

(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  
2015年6月18日(18.06.2015)



(10) 国際公開番号  
WO 2015/087945 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/082773
- (22) 国際出願日: 2014年12月11日(11.12.2014)
- (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 2013-255748 2013年12月11日(11.12.2013) JP  
特願 2014-185917 2014年9月12日(12.09.2014) JP
- (71) 出願人: 学校法人埼玉医科大学(SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 持田 智(MOCHIDA, Satoshi); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 内田 義人(UCHIDA, Yoshihito); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 神山 淳一(KOUYAMA, Jun-ichi); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 内木 佳代子(NAIKI, Kayoko); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 廣田 浩一, 外(HIROTA, Koichi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木1-24-10
- T S ビル 4 階 山の手合同国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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))

(54) Title: DETECTION METHOD FOR MUTATION IN 93RD AMINO ACID OF HEPATITIS C VIRUS NS5A PROTEIN, AND DETECTION KIT FOR MUTATION IN 93RD AMINO ACID OF HEPATITIS C VIRUS NS5A PROTEIN

(54) 発明の名称: C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法、及びC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット

(57) Abstract: A detection method, etc. for mutations in the 93rd amino acid of the hepatitis C virus NS5A protein, the method including a step for synthesizing cDNA using the hepatitis C viral RNA in a sample as a template, and a step for using a cycling probe method to conduct a real-time PCR that uses the cDNA as a template. The primer set used for the real-time PCR is a specific primer set, and the probes used for the real-time PCR include a specific probe.

(57) 要約: 検体中のC型肝炎ウイルスのRNAを鋳型としてcDNAを合成する工程と、前記cDNAを鋳型とし、サイクリングプローブ法を用いてリアルタイムPCRを行う工程とを含み、前記リアルタイムPCRに用いるプライマーセットが、特定のプライマーセットであり、前記リアルタイムPCRに用いるプローブが、特定のプローブを含むC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法などである。



WO 2015/087945 A1

## 明 細 書

発明の名称：

C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法、及びC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット

### 技術分野

[0001] 本発明は、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法、及びC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットに関する。

### 背景技術

[0002] C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; 以下、「HCV」と称することがある) は、輸血後非A非B型肝炎の主たる原因ウイルスで、約9,500塩基のプラス鎖RNAをゲノムとして持っている。厚生労働省の統計によると、2000年における日本でのHCVのキャリア数は、150万人以上であると推計されている。HCVに感染した場合は、一過性の急性肝炎を経た後に、慢性肝炎、肝硬変、肝癌への進展傾向が強く、日本における原発性肝癌のおよそ80%がHCV関連肝癌であると考えられている。HCVは、塩基配列の相同性によって遺伝子型が分類され、全世界では30種類程度に分類される。日本においては、日本人に感染が認められる遺伝子型及び日本国内で検出された遺伝子型として、1a型、1b型、2a型、2b型、3a型の5つの遺伝子型が確認されている。日本における前記5つの遺伝子型の割合としては、1b型、2a型及び2b型がほとんどを占めており、1a型及び3a型はわずかである。

[0003] HCVによる慢性肝炎の治療には、主にインターフェロン (以下、「IFN」と称することがある) が用いられている。また、直接作用型抗ウイルス剤 (Direct-acting Antiviral Agent) も使用されている。

前記直接作用型抗ウイルス剤としては、例えば、ダクラタスビルがある。ダクラタスビルは、HCVのNS5A (non-structural 5A) タンパク質の阻害剤である。これまでに、HCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸 (野生型は、チロシン) に変異が起こっているとダクラタスビルに対して耐性を示すことが知られている (例えば、非特許文献1参照)。そのため、ダクラタスビルを患者に投与する前に、HCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸に変異が起こっているか否かを、低コストで、簡便かつ迅速に確認できることが求められている。

[0004] また、HCVは、ヒトの体内において、複数のバリエーションのHCVが混在した形で存在していることが知られている。そのため、検体中のHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸に変異が起こっているか否かを確認する際には、変異の有無のみならず、前記変異を有するHCV及び前記変異を有さないHCVの定量や変異率を測定することも求められる。

[0005] 前記変異の有無を確認する方法としては、ダイレクトシーケンスや、次世代シーケンサーなどを用いて塩基配列を解読することが考えられる。

しかしながら、ダイレクトシーケンスは、安価に実施可能だが、定量性はなく、野生型や変異型の定量や変異率を測定するのは不可能であるという問題がある。また、次世代シーケンサーは、定量性はあるものの、1ラン当たりの費用が莫大であり、臨床分野で少数のゲノムサイズが比較的小さいHCVなどに使用することは事実上不可能であるという問題がある。

[0006] また、HCVは、変異を起こしやすく、同一の遺伝子型であっても1塩基から数100塩基の違いを有する多数のバリエーションが存在することが知られている。そのため、検体中のHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸に変異が起こっているか否かを確認する際には、HCVの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なHCVに対して適用し得る方法が求められている。

[0007] したがって、HCVの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有

無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定することができる方法の速やかな開発が強く求められているのが現状である。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0008] 非特許文献1: Robert A. Fridell, et al., Antimicrob Agents Chemother 2010, 54, 3641-50

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、前記従来における諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、HCVの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定することができるC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法、及びC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット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

- [0010] 前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、
- <1> 検体中のC型肝炎ウイルスのRNAを鋳型としてcDNAを合成するcDNA合成工程と、
  - 前記cDNAを鋳型とし、サイクリングプローブ法を用いてリアルタイムPCRを行うリアルタイムPCR工程とを含み、
  - 前記リアルタイムPCRに用いるプライマーセットが、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む領域を増幅可能なプライマーセットであり、
  - 前記リアルタイムPCRに用いるプローブが、
  - 下記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補

的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含むことを特徴とするC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法である。

a a c g c a t [ a ] c a (配列番号：1)

a a c g c a c [ a ] c a (配列番号：2)

a c g c a c [ a ] c a (配列番号：18)

配列番号：1、2、及び18中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<2> 下記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含むことを特徴とするC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットである。

a a c g c a t [ a ] c a (配列番号：1)

a a c g c a c [ a ] c a (配列番号：2)

a c g c a c [ a ] c a (配列番号：18)

配列番号：1、2、及び18中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

## 発明の効果

[0011] 本発明によれば、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、HCVの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定することができるC型肝炎

ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法、及びC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットを提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、試験例1におけるダイレクトシーケンスの結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0013] (C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法)

本発明のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異(以下、「HCV NS5A Y93変異」と称することがある)の検出方法は、cDNA合成工程と、リアルタイムPCR工程とを少なくとも含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

[0014] 前記C型肝炎ウイルスの遺伝子型としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、1a型、1b型、2a型、2b型が好ましい。

[0015] <cDNA合成工程>

前記cDNA合成工程は、検体中のC型肝炎ウイルスのRNAを鋳型としてcDNAを合成する工程である。

[0016] -検体-

前記検体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、HCV感染を検査される患者(以下、「被検者」と称することがある)の血液、組織などが挙げられる。

前記被検者から血液、組織などを採取する方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができる。

[0017] -C型肝炎ウイルスのRNAの調製-

前記C型肝炎ウイルスのRNAの調製方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができる。例えば、QIAamp MinElu

te Virus Spin Kit (キアゲン社製) を用いて調製する方法などが挙げられる。

[0018] - cDNAの合成 -

前記cDNAの合成方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社製)、cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version) (タカラバイオ株式会社製) を用いて合成する方法などが挙げられる。

[0019] <リアルタイムPCR工程>

前記リアルタイムPCR工程は、前記cDNAを鋳型とし、サイクリングプローブ法を用いてリアルタイムPCRを行う工程である。

[0020] <<サイクリングプローブ法>>

前記サイクリングプローブ法を用いたリアルタイムPCRは、RNAとDNAとからなるキメラプローブと、RNase Hとの組合せにより、試料における塩基配列及びその量を測定する方法である。

前記プローブは、一方の末端が蛍光物質で修飾されており、他方の末端がクエンチャー物質で修飾されている。そのため、増幅産物の相補的な配列と、プローブとがハイブリッドを形成した後にRNase HによりRNA部分が切断されることにより、強い蛍光が生じる。前記蛍光強度を測定することで、増幅産物量を定量することができる。

前記蛍光物質としては、特に制限はなく、公知の蛍光物質を適宜選択することができ、例えば、FAM、HEX、ROXなどが挙げられる。

前記クエンチャー物質としては、特に制限はなく、公知のクエンチャー物質を適宜選択することができ、例えば、Eclipse Dark Quencher (Epoch Biosciences社製)、BHQ1 Dark Quencher (BIOSERCH TECHNOLOGIES社製)、BHQ2 Dark Quencher (BIOSERCH TEC

HNOLOGIES社製)などが挙げられる。

[0021] プロローブ

前記プロローブは、下記配列番号：1で表される塩基配列からなるプロローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプロローブと、下記配列番号：2で表される塩基配列からなるプロローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプロローブ、及び下記配列番号：18で表される塩基配列からなるプロローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプロローブの少なくともいずれかをとを少なくとも含み、必要に応じて更にその他のプロローブを含む。

[0022] 前記HCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列近傍の配列は、下記配列番号：13で表されるとおりである。

5' - a a (y) g c (n) y a (y) - 3' (配列番号：13)

配列番号：13は、NS5Aタンパク質の91番目から93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であり、下線部は、93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する。また、配列番号：13中、「y」は、チミン又はシトシンを示し、「n」は、アデニン、グアニン、シトシン、又はチミンを示す。

後述する製造例1に示すように、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異は、主に277番目の塩基がtからcになることにより生じる。また、273番目、276番目、279番目の塩基（前記配列番号：13において、( )を付した塩基）では、HCV間にバリエーションが存在する。そのため、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定するためには、プロローブの設計が非常に重要である。

[0023] ー配列番号：1で表される塩基配列からなるプロローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプロローブー

前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプロローブ（以下、「Ycaccタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a c g c a t [a] c a - 3' (配列番号：1)



前記配列番号：1中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がチロシンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にcacである配列である。

前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を引き起こす277番目の塩基をRNAとするのではなく、その隣の278番目の塩基をRNAとすることにより、前記Ycacタイプの配列に加え、Ycgcタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列）、Ycccタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にcccである配列）、及びYctcタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にctcである配列）をも検出することができる。即ち、前記配列番号：13で表される塩基配列における「n」のバリエーションの影響を受けずにNS5Aの93番目がチロシンであるか否か及びその量を測定することができる。

前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0024] ー配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「Hcacタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a c g c a c [a] c a - 3' (配列番号：2)

前記配列番号：2中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13において( )を付した位置の塩基が5'側から順にc a cである配列である。

前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を引き起こす277番目の塩基をRNAとするのではなく、その隣の278番目の塩基をRNAとすることにより、前記H c a cタイプの配列に加え、H c g cタイプの配列(前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にc g cである配列)、H c c cタイプの配列(前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にc c cである配列)、及びH c t cタイプの配列(前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にc t cである配列)をも検出することができる。即ち、前記配列番号：13で表される塩基配列における「n」のバリエーションの影響を受けずにNS5Aの93番目がヒスチジンであるか否か及びその量を測定することができる。

前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0025] ー配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ(以下、「H c a cタイプ」と称することがある)の配列は、以下のとおりである。

5' - a c g c a c [a] c a - 3' (配列番号：18)

前記配列番号：18中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する

配列であることを示す。前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcacである配列である。

前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を引き起こす277番目の塩基をRNAとするのではなく、その隣の278番目の塩基をRNAとすることにより、前記Hcacタイプの配列に加え、Hcgcタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列）、Hcccタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcccである配列）、及びHctcタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にctcである配列）をも検出することができる。即ち、前記配列番号：13で表される塩基配列における「n」のバリエーションの影響を受けずにNS5Aの93番目がヒスチジンであるか否か及びその量を測定することができる。

前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0026] 前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ、又は前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0027] ーその他のプローブー

前記その他のプローブとしては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記その他のプローブとしては、下記配列番号：9で表される塩基配列か

らなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む態様が、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無をより高い精度で検出することができる点で、好ましい。

[0028] ー配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「Ycg cタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a c g c g t [ a ] c a - 3' （配列番号：9）

前記配列番号：9中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がチロシンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にc g cである配列である。

前記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

前記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0029] 前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、前記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブとを併用する場合の使用量の比としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択する

ことができ、例えば、分子数の比で、1 : 1とすることができる。

[0030] ---配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ---

前記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「Hcgcタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a c g c g c [a] c a - 3' （配列番号：10）

前記配列番号：10中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列である。

前記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0031] --配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ---

前記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「Hcgcタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a c g c g c [a] c a - 3' （配列番号：22）

前記配列番号：22中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列である。

前記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0032] 前記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相

補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ、又は前記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0033] 前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかと、前記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかをと併用する場合の使用量の比としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、分子数の比で、1：1とすることができる。

[0034] 前記その他のプローブは、更に、下記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかと含んでもよく、更に、(1) 下記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかからなる組合せ、及び(2) 下記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：21で表される塩基配列か

らなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかからなる組合せの少なくともいずれかを含んでもよい。

前記その他のプローブを用いることにより、更に多くの検体におけるC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を検出することができる。

[0035] ー配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「Ycatタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a c g c a t [ a ] t a - 3' （配列番号：3）

前記配列番号：3中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がチロシンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にc a tである配列である。

前記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

前記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0036] ー配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「Hcatタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a c g c a c [ a ] t a - 3' （配列番号：4）

前記配列番号：4中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部

はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にc a tである配列である。

前記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0037] ---配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ---

前記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「H c a tタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a c g c a c [a] t a - 3' （配列番号：19）

前記配列番号：19中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にc a tである配列である。

前記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0038] 前記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ、又は前記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0039] ---配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ---



前記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「Y t a cタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a t g c a t [a] c a - 3' （配列番号：5）

前記配列番号：5中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がチロシンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にt a cである配列である。

前記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

前記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0040] ---配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ---

前記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「H t a cタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a t g c a c [a] c a - 3' （配列番号：6）

前記配列番号：6中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にt a cである配列である。

前記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0041] ー ー ー 配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ ー ー ー

前記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「H t a cタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a t g c a c [a] c a - 3' （配列番号：20）

前記配列番号：20中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にt a cである配列である。

前記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0042] 前記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ、又は前記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0043] ー ー ー 配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ ー ー ー

前記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「Y t a tタイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a t g c a t [a] t a - 3' （配列番号：7）

前記配列番号：7中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がチロシンであり、前記配列番号：1

3で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順に t a t である配列である。

前記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

前記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0044] ---配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ---

前記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「H t a t タイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a a t g c a c [a] t a - 3' （配列番号：8）

前記配列番号：8中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順に t a t である配列である。

前記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0045] ---配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ---

前記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ（以下、「H t a t タイプ」と称することがある）の配列は、以下のとおりである。

5' - a t g c a c [a] t a - 3' （配列番号：21）

前記配列番号：21中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する

配列であることを示す。前記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブは、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にt a tである配列である。

前記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブは、その相補的な塩基配列からなるプローブとしてもよい。

[0046] 前記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。これらの中でも、前記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ、又は前記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0047] 前記サイクリングプローブ法を用いたリアルタイムPCRでは、前記プローブは、少なくとも下記(1)の組合せを用い、必要に応じて更に下記(2)、(3)、(4)、及び(5)の少なくともいずれかの組合せを用いる。これらの中でも、下記(1)の組合せと、下記(2)の組合せとを少なくとも含む態様が好ましい。

(1) 前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとの組合せ

(2) 前記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、前記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとの組合せ

(3) 前記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはそ

の相補的な塩基配列からなるプローブと、前記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとの組合せ

(4) 前記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、前記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとの組合せ

(5) 前記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、前記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとの組合せ

[0048] プライマーセット

前記プライマーセットとしては、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む領域を増幅可能なプライマーセットであれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む領域を増幅可能である点で、下記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット、及び下記配列番号：11に相補的な塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12に相補的な塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセットのいずれかであることが好ましい。

[0049] ー配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマー若しくはその相補的な塩基配列からなるプライマーー

前記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーは、NS5A

タンパク質をコードする塩基配列の208番目から226番目に対応するものであり、その配列は、以下のとおりである。

5' - g g t t c c a t g a g g a t c g t t g - 3' (配列番号：11)

前記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーは、その相補的な塩基配列からなるプライマーであってもよいが、前記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーが好ましい。

[0050] ー配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマー若しくはその相補的な塩基配列からなるプライマーー

前記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーは、NS5Aタンパク質をコードする塩基配列の376番目から394番目に対応するものであり、その配列は、以下のとおりである。

5' - c c g t c a c g t a g t g g a a a t c - 3' (配列番号：12)

前記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーは、その相補的な塩基配列からなるプライマーであってもよいが、前記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーが好ましい。

[0051] 前記リアルタイムPCRは、前記組合せのプローブを同一の反応容器に入れて行ってもよいし、それぞれのプローブを異なる反応容器に入れて行ってもよいが、検出感度に優れる点で、異なる反応容器に入れて行うことが好ましい。

前記組合せのプローブを同一の反応容器に入れて行う場合には、それぞれのプローブを修飾する前記蛍光物質を異なるものとすればよい。前記それぞれのプローブを異なる反応容器に入れて行う場合は、同一の蛍光物質を用いてもよいし、それぞれ異なる蛍光物質を用いてもよい。

前記リアルタイムPCRは、例えば、Cycleave (登録商標) PCR Reaction Mix (タカラバイオ株式会社製) を用いて行うことができる。

前記リアルタイムPCRの反応条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記リアルタイムPCRにより、検体中におけるHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を定量的に測定することができ、HCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を検出することができる。

[0052] <その他の工程>

前記その他の工程としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記被検者から血液、組織などを採取する採取工程などが挙げられる。

[0053] (C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット)

本発明のHCV NS5A Y93変異の検出用キットは、前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかをと少なくとも含み、必要に応じて更にその他の構成を含む。

[0054] 前記C型肝炎ウイルスの遺伝子型としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、1a型、1b型、2a型、2b型が好ましい。

[0055] <配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ>

前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと

同様であり、好ましい態様も同様である。

[0056] <配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ>

前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0057] <配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ>

前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0058] <その他の構成>

前記その他の構成としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、前記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び前記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの以外のプローブ（以下、「その他のプローブ」と称することがある）、プライマーセット、PCRに用いる試薬などが挙げられる。

[0059] -その他のプローブ-

前記HCV NS5A Y93変異の検出用キットにおけるその他のプローブとしては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。



前記その他のプローブとしては、下記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む態様が、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無をより高い精度で検出することができる点で、好ましい。

[0060] ー配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0061] ー配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0062] ー配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したも

のと同様であり、好ましい態様も同様である。

- [0063] 前記その他のプローブは、更に、下記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかと含んでもよく、更に、(1) 下記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかからなる組合せ、及び(2) 下記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかからなる組合せの少なくともいずれかを含んでもよい。

前記その他のプローブを用いることにより、更に多くの検体におけるC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を検出することができる。

- [0064] ー配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブー

前記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

- [0065] ー配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的

な塩基配列からなるプローブ――

前記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0066] ――配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ――

前記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0067] ――配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ――

前記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0068] ――配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ――

前記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0069] ――配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補

的な塩基配列からなるプローブ――

前記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0070] ―配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ――

前記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0071] ―配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ――

前記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0072] ―配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ――

前記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0073] ―プライマーセット――

前記プライマーセットとしては、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む領域を増幅可能なプライマーセットであれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む領域を増幅可能である点で、下記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット、及び前記配列番号：11に相補的な塩基配列からなるプライマーと、前記配列番号：12に相補的な塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセットのいずれかであることが好ましい。

[0074] ー配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマー若しくはその相補的な塩基配列からなるプライマーー

前記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマー若しくはその相補的な塩基配列からなるプライマーは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマー若しくはその相補的な塩基配列からなるプライマー」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

[0075] ー配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマー若しくはその相補的な塩基配列からなるプライマーー

前記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマー若しくはその相補的な塩基配列からなるプライマーは、上記した本発明のHCV NS5A Y93変異の検出方法の「配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマー若しくはその相補的な塩基配列からなるプライマー」の項目に記載したものと同様であり、好ましい態様も同様である。

## 実施例

[0076] 以下、製造例、試験例などを挙げて、本発明を説明するが、本発明は、以下の製造例、試験例などに何ら限定されるものではない。

[0077] (製造例1：プローブ)

<プローブの設計>

公開されているDNAデータベースに登録されている647例のHCVの塩基配列を調査した。NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸（野生型は、チロシン）をコードする塩基配列近傍の塩基配列の調査結果を表1示す。なお、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列近傍の配列は、下記配列番号：13で表されるとおりである。

5' - a a (y) g c (n) y a (y) - 3' (配列番号：13)

配列番号：13は、NS5Aタンパク質の91番目から93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であり、下線部は、93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する。また、配列番号：13中、「y」は、チミン又はシトシンを示し、「n」は、アデニン、グアニン、シトシン、又はチミンを示す。

[0078] [表1]

		塩基配列								
塩基		a	a	y	g	c	n	y	a	y
塩基番号		271	272	273	274	275	276	277	278	279
アミノ酸番号		91			92			93		
調査結果	t	0	0	0	0	0	311	609	0	13
	c	0	0	614	0	647	270	38	0	634
	a	647	647	33	0	0	62	0	647	0
	g	0	0	0	647	0	4	0	0	0

[0079] 表1の結果から、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異は、t (277nt) a(278nt) c (279nt) から、cacへの277ntのtがcに変わる変異により引き起こされることがわかった。

サイクリングプローブ法では、変異箇所をプローブのRNA部分とすることが一般的である。そのため、277番目の位置の塩基をRNAとしたプローブを設計することが考えられた。しかしながら、後述する試験例5に示すように、277番目の位置の塩基をRNAとした場合、276番目の位置の塩基のバリエーションの影響を受けてしまい、様々なバリエーションのHCVを検出するためには、それぞれのバリエーションに応じたプローブを用意

しなければならないことがわかった。

[0080] そこで、プローブのRNA部分を変異箇所の隣である278番目の塩基とした配列番号：1及び2のプローブセットを設計した。

ープローブセットー

・ Y c a cタイプ-1 :

5' - a a c g c a t [a] c a - 3' (配列番号：1)

配列番号：1中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記Y c a cタイプ-1は、NS5Aの93番目のアミノ酸がチロシンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にc a cである配列である。

前記Y c a cタイプ-1のプローブは、5'末端が蛍光物質(FAM)で修飾されており、3'末端がクエンチャー物質(Eclipse Dark Quencher (Epoch Biosciences社製))で修飾されている。

・ H c a cタイプ-1 :

5' - a a c g c a c [a] c a - 3' (配列番号：2)

配列番号：2中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記H c a cタイプ-1は、NS5Aの93番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号：13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にc a cである配列である。

前記H c a cタイプ-1のプローブは、5'末端が蛍光物質(FAM)で修飾されており、3'末端がクエンチャー物質(Eclipse Dark Quencher (Epoch Biosciences社製))で修飾されている。

[0081] (製造例2：プライマー)

C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードす

る塩基配列を含む領域を増幅可能なプライマーセットとして、以下の配列番号：11及び12で表される塩基配列からなるプライマーセットを調製した。前記プライマーセットは、公開されているDNAデータベースに登録されている約600例のHCV塩基配列をもとに、リアルタイムPCRに用いることができる、相同性の高い領域を見出し、設計した。

・ HCV\_Y93-1L :

5' - g g t t c c a t g a g g a t c g t t g - 3' (配列番号：11)

前記配列番号：11で表される塩基配列は、NS5Aタンパク質をコードする塩基配列の208番目から226番目に対応する。

・ HCV\_Y93-1R :

5' - c c g t c a c g t a g t g g a a a t c - 3' (配列番号：12)

前記配列番号：12で表される塩基配列は、NS5Aタンパク質をコードする塩基配列の376番目から394番目に対応する。

[0082] (調製例1：人工合成遺伝子)

前記製造例1で設計したプローブ、又は後述する製造例3で設計したプローブと、前記製造例2で設計したプライマーとを用い、リアルタイムPCRを行うことにより、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を検出することができるか否かを確認するための人工合成遺伝子として、以下の人工合成遺伝子を調製した。なお、前記人工合成遺伝子は、遺伝子型が1b型であるC型肝炎ウイルスのゲノムRNAの配列を参考に調製した。

・ 人工合成遺伝子-1 (野生型) :

NS5Aタンパク質をコードする塩基配列の198番目から404番目に対応する塩基配列であって、91番目から93番目のアミノ酸をコードする塩基配列が、「aacgcatac」であるもの(配列番号：14)と、その相補鎖からなる二本鎖DNA。前記人工合成遺伝子-1は、前記配列番号



: 13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にcacである配列である。

・ 人工合成遺伝子-2 (変異型) :

前記配列番号: 14において、NS5Aタンパク質の91番目から93番目のアミノ酸をコードする塩基配列が、「aacgcacac」であるもの(配列番号: 15)と、その相補鎖からなる二本鎖DNA。前記人工合成遺伝子-2は、前記配列番号: 13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にcacである配列である。

・ 人工合成遺伝子-3 (変異型) :

前記配列番号: 14において、NS5Aタンパク質の91番目から93番目のアミノ酸をコードする塩基配列が、「aacgcgcac」であるもの(配列番号: 16)と、その相補鎖からなる二本鎖DNA。前記人工合成遺伝子-3は、前記配列番号: 13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列である。

・ 人工合成遺伝子-4 (野生型) :

NS5Aタンパク質をコードする塩基配列の198番目から404番目に対応する塩基配列であって、91番目から93番目のアミノ酸をコードする塩基配列が、「aacgcgtac」であるもの(配列番号: 23)と、その相補鎖からなる二本鎖DNA。前記人工合成遺伝子-4は、前記配列番号: 13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列である。

[0083] (試験例1)

<人工合成遺伝子サンプルの調製>

前記調製例1で調製した人工合成遺伝子-1 (野生型: Y93)と、人工合成遺伝子-2 (変異型: Y93H)とを表2のように混合し、人工合成遺伝子サンプルを調製した。

[0084]

[表2]

サンプル名	人工合成遺伝子量(分子数)		人工合成 遺伝子-2 の混合比率 (%)
	人工合成 遺伝子-1 (Ycac)	人工合成 遺伝子-2 (Hcac)	
A-1	$1.00 \times 10^6$	0	0
B-1	$9.50 \times 10^5$	$5.00 \times 10^4$	5
C-1	$9.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$	10
D-1	$7.00 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	30
E-1	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	50
F-1	$3.00 \times 10^5$	$7.00 \times 10^5$	70
G-1	$1.00 \times 10^5$	$9.00 \times 10^5$	90
H-1	0	$1.00 \times 10^6$	100

## [0085] &lt;リアルタイムPCR&gt;

前記サンプルA-1からH-1のそれぞれについて、プローブを前記製造例1で設計した各プローブとし、プライマーセットを前記製造例2で設計したプライマーセットとし、Cycleave（登録商標）PCR Reaction Mix（タカラバイオ株式会社製）を用いて、以下の反応液の組成（表3参照）、及び反応条件で、リアルタイムPCR（反応装置：LightCycler 480）を行った。

なお、前記リアルタイムPCRでは、Ycacタイプのプローブ（配列番号：1）と、Hcacタイプのプローブ（配列番号：2）とを、それぞれ別のウェルに入れ、反応を行った。

ー反応条件ー

ーーホールド（初期変性）ーー

サイクル数：1

条件：95℃、30秒間

ーー3ステップPCRーー

サイクル数：45

条件：95℃、5秒間、次いで、55℃、10秒間、その後、72℃、2

5 秒間

[0086] [表3]

<1反応あたり>

試薬	使用量	最終濃度
CycleavePCR Reaction Mix (2×conc.)	10 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
サイクリングプローブ (5 μM)	0.8 μl	0.2 μM
ROX Reference Dye (50×conc.) or Dye II (50×conc.)	0.4 μl	1×
template (<100 ng)	1.0 μl	
disto (滅菌蒸留水)	7.0 μl	
total	20 μl	

[0087] 前記リアルタイムPCRの結果から、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を定量し、変異率を算出した結果を表4に示す。

[0088] [表4]

サンプル名	測定結果				サンプルにおける Y93Hへの変異率 (%)
	93番目のアミノ酸				
	Y		H		
	コピー数	Log値	コピー数	Log値	
A-1	1.13 × 10 <sup>6</sup>	6.05	1.10 × 10 <sup>2</sup>	2.04	0.0
B-1	1.80 × 10 <sup>5</sup>	5.26	4.40 × 10 <sup>3</sup>	3.64	2.4
C-1	1.05 × 10 <sup>6</sup>	6.02	4.39 × 10 <sup>4</sup>	4.64	4.0
D-1	1.02 × 10 <sup>6</sup>	6.01	3.28 × 10 <sup>5</sup>	5.52	24.3
E-1	7.89 × 10 <sup>5</sup>	5.9	6.11 × 10 <sup>5</sup>	5.79	43.6
F-1	3.63 × 10 <sup>5</sup>	5.56	9.08 × 10 <sup>5</sup>	5.96	71.5
G-1	3.39 × 10 <sup>4</sup>	4.53	1.25 × 10 <sup>6</sup>	6.1	97.4
H-1	0	0	9.15 × 10 <sup>5</sup>	5.96	100.0

[0089] <ダイレクトシーケンス>

前記サンプルA-1からH-1のそれぞれについて、シーケンサーとして、3730x1 DNA Analyzer (アプライドバイオシステムズ社製) を用い、試薬として、BigDye Terminator v3

． 1（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、サンガーデオキシ法によるダイレクトシーケンスを行った。結果を図1に示す。

[0090] 図1中、矢印で示す部分は、NS5Aタンパク質をコードする塩基配列の277番目の塩基である。図1の結果から、前記サンプルA-1からH-1の塩基配列が確認された。

[0091] 前記ダイレクトシーケンスの結果から、前記リアルタイムPCRの結果が正しいものであることが確認された。そのため、前記製造例1で設計した各プローブと、前記製造例2で設計したプライマーとを用い、サイクリングプローブ法によるリアルタイムPCRを行うことにより、検体中におけるHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定することができることが示された。

[0092]（試験例2）

<リアルタイムPCR>

遺伝子として、前記調製例1で調製した人工合成遺伝子-3（変異型：Y93H）を用いた以外は、前記試験例1のリアルタイムPCRと同様に、前記製造例1で設計した各プローブ、及び前記製造例2で設計したプライマーを用いてリアルタイムPCRを行った。結果を表5に示す。

[0093] [表5]

サンプル名	測定結果				サンプルにおけるY93Hへの変異率(%)
	93番目のアミノ酸				
	Y		H		
	コピー数	Log値	コピー数	Log値	
人工合成遺伝子-3 (Hcgc)	0	0	$2.41 \times 10^7$	7.38	100

[0094] 表5の結果から、前記製造例1で設計したプローブを用いると、Hcaccタイプの配列 (aa(c)gc(a) ca(c) ;前記配列番号:13で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順にcac

である配列)に加え、予想外にも、Hcg cタイプの配列 (a a (c) g c (g) c a (c) ; 前記配列番号 : 13で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順にc g cである配列)をも検出可能であることが示された。

したがって、前記製造例1で設計したプローブセットを用いると、HCVの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定することができることが示された。

[0095] (試験例3)

<検体>

検体として、HCV (遺伝子型 : 1b型) に感染している患者の血清 (SPI研究会から入手) を14検体用意した。

[0096] <ウイルスRNAの調製>

前記各検体について、QIAamp MinElute Virus Spin Kit (キアゲン社製) を用い、ウイルスRNAを抽出し、精製した。

[0097] <cDNA合成工程>

前記ウイルスRNAを鋳型とし、cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version) (タカラバイオ株式会社製) を用いて、二本鎖のcDNAを合成した。

[0098] <リアルタイムPCR工程>

鋳型を前記cDNA合成工程で得られた二本鎖のcDNAとした以外は、前記試験例1のリアルタイムPCRと同様にして、前記製造例1で設計した各プローブ、及び前記製造例2で設計したプライマーセットを用い、リアルタイムPCRを行った。結果を表6に示す。

[0099] <ダイレクトシーケンス>

前記cDNA合成工程で得られた二本鎖のcDNAを用いた以外は、前記試験例1と同様にして、ダイレクトシーケンスを行った。結果を表6に示す。

す。

[0100] [表6]

検体	リアルタイムPCR					ダイレクトシーケンス
	測定結果				サンプルにおけるY93Hへの変異率(%)	測定結果
	93番目のアミノ酸					93番目のアミノ酸
	Y		H			
	コピー数	Log値	コピー数	Log値		
1	3573	3.55	0	0.00	0	Y
2	161411	5.21	0	0.00	0	Y
3	537950	5.73	0	0.00	0	Y
4	0	0.00	707261	5.85	100	H
5	183033	5.26	0	0.00	0	Y
6	7845	3.89	0	0.00	0	Y
7	185173	5.27	0	0.00	0	Y
8	100275	5.00	0	0.00	0	Y
9	51548	4.71	0	0.00	0	Y
10	247	2.39	0	0.00	0	Y
11	218	2.34	0	0.00	0	Y
12	0	0.00	151001	5.18	100	H
13	123741	5.09	0	0.00	0	Y
14	10576	4.02	0	0.00	0	Y

[0101] 表6の結果から、前記リアルタイムPCRの結果と、前記ダイレクトシーケンスの結果とが一致しており、前記リアルタイムPCRの結果が正しいものであることが確認された。

前記ダイレクトシーケンスによれば、変異の有無を定性的に確認することはできるものの、変異の程度を定量的に確認することができず、また、検体からウイルスRNAを調製するところから、シーケンスの結果を得るまでに12時間程度の時間を要した。一方、本発明のサイクリングプローブ法によるリアルタイムPCRによれば、変異の有無のみならず、変異の量を定量的に確認することができ、また、検体からウイルスRNAを調製するところ

ろから、リアルタイムPCRの結果を得るまでの時間が5時間程度であり、非常に迅速に結果が得られた。

[0102] また、前記検体1から14に関し、配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基の情報を下記表7に示す。

[0103] [表7]

検体	配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基の情報（5'側から順に記載）	93番目のアミノ酸
1	cac	Y
2	cac	Y
3	cac	Y
4	cac	H
5	cac	Y
6	cgc	Y
7	cac	Y
8	cac	Y
9	cac	Y
10	ccc	Y
11	cgc	Y
12	cgc	H
13	cac	Y
14	cgc	Y

[0104] 表7の検体6、11、及び14、並びに10の結果から、前記製造例1で設計したプローブを用いると、Ycacタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcacである配列）に加え、予想外にも、Ycgcタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列）、及びYcccタイプの配列（前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcccである配列）をも検出可能であることが示された。

また、前記試験例2の結果と同様に、検体12の結果から、前記製造例1で設計したプローブを用いると、Hcacタイプの配列（前記配列番号：1

3で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にc a cである配列)に加え、予想外にも、H c g cタイプの配列(前記配列番号: 13で表される塩基配列において( )を付した位置の塩基が5'側から順にc g cである配列)をも検出可能であることが示された。

したがって、前記製造例1で設計したプローブセットを用いると、H C Vの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なH C VのN S 5 Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定することができることが示された。

[0105] (試験例4)

<検体>

検体として、H C V (遺伝子型: 1 a型)に感染している患者の血清、H C V (遺伝子型: 2 a型)に感染している患者の血清、及びH C V (遺伝子型: 2 b型)に感染している患者の血清(いずれもS P I研究会から入手)を、それぞれ1検体用意した。

[0106] <ウイルスRNAの調製>

前記各検体について、Q I A a m p M i n E l u t e V i r u s S p i n K i t (キアゲン社製)を用い、ウイルスRNAを抽出し、精製した。

[0107] <cDNA合成工程>

前記ウイルスRNAを鋳型とし、c D N A S y n t h e s i s K i t (M - M L V V e r s i o n) (タカラバイオ株式会社製)を用いて、二本鎖のc D N Aを合成した。

[0108] <リアルタイムPCR工程>

鋳型を前記c D N A合成工程で得られた二本鎖のc D N Aとした以外は、前記試験例1のリアルタイムPCRと同様にして、前記製造例1で設計した各プローブ、及び前記製造例2で設計したプライマーセットを用い、リアルタイムPCRを行った。結果を表8に示す。

[0109] <ダイレクトシーケンス>



前記 cDNA 合成工程で得られた二本鎖の cDNA を用いた以外は、前記試験例 1 と同様にして、ダイレクトシーケンスを行った。結果を表 8 に示す。

[0110] [表8]

検体	リアルタイムPCR				ダイレクトシーケンス	
	測定結果				サンプルにおける Y93H への変異率 (%)	測定結果
	93番目のアミノ酸					93番目のアミノ酸
	Y		H			
	コピー数	Log値	コピー数	Log値		
1a型	10392	4.02	0	0.00	0	Y
2a型	7807	3.89	0	0.00	0	Y
2b型	349	2.54	0	0.00	0	Y

[0111] 表 8 の結果から、前記リアルタイム PCR の結果と、前記ダイレクトシーケンスの結果とが一致しており、前記リアルタイム PCR の結果が正しいものであることが確認された。

[0112] (比較製造例 1 : プロブ)

NS5A タンパク質の 93 番目のアミノ酸の変異に寄与する 277 番目の塩基をプロブの RNA 部分とした以外は、配列番号 : 2 と同様とした下記プロブを設計した。

ープロブー

・ H c a c タイプ - 2 :

5' - a a c g c a [c] a c a - 3' (配列番号 : 17)

配列番号 : 17 中、[ ] 内の c は、RNA であることを示し、下線部は NS5A タンパク質の 93 番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。前記 H c a c タイプ - 2 は、NS5A の 93 番目のアミノ酸がヒスチジンであり、前記配列番号 : 13 で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が 5' 側から順に c a c である配列である。

前記Hcaccタイプ-2のプロープは、5'末端が蛍光物質（FAM）で修飾されており、3'末端がクエンチャー物質（Eclipse Dark Quencher（Epoch Biosciences社製））で修飾されている。

[0113]（試験例5）

以下の組合せとした以外は、前記試験例1と同様にしてリアルタイムPCRを行った。なお、リアルタイムPCRに用いた人工合成遺伝子量（分子数）は、 $2.00 \times 10^6$ とした。結果を表9に示す。

<試験例5-1>

・ 人工合成遺伝子 : 人工合成遺伝子-3（配列番号：16、変異型であり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列である。）

・ プロープ : Hcaccタイプ-2（配列番号：17、RNAは277番目の塩基、変異型であり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcacである配列である。）

・ プライマー : 製造例2のプライマーセット

<試験例5-2>

・ 人工合成遺伝子 : 人工合成遺伝子-3（配列番号：16、変異型であり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcgcである配列である。）

・ プロープ : Hcaccタイプ-1（配列番号：2、RNAは278番目の塩基、変異型であり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位置の塩基が5'側から順にcacである配列である。）

・ プライマー : 製造例2のプライマーセット

<試験例5-3>

・ 人工合成遺伝子 : 人工合成遺伝子-2（配列番号：15、変異型であり、前記配列番号：13で表される塩基配列において（ ）を付した位

置の塩基が5'側から順にc a cである配列である。)

- ・ プローブ : H c a cタイプ-2 (配列番号: 17、RNAは277番目の塩基、変異型であり、前記配列番号: 13で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順にc a cである配列である。)

- ・ プライマー : 製造例2のプライマーセット

<試験例5-4>

- ・ 人工合成遺伝子 : 人工合成遺伝子-2 (配列番号: 15、変異型であり、前記配列番号: 13で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順にc a cである配列である。)

- ・ プローブ : H c a cタイプ-1 (配列番号: 2、RNAは278番目の塩基、変異型であり、前記配列番号: 13で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順にc a cである配列である。)

- ・ プライマー : 製造例2のプライマーセット

[0114] [表9]

試験例	人工合成遺伝子	プローブ (RNAの位置)	リアルタイムPCR	
			コピー数	Log値
5-1	3(Hcgc)	Hcac-2 (277番目)	387	2.59
5-2	3(Hcgc)	Hcac-1 (278番目)	300000	5.48
5-3	2(Hcac)	Hcac-2 (277番目)	2410000	6.38
5-4	2(Hcac)	Hcac-1 (278番目)	2920000	6.47

[0115] 表9の結果から、通常のサイクリングプローブ法に沿って設計した前記比較製造例1のプローブ (H c a cタイプ-2) では、NS5Aタンパク質をコードする276番目の塩基のバリエーションの影響を受けてしまったのに

対し、前記製造例1で設計した本発明のプローブ（Hc a cタイプ-1）は、予想外にもNS5Aタンパク質をコードする276番目の塩基のバリエーションの影響を受けずに変異の有無を検出できることが確認された。

[0116] したがって、前記製造例1で設計したプローブセット、及び前記製造例2で設計したプライマーセットを用い、サイクリングプローブ法によるリアルタイムPCRを行うことにより、様々な遺伝子型のHCVにおいて、HCVの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定することができることが示された。

[0117] （製造例3：プローブ）

C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出率をより向上させるために、以下のプローブセットを設計した。

[0118] ープローブセットー

・ 野生株検出用プローブ：

(1) 5' - a a c g c a t [a] c a - 3' （配列番号：1）

(2) 5' - a a c g c g t [a] c a - 3' （配列番号：9）

配列番号：1、及び9中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。

前記配列番号：1、及び9で表される野生型検出用プローブは、5'末端が蛍光物質（FAM）で修飾されており、3'末端がクエンチャー物質（Eclipse Dark Quencher（Epoch Biosciences社製））で修飾されている。

前記野生株検出用プローブにおける、配列番号：1で表されるプローブと、配列番号：9で表されるプローブとの分子数の比は、1：1である。

[0119] ・ 変異株検出用プローブ：

5' - a c g c a c [a] c a - 3' （配列番号：18）

5' - a c g c g c [a] c a - 3' （配列番号：22）

配列番号：18、及び22中、[ ]内のaは、RNAであることを示し、下線部はNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする部分に対応する配列であることを示す。

前記配列番号：18、及び22で表される変異株検出用プローブは、5'末端が蛍光物質（ROX）で修飾されており、3'末端がクエンチャー物質（Eclipse Dark Quencher（Epoch Biosciences社製））で修飾されている。

前記変異株検出用プローブにおける、配列番号：18で表されるプローブと、配列番号：22で表されるプローブとの分子数の比は、1：1である。

[0120]（試験例6）

＜人工合成遺伝子サンプルの調製＞

前記調製例1で調製した人工合成遺伝子-4（野生型：Y93）と、人工合成遺伝子-3（変異型：Y93H）とを表10のように混合し、人工合成遺伝子サンプルを調製した。

[0121] [表10]

サンプル名	人工合成遺伝子量(分子数)		人工合成遺伝子-3の混合比率(%)
	人工合成遺伝子-4 (Ycgc)	人工合成遺伝子-3 (Hcgc)	
A-2	$1.00 \times 10^6$	0	0
B-2	$9.50 \times 10^5$	$5.00 \times 10^4$	5
C-2	$9.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$	10
D-2	$7.00 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	30
E-2	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	50
F-2	$3.00 \times 10^5$	$7.00 \times 10^5$	70
G-2	$1.00 \times 10^5$	$9.00 \times 10^5$	90
H-2	0	$1.00 \times 10^6$	100

[0122] ＜リアルタイムPCR＞

前記サンプルA-2からH-2のそれぞれについて、プローブを前記製造例3で設計した各プローブとし、プライマーセットを前記製造例2で設計し

たプライマーセットとし、Cycleave（登録商標）PCR Reaction Mix（タカラバイオ株式会社製）を用いて、以下の反応液の組成（表11参照）、及び反応条件で、リアルタイムPCR（反応装置：LightCycler 480）を行った。

なお、前記リアルタイムPCRでは、野生株検出用プローブ（サイクリングプローブY）と、変異株検出用プローブ（サイクリングプローブH）とを同じウェルに入れ、反応を行った。

－反応条件－

－－ホールド（初期変性）－－

サイクル数：1

条件：95℃、30秒間

－－3ステップPCR－－

サイクル数：45

条件：95℃、5秒間、次いで、55℃、10秒間、その後、72℃、25秒間

[0123] [表11]

<1反応あたり>

試薬	使用量	最終濃度
CycleavePCR Reaction Mix (2× conc.)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	2.5 μl	1.0 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	2.5 μl	1.0 μM
サイクリングプローブY (5 μM)	1.0 μl	0.2 μM
サイクリングプローブH (5 μM)	1.0 μl	0.2 μM
dH <sub>2</sub> O (滅菌蒸留水)	3.5 μl	
template	2.0 μl	
total	25.0 μl	

[0124] 前記リアルタイムPCRの結果から、NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を定量し、変異率を算出した結果を表12に示す。

[0125]

[表12]

サンプル名	測定結果				サンプルにおける Y93Hへの変異率 (%)
	93番目のアミノ酸				
	Y		H		
	コピー数	Log値	コピー数	Log値	
A-2	$4.09 \times 10^5$	5.61	0	0	0.0
B-2	$1.24 \times 10^6$	6.09	$5.32 \times 10^4$	4.73	4.1
C-2	$1.16 \times 10^6$	6.06	$1.51 \times 10^5$	5.18	11.5
D-2	$3.92 \times 10^5$	5.59	$1.65 \times 10^5$	5.22	29.6
E-2	$1.00 \times 10^6$	6.00	$8.38 \times 10^5$	5.92	45.6
F-2	$3.23 \times 10^5$	5.51	$8.85 \times 10^5$	5.95	73.3
G-2	$1.88 \times 10^5$	5.27	$1.59 \times 10^6$	6.20	89.4
H-2	0	0	$7.49 \times 10^5$	5.87	100.0

[0126] 前記リアルタイムPCRの結果から、前記製造例1で設計したプローブセットを用いた場合と比較して、前記製造例3で設計したプローブセットを用いることにより、検体中におけるHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無をより高い精度で検出できることが示された。

[0127] (試験例7)

遺伝子として、前記調製例1で調製した人工合成遺伝子-2(変異型: Y93H)を用いた以外は、前記試験例6のリアルタイムPCRと同様に、前記製造例3で設計した各プローブ、及び前記製造例2で設計したプライマーを用いてリアルタイムPCRを行った。結果を表13に示す。

[0128]

[表13]

サンプル名	測定結果				サンプルにおける Y93Hへの変異率 (%)
	93番目のアミノ酸				
	Y		H		
	コピー数	Log値	コピー数	Log値	
人工合成 遺伝子-2 (Hcac)	0	0	$1.10 \times 10^6$	6.04	100

[0129] 表13の結果から、前記製造例3で設計したプローブセットを用いると、Hcg cタイプの配列 ( a a ( c ) g c ( g ) c a ( c ) ; 前記配列番号 : 13で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順にc g cである配列) に加え、Hcacタイプの配列 ( a a ( c ) g c ( a ) c a ( c ) ; 前記配列番号 : 13で表される塩基配列において ( ) を付した位置の塩基が5'側から順にc a cである配列) をも高い精度で検出可能であることが示された。

したがって、前記製造例3で設計したプローブセットを用いると、HCVの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、より高い精度で測定することができることが示された。

[0130] 本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

<1> 検体中のC型肝炎ウイルスのRNAを鋳型としてcDNAを合成するcDNA合成工程と、

前記cDNAを鋳型とし、サイクリングプローブ法を用いてリアルタイムPCRを行うリアルタイムPCR工程とを含み、

前記リアルタイムPCRに用いるプライマーセットが、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む領域を増幅可能なプライマーセットであり、

前記リアルタイムPCRに用いるプローブが、



下記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含むことを特徴とするC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法である。

a a c g c a t [ a ] c a (配列番号：1)

a a c g c a c [ a ] c a (配列番号：2)

a c g c a c [ a ] c a (配列番号：18)

配列番号：1、2、及び18中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<2> リアルタイムPCRに用いるプローブが、

下記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む前記<1>に記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法である。

a a c g c g t [ a ] c a (配列番号：9)

a a c g c g c [ a ] c a (配列番号：10)

a c g c g c [ a ] c a (配列番号：22)

配列番号：9、10、及び22中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<3> リアルタイムPCRに用いるプローブが、

下記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む前記<1>から<2>のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法である。

a a c g c a t [ a ] t a (配列番号：3)

a a c g c a c [ a ] t a (配列番号：4)

a c g c a c [ a ] t a (配列番号：19)

配列番号：3、4、及び19中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<4> リアルタイムPCRに用いるプローブが、

(1) 下記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかからなる組合せ、及び

(2) 下記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかからなる組合せの少なくともいずれかを含む前記<1>から<3>のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法である。

a a t g c a t [ a ] c a (配列番号：5)

a a t g c a c [ a ] c a (配列番号：6)

a t g c a c [ a ] c a (配列番号：20)

a a t g c a t [ a ] t a (配列番号：7)

a a t g c a c [ a ] t a (配列番号：8)

a t g c a c [ a ] t a (配列番号：21)

配列番号：5、6、7、8、20、及び21中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<5> リアルタイムPCRに用いるプライマーセットが、

(1) 下記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット、及び

(2) 下記配列番号：11で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセットのいずれかである前記<1>から<4>のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法である。

g g t t c c a t g a g g a t c g t t g (配列番号：11)

c c g t c a c g t a g t g g a a a t c (配列番号：12)

<6> C型肝炎ウイルスの遺伝子型が、1a型、1b型、2a型、及び2b型のいずれかである前記<1>から<5>のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法である。

<7> 下記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとを含むことを特徴とするC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットである。

a a c g c a t [ a ] c a (配列番号：1)

a a c g c a c [ a ] c a (配列番号：2)

a c g c a c [ a ] c a (配列番号：18)

配列番号：1、2、及び18中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<8> 下記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む前記<7>に記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットである。

a a c g c g t [ a ] c a (配列番号：9)

a a c g c g c [ a ] c a (配列番号：10)

a c g c g c [ a ] c a (配列番号：22)

配列番号：9、10、及び22中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<9> 下記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む前記<7>から<8>のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットである。

a a c g c a t [ a ] t a (配列番号：3)

a a c g c a c [ a ] t a (配列番号：4)

a c g c a c [ a ] t a (配列番号：19)

配列番号：3、4、及び19中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<10> (1) 下記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとなる組合せ、及び

(2) 下記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとなる組合せの少なくともいずれかを含む前記<7>から<9>のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットである。

a a t g c a t [ a ] c a (配列番号：5)

a a t g c a c [ a ] c a (配列番号：6)

a t g c a c [ a ] c a (配列番号：20)

a a t g c a t [ a ] t a (配列番号：7)

a a t g c a c [ a ] t a (配列番号：8)

a t g c a c [ a ] t a (配列番号：21)

配列番号：5、6、7、8、20、及び21中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

<11> (1) 下記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット、及び

(2) 下記配列番号：11で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなる

プライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセットの少なくともいずれかを含む前記<7>から<10>のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットである。

g g t t c c a t g a g g a t c g t t g (配列番号：11)

c c g t c a c g t a g t g g a a a t c (配列番号：12)

<12> C型肝炎ウイルスの遺伝子型が、1a型、1b型、2a型、及び2b型のいずれかである前記<7>から<11>のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットである。

### 産業上の利用可能性

[0131] 本発明のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法によれば、HCVの変異やバリエーションによる影響を抑え、検体中における様々なHCVのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の有無を、低コストで、簡便かつ迅速に、定量的に測定することができるので、前記検出方法は、前記NS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異を指標とする薬剤の薬効予測などに好適に利用可能である。

本発明のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キットは、本発明のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法などに好適に利用可能である。

## 請求の範囲

### [請求項1]

検体中のC型肝炎ウイルスのRNAを鋳型としてcDNAを合成するcDNA合成工程と、

前記cDNAを鋳型とし、サイクリングプローブ法を用いてリアルタイムPCRを行うリアルタイムPCR工程とを含み、

前記リアルタイムPCRに用いるプライマーセットが、C型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む領域を増幅可能なプライマーセットであり、

前記リアルタイムPCRに用いるプローブが、

下記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含むことを特徴とするC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法。

a a c g c a t [ a ] c a (配列番号：1)

a a c g c a c [ a ] c a (配列番号：2)

a c g c a c [ a ] c a (配列番号：18)

配列番号：1、2、及び18中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

### [請求項2]

リアルタイムPCRに用いるプローブが、

下記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列か

らなるプローブの少なくともいずれかを含む請求項 1 に記載の C 型肝炎ウイルスの NS 5 A タンパク質の 9 3 番目のアミノ酸の変異の検出方法。

a a c g c g t [ a ] c a (配列番号 : 9)

a a c g c g c [ a ] c a (配列番号 : 1 0)

a c g c g c [ a ] c a (配列番号 : 2 2)

配列番号 : 9、1 0、及び 2 2 中、[ ] 内の塩基は、RNA であることを示す。

[請求項3]

リアルタイム PCR に用いるプローブが、

下記配列番号 : 3 で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号 : 4 で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号 : 1 9 で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む請求項 1 から 2 のいずれかに記載の C 型肝炎ウイルスの NS 5 A タンパク質の 9 3 番目のアミノ酸の変異の検出方法。

a a c g c a t [ a ] t a (配列番号 : 3)

a a c g c a c [ a ] t a (配列番号 : 4)

a c g c a c [ a ] t a (配列番号 : 1 9)

配列番号 : 3、4、及び 1 9 中、[ ] 内の塩基は、RNA であることを示す。

[請求項4]

リアルタイム PCR に用いるプローブが、

(1) 下記配列番号 : 5 で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号 : 6 で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号 : 2 0 で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくとも



もいずれかとかからなる組合せ、及び

(2) 下記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかとかからなる組合せの少なくともいずれかを含む請求項1から3のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法。

a a t g c a t [ a ] c a (配列番号：5)

a a t g c a c [ a ] c a (配列番号：6)

a t g c a c [ a ] c a (配列番号：20)

a a t g c a t [ a ] t a (配列番号：7)

a a t g c a c [ a ] t a (配列番号：8)

a t g c a c [ a ] t a (配列番号：21)

配列番号：5、6、7、8、20、及び21中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

[請求項5]

リアルタイムPCRに用いるプライマーセットが、

(1) 下記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット、及び

(2) 下記配列番号：11で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセットのいずれかである請求項1から4のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出方法。

g g t t c c a t g a g g a t c g t t g (配列番号：11)

c c g t c a c g t a g t g g a a a t c (配列番号：12)

[請求項6] 下記配列番号：1で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：2で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：18で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含むことを特徴とするC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット。

a a c g c a t [ a ] c a (配列番号：1)

a a c g c a c [ a ] c a (配列番号：2)

a c g c a c [ a ] c a (配列番号：18)

配列番号：1、2、及び18中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

[請求項7] 下記配列番号：9で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：10で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：22で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む請求項6に記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット。

a a c g c g t [ a ] c a (配列番号：9)

a a c g c g c [ a ] c a (配列番号：10)

a c g c g c [ a ] c a (配列番号：22)

配列番号：9、10、及び22中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

[請求項8] 下記配列番号：3で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、

下記配列番号：4で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：19で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかを含む請求項6から7のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット。

a a c g c a t [ a ] t a (配列番号：3)

a a c g c a c [ a ] t a (配列番号：4)

a c g c a c [ a ] t a (配列番号：19)

配列番号：3、4、及び19中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

[請求項9]

(1) 下記配列番号：5で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：6で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：20で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかからなる組合せ、及び

(2) 下記配列番号：7で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブと、下記配列番号：8で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブ、及び下記配列番号：21で表される塩基配列からなるプローブ若しくはその相補的な塩基配列からなるプローブの少なくともいずれかからなる組合せの少なくともいずれかを含む請求項6から8のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット。

a a t g c a t [ a ] c a (配列番号：5)

a a t g c a c [ a ] c a (配列番号：6)

a t g c a c [ a ] c a (配列番号：20)

a a t g c a t [ a ] t a (配列番号：7)

a a t g c a c [ a ] t a (配列番号：8)

a t g c a c [ a ] t a (配列番号：21)

配列番号：5、6、7、8、20、及び21中、[ ]内の塩基は、RNAであることを示す。

[請求項10]

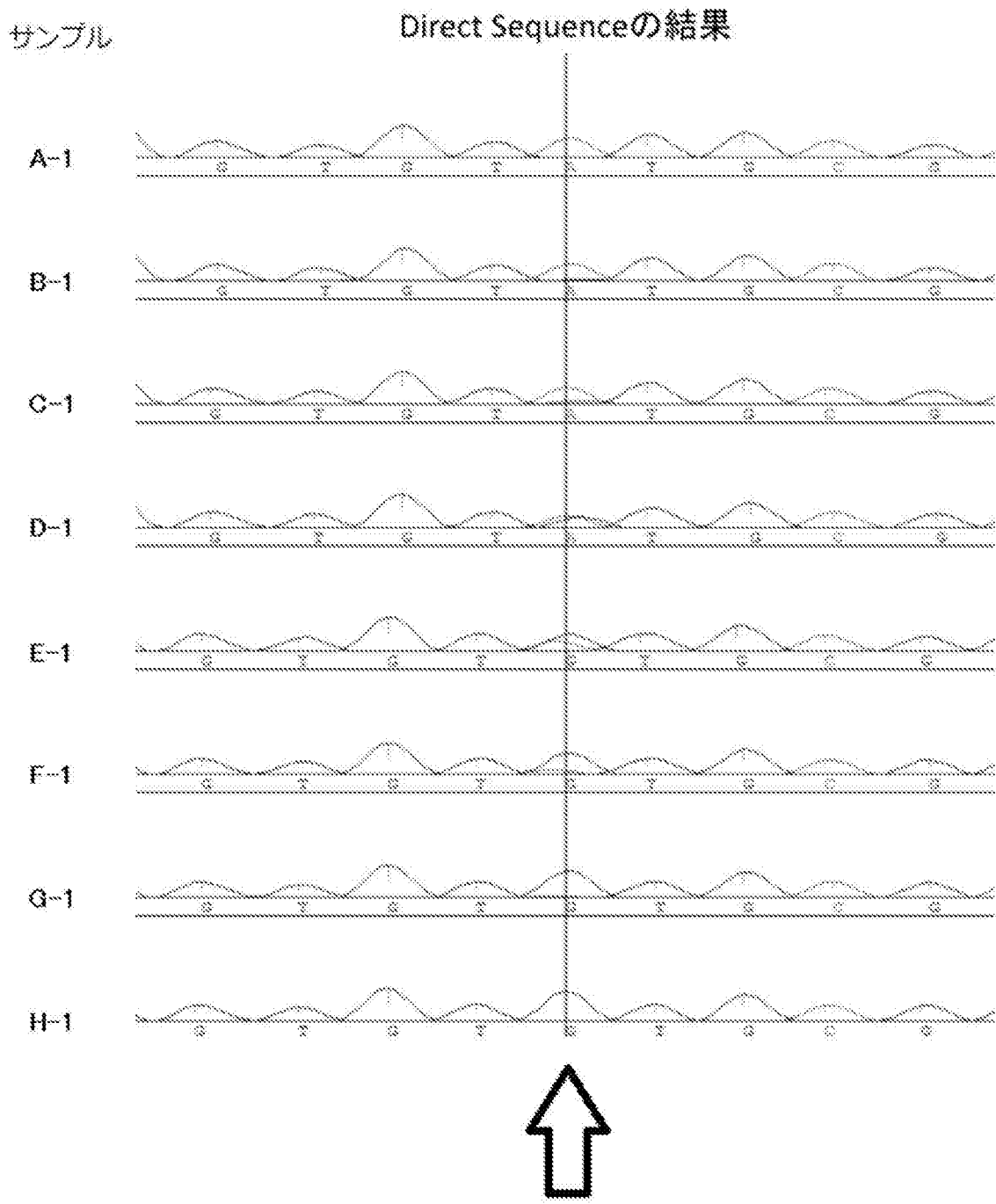
(1) 下記配列番号：11で表される塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット、及び

(2) 下記配列番号：11で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマーと、下記配列番号：12で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセットの少なくともいずれかを含む請求項6から9のいずれかに記載のC型肝炎ウイルスのNS5Aタンパク質の93番目のアミノ酸の変異の検出用キット。

g g t t c c a t g a g g a t c g t t g (配列番号：11)

c c g t c a c g t a g t g g a a a t c (配列番号：12)

[図1]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/082773

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12N15/09(2006.01) i, C12Q1/68(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)  
C12N15/09, C12Q1/68

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN),  
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	UCHIDA Y et al., A novel simple assay system to quantify the percent HCV-RNA levels of NS5A Y93H mutant strains and Y93 wild-type strains relative to the total HCV-RNA levels to determine the indication for antiviral therapy with NS5A inhibitors, PLoS One [online], 14-NOV-2014, Vol.9, e112647, <URL=http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112647>	1-10
Y	HERNANDEZ D et al., Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors, J. Clin. Virol., MAY-2013, Vol.57, p.13-18	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 06 March 2015 (06.03.15)	Date of mailing of the international search report 17 March 2015 (17.03.15)
---	--

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/JP2014/082773

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FRIDELL RA et al., Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system, Antimicrob. Agents. Chemother., 2010, Vol.54, p.3641-3650	1-10
Y	JP 2007-312660 A (Kyushu University), 06 December 2007 (06.12.2007), abstract; claims; paragraph [0012]; examples (Family: none)	1-10
Y	WO 2006/107031 A1 (Daiichi Asubio Pharma Co., Ltd.), 12 October 2006 (12.10.2006), paragraph [0030] & EP 1876244 A1 & US 2009-0098107 A1	1-10
Y	WO 2005/056790 A1 (Takara Bio Inc.), 23 June 2005 (23.06.2005), example 2 & EP 1715037 A1 & US 2007-0298415 A1 & CN 1890368 A & KR 10-2006-0116844 A	1-10
Y	JP 2005-517427 A (Sirna Therapeutics, Inc.), 16 June 2005 (16.06.2005), table I & EP 1430157 A2 & WO 2003/070750 A2	1-10
Y	JP 05-068562 A (Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd.), 23 March 1993 (23.03.1993), SEQ ID NO:2 (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(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. C12N15/09, C12Q1/68		
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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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） CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
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
PX	UCHIDA Y et al., A novel simple assay system to quantify the percent HCV-RNA levels of NS5A Y93H mutant strains and Y93 wild-type strains relative to the total HCV-RNA levels to determine the indication for antiviral therapy with NS5A inhibitors, PLoS One [online], 14-NOV-2014, Vol.9, e112647, <URL=http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112647>	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「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 06.03.2015	国際調査報告の発送日 17.03.2015	
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） 北田 祐介 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 4868



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	HERNANDEZ D et al., Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors, J. Clin. Virol., MAY-2013, Vol. 57, p. 13-18	1-10
Y	FRIDELL RA et al., Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system, Antimicrob. Agents. Chemother., 2010, Vol. 54, p. 3641-3650	1-10
Y	JP 2007-312660 A (国立大学法人九州大学) 2007. 12. 06, 要約、特許請求の範囲、[0012]、実施例 (ファミリーなし)	1-10
Y	WO 2006/107031 A1 (第一アスビオファーマ株式会社) 2006. 10. 12, [0030] & EP 1876244 A1 & US 2009-0098107 A1	1-10
Y	WO 2005/056790 A1 (タカラバイオ株式会社) 2005. 06. 23, 実施例 2 & EP 1715037 A1 & US 2007-0298415 A1 & CN 1890368 A & KR 10-2006-0116844 A	1-10
Y	JP 2005-517427 A (サーナ・セラピューティクス・インコーポレイテッド) 2005. 06. 16, 表 I & EP 1430157 A2 & WO 2003/070750 A2	1-10
Y	JP 05-068562 A (株式会社三和化学研究所) 1993. 03. 23, 配列番号 2 (ファミリーなし)	1-10