

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012 年 2 月 16 日(16.02.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/020679 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/067761
- (22) 国際出願日: 2011 年 8 月 3 日(03.08.2011)
- (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 2010-179566 2010 年 8 月 10 日(10.08.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ニプロ株式会社(NIPRO CORPORATION) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号 Osaka (JP). 独立行政法人国立国際医療研究センター (National Center for Global Health and Medicine) [JP/JP]; 〒1628655 東京都新宿区戸山 1-2-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 秋山 徹 (AKIYAMA, Tohru) [JP/JP]; 〒1628655 東京都新宿区戸山 1-2-1 独立行政法人国立国際医療研究センター内 Tokyo (JP). 小宮 真由美 (KOMIYA, Mayumi) [JP/JP]; 〒1628655 東京都新宿区戸山 1-2-1 独立行政法人国立国際医療研究センター内 Tokyo (JP). 切替 照雄 (KIRIKAE, Teruo) [JP/JP]; 〒1628655 東京都新宿区戸山 1-2-1 国立国際医療センター研究所内 Tokyo (JP). 末竹 寿紀 (SUETAKE, Toshinori) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号 ニプロ株式会社内 Osaka (JP). 近藤 裕司 (KONDO, Yuji) [JP/JP]; 〒5318510

大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号 ニプロ株式会社内 Osaka (JP).

- (74) 代理人: 進藤 卓也 (SHINDO, Takuya); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満 3 丁目 2 番 9 号 翁ビル 5 階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD AND TEST PIECE FOR SIMULTANEOUSLY TYPING INFLUENZA VIRUS A AND DETECTING OSELTAMIVIR PHOSPHATE-RESISTANT MUTATION

(54) 発明の名称: A 型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための方法および試験片

(57) Abstract: The present invention provides a reagent for the rapid and simple typing of influenza virus A and detection of oseltamivir phosphate-resistant mutation in a specimen.

(57) 要約: 本発明によれば、検体中の A 型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを迅速・簡便に行うための試薬が提供される。



WO 2012/020679 A1

明 細 書

発明の名称：

A型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための方法および試験片

技術分野

[0001] 本発明は、A型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための方法および試験片に関する。

背景技術

[0002] 現在、厚生労働省の資料によれば、日本では年間約1万人が、地球規模では年間約25～50万人がインフルエンザ（超過死亡概念）により死亡しているといわれている（非特許文献1参照）。インフルエンザは、主にA、B、C型に大別される。特にA型インフルエンザは、さらに多種多様の亜型が存在する。2009年度は、「新型インフルエンザ」と称される、従来の、いわゆる季節型のH1N1亜型インフルエンザウイルスとは異なる、H1N1亜型のインフルエンザウイルスに起因するインフルエンザが流行した。この「新型インフルエンザウイルス」に感染した妊婦および小人は、季節型のH1N1亜型インフルエンザに感染した妊婦および小人と比較して、重篤化しやすいといわれている。したがって、今後のインフルエンザの診断においては、この「新型インフルエンザ」であるか否かも重要となる。また、H1N1亜型とは異なる亜型である、H3N2亜型インフルエンザウイルスも流行を起こしている。

[0003] また、インフルエンザに有効な医薬品として、オセルタミビルリン酸塩（IUPAC名：（-）-エチル（3R, 4R, 5R）-4-アセトアミド-5-アミノ-3-エチルプロピル）シクロヘックス-1-エン-カルボキシレートモノホスフェート）を原薬とする抗インフルエンザウイルス剤（登録商標：タミフル（F Hoffman-La Roche社登録商標）、製造販売元／中外製薬社、非特許文献2参照）が知られている。

[0004] しかし、最近は、オセルタミビルリン酸塩に対する耐性を獲得したオセルタミビルリン酸塩耐性のA型インフルエンザウイルスの存在も問題となっている。オセルタミビルリン酸塩は、腹痛、下痢および嘔気などの頻度の高い副作用のおそれがあるので、オセルタミビルリン酸塩耐性のA型インフルエンザウイルスに感染した患者には、投与を避けるべきである。

[0005] このように、感染したインフルエンザウイルスが新型インフルエンザウイルス、季節型インフルエンザウイルスまたはA型H3N2亜型インフルエンザウイルスのいずれに該当するかの情報、および該インフルエンザウイルスのオセルタミビルリン酸塩耐性変異に関する情報をより迅速・簡便に得ることができる方法が望まれている。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：URL：<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou04/02.html#100>

非特許文献2：「タミフル（登録商標）カプセル75」添付文書、2009年12月改訂（第21版）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、検体中のA型インフルエンザウイルスが新型インフルエンザウイルス、季節型インフルエンザウイルスまたはA型H3N2亜型インフルエンザウイルスのいずれに該当するかの判定、すなわち検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングと、該インフルエンザウイルスのオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを迅速・簡便に行うための試薬を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の多型を解析することによ

り、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを一度に行うことができることを見出し、本発明を完成した。

[0009] 本発明は、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための試験片を提供し、該試験片は、少なくとも3つのプローブが異なる位置に固定されており、(1) 該プローブのうちの少なくとも1つのプローブは、新型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドからなり、(2) 該プローブのうちの少なくとも1つのプローブは、季節型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドからなり、(3) 該プローブのうちの少なくとも1つのプローブは、(3-1) A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異を有する塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチド、または(3-2) A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異を有する塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドからなる。

[0010] 1つの実施態様では、さらに、上記少なくとも3つのプローブとは異なるプローブであって、(4) A型H3N2亜型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型

塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドからなる少なくとも1つのプローブが、上記試験片の該少なくとも3つのプローブとは異なる位置に固定されている。

[0011] 1つの実施態様では、上記A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異は、A型H1N1亜型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のH275Y、ならびにA型H3N2亜型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のE119V、E119DおよびR292Kからなる群より選択される少なくとも1種である。

[0012] 本発明はまた、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うためのキットを提供し、該キットは、上記試験片を含む。

[0013] 1つの実施態様では、上記キットは、ハイブリダイズしたプローブの検出用試薬およびA型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子増幅用プライマー対を含む。

[0014] 本発明はさらに、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための方法を提供し、該方法は、検体中のA型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子を増幅する工程、増幅したノイラミニダーゼ遺伝子を請求項1から3のいずれかの項に記載の試験片と接触させて、該試験片に固定された上記プローブとハイブリダイズさせる工程、該増幅したノイラミニダーゼ遺伝子がハイブリダイズしたプローブを検出する工程、および検出したプローブの位置からA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行う工程を含む。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを迅速・簡便に行うことができる。このため、重篤化のおそれのある患者に対して適切な処置ができると同時に

オセタミビルリン酸塩の不必要な投与を回避することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1A] A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の塩基配列ならびに設計したプライマーおよびプローブの位置の関係を示す図である。

[図1B] A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の塩基配列ならびに設計したプライマーおよびプローブの位置の関係を示す図である。

[図1C] A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の塩基配列ならびに設計したプライマーおよびプローブの位置の関係を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明において、A型インフルエンザウイルスとは、オルトミクソウイルス科のA型インフルエンザウイルス属に分類されるウイルスの総称をいう。A型インフルエンザウイルスは、ウイルス粒子の表面に突出するヘマグルチニン（HA）とノイラミニダーゼ（NA）という二つの糖たんぱく質の変異が大きく、多くの亜型が存在する。亜型は、主に血清型により、例えば、H1N1、H2N2、H3N2などと表記される。インフルエンザウイルスはRNAウイルスであり、RNAからゲノムが構成される。

[0018] 本発明において、季節型インフルエンザウイルスとは、2009年より前に知られているA型のH1N1亜型のインフルエンザウイルスをいう。季節型インフルエンザウイルス株としては、例えば、A-Hawaii-21-2007 H1N1（アクセス番号：EU516112；配列番号1）、A-Paris-341-2007 H1N1（アクセス番号：EU551811；配列番号3）、A-Denmark-122-2008 H1N1（アクセス番号：FJ264981；配列番号4）、A-Hawaii-20-2008 H1N1（アクセス番号：GQ475841；配列番号5）、A-Chile-1-1983 H1N1（アクセス番号：CY020439；配列番号6）、および、A-Kyoto-07K001-2007 H1N1（アクセス番号：CY043591；配列番号7）などが挙げられる。

[0019] 本発明において、新型インフルエンザウイルスとは、2009年以降に流

行したインフルエンザに起因するA型のH1N1亜型のインフルエンザウイルスのうち、従来のインフルエンザウイルスとは異なるインフルエンザウイルスであって、A／H1N1 pdmと命名されたインフルエンザウイルスをいう。新型インフルエンザウイルス株としては、本願出願当時において、例えば、A-California-04-2009-H1N1（アクセス番号：FJ969517；配列番号8）が挙げられる。

[0020] 本発明において、H3N2亜型インフルエンザウイルスとしては、例えば、A-Boston-14-2008 H3N2（アクセス番号：CY044494；配列番号10）、A-Bethesda-956-2006 H3N2（アクセス番号：GU968161；配列番号12）、A-Texas-12-2007 H3N2（アクセス番号：FJ445772；配列番号13）、A-Pennsylvania-13-2008 H3N2（アクセス番号：GQ369891；配列番号14）、A-Texas-AF01-2007 H3N2（アクセス番号：CY044335；配列番号15）、および、A-Pennsylvania-PIT34-2008 H3N2（アクセス番号：CY044359；配列番号16）などが挙げられる。

[0021] 本発明において、オセルタミビルリン酸塩（IUPAC名：（-）-エチル（3R, 4R, 5R）-4-アセトアミド-5-アミノ-3-エチルプロピル）シクロヘックス-1-エン-カルボキシレート モノホスフェート）とは、登録商標：タミフルが付されて販売されている抗インフルエンザウイルス剤の原薬をいう。

[0022] 本発明において、A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異としては、例えば、A型H1N1亜型（新型または季節型を問わない）のNA遺伝子（例えば、配列番号2および9）のH275Y、A型H3N2亜型のNA遺伝子（例えば、配列番号11）のE119V、E119D、R292Kが挙げられる。

[0023] ここで、例えば、「H275Y」とは、A型インフルエンザウイルスのNA遺伝子がコードするタンパク質の第275番目のアミノ酸が野生型のヒス

チジン（H）からチロシン（Y）に変異したことを意味する。「H」、「Y」などはアミノ酸の1文字表記である。

[0024] A型インフルエンザウイルスのNA遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異は、上記のような既知の変異に制限されず、未知の変異でもよい。未知の変異を同定する方法は特に制限されない。例えば、オセルタミビルリン酸塩耐性のA型インフルエンザウイルスより逆転写RT-PCR法などを用いてNA遺伝子を単離し、該遺伝子の塩基配列を解読し、次いで解読した該遺伝子の塩基配列と野生型のNA遺伝子の塩基配列とを比較することにより変異を同定する方法が挙げられる。なお、本発明において、RT-PCRとは、逆転写（RT：Reverse Transcription）と組み合わせたPCRをいう。具体的には、RNAから逆転写によりcDNA（相補的DNA）を合成し、cDNAを鋳型としてPCRを行うことをいう。

[0025] （プローブ）

本発明のプローブは、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための試験片に用いられる。

[0026] 本発明のプローブとしては、（1）新型インフルエンザウイルスのNA遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのNA遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドプローブ（以下、「新型判定プローブ」という場合がある）、（2）季節型インフルエンザウイルスのNA遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのNA遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチド（以下、「季節型判定プローブ」という場合がある）、（3-1）A型インフルエンザウイルスのNA遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異を有する塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、A型インフルエンザウイルスのNA遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌ

クレオチドプローブ（以下、「変異型プローブ」という場合がある）が挙げられる。

[0027] また、変異型プローブの代わりとして、（３－２）Ａ型インフルエンザウイルスのＮＡ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、Ａ型インフルエンザウイルスのＮＡ遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異を有する塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドプローブ（以下、「野生型プローブ」という場合がある）であってもよい。

[0028] 各プローブの長さは、ハイブリダイズさせる条件にもよるが、一般的には１０～３０ヌクレオチド長、好ましくは１２～２６ヌクレオチド長である。また、変異型プローブにおける変異の位置は、変異を確実に識別するために、変異型プローブを構成するオリゴヌクレオチドの中央近辺が好ましい。

[0029] さらに、本発明のプローブとしては、（４）Ａ型Ｈ３Ｎ２亜型インフルエンザウイルスのＮＡ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのＮＡ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドプローブ（以下、「Ｈ３Ｎ２亜型判定プローブ」という場合がある）が挙げられる。

[0030] なお、本発明において、変異型プローブおよび野生型プローブに関しては、これら２つのプローブが検出対象とするＮＡ遺伝子の由来をインフルエンザウイルスの亜型まで特に限定していない。本発明の試験片にＨ３Ｎ２亜型判定プローブが固定されていない場合は、検体として新型インフルエンザウイルスおよび季節型インフルエンザウイルスのＮＡ遺伝子を増幅できるようにＲＴ－ＰＣＲのプライマー対を設定すればよい。本発明の試験片にＨ３Ｎ２亜型判定プローブが固定されている場合は、検体としてＡ型Ｈ３Ｎ２型インフルエンザウイルスのＮＡ遺伝子も増幅できるようにＲＴ－ＰＣＲのプライマー対を設定すればよい。なお、本発明において、検出対象とするＮＡ遺伝子の由来となるインフルエンザウイルスの亜型が特定されている変異型プ

ローブおよび野生型プローブについては、「亜型」+「・」+「変異型／野生型プローブ」というルールで名付けることがある。例えば、検出対象とするN A遺伝子の由来となるインフルエンザウイルスが新型である変異型プローブは、「新型・変異型プローブ」と名付ける。例えば、検出対象とするN A遺伝子の由来となるインフルエンザウイルスがH 3 N 2 亜型である野生型プローブは、「H 3 N 2 亜型・野生型プローブ」と名付ける。

[0031] 上記の各プローブは、標準的なプログラムおよびプライマー解析ソフトウェア、例えば、Primer Express (Perkin Elmer社) を用いることにより設計することができ、自動化オリゴヌクレオチドシンセサイザーなどの標準的な方法を用いて合成することができる。

[0032] さらに、各プローブは、以下で詳述するように、試験片に固定するために5' または3' 末端のいずれか一方が修飾されていてもよい。

[0033] (試験片)

本発明の試験片は、少なくとも3つのプローブが異なる位置に固定されている。少なくとも1つのプローブは新型判定プローブであり、少なくとも1つのプローブは季節型判定プローブであり、残る少なくとも1つのプローブは変異型プローブまたは野生型プローブである。

[0034] 本発明の試験片は、上記プローブを担体表面に固定して作製することができ、複数のプローブを固定する場合は、プローブ毎に担体表面を区切って固定する。担体としては、例えば、ビニル系ポリマー、ナイロン、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ニトロセルロースなどの有機材料；ガラス、シリカなどの無機材料；金、銀などの金属材料が挙げられるが、特に限定されない。成形加工性が容易である点で、有機材料が好ましく、ポリエチレンテレフタレートなどのポリエステル類がより好ましい。担体は、以下の判定方法において発色法を用いる場合には、発色を視認しやすくするために白色であることが好ましい。

[0035] プローブを担体表面に固定する方法としては、物理的方法および化学的方

法が挙げられる。物理的方法は特に制限されない。例えば、担体表面をポリリジンなどのポリカチオン性の高分子で被覆する方法、担体表面が金などの金属材料である場合には、2-アミノエタントチオールなどのアミノ基を有するチオールまたはジスルフィド化合物などで担体表面を処理する方法が挙げられる。これらの方法は、ポリアニオンであるプローブとの静電相互作用を利用するため、固定効率を上げることができる。さらに、プローブの末端に無関係な塩基配列（ポリチミン鎖など）を付加し、固定されるプローブ自体の分子量を増大させることによって、固定効率を上げることにもできる。例えば、ポリチミン付加オリゴヌクレオチドプローブを含む溶液を、ディスペンサを用いてニトロセルロース膜上に吐出し、次いでニトロセルロース膜に紫外線を照射することによって、比較的容易にプローブを固定することができる。具体的には、各プローブを含む溶液をそれぞれ24ゲージの針を備えたディスペンサに入れ、0.5～1.0 μL /分の量で吐出させながら、2.5～8.5 mm/秒の塗布速度で、それぞれ一定の間隔をあけてニトロセルロース膜上に塗布すると、各プローブが一定の間隔で並んだ約1～2 mmの幅のストライプが形成される。このプローブのストライプが形成されたニトロセルロース膜に紫外線を照射することによって、プローブがニトロセルロース膜表面に固定される。さらに、必要に応じて、これらのストライプを横断するように細く切断すると、各プローブが順に固定された多数の試験片を一挙に得ることができる。

[0036] 化学的方法は特に制限されない。例えば、担体の材料がガラス、シリコンなどの無機材料である場合には、プローブの末端をトリメトキシシラン、トリエトキシシランなどのシランカップリング反応が可能な官能基で修飾し、担体を、修飾プローブを含む溶液に24～48時間浸漬し、取り出した後、洗浄する方法が挙げられる。あるいは、担体を、アミノエトキシシランなどのアミノ基を有するシランカップリング剤で処理することにより、担体の表面をアミノ化し、次いで末端にカルボン酸を導入したプローブとアミノカップリング反応させる方法が挙げられる。担体の材料が金、銀などの金属材料

である場合には、プローブの末端をチオール基、ジスルフィド基などの金属と結合可能な官能基で修飾し、担体を、修飾プローブを含む溶液に24～48時間浸漬し、取り出した後、洗浄する方法が挙げられる。

[0037] プローブを担体表面に固定する方法としては、合成したプローブを固定する方法以外に、リソグラフィー技術などを利用して、プローブを担体表面上で合成する方法が挙げられる。

[0038] (A型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための方法)

本発明の方法は、検体中のA型インフルエンザウイルスのNA遺伝子を増幅する工程、増幅したNA遺伝子を上記試験片と接触させて、該試験片に固定された上記プローブとハイブリダイズさせる工程、該増幅したNA遺伝子がハイブリダイズしたプローブを検出する工程、および検出したプローブの位置からA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行う工程を含む。

[0039] 以下は、本発明の方法について説明する。

[0040] 1. 検体

本発明において、検体とは、インフルエンザウイルスを含む物質をいう。検体としては、例えば、鼻腔および咽頭ぬぐい液、ならびにこれらから培養して得られたインフルエンザウイルス自体が挙げられる。検体からのRNAの抽出は適宜実施することができるが、国際感染症研究所のホームページで公表されている「病原体検出マニュアル (URL : <http://www.nih.go.jp/nid/reference/pathogen-manual-60.pdf>)」を参考にすることができる。

[0041] 2. RT-PCR

次に上記検体中のA型インフルエンザウイルスのRNAを出発材料として、RT-PCRを実施する。RT-PCRでインフルエンザウイルスのNA遺伝子を増幅するための条件は適宜設定されるが、上記の「病原体検出マニュアル」を参考にすることができる。RT-PCRに用いるプライマー対は、目的のRNAから逆転写により合成されたNA遺伝子に対応するcDNA

のほぼ全領域を増幅できるように設計すればよい。新型インフルエンザウイルスのN A遺伝子を増幅するプライマー対（以下、「新型用プライマー」という場合がある）としては、以下の実施例に記載の配列番号17および18に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドが、季節型インフルエンザウイルスのN A遺伝子を増幅するプライマー対（以下、「季節型用プライマー」という場合がある）としては、以下の実施例に記載の配列番号19および20に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドが、H3N2亜型インフルエンザウイルスのN A遺伝子を増幅するプライマー（以下、「H3N2亜型用プライマー」という場合がある）としては、以下の実施例に記載の配列番号21および22に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドがそれぞれ挙げられる。これら全てのプライマー対を同時に用いてRT-PCRを実施すれば、A型インフルエンザウイルスがH1N1亜型またはH3N2亜型であるかを問わず、RT-PCRによりN A遺伝子を増幅することができるので好ましい。なお、例えば、配列番号17～22全てのプライマー対を同時に用いてRT-PCRを行い、DNAが増幅されない場合は、検体中のインフルエンザウイルスはB型またはC型である可能性が高いということもできる。また、プライマーの配列も、上記のプローブと同様、標準的なプログラムおよびプライマー解析ソフトウェア、例えばPrimer Express (Perkin Elmer社製)を用いることにより得ることができ、自動化オリゴヌクレオチドシンセサイザーなどの標準的な方法を用いて合成することができる。

[0042] 3. A型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出

増幅したN A遺伝子を上記試験片と接触させて、試験片に固定されたプローブとハイブリダイズさせる方法は特に制限されない。例えば、増幅したN A遺伝子を含む溶液に試験片を一定時間浸漬する方法が挙げられる。浸漬中の温度などの条件は、非特異的なハイブリダゼーションの抑制などを考慮して適宜設定される。

[0043] 増幅したN A遺伝子がハイブリダイズしたプローブを判定する方法は特に

制限されない。例えば、R T - P C R法により増幅する際に、放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質などの標識物質で修飾したプライマー対を用い、増幅したN A 遺伝子に付加されたこれらの標識物質を検出する方法が挙げられる。あるいは、放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質などの標識物質でプローブを修飾し、これらの標識物質を手がかりに増幅したN A 遺伝子がハイブリダイズしたプローブを検出する方法が挙げられる。標識物質を検出する方法は特に制限されない。例えば、ニトロブルーテトラゾリウム（N B T）／5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスファターゼ - p - トルイジニル塩（B C I P）発色法が挙げられる。

[0044] 具体的には、R T - P C R法を行う際に、3' または5' 末端をビオチンで修飾したプライマー対を用いる。次いで、増幅した末端にビオチンを有する遺伝子を含む溶液に試験片を浸漬する。この工程で、増幅したN A 遺伝子は試験片に固定されたプローブとハイブリダイズし得る。次いで、試験片を洗浄し、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを含む溶液に浸漬する。この工程で、試験片に固定されたプローブとハイブリダイズしたN A 遺伝子にアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンが結合する。次いで、洗浄した試験片にN B T／B C I Pを添加し、アルカリホスファターゼの反応による発色を検出する。この発色は視認可能である。発色の有無をより明確にするために、野生型プローブと変異型プローブとで発色の差異を確認してもよい。

[0045] R T - P C Rにより増幅したN A 遺伝子がハイブリダイズしたプローブの位置から、いずれのプローブとハイブリダイズしたかがわかる。各プローブは新型インフルエンザウイルス、季節型インフルエンザウイルスおよびA型H 3 N 2 亜型インフルエンザウイルス、ならびに該インフルエンザウイルスのオセルタミビルリン酸塩耐性と対応づけられているため、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うことができる。

[0046] （A型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐

性変異の検出とを同時に行うためのキット)

本発明のキットは、上記の試験片を含む。好ましくは、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うために適切な任意の試薬類を含み得る。試薬類としては、例えば、遺伝子増幅用試薬、ハイブリダイズしたプローブの検出用試薬が挙げられる。遺伝子増幅用試薬は、R T - P C Rの増幅用プライマー対も含み得る。ハイブリダイズしたプローブの検出用試薬としては、例えば、N B T / B C I P発色法の場合、ビオチン、ストレプトアビジン修飾アルカリホスファターゼ、N B TおよびB C I Pが挙げられる。

実施例

[0047] 以下に、実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0048] (実施例1 : A型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための試験片の作製)

1. プローブの合成

以下に示す、新型判定プローブ、季節型判定プローブおよびH 3 N 2亜型判定プローブを作製する。

[0049] 新型判定プローブ : GAAATGAATGCCCCCTAATTA (配列番号23)

季節型判定プローブ : GAGTTGAATGCACCCAATTT (配列番号24)

H 3 N 2亜型判定プローブ : ACATTGTCAGGAAGTGCTCA (配列番号25)

[0050] また、以下に示す、新型インフルエンザのRNAを出発材料とするR T - P C Rで増幅したDNA、季節型インフルエンザのRNAを出発材料とするR T - P C Rで増幅したDNA、および、H 3 N 2亜型インフルエンザのRNAを出発材料とするR T - P C Rで増幅したDNAに対する、野生型プローブおよび変異型プローブをそれぞれ作製する。

[0051] 新型・野生型プローブ : CCCTAATTATCACTATGAGG (配列番号26)

新型・変異型プローブ : CCCTAATTATTACTATGAGG (配列番号27)

)

季節型・野生型プローブ : ACCCAATTTTCATTATGAGG (配列番号 2 8

)

季節型・変異型プローブ : ACCCAATTTTATTATGAGG (配列番号 2 9

)

H 3 N 2 亜型・野生型プローブ 1 : TGACAAGAGAACCTTATGTG (配列番号 3 0

)

H 3 N 2 亜型・変異型プローブ 1 a : TGACAAGAGTACCTTATGTG (配列番号 3 1

)

H 3 N 2 亜型・変異型プローブ 1 b : TGACAAGAGACCTTTATGTG (配列番号 3 2

)

H 3 N 2 亜型・野生型プローブ 2 : TGACAAGAGAACTTTATGTG (配列番号 3 3

)

H 3 N 2 亜型・変異型プローブ 2 : TGACAAGAGACCTTTATGTG (配列番号 3 4

)

ここで、新型・野生型プローブ、新型・変異型プローブ、季節型・野生型プローブ、および季節型・変異型プローブは、H 1 N 1 亜型（新型または季節型を問わない）のN A遺伝子のH 2 7 5 Y変異に対応するプローブである。また、H 3 N 2 亜型・野生型プローブ 1、およびH 3 N 2 亜型・変異型プローブ 1 aは、H 3 N 2 亜型（新型または季節型を問わない）のN A遺伝子のE 1 1 9 V変異に対応するプローブである。また、H 3 N 2 亜型・野生型プローブ 2、およびH 3 N 2 亜型・変異型プローブ 1 bは、H 3 N 2 亜型のN A遺伝子のE 1 1 9 D変異に対応するプローブである。また、H 3 N 2 亜型・野生型プローブ 2、およびH 3 N 2 亜型・変異型プローブ 2は、H 3 N 2 亜型のN A遺伝子のR 2 9 2 K変異に対応するプローブである。

[0052] 2. プローブの固定

上記各プローブの5'末端にターミナルトランスフェラーゼ（Promega社製）を用いて、ポリチミンの付加を行う。具体的には、ターミナルトランスフ

エラーゼ（30 unit/μL）を0.4 μL、チミジン三リン酸（10 pmol/μL）を2 μL、オリゴヌクレオチドプローブ（50 mM）を2 μL、製品添付の反応緩衝液を2 μL、および精製水3.6 μLを混合して反応溶液を調製し、37℃で4時間反応させた後、反応溶液に10×SSC緩衝液90 μLを添加することにより、ポリチミンが付加されたオリゴヌクレオチドプローブを含む溶液（1 pmol/μL）を得る。

[0053] 次いで、ポリチミンが付加された各プローブを含む溶液をそれぞれ24ゲージの針を備えたディスペンサに入れ、0.7 μL/分の量で吐出させながら、2.5 mm/秒の塗布速度で、2 mmの幅のストライプになるようにニトロセルロース膜（縦75 mm×横150 mm：Whatman社製）上に2 mm間隔で縦方向に塗布する。次いで、これらのニトロセルロース膜に312 nmの紫外線を2分間照射して、プローブをニトロセルロース膜に固定する。次いで、ニトロセルロース膜を、すべてのストライプを含むように切断して、5 mm×150 mmの試験片を作製する。

[0054] （実施例2：実施例1の試験片を用いたA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出との同時実施）

1. RT-PCRによるNA遺伝子の増幅

インフルエンザと疑われる患者の鼻腔ぬぐい液を採取する。この検体を、配列番号17に記載の塩基配列からなる新型用プライマー1、配列番号18に記載の塩基配列からなりかつ5'末端にビオチンを結合させた新型用プライマー2、配列番号19に記載の塩基配列からなる季節型用プライマー1、配列番号20に記載の塩基配列からなりかつ5'末端にビオチンを結合させた季節型用プライマー2、配列番号21に記載の塩基配列からなるH3N2亜型用プライマー1、配列番号22に記載の塩基配列からなりかつ5'末端にビオチンを結合させたH3N2亜型用プライマー2、およびTaq DNAポリメラーゼ（ロシュ・ダイアグノスティクス社製）を用いるPCR法により増幅する。

[0055] 新型用プライマー1 : ATGAATCCAAACCAAAAGATAATAA（配列番号17）

)

新型用プライマー 2 : AGACCAACCCACAGTGTCACTGTTT (配列番号 18)

)

季節型用プライマー 1 : ATGAACCCAAATCAAAAGATAATAA (配列番号 19)

)

季節型用プライマー 2 : AGACCAGTTTGCAGTATCACTATTA (配列番号 20)

)

H3N2 亜型用プライマー 1 : ATGAATCCAAATCAAAAGATAATAA (配列番号 21)

)

H3N2 亜型用プライマー 2 : TGAGCCTGTTCCATATGTACCTGAG (配列番号 22)

)

[0056] 2. ハイブリダイズしたプローブの検出

増幅した遺伝子を含む溶液 10 μ L に、水酸化ナトリウム (5 M)、エチレンジアミン四酢酸 (0.05 M) の溶液 (10 μ L) を添加してよく攪拌し、5 分間放置して、増幅した遺伝子を 1 本鎖に変性する。この溶液に、ドデシル硫酸ナトリウム (0.01 w/v%)、塩化ナトリウム (1.8 w/v%)、クエン酸ナトリウム (1.0 w/v%) の溶液 (1 mL)、および実施例 2 で作製した試験片を添加し、混合液を 62 °C にて 30 分間振盪させる。次いで、混合液から試験片を取り出し、洗浄後、試験片にアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを添加し、さらにニトロブルーテトラゾリウム (NBT) および 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスファターゼ-p-トリイジニル塩 (BCIP) を添加して、試験片を発色させる。

産業上の利用可能性

[0057] 本発明によれば、検体中の A 型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを迅速・簡便に行うことができる。このため、重篤化のリスクが高い新型インフルエンザウイルスに感染した患者や、オセルタミビルリン酸塩耐性の A 型インフルエンザウイルスに感染し

た患者を適切に治療することが可能となる。インフルエンザ治療の適切な実施は、患者や医者負担を軽減するだけでなく、社会全体の医療費の抑制に貢献する。

請求の範囲

[請求項1]

検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための試験片であって、少なくとも3つのプローブが異なる位置に固定されており、

(1) 該プローブのうちの少なくとも1つのプローブが、新型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドからなり、

(2) 該プローブのうちの少なくとも1つのプローブが、季節型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドからなり、

(3) 該プローブのうちの少なくとも1つのプローブが、

(3-1) A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異を有する塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチド、または

(3-2) A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異を有する塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドからなる、試験片。

[請求項2]

さらに、前記少なくとも3つのプローブとは異なるプローブであって、

(4) A型H3N2亜型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得るが、他のインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の野生型塩基配列からなる任意の領域とハイブリダイズし得ないオリゴヌクレオチドからなる少なくとも1つのプローブが、前記試験片の該少なくとも3つのプローブとは異なる位置に固定されている、請求項1に記載の試験片。

[請求項3] 前記A型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のオセルタミビルリン酸塩耐性変異が、A型H1N1亜型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のH275Y、ならびにA型H3N2亜型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子のE119V、E119DおよびR292Kからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1または2に記載の試験片。

[請求項4] 請求項1から3のいずれかの項に記載の試験片を含む、検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うためのキット。

[請求項5] さらに、ハイブリダイズしたプローブの検出用試薬およびA型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子増幅用プライマー対を含む、請求項4に記載のキット。

[請求項6] 検体中のA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための方法であって、

検体中のA型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子を増幅する工程、

増幅したノイラミニダーゼ遺伝子を請求項1から3のいずれかの項に記載の試験片と接触させて、該試験片に固定された前記プローブとハイブリダイズさせる工程、

該増幅したノイラミニダーゼ遺伝子がハイブリダイズしたプローブを検出する工程、および

検出したプローブの位置からA型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行う工程を含む、方法。

Strain name	Accession No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522
-------------	---------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[図1B]

Strain name	Accession No.	H1N1 probe
季節型 A-Hawaii-21-2007H1N1	EU516112	791 ctaaatcaatagagttgaaatgcacccaattttattatgaggaatgttcctgttaccag 850 gagttgaaatgcacccaattt
季節型 A-Paris-341-2007H1N1	EU551811	791 ctaaatcaatagagttgaaatgcacccaattttattatgaggaatgttcctgttaccag 850
季節型 A-Denmark-122-2008H1N1	FJ264981	791 ctaaatcaatagagttgaaatgcacccaattttattatgaggaatgttcctgttaccag 850
季節型 A-Hawaii-20-2008H1N1	GQ475841	791 ctaaatcaatagagttgaaatgcacccaattttattatgaggaatgttcctgttaccag 850
季節型 A-Chile-1-1983H1N1	CY020439	791 ctaaatcaatagagttgaaatgcacccaattttattatgaggaatgttcctgttaccag 850
季節型 A-Kyoto-07K001-2007H1N1	CY043591	791 ctaaatcaatgagttgaaatgcacccaattttattatgaggaatgttcctgttaccag 850 H1N1 wild probe acccaattttcattatgagg H1N1 mutant probe acccaattttattatgagg
新型 A-California-04-2009H1N1	FJ969517	newH1N1 probe 791 tcaaatcagtcgaaatgaaatgccccctaattatcactatgaggaatgttcctgttaccag 850 newH1N1 wild probe ccctaattatcactatgagg newH1N1 mutant probe ccctaattattactatgagg
H3N2亜型 A-Boston-14-2008H3N2	CY044494	H3N2 probe 788 ttcatactagcacattgtcagggaagtgtcagcaatgtcaggagtgctcctgtatcctc 847 acattgtcagggaagtgtc
H3N2亜型 A-Bethesda-956-2006H3N2	GU968161	788 ttcatactagcacattgtcagggaagtgtcagcaatgtcaggagtgctcctgtatcctc 847
H3N2亜型 A-Texas-12-2007H3N2	FJ445772	788 ttcatactagcacattgtcagggaagtgtcagcaatgtcaggagtgctcctgtatcctc 847
H3N2亜型 A-Pennsylvania-13-2008H3N2	GQ369891	788 ttcatactagcacattgtcagggaagtgtcagcaatgtcaggagtgctcctgtatcctc 847
H3N2亜型 A-Texas-AF01-2007H3N2	CY044335	788 ttcatactagcacattgtcagggaagtgtcagcaatgtcaggagtgctcctgtatcctc 847
H3N2亜型 A-Pennsylvania-PIT34-2008H3N2	CY044359	788 ttcatactagcacattgtcagggaagtgtcagcaatgtcaggagtgctcctgtatcctc 847

[図1C]

Strain name	Accession No.	
季節型 A-Hawaii-21-2007H1N1	EU516112	1321 ggagagcagcatttctttttgtggcgtaataagtgatactgcaaaactgggtcttggccagac 1380
季節型 A-Paris-341-2007H1N1	EU551811	1321 ggagagcagcatttcccttttggcgtaataagtgatactgcaaaactgggtcttggccagac 1380
季節型 A-Denmark-122-2008H1N1	FJ264981	1321 ggagagcagcatttctttttgtggcgtaataagtgatactgcaaaactgggtct 1371
季節型 A-Hawaii-20-2008H1N1	GQ475841	1321 ggagagcagcatttctttttgtggcgtaataagtgatactgcaaaactgggtcttggccagac 1380
季節型 A-Chile-1-1983H1N1	CY020439	1321 ggagagcagcatttctttttgtggcgtaataagtgatactgcaaaactgggtcttggccagac 1380
季節型 A-Kyoto-07K001-2007H1N1	CY043591	1321 ggagagcagcatttctttttgtggcgtaataagtgatactgcaaaactgggtct 1371
		H1N1 reverse primer taataagtgatactgcaaaactgggtct
新型 A-California-04-2009H1N1	FJ969517	1318 ggagagcagcataatcccttttgggtgtaaacagtgacactgtgggttgggtcttggccagac 1377
		newH1N1 reverse primer aaacagtgacactgtgggttgggtct
H3N2亜型 A-Boston-14-2008H3N2	CY044494	1321 aacagtatgtgtgtgtgtgtgtgtggcacctcagggtacatatggaacagggtctcatggcctgat 1380
H3N2亜型 A-Bethesda-956-2006H3N2	GU968161	1321 aacagtatgtgtgtgtgtgtgtgtggcacctcagggtacatatggaacagggtctcatggcctgat 1380
H3N2亜型 A-Texas-12-2007H3N2	FJ445772	1321 aacagtatgtgtgtgtgtgtgtgtggcacctcagggtacatatggaacagggtctcatggcctgat 1380
H3N2亜型 A-Pennsylvania-13-2008H3N2	GQ369891	1321 aacagtatgtgtgtgtgtgtgtgtggcacctcagggtacatatggaacagggtctcatggcctgat 1380
H3N2亜型 A-Texas-AF01-2007H3N2	CY044335	1321 aacagtatgtgtgtgtgtgtgtgtggcacctcagggtacatatggaacagggtctcatggcctgat 1380
H3N2亜型 A-Pennsylvania-PIT34-2008H3N2	CY044359	1321 aacagtatgtgtgtgtgtgtgtgtggcacctcagggtacatatggaacagggtctcatggcctgat 1380
		H3N2 reverse primer ctcagggtacatatggaacagggtctca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/067761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VAN DER VRIES, E. et al., Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. J Clin Virol. (2010 Jan) Vol.47 p.34-37	1-6
Y	CARR, M.J. et al., Rapid molecular detection of the H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. J Virol Methods. (2008) Vol.153 p.257-262	1-6

☒ 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 October, 2011 (28.10.11)

Date of mailing of the international search report
08 November, 2011 (08.11.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/067761

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STEAIN, M.C. et al., Detection of influenza A H1N1 and H3N2 mutations conferring resistance to oseltamivir using rolling circle amplification. Antiviral Res. (2009) Vol.84 p.242-248	1-6
Y	DAWSON, E.D. et al., MChip: a tool for influenza surveillance. Anal Chem. (2006) Vol.78 p.7610-7615	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	VAN DER VRIES, E. et al., Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. J Clin Virol. (2010 Jan) Vol. 47 p. 34-37	1-6

☒ 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

2 8 . 1 0 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

0 8 . 1 1 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

小川 明日香

4 B

3 8 4 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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	CARR, M.J. et al., Rapid molecular detection of the H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. J Virol Methods. (2008) Vol.153 p.257-262	1-6
Y	STEAIN, M.C. et al., Detection of influenza A H1N1 and H3N2 mutations conferring resistance to oseltamivir using rolling circle amplification. Antiviral Res. (2009) Vol.84 p.242-248	1-6
Y	DAWSON, E.D. et al., MChip: a tool for influenza surveillance. Anal Chem. (2006) Vol.78 p.7610-7615	1-6

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. 提出手段

☐ 紙形式

☒ 電子形式

b. 提出時期

☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：