

(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
2018年11月1日(01.11.2018)



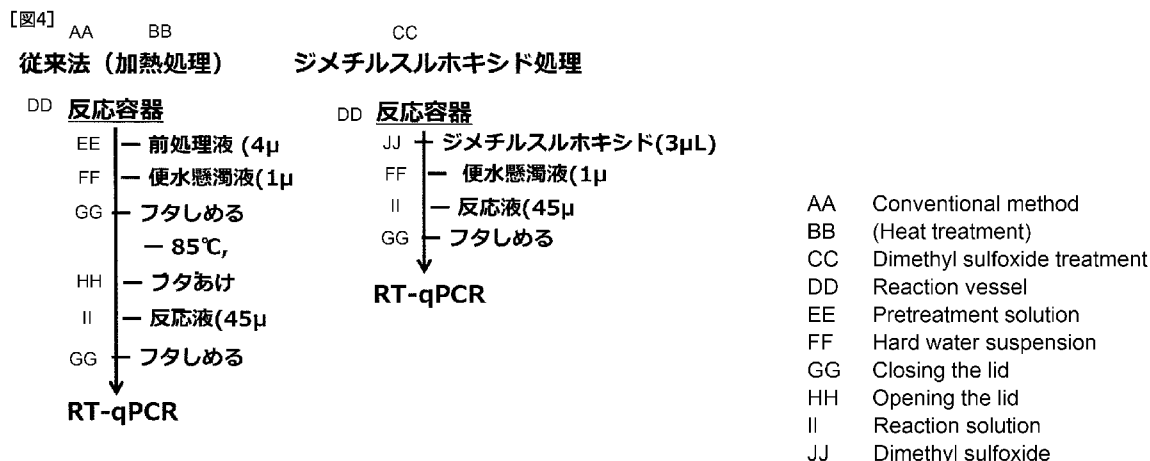
(10) 国際公開番号

WO 2018/198682 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/686 (2018.01) *C12Q 1/70* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/014068
- (22) 国際出願日: 2018年4月2日(02.04.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2017-087293 2017年4月26日(26.04.2017) JP
特願 2018-021711 2018年2月9日(09.02.2018) JP
- (71) 出願人: 東洋紡株式会社(TOYOBO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜
二丁目2番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 寺内 謙太 (TERAUCHI, Kenta);
〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24
号 東洋紡株式会社内 Fukui (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,

(54) Title: VIRUS TEST METHOD AND VIRUS TEST KIT

(54) 発明の名称: ウイルスの検査方法およびウイルスの検査用キット



(57) Abstract: Provided are a method and a kit with which it is possible to detect the presence of RNA of a non-enveloped virus by addition to a reaction solution and one-step RT-PCR without isolation of the RNA from a sample or advance heat treatment of the sample. A method for testing whether or not a virus is present, the method comprising the following steps (1) to (3). (1) A step for mixing a sample and a reagent that contains a polar organic solvent. (2) A step for adding a one-step RT-PCR reaction solution that contains reverse transferase and DNA polymerase, or DNA polymerase having reverse transcription activity, to the mixed solution. (3) A step for performing a one-step RT-PCR reaction after sealing the reaction vessel.

[続葉有]

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：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：試料からRNAの単離や試料の事前の加熱処理を行うことなく、反応液に加え、1ステップRT-PCRにより非エンベロープウイルスのRNAの有無の検出を可能とする方法およびキットを提供する。以下の（１）から（３）の工程からなるウイルスの存在の有無を検査するための方法。
（１）試料と極性有機溶媒を含む試薬を混合する工程、（２）前記混合液に逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ、または逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を添加する工程、（３）反応容器を密閉後、1ステップRT-PCR反応を実施する工程。

明 細 書

発明の名称： ウイルスの検査方法およびウイルスの検査用キット 技術分野

[0001] 本発明は、核酸増幅によるウイルスの検出法に関する。より具体的には、試料から核酸の単離や加熱処理をすることなく、試料を極性有機溶媒と混合後、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（q R T－P C R）の反応液を加えることによる、例えば糞便試料または環境拭き取り試料などに含まれている、エンベロープを持たないRNAウイルスの検出に関する。本発明は、生命科学研究、臨床診断や食品衛生検査、環境検査等にも利用できる。

背景技術

[0002] 核酸増幅法は数コピーの標的核酸を可視化可能なレベル、すなわち数億コピー以上に増幅する技術であり、生命科学研究分野のみならず、遺伝子診断、臨床検査といった医療分野、あるいは、食品や環境中の微生物検査等においても、広く用いられている。

代表的な核酸増幅法は、P C R（P o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n）である。P C Rは、（１）熱処理によるDNA変性（２本鎖DNAから１本鎖DNAへの解離）、（２）鋳型１本鎖DNAへのプライマーのアニーリング、（３）DNAポリメラーゼを用いた前記プライマーの伸長、という３ステップを１サイクルとし、このサイクルを繰り返すことによって、試料中の標的核酸を増幅する方法である。アニーリングと伸長を同温度で、２ステップで行う場合もある。

[0003] RNAを分析する場合、このP C Rの前段として、鋳型RNAをc D N Aに変換する逆転写（R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n ; R T）を実施する。これをR T－P C Rという。このR T－P C Rは、（１）R T、P C Rを非連続に実施する２ステップR T－P C R、（２）R T、P C Rを、単一酵素を利用して連続して実施する一酵素系１ステップR T－P C R、（３）逆転写酵素とDNAポリメラーゼの２種類の酵素を利用して、R T

、PCRを連続的に実施する二酵素系1ステップRT-PCRの3つに大別される。

[0004] RT-PCRのうち、遺伝子検査では、処理能力の高さや、反応途中での反応容器の開閉によるコンタミネーションを回避するため、1ステップRT-PCRが好まれる。一酵素系1ステップRT-PCRでは、Tth DNAポリメラーゼやTaq DNAポリメラーゼなどの逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼが利用される。一方、二酵素1ステップRT-PCRでは、逆転写酵素とDNAポリメラーゼの少なくとも2種類の酵素が使用される。

[0005] 逆転写酵素としては、レトロウイルスあるいは細菌由来の逆転写酵素（例えば、MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus; モロニーマウス白血病ウイルス)-RT (Reverse Transcriptase)、AMV (Avian Myeloblastosis Virus; トリ骨髓芽球症ウイルス)-RT、HIV (Human Immunodeficiency Virus)-RT、RAV (Rous-associated virus) 2-RT、EIAV (Equine Infectious Anemia Virus)-RT、カルボキシドサーマス・ハイドロゲノフォルマン (Carboxydotherrmus hydrogenoformans) DNAポリメラーゼなど) やこれらの変異体が利用される。また、DNAポリメラーゼとしては、Taq、Tth、Bst、KOD、Pfu、Pwo、Tbr、Tfi、Tfl、Tma、Tne、Vent、DEEPVENTやこれらの変異体などが利用される。

[0006] 一酵素系1ステップRT-PCR法は、2ステップRT-PCRよりも感度が低いことが知られる（非特許文献1）。これに対し、二酵素系1ステップRT-PCRは、DNAポリメラーゼの逆転写酵素活性と比べ、レトロウイルス由来の逆転写酵素の逆転写効率が高いことから、単一酵素共役RT-PCRよりも感度が高いとされる（非特許文献2）。しかし、二酵素系1ス

テップRT-PCRは、2ステップRT-PCRよりも感度が高いが、逆転写酵素とDNAポリメラーゼが干渉し、反応効率を低下させることが報告されている（非特許文献3）。この干渉を抑えるため、鋳型RNAの増加、非ホモログtRNA、T4遺伝子32タンパク質、あるいは逆転写酵素に対するDNAポリメラーゼ比率の増加などの使用が行われてきた。

[0007] 例えば、病原性RNAウイルスの一つであるノロウイルスは、急性胃腸炎の原因となる1本鎖RNAウイルスである。感染力が強く、集団食中毒や集団感染を引き起こすことから、公衆衛生上関心の高いウイルスである。ノロウイルスはGenogroup I（G1）及びGenogroup II（G2）の2つの遺伝子群に分類される。ノロウイルスの病原体検査では、組織培養法が確立できておらず、電子顕微鏡法、ELISAによる免疫学的抗原検出法、または核酸増幅技術を利用したウイルス遺伝子の検出法が開発されてきた。このうち、厚生労働省医薬食品局安全部監視安全課の通知（食安監1105001号）に基づくRT-PCR法が公定法として普及している。

[0008] ノロウイルスの感染の原因として主にノロウイルスに汚染された食品を飲食することによるが、ヒトの手を介した感染が多いため、調理施設、医療現場、老人介護施設及び保育園などでは定期的な検便検査が求められている。大量調理施設衛生管理マニュアルには、調理従事者等の検便検査に、必要に応じてノロウイルスの流行期である10月から3月についてノロウイルスの検査を含めることが追加されている。これはウイルスに感染していても症状がでない人（健康保因者）が少なからず存在し、これらの人たちが知らず知らずのうちに感染を広げる可能性があるためである。さらに、下痢や嘔吐などの症状がある調理従事者は医療機関を受診し、ノロウイルスに感染していることが判明した場合はリアルタイムPCR等の高感度検査を実施し、ノロウイルスを保有していないことが確認されるまでは食品に直接触れる調理作業を控えるなどの適切な処置をとることが望まれている。

[0009] ノロウイルスは、エンベロープを持たない、約30nmのキャプシドタンパク質からなる正二十面体構造を持ったウイルスである。このキャプシド構

造にウイルスRNAゲノムが封入される。そこで、従来、糞便試料からのノロウイルスの検出は、例えば糞便の10%乳剤を作製し、遠心上清から市販のウイルスRNA抽出キットを用いてRNAを抽出・精製し、このRNA抽出液を用いてノロウイルスの検出が行われてきた（食安監1105001号）。しかし、短時間で多数の検体を検査するには、このRNA抽出作業は煩雑である。そこで、近年、糞便試料から熱処理でキャプシドを破壊し、ウイルスRNAを露出させた処理液をRT-PCRに供することでウイルスの有無を検出する手法がとられるようになった（非特許文献4）。この際、RNAの抽出を省略することで、糞便試料中には含まれる、多糖類などのPCR反応阻害物質が持ち込まれる。

[0010] これらの影響を低減するような工夫が前処理剤やPCR反応液になされている（特許文献1）。便によるPCR阻害は、ベタイン、BSA、T4遺伝子32タンパク質、タンパク質分解酵素阻害剤の添加により改善されることが報告されているが、便試料にスパイクされたDNAを検出したものでRNAのRT-PCRによる検出を改善できるか不明であった（非特許文献5）。本発明者らは、既にアミノ酸における3個のメチル基を付加した構造を有する第4級アンモニウム塩（ベタイン、L-カルニチン、など）、ウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコール、及びゼラチンの全部または一部を組み合わせることによって、便によるPCR阻害を解消できることを見出している。

[0011] 一方で、前記糞便試料の熱処理は、逆転写酵素を失活させてしまうことから、熱処理後にRT-PCR反応液を添加する必要がある。ここで反応容器の開閉や試薬の添加が非常に手間と労力を要する。さらに、サンプル間のコンタミネーションのリスクもある。K. Kangらは、高病原性北米産豚生殖器呼吸器症候群ウイルスRNAを豚血清サンプルから直接RT-PCRにより検出できることを報告している（非特許文献6）。この報告では、試料を直接RT-PCR反応液と混合して反応するだけで、ウイルスのエンベロープ構造が破壊され、ウイルスRNAが検出される。しかし、ノロウイルス

のような消化管に感染しうるエンベロープを持たないウイルスは、胃酸による不活性化や胆汁酸の界面活性作用等に耐性のある、堅いキャプシド構造にRNAが保持されている。そのため、未処理の試料を直接RT-PCRに供するだけではこのキャプシド構造が保持され、RNAの検出を十分に行えないケースがある。非特許文献7には、ウイルスに対する極性有機溶媒によるキャプシド構造の不安定化効果は、ウイルスの種類によっても異なることが報告されており、よりRNAの検出を困難なものとしている。

[0012] そこで、RT-PCR反応液にカオトロピック剤を加えることで、糞便試料や拭き取り検査の濃縮試料から事前にRNAの単離や熱処理をせずに、効率よくウイルスRNAの有無を検出できる方法もある。しかしながら、過剰なカオトロピック剤の添加はPCR反応を阻害してしまうことが知られており、PCR反応時間の短縮化が困難であった。また、PCR反応時間の短縮化に伴い、従来の加熱処理方法においてもノロウイルスの検出感度が低下するケースがある。そこで、更に効率的で且つPCR反応を阻害しにくいウイルスRNA含有検体の前処理方法が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：特開2015-119656号公報

非特許文献

[0014] 非特許文献1：BioTechniques，第17巻，1994年、第1034-1036頁

非特許文献2：BioTechniques，第25巻，1998年、第230-234頁

非特許文献3：Nucl. Acids Res.，第20巻，1992年、第1487-1490頁

非特許文献4：J. Virol. Methods，第163巻，2010年、第282-286頁

非特許文献5：J. Virol. Microbiol.，第38巻、2000

年、第4463－4470頁

非特許文献6：J. Animal Science And Biotechnology, 第5巻、2014年、第45頁

非特許文献7：Bull, Natl. Inst. Health Sci., 第129巻、2011年、第37－54頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0015] 本発明の目的は、試料から非エンベロープウイルスのRNAの単離や、試料の事前の加熱処理を行うことなく、1ステップRT-PCRにより、従来知られている手法以上の精度でウイルスRNAの有無の検出を可能とすることである。

課題を解決するための手段

- [0016] 本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意研究を行った結果、ウイルスRNAの精製や事前の熱処理を行っていない試料を極性有機溶媒と混合後、1ステップRT-PCRに供することで、非エンベロープウイルスRNAの検出が可能であることを見出した。

さらに本発明者らは、ウイルスキャプシド構造の変性に必要な濃度の極性有機溶媒と1ステップRT-PCR反応に許容される極性有機溶媒濃度を見極め、同一反応容器に極性有機溶媒、試料、1ステップRT-PCR反応液を順次添加して反応容器を密閉後、RT-PCRのための温度サイクルで反応を行うだけでウイルスRNAを検出可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0017] 代表的な本願発明は、以下の通りである。

項1. 試料中のエンベロープを持たないRNAウイルスの検査方法であって、試料からのRNA精製、または試料の事前の熱処理のない、以下の工程を含むことを特徴とする試料中のウイルスの存在の有無を検査するためのウイルスの検査方法。

(1) 試料と極性有機溶媒を含む試薬を混合する工程、

(2) 前記混合液に逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ、または逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を添加する工程、

(3) 反応容器を密閉後、1ステップRT-PCR反応を実施する工程。

項2. 前記工程(1)、(2)が同一容器で行われることを特徴とする項1に記載のウイルスの検査方法。

項3. 工程(3)において反応容器を密閉後、一度もフタを開閉することなく1ステップRT-PCR反応を実施することを特徴とする項1又は2に記載のウイルスの検査方法。

項4. 試料が糞便である項1から3のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項5. 試料が水、生理食塩水または緩衝液に懸濁された懸濁液である項1から3のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項6. 試料が懸濁液の遠心上清である項1から3のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項7. 試料が環境中の拭き取り検査試料を水、生理食塩水または緩衝液に懸濁し、かつ、懸濁液を濃縮した試料であることを特徴とする項1から3のいずれかに記載の方法。

項8. エンベロープを持たないRNAウイルスがノロウイルスである項1から7のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項9. ノロウイルスがG1型かG2型であるかの判別を行うことを特徴とする項8に記載のウイルスの検査方法。

項10. 極性有機溶媒が、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、ピリジン、トリエチルアミンジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリクトリアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、およびアセトニトリルよりなる群から選択されるいずれかであることを特徴とする項1から9のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項 1 1. DNAポリメラーゼが、Taq、Tthおよびそれらの変異体よりなる群から選択されるいずれかであることを特徴とする項 1 から 1 0 のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項 1 2. 逆転写酵素の由来が、モロニー Maus 白血病ウイルス (MMRV)、トリ骨髄芽球症ウイルス (AMV) およびこれらの変異体からなる群より選択されるいずれかであることを特徴とする項 1 から 1 1 のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項 1 3. 工程 (3) における 1 ステップ RT-PCR 反応液が、アミノ酸におけるアミノ基に 3 個のメチル基を付加した構造を有する第 4 級アンモニウム塩 (以下、「ベタイン様 4 級アンモニウム」という)、0.5 mg/ml 以上のウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも 1 つを含むことを特徴とする項 1 から 1 2 のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項 1 4. ベタイン様 4 級アンモニウム塩が、ベタインまたは L-カルニチンである項 1 3 に記載のウイルスの検査方法。

項 1 5. 試料の処理から 1 ステップ RT-PCR 反応が完了するまでの所要時間が 1 時間以内である請求項 1 から 1 4 のいずれかに記載のウイルスの検査方法。

項 1 6. 極性有機溶媒を含む試薬、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、および 1 ステップ RT-PCR 反応液を含むことを特徴とするエンベロープを持たないウイルスの検査用キット。

項 1 7. 工程 (3) における 1 ステップ RT-PCR 反応液が、ベタイン様 4 級アンモニウム塩、0.5 mg/ml 以上のウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも 1 つを含む項 1 6 に記載のウイルスの検査用キット。

項 1 8. 検出対象の RNA ウイルスの検出領域に対応するプライマー対をさらに含むことを特徴とする項 1 6 または 1 7 に記載のウイルスの検査用キット。

項 1 9 . 検出対象の R N A ウイルスの検出領域に対応するハイブリダイゼーションプローブをさらに含むことを特徴とする項 1 6 から 1 8 のいずれかに記載のウイルスの検査用キット。

項 2 0 . エンベロープを持たない R N A ウイルスがノロウイルスである項 1 6 から 1 9 のいずれかに記載のウイルスの検査用キット。

項 2 1 . ノロウイルスが G 1 型か G 2 型であるかの判別を行うことを特徴とする項 2 0 に記載のウイルスの検査用キット。

発明の効果

[0018] 本発明によって、試料からウイルス R N A の単離や事前の試料の熱処理を必要とせず、試料を極性有機溶媒と混合後、1 ステップ R T - P C R 反応液に添加するだけで、試料中のノロウイルスのような非エンベロープウイルスの有無を検出することが可能になる。この結果、検査業務がさらに効率化することから、ウイルス感染しても症状のない被験者の検査量を増やすことができ、感染症予防にも寄与する。また、熱処理工程の省略化により反応容器の蓋の開閉作業も省略される。この結果、蓋の開閉時におけるウイルス含有サンプルの飛散リスクをなくすことができ、他のサンプルへのコンタミリスクも低減することができる。これにより、偽陽性発生リスクも抑えることができ、検査業務の精度を更に高めることができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]各溶媒における P C R 反応阻害効果を検討した結果を示す図である。
[図2]各溶媒における検体前処理効果を検討した結果を示す図である。
[図3]反応時間短縮化時における各前処理方法の比較を検討した結果を示す図である。
[図4]各前処理方法の作業工程を示す図である。
[図5]各前処理方法の作業時間の比較を検討した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明の実施形態を示しつつ、本発明についてさらに詳説する。

[0021] 本発明の一態様は、試料中のノロウイルスなどの非エンベロープ R N A ウ

イルスの検査であって、試料からウイルスRNAの精製や試料の事前の熱処理を行うことなく、試料と極性有機溶媒を含む試薬を混合し、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ、または逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR試薬を添加することからなるウイルスの存在の有無を検査するための方法である。

[0022] 本発明の試料中のウイルスの存在の有無を検査するための方法は、少なくとも以下の工程が含まれることを特徴とするウイルスの存在の有無を検査するための方法である。

(1) 試料と極性有機溶媒を含む試薬を混合する工程、

(2) 前記混合液に逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ、または逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を添加する工程、

(3) 反応容器を密閉後、1ステップRT-PCR反応を実施する工程。

前記工程(1)および(2)は、同一容器で行われることが好ましい。すなわち、工程(1)および(2)の間においては、混合液の全部または一部を別容器へ移し替えないことが好ましい。工程(1)により混合液の全量を工程(2)に供してもよいし、その一部を別の容器に移し替えて工程(2)を実施しても良い。更には、工程(3)においては、反応容器を密閉後、反応容器の蓋の開閉を行わないことが好ましい。

[0023] 本発明において検査対象となるRNAウイルスは、脂質二重膜に由来するエンベロープを持たない、非エンベロープ性のRNAウイルスであれば、特に限定されるものではない。このような非エンベロープRNAウイルスとしては、アストロウイルス科アストロウイルス、カリシウイルス科サポウイルス、ノロウイルス、ピコルナウイルス科A型肝炎ウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス、ヘペウイルス科E型肝炎ウイルス、レオウイルス科ロタウイルスなどが挙げられるが、特に限定されるものではなく、特にノロウイルスの検出に有用である。非エンベロープウイルスの多くが糞口感染などによって消化管

に感染可能で、胃酸による不活性化や胆汁酸の界面活性作用等に耐性のある、堅いキャプシド構造にRNAが保持されている。このため非エンベロープ性ウイルスは、エンベロープ性ウイルス（例えばインフルエンザウイルス等）が不活化する条件においても、不活化されない場合がある。

[0024] 本発明において用いられる試料として、例えば糞便（排泄便、直腸便）、嘔吐物、唾液などが挙げられるが、特に限定されるものではなく、生体由来するもの全般に用いることが可能である。特に、糞便（排泄便、直腸便）からの検出に有用である。糞便には、夾雑物として、プロテアーゼ及び核酸分解酵素等が含まれている他、大腸菌由来のタンパク質及び核酸が多量含まれていることが特徴として挙げられる。RT-PCR反応に用いる酵素やプライマー及び核酸プローブ等の反応液構成物は、糞便に含まれる夾雑物の影響により、消化または失活してしまい、検出感度が低下することが知られている。本発明においては、これら試料を市販のRNA精製キットでRNAを単離したり、あるいは熱処理でRNAをウイルス構造から露出させるための事前の熱処理を行う必要がないことを特徴とするものである。前記試料は直接検出に供してもよいし、夾雑物の反応への影響を低減し、より安定した検査結果を得るために、水、生理食塩水または緩衝液に前記試料を懸濁した試料であってもよい。さらに、糞便など特に夾雑物の多い試料では、遠心分離し、その上清を使用してもよい。あるいは、フィルターろ過を実施してもよい。前記緩衝液としては、特に限定されるものではないが、ハanks緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、HEPES緩衝液、トリシン緩衝液などが挙げられる。

[0025] 本発明における別の態様の試料としては、拭き取り検査試料である。汚染経路の解明や施設環境等の汚染状況の把握には、ふき取り検査が有用である。本発明において、拭き取り検査とは、特に限定されるものではないが、例えば綿棒等で該当区画や設備等を拭き取り、水や緩衝液に溶出し、ポリエチレングリコール（PEG）沈澱などで濃縮した試料である。具体的な拭き取り検査の要領としては、「ふきとり検体のノロウイルス検査法の改良」（h t

tp://idsc.nih.gov/iasr/32/382/dj3824.html)などが例示されるが、特に限定はされるものではなく、これに準ずる方法が広く含まれる。拭き取り箇所の例としては、まな板や包丁、ふきん、食器などの調理器具類、冷蔵庫の取手やトイレ、浴室のドアノブ、洗面所、厨房、トイレ、浴室などの蛇口、調理者の手や指、浴室、トイレ、洗面、手すり、居室などの施設などが挙げられる。また、拭き取り検査ではないが、環境検査として、下水試料の濃縮試料にも適用できる。

[0026] 本発明において、極性とは分子内に存在する電子的な偏りを指し、分子内の正電荷と負電荷の重心が一致しない分子を極性分子という。極性分子により構成された溶媒を極性溶媒という。極性溶媒の中でも、有機化合物により構成された極性有機溶媒を用いることにより、核酸やタンパク質のような生体分子の高次構造を不安定化することができる。この性質を利用することで、ウイルスのキャプシドタンパク質の疎水結合などを弱め、キャプシド構造を不安定化するような効果を奏するものである。上述した通り、ウイルスに対する極性有機溶媒によるキャプシド構造の不安定化効果は、ウイルスの種類によっても異なることが知られている（非特許文献7）。これはウイルスが保有するキャプシドタンパク質の性質の違いにより、疎水性結合などの強さが異なるからであると考えられる。

[0027] 前記極性有機溶媒として、具体的にはエタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、トリエチルアミン、ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリックトリアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、ピリジン等が挙げられるがこれに限られるものではない。好ましくは、メタノール、トリエチルアミン、ジメチルスルホキシド、アセトンである。また、これら極性有機溶媒を2つ以上含む混合溶液であっても良い。該極性有機溶媒のキャプシドタンパク質の変性剤としての下限の濃度としては、極性有機溶媒や他の添加剤の種類にもよるが、キャプシドタンパク質が変性される濃度であれば

特に限定されるものではなく、また、ウイルスの種類によりキャプシドタンパク質が異なるため、極性溶媒の実効濃度は各ウイルス毎に異なっているが、通常は検体量に対する極性溶媒の実効濃度が10%以上100%未満、より好ましくは30%以上90%以下、さらに好ましくは50%以上85%以下である。

[0028] 前記極性有機溶媒は、1種以上の界面活性剤、還元剤、キレート剤、金属塩と組み合わせて用いてもよい、

[0029] 前記極性有機溶媒は、通常はPCRの阻害剤としても知られる。そのため、前記極性有機溶媒の中でも、タンパク質の変性に必要な濃度とPCRへの持ち込み許容濃度の相違が小さいものを選択することで、極性有機溶媒、試料、1ステップRT-PCR反応液と順次添加することで、キャプシドタンパク質の変性から1ステップRT-PCR反応まで同一容器で、途中で容器を開閉することなく簡便に検出操作が進められる。このような極性有機溶媒の例として、特に好ましくはジメチルスルホキシドが挙げられる。例えば、ジメチルスルホキシド1 μ Lと試料1 μ Lを混合し、1ステップRT-PCR液48 μ Lを加えた場合、反応液中に持ち込まれるジメチルスルホキシドの濃度は2%である。2%のジメチルスルホキシドはRT-PCR液の持ち込まれても許容される濃度である。

[0030] 試料の移し替えまたは加熱処理工程の際には、反応容器の開閉作業が生じる。反応容器の開閉作業は煩雑化かつ作業時間を伸ばす原因となる。これに加えて、ウイルス含有検体の入った反応容器の開閉には、ウイルス及びウイルス由来RNAの飛散リスクが生じる。ウイルスの飛散は作業者の安全及び健康を脅かすものであると同時に、検査作業環境の汚染を意味する。飛散したRNAウイルスは作業場においてエアロゾル化するため、同時に検査している他のサンプルの汚染リスクが問題となっている。このため、蓋の開閉工程のないRT-PCRを用いたウイルスの存在の有無を検査方法は、作業の単純化以上の意義を持っている。

[0031] 前記混合液に添加される1ステップRT-PCR溶液は、逆転写酵素およ

びDNAポリメラーゼを含む。逆転写酵素活性を併せ持つDNAポリメラーゼである、Tth DNAポリメラーゼやTaq DNAポリメラーゼなどを使用することが好ましい。より好ましくは、二種の酵素の使用、逆転写酵素とDNAポリメラーゼの少なくとも2種類の酵素の使用である。

[0032] 前記1ステップRT-PCR反応液に含まれる逆転写酵素の由来としては、RNAをDNAに変換できれば特に限定されないが、MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)-RT、AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus)、HIV-RT、RAV2-RT、EIAV-RT、カルボキシドサーマス・ハイドロゲノフォルマン (Carboxydothermus hydrogenoformans) DNAポリメラーゼ) やその変異体が例示される。特に好ましい例としては、MMLV-RT、AMV-RT、またはそれらの変異体が挙げられる。

[0033] 前記1ステップRT-PCR反応液に含まれるDNAポリメラーゼとしては、Taq、Tth、Bst、KOD、Pfu、Pwo、Tbr、Tfi、Tfl、Tma、Tne、Vent、DEEPVENTやこれらの変異体が挙げられるが、特に限定されない。より好ましくは、Taq、Tth又はこれらの変異体の使用である。特に好ましくはTth又はその変異体の使用である。さらに、非特異的反応抑制の効果を高めるため、抗DNAポリメラーゼ抗体との併用、あるいは化学修飾により熱不安定ブロック基のDNAポリメラーゼへ導入することで、逆転写反応の間、DNAポリメラーゼの酵素活性を抑制され、ホットスタートPCRへの適用ができることが好ましい。

[0034] 本発明に用いられる1ステップRT-PCR反応液には、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼの他、緩衝剤、適当な塩として、マグネシウム塩又はマンガン塩、デオキシヌクレオチド三リン酸、検出対象のウイルスRNAの検出対象領域に対応するプライマー対を含み、さらに必要に応じて添加剤を含んでいてもよい。

[0035] 本発明で使用される緩衝剤としては、特に限定されないが、トリス (Tr

is), トリシン (Tricine), ビストリシン (Bis-Tricine), ビシン (Bicine) などが挙げられる。硫酸、塩酸、酢酸、リン酸などで pH を 6~9、より好ましくは pH 7~8 に調整されたものである。また、添加する緩衝剤の濃度としては、10~200 mM、より好ましくは 20~150 mM で使用される。この際、反応に適当なイオン条件とするために、塩溶液が加えられる。塩溶液としては、塩化カリウム、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウムなどが挙げられる。

[0036] 本発明で使用される dNTP としては、dATP, dCTP, dGTP, dTTP がそれぞれ 0.1~0.5 mM、最も一般的には 0.2 mM 程度加えられる。dTTP の代わり及び／又は一部として dUTP を使用することによって、クロスコンタミネーションに対する予防処置をとってもよい。マグネシウム塩としては、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、マンガン塩としては、塩化マンガン、硫酸マンガン、酢酸マンガンなどが例示され、1~10 mM 程度加えられることが好ましい。

[0037] さらに 1 ステップ RT-PCR 反応液に含まれる添加剤としては、アミノ酸におけるアミノ基に 3 個のメチル基を付加した構造を有する第 4 級アンモニウム塩（以下、「ベタイン様 4 級アンモニウム」という）、0.5 mg/ml 以上のウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも 1 つを含むことが好ましい。

[0038] 前記ベタイン様 4 級アンモニウム塩としては、ベタイン（トリメチルグリシン）、L-カルニチンなどが挙げられるが、アミノ酸におけるアミノ基に 3 個のメチル基を付加した構造を有する第 4 級アンモニウム塩であれば、特に限定されるものではない。ベタイン様 4 級アンモニウム塩が有する構造は分子内に安定な正、負の両電荷を持つ化合物で、界面活性剤のような性質を示し、ウイルス構造の不安定化を引き起こすものと考えられる。さらに、DNA ポリメラーゼの核酸増幅を促進することが知られる。好ましい前記ベタイン様 4 級アンモニウム塩濃度は 0.1 M~2 M であり、より好ましくは 0

、2 M～1.2 Mである。

[0039] 前記1ステップRT-PCR反応液に含まれるウシ血清アルブミンとしては、好ましくは少なくとも0.5 mg/ml以上、より好ましくは少なくとも1 mg/ml以上である。夾雑物の多い試料では、ウシ血清アルブミンの濃度が好ましくは2 mg/ml以上、さらに好ましくは3 mg/ml以上で、良好な検出が可能となる。

[0040] 前記1ステップRT-PCR反応液に含まれるゼラチンは、ウシや豚などの動物の皮膚や骨、腱、あるいは魚の鱗や皮に由来し、PCR酵素の安定化に寄与すると考えられている。使用濃度としては、PCR増幅を安定化する一方で、蛍光検出を妨げない程度が好ましい。好ましくは1～5%、さらに好ましくは1～2%である。特にゼラチンの由来については限定されるものではないが、ウシや豚由来よりも魚由来のものの方が、ゼリー強度が低く、反応液のハンドリングがよい点で好ましい。

[0041] さらに、当該技術分野でRT-PCRを促進することが知られる物質と組み合わせて使用することもできる。本発明において有用な促進物質とは、例えば、グリセロール、ポリオール、プロテアーゼインヒビター、シングルストランド結合タンパク質（SSB）、T4遺伝子3'2'タンパク質、tRNA、硫黄または酢酸含有化合物類、ジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール、トリメチレングリコール、ホルムアミド、アセトアミド、ベタイン、エクトイン、トレハロース、デキストラン、ポリビニルピロリドン（PVP）、塩化テトラメチルアンモニウム（TMAC）、水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）、酢酸テトラメチルアンモニウム（TMAA）、ポリエチレングリコール、トリトンX-100（Triton X-100）、トリトンX-114（Triton X-114）、ツイーン20（Tween 20）、ノニデットP40、Brij i 58などが挙げられるが、これらに限定されない。さらに反応阻害を低減するように、エチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル)-N, N, N', N'-四酢酸（EGTA）、1, 2-ビス（o-ア

ミノフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸(BAPTA)のようなキレート剤を含んでいてもよい。

[0042] 本発明に用いられるプライマー対としては、検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するプライマー対であり、一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に互いに相補的である2種一對のプライマーが挙げられる。また、別の態様として、上記プライマーが2対以上含まれる、いわゆるマルチプレックスPCRも挙げられる。さらに、ターゲットとする核酸が亜型からなる場合、縮重プライマーを含んでもよい。本発明でエンベロープを持たないRNAウイルスの1種であるノロウイルスを検出する場合、プライマー対の例としては、ノロウイルス検出用のプライマーとしては、厚生労働省医薬食品局安全部監視安全課の通知(食安監1105001号)に記載のプライマーが挙げられるが、これに限るものではない。

[0043] 本発明は、別の態様としては、さらに、少なくとも1種類の標識されたハイブリダイゼーションプローブまたは2本鎖DNA結合蛍光化合物を含む検出方法である。これによって、増幅産物の分析を通常の電気泳動ではなく、蛍光シグナルのモニタリングで監視することができ、解析労力が低減される。さらには、反応容器を開放する必要がなく、コンタミネーションのリスク低減が可能である。ウイルスのサブタイプに対応する、それぞれのハイブリダイゼーションプローブを異なる蛍光色素で標識することによって、ウイルスのサブタイプを識別することも可能である。

[0044] 2本鎖DNA結合蛍光化合物としては、例えば、SYBR(登録商標) Green I, SYBR(登録商標) Gold、SYTO-9、SYTP-13、SYTO-82(Life Technologies), EvaGreen(登録商標; Biotium)、LCGreen(Idaho), LightCycler(登録商標) 480 ResoLight(Roche Applied Science)などが挙げられる。

[0045] 本発明において用いられるハイブリダイゼーションプローブとしては、例えば、TaqMan加水分解プローブ(米国特許第5,210,015号公

報、米国特許第5, 538, 848号公報、米国特許第5, 487, 972号公報、米国特許第5, 804, 375号公報)、モレキュラービーコン(米国特許第5, 118, 801号公報)、FRETハイブリダイゼーションプローブ(国際公開第97/46707号パンフレット、国際公開第97/46712号パンフレット、国際公開第97/46714号パンフレット)などが挙げられる。ノロウイルス検出用のプローブの塩基配列としては、厚生労働省医薬食品局安全部監視安全課の通知(食安監1105001号)に記載の配列が挙げられるが、これに限るものではない。さらに、ターゲットとする核酸が亜型からなる場合、縮重配列を含んでもよい。

[0046] 本発明の別の一態様は、試料中のウイルスRNAの検査用キットであって、カオトロピック剤、並びに逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ(あるいは逆転写活性を有するDNAポリメラーゼ)、1ステップRT-PCR反応液を含むことを特徴とするエンベロープを持たないRNAウイルスの検査用キットである。本発明のウイルスの検査用キットは、少なくとも極性有機溶媒を含む試薬、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、および1ステップRT-PCR反応液を含む。1ステップRT-PCR反応液には、ベタイン様4級アンモニウム塩、0.5mg/ml以上のウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンのうちの少なくとも1つを含むことが好ましい。検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するプライマー対、さらには検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するハイブリダイゼーションプローブを含むことが好ましい。

実施例

[0047] 以下、実施例をもって、本発明を具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0048] 実施例1. 加熱処理必要検体のスクリーニング

(1) RT-PCR反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、有機溶媒の影響を評価した。

。

反応液 30 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2－高速プローブ検出－(東洋紡)添付品)

プライマー液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2－高速プローブ検出－(東洋紡)添付品)

プローブ液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2－高速プローブ検出－(東洋紡)添付品)

酵素液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2－高速プローブ検出－(東洋紡)添付品)

前処理液 4 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2－高速プローブ検出－(東洋紡)添付品)

[0049] (2) 試料の調製方法

ノロウイルスG2陽性のヒト糞便15検体を滅菌水0.5mlに10%(重量%)となるように懸濁した。この懸濁液を12,000rpmで5分間遠心し、上清を使用した。

[0050] (3) 反応

前処理を実施する条件では、前処理液 4 μ Lに調製した試料をそれぞれ1 μ L添加した。前処理液との混合液をApplied Bioscience製サーマルサイクラー(Gene Amp(登録商標)PCR System 9700)にて、85℃、1分間の加熱処理を行った。加熱処理後の前処理液に前記RT-PCR反応液45 μ L(反応液+プライマー液+プローブ液+酵素液)を添加し、PCR反応液とした。前処理を実施しない条件では、前記RT-PCR反応液45 μ Lに、前処理液4 μ Lを添加し、調製した試料をそれぞれ1 μ L添加し、加熱処理を行わずPCR反応液とした。これ

をBioRad製CFX96WELL DEEPを使用して、以下の温度サイクルでリアルタイムPCR反応を実施した。後半30サイクルの54℃の伸長ステップにおいて蛍光値の読取りを行った。

42℃ 5分（逆転写反応）、

95℃ 10秒、

95℃ 1秒－54℃ 22秒 10サイクル（PCR）

95℃ 1秒－54℃ 22秒 30サイクル（PCR）

[0051] （４）結果

プローブ液（ノロウイルス検出キットG1／G2－高速プローブ検出－（東洋紡）添付品）ではFAMチャネルで内部コントロール遺伝子、Cy5チャネルでノロウイルスG1、ROXチャネルでノロウイルスG2を検出する。ここでは、G1、G2 RNAのCq値を示す。この結果、熱処理を実施した条件では、全てのG2陽性の検体の検出が確認された（表1）。これに対して、前処理を実施しなかった検体においては、11検体において検出を確認できなかった（表2）。これは加熱処理を行わなかったことで、検体中のウイルスのキャプシド構造が壊れず、ウイルス粒子の中からRNA分子が出てこなかったことに起因すると考えられる。本検討において、G2陽性シグナルを確認できなかった検体を加熱処理必要検体とした。

[0052]

[表1]

[前処理工程あり]

検体配置		Cq値			
		IC		G2	
a1	a2	15.3	15.7	22.7	24.8
b1	b2	15.0	15.2	12.7	21.9
c1	c2	15.0	15.5	19.5	10.1
d1	d2	15.1	15.4	20.2	20.5
e1	e2	15.4	15.6	20.6	27.5
f1	f2	15.2	15.2	22.8	23.9
g1	g2	15.2	15.6	27.3	25.3
h1	h2	15.3	15.1	25.7	22.2

n.d. ; 検出不可

[0053] [表2]

[前処理工程なし]

検体配置		Cq値			
		IC		G2	
a1	a2	19.6	14.4	n.d.	n.d.
b1	b2	17.7	15.4	18.3	n.d.
c1	c2	13.9	15.5	24.0	18.4
d1	d2	14.7	17.1	22.7	26.0
e1	e2	15.6	15.2	n.d.	n.d.
f1	f2	14.2	14.2	n.d.	n.d.
g1	g2	13.9	19.5	n.d.	n.d.
h1	h2	14.4	27.5	n.d.	n.d.

n.d. ; 検出不可

[0054] 実施例2. 1ステップRT-PCR反応に利用できる溶媒のスクリーニング

(1) RT-PCR反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、各溶媒のRT-PCRへ与える影響を評価した。

反応液 30 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2-高速プローブ検出-(東洋紡)添付品)

プライマー液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2-高速プローブ検出-(東洋紡)添付品)

プローブ液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2-高速プローブ検出-(東洋紡)添付品)

酵素液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2-高速プローブ検出-(東洋紡)添付品)

前処理液 4 μ L

(ノロウイルス検出キットG1/G2-高速プローブ検出-(東洋紡)添付品)

[0055] (2) 溶媒条件

条件1 蒸留水

条件2 8Mウレア

条件3 エタノール

条件4 メタノール

条件5 1-プロパノール

条件6 2-プロパノール

条件7 1-ブタノール

条件8 アセトン

条件9 1,4-ジオキサン

条件10 ピリジン

- 条件 1 1 ジメチルスルホキシド
- 条件 1 2 トリエチルアミン
- 条件 1 3 酢酸-3-メチルブチル
- 条件 1 4 アニソール
- 条件 1 5 ヘキサン
- 条件 1 6 ベンジン

[0056] (3) 反応

反応チューブに前記溶媒を各 2 μ L ずつ添加し、前記 RT-PCR 反応液 49 μ L (反応液+プライマー液+プローブ液+酵素液+前処理液) を添加した。これにノロウイルス G2 の合成 RNA 250 コピーを添加した。これを BioRad 製 CFX96 WELLDEEP を使用して、以下の温度サイクルでリアルタイム PCR 反応を実施した。後半 30 サイクルの 54 $^{\circ}$ C の伸長ステップにおいて蛍光値の読取りを行った。

42 $^{\circ}$ C 5 分 (逆転写反応)、

95 $^{\circ}$ C 10 秒、

95 $^{\circ}$ C 1 秒-54 $^{\circ}$ C 22 秒 10 サイクル (PCR)

95 $^{\circ}$ C 1 秒-54 $^{\circ}$ C 22 秒 30 サイクル (PCR)

[0057] (4) 結果

この結果の G2 RNA の C_q 値を図 1 に示す。この結果、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、1,4-ジオキサン、ピリジンでは RT-PCR 反応を完全に阻害し、G2 のシグナルが確認されなかった。また、アニソールでは蒸留水添加条件と比較し、C_q 値が顕著に上昇し、PCR 阻害が起こっていることが確認された。

[0058] 実施例 3. ウイルス含有検体に対する前処理効果を持つ溶媒のスクリーニング

(1) RT-PCR 反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、各溶媒の検体の前処理効果を評価した。

反応液 30 μ L

(ノロウイルス検出キットG1 / G2 –高速プローブ検出– (東洋紡) 添付品)

プライマー液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1 / G2 –高速プローブ検出– (東洋紡) 添付品)

プローブ液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1 / G2 –高速プローブ検出– (東洋紡) 添付品)

酵素液 5 μ L

(ノロウイルス検出キットG1 / G2 –高速プローブ検出– (東洋紡) 添付品)

前処理液 4 μ L

(ノロウイルス検出キットG1 / G2 –高速プローブ検出– (東洋紡) 添付品)

[0059] (2) 溶媒条件

条件1 蒸留水

条件2 8Mウレア

条件3 エタノール

条件4 メタノール

条件5 アセトン

条件6 ジメチルスルホキシド

条件7 トリエチルアミン

条件8 酢酸-3-メチルブチル

条件9 アニソール

条件10 ヘキサン

条件11 ベンジン

[0060] (3) 試料の調製方法

加熱処理必要検体であるノロウイルス G2 陽性のヒト糞便検体 a1 を、滅菌水 0.5 ml に 10% (重量%) となるように懸濁した。この懸濁液を 12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を使用した。

[0061] (4) 反応

反応チューブに前記の各溶媒を各 2 μ L ずつ添加し、チューブの底に落ちていることを確認した。調製した試料 1 μ L を添加し、各溶媒と混合した。これに前記 RT-PCR 反応液 49 μ L (反応液+プライマー液+プローブ液+酵素液+前処理液) を添加した。これを BioRad 製 CFX96 WELLL DEEP を使用して、以下の温度サイクルでリアルタイム PCR 反応を実施した。後半 30 サイクルの 54 $^{\circ}$ C の伸長ステップにおいて蛍光値の読み取りを行った。

42 $^{\circ}$ C 5 分 (逆転写反応)、

95 $^{\circ}$ C 10 秒、

95 $^{\circ}$ C 1 秒-54 $^{\circ}$ C 22 秒 10 サイクル (PCR)

95 $^{\circ}$ C 1 秒-54 $^{\circ}$ C 22 秒 30 サイクル (PCR)

[0062] (5) 結果

この結果の G2 RNA の C_q 値を図 2 に示す。この結果、エタノール、酢酸-3-メチルブチル、アニソール、ヘキサン、ベンジンでは検出が確認されず、ウイルス含有検体に対する前処理効果は確認されなかった。これに対し、メタノール、アセトン、トリエチルアミン、ジメチルスルホキシドでは G2 シグナルの検出を確認した。特にジメチルスルホキシドにおいては、前処理効果のある尿素と比較し、C_q 値が 3 以上低いことから、ウイルス含有検体に対する前処理効果が高いことが確認された。

[0063] 実施例 4. ジメチルスルホキシドの有効濃度の検討

(1) RT-PCR 反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、ウイルス含有検体に対する前処理効果のジメチルスルホキシドの有効濃度を評価した。

反応液 30 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

プライマー液 5 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

プローブ液 5 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

酵素液 5 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

前処理液 4 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

[0064] (2) 試料の調製方法

加熱処理必要検体であるノロウイルス G 2 陽性のヒト糞便検体 e 1、f 1、h 2 を、滅菌水 0.5 ml に 10% (重量%) となるように懸濁した。この懸濁液を 12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を使用した。

[0065] (3) ジメチルスルホキシドとの混合方法

蒸留水にて 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40% ジメチルスルホキシド水溶液を調製し、以下の条件において試料 e 1、f 1、h 2 と混合した。

条件 1 各試料 1 μ L、100% ジメチルスルホキシド 2 μ L (有効濃度 67%)

条件 2 各試料 1 μ L、90% ジメチルスルホキシド 2 μ L (有効濃度 60%)

条件 3 各試料 1 μ L、80% ジメチルスルホキシド 2 μ L (有効濃度 53%)

条件4 各試料 1 μ L、70%ジメチルスルホキシド 2 μ L（有効濃度 47%）

条件5 各試料 1 μ L、60%ジメチルスルホキシド 2 μ L（有効濃度 40%）

条件6 各試料 1 μ L、50%ジメチルスルホキシド 2 μ L（有効濃度 33%）

条件7 各試料 1 μ L、40%ジメチルスルホキシド 2 μ L（有効濃度 27%）

条件8 各試料 1 μ L、蒸留水 2 μ L

[0066]（4）反応

反応チューブに前記条件の各ジメチルスルホキシド水溶液 2 μ L ずつ添加し、チューブの底に落ちていることを確認した。調製した試料 1 μ L を添加し、混合した。これに前記 RT-PCR 反応液 49 μ L（反応液+プライマー液+プローブ液+酵素液+前処理液）を添加した。これを BioRad 製 CFX96WELL DEEP を使用して、以下の温度サイクルでリアルタイム PCR 反応を実施した。後半 30 サイクルの 54℃ の伸長ステップにおいて蛍光値の読取りを行った。

42℃ 5分（逆転写反応）、

95℃ 10秒、

95℃ 1秒－54℃ 22秒 10サイクル（PCR）

95℃ 1秒－54℃ 22秒 30サイクル（PCR）

[0067]（5）結果

この結果、各条件における G2 シグナルの C_q 値を表 3 に示す。試料によって有効濃度は異なるが、試料とジメチルスルホキシドの混合液において、ジメチルスルホキシドの有効濃度が 40% 以上、さらに好ましくは 50% 以上で、混合しなかった条件に比べ、有意な検出感度の改善が認められた。この際、RT-PCR 反応液中のジメチルスルホキシド濃度は 2.4%～4% である。

[0068] [表3]

条件	添加濃度	有効濃度	IC (Cq値)			G2 (Cq値)		
			e 1	f 1	h 2	e 1	f 1	h 2
条件 1	100% DMSO	67%	14.0	12.6	13.5	21.3	21.7	20.6
条件 2	90% DMSO	60%	13.2	12.2	13.3	22.7	24.8	23.1
条件 3	80% DMSO	53%	12.8	13.0	13.3	24.2	26.9	23.1
条件 4	70% DMSO	47%	13.1	12.4	13.4	28.4	n.d.	25.1
条件 5	60% DMSO	40%	13.0	12.4	13.8	n.d.	n.d.	23.7
条件 6	50% DMSO	33%	13.2	12.7	13.5	n.d.	n.d.	n.d.
条件 7	40% DMSO	27%	12.9	12.7	13.9	n.d.	n.d.	n.d.
条件 8	0% DMSO	0%	13.3	13.1	13.8	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. ; 検出不可

[0069] 実施例 5. ジメチルスルホキシドの R T - P C R 反応液への持ち込み許容量
検討

(1) R T - P C R 反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、ジメチルスルホキシド持ち込み量が R T - P C R へ与える影響を評価した。

反応液 30 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

プライマー液 5 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

プローブ液 5 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

酵素液 5 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

[0070] (2) ジメチルスルホキシドの添加量

条件 1 0 μ L ジメチルスルホキシド、5 μ L 蒸留水 (最終濃度 0 %)

条件 2 1 μ L ジメチルスルホキシド、4 μ L 蒸留水 (最終濃度 2 %)

条件 3 2 μ L ジメチルスルホキシド、3 μ L 蒸留水 (最終濃度 4 %)

条件 4 3 μ L ジメチルスルホキシド、2 μ L 蒸留水 (最終濃度 6 %)

条件 5 4 μ L ジメチルスルホキシド、1 μ L 蒸留水 (最終濃度 8 %)

条件 6 5 μ L ジメチルスルホキシド、0 μ L 蒸留水 (最終濃度 10 %)

[0071] (3) 反応

反応チューブにジメチルスルホキシドと蒸留水を前記条件に記載した容量ずつ添加し、前記 R T - P C R 反応液 45 μ L (反応液 + プライマー液 + プローブ液 + 酵素液) を添加した。これにノロウイルス G 2 および G 1 の合成

RNAを250コピー、50コピー、10コピーを添加した。これをBioRad製CFX96WELL DEEPを使用して、以下の温度サイクルでリアルタイムPCR反応を実施した。後半30サイクルの54℃の伸長ステップにおいて蛍光値の読取りを行った。

42℃ 5分（逆転写反応）、

95℃ 10秒、

95℃ 1秒－54℃ 22秒 10サイクル（PCR）

95℃ 1秒－54℃ 22秒 30サイクル（PCR）

[0072] （4）結果

この結果、各試料のG1およびG2シグナルのCq値を表4に示す。ジメチルスルホキシドの最終濃度が10%で、G1およびG2シグナルは250コピーでのCq値の増大が確認され、50コピー及び10コピーにおいてはシグナルが確認されなくなった。この結果より、50コピー前後の検出を目的としたRT-PCRを実施する際、ジメチルスルホキシドの反応液への持ち込み許容量としては、10%以下と考えられ、更に好ましくは8%以下である。しかしながら、250コピー以上のノロウイルスG1及びG2RNAを検出する際には10%以上の持ち込みも許容される。

[0073]

[表4]

条件	DMSO 濃度	IC(Cq値)			G1(Cq値)			G2(Cq値)		
		RNA 250コピ―	RNA 50コピ―	RNA 10コピ―	RNA 250コピ―	RNA 50コピ―	RNA 10コピ―	RNA 250コピ―	RNA 50コピ―	RNA 10コピ―
条件1	0%	14.6	13.9	14.0	22.4	24.2	26.9	20.1	22.2	24.3
条件2	2%	14.1	13.7	13.7	22.6	24.5	26.5	19.9	22.1	23.9
条件3	4%	13.7	14.0	13.9	22.4	24.1	26.6	19.7	21.7	24.0
条件4	6%	13.8	13.8	13.8	21.9	24.5	26.6	19.5	21.8	23.7
条件5	8%	14.5	14.5	14.2	21.5	24.5	26.3	19.5	21.4	25.6
条件6	10%	15.8	15.1	15.0	22.4	n.d.	n.d.	19.4	22.9	n.d.

n.d. : 検出不可

[0074] 実施例 6. ジメチルスルホキシド処理と従来型前処理法の比較

(1) R T - P C R 反応液

以下に示される組成の反応液を基本組成とし、P C R 反応時間を短縮した条件において、ジメチルスルホキシドによるウイルス含有検体の前処理効果と、従来型の前処理方法を比較評価した。

反応液 30 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

プライマー液 5 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

プローブ液 5 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

酵素液 5 μ L

0.8 unit / μ L r T t h 変異体 DNA polymerase

0.24 μ g / μ L 抗 T t h 抗体 (東洋紡)

1 unit / μ l R e v e r t r a A c e (東洋紡)

前処理液 4 μ L

(ノロウイルス検出キット G 1 / G 2 - 高速プローブ検出 - (東洋紡) 添付品)

[0075] (2) 試料の調製方法

加熱処理必要検体であるノロウイルス G 2 陽性のヒト糞便検体 e 2、g 2 を、滅菌水 0.5 ml に 10% (重量%) となるように懸濁した。この懸濁液を 12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を使用した。

[0076] (3) ジメチルスルホキシド処理による検出

ジメチルスルホキシド 2 μ L と試料 1 μ L を混合後、前記 R T - P C R 反応液 45 μ L (反応液 + プライマー液 + プローブ液 + 酵素液) を加え、B i

○ R a d社 C F X 9 6 W E L L D E E Pを使用して、（６）に記載の温度サイクルでリアルタイムPCR反応を実施し、後半３０サイクルの５４℃の伸長ステップにおいて蛍光値の読取を行った。

[0077] （４）カオトロピック処理による検出

８Ｍ尿素水溶液 ２μＬと試料１μＬを混合後、前記RT-PCR反応液４５μＬ（反応液＋プライマー液＋プローブ液＋酵素液）を加え、B i o R a d製C F X 9 6 W E L L

D E E Pを使用して、（６）に記載の温度サイクルでリアルタイムPCR反応を実施し、後半３０サイクルの５４℃の伸長ステップにおいて蛍光値の読取を行った。

[0078] （５）熱処理法による検出

試料１μＬに前処理液４μＬを添加し、８５℃、１分間の熱処理を実施した。前記RT-PCR反応液４５μＬ（反応液＋プライマー液＋プローブ液＋酵素液）を混合後、B i o R a d製C F X 9 6 W E L L D E E Pを使用して、（６）に記載の温度サイクルでリアルタイムPCR反応を実施し、後半３０サイクルの５４℃の伸長ステップにおいて蛍光値の読取りを行った。

[0079] （６）反応サイクル

４２℃ ３分（逆転写反応）、

９５℃ １０秒、

９５℃ １秒－５４℃ ５秒 １０サイクル（PCR）

９５℃ １秒－５４℃ ５秒 ３０サイクル（PCR）

[0080] （７）結果

各前処理方法を実施した際のG2シグナルのCq値を図3に示す。本検討において、G2シグナルが得られた前処理方法はジメチルスルホキシドにおける処理のみであった。これはRT-PCR反応時間の短縮化に伴って、ウイルスのキャプシド構造の破碎効率が低く、反応液中へのRNAの漏洩が少ない条件では、鋳型となるRNA量が不足し、RT-PCRが十分に反応しなかった事が原因として考えられる。よって、従来より知られる加熱処理法

およびカオトロピック剤処理法と比較し、本発明のジメチルスルホキシド処理法では、検体中のウイルスのカプシド破碎効率が高いことが示された。

[0081] 実施例 7. ジメチルスルホキシド処理と従来型加熱処理法の作業時間の比較

(1) 作業工程

ジメチルスルホキシド処理と加熱処理工程を含む前処理方法の主な作業工程を図 4 に示した。加熱処理工程を含む方法における反応容器の蓋の開閉には、日本ジェネティクス株式会社の専用治具 (Fast Gene Cap e a s y) を利用した。

[0082] (2) 比較方法

図 4 に示した作業フローにおいて、RT-PCR 反応の 96 サンプル分の調製に要する時間を測定した。測定は 5 回実施し、平均値を算出し比較した。

[0083] (3) 結果

加熱処理工程を含む従来法では、21 分 30 秒程度時間を要するのに対し、本発明のジメチルスルホキシド処理では 14 分程度であり、作業時間が 36 % 短縮される結果となった (図 5)。

RT-PCR 反応時間は BioRad 製 CFX 96 WEL L D E E P にて以下の反応サイクルにて実施した場合、45 分となる。

42℃ 3 分 (逆転写反応)、

95℃ 10 秒、

95℃ 1 秒 - 54℃ 5 秒 10 サイクル (PCR)

95℃ 1 秒 - 54℃ 5 秒 30 サイクル (PCR)

ジメチルスルホキシド処理を利用した前処理法の所要時間と合わせると 59 分となり、検体の処理から、測定までの所要時間は 1 時間以内で達成できる。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明は、分子生物学研究、さらに臨床検査や食品衛生管理などを目的とした検査において、好適に用いられる。

請求の範囲

- [請求項1] 試料中のエンベロープを持たないRNAウイルスの検査方法であって、試料からのRNA精製、または試料の事前の熱処理のない、以下の工程を含むことを特徴とする試料中のウイルスの存在の有無を検査するためのウイルスの検査方法。
- (1) 試料と極性有機溶媒を含む試薬を混合する工程、
- (2) 前記混合液に逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ、または逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含む1ステップRT-PCR反応液を添加する工程、
- (3) 反応容器を密閉後、1ステップRT-PCR反応を実施する工程。
- [請求項2] 前記工程(1)、(2)が同一容器で行われることを特徴とする請求項1に記載のウイルスの検査方法。
- [請求項3] 工程(3)において反応容器を密閉後、一度もフタを開閉することなく1ステップRT-PCR反応を実施することを特徴とする請求項1又は2に記載のウイルスの検査方法。
- [請求項4] 試料が糞便である請求項1から3のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項5] 試料が水、生理食塩水または緩衝液に懸濁された懸濁液である請求項1から3のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項6] 試料が懸濁液の遠心上清である請求項1から3のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項7] 試料が環境中の拭き取り検査試料を水、生理食塩水または緩衝液に懸濁し、かつ、懸濁液を濃縮した試料であることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項8] エンベロープを持たないRNAウイルスがノロウイルスである請求項1から7のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項9] ノロウイルスがG1型かG2型であるかの判別を行うことを特徴とす

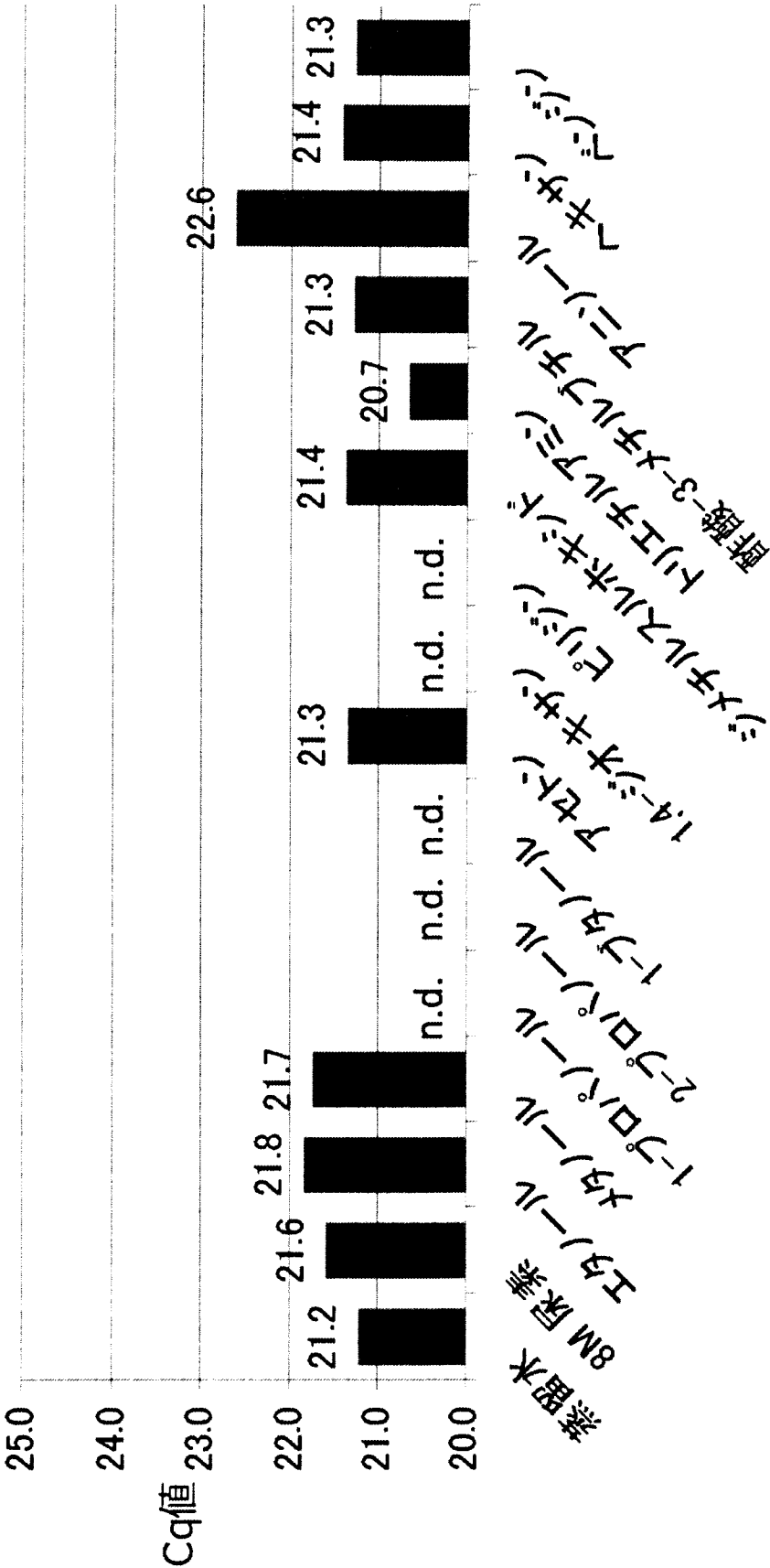
る請求項 8 に記載のウイルスの検査方法。

- [請求項10] 極性有機溶媒が、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、ピリジン、トリエチルアミンジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリックトリアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、およびアセトニトリルよりなる群から選択されるいずれかであることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項11] DNAポリメラーゼが、Taq、Tthおよびそれらの変異体よりなる群から選択されるいずれかであることを特徴とする請求項 1 から 10 のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項12] 逆転写酵素の由来が、モロニーマウス白血病ウイルス（MMRV）、トリ骨髄芽球症ウイルス（AMV）およびこれらの変異体からなる群より選択されるいずれかであることを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項13] 工程（3）における1ステップRT-PCR反応液が、アミノ酸におけるアミノ基に3個のメチル基を付加した構造を有する第4級アンモニウム塩（以下、「ベタイン様4級アンモニウム」という）、0.5 mg/ml以上のウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法。
- [請求項14] ベタイン様4級アンモニウム塩が、ベタインまたはL-カルニチンである請求項 13 に記載のウイルスの検査方法。
- [請求項15] 試料の処理から1ステップRT-PCR反応が完了するまでの所要時間が1時間以内である請求項 1 から 14 のいずれかに記載のウイルスの検査方法。
- [請求項16] 極性有機溶媒を含む試薬、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、および1ステップRT-PCR反応液を含むことを特徴とするエンベロープを持たないウイルスの検査用キット。

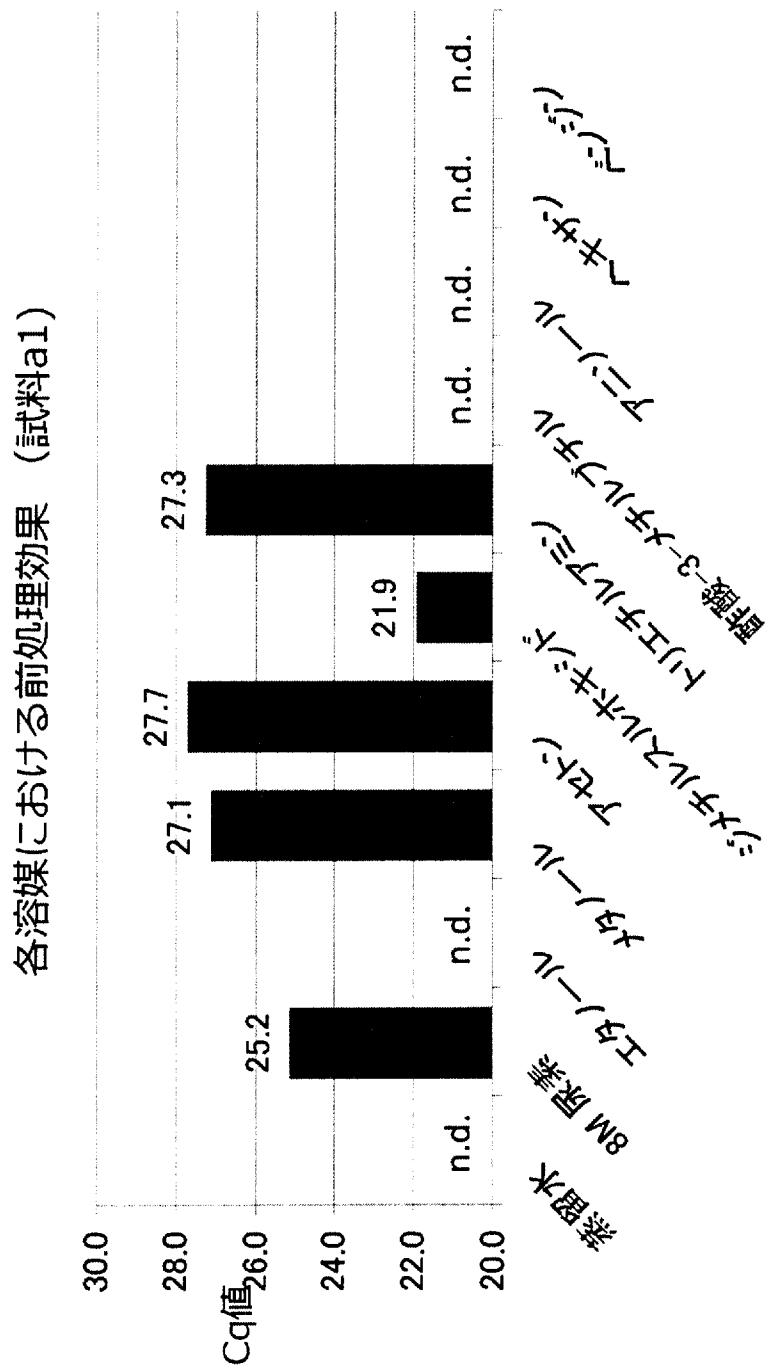
- [請求項17] 工程（3）における1ステップRT-PCR反応液が、ベタイン様4級アンモニウム塩、0.5 mg/ml以上のウシ血清アルブミン、グリセロール、グリコールおよびゼラチンよりなる群から選択された少なくとも1つを含む請求項16に記載のウイルスの検査用キット。
- [請求項18] 検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するプライマー対をさらに含むことを特徴とする請求項16または17に記載のウイルスの検査用キット。
- [請求項19] 検出対象のRNAウイルスの検出領域に対応するハイブリダイゼーションプローブをさらに含むことを特徴とする請求項16から18のいずれかに記載のウイルスの検査用キット。
- [請求項20] エンベロープを持たないRNAウイルスがノロウイルスである請求項16から19のいずれかに記載のウイルスの検査用キット。
- [請求項21] ノロウイルスがG1型かG2型であるかの判別を行うことを特徴とする請求項20に記載の検査用ウイルスのキット。

[図1]

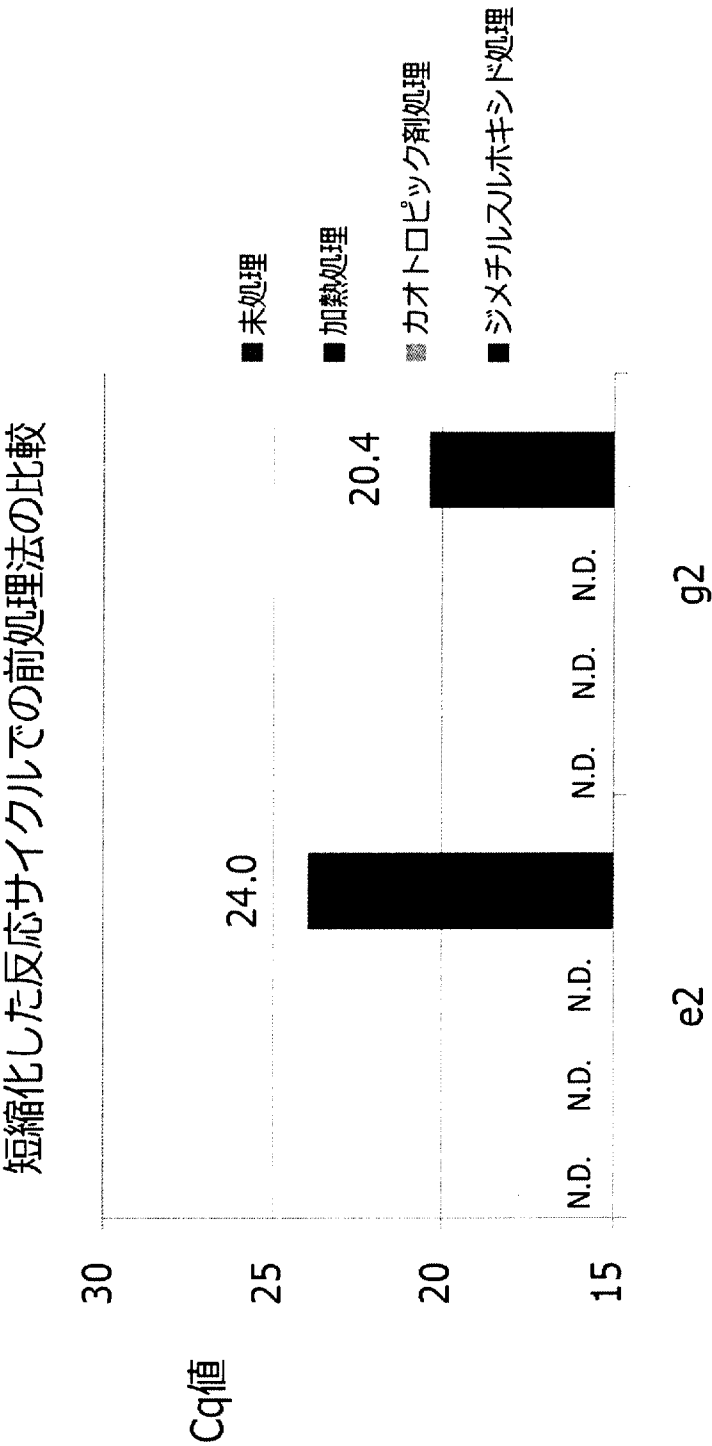
各溶媒におけるPCR阻害効果 (G2 RNA 250コピー)



[図2]



[図3]



[図4]

従来法（加熱処理）

ジメチルスルホキシド処理

反応容器

- 前処理液 (4 μ)
- 便水懸濁液(1 μ)
- フタしめる
- 85℃,
- フタあけ
- 反応液(45 μ)
- フタしめる

RT-qPCR

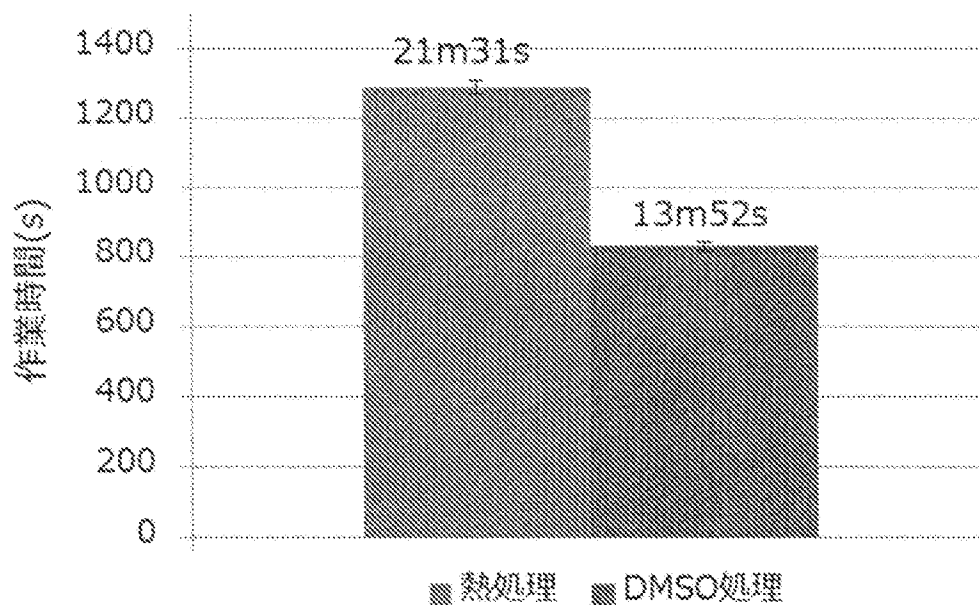
反応容器

- + ジメチルスルホキシド(3 μ L)
- 便水懸濁液(1 μ)
- 反応液(45 μ)
- フタしめる

RT-qPCR

[図5]

前処理工程の作業時間比較



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/014068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12Q1/686 (2018.01) i, C12N15/10 (2006.01) i, C12Q1/70 (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)

Int.Cl. C12Q1/686, C12N15/10, C12Q1/70

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 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	WO 2016/037099 A1 (TECHLAB INC.) 10 March 2016, claim 3, page 6, lines 1-14, example 4 & JP 2017-525383 A & US 2016/0138009 A1	1, 4, 8, 10, 16, 18, 20-21 1-21
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2011-19505 A (MUKOGAWA GAKUIN) 03 February 2011, paragraphs [0019], [0020], [0051]-[0059], examples 9-11 (Family: none)	16-21 1-21



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

22.06.2018

Date of mailing of the international search report

03.07.2018

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/014068

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/020759 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 16 February 2012, paragraphs [0063], [0072] & US 2013/0143225 A1, paragraphs [0145], [0154] & EP 2604688 A1	1-21
P, Y	JP 2017-131164 A (TOYOBO CO., LTD.) 03 August 2017 (Family: none)	1-21
P, A	JP 2017-209036 A (TOYOBO CO., LTD.) 30 November 2017 (Family: none)	1-21
A	野田衛ほか, ノロウイルスの不活化に関する研究の現状, Bulletin of National Institute of Health Sciences, 2011, vol. 129, pp. 37-54, (NODA, Mamoru et al., Current topics on inactivation of norovirus)	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/686(2018.01)i, C12N15/10(2006.01)i, C12Q1/70(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. C12Q1/686, C12N15/10, C12Q1/70

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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 Y	WO 2016/037099 A1 (TECHLAB INC.) 2016.03.10, Claim 3, Page 6, line 1-14, Example 4 & JP 2017-525383 A & US 2016/0138009 A1	1, 4, 8, 10, 16, 18, 20-21 1-21
X Y	JP 2011-19505 A (学校法人武庫川学院) 2011.02.03, [0019]-[0020], [0051]-[0059], 実施例 9-11 (ファミリーなし)	16-21 1-21

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

22.06.2018

国際調査報告の発送日

03.07.2018

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)

伊藤 良子

4 B

3 6 4 4

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	WO 2012/020759 A1 (国立大学法人京都大学) 2012. 02. 16, [0063], [0072] & US 2013/0143225 A1, [0145], [0154] & EP 2604688 A1	1-21
P, Y	JP 2017-131164 A (東洋紡株式会社) 2017. 08. 03, (ファミリーなし)	1-21
P, A	JP 2017-209036 A (東洋紡株式会社) 2017. 11. 30, (ファミリーなし)	1-21
A	野田衛ほか, ノロウイルスの不活化に関する研究の現状, Bulletin of National Institute of Health Sciences, 2011, Vol. 129, p. 37-54	1-21