

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6153866号
(P6153866)

(45) 発行日 平成29年6月28日 (2017. 6. 28)

(24) 登録日 平成29年6月9日 (2017. 6. 9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
G O 1 T 1/161 (2006. 01)	G O 1 T 1/161 D

請求項の数 8 (全 75 頁)

(21) 出願番号	特願2013-512140 (P2013-512140)	(73) 特許権者	512298890
(86) (22) 出願日	平成23年5月24日 (2011. 5. 24)		キアゲン ガイサーズバーグ アイエヌシ
(65) 公表番号	特表2013-534810 (P2013-534810A)		ー.
(43) 公表日	平成25年9月9日 (2013. 9. 9)		アメリカ合衆国, メリーランド 2 0 8 7
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/037684		8, ガイサーズバーグ, 1 2 0 1 クロッ
(87) 国際公開番号	W02011/149897		パー ロード
(87) 国際公開日	平成23年12月1日 (2011. 12. 1)	(74) 代理人	100088904
審査請求日	平成26年4月15日 (2014. 4. 15)		弁理士 庄司 隆
審判番号	不服2016-6945 (P2016-6945/J1)	(72) 発明者	マロニー, リチャード
審判請求日	平成28年5月12日 (2016. 5. 12)		アメリカ合衆国, メリーランド 2 1 2 1
(31) 優先権主張番号	61/347, 941		2, バルティモア, 7 1 1 2 ワードマン
(32) 優先日	平成22年5月25日 (2010. 5. 25)		ロード
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 迅速なハイブリッド捕捉アッセイ、及び関連する戦略的に切断されたプローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 5、配列番号 1 0 4 及びそれらの相補体からなる群から選択される高リスク H P V 核酸の L 1、L 2、E 1、E 2、E 4、E 6 及び E 7 の各々の少なくとも 1 0 0 個の連続塩基に対して 7 0 % ~ 1 0 0 % の相補性を有する少なくとも 1 つの配列を含み、
配列番号 4 5、4 6、配列番号 1 1 2 及びそれらの相補体に対して 7 0 % ~ 1 0 0 % の同一性を示す配列を含まず、低リスク H P V 核酸と交差反応しない、配列番号 9 7 又はその相補体の配列から本質的になる、ポリヌクレオチドプローブ。

【請求項 2】

配列番号 9 7 又はその相補体の配列からなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドプローブ。 10

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のポリヌクレオチドプローブを断片化することによって生成される核酸プローブセット。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載の少なくとも一つのポリヌクレオチドプローブを含む核酸プローブセット及び／又は請求項 3 に記載の核酸プローブセットを含むキット。

【請求項 5】

サンプル中の標的核酸の存在を決定する方法であって、

a) 請求項 1 又は 2 に記載の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドプローブを標的核酸分 20

子とハイブリダイズさせ、二本鎖核酸ハイブリッドを形成する、ポリヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせることと、

b) 該二本鎖核酸ハイブリッドを、二本鎖核酸ハイブリッドに特異的な第1の抗体を含む支持体上に捕捉させることと、

c) 該標的核酸分子を検出することと、
を含む、サンプル中の標的核酸の存在を決定する方法。

【請求項6】

二本鎖核酸ハイブリッドがDNA:RNAハイブリッドである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

標的核酸が高リスクHPV核酸である、請求項5又は6に記載の方法。

【請求項8】

サンプルが生物学的サンプルである、請求項5～7のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプル中の核酸の存在を決定するための方法、試薬、ハイスループットシステム及びキットに関する。

【0002】

〔関連出願の相互参照〕

本出願は2010年5月25日付けで出願された米国仮特許出願第61/347,941号（その内容全体が参照により本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

特定の核酸配列及び配列変化の検出及び特性化は、感染の指標となるウイルス又は細菌の核酸配列の存在の検出、疾患及びがんに関連する哺乳動物遺伝子の変異体又は対立遺伝子の存在の検出、並びに法医学的サンプル中に見られる核酸の由来の特定に、並びに父子鑑定に利用されている。

【0004】

例えば、多くの微生物及びウイルスのRNA又はDNAが単離され、シーケンシングされている。核酸プローブが多数の感染について検査されている。試験サンプル中の相補的なRNA配列又はDNA配列とハイブリダイズする、検出可能な核酸配列がこれまでに利用されている。プローブの検出は、そのプローブに特異的な試験サンプル中の特定の核酸配列の存在を示す。科学研究の助けとなることに加えて、DNAプローブ又はRNAプローブは、患者サンプルにおけるウイルス並びに細菌、酵母及び原虫等の微生物、並びに特定の障害と関係する遺伝子突然変異の存在を検出するために使用することができる。

【0005】

核酸ハイブリダイゼーションプローブは、他の検出方法に比べて高い感度及び特異性の利点を有し、生きた生物を必要としない。ハイブリダイゼーションプローブは例えば、容易に検出することのできる放射性物質、又は例えばその捕捉及び検出を可能にするビオチン等の生化学的マーカーによって標識することができる。高感度の戦略的に切断されたプローブは、望ましくない又は不要な領域との交差反応性を示す配列領域を取り除くことによって構築することもできる。DNA-RNAハイブリッド、DNA-DNAハイブリッド又はRNA-RNAハイブリッドを含み得るDNAハイブリッドに特異的な第1の抗体に核酸分子を捕捉させてもよい。ハイブリッドを続いて、例えばアルカリホスファターゼ等の生化学的マーカー、又は検出可能な任意の他のマーカーで標識され得る第2の標識抗体によって検出することができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

10

20

30

40

50

ヒト及び病原菌に由来する遺伝子の核酸配列データは蓄積されているため、迅速で費用効果の高い簡便な試験の需要が増大している。サンプル中の標的核酸を更に迅速に決定するための新規の効果的な方法、組成物及びキットを提供する必要がある。本発明の方法及びアッセイはこれらの要求を満たし、ハイスループットの自動化されたシステムに使用することができる。別の態様では、方法及びアッセイは部分的に自動化されたシステムで実施することができる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

一態様では、本開示は、高リスクH P V核酸とハイブリダイズすることが可能であるが、低リスクH P V核酸と交差反応しない、少なくとも1キロベース長のポリヌクレオチドプローブに関する。一態様では、ポリヌクレオチドプローブは、高リスクH P V核酸のL 1、L 2、E 1、E 2、E 4、E 6及びE 7の各々の少なくとも100個の連続塩基に対して70%~100%の相補性を有する少なくとも1つの配列を含む。更なる態様では、ポリヌクレオチドプローブは、低リスクH P V核酸の少なくとも100個の連続塩基に対して約70%~100%の相補性を有する少なくとも100個の連続塩基の任意の配列を含有しない。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは、配列番号44~配列番号57、配列番号111~配列番号115及びそれらの相補体に対して約70%~100%の同一性を有する任意の配列を含まない。また更なる態様では、ポリヌクレオチドプローブは、配列番号1~配列番号17及び配列番号104~配列番号110、配列番号116又はそれらの相補体からなる群から選択される高リスクH P V核酸に特異的である。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは、配列番号97~配列番号103又はそれらの相補体からなる群から選択される配列に対して約70%~100%の同一性を有する配列を含む。また別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは配列番号97~配列番号103又はそれらの相補体からなる群から選択される配列から本質的になるか、又はそれからなる。

【0008】

一態様では、本開示は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号116、配列番号117又はそれらの相補体に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する、少なくとも1キロベース長の配列を含む核酸を提供するが、但し、上記核酸は配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57又はそれらの相補体に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する任意の配列を含まない。

【0009】

本開示は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番

号41、配列番号42、配列番号43、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号116、配列番号117又はそれらの相補体に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる1つ又は複数のプローブのプローブセットを提供するが、但し、上記核酸は配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57又はそれらの相補体に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する任意の配列を含まない。

10

【0010】

一態様では、本開示は、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法であって、

- a) サンプルを回収媒体に懸濁することと、
 - b) 標的核酸分子をサンプルから回収媒体に放出させることと、
 - c) 二本鎖標的核酸分子を一本鎖標的核酸分子に変換することと、
 - d) 1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを、ポリヌクレオチドプローブと標的一本鎖標的核酸分子とがハイブリダイズして二本鎖核酸ハイブリッドを形成することを可能にする条件下で、一本鎖標的核酸分子に接触させることと、
 - e) 二本鎖核酸ハイブリッドを捕捉させることと、
 - f) 二本鎖核酸ハイブリッドを、結合していない一本鎖標的核酸分子から分離することと、
 - g) 二本鎖核酸ハイブリッドを検出し、それにより標的核酸の存在が示される、二本鎖核酸ハイブリッドを検出することと、
- を含む、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

20

【0011】

一態様では、ポリヌクレオチドプローブは、欠失部分が低リスクHPV型に対して高い配列同一性又は交差反応性を有する、高リスクHPV核酸に特異的な戦略的に切断されたプローブである。一態様では、戦略的に切断された高リスクHPVプローブは、HPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型の1つ又は複数に特異的であるか、又はそれとハイブリダイズすることが可能であり、欠失部分が低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型の1つ又は複数に対して交差反応性又は特異性を示す。別の態様では、プローブの欠失部分は、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する配列を含む。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103若しくは(or)配列番号117、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115又はそれらの相補体に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する核酸配列である。

30

40

【0012】

別の態様は、本明細書中で開示されるプローブを用いたサンプル中の標的核酸分子の迅速な検出に関する。検出方法は完全に自動化されているか、又は部分的に自動化されている(言い換えると、一部人手による入力が必要とする)、自動化されたものであり得る。

【0013】

50

別の態様は、本明細書中で開示されるプローブを用いた、例えば機械又は一連の機械内で同時の又は非常に短い期間での、複数のサンプル中の標的核酸分子の検出に関する。

【0014】

別の態様は、本明細書中で開示されるプローブを含む、サンプル中の標的核酸分子を検出するためのキットに関する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1-1】HPV33に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は、切断に選択される配列を示す。鋳型配列は、配列番号5（ベクター配列を含む）及び配列番号104（HPV配列のみ）に見ることができる。

10

【図1-2】つづき

【図1-3】つづき

【図1-4】つづき

【図2-1】HPV39に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は、切断に選択される配列を示す。鋳型配列は、配列番号7（ベクター配列を含む）及び配列番号105（HPV配列のみ）に見ることができる。

20

【図2-2】つづき

【図2-3】つづき

【図3-1】HPV52に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は、切断に選択される配列を示す。鋳型配列は、配列番号10（ベクター配列を含む）及び配列番号106（HPV配列のみ）に見ることができる。

【図3-2-1】つづき

【図3-2-2】つづき

【図3-3】つづき

30

【図3-4】つづき

【図4-1】HPV56に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は、切断に選択される配列を示す。鋳型配列は、配列番号11（ベクター配列を含む）及び配列番号107（HPV配列のみ）に見ることができる。

【図4-2】つづき

【図4-3】つづき

【図5-1】HPV58に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は、切断に選択される配列を示す。鋳型配列は、配列番号12（ベクター配列を含む）及び配列番号108（HPV配列のみ）に見ることができる。

40

【図5-2-1】つづき

【図5-2-2】つづき

【図5-3】つづき

【図5-4】つづき

【図6-1】HPV66に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は

50

、切断に選択される配列を示す。鋳型配列は、配列番号 1 4（ベクター配列を含む）及び配列番号 1 0 9（H P V 配列のみ）に見ることができる。

【図 6-2-1】 つづき

【図 6-2-2】 つづき

【図 6-3】 つづき

【図 7-1】 H P V 6 8 に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は、切断に選択される配列を示す。鋳型配列は、配列番号 1 5（ベクター配列を含む）及び配列番号 1 1 0（H P V 配列のみ）に見ることができる。

10

【図 7-2】 つづき

【図 7-3-1】 つづき

【図 7-3-2】 つづき

【図 8-1】 H P V 2 6（配列番号 1 1 6）に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は、切断に選択される配列を示す。

【図 8-2】 つづき

【図 8-3】 つづき

【図 9-1】 H P V 7 3 に特異的な戦略的に切断されたプローブを生成するために使用することのできる例示的な鋳型の配列を示す図である。下線を引いた文字列は欠失プライマーの結合部位を示す。点線の下線は欠失プライマーの重複部位を示す。小文字の文字列は、切断に選択される配列を示す。

20

【図 9-2】 つづき

【図 9-3】 つづき

【図 9-4】 つづき

【図 9-5】 つづき

【図 10-1】 戦略的に切断された H P V 2 6 X X プローブの制限酵素地図及びその配列（配列番号 1 1 7）を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す。

30

【図 10-2】 つづき

【図 10-3】 つづき

【図 10-4】 つづき

【図 11-1】 戦略的に切断された H P V 3 3 X プローブの制限酵素地図及びその配列を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す。

【図 11-2】 つづき

【図 11-3】 つづき

【図 11-4】 つづき

【図 11-5】 つづき

40

【図 12-1】 戦略的に切断された H P V 3 9 X X プローブの制限酵素地図及びその配列を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す。

【図 12-2】 つづき

【図 12-3】 つづき

【図 12-4】 つづき

【図 12-5】 つづき

50

【図13-1】戦略的に切断されたHPV52Xプローブの制限酵素地図及びその配列を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す。

【図13-2】つづき

【図13-3】つづき

【図13-4】つづき

【図13-5】つづき

【図14-1】戦略的に切断されたHPV56XXプローブの制限酵素地図及びその配列を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す。

10

【図14-2】つづき

【図14-3】つづき

【図14-4】つづき

【図14-5】つづき

【図15-1】戦略的に切断されたHPV58Xプローブの制限酵素地図及びその配列を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す

20

【図15-2】つづき

【図15-3】つづき

【図15-4】つづき

【図16-1】戦略的に切断されたHPV66XXプローブの制限酵素地図及びその配列を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。「***」が、プライマーpHPV66XF1（配列番号76）及びpHPV66XR1（配列番号77）が鋳型に結合し得る部位を示すことに留意されたい。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す。

【図16-2】つづき

30

【図16-3】つづき

【図16-4】つづき

【図16-5】つづき

【図17-1】戦略的に切断されたHPV68XXプローブの制限酵素地図及びその配列を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す。

【図17-2】つづき

【図17-3】つづき

【図17-4】つづき

40

【図17-5】つづき

【図18-1-1】戦略的に切断されたHPV73XXプローブの制限酵素地図及びその配列を示す図である。欠失プライマーの結合部位を一重下線によって示し、プライマーの重複部を点線の下線によって示す。プロモーター部位は二重下線を引いた太字のイタリック体の文字列によって示す。網掛けした文字列はプローブ配列を示す。

【図18-1-2】つづき

【図18-2】つづき

【図18-3】つづき

【図18-4】つづき

【図18-5】つづき

50

【図19】切断されたHR-HPVプローブを生成するためのサンプルの概略を示す図である。図19に示すように、欠失プローブを含むプラスミドを以下の工程に従って生成する：1. 標的HPV鋳型プラスミドをメチル化する。2. 重複尾部を有する2つのプライマー（欠失プライマー）を用いて、標的の欠失を除いてプラスミドを増幅する。3. 得られるPCR産物は、欠失の標的となるセグメントを除いた線状二本鎖DNAである。4. PCRプラスミド混合物を野生型大腸菌（E. coli）に形質転換する。宿主細胞は欠失したプラスミドを環状化し、発現されるMcrBCヌクレアーゼが元のメチル化標的プラスミドを消化する。これにより、複製された非メチル化切断プラスミドのみが残る。次いで、例えば図31の例示的な方法によって、切断プラスミドから線状プローブを生成することができる。

10

【図20】戦略的に切断されたHPV26XXプローブを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。1. GenBankアクセッション番号X74472によるHPV26配列を保有するメチル化プラスミドを、Aに記載のプライマー対p26F及びp26R1によって増幅し、単一の戦略的に切断されたプラスミドHPV26Xを生成し、これを次いでクローニングする。各々のプライマーの結合部位をプラスミドHPV26v2上に示す。2. クローニング後、HPV26Xを、プライマー対p26XF3及びp26XR3を用いて増幅し、HPV26XXを生成する。各々のプライマーの結合部位をプラスミドHPV26X上に示す。

【図21】戦略的に切断されたHPV26XXプラスミドの制限酵素地図及びサンプル消化を示す図である。

20

【図22】戦略的に切断されたHPV33Xプラスミドを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。

【図23】戦略的に切断されたHPV52Xプラスミドを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。

【図24】戦略的に切断されたHPV58Xプラスミドを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。

【図25】戦略的に切断されたHPV39XXプラスミドを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。

【図26】戦略的に切断されたHPV56XXプラスミドを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。

30

【図27】戦略的に切断されたHPV66XXプラスミドを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。

【図28】戦略的に切断されたHPV68XXプラスミドを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。

【図29】戦略的に切断されたHPV73XXプラスミドを生成するためのサンプルの概略を実証する図である。

【図30】Vector NTI 10.3.0ソフトウェア（Invitrogen Corp., Carlsbad, CA）を用いた、高リスクHPV型と低リスクHPV型との配列アラインメントの結果を実証する図である。網掛けしたセルは、交差反応の高いリスクを有する配列を示す。約70%～100%の配列同一性を有する配列が、交差反応の高いリスクを有するとみなされる。約75%～100%の配列同一性を有する配列が、交差反応の中程度に高いリスクを有するとみなされる。約80%～100%の配列同一性を有する配列が、交差反応の非常に高いリスクを有するとみなされる。

40

【図31】切断プラスミドから線状化プローブを生成する例示的なスキームを実証する図である。均一性を導入するために、各々の鋳型を、プロモーター配列（ctcactataggcgaaattgg）（配列番号96）を有するXhoI/NotI断片のようにL2からL1へクローニングする。このようにクローニングすると、全てのHPV核酸が同じ方向となり、RNA転写前に1つの酵素XhoIで線状化することができる。T7ポリメラーゼによってプロモーター配列でRNA転写が開始し、これはL1の末端で終了して、いずれのベクター配列も含まない完全長プローブが作製される。このように生成した

50

各々の線状化RNAプローブの配列を、配列番号97～配列番号105に記載する。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本開示は、サンプル中の核酸分子の存在を迅速に決定するための方法、組成物、試薬、システム及びキットを含む。方法、組成物、試薬、システム及びキットは、病原菌の検出及び同定、並びに特定の疾患に対する遺伝的素因の検出を含むが、これらに限定されない臨床診断目的で使用する事ができる。

【0017】

一態様では、第2のHPV核酸と実質的に交差反応することなく、第1のHPV核酸を検出する能力を有する核酸プローブを開示する。

10

【0018】

一態様では、上記核酸プローブは、a) 第1の核酸と約70%～100%の同一性を有する、少なくとも1キロベース長の配列を含む鋳型核酸を準備することと、b) 該鋳型核酸の配列を第2の核酸の配列と比較することと、c) 第2の核酸の領域と約70%～100%の同一性を有する鋳型核酸の任意の領域を切断することを含む方法によって生成する。

【0019】

一態様では、本開示は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号116、配列番号117又はそれらの相補体に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する、少なくとも1キロベース長の配列を含む核酸を提供するが、但し、上記核酸は配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115又はそれらの相補体に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する任意の配列を含まない。

20

30

【0020】

本開示は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号116、若しくは配列番号117又はそれらの相補体に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する、核酸を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる1つ又は複数のプローブのプローブセットも提供するが、但し、上記核酸は配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配

40

50

列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 5 7、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、配列番号 1 1 5 又はそれらの相補体に対して 7 0 % 以上、7 5 % 以上、8 0 % 以上、8 5 % 以上、9 0 % 以上、9 5 % 以上、9 8 % 以上又は 1 0 0 % の同一性を有する任意の配列を含まない。

【0 0 2 1】

更なる態様では、プローブセットが、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、若しくは配列番号 1 0 3、若しくは配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 7 又はそれらの相補体に対して 7 0 % 以上、7 5 % 以上、8 0 % 以上、8 5 % 以上、9 0 % 以上、9 5 % 以上、9 8 % 以上又は 1 0 0 % の同一性を有する、配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる少なくとも 1 つの拡散

10

【0 0 2 2】

一態様では、本開示は、配列番号 8 7、配列番号 8 8、配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4、配列番号 9 5、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、若しくは配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 7 又はそれらの断片若しくは相補体に対して 7 5 % 以上、8 0 % 以上、8 5 % 以上、9 0 % 以上、9 5 % 以上、9 8 % 以上又は 1 0 0 % の同一性を有する配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる核酸を提供する。

【0 0 2 3】

20

一態様では、本開示は、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法を提供する。この方法は、

a) 洗剤を含む回収媒体にサンプルを懸濁することと、
b) 標的核酸分子を変性させることと、
c) 1 つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを、プローブと標的核酸分子とがハイブリダイズすることにより二本鎖核酸ハイブリッドを形成することを可能にする条件下で、標的核酸分子に接触させることと、

d) 二本鎖核酸ハイブリッドを、二本鎖ハイブリッド核酸ハイブリッドに特異的な第 1 の抗体をコーティングした固体支持体上に捕捉させ、それにより二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持体複合体を形成する、二本鎖核酸ハイブリッドを捕捉させることと、

30

e) 二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持体複合体を、結合していない核酸から分離することと、

f) 複合体に、二本鎖核酸ハイブリッドに特異的であるか、又は第 1 の抗体に特異的である、検出可能なマーカーで標識した第 2 の抗体をコンジュゲートし、二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持体抗体複合体を形成する、第 2 の抗体をコンジュゲートすることと、

g) 二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持体抗体複合体を、洗剤を含む洗浄バッファで洗浄することと、

h) 第 2 の抗体上の標識を検出することであって、検出が標的核酸分子の存在を示す、標識を検出すること、

とを含む。

40

【0 0 2 4】

別の態様では、本開示は、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法であって、洗剤を含む回収媒体にサンプルを懸濁することと、標的核酸分子を変性させることと、1 つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを、プローブと標的核酸分子とがハイブリダイズ又は結合することを可能にする条件下で、標的核酸分子に接触させることと、二本鎖核酸ハイブリッドを、二本鎖ハイブリッド核酸ハイブリッドに特異的な第 1 の抗体をコーティングした固体支持体上に捕捉させることとを含む、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

【0 0 2 5】

一態様では、本開示は、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法であって、洗

50

剤を含む回収媒体にサンプルを懸濁することと、標的核酸分子を変性させることと、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを、プローブと標的核酸分子とがハイブリダイズ又は結合することを可能にする条件下で、標的核酸分子に接触させることと、二本鎖核酸ハイブリッドを、二本鎖ハイブリッド核酸ハイブリッドに特異的な第1の抗体をコーティングした固体支持体上に捕捉させることと、二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持体複合体を、結合していない核酸から分離することを含む、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

【0026】

別の態様では、本開示は、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法であって、洗剤を含む回収媒体にサンプルを懸濁することと、標的核酸分子を変性させることと、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを、プローブと標的核酸分子とがハイブリダイズ又は結合することを可能にする条件下で、標的核酸分子に接触させることと、二本鎖核酸ハイブリッドを、二本鎖ハイブリッド核酸ハイブリッドに特異的な第1の抗体をコーティングした固体支持体上に捕捉させること、それにより二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持複合体を形成する、二本鎖核酸ハイブリッドを捕捉することと、二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持複合体を、結合していない核酸から分離することと、複合体に、二本鎖核酸ハイブリッドに特異的であるか、又は第1の抗体に特異的である第2の抗体をコンジュゲートし、二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持体抗体複合体を形成する、第2の抗体をコンジュゲートすることを含む、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

【0027】

別の態様では、本開示は、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法であって、洗剤を含む回収媒体にサンプルを懸濁することと、標的核酸分子を変性させることと、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを、プローブと標的核酸分子とがハイブリダイズ又は結合することを可能にする条件下で、標的核酸分子に接触させることと、二本鎖核酸ハイブリッドを、二本鎖ハイブリッド核酸ハイブリッドに特異的な第1の抗体をコーティングした固体支持体上に捕捉させること、それにより二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持複合体を形成する、二本鎖核酸ハイブリッドを捕捉することと、二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持複合体を、結合していない核酸から分離することと、複合体に、二本鎖核酸ハイブリッドに特異的であるか、又は第1の抗体に特異的である第2の抗体をコンジュゲートし、二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持体抗体複合体を形成する、第2の抗体をコンジュゲートすることと、二本鎖核酸ハイブリッド／固体支持体抗体複合体を、洗剤を含む洗浄バッファで洗浄することを含む、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

【0028】

別の態様では、本開示は、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法であって、
a) 洗剤を含む回収媒体にサンプルを懸濁することと、
b) サンプル中の標的核酸分子を変性させることと、
c) 少なくとも1つのポリヌクレオチドプローブを標的核酸分子に接触させることによって、二本鎖核酸ハイブリッドを形成することと、
d) 二本鎖核酸ハイブリッドを、第1の抗体を含む支持体上に捕捉させることによって、二本鎖核酸ハイブリッドー支持体複合体を形成することと、
e) 二本鎖核酸ハイブリッドー支持体複合体に、検出可能なマーカで標識した第2の抗体を接触させることによって、二本鎖核酸ハイブリッドー支持体ー第2の抗体の複合体を形成することと、
f) 二本鎖核酸ハイブリッドー支持体ー第2の抗体の複合体を洗浄バッファで洗浄することと、
g) 第2の抗体上のマーカを検出することであって、検出が標的核酸分子の存在を示す、マーカを検出することと、
を含む、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

【0029】

一態様では、本明細書に記載の方法に使用されるポリヌクレオチドプローブは、戦略的に切断された高リスクHPVプローブである。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは、高リスクHPVプローブであり、欠失部分は高い配列同一性又は低リスクHPV型との交差反応を示す。一態様では、高リスクHPVプローブは、HPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型の1つ又は複数に特異的であるか、又はそれとハイブリダイズすることが可能であり、欠失部分が低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型の1つ又は複数に対して交差反応性又は特異性を有する。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、若しくは配列番号103若しくは配列番号117、配列番号117又はそれらの断片若しくは相補体に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する配列を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる。

10

【0030】

一態様では、固体支持体は、二本鎖ハイブリッド核酸に免疫特異的な第1の抗体をコーティングするか、又は付着させた改質常磁性ビーズを含む。磁場を用いて、結合していない核酸から二本鎖核酸-磁性ビーズ-抗体複合体を分離することができる。

20

【0031】

一態様では、方法はサンプルの前処理工程を含まない。例えば、洗剤ベースの回収媒体によってサンプル調製時間の短縮が可能となり、それにより標的核酸分子の検出の加速がもたらされ得る。サンプルは本開示の方法、アッセイ又は装置によって直接アッセイ法で分析することができる。一例では、本開示のアッセイを用いた評価の前に、サンプルに対する精製工程を行わない。一態様では、本開示の方法、アッセイ又は装置によって粗溶解物を直接分析する。別の態様では、サンプルは標的増幅工程を受けない。

【0032】

30

一態様は、本明細書中で提供される方法、キット、アッセイ及び装置を利用することによって、がんを診断する方法に関する。一態様では、HPV及びHPV変異体に関連する核酸分子を同定することによって、子宮頸がんを検出する。別の態様では、本明細書中で提供される方法、キット、アッセイ及び装置を用いて、子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)をスクリーニングすることができる。続いて、検出されたがんを本明細書中で提供される方法、キット、アッセイ及び装置によって診断した(beingdiagnosed)後、治療することができる。一態様では、診断されたがんは、子宮頸がん及びその変異型であり得る。

【0033】

一態様では、本開示は、

(a) 約0.5%~約2.0%のNP-40、約0.10%~約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、約25mM~約75mMのTris-HCl、約10mM~約50mMのEDTA、約50mM~約200mMのNaCl及び約0.01%~約0.10%のアジ化ナトリウムに懸濁した生物学的サンプルと、

40

(b) 1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブと、
を含む組成物を提供する。

【0034】

一態様では、本開示は、

(a) 約0.5%~約2.0%のNP-40、約0.10%~約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、約25mM~約75mMのTris-HCl、約10mM~約50mMのEDTA、約50mM~約200mMのNaCl及び約0.01%~約0.10%

50

のアジ化ナトリウムを含む回収媒体に懸濁した生物学的サンプルと、

(b) 1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブと、

(c) 第1の抗体と、

を含む組成物を提供する。

【0035】

一態様では、本開示は、

(a) 約0.5%～約2.0%のNP-40、約0.10%～約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、約25mM～約75mMのTris-HCl、約10mM～約50mMのEDTA、約50mM～約200mMのNaCl及び約0.01%～約0.10%のアジ化ナトリウムを含む回収媒体に懸濁した生物学的サンプルと、

(b) 1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブと、

(c) 第1の抗体と、

(d) 第2の抗体と、

を含む組成物を提供する。

【0036】

一態様では、本開示は、

(a) 約0.5%～約2.0%のNP-40、約0.10%～約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、約25mM～約75mMのTris-HCl、約10mM～約50mMのEDTA、約50mM～約200mMのNaCl及び約0.01%～約0.10%のアジ化ナトリウムを含む回収媒体に懸濁した生物学的サンプルと、

(b) 1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブと、

(c) 第1の抗体をコーティングした支持体と、

(d) 第2の抗体と、

を含む組成物を提供する。

【0037】

一態様では、本開示は、

(a) 少なくとも1つの洗剤を含む回収媒体に懸濁した生物学的サンプルと、

(b) 変性試薬と、

(c) 1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブと、

(d) 第1の抗体をコーティングした支持体と、

(e) 検出可能なマーカーで標識した第2の抗体と、

を含む組成物を提供する。

【0038】

一態様では、本明細書に記載の組成物に使用されるポリヌクレオチドプローブは、戦略的に切断された高リスクHPVプローブである。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは、高リスクHPVプローブであり、欠失部分は高い配列同一性又は低リスクHPV型との交差反応を示す。一態様では、高リスクHPVプローブは、HPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型の1つ又は複数に特異的であるか、又はそれとハイブリダイズすることが可能であり、欠失部分が低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型の1つ又は複数に対して交差反応性又は特異性を有する。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、若しくは配列番号103若しくは配列番号117、配列番号117又はそれらの断片若しくは相補体に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する核酸配列である。

【0039】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用される場合、「高リスクH P V」という語句は、がんを発症するリスクの上昇に関連する、当業者に既知のH P V型を指す。

【0040】

本明細書中で使用される場合、「低リスクH P V」という語句は、がんを発症するリスクの上昇に関連しない、当業者に既知のH P V型を指す。

【0041】

一態様では、上記のいずれの組成物も、本明細書中に記載のいずれの回収媒体とともに使用してもよい。一態様では、上記の組成物中の生物学的サンプルは、子宮頸部細胞サンプル又はヒト子宮頸部細胞サンプルである。別の態様では、生物学的サンプル中の核酸分子を変性させる。上記の組成物中の生物学的サンプルは、回収媒体中で少なくとも21日間33℃で貯蔵した場合に安定性を示すことができる。一態様では、検出可能なマーカーで第2の抗体を標識する。

10

【0042】

生物学的サンプル

本開示の方法を用いて、生物学的サンプル及び環境サンプルを含む、検体又は培養物（例えば細胞培養物、微生物培養物及びウイルス培養物）を含むが、これらに限定されないサンプルから標的核酸分子の存在を検出することができる。生物学的サンプルはヒトを含む動物由来のもの、流体、固体（例えば糞便）、又は組織、並びに乳製品、野菜、食肉及び食肉副産物等の液体又は固体の食品及び飼料の製品及び原料、並びに廃棄物であり得る。環境サンプルとしては、表層物質、土壌、水及び産業サンプル等の環境物質、並びに食品及び乳製品の加工用の機器、装置、設備、器具、使い捨て及び使い捨てではない（non-disposable）製品から得られるサンプルが挙げられる。

20

【0043】

生物学的サンプルとしては、子宮頸部上皮細胞（例えば、子宮頸部スワブから得られるサンプル）、アデノイド細胞、肛門上皮細胞、血液、唾液、脳脊髄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、喀痰及び精液を挙げることができるが、これらに限定されない。サンプルは二本鎖核酸分子を含んでいても、又は一本鎖核酸分子を含んでいてもよい。二本鎖核酸分子が存在する場合、例えばアルカリを使用して、プロテイナーゼK／SDS、カオトロピック塩を使用して、当該技術分野で既知の様々な方法によってハイブリダイゼーション分析のためにこれを調製することができる。ハイブリダイゼーション分析のために二本鎖核酸分子を調製するプロセスは一般に、二本鎖核酸分子を一本鎖核酸分子に変換することを伴う。このプロセスは一般に変性として知られる。しかしながら、例えば三本鎖構築物によって、変性を行うことなく二本鎖核酸分子が検出され得ることも企図される。

30

【0044】

サンプルにおける標的核酸分子はDNA若しくはRNA、又はDNA及びRNAの両方であってもよい。標的核酸分子はより大きな核酸分子内に含有されていてもよい。標的核酸分子又は標的核酸分子を含むより大きな核酸分子のいずれの検出も本開示で企図される。

【0045】

生物学的サンプルは子宮頸部細胞、特にヒト子宮頸部細胞を含み得る。サンプルは、DACRONチップスワブ等の化学的に不活性の回収デバイスを含む、当該技術分野で既知の任意の方法又はデバイスによって回収することができる。綿棒、子宮頸部ブラシ、フロックスワブ（DACRONスワブのような形状であるが、より多くの細胞の回収及び細胞のより容易な放出を可能にするナイロン繊維で作られているスワブ）、子宮頸部ブルーム、ミニブルーム、洗浄液、又はパップスメア試験によく使用される任意の回収デバイスを含むが、これらに限定されない他の許容可能な回収デバイスを使用することができる。

40

【0046】

一態様では、方法は、少なくとも30歳の女性からサンプルを回収することを含む。方法は、パップスメア試験又は同等の試験によって、少なくとも30歳の女性からサンプルを回収することも含み得る。パップスメア試験又は同等の試験によって回収されるサン

50

ルは、子宮頸部細胞サンプルであり得る。

【0047】

サンプルを回収した後、サンプルをサンプル管に入れることができる。汚染を防ぐために管を密封することができる。回収デバイス（スワブ、ブラシ等）は、それをサンプル管内に入れた後に動かすことのできる機構を更に含有し得る。一態様では、回収デバイスは、磁石を用いて動かすことのできるインサートを含有する。一態様では、このインサートは金属を含む。別の態様では、このインサートは磁性材料を含む。磁性材料は常磁性、強磁性及び反磁性の材料を含む。回収デバイスをサンプル管内に入れた後に動かすことの利点の一つは、回収デバイスが任意のサンプル抽出デバイス又はサンプル検出デバイスに接触するのを回避することである。サンプル抽出デバイスの例としては、ピペット、自動分注器及びピペットチップが挙げられる。サンプル検出デバイスの例としては、プローブ及びプローブチップが挙げられる。

10

【0048】

サンプル管

任意のタイプのサンプル管を使用することができる。汚染を最小限に抑えるためにサンプル管を閉鎖又は密封してもよい。クロージャは永久的なものであっても、又は取り外し可能なものであってもよい。取り外し可能なクロージャの例としては、スナップキャップ、スクリュューキャップ、ゴム隔膜、ホイル及びフィルムが挙げられる。クロージャは、穴を開けた場合に再封鎖可能な1つ又は複数の開口又は穿孔を含有し得る。かかる開口又は穿孔を含有するクロージャの利点の一つは、例えばサンプル抽出デバイス又はサンプル検出デバイスによって穴を開けた場合に、クロージャが無効にならないことである。サンプル抽出デバイス又はサンプル検出デバイスを取り外すと、クロージャは再封鎖され、それにより汚染が最小限に抑えられる。

20

【0049】

生物学的サンプルの貯蔵

サンプルをサンプル管内に入れた後、基質とともに、若しくは保存媒体中で、又はその両方で乾燥させることによって、サンプルを貯蔵することができる。乾燥保存（Desiccation）は加圧乾燥又は化学物質を用いた乾燥によって達成される。これによって水分の大部分が除去され、長期安定性に好適となる。代替的に、サンプルの安定性を確保するために、サンプルをトレハロース等の基質とともに凍結乾燥（フリーズドライ）してもよい。

30

【0050】

別の可能性は、サンプルを当業者に既知であり、明らかな保存媒体に懸濁することによって貯蔵し得ることである。保存媒体の目的は、分解し得る生物学的成分を保護することである。例えば、サンプル細胞、プローブ混合物、捕捉工程に使用される抗体：ビーズ複合体、及び検出工程に使用される二次抗体は全て分解を起こしやすい。回収の初期段階の保存媒体は、サンプルの安定性及び完全性をもたらすことが理想とされ、核酸を捕捉及び検出するプロセスの下流の工程に影響を及ぼし得る。

【0051】

回収媒体

一態様では、サンプルを回収媒体に回収及び貯蔵することができる。回収媒体は、保存媒体と同様に核酸を保存すること、及び分析前の核酸の分解を防止するためにヌクレアーゼを阻害することを含む幾つかの機能を有する。一態様では、回収媒体は少なくとも1つの洗剤を含有する。別の態様では、回収媒体は少なくとも2つの洗剤、少なくとも3つの洗剤又は少なくとも4つの洗剤を含有する。一態様では、洗剤は各々異なる。別の態様では、洗剤ベースの回収媒体は、バックグラウンドシグナルを制御することが可能な或る洗剤と、磁性ビーズの挙動、例えば粘性サンプル中での移動、回収（すなわち磁性ビーズがサンプルウェルの底部にどの程度集合するか）、及び保持（すなわちサンプルを含有する容器から上清を除去する際に、磁性ビーズがどの程度適所に留まるか）を改善する別の洗剤の2つの異なる洗剤を含む。

40

【0052】

50

一態様では、アッセイのハイブリダイゼーション工程、捕捉工程及び検出工程中に熱を用いる。洗剤及び加熱を用いても、アッセイに使用される抗体は機能的であり続ける。

【0053】

洗剤ベースの回収媒体は、1つ、2つ、3つ若しくは4つ、又はそれ以上の洗剤を含んでも、それから本質的になっていても、又はそれからなってもよい。洗剤は当該技術分野で既知であり、臭化セチルピリジニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム（総じてセトリモニウム化合物として知られる）、及び塩化アルキルベンジルジメチルアンモニウム（総じてベンザルコニウム化合物として知られる）、及びアルキルトリメチルアンモニウム塩等であるが、これらに限定されない陽イオン性洗剤、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）及びサルコシル等であるが、これらに限定されない陰イオン性洗剤、並びにNP-40等の非変性洗剤、並びに他の洗剤を挙げることができるが、これらに限定されない。NP-40は、ノニルフェノキシルポリエトキシルエタノールであるTergitolタイプのNP-40としても知られる。NP-40は核膜を破壊するほど強力ではないが、細胞膜を破壊することができる。そのため、NP-40を使用して、細胞培養物の細胞質内容物を得ることができる。

10

【0054】

他の洗剤及び洗剤の組合せを使用してもよく、その組合せによって、バックグラウンドノイズを制御する能力、及び磁性ビーズの挙動を改善する能力（用いられる固体支持体が磁性ビーズを含む場合）がもたらされる。或る特定の態様では、一方の洗剤が陰イオン性洗剤であり、第2の洗剤が非陰イオン性洗剤である。例えば一態様では、非イオン性洗剤と陰イオン性洗剤との組合せは、低バックグラウンドノイズを維持するのに役立つ。一態様では、洗剤ベースの回収媒体は、バックグラウンドノイズを制御するデオキシコール酸ナトリウム等の陰イオン性洗剤と、磁性ビーズの挙動を改善し得るNP-40とを含む。

20

【0055】

これら2つのタイプの洗剤の組合せは、2つの洗剤を合わせた単純な組合せに比べて、バックグラウンドノイズの制御、より良好なビーズの挙動、及びアッセイ速度の増加という相乗的な利益をもたらす。（洗剤ベースの回収媒体中の）これらの洗剤の存在は、より迅速なアッセイ結果を達成する能力をもたらすが、下流の分析工程中に核酸又は捕捉抗体に悪影響を及ぼさない。

【0056】

加えて、洗剤ベースの回収媒体は、サンプルがより容易に溶解するために、回収デバイスからの検体の取り出しを改善する。加えて、洗剤ベースの回収媒体は、PRESERVACYT（40%メタノール溶液を用いる）、STM（カオトロピック剤を用いる）及びアルコール等であるが、これらに限定されない他の回収媒体と比較して、サンプルの均一性を改善する。洗剤ベースの回収媒体はまた、（手動又は自動での）混合後のサンプルの粘度を低下させる。

30

【0057】

回収媒体中のNP-40の濃度は、約0.5%～約2.0%、約0.1%～約1.0%の範囲、及び列挙した範囲内の任意の濃度であり得る。或る特定の態様では、NP-40は約0.8%～約1.5%、約0.9%～約1.2%の濃度で存在し、或る特定の態様では約1.0%である。別の態様では、NP-40は約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%、約1.1%、約1.2%、約1.3%、約1.4%、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%又は約2.0%の濃度で存在する。回収媒体中のデオキシコール酸ナトリウムの濃度は、約0.10%～約0.40%、約0.20%～約0.30%の範囲、及び列挙した範囲内の任意の濃度であり得る。一態様では、デオキシコール酸ナトリウムの濃度は、約0.10%、約0.15%、約0.20%、約0.25%、約0.30%、約0.35%又は約0.40%である。

40

【0058】

洗剤ベースの回収媒体はバッファ、2つの洗剤、キレート剤及び防腐剤を含むか、それ

50

らから本質的になるか、又はそれらからなってもよい。バッファは、約25mM～約75mM、約30mM～約60mM、約40mM～約50mM、及び約45mM～約55mM、並びに列挙した範囲内の任意の濃度のTris-HClであり得る。バッファはまた、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約65mM、約70mM又は約75mMの濃度のTris-HClであり得る。

【0059】

任意の防腐剤を使用することができ、その選択は所望の機能性、副作用の最小化、コスト等の因子に依存し得る。好適な防腐剤としては、ゲンタマイシン (gentamicin)、Procain、dimerisol及びアジ化ナトリウムが挙げられる。回収媒体中の防腐剤の濃度は、防腐剤のタイプ、その効力、その副作用等の因子に依存する。例えば、アジ化ナトリウムについては、アジ化ナトリウムの濃度は、約0.01%～約0.1%、約0.025%～約0.075%、及び約0.04%～約0.06%の範囲、並びに列挙した範囲内の任意の濃度であり得る。防腐剤、例えばアジ化ナトリウムは、約0.01%、約0.02%、約0.03%、約0.04%、0.05%、約0.06%、約0.07%、約0.08%、約0.09%又は約0.10%存在していてもよい。

【0060】

一態様では、洗剤ベースの回収媒体は、1.0%のNP-40、0.25%のデオキシコール酸ナトリウム、50mMのTris-HCl、25mMのEDTA、150mMのNaCl及び0.09%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。別の態様では、洗剤ベースの回収媒体は、約0.5%～約2.0%のNP-40、約0.10%～約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、約25mM～約75mMのTris-HCl、約10mM～約50mMのEDTA、約50mM～約200mMのNaCl、及び約0.01%～約0.10%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。他の態様では、洗剤ベースの回収媒体は、約0.8%～約1.5%のNP-40、約0.20%～約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、約30mM～約60mMのTris-HCl、約20mM～約40mMのEDTA、約100mM～約200mMのNaCl、及び約0.025%～約0.075%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。また別の態様では、洗剤ベースの回収媒体は、約0.9%～約1.2%のNP-40、約0.20%～約0.30%のデオキシコール酸ナトリウム、約30mM～約60mMのTris-HCl、約20mM～約30mMのEDTA、約100mM～約150mMのNaCl、及び約0.04%～約0.06%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。

【0061】

一態様では、回収媒体はNP-40及びEDTAを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。別の態様では、回収媒体はNP-40、EDTA及びアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。一態様では、回収媒体はデオキシコール酸ナトリウム、EDTA及びアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。一態様では、回収媒体はNP-40、デオキシコール酸ナトリウム、EDTA及びアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。一態様では、回収媒体はNP-40、デオキシコール酸ナトリウム、Tris-HCl、EDTA及びアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。

【0062】

別の態様では、回収媒体は、0.5%～約2.0%のNP-40及び10mM～約50mMのEDTAを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。別の態様では、回収媒体は、0.5%～約2.0%のNP-40、10mM～約50mMのEDTA、及び約0.01%～約0.10%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。一態様では、回収媒体は、約0.10%～約0.40%のデ

オキシコール酸ナトリウム、10 mM～約50 mMのEDTA、及び約0.01%～約0.10%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。一態様では、回収媒体は、約0.5%～約2.0%のNP-40、約0.10%～約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、10 mM～約50 mMのEDTA、及び約0.01%～約0.10%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。一態様では、回収媒体は、約0.5%～約2.0%のNP-40、約0.10%～約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、約25 mM～約75 mMのTris-HCl、約10 mM～約50 mMのEDTA、及び約0.01%～約0.10%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。

【0063】

一態様では、回収媒体は非カオトロピック媒体である。すなわち、例えば回収媒体はカオトロピック媒体又はカオトロピック塩を含まない。限定されるわけではないが、一態様では、回収媒体は塩酸グアニジン又は尿素を含まない。非カオトロピック (non-chaotropic) 回収媒体を使用することの潜在的利点は、カオトロピック媒体又はカオトロピック塩を含む媒体に比べて、より良好なサンプルの再懸濁、より再現性のある試験、及びより均一な試験アリコートである。

【0064】

洗剤ベースの回収媒体を使用することの利点は、それによりサンプルの安定性が保存されることである。開示のように洗剤ベースの回収媒体中で貯蔵したサンプルは、少なくとも31日間安定であり、15℃～33℃の温度で保持した場合に、少なくとも21日間安定である。一態様では、サンプルは、-20℃の洗剤ベースの回収媒体中で凍結した場合に少なくとも6ヶ月間安定である。別の態様では、子宮頸部細胞サンプルは、少なくとも31日間、15℃～33℃の温度で保持した場合に少なくとも21日間、また、-20℃の洗剤ベースの回収媒体中では少なくとも6ヶ月間安定である。

【0065】

洗剤ベースの回収媒体はまた、変性剤を含有する回収媒体に比べて、厳しいハイブリダイゼーション条件及び捕捉条件下 (例えば65℃～75℃の温度) でのアッセイのパフォーマンスの改善をもたらす。

【0066】

1つ、2つ、3つ、4つ又はそれ以上の洗剤の存在によってサンプルの粘度を低減することができ、これは磁性ビーズからの液相の除去の助けとなり、サンプルの混合の助けとなる。

【0067】

一態様では、血液又は剥離子宮頸部細胞検体等のサンプルを、洗剤ベースの回収媒体に回収し、懸濁することができる。サンプルは、DACRONチップスワブ等の化学的に不活性の回収デバイスを用いて回収することができる。ナイロン繊維スワブ等の任意の他の好適なスワブを使用してもよい。分析前の核酸の分解を防止し、サンプルの安定性を維持するために、洗剤ベースの回収媒体中にサンプルを貯蔵することができる。

【0068】

サンプルを他の既知の回収媒体に回収した後、本明細書中に記載の方法に使用することができる。他の回収媒体の例としては、PRESERVACYT、SUREPATH、DIGENE回収媒体 (「DCM」) 及びSTM (サンプル/検体輸送媒体) が挙げられる。或る特定の回収媒体は核酸に特異的である。例えば、標的核酸がRNAである場合にはDCMは使用されない。これらの媒体の一部に回収されたサンプルは、サンプル中の核酸を検出及び分析する前に処理を必要とし得る。サンプルを処理する様々な方法 (サンプルの調製としても知られる) が当該技術分野で既知である。例えば、細胞学的分析のためにPRESERVACYT等の媒体に回収した子宮頸部細胞サンプルを、洗剤ベースの溶解バッファと合わせ、続いて核酸結合表面を備える磁性ビーズを添加してもよい。加えて、他の既知の一般に入手可能な回収媒体に回収した他の細胞サンプルを、洗剤ベースの溶解バッファと合わせ、続いて核酸結合表面を備える磁性ビーズを添加してもよい。

10

20

30

40

50

【0069】

別の態様では、溶解バッファは、150mMのTris-HCl (pH8.0)、0.09% (w/v) のアジ化ナトリウム、6% (v/v) のTriton x-100、300mMのジエタノールアミン (w/v) を、9.3～約9.5の最終pHで含む。また別の態様では、溶解バッファは、約100mM～約200mMのTris-HCl (pH約7.5～約8.5)、約0.05% (w/v) ～約0.10% (w/v) のアジ化ナトリウム、約2.5% (v/v) ～約7.5% (v/v) のTriton x-100、及び約200mM～約400mMのジエタノールアミン (w/v) を、9.0～約10.0の最終pHで含む。

【0070】

10

前処理

一態様では、アッセイはサンプルの前処理調製工程を含まない。別の態様では、洗剤ベースの回収媒体を使用する場合、アッセイはサンプルの前処理調製を含まない。例えば、洗剤ベースの回収媒体が約0.5%～約2.0%のNP-40、約0.10%～約0.40%のデオキシコール酸ナトリウム、約25mM～約75mMのTris-HCl、約10mM～約50mMのEDTA、約50mM～約200mMのNaCl、及び約0.01%～約0.10%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる場合、サンプルの前処理調製は必要とされない。これらの成分の任意の組合せも企図される。

【0071】

20

別の態様では、PRESERVACYT又はSUREPATHを回収媒体として使用する場合、アッセイはサンプルの前処理調製工程を含み得る。前処理は手作業で行なっても、又は自動化されていてもよい。

【0072】

自動化前処理機械の一例は、液状化検体細胞診 (LBC) サンプルを含む生物学的サンプルを処理して、抽出されたサンプルの核酸を含有する標準的な96ウェルプレートとするのに適合させた事前分析システム (PAS) 機器である。PASにおいては、抽出管ユニット (ETU) と呼ばれる一連の (a strip of) 8本の試験管内で処理する。各々のETUは96ウェルプレートの列に対応する。一態様では、システムのスループットは、最初のETUの完了まで約35分かかり、後続のETUが約2分間隔で完了するようなものである。

30

【0073】

スループット要件を満たすために、機器はETUを並行して処理するものであってもよい。各々のETUは、処理が完了する前に10個の工程を経る。これらの工程は、同様の工程毎にまとめられ、ステーション記号で識別される6個の処理モジュールが作られる。ETUは、6軸ロボットによって6個のステーション間を約2分間隔で行き来する。インキュベーション時間のために、一部の工程では、ETUが約2分よりも長くステーションに留まることが必要とされる。この場合、先入先出プロセスに対応するために、更なる位置がステーションに設けられる。

【0074】

40

PASは、1) ETU輸送機構、2) ETU及びETUグリッパー、3) 常磁性ビーズを引き付ける磁気ステーション、並びに4) 濃縮された核酸をETUからプレートへ移動させる分注器ステーション等の幾つかの部品を備えていてもよい。PASにおいては、標的核酸分子の存在を決定する方法を行うように設計された機器内での続く分析のために、液状化検体細胞診サンプルから抽出されたDNAの最大10個の96ウェルプレートを、5時間足らずで作成することができる。PASは、必要とされるサンプルの容量 (4mL)、自動化の制限、及び手動のサンプル変換プロトコルの低いスループットを含む、液状化検体細胞診試験サンプルからDNAを抽出することの現在の課題の一部に対処するように設計されている。

【0075】

50

標的核酸分子

標的核酸分子としては、生物学的サンプル及び環境サンプルを含む検体又は培養物（例えば細胞培養物、微生物培養物及びウイルス培養物）中に見られる核酸分子が挙げられるが、これに限定されない。標的核酸分子は、ヒトを含む動物に由来する生物学的サンプル、流体、固体（例えば糞便）又は組織、並びに乳製品、野菜、食肉及び食肉副産物等の液体又は固体の食品及び飼料の製品及び原料、並びに廃棄物中に見られるものであり得る。標的核酸分子は環境サンプル中に見られるものであってもよく、環境サンプルには、表層物質、土壌、水及び産業サンプル等の環境物質、並びに食品及び乳製品の加工用の機器、装置、設備、器具、使い捨て及び使い捨てではない製品から得られるサンプルが挙げられる。

10

【0076】

生物学的サンプル中に見られる標的核酸分子としては、子宮頸部サンプル（例えば、子宮頸部スワブから得られるサンプル）又は子宮頸部細胞サンプル、アデノイド細胞、肛門上皮細胞、血液、唾液、脳脊髄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、喀痰、尿及び精液中に見られるものが挙げられるが、これに限定されない。標的核酸分子は、他のウイルス（virus）、細菌、抗酸菌又は変形体、例えばサイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス、HIVウイルス、H1N1ウイルス、クラミジア、淋菌（gonorrhea）、トリコモナス・バギナリス（*Trichomonas vaginalis*）、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、結核菌、SARS関連コロナウイルス又はインフルエンザウイルスに由来するものであってもよい。一態様では、標的核酸分子は、子宮頸部サンプル（例えば、子宮頸部スワブから得られるサンプル）又は子宮頸部細胞サンプル、アデノイド細胞、肛門上皮細胞、血液、唾液、脳脊髄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、喀痰、尿及び精液、他のウイルス、細菌、抗酸菌又は変形体、例えばサイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス、HIVウイルス、H1N1ウイルス、クラミジア、淋菌、ナイセリア・ゴノレア（*Neisseria gonorrhoeae*）（GC）、クラミジア・トラコマチス（*Chlamydia trachomatis*）（CT）、トリコモナス・バギナリス、スタフィロコッカス・アウレウス、結核菌、SARS関連コロナウイルス又はインフルエンザウイルスのいずれか1つに関連する核酸分子に75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%同一である。

20

【0077】

一態様では、標的核酸分子はヒトパピローマウイルス（HPV）に由来し、HPVの遺伝的変異体に由来するものを含む。変異体としては、多型、突然変異体、誘導体、標的核酸の修飾形態、変形形態等が挙げられる。一態様では、標的核酸はHPV核酸である。別の態様では、HPV核酸は、高リスクHPV型のHPV DNAである。別の態様では、HPV核酸は高リスクHPV型のHPV RNAである。別の態様では、標的核酸は、高リスクHPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型のいずれか1つ、又は低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型のいずれか1つに由来するものである。

30

40

【0078】

別の態様では、標的核酸分子は、HPV、HPVの遺伝的変異体、高リスクHPV型のHPV DNA、又は高リスクHPV型のHPV RNAのいずれか1つに関連する核酸分子と75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%同一（identical）である。別の態様では、標的核酸は、高リスクHPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型のいずれか1つ、又は低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、7

50

2 型、7 4 型、8 1 型、8 3 型、8 4 型及び 8 9 型のいずれか 1 つに関連する核酸分子と 7 5 % 以上、8 0 % 以上、8 5 % 以上、9 0 % 以上、9 5 % 以上、9 8 % 以上又は 1 0 0 % 同一である。

【0079】

先に述べたように、標的核酸分子は DNA 又は RNA であり得る。標的核酸分子が DNA である場合、プローブは好ましくは RNA であり、標的核酸が RNA である場合、プローブは好ましくは DNA である。しかしながら、DNA プローブを DNA 標的核酸分子とともに使用することができ、RNA プローブを RNA 標的核酸分子とともに使用することができる。同様に前述したように、標的核酸分子によって、使用される回収媒体を決定することができる。

10

【0080】

変性

上記のようにサンプルを洗剤ベースの回収媒体に回収した後、サンプルを変性試薬で処理して、標的核酸分子をハイブリダイゼーションに利用しやすいものにしてもよい。一態様では、サンプルをアルカリ性溶液で変性させる。溶液の pH を約 pH 12、約 pH 13 又は約 pH 14 にすることができる任意のアルカリを使用することができる。さらに、溶液の pH を約 pH 12 ~ 約 pH 13、約 pH 12 ~ 約 pH 14、及び約 pH 13 ~ 約 pH 14 の範囲にすることができる任意のアルカリを使用することができる。アルカリの好適な濃度としては、約 1.0 N ~ 約 2.0 N、約 1.25 N ~ 約 1.75 N、及び約 1.25 N ~ 約 1.5 N、及び約 1.5 N、並びに列挙した範囲内の任意の濃度が挙げられる。限定されるわけではないが、好適なアルカリとしては NaOH 及び KOH が挙げられる。

20

【0081】

一例では、洗剤ベースの回収媒体に懸濁したサンプルを、約半分の容量の 1.75 N NaOH 溶液で処理することができる。例えば、或る特定の態様では、およそ 50 µl アリコート、洗剤ベースの回収媒体に懸濁したサンプルから取り出し、およそ 25 µl の 1.75 N NaOH 溶液を、この 50 µl のアリコートサンプルに添加する。変性試薬で処理したサンプルを、手作業での混合、又は約 800 rpm、約 900 rpm、約 1000 rpm、約 600 rpm ~ 約 1000 rpm、若しくは約 600 rpm ~ 1200 rpm での機械的振盪によって混合することができる。一態様では、変性試薬の添加後のサンプルの pH は約 14 であり得る。別の態様では、pH は約 pH 12 又は pH 13 であり得る。かかる塩基性 pH は、検体中の核酸の大部分に切れ目を入れ、変性させる。加えて、アルカリ処理は、ペプチドと核酸との間の相互作用を妨げ、標的核酸の利用可能性を改善し、タンパク質を分解することができる。

30

【0082】

タンパク質のアルカリ処理により、検体が効率的にホモジナイズされ、所与のサンプルの分析結果の再現性が確保される。このアルカリ処理は、サンプルの粘度を低減し、動態を増大させ、サンプルをホモジナイズし、サンプルにおける任意の内因性の一本鎖 RNA 核酸、DNA-RNA ハイブリッド又は RNA-RNA ハイブリッドを破壊することによりバックグラウンドを低減させることもできる。またこのアルカリ処理は、サンプルに存在し得る RNアーゼ及び DNアーゼ等の酵素を不活性化するのを助ける。当業者は、RNA が標的核酸である場合（DNA ではない (as opposed to)）、フェノール抽出及び TCA/アセトン沈殿、並びにチオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム抽出用の試薬を含むが、これらに限定されない異なる試薬が好まれ得ることを理解するであろう。

40

【0083】

加熱工程を利用する、例えばサンプルを約 95 °C に加熱して、核酸の鎖を分離するといったような他の変性方法を用いることができる。ヘリカーゼ等の酵素を使用することもできる。油はシリコン油であり得る。一実施形態では、油又は油系物質を加熱前にサンプルに添加する。油は約 0.5 Cst ~ 約 20 Cst、約 1.0 Cst ~ 約 10 Cst、又は約 2.0 Cst ~ 約 5 Cst の粘度を有し得る。一態様では、容量は約 5 Cst である

50

。一態様では、約10 μ l～約45 μ lの上記のシリコン油を、1 mL以上の回収媒体に添加し、自動化プラットフォーム上で評価する。油を添加することの利点の一つは、サンプルがより均等に加熱されることである。

【0084】

一態様では、1.5 N～2.0 NのNaOHをサンプルに添加し、加熱する。別の態様では、1.75 NのNaOHをサンプルに添加し、加熱する。変性試薬を含むサンプルは、約60℃～約80℃に約30分間、約65℃～約75℃に約30分間、約67℃～約70℃に約30分間、若しくは約70℃に約30分間、又は列挙した範囲内の任意の温度に加熱することができる。別の態様では、変性試薬を含むサンプルを、約60℃～約80℃に約20分間～約40分間、若しくは約65℃～約75℃に約20分間～約40分間、約67℃～約70℃に約20分間～約40分間、若しくは約70℃に約30分間、又は列挙した範囲内の任意の温度に加熱することができる。記載の時間条件及び温度条件の目的は、残りのハイブリダイゼーション、捕捉、洗浄及び検出の工程を行うのに好適な条件に標的核酸を置いたまま、最低限の時間で最大限のサンプルの変性をもたらすことである。したがって、サンプルを変性試薬中、約5分間～約120分間、約10分間～約60分間、約20分間～約40分間、約30分間、又は列挙した範囲内の任意の時間で加熱することができる。当業者であれば、より低い温度でより長いインキュベーション期間、又はより高い温度でより短いインキュベーション期間によって均衡をとって、本明細書中に記載の条件に同様の効果をもたらすことができることを容易に理解するであろう。

【0085】

ハイブリダイゼーション及びプローブの結合

核酸を含有するサンプルを変性させた後、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブと、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブがサンプル中の標的核酸とハイブリダイズして、二本鎖核酸ハイブリッドを形成するのに十分な条件下で接触させる。プローブは完全長DNA、切断DNA若しくは合成DNA、又は完全長RNA、切断RNA若しくは合成RNAであり得る。標的核酸がDNAであれば、プローブはRNAとすることができ、標的核酸がRNAであれば、プローブはDNAとすることができる。好ましくは、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを、（塩基性変性試薬を中和する）中和ハイブリダイゼーションバッファとしても働くことができる（塩基性変性試薬を中和する）プローブ希釈剤で希釈する。

【0086】

DNAプローブ又はRNAプローブに使用されるプローブ希釈剤は、RNAの安定性に対してDNAで必要される要件が異なることから、異なり得る。例えば、プローブがRNAである場合、NaOHがRNAを破壊する可能性があるため、サンプルを初めに中和し、次いでプローブを添加するのが好ましく、又は代替的にはRNAプローブ及び中和剤（プローブ希釈剤）をサンプルに同時に添加することができる。プローブ希釈剤は、プローブを溶解及び希釈するために使用することができ、ハイブリダイゼーションにより好都合な環境をもたらすために、サンプルをおよそ中性のpH、例えば約pH6～約pH9に戻すのにも役立つ。十分な容量のプローブ希釈剤、好ましくは2分の1容量のサンプルを用いて、塩基処理サンプルを中和することができる。

【0087】

一態様では、プローブ希釈剤はバッファ、ポリアクリル酸、NaOH及びアジ化ナトリウムを含む。プローブ希釈剤は酢酸を含んでもよい。一態様では、プローブ希釈剤は、2.2 MのBES（N，N-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸）、2.6 %のポリアクリル酸（PAA）、0.7 NのNaOH及び0.09 %のアジ化ナトリウムを含む。プローブ希釈剤は、約1.2 M～約2.6 MのBES、約1.5 M～約2.5 MのBES、約1.75 M～約2.25 MのBES、約2 M～2.4 MのBES、又は約2.2 MのBES、及び列挙した範囲内の任意の濃度のBESを含有し得る。一態様では、プローブ希釈剤は、約2 %～約3.0 %のPAA、及び列挙した範囲内の任意の濃度のPAAを含有し得る。別の態様では、PAA濃度は約2.2 %～約2.7 %

である。また別の態様では、PAA濃度は約2.6%である。更なる態様では、プローブ希釈剤は、約0.6N~約0.8NのNaOH、例えば約0.7NのNaOHを含有し得る。NaOHの濃度は一般に、BESの量が増大するにつれて増大する。

【0088】

プローブ希釈剤は、自動分注法によるその正確な分配を可能とする粘度を有する。言い換えると、プローブ希釈剤の粘度は、所望の容量が正確かつ自動的に分注されるように調整する。粘度が低過ぎると、プローブ希釈剤は安定な液滴を形成することができない。一方、粘度が高過ぎると、プローブ希釈剤の液滴は大きくなり過ぎる。かかる液滴がサンプル管に入ると、（例えば、サンプル管の壁への液飛びによって）サンプル管内に既に存在する内容物の顕著な攪乱を引き起こし得る。

10

【0089】

完全長プローブでは、加熱したアルカリ溶液をサンプルに添加し、次いでプローブ希釈剤を室温でサンプルに添加した後、サンプルを再加熱するものとする。かかるプロセスは二次構造が形成されるのを抑えることができる。抗体は二次構造を有する構造体と不可逆的に結合する傾向がある。切断プローブ又は合成プローブ等の不完全長プローブを使用する場合、二次構造の問題が存在しないため、溶液又はサンプルの加熱の必要はないとされる。一態様では、切断プローブ又は合成プローブとともに使用する場合、サンプルは加熱しない。

【0090】

変性試薬による処理の後、一定量の中和バッファ、一態様では1つ又は複数のプローブが溶解した記載のプローブ希釈剤を、プローブと少なくとも1つの標的核酸とのハイブリダイゼーション又は結合が起こるのに適切な条件下でサンプルに添加することができる。中和バッファは単一緩衝塩を含有し得る。一態様では、中和バッファは単一緩衝塩以外含有しない。ハイブリダイゼーション条件は、サンプルにおいて1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを、存在する場合に対応する相補的な核酸配列とアニーリングして、二本鎖核酸ハイブリッドを形成するのに十分なものである。

20

【0091】

本明細書に記載される特定のプローブ及び希釈剤に好適なハイブリダイゼーション条件が利用される。例えば、プローブ及びサンプル核酸を、ハイブリダイゼーション時間、好ましくは少なくとも約5分間~約30分間、約5分間~約20分間、又は約7分間~約15分間、又は約10分間、及び1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブに対応する相補的な核酸配列とアニーリングするのに十分な上述の範囲内のいずれかの時間（number）、インキュベートすることができる。ハイブリダイゼーション条件には、少なくとも約65℃、約68.5℃及び約67℃~約70℃、並びに上述の範囲内のいずれかの温度（number）のハイブリダイゼーション温度が含まれ得る。所与の標的核酸及び所与のプローブでは、当業者は、日常的な実験により所望のハイブリダイゼーション条件を容易に決定することができる。当業者は更に、ハイブリダイゼーションの時間と温度とを互いに最適化させなければならないことを理解するであろう。このため、より高いハイブリダイゼーション温度であれば、より短期間でハイブリダイゼーションを行うことができ、その逆もまた同様である。限定するものではないが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、温度の増大、0.5M超へのイオン条件の増大（例えばNaCl）、又はPAAの濃度の低減により制御することができる。非限定的な例として、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、高温、例えば少なくとも約65℃、少なくとも約68.5℃、約67℃~約70℃、及び約69℃~約70℃の高温でハイブリダイゼーション反応を行うことが含まれ得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、高温、例えば少なくとも約65℃、少なくとも約68.5℃、約67℃~約70℃の高温も含まれ得る。

30

40

【0092】

非限定的な態様では、プローブは、HPV、HPVの遺伝的変異体、高リスクHPV型のHPV DNA、又は高リスクHPV型のHPV RNA、又は高リスクHPV16型

50

、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型のいずれか1つ、又は低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型のいずれか1つに関連する核酸分子と75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%同一な核酸分子とハイブリダイズ又は結合することが可能である。別の態様では、プローブは、HPV、HPVの遺伝的変異体、高リスクHPV型のHPV DNA、高リスクHPV型のHPV RNA、又は高リスクHPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型のいずれか1つ、又は低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型のいずれか1つと相補的である。別の態様では、プローブは、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、若しくは配列番号95、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、若しくは配列番号103、若しくは配列番号117、又はそれらの相補体と75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%同一な戦略的に切断されたプローブである。

【0093】

一態様では、サンプルを洗剤ベースの回収媒体に懸濁し、標的核酸を、変性試薬を用いて変性させ、中和バッファに懸濁した核酸プローブとハイブリダイズする。別の態様では、中和バッファは本発明のプローブ希釈剤である。プローブ希釈剤は、2.2M BES (N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸)、2.6%ポリアクリル酸、0.7N NaOH及び0.09%アジ化ナトリウムを含む。

【0094】

捕捉

プローブを標的核酸分子とハイブリダイズさせ、二本鎖核酸ハイブリッドを形成した後、二本鎖核酸ハイブリッドに特異的な分子によってハイブリッドを捕捉させる。二本鎖核酸ハイブリッドに特異的な分子としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、タンパク質(RNアーゼ(RNase)H等であるが、これに限定されない)、核酸(アプタマーを含むが、これに限定されない)、又は配列特異的な核酸が挙げられるが、これらに限定されない。アプタマーは、標的とハイブリダイズし、ハイブリダイズしたアプタマーを増幅して、この選抜プロセスを繰り返すことにより、配列のライブラリーから連続的に選択したランダム配列の短いストレッチである。一態様では、二本鎖核酸ハイブリッドに特異的な分子は、抗ハイブリッド抗体として知られる抗体により捕捉される。

【0095】

一態様では、第1の抗ハイブリッド抗体を、当該技術分野で標準的な技法を用いて支持体に固定する。好適な支持体への結合の例としては、共有結合若しくは吸着、例えばタンパク質間相互作用、プロテインGビーズ、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用、カルボキシル基若しくはトシル基等へのEDACの結合、又はアフィニティークラム内での例えば配列特異的な核酸を用いた固体支持体への直接のハイブリダイゼーションが挙げられる。

【0096】

支持体としては、ビーズ、磁性ビーズ(先に示されるように常磁性ビーズ、反磁性ビーズ、強磁性ビーズ、強磁性ビーズ、反磁性ビーズを含む)、カラム、プレート、ろ紙、ポリジメチルシロキサン(PDMS)及びディップスティックが挙げられるが、これらに限定されない。液相の抽出が可能であり、結合抗体と結合していない抗体とを分離する能力があれば、あらゆる支持体を使用することができる。ビーズを固定するのに、磁場を印加

する場合、磁性ビーズが、溶液中に残り、液相を抽出又はデカンテーションすることができるという点で特に有用である。小さく、高い表面積を有するビーズ、例えば直径が約1 μm のビーズが好ましい。電荷の切り替え又はシリカ捕捉を利用する（磁場を印加しない）他のビーズを使用することもできる。

【0097】

固定された抗ハイブリッド抗体が二本鎖核酸ハイブリッドを捕捉するのに十分な時間、ハイブリッドを支持体に付着した抗ハイブリッド抗体とインキュベートする。一態様では、支持体はビーズである。

【0098】

抗ハイブリッド抗体はモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり得る。一態様では、抗体はモノクローナル抗体である。一態様では、抗体は、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド（EDAC）リンカーにより支持体に結び付く。一態様では、支持体はポリスチレンビーズである。一態様では、抗体と結び付いた支持体又はビーズをビーズ希釈バッファで希釈する。ビーズ希釈バッファは、ビーズ上のタンパク質変性を最小限に抑えるのに有用である。ビーズ希釈バッファの一例は、6%カゼイン、100mM Tris-HCl、300mM NaCl及び0.05%アジ化ナトリウムを含む。

【0099】

一態様では、抗ハイブリッド抗体でコーティングされたビーズを、約67°C〜約70°Cで約30分間、サンプルとインキュベートする。別の態様では、ビーズ及びサンプルを約68°C〜約69°Cで約30分間、インキュベートする。更に別の態様では、ビーズ及びサンプルを約68.5°Cで30分間インキュベートする。インキュベーション時間は、約5分間〜約60分間、約15分間〜約45分間、約20分間〜約40分間、又は上述の範囲内のいずれかの時間の範囲とすることができ、一般的に温度とは反比例関係である。インキュベーション時間、温度及び／又は振盪条件を、所望のように代替的な捕捉動態を達成するように変更することができることが、当業者により理解されるであろう。

【0100】

上記のような標的核酸／プローブハイブリッドの捕捉の後に、捕捉されていない核酸を洗い流すことにより、残りのサンプルから捕捉されたハイブリッドを分離することができる。

【0101】

コンジュゲーション

方法の別の工程は、同様に二本鎖核酸ハイブリッドに特異的な、又は代替的には第1の抗体に特異的な第2の抗体を調製することを含み得る。第2の抗体は直接的又は間接的に検出可能に標識することができ、モノクローナル抗体であっても、又はポリクローナル抗体であってもよい。一態様では、第2の抗体はモノクローナル抗体である。別の態様では、第2の抗体は検出可能なマーカーで直接標識され、モノクローナル抗体である。第2の抗体は、二本鎖核酸ハイブリッドの存在を検出するために使用される。一態様では、第2の抗体は、基質と反応して、検出することのできるシグナルを生じる必要のある標識を有する。第2の抗体は好適なバッファに溶解することができる。一態様では、バッファは100mMのTris-HCl（pH7.4）、0.5MのNaCl、0.1mMのZnCl₂、1.0mMのMgCl₂、0.25%のTween 20、0.2mg/mlのRNアーゼA、4%のヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン（シクロデキストリン）、先に論考した30%のビーズ希釈バッファ、0.05%のヤギIgG、0.09%のアジ化ナトリウムを含む。一態様では、コンジュゲーション反応は室温で行われる。別の態様では、コンジュゲーション反応は約37°C、約45°C又は約50°Cで行われる。一態様では、コンジュゲーション反応は約37°C、約45°C又は約50°C、35°C〜約40°C、40°C〜約50°Cで約20分間〜40分間行われる。一態様では、コンジュゲーション反応は約37°C、約45°C又は約50°Cで約20分間〜40分間行われる。別の態様では、コンジュゲーション反応は約45°Cで約30分間行われる。

【0102】

当業者であれば、例えば酵素、放射性分子、蛍光分子、又は金粒子等の金属粒子であるが、これらに限定されない任意の検出可能な標識を使用することができることを理解するであろう。或る特定の態様では、検出可能な標識はアルカリホスファターゼである。標識を抗体にコンジュゲートする方法は既知である。例えば、抗体をジチオスレイトール（DTT）で還元して、一価抗体断片を得ることができる。次いで、Ishikawa et al., J. Immunoassay 4:209-237 (1983)及びMeans et al., Chem. 1: 2-12 (1990)の方法（その各々の内容全体が参照により本明細書中に援用される）によって、還元抗体をマレイン化アルカリホスファターゼに直接コンジュゲートすることができ、得られるコンジュゲートをHPLCによって精製することができる。任意のタイプのサイズ排除クロマトグラフィーを用いてコンジュゲートを精製してもよい。精製の利益の一つは、或るタンパク質と或る抗体とのコンジュゲートを、他のタンパク質対抗体比を有するこれらのコンジュゲートから分離することができることである。

10

【0103】

別の態様では、二本鎖核酸ハイブリッドは、直接標識されない第2の抗ハイブリッド抗体を用いて検出することができる。例えば、第2の抗体は、標識したヤギ抗マウス抗体によって検出されるマウス免疫グロブリンであり得る。

【0104】

洗浄

第2の抗体とのコンジュゲーション後、サンプルを塩基性の（based）洗浄バッファで洗浄する。洗浄バッファは1つ若しくは複数の洗剤を含有していても、又は洗剤を含まなくてもよい。洗浄バッファが洗剤を含有する場合、洗剤はイオン性洗剤であっても、又は非イオン性洗剤であってもよい。非イオン性洗剤の一例はTriton-Xである。洗剤は洗浄バッファ中に、約0.05%～約1.5%、若しくは約0.075%～約1.0%、若しくは約0.1%～約0.75%、若しくは約0.5%、又は列挙した範囲内の任意の濃度で存在し得る。好適な洗浄バッファの一例は、40mMのTris（pH8.2）、100mMのNaCl、0.5%のTriton-X100及び0.05%のアジ化ナトリウムを含む。

20

【0105】

一態様では、洗浄バッファは、約7.5～約8.5のpHで、0.5mM～約2.0mMのTris及び0.02%～0.10%のアジ化ナトリウムを含有する。別の態様では、洗浄バッファは、約7.5～約8.5のpHで、約0.5mM～約2.0mMのTris及び0.02%～0.10%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。また別の態様では、洗浄バッファは、約1.0mMのTris及び約0.09%のアジ化ナトリウムを含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。一態様では、洗浄バッファは約7.6～約8.4のpHを有する。

30

【0106】

サンプルは、1回～10回、若しくは3回～7回、若しくは4回～6回、4回、若しくは5回、又は列挙した範囲内の任意の回数で、洗浄バッファで洗浄することができる。一態様では、サンプルを2つの異なる洗浄バッファで少なくとも4回洗浄する。別の態様では、サンプルを、或るバッファを用いて行う3回の洗浄及び異なるバッファを用いて行う別の洗浄工程によって少なくとも4回洗浄する。サンプルはまた、単一の洗浄バッファ又は複数の洗浄バッファで洗浄することができる。各々の洗浄に同じ洗浄バッファを使用しても、又は異なる洗浄バッファを使用してもよい。例えば、洗剤を含有する洗浄バッファを或る洗浄に使用し、洗剤を含まない洗浄バッファを別の洗浄に使用してもよい。一態様では、洗浄バッファのうち1つがTritonを含まない。

40

【0107】

検出

第2若しくは第3、又はそれ以上の抗体に存在する標識が検出されることにより、標的核酸分子の存在が示される。様々な標識を検出する方法が当該技術分野で既知である。例

50

えば、比色分析、放射能、表面プラズモン共鳴又は化学発光法が、例えばCoutlee et al., J. Clin. Microbiol. 27:1002-1007 (1989) (その内容全体が参照により本明細書中に援用される) によって記載されている。

【0108】

例えば、結合したアルカリホスファターゼコンジュゲートを、検出器、例えばE/LUMINA照度計 (Source Scientific Systems, Inc., Garden Grove, CA)、OPTOCOMP I Luminometer (MGM Instruments, Hamden, CT) 等、例えばTurnerBiosystems製のVeritas Microplate Luminometerを用いて、LUMI-PHOS 530試薬 (Lumigen, Detroit, MI) 又はDR2 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 等の試薬による化学発光によって検出することができる。一態様では、コンジュゲートを検出するために蛍光光度計を使用してもよい。多重検出法を順に又は並行して使用してもよい。例えば、コンジュゲートは化学発光及び蛍光によって検出することができる。別の態様では、コンジュゲートは化学発光によって検出することができる。

10

【0109】

異なるコンジュゲート検出法を用いた検出器を、サンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法を行うことが可能な機械に、例えばモジュール方式で可逆的に (reversibly) 又は不可逆的に取り付けてもよい。

【0110】

本明細書中に記載されるように、第2の抗体上の標識の検出は、サンプル中の1つ又は複数のプローブに相補的な標的核酸分子の1つ又は複数の存在を示す。洗浄の後、サンプルを、例えば第2の抗体上の標識の基質を含有する検出バッファに懸濁する。

20

【0111】

一態様では、サンプルは子宮頸部細胞を含む。子宮頸部細胞のサンプル中の標的核酸分子の存在を決定する方法は、サンプルを洗剤ベースの回収媒体に懸濁することと、手作業での混合によって混合することを含む。別の態様では、混合は機械によるものである。およそ50 µlのアリコートのサンプルを取り出し、約25 µlの変性試薬と混合する。サンプルを手作業での混合又は機械的振盪によって、約600 rpm〜約1200 rpmで約30秒間〜約60秒間混合し、約70℃で約30分間加熱する。高リスクHPV RNAプローブを希釈剤中で調製し、約375 ng/mlに希釈する。約40 µlの希釈したプローブを、70℃の加熱ブロック上のサンプルに添加する。サンプルを約1150 rpmで約30分間振盪しながら、およそ68.5℃で更にインキュベートする。上清は、ドロップパーボトル又は他のローテクデバイスによって除去することができる。約35 µlの検出試薬をサンプルに添加する。検出試薬は標識された第2の抗体を含有する。第2の抗体は二本鎖核酸ハイブリッドに特異的である。検出試薬を含有するサンプルを、約45℃で約30分間インキュベートし、約30秒間〜3分間磁気ラック上に置き、上清をデカンテーションする。別の態様では、検出試薬を含有するサンプルを室温でインキュベートする。次いで、サンプルを洗浄バッファで約4回又は5回洗浄する。

30

【0112】

抗ハイブリッド抗体

40

本発明に従って形成した二本鎖核酸ハイブリッドを捕捉させ、二本鎖核酸ハイブリッドに特異的な抗体を用いて検出することができる。抗体は、RNA-DNA、DNA-DNA、RNA-RNA及びその模倣物等であるが、これらに限定されない二本鎖ハイブリッドに特異的であり、ここで模倣物とは、RNA-DNA、DNA-DNA又はRNA-RNAのハイブリッドと同様に振る舞う分子を指す。利用される抗二本鎖核酸ハイブリッド抗体、すなわち抗ハイブリッド抗体は、形成される二本鎖核酸ハイブリッドのタイプによって異なる。一態様では、抗ハイブリッド抗体はRNA-DNAハイブリッドに免疫特異的である。

【0113】

当業者であれば、ポリクローナル又はモノクローナルの抗ハイブリッド抗体を、下記に

50

記載されるように本発明のアッセイにおいて使用し、及び／又はビーズに連結し、及び／又は支持体に固定することができることを理解するであろう。標準的な技法を用いて調製したモノクローナル抗体を、ポリクローナル抗体の代わりに使用することができる。モノクローナル抗体は、当該技術分野で標準的な方法によって作製することができる。一態様では、標的核酸の捕捉及び検出に使用される抗体はモノクローナル抗体である。一態様では、モノクローナル抗体は、捕捉工程における高ストリンジェンシーのインキュベーション温度を支持する。限定されるわけではないが、捕捉工程における高ストリンジェンシーのインキュベーション温度は、約65℃～約75℃又は約68℃～約75℃であり得る。第1及び第2の抗体は、捕捉及び検出について同じであっても（すなわち、同じハイブリッド骨髄腫細胞株によって産生される）、又は異なっており、異なるハイブリッド骨髄腫細胞株によって産生されたものであってもよい。一態様では、捕捉及び／又は検出に使用される第1及び第2のモノクローナル抗体は同じであり、RNA-DNAハイブリッドに特異的である。抗体の結合領域を含有する、二本鎖ハイブリッドに特異的な抗体の免疫断片又は誘導体も含まれる。

10

【0114】

例えば、RNA-DNAハイブリッドで免疫化した脾臓細胞と融合させた骨髄腫細胞から誘導された、モノクローナル抗RNA-DNAハイブリッド抗体を使用することができる。ハイブリッド特異的抗体は、例えばKitawaga et al., Mol. Immunology, 19:413 (1982)及び米国特許第4, 732, 847号（その各々の内容全体が参照により本明細書中に援用される）に記載されるように、固体支持体に固定したRNA-DNAハイブリッドに対するアフィニティー精製によって精製することができる。

20

【0115】

例えば組換え抗体（例えば一本鎖F_v若しくはF_ab、又はそれらの他の断片）をライブラリから選択する方法、又はヒト抗体レパートリーを産生することが可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）の免疫化に基づく方法（例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)、Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993)、並びに米国特許第5, 545, 806号及び米国特許第5, 545, 807号（その各々の内容全体が参照により本明細書中に援用される）を参照されたい）を含むヒト抗体又は人工抗体を含む抗体を作製又は単離する他の好適な方法を使用することができる。

【0116】

一態様では、検出対象の標的核酸はDNA（例えば、HPVのゲノムDNA又はcDNA）又はRNA（例えばmRNA、リボソームRNA、核RNA、トランスファーRNA、ウイルスRNA、ヘテロ核RNA）であり、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブは、それぞれポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドである。好ましい態様では、二本鎖核酸ハイブリッドは、標的DNAとプローブRNAとのハイブリダイゼーションによって形成されたDNA-RNAハイブリッドであり、RNA-DNAハイブリッドに免疫特異的な抗体を用いて検出することができる。

30

【0117】

本発明の一態様では、ハイブリドーマ細胞株から誘導されたモノクローナル抗RNA-DNAハイブリッド抗体が使用される。かかるハイブリドーマ細胞株は、米国特許第4, 865, 980号、米国特許第4, 732, 847号及び米国特許第4, 743, 535号（その各々の内容全体が参照により本明細書中に援用される）に記載されている。ハイブリッド特異的モノクローナル抗体は、当該技術分野で標準的な技法を用いて調製することができる。ハイブリッド特異的モノクローナル抗体は、標的核酸の捕捉及び検出の両方に使用することができる。

40

【0118】

任意の脊椎動物を、ポリクローナル抗RNA-DNAハイブリッド抗体の調製に用いることができるが、ヤギ又はウサギが好ましい。好ましくは、従来の注射手順に従ってハイブリッドを動物に注射することによって、ヤギ又はウサギを合成ポリ(A)-ポリ(dT)ハイブリッドで免疫化する。既知の抗体単離法に従って、免疫化した動物の種に特異的

50

な抗体を含む動物の血液からポリクローナル抗体を回収し、精製することができる。モノクローナル抗体の作製については、十分な時間経過の後、動物から脾臓を取り出し、脾細胞を適切な骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマを作製することができる。次いで、ハイブリドーマを、抗ハイブリッド抗体を分泌する能力についてスクリーニングすることができる。次いで、選択したハイブリドーマを、腹水の産生のために第2の動物の腹腔内への注射に使用してもよく、腹水を抽出し、参照により本明細書中に援用される所望のモノクローナル抗体の濃縮供給源として使用することができる。

【0119】

ポリヌクレオチドプローブ

ポリヌクレオチドプローブは、標的核酸分子とハイブリダイズ又は結合するように設計される。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは標的核酸分子に結合するように設計される。一態様では、プローブは、HPV及びHPV高リスク変異体とハイブリダイズ又は結合することが可能である。更なる態様では、ポリヌクレオチドプローブはHPV及びHPV高リスク変異体に特異的である。高リスク(HR)核酸プローブは、高リスクHPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型のプローブを含み得る。別の態様では、高リスク核酸プローブは、高リスクHPV16型、18型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型及び82型のプローブを含み得る。他の態様では、RNAプローブ又はDNAプローブは断片である。一態様では、プローブは長さ約6キロベース～約8キロベース、約7.5 10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0120】

プローブの量は、アッセイ毎に1つのHPV型当たり約7.5 ng～約60 ng、若しくはアッセイ毎に1つのHPV型当たり約20 ng～約45 ngと異なってもよく、又はアッセイ毎に各HPV型のプローブ約30 ngが使用される。このため、一態様では、HRプローブは高リスクHPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型、又は低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型の1つ又は複数のプローブからなるか、又はそれから本質的になり、各プローブ約30 ngが標的核酸分子の検出のためのアッセイ毎に使用される。

【0121】

別の態様では、核酸分子の組合せ又はセットが標的とされる。例えば、標的核酸分子のセットは高リスクHPV16型、18型及び45型を含み得る。一態様では、標的とされる核酸分子のセットは、高リスクHPV16型、18型及び45型のみを含む。さらに、標的核酸分子のセットは、高リスクHPV16型、18型及び45型とハイブリダイズするか、又はそれらに特異的なポリヌクレオチドプローブを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、本明細書中で開示される方法のいずれにも使用することができる。

【0122】

RNAプローブは、標的核酸分子のみに特異的に結合する短い合成RNAプローブであってもよい。2009年4月17日付けで出願された米国特許出願公開第12/426,076号(その内容全体が参照により本明細書中に援用される)に例が記載されている。

【0123】

或る特定の態様では、所望の標的核酸の混合物のいずれか1つを同時にスクリーニングするために、複数セットのプローブを含むプローブ混合物が使用される。例えば、生物学

的サンプルを任意のHR HPV型の存在についてスクリーニングすることが望ましい場合がある。かかる状況では、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、又は配列番号95、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、又は配列番号103、又は配列番号117、配列番号117と75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%同一なプローブセットが使用され得る。例えば、プローブ混合物を、全てのHR HPVについてプローブセットを提供するように設計することができ、1回の試験を行うことによって、サンプルが任意のHR HPV標的核酸を有するか否かを同定することができる。

【0124】

10

戦略的に切断されたプローブ

一態様では、戦略的に切断されたプローブは、高リスクHPV型とハイブリダイズする、結合することが可能であるか、又はそれに特異的である。別の態様では、戦略的に切断されたプローブは、高リスクHPV型とハイブリダイズする、結合することが可能であるか、又はそれに特異的であり、欠失部分は低リスクHPV型に対して高い配列同一性又は交差反応性を示す。別の態様では、戦略的に切断されたプローブは、LR型との同一性が最も高い傾向がある、HPV配列のE1位置及びE2位置の両方で切断されたものである（図1～図9を参照されたい）。戦略的に切断されたプローブは、低リスク型と高い配列同一性を示すHPVゲノムの領域において、プラスミドのE1位置、E2位置及びL1位置で切断されていても（図1、図4、図7～図8を参照されたい）、又はプラスミドのE1位置、E2位置及びL2位置で切断されていてもよい（図9を参照されたい）。

20

【0125】

更なる態様では、1つ(X)又は2つ(XX)の欠失中の欠失配列の総量は、およそ1.4Kb～2.4Kbの範囲である。別の態様では、欠失は約100塩基対～約200塩基対、約150塩基対～約300塩基対、約200塩基対～約500塩基対、約500塩基対～約1000塩基対、約1200塩基対～約1500塩基対、又は約1000塩基対～約2000塩基対である。別の態様では、第1の欠失は約150塩基対～約300塩基対、又は約200塩基対～約500塩基対であり、第2の欠失は約1200塩基対～約1500塩基対、又は約1000塩基対～約2000塩基対である。別の態様では、欠失部分は低リスクHPV型、例えば低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型に対して高い配列同一性、交差反応性を示すか、又はそれとハイブリダイズする。

30

【0126】

別の態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号116、又は配列番号117と約75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%同一な戦略的に切断されたプローブである。一態様では、戦略的に切断されたプローブは、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号116又は配列番号117の連続塩基対長が約100塩基対～約200塩基対、約150塩基対～約300塩基対、約200塩基対～約500塩基対、約500塩基対～約1000塩基対、約1200塩基対～約1500塩基対、又は約1000塩基対～約2000塩基対の断片である。

40

【0127】

一態様では、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブは、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番

50

号 94、配列番号 95、配列番号 97、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、若しくは配列番号 103、若しくは配列番号 116 若しくは配列番号 117 に対して少なくとも約 75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% の同一性を有する 1 つ又は複数のプローブのプローブセットである。本開示は、1 つ以上、2 つ以上、3 つ以上、4 つ以上又は 5 つ以上の本明細書中に記載のプローブを含むプローブセットも提供する。

【0128】

一態様では、戦略的に切断されたプローブは、低リスク HPV 型との交差反応、ハイブリダイゼーション又は結合を低減することが可能である。別の態様では、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 97、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102 又は配列番号 103 の 1 つ又は (or) 複数の戦略的に切断されたプローブは、1 つ又は複数の低リスク HPV 1 型、2 型、3 型、4 型、5 型、6 型、8 型、11 型、13 型、30 型、34 型、40 型、42 型、43 型、44 型、53 型、61 型、67 型、69 型、70 型、71 型、72 型、74 型、81 型、83 型、84 型及び 89 型との交差反応性を低減することが可能である。

【0129】

一態様では、本開示は、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 97、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、若しくは配列番号 103 若しくは配列番号 117 又はそれらの断片若しくは相補体に対して約 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一性である単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0130】

一態様では、本開示は、配列番号 87 又は配列番号 97 (26XX)、それらの断片又は相補体と 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一な配列を含む、HPV 26 とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチド；配列番号 88 又は配列番号 98 (33X)、それらの断片又は相補体と少なくとも 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一な配列を含む、HPV 33 とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチド；配列番号 89 又は配列番号 99 (39XX)、それらの断片又は相補体と少なくとも 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一な配列を含む、HPV 39 とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチド；配列番号 90 又は配列番号 100 (52X)、それらの断片又は相補体と 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一な配列を含む、HPV 52 とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチド；配列番号 91 又は配列番号 101 (56XX)、それらの断片又は相補体と 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一な配列を含む、HPV 56 とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチド；配列番号 92 又は配列番号 102 (58X)、それらの断片又は相補体と 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一な配列を含む、HPV 58 とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチド；配列番号 93 又は配列番号 103 (66XX)、それらの断片又は相補体と 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一な配列を含む、HPV 66 とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチド；配列番号 94 又は配列番号 104 (68XX)、それらの断片又は相補体と 50% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、98% 以上又は 100% 同一な配列

を含む、HPV68とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチド；及び配列番号95又は配列番号105（73XX）、それらの断片又は相補体と50%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%同一な配列を含む、HPV73とハイブリダイズするか、又は特異的に結合することが可能な単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0131】

別の態様では、低リスクHPV配列に対して交差反応性又は特異性を示す高リスクHPV配列を標的欠失のために同定する。交差反応性は、任意の既知の配列同定データベース、例えば本明細書中に記載のバイオインフォマティクスツールのいずれかを用いた配列アラインメントによる同一度（percent identity）によって予測することができる。一態様では、低リスクHPV配列に対して交差反応性又は同一性を示す高リスクHPV配列を、標的欠失のために同定した後、低リスクHPV配列に対して交差反応性又は同一性を示す配列部分を除去する。第1の欠失後も顕著な交差反応性が存在する場合に、第2、第3、第4、第5又はそれ以上の欠失を行なってもよい。別の態様では、InvitrogenのGene Tailor（商標）Site-Directed Mutagenesis Systemを用いて欠失を開始する。

【0132】

バイオインフォマティクスツールを用いて、1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを決定することができる。例えば、特異的なオリゴヌクレオチドを設計するソフトウェアプログラムであるOligoarray 2.0を利用することができる。Oligoarray 2.0は、Rouillard et al., Nucleic Acids Research, 31: 3057-3062 (2003)（参照により本明細書中に援用される）によって記載されている。Oligoarray 2.0は、BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）及びMfold（Genetics Computer Group, Madison, WI）の機能性を兼ね備えたプログラムである。Karlin and Altschulによる統計的マッチング理論（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264 (1990)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873 (1993)）を実行するBLASTは、所与のクエリ配列にマッチするヌクレオチド配列を迅速に検出するために広く使用されているプログラムである。当業者であれば、例えば高リスク及び低リスクのHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、16型、26型、30型、31型、33型、34型、35型、39型、40型、42型、43型、44型、45型、51型、52型、53型、54型、56型、58型、59型、61型、62型、66型、67型、68型、69型、70型、71型、72型、73型、74型、81型、82型、83型、84型及び89型に対して照合される配列のデータベースを準備することができる。次いで、関心の標的配列、例えばHPV18を、そのデータベースに対するBLASTにかけ、同一性の任意の領域を検索する。次いで、融解温度（T_m）及び%GCを特定の長さの1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブについて計算し、パラメータと比較することができる、その後二次構造を検査することもできる。関心の全てのパラメータが満足された後、交差ハイブリダイゼーションを、BLASTによって決定された類似性を用いて、Mfoldパッケージによって照合することができる。様々なプログラムを適合させて、所望の特異性要件を満たす1つ又は複数のポリヌクレオチドプローブを決定することができる。例えば、プログラムのパラメータは、25ntの長さ、55℃～95℃のT_m範囲、35%～65%のGC範囲であり、55℃以下で二次構造又は交差ハイブリダイゼーションを有しないポリヌクレオチドが作製されるように設定することができる。

【0133】

交差反応性

本発明は、HPV HRプローブセットと低リスクHPV型との間の交差反応性が、FDAに認可された標準的なHPVのアッセイ及びプローブセットと比較して劇的に低減したアッセイ組成物、プローブ及び条件も提供する。一態様では、HPV HRプローブセットは、高リスクHPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、4

10

20

30

40

50

5 型、5 1 型、5 2 型、5 6 型、5 8 型、5 9 型、6 6 型、6 8 型、7 3 型及び 8 2 型、又は低リスク H P V 1 型、2 型、3 型、4 型、5 型、6 型、8 型、1 1 型、1 3 型、3 0 型、3 4 型、4 0 型、4 2 型、4 3 型、4 4 型、5 3 型、6 1 型、6 7 型、6 9 型、7 0 型、7 1 型、7 2 型、7 4 型、8 1 型、8 3 型、8 4 型及び 8 9 型からなる群から選択される。本発明のアッセイをこれらの H R H P V プローブと用いると、低リスク H P V 型と高リスク H P V プローブとの間の交差反応性が低減する。例えば、米国特許出願公開第 1 2 / 4 2 6 , 0 7 6 号を参照されたい。

【0 1 3 4】

本発明は、サンプル中の H P V 等の標的核酸分子の存在を、上記で論考した方法を用いて、少なくとも 1 0 個のサンプルについて約 2 時間以内、約 2 . 5 時間以内、約 3 時間以内、約 3 . 5 時間以内、約 4 時間以内、約 5 時間以内、約 6 時間以内、約 7 時間以内、約 8 時間以内、約 1 2 時間以内、約 2 4 時間以内、他の態様では約 3 . 5 時間未満で決定する方法も提供する。H P V 又は他の標的核酸分子の存在を短時間で決定することができる理由の一つは、この方法では標的核酸分子を検出前に増幅しないことである。標的増幅の代わりに、シグナル増幅を、H P V 又は他の標的核酸分子の存在を正確に検出するために使用することができる。一態様では、本開示の方法はシグナル増幅工程を含み得る。一態様では、本開示の方法は標的増幅工程を含まない。別の態様では、本開示の方法はシグナル増幅工程を含むが、標的増幅工程を含まないものであり得る。

【0 1 3 5】

本開示は、サンプル中の H P V 等の標的核酸分子の存在を、上記で論考した方法及びアッセイを用いて、少なくとも 1 0 個のサンプルについて約 2 時間以内、約 2 . 5 時間以内、約 3 時間以内、約 3 . 5 時間以内、約 4 時間以内、約 5 時間以内、約 6 時間以内、約 7 時間以内、約 8 時間以内、約 1 2 時間以内、約 2 4 時間以内、他の態様では約 3 . 5 時間未満で検出することによって、がん、例えば子宮頸がんを検出する方法及びアッセイも提供する。

【0 1 3 6】

当業者であれば、本発明を管、ディップスティック、マイクロアレイ、マイクロプレート、3 8 4 ウェルプレート、他のマイクロタイタープレート及びマイクロ流体システムを含むが、これらに限定されない多数のプラットフォーム上で行うことができることを理解するであろう。当業者であれば、本発明の方法を自動化することができることを理解するであろう。

【0 1 3 7】

本発明の別の態様は、標的核酸を含有するサンプルを回収する回収媒体を提供する。回収媒体は数日間、数週間又は数ヶ月間のサンプル安定性をもたらす。例えば、回収媒体は、少なくとも 1 週間、少なくとも 2 週間、少なくとも 3 週間、少なくとも 4 週間、少なくとも 1 ヶ月間、少なくとも 2 ヶ月間、少なくとも 3 ヶ月間、少なくとも 4 ヶ月間、少なくとも 5 ヶ月間、少なくとも 6 ヶ月間、約 1 週間～約 4 週間、約 1 ヶ月間～約 3 ヶ月間、約 3 ヶ月間～約 4 ヶ月間、又は約 3 ヶ月間～6 ヶ月間のサンプル安定性をもたらすことができる。別の態様では、回収媒体は、3 3 °C で少なくとも 2 1 日間、又は 2 0 °C で少なくとも 6 ヶ月間のサンプル安定性をもたらす。一態様では、上記のサンプルは、子宮頸部細胞サンプル又はヒト子宮頸部細胞サンプルである。好適な回収媒体は本明細書中に記載される。一態様では、回収媒体は N P - 4 0 、デオキシコール酸塩、T r i s - H C l 、E D T A 、N a C l 及びアジ化ナトリウムを含むか、それらからなるか、又はそれらから本質的になる。他の態様では、回収媒体は 1 . 0 % の N P - 4 0 、0 . 2 5 % のデオキシコール酸ナトリウム、5 0 m M の T r i s - H C l 、2 5 m M の E D T A 、1 5 0 m M の N a C l 、及び 0 . 0 9 % のアジ化ナトリウムを含むか、それらからなるか、又はそれらから本質的になる。

【0 1 3 8】

別の態様は、4 0 m M の T r i s (p H 8 . 2) 、1 0 0 m M の N a C l 、0 . 1 % ~ 0 . 5 % の T r i t o n X - 1 0 0 、及び 0 . 0 9 % のアジ化ナトリウムを含むか、そ

10

20

30

40

50

れらからなるか、又はそれらから本質的になる、洗剤を含有する洗浄バッファである。また別の態様は、40 mMのTris (pH 8.2)、100 mMのNaCl、及び0.09%のアジ化ナトリウムを含むか、それらからなるか、又はそれらから本質的になる、洗剤を含まない洗浄バッファである。

【0139】

ハイスループットアッセイ

一態様は、本明細書中に記載の方法又は組成物のいずれかを用いて実行することが可能なハイスループットアッセイ及び装置に関する。ハイスループットアッセイは、多数のサンプルを短期間で正確かつ迅速に処理することが可能である。

【0140】

一態様では、ハイスループットアッセイは、少なくとも300個のサンプルを3時間未満で、900個のサンプルを約5時間で、少なくとも1000個のサンプルを約6時間で、又は少なくとも1500個のサンプルを約8時間で処理することが可能である。別の態様では、ハイスループットアッセイは、少なくとも10個のマイクロタイタープレート（例えば96ウェルプレート）を約5時間で、少なくとも15個のマイクロタイタープレート（例えば96ウェルプレート）を約7時間で、又は少なくとも20個のマイクロタイタープレート（例えば96ウェルプレート）を約8時間で処理することが可能である。一態様では、サンプルの処理は、方法又はアッセイの初めから完了まで行われる。

【0141】

キット

サンプル中の標的核酸分子の検出のためのキットであって、

- a) 回収媒体と、
- b) 変性試薬と、
- c) ポリヌクレオチドプローブと、
- d) 第1の抗ハイブリッド抗体をコーティングしたビーズと、
- e) 検出可能に標識された第2の抗ポリハイブリッド抗体を含む検出試薬と、
- f) 洗浄バッファと、
- g) 第2の抗体上の標識の基質を含む第2の検出試薬と、

を含むか、それらからなるか、又はそれらから本質的になる、キットも提供する。

【0142】

回収媒体、変性試薬、ビーズ、第1及び第2の抗体、ポリヌクレオチドプローブ、検出試薬並びに洗浄バッファについては先に記載している。

【0143】

一態様では、キットは1つ又は複数のHPV高リスクプローブを含み (includes)、欠失部分は低リスクHPV型に対して高い配列同一性又は交差反応性を有する。一態様では、HPV高リスクプローブはHPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型、73型及び82型の1つ又は複数に特異的であるか、又はそれとハイブリダイズすることが可能であり、欠失部分は低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型の1つ又は複数と交差反応性又は特異性を有する。別の態様では、ポリヌクレオチドプローブは、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103又は配列番号117に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は100%の同一性を有する核酸配列である。

【0144】

装置

一態様は、本明細書中に記載の方法又は組成物のいずれかを用いて実行することが可能

10

20

30

40

50

なハイスループット装置に関する。一態様では、本明細書中に記載の組成物、方法、アクセシ及びキットを、米国特許出願公開第12/508, 304号、米国特許出願公開第12/508, 306号、米国特許出願公開第12/622, 131号、米国特許出願公開第12/605, 540号及び同第12/605, 605号（その各々の内容全体が参照により本明細書中に援用される）に記載の装置とともに使用する。米国特許出願公開第12/508, 304号、米国特許出願公開第12/508, 306号、米国特許出願公開第12/622, 131号、米国特許出願公開第12/605, 540号及び同第12/605, 605号に記載の機器は広範にわたる用途を有し、多数のサンプルを短期間で正確かつ迅速に処理することが可能である。限定されるわけではないが、米国特許出願公開第12/508, 304号、米国特許出願公開第12/508, 306号、米国特許出願公開第12/622, 131号、米国特許出願公開第12/605, 540号及び同第12/605, 605号に記載のシステム及び機器は、子宮頸部サンプル（例えば、子宮頸部スワブから得られるサンプル）又は子宮頸部細胞サンプル、アデノイド細胞、肛門上皮細胞、血液、唾液、脳脊髄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、喀痰、尿及び精液、他のウイルス、細菌、抗酸菌又は変形体、例えばサイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス、HIVウイルス、H1N1ウイルス、クラミジア、淋菌、ナイセリア・ゴノレア（GC）、クラミジア・トラコマチス（CT）、トリコモナス・バギナリス、スタフィロコッカス・アウレウス、結核菌、SARS関連コロナウイルス又はインフルエンザウイルスのいずれか1つに関連する核酸分子を検出及び分析するために使用することができる。さらに、米国特許出願公開第12/508, 304号、米国特許出願公開第12/508, 306号、米国特許出願公開第12/622, 131号、米国特許出願公開第12/605, 540号及び同第12/605, 605号に記載のシステム及び機器は、HPV、HPVの遺伝的変異体、高リスクHPV型のHPV DNA、高リスクHPV型のHPV RNA、又は高リスクHPV16型、18型、26型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、66型、68型及び82型のいずれか1つ、又は低リスクHPV1型、2型、3型、4型、5型、6型、8型、11型、13型、30型、34型、40型、42型、43型、44型、53型、61型、67型、69型、70型、71型、72型、74型、81型、83型、84型及び89型のいずれか1つに関連する核酸分子を検出及び分析するために使用することができる。

【実施例】

【0145】

実施例1

LR-HPVと交差反応するリスクが最小のHR-HPVに特異的なプローブを生成するために、各々のHR-HPVゲノムの欠失プラスミドを生成した。これらの戦略的に切断されたプラスミドは、LR-HPV核酸と比較的高度の相同性を有する或る特定の領域を除いた各々のHR-HPVの完全長配列を含む。

【0146】

1. 欠失の標的の選択

15個のHR-HPV型（HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68及びHPV82）と、28個のLR-HPV型（HPV1、HPV2、HPV3、HPV4、HPV5、HPV6、HPV8、HPV11、HPV13、HPV30、HPV34、HPV40、HPV42、HPV43、HPV44、HPV53、HPV54、HPV61、HPV67、HPV69、HPV70、HPV71、HPV72、HPV74、HPV81、HPV83、HPV84及びHPV89）とを比較する配列アラインメントを行い、全体的な配列類似性を決定する。使用するHR-HPV配列及びLR-HPV配列を下記表1に記載する。

【0147】

【表 1 - 1】

High Risk HPV 高リスクHPV	GenBank Accession GenBankアクセッション番号	SEQ ID NO 配列番号
HPV 16	K02718	1
HPV 18	AY262282	2
HPV 26	X74472	3
HPV 31	JO4353	4
HPV 33	M12732	5
HPV 35	M74117	6
HPV 39	M62849	7
HPV 45	X74479	8
HPV 51	M62877	9
HPV 52	X74481	10
HPV 56	X74483	11
HPV 58	D90400	12
HPV 59	X77858	13
HPV 66	U31794	14
HPV 68	DQ080079	15
HPV 73	X94165	16
HPV 82	AB027021	17

10

20

30

【表 1 - 2】

Low Risk HPV 低リスクHPV	GenBank Accession	SEQ ID NO
HPV 1	NC_001356	18
HPV 2	NC_001352	19
HPV 3	X74462	20
HPV 4	NC_001457	21
HPV 5	NC_001531	22
HPV 6	AF092932	23
HPV 8	PPH8CG	24
HPV 11	M14119	25
HPV 13	X62843	26
HPV 30	X74474	27
HPV 34	NC_001587	28
HPV 40	X74478	29
HPV 42	M73236	30
HPV 43	AJ620205	31
HPV 44	U31788	32
HPV 53	NC_001593	33
HPV 54	HPU37488	34
HPV 55	HPU31791	35
HPV 61	HPU31793	36
HPV 62	AY395706	37
HPV 64	N/A	38
HPV 67	D21208	39
HPV 69	AB027020	40
HPV 70	HPU21941	41
HPV 71	AB040456	42
HPV 72	X94164	43

【0148】

この配列アラインメントの結果を図30に示す。LR型と最も高率の同一性を示すHR配列を標的の欠失に特定する。これに基づき、HPV26、HPV33、HPV39、HPV52、HPV56、HPV58、HPV66、HPV68及びHPV73を、LR交差反応性を低減する配列除去の候補プラスミドとして選択する。

【0149】

2. 部位特異的突然変異誘発

HR/LR配列アラインメントの結果に基づいて、各々のHR-HPVにおいて最も相同な領域を初めに欠失させる。関心の完全長HR-HPV配列を含むBluescriptプラスミドを、37℃で1時間メチル化する。次いで、重複増幅プライマーを用いてプラスミドを増幅する。増幅プライマーの一方は欠失に選択される標的の領域と重複するが、他方は重複しない。これにより得られる増幅産物は、欠失に選択される配列を除いた標

10

20

30

40

50

的配列に対応する非メチル化線状アンプリコンである。次いで、標的配列及びアンプリコンを、メチル化された標的を消化し、非メチル化線状アンプリコンを環状化及び増幅する大腸菌株にトランスフェクトする。この方法の例示的なワークフローを図 22～図 29 に実証する。

【0150】

欠失の標的とした部位の配列を、下記表 2 に記載する。

【0151】

【表 2-1】

SEQ ID NO 配列番号	HPV Type [Length] H P V 型 (長さ)	Sequence 配列
44	HPV26 [490bp]	CCGTTGTATGCCGGCCTGTAACATAAACTTACGCCCTAGTGGAATTGA TCCAAATCAATAGAAAATTTTCTTTTAAATCTACATCCCAAAATTTAAAT TTTGGAAAAGGATCTTCTTTGGCACAGGAGGGCGTTACGCTGACAGGT AGTAGCAGAGTTTTTAATAAACCTATAGGCATCTTCCAACTAGCAGTGG GAGGTAAGGTTAGTCCAAAATTTCCAATCCTCCAATATGGAGGCATTCAAT AAATGTATGTAAGCCATAACATCTGTGTGAAGTGTATTTACACAACATGA AATATAAATTGTAAATTCATATTCTTCGCCATGTCTTATAAATTGTTTATAAT CAGATGGTTTAAATGGAGTGGATGCAGATGCTGCAGATAATGTACTAATG GTAAGGTTAGTACTGCGGGTGGTATCAACACAGGTAACAAACAATTGATT GCCCCAACAGATACCATTATTATGACCCTGTGCACGT
111	HPV26 [1514bp]	TTTTGTTTACACACAACAGTAGAGGGCACCACCTGGTGGTTTATACATTGC ATGTTTCTTTCACGAGCTTTATAAAATATTGCACATTTCATATCGTACCAGT TTCCAATAATCAATTTGATCAGTTAATTTACTGTCCAGTTCATAATAGT CTAGTATTTTCTCCTGGCACGCATTTAAACGCTGGCAAAGGTTCTCCATTT TCTTTGTCCGCGTCTCCTCCTCCAAATCTAATCTGGACCAGGTGGTGGAAAA AAGCTTTTCCAATTTACATCAGTCAATGCATATACAGGATTCCCATTTGCTG TCAAAATGGAAATGTATTTGGAAATGGTATCACTGTTACTCTACTATGTAAA TACAAAAGTGAGTTATCTTCTTGAGGATTTATTTGAGGTAATTATTAAT GGGGGGCATGTAACCTTGCAAGTGGCTTCTATGTTTCTGTCTATACAACAG GGATTTCCATCTAAAAAGTTACGTAAATATTTATCAATATATAACCAGCAG CTATATGTAGCATCATCTAATACTGCAACTTTTGCATCTTCTAAAGGCTGC AGCCAAAAATGGCTATTTGAAATTTACATATGAAATGACTGACCCTTGCATA AATTTTATAAACTCATTGCAAACTGTGACTTACCAGTATTTGGCGGTCCA TATATTACTATACAATTGTGCTTTGGGGTACCCTTTAAAAACTGTTTAAAC ACTTGTAATAAAATAAATAAGTTACATGTTGAAACCTTAAAAATTGGC AATTTCTCTCCACGACCCGCCCTCTCTATTTTGAACATCTATATTGTAGC CATTGTGACATACACATAGATCGTTTCTGTGCTCTTTTATAATGTCTAGTCA TGGTTGCACAGTCTTTTACATATTTGCCTGACAATTGCTTTTAAAAAGG CAGCTGCATTACTATCTATGTCAGCTAACTGTGCATATTTAAATGCAATTT CACTATCATCTGTTATGTCATGATCGAACGCCCATTTGCACCATTTTGGATA AATCAAATGTAGCATCATCAAACTATGTTCTAATTGTGTTTGTGCTACTA TCCATTCTGGTGTATCTCCATATGTCTCACTTATATTGGACAACCCGTGTTT ATAAAAAATAATGCTACTGCTGTACTTCGCAATTTTGGTGGTTCAATTAG TAATTGCGTTTCTGGCACATTTAATAACATACATAGGCAGTTTAAATTGT TGTTCTGTTTGTGACATGTAAAGCGCACTAGCATTAGTACTATTACTCCC CAATTACATGTTAAACATTGTATATGATAATATAAACAATATTGTTGTATT AATGATTTAATACTTTCTGCTACAGAGCCTGCCACACCGAATGCTGCACAC ACCCAATCTGAACAGCATGTTTGTCACTTTTAAACACCCGTAAGTCTCT GCAAAACTTACACCATATACTGTTTAAATTACTTAACAATGCTGCTTTT ACATTACTACATTTTAAATAATTCACATATTT

10

20

30

40

【表 2 - 2】

45	HPV33 [1460 bp]	GTCTCTAATGCCATTTGTAGTTCAATTACTTGAAATGCTTTGGTCTTTGA TGCTAACAAAGAAGGCACACCTGGTGGCATAAAATGTGAAAAATCCCATT GTTTGGCTGTATACAATAAAGCACACTCCATGCGTATCAGTTTCCAATGTT CAATTTGTGATGGTAAATCAGTTTATCAGCTTCGTAAAGAGCTAGCATTT TCTCTGCACTGCATTTAAACGTGCTGATATTCTCCATGGTTTCTCTGT CCTCTTCTCTATTAAATCTAATTGACACACGTCCTTGAGAAAAAGGATT TCCAATTTTCATCATTTATTGCATACACTGGGTTACCATTTTCATCAAATGG GAATGGATTTTAAATTCAAATACTGTTAATCTACTATGTAATATGGCCA TCTAGAGTCTGTGCCTGCATTTGTATTGAGGTAAGAAGCAGTGGTGGACA TTTTAATTGCACTAATGCCCTATGTTTACATCTATTGAAATTTCAATTTCCA TCTAACGCATTTCTCATGTAATCATCTATATATGTCCAACCTATTGGCGTTA CATCATCTATCATTCCTATTTTTCATCTGATAATGGCTGCAACCAAAAGT GACTTTTAGAATTTACACATGATATAACACACCCCTTTTAAAACTGTATTA AACTCATTTCCAAAATATGACTTTCCTGTATTGCTGGTCCACAAATTAGCA TACAGCTTTTTTTGGTATACCTTTTAAAACTTTTAAATGCACCTAAAAA TGCTGTAAATTCATGTTTGTATCTTAAACAACGTACTATTGGTCTCCA ATTTCTCCATCATTTGTTTTTTCATCTACTTTGTATCCATTGTCTCTATTG ACATTTTACGTTTTTCTGCTTTTTTATAATGTCTACACATTATTCACAGTC CTTTACTATTTTGGTGTGAGTTACTTTTTAAAAATGCAGCAGCATTACTA TTTGAATCTGCAAGTTGTGCATAATAATATGCAATGTCATCTCGTCCGTT AACTCGTTATCATATGCCCCTGTACCATTTCACTTAAATCAAATATATTA TCATTAAGCTATGTTGTAACACAGTTAGTCTATCTATCCATTACGGTGT GTACCTTGATACACTAATGTTTGACATTGCTGTTCTAAACCAATACAAT GCACATGTTGGCTCCGTAATTTGGTGGCTCTATAACCATACATGTTTCA GGTATTGATAATAAATTAATCTAGTTTGTACTGTTAACTGTTTTTGC TACACCTAAATCTAATTAACAATAATATTATTATTCCTCTATCGCAAGTTA AACATTGTAATGAGTATACAACTATGCTGTTAATTAATCTTTTAAAC TTTCTGCTACTGATGGACTAATTCATATCTCTGTTATACACCAATCTGTAC AGCTTGTTTTATCACTTTTAAATG
46	HPV33 [1459 bp]	GTCTCTAATGCCATTTGTAGTTCAATTACTTGAAATGCTTTGGTCTTTGA TGCTAACAAAGAAGGCACACCTGGTGGCATAAAATGTGAAAAATCCCATT GTTTGGCTGTATAAAATATTCCCTCCATAATGGATCCGTTTCCAATGTTT AATTTGTGATGGTAAATCAGTTTATCAGCTTCGTAAAGATCTAGTATTTT CTCCTGCACTGCATTTAAACGTGCTGATATTCTCCATCGTTTCTCTGT CCTTCTCTATTAAATCTAATTGACACACGTCCTTGAGAAAAAGGATT CCAATTTTCATCATTTATTGCATACACTGGGTTACCATTTTCATCAAATGG GAATGGATTTTAAATTCAAATACTGTTAATCTACTATGTAATATGGCCA TCTAGGGTCTGTGCCTGCATTTGTATTGAGGTAAGAAGCAGTGGTGGACA TTTTAATTGCACTAATGCCCTATGTTTACATCTATTGAAATTTCAATTTCCA TCTAACGCATTTCTCATGTAATCATCTATATATGTCCAACCTATTGGCGTTA CATCATCTATCATTCCTATTTTTCATCTGATAATGGCTGCAACCAAAAGT GACTTTTTCGAATTTACACATGATATAACACACCCCTTTTAAAACTGTATTA AACTCATTTCCAAAATATGACTTTCCTGTATTGCTGGTCCACAAATTAGCA TACAGCTTTTTTTGGTATACCTTTTAAAACTTTTAAATGCACCTAAAAA TGCTGTAAATTCATGTTTGTATCTTAAACAACGTACTATTGGTCTCCA ATTTCTCCATCATTTGTTTTTTCATCTACTTTGTATCCATTGTCTCTATTG ACATTTTACGTTTTTCTGCTTTTTTATAATGTCTACACATTATTCACAGTC CTTTACTATTTTGGTGTGAGTTACTTTTTAAAAATGCAGCAGCATTACTA TTTGAATCTGCAAGTTGTGCATAATAATATGCAATGTCATGTCGTCGTT AACTCGTTATCGTATGCCCCTGTACCATTTCACTTAAATCAAATATATTA TCATTAAGCTATGTTGTAACACAGTTAGTCTATCTATCCATTACGGTGT GTACCTTGATACACTAATGTTTGACATTGCTGTTCTAAACCAATACAAT GCACATGTTGGCTCCGTAATTTGGTGGCTCTATAACCATACATGTTTCA GGTATTGATAATAAATTAATCTAGTTTGTACTGTTAACTGTTTTTGC TACACCTAAATCTAATTAACAATAATATTATTATTCCTCTATCGCAAGTTA AACATTGTAATGAGTATACAACTATGCTGTTAATTAATCTTTTAAAC TTTCTGCTACTGATGGACTAATTCATATCTCTGTTATACACCAATCTGTAC AGCTTGTTTTATCACTTTTAAATG

10

20

30

40

【表 2 - 3】

112	HPV33 [1460 bp]	ACAGTTATGTATATAATACATACCTATATAATCTACTTTCCCTGTAACCAT AGTACATGTATCTTCCCTCTATAATATATATTTACCCAGTTTGTATAATCC ATTGTATTTTTTTTGTGTCATTGTCATATTGCACAGTTACTGTTTCTCCTGTGTT TTTAAACATTTTGGTGGTTCACAAAGCCACACCTCTAAGCTTGTGTTG CAATGTCCATTGGCTTGTACTATACTGTGATTTACTTAATGTCTCTAATGCC ATTTGTAGTTCAATTACTTGAAATGCTTTGGTCTTTGATGCTAACAAAGAA GGCACCACCTGGTGGCATAAATGTGAAAATCCCATTTGTTGGCTGTATAC AATAAAGCACACTCCATGCGTATCAGTTTCCAATGTTCAATTTGTGATGGT AAATCAGTTTTATCAGCTTCGTAAAGAGCTAGCATTTTCTCCTGCACTGCA TTTAAACGTGCTGATATTCTCCTCCATGGTTTTCTTGTCTCTCTCTATT AAATCTAATTTGCACCACGTCTTGAGAAAAAGGATTTCCAATTTTCATCA TTTATTGCATACACTGGGTTACCATTTTCATCAAATGGGAATGGATTTTA AATTCAAATACTGTTAATCTACTATGTAAATATGGCCATCTAGAGTCTGTG CCTGCATTTGTATTTGAGGTAAGAAGCAGTGGTGGACATTTTAATTGCACT AATGCCCTATGTTTCACATCTATTGAAATTTCAATTCATCTAACGCATTTCT TCATGTAAATCATCTATATATGTCCAACCTATTGGCGTTACATCATCTATCAT TCCTATTTTGCATCTGATAATGGCTGCAACCAAAAGTGACTTTTAGAATT TACACATGATATAACACACCCTTTTAAAACTGTATTAAACTCATTCCAAA ATATGACTTTCTGTATTTGCTGGTCCACAAATTAGCATACAGCTTTTTTT GGTATACCTTTTAAAACTTTTAAATGCACCTAAAAATGCTGTAAATTC ATGTTTGTATCTTAACAACGTGACTATTGGTCTCCAAATTTCTCCTCATCAT TTGTTTTTTCACATCTACTTTGTATCCATTGCTCTATTGACATTTTACGTTTT TCTGCTTTTTTATAATGTCTACACATTATTCCACAGTCTTTACTATTTTTG CTTGTGAGTTACTTTTTTAAAAATGCAGCAGCATTACTATTGAATCTGCAA GTTGTGCATAATAATATGCAATGTCACTATCGTCCGTTAACTCGTTATCAT ATGCCCACTGTACCATTTCACTTAAATCAAATATATTATCATTAAAGCTAT GTTGTAAACAGTTAGTCTATCTATCCATTCAAGGTGTTGTACCTTGTACAT CACTAATGTTTGACATTGCTGTCTAAACCAATACAATGCACATGTTTGGC TCCGTAATTTTGGTGGCTCT
-----	--------------------	--

10

20

【表 2 - 3 - 2】

47	HPV39 [1692 bp]	CAGTAGTGGGTACCGATCCGTCAGTGGTACTGCACATAGAGTCAGGAC AATGAATTATGTTGCCATTATAATGCACCTTCCCATTGGCCACTAGTCCCAT ACCTTTCCGCATCTTGAATAAACACTTCATAGTATACTTTAGGTGCTCGTT CATATAATATATACCCCAATAGTCCACACACCCCTTCTGTTTACACCATAT GTCTATATTATTTTATAATATATAGCACCCATAATACATAGTTCATAGC ATTACATTTGTCCCATCATACACACCTCCACTGTAGTTTCTTGTGTTTTTA AAACATTGTTTTGGCTGTGTATGCCACAGTTCATTACTAGTGTCTTTAATG TCCACTCCTCTGTATTGTATTAGTTTGTGCAACACTTTCTAGTGCCATCTG CAGTTCAATAGCTTGATATGCTTTACATTTTGAATGTTTATGGTTGGCAC CACCTGGTGGTCAATAGTATGCATGCCACGTCTCGTGTGCATAAAATAT TGCATTTTCCATTGCGACACATTTCCAATAATTAATTTGATCATATATTGAT TACTGTCTGTTCATAGTATTCTAGTATTTTGTCTGTAAACACATTTAAAC GTTGTGAAAGTGTTCATCATTTGTCTCTTCATCCTCGTCTGTGCAAGT CTAATCTGCACCAAGTCTTTTCAAAAAACATTTCCAGTTTTTATCATTGA TTGTGTACACTGGATTCTGTTTTGGTCAAAATGGAAATGCATTAGGAAATT TAAACACTGTTAGCCTACTACGTAAATATGGCCACCTATCGTCTTCCACAG GATTGGTATTGGAGGTTATTAATAATGGTGGACATTTCAATTGTAGTAAAC TTTTATATTTCCTATCTAAACTTATTGCATACCCATCTAATGCATTTCTCAT ATAATATCGAAATATGACCAGCAGGTACCGTTGCATCATCTAACATTGC TAGTTTTGCATCTGCAAGTGGTTCTAGCCAAAAGTGGCTGGTGGAGTTTAC ATATGAAATAACTGTGCCCTGTAAAAAATGCATAAGGCTCATACAAAAAT GTGACTTTCTGTATTGCGCAGGTCCATATATACTATAACAGTTTTTTTTGGG AGTACCCCTTAAAAATTCCTTAAATGCACATAAAAAAGGATATAAATCTAT TCCTTGATATCTTAAGAATTGTACTATGGGTCTCCAGTCCCCGCCTTCATC ACATTTACTACACCTAAATTTATCCATTGAGACATGGACATTTGCCTTTTT TGTGCTCGCTTGTAATGTTTACACATTGTTGCACAATCTTTACATATTTG CCTGGCAGTTACTTTTTAAAAAGGCTGCAGCATTACTGTTACAATCTGCTA ACATTGCATAATTAATGCTATGTCACTTTTCATCAGTATATTCAATTGTCAA ATGCCCATTTGTACCATGTCCGATAGGTCAAATACACTATCATCTATTCCAT GTTGTATAACAGTTAATCGTTGTATCCATTCTGGCGTATCCCCGTTACCA CACTAATATTGGATATACCTGTGCGATACCAATATAGTGTGCTACAGGGC TGCGCAGTTTAGGAGGCTCCAGAAGCATACAACCTTTCTGGAACATGTAAC AATGTACTTAATCCCTTTCTACAGTAACCTATTTTTTCCACATGTATATC TT
----	--------------------	---

30

40

【表 2 - 4】

48	HPV 39 [190 bp]	ATACCACCACGATTCCAAAAATGTCTTGCAAACAGTTGTTCCCTACGTA AACAGAAGAACATACTGTCCCCATACACATCTGCAGACATTGCAAATAA TCAGGATATTTACAAATGGATTGACAAATATCTAAAGGCACCTCACTTTTG GTTTCTGCAATGCACCAAAGTCCATAGCTCCATAGCCAG
49	HPV52 [1376bp]	TAATAGAACCACCAAAATTACGAAGTGCTACCTGTGCATTATATTGGTA TAGAACAGGTTTGTCTAATATTAGTGAGGTATATGGTACCACCCAGAAT GGATAGAACAACAAACAGTATTACAGCATAGCTTTGACAATAGCATATTC GATTTTGGAGAAATGGTGCAATGGGCATATGATCATGATATAACAGATGA TAGTGACATAGCATATAAATATGCACAGTTAGCAGATGTAAATAGCAATG CTGCAGCATTCTAAAAAGCAATTCGCAAGCAAAAAATAGTAAAGGACTGT GCAACCATGTGTAGACATTATAAACGGGCAGAAAGAAAAACATATGAATAT TGGACAATGGATACAGTATAGATGTGATAGAATAGATGATGGTGGAGATT GGAGGCCTATAGTAAGATTTTAAAGATATCAAGACATAGAATTTACAGCC TTTTTAGACGCATTTAAAAAATTTTAAAGGTATACCTAAAAAATTTGT TTAGTATTATATGGACCTGCAAAACACAGGAAATCATATTTTGGAAATGAG TTTAATTAGGTTCTTAAGTGGATGTGTAATATCCTATGTAAACTCAAAAAG CCATTTTGGCTACAACCATTAACAGATGCAAAAGTGGGTATGATAGATG ATGTAACACCTATATGTTGGACATATATAGATGATTATATGAGAAATGCA CTGGATGGAAATGATATATCAGTAGATGTAAAGCATAGAGCCTTAGTACA AATAAAATGCCACCATTAAATTTTAAACAACAAATACAAATGCAGGAACAG ATCCTAGGTGGCCATATTTACATAGTAGATTGGTTGTGTTTCATTTCAAAA ACCCATTTCCATTTGATGAAAATGGCAATCCTATATATGAAATTAACAACG AAAATTGGAATCCTTTTCTCAAGGACGTGGTGCAAATTAGATTTAATAC AGGAAGAGGACAAGGAAAACGATGGAGTCGATACCGGCACGTTTAAATG CAGTGCAGGAAAAAATACTAGATCTATACGAAGCTGATAGTAATGACCTA AACGCACAAATTGAACATTGGAAATTGACTCGAATGGAATGTGTTTTGTTT TACAAAGCAAAGGAACTGGGAATAACTCATATAGGCCACCAGGTGGTGCC ACCAATGGCAGTGTCTAAGGCAAAGGCCTGCCAAGCTATTGAACTACAAT TGGCATTGGAGGCATTAAACAAAACACAATATAGCACAGATGGATGGACA TTACAACAAACAAGTCTAGAAATGTGGCGTGCAGAACCAAAAAATACTT TAAAAAACATGGGTATACAATAACAGTGAATACGATAATGATAAAACAA TACTATGGATTATACAACTGG

10

20

30

40

【表 2 - 5】

50	HPV56 [1961 bp]	ACGTGGAGGTGGTGGTGGTGGTCTTGTGGGTGTTGTATTTCGTTAACAGT TTCAACAGGGGATACGTTGTATCTACAGGTACTAGACACAGAGTCAGGAC AATAAATACTCTCATTTCATATGTACTTCCCATATGTTTTTACACCCAAA TTTTTGGCCTCTTGTTCAAAGTCTGTGTAGTATGTTTTGTGGCCATCATGT ACATAATATATACCTCTATAGTCTACCCAGAACACACTTTTTGCCACCCA CAATCTCCATTGTAATATATATATTTCCAGGCTACATATTGCATACAATTG TTTTTACTACCATCAAACCATACTTCTATATGTTGCTCTCTTTTTAAAGC ATTTTTTAGGTTTCAGTAAGCCATAGTTCCTCGCATGTGTCTCTTAATGTCCA CTCTTCATTGTTATATATTGTTGTACTTAATGATTCCAGTGCTATTTGCACT TCTATTGCACTACATGCTTTTGCTTTACATACTTGTAAACAAGGCACCATC TGGTGGTTTAGTACAGTAATGTCATTTTCTCTTGCTTTATAGTATAGCACAT TTTCATGTCGCACAGCTTTCCAATATTCTATATGATCTGCAATACATCTACT ATCTTTTTCAAAACAGTCTAGTATTTTGTCTGGCACGCATTTAAACGTTG GGAAAGCGTCTCCATTGTTTCTTGTCTCGTCGTTATCCAAATTTAATCT GGACCACGTCCTTGTAAAGAAACATTTCAGTTTACATTACTTAATTCATA TACAGGATTACCAATTATTATCTAATGGAAATGGATTGTGAACTGAAACAC TAACATTCTACTGTGTAAATATCGTAATTTAGCATCTAGCATAGGATTAT ATTGGTTGTAATTAGTAATGGTGGACATTTTATTGTACTAATTGTTTATGT TTTCTATCTAAACTTATAGGATTTCATCTACCAAATTCCTTAAATAATCGT CTATATATTCCAAACATATTTCTGTTGCATCATCCAACAACCCAAAGTTTAG CATTGTCTAATGGCTGCAACCAAAAGTGGCTTTGTGAATTCACAAATGAA ATGACAGACCCTTGAAAAAAGCTTTATAAGACTCATAGCAAAGCATGATTT ACCTGTATTTGGCGGTCCACAAAAGTACCAAACAGTTATGTTTAGGTGTTCC TTGTAGAAATAATTTAAAGTAACTTAGAAATGAAATGAAATCGACCCCTT GATATCTTAAAAATTGTACAATGGGTTTCCAATCACCCCTTCATCTGTTTT ACTACATATGTGCTTTATCCACTGGCACATATTCAATTTGTGCTGTTGTGCC CTTTTATAATGTCTACACATTATCCACAATCCTTTACATATTTGCCTGCA TATTGCTTTTTAAAAAGGCTTGTGCATTGCTGTCTACATCTGCTAATTGTGC ATATTGAAACGCAATTTGGCTATCATCTGTTACTTCATTATCAAATGCCCA CTGCACCATTTAGATAATTCAAATTGACTATCCTGTAAACTGTGTTGCAA TTGTGTTTGTCTTTGTATCCATTCTGGTGTGTCTCCATACACATCACTAATA TTTGACATTGCTGTTTTATAAAAAATATAAAGCTACAGCAGGACTTCGTATT TTTGGTGGTTGAATTAACATTGCTCCTGTGGTACATTTAATATTGAGCTTA ATGCTTTTGCAATTGTTTTCTGTTTTTGCCACATGTATATCTAATTAGCAT CATTACTATAACCCCATGTACATGTTAAACATTGCATATGATAATACAT ACAGTGTGGTTTTATTATAGTTTTTAGTGCCTCGGCTAATGTTTCATTAAAC CCAAATATAGCACATATCCAATCATTGCAACATGTACTATCACTTTTAAAC GTACGCACCAATTCTGAAAATGGAATACCATACACTTCTTTAAATTTATAA TATAATTTACC
----	--------------------	---

10

20

30

40

【表 2 - 6】

113	HPV56 [1962 bp]	CTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGAT AAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGG GCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTC AGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCA CTGATTAAGCATTGGTAAGTCTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAG ATTGATTTAAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTT TTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGA GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTT CTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGT GGTGTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGG CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTT AGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCT AATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGG GTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAA CGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAAGCAGCTACACCGAA CTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGG GAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAG CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCTGT CGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGG GGGCGGAGCCTATGGAACGCAACGCAACGCGCCTTTTACGGTTCC TGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTCGGTTATCCCCTGA TTCTGTGGATAAACGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCG CAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG CGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCTTAATGC AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGC AATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTAT GCTCCCGGCTCGTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACAC AGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACT AAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGATGGCGACGTG GCGGCTAGTGAAAATAAGGTGTATCTACCTCCAACCTGTTTCAAAGG TTGTGGCAACGGATTCTATGTAACGCACTAGTATATTTATCATGCAG GCAGTTACGATTGCTTGCCGTAGGACATCCCTATTACTCTGTGACTAAGG ACAATACCAAAAACAAACATTTCCCAAAGTTAGTGCATATCAATATAGGGTA TTTAGGGTACGGTTGCCCGACCTAATAAGTTTGGGCTTCCAGATACTAAT ATTTATAATCCGACAGGAACGGTTAGTGTGGGCATGTGTAGGTTTGGGA GGTAGGCCGCGACAGCCTTTAGGTGCTGGGCTAAGTGGCCATCCATTGT TTAATAGGCTGGATGATACTGAAAGTTCCAATTTAGCAAAATAATAATGTTA TAGAAGATAGTAGGGACAATATATCAGTTGATGGCAAGCAACAC
51	HPV56 [210bp]	TTAGCTAATGGGTCCTGTTTTCTGTTGGTGGCTGTTCCCGTTGACATGT TATAGCTGTGCTTCTAACATATCTATATTATCTTCTAGGCTGGTGGCCACT GGCGGGGATAACCCAATATCCAGTCTCCAGTAGGTTAGCATTTCATATTA TGTAAATATGCCATAACCTCTGCAGACAAAGTAATTTGCATAATTGAAA AACAAAT

10

20

30

40

【表 2 - 7 - 1】

52	HPV58 [1300 bp]	TTGTGATGTTAAATCATTTTTATCAGCTTCGTATATGTCTAGGATTTGT CCTGCACTGCACTTAAACGTGCTGATATTTCCCTCCATCGTTTCCCTGTCCT CTTCTCTATTAAGCCTAATTTGCACCACGTCCTTGAGAAAAAGGATTTCC AATTTTCATCATTTATTTTATACACTGGATTACCATTTGCATCAAAATGGAA ATGGATTGTTAAATCAAATACTGTTAGTCTACTGTGCAAAATATGGCCATC GTGAATCTTTGCCTGCATTGTATTTGAGGTAATTATTAATGGTGGACATT TTAATTGTACTAATGCCCTATGTTTACATCTATTGAAATGTCGTTACCATC TAATGCATTTCTCATATAATCATCTATATATGTCCAGCTTATGGCTGTTACA TCATCTATCATACCTAGTTTAGCATCTGATAATGGCTGCAACCAAAAAATGA CTTTTGAATTTACATATGAAATAATGCATCCTTTAAAAAATGTATTTAAA CTCATTTCCAAAATATGATTTCCCTGTATTGTCTGGGCCACACAGTAACATA CAACTTTTTTTGGTACACCTTGTA AAAAAGTGTAAATGCAACTAAAAAT GCTGTAAATTCATATTTTGATATCTTAAAAATGTACTATTGGTCTCCAA TTACCTCCATCATTTGTTTTTTCACACCTACTTTGTATCCATTGTCCCATTTGT CATACCACGCTTTTCTGCTCTTTTATAATGTCTGCACATAACGCCACAGTCT TTTACTATTTTGGCTTGTGCATTGCTTCTTAAAAATGCTGCTGCATTACTAT TAACATCTGCTAACTGTGCATATTATATGCAATGCTACTATCATCTGTAA TGTCTATTATCATATGCCCATTTGTATCATTTCACTTAAATCAAATATATCATC ATTAAGCTATGCTGTAACTGTTAATCTATCTATCCATTCTGGTGTGTGTC CCTTGCACATCACTTATATTTGACATTGCTGTTCTAAACCAATATAAGGCA CATGCTTGACTTCGTAATTTTGGTGGCTCGATAATCATACATGTTTCAGGA ATTGATAGTAAATTACTCATTAATTTGCCACAGTTAATCTATTTTGGTAC ATTTAAATCTAATTAAACAATAAATAATAAATTCCTCTGTACACGTTAAAC ATTGTAGGTGTGTATATATACTGTGCTGTTAATTAGTACTTTTAACTTTC TGCTACGGAGGGACTTATTCATACCTGTTATACACCAATCTGTACAGCT TGTTTTATCACTTTT
----	--------------------	---

10

【表 2 - 7 - 2】

53	HPV66 [1655bp]	TTTTTAAAAACAGTTTTTGGGCTCCGTGCGCCACAGTTCATCACATGTA TCACGTAATGTCCTACTTTCATTTTTATATATTGTGTTACTTATTGCTTCCA GTGCCATTTGTAATTCATTGCACTACATGCTTTTGCTTTACACACTTGTA AGAGGGCACCATCTGGTGGTTTAGTACATTAATGTCAATTTCTCTTGCTTT ATAATATAATACATATTTCATGTCTGACAGCTTCCAAATAGTTTATATGATC TATAATGCATTACTATCTTTTCATAACAGTCTAGTATTTGTCTGCGCAC GCATCTAAACGTTGGGATAGAGTCTCCATTGTTTTCTTTGCTCTCGTGTAA TCCAAATTTAACTCGGACCATGTCCTTTCAAAAAAACATTTCCAATTACA TTACTCAATTCATACACAGGATTACCATTTGTTATCTAATGGAAATGGATTT TCAAACCTAAACACTGAAATTCCTACTGTGTAGATATCCTAATTTTGCTCT TGCATAGGATTTACATTAGTTGTAATAATGACTGGAGGACATTTTATTGT ACTAATTTGTTATGTTTCTCTATCTAACTTATGGGATTCCCATCTAATAAAT TTCTTAGATAATCATCTATATATCTCCAACACGTATCTGTGCATCATCCA GCAAACCTAATTTGGCATTGTCTAGTGGCTGTAACCAAAAGTGGCTTTGTG AATTAACAAATGAAATGACTGACCCTTGGA AAAAATTTATAAGGCTCATA GCAAAACATGATTTACCTGTATTTGGTGGTCCACACAGTACCAAAACAATTA TGTTTAGGGCTGCTTTGTAAAAATAATTTAAAAATACTTAAAAATGAAAT GAAGTCGACCCCTTGATATCGTAAAAATTGCACAATGGGTTTCCAATCACC AAGCCAAGCTTAATTCGGCTTCCCTTCATCTACTTTACTACATATATGCTTT ATCCACTGGCACATATTCATTTGCTGTTGCTGTGCCCTTTTATAATGTCTAC ACATTATCCACAATCCTTTACATATTTGCTTGCAATTAATTTTAAAAA TGCTTGTCATTACTATCTATGTCTGTAGTTGTGCATATAAAAAGGCAAT TTGGCTATCATCTGTTACGTCAATATCAAATGCCCACTGTACCATTTTAGA CAATTCAAAATTGATTGTCTTGTAAACTGTGTTGCAATTGTGTCTGTCTTTGT ATCCATTCTGGTGTTCCTCCATACACCTCACTAATATTGACATTGCTGTTT TATAAAAATATAATGCCACAGCAGGACTTCGTAGTTTTGGTGGTTGAATTA ACATTGCTCTGTGGTACATTTAAAAATTGAGCTTAGCGATTTTGTAAATTGT TTTTCTGTTTTTCCACATATATATCTAATTAGCATCATTACAATTACCCCC CATGAACATGTTAGGCATTGCATATGATAGTACACACATTGTGGTTTTAGT ATAGTTTTTAACGCTTCTGCTAATGTTTCATTAAACACCAAAATATTGCACAT ATCCAATCGTTACAACATGTACTATCGCTTTTAAATGTTTCGCACCAACTCT GTATATGGCACTCCATACACTTCTTAAATTTAAATGTAATCTTCCCTTGTA CGTTACTACTTTTA
----	-------------------	---

20

30

40

【表 2 - 8】

114	HPV66 [1634bp]	CGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTA TGCTTTCATTACAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC CCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCA GAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCAT AATTCTCTACTGTCAATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAG TACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCT TGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA AGTGCTCATCATTTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTT ACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATC TTCAGCATCTTTTACTTTCACCAAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAG GCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATA CTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTC TCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGG GTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATA TTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAACCA ATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGA TAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAAC GTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCC ACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAA AGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGG GAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAG CGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGATAGCGGTACCGTGCAGCGTAACACC ACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTTCGCCATT AGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATT ACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA CGCCAGGGTTTCCAGTCAACGCTGTTGAAAACGACGGCCAGTGAGCGC GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGG CCGCTGTAAAAAATAGGGAACACGTTTACGGCGCTACGTTTAAAAAA ATATACAGGCCATAGTGCAATGTACCTCCCTGTATATATACATCATGTGT AACATCATAAGGAGACTGAGGTACAAAGGGCCAAGTACTGGGGCTGTG GGTAACCTATATCAGGACCA
54	HPV66 [320bp]	GATTACCCAGCATATGCCATTATTATGGCCCTGTGCACGTTGCAACCA ATAAGGTTTATTAATAAATTTGGGCCCTCAGAGGTAATCATGGACCCACTAG GAGTAGCAACATATACAGAAGTGGGAGGAGGGTCCCTGCCATTGCCACCC TTCCAATACAAATCTGTAGGAATGGCTTCCCAACATTACCTGCCCTATTA AAGTAATGTTGGCAAAACATTTGTTCCCTGCGTAAGTAAACACATAGA ATCCCCATAGGCATCTGCAGACATTTTATAGATAATCAGGATATTTACATGT AGATTGTACAATGTCCAAT
115	HPV66 [320bp]	GCGTGCCTTGTAATAAATAATTTAAAAATACTTAAAAATGAAATGAAGTCG ACCCCTTGATATCGTAAAAATTGCACAATGGGTTTCCAATCACCAAGCCA AGCTTAATTTCGGCTTCCCTTCATCTACTTTACTACATATATGCTTTATCCAC TGGCACATATTCATTTGCTGTTGCTGTGCCCTTTTATAATGTCTACACATTA TTCCACAATCCTTTACATATTTTGTCTGCATATTACTTTTAAAAATGCTTG TGCATTACTATCTATGTCTGTAGTTGTGCATATAAAAAAGGCAATTTGGCT ATCATCTGTTACG

10

20

30

40

【表 2 - 9】

55	HPV68 [1930bp]	GAGTTTGTGTTTTTGGTGCATGGGGCACCTGCGGTGGTATGGGTGCGGG TGGTGTCTGTAGGTCGGCAACAGATTTCAGTAGTGGATACTTTCCGTCAG TGGTACTGCACATAGAGTCAGGACAATGGATTATGTTGCCATTATAATGC ACGTCCCATTTCCTACTAGTCCCATATAGTTGTGCATCCTGCATAAACCTTT CGTAATAGGTTTTTTGTGTTTCATACATATAATATACACCCAGTAATCCA CACGCCCTTGGGTTTTACACCATGTGTCTGTACTGTTTTTAAAGTAAATGT ACCCACACTACATAATGCATTGAGTTACTCTTGTCCCCATCATACCATAC TTCCACTGTAACACCATGTTTTTAAACATTGCTTTGGCTTGTATGCCAT AGTTCACTACTGTGTCCCTTAATGTCCACTCCTCTGCACTATATGCAGTTT TAGCAAGGCTCTCTAGTGCCATCTGCAGTTCATAGCTTGATATGCTTTAG TTTTTGAAATGTTTACAGCGCGGCACCACCTGGTGGTCAATATTATGCATAC CACGTTCTCGTGTGCATAATATATTGCATTTCCAGTGCACACAAATCC AATAGTTAATATGGTCTGTATACATTTACTGTCTGTTCATAATGTTCTAA TATTTTCTCCTGTAACACATTTAAACGTTGGGAAAGTGTTCATCATTGTC TCCTTCATCCTCGTCTGTGCAGTCTAATCTGCACCAAGTCTTTTCAAA AAAACATTTCCAGTTTTTATCATTGATTGTATACACTGGGTTCTGTTTTG TCAAATGGAAATGCATTAGGAAATTTAAACACGGTTAGTCTACTATGTAA ATACGGCCACCTATTGTCTTCTACAGGGTATGATTGGATGTTATTAGCAT TGGTGGACACTTTATTGTATTAGGTGTCTGTGTTTTCTATAAATTATT GGGTTACCATCTAATGCATTCTCATGTAATTATCAAAATATGACCAGCAT GTACCTGTGCGTCATCTAGCATGGCTATTTTGCATCTGCAAGTGGCTCT AACCAAAAGTGACTTGCTGAATTTACATATGAAATTATTGTGCCTTGTAAA AAATGTATAAGGCTCATGCAAAATATGACTTGCTGTATTGGCGGCC ATGTATAACTATACAATTTTCGTTTTGGCGTGCCTTTTAAAAAATCTTTAAT GGACATAAAATGTTATAAATTCAGTCTTGAATCTTAAAAATTTGTACA ATTGGCGCCAATCACCGCCTTCGTACATTTACTGCATCTAAATTTAATC CATTGTGGCATTGTCTATTGTCTTTTTTGGCGCCGTTTGTAAATGTCTACACA TTGTTGCACAATCTTTACATATTTGCTTGACAGTTGCTTTTTAAAAACGC TGCAGCATTACTATTACAATCTGCTAACATAGCATATTGAAATGCTATATC ACTGTCATCTGTTAACTCATTATCAAAATGCCCATTTGACCATGTCTGATAA ATCAAAATACACTATCATCTATTCCATGTTGTATTATGGTTAATCTTTTATC CATTCCGGCGTGTGCGCACACACCTCACTAATATTAGATATTCCTGTTCTA TACCAATATAATGCTGCAACAGGGCTACGTAATTTTGGTGGCTGCAAAAG CATACAGCTGTCTGGAACATGCAACAATGTACTCAATCCTTTTCTACTGT TATTCTATTTTTTCCACATTGTATCTTATTAGCATTAGTATTAATATTCCA GTTTTTGTATCTAAACATTGTATATGGGTATACAATGCATATTGTTTAATTA GTGTTTTAAACCCTTCCGCAATGGTTGGATTACTCCAAATATTGCTGCTA CCCAGTCTGTACATGTGGTTTTTACTCTTTTAAAT
56	HPV68 [450bp]	GCAATAACTGTTCCCTACGTAAACAAAAAACATACTGTCTCCATAC ACATCTGCAGACATTTGCAAATAGTCAGGATATTTGCAAACAGATTGACA TATATCCAAAGGTACCTCGCTTTTCGTTTCTGTAATGTACCAAGTCCAT AGCACCATATCCTGTATCAATCATATCGCCATCCTCAATAGGAGTATTAC CAATTCCAATGGGGGACAGTCCCCTTGTGTACATTGGTAGGCTTACAAGA TTTACCTTTGGCCAGTGTCTGCAATAGCAGGAACACAGCCTATAATACA CAGCTGTGTTTGTACAGTCCACTGCAACATTGTCCCTACTGTCTTTAGG ATTTTTATTAGAGGAAAACGGGGAATTTTCAGTATCATCCAGCCTATTATA TAGTGGATGCCCCACTAAGGCCAACGCCCAATGGCTGCCCCCTACCT
57	HPV73 [640 bp]	ATGTTGGCTTTGGAGCCATGGATTTTAAAGCTTTACAAGCAAATAAAA GTGATGTACCTATTGATATTTCTAACACTACCTGTAAATACCCAGATTATT TAGGCATGGCTGTGATCCCTATGGTGATTCCATGTGGTTTTATCTTCGTA GGGAACAAATGTTTGTTCGACACTTATTTAACAGGGCTGGTGATACCGGT GATAAAATCCAGATGACCTAATGATTAAAGGCACAGGCAATCTGCAAC ACCATCCAGTTGTGTTTTTATCTACACCTAGTGGTTCCATGGTTTCTTCA GATGCACAGTTGTTAATAAACCTTATTGGTTGCAAAAGGCACAGGGACA AAATAATGGTATTTGTTGGCATAATCAATTATTTTAACTGTTGTAGATAC TACTAGAAGCACTAATTTTCTGTATGTGTAGGTACACAGGCTAGTAGCTC TACTACAACGTATGCCAATCTAATTTAAGGAATATTAAAGACATGCAGA AGAGTTTGTATTACAGTTTGTTCAGTTATGTAAAATTAGTTTAACTACT GAGGTAATGACATATATACATTCTATGAATTTACTATATTGGAAGAGTGG AATTTTGGTCTTACCCACACCGTCAGGTAC

【0152】

次いで、プラスミドから線状プローブを生成する。これは、プラスミドを例えば制限エンドヌクレアーゼで切断すること、及び／又はプラスミドの一部分を、例えば配列特異的ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅することを含むが、これらに限定されない多数の方法で達成することができる。

【0153】

一実施形態では、プローブを、（１）制限エンドヌクレアーゼを用いてプラスミドを線状化した後、（２）ポリメラーゼ及びポリメラーゼ特異的プロモーターを用いてプラスミドのプローブ部分を増幅することによって生成する。例えば、線状化RNAプローブは、図22～図29のプラスミドから、初めにプラスミドをXhoI制限エンドヌクレアーゼで切断し、次いでHPV核酸に特異的な部分をT7 RNAポリメラーゼで転写すること

10

20

30

40

50

によって生成することができる。これを図 3 1 に示す。

【0154】

3. LR-HPVとの交差反応性の試験

切断プラスミドから生成した *in vitro* 転写 RNA プロブセットを、プロブセットに対する実施例 1 に記載の方法に従って試験し、LR-HPVとの交差反応性が低減又は排除されているか否かを決定した。第 1 の欠失後も顕著な交差反応性が依然として明らかな場合に第 2 の欠失を作り出した。欠失プライマー配列を以下の表に記載する。

【0155】

10

20

30

40

【表 3】

HPV	SEQ ID NO	SEQUENCE
26X	58	5' GTATTCAATTGCCTGCCATGCCGTGTAACACTGTTACATGTGTGTC 3'
	118	3' GCTGACGTTACGATATACATAAAGTTAACGGACGGTACGGCA 5'
26XX	60	5' GTTTCGGCCGTGTAACCAGTATGGCTTATTAAATAGTTGT 3'
	119	3' ATCCCTGCAAACCACGGATCAAAGCCGGCACATTGGTCA 5'
33X	62	5' TTTATCTAATGTCTTACTAATTCATATAAACTTATTCAT 3'
	63	3' ACCGAACATGATATGACACTAAATGAATTACAGAATGATT 5'
52X	64	5' GAAACACATATGGAAGGAAATTTATTTACTTGGTGAGTGT 3'
	65	3' GTGTCGACAATTTATATGGTCTTTGTGTATACCTTCCTTT 5'
58X	66	5' TAGACCATTTATTGAACATTGGAACTAATACGCATGGAG 3'
	67	3' CATTCAAAATACCTTAATCAATCTGGTAAATAACTTGTA 5'
39X	68	5' AATGCTAATAACTTACTACCGAATTATCAAACACCACCGC 3'
	69	3' TTGTTCTCATGATTAAAATTACGATTATTGAATGATGG 5'
39XX	70	5' GTCACCCACCTATCAATCATATCACCATCCTCAATAGGGG 3'
	71	3' ATGTTAACCCGTCCTTACCGCAGTGGGTGGATAGTTAGTA 5'
56X	72	5' CAATTTACAACCGTGGGCAACCAAGACGCCGAGTATCC 3'
	73	3' GTCCTGAACAAATTTTCATCGTTAAATGTTGGCACCCGT 5'
56XX	74	5' ATGAATTACAATATAAAATTTGGGATGTAACTTACAGGA 3'
	75	3' GGAATCTGTACACCTCCTTATACTTAATGTATATTTAAA 5'
66X	76	5' AGGAACTATTGAAGGACAACATATAGAAGTGTGGTTTGAT 3'
	77	3' TTGTGGTTGTGTGGTTAACGTCCTTGATAACTTCCTGTTG 5'
66XX	78	5' CTGAGGTGCCAGGTATTTGTACTGTTGTGGATACTACCA 3'
	79	3' CGTTAATGTCCTTAGTTTCCGACTCCACGGTCCATAAACA 5'
68X	80	5' CTGGTACGTACGACGTCGTCTCGGAAGTATCCCAGACAGT 3'
	81	3' TACCTAACAGTAAATTACTGGACCATGCATGCTGCAGCAG 5'
68XX	82	5' AAAATGCCTGATTTCACACCAACACAGGCCCATACCATG 3'
	83	3' TGGTACGGAGGGGATAAGG TTTTACGGACTAAAGTTGTG 5'
73X	84	5' ATTGCTAGCACAGTAGAGGTTAGATATGACTGTGAAAAGG 3'
	85	3' TCCTTATTACGTTTTCGTCGTAACGATCGTGCATCTCCA 5'
73XX	86	5' TTCCTCTAAACTATCATATCACCATCCTGTATAGGGGTGT 3'
	87	3' CTACAATGTATAGATATACAAAGGAGATTTGATAGTATAG 5'

10

20

30

40

【0156】

選択したプラスミドのうち、1つ（X）又は2つ（XX）の欠失に含有される欠失配列の総量は、およそ1.4 Kb～2.4 Kbの範囲であった。最終プラスミド構築物は、単一の欠失を有するHPV33X、HPV52X、HPV58X、並びに二重欠失を有するHPV26XX、HPV39XX、HPV56XX、HPV66XX、HPV68XX及びHPV73XXを生じた。プラスミドの制限酵素地図及び得られたプローブを図10～図18に記載する。例示的な欠失を上記の表2に示す。

【0157】

50

4. HPV 26 の二重欠失のための例示的なワークフロー

二重の戦略的に切断されたHPV 26 プラスミドを生成するこのワークフローの一例を図19及び図20に示す。GenBankアクセッション番号X74472によるHPV 26 配列を保有するpBluescript II KS (+) プラスミドを、出発物質として使用した。メチル化の後、以下の欠失プライマー対を用いてプラスミドを増幅する：

フォワードプライマー（配列番号58）：

5' GTATTTCAATTGCCCTGCCATGCCGTGTAACACTGTTT
ACATGTGTGTCTC 3'

リバースプライマー（配列番号118）：

5' ACGGCATGGCAGGCCAATTGAAATACATATAGCATTTGC
AGTCG 3'

【0158】

この増幅の結果、プラスミドの1510塩基対部分が欠失し、E1領域及びE2領域の切断が生じた。次いで、このアンプリコンを、活性形態のMcrBCヌクレアーゼを保有するDH5α（商標）-T1^R大腸菌の株（Invitrogen Corp., Carlsbad, California）にトランスフェクトし、戦略的に切断されたHPV 26 X プラスミドを生成する。

【0159】

次いで第2の増幅は、以下の欠失プライマー対を用いて実行される：

フォワードプライマー（配列番号60）：

5' GTTTCGGCCGTGTAACCAAGTATGGCTTATTAAATAGT
TGT 3'

リバースプライマー（配列番号119）：

5' ACTGGTTACACGGCCGAAACTAGGCACCAAAACGTCCC
TTA 3'

【0160】

この増幅の結果、プラスミドの490塩基対部分が欠失し、L1領域の切断が生じた。

【0161】

次いで、このアンプリコンを、活性形態のMcrBCヌクレアーゼを保有するDH5α（商標）-T1^R大腸菌の株（Invitrogen Corp., Carlsbad, California）にトランスフェクトした。McrBCがメチル化した鑄型を消化する一方で、大腸菌によってアンプリコンが環状化され、戦略的に切断されたHPV 26 XX プラスミドが生成する。

【0162】

HPV 26 XX プラスミドを制限酵素地図化し、構造及びサイズを確認した。プラスミドを、（1）XhoIのみ、（2）XhoI及びNotI、（3）BamHI及びSpeI、並びに（4）HindIIIで消化した。結果を図21に示す。このプラスミドは下記表3に記載の特徴を有する。

【0163】

10

20

30

【表 4】

	名称	開始位置 (ヌクレオチド)	終了位置 (ヌクレオチド)	コード鎖
コード配列 (合計 7 個)	アンピシリン 耐性遺伝子	1233	2093	Complementary 相補鎖
	L2	2878	4296	Complementary
	切断された E 2	4622	5521	Complementary
	E 1 / E 2 欠失 (1510 bp の欠失)	5542	5542	Not Applicable 該当なし
	切断された E 1	5538	6093	Complementary
	E7	6101	6415	Complementary
	E6	6422	6860	Complementary
	L1 欠失 (490 bp の欠失)	7809	7809	Not Applicable
	切断された L1	7796	8818	Complementary
混合 (Misc.) 特徴 (合計 1 個)	pBluescript II KS(+)	1	2891	Not Applicable
原核生物プロモーター (合計 1 個)	T7 Promoter	2855	2874	Not Applicable

10

20

【0164】

実施例 2：子宮頸部サンプル及び HPV プローブを用いたアッセイ

合計 324 個の医師によって採取された子宮頸部サンプルを、洗剤ベースの回収媒体に回収し、高リスク HPV の存在について試験した。

【0165】

1 ml のサンプルをボルテックスしてサンプルをホモジナイズし、50 µl アリコートを取り出し、アッセイマイクロプレート内の 25 µl の変性試薬 (1.75 N の NaOH) と合わせた。これを振盪して混合し、70 °C で 30 分間インキュベートして一本鎖 DNA を作り出した。これに、16 個の HPV 型に対する RNA プローブを含有する 40 µl の中和バッファ (プローブ希釈剤; 2.2 M の BES、2.6 % の PAA、0.7 N の NaOH 及び 0.09 % のアジ化ナトリウム) を添加して中性 pH を生じさせ、68.5 °C で 10 分間インキュベートした。

30

【0166】

その後、10 µl の抗体コンジュゲート常磁性ビーズ (およそ 1 µm の Thermo Fisher 製カルボキシル化 SERADYN ビーズ) を反応混合物に添加し、68.5 °C で更に 30 分間インキュベートした。互いに相補的な RNA プローブと DNA 標的分子とが結合し、RNA-DNA ハイブリッドが生じる。次いで、常磁性 SERADYN ビーズにコーティングした RNA-DNA ハイブリッド特異的抗体によってハイブリッドを捕捉させた。

40

【0167】

インキュベーションの後、常磁性ビーズを磁場への曝露によって液相/上清から分離する。デカンテーションによって上清廃液を除去し、35 µl の検出試薬 1 (アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたモノクローナル抗 RNA-DNA ハイブリッド抗体を含む二次抗体コンジュゲート酵素) を添加し、45 °C で 30 分間インキュベートする。二次抗体は、RNA-DNA ハイブリッド抗体コンジュゲート常磁性ビーズ複合体に結合する。結合していない二次抗体を、洗剤ベースの洗浄バッファ (40 mM の Tris (pH 8.2)、100 mM の NaCl、0.1 % の Triton-X 100、及び 0.09 % のアジ化ナトリウム) を用いて洗い流した。

【0168】

50

基質（DCP Starと呼ばれるABI製のジオキセタンベースの基質、Emerald IIエンハンサーを添加）を洗浄したビーズに添加すると、高リスクHPV DNAを含有するウェルは、照度計によって検出可能であり、RLU（相対発光量）で測定される光を生じる。1 pg/mlのHPV DNAを含有するアッセイ陽性標準を用いて、陽性カットオフを確立する。全てのサンプルのRLU値を陽性標準のRLU値で除し、RLU/CO（カットオフ値に対するRLU）を得る。結果をRLU/COで報告し、1.0以上の値を陽性とみなす。

【0169】

実施例3：安定性試験

初期試験に続いて、サンプルを室温及び33℃で貯蔵し、サンプルの安定性を観察した。回収後21日目まで試験を行った。図3及び図4は、各々のサンプルのRLU/CO値が21日目まで経時的に変化しないことを実証する。ベースラインの結果と、21日間の貯蔵後の結果とを比較する2×2分析、及び散布図分析によって、RLU/CO値の経時的な直線性が実証された。これらのデータに基づいて、回収し、室温又は33℃で21日目まで貯蔵したサンプルが、ベースラインでの試験と同等のRLU/CO値をもたらすと結論付けることが可能である。貯蔵温度に対するRLU/CO値の線形混合モデル比較を用いると、P値は室温については0.8803、33℃で貯蔵したサンプルについては0.9517であり、これらの値が同等であることが示される。

【0170】

実施例4

本実施例では、検出限界（LOD）、C₉₅濃度、並びに再設計したHYBRID CAPTURE化学、並びに高リスク（HR）及び低リスク（LR）のHPVプラスミドDNA構築物を用いた交差反応性実験について記載する。LODは、ウイルスが検出されるか否かを特定するのに必要とされるコピー数として定義される。C₉₅濃度は、95%の時間で検体のシグナルが推定臨床カットオフを超えるか否かを特定するのに必要とされるコピー数として定義される。

【0171】

HPV16又はHPV18、及びHPV45のDNAとハイブリダイズする完全長相補的RNAプローブを用いた2回の独立したアッセイを行った。HPV16、HPV18及びHPV45のゲノムDNAの段階希釈、並びに相補的RNAプローブによる試験を用いて、LOD及びC₉₅濃度を決定した。1反応当たりおよそ1×10⁷コピーまで希釈した、LR及びHRのHPV型に由来するゲノムDNA、並びにHPV16、HPV18及びHPV45のRNAプローブによる試験を用いて、交差反応性を決定した。

【0172】

表5：検出限界及びC₉₅濃度

【表5】

コピー数	プローブ	HPV 16	HPV 18/45	HPV 18/45
	標的	16	18	45
	LOD	564	604	533
	C ₉₅	8,464	8,464	7,444

【0173】

表6：高リスク型の交差反応性

【表 6】

H R 標的型	シグナル対カットオフ比	
	HPV 16	HPV 18/45
→ HPV 16	172.47*	0.13
→ HPV 18	0.22	93.87*
HPV 26	0.14	0.16
HPV 31	0.19	0.19
HPV 33	0.15	0.21
HPV 35	0.23	0.20
HPV 39	0.15	0.19
→ HPV 45	0.19	146.92*
HPV 51	0.15	0.24
HPV 52	0.15	0.20
HPV 56	0.15	0.20
HPV 58	0.15	0.19
HPV 59	0.15	0.20
HPV 66	0.15	0.20
HPV68	0.15	0.27
HPV73	0.20	0.15
HPV82	0.14	0.15

* R L U / C O > 1 の場合 = 陽性

【 0 1 7 4 】

表 7 : 低リスク型の交差反応性

10

20

【表 7】

H R 標的型	シグナル対カットオフ比	
	HPV 16	HPV 18/45
HPV 1	0.32	0.34
HPV 2	0.34	0.37
HPV 3	0.39	0.39
HPV 4	0.27	0.26
HPV 5-9	0.28	0.34
HPV 5-48	0.20	0.23
HPV 8	0.27	0.33
HPV 30	0.26	0.27
HPV 34	0.17	0.20
HPV 40	0.35	0.34
HPV 42	0.15	0.15
HPV 44	0.21	0.33
HPV 53	0.28	0.35
HPV 61	0.42	0.48
HPV 62-116	0.58	0.15
HPV 62-177	0.24	0.14
HPV 67	0.23	0.29
HPV 69	0.46	0.41
HPV 70	0.14	0.15
HPV 81	0.55	0.51

10

20

【0175】

子宮頸部検体を外部臨床現場で採取し、日常的な臨床手順によってd i g e n e回収媒体（DCM）に入れた。検体をハイブリッド捕捉H R H P V D N Aスクリーニングアッセイを用いて試験し、反応性の検体、及び非反応性の検体のサブセットを、ハイブリッド捕捉H P V 1 6 及びH P V 1 8 / H P V 4 5 ジェノタイピングアッセイを用いてアッセイした。反応性の検体のサブセットを、同様にG P 5 + / 6 + P C R に続くL u m i n e x 検出によるH P V ジェノタイピングを用いて評価した。本明細書中に記載の洗剤ベースの回収媒体のいずれを使用してもよい。例えば、媒体は1. 0 %のN P - 4 0、0. 2 5 %のデオキシコール酸ナトリウム、5 0 m M のT r i s - H C l、2 5 m M のE D T A、1 5 0 m M のN a C l 及び0. 0 5 %のアジ化ナトリウムを含有し得る。

30

【0176】

【表 8】

代表的な臨床検体データ

ID	HR Screen RLU/CO	HPV 16 RLU/CO	HPV 18/45 RLU/CO	高リスク遺伝子型			低リスク遺伝子型				
3350	366.8*	156.7*	0.28	16			Neg				
3696	283.9*	0.50	0.20	35			Neg				
3631	278.0*	328.2*	0.20	16			40				
3419	211.2*	0.12	0.15	52			Neg				
3711	205.2*	0.13	0.22	56			Neg				
3355	158.2*	0.16	0.15	51			74	83	91		
3718	154.8*	0.19	117.0*	18			Neg				
3463	141.8*	0.13	0.15	66			Neg				
3514	124.8*	106.8*	0.17	16			Neg				
3637	65.8*	0.17	0.16	68			Neg				
3576	50.6*	0.13	0.13	52			32	42	62	67	90
3656	47.3*	0.14	0.22	31			54	72			
3415	10.2*	0.13	0.15	82			28	85	86		
3366	9.6*	0.11	5.4*	18	35	45	42	86	87		
3434	8.6*	0.14	5.2*	33	45		72	87			
3229	8.4*	15.7*	0.14	16			Neg				
3705	0.25	0.27	0.10	Neg			Neg				
3239	0.25	0.13	0.12	Neg			69				
3717	0.23	0.17	0.17	Neg			Neg				
3719	0.22	0.10	0.13	Neg			32				

Screen : スクリーニング

Neg : 陰性

【0177】

実施例 5

本実施例は、8 個の低リスクHPV型について、戦略的に切断されたプローブカクテル（B17XX）と比較した17完全長（B17FL）プローブカクテルの交差反応性の低下を実証する。低リスクHPVプラスミド30型、40型、53型、61型、67型、69型、71型及び81型を、試験される濃度：0.5 ng/mL、1 ng/mL及び2 ng/mLで標的として使用した。結果を下記表9にまとめる。

【0178】

【表 9】

	B17 FL			B17 XX		
	0.5 ng/mL	1 ng/mL	2 ng/mL	0.5 ng/mL	1 ng/mL	2 ng/mL
HPV 30	0.62	0.43	1.05	0.29	0.37	0.58
HPV 40	0.31	0.29	0.45	0.24	0.31	0.45
HPV 53	0.84	1.39	2.44	0.77	1.23	1.99
HPV 61	0.40	0.49	0.81	0.33	0.39	0.72
HPV 67	0.43	0.73	1.25	0.27	0.43	0.62
HPV 69	4.01	7.90	14.97	0.73	1.08	3.09
HPV 71	0.24	0.27	0.28	0.20	0.20	0.22
HPV 81	0.37	0.48	0.90	0.21	0.26	0.49

【0179】

読み取り値はRLU/COで示す。1以上のRLU/COを有する全ての反応を、高度の交差反応性を有するものとみなす。明らかなように、全ての場合で、完全長プローブカクテルは、対応する戦略的に切断されたプローブカクテルよりも高い交差反応性を示した。加えて、以下の完全長プローブは高度の交差反応性を示した：2 ng/mLでのHPV 30、1 ng/mLでのHPV 53、及び0.5 ng/mL未満でのHPV 67。この高い交差反応性は、戦略的に切断されたプローブによって低減又は排除された。

【図 2 - 2】

ccatacttcccgatcttgataaactctatgatacttttgggtctctgtcattatataatatacccaatagtcacacacct
clgtttacacactgatgctatatttttataatataatagaccccaataacatgactgacatgacattgctcccaataacaca
ctccacatgactgctgttttataaactggtttggtgtgtatccacacatgactactgagtttttataatggtccctctgtat
ctgactggtttgcaacactcttctagctcctcgtcgtaactgattgattgcttcaatttgaatgtttatgttggacacact
ggtgtgcaaatgatgcaatgcaactgctctcgtctcgtcgtacataaattgattttccattcgcacacacttcccaataaattgattgata
tattgattctgctgtctatagattctatgttttggctgtacacattaaactggttgaagtggttttcaattgctctccatcct
cgctcgtcgaagtcaatcgtccacaggttttccaaaaaaactttccagtttttttcatgtttgtacactggatcctgtttgg
tcaattggaatgacttgaagaattttaaactgtttgctgtacagtaaatgacttcccaactgctctccacaggtattgattgg
aggtttataatagtggtgacattctttgttgatataatcttcccaactattgacacctcctatgacatttcttataat
atatagaattatgacgaagtgaccgttgcgtgtatctcauatgctgtgtgtcattgcaatgcaatggtgttgcgaatggtggt
gtgggtttacatagaatagctgtgacctgtgcaaaaactgontagtgctcatcaaaaatggttgccttctgtatgcgaagcccat
atatactatacagtttttttggagtaacctttaaactctttatgacataaaaagataaattcttcttctgatatcttaaga
attgactatgggtccagtcgccctcatcacactttacacacattaaatttatacttgagacatggacattgctcttttggct
cggttgatgtttacacatgttgcaacatttttcaattgttggcgagttactttttaaaggctgcagcattactgttcaact
gctaacctgataatftaagtgtatgacttcatcagttatcttgcattgcccattgacacattgacatgctgafgagtaaalaca
ctatactatctcgtgtgtataacagttatctgttgcacatttggcgatccgtgttccacacataatattgatactcgtggc
ataccataatgctgtctacagggtggcgagtttgagggcgagacatacaacttttggacatgttaacatgtactta
atcccttccacagtaacccattttccacattatctat**ATTAGCACTTAAAAATTAGTACTCCTGTG**
TTTGTGTCTAAGCTTTGTATATGTGTATATAAAGGCATATTTTGTGTTAAATGTT
TAAATCCTTCTGCAATAGTTGGATGTACTCAAATATAGGCTGCCACCCAGCT
TGTACATGTTGTTTATCATCTTTAAACGTCAGTACCAGGTGAGTAAAGGAIA
GTCCATATGTTATTTTAAATGTTGTGACATTCAGCTTTTGTATTGGATT
GTAAACAATAATTTAATTTGTGCGAGTTGGAGATTGGGATCTCGTGGTTTCTACTA
TCTATAGCACTATCCACACTACTACACTCTCTCCGCTACACTGCCGCCATGTTT
CCCTTCAGCATCCCCATTGTATTATGTGCTACAGTACTCTCCACTTCAGC
TGTTTCCACTTCCATATGGCATATCCGGTGTCTGGCAGCGAATACACCGTT
GTGTGGCTGCTAGCTGTACTACATTTAATGAATTCCTGTAGTGTTCCTGGT
TATTCCTGCCTACTTTTCTTCCATACGGTCTAGTGTGCCACTGCTGTCTGTAT
ACTTTGCTTTAAAGCCACGCATCTTGTGCTATCTCTTTTGGGCTCTGTGCAAT
GTAAAAATACCTGTGCTGTCTCACGCTCTGCTGTACACAAATATCTGTGGAA
TCATCAATAAAGTGTGCCAGGTGTGAACCTGTATCTGTGTGATTTTCTCTCT
ATCTCCGACACTGTGTGGCGCTGTGTTTATCTACTACTATTCCTGTACTAGAAA
CCATCGTTACATCCCGACCCATCCCGCTGTGTACTCTACGATTGGCCATAG
CAGGTTACTGTTTGTGAGTGTGCACACTGGACACACAAATCCCTAGTGAGTC
CATAAAGCTGTGCTGACAGTGTGACATTCCTCAAAATGCTGATGATACCA
CTGCGAGTGTGTTGTCTACTTACACTACACAGCAACACTGCATTTGTGTGACGCTGT
GGTTCATCCCGCTGGCATCTGTGCTGTGTTGGTGATTAACTGCATGGTGGG
TTACTCTATTCTACTCTGACTCTCTTAATGTCTGTGCATACAAAGGTCAC
CGGCTGTATTCTATCTAAGGACATAAATCTAATACAAATTTCTGCAAGGTGG
GCTTTGGTGCACGATATCTGATGTTATATCTGGGTTTCTCTTCTGTTTATGTC
CGGGTCTCCCGTTTGTGGTGCAGCACCGTGGACAGCTGTCTGTATAGCTCT
CTGCTATTTATGCTATCTTATGAGTGTGCTTATGAGTGTCTTAAATTTCTGCT
GACACACGGGTTTACAGAACCACTGACCTTTAATAAAATATATATACTTT
GTATTAGTTATATTTTCTAATGTATGTATACACAGCGTCCAGTGAATATCG
TAGTCCCGTATTATAGCATAAAATTTTATACATGATTTGGCATGCGAGCTAGTG
GTCTCCCGTCTTATACTACATATAAATCTAAGTCAAAATGCAAAATCTATACCC

【図 3 - 1】

HPV52 Deletion Probe Template (SEQ ID NO: 106)
HPV 52 欠失プローブ模板 (配列番号 106)

CTGTAAAAAATATGGAAAACAGTTTACGCCCTGCCGAGTAGTAAAAAATACT
AGGATGTAAAAAATAATCTGTACCATCAACAATAATAGATGTAGATGGAGCT
GTAGGGGCTATATAGCAATAAGGAGTATGTGGGCTGTATATACGAAGTCAATG
ATGTCAGGACCTTGACTAAATGGCATATGTTGGGTGTATATACAAAGTCAATC
CACTATTAAATAGGTACAGTGAAGATTTATTATGGGTAGAAAGTGTGGAAGG
TAAGTGAAACGTTGGGTTGCTGCAAAAGTCTGCATACACATCATACAAACCA
TCATTAAATAGTGAAGGGGACACAGACTGTGGTATAAAGGTTGCAAAATCTA
TGTCCTTCTGAACCTTCAGCAGGCTGGATAGGACTAATATCATGATATAATGT
ACCGTGCCTCAATTTTGTCTTCTCACTACGCTGTACGTAGGGTGGCTTATTAAC
AAGCTGTCAAACTCAACGATACCTCTCGAGAGGGTTAATGACGGCTTACG
AAAGCTATAATGCTCAAAAAATCAGGATCGGTCGACAGTAAAAGTTGTGAAC
GATCAAAAAATATAGTTTCACTGTGTATCAACGCCCTCAAAAAACAGGATGTGA
TATGTTACTAATTTCTGTGGTGATGACATAAAGCAGGGTGCATCTACCTTAAC
CTGTGTGTGGCCAGCGCTATATAAACCAAGGCTGTGCTGTAGGGCGAGACCT
GGAATAGGTGTACTGTGTATACATGCTGCTGTCTAGTAGAGGTAAACAAATG
TATCCATAGGGATTTCTCTATAGGTGTGTGTACTAATAGTTGGCATAGAAAAC
AATACATGACCAAGATGCTTCTCGAGGTGGCGGGGCTGTATTATAGATGGTT
CAGTGAATGTAGGATTTAAATGTGGAACAGTGAATGTGTACAGATGATTACC
TATAGATGTTACATTAATATTGCGAGGATATTATTGTACAGATGTTGAACAT
CAAAACCTGTGTGATGGAATGTGTGAGGACAGGTGGCCGACGACTCAATAAA
TGTGTTTCTTCTATCATAGAACTATAGATGGTTCTAAGGACCAATGGGTT
CTACAGTTACAGGGGGACGAATGTTGGACAGTGGTATATCACTAGTGGGAGG
ACGAGTGGACAATGGCACATAGCCTGCCCTACCCAGAGCCTGCACCTGTA
CCTATACCCAACCTCCAAAAAACCCCTTAGGCTGCCATATTTTAAAAGTT
GATCTGCAATAGTTGTGCTTCCACTTTAGGAATAAACCTGGGGGGCGAGTT
GCCAAGGCTTTGCTGTTTGTATATAGCTGTGTGTGAGAGGACGCTTTGTGCC
GTGTAGAGCGGTGTGATCTATTGGCGACAAGTATTTAAAAATATAAAGTATA
TTTATTAGACAACACTACAAAGTGAAAGATATTTTGCTATATGTGCTAGTA
GCCAATCTACATGTACAGTTATTGCAAGTTGTGGCAAACTACTGTGCATGACAGT
GAATACAAAAAATGTGGAATAATAAAAAAGTGAAGTCAAAAAAACACTTT
TAAATGGTGACCAATAGATACCCATAGCAAAAAGCAGGACACCAACACCTG
CGCATACACCGATATAGTAGCAAGAGGCTACAGCAGTGCACAAAAACAC
CATAAGCAAAATAAAAAACATCAATAATCTCACTACATGTTTATATACA
CAATAGCAGCAATAATGCTGTGTGTGGTGTATTACATACACATACATAT
ATACATATGTACAAATATACAAATGACATGACACCTTGTATAACTTGCACAGT
ATTGGTATTTTAAACAGTTTAAAAAATTTGTGACGCTGTGTGTTCTATCACTGTA
CGTTATTGTTTAAATACCTAGTTTATTTTGTATCTTACTTACTGGTCCAATG
CCAGGTAGATGAATTTGAACATACAAACTTTTATGTGTTTATACCTCTATC
TAAACATTTTAAACTATTAGGATACCTTTTATGGTGTATATAGGTGACGTA
CAAGTTGTATGTGCACCGCTCTTTTGTGTGCACATGTTGCAAGTGACAG
TCCCGTGTAGTACTGCCAGGATGTGTGCCCGCAAAAGGTTGTGGGGT

【図 2 - 3】

TCGGTTTGCTGTAGTGGTCTGTGCAATAGACACAGGCTATTGTAATGTCCTG
CAAGGTGGTGTGCACAGGTGTGGCAATTGTGTAGGCGCTGTCTG
CAGGATTTGTGAATCGCGCCATCGGTTATGGACAGAAACCTGTGACTCGGTTT
ATATCCACCGATTTCCGCTGTACCCTTTCCGTTTCTCCCTTTTTTAAACAA
GATACTTATAAAATGTTATAAGTAAAGTATAGGTATGTATGCCCACTTAT
TCGGTTGCATAAATATTGTGTGCTACATTAGTCACTTGATATAACTTATCTG
TAAGACACATTCTGAATCAAAAGTAGTTATACAGGCCAACATTTATTAATA
AGCAAGTAAAAACAGCTTAAATATATGCTTAAAGCAGTGTATTATATAGG
GTGGAGATATGGATGTGTGCCAAAGTGTGTGCAGTGCACCTGGACAGGAT
ATGAGTAATAAGGGCGGCCAGTAAACCTGTACCACTGCCAACTATGCAAGG
TGAACCTAAGGTAAAGACATGTTTGTGTGAGAAAGGTGGTTTCTCACTAGTT
AAAAAAATGCTCAACCCACGACCTCTCGGTGCCCAAAAATGGCGAAGT
ATAAAATGTGAAACCGGTACAAACATGTAAAAATTACATATATAGGTAGTAA
ACACACCTTAGGGTAGGGCATATAGATTATGTATGAAATGTGTGCAGACTTAT
TATATGTAAACAAATACACTGTGTAGTACAGGGGTGTGCATCACACATGAA
ACTGTACATACACTTATTATTAACAAACACATATACACATCACTTACAAACAT
ACACATATACACTCAACACATAAGGAAACAAACACATACACACACATAAC
AAGGCATACACATGCATTATTAGACACACGTTTACGTTTGTGTTTAGTACT
GAGGACGAGGAAGTGGATGCACGAGGCCCTTTCGGGACCTATGTAGGG
CGCTTCGGGACCTTCGGCTGCACAAATAATTTACGTCCCAAAGGGAATGTAT
CAAGTTCACAACTAACTTTTCCCTTAAGTCAACATGACATGATTAATGACCG
TCATATGGATTTCTTTTTCAGTGTGCTGGAGCATCTTTTGACATGTAAAGCT
GCAGACTGTAGGTACTGTAAAGTGTCTACCAACTGGCGAGTGTGGAGGAG
CTACAGCAAAATCCAAATGTCCAATATAGAGGAATTCATAGTGTGAATATA
AGACATAACACTAGTTGTTAATGTGACAGTACACAGTGTGAATATAAAATGT
AAATCACTACTCTCCACGTGGCTGGTATATTCCTTAACTTAGAAGGATCATA
TGTAGAAGGTATGGAAGACTCTATAGAGGTAGATAATGTAAAGTTGTACTA
CGGTATAGTGTCCACACAGTAGAATAATTTGATTATGCCAACATATACCAT
TGTGTGGCCCTGGGCCCTTATGTAGCCATAAAGGCTTATTAATAACTGGGAA
TCAGAGGTTTACATGGAACCGCTGGGAGGGGCGATATACAGAACTACCG
GGGTTTGACATGATATCTGTGCCCTTAAT**TACAAATTGGGCGAGGAATGGCG**
TCACCCACCataccacacagttcaaaaattgcttgaacagttgcttccatgtaaacgaagacatcgtccccc
atcacatctgcagactgcaaatatcaggatfttacaatggttgcgaatattcaaggcctcactcttggtttgcctga
atgccaaatgctcagctcagatgcag**LAKAAKAKATAACCACTCTCAATAGGGGTG**
TTTACTAGTTCCAAAGGAGACAGTCCCTGTAGATACATTAATGGGCTGCA
TGCTTTCCCTTACCAGCTGCTCCCAATGGCGGGAACACAGCTCATAATGC
ACAACGTGTGTCTTTATAATCCACAGACACATTATCCCTACTGTCTTATTG
GTGGTTGATGAAAAATGGTAGTTTTCAGTATCATCTGTCTATTATATAATGG
GTGTCCATAATACCAACACCAATGGCTGGCCCTGCCACCTCCACCCCTA
CACAAGCCATACATAACGTTGTGTTTGTGATTATATAAAGGTAGCTGATA
ATACTAGTATTATAGGAAGTGTGAGGACAGAAATACCTCATATTGATA
TGACACACCTTGGAAATGCTCGTGTGCACACCATTCATACCACTTTAA
AATATGATGTCTACTGTTTAAATATCTAGAGCTGCCAGCATATAATATATG
CCTGTGCTGTAAACATAATCATCAGTATTGACAACTTCCGCCACAGAGAGTG
GAGGCAAAATACCACTGTCTGCTACTAGACCGCCACATAGGCATC

【図 3 - 2 - 1】

ACTTGGTGTCTTGGAGTCTGTGACGCTGTGCTGCTGTTCTGTGGTGGTT
GTAGTGGTGTGTCTTTTGGCACCCACGGACACTGGGAGGCTCTGGAGGTTCTG
GTGCATAGGTGGACAGCAGTTTCAGTAGTGGATCTTCGTACTAGATACAG
ATGCGAGGACAAACAAATTACCTGACACCCACATGTACTTCCATFACTCTGT
ACACAATATTGGTTTGGCATGTCTAAATTTTACAAAATCTTATTTTCTGCA
TCACCAAAATATATAACCATAGTAAATCTGTTTGTCTTCTACAAATGTACA
TTCCACTACCAAGTAAATAAATTTCCCTTcagtttgataactcatagatttttatactatgatt
attgcacgtttatgtatcacactgtttttaaagtattttgtgtgcacacattctacatgactgtttgtaagtccatccat
gtgctatattgttttttgaatgctccaatgtaagttaagtcaatgttgcagcgttccgttcagtcagcagtggtggc
accacctgtgtgctatagatttattcccggttctgttggtaaaacaacacatccatcagtgagttcaattccatgtcaatt
gtgctgtttaggttactactacgtgtgtatagatctagatttttctgcactgattaaacgtgcgggtatgcactcatgttctt
ctgtcctctcgttgaataactcaatmgccacgctcctggagaagaagatttccaatttctgttgaattcatatagtggtggt
atttccaaatgaataggttttgaatgaiaacacacactctccttgaatgagtcacactgtggtgtgtcgtcgtt
atttggttgaataaattggtgggctgattttgttactaaagctctgttcttactctactatatacttccatccactggttctctc
ataatactcatatcatatgtccaactataggtgtgtacatcatatcatacccttgcattgcattgttaagtgtgacgaacatggc
ttttgatttactataggattatfacacatccacttaagcaacttaataactcaatccaaatagatttttctgttggatgcgcatc
aatctaaacaaattttttaggtatctcttttaaaatttttaagtgtgtctaaagcgtgtgaattctatgtctgtatctaaatc
ttactataggctccaactccaactcatctattctatacctatcatctatgctatccttgctccaatattcatgttttcttgcctgt
ataatgctcaacatgttgcgaagcttctatgttggtagatttggtagaagtgtaggttgcattgctatatactgta
actgtgcatattatgtgtgctactctgtgtatgactatgactatgcccattgctccacttcccaaatcgaatgactgtt
caagctgtgtgtatgactgtttgtgtctatccttctgggtgtgacatctactcaactaattaggacaacactgttctatccn

【図 3 - 2 - 2】

ataatagtcacagtgtagcactgtgatttttgggtgttata**CCATAAGTGTGTTTCGGTATATTAAAC**
AGCTGTGACATTAGTTTGGACACTGTTAATCTGTTTTCACATTTAAACCT
AATTAGCAGCAGTATAAGCACGCCCTCTGCACATGTTAAACATTGCAATGG
GCATATATGCTATAGGGCTGTATTAATACTTTTAATCTTCTGCAACTGATGG
TGTTACTCCCTCTATATACGCCAACTGTGACAACTACTCTTATCTTTT
AAATGGTCTTACTAATTCATAAAGCTAACACACATGCTTCTTTTAATTTAA
ATAATACAGTGTGTTTATGCTATTTCGACACATAATTTTGTATGCTTTTTA
CGCTTCTATTACTATTTTCTTCTATGTCTTACTACTAGTACACCACTACATCG
AATTACTAGCCCCACCCCACTGTATGACTACTGTCTTGTGCCAGTCCGCA
TTTTCGCCGCTCTACCTGGCTGCGCATCTGCTGGCTTCCACTTCACTTTGCGA
TAGCCGCTGTCTTACTGTGACATGTTTGGGTTTGGTAAACACACTGTGT
ATTTACACAATAGTGTGTTTGCAGCGGACTACAGTTTCTTACCACTCT
GCCAGCACTTCCGAGCTGCTGTAAACTTCTGTTTACTGTACGACACAGCA
TGTAATCATCTCCCTCTCTGTGCAATAAACAATGCCCGGGCTGCTCATGT
TCTGCTGTCTTCAATATTATATTGAATCATCTATAAAATCTATAGACTGT
TCCACTATCATATGCTATTCTCTCTGCTCGAAATGTTATCTCTGTTTGT
TTTTTCTATTATGTGCTCTTACTCAACACAGCGCTGTACACTCCCTTTCGCC
CTGTGACTGTGCTGACTGTACTGACGGGTGTTTATAGCGCTGTGACAGCC
GGGCGACAACTGTGTAATGTGCCACACGATTTCTGTATAGGATACGAAGG
TCCGTGCGAGTGTCTGATGAATGCTATGCCGTAGTGTGCTATACCACTGTGACA
ATATGTACCAATGTAGTAATGCTGTGGCTGTGTTCTGCTGTCCATCTGGCC
GGTCCACCACTCTGTATCTCTCATCTGAGCTGTCACTAATTTGCTCATAG
CAGTGTAGGTCAAGTTTTCAGGTGACAGTCAATATATAAATCTTTATAGT
TGCTTGTCTCCACGCAATGAGTTACACTGGGTCACAGGTCCGGGCTTCCAA
CACTCTGAACAGCGCCCTGTGCCAGCACCAATAATATTATGAATCGCTTGT

【図 3-3】

ACCATTAACGTTATTTTCTTTCTTCAGGACATATAAGGCGTTGCACAAATTTG
ACCAATTAAGTTATTTCTACCAATGTTTCTTTTACCTCTGCTTGAATTTTCT
CCATACAGGTAAATTTGATATAGCTCTATTTCCGTATCTTAGATAAAAAAGG
TTCAGTAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG
TATCTGTAATAAGAAACATGTGATACCTCTTCAGTTGTAGCTCTTTTGGCAT
CGACACATCGACGGCCTTTATTCACCGAGCATCTTCGACACATGCACCAAT
TCGTGACGGGTCGGGGTGCTGTGCTGGATCTCAAAACATGGCCGTGCGTGA
GCTCATCGTGTCTATATATATACACGGTTTGGTCTGACGTTCTTCGGT
CACCTTATTTTTCATAGTAAAGATTAATTTATTAATTAATAAAAAAGG
TTCAGTAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG
CAGTAAATTAATCATGTTTTCACAGACATATTTGGGCTAGGATGTACTCTGTGTA
GGCCAAACATCGTAATTTAGTCAGTGTAAAGTTTAAATAAAATATGGCTCAA
AGCGTTTGAAGATCGCAATGTAGGCCAATGTATTTGTTAGTCGCATCGAC
GACCTGTATAGCTAGCAAGAAAGTCAGTTTAGGCGGGACATAGTACAGCA
GAGTAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGAT
TAGTGTCTTCAGTCTGCGTCAAAAGGTCGCAAAAGTGTGTCAGGACCAAA
TCGGTTAGGATTTTAAATGGTGGGATAGTACAAATGTTAAAGTAAAGGAGAT
ATAAGGCTAATGATGTAGTGTACAACAAAGTAGGACACAGGGTAGGGCGGGGA
CACAGGCTAGGCGAGGAGATGCAATATGATTAGGACAGCACTGTATTTGTTAT
TTGTGGGTGCACCAATACATAGAAGCATCTATAAATGTTTGAATAATACAG
TTCAGTAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG
AAATCATACACACATACATAACATGCCAAAGTGCACACAGTACGACACAAA
CAATTACATAACAAAACATGGTTACTCTTTTAAAGCTGTGTTCAGATACCAAC
CATACATGACACAGCAACATATCCCAACAGGCAATGGTACCTTTTAACTTT
TCTCTTGTGGGATGTGATCGTGGGGCGTAAAGTGTGACGGGCTTTTAAAGTTGG
CTAGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CTTAAAGGATCTCTCTCTCTCTTGTAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GTAGAAGTGCACAAATCTGATGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTAGCGGCAAAATGGCAGTCTCTAAATAGTGGCATCATCTTTATGAATGTG
TGCTATACATCAGCTGTGAATGATTTTGCACAAATGCAAAAAATTAATTTGA
TTCAGTAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG
GTCCCTCTCTCTGTTACACATGAAGTGTCTGATTTGATGCTTACAGTGTG
GTTCATACCTGTGACAAACACGTTAGTGGGCCCAACATATGCCATATTTGGCC
CTCGGCCAGCTGTGACACGAGTACGGTTATTTAAATAATTTGGGATCTCGAGG
ACCATAGAACCATAGGATAGGATGAAAAAAGACACGCTGTTGTGATACGTGGCAG
TATTCGCGAGCTGTAGACCGCTGTGATATAAATACATCGGCACAGGTCACCT
TTCAGTAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG
GAAAAAAGAACCAATCTGCACATATGGCTCGTAGCCATTTGCAAAATACG
TGGATATCTATACATCAGCTGCTACATATATATACATGGGACACATCTTTTAC
TCTGCAAGTATTTAAATACATGACAAACCAATCTGTGATACCATATGCTCCCA
TCTGTATATACATGTTTAAATGAGCTGTAGGGGAGGACAAATCCCGAGATTTCC
TGAAATTAATCTACAGGCGTGTGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
TTCAGTAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG
CTTATATCTACACAGGTTTACGACATATTTGTACTGGTTTTCAGTATCAICA
AACCTTGTTAATAAGGATGCCCATATATCCCAACATCGAAAGGCTGTCCCC

【图 3-4】

ACCAATTTTCCAGCCTGTGACAGGCCACACCAACTTTGGGGTTCTGGGGTTAT
 AAAAGATGTTCTGTGAAAACCAAAATTTTAGGGTCGCGCAAAATTAATCT
 AAATACCCGTGATTGCAGGCCAGACACCTTGGGAAGTAAAACCTTTTTACCAT
 TACCATACTGGTGTGTTTAAATAGAGAAATAGGAGATGCTCTACGTGTAGTAAT
 CAGAACTGCTCGTCAATAATAGATGTTGTGCGAGACACATCACTCAAG
 TGCTTACACCTTACAGAGCAGGTAGGAGGCGAGTACACAGTGGCCCTACT
 AGGCCGCCACAGGACATC

【図 4-2】

[illegible]

【図 4-1】

HPV56 Deletion Probe Template (SEQ ID NO: 107)

HPV56欠失プローブ鋳型（配列番号107）

[illegible]

【図 5－1】

HPV58 Deletion Probe Template (SEQ ID NO: 108)
HPV58 欠失プローブ模板 (配列番号 108)
TCTCGCAAAAATATGGGAAACCTTTACGTTCTGGCAGCCGAAAAATAAATAGC
TAGGGTGCAACATAAAATGACACACATCCCAAAATTTGGTATTTAAAGGAGT
TAGTGGAGATATAGGAATAAATGGACTAGACATAGATGTTACAGAAGATGCA
ATGTCTGGACCAAGTTCCTCAATGACACAAGAGGAGTGTCAAAATCAGTATTTA
ATGGTATGGACACATTAAGTGTGAGTGTGGGCAAGGACGTATGTGAGTG
CAGAGGACTCTGAAATCATGTATAGTATCAGCATCGCTCAGCATCAAAATATCA
TAAAGTCTCATCATTAATCATACGGGAGAAACAGAAGTATTTAAAGATTGTA
ATTCAAATTGTGTGCTGTGTGAACCTGTTCTTGGACAGGGCTGTATGGGACT
AAGTCTTGGTAGTAAATGTACTTTAGCCCTTATTGCTTTCACCTCGGAGTACG
AAGTGTAGCCTTTTGCCCAACCTCATATAACGTACAGTACCCCTGCGAGAG
GTTAATGCAAGGTCTGGTAATGCAACAATATCTAGAAAATCAGGATCAGGAG
CAGGCGATATGTCACTATGTGTGAACCTGCAATGTGCTCAGGGTTTAAAGCCT
TCAAATGCTGGATTATCATATGTTTACAAGTCTATGAGGAGATGTTAAAAAG
CAGGGTCAACAACCTTAACTTGTGGTGTGTGGGACTGTATAAACCAAGGCG
TGCCACAGGGCGAGACCTGGAAATGGGTGTCTAGACGTGACATTTGCCACTG
TCAGTAGAAAATAACAAAGGATATCAATTTGTTATTTTCATAACTATGTGTGCT
AACAGTAGGAGAGGAAAAATTTAAATGTCCAGAGGCCCTCTGCAGTGCAGG
AGGGCGGAGTACGGATGGCTCGATAAAGGAGGGATTTAAATGTGTAGAAAC
AGTTTGTATAGATGATTTCCAAATAGAGGAGAAACATTAAGTATTTGAGGTGTA
GTATCTGCAAGAGTGTGTAATTCAAAACAGAGTGGAGTGGGAATTTAATGGG
CTGGTGCAACCGGGTCTATAAAACATAGATTTCTCTATAAAGATACAAATAGA
AGAATCCAAAGGCCCAACAGATATCAACGTAACTGGGGGACGTATGGGCTGT
AAAGGTATAGCCTCAGACGGTGGGGTACTACCAGGGGGCACATATCCAGTCC
TGCCACCTGTACCCGACCTGTACCAATGGCTTAAACCTTCCAAAAAACCCCC
TAAGCTACCATATCGTAATATTGTATCTGTATAGTAGTGCTTCAACCTTGG
GTATAACATCAAGTGGGACAGTGCCTGAGGCTTGCAATGTTTGAAGTGTG
TGTAGCAGATGCACGCTTGCCTGTGTAGACGCTTGTGTCTCATATAAAGAC
AGTGCTAAAAATATAAAGTATTATTAGTAAGTATATAAAATATAAAAA
CAACACACACACAGTAAATTTACATACCATACCACCATGTGCGAGAACCC
AGTATACAGTTAGTCTTTTGGGTTAAGTATTGTGCGATGAAAATTTAATACACA
TCATTGGTATATATAAAAAATTTAAGTAACACAGAAAAAATTCGTAGAGCCGA
CCCCACAGACACCAAAAGGACACACCAACACCAACCAACAGCATAT
AGAAATAGATAGCCCAATGGCCGCAAAAAATGGACAAGCAATAAAACAG
TATAAAACAAACACAAAAATAGGTAATATCATTTGTATATACACTTAGCAGC
ACATATTGGCTTGTGGTTACATACAGTAATGTACAAATCAAAATTTACAAATGAC
ATAACACCACTACTTATTGCACAGTGGGTGGTATTTAACAGTGTTTAAAAAC
CAGTTGTGCTGTGTTTCCGTGTGTGTATGTACAGTAACCAATTTCCATTTGTGC
ACCTTTGTGCTACAGTGTCCCAATGCTATGTGATGATGACATTTACATTTGTC
TCAGATCGCTGCAAAAGTCTTTTATTACAGCATTTTCAATTCGATTTGATGT
CACAGATGTCTTCAACGCCCTGACACAAATGCAATGTCCGGTGTGTTCTCTCT
CTGCGTCTCGGAACATAGTCTCGATAGTACCTAAAGCAAAAAATGTCTGTTTAT
ATATGCAACCGGTTCTGGCTAGCCGGTGTTCGGTTACACCCCTAGTTTTTACAAG
ATTTGGCATTAGTTAGTTTATGATTTATAAAAAATGTGTGAACATGAACAATGTGA
CCCAAAACGGTTAGTTCACACCTTGCAATAAATGTGTAGTGAGTCACTTTTACA
AGACATAGTTTGTGCTAACAACACTATTGTGCAAGCCAAACCTGCATTAAGC
ATTGAAAGTAAAGTTAAAAATGTGGCTATAAAGCATGTTTAAACATAGATAT
AATTAACATTTTGAACCTGCATGCAATGTATATATAGTGCACATATGCCAAGT
ATAGGCAAAAGCAGTGCAGGAAGGGAAAGGATTAAGCTGTATTGTTTAAATTG
TAGTTTAAAAAAAACACGTTTGTGCCAGCAACCGAAATCGGTTACATGCAACA
AAATGGAGGTAAAGTAAATGGAGGCCAGTACTGTTAAAAACTATAAAATAC
ATATATACAAATGCTATTACATAGCTATGCTATAATAGCGAGGCAAGGTAG
GGCAATTTAGGGACAAGCACTTACTATAGATACACCAAAACAATACAAATA
GTTTACAATACACACAATAGTTTATATATATAACAGAAACAGGAACATGA
CAAGGACATAGAACATGTACACAAACATGACACATAACACATACAAACATATA
CACAAACATAAACACAGACACACATACATAAAGCAAAACAAACATGAT
AATAAAATAGTTAAGTACACAAACATTAATTTTTTAACTCTTTTTCGCTTTGG
TGATGGTGCACGGGTAGTACGGGCCGCAAGCTTTTGTGCTCGGCTTTTGTCTTA
AGGCTGATTGTGTAATAAACTTTCTGCCCAAGGAACATGCTAGATGCTCC
CTCCGACTCTAGAGGATGTGCGAGAAACTTTCTCTTAAAGTTAACCTCCCAAA
AAGTATATTTAATTAAGTATCTCTCTTTCTTTAGGGGGGTGCTGTTTITGGC
AGATTAATAGCCTGGGAGGTACAACATCTATATGTGTCTGTAAACCTGGCAGA
CGGAGGAGGTGTGAACCAAAATTTGCCAGTCTCCCAAAATATTTGGAATCCATA
GTATGTATATATGTCACTATCTCTGCGAGTATGTTGTAATTTTGCAAAAGCTGAAA
AACAACTGTAGATGCTATTCTTCAACATGACGTACATATCTCTTAAATAT
CATTTTATATGTACCTTTCTTGTACTCTCAGTGCATAATGTTCATATTAGTGC
TACGAGTGGTATCAACACGGGTACAACAAATAGTATTGTCCCGAGCAATGGCC
ATTGTTATGACCTTGTGCAAGCTGTGACCAATAAGCGCTTTATAAATAATTGTG
ATTTGTAGGTTAACTATAGAGCACTAGGAGTTGGAAAAATGCACTACTTTG
GATAACTGTCAGTATTACCGGACCTTTAATATAAAGGTCACTCGGGACAGCC
TGCCAGTTTTCAGCCCTATTAATAAAGTGTCTACAAACATCTGCTCACG
TCTAAGAAAAAAGCAAACTATCCCAATAAGGTCTACGTGCCATTTTAAAA
TAATCGGATATATTGCATGTACTGTACATAAATATCAATAGGCACATCACTTT
ATTAGCTGCAATGTACCAAAAGTCCATGATCTCAACACCTGTATCTACCATGT
CACCATCTCAATAATAGAAATTAAGAAAGTTCCAATGGAGGACAACTAGTAGC
ATGTCGATATTGTGTACAGGCAACACCTTTACCCCAATGCTTACCAGTGGGAG
GTTTACAGCATTAATAACATATTTGTGTTGTTTATAATCATAGATAAAGAT
TCCCTGTATACAGACCTTGGCTGGGAGATCTGTACTGGTTTCAAGTGTG
ATCAAAATTTTATTAATAAGGATGACCACTTACGCAACACCAATGGCTGTG
CCCTACCTATTTCAAGGCCACACATGCGCCAGACCAACGTTGTGTATCAGG

【図 5－3】

CCCGAAATATTATGAACCTTTTGTTTAAATCCCATGCTCTTTTITTTCTGT
GGACACAATGGTCTTTGACAAATAATACATCTAATTAATTTTCAATTAACA
CTTTTITAGTGTGTTCTAATGTGTCTTCAATATAGGCAATAATATAATGTCT
ATACTCACTATTATTAGATAGCAATCGTAAGCACACTTTACATACTGCAAAATG
GATTTCATCTCTATACACTATTCTTTAAATCTGCAAAACAAAGTCATATAC
TCAGATCGCTGCAAAAGTCTTTTATTACAGCATTTTCAATTCGATTTGATGT
CACAGATGTCTTCAACGCCCTGACACAAATGCAATGTCCGGTGTGTTCTCTCT
CTGCGTCTCGGAACATAGTCTCGATAGTACCTAAAGCAAAAAATGTCTGTTTAT
ATATGCAACCGGTTCTGGCTAGCCGGTGTTCGGTTACACCCCTAGTTTTTACAAG
ATTTGGCATTAGTTAGTTTATGATTTATAAAAAATGTGTGAACATGAACAATGTGA
CCCAAAACGGTTAGTTCACACCTTGCAATAAATGTGTAGTGAGTCACTTTTACA
AGACATAGTTTGTGCTAACAACACTATTGTGCAAGCCAAACCTGCATTAAGC
ATTGAAAGTAAAGTTAAAAATGTGGCTATAAAGCATGTTTAAACATAGATAT
AATTAACATTTTGAACCTGCATGCAATGTATATATAGTGCACATATGCCAAGT
ATAGGCAAAAGCAGTGCAGGAAGGGAAAGGATTAAGCTGTATTGTTTAAATTG
TAGTTTAAAAAAAACACGTTTGTGCCAGCAACCGAAATCGGTTACATGCAACA
AAATGGAGGTAAAGTAAATGGAGGCCAGTACTGTTAAAACTATAAAATAC
ATATATACAAATGCTATTACATAGCTATGCTATAATAGCGAGGCAAGGTAG
GGCAATTTAGGGACAAGCACTTACTATAGATACACCAAAACAATACAAATA
GTTTACAATACACACAATAGTTTATATATAACAGAAACAGGAACATGA
CAAGGACATAGAACATGTACACAAACATGACACATAACACATACAAACATATA
CACAAACATAAACACAGACACACATACATAAAGCAAAACAAACATGAT
AATAAAATAGTTAAGTACACAAACATTAATTTTTTAACTCTTTTTCGCTTTGG
TGATGGTGCACGGGTAGTACGGGCCGCAAGCTTTTGTGCTCGGCTTTTGTCTTA
AGGCTGATTGTGTAATAAACTTTCTGCCCAAGGAACATGCTAGATGCTCC
CTCCGACTCTAGAGGATGTGCGAGAAACTTTCTCTTAAAGTTAACCTCCCAAA
AAGTATATTTAATTAAGTATCTCTCTTTCTTTAGGGGGGTGCTGTTTITGGC
AGATTAATAGCCTGGGAGGTACAACATCTATATGTGTCTGTAAACCTGGCAGA
CGGAGGAGGTGTGAACCAAAATTTGCCAGTCTCCCAAAATATTTGGAATCCATA
GTATGTATATATGTCACTATCTCTGCGAGTATGTTGTAATTTTGCAAAAGCTGAAA
AACAACTGTAGATGCTATTCTTCAACATGACGTACATATCTCTTAAATAT
CATTTTATATGTACCTTTCTTGTACTCTCAGTGCATAATGTTCATATTAGTGC
TACGAGTGGTATCAACACGGGTACAACAAATAGTATTGTCCCGAGCAATGGCC
ATTGTTATGACCTTGTGCAAGCTGTGACCAATAAGCGCTTTATAAATAATTGTG
ATTTGTAGGTTAACTATAGAGCACTAGGAGTTGGAAAAATGCACTACTTTG
GATAACTGTCAGTATTACCGGACCTTTAATATAAAGGTCACTCGGGACAGCC
TGCCAGTTTTCAGCCCTATTAATAAAGTGTCTACAAACATCTGCTCACG
TCTAAGAAAAAAGCAAACTATCCCAATAAGGTCTACGTGCCATTTTAAAA
TAATCGGATATATTGCATGTACTGTACATAAATATCAATAGGCACATCACTTT
ATTAGCTGCAATGTACCAAAAGTCCATGATCTCAACACCTGTATCTACCATGT
CACCATCTCAATAATAGAAATTAAGAAAGTTCCAATGGAGGACAACTAGTAGC
ATGTCGATATTGTGTACAGGCAACACCTTTACCCCAATGCTTACCAGTGGGAG
GTTTACAGCATTAATAACATATTTGTGTTGTTTATAATCATAGATAAAGAT
TCCCTGTATACAGACCTTGGCTGGGAGATCTGTACTGGTTTCAAGTGTG
ATCAAAATTTTATTAATAAGGATGACCACTTACGCAACACCAATGGCTGTG
CCCTACCTATTTCAAGGCCACACATGCGCCAGACCAACGTTGTGTATCAGG

【図 5－4】

GTTATAAAAAGATGTATCAGGAAAAACAAATTTATGGGATCAGGTAAACGC
ACCTTAAGAGCCCTATACTGTAGGCTTGATACCTTGGGAACATAATCACTTTTT
ATTGTTATTGGGACTTTTGATGGAAAAATATGGATTGGCAACAGCCAAAGT
CTGGAACTGCAACATATAATAAATGCTTGTGCTGGTGCACATATGCTATAGT
GCTTACAACCTTAGACACAGGCACAGGAGCGAGTACACAGTGGCCTCCTA
GGCCGCCACACGGAATC

【図 5－2－1】

CGAGCTGTATACTTTGTGGAGTACTGGGTGTTGTCTCTGGAGTCTGTTAAAT
CGAGTCGTCGCTGCTTTTGCCCTGTGTACTTTCGTTGTTGGTGGCCTCGGGTG
TCTTTGGGTACGAGGTTTACGTATGGGATTTTGATCACTAGGATATAGATGTA
GGACATACAAATACCCGACTACCCACATGTACCTCCCAATAATTTGTTTITAGA
GTACTTTTGTGCATCTCTTTAAAAATATTAAAAATACGCTCTTTTACATGGCAGT
TATATAATAACACCCCAATAGTCACTTCTCTCTGCTACCAAGATACATGTGTG
TTTCTCAATAATATATATTTCACCTCAATTTGTATAAATCACTTGTGTGCTTT
TATCATTTGTCAATTTGTACAGTACTGTATGCGCTTTTTTTTAAAGCATTTT
GTGGCTCTGTAACACACACTTCTAAGCTTGTGTTGGAATGTCCATCATCT
GTTTTATGTGGTAGTCATTTAATGTCTCTAATGCCATTTTGCAGTTCAATTA
TGAACACGTTTAGTCTTTGATGTTACCAATGACGGCACCACTTGGTGCGACA
AATGTGATATTCCCATTTGTGCTGTGTATACATTAATAGCACACCTTCTGGCT
ATTAGTTTCCAAGTGTCAATThgtagtaaatcatatttagctgtgatatgtcaggagttgtcgaat
gcaactaaagctgtgatatctctccatgcttttgcctctctctctataagctaahtgcacacgctctggaagaaaggaat
ttccaahtttcactattttatataacgtggattacacgttgcataaggaagattgttaaatcaaatctgtagtactgtgc
aaatagggccatcgtgaacttttgcctgattttagggagaaatfaattggagacatttaattgactaattgcccattgtttaca
tcattgaaatgtggttaccctcaatgcaattctcatataatcatctatatgtccagctgttgccgtgtacatcatcatcaactggt
tagactgtgataatggctgcaacaaagaactttagtgaattacatatgaatgaatgcaactttttaaagagattatataacactt
caaatgattttccgtgattgtgtggccacacgagtaacacaaacttttttggacacgttgaagaaactgttaaatgacactaa
aaatgtgtaaatcatattttagtatataaattgtcattgtctccatcttccatctcattgttttttccacacactgtgtatcc
atgtcccaattgtatcacacagctttctgctttttatattgtctgcaacacacacagcttttttattgtgtgactgttgaatt
aaaaagctgtcgtcaattataacactctgcaactgtgcatattatgacatgcaactcatctcaattgattcatattatgccc
ttgtatcttaacatcaatcaatatacatcaatgaactgtgtaacacatgtaattcatctatcatctcattgtgtgtgtccctgac
atcaactatttagcaactgtgttcaaaccaataaagccacatgttgactctgaahtttgttggctgtcaatacaataahtctgtc
gaahtgtatgataahtcatatttaatttggccacatgtaattttttgtacatttaacttaatacaataataahtctgtc

【図 5－2－2】

cacacgttbaacattgttagtggtgtatatafatgtgtgltttaatgacttttbaacttgcctcagggagctatttcatacact
gtttacacacactgtgcaacgtgtttttatcaactt**AAATGGGCTA**ACTAATTC**CATAAAATCTAC**
TCCAATAGCTTCTTGAATTTATATAATAGCGTCTTGTAGTATTACTGTGTTAG
TAGAATATTACTAATATTTTGTAATGGACAGGATTAACCAACTGTCTACATCGG
TTTCACTGTTTACATCTGAACTAGCCCCACCCCACTAGACTCCGAGTCAATT
AAGTCTGCGTGCCTATTTTGGCTTCTTACTGGTGTGCCATCTGTCTCAGTTCC
ACTTCAGTATTGGCCATATCCCGTGCTCTAGCTCAATAATTTTTCGTTTTCG
TGTGTGCATCTTTATTTTATATTTCACGATACACACACATTTTGCAGCCCGG
TCCACACAGCTGCTACACAGCACTTGTGCAACCTGCGAACTCTGTTTAG
TGCACACAGACTTTTATCTGTCACCCCTTCTCTGTCAATTAACAAACAGCTC
GGGCTGCTCTGCTTCTGCTGTGTAGTACTTGTACTGAATCATCTATAAAC
TCTATTAACTGTACCACATCTGCTGTCTGTTTCTGCTCTCATCTGAAATA
TATCTCTGTCTTCTGTTCTATTACCGCTTCTACTCAAAACAGCCAGTACAG
CCCGCCCTTACCCCGTTTGTACTCTAGGGTCACTCCATGTCAGATGGTGTGTTA
TTGTGTGCACAGTAAAGGCCACCAATGGATCACTGGGCCCATTAAGCAGCTGC
TGTAGGGTGTGTCAGTGTGTATACACAAACGACCGTGT
CCCAAGGTGTACCAACAAAGTTACAATAGTAGTAATTACGTGGCCGGTGTG
GCTTGTCCATCTGGCCGTCCAAGCTATTTCATCTCGTCTGAGCTGTACACA
TAATTGTCTATAGCAGAATAGGTCAAGTGTGTTCAAGGATGTAATCTAAAAA
TATCTCTTACGGCTTGGTGTGTTTCTCTTCAAGCGTGTGTTACAGGTTACACTT
GTGTTTGTCTACGTCGGGCTCTCAACACACTGCACAGCGCCCTGTCTCAACGA

【図 6－1】

HPV66 Deletion Probe Template (SEQ ID NO: 109)
HPV66 欠失プローブ模板 (配列番号 109)
CTGTAAAAAATAGGGAACACGTTTACGGCGCCTACGTTTAAAAAATAATAC
AGGCCAATGTGCAAAATGTACTCTCCGTATATATACATCATCTGTGAACATCAT
AAGGAGACTTAGGTATCAAAAGGGCCAAAGTACCTGGGGCTCTGTAGGTAAAACTA
TATCAAGACAGCAATAAAATGTGTTTCCCAACACTTCCCAAAGGGGCACT
AACATTAGTTGTGTACTAGCAAAAGGATAATGTAGAAGGTTTAATAGGTAAAT
TGTGAGAAAGGTGTAGCACCAAGCTGACGAAATGAAATGGGTGCCTCATCAT
CAATATTGTGCAATAATATCATATAGGCCATCAAAATGGATGTGTGTAGCAAA
AATGGCTGCATTTCAATTTTCACTAGCGCTGTGCAATAGGACTTATATCAATA
ATAATGCAACAGAGCACTTATTGTGTACCCCTACGTTGTGTGATGGTAGGCT
TTTTGCTACGCTTACTAAAACGCAACACTGTGTACGTGTACTGTAATGTAGCAGG
CTATGCAATGCAACTATATCCATAAAATCAGGATCAGGAGACACCCGAGG
GAGAAAAGGTCAACGTTGTGTACGACCTTCAAAACAGGATATACAGCACT
TATTAATGTGTGGGGTTGTCAAAAATGCTGGGTGACGTGACCCCTAACTGCT
GAAAAGCCCTACTATACAACTTGGGAGCAGCAAGCGGTCTAAAACTTGGAA
AGGGGTACTACTAATAGGTTCTGTGTCAGTACCGTGTATAGCAAAATGTTTGA
TAGGTATTCTCTCATAGCTACGATTTCCAGATGTAGGAGTGTCAATCAAAAA
TTACAGATACCTCTCCAGTTTGTGAGGCTCAATTACTCGGAGATCAATA
TAGTGGGTGTTTATAGTAGTACTACTTACATGTACAGTACTAGATGTGGGTG
TAATATCCAACAGCAGGCTGTGGTGTGAGAAGGATGCTGACCTCAAAAGCC
CCCTGACCCAGTAAAAATTGGGAACACACGCGCCCTGAGTTTAAATACCATAG
TCTTCTACCAGTGTAAACAATAGAAGGATCGTATGAGCCCACTGACCTCACCA
CAATAGGTGTGCTGTCAGGAGGTGACATCACTATAGTAGAAGGCGCTAGAGCC
TAAAGGACATATAGCCGCCCGGACCAACGACGACCAAGCCAGTACCAATGCA
AGTCCCAAAATAGTAAATAAACCTTCCCATTTGTAAAAATTTCTACAGCCA
TGTTTTTGTCTCACTCTTTAATAAACATCTCAGGACATGTACCAAGGTAATTT
GCATGTTTATATAATTGTGTGGCAGATGCGCGTTTGGCTGTGTGGCAGCGT
GGGCAACCATAGTAGCAAAAAACGTAACTGTGTACAAATGGTGTATTAAACCA
CAAGCATGAAAAATATATACAGTGTAGGTATATAAAAAAATAGTAAAAA
CAGTATAAATGTATCAAAAAATGATGTAGGCCAACCAACAAACAAATAAAGTA
ATTAGTATAAGACAAATTTGTAAACAAGATGACAGTACAAAGCGGACA
AAATGGCACACACAGACAAACAAACAAAGCAAGGCAACACCAAAAT
ACACAAATATCAATGGTTGCAATATATAGCGATTACAGTTACGTTTCACTCAGT
GTTACAATACACATATACTACCAAAATCAAAATTAAGGGTGCAATATATATGT
CGTAGCAGCAATGTATGGCAATTACACTTCAATGTATCCGTGTACAAATAAC
ACATATGTATATACAAATATATACAACTTATAGGACAACTATTTTGTCCCAA
AATAACCTGTACATCAAGTATTTTACAACTATTAAGAAAGGTGTCCCTT
GGCTTTCATCTTATATAAATATTGTAAATAACTCTGCTGTTATATTACTGAC
TTGTCCAATGATATGTTGTGTACATCTGTAAATAATGTTTATATATTGGA
ATCTGTATCTACAAACACTTAATCTATTGGCTTCACTTTTAAATGAATGCA
GGTGTAGTCTTATCACCAGAGTGTGTGTGTGTGTATGACGTGCATCTACT
GTGGCGTGTGTACTGATGTCTGTGCTGTGTGTGACACGGTGTGGTAGGACT
CTTGGAGGAGTCAAGTCTGTATCTACTTGTCTTGGCTGTGTTCTGGTCTGT

【図 9 - 1】

HPV73 Deletion Probe Template (SEQ ID NO: 16)

HPV73 3次元プローブ設計 (配列番号16)

CAGCAGCACTGTGTAATAGCAATTAATATGTCATTTATAGGCAATGTAGACAG
TAATGCAGCTGCATTTTAAAGAAATGATGTCACAAAGCAAAATATGTAAAGAC
TGTGGTACAATGTGGCAGACATTTAAAGCAGCAGAACGTAAACAATGTCAA
TGGACAAATGGATACACAAATAGATGTGATTTAACTAATGATGGTGGTAATGT
GAAAGATATTGTGCTATTCCTAAAGATATCAAAATGTAGAATTTATGCTTTTT
TAATTACATTTAAACAATTTTAAAGATTTTCCAAACAACAACTGTATAGTA
TTATATGGACCGCCAGATACAGGAAATACATTTTGGAAATGAGTTTAATTA
AATTTTATACAAAGTGTAGTTATTTCTGTATGTAAATTTCAACTAGTCAATTTTGG
TTATCACCTTAGCTTAGTCAAAAATGGCATTTATTAGTAGTAGTCAACACCTGG
ATGCTGGACGTACATAGACAATATTTAAGAAATGCATTAGATGGTAAATCCCT
ATATGTTTAGATAGAAAACATAAAAATTTATACAAGTCTAAATGCCCTCCATT
ACTGATAACATCAAAATACAAATCCTAAAGCAGATGATCACTTGGAAATATTTA
CATAGTAGAAATTAAGGTGTTTACTTTTAAATCCATTTCCATTTGACAGTAA
TGGGAACCCACTATACCAACTTACTAATGAAACTTGGAAAGCATTTTATACA
AAACCGTGGTCAAACTAGATTTAAACAGGAGCAGCAGCAAGGAAAATGAT
GGAGACACTGTGCAACCGTTAATGTGGCTGTACGAGCGCAATCTAGAAGCTG
TATGAACGTGCAGAGTGTACACCTAAGTGATCATATTGATCATTTGGAAACACG
TGGCATGAAAATGTATTATTACATAAAGCAGGTGAATGGGACTGCAAAAC
TGTTAAACAATCAAGCGGTGCCAAGGCTGTGACGTATCACGATCCAAAGGGTAT
AATGCAATTGTAAATGCAATAGCACTAGAAAGTTTAAATGAATCTTTGTATA
ACACAGAGGAATGGCAATTGTCAACATCAAAAGTTGGGAACTGTGGGTACACAGA
ACCTAAACAATGTTTAAAAAGGATGGGAAAAACAGTAGAGGTTAGATATGAC
TGTGAAAAGGCAATAGCAATGCAATATGTATTTTGGACACATATATATTGTTG
GTATGAAGGGGGGTGGGCAAGGTAGGTAGCAAAAATAGATTATAATGGTAT
ATATTATGAACAGATGATGAGGAAAAGGTATACATATACAGAGTTTGTATACA
GATGCAAAACCGTACGGGTAAAAGGCATATGGGAAGTACATATGGGTGGT
CAGGTAATATGTTGTGCTCTGTATCTAGGCGCTGTGAAATATCCATTTCTGA
AATTGTTAACCCACTGACACCAACACCAACACACCCACACCTGCACCC
AACGTTGACCCGGTGTGCCATCAGCGAAACGGCAAGACAGTGTGACTCGG
ACCAAGGCGCCTGGATTTGTTGCATAAECTACATCTCCACCACAGAGTCTGT
ACCCAGTGTACTACATAATTTGTGGCGCAATAGTGCATTTAAAGGTGACAA
AAACAGCGTTAAATGTTTATAGATATAGATTGCTAAAGCGCTATTCACATTTA
TTTAAAGATGTAAACACCAATGGCATTTGGACCAATATACAAATAGTAATG
GTGGTGTAAATACCAATTAATGTTTACAACATTTATGCAACCAACCAATTTT
CAACATGTGAAAAATACCAACAATATTTAGTATGATCAATCAGGATACATGTCTT
GTAACATTTGGTTACACAGTATATATGATTTCTTGATATTTGTATTTTGT
GTGTGGCTTTTGTGTGCTGTGTGTGCTGTGGACAGTGTGCTGTATATTT
ACCCATGGTTATTTGGTATTTGATTTAATAACCTTTATACATGTATGACAACTA
TGTTTAAAGATTTTGTATTTATGATTTTATGATTTTATGATTTGATTTGAT
GTACATTAACAGTCTATTACAATAACATAAATACCAATTTACATATATAATA
AAGTCCATAATTTTATGTTACCAATCGGCTGCAAGCGTGACACACACATAG
GAAAAAACGTGCATCTGCAACACATATATAAAAATGTATAAACCAAGCAG

【図 9 - 3】

AATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAAGCATCTTCAGGATGGCA
TGACAGTAAGAGAATTATGACAGTCTGCCATAACCATGAGTGTAAACACTGC
GGCCAACTTACTCTTGACAAACGATCGGAGGACCAAGGAGCTAACCGTTTGT
TTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTGCCCTGTAGCTGTGGGAACCGGAGC
TGAATGAAGCCATAACCAACGACGAGCGTACAGCCAGATGCCTGTAGCAAT
GGCAACAACGTTGGCGCAACTATTAACCTGGCGAATCTTACTGTAGCTTCCT
GGCAACAATTTAAGAGCTTGTAGAGGGGGTAAAGCTTGCAGGACACTTCT
CGCTTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTATGCTGTGAATATCTGGAGCGGGTG
AGCTGGGTCTGCGGGTATCTTGCAGCATGTGGGCGAGATGGTAAAGCCCTC
CCGATCTCGTAGTTATCTACAGCAGCGAGGTTCAGGCAACTATGGATGAACGA
AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTTGTAACTGT
CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTACAGTGGCTGTGATAATTAACATTTAAT
TTAAAAAGGATCTAGGTGAAGATCTTTTGTATATTTCTATGACCAAAATCCCT
TAACGTGAGTTTTCGCTCCAGCTGAGCGTCAAGCCCGGTAGAAAAGATCAAAAG
GATCTCTTGAGATCCTTTTCTTCCGGCGTAACTTGTGCTGTGCAAAAACAAA
AAACCACCGCTACCAAGCGGTGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGTACCAACCT
TTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATATCTGTCTT
CTAGTGTAGCCGATGTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAGCCGCTA
CATACCTTCGCTCTGTCTAATCGCTGTAACTAGTGGCTGCGCAGTGGGCGATAG
TCTGTGTTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGACG
GGTCCGGCTGAACGGGGGGTCTGTGCAACAGCCACAGTTGGAGCGGAACGA
CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAAGCGCCACGT
TCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGATTCGCGTAAGCGGACGGGTGGGAAC
AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACAGCCCTGGTATCTTTATAGT
CCTGTGCGGGTTTGGCCACCTCTGACGTGTAGGCTGATTTTGTGTGCTGCTC
AGGGGGGGGAGCTATGAAAACCCGCCAAGCGCGCTTTTACGGTTC
CTGGCCTTTTGTCTGGCTTCTGCTCACATGTTCTTTTCCGTGCTATCCCTGAT
TCTGTGGTAACCGATTAACCGCTTTAGTGAAGCTGATACCGCTCGCGCGAG
CCGAACGACCGAGCGGACGAGTCACTGAGCGAGGAGCGGAAGAGCGGCC
AATACGCAAAACCGCTCTCCCCGGCGTGTGGCGATTCATTAATGCAGCTGG
CAGCAGAGGTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATG
TGAGTTAGCTACTCAATAGCAGCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCGGCT
ATGATGTTGTGTGGAAATGTGAGCGGATACCAATTTACACAGGAACACACT
GTGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTTCACTAAAGGGAACAA
GCTGGGTACCGGGCGCCCCCTCGAGATGTGGCGACTACTGATGCAAAAGGTA
TACCTGGCCCCGTGCTGTGCTTACAGGTTGAAGCAACAGATGAATATGTAA
AAGAACAATATATATATATGAGAGTACACAGCTTTGTTGGCTGTGGGA
CAGCCATATTTTCCATACAGGATTTCTCAAAAACGTTAAACCAATAGTCTTAA
AGTTTCAGGTTTGCATAACAGGGTGTATAGGCTGTGTTACAGATCTTAATA
AATTTGGATTTCAGAGTGCATCTTTTATACTCTGATAAGGAGCGCCTAGTA
TGGGCTGTCTGTGTTGGAGGTTGGAGCTGGACAACCCCTTAGGTATAGTGA
CTAGTGGCAATCCATTTATGAATAAATAGATGATACGAAAATGCTCCATA
ATACATTTGTGGACAAAATACAGATGGTAGAGAAATGATGTCAAGTGATTT
AAACAAACACAGTTGTGTATTTTAGGTTGTAGGCTCCCTTAGGGGAACATTG
GGGTGAGGCGACCGCATGTCTTCAACAACTGTATAATCTGTGATTTGTGCC
CACTGGAATTAAGAACACCCCTATACAGGATGGTGATATGATAGATGTTGG

【図 9 - 2】

GTACGTGCCCTCCTGATGTAATTCCEAAGGTTGAAGGTAGTACTATAGCTGAT
AATATATTTAAATATGGTATGTTGGAGTTTTTTTTGGGGGATGGGAATAGG
TAGTGCGCTCGGATCAGGGGGGGCTACTGGATACGTTCCATTATTCACAGGC
ACACCATCTAAACCGATTGAAATTCCTATTACCAACTATACGACCATACGTTG
TACGCTGTGTGGGCGCTTCAGATTTCTTATTGTTCTATTAGTGGGAAGAATCAA
GTTTTATAGAGTACAGGTACTCGTGTCTCATCTATAGTGCTTCTCTTCA
GGGTTTGATATTACAACCTCTCTGTAACAGTACACCTGCTATTATAGATGTATC
TGCTATTAGTGATACTACACAAATCTGTTTACAACTATTAAAAATCCCACT
TTACTGACCATCTGTGTGTGCAACCTCTCCACCCCTTAGAGAGCCTCTGGCAGA
CTTTATTTCCTAAATGCACGTAACTACCATTCATATGAAATATACCTCTT
GACACATTTGTAGTTACAAACAGCCACAATAGTATTTGTAGTAGTACGCCCAT
CCCAGGGAGGCCAACCCTGCTGCACGCTTAGGATATATGGAGCTGCAATACAA
CAGGTTAAGGTTGTAGACCCCTGCGTTTTTAACTACGCTACACGTTTAGTAAC
ATATGACAAACCTGCGCTTTGAAGGCTCGCAGGATACAACTATAGAGTTTCAG
CACAGTGACTGTGATAATGCTCTGATTTCTGATTTTGTAGATATGTAAAAAT
ACATAAGGCTGCTTTAACCTCTAGAAAAACAGGCATATGCTGTGTGTAGATT
GGCAACGCTGCAACACTTCTACTAGAACGTGGCAAGCTGTAGGTCTTAAG
TACATTTTATCATGTATATAAGTCTTACTACTAATGATATGAAATGCAA
CCTTAGTTACACCACAACACCTAGTATAGTAACCTGTTAGTAGTATTATGA
TGGGTTATATGATGTGTTTTTAGACAAATGATGAGAAGAGACTGTACTACAC
AAACATATACACCTCAAGTATACATAGTAAATAGTTTAGTTAGTAGTATATT
TCTACTGCAACTGCATAATACAACTATCTTTTAGTACTGGGTAGACACACA
TCTCGTTAGATATTGCTTTACACTACTCTTACAGAACTATTTTACAC
AATAGTGCCATTACAGCTGCTGCTCTATATATATTTATGGTCAAGTTTAA
TATTACACCTAGTTATTTATTTGTTAAAGCGCAACGTGAACGCTGTCTAT
TCTTTACAGCGCGCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTTGCCCTATAGTGA
GTGCTATTACGCGCGCTCACTGGCGTGTGTTTTACAACTGTGACTGGGAAA
ACCTGGCGGTACCCCACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGC
TGCCATATAGCGGAAGACCGGCAGTATGCTTCCCAACAGTTGCGCA
GCTTGAATGGCAATGGAGCGCCGCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGG
GTGTGGTGGTTACGGCGAGCGTACCGCTTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCC
CGCTCTTTCGCTTCTTCTCTCTCTTCTCGCACAGTTCGCGCGTTTCCCGC
TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTTCACGG
CTCACTGACCCCAAAAAAAGTTGATTAGGGTATGGTTACAGTGTGGGCATC
GCCCTGATAGACGGTTTTTCCGCTTGTGAGCTGTGGAGTCCAGTGTCTTTAATA
GTGGACTCTGTGCTCAACAGTGAACACACCTCAACCTATCTGCTGTATCT
TTTGATTTAAGGGATTTTGGCCATTTTCCGCTATTGGTTAAAAATGAGCT
GATTTAAACAAAAATTAACCGGAATTTTAAACAAAAATTAACGCTTACAATTT
AGCTGGCACTTTTGGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCT
AAATACATTTCAATATGTATCGCTCAGTAGAGCAATAACCCGTGATAAATGCTT
CAATAAATTTGAAAAAGGAAGATGATGATATTAACATTTCCGTTGTCGCC
TTATTTGCTTTTGTGCGGATTTGCTGCTCTGTTTTGCTCACACAGAAAGC
TGGTGAAGTAAAGAGTGTGAAGATCAGTTGGGTGACAGGTGGGTACTAT
CGAAGTGCATCTCAACAGCGGTAAAGTCTTGGAGATTTTTCGCCCGGAAGAC
CGTTTTCATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGTGATGTGGCGCGGTATTCAG
CCGATTTAGCGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTTCTACG

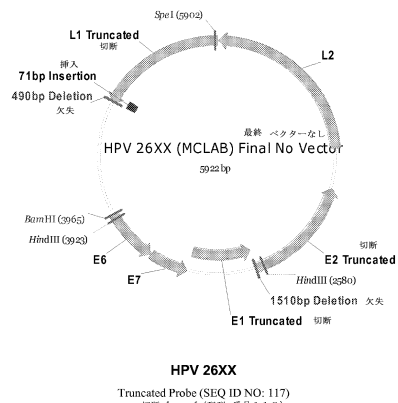
【図 9 - 4】

CTTTGGAGCCATGGATTTTAAAGCTTTACAAGCAATAAAGGTGATGTACCT
ATTGATATTCTCAACACTACCTGTAAATACCCAGATTTATTAGGCATGGGCTG
TGATCCCTATGGTATTCCTATGTGGTTTTATCTCGTAGGGAACAAATGTGTT
TTGCAACACTTATTTAACAGGGCGTGTGATACCGGTGATAAAATCCGAGATGA
CACTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ATTCTACACTAGTGGTTCCAGTGTCTTCTAGATGCGACAGTGTATTAATAAA
CCTTATTTGGTTGCAAAAGGCACAGGGAACAAATATTTGGTATTTGTGGCAT
ATCAATTTATTTTAACTGTGTAGATACTACTAGAAGCACTATTTTCTGTAT
GTGTAGGTACACAGGCTAGTAGCTCTACTACAAGTATGCCAAGCTCAATTTT
AAGGAATATTTAAGACATGCAAGAAAGATTTGATTTACAGTTTTGTCTTGT
ATGTAATAATTTAGTTTAACTACTGAGGTAAATGACATATGATCTATGATTA
CTACTATTTGGGAAGTGGGAATTTGGTCTTACCCCAACCGTGTAGTACT
TTAGAGGAAACATATAGATATGTAACATCACAGGCTATTAGTTGCCAACGTC
CTCAACCTCTTAAAGAAACAGAGGACCCATATGCCAAGCTATCCTTTGGGA
TGTAGATTTTAAAGGAAAGTTTTCGCAAGATAGACACAGTTCCTTTGGGAA
GAAAAATTTTATTAACAACCTGTTATGCTGTGACGCTTCAAGTTACAAGCTTCT
AAAAGTTCTGCTATCTGCTACCAAGGTGCCACCTAAGAAAAAACGTCGTA
AACGTTATTTAATAAGGTAAATGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TTGTATGTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
ATGTACATGTGTATAACTGTTGTTTATATATATAGTATGTATTTGTGTGTATG
GTATGTGTATGTGTATGTGTAGTAAATGTTGTATGTATGTATTAATAAGTTAT
ATGTGTGTGTGTGTGGTGGTTTACTTGACTACTGTGCTTCCATTTTGTATGT
GCCATTTTACATGATTAAGGTAAAAAGGCAACGATTTTCGGTTGACAGAT
AAAAACGTTTAAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTCTCTGCGAGGCAACTTGGCAGGTTTGTTCCTTAACTATGTTCTTCCACG
CAAGGTTATAAAGGTAAAGGCGCCACCTGGCAGTTACTCATTTGTCTGCAA
TATTTAAACAATGTCTGCAACACACATTTTAAACCACTTACATAAAATTT
GCTTTTAAAGCACATACCTATACTATGTACACAGTGTACTCTTGGGCAACAT
GTTTTTAAATGCAAGTAAATGTTTTTATAAATGAGTAAATACCGTGTACTCA
TACTGCACTAAAAAGTAAATCTTTCGATACACAAATGCAATTAATTTCT
CTTATTAACAATAACTATATGTTACTATTAATAAAAGGCTGTATCCGAAA
CGGTTTCAACCGAAATCGGTGATATAAAGATAGGAAGCAAAAAACGCTAC
AGATTTGGAAATGCTGTTTCCCAATTCAGAAGAACGACCATACAAGCTACAA
CGGTTATGTGACGAAGTGAATTTTCTATACATGATATAAAGCTGGACTGTGT
GTTTTGCAACGTGGACTGTACAGATCTGAGGTATATGATTTTGTCAATTAGTG
ATTGTGTATTTGATATAGAAAGGATAAACCATATGGTGTGTATGTCACCGTGT
TTAAAAATTTATTTCTAAAAATAGAGAGTATAGCGGATAGACATACAGTAT
ATGGCACTACGTTAGAAAATTTAACTAACAAACAGTATGATATATTTAATA
AGGTGCGGAAAAATGCCAAAACCAATTTGCTCACTGGAAAAGCAAAAGCAT
GTAGATGAAAAAAACCGTTTCTATCAAAATAGCAAGAACAGTGGACCGGACG
GTATACAGGCTGTGGGAGACCATCTGCAACTGTGGTGTAAAGATGCAATGAAA
AAAAACACCTTGCAGGACATTACTTTAGACTGAAAAACAAACCGGAAATGTG
ACCTTACATGTGCGAGTCTTGGACCTCAAGAGATGAGGATGAGGATGAACAG
CAGCCATCTAGACAGACAGCTGAACGAGAGTGTACAGAAATAGTACTAGCAG
TGACAGAAAGTGTGAGTGCAGATATGCTTGCCTATGAAAGCAACAAAGCTG
ATTTAAGAGTGTAGAAGATGTCTATGGGTACACTAGGATTTGTGTGCC

【図 9 - 5】

AACTGTTCCAGAAACCTATAAAAGAAGTGGCTGATTGAGTAAATGGGAAG
GGAGGTGTACGGGATGGTTTAAATGATAAGCAATTGTTAGAAAGAAACAG
GGGATCCAAATCCAGAGGATGAAATATGATGGAGGGGATACAGATGAGTC
GGAAATGGGGGATTTTATTGATAATGACACATATACCAAAATATATGCACAA
CAGGAAATGACAGGCGATTGTACAGTCACAGCAAGCAAAATGCAGACAATG
AGGCTATACGTGTTCTAAACGAAAGTTTACAGGTAGTCTCTGGCGGTAGCCC
AGATATGAAAAGAGATGAATTCATAGACAACAGCTTAGTCCACAAATAAAT
GTATTGTCAATAAGTAGCGGTGAAGATACATCTAAACGAAGCATGTTTGGG
AGCAGGACAGTGTGATATGGCAATATCTGAGTGGAAACTTACGAGACGAGG
TACCGGGACTTGGGGCAGGGGTAGGGTGTTCACAAATGTTAATGAAGAAGG
CAACCAATTTGTGTCCGACAGTGAAGCAGTAGTGGGTCCAGTAGCATTTC
AATATGGATATAGAAACAGAGAGCAACCTATAACAGATATTACAAATTTAT
TACAAAGGAATAATGCAAAAGCAGCATTTCTAGCAAAATTTAAAGAAGTATA
TGGGTTAAGTTTATATGGAATTAGTTAGACCATATAAAAGTGATAAAACACAT
TGCCAGATTTGGGTGTGTGCTGTGTTTGGTGTATACCTTCACTTCGAGAAAG
TTTAAATCTTACTACACAGATTTGTATGTATATACATTGCGATGTTTAA
CATGTACATGGGGCATATAATAGTTAGTATTAGTAAGATTAAAGTGAATAA
AAATAGACTAACAGTGCAAAATTTAATAGTTTATTAAATGTAACCAA
GAACGCATGTTAATTGAACCTCCAAGACTACGAAGTACACCATGTGCATTAT
ATTGGTATAGAACTAGTTTTTCAAAATATTAGTGAATAGTAGGAGACACCC
TGAGTGATTAAAAGACAACCGTTAGTGACGATAGTTTAGATGATAGTCAA
TTTGACCTATCTCAAATGATACAGTGGGCTTTGATATGATATACGAGCG
ACTGTGAATAGCATATAAATAGCATTATTAGGCAATGTAGACAGTAATGC
AGCTGCAATTTTAAAAAGTAATGCACAAGCAAAATATTGTAAGAAGCTGTGT
ACAATGTGCAGACATTATAAGCAGCAGAACGTAACAAATGTCAAATGGCAC
AATGGATACACATAGATGTGTTAACTAATGATGGTGGTAATTGGAAGA
TATGTGCTATTCCTAAGATATCAAAAGTGAAGATTTATGCCCTTTTAAATAC
ATTAAACAATTTTAAAGGTATTCCAAACAACAACTGTATAGTATTATATG
GACCGCCAGATACAGGAAATACATTTTGGATGAGTTTAAATTAATTTAT
ACAAGGTGTAGTTATTTCTGTATGAATTAACCTAGTCTATTGGTATCACCC
TTA

【図 10 - 1】



CTGAAAAAATAAGGCATACGTTTACGGCGTTTATGGATTAAATAAATATA
GGGCCATAAATAATAATATCCCATGCAACAATTTGCAAGTAAAGTATG
GTGGGTGGGGGGGCAATGATGCCATGTGCGGGAAGATGTGGCGGTGTAA
ATGCTGACCCACTATATACAGGTAGTTCAAAATGAGGTGGAATAAGGCACAG
TAACATTGGTAGGGAAGTATTAATAGAGGAAACACACATTGGAGGCATATCT
TGGAACTGGTAATGTGTAGGGGAATATGACATCGCGGGCGGTATGATGCTA
GGAAGTGTATCAGGGTGTGCAATATATCAAAACAAAGGTGTGAGTAGAATGG
TAGATGTATGAAGGCTGCAATTAATTTCTGTGTTACAGCAAAAGACTGT
ATAGGCAATAATCATGATAATAATGACTGTAGCTCAATTTGTTTCCACT
ACGTGTTTTCATAGTGGCTTTTGACCAACCTACTATAGCGTACAGTACCTT
TGCAGATGTAAAGGCGGACGATGCAATGCAATGTCCAATAATGTCAAAAATCGG
GGTCAGGTGCTACAGTACTCTGGGAAGCATATGTAGTGTGTTCTATAGGT
TCATATGAGGAGATTATCAAGGTAAACAAATGGGAGGAGATTACCAATAAAT

【図 10 - 2】

TGGGATCTGTAACTTTACTCTGTGATAGGCCCTTACTATACAAACGAGGAGCT
GACACTCGTTGTATACACGGAATAGCGTACTACTAAATAGGTTCTATCCTCTGT
TCCATTAGTAGAAGCAAAATCTCCATTGGAAATTTCTTCTATAAATATGTGTGG
CAGCTGTGGACGTTGTAGTAAATATATGACCTGATGCTTCCCGGCCCTGTGGT
ATATCTATAGGGGGTTCGAATATATAATGGAATTTGTATATGGTACTGTGTAG
ATGTACAGTTCACAGGAGGGGGTGTGATGTCTACAGGAGGAGCGTGTGTGCA
GAGGATGTGGTAAGTTCACAACTCTGACCACTAAATGTAGGTAATGAGGG
CTCCAGATTGTATAATAGTAGTTCTCTCCACCAAAAGTAACATAGAAAGTTCT
GTAGGACCCACAGGTTCAATAAATAAGGGGGCAGGGGTAGGGCCGATATCCA
CAACAGAGGGTCTACACCCCTCTAGGGGAATGTATCCAGTACGCCACCC
AGACCCAGTTCTGTACTATACCAAGGACCACTAAAAATATTCCAAACCA
CTCATGTGATATATCTTATCAGCAAGGGTAGAACCTCAATTTAGGAATAACT
ATCAGGAGGCGACGTACAGCGGCTTACATGTTTGTATAGCTGTAGCTGT
ATGCTCGTTTGGCTGAGGGGCAACGGACAGCTACCATTTGTAAACGTTTATTA
AAGGGACTAAGTACGAAATTTACATTAAGTATATAAAATGTAAAAAACAGG
AGGTATAAAAAATAGCAAAATATACCAATATAGGTAGTTATATATGATGTA
GATACCAACAAACAAAAACAAACACTAATAATAGCGAGGCTGCAAAACACA
TAAATGGAAAGC AAAAGTGGCAACAAACAAACAGACAAACACACACACAC
ACGCAAAAGCAACAAACATATAAATATAAAGGATAATGATTACAGGTATAT
AGGTGTGTAGCAGCAATATGGGCTGTGTGTGTGTGTAATAATATACATATAT
TACAATGACATTTATCCCAATGTGGAAGTTATCTTTGTGTTATTTTAAACAGT
TGTAAAAAATATAGTGTGTGTGTATACGTGTAAAGGTAAATGTATACATGG
CTGTGTGATTGTATCATATTAGTGTCCAATGCGAGGTAGATATACATTTGCA
TACAATCCCTTTATGCTTTTAAACATATATCTTAAACATTTTAAACATTTGTA
TCACTTTTAAAGTGTATATAACACAGATTGTGTGCTACTCTGTGCTCTCCG
GGTGTATGGCTCTCATGTACTGTGTAGGTTGTGTGTGTATAGTACCTGTA
CTGTGCGGGCTGTGTGGCAGCTGTGGTACAGTGGGTGACTGTGGTGACGGTG
GTGTGAGGTCCTGAGTGTCTGTGCTCTCTGGGTATGGCGGCTCGGTTCT
CTTGTGCCCACGGGCACTAGGCTCTCGTGGTCTGGGTGGTGGGCTTTGATA
CTGGCTCAGCAGTTTATAGCAGTGGATATTGTGTGTGCTGTCAGGTACTAGAT
ACAATTCAGGACACAGATTACTGACCAACACAGTACAGCGCTTCTGATCTTCA
CAGCTGTGCTCAATTTCTGCGCTCTGTTAAAGTCCAGCTATATCTCTAT
ATGCCCCCTGTGTATAATATATCCCTTTGCATCAACATCTCCAGTACCTTTAC
ACCACCTATATCACTTTTATAATACACATATTTCACTCAATAATATATCCAT
GTATTTTCTTTATACAAATCAATACACATGTTACCGTGTGCTCTTTTATA
AAACAATGTTTAGGTTCTGTATATACATTTTATAGCTGTGTCTCGCATTTGT
CAAGCTTCTGTATATATAGTCTGTGTTTATACGACCTGCAATGCTATATGTA
TTTGAATTTCTGACGAGGCTGACACCTGTTTACAGTGTGCTCTGCTACAT
CGATATCTTCCACTGAGGATTTGACCCCTGACCTGACACACACTAGGCAAG
CCGCCATTTCTCATATTTGTTATCTACCTGTACGGGCTAAGAGTTTCCACT
TCAGTATAGCCATACCCGCTGTCCGATACAGTGTACGGCTCTCTCTTTGGG
CTGTGAATTTATCTTGGTGTGTATCTCTGACGTGCGCTTTGCTGTCTGTG
TGTATTGTATTGTATGTGCAAGGGGCTGTGTGACTGCTAGTACCTAGTAACTTGTGTT
TAAATTCGGCATCTGCTGTGATTTGCTGCTGTGTTGTGTGTGCTGCAACATGCG
CTGGGTACTGCTGTGCTGTGATTTACTTACTACTACTACTACTACTACTACTACT
TATTAGGTCCGACCCCTGTATCACTACTATGTGCTGTTTCACTACTGATATGT

【図 10 - 3】

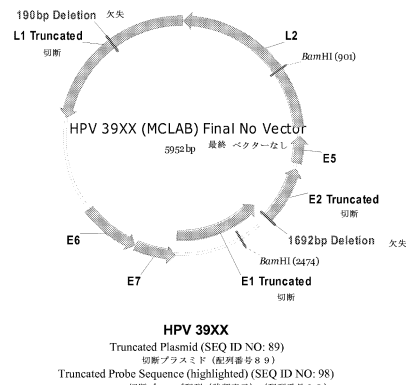
GTCCCTGTATGTTTTCACATATAGCTTCTACTGAAAACCAACCTGTACACC
CCCGCCCTCTCATTTGTACTCTTACAGTCTCATTCGAGGTTTACTGTGCAGC
ACACTGATGGCAACACAGGACAGCTTCTCATTAACATCTGCTCCAGCAT
CGAACGTTCTGTGACAGCTCTGCAAGCTAGCTGCATCTATATACACAT
ACAACTATTGTGCTGAATTTGTAAACACACTTCTGTGCTAGCTGTGCTGGCT
GCTGTGCTGCAATATATCTGTTTCACTCTACTGTAGGTTCAAAATGTGTCA
AGTCTCAATGTGCTGACAGCTGTAGTCAAAATTTGCGGTGTGCGGACAGCA
AGTATTACATCTCAATATTAATATGTTTCAATGCTGTTTCTTACACTGTG
GTTTCTGTTTGGGCGCTTGGTCTCAACAAATTTGTACACACCTTCTCCACTG
CCTGCTATTCTGTGAATGCTGCTTTCATCCCAATTTCTTGTCTCTCT
GGCCCCAATGGCATTTGACATCTATGACACCTTATTAACAAATATACATAAACT
TTTTTGTAGTAAAGGCTCTAATGTGTGACCATACAGCAATGTATAGCGCTG
TATACTCTGTATTTTGTATAAATAATACACATCTTTTGTGACGACATAC
GGACTCTATCTCTATACTACTCTTAGGTCACAAAATGTGCAAAATATATAC
ATCAGGCCATTTGAAGGTTCTTGTCAATATACACACTGTACCTGCAAAATTT
GCAAGTAGTATTTCAAGCTTTCACATAGCTCATGTAGGCTTCTGGGTGCTGT
CTAGGATCTCTGCAACATAGCTGTTTGTGCAATAGCTAGCTTCTTACTTTATAT
GTACCGGTTTGGTTGCAACGCTTTCGTTGCTACCTTTTATAGTAACTATAA
TTGTTAAAGTATTATATAAAGAACTTGTGCTATTAACAAACAGCTTTGG
TTACATACACACTGTGTTTAACTATGGGTTTACAACAGTATGTGTGACACACA
TAGTTGGCAACAAAGTGTATATGTTAGCCAACTATGCACTTAAAGAGCT
ATAAATAAATAAATAAATAATGTGCTAACAGCAGTTTATATATAATGTAA
AAAAGTGTCTATGTAGTATTTGTTAAATAATGTGACTATAACAGGCGCGG
ACTTATAGTGTCCAAAATGGCAAGCAGGCTAGGAGGCGAGGATGTGTGTCT
GCCAAGGATATACGTTTCTGCGAGTATACAGCAATGAAGTGTGATATAAG
TAAATAAAGGAACGACCGGAAACGGTGTGGGCAATAGATAGTAATAGAA
TATAAAGATATAAATAAATAACACTCAAAAGTTTAGTGAAATACATATAA
GGTAACCTGTGTAATATAAATAAAGGACACCACTTAAGGTTCTCTCC
ATTACTCAGGGGTAAACAAATGCAAAATAGTGTATGTATGAAGACATGTAAC
ATGATGAAGACACATTCTACTTTATTAATAACAAGTATGATACATAAACA
GGAACACATACCAATGACATATATATACATACATAAACAACGCTT
TACATTACATACAGTTGTACACACATACAAACACACTTACATAACATACA
CAACATATACACACACAAACATGCGGAATTTATAGTAAGTTTACGTTT
TTGCGTTTGGTAGGGAAGAGGTAGAAGTAAGGGAGCTTTTGGTGGCTAG
TTTGGGCGCTGTAACCACTAGTGGCTTATTAATAGTTGTGCTCGAAGT
AACCATAGAGCCTAGTGTGTAGCAAGTAAATAGAAAGTGTAGGGGCTG
CTGCTGTATTCAGGCTTTTAAATACAAAGTGGTGGGTATAGCATCCCA
CAGCCCCGCTTATATATAAATGTCTGGCAATTAATTTGTTCCCGGGAAG
AAAAAACAATGTGCTGTTTCCATATGTAATCTGACAGCAITTTAAGATAATCA
GGATATTACATGTGGATTGACTAATATCAATGGGACATCTGATTGTGTAGG
CTGTAAAGGCAGTAAATCTACAGTCTCAAGGCTGTATCAATACATATCGCA
TCTCAATAATGTGGAAATTAATCTAAGGGGGGGCAATCCCGCATGTGTGT
CTGTGATTATTTACATATAGTGGCAATACCCAGGCTGCTCCCAAGGCGGCTG
TACAAGCTGTGTTTGTGTTTATATACACTGAACTGAACATGTGCT
CTGTGTGCTGCTGCTTACAGTACGCAAAATGAGGTTTGTGCTATCAT
CAACTTATTAACCAAGGATGTCTACTAAGGCCAATGGCTAATGGCTGTCT

【図 10 - 4】

CTACCACTTCAACACCAACAGGCGCACACAGGCTTCTGTGTGAGGAT
TATATAACTGTGGTACAGGCAATCCAATTTATAGGATCAGGTAGGTGAC
TCTAAATACCTGTACTGATAGGCAGATACCTTAGGAATTTGGCGCTTTGGC
CAGTTTATGGATATGGAATAATATGGAATGCTCTAATGTATATAAAGCAGAGCT
CGCCGCAATAAATATATGCGCGGTGCGAGTACATATCTCATCTGTGTGGA
CCCGAGACAGGGGTGGGAGGAAGATATCCCTTGTGCTGCTACTATAGGCA
CAAGGCATC

【図 1 2 - 1】

AGCATACATAAAAGGCTAGGTTAGGTACACAAATATAGGGAAATAAATAGGTAGTAC
ATTCGATCAAGCGAGGTTAGGGCAAGCAATAACAATCTTACTACTATAGTATGACA
CCCATATATACATTAACATACATACAATAGTTTAAACATAACACACAAATGTTTATTA
TTACATATACATTAACAGAGCAAGCAATAGGTTAACACATAGATGACCAAGCAAT
TATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTAT
CACATACACAAAAAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
GAGAGAAACAAAAACAACAATAACAACAATACACAAGGTTGATTTTTFAC
CTTTTTCGGTTTTCGACAGATCTTCGGGTTGGATTTGGGGGGTGCACTGTTTAA
GTAGTATGTTTTCGATTAAGCATCTGTTAATAAATAATATGTCGTCTCAAAAGGA
GAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAG
ATATTTACATACAGGGGTTCTCTTTCCTTTGGAGGTACTGTTTTCGACAGTAA
ATAGGCTGGAGAGGTACAAACAATAGGTTATCTGTAACAGTACAGAGTAGGA
GGAAGTGTTAAACCAAAATGCGCAATCTTAAATAATCTGGATATACATAGCATAGT
TATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATG
CATAGATGATATCTTCTCTGAGTCTCTGATCTTATGTTATGTTTATGTTTAAATA
TATATGTACCTGACATAGTTAGTTGTGTCATAAAGTACATATAGTATCGGGA
GTGGTATTCACACAGTAAACAATACTGGATATGTCGCCCAAAATACCATTAAT
ATPGACTTGTGTCAGCATGTTAGGCCAATAATGGCTTATTAATAATCATGAGATTCGG
GAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAG
GAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAG
ATGACACCGCCTGTTATAAAAAGTGCTGTCTACATGAATTTGTTCACGTGGAAGA
AAGAAAAATAAATCATACCATTAAGGCTCACATGATCATTTTAAATATATCTG
GATATTTGATGTTAGTCTGACCAAAATACATAAGGACATCATCTTTATGAGTTCG
TCGATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTT
TCGATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTTATGTT
CATTTAGTACCAAGCAACCATTTACCACATGTTTCCCTGTTGGAGGCTTCATC
CCAGTAAACATACATGTTGTTTGTTTTAAATCATGTTAAATAACA



ATTCGAGGGGGGCCCCGCTACCGAGCTTGTTCCTTGTAGTAGAGGGTGAAT
 TTGCGCTGTGGCATAATACGTGATAACGTTGTTCTGTGTGGATGTTAT
 CGGCTCAATATGACACACATACGAGCGCGGATAAAGTGTAAAGCG
 GGGTGCTCAATTCGAGTGACTACATCATTAATTCGTGTGCGTCACTGCC
 GCGGAGGAGGAGGCGGCTTGGCTATTTGGGCGCTTCCGCTCTGCTACAT
 GACTCGCTGCTCGTGTGCTGTGCTGGCGAGCGGTGATACGCTACATCA
 AGCGGTAAATAGGCTATCCAGAGATACGGGATACACAGAGAAAGACA
 TGGGCTTTTTCATGCGCTCGCCCGCTGAGAGCATAAAGAAATCGACG
 CTCAGTACGAGGTTGGCAACCGCAGAGCATATAAAGATACAGCGGCTG
 CCGCTGGAGATCCCTCGTGGCTCTTCGTTTCGACGACGTCGCTCATACG
 ATACGAGCGCGCTTCTTCGTTGGAAGAGTGCGGCTCTTCATCAATAG
 TCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 CAGCAAGCCCCGCTGACGCCGACCTGCCCTCTTCTCGGATACATGCTCT

【図 1 2 - 3】

AGAGGTCAACCCCTGAAAGACGACTTATGCCATTCGGCAGCATGCTAAGT
 AACAGGATTACGACGAGGAGGTATTGTAGCCGGTGCTACAGATTTCTGAAGT
 GTGGTGCTCAACTACGGCTACACATAGAAGAACAGTATTGGTATCTCGGCTCTGT
 CTGAAGCATGACTTACTTCGGAAAAGGAGTGTGTAGCTCTTGATCGCCGAAC
 AAACCACTGAGTGTGGAGGTGGTTTTTTGTGGTGCAGACAGATTATCGGG
 GAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 CTCAGTGGAGCAAAACATCAGTTAAGGAAATTTTGGTCTATGAGATTGTCAA
 AAGGATCTACGATAGATCTTTAAATATAAAAGAGTATTTTAAATCAAT
 AAGATATATAGCTAAATTCGTGTGCAGATTTCAACATGAACCTTAAATAGT
 GGCACTATCTTCAGAGATCTGTCTATTCGTCTATCTCATAGTTGCGCTTACCTCC
 GAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 CCAATAGTACCGGAGACAGCTCACTCCGGCTCCAGATTATCTGCACATAA
 ACCAGCCAGCTCGGAAGGCCGAGCGAGCGAAGTGGTCTCCACATTTCTCCGC
 CTCCTACAGCTTATTAATTGTGCGGGGAAGTCAGATAGTAAGTTCCGACG
 TATAATGTTTGGCAGCATTTGTGTGCCATTCTCAGCAGCATCTGGTGTGTACCG
 TCGTCTGTTGTATGCTGCTATCAGTCAGTCTCGGTTTGGCCACATCAGCGCGAG
 TCGTGTTCAGAAAGTAAATGTGGCCGACGATGATCTACTCTATGTTTATGGCAG
 CTCATAATTTCTTCTACTGTCTGATCACTCGTAAAGTGTCTTCTGTGACTGT
 GAGTACTCAACCAAGTAACTTCTGAGATATAGTGTATCGGGCAGCGAGTTGTCT
 CTCTTTCGGCGTCAATACCGGTAAATCGCCGCCATCTACGAGAACTTTAA
 AATGCGCGGAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 CCGCTGTGGATGCTTCTGTGTGATGATCACTCTGCGACATCACTGATCTCT
 AGCTCTTTTACTTCTTCACTACCGCTTCTCGGTGGTGGGAAACAGGAAGCCAA
 AATGCGCGAAAGAAAGGAAATAGGGCCGACACGAAAGATTTGATAACTCATCT
 CTCTCTCTTTTCAATATTATTAAGGACATTTATCGGAAATTTGTTCTCAGTGG
 GGATCACTAATTTGAATGATTTATGAAAGAAATAAACAATTAAGGGTTCGGCGCA
 TCGGTTGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 TCCGGTTAAATTTTGTAAATACGCTATTTTHAACCAATAGGGCGGAAATCGG
 CAAAATCTCTTATAATCAAAAGATCGGACGAGATAGGGTTGAGTGTTGTGTT
 CAGTTTGGACAAAGAGTCTCACTATAAGAACCTGGTACCTCAAGTCAGTAAAG
 GGGCAAAAGCCGTCTATCAGGGGAGTGGCCACTACGTGTACCAACTCACTCA
 GAGGAGGCCCCATTTAGAGCTTACGCGGGAAGCGCGGCAAGCTGGCGAGA
 AAGGAAGGGAAGGAAGCGAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAGTGTG
 CGGGTCACTGGCGGTCAACCAACACACACCGCGCGCTTAATGTCGGCTCAT
 AGGGCGCGCTCCCATTCGCTCATAGGCTGCGCACTGTGGGAGAGGCGCATG
 GTTGGCGGGCTCTTGGCATATCGCGACTGGCGACTGGGAGGGAGATGTGCTGCA
 CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 CGACGGCTAGTGAAGCGCGCTAATACGATCTAGTCTAGGGCAATGTGGTGGT
 TCCACCGGCTGGCGGCGCGCTGAAAATAAATAGGGAATAAGTTTTCGTTGTT
 TTATGAGAAAAATGATCAATATGGCCAAACAAATTAATGGAAACCTGAAGT
 TATGTGATATTTGTGTGTCTATGTGTCAAGGAGCAATAGGCAACTGTGGA
 AGTCTATAAAGGAATAGTTGTATGTGGATATATGTAGATCTCGAAGAAAGC
 CACGAAGAAGTAGTGAAGCTGTGTATATGTGTAGTGGCCGAATCTGTATAT

AATTCAGCGATGATCAAAATATGTGTTATGTCCACATGAGGATATATCAAAAT
AATGCTCTGTAGCACTACAGAGGGCTACGGCTGAACTACAGGGGTGTAAATTCAA
TCCATTTCAGCAGAGCGAGCAATCTACTAATGTGATGGTAAATAATGTCATGCGCT
CGAATTTGTGTGGTCACGCCGGGTACACATGGAGTCGTTTGTCGAAAGCTCATG
GAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
ATGTCACGAAAAATCCGGAATCGGAGCTATGCTGACAGCAGCTTCATATTAATGT
AGTATCAACAGGCGTCAAAAGCAGGATGATCAAAGTTCACAATGTGAAGGG
TGAGTTAATGCTCAAAATCTAACACGAGCTGCTGATGTGCTCTACTA
TAAACTGGTCTGCGCACAGCAGTGATTCAGGTTGAGGTGGTGGTGGTGGTGGT
GGTTGGGTGATCTGTGACATGTTGTGGGCAAACTCTCATAGGATTTCTCEATAAT
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TGTGTTTGGGGAACCTAATTAAGGAAGAGTCCGTAAGGACAGGTTAGTATA
ACTGATGAGGAGTTATTTGTACAGACGAGGAGGAGGGGTGAATATCTAATCC
CGAGCGTGGTAGTAGTAAAGGAAGTAATTTCAAATCAAGAGGTGCGCTGAA
ATGTTGGTATCTGGTGTTCAGAGGATTTAAACATCTGAGTCTCCACCAATGAT
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
CAGGAGATCAATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TGTGCTGTCGCCAGACCTGAGTCTGGTCTGATGCTGATGCCAACCCCAAAATAT
TAATCCAAAGCTGATCAATGAAATTTGTACAGAGTGTAGTACCTTCAAT
TTCACAAAGCTGTGGGAGCAGGTACCCGATTTGTACAGGTTGTCTATATAG
TGTCAGGTTGCAGATGCAAGCTTACCTGGCTGGACAGCGGTGGGAACCATGTTAT
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
CACATACATATACAGTAAATATCATATCTCTGGCAGCTATCGAACACAA
TAGGGGCAATACAAAATAAGTAAATATCAAAAACAAAGCTTCAATGGTGTG
TGACGTTAATGAAGATAAACACAAACAAATATTCACACAAATGACGACACAAAT
CGACAGCGCGGCAAAAGGGGCACTTGGAACATATATATACACACAAAT
AGCCACGCAAAAATACAAATAATCATCATGTAGTATGTATACAAATAGT
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TGCACTAGGAAGTATTATTCACAGTGTCCAGAAATTTTGGGTGTTGATCTCT
GGGCGATGTTCACAGTAAATATGCGCAAGTTTGTGGTCTCTACCCGGGTAT
CGATCTGCGAGTACGAAATATTTTCAACATGTGTGTATATTTTGTAGTCT
TATATCTAATCAATTTAATCAAGTTTGTGGCACCTTTAAATGTATATAGGCG
TGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TGCGTGTGCTGACACATGTCGAGGTCGCTTTGCAGACGGCGGCGGGAAATTTT
TGGGTGATCTGGGTTGTGTGGGTGGATATGGTGTGGCGGTGGTTGTGAATAG
TGGTGTGAAGTTATAGCATATAAAATAGTACTCTCTTTTGTGTGGTCAAT
CGGTGTGATATGTGTTATGAAGCATATTTGTGTGATTAATTTTAAATCTTAA
TGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TTTATAATTTTAAAGCTGTCAGGAGTCAAGAAAGAAAGTCAATGTCATGTTT
TTCTAAATTTGTGTAGGATGTGACGCTTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TAATTTGTGTCAGTTGGAGATTTGGGATCTGGGATTTTCTACTTCTATAGTACATA
TCCACATCTACTACACTCTCCGTCACATCTGCGGATTTTCCCTCTACGATCT
CCGCTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGAT
TGTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTTGATGTT
TACTGCTACAAATTAAGAAATTTCTGTGATGTCTCCCTGGTATCTCTGGCT

GGTGTGTTGTTGTTGTTGAGGATGTTATCAAACTCCCCAGACCGAGTAAAT
 AGGAATCCCTGACACCAATCTTAACTAGGACCTGCTCTCAATGTATGAG
 ATGGAGGGGTCTGTAGGCCCTACGGA TTGCTCAACAACTAGGTTGTGCGCCG
 AGGTGATCTACCACTATTTGGAAGGGCTAGACCCCAATGGAACTACGCTGC
 AGCGCCGCCAGACGGTTCAGTTCTGTGCATATGCCAAGGCGCTCAAATATGTA
 AATAAATCTCCGATTCGCAATTAATTTATCCAGCCATGTTTGTGTCTATTTA
 TTAACAAACATCCCTGGCAATCTAGCAGACAACCTTACATCAIGTTTATATAGT
 TTGTTCAGATCGCTGTTTGGTGCTGTGTGGTGGTGGGACCAATGAGTACTG
 TGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
 TGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
 TACACAGACAGGACGATCAAAAAAATATCAAAAATATTTAAATGTATTTAA
 AAGAGTGTGGCTATAACAAAACAAAACATATTTAATTAATAACAACTG
 GAAAAACAGAGGGCAGATAGCCAAAGGGGACCAATGCAGACAAACAGCA
 AACAAACAAAAGGAACGACGACAAACCAATTAACAAAATAACATGGT
 TGCTAATATAATGCTGAGACGAATTTGTGCGGCTACGACCTTCACTATTTGT
 GTGTGATGTTGCAAAATGTATATAATATACAGCAATGTTGTTGTTGTTGTTG
 TGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
 AAAGCTGTCTCTGTGTGTGTCTATCTATATATAATGTATTAATTTGCTATAAT
 TTATTGTGTGTGATCTGTCCAGATATGTGTGTGTGATGTTCATAACAACTAG
 TTATTAATTTTGTGAATCGATATCTACCAACATTTAATCTGTAGGTTCACCT
 TTAAGTGTACTACAGGGCTGATCTTACACAGGGTGTTGTGTGTGTGTTA
 CTCTACTCTTCTAGTCGGATATTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
 ACACACTTGTGTTGGGAGGTTGTTGGAGGAGTACAACTGTGTTGCTGTGTTG
 TGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
 TTGCTAAATGCTACTTTTAAACAGCTGCTGCAATTTGTGTGTGGGTGTTGTT
 GTGTCTATCAATCTCATATGTTATACAGAGCTCTCATATGTGTGTACTATAGG
 TACTGTTTGTGTGAGGCTCTCATTTTGTGTATTTCCGCAACCCAGCTGTGCT
 CTCTCATCTACCTGTTCTGGTGTGTGTGAGAGTTTCTCAATGTGTCCCTATCCG
 TGTCTGTAGGTCTGATATAAAGGCTCGGTTTGTACCTCTTCCGGGCACAC
 TGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
 TTGTGCAAGCTGTTATCTCATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCAAAATGTGA
 TGTCTTCTGCTGTCCGCTGATATTTGTATATATGATATGCTGTAAATATCT
 CTAAATCTGTGATCATTTATCTCTTCCTGTGATCTTCAATCATGTATTTAT
 CTCCTGTTTGTCTTCTACAAATGGCTCTATCTCAAACTCAACAACTACCTCT
 TCCCTCCCATCTGTCTACGTTAGCGCCATTCGAGTTAGTTACTTGTGAT
 CGCAGATGGGCGACGTGTATTTGAACGACCTTAAGACGCTGTGTGTGAAC
 AATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
 TACAAACAAAGATGTTGTTTAGGTTGTTACCTGTTGTTGTAGTGTGTGTTACT
 TGTGTGGCGGCTCTGCAAAAGGTCATCTCTCTCTCTGATCACTCTCTGA
 GCTGTCAATGTCTATGTCATGTGACGTGAGTTGCTAATTTGTGTAGGTTGTGTT
 TAATCAACAGCTGTGACGGTTGGTACTTACATGCTAGTATATGATCTAGTA
 TTCTTAGTGTCTCTAGATGTTTGTCTCCAGACGCCAACTAATGACCGGGTCT
 AACCATGTGCTATATAGATGAATGTGTTTCTGTGTCGAATGGAATGTGTTTCT
 GTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
 TACTGTTTGTATGATATCTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
 ATACTTATTTTCTAATCTTACTATAAACAATACATCACTGTGCACATG
 CATAAGGAAATACCTCCTATACCAATATTTAATTTGTGATCTGCAAAAAT

AACATGATGAGGAGAAAAATTAATAATGTCGACGAGGCGTCGACGATGTGACG
 AGGGCGTAGCTACGGTAGGCTGCTCAATAAGCGAGGGGATTTAAATGTGTAGCAAA
 AGTTTGTGTATAGATGATTTCTCAATAGAGGAAACAAATTAAGATTTCGACGGTGTG
 GTATCTGCGACAGGTGGTAAATCTAAACACAGATGAGGTGGGAATGTATGGTG
 GTGTGTCGACAGGCTGCTATAAAATGAGATGTTATTAATGAAGTAAAGTAAAGTA
 AGAATTAACAAGGCTCAAGGAGGAGGAGTATGATGAGGAGGAGGTGGGGTGTTG
 GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 TGCACCTGTGACCGACCGACCTGTACAATCTGAACCTTAAACCTTCCAAAAACCCCT
 TAAGTACCATTAATCTGAAATTAATTTGCTGATAGTGTAGTGGTCTCACTTTG
 GTATAAGCATAGCTGGGCGACGCTGTGAGGCTGTGATGTTTGTGTAAGAATGTG
 GTATGCGAGATGACGCTGGGCTGTGTAGACG GTTTGTGTCTATAATAAAGAC
 GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 CAACACACACACACAGTAATTTTACAATACCATCAACCATGTCGACGAGAAC
 AGTATACAGTTAGTCTTTGTGGGTAAAGTATGTGCATGAAAATTAATACACA
 TCTTGTTGATTAATAAAAAATTAAGTAAAGCAAAAAAAATTTGTGAGGCGCA
 CCGACAGACACCAAGACAGCACACACACACAGCACAGCAACAGCAAGTAAAT
 GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 TATAAAACAAACACAAAGTAAAGTAAATATCTATGATATACACATTCAGCAC
 ACATAATTTGGCTTGTGGTTTACATACGTAATTTGTACACATAATTAACATGAC
 ATACACACAGTACATTTGTGACAGAGCTGGGTGCTATTTAACAGTTTFAAAAA
 CAGCTGTGTCGTGTGTGTTCTGTGTGTATGATGACGTAAACAAATCTGCAATTTGTG
 ATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 TTTGTTAGTGTGTTTAACTATATCTATCTATATCTATCTATCTATCTATCTATCT
 TAAATGACGACGATGGTAGGCTATATGAGTACACAGACGCTGGCCTTTGTAT
 GTACAGTGTGTGTGTGATCTGTGTAGTCTCTCTCTGTGGTCTACTGTCTCCAGCG
 CGAGTGTGTATATTTGTGGAGATCTGGGTGTGTGTTCTGGAATGTGTAATAAT
 GCGAGCTGTGCTGTGCTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 GGACATACAAATCCGCGACTACCAATGACCTTCCCAATTAATTTGTTTGTATGA
 GTACTTTTGTACACCTCTTAAAAATTTAAAAATACGCTCTTTTCATTTGCCATGT
 TATATAATACACCCCAATAGCTCAACTCTTGTGCTGCTGCAAGAGTACAGTTGT
 TTCTCCATAATAATATATATCTTACCTCAATTTGTATAATCAATCTTTGTGTGCTT
 GTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 GTGGCTGTATAACCAACACTTGAAGTCTTTGTGTGCAATGTCCATKATCTAT
 GTTTTATATGGTGATGATTTTGTATGCTCTTAATGCCCATTTGCATGATACATCT
 TGAACAGCTTTAGTCTTTGATGCTACCAATGACGGCCACACTGGTGGCACA
 GTGTGTATATCTCATTTGTGCTGGGTGTATACATATAGCAACACATCCATCTGCT
 CAGTATGTTTAAAGTCTTAAATTAAGTCTTAAATTAAGTCTTAAATTAAGTCTTAA
 CAAATGATGAGGAGAAAAATTAATAATGTCGACGAGGCGTCGACGATGTGACG
 AGAATATTAATAATTTTGTAAATGGAACAGATATACACGTGCTCATACCTGTG
 TFIACAGTGTACATCTGAACAGTACACCCACCCACCTACCTCGAGTCATTTA
 AGTCTGTGCTGCCATTTTGGGTTTCTTACCTTGGTGTGGCATCTGCTGATCTTTCCA
 GTGAGTATGATATTTTGTGTTTCCACCAAGTACCAATTTGTGAGTATGAGTATG
 GTGAGTATGATATTTTGTGTTTCCACCAAGTACCAATTTGTGAGTATGAGTATG
 CCACACACAGCTTTATCGACAGCTTGTGACGATCTGTGCCAACTTTGTTTATGT
 GCACACAGGATCTTATATGCTGCACCCCTCTCTGTATCTATAAACACAGTTG

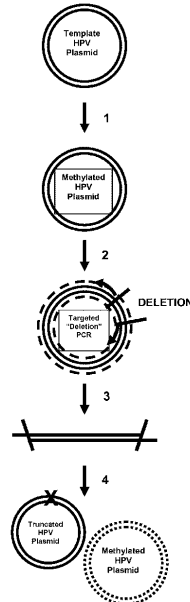
【図 18-4】

TCACCTTAATCAAGTTTTTGGGGTTCGAGGTGCGCGTAAAGCACTAAATCGG
AACCTTAAGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAAC
TGCGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCAAGGAGCGCGCGCTAGGCGCT
GGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGGTACCAACACACCCGCGCGCTTAAT
GCGCGCTACAGCGCGCGCTGCTTTCGCACTTACAGCTGCGCAACTGTTGGG
AAGGGCGATCGGTGCGCGCTTTCGCTTATCGCGAGCTGCGGAAGGGG
ATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGTTTCCAGTCACGA
CGTTGTAAACGACGCCAGTGAAGCGCGCTAATACGA CTCACTATAGGG
GAATGGAGCTCCACCGCGTGGCGCGCTGTAAAGAATATGACAGAC
GTTTACGTTTGGCTTTAAACAAATAATACTAGGGTGAATATAAACCTGAC
CCATAAATATATAGGACAGCAGGCTGTAATGGCACTATTGGTGAATAA
TAGTTTCTGTAGAAGTACTGGTAAAGCAATATCTGGACAGGAATGTGTC
TAACCCAGTACTAAAGGAATAGTTGATTTTGCAGTTGCAGTAAATATCA
CTACTAACTAACTATTACTATGTATCTGTAGGTGTATATGTTTGTAGT
ACAGTCTCTCTACATCTTGTCTAAACACATCATATAACCATCATTAAT
ACTACTACAGTACTACTAGGTGTTTGTGGTGAACATAAGGTGCAATTT
CAATATCATTAGTATAGGTATAGGACTATATCATGTATAAAATGTACTTTAGCA
CCTATACGTTTGCACACTTATGTAGAAAGTGTGACGCTGTGCTCAATCT
AACACGTATGCTGTTTATGTGTGAACAGATTTGTGTAGTATCACTAATA
CGAGATACATCTATAATAGCAGGTGACTGTTTACAGAAGTTGTAATCAA
ACCTGGAAGTAGAGGCACTATAGATGTAGGACAGGTATACCTGACTCTAT
AAAACTTGATTTCTCCACTAATGAACAATAGAAAGATCTGAAGGCCAACA
GAGCTAAACACTGATGTTGTATAGGTGTAAATGGAAATTCACATGTTTAT
ATGGTGTGCTGTAGTAATGGAAGTATCCAGTACCGCCCTGCTGACAGA
CCCACTACCTATTCACATCCCAAAACAACTCCAACTACTACCATATTTTA
ATATATTATCAGCTATAGTACTACCTTCAACCTTGGGAATACATCAGGAGGG
CAGTACCTGCTGTTTACATGTTTATATAATTTGTTGAGATGCAGTGT
TTTGTATGTGTGTGTCACGCTTGGACGCAATGCTACATAAAAAATATAGGC
AGTTTATATATATGTAATAATGTTATGTTATTTGTAATGTAGCATGTAAT
GTACAAGCTCATAGGAATATAAATACCAAAACATATAAAAAATATCTT
TAACAATGATGTATATATGTAATAGGTATTTATAATCAATACCAATAACC
ATGGGTAAATATACACAGACACTGCAAGCGACACACACAAGCACAACAA
AGCCAACACAAAAACAAATACAAATATACAAAGATCATATATCTGTGTA
ACCAATGTTACAAAGACATGTATCTGATGTAACATAATAGTTTGTGTTAT
TTTACATGTGTAAAAAATGTTGTGTGTGCAATACAGTTGTAAACATTAATGT
TATTACACCACTTACTATTTGATAGTATGGTCTCAATGCCATGTTGTGTTAC
ATTTTTAAATAAGTGAATAGCTTTATGCAATCTATATCAAAACATTTTA
AGCTGTTTGTGACCTTTTAAATGCACTATTGGCGCAACATTTATGTAGTA
CACTGGGTACAGGACTCTGTGGTGGATGAGTTATGCAAAACATCCAGGG
GCCTCGGTCCGAGTCACTGCTTTCGCGTTCCGATGGCACACCGGTG
TCAACGTTGGTGCAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
AACAAATTCAGGAATGGATCTTACAGGCGCTAGATACAGAGCACACACAT
ATTACCTGACACCACTATGTACTCCCATAGCCCTTACCGCTGACCGTTT
GCATCTGTACCAATCTGTATAGTATACCTTTCTCATCATCTGTTTCATAA
TATATACCAATTAACTATTTTGTACTACTACTTTGCCACCCCGCTTCATAC
CAACAATATATATGTGTCAAAATACATATTCATGCTATTTGCTCTTTTACA

【図 18-5】

GTCATATCTAACCTCTACTGTGCTAGCAATGCTGCTTTGCAATATTCCTTTGT
AATAAATTTGTAATATCTGTTATAGGTGTGCTCTGTTTCTATATCCATATTT
GAAATGCTACTGACGACCACTACTGCTTACAGTGGCGGACACAAATTTGGTGGC
TCTTCAATTAACATTTTGAACACCTTACCCTGGCCCAAGTCCCGGTACTCT
CTGCTCTGAAGTTTCCACTTCACTATGTCATATCCACTGCTCTGCTCTCAA
ACAGTCTGCTTTAGATGTAATCTTACCGCTACTTATTGACAATACATTTATTT
GTGGACTAAGCTGTTTGTCTATGAATTCATCTCTTTTATATCTGGGCTACCGC
CAGGACTACCTGTAACCTTTGCTTTAGAACACGATAGCCTCATTTGTCTGCA
TTTGTCTGCTGTGACTGATACAAATGCTGTGCAATTTCTGTTGTGATATATA
TTTGGTATATGCTATATCAATAAAATCCCCATTTCCGACTCATCTGTATCC
CTCCATCATATAATTTCTCTCTGGAATG

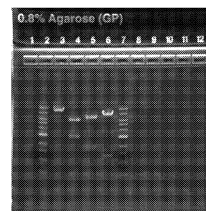
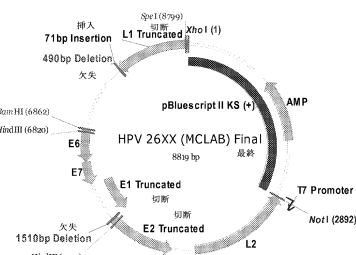
【図 19】



【図 21】

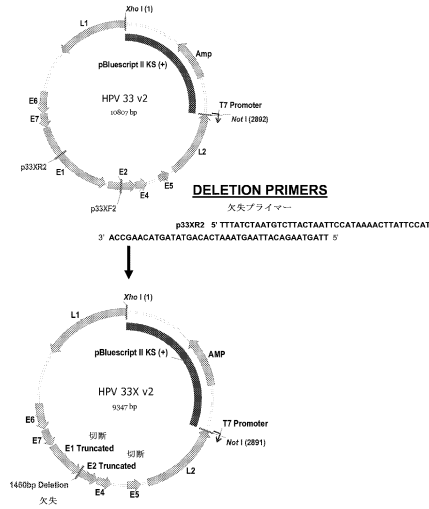
HPV 26XX Restriction Map Verification

HPV 26 XX の制限酵素地図の検証

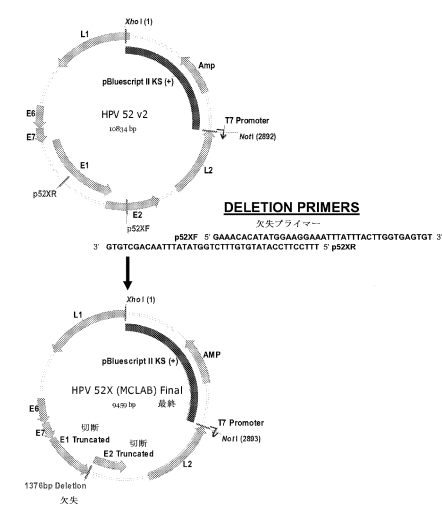


HPV 26xx		
レーン	消化	断片サイズ (bp)
1	Blank	-
2	1 kb DNA Ladder	-
3	XhoI	8,819
4	XhoI/NotI	5,927 + 2,892
5	BamHI/Spel	6,882 + 1,937
6	HindIII	-
7	1 kb DNA Ladder	-
8	Blank	-

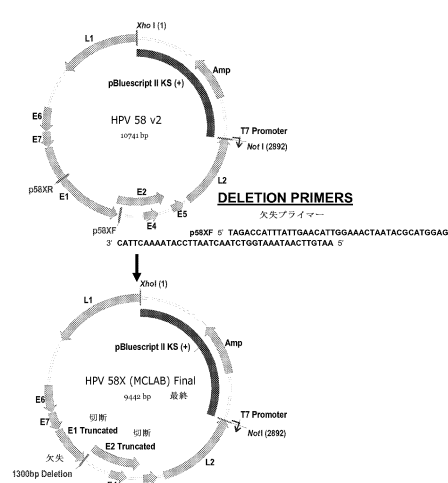
【図 2 2】



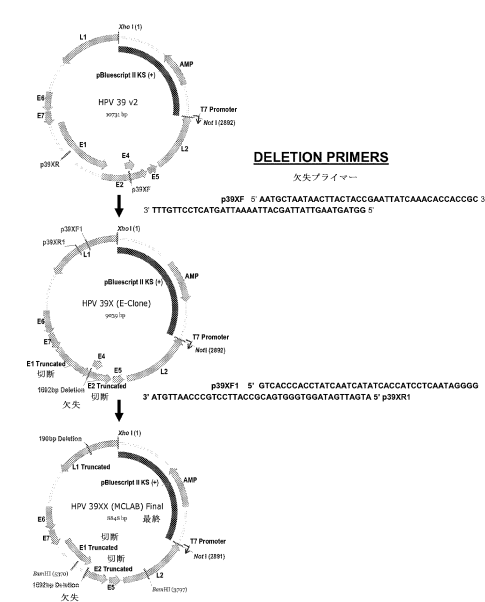
【図 2 3】



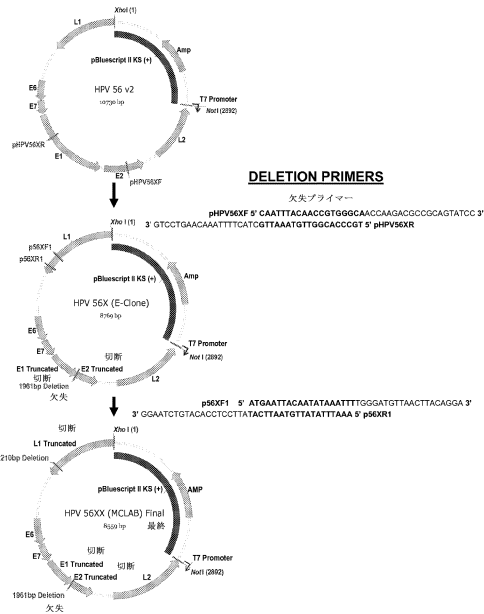
【図 2 4】



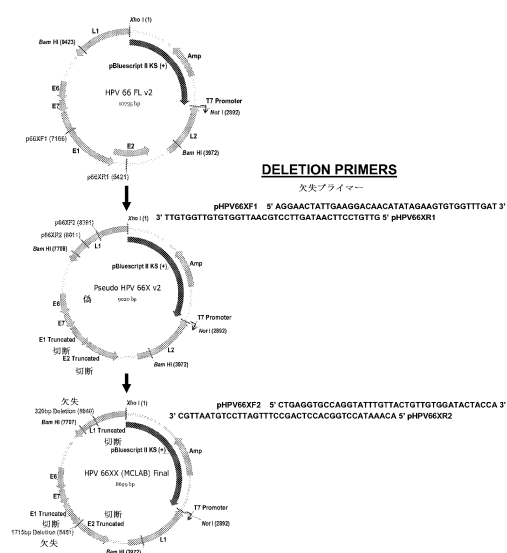
【図 2 5】



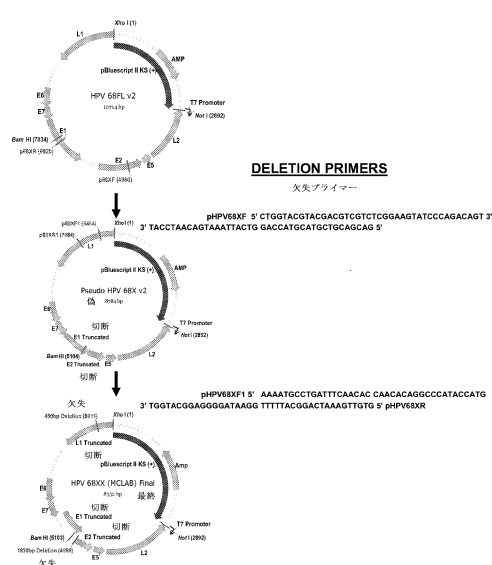
【図 26】



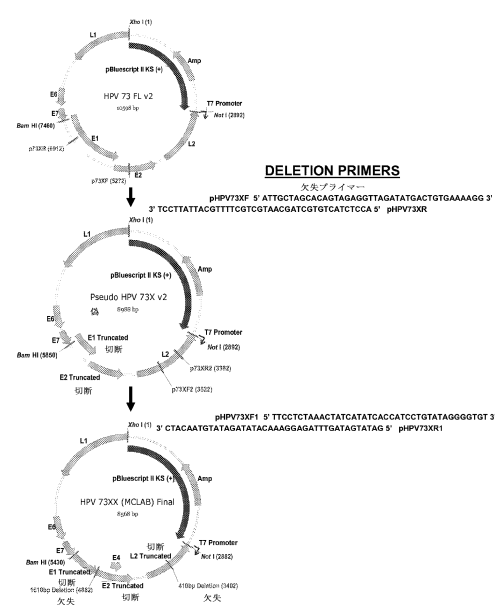
【図 27】



【図 28】



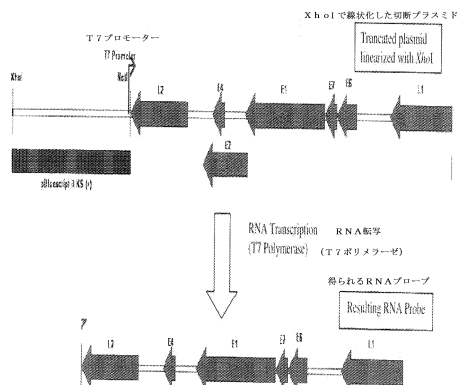
【図 29】



【図 30】

GenBank Accession Number	GenBank Accession Number	HPV Type (V P V 55)	HIGH RISK 高リスク																IDENTITY %
			GenBank Accession Number																
			NC_011396	NC_011397	NC_011398	NC_011399	NC_011400	NC_011401	NC_011402	NC_011403	NC_011404	NC_011405	NC_011406	NC_011407	NC_011408	NC_011409	NC_011410	NC_011411	
NC_011396	gb HPV 1	49	48	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	45	
NC_011397	gb HPV 2	54	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011398	gb HPV 3	55	55	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011399	gb HPV 4	50	50	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	50	
NC_011400	gb HPV 5	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	45	
NC_011401	gb HPV 6	58	58	54	57	63	56	54	55	54	56	62	55	54	55	57	54	54	
NC_011402	gb HPV 8	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	45	
NC_011403	gb HPV 11	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	55	
NC_011404	gb HPV 13	58	58	57	58	60	59	57	57	56	56	56	60	57	56	57	58	56	
NC_011405	gb HPV 16	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
NC_011406	gb HPV 18	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011407	gb HPV 26	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011408	gb HPV 31	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011409	gb HPV 33	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011410	gb HPV 35	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011411	gb HPV 39	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011412	gb HPV 42	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011413	gb HPV 44	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011414	gb HPV 45	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011415	gb HPV 48	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011416	gb HPV 51	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011417	gb HPV 52	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011418	gb HPV 54	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011419	gb HPV 55	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011420	gb HPV 56	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011421	gb HPV 58	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011422	gb HPV 59	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011423	gb HPV 61	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011424	gb HPV 62	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011425	gb HPV 64	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011426	gb HPV 66	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011427	gb HPV 68	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011428	gb HPV 70	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011429	gb HPV 72	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011430	gb HPV 74	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011431	gb HPV 76	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011432	gb HPV 78	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011433	gb HPV 80	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011434	gb HPV 82	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011435	gb HPV 84	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011436	gb HPV 86	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011437	gb HPV 88	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011438	gb HPV 90	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011439	gb HPV 92	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011440	gb HPV 94	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011441	gb HPV 96	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011442	gb HPV 98	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	
NC_011443	gb HPV 100	57	57	56	57	58	57	58	56	56	56	56	56	56	56	56	56	55	

【図 31】



【配列表】

0006153866000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 キュウ, ピーター

アメリカ合衆国, メリーランド 20878, ガイザースバーグ, 11407 ロイヤル ビュー
コート

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 山崎 利直

審判官 長井 啓子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0105060 (US, A1)

米国特許出願公開第2006/0160069 (US, A1)

Paul S. Eder et al., THE NEXT GENERATION HYBRID CAPTURE (R) HIGH RISK HPV DNA ASSAY ON A FULLY AUTOMATED PLATFORM, JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, 2009年7月1日, Vpl. 45, pp. S85-S92

Philip E. Castle et al., Human Papillomavirus Genotype Specificity of Hybrid Capture 2, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2008年8月, Vol. 46, No. 8, p. 2595-2604

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N 15/00

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS/WPIX (STN JSTPLUS/JST7580/JMEDPLUS)