

明 細 書

発明の名称：

シングルセルごとの特定の核酸のコピー数の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、シングルセルごとの特定の核酸のコピー数の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 非特許文献 1 は、シングルセル解析ではないが、細胞から抽出したゲノム DNA をドロップレットに封入して PCR で増幅することを開示している。非特許文献 1 では、標的となる試料と、基準となる試料とを同一ドロップレット内でそれぞれを独立して定量する。これは、インターカレーターの蛍光シグナルを区別してアンプリコンの長さを区別することにより実現している。

[0003] 非特許文献 2 は、特定の遺伝子の mRNA を標的としたシングルセル RT-PCR（逆転写 PCR）を開示している。非特許文献 3 では、CD4⁺T 細胞中の HIV-1 の存在を逆転写反応と single-cell-in-droplet（scid）PCR アッセイにてハイスループットで検出している。

[0004] 非特許文献 4 は、シングルセルドロップレットデジタル PCR（sc-ddPCR）法を開示している。この方法では、シングルセルをドロップレットに封入し、遺伝子に特異的なプライマーとプローブを用いてドロップレット内で PCR を行う。遺伝子は人工的に細胞に 1 コピー導入されている。

[0005] 非特許文献 5 は、シングルセルをドロップレット内で溶解するとともに、シングルセルが溶解したドロップレットと RT-PCR の反応液のドロップレットとを統合することを開示している。

[0006] 特許文献 1 は、シングルセル解析ではないが、母体血から濃縮された胎児細胞から得た DNA の特性を解析してその遺伝子状態を判定することを開示している。特許文献 1 では、濃縮された胎児細胞の DNA を増幅し、増幅さ

れたDNAを、デジタルPCRを用いて解析することを開示している。また、特許文献1は、21番染色体を検出することを開示している。

[0007] 特許文献2は、潜在的な胎児細胞を含む血球をシングルセルレベルでそれぞれ分離するとともに、分離された血球の各々に対して、独立に染色体DNAの抽出処理を行い、事後的に胎児由来の染色体DNAを含有する画分を同定することを開示している。

[0008] 非特許文献6は、上述のscddPCR法により、母体血中を循環する胎児細胞のゲノムDNA上のSRY遺伝子を検出することを開示している。

[0009] 非特許文献7は、圧電効果を用いて量り取られた1、2、4、・・・コピーの酵母ゲノムをテンプレートとする定量PCRを開示している。

[0010] 非特許文献8、9については、後述する。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特表2014-533509号公報

特許文献2：特開2018-102242号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Laura Miotke, et al., "High Sensitivity Detection and Quantitation of DNA Copy Number and Single Nucleotide Variants with Single Color Droplet Digital PCR", Analytical chemistry, 86, 5, 2618-2624.

非特許文献2：Dennis J. Eastburn, et al., "Identification and genetic analysis of cancer cells with PCR-activated cell sorting", Nucleic Acids Research, 42, 16, e128.

非特許文献3：Robert W. Yucha, et al., "High-throughput Characterization of HIV-1 Reservoir Reactivation Using a Single-Cell-in-Droplet PCR Assay", EBioMedicine, 20, 217-229.

非特許文献4：Yuka Igarashi, et al., "Single Cell-Based Vector Tracing in Patients with ADA-SCID Treated with Stem Cell Gene Therapy", Mole

cular Therapy, Methods & Clinical Development, 6, 8-16.

非特許文献5: Samuel C. Kim, et al., "Single-Cell RT-PCR in Microfluidic Droplets with Integrated Chemical Lysis", Analytical Chemistry, 90, 2, 1273-1279.

非特許文献6: Taisuke Sato, et al., "Direct Assessment of Single-Cell DNA Using Crudely Purified Live Cells: A Proof of Concept for Noninvasive Prenatal Definitive Diagnosis", The Journal of Molecular Diagnostics, 22, 2, 2, 132-140.

非特許文献7: Unoh Ki, et al., "A Novel Bioprinting Application for the Production of Reference Material Containing a Defined Copy Number of Target DNA", Ricoh Technical Report, 2020, 44, 14-26. Retrieved from <<https://jp.ricoh.com/technology/techreport/44/>>

非特許文献8: Ichiro Hanamura, et al., "Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation", Blood, 108, 5, 1724-1732.

非特許文献9: 石田 禎夫, "多発性骨髄腫: 染色体異常と臨床病型・予後", [online], 2013-09-21, 臨床血液, 54, 10, 2, 1856-1866. Retrieved from <<https://doi.org/10.11406/rinketsu.54.1856>>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] デジタルPCRは、微小区画（例えばドロップレット）内にテンプレートがあるか否かを定性的に提示する。したがって、デジタルPCRは、微小区画内の特定の核酸についての離散的なコピー数のバリエーション（Copy number variation, CNV）を検出するのに適していない。
- [0014] 本発明の目的は、細胞の集団中のシングルセルごとの特定の核酸のコピー数を検出できる方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明は、以下のシングルセルごとの特定の核酸のコピー数の検出方法に関する。

[0016] [1] 細胞の集団中のシングルセルごとの特定の核酸のコピー数を検出する方法であって、シングルセル内の核酸に由来する試料DNAとPCR反応系とを含む反応区画内にて前記試料DNAに含まれる標的をPCRで増幅する工程と、指数関数的増幅期において前記反応区画ごとに前記PCRのアンプリコンを定量する工程と、を含む、検出方法。

[2] 前記試料DNAは、シングルセル内のゲノムDNA一式、シングルセル内のRNAの逆転写産物、またはシングルセル内のミトコンドリアDNAである、[1]に記載の検出方法。

[3] 蛍光プローブ法で前記アンプリコンを定量する、[1]または[2]に記載の検出方法。

[4] 前記PCR反応系は、前記試料DNA上の相異なる領域ごとに割り当てられた、相異なる蛍光波長の蛍光物質をそれぞれ有する複数のプローブを含み、前記領域は、一または複数の前記標的を含み、前記アンプリコンを定量する工程では、一つの前記反応区画から複数の波長の蛍光を検出することで、前記試料DNAに含まれる前記標的が増幅した前記反応区画を、混入したセelfリーの核酸のみが増幅した反応区画と区別する、[3]に記載の検出方法。

[5] 前記領域は、互いに同一の蛍光波長の蛍光物質を有する複数のプローブがそれぞれ割り当てられた複数の標的を含み、前記アンプリコンを定量する工程では、前記領域ごとに、前記複数のプローブからの蛍光をそれらの標的の違いに関わらず一まとめに測定することで、前記アンプリコンを定量する、[3]または[4]に記載の検出方法。

[6] 前記試料DNAは、前記シングルセル内のゲノムDNA一式、および前記シングルセル内のミトコンドリアDNAを含み、前記PCR反応系は、ゲノムDNA上の領域に割り当てられた第1の蛍光波長の蛍光物質を有す

るプローブと、ミトコンドリアDNA上に割り当てられた第2の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブとを含み、前記領域は、一または複数の前記標的を含み、前記試料DNAに含まれる標的をPCRで増幅する工程では、前記反応区画内にて、前記ゲノムDNA一式に含まれる標的、および前記ミトコンドリアDNAに含まれる標的をPCRで増幅し、前記アンプリコンを定量する工程では、前記ミトコンドリアDNAに含まれる標的の増幅がプラトーとなり、前記ゲノムDNAに含まれる標的の増幅が前記指数関数的増幅期となるサイクルにおいて、前記反応区画ごとに前記ゲノムDNAおよび前記ミトコンドリアDNAのアンプリコンを定量し、前記アンプリコンを定量する工程では、一つの前記反応区画から前記第1および前記第2の蛍光波長の蛍光を検出することで、前記ゲノムDNAに含まれる標的および前記ミトコンドリアDNAに含まれる標的が増幅した前記反応区画を、混入したセルフフリーの核酸のみが増幅した反応区画と区別する、[3]に記載の検出方法。

[7] シングルセルと、細胞溶解試薬と、PCRのプレミックスとを含む区画内で前記シングルセルを溶解することで、前記反応区画を生成する工程をさらに含む、[1]～[6]のいずれか一項に記載の検出方法。

[8] シングルセルを含む区画内で前記シングルセルを溶解する工程と、溶解した前記シングルセルを含む区画と、PCRのプレミックスを含む区画とを統合することで、前記反応区画を生成する工程と、をさらに含む、[1]～[6]のいずれか一項に記載の検出方法。

[9] 細胞核の集団と、PCRのプレミックスとをバルクで混合する工程と、前記細胞核の集団中の個々の細胞核を前記プレミックスとともに個別化することで前記反応区画を生成する工程と、をさらに含む、[1]～[6]のいずれか一項に記載の検出方法。

[10] 前記反応区画は、前記試料DNAと前記PCR反応系とを含有するドロップレットである反応ドロップレットである、[1]～[9]のいずれか一項に記載の検出方法。

[11] 前記試料DNAは、前記シングルセル内のゲノムDNA一式を含

み、前記検出方法は、前記アンプリコンの定量結果から、染色体の全長に亘る異数性、染色体の部分的な異数性、遺伝子増幅、および遺伝子欠失からなる群から選択される少なくとも一つの染色体突然変異を有するシングルセルの存在を検出する工程をさらに有する、[1]～[10]のいずれか一項に記載の検出方法。

[12] 前記染色体突然変異を有するシングルセルは、少なくとも以下のいずれかの染色体突然変異を有するゲノムDNAを含む、[11]に記載の検出方法。

- 21番染色体の異数性
- 18番染色体の異数性
- 13番染色体の異数性
- Y染色体の異数性
- X染色体の異数性
- 22番染色体長腕22q11.2領域の欠失
- 5番染色体短腕5q領域の欠失
- 15番染色体長腕15q11-q13領域の欠失
- 1番染色体長腕の増幅
- 17番染色体短腕の欠失
- 13番染色体長腕の欠失
- 4番染色体長腕の欠失
- 5番染色体長腕の欠失
- 7番染色体長腕の欠失
- 8番染色体の増幅
- 11番染色体の欠失
- 12番染色体の異数性
- 20番染色体長腕の欠失
- 19番染色体長腕の欠失
- 1番染色体の欠失

- ー 1 8 番染色体長腕の欠失
- ー 8 番染色体短腕の欠失
- ー 4 番染色体の欠失
- ー 8 番染色体長腕の増幅
- ー 1 6 番染色体長腕の欠失
- ー 5 番染色体短腕の増幅
- ー 3 番染色体長腕の増幅
- ー 3 番染色体短腕の欠失
- ー 9 番染色体短腕の欠失
- ー MYCN 遺伝子の遺伝子増幅
- ー HER2 遺伝子の遺伝子増幅
- ー MET 遺伝子の遺伝子増幅

〔13〕前記染色体突然変異を有するシングルセルを検出したか否かの情報を含むデータを生成する工程をさらに含み、前記細胞の集団は、胎児細胞を含むように羊水または母体血から分離されたものであり、前記データは、13トリソミー、18トリソミー、21トリソミー、ターナー症候群、トリプルX症候群、XYY症候群、クラインフェルター症候群、ディ・ジョージ症候群、アンジェルマン症候群、プラダー・ウィリー症候群、またはねこ啼き症候群の診断に供するものである、〔11〕に記載の検出方法。

〔14〕前記染色体突然変異を有するシングルセルを検出したか否かの情報を含むデータを生成する工程をさらに含み、前記細胞の集団は、患者から分離されたものであり、前記データは、前記データは、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、特発性好酸球増多症、慢性好酸球性白血病、急性非リンパ性白血病、骨髓増殖性腫瘍、慢性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、大腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、膵臓癌、食道癌、甲状腺癌または頭頸部癌の診断に供するものである、〔11〕に記載の検出方法。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、細胞の集団中のシングルセルごとの特定の核酸のコピー数を検出することができる。たとえば、本発明によれば、シングルセルごとの特定の核酸のコピー数のバリエーション（CNV）を検出することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、検出の概念図である。

[図2]図2は、検出の一例を示すフローチャートである。

[図3]図3は、ドロップレット調製の概要を示す図である。

[図4]図4は、プローブの割り当てを示す図である。

[図5]図5は、検出イベントのスクアッターである。

[図6]図6は、複数プローブの割り当てを示す図である。

[図7]図7は、蛍光が増強された検出イベントのスクアッターである。

[図8]図8は、プラトーのドロップレットのスクアッターである。

[図9]図9は、指数関数的増幅期のドロップレットのスクアッターである。

[図10]図10は、蛍光が増強されたドロップレットのスクアッターである。

[図11]図11は、ヘテロの細胞集団のドロップレットのスクアッターである。

[図12]図12は、ヘテロの細胞集団のドロップレットのスクアッターである。

[図13]図13は、二倍性と一倍性とを区別するスクアッターである。

[図14]図14は、二倍性と一倍性とを区別するスクアッターである。

[図15]図15は、二倍性と一倍性とを区別するスクアッターである。

[図16]図16は、蛍光が増強された、二倍性と一倍性とを区別するスクアッターである。

[図17]図17は、蛍光が増強された、二倍性と一倍性とを区別するスクアッターである。

[図18]図18は、蛍光が増強された、二倍性と一倍性とを区別するスクアッターである。

[図19]図19は、各スクATTERに対応する箱ひげ図である。

[図20]図20は、23種類のプローブを用いた場合のROC曲線である。

[図21]図21は、カットオフ値を示す直線を含むスクATTERである。

[図22]図22は、測定ごとのクラスターの位置ずれを示す図である。

[図23]図23は、補正後の測定値のばらつきを示すグラフである。

[図24]図24は、補正後の測定値を用いたカットオフ値の算出を説明する図である。

[図25]図25は、ヒト血液由来のゲノムDNAを含むドロップレットのスクATTERである。

[図26]図26は、CD45細胞を含むドロップレットのスクATTERである。

[図27]図27は、ホモの細胞集団のドロップレットのスクATTERである。

[図28]図28は、ヘテロの細胞集団のドロップレットのスクATTERである。

[図29]図29は、各細胞集団のドロップレットのスクATTERを示す。

[図30]図30は、各細胞集団についての異常ドロップレットの検出結果を示す箱ひげ図である。

[図31]図31は、RNAの逆転写産物を含むドロップレットのスクATTERである。

[図32]図32は、ミトコンドリアDNAを含むドロップレットのスクATTERである。

発明を実施するための形態

[0019] <概要>

図1は、細胞の集団中のシングルセルごとの特定の核酸のコピー数、例えばゲノムDNA上の特定の位置のCNVを検出する様子を概念的に示す図である。一態様において細胞はヒト細胞である。

[0020] 以下、CNVを説明する上で、「一倍性」の用語は、特定の染色体の全体の一倍性化（すなわちモノソミー）と、欠失による部分的な一倍性の状態と

を含む。二倍性の染色体の全体または部分が一倍性になることは、CNVに含まれる。

[0021] 「三倍性」の用語は、特定の染色体の全体の三倍性化（すなわちトリソミー）と、重複による部分的な三倍性の状態とを含む。二倍性の染色体の全体または部分が三倍性になることは、CNVに含まれる。二倍性の染色体の全体または部分が三倍性よりも大きな倍数性になることは、CNVに含まれる。

[0022] 一倍性であることが正常である男子の性染色体の全体または部分の重複による倍数性の変化も、CNVに含まれる。以下、一倍性、二倍性、三倍性およびその他の倍数性を包含して「倍数性」という場合がある。

[0023] 倍数性の染色体の全体または部分が完全に無くなる変化（両アレル欠失）も、CNVに含まれる。また、通常であれば存在しない染色体の全体または部分が生じる変化も、CNVに含まれる。

[0024] 本発明において、異数性の染色体を有する細胞を検出することには、正倍数性の染色体を有する細胞を含んでいる細胞の集団が、さらに異数性の染色体を有する細胞も含んでいることを検出することが含まれる。本発明において、異数性の染色体を有する細胞を検出することには、正倍数性の染色体を有する細胞を含んでいる細胞の集団が、異数性の染色体を有する細胞を含んでいない細胞の集団であったこと、または異数性の細胞を検出限界以下でしか含んでいないことを検出することが含まれる。本発明において、異数性の染色体を有する細胞を検出することには、正倍数性の染色体を有する細胞を含んでいない、異数性の染色体を有する細胞の集団であることを検出することが含まれる。

[0025] <全体のフロー>

図1の左側に示すように、細胞の集団17を用意する。細胞の集団17は、シングルセル18の集合である。細胞は、真核細胞または原核細胞である。一態様において、細胞は、細胞核を1個有する真核細胞である。

[0026] 図1の中央に示すように、シングルセル18内の核酸に由来する試料DN

AとPCR反応系とを含む反応区画を準備する。図1では、反応区画として、ドロップレット20をオイル19中に形成している。図に示すのは、ドロップレットの一態様である。ドロップレット20は、油中水滴エマルション型のドロップレットである。一態様において、反応区画（ドロップレット20）の体積は、1 pL（ピコリットル）～1 μL（マイクロリットル）または1 pL（ピコリットル）～10 nL（ナノリットル）である。その一態様において、反応区画（ドロップレット20）の体積は、10 pL、100 pL、1 nL、10 nLまたは100 nLである。反応区画の構成は、試料DNAとPCR反応系とを含む微小区画であれば特に限定されず、例えばマイクロウェルであってもよい。

[0027] 試料DNAは、例えば、シングルセル内のゲノムDNA一式、シングルセル内のRNAの逆転写産物、またはシングルセル内のミトコンドリアゲノムのDNA（以下「ミトコンドリアDNA」という）である。図1では、ドロップレット20は、試料DNAとしてシングルセル18内のゲノムDNA一式21を含む。ドロップレット20は、さらにPCR反応系を含有する。以下、ドロップレット20を反応ドロップレットという場合がある。

[0028] 一態様において、試料DNAは、シングルセル内のゲノムDNA一式である。「ゲノムDNA一式」は、抽出されたままのゲノムDNAと解釈してもよい。一態様において、ゲノムDNA一式に対して全ゲノム増幅を行わない。これにより、全ゲノム増幅に起因するアレルドロップアウトを避けることができる。「ゲノムDNA一式」は、細胞溶解やその他の抽出操作の際に意図せずその一部が失われたものも含む。一態様において、「ゲノムDNA一式」は、ミトコンドリアDNAを含まない。ただし、試料DNAとしてゲノムDNA一式を用いる場合、反応区画にミトコンドリアDNAが混入してもよい。

[0029] 一態様において、試料DNAは、シングルセル内のRNAの逆転写産物である。

[0030] 一態様において、試料DNAは、シングルセル内のミトコンドリアDNA

である。

[0031] 一態様において、試料DNAは、シングルセル内のゲノムDNA一式、および同一シングルセル内のミトコンドリアDNAである。この場合、ミトコンドリアDNAを染色体ゲノムDNAのコピー数を検出する際のコントロールとしてもよい。

[0032] また、他の態様において、試料DNAは、細胞内に侵入した微生物またはウィルスの核酸、あるいは細胞内に導入された核酸である。

[0033] 図1の右側に示すように、反応区画をサーマルサイクルに供する。すなわち、シングルセル内の核酸に由来する試料DNAとPCR反応系とを含む反応区画内にて試料DNAに含まれる標的をPCRで増幅する。図1では、ドロップレット20内にてゲノムDNA一式21に含まれる標的をPCRで増幅している。PCRでは、試料DNA（例えばゲノムDNA）がテンプレートとなる。図1では、ドロップレット22aおよび22bは、指数関数的増幅期の反応ドロップレットである。この段階で、反応ドロップレットごとにそのアンプリコンを定量する。すなわち、指数関数的増幅期において反応区画（例えば反応ドロップレット）ごとにPCRのアンプリコンを定量する。一態様において、アンプリコンの定量は、蛍光プローブ法で行われる。

[0034] 図1中において、ドロップレット22bは、ドロップレット22aよりも強いシグナルを呈する。したがって、ドロップレット22bに対応するシングルセルの対象のゲノム領域のコピー数は、ドロップレット22aに対応するシングルセルの対象のゲノム領域のコピー数よりも多い。したがって、ゲノム上の特定の位置（標的の位置）についてのゲノムDNAのコピー数およびCNVを検出できる。

[0035] <検出のフロー>

図2は、核酸のコピー数の検出の一例を示すフローチャートである。ここでは、反応区画としてドロップレットを用い、かつ試料DNAとしてシングルセル内のゲノムDNA一式を用いる例について説明する。

[0036] 開始後のステップ25では、PCRのプレミックスを調製する。プレミッ

クスは、プライマー、DNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）、緩衝液および必要な補助因子を含む。一態様において、補助因子は、マグネシウムイオンを含む。一態様において、プレミックスに対して予め細胞溶解試薬を混合する。細胞溶解試薬の例には、ドデシル硫酸ナトリウム、TRITONX-100（TRITONは登録商標）、NP-40（商標）が含まれる。プレミックスは、必要なプローブを含む。

[0037] 図2に示すステップ26では、図3の上側に示すように、細胞の集団17をプレミックス31に懸濁する。細胞溶解試薬と細胞とが反応しないように、懸濁してからドロップレット化までの工程は速やかに実行する。

[0038] 図2に示すステップ27では、図3の下側に示すように個々のシングルセル18をプレミックス31ごとドロップレット化する。これによって、シングルセル18を含有するドロップレット33aが生じる。

[0039] シングルセルとプレミックスとをまとめてドロップレット化するためのシステムとしては、例えばQX200 Droplet Generator（BioRad社）を利用できる。シングルセル化のシステムは、これに限定されない。

[0040] 図3に示す一態様では、ドロップレット33aに細胞溶解試薬を含有させている。一態様において、ドロップレット33a中のシングルセル18を上述の細胞溶解試薬にてドロップレット33a内で溶解する。細胞溶解により反応ドロップレットを得る。すなわち、シングルセル18と、細胞溶解試薬と、PCRのプレミックスとを含む区画（ドロップレット33a）内でシングルセル18を溶解することで、反応区画（反応ドロップレット）を生成する。細胞溶解試薬の反応は、加温することによって効率的に進行する。

[0041] 図2に示すステップ27の他の態様において、プレミックスと混合する前に、シングルセルを含有する区画（ドロップレット）内でシングルセルを溶解する。さらに、溶解したシングルセルを含有する区画（ドロップレット）と、PCRのプレミックスを含む区画（ドロップレット）とを統合する。統合により反応区画（反応ドロップレット）を得ることができる。

[0042] 図2に示すステップ27の他の態様において、シングルセルをプレミック

スと混合する前に、バルクの細胞を溶解してバルクの細胞核の集団を得る。バルクの細胞核の集団をPCRのプレミックスと混合する。細胞核の集団中の個々の細胞核をプレミックスとともに個別化することで反応区画（反応ドロップレット）を生成する。

[0043] 図2に示すステップ28では、サーマルサイクルにより反応ドロップレット中でPCRが進行する。サーマルサイクルは、PCRの指数関数的増幅期で停止する。一態様において、「指数関数的増幅期」とは、dNTP、プライマーセット、プローブの組および活性のある酵素が枯渇に至っていないことから、鋳型依存的なDNA合成が制限されていないことをいう。一態様において、「指数関数的増幅期」とは、連鎖反応のプラトーに至っていないことをいう。

[0044] 図2に示すステップ29では、反応区画（反応ドロップレット）からのシグナルを解析することで反応ドロップレット中の標的のコピー数を定量する。以上により終了する。

[0045] 図2に示すステップ25の一態様において、プレミックスは、標的または標的から得られたアンプリコンにハイブリダイズする蛍光プローブをさらに含む。他の態様において、プレミックスは、DNAに結合する蛍光インターカレーターをさらに含む。

[0046] 一態様において、アンプリコン内に含まれるプローブの標的は、1個である。他の態様において、アンプリコン内に含まれるプローブの標的は、2個以上である。これらの一つのアンプリコンに結合する複数のプローブが互いに同色の蛍光を放出する蛍光物質を有することで、アンプリコンから放出される蛍光を増強できる。

[0047] <2色プローブ法>

図4は、2色のプローブの割り当ての例を示す。21番染色体上のいずれかの標的に第1の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブ35a (1st color) を割り当てる。18番染色体上のいずれかの標的に第2の蛍光波長を有するプローブ35b (2nd color) を割り当てる。これらの染色体の種類は、例示

にすぎない。反応区画（反応ドロップレット）中でこれらのプローブは互いに混合されている。

[0048] 本例では、第1の蛍光波長のプローブが割り当てられた標的、またはこれを含む領域をコピー数（CNV）の検出の対象とする。本例では、第2の蛍光波長のプローブが割り当てられた標的、またはこれを含む領域をコントロールとする。一態様において、コントロールは、CNVが相対的に小さい領域である。

[0049] すなわち、図4に示すように、PCR反応系は、試料DNA上の相異なる領域ごとに割り当てられた、相異なる蛍光波長の蛍光物質をそれぞれ有する複数のプローブを含む。本例でいう領域は、各染色体の全長である。領域は、各染色体の部分であってもよく、また染色体を跨いでもよい。

[0050] 図4に示す態様において、各領域に含まれる標的は、1個である。図と異なる態様において、領域に含まれる標的は、2個以上であってもよい。いずれにせよ、一つの反応区画（反応ドロップレット）から、各領域に割り当てられた各蛍光波長の蛍光を検出する。

[0051] 図4に示す態様の理想的な反応条件において、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において三倍性であれば、第1の蛍光波長の強度は、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性である場合の第1の蛍光波長の強度の1.5倍となる。21番染色体が全体または検出の対象となる部分において一倍性であれば、第1の蛍光波長の強度は、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性である場合の第1の蛍光波長の強度の0.5倍となる。その様子を図5に表す。

[0052] 図5は、反応区画（反応ドロップレット）から放出された蛍光の検出イベントのスクアッタープロットを示す。縦軸は21番染色体に割り当てられた第1の蛍光波長を、横軸は18番染色体に割り当てられた第2の蛍光波長をそれぞれ表す。各円は、プロット上の検出イベントの蛍光強度分布の中心付近を示す。この円内に大部分のイベントが集積するので、集積したイベントを以下「クラスター」という。クラスター39は、いずれの蛍光波長におい

ても、蛍光強度がバックグラウンドと差がなかったものを示す。クラスター 40 a～40 c は、いずれの蛍光波長においても、蛍光強度がバックグラウンドと差があったものを示す。

[0053] 図5に示すクラスター40 aについては、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性であることが、第1の蛍光波長の強度によって示されている。また、18番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性であることが、第2の蛍光波長の強度によって示されている。

[0054] 図5に示すクラスター40 bについては、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において三倍性であることが、第1の蛍光波長の強度によって示されている。また、18番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性であることが、第2の蛍光波長の強度によって示されている。

[0055] 図5に示すクラスター40 cについては、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において一倍性であることが、第1の蛍光波長の強度によって示されている。また、18番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性であることが、第2の蛍光波長の強度によって示されている。

[0056] 図5に示す一態様において、クラスター40 aの位置からクラスター40 bの位置に各点がシフトしていることが検出される。かかるシフトでは、第1の蛍光波長の強度が増大している。かかるシフトにおいて、第2の蛍光波長の強度は変化しない。かかるシフトは、細胞の集団中に、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において三倍性であるシングルセルが存在することを示す。

[0057] 図5に示す他の態様において、クラスター40 aの位置からクラスター40 cの位置に各点がシフトしていることが検出される。かかるシフトでは、第1の蛍光波長の強度が減少している。かかるシフトにおいて、第2の蛍光波長の強度は変化しない。かかるシフトは、細胞の集団中に、21番染色体

が全体または検出の対象となる部分において一倍性であるシングルセルが存在することを示す。

[0058] これらのスカッタープロット上におけるシフトの大きさは、予備的実験によって見積もってもよい。これらのスカッタープロット上における各クラスターの細胞の倍数性は、予備的実験によって見積もってもよい。

[0059] 図5に示すクラスター44aおよび44bを説明するために、図3に戻る。ドロップレット33aを生成する際、セルフリーの核酸をドロップレット内に巻き込むことがある。セルフリーの核酸は、例えば壊れた細胞から放出されたゲノムDNAの断片である。このようなセルフリーのゲノムDNAを含有するドロップレット33bからもPCRによってアンプリコンを生ずる場合がある。

[0060] 図5に示すスカッタープロットにおいて、このようなセルフリー分子に由来するアンプリコンは、クラスター44aおよびクラスター44bを生ずる。セルフリー分子に由来するアンプリコンのシグナルは、クラスター40aとは重なりにくい。なぜなら、相異なる領域上の2つ以上の標的が、セルフリー分子に由来するドロップレット内で同時に増幅されることは起こる可能性が低いからである。また、通常は、セルフリー分子を含んだドロップレットが有する標的のコピー数は1である。

[0061] 図4に戻る。図4に示すように相異なる領域のそれぞれで、相異なる蛍光波長の蛍光物質を用いる。言い換えれば、第2の蛍光波長のプローブをコントロールに用いる。これにより、図5に示すように、ゲノムDNAが増幅した反応ドロップレットを、混入したセルフリーの核酸のみが増幅したドロップレットと区別できる。

[0062] すなわち、図4の例では、PCR反応系は、試料DNA上の相異なる領域ごとに割り当てられた、相異なる蛍光波長の蛍光物質をそれぞれ有する複数のプローブを含む。また、領域は、一または複数の前記標的を含む。そして、アンプリコンを定量する工程では、一つの反応区画から複数の波長の蛍光を検出することで、試料DNAに含まれる標的が増幅した反応区画を、混入

したセルフリーの核酸のみが増幅した反応区画と区別する。

[0063] プローブに付加する蛍光物質（蛍光色素）およびクエンチャーの種類は、特に限定されない。たとえば、第1の蛍光波長の蛍光物質はFAM（商標、Fluorescein amidite）であり、第2の蛍光波長の蛍光物質はHEX（商標、Hexachloro-fluorescein）である。

[0064] <標的の増加とシグナルの増強>

図6は、各色に複数種類のプローブを割り当てた例を示す。以下、図4と異なる点を説明する。21番染色体上の3種類の標的に第1の蛍光波長の蛍光物質を有する3種類のプローブ（1st color）をそれぞれ割り当てる。18番染色体上の3種類の標的に第2の蛍光波長の蛍光物質を有する3種類のプローブ（2nd color）をそれぞれ割り当てる。これらの染色体の種類は、例示にすぎない。PCR反応系は、試料DNA上の相異なる領域ごとに割り当てられた、相異なる蛍光波長の蛍光物質をそれぞれ有する複数のプローブを含む。これらは相異なる標的の配列を有する。ドロップレット中でこれらのプローブは互いに混合されている。

[0065] 図7は、反応区画（反応ドロップレット）から放出された蛍光の検出イベントのスクATTERプロットを示す。クラスター41a～41cは、いずれの蛍光波長においても、蛍光強度がバックグラウンドと差があったものを示す。図5と同様のシフトが見られる。

[0066] 図7に示すクラスター41aについては、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性であることが、第1の蛍光波長の強度によって示されている。また、18番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性であることが、第2の蛍光波長の強度によって示されている。

[0067] 図7に示すクラスター41bについては、21番染色体が全体または検出の対象となる部分において三倍性であることが、第1の蛍光波長の強度によって示されている。また、18番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性であることが、第2の蛍光波長の強度によって示されている。

。

[0068] 図7に示すクラスター4 1 cについては、2 1番染色体が全体または検出の対象となる部分において一倍性であることが、第1の蛍光波長の強度によって示されている。また、1 8番染色体が全体または検出の対象となる部分において二倍性であることが、第2の蛍光波長の強度によって示されている。

。

[0069] 図7に示す一態様において、クラスター4 1 aの位置からクラスター4 1 bの位置に各点がシフトしていることが検出される。かかるシフトでは、第1の蛍光波長の強度が増大している。かかるシフトにおいて、第2の蛍光波長の強度は変化しない。かかるシフトは、細胞の集団中に、2 1番染色体の全体または検出の対象となる部分において三倍性であるシングルセルが存在することを示す。

[0070] 図7に示す他の態様において、クラスター4 1 aの位置からクラスター4 1 cの位置に各点がシフトしていることが検出される。かかるシフトでは、第1の蛍光波長の強度が増大している。かかるシフトにおいて、第2の蛍光波長の強度は変化しない。かかるシフトは、細胞の集団中に、2 1番染色体が全体または検出の対象となる部分において一倍性であるシングルセルが存在することを示す。

[0071] これらのスキャッタープロット上におけるシフトの大きさは、予備的実験によって見積もってもよい。

[0072] 図7に示すクラスター4 4 aおよび4 4 bは、図5に示したものと同様である。これらのクラスターは、相異なる蛍光波長のプローブを同ドロップレット内で検出する手法を用いることでクラスター4 1 a～4 1 cと区別できる。この点も図5と同様である。

[0073] 図6に戻る。2 1番染色体の1本当たり、第1の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブが3個割り当てられている。同様に、1 8番染色体の1本当たり、第2の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブが3個割り当てられている。したがって、理想的な反応条件において、反応ドロップレットにおける各

色の蛍光強度は、領域内の標的の数に比例して高まる。また、1つの反応ドロップレットにおける標的の数が増えることで、PCRの効率のばらつきが平均化され、反応ドロップレット間における蛍光強度のばらつきが低減する。

[0074] 図7に即して説明すれば、クラスター41a～41cは、クラスター39、クラスター44aおよびクラスター44bからさらに分離されやすくなる。

[0075] 本実施形態では、各領域が、互いに同一の蛍光波長の蛍光物質を有する複数のプローブがそれぞれ割り当てられた複数の標的を含む。また、アンプリコンを定量する際、領域ごとに、複数のプローブからの蛍光をそれらの標的の違いに関わらず色ごとに一まとめに測定することで、アンプリコンを定量する。以上により、これらの標的の割り当てられた領域に由来する蛍光を増強する。したがって、標的のシグナルをバックグラウンドノイズと分離しやすくなる。

[0076] 一態様において、1つの領域内の標的の数は、1～1,000個である。一態様において、1つの領域内の標的の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100である。標的の数は、領域間で揃えてもよく、異なってもよい。各領域において、標的の数と同じ数の種類のプローブを用いる。これらのプローブに同一の蛍光波長を割り当てる。

[0077] 一態様において、プライマーペアおよびプローブの組み合わせ1個が特定

する標的は、ゲノムDNA上に1個しかない。各領域においてn種類のプローブを用いることで、同領域においてn個の標的を検出する。

[0078] <3以上の領域への3色以上の割り当て>

上記実施形態では、2つの蛍光波長を用いた。さらに領域の数を増やすとともに、追加した領域に他の蛍光波長を割り当ててもよい。一態様において、18番染色体および21番染色体以外の染色体に、第3の蛍光波長を割り当ててもよい。

[0079] 一態様において、領域と蛍光波長の組の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24である。他の態様において、領域と蛍光波長の組は1個である。

[0080] プローブに付加する蛍光物質（蛍光色素）およびクエンチャーの種類は、特に限定されない。蛍光物質の例には、FAM、HEX、VIC、TAMRA、ROX、Cy5およびCy5.5（いずれも商標）が含まれる。

[0081] <試験例1. プラトーにおける定量>

図8は、プラトーのドロップレットのスクアッターを示す。21番染色体上の1つの標的に第1の蛍光波長の蛍光物質（FAM）を有するプローブを1種類割り当てた。また、18番染色体上の1つの標的に第2の蛍光波長の蛍光物質（HEX）を有するプローブを1種類割り当てた。これらのプローブは、1つのドロップレット中で互いに混合されていた。

[0082] PCRのサイクル数は40とした。PCRの反応は、指数関数的増幅期を過ぎてプラトーに達した。反応は飽和していた。図8は、シングルセルードロップレットPCR後のスクアッターを示す。

[0083] 図8の上段では、ヒト培養細胞GM22948株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。ヒト培養細胞GM22948株では、21番染色体および18番染色体が正倍数性、すなわち二倍性（Diploidy、実線の矢印）である。実線の矢印は、クラスターの中心を示す。矢じりは、セルフリーDNAのクラスターである。以下の図においても

同様である。

[0084] 図8の中段では、ヒト培養細胞AG17487株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。ヒト培養細胞AG17487株では、21番染色体が三倍性(Triploidy、破線の矢印)であり、18番染色体が正倍数性である。

[0085] 図8の下段では、両株のスクATTERを加算した結果を示す。21番染色体の二倍性と三倍性とでドロップレットのシグナル強度に違いはなかった。

[0086] <試験例2. 指数関数的増幅期における定量>

図9は、指数関数的増幅期のドロップレットのスクATTERを示す。試験例1と異なり、PCRのサイクル数は24とした。PCRの反応は、指数関数的増幅期にあった。他の点においては試験例1と同じであった。

[0087] 図9の上段では、ヒト培養細胞GM22948株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。

[0088] 図9の中段では、ヒト培養細胞AG17487株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。

[0089] 図9の下段では、両株のスクATTERを加算した結果を示す。21番染色体の二倍性と三倍性とでドロップレットのシグナル強度に違いがあった。指数関数的増幅期においてドロップレットの蛍光を定量することで二倍性と三倍性とを区別できた。よって、以下の試験例においては、指数関数的増幅期でドロップレットの蛍光強度を測定した。

[0090] なお、図9の各スクATTERにおいて、21番染色体が二倍性かつ21番染色体が二倍性または三倍性のクラスターの右上に存在する複数のイベントは、複数の細胞が含まれるドロップレットのシグナルを示していると考えられる。

[0091] <試験例3. 蛍光の増強>

図10は、蛍光が増強されたドロップレットのスクATTERを示す。試験例2と異なり、21番染色体に第1の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブを8種類割り当てた。21番染色体上の8つの標的に第1の蛍光波長の蛍光

物質を有するプローブをそれぞれ1種類ずつ割り当てた。また、18番染色体に第2の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブを8種類割り当てた。18番染色体上の8つの標的に第2の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブをそれぞれ1種類ずつ割り当てた。他の点においては試験例2と同じであった。

[0092] 図10の上段では、ヒト培養細胞GM22948株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。

[0093] 図10の中段では、ヒト培養細胞AG17487株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。

[0094] 図10の下段では、両株のスクATTERを加算した結果を示す。21番染色体の二倍性のクラスターと、三倍性のクラスターとがよりはっきりと分かれた。このためクラスターのシフト自体をより検出しやすくなった。これは、同一の蛍光波長のプローブに対応する1つの領域内での標的の数を増やすことで、ドロップレットの蛍光が増強されるとともに、蛍光強度のばらつきが低減されたことによる。以下の試験例においては、一つの領域に複数の標的を割り当てることで蛍光を増強した。

[0095] なお、図10の各スクATTERにおいて、21番染色体が二倍性かつ21番染色体が二倍性または三倍性のクラスターの右上に存在する複数のイベントは、複数の細胞が含まれるドロップレットのシグナルを示していると考えられる。

[0096] <試験例4. ヘテロな細胞集団におけるCNVの検出>

図11および図12は、ヘテロな細胞集団のドロップレットのスクATTERを示す。ヒト培養細胞GM22948株(Diploidy)およびヒト培養細胞AG17487株(Triploidy)とを混合してヘテロな細胞集団を得た。混合比を99/1から75/25とした。これらの細胞集団に対してシングルセルードロップレットPCRを行った。他の点においては試験例3と同じであった。二倍性から三倍性へのクラスターのシフトは、細胞の数の比を反映していた。

[0097] <試験例5. 二倍性から一倍性へのクラスターのシフト>

図13は、ホモの細胞集団のドロップレットのスクATTERを示す。縦軸のChr13-8pは、13番染色体の8か所の標的に8種類のプローブがそれぞれ割り当てられていることを表す。横軸のChr18-8pは、18番染色体の8か所の標的に8種類のプローブがそれぞれ割り当てられていることを表す。これらのプローブは、1つのドロップレット中で互いに混合されていた。

[0098] 図13の上段では、ヒト培養細胞GM22948株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。ヒト培養細胞GM22948株では、13番染色体および18番染色体が正倍数性、すなわち二倍性（Diploidy、実線の矢印）である。

[0099] 図13の下段では、ヒト培養細胞NCI-H929株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。ヒト培養細胞NCI-H929株では、13番染色体が一倍性（Monoploidy、破線の矢印）であり、18番染色体が正倍数性である。

[0100] 図14の上段では、両株のスクATTERを加算した結果を示す。13番染色体の二倍性と一倍性とでドロップレットのシグナル強度に違いがあった。指数関数的増幅期においてドロップレットの蛍光を定量することで二倍性と一倍性とを区別できた。

[0101] 図14の下段は、ヘテロの細胞集団のドロップレットのスクATTERを示す。ヒト培養細胞GM22948株（Diploidy）およびヒト培養細胞NCI-H929株（Monoploidy）とを混合してヘテロな細胞集団を得た。混合比を50/50とした。これらの細胞集団に対してシングルセルードロップレットPCRを行った。二倍性から一倍性へのクラスターのシフトは、細胞の数の比を反映していた。

[0102] <試験例6. 蛍光の増強>

10000個の細胞（GM22948株またはGM13721株）およびPBSを含む細胞懸濁液2μLを、ドデシル硫酸ナトリウムを含むPCRのプレミックスに添加してPCR反応液を調製した。PCR反応液中のプライ

マーやプローブなどの濃度は以下のとおりである。

- ・ 1 X ddPCR Multiplex Super Mix (BioRad社)
- ・ 500 nM / 575 nM 13番染色体-FAMプローブ
- ・ 1 μ M 13番染色体プライマー
- ・ 1000 nM / 1250 nM 18番染色体-HEXプローブ
- ・ 1 μ M 18番染色体プライマー
- ・ 蒸留水 (メスアップ用)

[0103] 上記PCR反応液をQX200 Droplet Generator (BioRad社) を用いてドロップレット化し、さらに各ドロップレット内において細胞を溶解させた。その後、各ドロップレット内において一般的な条件でPCRを行った。PCRのサイクル数は23とした。PCRの反応は、指数関数的増幅期にあった。

[0104] 本試験例では、13番染色体に第1の蛍光波長の蛍光物質 (FAM) を有するプローブを1、5、10または23種類割り当てた。13番染色体上の1、5、10または23の標的に第1の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブをそれぞれ1種類ずつ割り当てた。複数種類のプローブを用いる場合、各プローブの濃度は同じであり、上記のプローブの濃度 (1、5または10種類: 500 nM、23種類: 575 nM) は複数種類のプローブの合計濃度である。また、18番染色体に第2の蛍光波長の蛍光物質 (HEX) を有するプローブを1、5、10または25種類割り当てた。18番染色体上の1、5、10または25の標的に第2の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブをそれぞれ1種類ずつ割り当てた。複数種類のプローブを用いる場合、各プローブの濃度は同じであり、上記のプローブの濃度 (1、5または10種類: 1000 nM、25種類: 1250 nM) は複数種類のプローブの合計濃度である。これらのプローブは、1つのドロップレット中で互いに混合されていた。

[0105] 図15～図18は、指数関数的増幅期のドロップレットのスクアッターを示す。

[0106] 図15～図18の上段では、ヒト培養細胞GM22948株に対してシン

グルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。ヒト培養細胞GM22948株では、13番染色体および18番染色体が正倍数性、すなわち二倍性(Diploidy、実線の矢印)である。実線の矢印は、クラスターの中心を示す。

[0107] 図15～図18の下段では、ヒト培養細胞GM13721株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。ヒト培養細胞GM13721株では、13番染色体の片方の長腕の一部領域については一倍性(Monoploidy、破線の矢印)であり、18番染色体が正倍数性である。上記第1の蛍光波長の蛍光物質(FAM)を有するプローブは、すべて13番染色体の上記欠損領域に割り当てられている。

[0108] 図15は、13番染色体および18番染色体に、それぞれ1種類のプローブを割り当てた場合の結果を示す。図16は、13番染色体および18番染色体に、それぞれ5種類のプローブを割り当てた場合の結果を示す。図17は、13番染色体および18番染色体に、それぞれ10種類のプローブを割り当てた場合の結果を示す。図18は、13番染色体に23種類のプローブを、18番染色体に25種類のプローブを割り当てた場合の結果を示す。

[0109] なお、図15～図18の各スキャッターにおいて、18番染色体が二倍性かつ13番染色体が一倍性または二倍性のクラスターの右上に存在する複数のイベントは、複数の細胞が含まれるドロップレットのシグナルを示していると考えられる。

[0110] これらのスキャッターにおいて実線の矢印および破線の矢印の位置の違いを見てわかるように、同一の蛍光波長のプローブに対応する、1つの領域内での標的の数を増やすことで、コピー数の違いをより容易に判定できる。

[0111] 次いで、各スキャッターについて、1つの細胞が入ったドロップレットについて、第2の蛍光波長の蛍光強度に対する第1の蛍光波長の蛍光強度の割合「FAM/HEX」を算出し、箱ひげ図にまとめた。図19は、各スキャッターについての箱ひげ図である。

[0112] 図19において、いずれのグラフにおいても、13番染色体が一倍性の細

胞と二倍性の細胞とで、第3四分位数および第1四分位数を示す箱が重なっていないことから、一倍性の細胞と二倍性の細胞とを区別できることがわかる。特に、13番染色体に23種類のプローブを、18番染色体に25種類のプローブを用いた場合は、ひげも重なっていなかった。

[0113] 図20は、23種類のプローブを用いた場合の「FAM/HEX」を説明変数として、GM22948株（13番染色体が二倍性の細胞）およびGM13728株（13番染色体が一倍性の細胞）を含む細胞集団からGM13728株（13番染色体が一倍性の細胞）を検出できる性能をROC解析した結果を示す。Yoden Indexは0.743であった。Yoden Indexでカットオフしたときの感度は0.997（99.7%）であり、特異度は0.994（99.4%）であった。また、AUCは0.997（95%CI：0.996～0.999）と、極めて高い値であった。

[0114] <内部標準>

一態様において、倍数性の測定は内部標準で行う。一態様において、検出の対象となる領域において正倍数性である細胞が、CNVの内部標準である。たとえば、試験例4および試験例5の後半では、ヘテロな細胞の集団における、検出対象の領域のコピー数を測定した。また、正倍数性のクラスターに対して、CNVを有するクラスターが存在するかどうかで、それらが三倍性か一倍性かを判断した。

[0115] ヘテロな細胞の集団では、標的の割り当てられた領域において正倍数性である細胞の構成比は、0%超かつ100%未満である。ヘテロな細胞の集団において正倍数性である細胞の比は、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9、99.95、99.96、99.97、99.98または99.99%である。

[0116] ヘテロな細胞の集団では、標的の割り当てられた領域において対象となる

CNVを有する細胞の構成比は、0%超かつ100%未満である。ヘテロな細胞の集団においてCNVを有する細胞の比は、例えば、99.99、99.98、99.97、99.96、99.95、99.9、99.8、99.7、99.6、99.5、99.98、97、96、95、90、85、80、75、70、60、50、40、30、25、20、15、10、5、4、3、2、1、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.04、0.03、0.02または0.01%である。

[0117] <外部標準>

試験例1～3および試験例5の前半では、倍数性についてホモの細胞の集団における、検出対象の領域のコピー数を測定した。これらの細胞は、事前にCNVが判明していた。以下の手段により、事前にCNVが判明していない細胞に対して、検出対象の領域のコピー数の標準を提供できる。

[0118] すなわち、一態様において、倍数性の測定は外部標準で行う。たとえば、サンプルとは混合されない他のエマルジョン系において、倍数性が予め分かっている細胞のゲノムDNAをテンプレートとして同時にまたはその前後にPCRを行い、そのアンプリコンの蛍光強度を測定する。その蛍光強度より求められるクラスターの座標と、サンプルのクラスターの座標とを比較する。

[0119] このような外部標準の試験例は、図9の上段（二倍数性）および中段（三倍数性）、図10の上段（二倍数性）および中段（三倍数性）、ならびに図13の上段（二倍数性）および下段（一倍数性）に示されている。

[0120] がん患者の腫瘍細胞のいずれかの染色体の倍数性を測定することを例にとる。治療が順調に進み、測定対象となる細胞全てにおいて、元々存在した染色体突然変異が消失することが起こる。この場合、測定の対象となる染色体上の領域は正倍数性となる。したがって、上記の測定手法に則れば、スクATTER上の異数性のクラスターのシフトは消失する。言い換えれば、種々のクラスターの中で正倍数性のものだけが残る。

[0121] 一方で、がん患者の病勢が著しく進行すると、測定対象となる細胞全てに

染色体突然変異が存在することが想定される。または、正倍数性の細胞に比べて異数性の細胞が著しく多くなり、正倍数性の細胞が検出できなくなることが想定される。上記の測定手法に則れば、スキャッター上の正倍数性のクラスターは消失する。言い換えれば、種々のクラスターの中で異数性のものだけが検出されるようになる。

[0122] 係る異数性のクラスターにおいては、測定対象の領域の特定の倍数性を有する細胞のホモジーニアスな集団となる。または、様々な倍数性を有する細胞のヘテロジーニアスな集団となる。

[0123] 一態様において、がん患者の腫瘍細胞のゲノムの倍数性を、倍数性の外部標準をもって測定する。外部標準を用いることで、細胞の集団にもともと含まれるはずの正倍数性の細胞（がん化していない健全な細胞）を内部標準とすることに依拠することなく、細胞の倍数性を測定できる。がん治療における加療の必要性の判断をつける上で、または完全寛解の診断をつける上でこれらの倍数性のより正確な情報が役立つ。

[0124] 次に出生前診断の一環として、羊水中の胎児細胞を測定対象とすることを例にとる。羊水中の胎児細胞に母体由来の細胞の混入がない場合、通常の当該細胞の集団中に胎児細胞しか含まれない。当該細胞の集団はゲノムの倍数性についてホモジーニアスな集団である。

[0125] 一態様において、胎児細胞のゲノムの倍数性を、倍数性の外部標準をもって測定する。外部標準を用いることで、細胞の集団にもともと含まれるはずの正倍数性の細胞、この場合は母体由来の細胞である、を内部標準とすることに依拠することなく細胞の倍数性を測定できる。

[0126] なお、羊水中から胎児細胞を100%の純度で得たことを事前に確認できた場合は、上記測定手法を用いることで当該胎児細胞の集団がゲノムの倍数性に関してヘテロジーニアスであるか、ホモジーニアスであるかを調べることができる。すなわち、胎児細胞の染色体の倍数性のモザイクの有無を確認できる。

[0127] 本実施形態において、測定対象のゲノム領域のコピー数と、クラスターの

蛍光強度の中心とは、非常に明瞭な線形的関係を有する。したがって、サンプルの測定の際、外部標準の細胞から蛍光強度を得なくてもよい。すなわち、予め求めた外部標準の蛍光強度の情報と、サンプルの蛍光強度の情報とを比較することで、サンプルのゲノムの測定対象の領域の倍数性を決定できる。

[0128] <試験例 7. 外部標準としてのカットオフ値の設定>

図 2 1 は、本試験例で設定しようとしているカットオフ値に対応する直線を含むスキャッターを示す。本試験例では、この図に示されるように、13 番染色体の片方の長腕の一部領域が一倍性の細胞 (Monoploidy) と 13 番染色体が二倍性の細胞 (Diploidy) とを分けるカットオフ値を外部標準として設定する。

[0129] 10000 個の細胞 (GM22948 株) および PBS を含む細胞懸濁液 2 μ L を、ドデシル硫酸ナトリウムを含む PCR のプレミックスに添加して PCR 反応液を調製した。PCR 反応液中のプライマーやプローブなどの濃度は以下のとおりである。

- ・ 1 X ddPCR Multiplex Super Mix (BioRad社)
- ・ 25 nM 13 番染色体-FAM プローブ $\times$ 23 種類 (合計濃度: 575 nM)
- ・ 1 μ M 13 番染色体プライマー $\times$ 23 種類
- ・ 50 nM 18 番染色体-HEX プローブ $\times$ 25 種類 (合計濃度: 1250 nM)
- ・ 1 μ M 18 番染色体プライマー $\times$ 25 種類
- ・ 蒸留水 (メスアップ用)

[0130] 上記 PCR 反応液を QX200 Droplet Generator (BioRad社) を用いてドロップレット化し、さらに各ドロップレット内において細胞を溶解させた。その後、各ドロップレット内において一般的な条件で PCR を行った。PCR のサイクル数は 23 とした。PCR の反応は、指数関数的増幅期にあった。それぞれ別個に調製した 23 の上記 PCR 反応液を用いて、それぞれ別個に P

CRを行った。

[0131] 図22は、測定ごとのクラスターの位置ずれを示す。図22の上段および中段は、ヒト培養細胞GM22948株に対してシングルセルドロップレットPCRを行った結果を示す。ヒト培養細胞GM22948株では、13番染色体および18番染色体が正倍数性、すなわち二倍性(Diploidy、実線の矢印)である。これらの図に示されるように、同じ細胞株に対して同じプローブを用いて複数回測定した場合、異なる測定間においてクラスターの位置がずれることがある。ここで、各クラスターがずれる方向は、測定ごとに同じである。

[0132] 図22の下段は、23回測定を行ったときの測定値のばらつきを示すグラフである。このグラフでは、測定値としてFAM/HEXを用いている。このグラフからわかるように、同じ細胞株に対して同じプローブを用いて測定しても、測定結果にばらつきが生じる。適切なカットオフ値を設定するためには、このばらつきを補正した上でカットオフ値を設定することが好ましい。

[0133] そこで、本試験例では、23回の測定結果のそれぞれにおいて、陰性クラスター(スキャッターにおいて左下に位置するクラスター)の第1の蛍光波長(FAM)の蛍光強度の中央値(以下「FAM測定値」ともいう)および第2の蛍光波長(HEX)の蛍光強度の中央値(以下「HEX測定値」ともいう)をそれぞれ算出した。23のFAM測定値の平均値を陰性クラスターのFAM基準値とし、23のHEX測定値の平均値を、陰性クラスターのHEX基準値とした。そして、23回の測定結果のそれぞれについて、クラスターのシフト(測定結果のばらつき)を補正するための補正值として、「 $(\text{FAM基準値} + \alpha) / (\text{FAM測定値} + \alpha)$ 」および「 $(\text{HEX基準値} + \alpha) / (\text{HEX測定値} + \alpha)$ 」を算出した。 α は、測定装置の蛍光強度の検出限界を考慮して「FAM基準値/FAM測定値」および「HEX基準値/HEX測定値」を真の蛍光強度の比に近づけるために任意に設定される数値である。ここでは α を2000とした。得られたFAMの補正值およびHEX

の補正値を、すべての測定値に乗じて、測定結果のばらつきを補正した。

[0134] 図23は、補正後の測定値のばらつきを示すグラフである。測定番号は、図22の下段のグラフに対応する。測定結果のばらつき（クラスターのシフト）が顕著に低減していることがわかる。これらの補正後の測定値を用いてカットオフ値を設定した。

[0135] 図24は、補正後の測定値を用いたカットオフ値の算出を説明する図である。図24の上段は、95341個の補正後の測定値を示すスキャッターである。すべての測定値の分布を近似する一次関数式 ($y = ax + b$) を標準主軸回帰式で求めたところ、 $y = 0.84511x - 404.24$ の式が求められた。そして、各測定値の第1の蛍光波長 (FAM) の蛍光強度および第2の蛍光波長 (HEX) の蛍光強度を統合するために、上記一次式を変換した式 $b = y - 0.84511x$ の x (第2の蛍光波長 (HEX) の蛍光強度) および y (第1の蛍光波長 (FAM) の蛍光強度) に各測定値を代入して各測定値についての b の値を求めた。図24の中段のグラフは、算出された95341個の b の値の分布を示す。今回は、特異度を重視して、このグラフに示される分布の $-3SD$ (標準偏差) に相当する値を、13番染色体が一倍性の細胞と13番染色体が二倍性の細胞とを分けるカットオフ値とした。図24の下段のグラフは、カットオフ値を示す直線 ($y = 0.84511x - 2121.17$) を含むスキャッターである。13番染色体が二倍性の細胞についての95341個の測定値のうち99.85%の測定値は、この直線より上に位置する。

[0136] 表1に、求めたカットオフ値を用いて測定結果を判定した結果を示す。GM22948株 (13番染色体が二倍性の細胞) およびGM13721株 (13番染色体が一倍性の細胞) を含む細胞集団からGM13721株 (13番染色体の片方の長腕の一部領域が一倍性の細胞) を検出する場合の感度は84.1%、特異度は99.3%であった。上記のとおり、今回設定したカットオフ値は特異度を重視したものであり、感度を重視してカットオフ値を設定することももちろん可能である。

[表1]

		細胞株	
		GM13721 一倍体	GM22948 二倍体
判定結果	一倍体	2740	22
	二倍体	517	3235

[0137] なお、カットオフ値の設定方法は、上記の例に限定されない。たとえば、ROC解析を用いて感度および特異度が最大となるカットオフ値を算出してもよい。

[0138] <突然変異の検出>

一態様において、CNVを検出することで、細胞の集団中から、突然変異を有するシングルセルの存在を検出する。一態様において、突然変異は、体細胞突然変異または生殖細胞突然変異である。一態様において、突然変異は、染色体突然変異または遺伝子突然変異である。

[0139] <染色体突然変異の検出>

一態様において、試料DNAがシングルセル内のゲノムDNA一式を含む場合、PCRのアンプリコンの定量結果からCNVを検出することで、細胞の集団中から、染色体突然変異を有するシングルセルの存在を検出する。一態様において、染色体突然変異は、染色体の全長に亘る異数性、染色体の部分的な異数性、遺伝子増幅および遺伝子欠失の少なくともいずれかである。先に説明した図4～図7は、染色体の全長に亘る異数性の検出の一態様である。

[0140] 遺伝子増幅は、染色体の部分的な重複により遺伝子が増殖することである。一態様において、重複の起こる回数に制限はない。遺伝子欠失は、染色体の部分的な欠失により遺伝子が喪失することである。一態様において、遺伝子欠失はhaploまたはnullである。一態様において、遺伝子増幅および遺伝子欠失は多型である。

[0141] 上述のとおり、細胞の集団がゲノム異数性の細胞で占められていない限り、細胞の集団には正倍数性の細胞が混入している。細胞の集団は、標的のゲ

ノム上の位置において、染色体突然変異を有さない正常なシングルセルを含んでいる。上述の反応区画（反応ドロップレット）のそれぞれに割り当てられるシングルセルのいずれかは、異数性検出の対象となっている領域において正倍数性の染色体を有する。スキャッター上では、染色体突然変異を有するシングルセルのクラスターが、正常なシングルセルの作り出すクラスターの位置からシフトする。先に説明した図5の示すクラスター40aおよび図7に示すクラスター41aが、そのシフトの例である。クラスター40aは、一種の内部標準として機能する。

[0142] また、細胞の集団がゲノム異数性の細胞で占められていても、上述の外部標準を用いることで、そのクラスターの倍数性を絶対的に定量できる。また、正倍数性の細胞と異数性の細胞からなるヘテロジーニアスな細胞の集団に対しても、外部標準を適用できる。

[0143] 標的のゲノム上の位置における染色体突然変異を有しないシングルセルの反応ドロップレットのアンプリコン量とは異なるアンプリコン量を有するに至った反応ドロップレットを検出する。以下、これを異数性ドロップレットという。先に説明した図5に示すクラスター40bおよび40cならびに図7に示すクラスター41bおよび41cがその検出例である。

[0144] 異数性ドロップレットを生じる染色体突然変異の例は、以下である。すなわち、検出されうる染色体突然変異を有するシングルセルは、例えば、以下のいずれかの染色体突然変異を有するゲノムDNAを含む。

- 21番染色体の異数性
- 18番染色体の異数性
- 13番染色体の異数性
- Y染色体の異数性
- X染色体の異数性
- 22番染色体長腕22q11.2領域の欠失
- 5番染色体短腕5q領域の欠失
- 15番染色体長腕15q11-q13領域の欠失

- 1 番染色体長腕の増幅
- 1 7 番染色体短腕の欠失
- 1 3 番染色体長腕の欠失
- 4 番染色体長腕の欠失
- 5 番染色体長腕の欠失
- 7 番染色体長腕の欠失
- 8 番染色体の増幅
- 1 1 番染色体の欠失
- 1 2 番染色体の異数性
- 2 0 番染色体長腕の欠失
- 1 9 番染色体長腕の欠失
- 1 番染色体の欠失
- 1 8 番染色体長腕の欠失
- 8 番染色体短腕の欠失
- 4 番染色体の欠失
- 8 番染色体長腕の増幅
- 1 6 番染色体長腕の欠失
- 5 番染色体短腕の増幅
- 3 番染色体長腕の増幅
- 3 番染色体短腕の欠失
- 9 番染色体短腕の欠失
- MYCN 遺伝子の遺伝子増幅
- HER2 遺伝子の遺伝子増幅
- MET 遺伝子の遺伝子増幅。

[0145] 一態様において、欠失から両アレル欠失、いわゆる *null* を除外する。
一態様において、その一部分が欠失した染色体と当該一部分が正常な染色体との対が検出対象である。

[0146] 一態様において、異数性ドロップレットを検出したか否かの情報を含むデ

ータをさらに生成する。すなわち、染色体突然変異を有するシングルセルを検出したか否かの情報を含むデータを生成する。シングルセルを生ずる細胞の集団を選択することで、以下のような特異な診断領域に有益なデータが生成される。

[0147] <出生前診断への応用>

一態様において、シングルセルを羊水または母体血のいずれかから得る。具体的には、羊水または母体血からバルクの細胞の集団を得る。細胞の集団は、胎児細胞を含む。一態様において、細胞の集団中の胎児細胞を濃縮する。細胞の集団は、母体細胞を含む。一態様において、母体細胞は、検出の対象となるゲノムDNA上の領域において正倍数性である。一態様において、胎児細胞は、母体血中を循環する胎児有核赤血球（胎児有核赤芽球、fNRBC）であり、母体細胞は、母体血中を循環する白血球である。一態様において、胎児細胞は、羊水中に浮遊する胎児細胞であり、母体細胞は、羊水中に浮遊する母体細胞である。

[0148] 一態様において、データは、13トリソミー、18トリソミー、21トリソミー、ターナー症候群、トリプルX症候群、XYY症候群、クラインフェルター症候群、ディ・ジョージ症候群、アンジェルマン症候群、プラダー・ウィリー症候群、またはねこ啼き症候群の診断に供するものである。

[0149] <がん診断への応用>

一態様において、シングルセルをがん患者の血液から得る。具体的にはがん患者の血液からバルクの細胞の集団を分離する。細胞の集団は、末梢循環腫瘍細胞（CTC）およびがん化した血球の少なくともいずれかからなるがん細胞を含む。他の態様において、細胞の集団は、固形がんを生検し、さらに所定の化学的および／または物理的处理で分散させることで得た細胞である。一態様において、がん化した血球は、がん化した形質細胞である。一態様において、細胞の集団中のこれらのがん細胞を濃縮する。細胞の集団は、さらにがん細胞でない細胞を含む。一態様において、がん細胞でない細胞は、検出の対象となるゲノムDNA上の領域において正倍数性である。一態様

において、がん細胞でない細胞は、がん患者の血液中を循環する正常な白血球である。一態様において、正常な白血球は正常な形質細胞である。

[0150] 一態様においてデータは、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、特発性好酸球増多症、慢性好酸球性白血病、急性非リンパ性白血病、骨髓増殖性腫瘍、慢性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、大腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、膵臓癌、食道癌、甲状腺癌または頭頸部癌の診断に供するものである。

[0151] <多発性骨髓腫への応用例>

非特許文献8および非特許文献9に記載の通り、多発性骨髓腫（MM）は造血器腫瘍の一種で、形質細胞が腫瘍化する疾患である。MMの大多数の症例において、染色体異常が認められる。3、5、7、9、11、15および19番染色体では、高頻度にトリソミーが報告されている。13、14、16および22番染色体では、モノソミーが高頻度に認められる。このうち、13番染色体のモノソミーおよび13番染色体長腕の欠失（13q欠失）は最も頻度の高い染色体突然変異の例である。これらの染色体突然変異は、新規患者の約50％に認められる。これらのうち85％が全体または検出の対象となる部分において一倍性であり、15％が13q14欠失を含む腕内欠失である。なお、両アレルの欠失はまれである。また、17番染色体短腕の17p13の欠失は、約10％に認められる。これらは、MMの予後不良因子の一つである。別の予後不良因子として、1番染色体長腕の1q21の増幅が挙げられる。未治療のMM患者中の43％に認められたと報告されている。

[0152] 本実施形態において、これらの染色体異常を有する患者に残存する腫瘍の量をモニタリングする。具体的には、治療後の期間において、これらの染色体突然変異を有する形質細胞（がん化した形質細胞）が体内にどの程度残存するかを定期的に測定する。

[0153] 本実施形態では、上記染色体突然変異を有する細胞からなる微小な残存病

変 (Minimal Residual Disease : MRD) を測定する。MRDは、残存病変の中でも特に既存技術では測定しにくい。MRDの測定により深く治療効果を評価できる。係る評価に基づき、医師は治療薬の増量、減量、中止および再開を判断する。

[0154] 実際の検査方法の一例を以下に示す。一例において、患者から採取された骨髓液または血液をサンプルとする。これらの液体中から赤血球を取り除く。赤血球の除去には溶血、遠心分離および水力学的分級チップが用いられる。

[0155] サンプルに所定のプローブプライマーセットおよびPCRプレミックスを混合するとともに、細胞を可溶化する。検出対象のプローブプライマーセットとして、13qの領域内に標的を有するものを選択する。一態様において、コントロールのプローブプライマーセットとして、18番染色体全体のいずれかの箇所に標的を有するものを選択する。

[0156] 13番染色体の13q欠失、すなわち部分的な一倍性を図5および図7に示すようなクラスターのシフトによって検出する。クラスター内のイベントは、蛍光強度の分布を有している。必要な統計的解析を併用することで、サンプルの細胞の集団中に0~100%の範囲で存在する13番染色体の13q欠失の細胞を検出する。一態様において、検出される13番染色体の13q欠失の細胞の存在比は、サンプルの細胞の集団中10、1、0、1、0、05、0、04、0、03、0、02および0、01%のいずれかである。上述の通り、13番染色体の13q欠失の細胞は、がん化した形質細胞であると予想される。他の態様において、13q欠失および13番染色体のモノソミーのいずれも検出できる領域に標的を割り当てる。

[0157] 一態様において、測定に供する前に、形質細胞に特異的な抗原に対する抗体を用いて、循環腫瘍細胞を含めて形質細胞を濃縮する。これにより、骨髓液または血液中に存在するがん化した形質細胞、すなわち腫瘍を形成する形質細胞をさらに高感度で検出する。

[0158] 他の態様において、サンプル中の細胞が17p13の欠失および1q21

の増幅の少なくともいずれかを有するか否かの情報をクラスターのシフトから得る。これらの情報は、MMの予後の予測に役立つ。

[0159] <骨髄異形成症候群および他の造血器腫瘍への応用例>

骨髄異形成症候群（MDS）は、造血器腫瘍の一種である。MDSの少なくとも50%は、造血幹細胞に生じる染色体突然変異（具体的には、染色体の全長に亘る異数性、染色体の部分的な異数性、遺伝子増幅、および遺伝子欠失）により発症する。MDSの染色体突然変異として代表的なのは、5番染色体長腕（5q）の欠失、7番染色体のモノソミーおよび20番染色体長腕（20q）の欠失である。サンプル中に存在する染色体突然変異を備えた細胞を検出することで、MRDを定期的に測定する。

[0160] 5q欠失を伴う疾患は、5q-症候群というMDSの一種として独立に定義されている。欧州および米国の研究によれば、MDSのおよそ10%が5q-症候群である。5q-症候群には、一般名レナリドマイドが有効である。レナリドマイドの治療効果のモニタリングを上記クラスターのシフトで行う。

[0161] 他の態様において、染色体異数性、特に染色体欠失および増幅を伴うその他の造血器腫瘍の検出を上記クラスターのシフトで行う。

[0162] <遺伝子突然変異の検出>

一態様において、CNVを検出することで、遺伝子突然変異を有するシングルセルの存在を検出する。遺伝子突然変異は、塩基置換、塩基挿入および塩基欠失の少なくともいずれかである。

[0163] 一態様において、上述の反応区画（反応ドロップレット）のそれぞれに割り当てられるシングルセルのいずれかは、少なくとも標的のゲノム上の位置において、検出対象となる遺伝子突然変異を有しない内部標準である。このような反応ドロップレットのアンプリコン量とは異なるアンプリコン量を有するに至った反応ドロップレットのクラスターは、遺伝子突然変異のないクラスターの位置からシフトする。これらを突然変異性ドロップレットとして検出する。

- [0164] 他の態様において、別ウェルまたは別時に外部標準の蛍光強度を予め測定しておく。かかる蛍光強度の情報と、各クラスターの中心の蛍光強度の情報を比較する。係る比較に基づき、各クラスターの遺伝子突然変異のコピー数を測定する。細胞の集団が遺伝子突然変異を起こした細胞で占められており、野生型遺伝子だけを有する細胞を内部標準として用いることのできない場合でも、遺伝子突然変異のコピー数を測定できる。
- [0165] 一態様において、遺伝子突然変異は、レンチウイルスベクターやその他のベクターによってゲノム上の不特定の領域に導入されたものである。ベクターにより生じた遺伝子突然変異を有する細胞の例は、CAR-T細胞 (Chimeric antigen receptor T cell)、TCR-T細胞である。本実施形態における検出では、標的は、ベクターにより導入されたDNAであってもよい。たとえば、ベクターにより導入されたDNAのコピー数を検出してもよい。
- [0166] <試験例 8. ヒト検体におけるコピー数の検出>
- 健常者の末梢血を溶血し、PCRのプレミックスに添加してPCR反応液を調製した。上記PCR反応液をQX200 Droplet Generator (BioRad社) を用いてドロップレット化し、さらに各ドロップレット内において細胞を溶解させた。その後、各ドロップレット内において一般的な条件でPCRを行った。PCRのサイクル数は23とした。PCRの反応は、指数関数的増幅期にあった。
- [0167] 本試験例では、13番染色体に第1の蛍光波長の蛍光物質 (FAM) を有するプローブを23種類割り当てた。また、18番染色体に第2の蛍光波長の蛍光物質 (HEX) を有するプローブを25種類割り当てた。これらのプローブは、1つのドロップレット中で互いに混合されていた。
- [0168] 図25は、ヒト血液に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。中央にあるクラスターは、1個の細胞を含むドロップレットに対応する測定結果である。その右上にあるクラスターは、2個の細胞を含むドロップレットに対応する測定結果である。このように、クラスターが明確に区別できることから、ヒトの血液を検体とした場合も核酸のコピー数を

検出できることが示唆された。

- [0169] 次に、健常者の末梢血を溶血し、さらにEasySep Human CD45 Depletion Kit II (STEMCELL Technologies) を用いてCD45陽性細胞を分離した。得られたCD45細胞をPCRのプレミックスに添加してPCR反応液を調製した。上記PCR反応液をQX200 Droplet Generator (BioRad社) を用いてドロップレット化し、さらに各ドロップレット内において細胞を溶解させた。その後、各ドロップレット内において一般的な条件でPCRを行った。PCRのサイクル数は23とした。PCRの反応は、指数関数的増幅期にあった。
- [0170] 本試験例でも、13番染色体に第1の蛍光波長の蛍光物質 (FAM) を有するプローブを23種類割り当てた。また、18番染色体に第2の蛍光波長の蛍光物質 (HEX) を有するプローブを25種類割り当てた。これらのプローブは、1つのドロップレット中で互いに混合されていた。
- [0171] 図26は、ヒト血液由来のCD45細胞に対してシングルセルドロップレットPCRを行った結果を示す。中央にあるクラスターは、1個の細胞を含むドロップレットに対応する測定結果である。その右上にあるクラスターは、2個の細胞を含むドロップレットに対応する測定結果である。このように、クラスターが明確に区別できることから、特定の抗原を標的として濃縮した細胞を用いた場合も核酸のコピー数を検出できることが示唆された。
- [0172] 次に、上記CD45陽性細胞と、ヒト培養細胞GM13721株の細胞とを所定の割合で混合した細胞集団をPCRのプレミックスに添加してPCR反応液を調製した。上記PCR反応液をQX200 Droplet Generator (BioRad社) を用いてドロップレット化し、さらに各ドロップレット内において細胞を溶解させた。その後、各ドロップレット内において一般的な条件でPCRを行った。PCRのサイクル数は23とした。PCRの反応は、指数関数的増幅期にあった。CD45陽性細胞では、13番染色体および18番染色体が正倍数性、すなわち二倍性 (Diploidy) である。ヒト培養細胞GM13721株では、13番染色体の片方の長腕の一部領域については一倍性 (Monoploidy) であり、18番染色体が正倍数性である。

[0173] 本試験例でも、13番染色体の上記欠損領域に第1の蛍光波長の蛍光物質（FAM）を有するプローブを23種類割り当てた。また、18番染色体に第2の蛍光波長の蛍光物質（HEX）を有するプローブを25種類割り当てた。これらのプローブは、1つのドロップレット中で互いに混合されていた。

[0174] 図27は、ホモの細胞集団のドロップレットのスクATTERを示す。図27の上段では、CD45陽性細胞に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。図27の下段では、ヒト培養細胞GM13721株に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。

[0175] 図28は、ヘテロの細胞集団のドロップレットのスクATTERを示す。図28の上段では、CD45陽性細胞とヒト培養細胞GM13721株との混合比が75/25である細胞集団に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。図28の下段では、CD45陽性細胞とヒト培養細胞GM13721株との混合比が95/5である細胞集団に対してシングルセルードロップレットPCRを行った結果を示す。

[0176] これらの結果から、CD45陽性細胞とヒト培養細胞GM13721株とが明確に区別されていることがわかる。このことから、ヒトの血液由来の細胞集団からも、コピー数が異常な細胞を検出できることが示唆された。

[0177] <試験例9. ヒト検体を用いた場合の検出感度の評価>

上記試験例8と同様の手順で、CD45陽性細胞と、ヒト培養細胞GM13721株の細胞とを所定の割合で混合した細胞集団を準備した。細胞集団中のGM13721株の細胞の割合は、0%、0.1%または3%とした。各細胞集団をPCRのプレミックスに添加してPCR反応液を調製した。上記PCR反応液をQX200 Droplet Generator（BioRad社）を用いてドロップレット化し、さらに各ドロップレット内において細胞を溶解させた。その後、各ドロップレット内において一般的な条件でPCRを行った。PCRのサイクル数は23とした。PCRの反応は、指数関数的増幅期にあった。CD45陽性細胞では、13番染色体および18番染色体が正倍数性、すなわち二

倍性 (Diploidy) である。ヒト培養細胞 GM13721 株では、13 番染色体の片方の長腕の一部領域については一倍性 (Monoploidy) であり、18 番染色体が正倍数性である。

[0178] 本試験例でも、13 番染色体の上記欠損領域に第 1 の蛍光波長の蛍光物質 (FAM) を有するプローブを 23 種類割り当てた。また、18 番染色体に第 2 の蛍光波長の蛍光物質 (HEX) を有するプローブを 25 種類割り当てた。これらのプローブは、1 つのドロップレット中で互いに混合されていた。

[0179] 図 29 は、各細胞集団のドロップレットのスクアッターを示す。図 29 の上段では、GM13721 株の細胞の割合が 0 % の細胞集団に対してシングルセルードロップレット PCR を行った結果を示す。図 29 の中段では、GM13721 株の細胞の割合が 0.1 % の細胞集団に対してシングルセルードロップレット PCR を行った結果を示す。図 29 の下段では、GM13721 株の細胞の割合が 3 % の細胞集団に対してシングルセルードロップレット PCR を行った結果を示す。

[0180] 本試験例では、第 1 の蛍光波長 (FAM) の蛍光強度が 5000 以上、または第 2 の蛍光波長 (HEX) の蛍光強度が 9000 以上のドットを、評価対象の陽性ドロップレットとした。また、試験例 7 と同様の手順で求めたカットオフ ($y = 0.84806x - 1044$) を用いて、陽性ドロップレットに対する異常ドロップレット (13 番染色体が一倍性と思われるドロップレット) の割合を算出した。

[0181] 図 30 は、各細胞集団についての異常ドロップレットの検出結果を示す箱ひげ図である。アスタリスクは、 $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis 検定による結果が有意であったことを確認した後の、コントロール (0 %) とそれぞれ比較した Steel 検定の結果) であることを示している。このグラフから、GM13721 株の細胞の割合が 3 % または 0.1 % の細胞集団の検出結果は、GM13721 株の細胞の割合が 0 % の細胞集団の検出結果とは有意に異なることがわかる。したがって、少なくとも 0.1 % までは検出できているこ

とがわかる。

[0182] <試験例 10. RNA の逆転写産物におけるコピー数の検出>

試料 DNA として、シングルセル内の RNA の逆転写産物を用いて、B2M 遺伝子の mRNA のコピー数および GAPDH 遺伝子の mRNA のコピー数を検出した。

[0183] 本試験例では、ヒト培養細胞 GM22948 株に対してシングルセルードロップレット RT-PCR を行った。プレミックスは、B2M 遺伝子に対するプライマー、GAPDH 遺伝子に対するプライマー、B2M 遺伝子に対するプローブ (FAM 標識)、GAPDH 遺伝子に対するプローブ (HEX 標識)、逆転写酵素 (SuperScriptIV) などを含む。ゲノム DNA 中の遺伝子ではなく、当該遺伝子の mRNA を PCR で増幅するために、両遺伝子のプライマーは、イントロンを挟むように設計した。

[0184] 具体的には、10000 個の細胞 (GM22948 株) および PBS を含む細胞懸濁液 2 μ L を、ドデシル硫酸ナトリウムを含む PCR のプレミックスに添加して PCR 反応液を調製した。PCR 反応液中のプライマーやプローブなどの濃度は以下のとおりである。

- ・ 1 X SuperScriptIV (Thermo Fisher Scientific 社)
- ・ 1 X ddPCR Multiplex Super Mix (BioRad 社)
- ・ 200 nM B2M-FAM プローブ
- ・ 400 nM B2M プライマー
- ・ 200 nM GAPDH-HEX プローブ
- ・ 400 nM GAPDH プライマー
- ・ 蒸留水 (メスアップ用)

[0185] 上記 PCR 反応液を QX200 Droplet Generator (BioRad 社) を用いてドロップレット化し、さらに各ドロップレット内において細胞を溶解させ、50℃ で 10 分間静置して逆転写を行い、95℃ で 10 分間 DNA を変性させた後、一般的な条件で PCR を行った。PCR のサイクル数は 23 とした。PCR の反応は、指数関数的増幅期にあった。

[0186] 図31は、ヒト培養細胞GM22948株に対してシングルセルドロップレットRT-PCRを行った結果を示す。この結果から、試料DNAとしてRNAの逆転写産物を用いても、RNAのコピー数を検出できることがわかる。

[0187] なお、プレミックスが逆転写酵素を含まない場合は、陽性ドロップレットは検出されなかった。すなわち、上記のとおり、イントロンを挟むようにプライマーを設計したため、ゲノムDNA中の両遺伝子はほとんど増幅されなかった。

[0188] <試験例11. ミトコンドリアDNAのコピー数の検出>

試料DNAとして、ミトコンドリアDNAを用いて、ND1遺伝子のコピー数を検出した。

[0189] 本試験例では、ヒト培養細胞GM22948株に対してシングルセルドロップレットPCRを行った。各ドロップレットには、シングルセル内のミトコンドリアDNAだけでなくゲノムDNAも含まれる。プレミックスは、13番染色体に対するプライマー（23種類）、ミトコンドリアDNAのND1遺伝子に対するプライマー、13番染色体に対するプローブ（23種類、FAM標識）、ND1遺伝子に対するプローブ（HEX標識）などを含む。

[0190] 具体的には、10000個の細胞（GM22948株）およびPBSを含む細胞懸濁液2 μ Lを、ドデシル硫酸ナトリウムを含むPCRのプレミックスに添加してPCR反応液を調製した。PCR反応液中のプライマーやプローブなどの濃度は以下のとおりである。

- ・ 1X ddPCR Multiplex Super Mix (BioRad社)
- ・ 25 nM 13番染色体-FAMプローブ
- ・ 1 μ M 13番染色体プライマー
- ・ 500 nM ND1-HEXプローブ
- ・ 1 μ M ND1プライマー
- ・ 蒸留水（メスアップ用）

[0191] 上記PCR反応液をQX200 Droplet Generator (BioRad社) を用いてドロップレット化し、さらに各ドロップレット内において細胞を溶解させ、95℃で10分間DNAを変性させた後、一般的な条件でPCRを行った。PCRのサイクル数は23とした。PCRの反応は、指数関数的増幅期にあった。

[0192] 図32は、ヒト培養細胞GM22948株に対してシングルセルドロップレットPCRを行った結果を示す。中央やや右にあるクラスターは、1個の細胞（約1X個のミトコンドリアDNAを含む）を含むドロップレットに対応する測定結果である。その右上にあるクラスターは、2個の細胞（約2X個のミトコンドリアDNAを含む）を含むドロップレットに対応する測定結果である。このように、ミトコンドリアDNAのコピー数が増大すると、クラスターが右にずれていた。この結果から、試料DNAとしてミトコンドリアDNAを用いても、ミトコンドリアDNA中の遺伝子のコピー数を検出できることがわかる。

[0193] <ミトコンドリアDNAのコントロールとしての利用>

標的の割り当てられた領域のCNVを検出するために、CNVが乏しく正倍数性であると考えられる領域にコントロールを割り当てる。染色体異常が頻発している細胞、例えばがん細胞ではコントロールとして適当な染色体を見出せない可能性がある。このような場合、ミトコンドリアDNAをコントロールとしてもよい。すなわち、いずれかの蛍光波長を選択し、選択された蛍光波長の蛍光物質を有するプローブをミトコンドリアDNAに割り当てる。

[0194] たとえば、試料DNAは、シングルセル内のゲノムDNA一式、およびシングルセル内のミトコンドリアDNAを含む。PCR反応系は、ゲノムDNA上の領域に割り当てられた第1の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブと、ミトコンドリアDNA上に割り当てられた第2の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブとを含む。領域は、一または複数の標的を含む。反応区画内に、ゲノムDNA一式に含まれる標的、およびミトコンドリアDNAに含まれる標的をPCRで増幅する。ミトコンドリアDNAに含まれる標的の増幅

がプラトーとなり、ゲノムDNAに含まれる標的の増幅が指数関数的増幅期となるサイクルにおいて、反応区画ごとにゲノムDNAおよびミトコンドリアDNAのアンプリコンを定量する。このとき、一つの反応区画から第1および第2の蛍光波長の蛍光を検出することで、ゲノムDNAに含まれる標的およびミトコンドリアDNAに含まれる標的が増幅した反応区画を、混入したセルフリーの核酸のみが増幅した反応区画と区別することができる。

[0195] ドロップレットPCRに際して、ミトコンドリアDNAをテンプレートとする増幅は早期に進行する。したがって、プライマーまたはプローブが早期に枯渇する。ミトコンドリアDNAの細胞当たりのコピー数は、ゲノムDNAの細胞当たりのコピー数に比べて大きいからである。したがって、ミトコンドリアDNAについてプラトーに達するサイクル数でPCRを停止する。ただし、係るサイクル数において、染色体のゲノムDNAをテンプレートとする増幅は、指数関数的増幅期にある。

[0196] たとえば、図4～図7において、第2の蛍光波長（2nd color）のプローブをCNVの大きな染色体上に割り当てた場合、第2の蛍光波長の強度に関してクラスターが収束しにくい。あるいは、第2の蛍光波長の強度に関してクラスターが正倍数性相当の強度に収束しない。

[0197] たとえば、図4～図7において、第2の蛍光波長をミトコンドリアDNAに割り当てた場合、第2の蛍光波長のPCRにおいて蛍光強度はプラトーに達する。したがって、第2の蛍光波長の強度に関してクラスターがプラトーの強度に収束する。

[0198] 本出願は、2020年12月25日出願の特願2020-216149に基づく優先権を主張する。当該出願明細書および図面に記載された内容は、すべて本願明細書に援用される。

産業上の利用可能性

[0199] 本発明の検出方法は、例えば出生前診断やがん診断などに有用である。

符号の説明

[0200] 17 細胞の集団

- 19 オイル
- 20 ドロップレット
- 21 ゲノムDNA一式
- 22 a、22 b ドロップレット
- 31 プレミックス
- 33 a、33 b ドロップレット
- 35 a、35 b プローブ
- 39 クラスター
- 40 a、40 b、40 c クラスター
- 41 a、41 b、41 c クラスター
- 44 a、44 b クラスター

請求の範囲

- [請求項1] 細胞の集団中のシングルセルごとの特定の核酸のコピー数を検出する方法であって、
- シングルセル内の核酸に由来する試料DNAとPCR反応系とを含む反応区画内にて前記試料DNAに含まれる標的をPCRで増幅する工程と、
- 指数関数的増幅期において前記反応区画ごとに前記PCRのアンプリコンを定量する工程と、
- を含む、検出方法。
- [請求項2] 前記試料DNAは、シングルセル内のゲノムDNA一式、シングルセル内のRNAの逆転写産物、またはシングルセル内のミトコンドリアDNAである、請求項1に記載の検出方法。
- [請求項3] 蛍光プローブ法で前記アンプリコンを定量する、請求項1または請求項2に記載の検出方法。
- [請求項4] 前記PCR反応系は、前記試料DNA上の相異なる領域ごとに割り当てられた、相異なる蛍光波長の蛍光物質をそれぞれ有する複数のプローブを含み、
- 前記領域は、一または複数の前記標的を含み、
- 前記アンプリコンを定量する工程では、一つの前記反応区画から複数の波長の蛍光を検出することで、前記試料DNAに含まれる前記標的が増幅した前記反応区画を、混入したセelfリーの核酸のみが増幅した反応区画と区別する、
- 請求項3に記載の検出方法。
- [請求項5] 前記領域は、互いに同一の蛍光波長の蛍光物質を有する複数のプローブがそれぞれ割り当てられた複数の標的を含み、
- 前記アンプリコンを定量する工程では、前記領域ごとに、前記複数のプローブからの蛍光をそれらの標的の違いに関わらず一まとめに測定することで、前記アンプリコンを定量する、

請求項3または請求項4に記載の検出方法。

[請求項6]

前記試料DNAは、前記シングルセル内のゲノムDNA一式、および前記シングルセル内のミトコンドリアDNAを含み、

前記PCR反応系は、ゲノムDNA上の領域に割り当てられた第1の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブと、ミトコンドリアDNA上に割り当てられた第2の蛍光波長の蛍光物質を有するプローブとを含み、

前記領域は、一または複数の前記標的を含み、

前記試料DNAに含まれる標的をPCRで増幅する工程では、前記反応区画内にて、前記ゲノムDNA一式に含まれる標的、および前記ミトコンドリアDNAに含まれる標的をPCRで増幅し、

前記アンプリコンを定量する工程では、前記ミトコンドリアDNAに含まれる標的の増幅がプラトーとなり、前記ゲノムDNAに含まれる標的の増幅が前記指数関数的増幅期となるサイクルにおいて、前記反応区画ごとに前記ゲノムDNAおよび前記ミトコンドリアDNAのアンプリコンを定量し、

前記アンプリコンを定量する工程では、一つの前記反応区画から前記第1および前記第2の蛍光波長の蛍光を検出することで、前記ゲノムDNAに含まれる標的および前記ミトコンドリアDNAに含まれる標的が増幅した前記反応区画を、混入したセelfリーの核酸のみが増幅した反応区画と区別する、

請求項3に記載の検出方法。

[請求項7]

シングルセルと、細胞溶解試薬と、PCRのプレミックスとを含む区画内で前記シングルセルを溶解することで、前記反応区画を生成する工程をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項8]

シングルセルを含む区画内で前記シングルセルを溶解する工程と、溶解した前記シングルセルを含む区画と、PCRのプレミックスを

含む区画とを統合することで、前記反応区画を生成する工程と、
をさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項9] 細胞核の集団と、PCRのプレミックスとをバルクで混合する工程と、

前記細胞核の集団中の個々の細胞核を前記プレミックスとともに個別化することで前記反応区画を生成する工程と、

をさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項10] 前記反応区画は、前記試料DNAと前記PCR反応系とを含有するドロップレットである反応ドロップレットである、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項11] 前記試料DNAは、前記シングルセル内のゲノムDNA一式を含み、

前記検出方法は、前記アンプリコンの定量結果から、染色体の全長に亘る異数性、染色体の部分的な異数性、遺伝子増幅、および遺伝子欠失からなる群から選択される少なくとも一つの染色体突然変異を有するシングルセルの存在を検出する工程をさらに有する、

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項12] 前記染色体突然変異を有するシングルセルは、少なくとも以下のいずれかの染色体突然変異を有するゲノムDNAを含む、請求項 11 に記載の検出方法。

- 21 番染色体の異数性
- 18 番染色体の異数性
- 13 番染色体の異数性
- Y 染色体の異数性
- X 染色体の異数性
- 22 番染色体長腕 22q11.2 領域の欠失
- 5 番染色体短腕 5q 領域の欠失
- 15 番染色体長腕 15q11-q13 領域の欠失

- 1 番染色体長腕の増幅
- 1 7 番染色体短腕の欠失
- 1 3 番染色体長腕の欠失
- 4 番染色体長腕の欠失
- 5 番染色体長腕の欠失
- 7 番染色体長腕の欠失
- 8 番染色体の増幅
- 1 1 番染色体の欠失
- 1 2 番染色体の異数性
- 2 0 番染色体長腕の欠失
- 1 9 番染色体長腕の欠失
- 1 番染色体の欠失
- 1 8 番染色体長腕の欠失
- 8 番染色体短腕の欠失
- 4 番染色体の欠失
- 8 番染色体長腕の増幅
- 1 6 番染色体長腕の欠失
- 5 番染色体短腕の増幅
- 3 番染色体長腕の増幅
- 3 番染色体短腕の欠失
- 9 番染色体短腕の欠失
- M Y C N 遺伝子の遺伝子増幅
- H E R 2 遺伝子の遺伝子増幅
- M E T 遺伝子の遺伝子増幅

[請求項13] 前記染色体突然変異を有するシングルセルを検出したか否かの情報を含むデータを生成する工程をさらに含み、

前記細胞の集団は、胎児細胞を含むように羊水または母体血から分離されたものであり、

前記データは、１３トリソミー、１８トリソミー、２１トリソミー、ターナー症候群、トリプルＸ症候群、ＸＹＹ症候群、クラインフェルター症候群、ディ・ジョージ症候群、アンジェルマン症候群、プラダー・ウィリー症候群、またはねこ啼き症候群の診断に供するものである、

請求項１１に記載の検出方法。

[請求項14]

前記染色体突然変異を有するシングルセルを検出したか否かの情報を含むデータを生成する工程をさらに含み、

前記細胞の集団は、患者から分離されたものであり、

前記データは、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、特発性好酸球増多症、慢性好酸球性白血病、急性非リンパ性白血病、骨髓増殖性腫瘍、慢性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、大腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、膵臓癌、食道癌、甲状腺癌または頭頸部癌の診断に供するものである、

請求項１１に記載の検出方法。