(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年1月4日(04.01.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/005105 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/6813 (2018.01) *C12Q 1/6816* (2018.01)
C12Q 1/06 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/024068

(22) 国際出願日： 2023年6月28日(28.06.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2022-106625 2022年6月30日(30.06.2022) JP

(71) 出願人: 積水メディカル株式会社 (**SEKISUI MEDICAL CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目１番３号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 小川 風和 (**OGAWA Funa**); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目１番３号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 大澤 雅子 (**OSAWA Masako**); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目１番３号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 秋谷 拓郎 (**AKIYA Takurou**); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目１番３号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP).

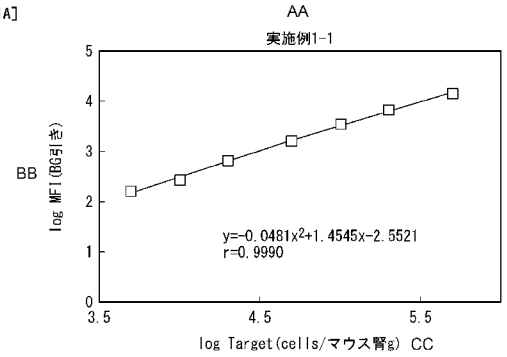
(74) 代理人: 西澤 和純, 外 (**NISHIZAWA Kazuyoshi et al.**); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,

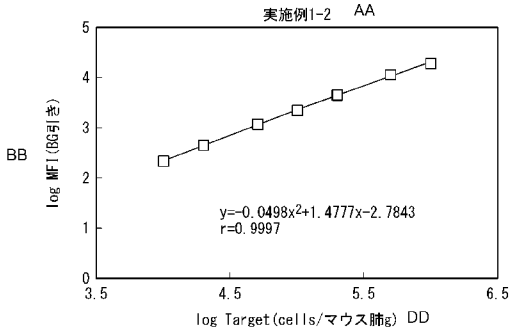
(54) **Title:** METHOD FOR MEASURING HUMAN CELLS

(54) 発明の名称： ヒト細胞を測定する方法

[図1A]



[図1B]



AA Example
BB log MFI (-BG)
CC log Target (cells/mouse kidney g)
DD log Target (cells/mouse lung g)

(57) **Abstract:** A method for measuring human cells, wherein the method includes a preparation step that prepares a sample containing human cells and non-human animal components derived from non-human animal cells, a lysis step that lyses the cell membranes in the sample, and an assay step that performs hybridization assay to a nucleic acid sequence specific to the human cells. The method for measuring human cells does not require correction of the recovery rate by genomic DNA extraction or correction of the amount of genomic DNA by quantification of an internal standard, etc.

WO 2024/005105 A1

[続葉有]

CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能):ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約:ヒト細胞を測定する方法であって、非ヒト動物細胞に由来する非ヒト動物成分及びヒト細胞を含む試料を準備する準備工程と、前記試料中の細胞膜を溶解する溶解工程と、前記ヒト細胞に特異的な核酸配列に対してハイブリダイゼーションアッセイを行うアッセイ工程と、を含む、ヒト細胞を測定する方法。前記ヒト細胞を測定する方法は、ゲノムＤＮＡ抽出による回収率補正及び内部標準等の定量によるゲノムＤＮＡ量の補正を必要としない。

明　細　書

発明の名称 ： ヒト細胞を測定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヒト細胞を測定する方法に関する。

本願は、２０２２年６月３０日に、日本に出願された特願２０２２－１０６６２５号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 間葉系幹細胞（ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ：ＭＳＣ）は、組織再生や免疫調整等の作用を有し、さまざまな疾患への臨床応用が試みられている。

ＭＳＣは、種々のサイトカインや液性因子を産生し、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ（ｎａｔｕｒａｌ　ｋｉｌｌｅｒ）細胞、単球及び樹状細胞等の免疫担当細胞に対して抑制的に、制御性Ｔ細胞に対して促進的に作用する。さらに、炎症部位や組織傷害部位に集積しやすい性質もある。ＭＳＣはＨＬＡ（ｈｕｍａｎ　ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　ａｎｔｉｇｅｎ）分子を発現しているものの、その発現レベルは低く、共刺激分子であるＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ４０等を発現していないため、非自己Ｔ細胞を刺激しない。この性質により、ＨＬＡの異なるＭＳＣを患者に投与しても、Ｔ細胞による攻撃（拒絶）から免れることができる。さらに、ＭＳＣは、樹立及び培養が容易であり、増殖能が高く、凍結保存することが可能である。これらの特徴により、ＨＬＡの一致・不一致を問わず、他家由来のＭＳＣを患者に投与する治療が可能である。

[0003] 一般に、医薬品の有効性・安全性を評価する試験は、非臨床試験と臨床試験に大別される。非臨床試験の結果、有効性が期待でき、安全性にも問題がないと考えられた場合にヒトで行うのが臨床試験である。非臨床試験は、有効性と安全性を評価・証明するための科学的データを提供するものであり、臨床試験へと進むために必要であるとともに臨床における有効性と安全性を

裏づけるために重要である。非臨床試験では、通常、動物を用いて医薬品の薬効薬理作用、生体内での動態、有害な作用などが調べられる。

[0004] ＭＳＣ等のヒト細胞を主成分とする再生医療等製品開発の、探索段階における薬物動態・薬力学（ＰＫ／ＰＤ）スクリーニング試験、非臨床段階における安全性試験、薬理試験及び薬物動態試験においては、ヒト細胞が投与された非ヒト動物におけるヒト細胞の体内分布を確認することが必要となる。非ヒト動物におけるヒト細胞の体内分布を計測するための技術としては、定量ＰＣＲ（ｑＰＣＲ：ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ＰＣＲ）が普及している。

この場合、増幅対象の標的遺伝子は、ヒト細胞中に存在し、かつ、非ヒト動物には存在しない遺伝子である。このような標的遺伝子としては、Ａｌｕ配列や長鎖散在反復配列－１（ＬＩＮＥ－１）等のマルチコピー遺伝子が用いられる。

[0005] 特許文献１には、４６のヒトＡｌｕサブファミリーのコンセンサス配列を代表する一つの「ヒトＡｌｕモデル配列」を同定し、このヒトＡｌｕモデル配列を用いてＡｌｕ検出用ＰＣＲプライマー・プローブ候補を選択する。次に、ヒトＡｌｕ配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド配列であって、且つ、ダイマーの形成を最小限に抑え得るオリゴヌクレオチド配列からなるプライマー・プローブセットを、独自のクライテリアを用いて選択する。このようにして得られたＡｌｕ検出用ＰＣＲプライマー・プローブを用いて定量リアルタイムＰＣＲを行うことにより、被験試料中のヒトゲノムＤＮＡを高感度に検出及び／又は定量することができることが開示されている。

[0006] 特許文献２には、ヒト以外の動物に移植又は投与されたヒト細胞を検出するための技術が開示されている。より詳細には、ヒトＬＩＮＥ－１遺伝子に由来する所定の塩基配列中の連続する１０～３５塩基の配列からなるオリゴヌクレオチドにハイブリダイズ可能な配列と、標識部分を含む、定量ＰＣＲプローブが開示されている。

[0007] 特許文献３には、ｑＰＣＲにおける一般的なゲノムＤＮＡ量の補正方法が開示されている。一般的に、ｑＰＣＲにおけるヒト細胞の細胞数は、標的遺伝子のコピー数として定量されるが、その際、標的遺伝子のコピー数は、例えばＲＮａｓｅＰ遺伝子等、ゲノム中のコピー数がよく知られている遺伝子を内部標準として、それらの遺伝子の定量値から、ゲノムＤＮＡ量を補正する。以上のような換算方法から、ｑＰＣＲでは遺伝子のコピー数やゲノムＤＮＡ量が単位として用いられる。

[0008] 非特許文献１には、組織毎のゲノムＤＮＡの抽出回収率が開示されている。ｑＰＣＲには、組織からゲノムＤＮＡを抽出し精製する必要があるが、組織によりゲノムＤＮＡの回収率に差があることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第２０１８／１０１３７５号

特許文献2：国際公開第２０１９／２４００７３号

特許文献3：国際公開第２０２１／０６５８７７号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ｓｐｉｃｋｌｅｒ，Ｃ.、外６名、“Ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｃｅｌｌｓ ｉｎ Ｍｕｒｉｎｅ Ｏｒｇａｎ ＤＮＡ ｂｙ ＰＣＲ”、２０２２年６月１０日閲覧、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ、インターネット<URL:https://www.criver.com/sites/default/files/resource-files/SP-WRIB-20-Sensitive-Detection-of-Human-Cells-in-Murine-Organ-DNA-by-qPCR.pdf>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] ｑＰＣＲには、組織からゲノムＤＮＡを抽出し精製する必要があり、組織によりゲノムＤＮＡの回収率に差があるため、ゲノムＤＮＡ抽出による回収率補正を実施する必要があるという問題がある。また、ゲノムＤＮＡを内部

標準としてゲノムＤＮＡ量を補正することから、定量ＰＣＲでは遺伝子のコピー数やゲノムＤＮＡ量が単位として用いられる。しかし、ヒト細胞製剤は、細胞そのものが治療効果を発揮するため、遺伝子のコピー数やゲノムＤＮＡ量ではなく、細胞の個数で非ヒト動物の体内分布を評価することが理想的である。

[0012] 本発明は上記実情に鑑みてなされたものであり、ゲノムＤＮＡ抽出による回収率補正及び内部標準等の定量によるゲノムＤＮＡ量の補正を必要としない、ヒト細胞の定量方法を提供することを目的のひとつとする。

課題を解決するための手段

[0013] ［１］ ヒト細胞を測定する方法であって、

非ヒト動物細胞に由来する非ヒト動物成分及びヒト細胞を含む試料を準備する準備工程と、

前記試料中の細胞膜を溶解する溶解工程と、

前記ヒト細胞に特異的な核酸配列に対してハイブリダイゼーションアッセイを行うアッセイ工程と、

を含む、ヒト細胞を測定する方法。

［２］ 前記ヒト細胞に特異的な核酸配列がヒトに特異的な反復配列である、［１］に記載のヒト細胞を測定する方法。

［３］ 前記ヒトに特異的な反復配列が、Ａｌｕ配列及び長鎖散在反復配列－１（ＬＩＮＥ－１）からなる群から選択される少なくとも１種を含む、［２］に記載のヒト細胞を測定する方法。

［４］ 前記ハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いる核酸プローブが非ヒト動物のゲノムＤＮＡとハイブリダイズしない、［１］～［３］のいずれかに記載のヒト細胞を測定する方法。

［５］ 前記溶解工程において、前記非ヒト動物成分及び前記ヒト細胞の細胞膜を、物理的方法、化学的方法、酵素的方法及びこれらの組合せからなる群から選択されるいずれかの方法で溶解する、［１］～［４］のいずれかに記載のヒト細胞を測定する方法。

［６］　前記ハイブリダイゼーションアッセイがＰＡＬＳＡＲ法又はデュアルハイブリダイゼーション法である、［１］～［５］のいずれかに記載のヒト細胞を測定する方法。

［７］　前記溶解工程の後に、さらに、前記非ヒト動物細胞及び前記ヒト細胞に含まれるゲノムＤＮＡを、物理的方法、化学的方法、酵素的方法及びこれらの組合せからなる群から選択されるいずれかの方法で断片化する断片化工程を含む、［１］～［６］のいずれかに記載のヒト細胞を測定する方法。

［８］　前記ゲノムＤＮＡを断片化して得られるゲノムＤＮＡの断片長が５０～６００ｂｐである、［７］に記載のヒト細胞を測定する方法。

［９］　前記ヒト細胞の数を計測するための、［１］～［８］のいずれかに記載のヒト細胞を測定する方法。

発明の効果

[0014]　本発明のヒト細胞の定量方法は、ゲノムＤＮＡ抽出による回収率補正及び内部標準等の定量によるゲノムＤＮＡ量の補正を必要としない。

また、本発明のヒト細胞の定量方法は、試料中のヒト細胞の数を直接計測することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1A]実施例１－１のマウス腎臓マトリクスにおけるヒト細胞の定量結果を示すグラフである。

[図1B]実施例１－２のマウス肺マトリクスにおけるヒト細胞の定量結果を表３、表４及び図１Ｂに示した。

[図2]標的遺伝子及び標的配列の検討結果を示すグラフである。

[図3]標的遺伝子ごとのマウス交差反応性の結果を示すグラフである。

[図4]ハイブリダイゼーション法における検出方法比較の結果を示すグラフである。

[図5A]ゲノムＤＮＡの断片化処理条件の検討結果を示すグラフである。

[図5B]ゲノムＤＮＡの断片化処理条件の検討結果を示すグラフである。

[図6A]ゲノムＤＮＡの断片化処理条件の検討結果を示すグラフである。

[図6B]ゲノムＤＮＡの断片化処理条件の検討結果を示すグラフである。

[図7]ヒト細胞の定量結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明の実施形態を詳細に説明するが、本発明は後述する実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない限り、種々の変形が可能である。

本発明において、「測定する」は「検出する」又は「定量する」の意味で使用される。同様に、「測定」は「検出」又は「定量」の意味で使用される。定量する行為には、必然的に、検出する行為が含まれる。

[0017] ＤＮＡはデオキシリボ核酸（Ｄｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ）を意味する。

ＲＮＡはリボ核酸（Ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ）を意味する。

数値範囲を「～」を用いて表す場合、その数値範囲は「～」の両側の数値を含む。

[0018] 本発明のヒト細胞を測定する方法は、ヒト細胞を測定する方法であり、非ヒト動物細胞に由来する非ヒト動物成分及びヒト細胞を含む試料を準備する準備工程と、前記試料中の細胞膜を溶解する溶解工程と、前記ヒト細胞に特異的な核酸配列に対してハイブリダイゼーションアッセイを行うアッセイ工程と、を含む。

[0019] 準備工程では、本発明を実施するための、非ヒト動物細胞に由来する非ヒト動物成分及びヒト細胞を含む試料を準備する。

[0020] 前記非ヒト動物細胞に由来する非ヒト動物成分としては、例えば、非ヒト動物細胞そのもののほか、非ヒト動物細胞に含まれていたタンパク質、核酸、脂質等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のヒト細胞の測定方法は、これらの非ヒト動物細胞に由来する非ヒト動物成分とヒト細胞とが混在する場合であっても、ヒト細胞を測定することができる。

[0021] 前記ヒト細胞は、ヒト幹細胞、ヒトがん細胞、ヒト体細胞、ヒト生殖細胞等のヒト由来の細胞であればどのような種類の細胞であってもよいが、ヒト

幹細胞が好ましく、ヒト間葉系幹細胞、ヒト造血幹細胞、ヒト神経幹細胞、ヒトｉＰＳ細胞、ヒトＥＳ細胞、ヒト体細胞由来胚性幹細胞等のヒト幹細胞を特に好適に例示することができる。

[0022] 前記非ヒト動物細胞は、非ヒト動物の細胞であれば特に限定されない。

前記非ヒト動物の例としては、マウス、ラット、ギニアピッグ（モルモット）、イヌ、ウサギ、ブタ、ヤギ及びウシ等の非ヒト哺乳動物が挙げられる。前記非ヒト動物としては、マウス、ラット及びギニアピッグ等のげっ歯類動物が好ましい。

[0023] また、前記非ヒト動物からは、ヒト（学名：ホモ・サピエンス（Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ）以外の霊長類（サル）を除くことが好ましい。前記ヒト以外の霊長類としては、ヒト以外のヒト上科（Ｈｏｍｉｎｏｉｄｅａ）動物が挙げられ、より具体的にはチンパンジー、ボノボ、ゴリラ及びオランウータン等のヒト以外のヒト科動物、シロテテナガザル及びフクロテナガザル等のテナガザル科動物、並びにオナガザル、ヒヒ、マカク及びテングザル等のオナガザル科動物が挙げられる。

[0024] 本発明のヒト細胞の定量方法では、ヒト細胞に特異的な核酸配列に対してハイブリダイゼーションアッセイを行うが、ここでいうヒト細胞に特異的な核酸配列とは、試料中の非ヒト動物細胞とヒト細胞との組合せによって異なってくる。例えば、ヒト細胞とげっ歯類細胞が試料中に混在している場合、Ａｌｕ配列はヒト細胞に特異的な核酸配列といえるが、ヒト細胞とチンパンジー細胞が試料中に混在している場合、同じＡｌｕ配列であってもヒト細胞に特異的な核酸配列とは言えない場合がある。逆に、ヒト細胞に特異的な核酸配列としてＡｌｕ配列を採用する場合、非ヒト動物からはヒト以外の霊長類が必然的に除かれる。これに対し、長鎖散在反復配列－１（ＬＩＮＥ－１）を採用する場合、例えばＴａファミリー等、一部のファミリーはヒト特異的であることから、ヒト以外の霊長類を非ヒト動物に加えることが可能である。

[0025] 前記非ヒト動物細胞に由来する非ヒト動物成分及びヒト細胞を含む試料と

しては、例えば、非ヒト動物にヒト細胞を移植して作製された異種移植モデル動物由来の生体試料が挙げられるが、これに限定されない。

[0026] 前記ヒト細胞に特異的な核酸配列（以下「標的配列」や「標的遺伝子」という場合がある。）がヒトに特異的な反復配列が好ましく、例えば、Ａｌｕ配列及び長鎖散在反復配列－１（ＬＩＮＥ－１）からなる群から選択される少なくとも１種が好ましい。

上記に例示した反復配列には、各配列において複数のファミリーが存在するが、本発明においてはどのファミリーを標的配列としてもよい。また、複数のファミリーに共通する配列、いわゆるコンセンサスな配列を標的としてもよい。

[0027] Ａｌｕ配列は、ヒトをはじめとする霊長類のゲノムに見られる遺伝因子の一つであり、Ａｌｕ要素とも称される。Ａｌｕの名称は、アルスロバクター・ルテウス（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｌｕｔｅｕｓ）の制限エンドヌクレアーゼ活性により最初に特徴づけられたことに因む。

Ａｌｕ配列はヒトゲノム中に最も頻繁にみられるトランスポゾンであり、ヒトゲノム全体では１００万以上のコピーが散在するマルチコピー遺伝子である。Ａｌｕ配列は霊長類ゲノム間で高度に保存されており、ヒトとヒト以外の霊長類を区別できないという欠点はあるが、例えば、ヒトとげっ歯類、ヒトと偶蹄類などを区別することはできるため、本発明のヒト細胞の定量方法においても有用である。

[0028] ＬＩＮＥ－１は長鎖散在反復配列（ＬＩＮＥ：Ｌｏｎｇ　Ｉｎｔｅｒｓｐｅｒｓｅｄ　Ｎｕｃｌｅａｒ　Ｅｌｅｍｅｎｔ）のひとつである。ＬＩＮＥは、非ＬＴＲ型レトロトランスポゾンの一群であり、多くの真核生物のゲノムに広く見られる。ＬＩＮＥはヒトゲノムでは全体のおよそ２１．１％を占めるマルチコピー遺伝子であり、それぞれの長さはおおよそ７０００塩基対（ｂｐ）程度である。中でも、Ｔａ－１及びＴａ－０を含むＴａファミリーはヒト特異的であることから、プローブの設計により、ヒトとヒト以外の霊長類を区別することが可能である。

[0029] ＳＶＡ（ＳＩＮＥ－ＶＮＴＲ－Ａｌｕ）は、レトロトランスポゾンの中でも最も近年進化した反復配列である。霊長類の中でも類人猿に特異的な配列である。ヒトゲノム上に約３０００コピー存在する。ＳＶＡ＿Ａ、ＳＶＡ＿Ｂ、ＳＶＡ＿Ｃ、ＳＶＡ＿Ｄ、ＳＶＡ＿Ｅ及びＳＶＡ＿Ｆの６つのファミリーが存在するが、中でもＳＶＡ＿Ｅ及びＳＶＡ＿Ｆはヒト特異的であることから、プローブの設計、投与する細胞数の検討により、ヒトとヒト以外の霊長類の区別に用いられうる。

[0030] 前記溶解工程において、前記試料中の細胞膜を溶解する方法は、特に限定されないが、物理的方法、化学的方法、酵素的方法及びこれらの組合せからなる群から選択されるいずれかの方法が好ましい。

物理的方法としては、例えば、機械的破砕技術（ダウンス、ポリトロン、乳鉢と乳棒によるホモジナイズなど）、凍結融解溶解、浸透圧ショック、超音波処理等が挙げられる。

化学的方法としては、例えば、界面活性剤可溶化等が挙げられる。

酵素的方法としては、例えば、細胞膜裏打ちタンパク質をタンパク質分解酵素や酸・アルカリ等により加水分解して細胞膜をバーストさせる方法などが挙げられる。

[0031] 前記溶解工程のより具体的な手順については、後述する実施例に記載している。

[0032] 前記ハイブリダイゼーションアッセイにおいては、用いる核酸プローブが非ヒト動物のゲノムＤＮＡとハイブリダイズしないことが好ましい。なお、ハイブリダイゼーションアッセイにおいては核酸プローブを用いる。

[0033] 前記ハイブリダイゼーションアッセイの方法としては、ＰＡＬＳＡＲ（Ｐｒｏｂｅ Ａｌｔｅｒｎａｔｉｏｎ Ｌｉｎｋ Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎ）法又はデュアルハイブリダイゼーション法が好ましい。

[0034] デュアルハイブリダイゼーション法は、２つの配列特異的オリゴヌクレオチドプローブを使用する方法である。２つのプローブは、標的配列中の隣接

する配列に結合するように設計されている。第一のプローブは、プレートやビーズ等の固相担体に固定されており、標的を捕捉するためのプローブである。第二のプローブの末端には、例えばビオチン等の標識物が修飾されている。上記２つのプローブが標的とするＤＮＡ、ＲＮＡにハイブリダイゼーションし、標識物に蛍光物質を反応させることで、標的を検出する。

[0035] デュアルハイブリダイゼーション法によるＡｌｕ配列の検出方法の詳細は後述する実施例に記載した。他の標的遺伝子の場合は適宜プローブを変更することにより対応可能である。

[0036] ＰＡＬＳＡＲ法（例えば、特許第４６１６８８１号公報）では、あらかじめ用意した互いに相補的な３つの領域からなる２種類のＤＮＡプローブを用いる方法である。この２種類のＤＮＡプローブに標識物を付け、それらがハイブリダイゼーションによる自己集合反応を繰り返すことにより蜂の巣のような形で結合して大きなＤＮＡの塊となり、これが増幅シグナルとなる。そして、検出したい遺伝子にこの大きなＤＮＡの塊が結合することによって、その増幅したシグナルを捕捉して検出遺伝子の存在が確認できる。例えば、特許第４６１６８８１号公報では、上記デュアルハイブリダイゼーション法のシグナルを、ＰＡＬＳＡＲ法を用いて増幅する方法が開示されている。このハイブリダイゼーションには核酸合成酵素を必要とせず、短時間に反応し（３０秒から３０分）、一定の温度で反応が進み（４０℃から７０℃）、標的とするＤＮＡ、ＲＮＡのどちらも高感度に検出できるという特徴がある。一方、定量ＰＣＲ法においては、熱変性により標的核酸を１本鎖に分離した後、標的核酸に特異的な配列をもつＤＮＡプローブをハイブリダイゼーションさせ、核酸合成酵素により１本鎖に分離した標的核酸に相補的な核酸の伸長反応を行う。このようにＰＡＬＳＡＲ法又はデュアルハイブリダイゼーション法においてもＤＮＡプローブを標的核酸にハイブリダイゼーションを行うが、その反応機構は全く異なる。

[0037] ＰＡＬＳＡＲ法によるＡｌｕ配列及びＬＩＮＥ－１配列の検出方法の詳細は、後述する実施例に記載した。他の標的遺伝子の場合は適宜プローブを変

更することにより対応可能である。

[0038] 前記溶解工程の後に、ゲノムＤＮＡを断片化する工程として断片化工程を含んでもよい。

前記断片化工程では、前記非ヒト動物細胞及び前記ヒト細胞に含まれるゲノムＤＮＡを、物理的方法、化学的方法、酵素的方法及びこれらの組合せからなる群から選択されるいずれかの方法で断片化することが好ましい。

物理的方法としては、例えば、機械的破砕技術（ダウンス、ポリトロン、乳鉢と乳棒によるホモジナイズなど）、凍結融解溶解、浸透圧ショック、超音波処理等が挙げられる。

化学的方法としては、例えば、酸・アルカリ等により部分加水分解する方法などが挙げられる。

酵素的方法としては、例えば、エンドヌクレアーゼを用いる方法が挙げられる。

[0039] 前記エンドヌクレアーゼとしては、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ　Ｉ）、デオキシリボヌクレアーゼＩＩ（ＤＮａｓｅ　ＩＩ）、Ｍｉｃｒｏｃｃａｌ　Ｎｕｃｌｅａｓｅ、Ｔｕｒｂｏ　Ｎｕｃｌｅａｓｅ、制限酵素等が挙げられる。前記制限酵素としては、ＢａｍＨＩ、ＥｃｏＲＩ、ＥｃｏＲＶ、ＨｉｎｄＩＩＩ、ＨａｅＩＩＩ、ＢｇｌＩＩ、ＭｓｐＩ、ＴａｑＩ－ｖ２等が挙げられる。制限酵素は特定のＤＮＡ配列を認識して切断するエンドヌクレアーゼである。酵素的方法を用いる場合の酵素は、特に限定されないが、ＤＮａｓｅ　Ｉが好ましい。ゲノムＤＮＡの断片化にＤＮａｓｅ　Ｉを使用する場合の使用量は、特に限定されないが、０．０００１～０．１Ｕ／ｗｅｌｌが好ましく、０．００１～０．０２５Ｕ／ｗｅｌｌがより好ましく、０．００５～０．０１Ｕ／ｗｅｌｌがさらに好ましい。なお、１ユニットは、反応全容量５０ μＬ中、３７ ℃、１０分間で１ μｇのプラスミドベクターｐＢＲ３２２のＤＮＡを完全に分解する酵素量として定義される。ＤＮＡ断片がテトラヌクレオチド以下に分解されることを完全な分解と定義する。

[0040] ゲノムＤＮＡを断片化することにより、より高感度でヒト細胞を検出でき、定量精度も向上する。

この場合のゲノムＤＮＡ断片長は、５０～１０００ｂｐが好ましく、５０～６００ｂｐがより好ましく、１５０～６００ｂｐがさらに好ましく、１５０～３００ｂｐがいっそう好ましい。

実施例

[0041] 以下では実施例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は実施例によって何ら限定されるものではない。

[0042] 本発明の実施例の一部では、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（ＰＭＤＡ）より発表された「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法（リガンド結合法）のバリデーションに関するガイドライン」に基づき、測定法の信頼性を評価した。

[0043] ［標的配列と使用する核酸プローブ］

本発明の実施例においては、標的遺伝子及び塩基配列の異なる３種類の標的配列を使用した。各標的配列の説明及び標的配列を検出するために使用した捕捉プローブとアシストプローブの組合せを、以下に示す。

[0044] １．Ａｌｕ配列（１）

国際公開第２０１８／１０１３７５号に記載された「ヒトＡｌｕモデル配列」の内、４３ｂｐを標的とした配列である。

捕捉プローブとして、Ａｌｕ配列（１）の５’側に対して相補的な塩基配列を持つ核酸プローブＣＰ－Ａｌｕ配列（１）を、アシストプローブとして、Ａｌｕ配列（１）の３’側に対して相補的な塩基配列にポリＡ鎖を付加した塩基配列を持つＡＰ－Ａｌｕ配列（１）を、それぞれ使用した。

[0045] 〈Ａｌｕ配列（１）の塩基配列〉

5’-GCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAG-3’（塩基部分は配列番号１）

[0046] 〈ＣＰ－Ａｌｕ配列（１）の塩基配列〉

5’-CGGGTTCAAGCGATTCTCCTGC-(NH2)-3’（塩基部分は配列番号２）

[0047] 〈ＡＰ－Ａｌｕ配列（１）の塩基配列〉

5’-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCACTGCAACCTCCGCCTCC-3’（塩基部分は配列番号３）

[0048] ２．Ａｌｕ配列（２）

独立行政法人医薬品医療機器総合機構（ＰＭＤＡ）より発表された「再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンス」（平成２８年６月１４日）に記載されたＡｌｕ－ＰＣＲプローブ３０ｂｐの内、ヒトゲノム上で高い相同性が確認された１９ｂｐを標的とした配列である。

捕捉プローブとして、Ａｌｕ配列（２）の３’側に対して相補的な塩基配列を持つ核酸プローブＣＰ－Ａｌｕ配列（２）を、アシストプローブとして、Ａｌｕ配列（２）の５’側に対して相補的な塩基配列にポリＡ鎖を付加した塩基配列を持つＡＰ－Ａｌｕ配列（２）をそれぞれ使用した。

[0049] 〈Ａｌｕ配列（２）の塩基配列〉

5’-ATCTCGGCTCACTGCAAGC-3’（塩基部分は配列番号４）

[0050] 〈ＣＰ－Ａｌｕ配列（２）の塩基配列〉

5’-(NH2)-GCTTGCAGTGAG-3’（塩基部分は配列番号５）

[0051] 〈ＡＰ－Ａｌｕ配列（２）の塩基配列〉

5’-5(L)5(L)G(L)A(L)G(L)A(L)T(L)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3’（塩基部分は配列番号６）

※（Ｌ）＝ＬＮＡ（Ｌｏｃｋｅｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ：ロック核酸）、５＝５－Ｍｅｔｈｙｌ－Ｃｙｔｏｓｉｎｅに置換されていることを示す。

[0052] ３．ＬＩＮＥ－１配列

国際公開第２０１９／２４００７３号に記載されたヒト細胞定量ＰＣＲプローブを参考に設計した、３０ｂｐの標的配列である。捕捉プローブとして、ＬＩＮＥ－１配列の３’側に対して相補的な塩基配列を持つ核酸プローブＣＰ－ＬＩＮＥ－１配列を、アシストプローブとして、ＬＩＮＥ－１配列の

５’側に対して相補的な塩基配列にポリＡ鎖を付加した塩基配列を持つＡＰ－ＬＩＮＥ－１配列をそれぞれ使用した。

[0053] 〈ＬＩＮＥ－１配列の塩基配列〉

５’-AATGCTAGATGACACATTAGTGGGTGCAGC-3’（塩基部分は配列番号７）

[0054] 〈ＣＰ－ＬＩＮＥ－１配列の塩基配列〉

5’-(NH2)-GCTGCACCCACTAATGT-3’（塩基部分は配列番号８）

[0055] 〈ＡＰ－ＬＩＮＥ－１配列の塩基配列〉

5’-GTCAT(L)5(L)T(L)A(L)G(L)CATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3’（塩基部分は配列番号９）

※（Ｌ）＝ＬＮＡ（Ｌｏｃｋｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ：ロック核酸）、５＝５－Ｍｅｔｈｙｌ－Ｃｙｔｏｓｉｎｅに置換されていることを示す。

[0056] ［実施例１－１］

マウス腎臓マトリクスにおけるヒト細胞定量の検討

１．材料

（１）生体試料

測定対象のヒト細胞として、ＨＥＫ２９３細胞を用いた。また、非ヒト動物試料としてマウス腎臓（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社）を使用した。マウスはＣ５７ＢＬ／６Ｊ系統のオス、週齢ＲＥＴＩＲＥを用いた。

[0057] （２）標的配列

標的配列としてＡｌｕ配列（１）（配列番号１）を用いた。

[0058] ２．方法

（１）マウス腎臓及びヒト細胞の溶解処理

マウス腎臓及びヒト細胞をそれぞれ調製し、ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ Ｌｙｓｉｓ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔａｉｌ）（Ｖｉａｇｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ社、製品番号：１０２－Ｔ）及びプロテイナーゼＫ溶液（関東化学社、製品番号：３４０６０－９６）を用いて溶解処理を実施した。

[0059] （１－１）マウス腎臓の調製

ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ　Ｌｙｓｉｓ　Ｒｅａｇｅｎｔ　（Ｔａｉｌ）とプロテイナーゼＫ溶液は１００：１の比率で混合し、溶解反応試薬として調製した。マウス腎臓をチューブに秤量後、組織重量が２００ｍｇ／ｍＬとなるよう溶解反応試薬を添加し、よく懸濁した。

[0060] （１－２）ヒト細胞の調製

凍結保存液中のＨＥＫ２９３細胞を流水にて融解し、チューブに２５０μＬ分注した。遠心し、上清を除去後、等量の１×ＰＢＳを添加し、ピペッティングにて細胞表面に残存した凍結保存液を洗浄した。再度遠心、上清を除去後、１×ＰＢＳを２０μＬ添加し、ＴＣ２０™全自動セルカウンター（ＢＩＯ　ＲＡＤ社、製品番号：１４５０１０１Ｊ１）を用いて細胞数を計測した。計測結果より、全量に対し1×10^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるよう、ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ　Ｌｙｓｉｓ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔａｉｌ）を添加した。また、全量１／１００量のプロテイナーゼＫ溶液を添加し、よく懸濁した。

[0061] （１－３）溶解処理

１，０００ｒｐｍにてチューブを振盪しながら、５５℃で１６時間反応させた。一旦取り出して懸濁後、１，０００ｒｐｍ、８５℃にて４５分間反応させ、プロテイナーゼＫを失活させた。

[0062] （２）超音波によるゲノムＤＮＡ断片化処理

溶解処理したマウス腎臓とＨＥＫ２９３細胞を混合し、超音波破砕装置Ｃｏｖａｒｉｓ　Ｆｏｃｕｓｅｄ－ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃａｔｏｒ　Ｍ２２０（Ｃｏｖａｒｉｓ社、製品番号：Ｍ２２０）を用いて、ゲノムＤＮＡの断片化処理を実施した。

[0063] （２－１）サンプル調製

ＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒにて１０倍希釈した溶解済みマウス腎臓に、溶解処理したＨＥＫ２９３細胞溶液を９：１で混合し、ヒト細胞・マウス腎臓混合サンプルを調整した。希釈率を考慮し、上記サンプルの細胞数を計算すると、容量換算で1×10^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ、組織重量換算で6×10^{6}ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇであった。

[0064] （２－２）超音波処理

ｍｉｃｒｏＴＵＢＥ－５０　ＡＦＡ　Ｆｉｂｅｒ　Ｓｃｒｅｗ－Ｃａｐ（Ｃｏｖａｒｉｓ社、製品番号：５２０１６６）に上記サンプルを５５μＬ分注し、Ｃｏｖａｒｉｓ　Ｆｏｃｕｓｅｄ－ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃａｔｏｒ　Ｍ２２０にて超音波処理を実施した。超音波の各パラメーターはＰＩＰ　５０Ｗ、ＤＦ　２０％、ＣＰＢ　２００ｃｐｂに設定し、処理時間は１５分とした。

[0065] （３）捕捉プローブの調製

担体であるＭｉｃｒｏＰｌｅｘ™ Ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅｓ（Ｌｕｍｉｎｅｘ社、製品番号：ＬＣ１００２２－０１）に、核酸プローブＣＰ－ＡＩｕ配列（１）（配列番号２）を、３’末端のＮＨ２修飾を介して結合させることにより捕捉プローブを調製した。

[0066] （４）検量線サンプル及びＱＣサンプルの調製

上記（２）で断片化処理したヒト細胞・マウス腎臓混合サンプルを、ＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒにて１０倍希釈した溶解済みマウス腎臓マトリクスにて段階希釈し、検量線サンプル及びＱＣサンプルを調製した。検量線サンプルは、細胞数6×10^{3}、1.2×10^{4}、2.4×10^{4}、6×10^{4}、1.2×10^{5}、2.4×10^{5}、6×10^{5}ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇとなるよう調製した。ＱＣサンプルは、細胞数6×10^{3}、1.2×10^{4}、6×10^{4}、2.4×10^{5}、6×10^{5}ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇとなるよう調製し、各サンプル名をＬＬＯＱ、ＬＱＣ、ＭＱＣ、ＨＱＣ、ＵＬＯＱとした。ＱＣサンプルは３系列調製し、１系列ごとに段階希釈した。

[0067] （５）捕捉プローブへの標的核酸の捕捉（１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応）

上記（４）で調製した検量線サンプル、ＱＣサンプル及びブランクサンプル５μＬに、１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液を１５μＬ加えて計２０μＬとし、９５℃で２分間反応させた後、４７℃で１８時間反応させた。

[0068] （５－１）１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液の組成

上記（３）で担体へ固定した捕捉プローブ０．４μＬ（８００個）、

５Ｍ　ＴＭＡＣ（テトラメチルアンモニウムクロリド）６．０μＬ、

１０×ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ［５００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、４０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、８．０％　Ｎ－ラウロイルサルコシンナトリウム］　３．０μＬ、

６．６７％　ＰＥＧ２００００（ポリエチレングリコール）　３．０μＬ、

ＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　ｗａｔｅｒ　１．６μＬ、

５００ｆｍｏｌ／ｍＬアシストプローブ（ＡＰ－Ａｌｕ配列（１）（配列番号３））　１μＬ。

[0069] （６）非標的配列ゲノム断片の洗浄

１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応終了後の反応液を遠心し、上清を除去した。１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０５％　Ｔ）［１×ＰＢＳ［１３７ｍＭ　Ｓｏｄｉｕｍ　Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、８．１ｍＭ　Ｄｉｓｏｄｉｕｍ　Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ、２．６８ｍＭ　Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ　Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、１．４７ｍＭ　Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ　Ｄｉｈｙｄｒｏｇｅｎｐｈｏｓｐｈａｔｅ］、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０、１．５　ｐｐｍ　ＰｒｏＣｌｉｎ３００］で１回洗浄した後、再度遠心し、上清を除去した。

[0070] （７）ＰＡＬＳＡＲ反応によるシグナル増幅

上清除去後の各ウェルに対し、ＰＡＬＳＡＲ反応液を５０μＬ加え、４２℃で１時間反応させた。本実施例１に使用する自己凝集可能な一対のプローブ（シグナル増幅用プローブともいう）の配列は、５’末端がビオチンで標識された以下のＨＣＰ－１及びＨＣＰ－２である。

[0071] 〈ＨＣＰ－１の塩基配列〉

5’-(Biotin)-CAACAATCAGGACGATACCGATGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3’（塩基部分は配列番号１０）

[0072] 〈ＨＣＰ－２の塩基配列〉

5’-(Biotin)-GTCCTGATTGTTGCTTCATCGGTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3’（塩基部分は配列番号１１）

[0073]（７－１）ＰＡＬＳＡＲ反応液の組成

Ｎｕｃｌｅａｓｅ－Ｆｒｅｅ Ｗａｔｅｒ ２０．６８μＬ、

６．６７％ ＰＥＧ２００００（ポリエチレングリコール）３．０μＬ、

５Ｍ ＴＭＡＣ １５．０μＬ、

１０×ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ［５００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、４０ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、８％ Ｎ－ラウロイルサルコシンナトリウム］ ８．０μＬ、

２０ｐｍｏｌ／μＬ ＨＣＰ－１ １．７５μＬ、

２０ｐｍｏｌ／μＬ ＨＣＰ－２ １．５８μＬ

[0074]（８）蛍光検出

ＰＡＬＳＡＲ反応終了後の反応液を、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ）［１×ＰＢＳ［１３７ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、８．１ｍＭ Ｄｉｓｏｄｉｕｍ Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ、２．６８ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、１．４７ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｄｉｈｙｄｒｏｇｅｎｐｈｏｓｐｈａｔｅ］、０．０２％ Ｔｗｅｅｎ２０、１．５ｐｐｍ ＰｒｏＣｌｉｎ３００］で１回洗浄した。

その後、検出試薬［ＳＡ－ＰＥ（Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－Ｒ－Ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ、Ｐｒｏｚｙｍｅ社製） ５μｇ／ｍＬ］を５０μＬ加えて２５℃の遮光下で１時間静置した後、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ）で２回洗浄した。その後、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ）を７５μＬ加えて、Ｌｕｍｉｎｅｘ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｌｕｍｉｎｅｘ社製）でビーズ及びＳＡ－ＰＥ複合体からの蛍光を測定し、ヒト細胞ゲノムのシグナルを検出した。

[0075] ３．結果

本発明のヒト細胞の定量方法による、マウス腎臓マトリクスにおけるヒト細胞の定量結果を表１、表２及び図１Ａに示した。

図１より、試料中のヒト細胞数に依存したシグナルが得られた。ヒト細胞数とシグナルの相関係数（ｒ）は、０．９９９０であり、相関性の高い検量線を作成することができた。また、作成した検量線に対する検量線サンプルの％ＲＥは－１１．３～８．５％と、ＬＢＡガイドライン基準内の値を示した。ＱＣサンプルの％ＣＶ、％ＲＥ及び％ＴＥも基準内であり、ＬＢＡガイドライン基準を満たした堅牢性の高い定量法であると言える。

[0076] [表1]

試料 (cells/マウス腎g)	平均 (n=2)	%CV	S/N比	%RE	r値
0	84.0	14.3	-	-	0.9990
5000	245.8	3.0	2.9	8.5	
10000	359.8	25.5	4.3	-11.3	
20000	732.5	1.3	8.7	-0.5	
50000	1721.5	1.9	20.5	-1.4	
100000	3596.3	0.5	42.8	6.8	
200000	6769.8	0.6	80.6	4.6	
500000	14361.3	0.3	171.0	-5.0	
			基準値	±20%以内 (定量下限・ 上限±25%以内)	r≧0.9900

[0077] [表2]

試料	試料 (cells/マウス腎g)	%CV	%RE	%TE
LLOQ	5000	8.2	16.5	24.7
LQC	10000	7.9	6.9	14.8
MQC	50000	0.6	1.4	2.0
HQC	200000	0.4	-2.8	9.3
ULOQ	500000	1.6	-6.7	8.3
基準値		20%以内 (定量下限・ 上限25%以内)	±20%以内 (定量下限・ 上限±25%以内)	30%以内 (定量下限・ 上限40%以内)

[0078] ［実施例１－２］

マウス肺マトリクスにおけるヒト細胞定量の検討

１．材料

（１）生体試料

測定対象のヒト細胞として、ＨＥＫ２９３細胞を用いた。また、非ヒト動物試料としてマウス肺（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社）を使用した。マウスはＣ５７ＢＬ／６Ｊ系統のオス、週齢ＲＥＴＩＲＥを用いた。

[0079]（２）標的配列

標的配列としてＡｌｕ配列（１）（配列番号１）を用いた。

[0080] ２．方法

（１）マウス肺及びヒト細胞の溶解処理

実施例１－１と同様の手順で、マウス肺及びＨＥＫ２９３細胞の溶解処理を実施した。

[0081]（２）超音波によるゲノムＤＮＡ断片化処理

実施例１－１と同様の手順で、マウス肺マトリクスに混合したＨＥＫ２９３細胞のゲノムＤＮＡを断片化した。

[0082]（３）捕捉プローブの調製

実施例１－１と同様の手順で、捕捉プローブを調製した。

[0083]（４）検量線サンプル及びＱＣサンプルの調製

上記（２）で断片化処理を実施したヒト細胞・マウス肺混合サンプルを、ＲＮａｓｅ Ｆｒｅｅ Ｗａｔｅｒにて１０倍希釈した溶解済みマウス肺マトリクスにて段階希釈し、検量線サンプル及びＱＣサンプルを調製した。検量線サンプルは、細胞数が1.2×10^{4}、2.4×10^{4}、6×10^{4}、1.2×10^{5}、2.4×10^{5}、6×10^{5}、1.2×10^{6}ｃｅｌｌｓ／肺ｇとなるよう調製した。ＱＣサンプルは、細胞数が1.2×10^{4}、2.4×10^{4}、1.2×10^{5}、6×10^{5}、1.2×10^{6}ｃｅｌｌｓ／肺ｇとなるよう調製し、各サンプル名をＬＬＯＱ、ＬＱＣ、ＭＱＣ、ＨＱＣ、ＵＬＯＱとした。また、ＱＣサンプルは３系列調製し、１系列ごとに段階希釈した。

[0084] 以下、実施例１－１の（５）～（８）と同様の手順で本実施例を実施した。

[0085] ３．結果

本発明のヒト細胞の定量方法による、マウス肺マトリクスにおけるヒト細胞の定量結果を表３、表４及び図１Ｂに示した。

実施例１－１のマウス腎臓と同様、検量線サンプルとＱＣサンプル両方において、ＬＢＡガイドライン基準を満たした。以上から、非ヒト動物試料に関して、組織の種類に関係なく、本発明方法は堅牢性の高い定量法であると言える。

[0086] [表3]

試料 (cells/マウス肺g)	平均 (n=2)	%CV	S/N比	%RE	r値
0	108.0	13.7	-	-	0.9997
10000	322.3	2.1	3.0	0.3	
20000	554.5	0.5	5.1	-0.1	
50000	1298.8	0.7	12.0	3.7	
100000	2273.0	9.8	21.0	-5.4	
200000	4558.0	3.4	42.2	-0.3	
500000	11308.0	7.5	104.7	7.8	
1000000	18996.0	4.8	175.9	-3.3	
			基準値	±20%以内 (定量下限・ 上限±25%以内)	r≧0.9900

[0087] [表4]

試料	試料 (cells/マウス肺g)	%CV	%RE	%TE
LLOQ	10000	14.8	17.0	31.8
LQC	20000	11.0	3.0	14.0
MQC	100000	11.6	2.0	13.5
HQC	500000	1.5	4.4	5.9
ULOQ	1000000	3.7	-2.9	6.6
基準値		20%以内 (定量下限・ 上限25%以内)	±20%以内 (定量下限・ 上限±25%以内)	30%以内 (定量下限・ 上限40%以内)

[0088] ［実施例２］

ヒト細胞定量における標的遺伝子及び標的配列の検討

１．材料

（１）生体試料

測定対象のヒト細胞として、ＨＥＫ２９３細胞を用いた。また、非ヒト動物試料としてマウス腎臓（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社）を使用した。

[0089]（２）標的配列

標的配列としてＡｌｕ配列（２）（配列番号４）及びＬＩＮＥ－１配列（配列番号７）を用いた。

[0090]　２．方法

（１）マウス腎臓及びヒト細胞の溶解処理

実施例１－１と同様の手順で、マウス腎臓及びＨＥＫ２９３細胞の溶解処理を実施した。

[0091]（２）超音波によるゲノムＤＮＡ断片化処理

実施例１－１と同様の手順で、マウス腎臓マトリクスに混合したＨＥＫ２９３細胞のゲノムＤＮＡを断片化した。

[0092]（３）捕捉プローブの調製

実施例１－１と同様の手順で、核酸プローブＣＰ－Ａｌｕ配列（２）（配列番号５）及びＣＰ－ＬＩＮＥ－１配列（配列番号８）を、５’末端のＮＨ２修飾を介して担体にそれぞれ結合させ、捕捉プローブを調製した。

[0093]（４）検量線サンプルの調製

上記（２）で断片化処理を実施したヒト細胞・マウス腎臓混合サンプルを、ＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒにて１０倍希釈した溶解済みマウス腎臓マトリクスにて段階希釈し、検量線サンプルを調製した。Ａｌｕ配列（２）を標的配列とする場合、細胞数1.2×10^{4}、2.4×10^{4}、6×10^{4}、1.2×10^{5}、2.4×10^{5}、6×10^{5}、1.2×10^{6}ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇとなるよう調製した。ＬＩＮＥ－１配列を標的配列とする場合は、細胞数2.4×10^{4}、6×10^{4}、1.2×10^{5}、2.4×10^{5}、6×10^{5}、$1.2\times$

10^6ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇとなるよう調製した。

[0094] （５）捕捉プローブへの標的核酸の捕捉（１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応）

上記（４）で調製した検量線サンプル及びブランクサンプル５μＬに、１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液を１５μＬ加えて計２０μＬとし、９５℃で２分間反応させた後、Ａｌｕ配列（２）を標的配列とする場合は３３℃で、ＬＩＮＥ－１配列を標的配列とする場合は４０℃で、それぞれ１８時間反応させた。１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液の組成は実施例１－１と同様であり、アシストプローブとしてＡＰ－Ａｌｕ配列（２）（配列番号６）及びＡＰ－ＬＩＮＥ－１配列（配列番号９）をそれぞれ使用した。捕捉プローブとアシストプローブの組合せは、［標的配列と使用する核酸プローブ］に記載の通りに添加した。

[0095] （６）非標的配列ゲノム断片の洗浄

実施例１－１と同様の手順で、非標的配列ゲノム断片の洗浄を行った。

[0096] （７）ＰＡＬＳＡＲ反応によるシグナル増幅

上清除去後のサンプルに対し、ＰＡＬＳＡＲ反応液を５０μＬ加え、Ａｌｕ配列（２）を標的配列とする場合は３３℃で、ＬＩＮＥ－１配列を標的配列とする場合は４０℃で、それぞれ１時間反応させた。自己凝集可能な一対のプローブとしては、ＨＣＰ－１（配列番号１０）及びＨＣＰ－２（配列番号１１）を使用した。

[0097] （８）蛍光検出

実施例１－１と同様の手順で、ヒト細胞ゲノムをシグナルとして検出した。

[0098] ３．結果

本発明方法による、ヒト細胞の定量における標的遺伝子及び標的配列の検討結果を表５、表６及び図２に示した。表５より、Ａｌｕ配列（２）を標的配列とした場合、定量範囲1.2×10^4～1.2×10^6ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇにおいて、ガイドライン基準をクリアした正確な検量線を作成することができた。一方、表６より、ＬＩＮＥ－１配列を標的配列とした場合、定量範囲

２．４×１０^{4}～１．２×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇにおいて、同じくガイドライン基準内の正確な検量線が得られた。実施例１－１で標的配列として使用したＡｌｕ配列（１）の定量範囲は６×１０^{3}～６×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇであり、標的配列ごとに定量範囲は異なるものの、ヒト反復遺伝子を標的配列とすることで、ヒト細胞を正確に定量可能であると言える。

[0099] [表5]

試料 (cells/マウス腎g)	平均 (n=2)	%CV	S/N比	%RE	r値
0	32.8	9.7	-	-	0.9980
10000	99.0	0.7	3.0	0.1	
20000	169.3	0.2	5.2	5.4	
50000	294.8	5.2	9.0	-16.8	
100000	698.3	4.0	21.3	11.5	
200000	1273.0	2.8	38.9	8.6	
500000	2476.5	1.2	75.6	-9.3	
1000000	5154.8	0.4	157.4	2.3	
			基準値	±20%以内 (定量下限・ 上限±25%以内)	r≧0.9900

[0100] [表6]

試料 (cells/マウス腎g)	平均 (n=2)	%CV	S/N比	%RE	r値
0	18.5	26.8	-	-	0.9998
20000	30.8	8.0	1.7	-1.8	
50000	57.3	6.8	3.1	4.0	
100000	102.8	12.0	5.6	1.4	
200000	195.0	0.7	10.5	-3.4	
500000	531.8	4.5	28.7	-0.4	
1000000	1147.8	5.0	62.0	1.6	
			基準値	±20%以内 (定量下限・ 上限±25%以内)	r≧0.9900

[0101] ［実施例３］

マウス抽出ゲノムを用いたマウス交差反応性の検討

１．材料

（１）生体試料

ヒト細胞の測定対象として、ＨＥＫ２９３細胞を用いた。また、マウス抽出ゲノムとして、Ｍｏｕｓｅ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ（Ｐｒｏｍｅｇａ社、製品番号：Ｇ３０９１）を用いた。マウス抽出ゲノムのゲノム濃度は２００ｎｇ／μＬである。

[0102] （２）標的配列

標的配列としてＡｌｕ配列（１）（配列番号１）、ＬＩＮＥ－１配列（配列番号７）を用いた。

[0103] ２．方法

（１）ヒト細胞の溶解処理

実施例１－１と同様の手順で、ＨＥＫ２９３細胞を溶解処理した。

（２）超音波によるゲノムＤＮＡ断片化処理

溶解処理したＨＥＫ２９３細胞溶液１３０μＬを、ｍｉｃｒｏＴＵＢＥ－１３０　ＡＦＡ　Ｆｉｂｅｒ　Ｓｃｒｅｗ－Ｃａｐ（Ｃｏｖａｒｉｓ社、製品番号：５２０１６６）に分注し、Ｃｏｖａｒｉｓ　Ｆｏｃｕｓｅｄ－ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃａｔｏｒ　Ｍ２２０にて超音波処理を実施した。超音波の各パラメーターは、ＰＩＰ　５０Ｗ、ＤＦ　２０％、ＣＰＢ　２００ｃｐｂとし、処理時間は６０分とした。マウス抽出ゲノムに関しても同様に超音波処理した。

[0104] （３）捕捉プローブの調製

実施例１－１（３）及び実施例２（３）と同様の手順で、各標的配列に対する捕捉プローブを調製した。

[0105] （４）ヒト細胞サンプルの調製

上記（２）で断片化処理を実施した1×10^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬヒト細胞溶液は、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ　２０水溶液にて１００、４０００ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるよう希釈した。

[0106] （５）捕捉プローブへの標的配列の捕捉（１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応）

上記（４）で調製したヒト細胞サンプル、マウス抽出ゲノム及びブランクサンプル５μＬに、１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液を１５μＬ加えて計２０μＬとし、９５℃で２分間反応させた後、各温度で１８時間反応させた。ヒト細胞サンプルは、各標的配列測定系においてＳ／Ｎ比２．０以上の定量下限付近とし、Ａｌｕ配列（１）、ＬＩＮＥ－１配列の順に１００、４０００ｃｅｌｌｓ／ｍＬのヒト細胞サンプルをそれぞれ使用した。また、１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液は実施例１－１と同様の組成であり、捕捉プローブとアシストプローブは［標的配列と使用する核酸プローブ］に記載の通りの組合せで添加した。

[0107] 以下、実施例１－１及び２の（６）～（８）と同様の手順で本実施例を実施した。

[0108] ３．結果

本発明方法における、標的遺伝子ごとのマウス交差反応性の結果を表７及び図３に示した。Ａｌｕ配列（１）、ＬＩＮＥ－１配列共に、マウス抽出ゲノムを測定対象とした場合のシグナル値はＢＬ値と同程度であり、定量下限付近のヒト細胞サンプルのシグナル値と比較して低い値であった。以上から、本発明において使用する標的遺伝子に関して、マウスとの交差反応性は非常に低いことが示された。

[0109] [表7]

	Alu配列(1)	LINE-1配列
BL値	110.3	10.8
定量下限ヒト細胞数	339.0	33.5
マウスゲノム	126.3	19.0

[0110] ［実施例４］

ハイブリダイゼーション法における検出方法の検討

１．材料

（１）生体試料

測定対象のヒト細胞として、ＨＥＫ２９３細胞を用いた。また、非ヒト動物試料としてマウス腎臓（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社）を使用した。

[0111]（２）標的配列

標的配列としてＡｌｕ配列（１）（配列番号１）を用いた。

[0112]　２．方法

（１）マウス腎臓及びヒト細胞の溶解処理

実施例１－１と同様の手順で、マウス腎臓及びＨＥＫ２９３細胞の溶解処理を実施した。

（２）超音波によるゲノムＤＮＡ断片化処理

実施例１－１と同様の手順で、マウス腎臓マトリクスに混合したＨＥＫ２９３細胞のゲノムＤＮＡを断片化した。

[0113]（３）捕捉プローブの調製

実施例１－１（３）と同様の手順で、捕捉プローブを調製した。

[0114]（４）ヒト細胞サンプルの調製

上記（２）で断片化処理を実施したヒト細胞・マウス腎臓混合サンプルを、ＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒにて１０倍希釈した溶解済みマウス腎臓マトリクスにて段階希釈し、細胞数6×10^{3}、6×10^{4}、6×10^{5}ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇとなるようサンプルを調製した。

[0115]（５）捕捉プローブへの標的配列の捕捉（１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応）

上記（４）で調製したヒト細胞サンプル及びブランクサンプル５μＬに、１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液を１５μＬ加えて計２０μＬとし、９５℃で２分間反応させた後、９５℃で１８時間反応させた。１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液は実施例１－１と同様の組成である。アシストプローブは、ＰＡＬＳＡＲ法にて検出するサンプルに関してはＡＰ－Ａｌｕ配列（１）（配列番号３）を、デュアルハイブリダイゼーション法に

て検出するサンプルに関してはＡＰ－Ａｌｕ配列（１）－５’Ｂｉｏｔｉｎ（配列番号１２）をそれぞれ使用した。ＡＰ－Ａｌｕ配列（１）－５’Ｂｉｏｔｉｎは、５’末端がビオチンで標識された核酸プローブである。

[0116] 〈ＡＰ－Ａｌｕ配列（１）－５’Ｂｉｏｔｉｎの塩基配列〉

5’-(Biotin)-CTCACTGCAACCTCCGCCTCC-3’（塩基部分は配列番号１２）

[0117] ＰＡＬＳＡＲ法にて検出するサンプルに関しては、以下、実施例１－１の（６）～（８）と同様の手順で実施した。また、デュアルハイブリダイゼーション法にて検出するサンプルに関しては、以下、実施例１－１の（８）と同様の手順で実施した。

[0118] ３．結果

本発明のヒト細胞の定量方法における、ハイブリダイゼーション法における検出方法比較の結果を表８及び図４に示した。デュアルハイブリダイゼーション法によって検出した場合、６０００ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇのサンプルをＳ／Ｎ比２．１で測定可能であった。これに対し、ＰＡＬＳＡＲ法を用いて検出した場合、デュアルハイブリダイゼーション法に比べてＳ／Ｎ比２．８とシグナル値は高く、より細胞数の少ないサンプルでも測定可能であることが示唆された。

[0119] [表8]

試料 (cells/マウス腎g)	平均(n=2)		S/N比	
	PALSAR法	デュアルハイブリダイゼーション法	PALSAR法	デュアルハイブリダイゼーション法
0	84.3	56.3	-	-
5000	238.0	116.0	2.8	2.1
50000	1826.3	647.8	21.7	11.5
500000	15589.8	4659.8	185.0	82.8

[0120] ［実施例５］

断片化処理条件の検討

１．材料

（１）生体試料

測定対象のヒト細胞として、ＨＥＫ２９３細胞を用いた。また、非ヒト動物試料としてマウス腎臓（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社）を使用した。

[0121] （２）標的配列

標的配列としてＡｌｕ配列（１）（配列番号１）を用いた。

[0122] ２．方法

（１）マウス腎臓及びヒト細胞の溶解処理

実施例１－１と同様の手順で、マウス腎臓及びＨＥＫ２９３細胞の溶解処理を実施した。

（２）超音波によるゲノムＤＮＡ断片化処理

溶解処理したマウス腎臓とＨＥＫ２９３細胞を混合し、超音波破砕装置Ｃｏｖａｒｉｓ　Ｆｏｃｕｓｅｄ－ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃａｔｏｒ　Ｍ２２０（Ｃｏｖａｒｉｓ社、製品番号：Ｍ２２０）を用いて、ゲノムＤＮＡの断片化処理を実施した。

[0123] （２－１）サンプル調製

実施例１－１と同様の手順で、ヒト細胞・マウス腎臓混合サンプルを調製した。

[0124] （２－２）超音波処理

ｍｉｃｒｏＴＵＢＥ－５０　ＡＦＡ　Ｆｉｂｅｒ　Ｓｃｒｅｗ－Ｃａｐ（Ｃｏｖａｒｉｓ社、製品番号：５２０１６６）に上記サンプルを５５μＬずつ分注し、Ｃｏｖａｒｉｓ　Ｆｏｃｕｓｅｄ－ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃａｔｏｒ　Ｍ２２０にて超音波処理を実施した。超音波処理条件は、表９の通り合計７条件とした。また比較のため、超音波処理による断片化を実施しないサンプルも準備した。

[0125] （３）捕捉プローブの調製

実施例１－１（３）と同様の手順で、捕捉プローブを調製した。

[0126] （４）ヒト細胞サンプルの調製

上記（２）で断片化処理を実施したヒト細胞・マウス腎臓混合サンプルを

、ＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒにて１０倍希釈した溶解済みマウス腎臓マトリクスにて希釈し、細胞数６×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇとなるようサンプルを調製した。

[0127] （５）捕捉プローブへの標的配列の捕捉（１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応）

上記（４）で調製したヒト細胞サンプル及びブランクサンプル５μＬに、１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液を１５μＬ加えて計２０μＬとし、９５℃で２分間反応させた後、９５℃で１８時間反応させた。１ｓｔ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液は実施例１－１と同様の組成であり、アシストプローブとしてＡＰ－Ａｌｕ配列（１）（配列番号３）を使用した。

[0128] 以下、実施例１－１の（６）～（８）と同様の手順で本実施例を実施した。

[0129] （９）超音波処理したヒト細胞ゲノムＤＮＡの電気泳動

上記（２）で断片化処理を実施したＨＥＫ２９３細胞・マウス腎臓混合サンプルから、エタノール沈殿によりゲノムＤＮＡを抽出・精製し、Ｅ－Ｇｅｌ™ Ｐｏｗｅｒ　Ｓｎａｐ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ™社、製品番号：Ｇ８３００）を用いて、アガロース電気泳動にて各超音波処理条件におけるゲノムＤＮＡの断片長を検証した。

[0130] ３．結果

本発明のヒト細胞の定量方法における、ゲノムＤＮＡの断片化処理条件の検討結果を表１０及び図５Ａ、５Ｂに示した。表１０の断片長（ｂｐ）は、表９及び図５Ｂの電気泳動結果（ｂｐ）を参照した。断片化処理を実施しなかった比較例に比べ、断片化処理を実施した条件１～７ではシグナル値が上昇しており、ゲノムＤＮＡの断片長が短くなるほどその上昇効果は高かった。また、条件６と条件７を比較すると、処理時間のより長い条件７の方がシグナル値は高いことから、超音波処理によるゲノムＤＮＡの断片化がより均一に施されることで、より高感度に定量可能であることが示された。

[0131] [表9]

泳動レーン	断片化条件	泳動結果(bp)	超音波条件		
			強度	照射割合	時間
M	ラダー	-	-		
1	断片化なし	2,30000程度	断片化なし		
2	条件1	600	2	2	5秒
3	条件2	550	2	2	10秒
4	条件3	500	2	2	20秒
5	条件4	400	5	5	52秒
6	条件5	300	10	10	70秒
7	条件6	200	20	20	330秒
8	条件7	250	20	20	15分
9	ラダー	-	-		

[0132] [表10]

	断片化条件	断片長(bp)	MFI
比較例5	断片化なし	30000	1211.5
実施例5	条件1	600	1411.0
	条件2	550	1398.8
	条件3	500	1538.5
	条件4	400	1928.5
	条件5	300	2291.8
	条件6	200	4775.0
	条件7	200	6396.8

[0133] ゲノム断片化処理方法として酵素と超音波処理を併用した方法についての実施例を以下に示した。

[0134] ［実施例６－１］

酵素量の検討

１．材料

（１）生体試料

測定対象のヒト細胞として、ＨＥＫ２９３細胞を用いた。また、非ヒト動

物試料としてマウス腎臓（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社）を使用した。マウスはＣ５７ＢＬ／６Ｊ系統の８週齢オスを用いた。

[0135] （２）標的配列

標的配列としてＡｌｕ配列（１）（配列番号１）を用いた。

[0136] 〈Ａｌｕ配列（１）の塩基配列〉

5’-GCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAG-3’（塩基部分は配列番号１）

[0137] ２．方法

（１）マウス腎臓及びヒト細胞の溶解処理

マウス腎臓及びヒト細胞をそれぞれ調製し、ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ Ｌｙｓｉｓ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔａｉｌ）（Ｖｉａｇｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ社、製品番号：１０２－Ｔ）及びプロテイナーゼＫ溶液（関東化学社、製品番号：３４０６０－９６）を用いて溶解処理を実施した。

[0138] （１－１）マウス腎臓の調製

ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ Ｌｙｓｉｓ Ｒｅａｇｅｎｔ （Ｔａｉｌ）とプロテイナーゼＫ溶液は１００：１の比率で混合し、溶解反応試薬として調製した。マウス腎臓をチューブに秤量後、組織重量が２００ｍｇ／ｍＬとなるよう溶解反応試薬を添加し、よく懸濁した。

[0139] （１－２）ヒト細胞の調製

凍結保存液中のＨＥＫ２９３細胞を流水にて融解し、チューブに２５０μＬ分注した。遠心し、上清を除去後、等量の１×ＰＢＳを添加し、ピペッティングにて細胞表面に残存した凍結保存液を洗浄した。再度遠心、上清を除去後、１×ＰＢＳを２０μＬ添加し、ＴＣ２０™全自動セルカウンター（ＢＩＯ ＲＡＤ社、製品番号：１４５０１０１Ｊ１）を用いて細胞数を計測した。計測結果より、全量に対し1×10^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるよう、ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ Ｌｙｓｉｓ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔａｉｌ）を添加した。また、全量１／１００量のプロテイナーゼＫ溶液を添加し、よく懸濁した。

[0140] （１－３）溶解処理

１，０００ｒｐｍにてチューブを振盪しながら、５５℃で１６時間反応させた。一旦取り出して懸濁後、１，０００ｒｐｍ、８５℃にて４５分間反応させ、プロテイナーゼＫを失活させた。

[0141] （２）酵素及び超音波併用によるゲノムＤＮＡ断片化処理

（２－１）サンプル調製

ＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒにて８倍希釈した溶解済みマウス腎臓にて、溶解処理したＨＥＫ２９３細胞溶液を段階希釈して、細胞数７．５×10^3、７．５×10^4、７．５×10^5ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇ（最終的な細胞数が６×10^3、６×10^4、６×10^5ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇ）となるよう調製した。

[0142] （２－２）酵素処理

溶液全量１０μＬ中、終濃度が１×ＤＮａｓｅ　Ｉ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ及び、ＤＮａｓｅ　Ｉ（ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社、製品番号：Ｍ０３０３Ｓ）濃度が０．００１、０．００２５、０．００５、０．００７５、０．０１、０．０２５、０．０５、０．０７５、０．１Ｕ／ｗｅｌｌとなるように各酵素ミックスを調製した。９６ウェルマイクロプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、製品番号：７００７）に各酵素ミックス１０ｕＬ及び、（２－１）にて調製したヒト細胞・マウス腎臓混合サンプルを６０μＬ添加し、３７℃で３０分インキュベートした。インキュベート後、０．５Ｍ　ＥＤＴＡを各ウェルに５μＬずつ添加し、酵素反応を停止させた。

[0143] （２－３）超音波処理

酵素処理後のプレート上のサンプルを超音波装置ＰＩＸＵＬ　Ｍｕｌｔｉ－Ｓａｍｐｌｅ　Ｓｏｎｉｃａｔｏｒ（アクティブ・モティフ社）にセットし、超音波処理を行った。装置のパラメーターは、Ｐｕｌｓｅ　５０、ＰＲＦ　１．００、Ｂｕｒｓｔ　ｒａｔｅ　２０．００、処理時間は１２０分とした。

[0144] （３）捕捉プローブの調製

担体であるＭｉｃｒｏＰｌｅｘ™ Ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅｓ（Ｌｕｍｉｎｅｘ社、製品番号：ＬＣ１００２２－０１）に、核酸プローブＣＰ－Ａｌｕ配列（１）（配列番号２）を、３’末端のＮＨ２修飾を介して結合させることにより捕捉プローブを調製した。

[0145] 〈ＣＰ－Ａｌｕ配列（１）の塩基配列〉

5’-CGGGTTCAAGCGATTCTCCTGC-(NH2)-3’（塩基部分は配列番号２）

[0146] （４）捕捉プローブへの標的核酸の捕捉（１ｓｔ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応）

上記（２）で断片化処理した各サンプル１０μＬに、１ｓｔ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液を１５μＬ加えて計２５μＬとし、９５℃で２分間反応させた後、４７℃で１８時間反応させた。

[0147] （４－１）１ｓｔ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液の組成

上記（３）で担体へ固定した捕捉プローブ０．４μＬ（８００個）、

５Ｍ ＴＭＡＣ（テトラメチルアンモニウムクロリド）７．５μＬ、

１０×ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ［５００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、４０ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、８．０％ Ｎ－ラウロイルサルコシンナトリウム］ ３．７５μＬ、

２０％ ＰＥＧ２００００（ポリエチレングリコール） １．２５μＬ、

ＲＮａｓｅ Ｆｒｅｅ ｗａｔｅｒ １．６μＬ、

１ｐｍｏｌ／μＬアシストプローブ（ＡＰ－Ａｌｕ配列（１）（配列番号３）） ０．５μＬ。

[0148] 〈ＡＰ－Ａｌｕ配列（１）の塩基配列〉

5’-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCACTGCAACCTCCGCCTCC-3’（塩基部分は配列番号３）

[0149] （５）非標的配列ゲノム断片の洗浄

１ｓｔ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応終了後の反応液を遠心し、上清を除去した。１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ） ［１×ＰＢＳ ［１３７ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、８．１ｍＭ Ｄｉｓｏｄｉｕｍ

Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ、２．６８ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、１．４７ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｄｉｈｙｄｒｏｇｅｎｐｈｏｓｐｈａｔｅ］、０．０２％ Ｔｗｅｅｎ２０、１．５ ｐｐｍ ＰｒｏＣｌｉｎ３００］で１回洗浄した後、再度遠心し、上清を除去した。

[0150] （６）ＰＡＬＳＡＲ反応によるシグナル増幅

上清除去後の各ウェルに対し、ＰＡＬＳＡＲ反応液を５０μＬ加え、４２℃で１時間反応させた。本実施例１に使用する自己凝集可能な一対のプローブ（シグナル増幅用プローブともいう）の配列は、５’末端がビオチンで標識された以下のＨＣＰ－１及びＨＣＰ－２である。

[0151] 〈ＨＣＰ－１の塩基配列〉

5’-(Biotin)-CAACAATCAGGACGATACCGATGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3’（塩基部分は配列番号１０）

[0152] 〈ＨＣＰ－２の塩基配列〉

5’-(Biotin)-GTCCTGATTGTTGCTTCATCGGTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3’（塩基部分は配列番号１１）

[0153] （６－１）ＰＡＬＳＡＲ反応液の組成

Ｎｕｃｌｅａｓｅ－Ｆｒｅｅ Ｗａｔｅｒ ２２．４３μＬ、

２０％ ＰＥＧ２００００（ポリエチレングリコール）１．２５μＬ、

５Ｍ ＴＭＡＣ １５．０μＬ、

１０×ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ［５００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、４０ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、８％ Ｎ－ラウロイルサルコシンナトリウム］ ８．０μＬ、

２０ｐｍｏｌ／μＬ ＨＣＰ－１ １．７５μＬ、

２０ｐｍｏｌ／μＬ ＨＣＰ－２ １．５８μＬ

[0154] （７）蛍光検出

ＰＡＬＳＡＲ反応終了後の反応液を、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ）［１×ＰＢＳ［１３７ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、８．１ｍＭ Ｄｉｓｏｄｉｕｍ Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ、２．６８ｍＭ Ｐｏｔａｓｓ

ｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、１．４７ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｄｉｈｙｄｒｏｇｅｎｐｈｏｓｐｈａｔｅ］、０．０２％ Ｔｗｅｅｎ２０、１．５ｐｐｍ ＰｒｏＣｌｉｎ３００］で１回洗浄した。

その後、検出試薬［ＳＡ－ＰＥ（Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－Ｒ－Ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ、Ｐｒｏｚｙｍｅ社製） ２．５μｇ／ｍＬ］を５０μＬ加えて２５℃の遮光下で３０分静置した後、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ）で２回洗浄した。その後、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ）を７５μＬ加えて、Ｌｕｍｉｎｅｘ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｌｕｍｉｎｅｘ社製）でビーズ及びＳＡ－ＰＥ複合体からの蛍光を測定し、ヒト細胞ゲノムのシグナルを検出した。

[0155] ３．結果

酵素処理と超音波処理を併用したゲノム断片化方法について、酵素量の検討結果を図６Ａ及び図６Ｂに示した。

図６Ａより、酵素量に応じてシグナルに変化がみられた。最もシグナル値の高い酵素量は０．００７５Ｕ／ｗｅｌｌであった。また、断片化処理後のサンプルを電気泳動した図６Ｂより、各サンプルの断片長は、０．００１～０．０１Ｕ／ｗｅｌｌの酵素量で２００ｂｐ前後、０．０２５～０．１Ｕ／ｗｅｌｌの酵素量で１００ｂｐ前後、あるいは泳動上目視できない結果となった。これより、酵素を使用した断片化を行った場合においても、断片鎖長を２００ｂｐ前後となるよう酵素量を調整することで、より良好なシグナルを検出できることがわかった。

[0156] ［実施例６－２］

マウス腎マトリクスにおける酵素及び超音波併用ゲノム断片化処理によるヒト細胞定量の検討

[0157] １．材料

（１）生体試料

測定対象のヒト細胞として、ＨＥＫ２９３細胞を用いた。また、非ヒト動物試料としてマウス腎臓（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社）を使用

した。マウスはＣ５７ＢＬ／６Ｊ系統の８週齢オスを用いた。

（２）標的配列

標的配列としてＡｌｕ配列（１）（配列番号１）を用いた。

[0158] ２．方法

（１）マウス腎臓及びヒト細胞の溶解処理

マウス腎臓及びヒト細胞をそれぞれ調製し、ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ Ｌｙｓｉｓ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔａｉｌ）（Ｖｉａｇｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ社、製品番号：１０２－Ｔ）及びプロテイナーゼＫ溶液（関東化学社、製品番号：３４０６０－９６）を用いて溶解処理を実施した。

[0159] （１－１）マウス腎臓の調製

ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ Ｌｙｓｉｓ Ｒｅａｇｅｎｔ （Ｔａｉｌ）とプロテイナーゼＫ溶液は１００：１の比率で混合し、溶解反応試薬として調製した。マウス腎臓をチューブに秤量後、組織重量が２００ｍｇ／ｍＬとなるよう溶解反応試薬を添加し、よく懸濁した。

[0160] （１－２）ヒト細胞の調製

凍結保存液中のＨＥＫ２９３細胞を流水にて融解し、チューブに２５０μＬ分注した。遠心し、上清を除去後、等量の１×ＰＢＳを添加し、ピペッティングにて細胞表面に残存した凍結保存液を洗浄した。再度遠心、上清を除去後、１×ＰＢＳを２０μＬ添加し、ＴＣ２０™全自動セルカウンター（ＢＩＯ ＲＡＤ社、製品番号：１４５０１０１Ｊ１）を用いて細胞数を計測した。計測結果より、全量に対し1×10^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるよう、ＤｉｒｅｃｔＰＣＲ Ｌｙｓｉｓ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔａｉｌ）を添加した。また、全量１／１００量のプロテイナーゼＫ溶液を添加し、よく懸濁した。

[0161] （１－３）溶解処理

１，０００ｒｐｍにてチューブを振盪しながら、５５℃で１６時間反応させた。一旦取り出して懸濁後、１，０００ｒｐｍ、８５℃にて４５分間反応させ、プロテイナーゼＫを失活させた。

[0162] （２）酵素及び超音波併用によるゲノムＤＮＡ断片化処理

（２－１）サンプル調製

ＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒにて８倍希釈した溶解済みマウス腎臓にて、溶解処理したＨＥＫ２９３細胞溶液を段階希釈して、細胞数７．５×10^3、１．５×10^4、３．７５×10^4、７．５×10^4、１．５×10^5、３．７５×10^5、７．５×10^5ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇ（最終的な細胞数が６×10^3、１．２×10^3、３×10^4、６×10^4、１．２×10^5、３×10^5、６×10^5ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇ）となるよう検量線サンプルを調製した。ＱＣサンプルは、細胞数７．５×10^3、１.５×10^4、７．５×10^4、３．７５×10^5、７．５×10^5ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇ（最終的な細胞数が６×10^3、１.２×10^3、６×10^4、３×10^5、６×10^5ｃｅｌｌｓ／腎臓ｇ）となるよう調製し、各サンプル名をＬＬＯＱ、ＬＱＣ、ＭＱＣ、ＨＱＣ、ＵＬＯＱとした。ＱＣサンプルは３系列調製し、１系列ごとに段階希釈した。

[0163] （２－２）酵素処理

溶液全量１０μＬ中、終濃度が１×ＤＮａｓｅ　Ｉ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ及び、ＤＮａｓｅ　Ｉ濃度が０．００７５Ｕ／ｗｅｌｌとなるように酵素ミックスを調製した。９６ウェルマイクロプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、製品番号：７００７）に酵素ミックス１０μＬ、（２－１）にて調製したヒト細胞・マウス腎臓混合サンプルを６０μＬ添加し、３７℃で３０分インキュベートした。インキュベート後、０．５Ｍ　ＥＤＴＡを各ウェルに５μＬずつ添加し、酵素反応を停止させた。

[0164] （２－３）超音波処理

酵素処理後のプレート上のサンプルを超音波装置ＰＩＸＵＬ　Ｍｕｌｔｉ－Ｓａｍｐｌｅ　Ｓｏｎｉｃａｔｏｒ（アクティブ・モティフ社）にセットし、超音波処理を行った。装置のパラメーターは、Ｐｕｌｓｅ　５０、ＰＲＦ　１．００、Ｂｕｒｓｔ　ｒａｔｅ　２０．００、処理時間は１２０分とした。

[0165] （３）捕捉プローブの調製

担体であるＭｉｃｒｏＰｌｅｘ™ Ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅｓ（Ｌｕｍｉｎｅｘ社、製品番号：ＬＣ１００２２－０１）に、核酸プローブＣＰ－Ａｌｕ配列（１）（配列番号２）を、３’末端のＮＨ２修飾を介して結合させることにより捕捉プローブを調製した。

[0166] （４）捕捉プローブへの標的核酸の捕捉（１ｓｔ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応）

上記（２）で断片化処理した各サンプル１０μＬに、１ｓｔ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液を１５μＬ加えて計２５μＬとし、９５℃で２分間反応させた後、４７℃で１８時間反応させた。

（４－１）１ｓｔ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応液の組成

上記（３）で担体へ固定した捕捉プローブ０．４μＬ（８００個）、

５Ｍ ＴＭＡＣ（テトラメチルアンモニウムクロリド）７．５μＬ、

１０×ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ［５００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、４０ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、８．０％ Ｎ－ラウロイルサルコシンナトリウム］ ３．７５μＬ、

２０％ ＰＥＧ２００００（ポリエチレングリコール） １．２５μＬ、

ＲＮａｓｅ Ｆｒｅｅ ｗａｔｅｒ １．６μＬ、

１ｐｍｏｌ／μＬアシストプローブ（ＡＰ－Ａｌｕ配列（１）（配列番号３）） ０．５μＬ。

[0167] （５）非標的配列ゲノム断片の洗浄

１ｓｔ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ反応終了後の反応液を遠心し、上清を除去した。１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ） ［１×ＰＢＳ ［１３７ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、８．１ｍＭ Ｄｉｓｏｄｉｕｍ Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ、２．６８ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、１．４７ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｄｉｈｙｄｒｏｇｅｎｐｈｏｓｐｈａｔｅ］、０．０２％ Ｔｗｅｅｎ２０、１．５ ｐｐｍ ＰｒｏＣｌｉｎ３００］で１回洗浄した後、再度遠心し、上清を除去した。

[0168] （６）ＰＡＬＳＡＲ反応によるシグナル増幅

上清除去後の各ウェルに対し、ＰＡＬＳＡＲ反応液を５０μＬ加え、４２℃で１時間反応させた。自己凝集可能な一対のプローブ（シグナル増幅用プローブともいう）の配列は、5’末端がビオチンで標識された以下のＨＣＰ－１及びＨＣＰ－２である。

[0169] 〈ＨＣＰ－１の塩基配列〉

5’-(Biotin)-CAACAATCAGGACGATACCGATGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3’（塩基部分は配列番号１０）

[0170] 〈ＨＣＰ－２の塩基配列〉

5’-(Biotin)-GTCCTGATTGTTGCTTCATCGGTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3’（塩基部分は配列番号１１）

[0171] （６－１）ＰＡＬＳＡＲ反応液の組成

Ｎｕｃｌｅａｓｅ－Ｆｒｅｅ Ｗａｔｅｒ ２２．６μＬ、

２０％ ＰＥＧ２００００（ポリエチレングリコール）１．２５μＬ、

５Ｍ ＴＭＡＣ １５．０μＬ、

１０×ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ［５００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、４０ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、８％ Ｎ－ラウロイルサルコシンナトリウム］ ８．０μＬ、

２０ｐｍｏｌ／μＬ ＨＣＰ－１ １．７５μＬ、

２０ｐｍｏｌ／μＬ ＨＣＰ－２ １．４μＬ

[0172] （７）蛍光検出

ＰＡＬＳＡＲ反応終了後の反応液を、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％ Ｔ）［１×ＰＢＳ［１３７ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、８．１ｍＭ Ｄｉｓｏｄｉｕｍ Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ、２．６８ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ、１．４７ｍＭ Ｐｏｔａｓｓｉｕｍ Ｄｉｈｙｄｒｏｇｅｎｐｈｏｓｐｈａｔｅ］、０．０２％ Ｔｗｅｅｎ２０、１．５ｐｐｍ ＰｒｏＣｌｉｎ３００］で１回洗浄した。

その後、検出試薬［ＳＡ－ＰＥ（Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－Ｒ－Ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ、Ｐｒｏｚｙｍｅ社製） ２．５μｇ／ｍＬ］を５０

μＬ加えて２５℃の遮光下で３０分静置した後、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％　Ｔ）で２回洗浄した。その後、１×ＰＢＳ－ＴＰ（０．０２％　Ｔ）を７５μＬ加えて、Ｌｕｍｉｎｅｘ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｌｕｍｉｎｅｘ社製）でビーズ及びＳＡ－ＰＥ複合体からの蛍光を測定し、ヒト細胞ゲノムのシグナルを検出した。

[0173]　３．結果

マウス腎マトリクスにおける酵素及び超音波併用ゲノム断片化処理によるヒト細胞の定量結果を図７、表１１及び表１２に示した。

[0174] [表11]

試料 (cells/マウス腎g)	Average (n=2)	%CV	S/N比	%RE	r値
0	11.0	0.0	-	-	0.9994
6000	196.5	1.4	17.9	1.2	
12000	386.5	2.4	35.1	-2.1	
30000	1000.3	1.2	90.9	3.1	
60000	1742.3	4.5	158.4	-6.3	
120000	3464.0	0.2	314.9	2.7	
300000	7387.0	0.5	671.5	5.0	
600000	11597.3	2.2	1054.3	-3.8	
			基準値	±20%以内 (定量下限・ 上限±25%以内)	r≧0.9900

[0175] [表12]

試料	試料 (cells/マウス腎g)	%CV	%RE	%TE
LLOQ	6000	7.2	18.8	26.0
LQC	12000	7.2	7.3	14.6
MQC	60000	7.8	7.2	15.0
HQC	300000	2.6	7.2	9.7
ULOQ	600000	5.6	3.1	8.7
基準値		20%以内 (定量下限・ 上限25%以内)	±20%以内 (定量下限・ 上限±25%以内)	30%以内 (定量下限・ 上限40%以内)

[0176] 図７より、試料中のヒト細胞数に依存したシグナルが得られた。ヒト細胞数とシグナルの相関係数は、ｒ＝０．９９９７であり、相関性の高い検量線を作成することができた。また、作成した検量線の％ＲＥは－６．３～５．０％と、ガイドライン基準内の値を示した。さらに、ＱＣサンプルの％ＣＶ、％ＲＥ及び％ＴＥも基準内であった。

[0177] 以上より、本発明における測定法は、断片化方法が異なっても、ガイドライン基準を満たす堅牢性の高い定量法であることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0178] 本発明のヒト細胞の定量方法を用いることにより、ヒト細胞を主成分とする再生医療等製品開発の、探索段階における薬物動態・薬力学（Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ／Ｐｈａｒｍａｃｏｄｙｎａｍｉｃｓ（ＰＫ／ＰＤ））スクリーニング試験、非臨床段階における安全性試験、薬理試験及び薬物動態試験において、薬物が投与された非ヒト動物生体試料中の薬物濃度を、ゲノム抽出による回収率の補正を実施することなく、ヒト細胞数を直接、正確に測定することが出来る。

[0179] ［配列一覧］

以下の表に、本明細書中に開示したポリヌクレオチド配列を示す。

[0180]

[表13]

配列番号	配列名称	配列長[nts]	ポリヌクレオチド配列(5'→3')
1	Alu_sequence(1)	43	GCAGGAGAAT CGCTTGAACC CGGGAGGCGG AGGTTGCAGT GAG
2	CP-Alu_sequence(1)	22	CGGGTTCAAG CGATTCTCCT GC-(NH2)
3	AP-Alu_sequence(1)	81	AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA CTCACTGCAA CCTCCGCCTC C
4	Alu_sequence(2)	19	ATCTCGGCTC ACTGCAAGC
5	CP-Alu_sequence(2)	12	(NH2)- GCTTGCAGTG AG
6	AP-Alu_sequence(2)	67	5(L)5(L)G(L)A(L)G(L)A(L)T(L)AAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA
7	LINE-1_sequence	30	AATGCTAGAT GACACATTAG TGGGTGCAGC
8	CP-LINE-1_sequence	17	(NH2)- GCTGCACCCA CTAATGT
9	AP-LINE-1_sequence	73	GTCAT(L)5(L)T(L)A(L)G(L)C ATTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA
10	HCP-1	46	(Biotin)-CAACAATCAG GACGATACCG ATGAAGTTTT TTTTTTTTTT TTTTTT
11	HCP-2	46	(Biotin)-GTCCTGATTG TTGCTTCATC GGTATCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA
12	AP-Alu_sequence(1)-5'Biotin	21	(Biotin)-CTCACTGCAA CCTCCGCCTC C

[0181] 表中、「５」は塩基が５－メチルシトシンであることを意味し、（Ｌ）はデオキシリボースの２’及び４’の炭素が架橋で修飾されていることを意味する。また、（ＮＨ２）はポリヌクレオチドの５’末端又は３’末端がアミ

ノ基で修飾されていることを意味し、（Ｂｉｏｔｉｎ）はポリヌクレオチドの５’末端がビオチン標識されていることを意味する。

請求の範囲

[請求項1] ヒト細胞を測定する方法であって、

非ヒト動物細胞に由来する非ヒト動物成分及びヒト細胞を含む試料を準備する準備工程と、

前記試料中の細胞膜を溶解する溶解工程と、

前記ヒト細胞に特異的な核酸配列に対してハイブリダイゼーションアッセイを行うアッセイ工程と、

を含む、ヒト細胞を測定する方法。

[請求項2] 前記ヒト細胞に特異的な核酸配列がヒトに特異的な反復配列である、請求項１に記載のヒト細胞を測定する方法。

[請求項3] 前記ヒトに特異的な反復配列が、Ａｌｕ配列及び長鎖散在反復配列－１（ＬＩＮＥ－１）からなる群から選択される少なくとも１種を含む、請求項２に記載のヒト細胞を測定する方法。

[請求項4] 前記ハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いる核酸プローブが非ヒト動物のゲノムＤＮＡとハイブリダイズしない、請求項１又は２に記載のヒト細胞を測定する方法。

[請求項5] 前記溶解工程において、前記非ヒト動物成分及び前記ヒト細胞の細胞膜を、物理的方法、化学的方法、酵素的方法及びこれらの組合せからなる群から選択されるいずれかの方法で溶解する、請求項１又は２に記載のヒト細胞を測定する方法。

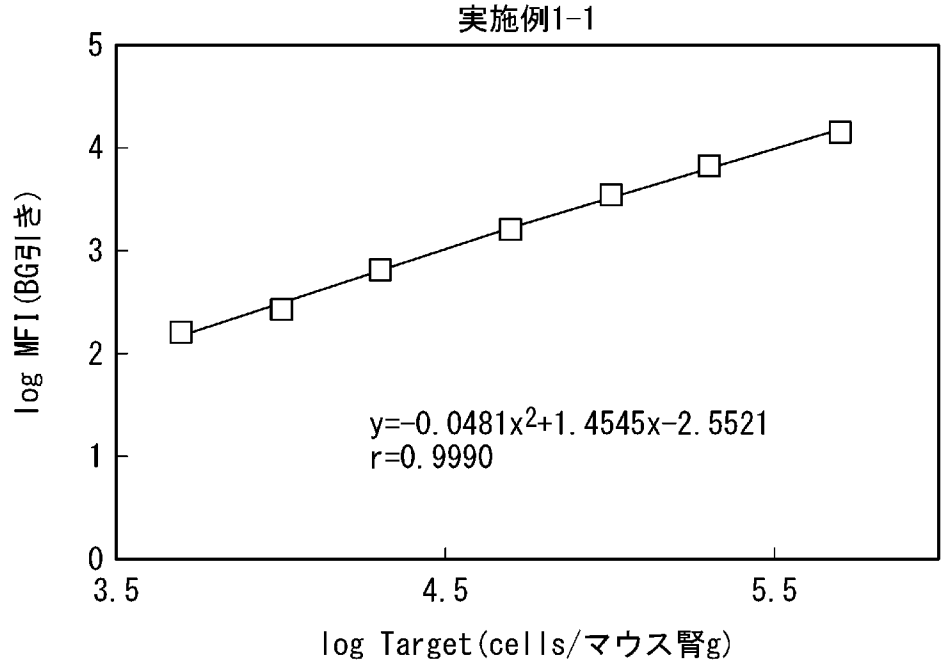
[請求項6] 前記ハイブリダイゼーションアッセイがＰＡＬＳＡＲ法又はデュアルハイブリダイゼーション法である、請求項１又は２に記載のヒト細胞を測定する方法。

[請求項7] 前記溶解工程の後に、さらに、前記非ヒト動物細胞及び前記ヒト細胞に含まれるゲノムＤＮＡを、物理的方法、化学的方法、酵素的方法及びこれらの組合せからなる群から選択されるいずれかの方法で断片化する断片化工程を含む、請求項１又は２に記載のヒト細胞を測定する方法。

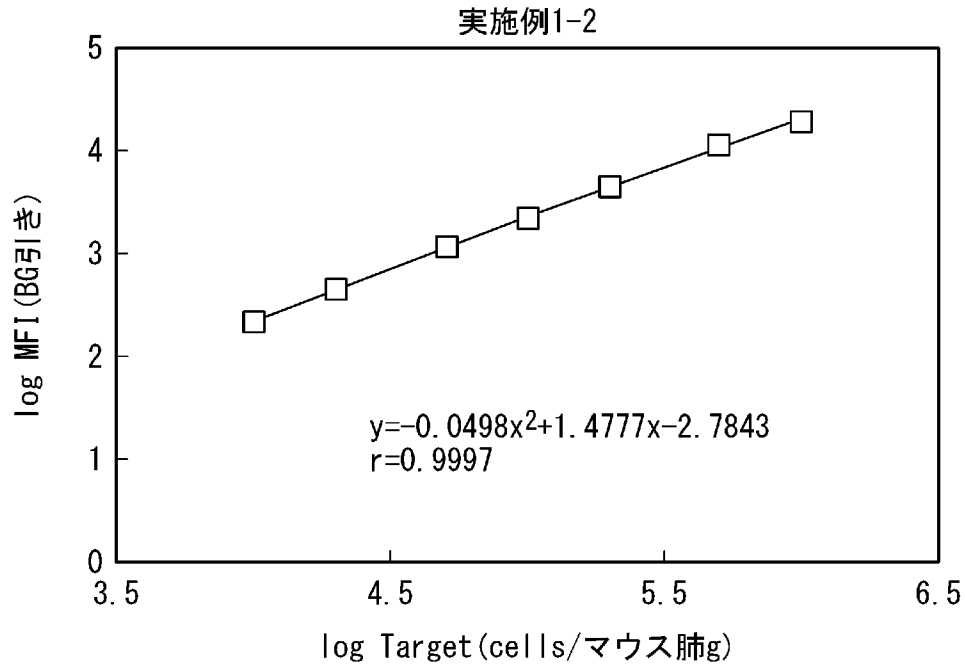
[請求項8] 前記ゲノムＤＮＡを断片化して得られるゲノムＤＮＡの断片長が５０～６００ｂｐである、請求項７に記載のヒト細胞を測定する方法。

[請求項9] 前記ヒト細胞の数を計測するための、請求項１又は２に記載のヒト細胞を測定する方法。

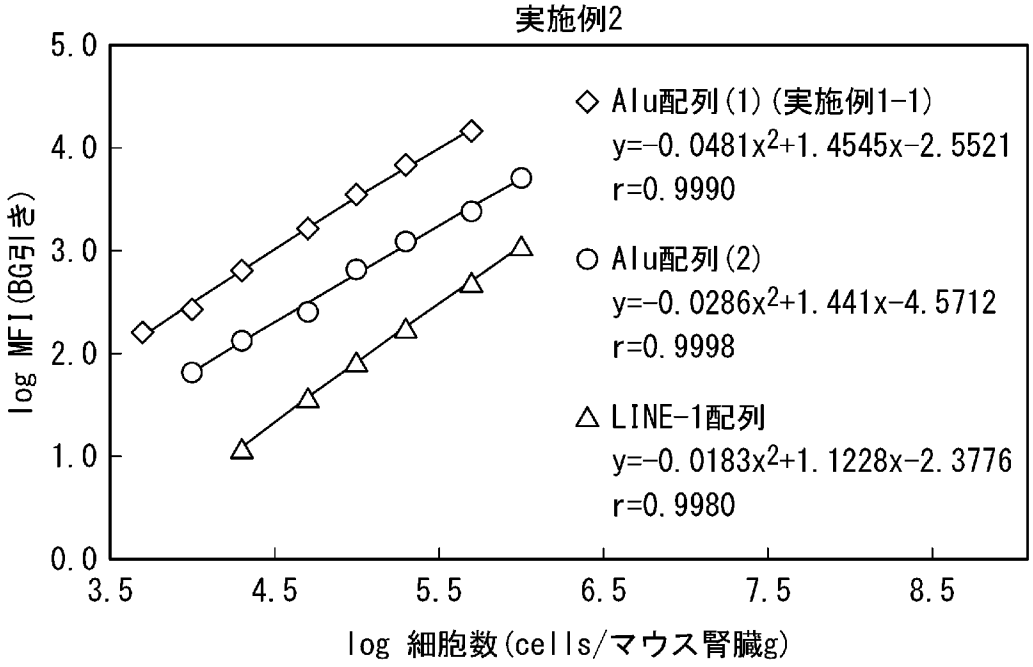
[図1A]


実施例1-1
log MFI(BG引き)
log Target(cells/マウス腎g)
y=-0.0481x2+1.4545x-2.5521
r=0.9990
0
1
2
3
4
5
3.5
4.5
5.5

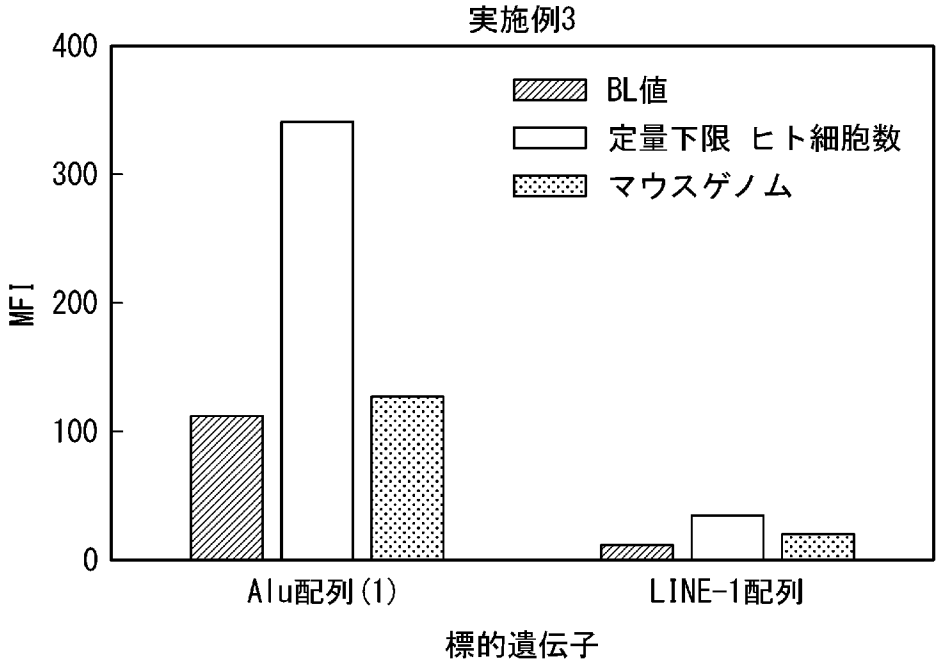
[図1B]


実施例1-2
log MFI(BG引き)
log Target(cells/マウス肺g)
y=-0.0498x2+1.4777x-2.7843
r=0.9997
0
1
2
3
4
5
3.5
4.5
5.5
6.5

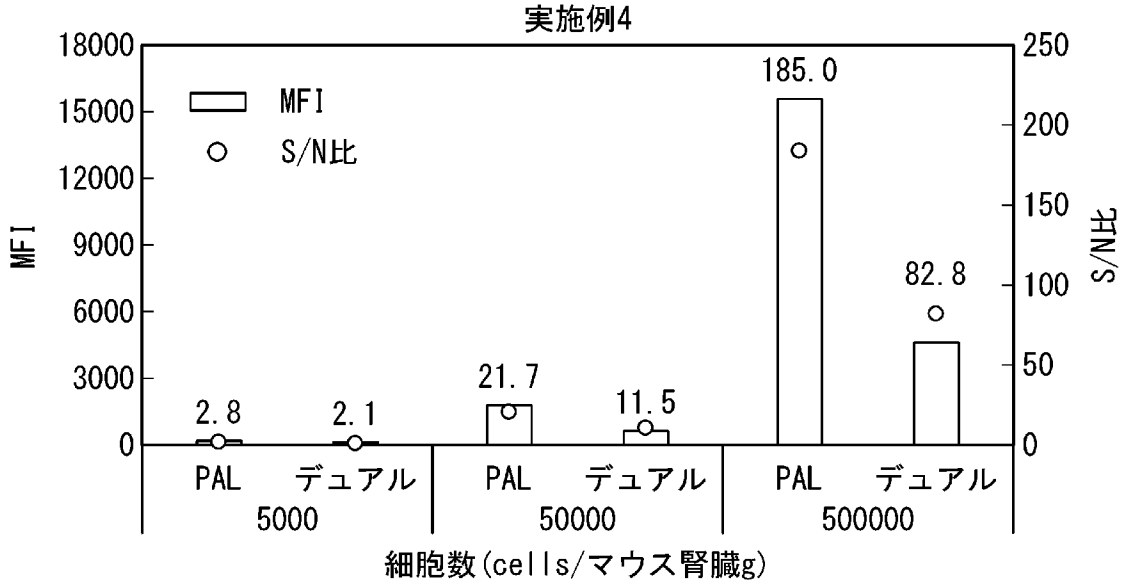
[図2]


実施例2
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
log MFI(BG引き)
3.5
4.5
5.5
6.5
7.5
8.5
log 細胞数(cells/マウス腎臓g)
◇ Alu配列(1)(実施例1-1)
y=-0.0481x2+1.4545x-2.5521
r=0.9990
○ Alu配列(2)
y=-0.0286x2+1.441x-4.5712
r=0.9998
△ LINE-1配列
y=-0.0183x2+1.1228x-2.3776
r=0.9980

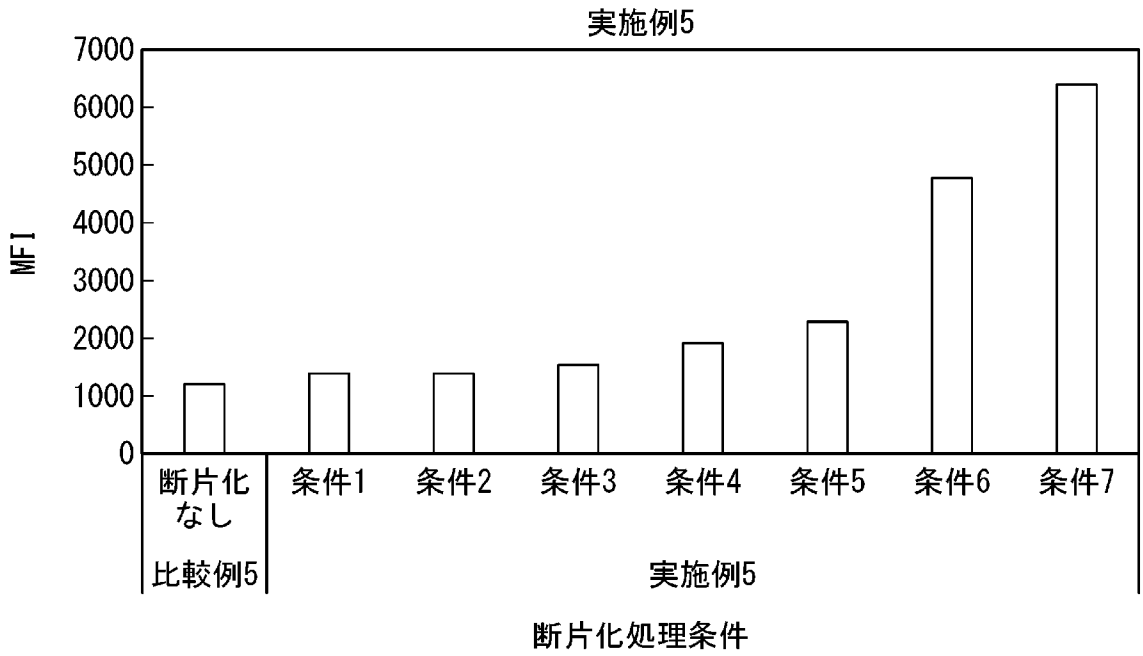
[図3]


実施例3
400
300
200
100
0
MFI
BL値
定量下限 ヒト細胞数
マウスゲノム
Alu配列(1)
LINE-1配列
標的遺伝子

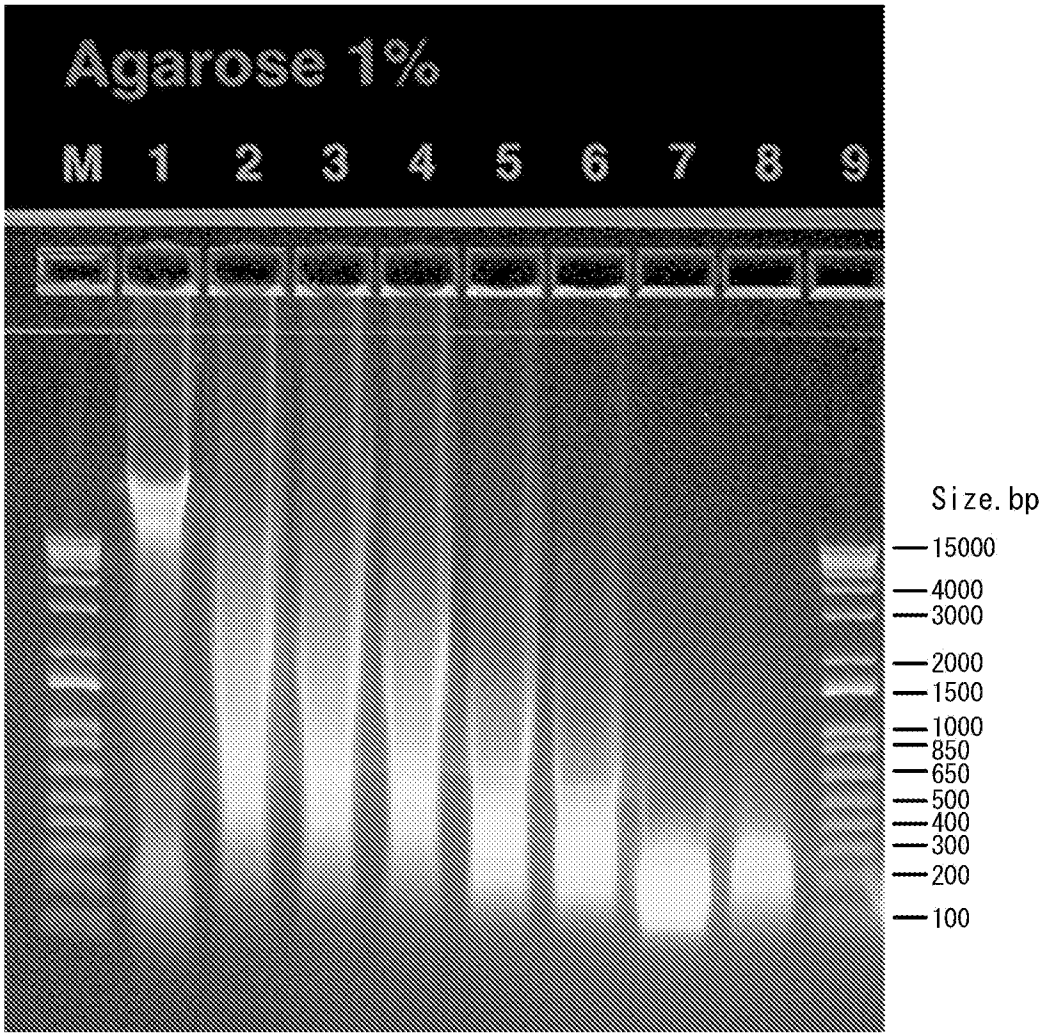
[図4]


実施例4
18000
15000
12000
9000
6000
3000
0
MFI
250
200
150
100
50
0
S/N比
MFI
S/N比
2.8
2.1
21.7
11.5
185.0
82.8
PAL
デュアル
PAL
デュアル
PAL
デュアル
5000
50000
500000
細胞数(cells/マウス腎臓g)

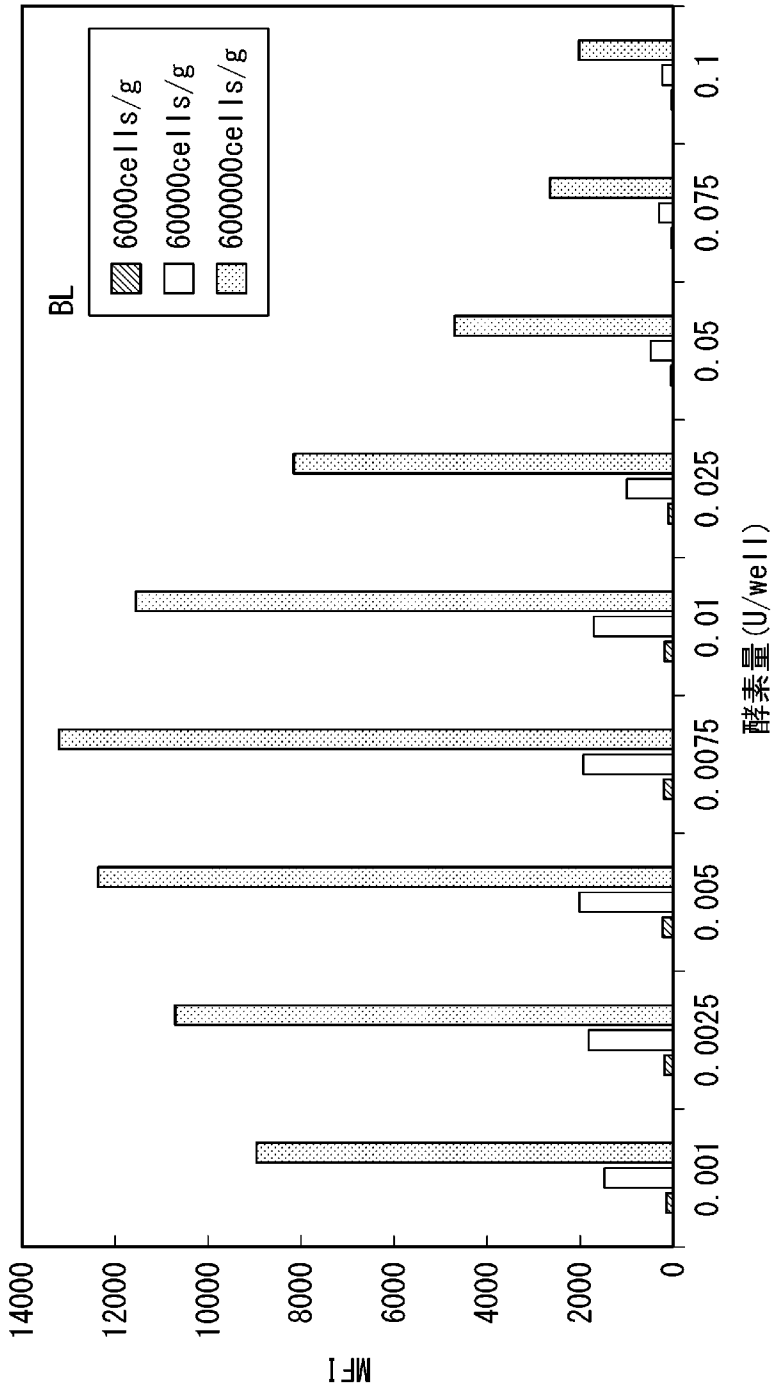
[図5A]


実施例5
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
MFI
断片化なし
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6
条件7
比較例5
実施例5
断片化処理条件

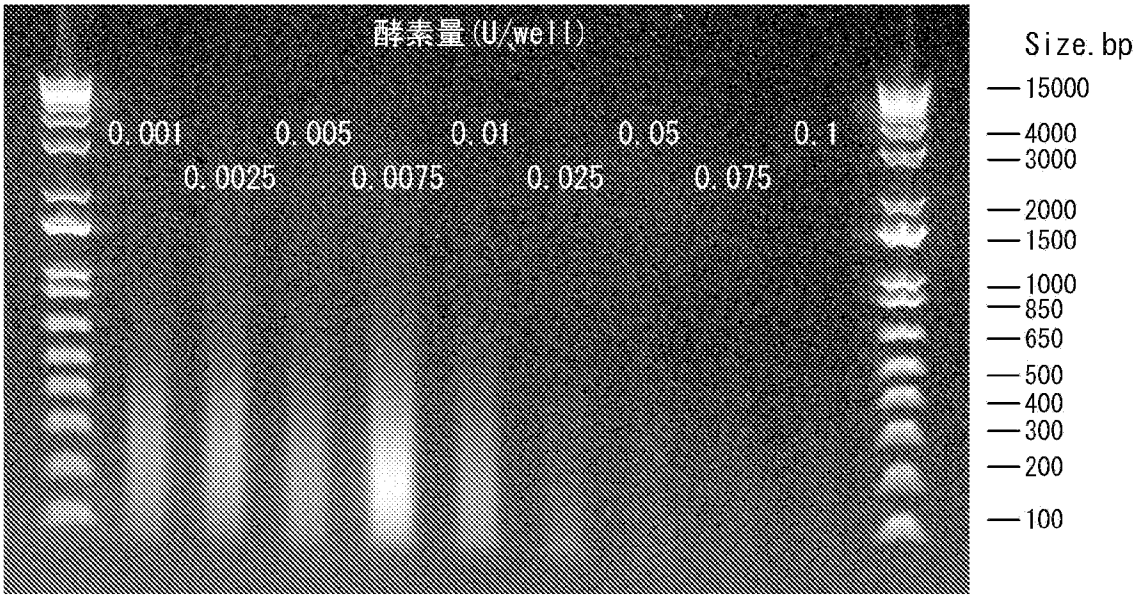
[図5B]


Agarose 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Size.bp
15000
4000
3000
2000
1500
1000
850
650
500
400
300
200
100

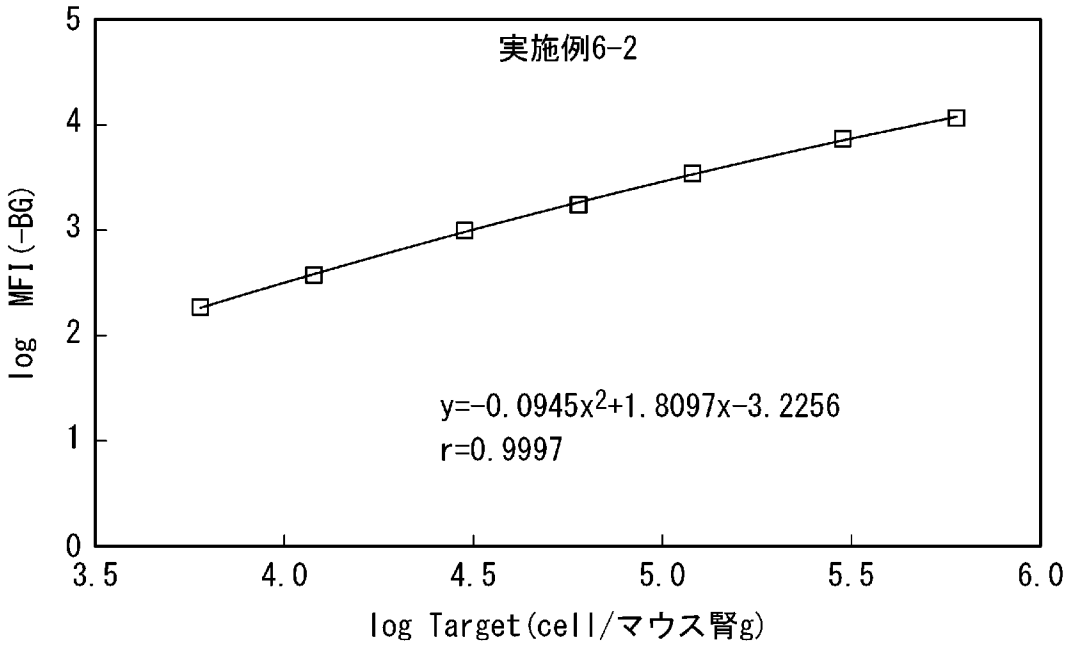
[図6A]


BL
6000cells/g
60000cells/g
600000cells/g
MFI
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.0025
0.005
0.0075
0.01
0.025
0.05
0.075
0.1
酵素量(U/well)

[図6B]


酵素量(U/well)
0.001
0.0025
0.005
0.0075
0.01
0.025
0.05
0.075
0.1
Size.bp
15000
4000
3000
2000
1500
1000
850
650
500
400
300
200
100

[図7]


実施例6-2
log MFI(-BG)
y=-0.0945x2+1.8097x-3.2256
r=0.9997
log Target(cell/マウス腎g)
0
1
2
3
4
5
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6813(2018.01)i; ***C12Q 1/06***(2006.01)i; ***C12Q 1/6816***(2018.01)i; *C12N 15/11*(2006.01)n
FI: C12Q1/6813 Z; C12Q1/06; C12Q1/6816 Z; C12N15/11 Z ZNA

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)

C12Q1/6813; C12Q1/06; C12Q1/6816; C12N15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/101375 A1 (UNIVERSITY AKITA) 07 June 2018 (2018-06-07) abstract, paragraphs [0051], [0053], [0057], [0117]	1-9
X	WO 2019/240073 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 19 December 2019 (2019-12-19) abstract, examples 1, 2	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ 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	Date of mailing of the international search report
02 August 2023	**15 August 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024068

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"Annex C/ST.25 text file format" should be read as 'ST.26 format"

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/024068

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2018/101375 A1	07 June 2018	(Family: none)	
WO 2019/240073 A1	19 December 2019	US 2021/0262044 A1 abstract, examples 1, 2 EP 3805409 A1 CN 112449652 A KR 10-2021-0027364 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/024068

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/6813(2018.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i; C12Q 1/6816(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)n
FI: C12Q1/6813 Z; C12Q1/06; C12Q1/6816 Z; C12N15/11 Z ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q1/6813; C12Q1/06; C12Q1/6816; C12N15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2018/101375 A1 (国立大学法人秋田大学) 07.06.2018 (2018-06-07) 要約, 段落0051, 0053, 0057, 0117	1-9
X	WO 2019/240073 A1 (武田薬品工業株式会社) 19.12.2019 (2019-12-19) 要約, 実施例1-2	1-9

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
02.08.2023	15.08.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
藤山　純 4B 1968

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/024068

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/024068

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2018/101375 A1	07.06.2018	（ファミリーなし）	
WO 2019/240073 A1	19.12.2019	US 2021/0262044 A1 Abstract, Examples 1-2 EP 3805409 A1 CN 112449652 A KR 10-2021-0027364 A	