

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5923497号
(P5923497)

(45) 発行日 平成28年5月24日(2016.5.24)

(24) 登録日 平成28年4月22日(2016.4.22)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/68 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/68
C 12 N 15/00Z N A A
A

請求項の数 12 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2013-516945 (P2013-516945)
 (86) (22) 出願日 平成22年11月15日 (2010.11.15)
 (65) 公表番号 特表2013-529471 (P2013-529471A)
 (43) 公表日 平成25年7月22日 (2013.7.22)
 (86) 國際出願番号 PCT/CN2010/001833
 (87) 國際公開番号 WO2012/000151
 (87) 國際公開日 平成24年1月5日 (2012.1.5)
 審査請求日 平成25年11月5日 (2013.11.5)
 (31) 優先権主張番号 201010213722.7
 (32) 優先日 平成22年6月30日 (2010.6.30)
 (33) 優先権主張国 中国(CN)

前置審査

(73) 特許権者 513212316
 ビージーアイ ゲノミクス カンパニー
 リミテッド
 中華人民共和国 518083 グワンド
 ン省 シエンチェン ヤンチャン ディス
 トリクト ホンガン サード ストリート
 ナンバー21 ビージーアイ パーク
 ビルディング ナンバー7 フロアズ 7
 -14
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和
 (74) 代理人 100095500
 弁理士 伊藤 正和
 (74) 代理人 100111235
 弁理士 原 裕子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 S o l e x a 塩基配列決定法に基づくヒトバビローマウイルス検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

9 5 のインデックスプライマー群を含むインデックスプライマーセットであって、各インデックスプライマー群は11のインデックスプライマーを含み、前記インデックスプライマーの配列はインデックス配列およびPCRプライマー配列を含み、インデックス配列はPCRプライマー配列の5'末端に、任意にリンカー配列を介して連結しており、ここで、

1) 各インデックスプライマー群について、インデックスプライマー群のうちの前記の1 1のインデックスプライマーは、同一のインデックス配列を有し、および

2) 各インデックスプライマー群について、前記の11のインデックスプライマーのPCRプライマー配列は、それぞれ配列番号：96～106に記載される配列であり、

異なるインデックスプライマー群で使用されるインデックス配列は異なっており、9 5 のインデックスプライマー群のインデックス配列はそれぞれ配列番号：1～95に記載される配列である、

インデックスプライマーセット。

【請求項2】

請求項1に記載のインデックスプライマーセットを含むキット。

【請求項3】

少なくとも1のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項4】

10

20

少なくとも2のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項 5】

少なくとも10のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項 6】

少なくとも20のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項 7】

少なくとも30のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項 8】

少なくとも40のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項 9】

少なくとも50のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項 10】

少なくとも100のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項 11】

少なくとも200のアダプターをさらに含む、請求項2に記載のキット。

【請求項 12】

前記アダプターが配列番号：121～132からなる群より選択される配列を有する、請求項3～11のいずれか1項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、ヒトパピローマウイルス(HPV)の検出方法、特にSolexa塩基配列決定法に基づくHPV検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

子宮頸癌は、世界中の女性の間で、乳癌に次いで二番目に罹患率の高い悪性腫瘍である。毎年全世界で約500,000件の症例報告があり、そして毎年250,000人近い人々がこの疾患により死亡している。開発途上国での症例は、全体のおよそ3分の2を占める。子宮頸癌は、中国においても広まっている。中国における子宮頸癌の症例は、全体の10%を占める。研究によれば、ヒトパピローマウイルス(HPV)は子宮頸癌と密接に関連しており、そして重要な発癌因子であること、および子宮頸癌を発症する必要条件の1つであることが示されている。100種類を超えるHPVが、皮膚(皮膚型)または気道および肛門・生殖管の粘膜(粘膜型)において感染可能であり、および40種類を超えるHPVが子宮頸部において感染可能である。HPVの種類は、HPVによって誘発される良性病変、前癌病変、または悪性病変によって、以下の2つの群に分類される：(1)6、11、42、43、および44型などを含む発癌の危険が低い群；ならびに(2)16、18、31、33、および45型などを含む発癌の危険が高い群。従って、HPV感染の早期発見および正確な分類は、子宮頸癌の予防および治療に不可欠である。

30

【発明の概要】

【0003】

40

現在のHPV検出法は主に以下の群に分類される。(1)子宮頸部塗抹標本の細胞診またはThin-prep細胞試験(TCT)を用いることにより細胞形態学的な変化に基づいて診断する細胞診。HPV感染については、空胞細胞症、異常角化症、およびコンジローマ様の基底細胞を顕微鏡下において見ることができる。この方法の欠点は、HPV感染の診断において感度および特異性が低いことにある。(2)HPVのカプシド抗原を検出することによってHPV感染をさらに確認する免疫組織化学法。こうして得られた陽性反応は、明確に示されるものであり、結果は信頼できる。しかしながら、カプシド抗原は、HPV-DNAが複製および成熟するまで生成されない。従って、陰性と診断される被験体が、HPVに感染していないとみなすことはできない。本方法は感度が低い。(3)主に蛍光検出PCR装置を使用するリアルタイム蛍光定量PCR(FQ-PCR)。本方法において、蛍光基をPCR反応系に添加し、およ

50

びPCRの各サイクルで生成した増幅産物を、蛍光シグナルの蓄積によってリアルタイムに監視することにより、鑄型の初期濃度の定量を実現する。本方法は処理能が低い。(4)米国FDAによって承認されているHPV DNAの検出のための唯一の臨床方法であり、ヨーロッパCEおよび中国SFDAによって承認されている、ハイブリッドキャプチャー法(主にHC-11システム)。本方法は、特定の標本採取器および容器、全鎖長8000bpのRNAプローブならびに特異的な一次抗体(どちらも特許権が許可されている)を使用する。本方法の機構は、核酸プローブが試験される被験体のHPV DNAとハイブリダイズし、化学蛍光反応または酵素反応による増幅シグナルに基づいて検出が実施される。本方法において使用される核酸プローブは、主に2つのクラスに分類される:低リスクHPVを対象とする核酸プローブおよび高リスクHPVを対象とする核酸プローブ。本方法は、HPVの一次スクリーニングに使用可能であるが、HPVの特定の型を確定することも、多重感染を確定することもできない。
。

【0004】

前記の検出法を組み合わせて用いることにより、HPV検出の感度を増加させることができ、偽陰性率を低減させることができる。しかしながら、これらの方法を組み合わせる場合の費用は高く、従って、これらの方法の組み合わせは、経済的に発展した地域におけるHPV検出および子宮頸癌のスクリーニングにのみ適している。経済的に発展途上な地域、特に山岳地域および多くの農村地域にとって、前述の検出法を組み合わせて用いるのには大きな制限がある。従って、適かつ低費用なHPV検出法の開発が必要とされている。

【0005】

別の態様において、前述の検出法などの現在知られるHPV検出法は、処理能が低い。試料に対するHPV検出を大規模に実施する場合、前述の方法の利用は時間および労力がかかり、その費用が高い。従って、当技術分野において新規の高処理能かつ低費用なHPV検出法の緊急な必要性もある。

【0006】

発明の説明

本発明は、Solexa塩基配列決定法およびPCRインデックスに基づく、新規のHPV検出法および同検出法のためのキットを開発する。本発明の方法およびキットは、低費用での高処理能HPV検出を達成可能なだけでなく、正確なHPV分類も実施可能である。

【0007】

発明の定義

本発明をより理解するために、関連用語の定義および説明を本明細書に記載する。

【0008】

本出願で用いられる用語「PCR」は、ポリメラーゼ連鎖反応を指す。

【0009】

本出願で用いられる用語「Solexa塩基配列決定法」は、近年開発された次世代のDNA塩基配列決定法を指し、これはまた、第二世代塩基配列決定法とも称されている。Solexa塩基配列決定法と従来の塩基配列決定法(サンガー塩基配列決定法など)との違いは、Solexa塩基配列決定法が、合成を実施しながら塩基配列決定を行うことによってDNA配列を解析するところにある。Solexa塩基配列決定法には、以下の利点がある:1)低費用であり、従来の塩基配列決定法の費用の1%である;2)高処理能を有し、複数の試料に対する塩基配列決定を同時に実施することが可能であり、1回のSolexa塩基配列決定において約500億(50G)塩基のデータが生成可能である;3)高精度(98.4%を超える)であり、多重反復配列の読み出しに関する問題を効果的に解決する。別の態様において、塩基配列決定される配列の数が予め決まっている場合、高い塩基配列決定処理能が、配列の塩基配列決定冗長度を次々に高めることにより(例えば、各配列を何度も塩基配列決定することができる)、塩基配列決定の結果の信頼性を保証する。本出願で用いられる場合、用語「塩基配列決定冗長度」は、塩基配列決定データに現れるDNA配列の断片の回数を指す。塩基配列決定冗長度は塩基配列決定データの量をゲノムの長さで割ることにより算出することができ、例えば、塩基配列決定冗長度10は、塩基配列決定データの量が全ゲノム長の10倍

10

20

30

40

50

であることを示す。

【0010】

Solexa塩基配列決定法は、幅広く用いられている。これは、ゲノム塩基配列決定、遺伝子型、遺伝的多型における研究などに利用可能である。本発明の方法において、Solexa塩基配列決定法はHPVを検出するために用いられる：HPVを対象として解析されるべき試料を塩基配列決定し、次に、BLASTおよびSOAPなどの当技術分野において既知のアライメントプログラムを用いることによって、塩基配列決定結果をHPVデータベース内の参照配列と並べ、試料中の感染したHPVを正確に分類する。本明細書で用いるHPVデータベースは、例えばNCBIデータベース（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）などの公開データベース内に見出すことができる、当技術分野において既知の多様なHPV型由来の配列を含む。

10

【0011】

本明細書において互換的に用いられる場合、用語「PCRインデックス」、「インデックス」、または「プライマーインデックス」は、PCRプライマーの5'末端に付加されているヌクレオチド配列の小断片を指し、異なる鑄型由来のPCR産物の混合物中の各PCR産物の鑄型の由来を区別するために、PCR增幅によってPCR産物を標識するのに使用することができる。プライマーの5'末端にインデックスを付加すること、および増幅を実行するのにインデックスプライマーを用いることによって、PCR産物を標識することにより、さらなる解析および処理のためのライプラリを、複数の異なるPCR産物を混合することにより得ることができる。ライプラリ内の各々の異なるPCR産物は固有のインデックスを有し、従って、異なるPCR産物は、各PCR産物中の固有のインデックスに基づいて互いを識別することができ、および、PCR産物をそれらが増幅されるPCR鑄型と1つずつ対応させる。

20

【0012】

例えば、複数の試料を塩基配列決定する場合、異なるインデックスを各試料のためのプライマーの5'末端に付加してもよく、および次に、付加したインデックスを有するプライマーを使用してPCR反応を実施することにより、各試料（すなわちPCR産物）を標識する。PCR反応の後、試料由来の異なるインデックスを有するPCR産物を混合してライプラリを構築し、および次に、ライプラリ中のPCR産物を高処理能Solexa塩基配列決定法によって塩基配列決定する。最後に、結果として得た配列データ内で、固有のインデックスの配列に基づいて、塩基配列決定結果を1つずつPCR産物（つまり試料鑄型）と対応させる。

30

【0013】

インデックスを、PCR増幅のためのプライマー対の1つまたはプライマー対の両方のプライマーに導入してもよい。プライマー対の両方のプライマーにインデックスを導入する場合、インデックスプライマー対を形成するようにPCRプライマー対をインデックス対と組み合わせ、ここで、順方向および逆方向PCRプライマーは、それぞれ順方向および逆方向インデックスを有し、そして、順方向インデックスは順方向PCRプライマーに対応し、および逆方向インデックスは逆方向PCRプライマーに対応し、かつ順方向および逆方向インデックスは同一であっても異なっていてもよい。

【0014】

インデックスを設計する場合、複数の要素が考慮され、これらは以下を含む。：1) インデックス配列において、3以上の塩基を含む单一塩基反復配列を避けるべきである。；2) すべてのインデックスの同位置の塩基Aおよび塩基Cの総含有量は、その位置における全塩基の30%～70%にするべきである。例えば、100の異なるインデックス配列を設計する場合、各インデックス配列の二番目の位置（つまり、いわゆる同位置）の塩基Aおよび塩基Cの総含有量は、100の配列の二番目の位置の塩基の30%～70%を占めるべきである。；3) インデックス配列自身のGC含有量は、40%～60%であるべきである。；4) インデックスの配列は、互いに5塩基以上異なるべきである。；5) 塩基配列決定のためのプライマーと高度に類似した配列は、インデックス配列において避けるべきである。；6) インデックス配列をPCRプライマーに付加した後において、PCRインデックスプライマー内の、ヘアピン構造および二量体などの二次構造を避けるべきである。

40

【0015】

50

本出願で用いられる場合、用語「インデックスプライマー」は、二つの部位、すなわちインデックス部位およびプライマー部位を含むインデックスを有するプライマーを指し、ここで、インデックス部位は、増幅反応においてPCR産物を標識するのに使用され、一方、プライマー部位は鑄型を増幅するために鑄型と塩基相補的に一致し、そして、インデックス部位は、任意にリンカー配列を介して、プライマー部位の5'末端と連結する。

【0016】

本出願で用いられる場合、用語「アダプター」または「ライプラリアダプター」は、ライプラリ中で増幅したPCR産物に連結し得る、設計されたヌクレオチド配列断片を指し、従って、ライプラリ中のすべての増幅PCR産物は、アダプターに基づいて塩基配列決定することができ、例えば、PCRプライマーに対する特異的塩基配列決定プライマーを使用せずに、アダプターに対して設計された塩基配列決定プライマーを使用して、塩基配列決定が実施される。好ましくは、本発明のアダプターは、「非PCR」法によりPCR産物と連結し得る。

10

【0017】

本出願で用いられる場合、用語「非PCR」は、PCR反応を実施することなくアダプターを直接PCR産物に連結させる方法であり、例えば、アダプターはDNAリガーゼを使用することによりPCR産物と連結する。非PCR法を用いることによって塩基配列決定ライプラリを構築することは、当業者に知られている（例えば、Nature Methods 6, 291-295 (2009)を参照せよ）。「非PCR」法は、PCRがすべての工程で不必要なため、以下の利点を有する。
： 1) 精製ステップを減少させ、時間および費用の消費を抑える。； 2) 非特異的増幅を低減させる； 3) 配列が高度に相同である多くのPCR産物を多く含むライプラリの構築中にPCRによって導入される誤りを避け、その結果、最終的な塩基配列決定結果の精度が向上する。

20

【0018】

本出願で用いられる場合、本発明の方法およびキットは、少なくとも1つのアダプターを使用し得る。異なるアダプターは、同一配列の断片（「塩基配列決定配列」として本明細書において言及される）を共有してもよく、異なる特徴的配列をさらに含んでもよく、従って、異なるアダプターは、（同一の塩基配列決定配列に対して設計される）同一のプライマーによって塩基配列決定することが可能であり、固有の特徴的配列は、複数のライプラリの混合物中で各PCR産物のライプラリの由来を識別するために、すなわち、異なるライプラリ由来のPCR産物をさらに標識するために、使用可能である。

30

【0019】

標識効率は、インデックスと、異なる特徴的配列を有するアダプターとを組み合わせることにより、大きく向上する（図1を参照せよ）。例えば、100のインデックスは100の試料を標識することができる一方、100のインデックスと、異なる特徴的配列を有する200のアダプターとの組み合わせは、 $100 \times 200 = 20000$ の試料を標識することができる。

【0020】

従って、1つの態様において、本発明は少なくとも10、好ましくは少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または95のインデックスを含むインデックスの群を提供し、そして前述のインデックスは、配列番号：1～95からなる群より選択される配列を有する。好ましい実施形態において、インデックスの群は、少なくとも配列番号：1～10、もしくは配列番号：1～20、もしくは配列番号：21～30、もしくは配列番号：31～40、もしくは配列番号：41～50、もしくは配列番号：51～60、もしくは配列番号：61～70、もしくは配列番号：71～80、もしくは配列番号：81～90、もしくは配列番号：91～95に記載のインデックス、またはこれらの任意の組み合わせ、例えば配列番号：1～95に記載のインデックスを含む。

40

【0021】

本発明の好ましい実施形態において、本発明のインデックスは、配列番号：96～106に記載のPCRプライマーを標識するのに使用され、従って、これらは高処理能なHPVの塩基配列決定、検出、または分類を実施するのに用いられる。

50

【0022】

1つの態様において、本発明は、11のインデックスプライマーを含む1つのインデックスプライマー群を提供し、前述のインデックスプライマーの配列は1つのインデックス配列およびPCRプライマー配列を含み、そしてインデックス配列は、任意にリンカー配列を介して、PCRプライマー配列の5'末端に連結され、ここで、

1) 前述のインデックス配列は、配列番号：1～95からなる群より選択され、インデックスプライマー群内の前述の11の各インデックスプライマーは同一のインデックス配列を有し、および

2) 前述の11のインデックスプライマーのPCRプライマー配列は、それぞれ配列番号：96～106に記載される。

10

【0023】

本発明のインデックスプライマー群は、HPVゲノムの最も保存された遺伝子領域（L1領域）内の高度に保存されたDNA配列に対応する、約170bpの少なくとも16の産物を増幅することができる。従って、本発明のインデックスプライマー群は、HPVを正確に分類するために使用され得る。

【0024】

好ましい実施形態において、本発明のインデックスプライマー群は、HPVの塩基配列決定、検出、または分類に有用であり、従って、HPVの存在の診断およびHPV型の決定といった医療用途、ならびにHPVデータベースの構築、新規のHPV型および亜型の同定、HPV型の分布の地域特性に関する研究、疫病学上の研究、およびワクチンの開発といった非医療用途において有用である。別の好ましい実施形態において、本発明のインデックスプライマー群は、HPVの塩基配列決定、検出、または分類に有用なキットの製造に使用され得る。

20

【0025】

別の態様において、本発明は少なくとも10、好ましくは少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または95の前述のインデックスプライマー群を含む、インデックスプライマーセットを提供する。好ましくは、インデックスプライマーセットにおいて、異なるインデックスプライマー群に使用されるインデックス配列は異なる。より好ましくは、インデックスプライマーセットに使用されるインデックス配列は、少なくとも配列番号：1～10、もしくは配列番号：11～20、もしくは配列番号：21～30、もしくは配列番号：31～40、もしくは配列番号：41～50、もしくは配列番号：51～60、もしくは配列番号：61～70、もしくは配列番号：71～80、もしくは配列番号：81～90、もしくは配列番号：91～95に記載のインデックス配列、またはこれらの任意の組み合わせ、例えば配列番号：1～95に記載のインデックス配列などを含む。

30

【0026】

好ましい実施形態において、本発明のインデックスプライマーセットは、高処理能なHPVの塩基配列決定、検出、または分類に有用であり、従って、大規模なHPV関連疾患の診断およびHPV型の正確な決定（これは臨床診断および治療計画の根拠を提供する）といった医療用途、ならびにHPVデータベースの構築、新規のHPV型および亜型の同定、HPV型の分布の地域特性に関する研究、疫病学上の研究、およびワクチンの開発といった非医療用途において有用である。別の好ましい実施形態において、本発明のインデックスプライマーセットは、HPVの塩基配列決定、検出、または分類に有用なキットの製造に使用され得る。

40

【0027】

別の態様において、本発明は前述のインデックスプライマー群またはインデックスプライマーセットを含むキットを提供する。好ましくは、本発明のキットは、少なくとも1、好ましくは少なくとも2、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、または少なくとも200のアダプターをさらに含む。好ましい実施形態において、アダプターはSolexa塩基配列決定法に好適である。；例えば、アダプターは塩基配列決定ライブラリの構築に有用であり、例えば、前述のアダプターは、配

50

列番号：121～132からなる群より選択される配列を有し得る。好ましい実施形態において、アダプターは、DNAリガーゼアッセイなどの非PCR法によって塩基配列決定ライプラリを構築するのに使用される。

【0028】

好ましい実施形態において、本発明のキットは、高処理可能なHPVの塩基配列決定、検出、または分類に有用であり、そして前述の医療用途および非医療用途において有用である。

【0029】

別の態様において、本発明は、1以上の試料中のHPVを塩基配列決定、検出、または分類する方法を提供する。本方法は、前述のインデックスプライマー群またはインデックスプライマーセットまたはキットを用いて各試料中のDNAを増幅するステップ、および次に、試料の配列を得るために塩基配列を決定するステップを含む。10

【0030】

別の態様において、本発明は1以上の試料中のHPVを塩基配列決定、検出、または分類する方法を提供し、以下のステップを含む。：

n個の試料を提供するステップ、ここで、nは1以上の整数であり、前述の試料は好ましくは哺乳動物由来であり、より好ましくはヒト由来であり、および好ましくは剥離細胞であって；任意に、分析されるn個の検査試料はm個の群に分割され、ここで、mは1以上n以下の整数である；

1) 各試料について、1つのインデックスプライマー群により試料中のDNAを増幅するステップ、ここで、前述のインデックスプライマー群は11のインデックスプライマーを含み、前述のインデックスプライマーの配列は、インデックス配列およびPCRプライマー配列を含み、インデックス配列は、任意にリンカー配列を介して、PCRプライマー配列の5'末端に連結している、ここで、20

i) 前述のインデックス配列は、配列番号：1～95からなる群より選択され、前述の11のインデックスプライマーは、同一のインデックス配列を有する、および

ii) 前述の11のインデックスプライマーのPCRプライマー配列は、それぞれ配列番号：96～106に記載される、30

ここで、異なる試料に使用されるインデックスプライマー群は、同一であっても異なっていてもよく、異なるインデックスプライマー群は異なるインデックス配列を使用する；

2) ステップ1)で異なるインデックスプライマー群を用いて増幅を行って得られた増幅産物を混合することにより、1以上のPCR産物ライプラリを得るステップ；

3) ステップ2)で得られた1以上のPCR産物ライプラリに、DNAリガーゼアッセイなどの非PCR法によってアダプターを付加することにより、1以上の塩基配列決定ライプラリを構築するステップ、ここで、異なる塩基配列決定ライプラリ中で使用するアダプターは、同一であっても異なっていてもよく、異なるアダプターは同一の塩基配列決定配列を共有するが、異なる特徴的配列を有する；

4) 任意に、ステップ3)で得られた異なるアダプターを有する塩基配列決定ライプラリを混合することにより、1以上のライプラリ混合物を得るステップ；

5) 第二世代塩基配列決定法、好ましくはペアエンド法(Solexa、Illumina Hiseq 2000など)を用いて、ステップ3)で得られた1以上の塩基配列決定ライプラリまたはステップ4)で得られた1以上のライプラリ混合物に対して、塩基配列決定を実施するステップ；40

6) インデックスプライマー群のインデックスプライマー配列に基づいて、またはインデックスプライマー群のインデックスプライマー配列およびアダプターの特徴的配列に基づいて、塩基配列決定結果を1つずつ試料と対応させるステップ；

ここで前述の試料は、好ましくは剥離細胞であり、および好ましくはヒトなどの動物由来である。

【0031】

好ましい実施形態において、少なくとも10、好ましくは少なくとも20、少なくとも30、50

少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または95の前述のインデックスプライマー群を、本発明の方法で使用する。さらに好ましくは、使用するインデックス配列は、少なくとも配列番号：1～10、もしくは配列番号：11～20、もしくは配列番号：21～30、もしくは配列番号：31～40、もしくは配列番号：41～50、もしくは配列番号：51～60、もしくは配列番号：61～70、もしくは配列番号：71～80、もしくは配列番号：81～90、もしくは配列番号：91～95に記載のインデックス配列、またはこれらの任意の組み合わせ、例えば配列番号：1～95に記載のインデックス配列を含む。

【0032】

好ましい実施形態において、少なくとも1、好ましくは少なくとも2、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、または少なくとも200のアダプターを、本発明の方法に使用し、および例えば、前述のアダプターは配列番号：121～132からなる群より選択される配列を有し得る。10

【0033】

本発明の方法の好ましい実施形態において、塩基配列決定の後、試料より得られた配列をHPVデータベース内の配列と並べることにより、試料中のHPVを正確に分類する。

【0034】

本発明の方法の別の態様において、本発明は、Solexa塩基配列決定法に基づき、複数の試料内での高処理能なHPVの塩基配列決定、検出、または分類をする方法を提供し、以下のステップを含む。20

- 1) 分析する試料をm個の群に分割するステップ、ここでmは1以上の整数である；
- 2) 各群内の試料に以下のステップを実施するステップ：
 - 2a) 分析する試料からDNAを抽出するステップ；
 - 2b) HPV DNAを増幅するためのプライマー群内のすべてのプライマー配列に基づいて、インデックスのセットを設計するステップ、ここで、インデックスの数、つまりnは群内の試料の数と等しい；
 - 2c) ステップ2b) で設計した各インデックスを、すべての順方向プライマーもしくは逆方向プライマーまたはすべてのプライマー配列の5'末端にそれぞれ付加することにより、n個のインデックスプライマー群を用意するステップ；
 - 2d) ステップ2a) で得られたDNA試料に対して、ステップ2c) で用意したインデックスプライマー群を用いてPCR増幅を実施することにより、PCR産物を用意するステップ、ここで、異なるインデックスプライマー群が各DNA試料に対して使用される；および
 - 2e) ステップ2d) のすべてのPCR産物を混合することにより、PCR産物ライプラリを得るステップ；
 - 3) ステップ2) で得られたPCR産物ライプラリにアダプターを付加するステップ、ここで、各PCR産物ライプラリは、異なるアダプターを使用してm個の塩基配列決定ライプラリを構築し、ここで、各アダプターは同じ塩基配列決定配列を共有し、異なる特徴的配列を有する；
 - 4) m個の塩基配列決定ライプラリを混合し、第二世代塩基配列決定法、好ましくはSolexaおよびIllumina Hiseq 2000塩基配列決定などのペアエンド法を用いて塩基配列決定を実施することにより、すべての試料の塩基配列決定結果を得るステップ；40

5) 塩基配列決定結果中のアダプターの特徴的配列、インデックスの配列、およびプライマーの配列に基づいて、塩基配列決定結果を1つずつ試料と対応させるステップ；および任意に、各試料の塩基配列決定結果をHPVデータベースと並べることにより、HPVの塩基配列決定、検出、または分類をするステップ；

ここで前述の試料は、好ましくは剥離細胞であり、および好ましくはヒトなどの動物由来である。

【0035】

好ましい実施形態において、DNAは、当業者によく知られる方法によって抽出される。例えば、DNA抽出は、自動DNA抽出機およびDNA抽出キット、例えば、市販のKingFisher自50

動抽出機およびUS Thermo Scientific Kingfisher Flex全自動ビーズ抽出精製システムを用いて実施され得る。

【0036】

好ましい実施形態において、ステップ2b)のプライマー群は11のプライマーを含み、その配列は配列番号：96～106にそれぞれ記載される。11のプライマーからなるプライマーパターンは、HPVゲノムの最も保存された遺伝子領域（L1領域）内の高度に保存されたDNA配列に対応する、約170bpの少なくとも16の産物を得るために増幅に使用することができる。従って、正確なHPVの分類は、増幅産物を正確に塩基配列決定することによって達成され得る。

【0037】

別の好ましい実施形態において、ステップ2b)で設計されるインデックスの数は、少なくとも10、好ましくは少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、または少なくとも100個である。好ましくは、インデックスは、配列番号：1～95からなる群より選択される配列を有する。好ましい実施形態において、異なる試料の群内で使用されるインデックスは、同一であっても異なっていてもよい。好ましい実施形態において、順方向プライマーに導入されるインデックスは、逆方向プライマー内に導入されるインデックスと同一であっても異なっていてもよい。特に好ましい実施形態において、ステップ2b)で設計されるインデックスは、少なくとも配列番号：1～10、もしくは配列番号：11～20、もしくは配列番号：21～30、もしくは配列番号：31～40、もしくは配列番号：41～50、もしくは配列番号：51～60、もしくは配列番号：61～70、もしくは配列番号：71～80、もしくは配列番号：81～90、もしくは配列番号：91～95に記載のインデックス、またはこれらの任意の組み合わせを含む。特に好ましい実施形態において、ステップ2b)で設計されるインデックスは、配列番号：1～95に記載される。

10

【0038】

好ましい実施形態において、アダプターを、例えばDNAリガーゼを使用する非PCR法によって、PCR産物ライプラリに付加する。特に、本発明の方法において、異なるHPV型のDNA配列が高度に相同であるため、本発明の塩基配列決定ライプラリの構築は、非PCR法によって実施する必要がある。反対に、塩基配列決定ライプラリを構築するために、従来のブールPCR法によってアダプターをPCR産物に付加した場合には、生じるライプラリは、元の鑄型と一致しない多くの産物を含むことになり、元の鑄型を正確に塩基配列決定できない結果となる。好ましい実施形態において、使用されるアダプターの数は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、または少なくとも200であり、例えば、前述のアダプターは配列番号：121～132からなる群より選択される配列を有し得る。

20

【0039】

本発明の方法の好ましい実施形態において、アダプターは、Illumina社から購入したPCR-free Index Adapter Oligo Mixなどの市販のアダプターである。別の実施形態において、本発明はまた、以下の非PCRアダプターも使用することができる（下線部は、アダプターの特徴的配列である）。

30

【0040】

非PCRアダプター1（配列番号：121）：

【化1】

40

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCCGTCTCTGC
TTG

【0041】

非PCRアダプター2（配列番号：122）：

50

【化2】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCGATGTATCTCGTATGCCGTCTCTGC
TTG

【0042】

非PCRアダプター3(配列番号:123) :

【化3】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTTAGGCATCTCGTATGCCGTCTCTGC
TTG

10

【0043】

非PCRアダプター4(配列番号:124) :

【化4】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTGACCAATCTCGTATGCCGTCTCTGC
TTG

20

【0044】

非PCRアダプター5(配列番号:125) :

【化5】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACAGTGATCTCGTATGCCGTCTCTGC
TTG

【0045】

非PCRアダプター6(配列番号:126) :

30

【化6】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGCCAATATCTCGTATGCCGTCTCTGC
TTG

【0046】

非PCRアダプター7(配列番号:127) :

【化7】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCAAGATCATCTCGTATGCCGTCTCTGC
TTG

40

【0047】

非PCRアダプター8(配列番号:128) :

【化8】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGTATGCCGTCTCTGC
TTG

50

【 0 0 4 8 】

非PCRアダプター9（配列番号：129）：

【化 9】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGATCTCGTATGCCGTCTCTGC

TTG

【 0 0 4 9 】

非PCRアダプター10（配列番号：130）：

【化 1 0 】

10

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGATCTCGTATGCCGTCTCTGC

TTG

【 0 0 5 0 】

非PCRアダプター11（配列番号：131）：

【化 1 1 】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGGCTACATCTCGTATGCCGTCTCTGC

TTG

20

【 0 0 5 1 】

非PCRアダプター12（配列番号：132）：

【化 1 2 】

5-Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCTTGTAATCTCGTATGCCGTCTCTGCT

TG

【 0 0 5 2 】

好ましい実施形態において、Solexaシーケンサー（Illumina Genome Analyzer II xシーケンサーなど）を本発明の方法において使用することにより、Solexa塩基配列決定を実行する。別の好ましい実施形態において、HPVデータベースは、例えば、NCBIデータベース（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）などの公開データベースに見出すことができる、当技術分野に既知のHPV型の配列を含む。

30

【 0 0 5 3 】

本発明の方法の好ましい実施形態において、試料は剥離細胞であり得る。別の好ましい実施形態において、試料は動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト由来であり得る。

【発明の効果】

【 0 0 5 4 】

40

本発明の有益な効果

本発明のHPV検出のための新規の方法および同キットは、従来技術に比べて以下の利点を有する。

【 0 0 5 5 】

1) 高処理能。インデックスと異なる特徴的配列を有するアダプターとを用いて、本発明の方法を1回実施することにより、10000個もの試料の検出が達成可能である。従って、本発明の方法は、疾患調査に幅広く利用でき、そして疾患の早期診断に有効な手段となり得る。

【 0 0 5 6 】

2) 低費用。本発明は、Solexa塩基配列決定法による塩基配列決定を実施し、塩基配列

50

決定のための費用は大きく削減され（従来の塩基配列決定法の費用のたった1%に相当する）、その結果、HPVの検出費用が大きく削減される。

【0057】

3) HPVの正確な分類。複数のプライマー（本発明の6つの順方向プライマーおよび5つの逆方向プライマーなど）を使用した増幅を実施すること、ならびに増幅産物の配列情報をHPVデータベースと並べることにより、HPVの型を正確に決定することができ、その結果、臨床診断および治療計画の選択のための根拠を提供する。

【0058】

さらに、本発明の方法はまた、新規の亜型および既知の型の変異体を含む新規のHPV型の発見を容易にし、および科学的研究に対してより効果的で便利な手段を提供する。

10

【0059】

本発明の好ましい実施形態は、図面を実施例と組み合わせることにより、以下に詳細に記載される。しかしながら、当業者は、以下の図面および実施例が、本発明の範囲を限定するのではなく、単に本発明を説明することを意図することを理解するだろう。図面および好ましい実施形態についての詳細な記載に基づき、本発明の目的および利点は当業者にとって明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】図1は、インデックスと固有の特徴的配列を有するアダプターとによって標識されたPCR産物の図である。本発明の例示的な方法において、インデックスは、各試料に由来するPCR産物の両端に、PCRによって同時的に付加され、異なるインデックスを有する複数のPCR産物を共に混合することにより、塩基配列決定ライプラリを構築する。塩基配列決定ライプラリの構築中に、必要であれば、複数の塩基配列決定ライプラリを構築することができ、ここで、異なる特徴的配列を有するアダプターが、塩基配列決定ライプラリを標識するために使用される。ライプラリの構築が完了した後、異なる特徴的配列を有するアダプターによって標識された複数のライプラリを共に混合し、Solexa塩基配列決定法によって同時に塩基配列決定する（異なる塩基配列決定ライプラリに使用するインデックスは、同一であっても異なっていてもよい）。最後に、塩基配列決定結果中のアダプターの特徴的配列およびインデックスの配列情報に基づいて、塩基配列決定結果を1つずつ試料と対応させることができる。

20

【図2】図2は、PCR産物の一部のアガロースゲル電気泳動図である。電気泳動図から、PCR産物のバンドが約170bpであることが分かり、ここで、レーンMは50bp DNAの分子ラダーであり、レーン1～14は、ランダムに選択したHPV陽性試料由来のPCR産物を指す。

30

【実施例】

【0061】

HC-IIの結果が既知である190の試料は、本発明の方法によりHPVの遺伝子型を同定した。その結果は、本発明の方法によって得られた結果が、既知のHC-IIの結果と一致するだけでなく、HPVの正確な分類も達成することを示した。

【0062】

実施例1：DNA試料の抽出

40

製造業者の使用説明書に従い、KingFisher自動抽出機（US Thermo Scientific Kingfisher Flex全自動ビーズ抽出精製システム）を用いて、HC-IIの結果が既知である190の剥離細胞試料からDNAを抽出した。核酸は、プログラム「Bioeasy_200 μl Blood DNA_KF.ms2」を用いて抽出した。プログラムが完了した後、約100 μlの溶出産物（抽出されたDNA）を得て、これを次のステップでPCR増幅のための錫型として用いた。

【0063】

実施例2：PCR増幅

実施例1で得られた190のDNA試料に1番～190番の番号を付け、平均的に2つの群に分割した（HPV-1群：1番～95番；HPV-2群：96番～190番）。HPV DNAの増幅のためのプライマー群内のプライマーの配列（6つの順方向プライマーおよび5つの逆方向プライマーを含む

50

) (表2、配列番号：96～106)に基づいて、95のインデックス(表1、配列番号：1～95)を含むインデックスのセットを設計した。設計した各インデックスを、プライマーセットの各プライマーの配列の5'末端にそれぞれ付加することにより、95のインデックスプライマー群を取得し、ここで、各インデックスプライマー群は対応する6つの順方向インデックスプライマーおよび5つの逆方向インデックスプライマーを含み、そして、異なるインデックスプライマー群は異なるインデックスを使用した(すなわち、95のインデックスプライマー群を、95のインデックスと1つずつ対応させた)。

【0064】

96穴プレート内ですべての試料に対してPCR反応を実施し、2枚のプレートを使用した(1枚はHPV-1群用およびもう片方はHPV-2群用)。実施例1で得られたDNAを鑄型として使用し、異なるインデックスプライマー群を用いて、HPV-1群およびHPV-2群(各95の試料を含む)の各試料を対象としてPCR増幅を実行し、すなわち、95の試料を95のインデックスプライマー群と1つずつ対応させた。各インデックスプライマー群(各インデックス)に対する試料の番号を記録した。各プレートにおいて、鑄型を添加しない陰性対照を用意した。2枚のプレート内で陰性対照に使用したプライマーは、試料1番および96番でそれぞれ使用したプライマーと同一のものとした。

【表1】

表1:インデックスおよび試料に関する情報

インデックス番号	インデックス配列	96穴プレート内の対応位置	対応試料(1群)	対応試料(2群)	配列番号
PI-1	GCTGCGACTC	A1	1	96	1
PI-2	GTGTAGATAC	A2	2	97	2
PI-3	CTGATATCTA	A3	3	98	3
PI-4	ACGATGCTAT	A4	4	99	4
PI-5	TAGACTAGAC	A5	5	100	5
PI-6	CTGTCTGTGT	A6	6	101	6
PI-7	GCATACTGAC	A7	7	102	7
PI-8	CTGCTCGCAT	A8	8	103	8
PI-9	CATGAGTAGA	A9	9	104	9
PI-10	TCTCACTATG	A10	10	105	10
PI-11	TGTACTACTA	A11	11	106	11
PI-12	GTAGACTAGT	A12	12	107	12
PI-13	ATATGCTACT	B1	13	108	13
PI-14	CACTCGCTGT	B2	14	109	14
PI-15	CATCACGCAC	B3	15	110	15
PI-16	AGCATGTGAT	B4	16	111	16
PI-17	AGCTACTAGA	B5	17	112	17
PI-18	GCTATGTAGT	B6	18	113	18
PI-19	TACGATGATG	B7	19	114	19
PI-20	TACGCTGTAC	B8	20	115	20

【0065】

PI-21	TATGTGTACT	B9	21	116	21
PI-22	TGACTCAGAC	B10	22	117	22
PI-23	TCGTAGCTCA	B11	23	118	23
PI-24	GAGACTCGTA	B12	24	119	24
PI-25	CTAGATGTCA	C1	25	120	25
PI-26	GATGACTCTC	C2	26	121	26
PI-27	TCAGTCGCAC	C3	27	122	27
PI-28	TGTAGTGAGT	C4	28	123	28
PI-29	TCATCGTAGA	C5	29	124	29
PI-30	TAGCATCTGT	C6	30	125	30
PI-31	TAGTAGTCGT	C7	31	126	31
PI-32	CTATACGTGC	C8	32	127	32
PI-33	CGACTGTAGA	C9	33	128	33
PI-34	GATGTCATGT	C10	34	129	34
PI-35	GTCTCGACTG	C11	35	130	35
PI-36	AGCTGACGAT	C12	36	131	36
PI-37	ATGATATAAGT	D1	37	132	37
PI-38	ATGTGCTCTA	D2	38	133	38
PI-39	CTCACTCGAT	D3	39	134	39
PI-40	GCTGCGACTC	D4	40	135	40
PI-41	GAGTCATGTC	D5	41	136	41
PI-42	CATACGCTCA	D6	42	137	42

10

20

30

40

PI-43	CACTCTCGTC	D7	43	138	43
PI-44	GCACTAGATG	D8	44	139	44
PI-45	ACTACGGCATG	D9	45	140	45
PI-46	TCTGTGACGT	D10	46	141	46
PI-47	TAGCTCATCT	D11	47	142	47
PI-48	AGCATAACACT	D12	48	143	48
PI-49	GCTATAGTCA	E1	49	144	49
PI-50	CGTCTCATGC	E2	50	145	50
PI-51	GCTACTACGT	E3	51	146	51
PI-52	GAGTGTACTA	E4	52	147	52
PI-53	GTCATAACGTG	E5	53	148	53
PI-54	TATGAGAGAT	E6	54	149	54
PI-55	ATCTGAGTAC	E7	55	150	55
PI-56	CGATAGGCATC	E8	56	151	56
PI-57	ACTGATCTCA	E9	57	152	57
PI-58	CTCGATACTA	E10	58	153	58
PI-59	CATGTGACTG	E11	59	154	59
PI-60	CGCATCACTA	E12	60	155	60
PI-61	GCATATATCT	F1	61	156	61
PI-62	CTGATGCGAC	F2	62	157	62
PI-63	TCTCAGAGTC	F3	63	158	63
PI-64	CAGTGCGAGT	F4	64	159	64

10

20

30

40

PI-65	ATCTCTGATG	F5	65	160	65
PI-66	GCTAGTAGTC	F6	66	161	66
PI-67	ATGAGTCGTC	F7	67	162	67
PI-68	ATCACTCAGA	F8	68	163	68
PI-69	TCTCTCTGAT	F9	69	164	69
PI-70	CTCTAGTGCT	F10	70	165	70
PI-71	CGTCGTGCTA	F11	71	166	71
PI-72	CGACTACTAT	F12	72	167	72
PI-73	GCACGTCGAT	G1	73	168	73
PI-74	GTAGTGCTCT	G2	74	169	74
PI-75	CTGACGAGCT	G3	75	170	75
PI-76	CTATAAGTCTA	G4	76	171	76
PI-77	ACACGGCACTA	G5	77	172	77
PI-78	CTCGCACTAC	G6	78	173	78
PI-79	AGATCTCACT	G7	79	174	79
PI-80	ATACTAGTGT	G8	80	175	80
PI-81	ATATCTCGTA	G9	81	176	81
PI-82	TGACTGCGTA	G10	82	177	82
PI-83	TGTAGACGTA	G11	83	178	83
PI-84	AGAGACTATG	G12	84	179	84
PI-85	GTCGAGTCAC	H1	85	180	85
PI-86	TGACAGCTAC	H2	86	181	86

PI-87	CGCTAGACAT	H3	87	182	87
PI-88	CGTAGATATG	H4	88	183	88
PI-89	TGAGTCTGCT	H5	89	184	89
PI-90	TAGTCGTATG	H6	90	185	90
PI-91	CATACACGAC	H7	91	186	91
PI-92	CGCTCAGAGA	H8	92	187	92
PI-93	GTGAGTCTCA	H9	93	188	93
PI-94	GACAGATGAT	H10	94	189	94
PI-95	GCTGTGCGAC	H11	95	190	95

【表2】

10

20

表2：インデックスを付加していない、HPV DNAを増幅するための
プライマ一群のプライマーの配列情報

プライマー番号	プライマー配列	配列番号
F1	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	96
F2	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	97
F3	TTTGTTACCGTTGTTGATACTAC	98
F4	TTTGTTACTAACGGTAGATACCACTC	99
F5	TTTGTTACTGTTGTGGATACAAC	100
F6	TTTGTTACTATCCTAGATACCAACAC	101
R1	GAAAAATAAACTGTAATCATATTCC	102
R2	GAAAAATAAAATTGTAATCATACTC	103
R3	GAAATATAAAATTGTAATCAAATTC	104
R4	GAAAAATAAACTGTAATCATATTTC	105
R5	GAAAAATAAACTCCAAATCATATTTC	106

30

40

注：Fは順方向プライマーを表し、Rは逆方向プライマーを表す。

【0069】

以下のPCRパラメーターを増幅に用いた。：

95 30秒 48 30秒 72 30秒 (40サイクル)

72 10分 12

50

PCR反応系を25 μlとし、その組成は以下の通りとした（すべての試薬はEnzymatics社より購入した）。：

【表3】

試薬	容積／反応
H ₂ O(HPLCグレード)	14.375 μl
10×Ex Taqバッファー(Mg ²⁺ プラス)	2.5 μl
dNTP混合液(各2.5mM)	2 μl
インデックスを有するF1/F2/F3/F4/F5/F6の混合液(各7.5pmol)	0.5 μl
インデックスを有するR1/R2/R3/R4/R5の混合液(各7.5pmol)	0.5 μl
Ex Taq HS (5U/μl)	0.125 μl
錆型DNA	5 μl
総容積	25 μl

10

20

【0070】

PCR反応は、Bio-Rad社のPTC-200 PCR装置で実行した。PCR完了後、3 μlのPCR産物を採取して、2.5%アガロースゲル上で電気泳動を実施した（図2）。

【0071】

実施例3：PCR産物の混合および精製

HPV-1群およびHPV-2群それぞれの残りのPCR産物を、3mlのEP管内で混合し（また、HPV-1群およびHPV-2群と印をつけた）、振とうして均質に混合した。500 μlのDNAを2本の管それぞれから採取し、製造業者の使用説明書に従ってQiagen DNA 精製キットを用いて精製し、200 μlの精製DNAを用意した。精製混合物のDNA濃度を、Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific社) を用いて、それぞれ98ng/ μl (HPV-1群) および102ng/ μl (HPV-2群) と測定した。

30

【0072】

実施例4：Solexa塩基配列決定ライブラリの構築

4.1：末端修復反応

DNAの末端修復反応を、実施例3で得られた2本の管内の精製DNA混合物に対し、Thermomixer (Eppendorf社) を用いて、それぞれ実施した。修復反応の反応系は100 μlであり、その組成は以下の通りであった（すべての試薬はEnzymatics社より購入した）。：

【表4】

試薬	容積／反応
直前のステップで得られたDNA	75μl
20×ポリヌクレオチドキナーゼバッファー(B904)	10μL
dNTP混合液(各20mM)	4μL
T4 DNAポリメラーゼ	5μL
Klenow断片	1μL
T4ポリヌクレオチドキナーゼ	5μL
総容積	100μL

10

【0073】

反応条件：20℃、30分。

【0074】

製造業者の使用説明書に従い、QIAquick PCR 精製キットを用いて、DNAの末端修復反応産物を精製および回収した。回収産物を34 μl EB (Qiagen 溶出バッファー) 中に溶解した。

20

【0075】

4.2 : 3'末端におけるAの付加

Thermomixer (Eppendorf社) を用いて、回収したDNAの3'末端に塩基Aを付加した。反応系は50 μl であり、その組成は以下の通りであった（すべての試薬はEnzymatics社より購入した）。

【表5】

30

試薬	容積／反応
直前のステップで得られたDNA	32μl
dATP(1mM、GE社)	10μl
10×ブルーバッファー	5μl
Klenow(3'-5'エキソ)	3μl
総容積	50μl

40

【0076】

反応条件：37℃、30分。

【0077】

製造業者の使用説明書に従い、MiniElute PCR 精製キット (QIAGEN社) を用いて、3'末端に付加された塩基Aを有する産物を精製および回収した。回収産物を20 μl EBに溶解した。

【0078】

4.3 : Solexaアダプターの付加

Thermomixer (Eppendorf社) を用いて、直前のステップで得られた2つの産物に異なるアダプターを付加して、2つの塩基配列決定ライブリを構築した。アダプターとライブ

50

ラリとの間の相関関係を記録した。

【0079】

Solexaアダプターの付加のための反応系は50 μLであり、その組成は以下の通りであつた（すべての試薬はIllumina社より購入した）。

【表6】

試薬	容積／反応
直前のステップで得られたDNA	11μL
2 × Rapidライゲーションバッファー	15μL
非PCRインデックスアダプター オリゴミックス(25mM)	1μL
T4 DNAリガーゼ(Rapid、L603-HC-L)	3μL
総容積	30μL

10

【0080】

反応条件：20 ℃、15分。

【0081】

20

製造業者の使用説明書にしたがい、Ampure Beads (Beckman Coulter Genomics) を用いて、反応産物を精製し、精製産物を17 μL脱イオン水に溶解した。Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent社) および蛍光定量PCR (QPCR) を用いて、産物のDNA濃度を検出し、結果は以下の通りであった。

【表7】

	2100 (nM)	qPCR (nM)
HPV-1 群	20.4	24.2
HPV-2 群	21.6	25.8

30

【0082】

実施例5：Solexa塩基配列決定

Agilent Bioanalyzer 2100によって測定した濃度を基準として用い、直前のステップで得られた2つの産物を等モルで混合した（各10pmol DNA）。製造業者の使用説明書に従い、Solexaシーケンサー (Illumina Genome Analyzer IIxシーケンサー) を、Solexa PE-75プログラムに基づく塩基配列決定に使用した。

【0083】

40

実施例6：結果解析

塩基配列決定結果のアダプターの特徴的配列およびインデックスプライマー（インデックス部位およびプライマー部位）の配列情報に基づき、塩基配列決定結果を1つずつ試料と対応させた。次に、BLASTおよびSOAPなどの当技術分野において知られるアライメントプログラムを用いて、各試料の配列結果をHPVデータベースと並べ、それによってHPVの検出および正確な分類を達成した。

【0084】

得られた検出結果は、既知の結果と全く同一であり（表3を参照せよ）、このことは、本発明の方法が試料中のHPVの正確な検出に利用可能であることを示した。

【表8】

表3:190の試料の検出結果

試料番号	既知のHC-II結果(RLU/CO値)	HPV存在検出の結果	試料番号	既知のHC-II結果(RLU/CO値)	HPV存在検出の結果
1	14.2	HPV56	96	0.28	陰性
2	0.31	陰性	97	0.33	陰性
3	196.41	HPV16	98	181.29	HPV35, HPV6
4	5.76	HPV18	99	77.32	HPV16
5	0.35	陰性	100	91.22	HPV39
6	99.86	HPV18, HPV11, HPV16	101	188.92	HPV52
7	128.86	HPV39	102	1352.83	HPV35, HPV11, HPV39
8	35.12	HPV18, HPV6	103	1.39	HPV43
9	498.69	HPV16, HPV56	104	119.5	HPV45, HPV11
10	603.57	HPV18, HPV31, HPV39	105	292.43	HPV56, HPV31
11	0.27	陰性	106	2.91	HPV68
12	3420.57	HPV18	107	193.13	HPV45
13	0.38	陰性	108	2.62	HPV6
14	0.41	陰性	109	94.12	HPV16
15	455.06	HPV16	110	792.72	HPV18, HPV31
16	8.93	HPV18	111	31.76	HPV11
17	0.6	陰性	112	0.25	陰性
18	0.41	陰性	113	0.23	陰性
19	0.29	陰性	114	750.82	HPV56, HPV16
20	27.64	HPV31	115	0.4	陰性
21	1985.41	HPV56, HPV68	116	2.75	HPV31
22	20.71	HPV42	117	396.04	HPV45
23	1795.83	HPV11, HPV16, HPV52	118	354.76	HPV18, HPV16

【0085】

24	9.55	HPV43	119	6.26	HPV11
25	237.62	HPV39	120	1719.67	HPV16, HPV45
26	1.5	HPV6	121	76.92	HPV51
27	1478.98	HPV68, HPV16	122	1318.02	HPV56, HPV16, HPV42
28	115.31	HPV44	123	0.28	陰性
29	419.31	HPV16	124	0.33	陰性
30	1.81	candHPV89	125	181.29	HPV59
31	2013.61	HPV52, HPV39	126	77.32	HPV68
32	1379.09	HPV54, HPV33	127	110.8	HPV52
33	12.74	HPV42	128	147.25	HPV16
34	1695.31	HPV16, candHPV89	129	0.24	HPV26
35	1410.85	HPV35	130	1.55	HPV11, HPV53
36	1149.25	HPV18	131	2.03	HPV6, HPV66
37	0.24	陰性	132	8.45	HPV43
38	1.55	HPV11	133	0.2	陰性
39	2.03	HPV11, HPV6	134	0.24	陰性
40	8.45	HPV42	135	10.53	HPV11
41	0.2	陰性	136	1410.85	HPV16, HPV53, HPV70
42	0.22	陰性	137	1149.25	HPV56, HPV81, HPV73
43	0.53	陰性	138	0.24	陰性
44	10.38	HPV6	139	413.9	HPV45
45	78.21	HPV16	140	17.05	HPV11
46	0.23	陰性	141	23.6	HPV52
47	45.42	HPV16, HPV18	142	3379.09	HPV16, HPV35, HPV56
48	0.35	陰性	143	0.18	陰性
49	148.66	HPV18, candHPV89	144	1.46	HPV18

10

20

30

40

50	60.27	HPV56	145	1.25	HPV11, HPV26
51	0.28	陰性	146	2.13	HPV6, HPV81
52	360.26	HPV56, HPV68	147	872.52	HPV16, HPV45, HPV52
53	50.31	HPV18	148	1.5	HPV18
54	0.18	陰性	149	4.33	HPV16
55	0.31	陰性	150	0.82	陰性
56	196.41	HPV16	151	60.35	HPV59
57	5.76	HPV51	152	0.24	陰性
58	0.23	陰性	153	0.23	陰性
59	0.88	陰性	154	0.18	陰性
60	0.16	陰性	155	1.46	HPV51
61	870.63	HPV52, HPV16	156	11.25	HPV16
62	10.18	HPV42	157	2.13	HPV11
63	0.15	陰性	158	0.13	陰性
64	1.36	HPV11	159	90.18	HPV58
65	68.2	HPV59	160	0.15	陰性
66	0.68	陰性	161	602.79	HPV68, HPV16
67	130.41	HPV45	162	132.68	HPV56, HPV11
68	0.26	陰性	163	127.08	HPV39, HPV54
69	5.25	HPV6	164	602.79	HPV33
70	0.46	陰性	165	276	HPV18
71	8.23	HPV40	166	243.6	HPV45
72	0.28	陰性	167	229.44	HPV51
73	100.16	HPV43, HPV44	168	1384.92	HPV16, HPV58, HPV72
74	450.13	HPV41	169	172.64	HPV58
75	127.08	HPV39, HPV6	170	855.24	HPV16, candHPV89

10

20

30

40

76	602.79	HPV45	171	126.47	HPV51
77	276	HPV16	172	86.62	HPV44, HPV11
78	243.6	HPV6, HPV70, HPV39	173	879.37	HPV18, HPV58
79	229.44	HPV35	174	119.39	HPV56
80	1384.92	HPV52, HPV56, HPV11	175	0.61	陰性
81	172.64	HPV26, HPV42	176	18.02	HPV16
82	855.24	HPV35, HPV6	177	16.06	HPV18
83	620.69	HPV52	178	60.69	HPV56, HPV11
84	128.02	HPV11	179	2.45	HPV11
85	514.84	HPV33	180	94.93	HPV39
86	68.3	HPV58	181	1635.3	HPV16, HPV35, HPV51
87	402.15	HPV59, HPV16	182	754.64	HPV33, c and HPV89
88	51.72	HPV33	183	0.23	HPV11
89	1.78	HPV6	184	20.28	HPV18
90	56.7	HPV11, HPV31	185	0.16	陰性
91	186.06	HPV16	186	0.13	陰性
92	0.02	陰性	187	60.18	HPV59
93	386.06	HPV18, HPV16	188	0.15	陰性
94	28.09	HPV6, HPV44	189	1.36	HPV43
95	186.06	HPV68,	190	0.28	陰性

10

20

30

【0088】

さらに、試料中のHPVの正確な分類もまた、本発明の方法によって実施される。表4は、図2に示す、レーン番号1~14に対応する試料の配列および分類の結果を表示する。

【表9】

表4：図2に示すレーン番号1～14に対応する試料の配列および分類結果

レーン 番号	HPV型	配列結果			アライメントのパラメーター 同一性 スコア e値	配列番号
1	HPV11	GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCCTCACATGGGCATGTATTCCCTATAATCTGAATTAA	96.77	107	6.00E-27	107
2	HPV16	TTTGTACTGTGGTAGATACTACCCGCAGTACAATAATATGTCAATTATGTCCTGCCTATCTAC	96.77	107	6.00E-27	108
3	HPV18	TTTGTACTAAGGTAGATAACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATAATGTGCTCTACACAGTC	96.77	107	6.00E-27	109
4	HPV31	GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCCTCACCATGTCTTAATACTCTTAAATTACTACTT	95.16	99.6	2.00E-24	110
5	HPV33	GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCCTAACATGTCTTATAATTCTTAAATTTCATT	96.77	107	6.00E-27	111
6	HPV35	GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCCTCACCATGCCTTAATAATTCTCATTT	98.39	115	3.00E-29	112
7	HPV39	TTTGTACTGTGGTAGATACTACCCGTAGTACCAACTTACATTACCTCTATAGAGTC	94.83	91.7	4.00E-22	113
8	HPV43	TTTGTACTAAGGTAGATAACCACTCGTAGTACAAACTTAAACGTTATGTGCCCTACTGACCC	100	101	4.00E-25	114
9	HPV45	GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCCTCACATGTCTACTATAGTCCTAAACTTACTAGGA	100	123	1.00E-31	115
10	HPV51	GAAAATAAAATTGTAATCAAATTCTCCCCATGCCATTAAAGTTACTTGGA	91.94	83.8	9.00E-20	116
11	HPV52	TTTGTACTGTGGATACTACTCGTAGCACTAACATGACTTTATGTGCTGAGGTTAAAAA	98	91.7	4.00E-22	117
12	HPV56	TTTGTACTGTGGATAACAACCTAGAAGTACTAACATGACTATTACTGCTACAGAACAA	95.16	99.6	2.00E-24	118
13	HPV58	GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCCTAACATGACGTACATATTCCCTAAATTATCATT	96.77	107	6.00E-27	119
14	HPV61	TTTGTACTGTGGATACTACCCGCAGTACTAACATTAGCCATTGCACTGCTACATCCCC	94	75.8	2.00E-17	120

【0089】

参考文献

本発明を説明するために用いられるか、または本発明の実施に関する詳細な内容をさら

に提供する、特許、出版物、およびその他の資料は、参照により本明細書に組み込まれ、便宜上以下のリストに提供される。

【0090】

- [1].Pectasides D, Kanposioras K, Papaxoinis Gら。Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 2008, 34(7): 603-613.
- [2].Brink, A. A., P. J. SnijdersおよびC. J. Meijer. HPV detection methods. *Dis. Markers* 2007, 23: 273-281.
- [3].IARC. Handbooks of cancer prevention . Cervix cancer screening [R].Lyon: IARC出版社、2005.
- [4].Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci.* 2006, 110: 525-541. 10
- [5].Cox T, Cuzick J. HPV DNA testing in cervical cancer screening: From evidence to policies. *Gynecol Oncol*、2006, 103: 8-11.
- [6].Kulmala S, syljhen. Human papillomavirus testing with the hybrid capture assay and PCR as screening tools. *Clin Microbiol*, 2004, 42(6): 2470-2475.
- [7].Quail, M.ら、A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nat. Methods*、2008, 5, 1005-1010.
- [8].Brown, C. G.ら、Solexa/Illumina GAPipeline product and product documentation, Illumina社、2006.
- [9].Lozano, R. Successfully integrating human papillomavirus testing into your practice . *Arch . Pathol . Lab Med*、2003, 127: 991-994. 20

【図1】

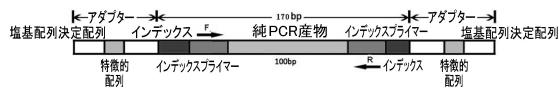


図1: インデックスおよび固有の特徴的配列を有するアダプターによつて標識されたPCR産物の図。
F:順方向PCRプライマー; R:逆方向PCRプライマー。

【図2】

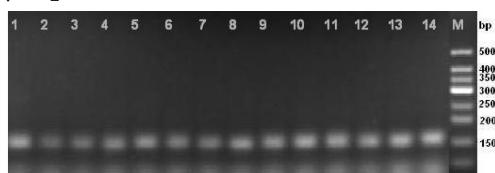


図2: PCR産物の一部のゲル電気泳動図

【配列表】

0005923497000001.xml

フロントページの続き

(72)発明者 イー、シン

中華人民共和国 518083 グワンドン シエンчен ヤンチャン ディストリクト ベイ
シャン ロード ナンバー146 ベイシャン インダストリアル ゾーン メイン ビルディング
グ

(72)発明者 シュイ、ジャジャ

中華人民共和国 518083 グワンドン シエンчен ヤンチャン ディストリクト ベイ
シャン ロード ナンバー146 ベイシャン インダストリアル ゾーン メイン ビルディング

(72)発明者 ニ工、シーファン

中華人民共和国 518083 グワンドン シエンчен ヤンチャン ディストリクト ベイ
シャン ロード ナンバー146 ベイシャン インダストリアル ゾーン メイン ビルディング

(72)発明者 ジャオ、メイルウ

中華人民共和国 518083 グワンドン シエンчен ヤンチャン ディストリクト ベイ
シャン ロード ナンバー146 ベイシャン インダストリアル ゾーン メイン ビルディング

審査官 山本 晋也

(56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0202436(US,A1)

特表2009-518001(JP,A)

Binladen et al, PLoS ONE, 2007年 2月, Issue 2, e197

Meyer et al, Nucleic Acids Research, 2007年, Vol. 35, No. 15

Carvalho et al, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010年 2月, Vol. 105, No. 1, p. 73-78

Kozarewa et al, Nature Methods, 2009年 4月, Vol. 6, No. 4, p. 291-295

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

DWPI(Thomson Innovation)