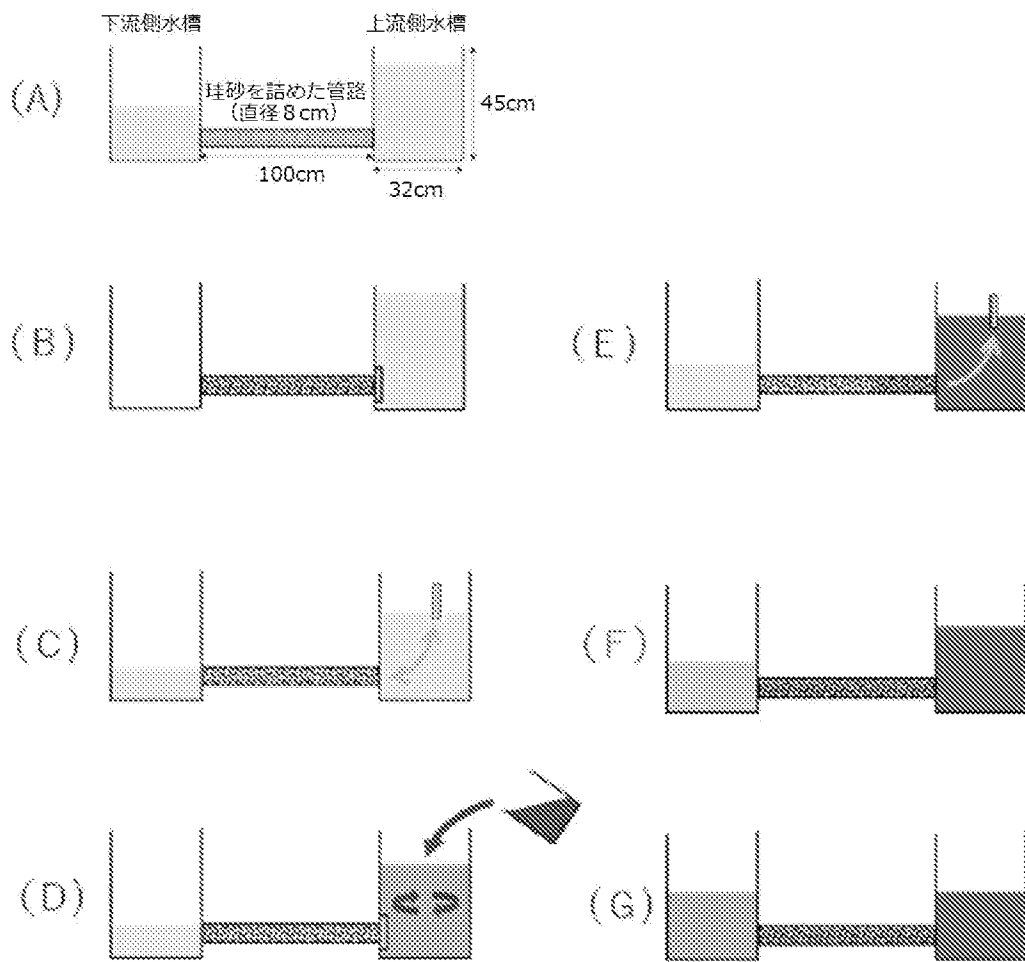
(A) リボソーム 10°C 精製水



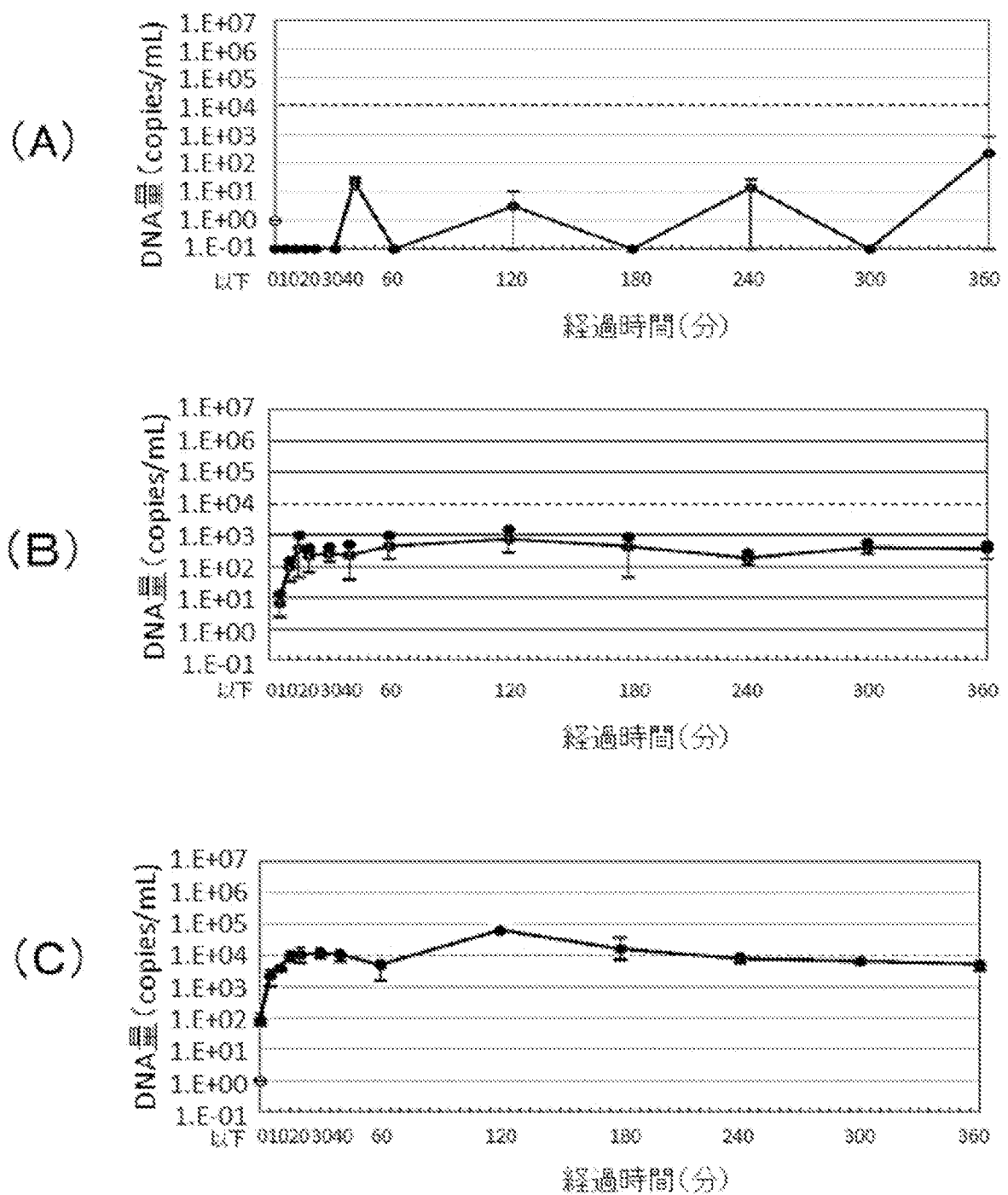
(B) リボソーム 10°C 地下水



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/030610

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12Q 1/6851*(2018.01)i; *C12Q 1/686*(2018.01)i

FI: C12Q1/6851 Z ZNA; C12Q1/686 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/6851; C12Q1/686

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIAO, R. et al., Biopolymer/plasmid DNA microspheres as tracers for multiplexed hydrological investigation. Chemical Engineering Journal. 24 June 2020, vol. 401, Article 126035, pages 1-9 abstract, page 7, right column, second paragraph, page 8, left column, second to third paragraphs, fig. 1, 6	1-2, 7-10
Y	abstract, page 7, right column, second paragraph, page 8, left column, second to third paragraphs, fig. 1, 6	1-10
X	PANG, L. et al., Water tracking in surface water, groundwater and soils using free and alginate-chitosan encapsulated synthetic DNA tracers. Water Research. 16 July 2020, vol. 184, Article 116192, pages 1-11 abstract, page 1, right column, first paragraph to page 2, left column, fourth paragraph, page 3, left column, sixth paragraph to page 4, right column, first paragraph	1-2, 7-10
Y	abstract, page 1, right column, first paragraph to page 2, left column, fourth paragraph, page 3, left column, sixth paragraph to page 4, right column, first paragraph	1-10

☒ 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

28 September 2021

Date of mailing of the international search report

12 October 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/030610**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIAO, R. et al., A DNA Tracer System for Hydrological Environment Investigations. Environmental Science & Technology. 2018, vol. 52, no. 4, pages 1695-1703 abstract, page 1697, right column, 3rd paragraph to page 1699, left column, first paragraph, page 1699, right column, third paragraph to page 1700, left column, second paragraph, fig. 1, 3, table 2	1-2, 7-10
Y	abstract, page 1697, right column, thrrd paragraph to page 1699, left column, first paragraph, page 1699, right column, third paragraph to page 1700, left column, second paragraph, fig. 1, 3, table 2	1-10
Y	JP 2002-538096 A (LIPOSOME CO. INC.) 12 November 2002 (2002-11-12) paragraphs [0003], [0008]	1-10
Y	JP 2003-535832 A (BOULIKAS, Teni) 02 December 2003 (2003-12-02) paragraph [0081]	1-10
Y	JP 2008-531481 A (UNIV. TEXAS) 14 August 2008 (2008-08-14) paragraph [0166]	1-10
Y	JP 2004-513624 A (STATENS INST. FOR FOLKEHELSE) 13 May 2004 (2004-05-13) paragraphs [0015], [0033]	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/030610

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2002-538096	A	12 November 2002	US 7491409 B1 column 1, third paragraph, column 2, third paragraph WO 2000/051565 A1 EP 1156783 B1	
JP	2003-535832	A	02 December 2003	US 2003/0072794 A1 paragraph [0097] WO 2001/093836 A2 EP 1292284 A2	
JP	2008-531481	A	14 August 2008	US 2007/0009484 A1 paragraph [0219] WO 2006/086798 A2 EP 1863516 A2	
JP	2004-513624	A	13 May 2004	US 2004/0101869 A1 paragraphs [0015]-[0017] WO 2002/018635 A2 EP 1320631 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/6851(2018.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i FI: C12Q1/6851 Z ZNA; C12Q1/686 Z														
B. 調査を行った分野														
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/6851; C12Q1/686														
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2021年													
日本国実用新案登録公報	1996-2021年													
日本国登録実用新案公報	1994-2021年													
国際調査で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); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq														
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	LIAO R. et al., Biopolymer/plasmid DNA microspheres as tracers for multiplexed hydrological investigation, Chemical Engineering Journal, 2020.06.24, Vol.401, Article 126035, p.1-9 要約、第7頁右欄第2段落、第8頁左欄第2段落～第3段落、Fig. 1、6	1-2, 7-10												
Y	要約、第7頁右欄第2段落、第8頁左欄第2段落～第3段落、Fig. 1、6	1-10												
X	PANG L. et al., Water tracking in surface water, groundwater and soils using free and alginate-chitosan encapsulated synthetic DNA tracers, Water Research, 2020.07.16, Vol.184, Article 116192, p.1-11 要約、第1頁右欄第1段落～第2頁左欄第4段落、第3頁左欄第6段落～第4頁右欄第1段落	1-2, 7-10												
Y	要約、第1頁右欄第1段落～第2頁左欄第4段落、第3頁左欄第6段落～第4頁右欄第1段落	1-10												
☒ 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。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“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	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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	
* 引用文献のカテゴリー	“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													
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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													
“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	“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													
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“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														
国際調査を完了した日 28.09.2021	国際調査報告の発送日 12.10.2021													
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 伊藤 良子 4N 3644 電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

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	LIAO R. et al., A DNA Tracer System for Hydrological Environment Investigations, Environmental Science & Technology, 2018, Vol.52, No.4, p.1695-1703 要約、第1697頁右欄第3段落～第1699頁左欄第1段落、第1699頁右欄第3段落～第1700頁左欄第2段落、Figure 1、3、Table 2	1-2, 7-10
Y	要約、第1697頁右欄第3段落～第1699頁左欄第1段落、第1699頁右欄第3段落～第1700頁左欄第2段落、Figure 1、3、Table 2	1-10
Y	JP 2002-538096 A (ザ リボソーム カンパニー、インコーポレーテッド) 12.11.2002 (2002 - 11 - 12) [0003]、[0008]	1-10
Y	JP 2003-535832 A (ブリカス、テニ) 02.12.2003 (2003 - 12 - 02) [0081]	1-10
Y	JP 2008-531481 A (ボード オブ リージェンツ、ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム) 14.08.2008 (2008 - 08 - 14) [0166]	1-10
Y	JP 2004-513624 A (ナショナルテ フォールケヘルセ インスティトゥット) 13.05.2004 (2004 - 05 - 13) [0015]、[0033]	1-10

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/030610

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2002-538096	A	12.11.2002	US 7491409 B1	
				第1欄第3段落、第2欄第3段落	
				WO 2000/051565 A1	
				EP 1156783 B1	
JP	2003-535832	A	02.12.2003	US 2003/0072794 A1	
				[0097]	
				WO 2001/093836 A2	
				EP 1292284 A2	
JP	2008-531481	A	14.08.2008	US 2007/0009484 A1	
				[0219]	
				WO 2006/086798 A2	
				EP 1863516 A2	
JP	2004-513624	A	13.05.2004	US 2004/0101869 A1	
				[0015] - [0017]	
				WO 2002/018635 A2	
				EP 1320631 A2	