

(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
2014年1月23日(23.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/014077 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/JP2013/069598
- (22) 国際出願日: 2013年7月19日(19.07.2013)
- (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 2012-161040 2012年7月20日(20.07.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 富山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF TOYAMA) [JP/JP]; 〒9308555 富山県富山市五福3190 Toyama (JP).
- (72) 発明者: 大黒 徹(DAIKOKU Tohru); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP). 白木 公康(SHIRAKI Kimiyasu); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP).
- (74) 代理人: 大谷 嘉一(OTANI Kaichi); 〒9330023 富山県高岡市末広町14-45 Toyama (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, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

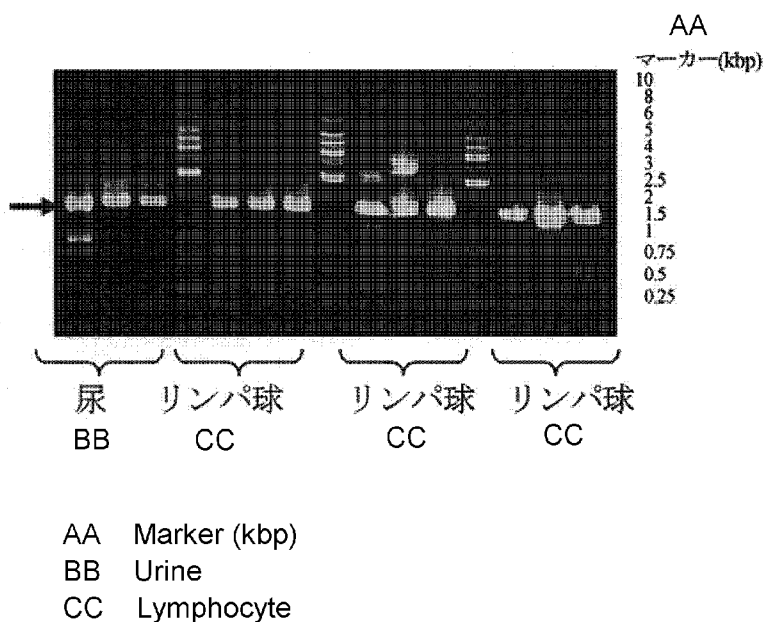
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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: METHOD FOR DETECTING DRUG RESISTANCE MUTATION IN CYTOMEGALOVIRUS, AND METHOD FOR IDENTIFYING DRUG RESISTANCE MUTATION GENE

(54) 発明の名称: サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の検出方法および薬剤耐性変異遺伝子の同定方法



(57) Abstract: [Problem] To provide a novel primer set to be used for quickly detecting a mutation in UL97 gene and/or UL54 gene to thereby detect drug-resistant cytomegalovirus. [Solution] A novel primer set that enables the analysis of the second half region of UL97 gene, wherein a mutation relating to drug resistance is reported, and a region corresponding to 92% or greater of UL54 gene region.

(57) 要約: 【課題】薬剤耐性サイトメガロウイルスを検出するために、UL97遺伝子および/またはUL54遺伝子の変異を迅速に検出するために使用する新規なプライマーセットを提供する。【解決手段】新規なプライマーセットは、UL97遺伝子の薬剤耐性に関わる変異が報告されている後半の領域と、UL54遺伝子領域の92%以上に相当する領域の解析を可能とした。

WO 2014/014077 A1

明 細 書

発明の名称：

サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の検出方法および薬剤耐性変異遺伝子の同定方法

技術分野

[0001] 本発明は、サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の迅速な検出方法およびサイトメガロウイルスの薬剤耐性変異遺伝子の同定方法に関する。

背景技術

[0002] サイトメガロウイルスは、ヘルペスウイルス科に属する2本鎖DNAウイルスであり、幼児期に不顕性感染し、一生涯にわたり潜伏感染する。サイトメガロウイルス（CMV）による感染は、人類の最大の感染症であり、米国では出生時期のCMV感染による難聴や精神発育遅延など恒久的な医療補助が必要とされる患者は5000人程とされる。

また、移植や医療の高度化、HIV感染等による免疫不全時に、CMVは肺炎、網膜炎、消化管潰瘍等の疾病を引き起こす。

その治療に、ガンシクロビル、フォスカビル、シドフォビル等の抗CMV薬が使用されるが、臓器移植患者における長期の予防投与などにより、耐性ウイルスの出現が問題となっている。

CMVの薬剤耐性は、上記の治療薬の作用機序に関わる遺伝子の変異により生じる。

例えば、ガンシルビルは、CMVのDNAポリメラーゼを阻害するために、CMVのUL97遺伝子にコードされるリン酸転移酵素で一リン酸化されることが活性型になる要件である。

そのため、CMVのガンシクロビル耐性株は、UL97遺伝子に変異を持つか、またはDNAポリメラーゼをコードするUL54遺伝子に変異を持つことが知られている（非特許文献1）。

[0003] 非特許文献1：日本臨床， Vol. 65増刊号2， 476-479 (2

007)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 患者から分離されたCMVの薬剤感受性を調べるため、UL97遺伝子とUL54遺伝子の塩基配列の決定が必要である。

しかしながら、従来の方法では、患者から分離された試料より得られるDNA量が少ないため、直接PCRでそれらの遺伝子のORF全領域を増幅することはその困難であった。

すなわち、これまでは患者のリンパ球を分離し、培養細胞に重層し、ウイルスが増殖するのを待ち、ウイルス粒子を超遠心で濃縮し、ゲノムDNAを精製し、PCRを行っていた。

この方法では、最終的に塩基配列を決定するまでに2ヶ月弱の時間を要していたため、臨床現場へのフィードバックまでに大幅に時間がかかっていた。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、ウイルスを増殖させる時間を省き、薬剤感受性に関する塩基配列を短時間で決定する方法の開発を試みた。

その結果、これまでに報告されていないプライマーのセットを考案し、薬剤耐性遺伝子UL97とUL54の遺伝子を増幅できる条件を決定した。

そして、両遺伝子の塩基配列を決定し、薬剤耐性遺伝子とが同定した。

さらに、その遺伝子と、ウイルス分離を行ったウイルスの遺伝子との配列は同一であり、この方法の有用性も確認した。

以下に本発明を詳細に説明する。

[0006] (1) UL97遺伝子の変異

CMVのUL97遺伝子産物(707アミノ酸、2124塩基)は、蛋白質リン酸化活性を有する酵素で、ガンシクロビルなどの抗CMV薬をリン酸化し、活性型へと誘導することが知られている。

すなわち、ガンシクロビルに耐性を獲得したCMVの多くはUL97遺伝子に変異を持つことが、これまで種々の耐性CMVの遺伝子解析からも報告

されている。

また、これらの研究からガンシクロビル耐性に関わるUL97遺伝子の変異は、全長で707アミノ酸の内、400番目のアミノ酸以降の後半に集中している。

そこで、新たに下記のプライマーセット (A) を設計した。

[0007] <プライマーセット (A) >

・プライマー1 (UL97 forward primer)

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

[0008] ・プライマー2 (UL97 reverse primer)

5' - g t a g t c c a a a c t c g a g a c g c - 3' (配列番号2)
)

[0009] (2) UL54遺伝子の変異

UL54遺伝子産物は、DNA合成酵素の活性を担っており、これまでの研究によりガンシクロビル、シドフォビルに対する耐性、フォスカビルに対する耐性に関わる変異箇所が報告されてきている。

そこで、新たに下記のプライマーセット (B) , (C) を設計した。

[0010] <プライマーセット (B) >

・プライマー3 (UL54 forward primer 1)

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

[0011] ・プライマー4 (UL54 reverse primer 1)

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

[0012] <プライマーセット (C) >

・プライマー5 (UL54 forward primer 2)

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

・プライマー4 (UL54 reverse primer 1)

[0013] 本発明の方法は、以下の手順で行えばよい。

(1) 患者の尿や血液から分離したリンパ球からDNAを抽出する。

(2) 抽出したDNAをPCRする際、以下の操作を行う。

a) PCR反応のサイクル数を増やす。

b) 遺伝子変異領域に絞って増幅を行い、その増幅距離を短くする。

上記の手順で実施することにより、少ないDNA量から効率よく必要な塩基配列を決定することができる。

[0014] 患者の尿や血液からリンパ球の分離および分離したリンパ球からのDNAの抽出は、公知の方法を用いればよい。

[0015] PCR反応のサイクル数を増やすとは、例えば、PCR反応を30回以上、好ましくは、35回~50回行うことである。

[0016] 微量のDNAサンプルから増幅するためには、例えば、プライマーセットを2種類組み合わせたNested PCR法がよく用いられている。

しかし、PCR反応を2度行う必要があり、PCR反応終了後に希釈や一度目のPCRに使ったプライマーを除去するなど手技が複雑になり所用時間もかかる。

本発明方法では、最初は厳しい条件でPCR反応を行い、少しずつアニーリングの温度条件を緩和していくことで、非特異反応を軽減し、目的の遺伝子の高率な増幅を行う。

具体的には、ステップダウンPCRでアニーリングの温度を68~70℃から1サイクルごとに1℃ずつ下げながら約10サイクル増幅を行う。

[0017] 遺伝子変異領域に絞って増幅とは、UL97遺伝子の変異として既に報告された遺伝子変異領域のことである。

具体的には、全長で707アミノ酸の内、400番目のアミノ酸以降の後半である。

この領域の変異を検出するためには、上記のプライマーセット(A) (プライマー1およびプライマー2)でUL97遺伝子の後半の遺伝子領域(約

1. 3 k b p) を、P C R法により増幅して塩基配列を解析し、さらにアミノ酸変異の有無を検討すればよい。

塩基配列の解析およびアミノ酸変異の検討は公知の方法で行えばよい。

[0018] U L 5 4 遺伝子の変異を検出するには、上記のプライマーセット (B) または (C) (プライマー 3 ~ 5) で U L 5 4 遺伝子のほぼ全領域に相当する約 3. 4 k b p (5 3 番目から 1 2 0 0 番目のアミノ酸をコードする領域) を P C R法で増幅して塩基配列を解析し、アミノ酸変異の有無を検討すればよい。

塩基配列の解析およびアミノ酸変異の検討は公知の方法で行えばよい。

発明の効果

[0019] 本発明方法および本発明のプライマーは、U L 9 7 遺伝子の薬剤耐性に関わる変異が報告されている後半の領域と、U L 5 4 遺伝子領域の 9 2 % 以上に相当する領域の解析を可能とした。

これにより、サイトメガロウイルス全ての薬剤耐性変異株を検出することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1] U L 9 7 の P C R の結果を示す写真である。U L 9 7 の既報の薬剤耐性に関与するアミノ酸変異が多い C 末より 3 0 0 のアミノ酸をコードする領域に対する P C R。矢印で示した場所に約 1. 3 k b p の増幅が認められる。

[図2] U L 5 4 の P C R の結果を示す写真である。U L 5 4 の A T G から 1 5 5 b p、5 0 9 b p 離れた領域から、3 6 0 2 b p 離れた領域までの P C R。なお、C M V の U L 5 4 の C D S は 3 7 2 9 b p である。

[図3] U L 5 4 のアミノ酸比較である。分離株 1 では、3 5 5 番目のバリンからアラニンに、6 8 8 番目のアラニンからバリンへの変異がある。なお、3 1 5 7 および 3 3 0 1 は、乳児の尿からの分離株、H A N 1 3 は、気管支肺胞洗浄からの分離株である。

発明を実施するための最良の形態

[0021] 以下、本発明を実施例で説明するが、本発明はこれらに限定されるもので

はない。

実施例 1

[0022] (1) 患者の血液・尿から分離したリンパ球からDNAの抽出

患者の血液は凝固させないように、EDTAを加えた状態のものを使用した。

患者血液をリン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline; PBS) で2倍に希釈し、密度勾配遠心用担体 (Ficoll) を3mL加えた15mLチューブに静かに重層し、低速 (1,500rpm 30分) 遠心分離を行う。

リンパ球は赤血球と血清の境界面に集積するので、静かにこれを抜き取る。

サイトメガロウイルスのゲノムDNAの抽出には、キアゲン (Qiagen) 社のQIA Blood DNA extraction mini kit、もしくはロシュ (Roche) 社のHigh Pure Viral Nucleic Acid Kitを使用した。

患者の全血より分離した血漿、末梢血リンパ球200 μ L、もしくは尿200 μ Lに溶解buffer AL (Qiagen)、またはBinding Buffer (Roche) を加え常法により抽出を行った。

[0023] (2a) 抽出したDNAのPCR (その1)

サイトメガロウイルスのリン酸化酵素をコードしているUL97およびDNA合成酵素をコードしているUL54遺伝子領域をPCRで増幅する。

<反応液の作成>

5 μ M Primer Forward : 2 μ L

5 μ M Primer Reverse : 2 μ L

10 \times KOD FX neo buffer : 5 μ L

2mM dNTP : 5 μ L

KOD FX neo DNA polymerase : 0.5 μ L

Template DNA : 5 μ L

dw : 30.5 μ L

Total : 50 μ L

[0024] <反応条件 (UL97)>

96°C、5 min

96°C、30 sec

58°C、15 sec (30 cycle 繰り返す。)

72°C、1 min 30 min

72°C、7 min

4°C、 ∞

[0025] <反応条件 (UL54) ステップダウンPCR>

94°C、2 min

98°C、10 sec

70°C、30 sec [10 cycle 繰り返す。(1 cycle ごとに1°C/ずつアニーリングの温度を下げる。)]

68°C、5 min

98°C、10 sec

60°C、30 sec (45 cycle 繰り返す。)

68°C、5 min

[0026] (2b) 抽出したDNAのPCR (その2)

サイトメガロウイルスのリン酸化酵素をコードしているUL97およびDNA合成酵素をコードしているUL54 遺伝子領域をPCRで増幅する。

<反応液の作成>

5 μ M Primer Forward : 2 μ L

5 μ M Primer Reverse : 2 μ L

2 \times KOD FX neo buffer : 25 μ L

2mM dNTP : 5 μ L

KOD FX neo DNA polymerase : 1 μ L

Template DNA : 5 μ L

d w : 1 0 μ L

T o t a l : 5 0 μ L

[0027] <反応条件 (UL97)>

9 6 ° C、 5 m i n

9 6 ° C、 3 0 s e c

5 8 ° C、 1 5 s e c (3 0 c y c l e 繰り返す。)

7 2 ° C、 1 m i n 3 0 m i n

7 2 ° C、 7 m i n

4 ° C、 ∞

[0028] <反応条件 (UL54) ステップダウンPCR>

9 4 ° C、 2 m i n

9 8 ° C、 1 0 s e c

6 8 ° C、 3 0 s e c [1 0 c y c l e 繰り返す。 (1 c y c l e
ごとに 1 ° C / ずつアニーリングの温度を下げる。)]

6 8 ° C、 5 m i n

9 8 ° C、 1 0 s e c

5 8 ° C、 3 0 s e c (4 5 c y c l e 繰り返す。)

6 8 ° C、 5 m i n

[0029] アガロースゲル電気泳動で目的のサイズのバンドが増幅されているかを確認する。

複数のバンドが見られる場合は、アガロースゲル電気泳動後、切り出し精製をおこなう。

1本バンドの場合はPCR反応後の反応液からclean up kitを用いてプライマーを除去する。

図1にUL97のPCRの結果の写真例を示し、図2にUL54のPCRの結果の写真例を示す。

[0030] (3) 塩基配列の解析

<シーケンス反応液の調製>

ABI 5×buffer : 3.5 μL

ABI Big Dye Terminator V3.1 : 1 μL

Dw : 12.5 μL

Template DNA : 2 μL

Primer : 1 μL

[0031] <シーケンス反応のプログラム>

96°C、1 min

96°C、10 sec

50°C、5 sec (28 cycle繰り返す。)

60°C、4 min

4°C、∞

[0032] エタノール沈殿により過剰な蛍光物質を除去する。

上記反応液 : 20 μL

99.5%エタノール : 70 μL

62.5 mM EDTA : 10 μL

Total : 100 μL

[0033] ボルテックスミキサーでよく攪拌し、室温15分放置

12,000 rpm×15 min 遠心

上清を完全に抜き取る。

70%エタノール100 μLを加える。

12,000 rpm×10 min 遠心

上清を完全に抜き取る。

乾燥 (10~15分放置)

95°Cヒートブロックかサーマルサイクラーを準備

Hi-Di Formamide 15 μLを各チューブに入れる。

[0034] 95°C、2 min

氷中で5 min以上冷やす。

シーケンス用プレートに気泡ができないようにサンプルを移す。

セプタをかぶせる。

シーケンス解析 ABI (Applied Biosystems) 3130 DNA sequencerにて塩基配列の決定。

[0035] (4) アミノ酸変異の検討

上記実験結果から塩基配列をGENETYX 遺伝子解析ソフトによりこれまで報告されているサイトメガロウイルスのUL97, UL54 遺伝子と相同性の比較検討を行った。

また、得られた塩基配列からアミノ酸配列に変換し、アミノ酸置換の有無を検討した。

アミノ酸配列に変異が認められた場合は、これまで報告されているガンシクロビルまたはフォスカビル耐性に関わる変異箇所と比較し、変異箇所が既報告と同一の場合には薬剤耐性に関わる変異とみなした。

図3にUL54のアミノ酸比較例を示す。

産業上の利用可能性

[0036] 本発明は、UL97 遺伝子の薬剤耐性に関わる変異が報告されている後半の領域と、UL54 遺伝子領域の92%以上に相当する領域の解析を可能とした。

本発明は、薬剤の耐性を獲得したサイトメガロウイルスの迅速な検出に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の検出方法であって、
サイトメガロウイルスのUL97遺伝子の変異を検出するための下記
プライマーセット(A)と、サイトメガロウイルスのUL54遺伝子
の変異を検出するためのプライマーセット(B)またはプライマーセ
ット(C)のうち、いずれか1つとを組み合わせで用いる検出方法。
<プライマーセット(A)>
プライマー1: 5' - t g c c c a a a g a g g a c g a t t t t -
3' (配列番号1)
プライマー2: 5' - g t a g t c c a a a c t c g a g a c g c -
3' (配列番号2)
<プライマーセット(B)>
プライマー3: 5' - a c g g t c a g a c g g g g t t g a t c a
a g c a - 3' (配列番号3)
プライマー4: 5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g
a g a a c c t - 3' (配列番号4)
<プライマーセット(C)>
プライマー5: 5' - t c a t t g c c a g c g t g g g c g a a c
t a g t g - 3' (配列番号5)
プライマー4: 5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g
a g a a c c t - 3' (配列番号4)
- [請求項2] サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異が、サイトメガロウイルスの
UL97遺伝子産物の400番目のアミノ酸以降の変異およびサイト
メガロウイルスのUL54遺伝子産物のアミノ変異である請求項1記
載の検出方法。
- [請求項3] 検出方法がPCRを利用する方法であって、サイトメガロウイルス
のUL54の変異を検出するPCRが、ステップダウンPCRである
請求項1または2記載の検出方法。

[請求項4] サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の同定方法であって、以下の工程を含む同定方法。

(1) 工程1：サイトメガロウイルスのUL97遺伝子の後半領域の約1.3kbpを以下のプライマーセット(A)でPCR法により増幅して塩基配列を解析し、アミノ酸変異の有無を調べる工程、

<プライマーセット(A)>

プライマー1：5' - t g c c c a a a g a g g a c g a t t t t -
3' (配列番号1)

プライマー2：5' - g t a g t c c a a a c t c g a g a c g c -
3' (配列番号2)

(2) 工程2：サイトメガロウイルスのUL54遺伝子のほぼ全域の約3.4kbpを以下のプライマーセット(B)またはプライマーセット(C)でPCR法により増幅して塩基配列を解析し、アミノ酸変異の有無を調べる工程とを有する。

<プライマーセット(B)>

プライマー3：5' - a c g g t c a g a c g g g g t t g a t c a
a g c a - 3' (配列番号3)

プライマー4：5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g
a g a a c c t - 3' (配列番号4)

<プライマーセット(C)>

プライマー5：5' - t c a t t g c c a g c g t g g g c g a a c
t a g t g - 3' (配列番号5)

プライマー4：5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g
a g a a c c t - 3' (配列番号4)

[請求項5] 前記工程2におけるPCR法が、ステップダウンPCRである請求項4記載の同定方法。

[請求項6] サイトメガロウイルスの薬剤耐性変異の検出または同定に用いる以下のプライマーセット(A)と、プライマーセット(B)又は(C)の

うち、いずれか1つの組合せからなるプライマーセット。

<プライマーセット (A) >

プライマー1 : 5' - t g c c c a a a g a g g a c g a t t t t -
3' (配列番号1)

プライマー2 : 5' - g t a g t c c a a a c t c g a g a c g c -
3' (配列番号2)

<プライマーセット (B) >

プライマー3 : 5' - a c g g t c a g a c g g g g t t g a t c a
a g c a - 3' (配列番号3)

プライマー4 : 5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g
a g a a c c t - 3' (配列番号4)

<プライマーセット (C) >

プライマー5 : 5' - t c a t t g c c a g c g t g g g c g a a c
t a g t g - 3' (配列番号5)

プライマー4 : 5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g
a g a a c c t - 3' (配列番号4)

[請求項7]

サイトメガロウイルスのUL97遺伝子変異の検出または同定に用いる以下のプライマーセット (A)。

プライマー1 : 5' - t g c c c a a a g a g g a c g a t t t t -
3' (配列番号1)

プライマー2 : 5' - g t a g t c c a a a c t c g a g a c g c -
3' (配列番号2)

[請求項8]

サイトメガロウイルスのUL54遺伝子変異の検出または同定に用いる以下のプライマーセット (B)。

プライマー3 : 5' - a c g g t c a g a c g g g g t t g a t c a
a g c a - 3' (配列番号3)

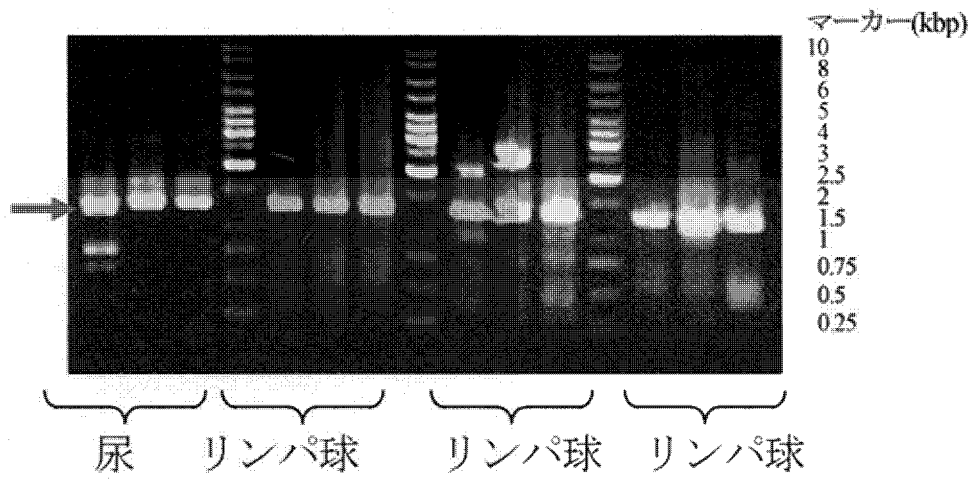
プライマー4 : 5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g
a g a a c c t - 3' (配列番号4)

[請求項9] サイトメガロウイルスのUL54遺伝子変異の検出または同定に用いる以下のプライマーセット (C)。

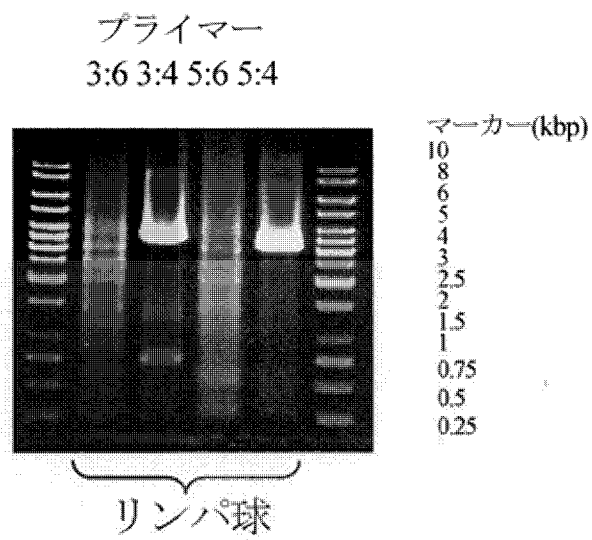
プライマー5 : 5' - t c a t t g c c a g c g t g g g c g a a c
t a g t g - 3' (配列番号5)

プライマー4 : 5' - a g c a c g t t g g t t a c a g c c t t g
a g a a c c t - 3' (配列番号4)

[図1]



[図2]



[図3]

分離株 1	301:DIECMSGEGGFPCA EKSDDIVIQISCVCYETGGNTAVDQGIPNGNDGRGCTSEGAI FGHS	360
Towne	301:DIECMSGEGGFPCA EKSDDIVIQISCVCYETGGNTAVDQGIPNGNDGRGCTSEGVIFGHS	360
AD169	301:DIECMSGEGGFPCA EKSDDIVIQISCVCYETGGNTAVDQGIPNGNDGRGCTSEGVIFGHS	360
Toledo	301:DIECMSGEGGFPCA EKSDDIVIQISCVCYETGGNTAVDQGIPNGNDGRGCTSEGVIFGHS	360
3157	301:DIECMSGEGGFPCA EKSDDIVIQISCVCYETGGNTAVDQGIPNGNDGRGCTSEGVIFGHS	360
3301	301:DIECMSGEGGFPCA EKSDDIVIQISCVCYETGGNTAVDQGIPNGNDGRGCTSEGVIFGHS	360
HAN13	301:DIECMSGEGGFPCA EKSDDIVIQISCVCYETGGNTAVDQGIPNGNDGRGCTSEGVIFGHS	360
分離株 1	661:NSSSSVGVFSVGS GSSGGVGSND SHGVGGTAAVS YQGATVFEPEVGYNDP VAVDFAS	720
Towne	661:NSSSSVGVFSVGS GSSGGVGSND SHGAGGTA AVSYQGATVFEPEVGYNDP VAVDFAS	720
AD169	661:NSSSSVGVFSVGS GSSGGVGSND NHGAGGTA AVSYQGATVFEPEVGYNDP VAVDFAS	720
Toledo	661:NSSSSVGVFSVGS GSSGGVGSND NHGAGGTA AVSYQGATVFEPEVGYNDP VAVDFAS	720
3157	661:NSSSSVGVFSVGS GSSGGVGSND NHGAGGTA AVSYQGATVFEPEVGYNDP VAVDFAS	720
3301	661:NSSSSVGVFSVGS GSSGGVGSND NHGAGGTA AVSYQGATVFEPEVGYNDP VAVDFAS	720
HAN13	661:NSSSSVGVLSVGS GSSGGVGSND SHGAGGTA AVSYQGATVFEPEVGYNDP VAVDFAS	720

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/069598

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (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.
Y	DREW, W. L., Cytomegalovirus Resistance Testing: Pitfalls and Problems for the Clinician, Clinical Infectious Diseases, 2010, Vol.50, p.733-736, particularly, page 734, left column, line 6 to right column, line 19, fig. 1, 2, page 733, right column 2., lines 7 to 10	1-9
Y	Yoshito EIZURU, "Cytomegalovirus no Yakuzai Taiseika Kiko", Japanese Journal of Clinical Medicine, 2007, vol.65, special extra issue 2, pages 476 to 479, particularly, fig. 2, 3	1-9

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 12 September, 2013 (12.09.13)	Date of mailing of the international search report 24 September, 2013 (24.09.13)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069598

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HECKER, K. H. and ROUX, K. H., High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR, <i>Biotechniques</i> , 1996, Vol.20, No.3, p.478-480, 482-485, particularly, page 478, right column, the last paragraph, page 479, right column, 1st paragraph, page 485, left column	1-9
P,X	Takamitsu AIHARA et al., "CMV no Yakuzai Kanjusei ni Kakawaru UL97 to UL54 no Enki Hairetsu no Soki Kettei", Dai 60 Kai The Japanese Society of Virology Gakujutsu Shukai Program Shoroku-shu, 31 October 2012 (31.10.2012), page 447, P2-117	1-9
P,X	DAIKOKU, T. et. al, Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical specimens, <i>Microbiology and Immunology</i> , 2013.05.14, Vol.57, p.396-399, entire text	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

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 (IPC))

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013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)

REGISTRY (STN), CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (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
Y	DREW, W. L., Cytomegalovirus Resistance Testing: Pitfalls and Problems for the Clinician, Clinical Infectious Diseases, 2010, Vol. 50, p. 733-736, 特に、734 頁左欄 6 行-右欄 19 行、Figure 1、Figure 2、733 頁右欄 2. の 7-10 行	1-9

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

12.09.2013

国際調査報告の発送日

24.09.2013

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)

吉田 知美

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3335

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	榮鶴義人, サイトメガロウイルスの薬剤耐性化機構, 日本臨床, 2007, Vol.65, 増刊号2, p.476-479, 特に、図2、図3	1 - 9
Y	HECKER, K. H. and ROUX, K. H., High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR, Biotechniques, 1996, Vol.20, No.3, p.478-480,482-485, 特に、478頁右欄最終段落、479頁右欄1段落、485頁左欄	1 - 9
P X	相原隆充, 外2名, CMVの薬剤感受性にかかわるUL97とUL 54の塩基配列の早期決定, 第60回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2012.10.31, p.447, P2-117	1 - 9
P X	DAIKOKU, T. et. al, Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical specimens, Microbiology and Immunology, 2013.05.14, Vol.57, p.396-399, 全文	1 - 9