

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-165661

(P2013-165661A)

(43) 公開日 平成25年8月29日(2013.8.29)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	4 B 0 2 4

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2012-30173 (P2012-30173)
 (22) 出願日 平成24年2月15日 (2012.2.15)

(71) 出願人 504300088
 国立大学法人帯広畜産大学
 北海道帯広市稲田町西2線11番地
 (72) 発明者 山岸潤也
 〒080-0834 北海道帯広市稲田町
 西2線15番地42-1
 Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13 DA14 JA01
 4B024 AA20 CA01 CA11 HA19

(54) 【発明の名称】 複数検体の塩基配列を、各検体と配列を対応付けて一度に決定する方法

(57) 【要約】

【課題】複数検体の塩基配列を、各検体と配列を対応付けて一度に決定する方法

【解決手段】複数からなる核酸検体を特定の組み合わせで混合したグループを複数作成し、各グループ特有の Index 配列を付与した後に、次世代シーケンサー（あるいは超並列シーケンサー、NGS）を用いて配列解析を行い、検体相当部分が同一の配列について、付与されている Index 配列の組み合わせパターンに基づいて各検体と対応付けを行い、同一検体に対応付けられた配列群をアセンブルすることで、各検体とその配列を対応付けて一度に決定する。

【選択図】図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数からなる核酸検体（プラスミド A, B, C, D）のそれぞれに対して、複数の I D（1, 2, 3, 4）を同一の組み合わせにならないように付与し（A=1 & 2, B=1 & 3, C=2 & 4, D=3 & 4）、同一の I Dを有する検体を合わせたサブグループを構成し（分割・混合：1=A+B, 2=A+C, 3=B+D, 4=C+D）、各サブグループを断片化し、各サブグループを構成する核酸にサブグループ特有の I n d e x 配列（1=AA, 2=CT, 3=CG, 4=AT、I n d e x 結合）を付与した後、全てを混合して配列解析を行い（混合シーケンス）、得られた配列を I n d e x 配列に応じて分類することで各検体との対応付けを行い（I n d e x に応じてグループ化：A=AA+CT, B=AA+CG, C=AT+CT, D=AT+CG）、対応付けられた配列をアセンブルすることで各検体の塩基配列を決定する方法。（括弧内は 4 サンプル同時解析を例示した図 2 の場合を示す）

10

【請求項 2】

請求項 1 における検体数が、n 0 個の検体と、（a の n 乗－n 0）個のモック検体から構成される a の n 乗個の検体である、塩基配列の決定方法。

【請求項 3】

請求項 2 におけるサブグループの構成方法が、X 番目の検体について（X－1）を a 進数で表記し、各桁と各数値の組み合わせを I D とみなして、各桁ごとに同一の数値を有する検体をまとめて 1 つのサブグループとすることを、全ての桁について繰り返すことと同義の操作からなる、塩基配列の決定方法。

20

【請求項 4】

請求項 3 における a が 2、あるいは 2 の倍数である、塩基配列の決定方法。

【請求項 5】

請求項 1 における得られた配列を I n d e x 配列に応じて分類することで各検体との対応付けを行う方法が、同一配列に付与された種々の I n d e x 配列の組み合わせと、検体に付与された I D の組み合わせとの照合により成される、塩基配列の決定方法。

【請求項 6】

請求項 1 における核酸検体が D N A もしくは R N A である、塩基配列の決定方法。

【請求項 7】

請求項 1 における配列解析技術が次世代シーケンサーを用いたものである、塩基配列の決定方法。

30

【請求項 8】

請求項 1 における I n d e x 配列が D N A、R N A もしくはその混合物質である、塩基配列の決定方法。

【請求項 9】

請求項 8 における I n d e x 配列がパリティ因子を含む、塩基配列の決定方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 5 に、請求項 6 から 9 記載の方法を任意に組み合わせた、塩基配列の決定方法。

【請求項 11】

請求項 10 記載の方法を計算機により実行する際の、コンピュータープログラム。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複数の核酸検体を特定の組み合わせで混合したサブグループを作成し、各サブグループ特有の I n d e x 配列を付与した後に、超並列シーケンサーを用いて配列解析を行い、得られた配列を I n d e x 配列に応じて分類したものをアセンブルすることで、各検体と配列を対応付けて決定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

50

次世代シーケンサーは並列処理により一度に大量の配列を出力することが出来るが、検体を混合して反応を行うため、検体と出力配列を対応付けることが出来ない。そのため、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析など1検体に由来するDNA、RNAの解析や、メタゲノム解析などポピュレーションを明らかにすることを目的とした解析に用いられる（図1）。

【0003】

一方、次世代シーケンサーの解析力を有効に利用するため、検体を処理する際に数塩基から十数塩基からなる人工的な塩基配列（Index）を付与することで検体と出力配列を対応付け、多検体処理を行う方法としてマルチプレックス法が知られているが、並列可能な数は数十検体にとどまる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】細胞工学 2011年8月号 次世代シーケンサーを使いこなす 基礎の基礎

【非特許文献2】細胞工学 2011年8月号 次世代シーケンサーを使いこなす マルチプレックス法によるバクテリアゲノムのde novo DNA配列解読

【非特許文献3】細胞工学 2011年8月号 次世代シーケンサーを使いこなす マルチプレックス法によるバクテリアゲノムのde novo DNA配列解読

【非特許文献4】Parasitol Int. 2011 Jun; 60 (2) : 199-202. Epub 2011 Mar 21. Construction and analysis of full-length cDNA library of *Cryptosporidium parvum*.

【非特許文献5】Genome Biol. 2009; 10 (3) : R25. Epub 2009 Mar 4. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、Index付与方法の改良によりマルチプレックス法を超える多検体化を達成し、次世代シーケンサーの解析力を有効に利用する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、Index付与方法と次世代シーケンサーから出力される配列の解析方法を鋭意検討した結果、各サンプルを特定の組み合わせで混合した後、元サンプル数の根に比例する数へ圧縮された各混合サンプルにIndexを付与して次世代シーケンサーにより塩基配列を取得し、出力された配列から混合前の配列を検体のIDと対応付けて復元する方法を見出し、本発明を完成した（図2）。

【0007】

すなわち、本発明は、以下の態様からなる。

【0008】

（1）複数からなる核酸検体（プラスミドA,B,C,D）のそれぞれに対して、複数のID（1,2,3,4）を同一の組み合わせにならないように付与し（A=1 & 2、B=1 & 3、C=2 & 4、D=3 & 4）、同一のIDを有する検体を合わせたサブグループを構成し（分割・混合：1=A+B, 2=A+C, 3=B+D, 4=C+D）、各サブグループを断片化し、各サブグループを構成する核酸にサブグループ特有のIndex配列（1=AA, 2=CT, 3=CG, 4=AT、Index結合）を付与した後、全てを混合して配列解析を行い（混合シーケンス）、得られた配列をIndex配列に応じて分類することで各検体との対応付けを行い（Indexに応じてグループ化：A=AA+CT, B=AA+CG, C=AT+CT, D=AT+CG）、対応付けら

10

20

30

40

50

れた配列をアセンブルすることで各検体の塩基配列を決定する方法。（括弧内は4サンプル同時解析を例示した図2の場合を示す）

【0009】

（2）上記（1）における検体数が、 n 0 個の検体と、（ a の n 条－ n 0）個のモック検体から構成される a の n 条個の検体である、塩基配列の決定方法。

【0010】

（3）上記（2）におけるサブグループの構成方法が、 X 番目の検体について（ $X-1$ ）を a 進数で表記し、各桁と各数値の組み合わせをIDとみなして、各桁ごとに同一の数値を有する検体をまとめて1つのサブグループとすることを、全ての桁について繰り返すことと同義の操作からなる、塩基配列の決定方法。

10

【0011】

（4）上記（3）における a が2、あるいは2の倍数である、塩基配列の決定方法。

【0012】

（5）上記（4）における得られた配列をIndex配列に応じて分類することで各検体との対応付けを行う方法が、同一配列に付与された種々のIndex配列の組み合わせと、検体に付与された付与されたIDの組み合わせとの照合により成される、塩基配列の決定方法。

【0013】

（6）上記（1）における核酸検体がDNAもしくはRNAである、塩基配列の決定方法。

20

【0014】

（7）上記（1）における配列解析技術が次世代シーケンサーを用いたものである、塩基配列の決定方法。

【0015】

（8）上記（1）におけるIndex配列がDNA、RNAもしくはその混合物質である、塩基配列の決定方法。

【0016】

（9）上記（8）におけるIndex配列がパリティー因子を含む、塩基配列の決定方法。

30

【0017】

（10）上記（1）から（5）に、上記（6）から（9）記載の方法を任意に組み合わせた、塩基配列の決定方法。

【0018】

（11）上記（11）記載の方法を計算機により実行する際の、コンピュータープログラム。

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、1回の次世代シーケンサー解析で、使用するIndex数の累乗に相当する検体数の配列を決定することが可能となる（図1、図2）。

【0020】

例えば、20種類のIndex配列を用いることで、2の10乗、すなわち1,024検体の配列を、40種類のIndex配列を用いることで、2の20乗、すなわち1,048,576検体の配列を、検体と出力配列の対応情報を保持した状態で、1回の次世代シーケンサー解析で決定することが出来る。

40

【0021】

具体的には、これまでキャピラリー法で行われていたプラスミドDNAの塩基配列解析を、当該発明と次世代シーケンサーの組み合わせで置き換えることが可能であり、その結果、費用対効果の大幅な向上が見込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

50

【図 1】 発明の効果

【図 2】 発明概要

【図 3】 検体混合方法の概要

【図 4】 パリティーとは

【図 5】 発明概要 (2)

【図 6】 実施例 (1) に用いた塩基配列のアクセッション番号

【図 7】 実施例 (1) で用いた混合グループの構成

【図 8】 実施例 (1) 復元率

【図 9】 実施例 (1) 復元率

【発明を実施するための形態】

【0023】

10

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

【0024】

本発明において次世代シーケンサーとは、近年開発された、並列処理によって飛躍に解析能力を向上させた一群の塩基配列解析装置で、具体的には、Illumina社HiSeq 2000、Roche社Genome Sequencer、ライフテクノロジー社Ion PGM、Pacific Biosciences等を指す（非特許文献1）が、今後開発される装置も含み、ここに示したものの限定されるものではない。

【0025】

本発明において核酸検体とは、同一配列からなるDNAあるいはRNA分子の集合体である。すなわち、大腸菌を用いた系で増幅およびクローニングされたプラスミドが当てはまる。核酸検体はPCR産物でもよい。また上記の同一配列とは、完全に一致した配列だけではなく、部分的に同一の配列も含む分子の集合体も含む。さらに、一定量のコンタミネーションを含んでいてもよい。

20

【0026】

核酸検体の混合方法について、図3と以下に例示するが、ここに示すものの限定されるものではない。

【0027】

検体数を $n0$ とした場合、 a を整数の定数として、 a の n 乗 $>n0$ となる最少の n を求め、（ a の n 乗 $-n0$ ）個のモック検体を加えることで0番から（ a の n 乗 -1 ）番からなる a の n 乗個の検体を準備し、 X 番目の検体について（ $X-1$ ）を a 進数で表記し、各桁と各数値の組み合わせをIDとみなして、各桁ごとに同一の数値を有する検体をまとめて1つのサブグループとして混合する。

30

【0028】

以下に $a=2$ の場合における具体例を表1と共に示すが、混合方法は例示した方法に限定されるものではない。

【0029】

#0から#2の n 乗 -1 までの2の n 乗種類からなる核酸サンプルを並列解析する場合、以下のルールに基づいて検体の混合を行う。

【0030】

40

検体番号を2進数で表記し、 k 桁目の数値が0ならば混合グループID（ $2 \times (n-k) + 1$ ）、1ならば混合グループID（ $2 \times (n-k) + 2$ ）を付与することを、1から n を満たす全ての k について繰り返し行う。

【0031】

例えば、 $n=3$ の時、総検体数は8で、検体番号#6の検体は、2進法で110と表記され、3桁目の数は1なので、（ $2 \times (3-3) + 2$ ）=2、2桁目の数は1なので、（ $2 \times (3-2) + 2$ ）=4、1桁目の数は0なので、（ $2 \times (3-1) + 1$ ）=5となり、結果、検体番号#6には、混合グループID 2, 4, 5が付加されることになる。逆に、ID 2を付加される検体は、検体#6（110）、検体#7（111）、検体#5（101）、検体#4（100）なので、これらをまとめた混合検体を作成する。

50

【0032】

2n種類からなる核酸検体を上記のルールによって2n種類の混合検体に編成したものを、次世代シーケンサーを用いた既知マルチプレックス法（非特許文献2）に供し、塩基配列を取得する。

【0033】

この時に用いるIndexにはパリティ塩基を付与することが出来る（図4）。

【0034】

塩基配列の再構成を以下の様に行う（図2、図5）。

【0035】

次世代シーケンサーから出力された配列にはIndexが付与されており、Indexに基づいて配列と混合IDを対応付けすることができる。

10

【0036】

2n種類からなる核酸検体を2n種類の混合検体に編成した後に並列解析する場合、例えば、混合ID0, 2, 4, ..., 2n-2には検体番号#0が含まれている。同様に、混合ID0, 2, 4, ..., 2n-1には検体番号#1が含まれている。

【0037】

すなわち、検体番号#0由来の配列には、混合ID0, 2, 4, ..., 2n-2に相当するIndexが付与されている。同様に、検体番号#1由来の配列には、混合ID0, 2, 4, ..., 2n-1に相当するIndexが付与されている。

【0038】

逆に、同一の配列に付与されていたIndexを集計し、その分布を解析することで、元々の検体番号を特定することができる。

20

【0039】

例えば、次世代シーケンサーから出力されたある塩基配列に混合ID1, 3, 5, ..., 2n-2に相当するIndexが付与されていた場合、その配列は検体番号#0を構成する配列であることが解る。同様に、ある配列に混合ID2, 4, 5, ..., 2n-1に相当するIndexが付与されていた場合、その配列は検体番号#1を構成する配列であることが解る。

【0040】

元々の検体番号に対応付けられた次世代シーケンサーからの出力配列を基にアセンブラーでコンティグを作成することで、各サンプルの塩基配列を得ることができる。ここでアセンブラーはABYSS（非特許文献3）あるいはVelvet等を用いてもよいが、それらに限らない。

30

【0041】

次世代シーケンサーからの出力配列は適宜短縮して上記の解析に供しても良い。

【実施例】

【0042】

以下、実施例を持って本発明の実施の態様を説明するが、これは単なる例示であり本発明を何等制限するものではない。

【0043】

40

（実施例1）計算機による模擬解析

1, 066配列からなるクリプトスポリジウムパルバムの既知完全長cDNA配列を模擬解析の対象配列とした。この配列は、サンガー法で明らかにされた配列断片、および、次世代シーケンサーを用いたショットガン解析により明らかにされた18, 308, 250個の配列断片（アクセス番号：SRX004536～SRX004538）を、既知のクリプトスポリジウムパルバムのゲノム配列と比較することで決定されたものである（非特許文献4）。

【0044】

本実施例では、請求項2に記載のaを2に、nを8とし、上記1, 066配列の中から256配列を選択した（図6）。また、上記18, 308, 250断片配列の中から256

50

配列に相当する 5, 4 7 4, 1 6 4 断片配列を選抜し、以降に用いた。

【0045】

本実施例では、当該発明に基づいた処理により、上記 5, 4 7 4, 1 6 4 断片配列から 2 5 6 配列を再構成することを、計算機を用いた模擬解析により試みた。

【0046】

対象となる 2 5 6 配列を図 7 に示す組み合わせで混合することで、1 6 グループを構成した。すなわち各配列は 8 種類のグループに属することになる。

【0047】

マッピングツールである B o w t i e (非特許文献 5) を用いることで、上記 5, 4 7 4, 1 6 4 断片配列を対象となる 2 5 6 配列に対応付け、さらにこれらを上記の 8 グループにランダムに割り振った。これは模擬解析に特有の操作であり、実解析では I n d e x 配列に基づく処理に置き換えられる。また、5' 側の 4 塩基を I n d e x 相当配列として除去し、残った 3 2 塩基を続く解析に用いた。

10

【0048】

解析対象の 3 2 塩基を連続する 2 2 塩基を単位として抽出することで、1 配列から 1 1 配列のサブセットを作成した。

【0049】

同一配列を有する 2 2 塩基の配列を集計し、それらに付与されていた I n d e x 配列のパターンを解析することで、その 2 2 塩基が 2 5 6 配列のうちのどの配列に由来するものかを推定した。

20

【0050】

2 5 6 配列のそれぞれについて、対応付けられた 2 2 塩基の配列を集計し、アセンブラーである A B y S S (非特許文献 3) によりコンティグの作成を行った。

【0051】

作成されたコンティグ配列を元の配列を比較することにより、復元度を見積もった。

【0052】

ここで復元度は、(最大長コンティグの長さ／元の配列の長さ) で定義する。

【0053】

その結果、当該方法により大部分の配列が復元できることが示された。すなわち、2 5 6 配列のうち、99%以上の領域を復元できたものが 1 0 4 配列、95%以上の領域を復元できたものが 1 6 0 配列、90%以上の領域を復元できたものが 1 9 9 配列となる成績が得られた。詳細を図 8 および図 9 に示した。

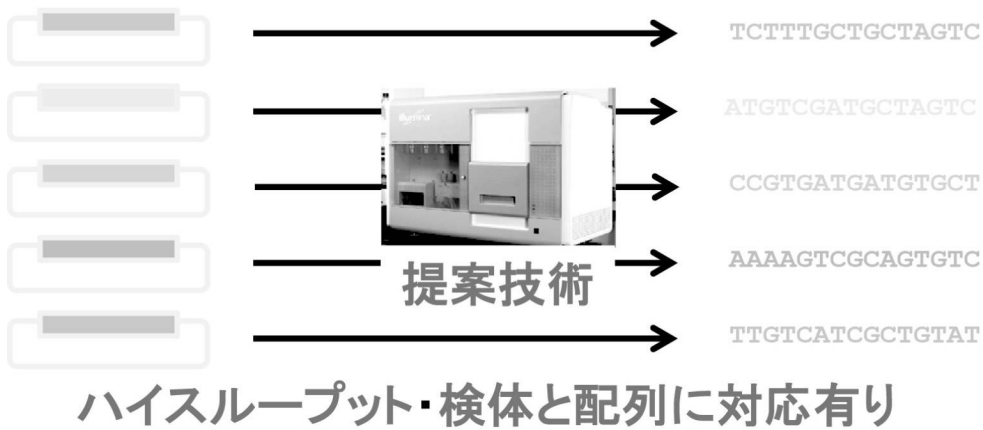
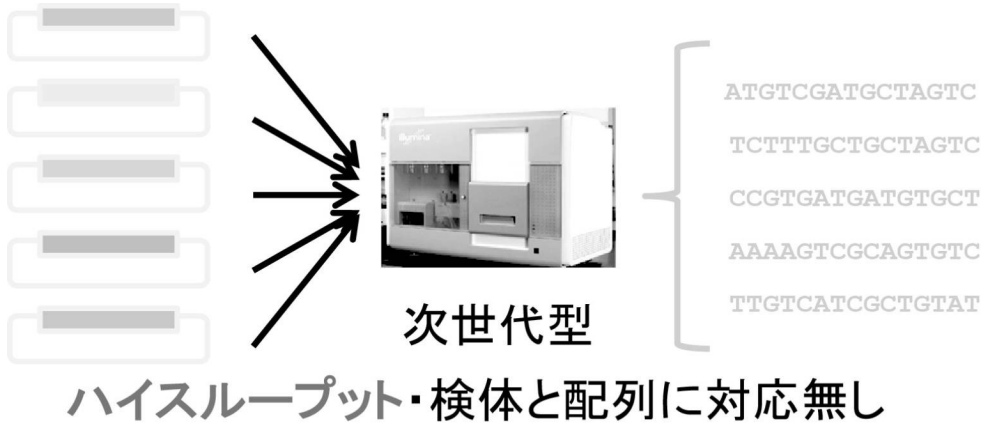
30

【産業上の利用可能性】

【0054】

これまでキャピラリー法で行われていたプラスミド DNA の塩基配列解析を、当該発明と次世代シーケンサーの組み合わせで置き換えることが可能であり、その結果、費用対効果の大幅な向上が見込まれる。

【図 1】



【図 3】

		検体#											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	...	2^n-2	2^n-1
混合グループID	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	2											+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	4											+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	6											+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	8											+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+				
	10									+		+	+
	11	+	+	+	+					+			
	12					+	+	+	+			+	+
	13	+	+			+	+			+			
	...												
	$2n-2$	+		+		+		+		+		+	
	$2n-1$		+		+		+		+				+

【図 4】

Index配列

ATGC**1234**

$$(1+2+3+4) / 4$$

の余りは2

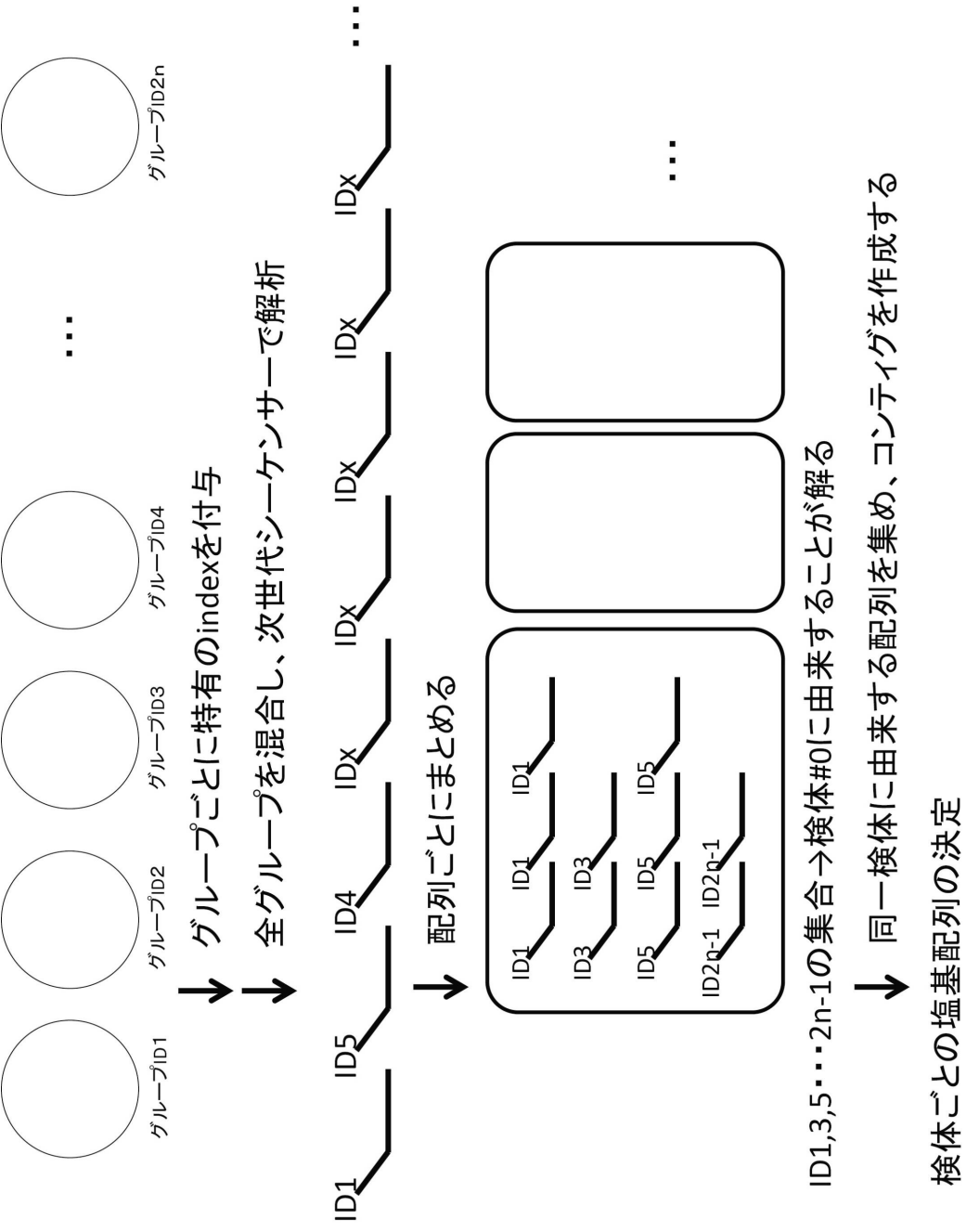


パリティ付加

ATGCT**12342**

Indexの配列が正しく読めなかった場合、
パリティの合計が4で割り切れなくなる

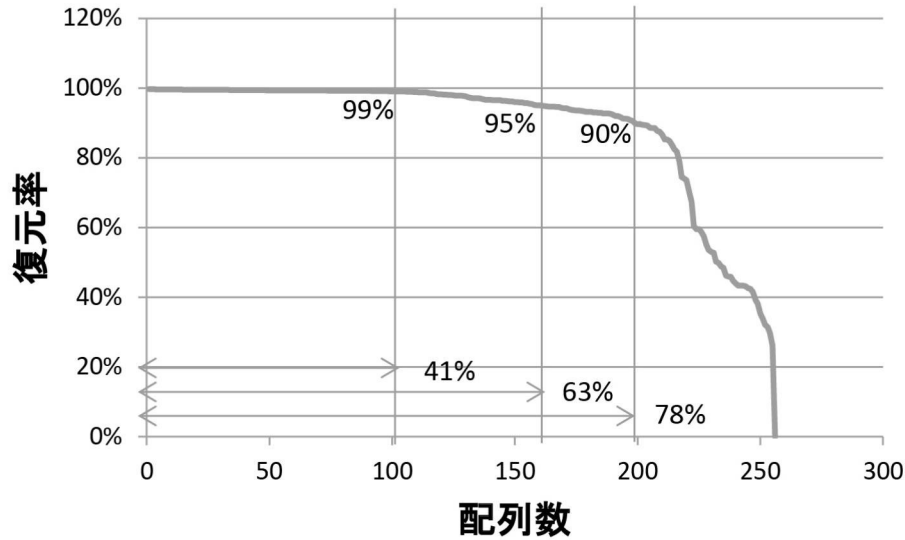
【図 5】



XCpA000018	XCpA000964	XCpA002401	XCpA004417	XCpA006176	XCpA007696	XCpA010435	XCpA011795
XCpA000052	XCpA000984	XCpA002448	XCpA004504	XCpA006195	XCpA007907	XCpA010468	XCpA011837
XCpA000055	XCpA000986	XCpA002544	XCpA004530	XCpA006220	XCpA007927	XCpA010502	XCpA011959
XCpA000076	XCpA000990	XCpA002645	XCpA004743	XCpA006247	XCpA007930	XCpA010535	XCpA012008
XCpA000074	XCpA001024	XCpA002647	XCpA004755	XCpA006357	XCpA007955	XCpA010542	XCpA012028
XCpA000077	XCpA001034	XCpA002661	XCpA004780	XCpA006364	XCpA008021	XCpA010544	XCpA012030
XCpA000185	XCpA001192	XCpA002674	XCpA004781	XCpA006379	XCpA008056	XCpA010770	XCpA012098
XCpA002026	XCpA001211	XCpA002713	XCpA004788	XCpA006407	XCpA008073	XCpA010875	XCpA012115
XCpA002073	XCpA001224	XCpA002787	XCpA004823	XCpA006414	XCpA008076	XCpA011001	XCpA012136
XCpA003334	XCpA001468	XCpA002814	XCpA004862	XCpA006502	XCpA008084	XCpA011026	XCpA012143
XCpA003054	XCpA001512	XCpA002827	XCpA004903	XCpA006528	XCpA008174	XCpA011085	XCpA012308
XCpA003966	XCpA001571	XCpA002856	XCpA004982	XCpA006538	XCpA008185	XCpA011130	XCpA012316
XCpA004038	XCpA001648	XCpA002875	XCpA005043	XCpA006599	XCpA008398	XCpA011131	XCpA012437
XCpA004051	XCpA001649	XCpA003118	XCpA005044	XCpA006661	XCpA008522	XCpA011187	XCpA012438
XCpA004067	XCpA001662	XCpA003229	XCpA005078	XCpA006848	XCpA008630	XCpA011204	XCpA012485
XCpA005008	XCpA001682	XCpA003313	XCpA005080	XCpA006849	XCpA008795	XCpA011212	XCpA012533
XCpA005023	XCpA001688	XCpA003316	XCpA005173	XCpA006862	XCpA008876	XCpA011282	XCpA012653
XCpA005051	XCpA001692	XCpA003319	XCpA005185	XCpA006864	XCpA008946	XCpA011297	XCpA012708
XCpA005073	XCpA001733	XCpA003465	XCpA005213	XCpA006893	XCpA009025	XCpA011313	XCpA012839
XCpA005074	XCpA001781	XCpA003740	XCpA005283	XCpA007024	XCpA009043	XCpA011319	XCpA012859
XCpA005955	XCpA001841	XCpA003791	XCpA005687	XCpA007025	XCpA009070	XCpA011338	XCpA012870
XCpA006004	XCpA001883	XCpA003799	XCpA005717	XCpA007047	XCpA009156	XCpA011381	XCpA012872
XCpA006069	XCpA002048	XCpA003801	XCpA005763	XCpA007081	XCpA009365	XCpA011422	XCpA012903
XCpA006663	XCpA002050	XCpA003839	XCpA005809	XCpA007115	XCpA009369	XCpA011482	XCpA012905
XCpA007041	XCpA002184	XCpA003944	XCpA005833	XCpA007126	XCpA009405	XCpA011487	XCpA012908
XCpA007080	XCpA002222	XCpA004090	XCpA005839	XCpA007190	XCpA009413	XCpA011507	XCpA013341
XCpA007091	XCpA002254	XCpA004112	XCpA005949	XCpA007215	XCpA009662	XCpA011572	XCpA013499
XCpA00859	XCpA002258	XCpA004164	XCpA005992	XCpA007321	XCpA009664	XCpA011649	XCpA013717
XCpA008081	XCpA002266	XCpA004189	XCpA006008	XCpA007361	XCpA010040	XCpA011700	XCpA013744
XCpA00887	XCpA002333	XCpA004232	XCpA006052	XCpA007369	XCpA010066	XCpA011708	XCpA013772
XCpA009026	XCpA002380	XCpA004235	XCpA006086	XCpA007383	XCpA010233	XCpA011738	XCpA013851
XCpA009334	XCpA002394	XCpA004384	XCpA006185	XCpA007662	XCpA010327	XCpA011755	XCpA013855

			XCPa000018	XCPa000052	XCPa000053	XCPa000067	XCPa000074	XCPa000077	XCPa000185	XCPa000206	XCPa000273	XCPa000334	XCPa000354	XCPa000366	XCPa000438	XCPa000451	XCPa000467	XCPa000508	XCPa000523	⋮	XCPa013851	XCPa013855		
混合グループID	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
	2																					+	+	
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	
	4																					+	+	
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	6																					+	+	
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	
	8																			+		+	+	
	9	+	+	+	+	+	+	+	+											+				
	10											+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	
	11	+	+	+	+							+	+	+	+					+				
	12						+	+	+	+						+	+	+	+			+	+	
	13	+	+				+	+				+	+			+	+			+				
	14			+	+					+	+			+	+			+	+				+	+
	15	+		+			+			+		+		+		+		+		+		+		
	16		+		+			+		+			+		+		+		+					

【図 8】



【図 9】

検体#	最大長	元の長さ	復元率	検体#	最大長	元の長さ	復元率	検体#	最大長	元の長さ	復元率	検体#	最大長	元の長さ	復元率
XPao00508	974	977	0.997	XPao000334	1151	1159	0.993	XPao005949	854	874	0.977	XPao005717	838	814	0.917
XPao002827	1127	1131	0.996	XPao006964	859	865	0.993	XPao007215	984	1006	0.976	XPao001682	1180	1293	0.913
XPao010770	1106	1110	0.996	XPao011338	1271	1280	0.993	XPao011738	954	980	0.973	XPao012438	975	1069	0.912
XPao005522	1897	1904	0.996	XPao012903	988	995	0.993	XPao010544	1199	1234	0.972	XPao005599	1272	1396	0.911
XPao000864	1542	1548	0.996	XPao012115	1411	1421	0.993	XPao000881	1241	1278	0.971	XPao041755	1313	1447	0.907
XPao010328	1469	1495	0.986	XPao013851	1116	1124	0.993	XPao006414	1426	1469	0.971	XPao013381	1217	1344	0.906
XPao001224	1689	1696	0.996	XPao012806	1101	1109	0.993	XPao000863	1247	1285	0.970	XPao003964	800	891	0.898
XPao012030	1635	1642	0.996	XPao011130	1096	1104	0.993	XPao007047	1098	1132	0.970	XPao001462	1058	1180	0.897
XPao000879	1633	1640	0.996	XPao008284	950	957	0.993	XPao006096	1446	1700	0.849	XPao003740	1165	1300	0.896
XPao001185	1370	1379	0.996	XPao000785	940	947	0.993	XPao001583	1069	1106	0.967	XPao002333	869	871	0.895
XPao011212	1551	1558	0.996	XPao010435	1206	1215	0.993	XPao005008	964	998	0.966	XPao004112	1011	1132	0.893
XPao012098	1540	1547	0.995	XPao000826	935	942	0.993	XPao013717	1077	1115	0.966	XPao010468	816	814	0.893
XPao007927	1538	1543	0.995	XPao004862	931	939	0.993	XPao008076	1006	1044	0.966	XPao011187	1389	1566	0.886
XPao011131	1523	1530	0.995	XPao011204	927	934	0.993	XPao004384	1454	1506	0.965	XPao001192	1408	1591	0.885
XPao010095	863	867	0.995	XPao013499	919	926	0.992	XPao005809	1504	1558	0.965	XPao002266	946	1069	0.885
XPao033465	1262	1268	0.995	XPao008156	1541	1553	0.992	XPao001468	1424	1476	0.965	XPao002875	1072	1223	0.877
XPao011959	1461	1468	0.995	XPao002544	1147	1156	0.992	XPao003313	1256	1304	0.963	XPao003966	1086	1252	0.875
XPao005523	1666	1674	0.995	XPao005185	1262	1272	0.992	XPao005948	1433	1488	0.963	XPao002222	878	1013	0.867
XPao005044	1666	1674	0.995	XPao005987	1007	1015	0.992	XPao004789	1044	1085	0.962	XPao000887	1137	1333	0.853
XPao001173	1457	1464	0.995	XPao007907	875	882	0.992	XPao010312	892	929	0.961	XPao002448	1000	1173	0.853
XPao010535	1453	1460	0.995	XPao004743	879	887	0.992	XPao000785	1388	1340	0.961	XPao003118	824	972	0.848
XPao004781	1229	1235	0.995	XPao000741	1711	1725	0.992	XPao004803	1316	1371	0.960	XPao012653	885	1058	0.839
XPao005763	1623	1631	0.995	XPao000195	970	978	0.992	XPao002026	1271	1325	0.959	XPao011572	546	662	0.825
XPao004164	1419	1426	0.995	XPao004823	966	974	0.992	XPao000176	1370	1429	0.959	XPao001126	869	1063	0.817
XPao005283	1343	1350	0.995	XPao002814	1084	1093	0.992	XPao000604	855	892	0.959	XPao011297	808	1024	0.789
XPao008398	1524	1532	0.995	XPao007190	1081	1090	0.992	XPao011507	939	981	0.957	XPao009070	733	964	0.745
XPao007399	1142	1148	0.995	XPao006993	958	966	0.992	XPao000074	1120	1171	0.956	XPao012839	969	1348	0.741
XPao010875	1328	1335	0.995	XPao002384	852	860	0.992	XPao005213	1177	1232	0.955	XPao000873	842	1145	0.735
XPao010400	1323	1330	0.995	XPao012805	1388	1400	0.991	XPao000886	1165	1221	0.954	XPao000760	462	656	0.704
XPao007986	1317	1324	0.995	XPao007961	1379	1391	0.991	XPao012533	821	863	0.951	XPao003791	925	1375	0.673
XPao000894	1267	1294	0.985	XPao002856	1017	1026	0.991	XPao013241	1116	1174	0.951	XPao013772	721	1195	0.603
XPao003319	1274	1291	0.995	XPao0001692	1005	1014	0.991	XPao000053	1125	1184	0.950	XPao003801	747	1255	0.595
XPao005078	1448	1456	0.995	XPao012143	884	892	0.991	XPao007081	988	1041	0.948	XPao008876	313	526	0.595
XPao011708	1408	1416	0.994	XPao006985	755	762	0.991	XPao002947	978	1031	0.948	XPao006247	381	648	0.588
XPao012316	1232	1239	0.994	XPao011755	956	965	0.991	XPao000165	1503	1596	0.948	XPao012872	1045	1819	0.574
XPao007024	1577	1588	0.994	XPao003944	1038	1048	0.990	XPao002254	1319	1393	0.947	XPao013744	728	1323	0.550
XPao002674	1225	1232	0.994	XPao005833	934	943	0.990	XPao013855	855	903	0.947	XPao007321	721	1347	0.535
XPao002880	1224	1231	0.994	XPao002409	1013	1023	0.990	XPao004330	1102	1164	0.947	XPao012859	610	1151	0.530
XPao000859	1383	1391	0.994	XPao012708	1011	1021	0.990	XPao011422	877	927	0.946	XPao007955	701	1330	0.527
XPao010323	1370	1378	0.994	XPao006407	809	818	0.990	XPao007383	1481	1566	0.946	XPao006528	526	1048	0.502
XPao044171	1011	1017	0.994	XPao007025	1082	1093	0.990	XPao003939	807	856	0.943	XPao006220	928	1864	0.498
XPao012136	1329	1336	0.994	XPao010502	964	974	0.990	XPao000067	1073	1139	0.942	XPao002164	805	1855	0.488
XPao001733	1451	1460	0.994	XPao010542	964	974	0.990	XPao002787	1228	1304	0.942	XPao001211	926	1913	0.484
XPao004189	1285	1293	0.994	XPao000969	862	871	0.990	XPao000781	871	927	0.940	XPao011282	960	2143	0.462
XPao012308	1110	1117	0.994	XPao003316	859	869	0.988	XPao004235	1516	1618	0.937	XPao002961	1023	2227	0.459
XPao005992	1109	1116	0.994	XPao006962	1314	1330	0.988	XPao001649	836	893	0.936	XPao006073	1020	2226	0.458
XPao006948	1266	1274	0.994	XPao0006357	978	990	0.988	XPao001841	960	1026	0.936	XPao002050	538	1205	0.446
XPao040504	848	854	0.994	XPao005043	975	987	0.988	XPao012485	913	976	0.935	XPao041232	1057	2402	0.440
XPao004405	1072	1079	0.994	XPao011026	881	892	0.988	XPao001689	797	853	0.934	XPao012870	670	1546	0.433
XPao000934	1223	1231	0.994	XPao0001648	938	950	0.987	XPao007662	908	973	0.933	XPao004982	1003	2316	0.433
XPao006961	1222	1230	0.993	XPao0001571	941	955	0.985	XPao008630	1195	1282	0.932	XPao012008	595	1374	0.433
XPao011700	1069	1076	0.993	XPao007115	1100	1117	0.985	XPao005938	1634	1753	0.932	XPao011837	1119	2597	0.431
XPao008021	1061	1066	0.993	XPao007369	1463	1486	0.985	XPao006043	1000	1077	0.931	XPao002258	792	1859	0.428
XPao008646	1204	1212	0.993	XPao000018	1117	1137	0.982	XPao002713	1591	1711	0.930	XPao000354	666	1572	0.424
XPao000052	1354	1363	0.993	XPao000095	930	947	0.982	XPao000962	1479	1591	0.930	XPao000077	950	2293	0.414
XPao001024	1052	1059	0.993	XPao005229	1199	1221	0.982	XPao002945	1020	1086	0.929	XPao005880	696	1773	0.393
XPao006025	1047	1054	0.993	XPao000090	1363	1389	0.981	XPao000073	1188	1279	0.929	XPao011467	789	2066	0.381
XPao010337	1189	1197	0.993	XPao000451	1223	1247	0.981	XPao000436	641	807	0.927	XPao012437	612	1734	0.353
XPao011795	1186	1194	0.993	XPao0000552	1197	1221	0.980	XPao000574	828	893	0.927	XPao001781	730	2161	0.338
XPao008413	862	886	0.993	XPao011001	837	854	0.980	XPao011065	1049	1132	0.927	XPao011313	586	1827	0.321
XPao007930	875	891	0.993	XPao011648	1149	1173	0.980	XPao000551	946	1021	0.927	XPao005056	597	1901	0.314
XPao000467	1165	1173	0.993	XPao000964	1322	1351	0.979	XPao008174	1267	1372	0.923	XPao005939	485	1630	0.298
XPao001034	1008	1015	0.993	XPao005032	316	323	0.978	XPao002048	808	888	0.920	XPao011319	439	1683	0.261
XPao011462	1152	1160	0.993	XPao004080	1346	1376	0.978	XPao000609	892	970	0.920	XPao041780	0	0	0.000