

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-507134

(P2014-507134A)

(43) 公表日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 6 3
G O 6 F 19/18 (2011.01)	G O 6 F 19/18	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/533 (2006.01)	G O 1 N 33/533	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2013-547929 (P2013-547929)
 (86) (22) 出願日 平成24年1月5日 (2012.1.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年8月23日 (2013.8.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/000015
 (87) 国際公開番号 W02012/093331
 (87) 国際公開日 平成24年7月12日 (2012.7.12)
 (31) 優先権主張番号 61/430,032
 (32) 優先日 平成23年1月5日 (2011.1.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/475,632
 (32) 優先日 平成23年4月14日 (2011.4.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505214331
 ザ・チャイニーズ・ユニバーシティー・オブ・ホンコン
 THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG
 中華人民共和国、香港、ニュー・テリトリー、シャティン
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胎児の性染色体遺伝子型の非侵襲的出生前同定

(57) 【要約】

母体試料を分析し、妊婦の男児胎児が母親からのX連鎖変異を受け継いでいるか否かを判定するための方法、装置、およびシステムが提供される。試料中の胎児DNAパーセンテージが取得され、2つの可能性(胎児が変異または正常対立遺伝子を受け継いでいる)に対するカットオフ値が求められる。次に、X染色体上の正常対立遺伝子に対する変異対立遺伝子の比率が、カットオフ値と比較され、どちらの対立遺伝子を受け継がれているかの分類が行われる。あるいは、X染色体上の標的領域由来の対立遺伝子の数が、X染色体上の参照領域由来の対立遺伝子の数と比較され、欠失または拡大変異が特定される。胎児DNAパーセンテージは、胎児特異的対立遺伝子との反応を数え、反応における統計分布に対応するようにその数を補正することにより計算できる。

【選択図】 図1

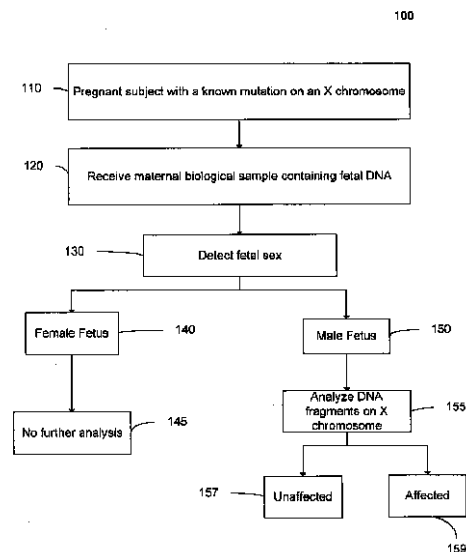


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

X染色体上の座位で、変異および正常対立遺伝子に対しヘテロ接合である妊婦の男児胎児がX連鎖変異を有するか否かを判定する方法であって、複数の反応それぞれが生物学的試料由来の1つまたは複数の核酸分子を含み、その生物学的試料が妊婦由来および男児胎児由来の核酸分子を含み、データが：

その座位の変異対立遺伝子の第1の量を示す第1の定量的データセット；およびその座位の正常対立遺伝子の第2の量を示す第2の定量的データセット、

を含む複数の反応からのデータの入手；

第1と第2の量の間の相対量を表すパラメータの、第1の量および第2の量からの決定；
生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージPfの取得；

胎児がその座位で変異対立遺伝子を受け継いでいるか否かの判定用の第1のカットオフ値が少なくとも第1の比率： $k / (1 + k - Pf)$ (k は、妊婦の変異染色体上の変異対立遺伝子の数、 k は1以上の整数)から算出される計算；

胎児がその座位で正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かの判定用の第2のカットオフ値が少なくとも第2の比率： $[k(1 - Pf)] / [1 + k - kPf]$ から算出される計算；および

胎児が変異対立遺伝子または正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かの分類を決定するための、パラメータの第1および第2のカットオフ値の内の少なくとも1つとの比較、を含む方法。

【請求項 2】

パラメータが第1および第2のカットオフ値と比較される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

分類が、疾患状態、非疾患状態、および分類不能を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

パーセンテージPfの取得が、実験的に得た生物学的試料中の胎児核酸分子パーセンテージの、複数の反応に対し予想される統計的分子分布による補正を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

パーセンテージPfの取得が、妊婦がホモ接合で、胎児がヘテロ接合または半接合である座位で母親および胎児で共有される第1の対立遺伝子の、反応における検出；

式 $[-\ln((N - P1) / N)] * N$ によるポアソン補正された濃度Pxの計算 (N は、分析された反応の合計数、 $P1$ は、第1の対立遺伝子に対する陽性の反応の数、および \ln は、自然対数)；

反応における胎児特異的な第2の対立遺伝子の検出；さらに

式 $[-\ln((N - P2) / N)] * N$ によるポアソン補正された濃度Pyの計算 (N は、分析された反応の合計数、および $P2$ は、第2の対立遺伝子に対し陽性の反応の数)、を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

第2の対立遺伝子が染色体Y上にある、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

第1の対立遺伝子が染色体X上にある、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

胎児特異的対立遺伝子が、常染色体上の父性系遺伝性対立遺伝子である、請求項5に記載の方法。

【請求項 9】

胎児特異的対立遺伝子が、胎児に特異的なメチル化マーカーを含む、請求項5に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

Pf の $[(2Py) / (Px + Py)] * 100\%$ としての計算をさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

第 1 および第 2 のカットオフ値が、逐次確率比検定 (SPRT) を使って決定され、胎児が変異または正常核酸配列を受け継いでいるか否かが判定される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

変異核酸配列に連鎖した多形部位の対立遺伝子が、変異核酸配列と同じ母体ハプロタイプ上に位置する対立遺伝子であり、多形部位と変異核酸配列との間の組換えの確率が 1% 未満である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 13】

正常な核酸配列に連鎖した多形部位の対立遺伝子が、正常な核酸配列と同じ母体ハプロタイプ上に位置する対立遺伝子であり、多形部位と変異核酸配列の間の組換えの確率が 1% 未満である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

反応が、下記の内のいずれか 1 つまたは複数を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法：

シーケンシング反応、光学的分析、および蛍光プローブを使ったハイブリダイゼーション、またはナノポアシーケンシング。

20

【請求項 15】

反応が増幅反応である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

反応が、ポリメラーゼ連鎖反応を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

平均濃度が、反応当たり 1 テンプレート分子未満であり、ポアソン分布が、生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージ Pf の決定に使われる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 18】

生物学的試料が、妊婦由来の血漿、血清、または全血である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 19】

妊婦の男児胎児が X 連鎖変異であるか否かを判定する方法であって、複数の反応のそれぞれが生物学的試料由来の 1 つまたは複数の核酸分子を含み、生物学的試料が妊婦由来および男児胎児由来の核酸分子を含み、

X 染色体上の座位で対立遺伝子に対しホモ接合である妊婦が、変異 X 染色体上の対立遺伝子の拡大変異を有し、変異体 X 染色体がその座位の対立遺伝子の正常なコピーおよび 1 つまたは複数の対立遺伝子の追加のコピーを有し、さらに、その座位の対立遺伝子の正常なコピーの正常な X 染色体を有し、
データが、

1 つまたは複数の追加の対立遺伝子のコピーにより生成された第 1 の量の追加の接合部を示す第 1 の定量的データセット；および
両 X 染色体上の対立遺伝子の正常なコピーにより生成された正常な接合部の第 2 の量を示す第 2 の定量的データセット、

40

を含む、複数の反応からのデータの入手；

第 1 の量および第 2 の量から、第 1 と第 2 の量の間の相対量を表すパラメータの決定；
生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージ Pf の取得；

少なくとも第 1 の比率： $n / (n + 1 - Pf)$ から算出される、胎児が変異 X 染色体を受け継いでいるか否かを判定のための第 1 のカットオフ値の計算 (n は、対立遺伝子の追加のコピー数、 n は、1 以上の整数)；

少なくとも第 2 の比率： $[n(1 - Pf) / [n + 2 - Pf(n + 1)]]$ から算出される

50

、胎児が正常な X 染色体と受け継いでいるか否かの判定のための第 2 のカットオフ値の計算；さらに

胎児が変異体 X 染色体または正常な X 染色体を受け継いでいるか否かの分類を決定するための、パラメータの第 1 および第 2 のカットオフ値の内の少なくとも 1 つとの比較、を含む方法。

【請求項 20】

X 染色体上の標的領域で変異および正常対立遺伝子に対しヘテロ接合であり、その変異が、標的領域の欠失または拡大である妊婦の男児胎児が X 連鎖変異を有するか否かを判定する方法であって、

複数の反応のそれぞれが生物学的試料由来の 1 つまたは複数の核酸分子を含み、生物学的試料が妊婦由来および男児胎児由来の核酸分子を含み、

データが、

標的領域由来の核酸分子の第 1 の量を示す第 1 の定量的データセット；および X 染色体上の参照領域由来の核酸分子の第 2 の量を示す第 2 の定量的データセット、

を含む複数の反応からのデータの入手；

第 1 と第 2 の量の間の相対量を表すパラメータの、第 1 の量および第 2 の量からの決定；生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージ P f の取得；

胎児が変異を受け継いでいるか否かを判定するための、パーセンテージ P f に依存する第 1 のカットオフ値の計算；

胎児が正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かの判定のための、パーセンテージ P f に依存する第 2 のカットオフ値の計算；および

胎児が変異または正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かの分類を決定するための、パラメータの第 1 および第 2 のカットオフ値の内の少なくとも 1 つとの比較、を含む方法。

【請求項 21】

変異が拡大であり、

第 1 のカットオフ値が、同じ拡大変異を有する非妊婦の第 2 の量に対する第 1 の量の比率と比べて、対応する比率が増加するという仮定に基づいて決定され、また、

第 2 のカットオフ値が、同じ拡大変異を有する非妊婦の第 2 の量に対する第 1 の量の比率と比べて、対応する比率が減少するという仮定に基づいて決定される、

請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

変異が欠失であり、

第 2 のカットオフ値が、同じ欠失変異を有する非妊婦の第 2 の量に対する第 1 の量の比率と比べて、対応する比率が増加するという仮定に基づいて決定され、また、

第 1 のカットオフ値が、同じ欠失変異を有する非妊婦の第 2 の量に対する第 1 の量の比率と比べて、対応する比率が減少するという仮定に基づいて決定される、

請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

変異が欠失であり、

第 2 のカットオフ値が少なくとも第 1 の比率： $1 / (2 - P f)$ から算出され、

第 1 のカットオフ値が少なくとも第 2 の比率： $(1 - P f) / (2 - P f)$ から算出される、

請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

変異が重複であり、

第 2 のカットオフ値が少なくとも第 1 の比率： $(3 - P f) / (2 - P f)$ から算出され、

第 1 のカットオフ値が少なくとも第 2 の比率： $(3 - 2 P f) / (2 - P f)$ から算出さ

10

20

30

40

50

れる、

請求項 20 に記載の方法。

【請求項 25】

パーセンテージ P f の取得が、複数の反応における予測統計的分子分布を使った生物学的試料中の胎児核酸分子の実験パーセンテージの補正を含む、請求項 20 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

胎児を有する妊婦由来の生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージ P f を取得する方法であって、

複数の反応それぞれが生物学的試料由来の複数の核酸分子を含み、生物学的試料が妊婦由来および胎児由来の核酸分子を含む複数の反応からのデータの入手；

妊婦がホモ接合で、胎児がヘテロ接合または半接合である座位で母親および胎児により共有される第 1 の対立遺伝子の、反応における検出；

第 1 の対立遺伝子に対する陽性の反応の数に基づいて、複数の反応における第 1 の対立遺伝子の予測統計分布により補正される、第 1 の対立遺伝子の補正濃度 P x の計算；

胎児に特異的である第 2 の対立遺伝子の、反応における検出；

第 2 の対立遺伝子に対する陽性の反応の数に基づいて、複数の反応における第 2 の対立遺伝子の予測統計分布により補正される、第 2 の対立遺伝子の補正濃度 P y の計算；さらに

$[(2 P y) / (P x + P y)]$ を使った P f の計算；

を含む方法。

【請求項 27】

P f が $[(2 P y) / (P x + P y)] * 100\%$ に等しい、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

統計分布がポアソン分布であり、

ポアソン補正される濃度 P x が、式 $[- \ln((N - P 1) / N)] * N$ (N は、分析する反応の合計数、P 1 は、第 1 の対立遺伝子に対する陽性のウエルの数、および \ln は、自然対数) を使用し、また、

ポアソン補正される濃度 P y が、式 $[- \ln((N - P 2) / N)] * N$ (N は、分析する反応の合計数、P 2 は、第 2 の対立遺伝子に対する陽性のウエルの数) を使用する、

請求項 26 および 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

データが、

変異核酸配列に連鎖した多形部位の変異核酸配列または対立遺伝子の第 1 の量を示す第 1 の定量的データセット；および

正常な核酸配列に連鎖した多形部位の正常な核酸配列または対立遺伝子の第 2 の量を示す第 2 の定量的データセット、

を含み、

2 つのデータセットからパラメータの決定；

胎児が変異核酸配列を受け継いでいるか否かの判定用の、パーセンテージ P f に基づく第 1 のカットオフ値の決定；

胎児が正常な核酸配列を受け継いでいるか否かの判定用の、パーセンテージ P f に基づく第 2 のカットオフ値の決定；

パラメータの、第 1 および第 2 のカットオフ値の内の少なくとも 1 つとの比較；および比較に基づく、胎児が変異または正常な核酸配列を受け継いでいるか否かの分類の決定、

をさらに含む、請求項 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

プロセッサが操作を行うのを制御するための複数の命令を保存する非一時的コンピュータ可読メディアを含み、命令が上記方法のいずれかを含むコンピュータプログラム製品。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

上記方法のいずれかを実行するように構成されている1つまたは複数のプロセッサを含むシステム。

【請求項32】

上記方法のいずれかを実行するように構成されているモジュールを含むシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年1月5日出願のLo et al. (008300US)による「胎児の性染色体遺伝子型の非侵襲的出生前同定 (Noninvasive Prenatal Genotyping Of Fetal Sex Chromosomes)」の名称の米国特許仮出願第61/430,032号;および、2011年4月14日出願のLo et al. (008301US)による「胎児の性染色体遺伝子型の非侵襲的出生前同定 (Noninvasive Prenatal Genotyping Of Fetal Sex Chromosomes)」の名称の米国特許仮出願第61/475,632号の非仮出願であり、これら仮出願特許の優先権を主張する。これらの特許の全内容は、あらゆる目的において、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、2008年7月23日出願のLo et al. (005210US)による「核酸配列不均衡の測定 (Determining a Nucleic Acid Sequence Imbalance)」の名称の、所有者共通の米国特許出願第12/178,116号に関し、この開示は、参照によってその全体が組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

血友病AおよびBは、凝固因子VIII (F8) (Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Nucleic Acids Res., 25:128-132 (1997))および凝固因子IX (F9) (Giannelli F, Green PM, Sommer SS, et al., Nucleic Acids Res., 26:265-268 (1998))を、それぞれ、コードする染色体X上の遺伝子のヘテロ変異が原因である。血友病キャリア妊婦が妊娠毎に、罹患した男の胎児を出産する確率は、25%である。出生前の診断は、血友病家庭の女性の生殖の選択に関する重要な側面である (Lee CA, Chi C, Pavord SR, et al., Haemophilia., 12:301-336 (2006))。さらに、起こりうる胎児および新生児の出血性合併症を最小限にするために、罹患胎児では、遷延分娩、侵襲的モニタリング技術および器械分娩は避けるべきことから、出生前の診断は、分娩および出産の適切な産科管理にも有益である (Lee CA, Chi C, Pavord SR, et al., Haemophilia., 12:301-336 (2006))。従って、血友病の出生前の非侵襲的診断法の開発は、産科医および血友病の家族の両方にとって有益である。

【0004】

現在の出生前の伴性遺伝疾患用診断法は、典型的な例では、侵襲的であり、胎児に危険を及ぼす。母体血漿中の無細胞胎児DNAの発見は、非侵襲的出生前診断への新しい機会を提供した (Lo YMD et al., Lancet., 350:485-487 (1997); Lo YMD, Chiu RWK, Nat Rev Genet., 8:71-77 (2007))。母体血漿中の遺伝性の父系性遺伝形質の検出に基づく多くの有望な臨床的用途が開発されている。例えば、胎児の性別およびRHD状態の非侵襲的検出は、伴性遺伝疾患およびRHD不適合の臨床的管理に有用である (Bustamante-Aragones A et al., Haemophilia., 14:593-598 (2008); Finning K et al., BMJ., 336:816-818 (2008))。軟骨無形成症および地中海貧血症、等の単一遺伝子疾患に関して、

母体血漿中の父系遺伝性変異の存在または非存在の検出は、それぞれ、常染色体優性遺伝病の診断、または胎児常染色体劣性遺伝疾患の排除を可能とするであろう (Saito H et al., Lancet., 356:1170 (2000); Chiu RWK et al., Lancet., 360:998-1000 (2002); Ding C et al., Proc Natl Acad Sci USA., 101:10762-10767 (2004))。

【0005】

この分野の急速な発展にもかかわらず、変異を持つ母親から遺伝した胎児対立遺伝子の検出は困難なまま残されている。この困難さは母体血漿中の胎児と母体DNAの共存に原因があり、母系遺伝性胎児対立遺伝子は、背景にある母体DNAと区別がつかない (Lo YMD, Chiu RWK, Nat Rev Lancet., 8:71-77 (2007))。

10

【0006】

従って、男の胎児にX連鎖変異が遺伝しているかどうか判定する正確で効率的な方法の提供が望まれる。

【発明の概要】

【0007】

母体試料を分析して、妊婦の男児胎児が母親由来の遺伝性X連鎖変異を持つか否かを判定する方法、装置、およびシステムが提供される。その試料中で、あるパーセンテージの胎児DNAが得られ、2つの可能性(胎児が変異、または正常な対立遺伝子を受け継ぐ)に対するカットオフ値が求められる。その後、ある比率の変異対立遺伝子が、X染色体上の正常な対立遺伝子に対してカットオフ値と比較され、どちらの対立遺伝子が遺伝しているかの分類ができる。あるいは、X染色体上の標的領域の対立遺伝子の数が、X染色体上の参照領域の対立遺伝子の数と比較され、欠失または拡大を特定することができる。胎児DNAのパーセンテージは、胎児特異的対立遺伝子との反応を数え、反応中の統計分布に対応するようにその数を補正することにより、計算できる。

20

【0008】

一実施形態では、妊婦の男児胎児がX連鎖変異を有するか否かを判定する方法が提供される。妊婦は、X染色体上の座位で、変異および正常対立遺伝子のヘテロ接合である。データは、それぞれ、生物学的試料由来の1つまたは複数の核酸分子を含む複数の反応から採取される。生物学的試料には、妊婦由来、および男児胎児由来の核酸分子が含まれる。データは、その座位の変異対立遺伝子の第1の量を示す第1の定量的データセット、およびその座位の正常対立遺伝子の第2の量を示す第2の定量的データセットを含む。パラメータは、第1の量および第2の量から決定され、そのパラメータは、第1と第2の量の間の相対的量を表す。生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージPfが得られる。胎児がその座位で変異対立遺伝子を受け継いでいるか否かを判定するための第1のカットオフ値が計算され、第1のカットオフ値が少なくとも第1の比率、 $k / (1 + k - Pf)$ から算出される(式中、kは妊婦の変異染色体上の変異対立遺伝子の数であり、kは1以上の整数である)。胎児が、その座位で正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かを判定するための第2のカットオフ値が、計算され、第2のカットオフ値は、少なくとも第2の比率、 $[k(1 - Pf)] / [1 + k - kPf]$ から算出される。パラメータは、第1と第2のカットオフ値の内の少なくとも1つと比較され、胎児が変異対立遺伝子、または正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かの分類が行われる。

30

40

【0009】

別の実施形態では、妊婦の男児胎児がX連鎖変異を有するか否かの判定方法が提供される。妊婦は、X染色体上の標的領域で変異および正常対立遺伝子のヘテロ接合である。変異は、標的領域の欠失または拡大である。複数の反応由来のデータが採取される。各反応は、生物学的試料由来の1つまたは複数の核酸分子を含む。生物学的試料は、妊婦由来および男児胎児由来の核酸分子を含む。データは、X染色体上の標的領域由来の核酸分子の第1の量を示す第1の定量的データセット、および参照領域由来の核酸分子の第2の量を

50

示す第2の定量的データセットを含む。パラメータは、第1の量および第2の量から決定され、このパラメータは、第1と第2の量の間の相対量を表す。生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージPfが得られる。胎児が変異を受け継いでいるか否かを判定するための第1のカットオフ値が計算される。第1のカットオフ値は、パーセンテージPfに依存する。胎児が正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かを判定するための第2のカットオフ値が計算される。第2のカットオフ値は、パーセンテージPfに依存する。パラメータは、第1と第2のカットオフ値の内の少なくとも1つと比較され、胎児が変異または正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かの分類が決定される。

【0010】

別の実施形態では、胎児を有する妊婦由来の生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージPfを得る方法が提供される。データは、複数の反応から採取される。各反応は、妊婦由来および胎児由来の核酸分子を含む生物学的試料由来の複数の核酸分子を含む。第1の対立遺伝子は、反応で検出される。第1の対立遺伝子は、妊婦がホモ接合で、胎児がヘテロ接合または半接合である座位で母親および胎児により共有される。第1の対立遺伝子の補正濃度Pxは、第1の対立遺伝子に対し陽性の反応に基づいて計算され、Pxは、複数の反応の第1の対立遺伝子の予想される統計分布で補正される。第2の対立遺伝子が反応で検出されるが、この場合、第2の対立遺伝子は胎児に特異的である。第2の対立遺伝子の補正濃度Pyは、第2の対立遺伝子に対する陽性の反応に基づいて計算される。Pyは、複数の反応での第2の対立遺伝子の予想される統計分布により補正される。胎児パーセンテージPfは、その後、 $[(2Py) / (Px + Py)]$ を使って計算される。

10

20

【0011】

他の実施形態は、本明細書記載の方法に関連するシステム、およびコンピュータ可読メディアに関する。

【0012】

下記の詳細説明および付随する図の参照により、本発明の特質および利点に関し、さらに深い理解を得ることができるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】は、母体の生物学的試料を分析し、本発明の実施形態に従って、胎児中のX連鎖障害を診断する方法100を示すフローチャートである。

30

【図2】図2Aは、変異対立遺伝子または正常対立遺伝子を受け継いでいる胎児の2つの可能性を示す。図2Bは、本発明の実施形態に従って、逐次確率比検定(SPRIT)を使って得られた試料分類用カットオフ値のプロット250を示す。

【図3】は、本発明の実施形態に従って、妊婦の男児胎児がX連鎖変異を有するか否かを判定する方法300を示すフローチャートである。

【図4】は、本発明の実施形態に従って、男児胎児がX連鎖変異を受け継いでいるか否かを判定する方法400を示す。

【図5A】は、染色体X上の変異に対する変異および野性型対立遺伝子の間の遺伝子の量不均衡を示す表500である。

【図5B】は、妊娠対象が目的の座位でヘテロ接合である場合の拡大の検出用の第1のシナリオを示す。

40

【図5C】は、妊娠対象が目的の座位でホモ接合である場合の拡大の検出用の第2のシナリオを示す。

【図6】は、妊婦の男児胎児がX連鎖変異を有するか否かを判定するための方法600を示すフローチャートである。

【図7】は、染色体X上の欠失および重複変異に対する標的および参照座位間の遺伝子量不均衡を示す表700である。

【図8】は、本発明の実施形態に従って、胎児を有する妊婦由来の生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージPfを得る方法800を示すフローチャートである。

【図9】は、血友病変異を持つ7人の妊婦の臨床的情報を含む表900を示す。

50

【図10】は、対立遺伝子判別可能アッセイのためのオリゴヌクレオチド配列およびリアルタイムPCR条件を示す表1000である。

【図11】は、デジタルRMDにより、母体血漿中のrs6528633の胎児遺伝子型同定を示す表1100である。

【図12】は、人工DNA混合物を使った、デジタルRMDアッセイの検証を示す。

【図13】は、デジタルRMDによる母体血漿中の胎児血友病変異の非侵襲的検出を示す表1300である。

【図14】は、母体血漿試料中の胎児血友病変異のSPRT分析プロットを示す。試料番号は、グラフの上端に示されている。 P_p ：変異対立遺伝子を含む陽性ウエルの比率。

【図15】は、正常な妊娠由来の母体血漿試料に対するデジタルRMDの結果を示す。

【図16】は、本発明の実施形態によるシステムと方法で使用可能なコンピュータシステムの例のブロックダイアグラム1600を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

定義

本明細書で使われる用語の「生物学的試料」は、対象（例えば、妊婦、等のヒト）から採取したいずれかの試料を指し、1つまたは複数の目的の核酸分子を含む。

【0015】

用語の「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）およびそれらの単鎖または二重鎖型のポリマーを意味する。特に制限がなければ、この用語は、参照核酸に類似の結合特性を有し、天然ヌクレオチドと類似の方式で代謝される天然ヌクレオチドの類似体を含む核酸を包含する。別段の指定がなければ、特定の核酸配列は、また、保存的に改変された（例えば、縮重コドン置換）それらの変異体、対立遺伝子、オーソログ、SNP、および相補的配列、ならびに明示的に指定された配列、を暗黙の内に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの3つ目の位置が、混合塩基、および/またはデオキシイノシン残基で置換される配列を生成することにより実現できる（Batzler et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); および Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)）。用語の核酸は、遺伝子、cDNA、mRNA、小分子ノンコーディングRNA、マイクロRNA (miRNA)、Piwi-interacting RNA、および遺伝子または座位によりコードされたショートヘアピンRNA (shRNA)、と同義に使用される。

【0016】

用語の「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の産生に関与するDNAのセグメントを意味する。それは、コード領域の前および後ろの領域（リーダーおよびトレーラー）、ならびにそれぞれのコードセグメント（エキソン）の間に、介在する配列（イントロン）を含んでもよい。

【0017】

本明細書で使われる用語の「反応」は、目的の特定のポリヌクレオチド配列の存在または非存在を示す化学的、酵素的、または身体的作用を含むプロセスを意味する。「反応」の一例は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、等の増幅反応である。「反応」の別の例は、合成、連結反応、ハイブリダイゼーションまたは分解によるシーケンシング反応である。「情報価値のある反応」は、1つまたは複数の特定の目的のポリヌクレオチド配列の存在を示す反応、および唯一の目的の配列が存在する場合の反応である。本明細書で使われる用語の「ウエル」は、閉じ込められた構造、例えば、ウエル形状バイアル、細胞、PCRアレイのチャンパー、乳剤中の液滴、表面上の粒子、ナノボアまたは領域、内の所定の部位での反応を意味する。

【0018】

10

20

30

40

50

本明細書で使われる用語の「不釣り合いに多い核酸配列」は、生物学的試料中の他の配列より多くの存在量である目的の2つの配列（例えば、臨床的に関連する配列および背景配列）間の核酸配列を意味する。

【0019】

本明細書で使われる用語の「～に基づく」は、「少なくとも一部は～に基づく」を意味し、ある方法の入力およびその方法の出力の関係で生ずるような、別の値の決定に使われる1つの値（または結果）を指す。本明細書で使われる用語の「由来する（derive）」は、また、算出が式の計算である場合に生ずるような、ある方法の入力およびその方法の出力の関係を指す。

【0020】

本明細書で使われる用語の「定量的データ」は、1つまたは複数の反応から採取し、1つまたは複数の数値を与えるデータを意味する。例えば、特定の配列に対する蛍光マーカを示すウエルの数は、定量的データでありうる。

【0021】

本明細書で使われる用語の「パラメータ」は、定量的データセット、および/または定量的データセット間の数値的關係を特徴付ける数値を意味する。例えば、第1の核酸配列の第1の量および第2の核酸配列の第2の量の間の比率（または比率の関数）はパラメータである。

【0022】

本明細書で使われる用語の「座位（locus）」またはその複数形「座位（loci）」は、ゲノム全域で変異を有する任意の長さのヌクレオチド（または塩基対）の位置またはアドレスである。用語の「対立遺伝子」は、同じ物理ゲノム座位の代替DNA配列を意味し、これは、異なる表現型形質を生じて、生じなくてもよい。各染色体（男性のヒト対象の性染色体を除いて）の2つのコピーを有するいずれかの特定の二倍体生物では、各遺伝子の遺伝子型は、その座位に存在する一对の対立遺伝子を含み、これら2つは、ホモ接合体では同じで、ヘテロ接合体では異なる。生物体の集団または種は、典型的な例では、種々の個体間で各座位に複数の対立遺伝子を含む。集団中で2つ以上の対立遺伝子が見つかるゲノム座位は、多形性部位と呼ばれる。ある座位の対立遺伝子変異は、存在する対立遺伝子の数（すなわち、多型の度数）、または集団中のヘテロ接合体の比率（すなわち、ヘテロ接合体割合）として測定可能である。本明細書で使われる用語の「多型」は、その頻度に関わらず、ヒトゲノムのいずれかの個体間変異を意味する。このような変異の例には、限定されないが、単一ヌクレオチド多形、単一タンDEM反復多形、挿入-欠失多形、変異（疾患の原因であってもよい）およびコピー数変異が含まれる。

【0023】

本明細書で使われる用語の「カットオフ値」は、生物学的試料の分類の2つ以上の状態（例えば、疾患と非疾患）の間を区分けするのに使われる数値を意味する。例えば、パラメータがカットオフ値より大きい場合は、定量的データに第1の分類（例えば、疾患状態）が適用され；または、パラメータがカットオフ値より小さい場合は、定量的データに異なる分類（例えば、非疾患状態）が適用される。

【0024】

本明細書で使われる用語の「不均衡」は、少なくとも1つのカットオフ値により定義される臨床的に関連する核酸配列の量中の参照量からの何らかの有意な偏差を意味する。例えば、参照量が3/5の比率とすると、測定比率が1:1の場合には、不均衡が生じていることになる。

【0025】

本明細書で使われる用語の「配列決定されたタグ」は、核酸分子のいずれかの部分または全体から配列決定されたヌクレオチドの配列を指す。例えば、配列決定されたタグは、核酸断片から配列決定されたヌクレオチドの短い配列でも、核酸断片の両末端のヌクレオチドの短い配列でも、または生物学的試料中に存在する全核酸断片の配列であってもよい。核酸断片は、より大きな核酸分子のいずれかの部分である。断片（例えば、遺伝子）は

10

20

30

40

50

、より大きな核酸分子の他の部分に対し別々に（すなわち、連結されないで）存在してもよい。

【0026】

詳細な説明

伴性遺伝疾患に対する現在の出生前診断法は、典型的な例では、侵襲的で、胎児に危険を及ぼす。母体血漿中の無細胞の胎児DNA分析は、このような妊娠で胎児性別の評価用の非侵襲的手段を提供する。しかし、変異特異的確認分析が行われない場合には、男児胎児の疾患状態は、未知のままである。これに関し、我々は、母親からの伴性遺伝疾患の原因となる変異を胎児が受け継いでいるか否かを診断する非侵襲的検査を開発した。1つの戦略は、相対的変異遺伝子量（RMD）法に基づいている。この方法は、常染色体疾患変異の胎児の変異状態を判定するために以前に確立している。RMD法は、変異体または野性型対立遺伝子の濃度が、ヘテロ接合の男児胎児を有する妊婦の血漿中で不釣り合いに多いかどうかを検出することにより、染色体X上の伴性変異を胎児が受け継いでいるかどうかを推定するために使用される。

10

【0027】

実施形態は、X連鎖障害、例えば、血友病の出生前診断で、RMD手法の適用を提供する。常染色体疾患およびX連鎖疾患のRMD分析の間の差異は、前者に対しては、3つの可能な胎児遺伝子型（すなわち、正常ホモ接合、変異ホモ接合、およびヘテロ接合）があるが、他方、後者に対しては、2つの可能な胎児遺伝子型のみがあるということである。X連鎖疾患では、男児胎児は、ただ1つの染色体Xを有し、従って、それは、変異体か、または野性型遺伝子型となる。X連鎖疾患に対するこの2つの帰結は、常染色体疾患の場合の3つの帰結に比べて、所与の分析精度での、X連鎖疾患に対しRMD手法をよりロバストにすることができる。実施形態は、また、限定されないが、以下を含む他の伴性遺伝疾患にも使用できる：デュシェンヌ型筋ジストロフィー、X連鎖副腎白質ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、全脈絡膜萎縮、ハンター症候群、レッシュ・ナイハン症候群、ノリエ症候群およびオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症。

20

【0028】

我々は、血友病、X連鎖出血障害を例として使って、概念を説明する。我々は、妊娠の第11週目の早期から血友病（伴性遺伝疾患）の危険にさらされている妊娠から採取した12の調査母体血漿試料の全てで、血友病変異の胎児遺伝子型を正確に検出した。この開発により、危険にさらされている家族が、より外傷性の少ない、より安全な出生前の検査を行う決断ができるであろう。

30

【0029】

I. 伴性遺伝変異の判定

図1は、本発明の実施形態に従って、胎児中の母体生物学的試料を分析し、X連鎖障害を診断する方法100を示すフローチャートである。方法100は、非侵襲的であり、母体生物学的試料中で循環するDNAを使用することができる。

【0030】

ステップ110では、X染色体上の既知の変異を有する妊娠対象が特定される。変異は、血友病、等の本明細書記載のいずれのタイプでもよい。変異は、DNAシーケンシング、サザンプロット分析、PCR（対立遺伝子特異的PCRを含む）、融解曲線分析、等の種々の方法で決定できる。変異は、唯一の妊娠対象のX染色体が変異を有する、すなわち、妊娠対象が変異に関連する座位でヘテロ接合であるものである。実施形態は、また、点変異または配列欠失、重複または反転を伴う他の伴性障害、例えば、全脈絡膜萎縮およびノリエ症候群の非侵襲的出生前診断にも適用できる。

40

【0031】

ステップ120では、妊娠対象の生物学的試料が入手される。試料は、血漿、尿、血清、および唾液、等の胎児核酸を含むいずれの生物学的試料であってもよい。例えば、母体血漿試料を産科ケアを受けている妊婦キャリアから集めることができる。

【0032】

50

ステップ130では、胎児の性別が決定される。性別は、XおよびY染色体を検出することにより判定できる。母体血漿中の染色体YのDNA配列の検出により、妊娠以降7週目から、男児胎児が97%を越える正確さで特定できる。女児胎児に対し不必要な侵襲的検査を避けることができる。理由は、女児は非罹患か、または疾患キャリアであるからである。

【0033】

ステップ140では、胎児は、女児であると判定でき、その後、ステップ145でさらなる分析は行われない。女児胎児は、偏ったX染色体不活性化のようなシナリオ以外は、キャリアとして罹患している。

【0034】

ステップ150では、胎児は、男児であると判定され、その後、ステップ155で、X染色体上のDNA断片が分析される。一実施形態では、胎児変異検出が相対的変異遺伝子量(RMD)技術により行われるが、この技術は以降でさらに詳細に説明される。別の実施形態では、標的領域の対立遺伝子の量(これには、母親の変異も含む)を母体中で正常である参照領域の対立遺伝子の量と比較することにより、胎児の欠失または拡大変異が検出される。

【0035】

ステップ157では、胎児が母体対象の変位X染色体を受け継がなかったことを判定できる。ステップ159では、胎児が母体対象の変位X染色体を受け継いだことを判定できる。胎児DNAパーセンテージが高い場合には、必要に応じ、妊娠の後の段階で採取された第2の母体血漿試料を使って分類を確認でき(Lun F M F et al., Clin Chem., 54:1664-1672(2008))、さらにロバストな試験が可能となる。

【0036】

II. 正常体と変異体間の分類

方法100のステップ155での分析は、母体試料中のDNA断片を分析する。母体試料は、胎児DNAも含むため、男児胎児のX染色体の遺伝子型も判定できる。染色体X上のいずれの変位に対しても、男児胎児を有するヘテロ接合の女性の血漿中の変異型および野生型対立遺伝子の濃度の間の対立遺伝子不均衡が常に存在する。不釣り合いに多い対立遺伝子は、胎児により受け継がれている対立遺伝子である。一実施形態では、胎児の遺伝子型は、RMD技術により判定でき、この技術は、母体試料中の変異対立遺伝子の数を正常対立遺伝子の数と比較することを含む。

【0037】

図2Aは、変異対立遺伝子または正常対立遺伝子を受け継ぐ胎児の2つの可能性を示す。母体DNA210は、特定のX染色体上の座位に対し示されている。座位215は、正常なN(野生型)である1つの対立遺伝子および変異体Mであるもう一つの対立遺伝子を有するヘテロ接合である。変異は、例えば、異なる配列、欠失、挿入、および反転、等の種々の型でありうる。これらの変異のそれぞれは、座位215の正常対立遺伝子以外の、異なる対立遺伝子として特定できる。

【0038】

胎児DNA220では、2つの可能性が示される。男児胎児は、唯一X染色体を有するので、母体DNA210のX染色体の内のただ1つが男児胎児に受け継がれることになる。可能性222は、変異対立遺伝子Mを受け継ぐ男児胎児を示す。可能性224は、正常対立遺伝子Nを受け継ぐ男児胎児を示す。X染色体より小さいY染色体もそれぞれの可能性と共に示されている。

【0039】

母体試料(例えば、血漿)230は、胎児が変異体を受け継ぐか、または正常対立遺伝子を受け継ぐかに応じて、正常対立遺伝子に対する変異対立遺伝子の比率が異なるであろう。可能性222では、男児胎児が変異対立遺伝子Mを受け継ぐので、母体試料はより多い変異対立遺伝子Mを持つことになる。これは、統計的に有意な量のDNAが分析される

10

20

30

40

50

場合、胎児DNAが、変異対立遺伝子Mにのみ寄与するのに対し、母体DNAが、変異対立遺伝子Mおよび正常対立遺伝子Nのほぼ同等に寄与することが理由であると思われる。可能性224では、母体試料は、男児胎児が、正常対立遺伝子Nを受け継いでいるため、より多くの正常対立遺伝子Nを持つことになる。

【0040】

正常および変異対立遺伝子を示すDNA断片の数は、種々の方法、例えば、デジタルPCR、シーケンシング（Sangerシーケンシング、大量並列シーケンシングおよび一分子シーケンシングを含む）、および単一DNA分子または増幅群のDNA分子（例えば、固体表面上のクラスター）の分析を可能とする他の方法、を使って計数できる。NおよびM対立遺伝子の数が計数されるとすぐに、種々の技術を使って、例えば、罹患、または非罹患（例えば、胎児が血友病であるか、正常であるかの診断）、等の分類を行うことができる。例えば、NおよびM対立遺伝子の数からパラメータ（例えば、比率または差異）が決定でき、パラメータを1つまたは複数のカットオフ値に対し比較できる。カットオフ値は、種々の統計技術、例えば、逐次確率比検定（SPRT）により得ることができる（Zhou W、Galizia G、Lieto E、et al.、Nat Biotechnol.、19：78-81（2001）；Zhou W、Goodman SN、Galizia G、et al.、Lancet.、359：219-225（2002））。

10

【0041】

図2Bは、本発明の実施形態に従ってSPRTを使って得られた試料分類用カットオフ値のプロット250を示す。Y-軸は、変異している対立遺伝子の比率 P_r （パラメータの一例）を示す。X-軸は、計数された座位215の対立遺伝子の数を示す。2つの曲線は、胎児が変異（例えば、血友病）を持つか、正常であるか、または分類不能であるかを判定するためのカットオフ値に対応する。上方境界より大きい、および下方境界より小さい変異対立遺伝子比率（ P_r ）を有する試料は、それぞれ、変異型および野性型として分類される。2つの曲線の中間の P_r を有する試料は、分類不能であり、追加のデジタル分析（例えば、追加のPCRウエルからのデータ）が必要である。

20

【0042】

使用する特定のカットオフ値は、計数した対立遺伝子の数に依存する。少しの対立遺伝子のみが計数される場合は、より大きな統計的変動がある可能性があり、従って、試料を変異型または正常型として確信を持って分類するためには、カットオフ値として、極端な P_r の値が必要となる。以降でさらに詳細に説明するように、デジタルPCRが使用可能である（この場合、Y-軸は、変異対立遺伝子を含む陽性のウエルの比率で、X-軸は、陽性のウエルの数である）。Y-軸上の曲線の位置は、どのようにして、パラメータが計算されたかに応じて変化し、例えば、パラメータが、M対立遺伝子の数で除算されたN対立遺伝子の数である場合、分類不能領域を1.0が中心となるようにできる。

30

【0043】

変異が欠失または拡大である場合の別の実施態様では、母体X染色体の1つが欠失/拡大を有する標的領域（例えば、座位215）および参照領域（拡大または欠失のない）の間の断片の数の間の比較を使って、欠失/拡大を特定することができる。このような実施態様は、特定のヘテロ接合の座位に依存せず、従って、妊娠対象は、標的領域でホモ接合であってもよい。欠失に対しては、参照領域由来よりもより少ない標的領域由来の断片が予測できる。拡大に対しては、参照領域由来よりもより多くの標的領域由来の断片が予測できる。カットオフ値は、また、SPRTまたは類似の技術を使って決定できる。

40

【0044】

III. RMD法

図3は、本発明の実施形態に従って、妊婦の男児胎児がX連鎖変異であるか否かを判定する方法300を示すフローチャートである。妊婦は、X染色体上の座位で変異および正常対立遺伝子のヘテロ接合である。方法300は、相対的量の変異および正常対立遺伝子を使って疾患分類を行う。

50

【0045】

ステップ310では、複数の反応由来のデータが入手される。各反応は、生物学的試料由来の1つまたは複数の核酸分子を含み、この試料は、妊婦由来、および男児胎児由来の核酸分子を含む。反応は、種々のウエルでのデジタルPCR反応、等の種々の型であってよい。他の実施形態では、シーケンシング反応（例えば、限定されないが、Illumina Genome Analyzer、Roche 454、Life Technologies SOLiD、Pacific Biosciences単分子リアルタイムシーケンシングまたはIon Torrent、を含む大量並列シーケンシングプラットフォームによる）、プライマー伸長法反応、質量分析、ナノポアを使った分析、光学的方法または蛍光または他のプローブへのハイブリダイゼーション、等の他の反応を使うことができる。従って、データには、デジタルPCRウエルからの蛍光シグナル、ウエル中の少なくとも一部のDNA分子のシーケンシングから得た配列決定されたタグ、またはこのような反応から生じた他のデータ、を含むことができる。

10

【0046】

反応由来のデータには、その座位の変異対立遺伝子の第1の量を示す第1の定量的データセット、およびその座位の正常対立遺伝子の第2の量を示す第2の定量的データセットを含む。その座位の特定の対立遺伝子の量は、種々の方法、例えば、特定の対立遺伝子を含み、その座位に整列させた（参照ゲノムを使って）配列決定されたタグの数、および配列決定されたヌクレオチド（塩基対）の数または特定の対立遺伝子を含み、その座位に整列させた配列決定されたヌクレオチド（塩基対）の累積長さを計数し、特定の対立遺伝子に対する陽性のウエルの合計数により、測定できる。

20

【0047】

ステップ320では、パラメータが第1の量および第2の量から決定される。パラメータは、第1と第2の量の間の相対量を表す。パラメータは、例えば、第1の量の第2の量に対する単純比率、または第1の量の第2の量+第1の量に対する比率であってもよい。一態様では、各量は、ある関数または別の関数に対する引数であってよく、この場合、比率は、次に、これらの別々の関数から算出できる。当業者なら、異なる適切なパラメータの数を理解するであろう。例えば、パラメータは、血漿試料中に存在する変異対立遺伝子の数の、変異および野性型対立遺伝子の合計数に対する比率（ P_r で示される）であってもよい。

30

【0048】

ステップ330では、生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージPfが得られる。パーセンテージPfは、母体DNAに比べて、どのくらい多くの胎児DNAが母体試料中存在するかの測定値を提供する。パーセンテージPfがより高い場合は、受け継がれた不釣り合いに多い対立遺伝子が多くなる。パーセンテージは、1を100%として、0~1の分数で表現できる。

【0049】

ステップ340では、胎児がその座位で変異対立遺伝子を受け継いでいるか否かを判定するための第1のカットオフ値が計算される。第1のカットオフ値は、少なくとも第1の比率： $1 / (2 - Pf)$ から算出される。ステップ320からのパラメータの公式化の方法に応じて、比率： $1 / (2 - Pf)$ は、変異対立遺伝子を受け継がれた場合は、第1と第2の量の予測比率に等しくなりうる。予測値を統計関数に入力し、カットオフ値を決定できる。カットオフ値は、多くの異なる形式の方法、例えば、SPRT、偽陽性検出（false discovery）、信頼区間、および受信者動作特性（ROC）曲線分析、を使って決定できる。

40

【0050】

ステップ350では、胎児がその座位で正常対立遺伝子を受け継いだか否かを判定するための第2のカットオフ値が計算される。第2のカットオフ値は、少なくとも第2の比率： $(1 - Pf) / (2 - Pf)$ から算出される。

【0051】

50

ステップ360では、パラメータが第1および第2のカットオフ値の内の少なくとも1つと比較され、胎児が変異対立遺伝子または正常対立遺伝子を受け継いだかどうかの分類が決定される。上述のように、分類は、罹患（変異を受け継いでいる）および非罹患（正常な遺伝子を受け継いでいる）を含み、さらに、未分類を含めてもよい。正確さの確率も分類に含めることができ、例えば、正確さは、どれくらい多くのパラメータがカットオフ値を越える（越えるまたは下まわる）かによって決定することも可能である。一実施態様では、分類は、後日、例えば、医師により解釈されるスコアであってもよい。

【0052】

対立遺伝子の量を示すデータは、連鎖性対立遺伝子由来であってもよい。従って、変異または正常対立遺伝子に連鎖した対立遺伝子は、正常および変異対立遺伝子の代わりに使用可能である。例えば、変異核酸配列に連鎖した多形部位の対立遺伝子は、同じ母体ハプロタイプ上に位置する変異核酸配列として対立遺伝子である可能性があり、この場合、多形部位および変異核酸配列の間の組換えの確率は、特定の値、例えば、1%未満である。従って、多形部位は、変異対立遺伝子の直接の測定値と同じまたは類似の定量的データを提供できる。別の例では、正常な核酸配列に連鎖した多形部位の対立遺伝子は、正常な核酸配列と同じ母体ハプロタイプ上に位置する対立遺伝子でありえ、この場合、多形部位および変異核酸配列の間の組換えの確率は、特定の値、例えば、1%未満である。

10

【0053】

A. 血漿を含むPCRを使った例

上述のように、デジタルPCRを、変異または正常対立遺伝子を含むDNA断片を特定する方法として使用可能である。デジタルPCRでは、試料は複数の区画（例えば、ウエルまたはビーズ）に分割される。平均して、各区画は2つの対立遺伝子のいずれか1つ未満を含む。従って、陽性のウエルが対立遺伝子含有断片のただ1つの事例として計数できる。

20

【0054】

図4は、本発明の実施形態に従って、男児胎児がX連鎖変異を受け継いでいるかどうかを判定する方法400を示す。デジタルPCRを使って、変異対立遺伝子比率および胎児DNAパーセンテージが決定される。胎児DNAパーセンテージを使って、変異対立遺伝子比率が比較され、それにより、男児胎児が変異を受け継いでいるか否かの分類を提供するカットオフ値が決定される。変異対立遺伝子比率が決定されるので、実施形態は、RMD法と呼ぶことができる。

30

【0055】

図示のように、各母体血漿DNA試料に対し、変異体DNA比率(P_r)および胎児DNAパーセンテージ P_f の両方がデジタルPCRにより決定されるが、特定の配列を特定できる他の反応も使用可能である。 P_r を決定するステップは左側で提供され（プロセス401）、胎児DNA濃度比率 P_f の決定ステップは、右側に提供される（プロセス402）。示されているように、 P_r は、母体により保有されている変異を標的にしたリアルタイムPCRアッセイを使って決定でき、他方、胎児DNAパーセンテージ P_f は、相同ZFYおよびZFX遺伝子領域に対するリアルタイムPCRアッセイを使って決定される。

40

【0056】

ステップ410では、PCR混合物が調製される。示されているように、混合物は、2つの測定値に対し異なる。 P_r 測定（プロセス401）に対しては、混合物は、検査される座位を含むX染色体上の領域を増幅するPCRプライマーを含む。混合物は、また、野生型対立遺伝子を有するDNA断片の存在を特定する蛍光プローブ、および変異対立遺伝子を有するDNA断片の存在を特定する蛍光プローブを含む。 P_f 測定（プロセス402）では、混合物は、ZFYおよびZFX遺伝子領域に対するプライマーを含む。混合物は、また、ZFX遺伝子由来の配列を含むDNA断片の存在を特定する蛍光プローブ、およびZFY遺伝子由来の配列を含むDNA断片の存在を特定する蛍光プローブを含む。

【0057】

50

ステップ420では、反応混合物は、PCR装置に供される。一実施形態では、マイクロフルイディクスデジタルアレイ (Fluidigm) 中でデジタルPCRを行い、これは、各パネルがさらに765の反応チャンパーに分割されている12パネルからなる。各DNA試料(すなわち、1つはP_r用、1つはP_f用)が6パネル、すなわち、765×6=4590チャンパーを使って分析される。PCR混合物は、最初に、マニュアルで各パネルの試料導入口に加えることができる。次に、混合物は、Integrated Microfluidics Circuit Controller (Fluidigm) により各パネル中の765チャンパーに自動的に分注される。各チャンパーは、6nLの最終反応容量を含む。母体血漿中の無細胞のDNA濃度は、典型的な例では、非常に少なく、平均で、1テンプレート分子/チャンパーより少ない程度である。従って、チャンパーへのテンプレート分子の分布は、ポアソン分布に従う。他の試料に対しては、DNA試料を分析前に希釈する必要があるかもしれない。また、当業者によく知られた方法、例えば、マイクロフルイディクスチップ、ナノリッターPCR (nanoliter PCR) マイクロプレートシステム、エマルジョンPCR (レインダンス (RainDance) プラットホームを含む)、ポロニー (colony) PCR、ローリングサークル増幅 (rolling-circle amplification)、プライマー伸長法および質量分析、を使ってデジタルPCRを行うことができることは、当業者には明らかであろう。

10

【0058】

P_r測定に対し示されているように、野性型対立遺伝子を有するDNA断片を含むウエル(チャンパー)は、青で示され、変異対立遺伝子を有するDNA断片を含むウエルは、赤で示される。テンプレートDNA分子を含まない(すなわち、対応するプローブがある対立遺伝子が存在しない)ウエルは、単純に白で示される。P_f測定に対しても同様に、ZFX遺伝子を含むウエルは青で示され、ZFY遺伝子を含むウエルは赤で示される。

20

【0059】

ステップ430では、リアルタイムPCRを、例えば、BioMark System (Fluidigm) 上で行った。各ウエルは、対応する混合物中でプライマーに対応するDNA領域を増幅する一連のサイクルに供される。ほとんどのチャンパーは、0または1つのテンプレートDNA分子を含むので、ウエルの増幅産物は、1つのテンプレートDNA分子由来である。

30

【0060】

ステップ440では、陽性のPCR増幅チャンパーの数が計数される。プロセス401では、野性型対立遺伝子に対し陽性のチャンパーの数が計数でき、また、変異対立遺伝子に対するチャンパーの数が計数できる。プロセス402では、ZFX遺伝子に対し陽性のチャンパーの数が計数でき、また、ZFY遺伝子に対するチャンパーの数が計数できる。各プロセスでは、両方の対立遺伝子に対し陽性のチャンパーの数もまた、特定できる。陽性のチャンパーの検出は、蛍光シグナル(例えば、各対立遺伝子は、異なる色のシグナルを発光する)の検出、等の種々の方法で行うことができる。例えば、ZFX遺伝子を含むチャンパーは、青い蛍光のシグナルを発光でき、ZFY遺伝子を含むウエルは、赤い蛍光のシグナルを発光できる。

40

【0061】

ステップ450では、ステップ440で計数された対応する数を使って、変異体DNA比率(P_r)および胎児DNAパーセンテージP_fが計算される。例えば、変異対立遺伝子比率が、変異対立遺伝子に対する陽性のチャンパーの数を陽性のウエルの合計数で除算して計算できる。他の例では、分母は、1つの対立遺伝子のみに対し陽性のチャンパーの合計数であってもよい。未加工のカウント数を含む比率の代わりに、値は、分子および分母を上記のいずれかの数値で効果的に除算した、濃度それ自体であってもよい。類似の値を使用して、式[(2Y)/(X+Y)]*100%に従い胎児DNAパーセンテージP_fを計算できる。式中、Yは、ZFY遺伝子の測定量(例えば、陽性のチャンパーまたは陽性のチャンパーの比率の数)であり、Xは、ZFX遺伝子の測定量である。

50

【0062】

反応ウエル当たり、1つ未満のテンプレート分子が存在するため、各反応チャンパーに分配されたテンプレート分子の実際数は、ポアソン分布に従った。従って、いずれかの対立遺伝子に対するチャンパーの数は、式 $[-\ln((N-P)/N)] * N$ を使って、ポアソン補正できる。式中、 N は、分析反応チャンパーの合計数、 P は、対立遺伝子に対する陽性のチャンパーの数であり、 \ln は自然対数である。次に、ポアソン補正された値を使って、上述と類似の方式で、比率 P_r および胎児DNAパーセンテージ P_f を決定できる。

【0063】

ステップ460では、変異体DNA比率 (P_r) および胎児DNAパーセンテージ P_f を使って、男児胎児が変異を受け継いだか否かの分類が行われる。方法300と同様に、カットオフ値が、例えば、ステップ340および350のように、胎児DNAパーセンテージ P_f から決定できる。カットオフ値は、また、平均参照テンプレート濃度 (m_r) から算出でき (これは、 m_r に等しい場合も含む)、例えば、実験的に測定した野性型対立遺伝子に対する陽性のチャンパーのパーセンテージを使って、ステップ460で使われるカットオフ値を決定できる。この戦略は、確信できる分類に必要な検査の量をさらに最小限にできる。これは、テンプレート量が制限されることが多い血漿核酸分析に特に適切である。

10

【0064】

B. S P R T

S P R T は、データが蓄積するに従い、2つの確率的仮説の比較を可能とする方法である。換言すれば、それは、デジタルPCRの結果を変異または正常対立遺伝子の方向に偏らせることを示唆するようにして、分類する統計的方法である。それは、分析されるウエルの数を最小化して所与の統計的な力と正確さを実現する利点を有する。

20

【0065】

代表的S P R T分析では、実験結果は、2つの対立仮説に対して検定される。1つ目の対立仮説は、変異対立遺伝子が不釣り合いに多い場合に採択される。2つ目の対立仮説は、変異対立遺伝子が不当に少なく見積もられた場合に、採択される。測定された P_r は、2つのカットオフ値の内の少なくとも1つと比較されて、1つ目または2つ目の対立仮説が採択される。いずれの仮説も採択されない場合は、試料は、未分類として標識されることになり、これは、試料を所望の統計的信頼性で分類するには、観察されたデジタルPCR結果の数が十分ではないことを意味する。より多くのデータを集めて、所望の統計的信頼性を得ることができる。

30

【0066】

集めたデータ量に依存する一对の曲線により、仮説を採択するか、または棄却するかの確率的限界 (カットオフ値) を定義できる (Zhou W, Galizia G, Lieto E, et al., Nat Biotechnol., 19:78-81 (2001); Zhou W, Goodman SN, Galizia G, et al., Lancet., 359:219-225 (2002))。S P R T 曲線は、胎児遺伝子型の分類のために、所与の陽性の反応の合計数 (x -軸) に対する必要な P_r (y -軸) を図示した。実験値 P_r が、上方境界を越えた領域、または下方境界より低い領域へ入る場合に、それぞれ、仮説 (i) または ($i i$) が採択される。S P R T 限界を計算する式は、統計的信頼性のレベルを変えて判定できる (例えば、閾値尤度比8に調節して)。一態様では、S P R T 曲線のカットオフ値は、試料特異的である。カットオフ値は、上述の胎児DNA濃度比率 (胎児DNAパーセンテージ) に依存する。カットオフ値は、また、所与の反応セットに対する平均PCRウエル当たりの参照テンプレート濃度 (m_r) にも依存する可能性がある (Lo YMD et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2007; 104:13116-13121 (2007); Lun FMF, Tsui NBY, Chan KCA, et al., Proc Natl Acad Sci USA., 105:19920-19925 (2008))。参照テンプレ

40

50

トは、試料中のより少ない陽性の増幅数を示した対立遺伝子であってもよい。

【0067】

S P R Tは、所与の信頼性レベルに対し、他の統計的方法より少ない試験量で済むという利点を与えることができる。実際面では、S P R Tは、必要量のデータが蓄積されるとすぐに、いずれかの仮説の採択または拒絶が可能となり、従って、不必要な追加の分析を最小限にする。この特徴は、通常、利用可能なテンプレート分子の数が限られている、低い濃度で存在する血漿核酸の分析に特に適合する。厳密な分類に加えて、分類には、パーセント正確性を含んでもよい。例えば、カットオフ値との比較で得られた分類は、試料が特定のパーセンテージで核酸配列不均衡の尤度を示すこと、すなわち、換言すれば、決定した不均衡は、特定のパーセンテージまたは他の値の程度に正確であることを規定できる。

10

【0068】

S P R Tを使用した実施形態では、E l K a r o u i、等のS P R T曲線の上方および下方境界の計算に算出式を使用できる(E l K a r o u i N、Z h o u W、W h i t t e m o r e A S、S t a t M e d . 2 5 : 3 1 2 4 - 3 1 3 3 (2 0 0 6))。さらに、1つ目のまたは2つ目の仮説の採択のために好ましい統計的信頼性のレベルは、式中の閾値尤度比を調節することにより変えることができる。閾値尤度比8は、癌検出との関連で、対立遺伝子不均衡を含む試料、および含まない試料を識別するために、満足できる結果を与えることを示した。従って、一実施形態では、S P R T曲線の上方および下方境界を計算する式は：

20

上方境界 = [(l n 8) / N - l n] / l n

下方境界 = [(l n 1 / 8) / N - l n] / l n

であり、

式中、 = (1 - ₁) / (1 - ₂)、

【数1】

$$\gamma = \frac{\theta_1(1-\theta_2)}{\theta_2(1-\theta_1)},$$

30

l nは、自然対数、すなわち、l o g_eを表す数学記号、N = 分子の合計数(すなわち、分析される変異および正常分子の合計)、

₁ = 1つ目の対立仮説が真の場合(すなわち、胎児が変異対立遺伝子受け継いでいる場合)、変異および正常分子の合計数に対する変異分子の比率；および

₂ = 2つ目の対立仮説が真の場合(すなわち、胎児が正常対立遺伝子を受け継いでいる場合)、変異および野性型分子の合計数に対する変異分子の比率である。

【0069】

1つ目の対立仮説を採択するための₁測定に際し、試料は、変異(M)対立遺伝子を受け継いでいる男児胎児を有する妊婦から採取したと仮定される。₁は、1 / (2 - P f)であると判断される。式中、P fは、試料中の胎児DNAのパーセンテージである。P fは、統計分布、例えば、本明細書記載のポアソン分布、で補正できる。

40

【0070】

2つ目の対立仮説を採択するための₂の測定に際し、試料は、正常な(N)対立遺伝子を受け継いでいる男児胎児を有する妊婦から採取したと仮定される。₂は、(1 - P f) / (2 - P f)であると判断される。

【0071】

実験による変異および野性型分子の数の測定後、変異および野性型分子の合計数に対する変異分子の比率(P r)が計算できる。次に、P rの値がカットオフ値と比較され、母

50

体血漿中の変異または野性型対立遺伝子が不釣り合いに多いかが判定される。

【 0 0 7 2 】

C . カットオフ値のポアソン補正

デジタルPCRを使った一実施形態では、平均濃度/ウエル（反応または反応混合物）が決定され、その配列を示すウエルの予想数が計算される。この量は、パーセンテージ、分数値、または整数値として表現できる。一実施態様では、例えば、デジタルPCR等の測定方法のウエルの反応混合物の中で、正常な（N）対立遺伝子、または変異対立遺伝子に対しポアソン分布が仮定される。他の実施態様では、二項分布、等の他の分布関数が使われる。

【 0 0 7 3 】

ポアソン方程式は：

【数2】

$$P(n) = \frac{m^n e^{-m}}{n!}$$

であり、式中、n = ウエル当たりのテンプレート分子の数；P（n）= 特定のウエル中のnテンプレート分子の存在確率；およびm = 特定のデジタルPCR実験における1つのウエル中のテンプレート分子の平均数である。従って、平均正常対立遺伝子濃度0.5で、どのウエルも正常対立遺伝子分子も含まない確率は：

【数3】

$$P(0) = \frac{0.5^0 e^{-0.5}}{0!} = e^{-0.5} = 0.6065,$$

となるであろう。

【 0 0 7 4 】

従って、いずれかのウエルが少なくとも1つの正常対立遺伝子分子を含む確率は：1 - 0.6065 = 0.3935、となるであろう。従って、約39%のウエルは、少なくとも1つの正常対立遺伝子分子を含むことが期待されることになる。一実施形態では、実験的に（例えば、デジタルPCRを使って）得られた陰性ウエルの比率から変異または野性型に対するP（0）が決定できる。その後、P（0）を使って、ウエル当たりの平均分子数（m）が計算できる。次に、パラメータが、ウエル当たりの平均分子数から、例えば、変異平均を変異および正常対立遺伝子に対する平均の合計で除算することにより計算できる。陽性のウエルの数、および分子の数の間のこの関係を考慮すれば、選択肢は、陽性のウエルの数を補正し、分子の数を得ることである（上述のように、式 $[-1 \ln((N - P) / N)] * N$ を使って。式中、Nは、分析した反応チャンパー合計数、およびPは、対立遺伝子に対し陽性のチャンパーの数である）。

【 0 0 7 5 】

m_r の測定を、当業者に既知の、または今後知られる種々の機序により行うことができる。一実施形態では、 m_r の値は、デジタルPCR分析の実験プロセスの間に測定される。 m_r の値および参照対立遺伝子に対し陽性であるウエルの合計数、の間の関係は、分布（例えば、ポアソン分布）により支配される可能性があるので、 m_r は、参照対立遺伝子に対し陽性であるウエルの数から、下記の式を使って計算できる：

$m_r = -1 \ln(1 - \text{参照対立遺伝子に対し陽性であるウエルの比率})$ 。

この手法は、デジタルPCR実験に使われるDNA試料中の m_r の直接的で、正確な推

10

20

30

40

50

定を与える。

【0076】

この方法は、所望の濃度を得るために使用できる。例えば、抽出した試料の核酸を希釈し、特定の濃度、例えば、反応ウエル当たり1つのテンプレート分子の濃度にする事ができる。ある実施形態では、ポアソン分布を使って、テンプレートのないウエルの予測比率が下式で計算できる：

【数4】

$$e^{-m}$$

10

式中、 m は、ウエル当たりのテンプレート分子の平均濃度である。例えば、ウエル当たり1テンプレート分子の平均濃度で、テンプレート分子のないウエルの予測比率は、

【数5】

$$e^{-1}$$

20

すなわち、0.37(37%)により与えられる。残りの63%のウエルは、1つまたは複数のテンプレート分子を含むことになる。典型的な例では、次に、デジタルPCR操作中の陽性のウエルの数を数えることが可能となろう。情報価値のあるウエルの定義およびデジタルPCRデータが解釈される方法は、用途に依存する。

【0077】

他の実施形態では、ウエル当たりの平均濃度、 m_r は、例えば、定量リアルタイムPCR、半定量競合PCR、および質量分析法を使ったreal-competitive PCR、等の別の定量化方法によって測定される。

30

【0078】

一実施態様では、正常対立遺伝子に対する変異対立遺伝子の比率は、補正濃度を使って計算できる。各対立遺伝子に対する濃度 m は、上述のように計算できる。次に、各対立遺伝子に対する濃度が決定でき、濃度の比率 P_r が実験的に算出され、分布補正された比率として使って、各仮説(例えば、変異または野性型遺伝)に対する予測比率と比較できる。例えば、実験的に決定された試験試料の P_r が式：(変異対立遺伝子の濃度)/(変異体+野性型対立遺伝子の濃度)、を使って計算できる。別の実施態様では、各対立遺伝子に対するウエルの数の比率が使用される。予測比率(カットオフ値)も統計分布に基づき補正できる。

【0079】

40

D. 実例

図5Aは、本発明の実施形態に従って、染色体X上の変位に対する変異および野性型対立遺伝子の間の遺伝子量不均衡を説明する表500を示す。計算を説明するために、合計100ゲノム当量(GE)の10%胎児DNAを有するDNAを含む母体血漿試料を使用した。母体ゲノムに対しては、1GEは、2コピーの対立遺伝子、すなわち、MおよびN対立遺伝子それぞれを1コピー含む。これは、90コピーの各変異および正常対立遺伝子を与える。胎児ゲノムに対しては、1GEは、X連鎖対立遺伝子の1コピー、すなわち、変異体(M)または正常な(N)対立遺伝子のいずれかの1コピーを含む。これは、どちらの対立遺伝子を胎児が受け継いでいるかに応じて、各対立遺伝子の0または10コピーを与える。

50

【0080】

表500では、上段は、正常対立遺伝子を受け継いでいる胎児に対応し、従って、正常対立遺伝子に対する変異対立遺伝子の比率は1未満である。下段は、変異対立遺伝子を受け継いでいる胎児であり、従って、正常対立遺伝子に対する変異対立遺伝子の比率は1を越える。

【0081】

E. 欠失、拡大、挿入、および反転

方法300および400は、標準的SNP以外の、追加の状況で適用できる。実施形態は、例えば、大きなDNAセグメントの欠失、拡大（例えば、重複）、挿入、および反転、等の胎児変異の非侵襲的検出にさらに適用できる。このような変異の例は、X連鎖疾患、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィーおよびオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、に関連する。手法は、拡大（例えば、重複）DNAセグメントの間の、または反転および隣接正常DNAセグメントの間の、欠失の再結合配列の接合部のターゲティングにより変異対立遺伝子を検出することである。胎児遺伝子型は、正常および変異対立遺伝子の間の遺伝子量不均衡から、本明細書記載の方法を使って推測することができる。

10

【0082】

図5Bは、妊娠対象が目的の座位でヘテロ接合の場合に、拡大検出用の第1のシナリオを説明する。第1の染色体の拡大に対しては、拡大対立遺伝子Bが非拡大対立遺伝子Aと異なる場合、拡大対立遺伝子Bの種々のコピーB1およびB2に対し、異なる接合部が存在する。これは、拡大コピーB1およびB2が第1の染色体上の異なる位置にあることが理由である。接合部の1つがユニークである（例えば、Bの始点にある、またはB2の末端にある接合部がユニークであり、一方、B-B1およびB1-B2間の接合部は、同じである）場合、ユニーク接合部は、他の染色体上の正常対立遺伝子との比較のための変異対立遺伝子として使用できる。この方法では、カットオフ値は、ステップ340と350の場合と同じ方法で算出できる。あるいは、拡大対立遺伝子Bの全ての具体例（すなわち、B、B1、およびB2）が、第1の染色体の部位にかかわらず使用可能である。このような実施形態では、 $\gamma_1 = (1 + n) / (2 + n - Pf)$ 、および $\gamma_2 = [(1 + n)(1 - Pf)] / [2 + n - Pf(1 + n)]$ であり、式中、nは追加コピーの数（示されるように、n = 2）で、nは、ゼロ以上の整数である。これらの式は、また、 $\gamma_1 = k / (1 + k - Pf)$ および $\gamma_2 = [k(1 - Pf)] / [1 + k - kPf]$ のように表すこともでき、kは変異染色体上の変異対立遺伝子（新しく形成された接合部でもよい）のコピー数で、kは、ゼロ以上の整数である。

20

30

【0083】

接合部は、また、類似の手法で常染色体上の変異に対してRMD分析にも使用可能であるが、 γ_1 と γ_2 の値の調節が必要である。例えば、染色体が父親から正常な染色体を受け継いでいると仮定して、胎児が拡大変異を受け継いでいる場合は、試料は母親と同じ比率を持つと思われる。このシナリオでは、 γ_1 の値は、 $k / (k + 1)$ となり、kは拡大変異により作られた追加の接合部の数であり、追加の接合部は、変異対立遺伝子として使用される（従って、重複または欠失に対しては、1つの変異対立遺伝子が存在し、3倍拡大に対しては、2つの変異対立遺伝子が存在する、等）。胎児が母親から正常な染色体を受け継いでいる場合は、 γ_2 の値は、 $k(1 - Pf) / [k + 1 + (1 - k)Pf]$ となる。

40

【0084】

図5Cは、妊娠対象が、目的の座位でホモ接合の場合に拡大を検出するための第2のシナリオを示す。拡大対立遺伝子および非拡大対立遺伝子が同じ（Aで示す）の場合、2つの接合部510は、同じであり（正常な部位での2つの対立遺伝子に対し）、また、追加の対立遺伝子のコピーの追加の（新規）接合部520は、これらの追加の対立遺伝子が、異なるゲノム部位にあると思われるため、異なる。追加の接合部は、変異対立遺伝子として使用可能であり、正常な接合部510は、正常対立遺伝子として使用可能である。追加

50

の対立遺伝子に対し、追加の接合部 5 2 0 の内の 1 つのみを使用することができる（重複に対しては 1 つのみが存在する）。このような実施形態では、 $p_1 = 1 / (3 - P f)$ ；および $p_2 = (1 - P f) / (3 - 2 P f)$ である。この式では 1 つの追加の接合部のみが使用されるため、追加のコピーの量は使用されないことに留意されたい。

【0085】

2 つ以上の追加の A のコピーがある場合は、使用される追加の接合部は、ユニークとなるように選択されるべきである（例えば、A の最後の拡大コピー後の接合部）。または、追加の接合部の全て（または 2 つ以上の一部の数）を合計し、正常な部位の 2 つの対立遺伝子の接合部と比較できる。このような実施形態では、 $p_1 = n / (n + 2 - P f)$ ；および $p_2 = n (1 - P f) / [n + 2 - P f (n + 1)]$ であり、n は、使用される新規接合部 5 2 0 の数である。この式中では、2 つ以上の接合部のみが使用されるため、追加のコピーの量が使用されることに留意されたい。接合部は、また、常染色体上の変異の場合と類似の方法で RMD 分析に対し使用できるが、 p_1 および p_2 の値は、調節が必要であると思われる。例えば、胎児が拡大変異（拡大）を受け継いでいる場合は、試料は、染色体が父親から変異を受け継いでいないことを仮定して、母親と同じ比率（例えば、重複に対しては 1 : 2）を持つであろう。このシナリオでは、 p_1 の値は、 $n / (n + 2)$ となり、n は、拡大変異により作られた追加の接合部の数である。胎児が母親からの正常な染色体を受け継いでいる場合には、値 p_2 は、 $n (1 - P f) / (n + 2 - n P f)$ 、となる。欠失および拡大を検出する別の手法は、以降で記載される。

10

【0086】

IV . 標的領域と参照領域

上述の RMD 法では、変異が欠失、拡大、挿入、または反転である場合、異なる接合部が対立遺伝子として使用できる。欠失および拡大（例えば、重複）変異に適用可能な別の手法は、標的領域（すなわち、欠失または拡大領域）から生じる分子の量を、参照領域から生じる分子の量と比較することである。欠失（または拡大）のない染色体 X 上のいずれのゲノム座位、例えば、欠失または拡大がない場合の ZFX 遺伝子も、参照座位 / 領域として使用可能である。

20

【0087】

参照領域由来の分子の数に対する標的領域由来の分子の数の比率（R）（または関連する量を表す他のいくつかのパラメータ）は、変異が受け継がれているか否かを判定するのに使用できる。欠失変異を有する非妊婦では、R の予測値は、0.5 である。理由は、X 染色体（正常対立遺伝子を有するもの）の半分のみが、血漿中の標的分子の量に寄与するからである。この欠失変異を有する女性が男児胎児を持つ妊婦の場合は、R の予測値は、男児胎児由来の 1 つの余分の X 染色体からの DNA の寄与により、0.5 から外れるであろう。R の予測偏差は、変異が欠失か、または拡大かどうかによって依存するであろう。

30

【0088】

図 6 は、妊婦の男児胎児が X 連鎖変異を有するかどうかを判定する方法 600 を説明するフローチャートである。妊婦は、X 染色体上の標的領域で、変異および正常対立遺伝子に対しヘテロ接合である。変異は、標的領域の欠失または拡大である。

【0089】

ステップ 610 では、複数の反応由来のデータが入手される。データは、方法 300 のステップ 310 で入手されたものと同じタイプであってよい。各反応は、妊婦由来および男児胎児由来の核酸分子を含む生物学的試料からの 1 つまたは複数の核酸分子を含む。データは、X 染色体上の標的領域由来の核酸分子の第 1 の量を示す第 1 の定量的データセット、および参照領域由来の核酸分子の第 2 の量を示す第 2 の定量的データセットを含む。量は、例えば、上述のステップ 310 用のような、種々の方法で計算できる。

40

【0090】

ステップ 620 では、パラメータが、第 1 の量および第 2 の量から決定される。パラメータは、第 1 と第 2 の量の間の相対量を表す。一実施形態では、パラメータは、第 2 の量に対する第 1 の量の比率 T である。他の実施形態は、本明細書記載のように、例えば、第

50

1の量を第1の量と第2の量の合計で除算したパラメータを使用できる。

【0091】

ステップ630では、生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージPfが得られる。パーセンテージPfは、本明細書記載のようにして計算できる。パーセンテージPfは、また、胎児特異的分子の計数用の分布補正（例えば、ポアソン補正）値から決定できる。

【0092】

ステップ640では、胎児が変異を受け継いでいるか否かを判定するための第1のカットオフ値が計算される。第1のカットオフ値は、パーセンテージPfに依存する。第1のカットオフ値計算用の特定の式は、変異が欠失であるか拡大であるかに依存する。

10

【0093】

ステップ650では、胎児が正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かを判定するための第2のカットオフ値が計算される。第2のカットオフ値は、パーセンテージPfに依存する。第1のカットオフ値計算用の特定の式は、変異が欠失であるか拡大であるかに依存する。

【0094】

ステップ660では、パラメータは、第1および第2のカットオフ値の内の少なくとも1つと比較され、胎児が変異または正常対立遺伝子を受け継いでいるか否かの分類が決定される。分類は、ステップ360と同じタイプでよく、例えば、罹患、非罹患、または未分類（または生のスコア）である。

20

【0095】

図7は、染色体X上の欠失および重複変異に対する標的および参照座位の間の遺伝子量不均衡を示す表700である。表700は、対立遺伝子不均衡度の計算を説明する。同じ欠失変異を有する非妊婦のRと比較した場合、Rの増加または減少は、それぞれ正常なまたは罹患した胎児を示すことができる。逆に、部分拡大、例えば、表700に示すような重複を有する非妊婦では、変異対立遺伝子由来の標的分子の2倍量の寄与により、Rの予測値は、1.5になるであろう。この重複変異を有する女性が妊婦の場合、Rの増加または減少は、同じ重複変異を有する非妊婦のRと比較すると、それぞれ、罹患または正常な胎児を示す。

【0096】

各シナリオのRの増加または減少の程度は、試料中の胎児DNA濃度比率（Pf）に依存する。一実施形態では、SPRT分析を使って、Rが、同じ変異を有する非妊婦女性に比べて、統計的に有意な増加であるか、または減少であるかを判定できる。SPRTの上方境界および下方境界（カットオフ値）を計算する式は類似の構造を有する：

30

$$\text{上方境界} = [(\ln 8)/N - \ln \quad] / \ln \quad ;$$

$$\text{下方境界} = [(\ln 1/8)/N - \ln \quad] / \ln \quad ;$$

$$\text{式中、} \quad = (1 - \theta_1) / (1 - \theta_2);$$

【数6】

40

$$\gamma = \frac{\theta_1(1-\theta_2)}{\theta_2(1-\theta_1)} ;$$

\ln は、自然対数を表す数学記号、すなわち、 \log_e ； N = 変異および参照分子の合計数；

θ_1 = 1つ目の対立仮説が真の場合（すなわち、同じ変異を有する非妊婦のRの値と比較して、 R_1 が増加する場合）の参照分子に対する標的分子の比率（ R_1 ）

θ_2 = 2つ目の対立仮説が真の場合（すなわち、同じ変異を有する非妊婦のRの値と比較して、 R_2 が減少する場合）の参照分子に対する標的分子の比率（ R_2 ）

50

である。

【0097】

μ_1 は、同じ変異を有する非妊婦の対応する比率に比べて、参照分子の量に対する標的分子の量の比率が増加する状況、例えば、欠失変異に対し正常なケース、または重複変異に対し変異のケースを表している。同様に、 μ_2 は、同じ変異を有する非妊婦の対応する比率に比べて、参照分子の量に対する標的分子の量の比率が低下する状況、例えば、欠失変異に対する変異のケース、または重複変異に対し正常なケースを表すことができる。

【0098】

一実施形態では、正常な(N)対立遺伝子を受け継いでいる男児胎児を有する妊婦から試料を入手したと仮定して、欠失変異に対し、 μ_1 が計算される。 μ_1 は、 $1 / (2 - Pf)$ であると判断される。変異(例えば、欠失変異を有する染色体X)を受け継いでいる男児胎児を有する妊婦から試料を入手したと仮定して、 μ_2 が計算される。 μ_2 は、 $(1 - Pf) / (2 - Pf)$ であると判断される。

10

【0099】

重複変異に対する別の実施形態では、変異(すなわち、重複変異を有する染色体X)を受け継いでいる男児胎児を有する妊婦から試料を入手したと仮定して、 μ_1 が計算される。

μ_1 は、 $(3 - Pf) / (2 - Pf)$ であると判断される。正常な(N)対立遺伝子を受け継いでいる男児胎児を有する妊婦から試料を入手したと仮定して、 μ_2 が計算される。

μ_2 は、 $(3 - 2 \times Pf) / (2 - Pf)$ であると判断される。どのレベルの拡大にも適応できる一般化された式は： μ_1 が、 $(n + 2 - Pf) / (2 - Pf)$ 、および μ_2 が、 $[n + 2 - Pf(n + 1)] / (2 - Pf)$ であり、式中、nは、拡大されたセグメントの追加コピーの数である。

20

【0100】

V. 胎児パーセンテージの決定

上述のように、特定の対立遺伝子(例えば、染色体Xに特異的および胎児特異的配列)の確率P(n)を使って、試料中の胎児DNAのパーセンテージ(Pf)を調節できる。この調節されたPfを使って、次に、変異または野性型対立遺伝子が受け継がれているか否かを判定するためのカットオフ値を計算できる。

【0101】

図8は、本発明の実施形態に従って、胎児を有する妊婦由来の生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージPfを得る方法800を示すフローチャートである。生物学的試料は、妊婦由来および胎児由来の核酸分子を含む。

30

【0102】

ステップ810では、データが複数の反応から入手される。各反応は、生物学的試料由来の複数の核酸分子を含む。一態様では、1つまたは複数の対立遺伝子が反応中に存在し、反応が、特定の対立遺伝子に対して陽性であると考えられる場合は、反応は、どのタイプであってもよい。

【0103】

ステップ820では、反応中の第1の対立遺伝子が検出される。第1の対立遺伝子は、妊婦がホモ接合で、胎児がヘテロ接合または半接合のいずれかである座位で、母親と胎児の間で共有される。一実施形態では、第1の対立遺伝子は、X染色体である。

40

【0104】

ステップ830では、第1の対立遺伝子の補正濃度Pxが第1の対立遺伝子に対する陽性の反応の数に基づいて計算される。Pxは、複数の反応における第1の対立遺伝子の予想される統計分布で補正される。例えば、Pxは、ポアソン分布に基づいて補正できる。一実施形態では、母親と胎児により共有された第1の対立遺伝子(母親がホモ接合で、胎児がヘテロ接合または半接合のいずれか)に対する第1の補正濃度が、例えば、 $[-\ln((N - P1) / N)] * N$ のように計算される。式中Nは、分析された反応チャンパーの合計数、P1は、第1の対立遺伝子に対し陽性のチャンパー数、およびlnは自然対数

50

である。

【0105】

ステップ840では、胎児に特異的な第2の対立遺伝子が検出される。一実施形態では、胎児が男児胎児の場合、第2の対立遺伝子は、Y染色体上にある。別の実施形態では、胎児特異的対立遺伝子は、常染色体上の父系遺伝性対立遺伝子である。さらに別の実施形態では、胎児特異的対立遺伝子は、胎児特異的メチル化マーカ-を含む。

【0106】

ステップ850では、第2の対立遺伝子の補正濃度 P_y は、第2の対立遺伝子に対し陽性の反応の数に基づいて計算される。 P_y は、複数の反応における第2の対立遺伝子の予測統計分布で補正される。例えば、 P_y は、ポアソン分布に基づいて補正できる。一実施形態では、胎児がヘテロ接合または半接合性である胎児特異的対立遺伝子に対する第2の補正濃度は、 $[-\ln((N - P_2) / N)] * N$ により計算できる。式中、 N は、分析反応チャンパーの合計数、 P_2 は、胎児特異的対立遺伝子に対し陽性のチャンパー数、および \ln は自然対数である。

【0107】

ステップ860では、生物学的試料中の胎児核酸分子のパーセンテージ P_f は、 $[(2P_y) / (P_x + P_y)]$ を使って計算され、これは小数値を与える。胎児DNAパーセンテージは、式： $[(2P_2) / (P_1 + P_2)] * 100\%$ 、を使って計算できる。

【0108】

VI. 実施例

血友病のキャリアであり、男児胎児を有する妊婦である7人の女性(3人は、血友病Aのキャリア、4人は、血友病Bのキャリア)をRoyal Free Hospital、London、UKから集めた。我々は、また、それぞれ単生児の健康な男児胎児を有する20人の妊婦(血友病ノンキャリア)を集めた。その内の10人は、Royal Free Hospital、London、UKから、残りは、Prince of Wales Hospital、Hong Kongから集めた。本件の臨床情報を図9の表900に示すが、この表は、血友病変異のキャリアである7人の妊婦の臨床情報である。

【0109】

全ての女性は、インフォームドコンセントで同意の上、集めた。倫理的承認はそれぞれの組織の委員会から取得した。妊婦から10mLの末梢血試料をEDTAチューブに集めた。血友病キャリア妊婦の内の5人に対し、妊娠の間に2回、末梢血試料を採取した(表900)。この調査で、どの血友病キャリア妊婦も侵襲的出生前検査を受けなかった。胎児の性別および血友病状態は、出産後確認された。Hong Kongで採用された10人の非罹患妊婦に対しては、出産後、胎盤の組織も集めた。

【0110】

我々は、血液サンプルを1600g、4で10分間、遠心分離した。血漿部分を、1600g、4で10分間、再遠心分離した。母体血漿およびパフィコート試料をさらに処理するまで-20で貯蔵した。英国で集めた全試料を、処理し、その場所で、凍結貯蔵し、ドライアイスの上に載せ、Hong Kongに輸送した。我々は、QIAamp DSP DNA Blood Miniキット(Qiagen)を使って、メーカーのインストラクションに従って、母体血漿からDNAを抽出した。Illustra DNA Extractionキット(GE Healthcare)を使ってメーカーのプロトコルに従い、パフィコートDNAを抽出した。

【0111】

rs6528633 SNPおよび血友病変異の遺伝子型同定

RMD法の可能性を評価するために、我々は、染色体X上のSNP(rs6528633)を調査した。このSNPは、例示目的で選択されたが、他のSNPも使用可能である。胎児と母体のSNP遺伝子型が、それぞれ、胎盤および母体パフィコート試料由来のDNAを使って決定された。以前記載のように、MassARRAY homogenous MassEXTEND(hME)アッセイ(Sequenom)を使って、遺伝子型同

10

20

30

40

50

定を行った (Tsui NBY, Chiu RWK, Ding C, et al., Clin Chem., 51:2358-2362 (2005); Tsui NBY, Chiu RWK, Ding C, et al., Clin Chem., 51:2358-2362 (2005))。血友病キャリア妊婦の末梢血試料から得たゲノムDNAを使って、血友病変異検出を行った。コード領域、イントロン/エキソン境界、プロモーターおよび3'UTRを含む全エキソンに対しPCRを行った。Big Dye Terminators V1.1 (Applied Biosystems) を使ってサイクルシーケンス法を行い、Applied Biosystems 3100 Avant Genetic Analyserで解析した。

【0112】

母体血漿分析用デジタルRMD反応

デジタルRMDの実験ワークフローは、本発明の特定の実施形態に従って、図4で説明されている。我々は、以前記載のデジタルZFY/Xアッセイを使って、母体血漿試料中の胎児DNA濃度比率を測定した。このアッセイは、染色体YおよびX上に位置する、それぞれ、相同ZFYおよびZFX遺伝子座位を定量化した (Lun FMF et al., Clin Chem., 54:1664-1672 (2008); Lun FMF, Tsui NBY, Chan KCA, et al., Proc Natl Acad Sci USA., 105:19920-19925 (2008))。rs6528633 SNPに対しては、2つの対立遺伝子特異的TaqManプローブ (Applied Biosystems) を使ったリアルタイムPCRアッセイを設計し、2つのSNP対立遺伝子を識別した。血友病の危険がある妊婦の場合の変異に対しては、それぞれの変異に対し、対立遺伝子識別のためのリアルタイムPCRアッセイを設計した。各アッセイには、変異および野生型対立遺伝子用の2つの対立遺伝子特異的TaqManプローブを含めた。プライマーおよびプローブ配列は、図10の表1000に列挙した。この表は、対立遺伝子判別可能アッセイ用のオリゴヌクレオチド配列およびリアルタイムPCR条件を示す。他の実施形態では、胎児DNA濃度比率は、母体血漿中の胎児および母体DNAの間で異なるようにメチル化された配列を使うことにより測定できる (例えば、Chim SS et al., Proc Natl Acad Sci USA., 102:14753-14758 (2005); Chan KCA et al., Clin Chem., 52:2211-2218 (2006)、を参照)。

【0113】

我々は、BioMark System (Fluidigm) 上で、12.765 Digital Arrays (Fluidigm) を使ってデジタルPCR分析を行った (Lun FMF et al., Clin Chem., 54:1664-1672 (2008))。デジタルアレイ上の12パネルの内の6つを各DNA試料用に使ったが、これは4590の個別のPCRに相当する。1試料 (6パネル) に対する反応を、2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使って、52μLの反応容量で設定した。反応の設定は、図10の表1000に挙げたプライマーとプローブ組成物を使って、メーカーのプロトコルに従って行った。各反応混合物には、18.2μLのDNA試料を含めた。反応混合物は、NanoFlex IFC Controller (Fluidigm) により、自動的にデジタルアレイにロードされた。反応をBioMark System (Fluidigm) 上で行った。反応は、50℃、2分間で開始し、続けて、95℃、10分間、および95℃、15秒を45サイクル、およびアッセイ特異的アニール温度 (図10表3) で1分間、行った。1回の4590ウエルデジタルPCRセットからのデータによるRMDで未分類のまま残された試料に対しては、遺伝子型判定がなされるまで、追加の4590ウエルデジタルPCRセットを実施した。

【0114】

結果

X連鎖多形のためのデジタルRMDの原理

10

20

30

40

50

実施形態は、男児胎児を有するヘテロ接合の妊婦の血漿中の変異および野性型対立遺伝子の合計量（母体 + 胎児由来）の間の濃度差を測定するデジタルPCRを使用できる。男児胎児は、単一の染色体Xを有するので、野性型および変異対立遺伝子の間の相対的濃度は、常に遺伝子量不均衡状態にある（図2A）。変異対立遺伝子の過剰または過小発現量は、罹患または正常な胎児を、それぞれ表す。我々は、遺伝子量不均衡の試験にSPRTを使用した。1対のSPRT曲線を生成した（図2B）。上方曲線を越える、または下方曲線より小さいデータポイントの試料は、罹患または正常として、それぞれ、分類された。2つの曲線の間の中間のデータポイントの試料は、不十分な統計的検出力のために分類されず、追加のデジタルPCRが行われるであろう。

【0115】

染色体X上のSNPの胎児遺伝子型の非侵襲的測定

我々は、染色体X上のSNP：rs6528633（A/T多型）をモデルとして使用して、染色体X上の座位の胎児遺伝子型測定に対するRMD法の実用上の可能性を評価した。現在のRMD分析は、危険性のある妊婦、すなわち、染色体X上の変異に対しヘテロ接合で、男児胎児を有する妊婦の場合に適する。従って、我々は、染色体X上のSNPに対しヘテロ接合で、男児胎児を有する10人の妊婦由来の血漿試料を調査した。我々は、対立遺伝子判別可能デジタルリアルタイムPCRアッセイを開発し、各試料中のA - およびT - 対立遺伝子の濃度を測定した。我々は、さらに、胎児DNA濃度比率をZFY/Xアッセイで測定した。デジタルRMDの結果を図11の表1100に示す。この表は、デジタルRMDによる、母体血漿中のrs6528633の胎児遺伝子型同定を示す。

【0116】

全ての場合に、胎児SNP遺伝子型はSPRT分類と一致した。胎児DNA濃度比率（表1100中の胎児%）は、5% ~ 24%の範囲であった。従って、結果は、デジタルRMD戦略の可能性を立証した。

【0117】

DNA混合物中の血友病変異検出用デジタルRMD

次に、我々は、デジタルRMD法を血友病変異検出に適用した。我々は、F8遺伝子中の3つの変異、F9遺伝子中の4つの変異およびそれらの対応する野性型カウンターパートを検出するための7種のデュプレックスデジタルリアルタイムPCRアッセイを開発した。我々は、大部分の母体DNA背景中の少数の男児胎児DNA成分を含む母体血漿試料の組成を模擬した人工DNA混合物を形成することにより、デジタルPCRアッセイの性能を評価した。我々は、対応する変異に対しヘテロ接合の女性から入手した血液細胞DNAを有する非罹患男児胎児由来の10%または20%の胎盤のDNAを混合した。図12は、人工DNA混合物を使ったデジタルRMDアッセイの検証を示す。人工混合物は、母体血漿中の胎児および母体DNA組成物をシミュレートするように作成された。図12の表1200に示すように、全てのDNA混合物で、デジタルRMD分析により、母体血漿中の胎児DNAを模倣した胎盤DNAの遺伝子型が正しく検出された。

【0118】

母体血漿中の胎児血友病変異の検出

我々は、母体血漿DNA分析による血友病変異の胎児遺伝子型の検出用にデジタルRMD法を試験した。我々は、原因である変異に対しヘテロ接合の7人の妊婦から入手した12の血漿試料でデジタルPCRを行った（表900）。全ケースとも、男児胎児を含んでいた。我々は、また、ZFY/Xアッセイにより、母体血漿試料中の胎児DNA濃度比率を測定した。デジタルRMD結果を図13の表1300に示す。この表は、デジタルRMDによる母体血漿中の胎児血友病変異の非侵襲的検出を示す。

【0119】

胎児遺伝子型は、全調査ケースでSPRTアルゴリズムにより正しく分類された（図14）。これらのケースの内、3つ（H26a、H25aおよびH12a）で、胎児DNA比率が、10%未満であった。従って、変異および野性型対立遺伝子の量の間の定量的差異の程度があまりにも小さく、4590ウエルデジタルPCRセットからのデータでは

10

20

30

40

50

、分類されなかった。従って、分類できるまで、追加の4590ウエルデジタルPCRセットの試験を行った。

【0120】

対照として、我々は、5人の正常な妊婦から入手した母体血漿試料についても、それぞれ変異特異的アッセイを使って調査した。図15は、正常な妊娠由来の母体血漿試料に対するデジタルRMD結果を示す。図15の表1500に示すように、ほとんどの場合、変異対立遺伝子は検出されなかった。35例の調査母体血漿の内の6例における、変異対立遺伝子を含む陽性のウエルは、実験の陽性のウエル合計数の0.3%未満であった。これらの陽性シグナルは、PCR中の蛍光プローブのクロスハイブリダイゼーションから生じた可能性がある。それにもかかわらず、このような少ない変異体陽性のウエルの数が、SPTによるRMD分類を変えてしまうほどには、変異および野性型対立遺伝子の間の対立遺伝子比率を偏らせることはないであろう。

10

【0121】

考察

この調査で、我々は、血友病を一例として使って、X連鎖疾患の危険のある妊娠の男児胎児に保有されている原因変異を直接検出する非侵襲的出生前診断法を開発した。染色体X上の遺伝子座位に対しデジタルRMD手法を使用することにより、我々は、7人の血友病キャリア妊婦(表1300)由来の12の調査母体血漿試料の全てで、男児胎児が受け継いでいる変異または野性型対立遺伝子を正確に同定した。胎児遺伝子型は、妊娠の11週目(表900)の早期に検出できる可能性があり、この方法が早期診断への適用に有望であることを証明した。染色体X上の標的領域および参照領域を使う方法も利用できる。

20

【0122】

この非侵襲的出生前変異検出方法は、既存の非侵襲的胎児性別判定検査と組み合わせて、数侵襲的診断検査が必要とされる危険性のある妊婦の症例の数をさらに最小にできる可能性がある。特定の罹患胎児は、その後の別の侵襲的出生前検査を考慮しなくてもよくなり、妊婦の産科管理を容易にすることができよう。血友病乳児の3~4パーセントが分娩と出産の間に起こる頭蓋出血を経験する(Kulkarni R, Lusher JM, J Pediatr Hematol Oncol., 21:289-295(1999))。長期の分娩と難しい器械分娩がこの合併症の主要な危険因子であり(Kadir RA et al., Haemophilia., 6:33-40(2000); Chi C et al., Haemophilia., 14:56-64(2008))、これらは罹患胎児の出産に対しては、避けられるべきである(Lee CA, Chi C, Pavord SR, et al., Haemophilia., 12:301-336(2006))。また、罹患胎児は、関連血友病センターを備えた三次医療施設(tertiary unit)で出産し、患者の管理に必要な専門知識と資源の利用を確実にすることが推奨されている(Lee CA, Chi C, Pavord SR, et al., Haemophilia., 12:301-336(2006))。最近、出生前早期検査に関連する胎児喪失の危険性を受け入れようとしない両親に対し、第三期羊水穿刺による出生前診断が出産方法と場所の適切な計画を支援するとして勧められている(Lee CA, Kadir RA, Kouides PA, eds. Inherited Bleeding Disorders in Women, Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 122-148(2009))。胎児が非罹患である場合は、分娩と出産は、何ら制限なく地域の産科病棟で管理できる。しかし、第三期羊水穿刺は、侵襲的方法でもあり、潜在的リスクと合併症に関連している(Hodor JG, Poggi SH, Spong CY, et al., Am J Perinatol., 23:177-180(2006); O'Donoghue K et al., Prenat Diagn., 27:1000-1004(2007))。胎児DNA濃度は、妊娠の第三期の間に最大となり(Lun FMF et al., Clin Chem., 54:1664-1672(2008))、従って、実施

30

40

50

形態は、この目的に対し、第三期羊水穿刺に代わる的確な非侵襲的選択肢を提供できる。

【0123】

V I I . コンピュータシステム

本明細書に記載のいずれのコンピュータシステムでも、どのような適切な数のサブシステムの利用も可能である。このようなサブシステムの例を、図16のコンピュータ装置1600に示す。一部の実施形態では、コンピュータシステムは、単一コンピュータ装置を含み、この場合、サブシステムは、コンピュータ装置の構成要素でありうる。他の実施形態では、コンピュータシステムは、複数のコンピュータ装置を含み、それぞれが内部構成要素を含むサブシステムであってもよい。

【0124】

図16に示すサブシステムは、システムバス1675を介して相互接続される。例えば、プリンター1674、キーボード1678、固定ディスク1679、ディスプレイアダプター1682に接続されたモニタ1676、等の追加のサブシステム、が示されている。I/O制御装置1671に接続された周辺装置および入/出力(I/O)装置を、当技術分野で既知の任意の数のシリアルポート1677、等の手段によりコンピュータシステムに接続できる。例えば、シリアルポート1677または外部インターフェイス1681を使って、コンピュータシステム1600をインターネット等の広域ネットワーク、マウス入力装置、またはスキャナーに接続できる。システムバス1675を介した相互接続は、中央処理装置1673のそれぞれのサブシステムとの通信、およびシステムメモリー1672または固定ディスク1679からの命令の実行の制御、ならびにサブシステム間の情報交換の制御を可能とする。システムメモリー1672および/または固定ディスク1679は、コンピュータ可読メディアを組み入れることができる。本明細書に記載のいずれの値も、1つの装置から別の装置に出力でき、また、ユーザーにも出力できる。

【0125】

コンピュータシステムは、例えば、外部インターフェイス1681または内部インターフェイスにより接続された複数の同じ装置またはサブシステムを含むことができる。一部の実施形態では、コンピュータシステム、サブシステム、または装置は、ネットワークを介して通信できる。このような場合は、1つのコンピュータをクライアント、別のコンピュータをサーバーと見なすことができ、この場合、それぞれは、同じコンピュータシステムの一部となりうる。クライアントおよびサーバーは、それぞれ複数のシステム、サブシステム、または装置を含んでもよい。

【0126】

本発明のいずれの実施形態も、モジュールまたは集積方式のハードウェアおよび/またはコンピュータソフトウェアを使った制御論理の形で実装できることは理解されよう。本明細書で提供される開示と教示に基づいて、当業者なら、ハードウェアおよびハードウェアとソフトウェアの組み合わせを使って、本発明の実施形態を実施する他の手段、および/または方法を知り、理解するであろう。

【0127】

本出願に記載のいずれのソフトウェア成分または機能も、例えば、Java、C++またはPerl等のいずれかの適切なコンピュータ言語を使い、例えば、従来の、またはオブジェクト指向技術を使って、プロセッサにより実行されるソフトウェアコードとして実装可能である。ソフトウェアコードは、保存、および/または送信用のコンピュータ可読メディア上の一連の指令または命令として保存できる。適切なメディアには、ランダムアクセスメモリー(RAM)、読取り専用メモリー(ROM)、ハードドライブもしくはフロッピーディスク、等の磁気メディア、またはコンパクトディスク(CD)もしくはDVD(デジタル多用途ディスク)等の光学メディア、フラッシュメモリー、等が含まれる。コンピュータ可読メディアは、このような保存または送信装置のいずれかの組み合わせであってもよい。

【0128】

このようなプログラムは、また、インターネットを含む種々のプロトコルに準拠した有

10

20

30

40

50

線、光学、および/または無線ネットワークを介した送信に適応したキャリアシグナルを使って、コード化および送信できる。従って、本発明の実施形態によるコンピュータ可読メディアは、このようなプログラムでコードされたデータシグナルを使って作成できる。プログラムコードでコードされたコンピュータ可読メディアは、互換性のある装置と一緒にパッケージされても、または他の装置から別々に（例えば、インターネットのダウンロードで）提供されてもよい。いずれのこのようなコンピュータ可読メディアも、単一コンピュータプログラム製品（例えば、ハードドライブ、CD、または全体コンピュータシステム）上にあっても、内部にあってもよく、また、システムまたはネットワーク内の異なるコンピュータプログラム製品の上にあっても、内部にあってもよい。コンピュータシステムは、モニタ、プリンター、または本明細書記載のいずれかの結果をユーザーに提供するための他の適切なディスプレイを含んでもよい。

10

【0129】

本明細書記載の方法のいずれかは、全体的に、または部分的、ステップを実行するように構成できる、プロセッサを含むコンピュータシステムを使って行うことができる。従って、実施形態は、本明細書記載の方法のいずれかのステップを実行するように構成され、場合によっては、それぞれのステップまたはそれぞれのステップ群を実行する異なる装置を備えた、コンピュータシステムを対象にできる。番号を付けたステップとして示したが、本明細書にある方法のステップは、同時にまたは異なる順で行うことができる。さらに、これらのステップの一部は、他の方法由来の他のステップの一部と一緒に使用できる。また、全部または一部のステップは、任意に選択できる。さらに、いずれかの方法のいずれかのステップは、モジュール、回路、またはこれらのステップを実行する他の手段と一緒に行うことができる。

20

【0130】

特定の実施形態の特定の詳細は、本発明の実施形態の趣旨および範囲を逸脱することなく、いずれかの適切な方法で組み合わせることができる。しかし、本発明の他の実施形態は、それぞれの個別態様、またはこれらの個別態様の特定の組み合わせ、に関連する具体的実施形態を対象にできる。

【0131】

本発明の代表的実施形態の上記説明は、例示と説明の目的で提示されてきた。それは、網羅的とする意図、または本発明を記載された通りの形態に限定する意図はなく、上記教示を考慮すると多くの修正及び変形が可能である。実施形態は、本発明の原理およびその実際の適用を最良に説明し、それにより、種々の実施形態で、特定の意図された用途に適合されるように種々の変形を用いて、他の当業者が本発明を最良に利用するのを可能とするように選択および記載された。

30

【0132】

特に逆の指示がなければ、「a」、「an」または「the」の記述は、「1つまたは複数の」を意味することが意図されている。

【0133】

全ての特許、特許出願、出版物、および上述の記載は、参照によってその全体が、あらゆる目的において、本明細書に組み込まれる。これらのいずれも先行技術であることを認めるものではない。

40

【 図 1 】

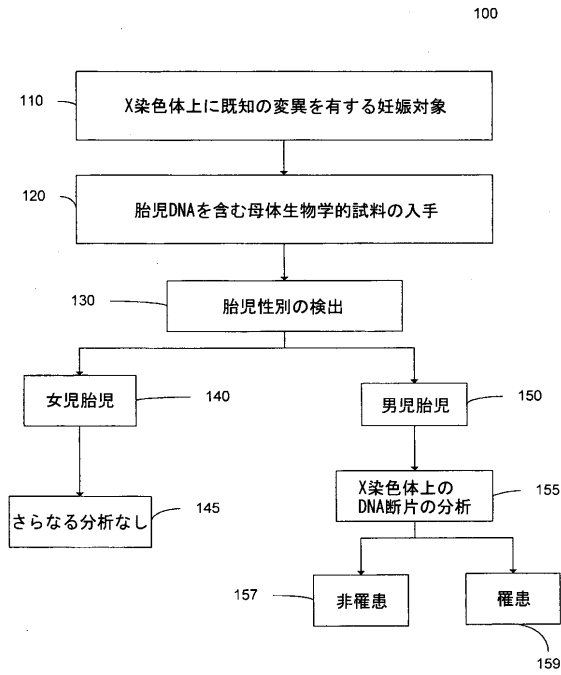


FIG. 1

【 図 2 】

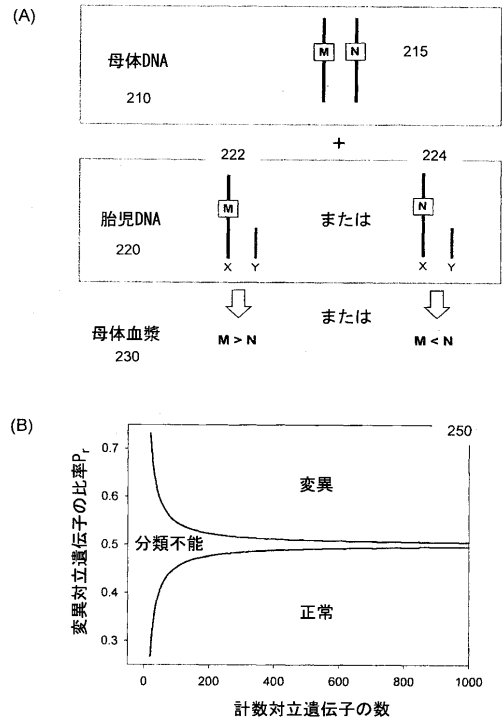
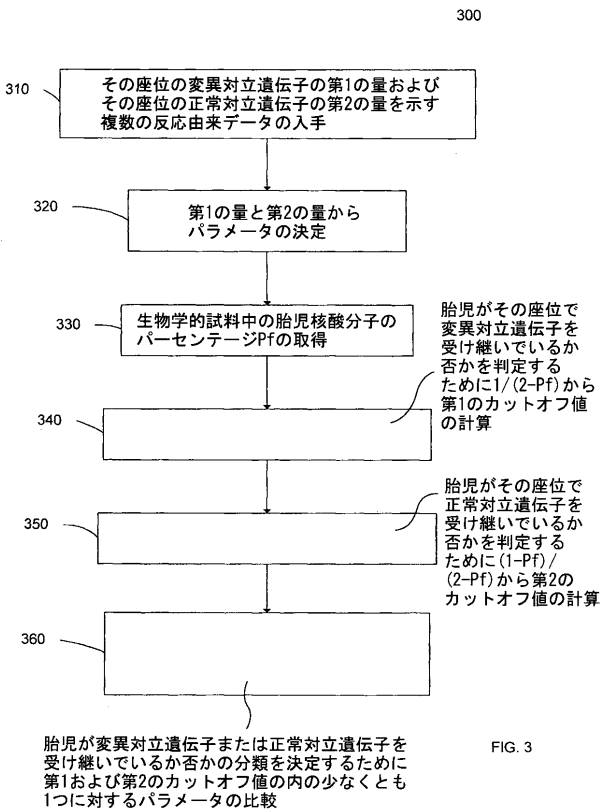
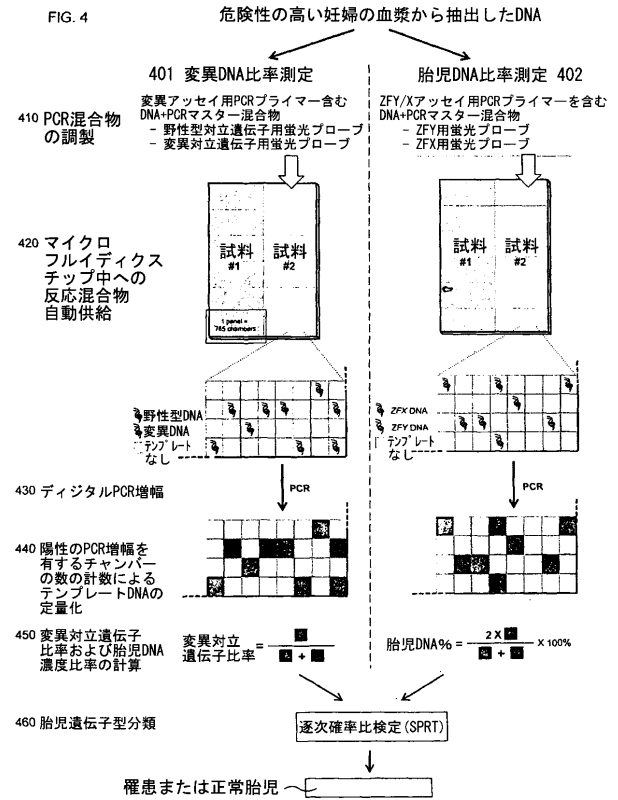


FIG. 2

【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 A 】

500

疾患タイプ	母体遺伝子型	胎児遺伝子型	母体血清中の合計DNA対立遺伝子=100GE 胎児DNA/ハーセンテージ=10%				M : N比率
			母体由来対立遺伝子 総母体対立遺伝子=90GE M(コピー) N(コピー)	胎児由来対立遺伝子 総胎児対立遺伝子=10GE M(コピー) N(コピー)	母体由来対立遺伝子 総母体対立遺伝子=100GE M(コピー) N(コピー)	(母体+胎児)対立遺伝子 M(コピー) N(コピー)	
X連鎖疾患			90 ²	0 ²	90	100	0.90 : 1
			90	10	100	90	1.11 : 1

1 計算の説明上、10%胎児DNAを有する合計100GEのDNAを含む母体血漿試料を使用した
2 母体ゲノムでは、1GEは、2コピーの対立遺伝子、すなわち、MおよびN対立遺伝子のそれぞれ1つずつのコピーを含む
3 胎児ゲノムでは、1GEは、1コピーのX連鎖対立遺伝子、すなわち、MまたはN対立遺伝子のいずれか1つのコピーを含む
GE : ゲノム当量、M : 変異対立遺伝子、N : 野生型対立遺伝子

FIG. 5A

【 図 5 B 】

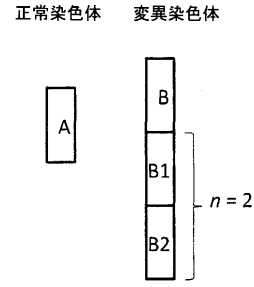


FIG. 5B

【 図 5 C 】

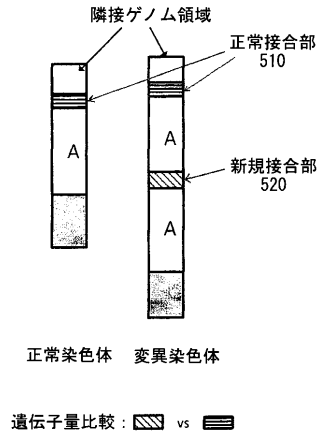


FIG. 5C

【 図 6 】

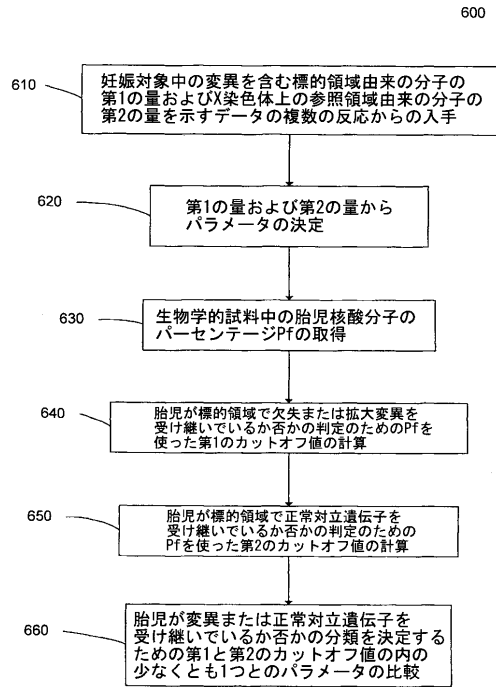


FIG. 6

【 図 1 1 】

試料	妊娠 (週)	SNP遺伝子型 ¹		ディジタルPCRの結果			胎児 % ³	m ³	SPRT 分類 ⁵
		母親	胎児	合計 ウエル数	A計算 ²	T計算 ²			
M5193P	17 3/7	AT	A	4590	410	335	7.5	0.09	A
M5290P	17 4/7	AT	A	4590	204	144	10.7	0.05	A
M5269P	19 2/7	AT	T	4590	337	409	11.2	0.08	T
M5297P	19 3/7	AT	A	13770 ⁶	1482	1368	5.4	0.11	A
M5244P	22 6/7	AT	T	4590	139	163	8.5	0.03	T
M5240P	38 2/7	AT	T	4590	396	484	23.7	0.09	T
M5241P	38 2/7	AT	T	4590	706	920	13.9	0.17	T
M4817P	38 4/7	AT	A	4590	502	425	17.2	0.12	A
M4847P	39 3/7	AT	A	4590	379	312	14.9	0.09	A
M4846P	40	AT	A	4590	700	516	17.5	0.17	A

¹SNP遺伝子型は、質量分析により決定された。
²Aの数は、対立遺伝子に対する陽性のウエル数、Tの数は、対立遺伝子に対し陽性のウエルの数。
³Aの数は、対立遺伝子に対する陽性のウエル数、Tの数は、対立遺伝子に対し陽性のウエルの数。
⁴胎児DNAパーセンテージは、ディジタルZY/Aッセイにより決定された。
⁵PCRウエル当たりの平均参照テンプレート濃度。参照テンプレートは、各試料中であり、少ない数の対立遺伝子とした。
⁶SPRTによる胎児遺伝子型の分類。
⁷M5297P(巻線標)は、1回目の4590ウエルディジタルPCRセット由来のデータを、SPRTでは、未分類であった。2回目の追加の4590ウエルディジタルPCRセットを行った後に、分類が可能であった。

【 図 1 3 】

血漿 試料	胎児血友病 状態	ディジタルPCRの結果		胎児 % ²	m ³	SPRT 分類 ⁴
		合計 ウエル数	変異体数 ¹ 野性型数 ¹			
H9	罹患	4590	1022 801	14.8	0.19	変異体
H28a	非罹患	9180	1590 1710	3.8	0.21	野性型
H26b	非罹患	4590	590 650	6.8	0.15	野性型
H15a	罹患	4590	573 435	10.5	0.10	変異体
H15b	罹患	4590	2506 1956	10.7	0.56	変異体
H17	非罹患	4590	329 342	14.0	0.08	野性型
H30a	非罹患	4590	611 780	18.2	0.19	野性型
H30b	非罹患	4590	1839 2017	11.4	0.58	野性型
H25a	罹患	9180	1160 1108	4.6	0.13	変異体
H25b	罹患	4590	223 166	15.0	0.04	変異体
H12a	罹患	9180	511 464	9.0	0.05	変異体
H12b	罹患	4590	293 230	25.1	0.05	変異体

¹変異体数：変異対立遺伝子に対する陽性のウエルの数、野性型数：野性型対立遺伝子に対する陽性のウエルの数。
²胎児DNAパーセンテージは、ディジタルZY/Aッセイにより決定された。
³PCRウエル当たりの平均参照テンプレート濃度。参照テンプレートは、各試料中であり、少ない数の対立遺伝子とした。
⁴SPRTによる胎児遺伝子型の分類

FIG. 13

【 図 1 2 】

変異	胎児DNA パーセンテージ ¹		ディジタルPCRの結果		m ³	SPRT 分類 ⁴
	合計 ウエル数	変異体数 ²	野性型数 ²	野性型数 ²		
F8	20%	4590	1495	1721	0.47	野性型
c.826G>A	10%	4590	2917	3006	1.06	野性型
F8	20%	4590	406	507	0.12	野性型
c.1171C>T	10%	4590	435	483	0.11	野性型
F8	20%	4590	485	593	0.14	野性型
c.6278A>G	10%	4590	857	892	0.22	野性型
F9	20%	4590	88	109	0.02	野性型
c.3011T>A	10%	4590	1640	1740	0.48	野性型
F9	20%	4590	375	463	0.11	野性型
c.874delC	10%	4590	388	438	0.10	野性型
F9	20%	4590	308	365	0.05	野性型
c.1144T>C	10%	4590	380	408	0.04	野性型
F9	20%	4590	673	835	0.20	野性型
c.1069G>A	10%	4590	966	1046	0.26	野性型

¹胎児DNAは、指定パーセンテージで母体DNAと混合された。胎児DNAは、正常な男児胎児の胎盤から採取した。母体DNAは、対応する変異に対しヘテロ接合の妊婦血液細胞から採取した。
²変異体数：変異対立遺伝子に対し陽性のウエルの数、野性型数：野性型対立遺伝子に対し陽性のウエルの数。
³PCRウエル当たりの平均参照テンプレート濃度。参照テンプレートは、各試料中であり、少ない数の対立遺伝子とした。
⁴人混合物中の正常な胎盤DNAにより模倣された「胎児遺伝子型」のSPRT分類。

FIG. 12

【 図 1 4 】

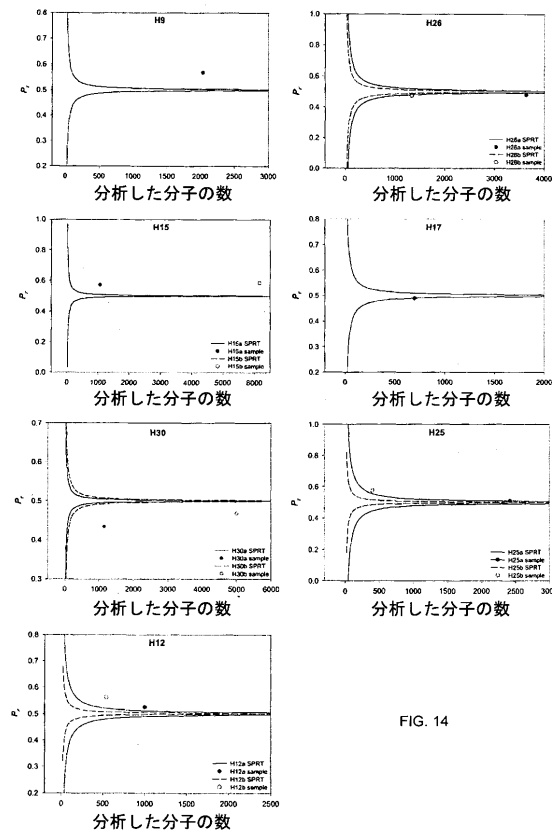


FIG. 14

1300

1200

【 図 1 5 】

1500

変異	血漿試料	妊娠 (週)	デジタルPCRの結果			胎児 % ³
			合計 ウエル数	変異体数 ^{1,2}	野性型数 ¹	
F8 c.826G>A	N1P	26	4590	0	589	12.8
	N10P	36	4590	0	1541	17.9
	N11P	28	4590	0	587	10.0
	N17P	39	4590	0	2476	16.9
	N21P	30	4590	0	763	10.3
F8 c.1171C>T	N1P	26	4590	0	575	12.8
	N10P	36	4590	0	1346	17.9
	N11P	28	4590	0	583	10.0
	N17P	39	4590	1	2202	16.9
	N21P	30	4590	0	640	10.3
F8 c.6278A>G	N2P	37	4590	0	1584	14.0
	N3P	35	4590	0	737	18.3
	N11P	28	4590	0	406	10.0
	N13P	42	4590	0	587	29.8
	N19P	36	4590	0	623	18.6
F9 c.802T>A	N1P	26	3825	0	261	12.8
	N10P	36	4590	0	814	17.9
	N11P	28	4590	0	410	10.0
	N17P	39	4590	0	1406	16.9
	N21P	30	4590	0	549	10.3
F9 c.874delC	N1P	26	4590	0	457	12.8
	N10P	36	4590	0	1244	17.9
	N11P	28	4590	0	551	10.0
	N17P	39	4590	0	1767	16.9
	N21P	30	4590	0	606	10.3
F9 c.1069G>A	N2P	37	4590	0	2124	14.0
	N3P	35	4590	0	990	18.3
	N11P	28	4590	0	483	10.0
	N17P	39	4590	1	2112	16.9
	N21P	30	4590	1	708	10.3
F9 c.1144T>C	N1P	26	4590	1	613	12.8
	N10P	36	4590	0	1132	17.9
	N11P	28	4590	1	602	10.0
	N17P	39	4590	0	1808	16.9
	N21P	30	4590	2	597	10.3

¹変異体数：変異対立遺伝子に対する陽性のウエルの数、野性型数：野性型対立遺伝子に対する陽性のウエルの数。

²一部の事例では、変異対立遺伝子に対し陽性の1または2つのウエルがあった。これは、野性型アンプリコンに対する変異蛍光プローブのクロスハイブリダイゼーションに起因する可能性がある。

³胎児DNAパーセンテージは、デジタルZF/Y/Xアッセイにより決定された。

FIG. 15

【 図 1 6 】

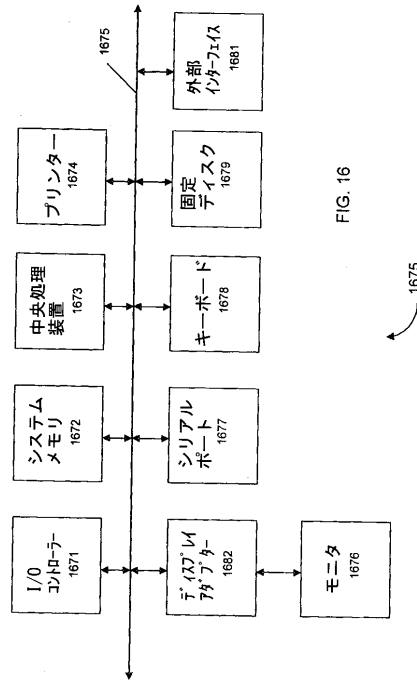


FIG. 16

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2012/000015
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
<i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G06F 19/00</i> (2011.01)		
Action Date: 26 April 2012		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, BIOTECHABS, WPI, EPODOC (pregnant, impregnated, prenatal, maternal, antenatal, fetus, X-linked, X chromosome, sex-linked, classified, quantitative, percentage, ratio, statistical, calculate, nucleic acid, DNA, RNA, mutation, allele, loci, polymorphism, genotype, heterozygous, hemizygous, homozygous, cell-free, extra-cellular, circulating, plasma, serum, relative mutation dosage, hemophilia, muscular dystrophy; and other synonyms and like terms)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LUN, F. M. F. et al., "Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 16 December 2008, Vol. 105, No. 50, pages 19920-19925 See whole document especially Abstract	
A	CHIU, R. W. K. and LO, Y. M. D., "Application of fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal diagnosis", Expert Review of Molecular Diagnostics, January 2002, Vol. 2, No. 1, pages 32-40 See whole document	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 26 April 2012	Date of mailing of the international search report 27 April 2012	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999	Authorized officer DAMIAN TRIFFETT AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2845	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2012/000015

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	TSUI, N. B. Y. et al., "Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA", Blood, 31 March 2011, Vol. 117, No. 13, pages 3684-3691 See whole document especially Abstract	1-32

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H, U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . J A V A

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ユク ミン デニス ロ

中華人民共和国, 香港, カオルーン, ホマンティン, キング タク ストリート 7, フォース
フロア

(72)発明者 ワイ クン ロッサ チウ

中華人民共和国, 香港, ニューテリトリーズ, シャーティン, マ ロク パス 52 ダブル ヘ
イブン, ハウス 31

(72)発明者 チャン クワン チー

中華人民共和国, 香港, カオルーン, メイ フー サン チュン, ブロードウェイ ストリート,
ブロック 34, 13 / エフ, フラット エー

(72)発明者 ツィ ボ イン

中華人民共和国, 香港, ニューテリトリーズ, マ オン シャン, ベイショア タワーズ, ブロッ
ク 3, 2 / エフ, ルーム エイチ

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA12 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR32 QR56 QR62 QS25

QS34 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014507134A5	公开(公告)日	2014-09-04
申请号	JP2013547929	申请日	2012-01-05
[标]申请(专利权)人(译)	香港中文大学		
申请(专利权)人(译)	中国的大学香港		
[标]发明人	ユクミンデニスロ ワイクンロツサチウ チャンクワンチー ツイボイン		
发明人	ユク ミン デニス ロ ワイ クン ロツサ チウ チャン クワン チー ツイ ボ イン		
IPC分类号	C12Q1/68 G06F19/18 G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G16B20/00		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G06F19/18 G01N33/53.M G01N33/533		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 池田 达则		
优先权	61/430032 2011-01-05 US 61/475632 2011-04-14 US		
其他公开文献	JP6105485B2 JP2014507134A		

摘要(译)

提供了用于分析母体样品以确定怀孕的女性胎儿是否遗传自母亲的X连锁突变的方法, 设备和系统。获得样品中胎儿DNA的百分比, 并确定两种可能性(胎儿继承突变体或正常等位基因)的临界值。然后将X染色体上突变等位基因与正常等位基因的比率与临界值进行比较, 以对遗传了哪些等位基因进行分类。备选地, 将来自X染色体上的靶区域的等位基因的数目与来自X染色体上的参考区域的等位基因的数目进行比较, 以鉴定缺失或延伸的突变。可以通过对具有胎儿特异性等位基因的反应进行计数并校正数字使其与反应中的统计分布相对应, 来计算胎儿的DNA百分比。[选型图]图1