(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2018-517421
(P2018-517421A)
(43)公表日　平成30年7月5日(2018.7.5)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12Q	1/686	(2018.01)	C12Q	1/686	Z	4B063
C12Q	1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		
C12Q	1/6837	(2018.01)	C12Q	1/6837	Z	
C12Q	1/6869	(2018.01)	C12Q	1/6869	Z	
C12Q	1/6881	(2018.01)	C12Q	1/6881	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 72 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-565309 (P2017-565309)
(86)(22)出願日　平成28年6月15日 (2016.6.15)
(85)翻訳文提出日　平成29年12月28日 (2017.12.28)
(86)国際出願番号　PCT/AU2016/050499
(87)国際公開番号　WO2016/201507
(87)国際公開日　平成28年12月22日 (2016.12.22)
(31)優先権主張番号　2015902274
(32)優先日　平成27年6月15日 (2015.6.15)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　501489111
マードック　チルドレンズ　リサーチ　インスティチュート
オーストラリア国、ビクトリア　３０５２、パークビル、フレミントン　ロード、ロイアル　チルドレンズ　ホスピタル
(74)代理人　110002572
特許業務法人平木国際特許事務所
(72)発明者　スレイター，ホワード
オーストラリア国　３０５２　ビクトリア，パークビル，フレミントン　ロード，ザ　ロイヤル　チルドレンズ　ホスピタル，マードック　チルドレンズ　リサーチ　インスティチュート

最終頁に続く

(54)【発明の名称】キメリズムを測定する方法

(57)【要約】
本開示は、情報提供型コピー数変動（ＣＮＶ）を使用して、生物学的サンプルにおけるキメリズムを測定する方法に関する。
【選択図】図３

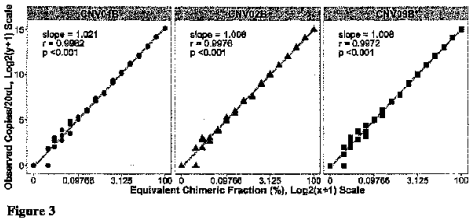


Figure 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
２つ以上の遺伝的に別個の細胞集団を含む被験体から得られる生物学的サンプルにおいてキメリズムを測定する方法であって、
第１の遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、第１の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるサンプル中のゲノムＤＮＡのレベルを決定することを含み、
そこで、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルがサンプルにおけるキメリズムの測定を提供する、
該方法。
【請求項２】
第２の遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるＣＮＶ多型に基づいて、第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるサンプル中のゲノムＤＮＡのレベルを決定することを更に含み、そこで、単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、サンプルにおけるキメリズムの測定を提供する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーが、
第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失していない、ＣＮＶ多型；及び、
第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失していない、ＣＮＶ多型
を含む、請求項１または２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４】
サンプル中の単離される全ゲノムＤＮＡの決定によって、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルを検証することを更に含み、そこで、全ＤＮＡのレベルに等しい遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、単離されるゲノムＤＮＡのレベルが検証されることを指摘する、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記キメリズムの測定が、サンプル中の全体の細胞集団中の遺伝的に別個の細胞のパーセンテージとして表現される、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記キメリズムの測定が、サンプル中の遺伝的に別個の細胞の比（第１の細胞集団：第２の細胞集団）として表現される、請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記ＣＮＶ多型がコピー数欠失（ＣＮＤ）多型である、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーが、
第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；及び／または、
第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型
を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーが、
第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも２つのＣＮＤ多型；及び／または、

第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも２つのＣＮＤ多型
を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーが、
第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも３つのＣＮＤ多型；及び／または、
第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも３つのＣＮＤ多型
を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１１】
前記遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーが、少なくとも５、または少なくとも６、または少なくとも７、または少なくとも１０、少なくとも２０、または少なくとも３０、または少なくとも３８のＣＮＤを含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーが、
第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６のＣＮＤ多型；及び／または
第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６のＣＮＤ多型
を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１３】
前記遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルの決定が、該遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーである前記ＣＮＶ多型を標的とするプライマーによる増幅反応を該ＤＮＡに行うことを含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記プライマーが前記情報提供型ＣＮＶ（複数可）の内部領域を標的とする、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記ＣＮＶ多型が表７から選択されるプライマーを使用して増幅される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１６】
前記ＣＮＶ多型が、表１中でリストされるＣＮＤ多型から選択される、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、ＮＧＳ、ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ技術、液滴デジタルＰＣＲ、定量的ＲＴ－ＰＣＲを使用して、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるＣＮＶ多型を査定することによって決定される、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記生物学的サンプルを加工して、該サンプルから循環セルフリーＤＮＡを実質的に除去した、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記生物学的サンプルが血液サンプルである、請求項１～１８のいずれか一項に記載の

方法。
【請求項２１】
前記生物学的サンプルが末梢血単核細胞である、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記生物学的サンプルが、精製された免疫細胞集団または精製された免疫細胞の混合物である、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記免疫細胞が白血球である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２４】
前記生物学的サンプルが、Ｔ細胞、Ｂ細胞、顆粒球またはその混合物の精製された集団である、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記被験体から得られる前記生物学的サンプルを精製して少なくとも２つの細胞集団を提供し、各々の細胞集団においてキメリズムが測定される、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記２つの細胞集団がＢ細胞及び顆粒球を含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記被験体から得られる前記生物学的サンプルを精製して少なくとも３つの細胞集団を提供し、各々の細胞集団においてキメリズムが測定される、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記３つの細胞集団がＢ細胞、顆粒球及びＴ細胞を含む、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記遺伝的に別個の細胞集団が、自己細胞（第１の細胞集団）及び非自己細胞（第２の細胞集団）を含む、請求項１～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
前記被験体が造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）レシピエントである、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
ＨＳＣＴレシピエントにおける生着のレベルを決定することにおける使用のための、請求項１～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
約９０％を超える非自己細胞のレベルが、移植の生着を指摘する、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
ＨＳＣＴ移植後の造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）レシピエント自身の骨髄の再建をモニターすることにおける使用のための、請求項１～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
約１０％を超える自己細胞のレベルは、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記方法が、毎日、毎週、毎月、２か月ごとまたは３か月ごとに遂行される、請求項１～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少が、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少が、免疫抑制療法がＨ

ＳＣＴレシピエントへ施行されるべきか、またはＨＳＣＴレシピエントの免疫抑制療法が修飾されるべきか、を指摘する、請求項３５または３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
それを必要とする患者における微小残存病変をモニターすることにおける使用のための、請求項１～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記ＨＳＣＴレシピエントが血液学的障害の治療のためにＨＳＣＴを受けた、請求項３１または３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
前記血液学的障害が血液学的悪性腫瘍である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記血液学的悪性腫瘍が白血病である、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
約１％を超える自己細胞のレベルが、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害の再発を指摘する、請求項３９～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少が、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害の再発を指摘する、請求項３９～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少が、血液学的障害のための療法がＨＳＣＴレシピエントへ施行されるべきか、またはＨＳＣＴレシピエントの療法が修飾されるべきか、を指摘する、請求項３９～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記遺伝的に別個の細胞集団が、胎児細胞（第１の細胞集団）及び母親細胞（第２の細胞集団）を含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記生物学的サンプルが臍帯血である、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
臍帯血サンプルの母親からの混入を同定することにおける使用のための、請求項１～１９または４５～４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
約１：１００、約１：５０、約１：２０、約１：１０、約３：２０を超えるキメリズム（胎児細胞：母親細胞）の比が、臍帯血サンプルが造血幹細胞移植における使用のために好適ではないことを指摘する、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
請求項１～４８のいずれか一項に記載の方法における使用のための表７中でリストされるプライマーから選択されるプライマーを含む、キット。
【請求項５０】
ＨＳＣＴ移植レシピエントにおけるＨＳＣＴ生着を測定する方法であって、自己細胞及び非自己細胞の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、ＨＳＣＴレシピエントから得られる生物学的サンプル中の自己細胞及び非自己細胞のレベルを決定することを含み、
そこで、情報提供型マーカーが、
自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；及び
非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；
を含み、
そこで、約９０％を超える非自己細胞のレベルが、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の生着を

指摘する、
該方法。
【請求項５１】
ＨＳＣＴレシピエントにおける微小残存病変を測定する方法であって、自己細胞及び非自己細胞の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、ＨＳＣＴレシピエントから得られる生物学的サンプル中の自己細胞及び非自己細胞のレベルを決定することを含み、
そこで、情報提供型マーカーが、
自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；及び
非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；
を含み、
そこで、約１％を超える自己細胞のレベルが、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する、
該方法。
【請求項５２】
臍帯血サンプルにおける母親の混入を測定する方法であって、自己細胞及び非自己細胞の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、臍帯血サンプル中の自己細胞及び非自己細胞のレベルを決定することを含み、
そこで、情報提供型マーカーが、
自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；及び
非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；
を含み、
そこで、約１：１００、約１：５０、約１：２０、約１：１０、約３：２０を超える胎児細胞：母親細胞の比が、臍帯血サンプルが造血幹細胞移植における使用のために好適ではないことを指摘する、
該方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、情報提供型（ｉｎｆｏｒｍａｔｉｖｅ）コピー数変動（ＣＮＶ）を使用して、生物学的サンプルにおけるキメリズムを測定する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
キメリズムは、２つ以上の個体から生じる細胞の共存在を記載するものである。キメリズムの最も頻繁に遭遇する例の１つは、造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）を受けた個体からの生物学的サンプルである。
【０００３】
ＨＳＣＴは、ある特定の悪性血液学的疾患及び非悪性血液学的障害を患う患者のための一般的な治療である。ＨＳＣＴの臨床管理の重要な構成要素は、治療の成功（例えば生着）または失敗（例えば疾患再発、移植片拒絶及び移植片対宿主病）の適時の査定のためのキメリズム分析である。
【０００４】
ＨＳＣＴに後続するキメリズムをモニターする最も一般的な方法の１つは、ショートタンデムリピート（ＳＴＲ）遺伝子座のＰＣＲ増幅に後続するキャピラリー電気泳動による

ものである（Ｔｈｉｅｄｅ ｅｔ ａｌ．Ｂｏｎｅ Ｍａｒｒｏｗ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ，２３：１０５５－１０６０，１９９９；Ｎｕｃｋｏｌｓ ｅｔ ａｌ．Ａｍ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐａｔｈｏｌ，１１３：１３５－１４０，２０００）。しかしながら、ドナー及びレシピエントを区別する遺伝子座を同定するために、複数のＳＴＲ遺伝子座を分析しなければならない。ドナー及びレシピエントは多くの場合で血縁関係があり、したがって多くの場合で複数の遺伝的決定基を共有するので、このことは特に当てはまる。

【０００５】

キメリズムをモニターする別の確立している方法は、Ｘ及びＹに特異的な染色体プローブをドナー細胞及びレシピエント細胞の細胞学的な区別のために使用する、核の蛍光ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）を包含する。しかしながら、ＦＩＳＨは、ドナーとレシピエントとの間の性別ミスマッチを要求するという制約を有する。ＦＩＳＨは約＞１％の感受性も有し、それは早期再発の検出のためには不適切である。

【０００６】

キメリズムをモニターする最近記載された方法は、ＳＮＰマーカーまたはインデルマーカーのＴａｑＭａｎリアルタイムＰＣＲを包含する。これらのリアルタイムフォーマットの短所は、各々のマーカーが比較的低い弁別力を有し、したがって、比較的多くの遺伝子座を評価する必要があるということである。さらに、情報提供型多型はすべての事例において利用可能ではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

したがって、生物学的サンプルにおけるキメリズムを測定する正確且つ効率的な方法のための未解決の必要性が依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明者は、遺伝的に別個の細胞集団中の情報提供型コピー数変動（ＣＮＶ）多型を査定することによって、生物学的サンプルにおいて正確にキメリズムを測定できることを見出した。これらの所見は、ゲノムＤＮＡ中のＣＮＶ多型の査定がキメリズムを測定する有用なインビトロの方法を提供し得ることを示唆する。したがって、一例において、本開示は、２つ以上の遺伝的に別個の細胞集団を含む被験体から得られる生物学的サンプルにおいてキメリズムを測定する方法であって、第１の遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、第１の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるサンプル中のゲノムＤＮＡのレベルを決定することを含み、そこで、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、サンプルにおけるキメリズムの測定を提供する、該方法に関する。

【０００９】

別の例において、方法は、第２の遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるＣＮＶ多型に基づいて、第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるサンプル中のゲノムＤＮＡのレベルを決定することを更に含み、そこで、単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、サンプルにおけるキメリズムの測定を提供する。

【００１０】

一例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、

第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で存在し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で存在しない、ＣＮＶ多型；及び、

第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で存在し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で存在しない、ＣＮＶ多型

を含む。

【００１１】

本発明者は、内部検証ステップを使用して、本開示の方法の正確性を検証できることも見出した。したがって、一例において、本開示の方法は、サンプル中の単離される全ゲノ

ムＤＮＡの決定によって、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルを検証することを更に含み、そこで、全ＤＮＡのレベルにおよそ等しい遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、単離されるゲノムＤＮＡのレベルが検証されることを指摘する。一例において、キメリズムの測定は、サンプル中の全体の細胞集団中の遺伝的に別個の細胞のパーセンテージとして表現される。別の例において、キメリズムの測定は、サンプル中の遺伝的に別個の細胞の比（第１の細胞集団：第２の細胞集団）として表現される。

【００１２】

別の例において、ＣＮＶ多型はコピー数欠失（ＣＮＤ）多型である。一例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、

第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；及び／または、

第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型

を含む。

【００１３】

別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、

第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも２つのＣＮＤ多型；及び／または、

第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも２つのＣＮＤ多型

を含む。

【００１４】

別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、

第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも３つのＣＮＤ多型；及び／または、

第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも３つのＣＮＤ多型

を含む。

【００１５】

一例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、

第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０のＣＮＤ多型；及び／または、

第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかもしくはホモ接合で欠失していない、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０のＣＮＤ多型

を含む。

【００１６】

別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも５、または少なくとも６、または少なくとも７、または少なくとも１０、少なくとも２０、または少なくとも３０、または少なくとも３８のＣＮＤを含む。別の例において、遺伝的に別

個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルの決定は、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるＣＮＶ多型を標的とするプライマーによる増幅反応をＤＮＡに行うことを含む。一例において、プライマーは、情報提供型ＣＮＶ（複数可）の内部領域を標的とする。別の例において、ＣＮＶ多型は表７中に示されるプライマーを使用して増幅される。

【００１７】

別の例において、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルの決定は、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるＣＮＶ多型を標的とする定量的増幅に非依存性の検出手段によりＤＮＡを査定することを含む。

【００１８】

別の例において、ＣＮＶ多型は表１中にリストされるＣＮＤ多型から選択される。別の例において、ＣＮＶ多型は表１中にリストされる多型ＣＮＤ＿０１～ＣＮＤ＿１０から選択される。

【００１９】

一例において、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルは、ＮＧＳ、ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ技術、液滴デジタルＰＣＲ、定量的ＲＴ－ＰＣＲを使用して、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるＣＮＶ多型を査定することによって決定される。例えば、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルは、液滴デジタルＰＣＲを使用して決定することができる。

【００２０】

一例において、生物学的サンプルを加工して、サンプルから循環セルフリーＤＮＡを実質的に除去した。別の例において、生物学的サンプルは血液サンプルである。別の例において、生物学的サンプルは末梢血単核細胞である。別の例において、生物学的サンプルは、精製された免疫細胞集団または精製された免疫細胞の混合物である。別の例において、免疫細胞は白血球である。別の例において、生物学的サンプルは、Ｔ細胞、Ｂ細胞、顆粒球またはその混合物の精製された集団である。別の例において、被験体から得られる生物学的サンプルを精製して少なくとも２つの細胞集団を提供し、各々の細胞集団においてキメリズムが測定される。一例において、２つの細胞集団はＢ細胞及び顆粒球を含む。別の例において、被験体から得られる生物学的サンプルを精製して少なくとも３つの細胞集団を提供し、各々の細胞集団においてキメリズムが測定される。一例において、３つの細胞集団は、Ｂ細胞、顆粒球及びＴ細胞を含む。

【００２１】

一例において、遺伝的に別個の細胞集団は、自己細胞（第１の細胞集団）及び非自己細胞（第２の細胞集団）を含む。別の例において、被験体は造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）レシピエントである。別の例において、本開示の方法は、ＨＳＣＴレシピエント中の生着のレベルを決定することを包含する。この例において、約９０％を超える非自己細胞のレベルは、移植の生着を指摘する。

【００２２】

別の例において、本開示の方法は、ＨＳＣＴ移植後の造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）レシピエント自身の骨髄の再建をモニターすることを包含する。この例において、約１０％を超える自己細胞のレベルは、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する。

【００２３】

一例において、本開示の方法は、毎日、毎週、毎月、２か月ごとまたは３か月ごとに遂行される。これらの例において、本開示の方法を使用してキメリズムのレベルを経時的にモニターすることができる。一例において、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少は、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する。一例において、キメリズムの経時的なモニターは、臨床医が患者の治療または治療レジメンを施行または修飾することを支援し得る。一例において、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少は、免疫抑制療法がＨＳＣＴレシピエントへ施行されるべきか、またはＨＳＣＴレシピエントの免疫抑制療法が修飾されるべきか、を指摘する。別の例におい

て、本開示の方法は移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）をモニターすることを包含する。別の例において、本開示の方法は、それを必要とする患者における微小残存病変をモニターすることを包含する。

【００２４】

一例において、ＨＳＣＴレシピエントは、血液学的障害の治療のためにＨＳＣＴを受けた。一例において、血液学的障害は血液学的悪性腫瘍である。一例において、血液学的悪性腫瘍は白血病である。一例において、約１％を超える自己細胞のレベルは、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害の再発を指摘する。一例において、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少は、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害の再発を指摘する。一例において、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少は、血液学的障害のための療法がＨＳＣＴレシピエントへ施行されるべきか、またはＨＳＣＴレシピエントの療法が修飾されるべきか、を指摘する。

【００２５】

別の例において、遺伝的に別個の細胞集団は、胎児細胞（第１の細胞集団）及び母親細胞（第２の細胞集団）を含む。一例において、生物学的サンプルは臍帯血である。別の例において、本開示の方法は、臍帯血サンプルの母親からの混入を同定することを包含する。一例において、約１：１００、約１：５０、約１：２０、約１：１０、約３：２０を超えるキメリズム（胎児細胞：母親細胞）の比は、臍帯血サンプルが造血幹細胞移植における使用のために好適ではないことを指摘する。

【００２６】

別の例において、本開示は、本開示の方法における使用のために表７中にリストされるプライマーから選択されるプライマーを含むキットに関する。

【００２７】

別の例において、本開示は、ＨＳＣＴ移植レシピエントにおけるＨＳＣＴ生着を測定する方法であって、自己細胞及び非自己細胞の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、ＨＳＣＴレシピエントから得られる生物学的サンプル中の自己細胞及び非自己細胞のレベルを決定することを含み、そこで、情報提供型マーカーが、
自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；及び
非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；
を含み、
そこで、約９０％を超える非自己細胞のレベルが、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の生着を指摘する、該方法に関する。

【００２８】

別の例において、本開示は、ＨＳＣＴレシピエントにおける微小残存病変を測定する方法であって、自己細胞及び非自己細胞の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、ＨＳＣＴレシピエントから得られる生物学的サンプル中の自己細胞及び非自己細胞のレベルを決定することを含み、そこで、情報提供型マーカーが、
自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；及び
非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；
を含み、
そこで、約１％を超える自己細胞のレベルが、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する、該方法に関する。

【００２９】

別の例において、本開示は、臍帯血サンプル中の母親からの混入を測定する方法であっ

て、自己細胞及び非自己細胞の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、臍帯血サンプル中の自己細胞及び非自己細胞のレベルを決定することを含み、そこで、情報提供型マーカーが、
自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；及び
非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型；
を含み、
そこで、約１：１００、約１：５０、約１：２０、約１：１０、約３：２０を超える胎児細胞：母親細胞の比が、臍帯血サンプルが造血幹細胞移植における使用のために好適ではないことを指摘する、該方法に関する。

【００３０】

特に、本発明者は、血液サンプル中の細胞からゲノムＤＮＡを単離すること、ならびに次いで自己ＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失せず、非自己ＤＮＡ中でホモ接合で欠失する、ＣＮＤ多型に基づいて、自己ＤＮＡのレベルを測定すること、及び非自己ＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失せず、自己ＤＮＡ中でホモ接合で欠失する、ＣＮＤ多型に基づいて、非自己ＤＮＡのレベルを測定すること、によって、自己細胞及び非自己細胞を含有する血液サンプルにおけるキメリズムを正確に測定できることを見出した。非自己ＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失せず、自己ＤＮＡ中でホモ接合で欠失する、ＣＮＤ多型に基づく自己ＤＮＡのレベルの測定、及び自己ＤＮＡ中でヘテロ接合であり、非自己ＤＮＡ中でホモ接合で欠失する、ＣＮＤに基づく非自己ＤＮＡのレベルの測定は有利であるが、それは、自己ＤＮＡまたは非自己ＤＮＡからのバックグラウンドの影響に遭遇せずに、ＤＮＡレベルを査定することができるからである。

【００３１】

本明細書における任意の実施例は、特別に具体的に明示されない限り、必要な変更を加えて他の実施例に適用されると見なすべきである。

【００３２】

本発明は、本明細書において記載される具体的な実施例によって範囲が限定されず、これらの実施例は例示のみの目的が意図される。本明細書において記載されるように、機能的に等価な産物、組成物及び方法は、明らかに本発明の範囲内である。

【００３３】

本明細書を通して、特別に具体的に明示されないか、または特別に文脈が要求しない限り、単一のステップ、物質の組成物、ステップの群、または物質の組成物の群への参照は、それらのステップ、物質の組成物、ステップの群、または物質の組成物の群のうちの１つ及び複数（すなわち１つまたは複数）を包含すると見なされるだろう。

【００３４】

本発明は、以下の非限定的実施例によって、及び添付の図面を参照して、以下に記載される。

【図面の簡単な説明】

【００３５】

【図１】２１の対照サンプルについて得られた遺伝子型決定の結果。

【図２】３つの独立した集団コホート中で観察される「ホモ接合で欠失する」ＣＮＤ頻度の分布。

【図３】３つの代表的な標的マーカー（ＣＮＶ０１Ｂ、ＣＮＶ０２Ｂ及びＣＮＶ０９Ｂ）のｄｄＰＣＲを使用する、検出の範囲および限界にわたる測定直線性。各々は、指示されるキメラ画分を与えるように、これらのマーカーについてホモ接合で欠失するＤＮＡの中へスパイクされ、三重で測定された。

【図４】ホモ接合で欠失することが既知の個体からのＤＮＡの中へ、それぞれのマーカー

についてヘテロ接合で欠失することが公知の個体からのＤＮＡを希釈することによって作製されたスパイキングシリーズにわたって三重測定された、３つのＣＮＶマーカーのアッセイ内及びアッセイ間の変動。
【図５】臨床例から長期的にサンプリングする間の各々の時点での、８つの情報提供型ドナーＣＮＶマーカー及び５つの情報提供型レシピエントＣＮＶマーカーのアッセイ間の変動（標準偏差、ＣＶ）であり、その臨床例においてキメリズム分析を使用して、移植片対宿主病における免疫抑制管理を考慮する意思決定をガイドした。
【図６】ｄｄＰＣＲの絶対定量的な生データ。
【図７】サンプル１のキメリズムの結果。
【図８】サンプル２のキメリズムの結果。
【図９】サンプル３のキメリズムの結果。
【図１０】サンプル４のキメリズムの結果。高感度のｄｄＰＣＲ／ＣＮＤアッセイによって微量レベルとして検出されたＣＮＤ１５及びＣＮＤ３Ｂについての、純粋なレシピエントＤＮＡサンプルの中への純粋なドナーＤＮＡの混入。
【図１１】従来のＳＴＲ分析とＣＮＶキメリズムの相関性。
【図１２】（左側パネル）男性及び女性の細胞をスパイクしたシリーズを使用するＸ／Ｙ　ＦＩＳＨ法と、（右側パネル）４名の移植レシピエントから長期的に収集された１５の血液サンプルからのＤＮＡを使用するＳＮＰ／ｒｔＰＣＲ方法と、ＣＮＶ方法を使用するキメリズム測定の比較。
【図１３】３５名のドナーからの３２名の移植レシピエントにおける方法の情報提供性のヒストグラム。遺伝子型を決定したすべての個体において、少なくとも１つの情報提供型マーカーは存在していた（左側パネル）。５／６７の（７％）事例において、３７～３８のＣＮＶマーカーをアッセイして情報提供型マーカーの数を最大限にしたが、典型的にはおよそ１５または３０のＣＮＶマーカーのパネルを使用して個体の遺伝子型を決定した（中央パネル）。大多数の個体において、試験されたマーカーのうちの１０～３０％が情報提供型であった（右側パネル）。
【図１４】移植後サンプルにおける、ＣＮＤ生着（Ａ）及び微小残存病変（Ｂ）分析。
【図１５】移植後サンプルのＣＮＤ分析。
【図１６】臍帯血サンプルのＣＮＤ分析。
【発明を実施するための形態】
【００３６】
一般的技法及び選択された定義
特別に具体的に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語及び科学用語は、当業者（例えば分子遺伝学、発現分析、生化学、診断における）によって共通して理解されるものと同じ意味を有すると見なされるべきである。
【００３７】
当業者によって理解されるように、本開示において利用される様々な分子的技法ならびにＤＮＡの修飾及び検出の方法は、当業者に周知のスタンダードな手順である。かかる技法は、Ｊ．Ｐｅｒｂａｌ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９８４）、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｔ．Ａ．Ｂｒｏｗｎ（ｅｄｉｔｏｒ），Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １ ａｎｄ ２，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９１）、Ｄ．Ｍ．Ｇｌｏｖｅｒ ａｎｄ Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ（ｅｄｉｔｏｒｓ），ａｎｄ Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｉｔｏｒｓ），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８年、現在でまでのすべての改訂を包含する）、Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ（ｅｄｉｔｏ

ｒｓ）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，（１９８８）、及びＪ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｉｔｏｒｓ）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（現在までのすべての改訂を包含する）等のソース中で文献の全体にわたって記載及び説明される。

【００３８】

当業者は、本明細書において記載される開示が具体的に記載されるもの以外の変動及び修飾を受けることを認識するだろう。本開示がかかる変動及び修飾をすべて含むことを理解すべきである。本開示は、本明細書に参照または指摘されるステップ、特色、組成物及び化合物のすべても、個別にまたは集合的に包含し、該ステップまたは特色のうちの任意のもの及びすべての組み合わせまたは任意の２つ以上のものも包含する。例えば、当業者は、単一の祖先染色体に由来する、２つ以上の遺伝子座での対立遺伝子のランダムでない連関に関連する「連鎖不平衡」に気づくだろう。以下で略述されるように、本開示は、コピー数変動（ＣＮＶ）のシリーズ、特に、生物学的サンプル中のレシピエントＤＮＡまたはドナーＤＮＡのレベルを決定するのに使用することができるコピー数欠失（ＣＮＤ）を記載する。本開示のＣＮＶは、連鎖不平衡で関連するＣＮＶを包含する。更に、本開示のＣＮＶに基づく自己ＤＮＡまたは非自己ＤＮＡのレベルの決定が、特定の開示されるＣＮＶと連鎖不平衡である他のＣＮＶの査定によって、自己ＤＮＡまたは非自己ＤＮＡのレベルを決定することを包含することが意図される。

【００３９】

「及び／または」という用語（例えば「Ｘ及び／またはＹ」）は、「Ｘ及びＹ」または「ＸまたはＹ」のいずれかを意味することが理解され、両方の意味またはいずれかの意味のための明示的な支持を提供すると見なされるべきである。

【００４０】

本明細書において使用される時、「約」という用語は、相反することが明示されない限り、指定される値の±１０％、より好ましくは±５％を指す。

【００４１】

この明細書を通して、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という単語、または変形（「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」または「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」等）は、明示された要素、整数値もしくはステップ、または要素、整数値もしくはステップの群を包含するが、他の要素、整数値もしくはステップ、または要素、整数値もしくはステップの群を除外しないことを示唆すると理解される。

【００４２】

本明細書において使用される時、「患者」は、サンプルが自己細胞及び非自己細胞を含んで得ることができる任意の生物体であり得る。一例において、患者は哺乳類である。哺乳類は、ペット用動物（イヌまたはネコ等）または家畜動物（ウマまたはウシ等）であり得る。一例において、患者はヒトである。例えば、患者は成体であり得る。別の例において、患者は小児であり得る。別の例において、患者は青年であり得る。「患者」、「被験体」または「個体」等という用語は、本開示において文脈中で互換的に使用することができる用語である。

【００４３】

本明細書において使用される時、「自己」、「自己核酸」及び「自己ＤＮＡ」という用語は、生物学的サンプルが得られた被験体（例えばＨＳＣＴレシピエント）からの核酸及びＤＮＡを指すように使用される。反対に、「非自己」、「非自己核酸」及び「非自己ＤＮＡ」という用語は、サンプルが得られた被験体に対して外来（例えばＨＳＣＴドナー）の核酸及びＤＮＡを定義するように使用される。

【００４４】

本明細書を通して、特別に具体的に明示されないか、または特別に文脈が要求しない限り、ＤＮＡという用語は細胞内ゲノムＤＮＡを指すように使用される。例えば、「自己ＤＮＡ」及び「非自己ＤＮＡ」は、生物学的サンプル中の自己細胞及び非自己細胞から単離

されるゲノムＤＮＡを指す。
【００４５】
ＨＳＣＴ移植レシピエントの血液サンプル中で、自己ＤＮＡは移植レシピエントからであり、非自己ＤＮＡは移植ドナーからである。移植ドナーの「非自己ＤＮＡ」が複数の個体からのＤＮＡを含み得ることは当業者によって認識されるだろう。例えば、移植ドナー自身が以前に移植を受けていてもよく、そこで移植ドナーのサンプルは非自己ＤＮＡも含み得る。この事例において、サンプルは自己ＤＮＡ及び複数のタイプの非自己ＤＮＡを含み得る。本開示の方法が、サンプル中の「自己ＤＮＡ」及び複数のタイプの「非自己ＤＮＡ」の査定を可能にすることが意図される。臍帯血サンプル中で、自己ＤＮＡは胎児ＤＮＡであるが、非自己ＤＮＡは母親ＤＮＡである。
【００４６】
本開示の方法はインビトロのアッセイとして遂行することができる。当業者が認識するように、アッセイは、標的の存在もしくは量または機能的活性を定性的に査定または定量的に測定するための調査（分析）の手順または方法である。
【００４７】
一例において、本開示に記載の方法またはアッセイは治療レジメンの中へ援用され得る。例えば、それを必要とする被験体における病態を治療する方法は、本開示の方法を具現するアッセイを遂行することを含み得る。一例において、臨床医等は、患者への治療の施行または修飾の前に本開示に記載のアッセイの性能を遂行または要求することを希望するだろう。例えば、臨床医は、療法（免疫療法等）を施行または修飾することを選ぶ前にＨＳＣＴレシピエントに対して本開示に記載のアッセイの性能を遂行または要求し得る。
【００４８】
コピー数変動（ＣＮＶ）多型
本開示の方法を遂行する場合に、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルは、細胞集団の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて決定される。「ＣＮＶ」多型は、コピー数欠失（ＣＮＤ）、挿入または重複を包含する。「情報提供型マーカー」という用語は、生物学的サンプル中の１つ細胞集団と別の細胞集団を遺伝的に識別するマーカーを指すように、本開示の文脈中で使用される。情報提供型マーカーは、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが決定されることを可能にする（例えば液滴デジタルＰＣＲ等の定量的方法の使用によって）。
【００４９】
一例において、情報提供型マーカーは、生物学的サンプル中の第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在しない、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在するＣＮＶ多型であり得る。一例において、情報提供型マーカーは、生物学的サンプル中の非自己細胞集団から単離されるノムＤＮＡ中で存在しない、自己細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在するＣＮＶ多型であり得る。別の例において、情報提供型マーカーは、少なくとも２つのＣＮＶ多型（生物学的サンプル中の第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在しない、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在するもの、及び第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在する、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在しないもの）であり得る。
【００５０】
単離されるゲノムＤＮＡ中で存在するＣＮＶ多型は、「ホモ接合で存在する」、「ホモ接合で存在しない」または「ヘテロ接合である」として参照され得る。「ホモ接合で存在する」という用語は、２コピーのＣＮＶ多型が存在する場合に本開示の文脈中で使用される（例えば２倍性個体は、２つの相同染色体の各々についての遺伝子座で同じＣＮＶのコピーを有する）。「ホモ接合で存在しない」という用語は、２コピーのＣＮＶ多型が存在しない場合に本開示の文脈中で使用される（例えば２倍性個体は、２つの相同染色体の各々についての遺伝子座で０コピーのＣＮＶを有する）。「ヘテロ接合」という用語は、１コピーのＣＮＶ多型が存在する場合に本開示の文脈中で使用される（例えば１コピーの２

つの異なる対立遺伝子の各々を備えた２倍性個体）。したがって、「ヘテロ接合」という用語は、１コピーのＣＮＶ多型が存在する場合の「ヘテロ接合で存在する」及び１コピーのＣＮＶ多型が存在しない場合の「ヘテロ接合で存在しない」を包含する。

【００５１】

コピー数欠失の文脈中で、「ホモ接合で存在する」という用語は、２コピーの欠失が存在する場合の遺伝子型を指すように使用され（すなわち「ホモ接合で欠失する」；「２コピーで欠失する」）、一方で、「ホモ接合で存在しない」は、２コピーの欠失が存在しない場合の遺伝子型を指すように使用される（すなわち「ホモ接合で欠失していない」；「０コピーで欠失する」）。「ヘテロ接合」という用語は、１コピーの欠失が存在する場合の遺伝子型を指すように使用される（すなわち「ヘテロ接合で欠失する」；「１コピーで欠失する」）。

【００５２】

コピー数重複の文脈中で、「ホモ接合で存在する」は、２コピーの重複が存在する場合の遺伝子型を指すように使用され（すなわち「ホモ接合で重複する」；２コピーで重複する）、一方で、「ホモ接合で存在しない」は、２コピーの重複が存在しない場合の遺伝子型を指すように使用される（すなわち「ホモ接合で重複していない」；０コピーで重複する）。「ヘテロ接合」という用語は、１コピーの重複が存在する場合の遺伝子型を指すように使用される（すなわち「ヘテロ接合で重複する」；１コピーで重複する）。

【００５３】

一例において、情報提供型ＣＮＶは遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で存在する。別の例において、情報提供型ＣＮＶは遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合である。別の例において、情報提供型ＣＮＶは遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で存在しない。

【００５４】

一例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のヘテロ接合であるＣＮＶ多型を含む。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で存在するＣＮＶ多型を含む。他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、

少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で存在しないＣＮＶ多型を含む。

【００５５】

別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は、第１の集団中でヘテロ接合であり、遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で存在するかまたはホモ接合で存在しない。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は、第１の集団中でホモ接合で存在し、遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で存在しないかまたはヘテロ接合である。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は、第１の集団中でホモ接合で存在せず、遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で存在する。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は、自己集団中でヘテロ接合であり、非自己集団中でホモ接合で欠失するか、ホモ接合で存在するか、またはホモ接合で存在しない。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は、自己集団中でホモ接合で存在し、非自己集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で存在しない。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は、自己集団中でホモ接合で存在し、非自己集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で存在しない。

【００５６】

別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で存在するＣＮＶ多型（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で存在しない）を含む。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で存在するＣＮＶ多型（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合である）を含む。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のヘテロ接合であるＣＮＶ多型（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で存在しない）を含む。

【００５７】

別の例において、少なくとも１つのＣＮＶを生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。他の例において、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のＣＮＶ多型を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。例えば、少なくとも４つのＣＮＶ多型を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。例えば、少なくとも６つのＣＮＶ多型を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。

【００５８】

一例において、ＣＮＶはコピー数欠失（ＣＮＤ）多型である。一例において、情報提供型ＣＮＤは遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合で欠失する。別の例において、情報提供型ＣＮＤは遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で欠失する。別の例において、情報提供型ＣＮＤは遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で欠失していない。

【００５９】

例えば、情報提供型マーカーは、生物学的サンプル中の第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失するＣＮＤ多型であり得る。一例において、情報提供型マーカーは、生物学的サンプル中の非自己細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、自己細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失するＣＮＤ多型であり得る。別の例において、情報提供型マーカーは、少なくとも２つのＣＮＤ多型（生物学的サンプル中の第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失していない、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失するかまたはヘテロ接合で欠失するもの、及び第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失するかまたはヘテロ接合で欠失する、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失していないもの）であり得る。

【００６０】

他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のヘテロ接合で欠失するＣＮＤ多型を含む。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３

４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で欠失するＣＮＤ多型を含む。

【００６１】

別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のヘテロ接合で欠失するＣＮＤ多型（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で欠失する）を含む。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のヘテロ接合で欠失するＣＮＤ多型（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で欠失していない）を含む。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で欠失するＣＮＤ多型（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で欠失していない）を含む。

【００６２】

例えば、情報提供型ＣＮＤ多型は、第１の集団中でヘテロ接合で欠失し、遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で欠失するかまたはホモ接合で欠失していないことが可能である。別の例において、情報提供型ＣＮＤ多型は、第１の集団中でホモ接合で欠失し、遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していないことが可能である。別の例において、情報提供型ＣＮＤ多型は、第１の集団中でホモ接合で欠失せず、遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失することが可能である。別の例において、情報提供型ＣＮＤ多型は、自己集団中でヘテロ接合で欠失し、非自己集団中でホモ接合で欠失するかまたはホモ接合で欠失していないことが可能である。別の例において、情報提供型ＣＮＤ多型は、自己集団中でホモ接合で欠失し、非自己集団中でヘテロ接合で欠失するかまたはホモ接合で欠失していないことが可能である。別の例において、情報提供型ＣＮＤ多型は、自己集団中でホモ接合で欠失せず、非自己集団中でホモ接合で欠失するかまたはヘテロ接合で欠失することが可能である。

【００６３】
別の例において、情報提供型ＣＮＤは、第１の細胞の集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合で欠失し、遺伝的に別個の細胞の集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失するかまたはホモ接合で欠失していない。別の例において、情報提供型ＣＮＤは、第１の細胞の集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、遺伝的に別個の細胞の集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない。別の例において、情報提供型ＣＮＤは、第１の細胞の集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失せず、遺伝的に別個の細胞の集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失する。例えば、情報提供型ＣＮＤは、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合で欠失し、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失するかまたはホモ接合で欠失していない。例えば、情報提供型ＣＮＤは、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない。例えば、情報提供型ＣＮＤは、自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失せず、非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失する。
【００６４】
例えば、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、約５～４０、約７～２０、約６～３０、約８～１０の間のＣＮＤ多型であり得る。これらの例において、ＣＮＤは表１から選択することができる。例えば、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、表１からの１０のＣＮＤ多型を含み得る。例えば、情報提供型マーカーは、表１からのＣＮＤ　０１～ＣＮＤ　１０からなる群から選択することができる。表１からのＣＮＤの組み合わせを含む他の情報提供型マーカーは以下で議論される。
【００６５】
他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８の表１からのヘテロ接合であるＣＮＤ多型を含む。他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８の表１からのホモ接合で欠失するＣＮＤ多型を含む。
【００６６】
他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、

少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８の表１からのヘテロ接合で欠失するＣＮＤ多型（遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で欠失するかまたはホモ接合で欠失していない）を含む。他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８の表１からのホモ接合で欠失するＣＮＤ多型（遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合で欠失するかまたはホモ接合で欠失していない）を含む。他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８の表１からのホモ接合で欠失していないＣＮＤ多型（遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合で欠失するかまたはホモ接合で欠失する）を含む。一例において、ＣＮＤはＨＬＡ遺伝子座に所在しない。

【００６７】

一例において、少なくとも１つのＣＮＤを生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。他の例において、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のＣＮＤ多型を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。例えば、少なくとも４つのＣＮＤ多型を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。例えば、少なくとも６つのＣＮＤ多型を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。

表１：

名称	CNP_id	染色体	開始_hg18	終結_hg18	サイズ(bp)	ホモ接合で欠失する頻度(0コピーのPCR産物)	ヘテロ接合で欠失する頻度(1コピーのPCR産物)	ホモ接合で欠失していない頻度(2コピーのPCR産物)
CND12	CNVR3451.1	染色体7	73,467,042	73,469,172	2,130	0.55	0.33	0.12
CND13	CNVR4596.1	染色体10	4,698,559	4,700,493	1,934	0.61	0.31	0.08
CND14	CNVR801_全長	染色体2	54,419,132	54,420,976	1,844	0.59	0.37	0.04
CND15	CNVR5853_全長	染色体13	38,831,627	38,833,387	1,760	0.55	0.33	0.12
CND16	CNVR842.1	染色体2	76,627,234	76,628,943	1,709	0.6	0.33	0.08
CND17	CNVR431.1	染色体1	185,731,458	185,733,106	1,648	0.62	0.33	0.04
CND18	CNVR4203.1	染色体9	17,900,038	17,901,633	1,595	0.61	0.36	0.03
CND20	CNVR952.1	染色体2	121,513,996	121,515,257	1,261	0.53	0.36	0.1
CND21	CNVR1138.2	染色体2	219,761,436	219,762,572	1,136	0.39	0.42	0.18
CND22	CNVR5923.1	染色体13	71,743,783	71,744,892	1,109	0.41	0.55	0.04
CND23	CNVR8147.1	染色体22	33,975,445	33,976,472	1,027	0.45	0.43	0.12
CND24	CNVR3004.1	染色体6	95,250,114	95,251,113	999	0.4	0.47	0.13
CND25	1343*	染色体8	112,363,455	112,364,436	981	0.57	0.38	0.05
CND26	CNVR381.1	染色体1	157,915,386	157,916,253	867	0.6	0.35	0.05
CND27	CNVR4374.1	染色体9	88,344,772	88,345,596	824	0.56	0.36	0.07
CND28	CNVR2799.1	染色体6	18,510,099	18,510,860	761	0.41	0.44	0.15
CND29	CNVR6540.1	染色体15	97392250	97392985	735	0.51	0.43	0.06
CND	CNVR6357.	染色体	375316	37532136	446	0.52	0.42	0.07

名称	CNP_id	染色体	開始_hg18	終結_hg18	サイズ(bp)	ホモ接合で欠失する頻度(0コピーのPCR産物)	ヘテロ接合で欠失する頻度(1コピーのPCR産物)	ホモ接合で欠失していない頻度(2コピーのPCR産物)
30	1	15	90					
CND31	158	染色体1	208148236	208150607	2,371	0.383	0.450	0.167
CND32	CNVR358.1	染色体1	150822234	150856715	34,481	0.393	0.459	0.148
CND33	CNVR217.1	染色体1	72538870	72584557	45,687	0.393	0.459	0.148
CND34	CNVR7808.1	染色体20	21234267	21236529	2,262	0.516	0.418	0.066
CND36	554	染色体4	98232534	9844366	21,112	0.550	0.333	0.117
CND37	CNVR2469.1	染色体5	57359283	57369499	10,216	0.615	0.361	0.025
CND38	CNVR3009.1	染色体6	100141275	100141994	719	0.623	0.377	0.000
CND39	CNVR3609.1	染色体7	147704059	147707263	3,204	0.656	0.311	0.033
CND41	CNVR2304.1	染色体5	19776004	1978111	507	0.672	0.328	0.000
CND01	CNVR376.1	染色体1	157,134,152	157,136,674	2,522	0.51	0.42	0.07
CND02	CNVR7344.1	染色体18	53,097,735	53,099,702	1,967	0.52	0.4	0.08
CND03	CNVR4014.1	染色体8	112,363,260	112,365,469	2,209	0.5	0.41	0.08
CND04	CNVR6084.1	染色体14	21,951,540	21,952,070	530	0.46	0.43	0.11
CND05	CNVR6676.1	染色体16	25,247,611	25,250,595	2,984	0.45	0.47	0.08
CND06	CNVR3319.1	染色体7	24,004,755	24,006,584	1,829	0.47	0.38	0.15
CND	CNVR5850.	染色体	37,955	37,958,191	2,87	0.43	0.43	0.14

名称	CNP_id	染色体	開始_hg18	終結_hg18	サイズ(bp)	ホモ接合で欠失する頻度(0コピーのPCR産物)	ヘテロ接合で欠失する頻度(1コピーのPCR産物)	ホモ接合で欠失していない頻度(2コピーのPCR産物)
07	1	13	,318		3			
CND08	CNVR3753_全長	染色体8	4,110,308	4,112,335	2,027	0.43	0.43	0.13
CND09	CNVR7301.1	染色体18	33,560,073	33,560,645	572	0.42	0.45	0.12
CND10	CNVR4886.1	染色体10	108,020,303	108,022,518	2,215	0.41	0.42	0.17
CND19	CNVR1037.1	染色体2	159,668,040	159,669,209	1,169	0.5	0.43	0.07

【００６８】

別の例において、ＣＮＶはコピー数重複多型である。一例において、情報提供型コピー数重複は遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で重複する。別の例において、情報提供型コピー数重複は遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合で重複する。別の例において、情報提供型コピー数重複は遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で重複していない。他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のヘテロ接合で重複するコピー数重複を含む。他の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で重複するコピー数重複を含む。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５

、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で重複するコピー数重複（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で重複していない）である。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のホモ接合で重複していないコピー数重複（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で重複する）である。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーは、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のヘテロ接合で重複するコピー数重複（生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で重複していないかまたはホモ接合で重複する）である。

【００６９】

例えば、情報提供型コピー数重複多型は、第１の集団中でヘテロ接合で重複し、遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で重複するかまたはホモ接合で重複していないことが可能である。別の例において、情報提供型コピー数重複多型は、第１の集団中でホモ接合で重複し、遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で重複していないことが可能である。別の例において、情報提供型コピー数重複多型は、第１の集団中でホモ接合で重複せず、遺伝的に別個の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で重複することが可能である。別の例において、情報提供型コピー数重複多型は、自己集団中でヘテロ接合であり、非自己集団中でホモ接合で重複するかまたはホモ接合で重複していないことが可能である。別の例において、情報提供型コピー数重複多型は、自己集団中でホモ接合で重複し、非自己集団中でヘテロ接合で重複するかまたはホモ接合で重複していないことが可能である。別の例において、情報提供型コピー数重複多型は、自己集団中でホモ接合で重複せず、非自己集団中でヘテロ接合で重複するかまたはホモ接合で重複することが可能である。

【００７０】

一例において、少なくとも１つのコピー数重複を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。他の例において、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なく

とも３０、少なくとも３１、少なくとも３２、少なくとも３３、少なくとも３４、少なくとも３５、少なくとも３６、少なくとも３７、少なくとも３８、少なくとも３９、少なくとも４０、少なくとも４１、少なくとも４２、少なくとも４３、少なくとも４４、少なくとも４５のコピー数重複多型を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。例えば、少なくとも４つのコピー数重複を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。例えば、少なくとも６つのコピー数重複を生物学的サンプル中で査定して、情報提供型マーカーを同定する。

【００７１】

一例において、情報提供型ＣＮＶ多型は少なくとも約０．５ｋｂ～１００メガベース（ｍｂ）のサイズである。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は少なくとも約１ｋｂ～５０Ｍｂのサイズである。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は少なくとも約１．５ｋｂ～２５Ｍｂのサイズである。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は少なくとも約２ｋｂ～１０Ｍｂのサイズである。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は少なくとも約２．５ｋｂ～１Ｍｂのサイズである。別の例において、情報提供型ＣＮＶ多型は、約５ｋｂ、約４．５ｋｂ、約４ｋｂ、約３．５ｋｂ、約３ｋｂ、約２．５ｋｂ、約２ｋｂ、約１．５ｋｂ、約１ｋｂ、約０．５ｋｂ未満のサイズである。一例において、情報提供型ＣＮＶ多型は３ｋｂ未満のサイズである。別の例において、全ての情報提供型ＣＮＶは３ｋｂ未満のサイズである。

【００７２】

一例において、情報提供型ＣＮＶは多型である。別の例において、情報提供型ＣＮＶは公知の内因性の臨床的有意性を有していない。

【００７３】

一例において、情報提供型ＣＮＶは、約０．１、約０．２、約０．３、約０．４、約０．５、約０．６、約０．７、約０．８、約０．９を超えるゼロコピーの対立遺伝子頻度を有する。

【００７４】

他の例において、情報提供型ＣＮＤ多型は５０ｂｐ～１００Ｍｂの欠失を包含することができる。したがって、一例において、ＣＮＤは、５０塩基対長を超える遺伝子セグメントの消失または獲得を記載するために本開示の文脈中で使用することができる。他の例において、ＣＮＤには、少なくとも約５０、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００ｂｐ、約１０、約２０、約３０、約４０、約５０、、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００、約２００、約３００、約４００、約５００、約６００、約７００、約８００、約９００または約１，０００ｋｂの欠失が含まれ得る。別の例において、ＣＮＤ多型は、少なくとも約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０、約３１、約３２、約３３、約３４、約３５、約３６、約３７、約３８、約３９、約４０、約４１、約４２、約４３、約４４、約４５、約４６、約４７、約４８、約４９、約５０、約５１、約５２、約５３、約５４、約５５、約５６、約５７、約５８、約５９、約６０、約６１、約６２、約６３、約６４、約６５、約６６、約６７、約６８、約６９、約７０、約７１、約７２、約７３、約７４、約７５、約７６、約７７、約７８、約７９、約８０、約８１、約８２、約８３、約８４、約８５、約８６、約８７、約８８、約８９、約９０、約９１、約９２、約９３、約９４、約９５、約９６、約９７、約９８、約９９、または約１００Ｍｂの欠失を含むことができる。

【００７５】

当業者は、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるＣＮＶ多型を容易に同定することができる。例えば、当業者は、表７中でリストされるプライマーセットのうちの任意のものまたはすべてを使用して、生物学的サンプルから単離されるゲノムＤＮＡ中で情報提供型マーカーを同定することができるだろう。情報提供型ＣＮＶ多型は、様々な生物学的サンプル中で同定することができる。例えば、情報提供型ＣＮＶ多型は、液体サ

ンプルから得られたＤＮＡ中で同定することができる。例えば、情報提供型ＣＮＶは、血液サンプルから単離されるＤＮＡの査定によって同定することができる。

【００７６】

一例において、自己ＤＮＡ及び／または非自己ＤＮＡ中の情報提供型ＣＮＶ多型は、キメリズムのないサンプルから得られるＤＮＡとの比較によって同定することができる。一例において、自己ＤＮＡ中の情報提供型ＣＮＶ多型は、既知の自己細胞集団から得られるＤＮＡとの比較によって同定される。別の例において、非自己ＤＮＡ中の情報提供型ＣＮＶ多型は、既知の非自己細胞集団から得られるＤＮＡとの比較によって同定される。既知の自己細胞または非自己細胞を得ることができる例示的なサンプルには、生検材料及び切除材料、溶血産物、リンパ、関節液、髄液、尿、精液、便、喀痰、粘液、羊水、涙液、嚢胞液、汗腺分泌、胆汁、乳汁、涙または唾液が含まれる。別の例において、得ることができる既知の自己細胞または非自己細胞は、口腔スワブによって得られた頬腔細胞であり得る。

【００７７】

ゲノムのキメリズム

本開示は、被験体から得られる生物学的サンプルにおける「キメリズム」を測定する方法に関する。「キメリズム」という用語は、被験体から得られる生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団の共存を記載するために、本開示の文脈中で使用される。例えば、「キメリズム」という用語は、被験体から得られる生物学的サンプル中の自己細胞集団及び非自己細胞集団の共存を包含する。キメリズムの様々な例は当技術分野において公知である。例えば、キメリズムはＨＳＣＴを受けた被験体中で存在し得る。この例において、ＨＳＣＴを受けた被験体からの生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団は、ＨＳＣＴドナーからの細胞集団及びＨＳＣＴレシピエントからの細胞集団を含む。胎児－母親のキメリズムは別の例である。胎児－母親のキメリズムの文脈中で、遺伝的に別個の細胞集団は、胎児の臍帯から得られる生物学的サンプル中で共存することができる。例えば、臍帯から得られる生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団は、母親からの細胞集団及び胎児からの細胞集団を含むことができる。

【００７８】

キメリズムという用語は、細胞の２つの遺伝的に別個の集団の共存へ限定されるとは意図されない。例えば、キメリズムは、自身が以前にＨＳＣＴを受けたドナーからＨＳＣＴを受けた被験体中で存在し得る。この例において、この被験体から得られた生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団は、ＨＳＣＴドナーのドナーからの細胞集団、ＨＳＣＴドナーからの細胞集団、及びＨＳＣＴレシピエントからの細胞集団を含むことができる。したがって、一例において、生物学的サンプルは少なくとも３つの遺伝的に別個の細胞集団を含むことができる。他の例において、生物学的サンプルは少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０の遺伝的に別個の細胞集団を含むことができる。一例において、遺伝的に別個の細胞集団は、第１の集団及び第２の集団として特徴づけることができる。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団は、第１の集団、第２の集団、及び第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、または第１０の集団のうちの任意の１つまたは複数として特徴づけることができる。

【００７９】

「遺伝的に別個の」という用語は、それらのゲノムの構成に基づいて２つの細胞集団を識別するために本開示の文脈中で使用される。したがって、遺伝的に別個の細胞集団は異なる遺伝子型を有する。例えば、非自己細胞は、自己細胞とは遺伝的に異なる。例えば、骨髄移植ドナー（非自己細胞）からの細胞は、骨髄移植レシピエント細胞（自己細胞）とは遺伝的に異なる。別の例において、胎児細胞は、母親細胞とは遺伝的に異なる。

【００８０】

一例において、細胞集団は、ＣＮＶ多型の存在または非存在に基づいて、遺伝的に別個のものとして特徴づけられる。例えば、２つの遺伝的に別個の細胞集団は、１つの細胞集団が、その単離されるゲノムＤＮＡ中で、他の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で

存在しないＣＮＶ多型を含むということに基づいて、互いと識別される。別の例において、２つの遺伝的に別個の細胞集団は、１つの細胞集団が、その単離されるゲノムＤＮＡ中で、他の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在しない少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも３８のＣＮＶ多型を含むということに基づいて、互いと識別される。別の例において、２つの遺伝的に別個の細胞集団は、少なくとも２つのＣＮＶ多型（第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在しない１つのＣＮＶ、及び第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在せず、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在する１つのＣＮＶ）に基づいて、互いと識別される。

【００８１】

別の例において、２つの遺伝的に別個の細胞集団は、少なくとも３つのＣＮＶ多型（第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在しない２つのＣＮＶ、及び第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在する、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在しない１つのＣＮＶ）に基づいて、互いと識別することができる。別の例において、２つの遺伝的に別個の細胞集団は、少なくとも４つのＣＮＶ多型（第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在し、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在しない２つのＣＮＶ、及び第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在せず、第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在する２つのＣＮＶ）に基づいて、互いと識別することができる。要するに、ＣＮＶの様々な他の組み合わせに基づいて、遺伝的に別個の細胞集団を識別できるということである。

【００８２】

キメリズムの測定

一例において、本開示は、被験体から得られる生物学的サンプルにおいてキメリズムを測定する方法に関する。一例において、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルは、生物学的サンプルにおけるキメリズムの測定を提供する。本開示の文脈中で、単離されるゲノムＤＮＡは、サンプル内でインタクトな細胞から優先的に単離される「細胞内ゲノムＤＮＡ」からのものであろう。「細胞内ゲノムＤＮＡ」という用語は、個体の血漿中に存在し得る循環セルフリーＤＮＡ（ｃｃｆＤＮＡ）という用語とは対照的に使用される。ｃｃｆＤＮＡは、アポトーシス細胞及び壊死細胞が破壊されるにつれて、個体の血液の中へこれらの細胞から放出される。「細胞内ゲノムＤＮＡのキメリズム」という用語は、遺伝的に別個の（例えば「自己」及び「非自己」）ＤＮＡの混合物が、被験体から得られる生物学的サンプル中の細胞から単離されるＤＮＡ中で存在する状況を指すように、本開示の文脈中で使用される。細胞内ＤＮＡのキメリズムを測定する場合に、遺伝的に別個の細胞集団（自己細胞及び非自己細胞）から単離されるＤＮＡが査定される。「血漿ＤＮＡのキメリズム」という用語は、遺伝的に別個（例えば「自己」及び「非自己」）の循環セルフリーＤＮＡ（ｃｃｆＤＮＡ）の混合物が、個体の血漿中に存在する状況を指す。錯誤回避のために記載するならば、「細胞内ＤＮＡのキメリズム」という用語は「血漿ＤＮＡのキメリズム」を包含せず、逆の場合も同様である。

【００８３】

別の例において、生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団中の細胞の数は、サンプルにおけるキメリズムの測定を提供する。二倍体細胞は、一般的には公知の量のＤＮＡを含有する。したがって、この例において、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルを使用して、集団中の遺伝的に別個の細胞の数を計算することができる。例えば、ＨＳＣＴドナー（すなわち第１の遺伝的に別個の細胞集団）からのゲノムＤＮＡのレベルが生物学的サンプル中の全ＤＮＡのうちの８０％であり、ＨＳＣＴレシピエント（すなわち第２の遺伝的に別個の細胞集団）からのゲノムＤＮＡのレベルがサンプル中の全ＤＮＡのうちの２０％であるならば、そのとき、サンプルにおけるキメリズムの測定は８０

％のドナー細胞（非自己）及び２０％のレシピエント細胞（自己）を含むとして表現することができる。一例において、サンプルにおけるキメリズムの測定は、次に被験体におけるキメリズムのレベルを提供し、それは、ＨＳＣＴ移植成功（例えば生着）または失敗（例えば移植拒絶）の査定を可能にする。

【００８４】

別の例において、臍帯血サンプルにおけるキメリズムの測定を参照して、胎児（すなわち第１の遺伝的に別個の細胞集団）からのゲノムＤＮＡのレベルが生物学的サンプル中の全ＤＮＡのうちの９８％であり、母親レシピエント（すなわち第２の遺伝的に別個の細胞集団）からのゲノムＤＮＡのレベルがサンプル中の全ＤＮＡのうちの２％であるならば、そのとき、サンプルにおけるキメリズムの測定は９８％の胎児細胞及び２％の母親細胞を含むとして表現することができる。一例において、サンプルにおけるキメリズムの測定は、次に臍帯血サンプルにおけるキメリズムのレベルを提供し、それは、臍帯血における母親の混入のレベルを指摘する。

【００８５】

別の例において、２つ以上の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルを比較して、サンプルにおけるキメリズムの測定を提供する。これらの例において、遺伝的に別個の細胞から単離される全ゲノムＤＮＡのレベルを決定することができる。例えば、全ＤＮＡのレベルは非多型標的配列に基づいて決定することができる。「非多型標的配列」は、ホモ接合の２コピーの対照を指すように、本開示の文脈中で使用される。言い換えれば、２コピーの非多型標的配列が遺伝的に別個の細胞集団中に存在する。例えば、全ＤＮＡのレベルは、アンジオテンシンＩ変換酵素（例えば＃ＮＭ＿０００７８９）をコードする遺伝子内の標的配列に基づいて決定することができる。

【００８６】

別の例において、全ＤＮＡのレベルは、非自己ＤＮＡ及び自己ＤＮＡ中で存在するホモ接合の多型に基づいて決定される。例えば、全ＤＮＡのレベルは、非自己ＤＮＡ及び自己ＤＮＡ中で存在するホモ接合のＣＮＶ多型に基づいて決定することができる。

【００８７】

別の例において、自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、自己ＤＮＡ／全ＤＮＡの比を提供する。したがって、一例において、自己ＤＮＡ／全ＤＮＡのレベル＝自己ＤＮＡ：全ＤＮＡのレベルである。

【００８８】

別の例において、非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、非自己ＤＮＡ／全ＤＮＡの比を提供する。したがって、一例において、非自己ＤＮＡ／全ＤＮＡのレベル＝非自己ＤＮＡ：全ＤＮＡのレベルである。

【００８９】

別の例において、非自己ＤＮＡのレベルを自己ＤＮＡのレベルと比較して、非自己ＤＮＡ／自己ＤＮＡの比を提供する。したがって、一例において、非自己ＤＮＡ／自己ＤＮＡのレベル＝非自己ＤＮＡ：自己ＤＮＡのレベルである。

【００９０】

別の例において、自己ＤＮＡ及び非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、自己ＤＮＡ／全ＤＮＡの比及び非自己ＤＮＡ／全ＤＮＡの比を提供する。別の例において、自己ＤＮＡのレベルは、全ＤＮＡのうちのパーセンテージとして表現することができる。別の例において、非自己ＤＮＡのレベルは、全ＤＮＡのうちのパーセンテージとして表現することができる。

【００９１】

一例において、本開示の方法は内部検証ステップを含むことができる。例えば、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベル、及び第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルは、サンプル中の全ＤＮＡのレベルとの比較によって検証することができる。一例において、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベル、及び第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが検証され

、その場合、
第１の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベル＋第２の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベル＝およそ全ＤＮＡである。
【００９２】
この例において、第１の集団からのＤＮＡのレベル＋第２の細胞集団からのＤＮＡのレベルが、全ＤＮＡのレベルと等しくない場合に、結果から、追加の遺伝的に別個の細胞集団がサンプル中に存在することが指摘され得る。
【００９３】
一例において、
－第１の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは情報提供型ＣＮＶ多型に基づいて決定され；
－第２の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは情報提供型ＣＮＶ多型に基づいて決定され；及び
全ＤＮＡのレベルは非多型標的配列（アンジオテンシンＩ変換酵素等）に基づいて測定され、
そこで、ＤＮＡのレベルの合計が全ＤＮＡのレベルとおよそ等しい場合に、第１の細胞集団及び第２の細胞集団からのＤＮＡのレベルが検証される。
【００９４】
別の例において、
第１の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは、第１の細胞集団から単離されるＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失せず、第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡ中でホモ接合で欠失する、ＣＮＤ多型に基づいて決定され；
第２の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは、第１の細胞集団から単離されるＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型に基づいて決定され；及び
全ＤＮＡのレベルは非多型標的配列（アンジオテンシンＩ変換酵素等）に基づいて測定され、
そこで、ＤＮＡのレベルの合計が全ＤＮＡのレベルとおよそ等しい場合に、第１の細胞集団及び第２の細胞集団からのＤＮＡのレベルが検証される。
【００９５】
別の例において、第１の細胞集団及び第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中で存在するホモ接合のＣＮＶに基づいて、全ＤＮＡのレベルが計算される場合に、全ＤＮＡのレベルについて等しくない、第１の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベル＋第２の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは、ＤＮＡのレベルが不正確であることも指摘することができる。
【００９６】
別の例において、
第１の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは情報提供型ＣＮＶ多型に基づいて決定され；
第２の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは情報提供型ＣＮＶ多型に基づいて決定され；及び
全ＤＮＡのレベルは第１の細胞集団及び第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で存在するＣＮＶ多型に基づいて測定され、
そこで、レベルの合計が全ＤＮＡのレベルとおよそ等しい場合に、ＤＮＡのレベルが検証される。
【００９７】
別の例において、
第１の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは、第１の細胞集団から単離されるＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失せず、第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡ中でホモ接合で欠失する、ＣＮＤ多型に基づいて決定され；

第２の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは、第１の細胞集団から単離されるＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第２の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、ＣＮＤ多型に基づいて決定され；及び
全ＤＮＡのレベルは第１の細胞集団及び第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で存在するＣＮＶ多型に基づいて測定され、
そこで、レベルの合計が全ＤＮＡのレベルとおよそ等しい場合に、ＤＮＡのレベルが検証される。

【００９８】

これらの例において、ＤＮＡの組み合わせたレベルが全ＤＮＡのレベルについて等しくない場合に、第１の細胞集団及び第２の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルは不正確であり得る。例えば、他の遺伝的に別個の細胞集団がサンプル中で存在し得る。

【００９９】

別の例において、２つ以上の遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡのレベルを使用して、それらの集団中の細胞の数を計算する。一例において、各々の集団中の遺伝的に別個の細胞の数を比較して、サンプルにおけるキメリズムの比較手段を提供する。

【０１００】

一例において、生物学的サンプル中の細胞集団数を比較して、キメリズムのパーセンテージを提供する。例えば、非自己細胞及び自己細胞の数を比較して、キメリズムのパーセンテージを提供することができる。一例において、生物学的サンプル中の細胞集団を比較して、比を提供する。例えば、生物学的サンプル中の自己細胞及び非自己細胞の数を比較して、キメリズムの測定を自己細胞：非自己細胞の比として表わすことができる。したがって、一例において、自己細胞の数／非自己細胞の数＝自己細胞の数：非自己細胞の数である。

【０１０１】

別の例において、全ＤＮＡのレベルを使用して、サンプル中の細胞の全数を計算することができる。

【０１０２】

ゲノムＤＮＡのレベルの決定

一例において、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルは、上で議論された情報提供型ＣＮＶ多型に基づいて決定される。ＤＮＡのレベルは、当技術分野において公知の様々な方法を使用して、これらのＣＮＶに基づいて決定することができる。例えば、ＤＮＡのレベルは、所望されるＣＮＶを標的とするプライマーを使用する増幅反応によって、または増幅非依存性検出手段によって決定することができる。一例において、ＤＮＡのレベルの決定は、情報提供型ＣＮＤ多型を標的とするプライマーによる増幅反応を単離されるＤＮＡに行うことを含む。一旦情報提供型ＣＮＶが同定されたならば、当業者は領域を標的とするプライマーを容易にデザインすることができる。例えば、ＰｒｉｍｅｒＱｕｅｓｔ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）等のプライマーデザインツールを使用して、情報提供型ＣＮＶの核酸配列に基づく好適なプライマーを生成することができる。一例において、ＤＮＡのレベルは、情報提供型ＣＮＶの内部領域を標的とするプライマーを使用して、増幅反応によって決定することができる。別の例において、ＤＮＡのレベルは、情報提供型ＣＮＶの境界を標的とするプライマーを使用して、増幅反応によって決定することができる。別の例において、ＤＮＡのレベルは、情報提供型ＣＮＶに外部の領域を標的とするプライマー及び情報提供型ＣＮＶの内部領域を標的とするプライマーを使用して、増幅反応によって決定することができる。当業者は、この例において、ヘテロ接合で欠失するＣＮＤが１コピーのＰＣＲ産物を提供し、ホモ接合で欠失するＣＮＤが０コピーのＰＣＲ産物を提供し、ホモ接合で欠失していないＣＮＤが２つのコピーＰＣＲ産物を提供するだろうことを認識するだろう。別の例において、ＤＮＡのレベルは、ＣＮＶ境界の反対側を標的とするプライマーセット（つまり情報提供型ＣＮＶにすぐ外部の領域「外部ＣＮＶ境界」、及び情報提供型ＣＮＶにすぐ内部の領域「内部ＣＮＶ境界」）を使用して、増幅反応によって決定することができる。別の例に

おいて、ＤＮＡのレベルは、情報提供型ＣＮＤの内部領域を標的とするプライマーを使用して、増幅反応によって決定することができる。別の例において、ＤＮＡのレベルは、情報提供型ＣＮＤの境界を標的とするプライマーを使用して、増幅反応によって決定することができる。別の例において、ＤＮＡのレベルは、情報提供型ＣＮＶに外部の領域を標的とするプライマー及び情報提供型ＣＮＤの内部領域を標的とするプライマーを使用して、増幅反応によって決定することができる。別の例において、ＤＮＡのレベルは、ＣＮＤ境界の反対側を標的とするプライマーセット（つまり情報提供型ＣＮＤにすぐ外部の領域「外部ＣＮＤ境界」、及び情報提供型ＣＮＤにすぐ内部の領域「内部ＣＮＤ境界」）を使用して、増幅反応によって決定することができる。別の例において、ＤＮＡレベルは、表７中で示されるプライマーを使用して、情報提供型ＣＮＤ多型の増幅に基づいて決定することができる。例示的な増幅ベースの検出方法には液滴デジタルＰＣＲ及び定量的ＲＴ－ＰＣＲが含まれる。

【０１０３】

当業者は、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるＤＮＡのバックグラウンド増幅なしに（「ゼロバックグラウンド」）、第１の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを決定することができるので、第１の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失せず、遺伝的に別個の細胞集団中でホモ接合で欠失する、ＣＮＤ多型の同定が有利であることを認識するだろう。ゼロバックグラウンドで第２の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを決定することができるので、第２の細胞集団中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失せず、第１の集団中でホモ接合で欠失する、ＣＮＤ多型を同定することも有利である。したがって、一例において、第１の細胞集団中のＤＮＡのレベルは、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、第１の集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０のＣＮＤ多型に基づいて決定される。別の例において、第２の細胞集団中のＤＮＡのレベルは、第１の集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でホモ接合で欠失し、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡ中でヘテロ接合であるかまたはホモ接合で欠失していない、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０のＣＮＤ多型に基づいて決定される。これらの例において、ゲノムＤＮＡのレベルは、情報提供型ＣＮＤの内部領域を標的とするプライマーを使用して決定することができる。

【０１０４】

別の例において、ＤＮＡのレベルの決定は、情報提供型ＣＮＶ多型を標的とする定量的増幅非依存性検出手段によりＤＮＡを査定することを含む。例えば、ＤＮＡのレベルは、次世代シークエンス（ＮＧＳ）、大量並列シーケンス、及びＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ技術等の方法を使用して、情報提供型ＣＮＶ多型を査定することによって、決定することができる。当業者は、ＣＮＶのシグナルの強度に基づいて、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡの量を決定することができる（例えば定量的増幅によって、または増幅非依存性ＮＧＳもしくはＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ技術によって測定されるように）。例えば、ＤＮＡ濃度は、Ｌｏ ｅｔ ａｌ．Ａｍ Ｊ ＨｕｍＧｅｎｅｔ．６２：７６８ １９９８中で記載される式を使用して計算することができる。

【０１０５】

サンプルの調製及び分析

キメリズムは、被験体から単離される生物学的サンプルに対して本開示の方法を使用して査定される。「生物学的サンプル」及び「試料」等の用語は、本開示において互換的に文脈中で使用できる用語であると判断される。一例において、サンプルはヒトから単離される。例えば、サンプルは、小児、青年または成体の被験体から単離することができる。一例において、被験体はＨＳＣＴレシピエントである。一例において、被験体は骨髄移植を受けていた。別の例において、被験体は臍帯血移植を受けていた。

【０１０６】
本開示において、被験体からそれを収集することができ、ＤＮＡを細胞から単離することができ、本開示の方法に従って分析することができる限り、任意の細胞材料を上述の生物学的サンプルとして使用することができる。例えば、サンプルは液体サンプルであり得る。例えば、サンプルは血液サンプル（例えば単離された静脈血）であり得る。一例において、サンプルは自己細胞及び非自己細胞を含有する血液サンプルである。
【０１０７】
「血液サンプル」という用語は、全血のサンプルまたは全血中の細胞の亜集団を指すように、本開示の文脈中で使用される。全血中の細胞の亜集団には、血小板、赤色血球（赤血球）、血小板、及び白血球（すなわち好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球及び単球から構成される末梢血白血球）が含まれる。これらの５つのタイプの白血球は、更に２つの群、顆粒球（多形核白血球としても公知であり、好中球、好酸球及び好塩基球が含まれる）及び単核白血球（単球及びリンパ球が含まれる）へと分割することができる。リンパ球は、Ｔ細胞、Ｂ細胞及びナチュラルキラー細胞へと更に分割することができる。血液サンプルは遠心分離、親和性クロマトグラフィー（例えば免疫吸着手段）及び濾過等によって全細胞を除去するように処理することができる。
【０１０８】
一例において、サンプルは、被験体から直接単離されるかまたは被験体から得られたサンプルから精製される、特異的な細胞タイプまたは細胞タイプの混合物を含むことができる。例えば、サンプルは末梢血単核細胞（ｐＢＭＣ）であり得る。別の例において、血液サンプルから上で参照される細胞タイプのうちの任意のものが精製され、本開示の方法を使用して査定され得る。例えば、ゲノムＤＮＡレベルはＴ細胞において査定することができる。別の例において、ゲノムＤＮＡレベルはＢ細胞において査定することができる。別の例において、ゲノムＤＮＡレベルは顆粒球において査定することができる。別の例において、ゲノムＤＮＡレベルは、被験体血液サンプルから得られるＴ細胞、Ｂ細胞及びナチュラルキラー細胞において査定することができる。別の例において、ゲノムＤＮＡレベルは、被験体血液サンプルから得られるＴ細胞、Ｂ細胞及び顆粒球において査定することができる。細胞の亜集団を精製する様々な方法は当技術分野において公知である。例えば、全血からのｐＢＭＣは、様々な公知のフィコールベースの遠心分離方法（例えばフィコール－ハイパック密度勾配遠心分離）を使用して精製することができる。全血からｐＢＭＣを精製する方法は以下でも例示される。他の細胞集団は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）または磁性ビーズベースの分離技法等の技法を使用して、様々な細胞表面マーカーの発現に基づいて免疫選択され得る。例えば、Ｔ細胞はＣＤ３及びＣＤ４ならびに／またはＣＤ８の発現に基づいて選択することができ、Ｂ細胞はＣＤ１９の発現に基づいて選択することができ、ナチュラルキラー細胞はＣＤ１６及び／またはＣＤ５６の発現に基づいて選択することができる。他の例において、単球はＣＤ１４の発現に基づいて精製することができる。別の例において、Ｔ細胞及び顆粒球はＣＤ３及びＣＤ１９の発現に基づいて精製され、Ｔ細胞はＣＤ３＋ＣＤ１９＋であり、顆粒球はＣＤ３－ＣＤ１９－である。
【０１０９】
別の例において、生物学的サンプルを精製または加工して、細胞からのゲノムＤＮＡを単離する前に循環セルフリー核酸を除去する。例えば、生物学的サンプルからの血漿は、遠心分離を使用して精製することができる。別の例において、全血サンプルは被験体から得ることができ、血清は凝血後に遠心分離によって除去することができる。
【０１１０】
ＤＮＡは分析のために生物学的サンプル中の細胞から抽出される。一例において、細胞から抽出されたＤＮＡはゲノムＤＮＡである。細胞からＤＮＡ（特にゲノムＤＮＡ）を単離する様々な方法は、当業者に公知である。一般に、公知の方法は、出発材料の破壊及び溶解、続いてタンパク質及び他の混入物の除去ならびに最終的にＤＮＡの回収を包含する。例えば、アルコール沈殿；有機フェノール／クロロホルム抽出及び塩析を包含する技法は、ＤＮＡを抽出及び単離するために長年使用されてきた。ＤＮＡ単離の１つの例は、以

下で例示される（例えばＱｉａｇｅｎ　Ａｌｌ－ｐｒｅｐキット）。しかしながら、ゲノムＤＮＡ抽出のために様々な他の商業的に入手可能なキット（例えばＬｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；Ｑｉａｇｅｎ）がある。ＤＮＡの純度及び濃度は様々な方法（例えば分光測光法）によって査定することができる。

【０１１１】

生物学的サンプル中の遺伝的に別個の細胞集団の検出

ＨＳＣＴは、少なくとも２つの遺伝的に別個の細胞集団（例えば自己細胞及び非自己細胞）を備えたレシピエントを提供する。ＨＳＣＴの前に、レシピエント骨髄（自己細胞集団）は除去される。例えば、被験体は一般的にはＨＳＣＴの施行の前に強化化学療法及び／または照射を受ける。除去された骨髄はドナー骨髄（非自己細胞）によって置き換えられる。ドナー骨髄は次いで非自己細胞（血球等）を産生し始めることができる。このプロセスは生着として公知である。一例において、本開示の方法は、ＨＳＣＴレシピエント中の生着のレベルの決定に関する。例えば、本開示の方法を使用して、ＨＳＣＴレシピエントから得られる生物学的サンプル中の非自己細胞のレベルの決定によって、ＨＳＣＴレシピエントにおける生着のレベルを決定することができる。したがって、一例において、本開示の方法はＨＳＣＴレシピエント中の生着のレベルを決定する方法であって、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを、ＨＳＣＴレシピエントから得られる生物学的サンプルにおいて決定することを含み、そこで、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルがＨＳＣＴレシピエント中の生着の測定を提供する、該方法に関する。この例において、遺伝的に別個の細胞集団は、被験体とは遺伝的に異なり得る。例えば、遺伝的に別個の細胞集団は非自己細胞からなり得る。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団は自己細胞であり得る。

【０１１２】

一例において、自己細胞及び非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを比較して、ＨＳＣＴレシピエント中の生着の測定を提供する。別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、生着のパーセンテージを提供する。

【０１１３】

例えば、全細胞に対する非自己細胞のパーセンテージは生着のパーセンテージを提供する。様々な例において、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約７６％、約７７％、約７８％、約７９％、約８０％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％を超える非自己細胞のパーセンテージは、ＨＳＣＴの生着を指摘する。別の例において、１００％の非自己細胞は完全な生着を指摘する。別の例において、約４０％、約３５％、約３０％、約２５％、約２４％、約２３％、約２２％、約２１％、約２０％、約１９％、約１８％、約１７％、約１６％、約１５％、約１４％、約１３％、約１２％、約１１％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％未満の自己細胞のパーセンテージは、ＨＳＣＴの生着を指摘する。別の例において、０％の自己細胞は完全な生着を指摘する。

【０１１４】

別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、生着の比を提供する。一例において、約３：２０；約１：１０；約１：２０、約１：５０；約１：１００を超える自己細胞：非自己細胞の比は、ＨＳＣＴ被験体中の生着を指摘する。

【０１１５】

別の例において、本開示の方法を使用して、ＨＳＣＴのレシピエント自身の骨髄の再建（すなわち自己細胞の再建）を測定することができる。例えば、本開示の方法はＨＳＣＴレシピエント骨髄の再建のレベルを決定する方法であって、遺伝的に別個の細胞集団の情

報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを、ＨＳＣＴレシピエントから得られる生物学的サンプルにおいて決定することを含み、そこで、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄が再安定化するかどうかを指摘する、該方法に関する。この例において、遺伝的に別個の細胞集団は、被験体とは遺伝的に異なり得る。例えば、遺伝的に別個の細胞集団は非自己細胞からなり得る。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団は自己細胞であり得る。

【０１１６】

一例において、自己細胞及び非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを比較して、ＨＳＣＴレシピエント中の生着の測定を提供する。

【０１１７】

別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、骨髄再建のパーセンテージを提供する。例えば、全細胞に対する自己細胞のパーセンテージは骨髄再建のパーセンテージを提供する。別の例において、非自己細胞のパーセンテージは骨髄再建のパーセンテージを提供する。様々な例において、約１％、約２％、約３％、約４％、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、約１０％、約１１％、約１２％、約１３％、約１４％、約１５％、約１６％、約１７％、約１８％、約１９％、約２０％、約２１％、約２２％、約２３％、約２４％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％を超える自己細胞のパーセンテージは、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する。別の例において、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約７６％、約７７％、約７８％、約７９％、約８０％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％未満の非自己細胞のパーセンテージは、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する。別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、ＨＳＣＴレシピエント骨髄の再建の比を提供する。一例において、約３：２０；約１：１０；約１：２０、約１：５０；約１：１００を超える自己細胞：非自己細胞の比は、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する。

【０１１８】

様々な理由のために、本開示の方法を使用して、ＨＳＣＴを受けた被験体におけるキメリズムを測定することができる。一例において、被験体は、血液学的障害の治療のためにＨＳＣＴを受けた。一例において、被験体は、血液学的悪性腫瘍の治療のためにＨＳＣＴを受けた。例示的な血液学的悪性腫瘍には、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、多発性骨髄腫（ＭＭ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、慢性または急性骨髄白血病（ＡＭＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）または急性リンパ性白血病、濾胞性リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症（ＷＭ）、Ｂ細胞リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、骨髄異形成性新生物形成または骨髄増殖性新生物形成が含まれる。一例において、被験体は、Ｂ細胞障害の治療のためにＨＳＣＴを受けた。別の例において、被験体は、Ｂ細胞悪性腫瘍の治療のためにＨＳＣＴを受けた。別の例において、被験体は、形質細胞障害の治療のためにＨＳＣＴを受けた。別の例において、被験体は、リンパ増殖性障害の治療のためにＨＳＣＴを受けた。例えば、被験体は、多発性骨髄腫、Ｂ細胞リンパ腫、ホジキンホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫ならびにマクログロブリン血症の治療のためにＨＳＣＴを受けることができた。別の例において、被験体は、免疫不全の治療のためにＨＳＣＴを受けることができた。例えば、被験体は、ウィスコット－アルドリッチ症候群、慢性肉芽腫性疾患及びサラセミアの治療のためにＨＳＣＴを受けることができた。他の例において、被験体は、代謝障害、異常血色素症、自己免疫性疾患または骨髄機能不全の治療のためにＨＳＣＴを受けることができた。

【０１１９】

別の例において、本開示の方法を使用して、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害の再

建を測定することができる。例えば、本開示の方法はＨＳＣＴレシピエントのＢ細胞障害の再建を決定する方法であって、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを、ＨＳＣＴレシピエントから得られる生物学的サンプルにおいて決定することを含み、そこで、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害が再安定化するかどうかを指摘する、該方法に関する。この例において、遺伝的に別個の細胞集団は、被験体とは遺伝的に異なり得る。例えば、遺伝的に別個の細胞集団は非自己細胞からなり得る。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団は自己細胞であり得る。

【０１２０】

別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、血液学的障害再建のパーセンテージを提供する。一例において、全細胞に対する自己細胞のパーセンテージは血液学的障害再建のパーセンテージを提供する。一例において、約１％、約２％、約３％、約４％、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、約１０％、約１１％、約１２％、約１３％、約１４％、約１５％、約１６％、約１７％、約１８％、約１９％、約２０％、約２１％、約２２％、約２３％、約２４％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％を超える自己細胞のパーセンテージは、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害の再建を指摘する。別の例において、非自己細胞のパーセンテージは、血液学的障害再建のパーセンテージを提供する。一例において、約９９％、約９８％、約９７％、約９６％、約９５％、約９４％、約９３％、約９２％、約９１％、約９０％、約８９％、約８８％、約８７％、約８６％、約８５％、約８４％、約８３％、約８２％、約８１％、約８０％、約７９％、約７８％、約７７％、約７６％、約７５％、約７０％、約６５％、約６０％未満の非自己細胞のパーセンテージは、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害の再建を指摘する。

【０１２１】

別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、血液学的障害再建の比を提供する。一例において、約３：２０；約１：１０；約１：２０、約１：５０；約１：１００を超える自己細胞：非自己細胞の比は、ＨＳＣＴレシピエントの血液学的障害の再建を指摘する。

【０１２２】

別の例において、本開示の方法を使用して、患者における疾患再発を測定することができる。別の例において、本開示の方法を使用して、それを必要とする患者における微小残存病変を測定することができる。例えば、本開示の方法は微小残存病変を測定する方法であって、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを、患者から得られる生物学的サンプルにおいて決定することを含み、そこで、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが、微小残存病変のレベルかどうかを指摘する、該方法に関する。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団は自己細胞であり得る。別の例において、自己細胞及び非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡのレベルは、本開示の方法に従って決定される。一例において、自己細胞及び非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを比較して、微小残存病変のレベルを決定する。別の例において、サンプルにおける全ＤＮＡのレベルは本開示の方法に従って決定される。別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、微小残存病変のパーセンテージを提供する。別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、微小残存病変の比を提供する。

【０１２３】

上述の例において、キメリズムは細胞タイプにわたって測定することができる。例示的な細胞タイプは上で略述される。例えば、キメリズムは、Ｔ細胞、Ｂ細胞及び顆粒球において査定することができる。この例において、キメリズムの３つの測定が得られる。キメ

リズムのこれらの測定は治療状況を知らせることができる。一例において、レシピエントＴ細胞のレベルの低減は、免疫抑制が高すぎることを指摘することができる。この事例において、治療する医師は、レシピエントにおける免疫抑制を低減させることができる。これとは対照的に、レシピエントＴ細胞のレベルの上昇は、必要ならば免疫抑制を増加させる余地を提供する。これらの例は、Ｔ細胞媒介性疾患（ＧＶＨＤ等）において特に有利であり得る。これらの病変において、治療は、Ｔ細胞抑制と移植生存との間の適切なバランスを維持することを目指す。したがって、一例において、本開示の方法はＧＶＨＤを治療する方法であって、Ｔ細胞、Ｂ細胞及び顆粒球におけるキメリズムを測定すること、ならびに測定されたキメリズムのレベルに基づいて治療を施行することを含む、該方法に関する。

【０１２４】

別の例において、本開示の方法を使用して、生物学的サンプルの混入を同定することができる。この例において、「混入」という用語は、生物学的サンプル中の２つ以上の遺伝的に別個の細胞集団の存在を定義するように使用される。一例において、本開示の方法は血液サンプル中の混入のレベルの決定に関する。例えば、本開示の方法は、臍帯血サンプルの母親の混入を同定することを包含することが意図される（例えば胎児の「自己」臍帯血サンプル中の母親の「非自己」細胞の存在）。例えば、本開示の方法は臍帯血サンプル中の母親の混入のレベルを決定する方法であって、遺伝的に別個の細胞集団の情報提供型マーカーであるコピー数変動（ＣＮＶ）多型に基づいて、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを、臍帯血サンプルにおいて決定することを含み、そこで、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルが臍帯血サンプル中の混入の測定を提供する、該方法に関する。この例において、遺伝的に別個の細胞集団は、胎児とは遺伝的に異なり得る。例えば、遺伝的に別個の細胞集団は母親細胞であり得る。別の例において、遺伝的に別個の細胞集団は胎児細胞であり得る。

【０１２５】

一例において、自己細胞及び非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡのレベルを比較して、臍帯血サンプル中の混入の測定を提供する。別の例において、サンプルにおける全ＤＮＡのレベルは本開示の方法に従って決定される。別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、混入のパーセンテージを提供する。例えば、全細胞に対する自己細胞のパーセンテージは混入のパーセンテージを提供する。例えば、全細胞に対する自己細胞のパーセンテージは混入のパーセンテージを提供する。別の例において、自己ＤＮＡのレベル及び／または非自己ＤＮＡのレベルを全ＤＮＡのレベルと比較して、混入の比を提供する。一例において、約３：２０；約１：１０；約１：２０、約１：５０；約１：１００を超える自己細胞：非自己細胞の比は、臍帯血サンプルの混入を指摘する。

【０１２６】

モニタリング

少なくとも２つのタイムポイントにわたる本開示の方法の遂行によって、本開示の方法を使用して被験体中のキメリズムを経時的にモニターすることができる。例えば、本開示の方法を使用して、ＨＳＣＴの後に被験体をモニターすることができる。別の例において、本開示の方法を使用して、生着をモニターすることができる。別の例において、本開示の方法を使用して、被験体の骨髄の再建をモニターすることができる。別の例において、本開示の方法を使用して、被験体の血液学的障害の再建をモニターすることができる。別の例において、本開示の方法を使用して、微小残存病変をモニターすることができる。例えば、本開示の方法を使用して、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）をモニターすることができる。別の例において、本開示の方法を使用して、疾患再発をモニターすることができる。別の例において、本開示の方法を使用して、ＨＳＣＴ移植片拒絶をモニターすることができる。別の例において、本開示の方法を使用して、治療失敗を予測することができる。一例において、本開示の方法は毎日遂行することができる。一例において、本開示の方法は一週に一回遂行することができる。別の例において、本開示の方法は一月に一回遂行する

ことができる。別の例において、本開示の方法は二か月に一回遂行することができる。別の例において、本開示の方法は、３か月ごとに、４か月ごとに、６か月ごとに遂行することができる。別の例において、本開示の方法は一年に一回遂行することができる。

【０１２７】

一例において、自己細胞のレベル中の増加及び／または非自己細胞のレベル中の減少は、ＨＳＣＴレシピエントの骨髄の再建を指摘する。被験体の骨髄の再建はＨＳＣＴ拒絶を指摘することができる。したがって、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少は、免疫抑制療法がＨＳＣＴレシピエントへ施行されるべきか、またはＨＳＣＴレシピエントの免疫抑制療法が修飾されるべきか、を指摘することができる。別の例において、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少は、血液学的障害のための療法がＨＳＣＴレシピエントへ施行されるべきか、またはＨＳＣＴレシピエントの療法が修飾されるべきか、を指摘することができる。免疫抑制療法への例示的な修飾は、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少が観察される場合に、免疫抑制療法を増加させることを包含する。

【０１２８】

一例において、本開示の方法は、好適な治療レジメンの決定における使用のためのアッセイへと援用され得る。例えば、本開示は被験体におけるＨＳＣＴ拒絶を治療する方法であって、ＨＳＣＴレシピエントから得られたサンプル中の自己細胞及び非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡのレベルをモニターすることを含み、そこで、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少が検出されるならば、免疫抑制療法がＨＳＣＴレシピエントへ施行されるか、またはＨＳＣＴレシピエントの免疫抑制療法が修飾される、該方法を提供する。別の例において、本開示は被験体における血液学的障害を治療する方法であって、ＨＳＣＴレシピエントから得られたサンプル中の自己細胞及び非自己細胞から単離されるゲノムＤＮＡのレベルをモニターすることを含み、そこで、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少が検出されるならば、療法がＨＳＣＴレシピエントへ施行されるか、またはＨＳＣＴレシピエントの療法が修飾される、該方法を提供する。この例において、この療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、抗体療法、ＨＳＣＴまたは他の薬物を含み得る。例示的な療法修飾は、自己細胞のレベルの増加及び／または非自己細胞のレベルの減少が観察される場合に、療法を増加させることを包含する。

【０１２９】

コンピューターに実装される方法

本開示の方法が、コンピューターに実装される方法等のシステムによって、実装され得ることが意図される。例えば、システムは、１つまたは複数のプロセッサー（それらはメモリへ接続されて、一緒に作動できる（便宜上「プロセッサー（単数）」と称される））を含むコンピューターシステムであり得る。メモリは、非一時的なコンピューター読み取り可能なメディア（ハードドライブ、半導体ディスクまたはＣＤ－ＲＯＭ等）であり得る。実施可能な命令またはプログラムコード（コードモジュールへとグループ化されたプログラムコード等）であるソフトウェアは、メモリ上で保存することができ、プロセッサーによって実施される場合に、コンピューターシステムに機能を遂行させることができ、この機能は、被験体からの生物学的サンプルから得られるＤＮＡ中の情報提供型ＣＮＶ多型をユーザーが決定することを支援するように、課題が遂行されることを決定すること；サンプル中のＤＮＡ（例えば自己ＤＮＡ及び／または非自己ＤＮＡ）のレベルを指摘するデータを受け取ること；データを加工して、ＤＮＡのレベルに基づいてサンプルにおけるキメリズムのレベルを検出すること；サンプルにおけるキメリズムのレベルをアウトプットすること等である。

【０１３０】

例えば、メモリは、プログラムコードを含むことができ、そのプログラムコードがプロセッサーによって実施された場合に、システムは、被験体におけるキメリズムの測定を決定するか、または被験体におけるキメリズムの測定を指摘するデータを受け取り；データ

を加工して、遺伝的に別個の細胞集団から単離されるゲノムＤＮＡのレベルに基づいてキメリズムを測定し；被験体におけるキメリズムの測定を報告する。

【０１３１】

別の例において、システムをユーザーインターフェースへカップリングして、システムがユーザーから情報を受け取ること及び／または情報をアウトプットもしくはディスプレイすることを可能にできる。例えば、ユーザーインターフェースは、グラフィカルユーザーインターフェース、音声ユーザーインターフェースまたはタッチスクリーンを含むことができる。

【０１３２】

一例において、システムは、通信ネットワーク（無線通信ネットワーク等）にわたって、少なくとも１つのリモートデバイスまたはサーバーと通信するように構成され得る。例えば、システムは、通信ネットワークにわたって、デバイスまたはサーバーから情報を受け取るように、及び通信ネットワークにわたって、同じまたは異なるデバイスまたはサーバーへ情報を伝達するように構成され得る。他の実施形態において、システムは、直接的なユーザーの相互作用から隔離され得る。

【０１３３】

別の例において、被験体中の遺伝的に別個の細胞集団から得られるＤＮＡのレベルの決定によって、被験体におけるキメリズムを測定し、ＤＮＡのレベルが情報提供型ＣＮＶ多型に基づいて決定される、本開示の方法を遂行することは、ＤＮＡレベルに基づいた診断または予後のルールの確立を可能にする。例えば、診断または予後のルールは、対照と比べたキメリズムの測定に基づき得る。

【０１３４】

別の例において、診断または予後のルールは統計的な機械学習アルゴリズムの適用に基づく。かかるアルゴリズムは、キメリズムの測定と訓練データにおいて観察される疾患状態（既知の疾患状態による）との間の関係性を使用して、関係性を推測し、次いでそれを使用して未知の状態の患者の状態を予測する。アルゴリズムを用いて、例えば以下の確率の指標を提供する。

生着が生じた；

患者の骨髄が再建した；

患者の血液学的障害が再発した。

【０１３５】

一例において、アルゴリズムは多変量解析関数または単変量解析関数を遂行する。

【０１３６】

別の例において、本開示は、ＨＳＣＴレシピエントの状態、予後及び／または治療応答をユーザーが決定することを可能にする方法であって、（ａ）被験体におけるキメリズムの測定を指摘するデータを受け取ること；ｂ）データを加工して、被験体におけるキメリズムの測定を決定すること；ｃ）被験体の状態、予後及び／または治療応答をアウトプットすることが含まれる、該方法に関する。

【０１３７】

別の例において、本開示は、障害に罹患する被験体の状態、予後及び／または治療応答をユーザーが決定することを可能にする方法であって、（ａ）被験体におけるキメリズムの測定を指摘するデータを受け取ること；ｂ）データを加工して、被験体におけるキメリズムの測定を決定すること；ｃ）被験体の状態、予後及び／または治療応答をアウトプットすることが含まれる、該方法に関する。

【０１３８】

一例において、キメリズムの測定は、疾患の存在、状態、分類、寛解または進行への相関性を提供する。

【０１３９】

組成物／キット

一例において、本開示は、本開示の方法における使用のために、本開示において略述さ

れるＣＮＶ多型（例えば表７を参照）を増幅するように特異的に構成されたＰＣＲプライマーペアを含むキットに関する。例えば、キットは、
ａ）表１中で示されるＣＮＶ多型について特異的なプローブ及び／またはプライマー；及び／または
ｂ）表７中で示されるプローブ及び／またはプライマー
を含むことができる。

【０１４０】

一例において、キット構成要素は、好適な溶媒中でもしくはそれと共に、または凍結乾燥形状でパッケージングすることができる。キット構成要素は、本開示の方法の遂行ための書面の指示と共に好適な容器中で随意にパッケージングすることができる。一例において、本開示は、本開示の方法の遂行のための非侵襲性のインビトロの診断アッセイの製造における、本明細書において開示されるプライマーの使用に関する。

【０１４１】

多数の変形及び／または修飾が本開示の広義の一般的な範囲から逸脱せずに、上述の実施形態へ行われ得ることは当業者によって認識されるだろう。したがって、本実施形態は、例示的であり限定的ではないとして、すべての点において考慮されるべきである。本明細書において議論及び／または参照されるすべての出版物は、それらの全体で本明細書に援用される。本明細書中に包含される文書、動作、材料、デバイス、論文、または同種のものの任意の考察は、もっぱら本開示のための文脈を提供する目的のためである。任意のまたはすべてのこれらの事柄が、先行技術基準の一部を形成するか、または本出願の各々の請求項の優先日の前に存在していたとする本開示に関連する分野における共通の一般知識であるという承認として見なされるべきではない。本出願は２０１年６月１５日に出願されたＡＵ２０１５９０２２７４に対して優先権を主張し、それらの開示は参照により本明細書に援用される。

【実施例】

【０１４２】

実施例１　－　ＣＮＶ欠失遺伝子座の選択

すべての個体のゲノムは、ゲノムの全体にわたって広がる何千もの欠損（すなわち欠失）及び獲得（すなわちディレクテーション（ｄｅｌｅｃｔａｔｉｏｎ）、増幅など）からなる、異なるコピー数バリアント（ＣＮＶ）プロファイルを有する。これらのうちのいくつかは、大規模なＣＮＶ遺伝子型決定研究において同定されたコピー数可変領域で生じるが、多くのものが一意的でもある。公知のＣＮＶ領域のうちで、これらは、対立遺伝子分布のコピー数状態（すなわち０、１、２、３など）、ゲノムサイズ、及び集団内頻度に関して層別化され得る。ＤＮＡサンプルにおけるキメリズムを検出する目的のために、ＣＮＶ領域は、０、１、２（しかし重複ではない）の対立遺伝子分布を有して、及び０．４より大きい、ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）対立遺伝子頻度を有して、選択される。後者は制約として見なすことができないが、むしろ、父方のゲノムをスクリーニングする必要性なしに、サンプルの大部分においてキメリズムを検出できるアッセイのパネルの開発のためのアプローチを反映する。かかるＣＮＶは集団中で一般的であり、１０の最初のパネル（ＣＮＤ＿０１～ＣＮＤ＿１０；表１）は公共のＨａｐＭａｐデータのコンピューター内の分析によって選択された（Ｃｏｎｒａｄ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ，４（５４）：７０４－７１２，２０１０；ＭｃＣａｒｒｏｌ　ｅｔ　ａｌ．　Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔ　４０（１０）：１１６６－１１７４，２００８）。ＨａｐＭａｐデータは、高解像度マイクロアレイ分析によって同定された各々のＣＮＶについてのコピー数情報を含む。頻度の計算のために、血縁関係がない個体からのデータのみが含まれていた（ｎ＝１２２）。ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型、ヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型、ホモ接合で欠失していない（２コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型を備えたＣＮＶが、分析のために選択された。２コピーを超えて広がる対立遺伝子分布を備えたＣＮＶならびに染色体Ｘ及びＹのＣＮＶは、除外された。各々の選択されたＣＮＶについて、遺伝子型の頻度を計算した。分節重複によりオーバーラップ

するＣＮＶは除外された。すべての１０のＣＮＶは３ｋｂ未満のサイズであったが、方法はすべてのサイズ範囲のＣＮＶへ適用する。臨床適用に関して、すべての１０のＣＮＶ領域が多型であり、それらのどれも任意の固有の臨床的有意性はないことに注目することが重要である。

表１：

名称	CNP_id	染色体	開始_hg18	終結_hg18	サイズ(bp)	ホモ接合で欠失する頻度(0コピーのPCR産物)	ヘテロ接合で欠失する頻度(1コピーのPCR産物)	ホモ接合で欠失していない頻度(2コピーのPCR産物)
CND 12	CNVR3451.1	染色体7	73,467,042	73,469,172	2,130	0.55	0.33	0.12
CND 13	CNVR4596.1	染色体10	4,698,559	4,700,493	1,934	0.61	0.31	0.08
CND 14	CNVR801_全長	染色体2	54,419,132	54,420,976	1,844	0.59	0.37	0.04
CND 15	CNVR5853_全長	染色体13	38,831,627	38,833,387	1,760	0.55	0.33	0.12
CND 16	CNVR842.1	染色体2	76,627,234	76,628,943	1,709	0.6	0.33	0.08
CND 17	CNVR431.1	染色体1	185,731,458	185,733,106	1,648	0.62	0.33	0.04
CND 18	CNVR4203.1	染色体9	17,900,038	17,901,633	1,595	0.61	0.36	0.03
CND 20	CNVR952.1	染色体2	121,513,996	121,515,257	1,261	0.53	0.36	0.1
CND 21	CNVR1138.2	染色体2	219,761,436	219,762,572	1,136	0.39	0.42	0.18
CND 22	CNVR5923.1	染色体13	71,743,783	71,744,892	1,109	0.41	0.55	0.04
CND 23	CNVR8147.1	染色体22	33,975,445	33,976,472	1,027	0.45	0.43	0.12
CND 24	CNVR3004.1	染色体6	95,250,114	95,251,113	999	0.4	0.47	0.13

名称	CNP_id	染色体	開始_hg18	終結_hg18	サイズ(bp)	ホモ接合で欠失する頻度(0コピーのPCR産物)	ヘテロ接合で欠失する頻度(1コピーのPCR産物)	ホモ接合で欠失していない頻度(2コピーのPCR産物)
CND 25	1343*	染色体8	112,363,455	112,364,436	981	0.57	0.38	0.05
CND 26	CNVR381.1	染色体1	157,915,386	157,916,253	867	0.6	0.35	0.05
CND 27	CNVR4374.1	染色体9	88,344,772	88,345,596	824	0.56	0.36	0.07
CND 28	CNVR2799.1	染色体6	18,510,099	18,510,860	761	0.41	0.44	0.15
CND 29	CNVR6540.1	染色体15	97392250	97392985	735	0.51	0.43	0.06
CND 30	CNVR6357.1	染色体15	37531690	37532136	446	0.52	0.42	0.07
CND 31	158	染色体1	208148236	208150607	2,371	0.383	0.450	0.167
CND 32	CNVR358.1	染色体1	150822234	150856715	34,481	0.393	0.459	0.148
CND 33	CNVR217.1	染色体1	72538870	72584557	45,687	0.393	0.459	0.148
CND 34	CNVR7808.1	染色体20	21234267	21236529	2,262	0.516	0.418	0.066
CND 36	554	染色体4	9823254	9844366	21,112	0.550	0.333	0.117
CND 37	CNVR2469.1	染色体5	57359283	57369499	10,216	0.615	0.361	0.025
CND 38	CNVR3009.1	染色体6	100141275	100141994	719	0.623	0.377	0.000
CND 39	CNVR3609.1	染色体7	147704059	147710726	3,20	0.656	0.311	0.033

名称	CNP_id	染色体	開始_hg18	終結_hg18	サイズ(bp)	ホモ接合で欠失する頻度(0コピーのPCR産物)	ヘテロ接合で欠失する頻度(1コピーのPCR産物)	ホモ接合で欠失していない頻度(2コピーのPCR産物)
				3	4			
CND_41	CNVR2304.1	染色体5	1977604	1978111	507	0.672	0.328	0.000
CND_01	CNVR376.1	染色体1	157,134,152	157,136,674	2,522	0.51	0.42	0.07
CND_02	CNVR7344.1	染色体18	53,097,735	53,099,702	1,967	0.52	0.4	0.08
CND_03	CNVR4014.1	染色体8	112,363,260	112,365,469	2,209	0.5	0.41	0.08
CND_04	CNVR6084.1	染色体14	21,951,540	21,952,070	530	0.46	0.43	0.11
CND_05	CNVR6676.1	染色体16	25,247,611	25,250,595	2,984	0.45	0.47	0.08
CND_06	CNVR3319.1	染色体7	24,004,755	24,006,584	1,829	0.47	0.38	0.15
CND_07	CNVR5850.1	染色体13	37,955,318	37,958,191	2,873	0.43	0.43	0.14
CND_08	CNVR3753_全長	染色体8	4,110,308	4,112,335	2,027	0.43	0.43	0.13
CND_09	CNVR7301.1	染色体18	33,560,073	33,560,645	572	0.42	0.45	0.12
CND_10	CNVR4886.1	染色体10	108,020,303	108,022,518	2,215	0.41	0.42	0.17
CND_19	CNVR1037.1	染色体2	159,668,040	159,669,209	1,169	0.5	0.43	0.07

【０１４３】

実施例２　－　遺伝子型決定

ＰＣＲは、１０の「ＣＮＶ欠失」遺伝子座（ＣＮＤ＿０１～ＣＮＤ＿１０；表１）内に

（すなわち内部ＰＣＲ）及び隣接して（すなわち外部ＰＣＲ）所在するプライマーによりデザインされた。内部ＰＣＲは、ヘテロ接合で欠失する遺伝子型（１コピーのＰＣＲ産物）またはホモ接合で欠失していない遺伝子型（２つのコピーＰＣＲ産物）について特異的な産物を与え、特異的な産物の非存在は、ホモ接合で欠失する遺伝子型（０コピーのＰＣＲ産物）を指摘する。外部ＰＣＲは、「野生型」よりも短い精密な産物を与え（注：より大きな、欠失していない対立遺伝子は大きすぎるので増幅することができないので「野生型」産物は存在しない）、内部ＰＣＲによって検出されるすべての欠失を確認する。内部ＰＣＲ及び外部ＰＣＲの組み合わせを使用して、母親細胞のＤＮＡ中の各々のＣＮＤについての遺伝子型状態を決定する（すなわち、ホモ接合で欠失していない（２コピーのＰＣＲ産物）、ヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）またはホモ接合で欠失する（２コピーのＰＣＲ産物））。２１の対照サンプルについて得られる遺伝子型決定の結果を図１中で示す。バンドの非存在は「ホモ接合で欠失する」（０コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型を備えた個体を指摘し（図１ａ）、それは１２の個体において観察される。これはＣＮＤ＿０１について予測される５０％の頻度と一致する。外部ＰＣＲ結果（図１ｂ）から推測されるように、ＰＣＲ産物のバンドを示す９個体は、「ヘテロ接合で欠失する」（１コピーのＰＣＲ産物）または「ホモ接合で欠失していない」（２コピーのＰＣＲ産物）のいずれかであった。ホモ接合で欠失（０コピーのＰＣＲ産物）がＰＣＲ失敗ではなく本当のことであったということも外部ＰＣＲ（図１ｂ）からの結果で確認される。遺伝子型決定アッセイが正確であったことを明白に証明するために、示される「内部ＰＣＲ」及び「外部ＰＣＲ」産物をシークエンスし、ＢＬＡＴを使用して、ゲノムの所在位置へマッピングした。すべての事例において、これは正しく一意的なゲノム遺伝子座であった。すべてのＣＮＶ欠失の予想される頻度は、局所的な一般集団を起源とする１００名の個体のＤＮＡサンプルを遺伝子型決定することによって確認された（表１）。予想される頻度及び観察される頻度は、ＣＮＤ＿１０以外の大部分のＣＮＤについて類似し、それは本対照集団中で比較的低い、ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）頻度を有していた。

【０１４４】

実施例３　－　スパイキング実験

パネル中の各々のＣＮＤについて、キメリズムの測定における感度下限及び特異性は、対照ＤＮＡの混合によって遺伝子型状態が異なる個体から得られた「キメラ」ＤＮＡの力価測定の使用によって、経験的にモデル化された。簡潔には、その選択されたＣＮＶ欠失遺伝子座について「ホモ接合で欠失する」（０コピーのＰＣＲ産物）個体からのＤＮＡサンプルの中へ、選択されたＣＮＶ欠失遺伝子座についてヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）個体からのＤＮＡサンプルをスパイクした。ＣＮＶ欠失ｑＰＣＲアッセイ及びＳＲＹベースのｑＰＣＲアッセイを、スパイクしたサンプルで遂行した。

【０１４５】

実施例４　－　ＣＮＤマーカーのコンピューター内の選択

０．３～０．７の間の、ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）欠失頻度を備えたＣＮＤが、２つの高解像度データセットのコンピューター内の分析によって同定された。データセット１：５００ｂｐの解像度で４５０のＨａｐＭａｐサンプルを試験することによって生成された、５２３８のＣＮＶ遺伝子座のための遺伝子型データ（Ｃｏｎｒａｄ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０）上記）。データセット２：２Ｋｂの解像度で２７０のＨａｐＭａｐサンプルを試験することによって生成された、１３１９のＣＮＶ遺伝子座のための遺伝子型データ（ＭｃＣａｒｒｏｌ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）上記）。分析はＣＥＰＨデータのみを使用した。ＣＥＰＨ　ＨａｐＭａｐデータが発端者及び両親についてのトリオデータを含むので、ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型、ヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型及びホモ接合で欠失していない（２コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型の頻度の計算は、過大評価を最小限にするように親のデータのみを使用して遂行された。更なる補正（同祖接合性について等（Ｓｔｅｖｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）ＥＪＨＧ　２０：６５７－６６７；Ｓｔｅｖｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）ＰＬＯＳ　Ｏｎｅ　７：４９５７５））は行わなかった。コンピューター内の

選択は、以下の尺度を使用した。各々のＣＮＶは、３キロベース未満に広がるヒトゲノム中で単一の遺伝子座を構成する（性差による偏向を考慮して）。これは３８の候補をもたらし；これらのＣＮＶ領域はすべて多型であり、そのどれにも任意の公知の固有の臨床的有意性はない。

【０１４６】

実施例５　－　ＣＮＤパネル

上で同定された３８のＣＮＤのうちで、最も情報提供型の「ホモ接合で欠失する」（０コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型の頻度ランキングを有すると予測される１０個を、インビトロの査定のための最初のパネルとして選択した（ＣＮＤ＿０１～ＣＮＤ＿１０；表１）。ホモ接合で欠失する遺伝子型（０コピーのＰＣＲ産物）の頻度は０．４１０～０．５０８の間の範囲であり、平均値は０．４５２であり、標準偏差は０．０３８である。これらのホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型の頻度に基づいて、計算され、個体の９９％がおそらくパネル中の少なくとも１つのＣＮＤについてホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）という観察によって後に確認された。ＣＮＤ頻度のインビトロの推定

【０１４７】

コンピューター内の選択から得られた１０のＣＮＤについて推定される集団頻度を、９３名の健康な個人の未選択のサンプル中のものと比較した。このサンプルが採取された局所的な集団は民族的に非常に多様性があり、我々の無作為抽出はこのことを反映すると推測される。異なる民族集団中のこれらのＣＮＤについて情報不足であるにもかかわらず、多様性のある集団におけるキメリズム試験についてのこれらのＣＮＤマーカーの能力は、コンピューター内及びインビトロの頻度が非常に類似することによって、強調された。

【０１４８】

実施例６　－　サンプルの遺伝子型決定

ＰＣＲプライマーは、パネル中の各々のＣＮＤマーカー内に（すなわち内部ＰＣＲ）及び欠失する領域に隣接して（すなわち外部ＰＣＲ）所在するようにデザインされた。短いアンプリコン（５８～７４ｂｐ（平均６５ｂｐ）のサイズの範囲）を、内部ＰＣＲのために選択した。ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型を備えたサンプルは「内部」ＰＣＲ産物を与えない。ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型の確認は外部ＰＣＲアッセイを使用して行われ、それは一意的なＰＣＲ産物を与える。内部ＰＣＲアンプリコン及び外部ＰＣＲアンプリコンの同一性をサンガーシークエンスを使用して確認した。欠失していない対立遺伝子のすべての内部ＰＣＲアンプリコン配列はＣＮＤ遺伝子座内の予想される領域へマッピングされ、欠失する対立遺伝子の外部ＰＣＲアンプリコンはＣＮＤ遺伝子座の隣接する領域へマッピングされた。内部／外部のＰＣＲ結果の組み合わせは、ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型、ヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型及びホモ接合で欠失していない（２コピーのＰＣＲ産物）遺伝子型を識別する（実施例について図１を参照）。

【０１４９】

３つの独立した集団コホートにおいて観察される「ホモ接合で欠失する」（０コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ頻度の分布はほとんど重ねられ、任意の個体について、平均で１０のパネル遺伝子型が、４～５の、ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤを含有することを指摘する（図２）。

【０１５０】

実施例７　－　検証研究

同種異系骨髄移植の事例において、移植後のモニタリングを使用して、治療失敗（疾患再発、移植片拒絶及び移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）等）を予測する。この文脈において、キメリズム分析は、患者予後を予測し、臨床医が適切な患者管理戦略を設定することを支援するのに重要である。

【０１５１】

単純で効率的なキメリズム分析は、コピー数欠失変動マーカー及び液滴デジタルＰＣＲ

（ｄｄＰＣＲ）の使用によって、骨髄移植事例における生着をモニターするために確立された。４名の個体（３名は近い血縁であった）を含む、非常に複雑な骨髄移植事例における生着のモニターにおいて、この方法は成功した（実施例９を参照）。

【０１５２】

感受性の査定

パネルからの３つの無作為に選択されたＣＮＶマーカーに感受性分析を行った。そのマーカーについてホモ接合で欠失することが既知である個体からのＤＮＡの中へ、それぞれのＣＮＶマーカーについてヘテロ接合で欠失することが示される個体からのゲノムＤＮＡをスパイクして、１００％～０．０４９％の分画範囲にわたるスパイキングシリーズを生成した。０．０４９％未満のキメラ画分の少量のＤＮＡによる連続希釈を使用して、０．０４９％～０．００６１％までのキメラ画分を生成した。

【０１５３】

三重のスパイクされたサンプルに、分画範囲全体にわたって１ウェルあたり１００ｎｇのゲノムＤＮＡのスタンダード化したインプットを使用して、記載されるようなｄｄＰＣＲを行った。各々のＣＮＶアッセイについて直線状のモデルを決定した。アッセイ内変動は、各々の希釈で各々のＣＮＶマーカーの三重測定について変動係数（ＣＶ）を計算することによって測定された。アッセイ間変動は、各々の希釈ステップですべての３つのＣＮＶマーカーについてＣＶを計算することによって測定された。検出限界は、すべての重複測定が情報提供型ＣＮＶマーカーを測定した最低のキメラ画分として定義された。

【０１５４】

アッセイ間変動は、高情報提供型の血縁関係がないＢＭＴドナーレシピエントペアからの長期的なキメリズム分析データを使用して、実際に査定もされた。標準偏差及びＣＶは、各々のタイムポイントでドナー及びレシピエントについてのすべての情報提供型マーカーから計算された。

【０１５５】

３つのＣＮＶマーカーはすべて０．００６％までのキメリズムを検出した。検出下限は０．０１２％で決定された。３つのＣＮＶマーカーすべてについての性能は、ダイナミックレンジ（０％～１００％）にわたって直線状であった（ｒ＞０．９９、ｐ＜０．００１）（図３）。各々のマーカー（アッセイ内変動）についての重複測定内のＣＶは、１００％～０．１％までのキメラ画分について４．６％～１４．６％の範囲であった（図４）。０．１％～０．０１％の間のキメリズムで、ＣＶは３５～４１％の範囲であった。１００％のキメリズム～０．０９％のキメリズムまでのマーカーの重複測定（アッセイ間変動）の平均値の間のＣＶは、３．３％～１５％の範囲であった。これより下で、アッセイ間のＣＶは５％～３４％であった。

【０１５６】

スパイキングシリーズから得られたアッセイ間のＣＶの結果は、長期的にサンプリングされた臨床例（ドナーが５つの情報提供型ＣＮＶマーカーを有し、レシピエントが８つの情報提供型ＣＮＶマーカーを有していた）から得られた結果に一致した（図５）。アッセイ間のキメラ画分の標準偏差は０．００３～０．０３の範囲であり、ＣＶはキメラ分画範囲３％～９６％にわたって２～１１％の範囲であった。

【０１５７】

再現性の査定

記載されるように抽出したＢＭＴ後のキメラのゲノムＤＮＡサンプルを、Ｑｕｂｉｔ ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ、米国）を使用して定量化し、およそ７．５ｎｇ／ｕＬへ希釈した。１６のＣＮＶマーカーが、記載されるようなｄｄＰＣＲを使用して、このサンプルに対して実行された。実験は、１、２、５、６、７及び８日目に同じサンプルで反復された。８日目に、実験は午前（８日目ａ）及び午後（８日目ｂ）に反復された。反応中の各々のＣＮＶマーカーの濃度を使用して、各々のマーカーについての再現性のＣＶを経時的に計算した。加えて、ＣＮＶキメリズム分析を各々のタイムポイント

で遂行し、もたらされたキメラ画分をタイムポイントにわたって比較した。

【０１５８】

１６のＣＮＶマーカーを７度使用する同じキメラサンプルの反復分析は、１つを除いて全てのマーカーで一致する結果を与え、ＣＶが３．３～５％であることを実証した。１つのマーカー（ＣＮＶ０９Ｂ）において、変動係数は１つの実行上の外れ値によって９．９％へ増加した。これらのマーカーがキメラ画分を決定するために使用された場合に、同じサンプルからのキメリズム結果は、タイムポイントにわたって類似して一致し、０．０２４％～０．０５０％（標準偏差０．０１３％）の範囲であった。

【０１５９】

ｄｄＰＣＲは、ＢｉｏＲａｄ Ｑｘ２００ Ｄｒｏｐｌｅｔ Ｄｉｇｉｔａｌ ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－ｒｅｄ、Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ、ＣＡ）を後述されるように使用して遂行した。個々の実行からのｄｄＰＣＲの絶対定量的生データを、図６中で示す。個々のＣＮＤアッセイについての絶対測定は、３．３～５．０％の間の大部分のＣＶ範囲で、日々の実行間で実質的にオーバーラップする（例外は、ＣＮＤ０９；金曜日のアッセイにおいて単一の外れ値測定に起因して、９．９％の比較的高いＣＶである）。日内及び日間の実行からのキメリズム結果を比較するために、ドナー遺伝子型及びレシピエント遺伝子型を比較して、一意的な多型（情報提供型マーカー）を同定した。情報提供型マーカーを独立して分析して、レシピエントＤＮＡ及びドナーＤＮＡの全ＤＮＡコピーを査定した（表２）。各々の個々の情報提供型ＣＮＤ多型は、キメリズム結果の計算のための独立した測定を提供する。したがって、すべてのヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）マーカーの平均を使用して、サンプル中のレシピエントＤＮＡ及びドナーＤＮＡの量を表わした。次いで全ＤＮＡ量を、後述されるように、レシピエントＤＮＡ及びドナーＤＮＡを加えることによって計算した。

表２：

		１コピーマーカーの平均コピー数		
日	日付	レシピエント	ドナー	合計
木曜日	14052015	1	4214	4215
金曜日	15052015	2	4302	4304
月曜日	18052015	1	4138	4139
火曜日	19052015	1	4132	4133
水曜日	20052015	2	4188	4190
木曜日１	21052015	2	4124	4126
木曜日２	21052015	2	4028	4030

【０１６０】

キメリズム結果は、ドナー及びレシピエントのプロファイルのパーセンテージとして提示された（表４）。標準偏差は日間及び日内の実行結果のパーセンテージとして提示された（０．０１３％）。日内及び日間からの生データを表５中で示す。情報提供型マーカーの日々変動の結果を表６中で示す。低い標準偏差から、情報提供型ＣＮＤ多型マーカーに基づくキメリズムアッセイは一致する非常に高い再現性を有することが実証される。

表３：

		キメリズム結果	
日	日付	レシピエント%	ドナー%
木曜日	14052015	0.024%	99.976%
金曜日	15052015	0.046%	99.954%
月曜日	18052015	0.024%	99.976%
火曜日	19052015	0.024%	99.976%
水曜日	20052015	0.048%	99.952%
木曜日１	21052015	0.048%	99.952%
木曜日２	21052015	0.050%	99.950%
		標準偏差=0.013%	標準偏差=0.013%

【０１６１】

正確性の評価

４つの患者群からの１５のゲノムＤＮＡサンプルを、アッセイの査定のためのコンパレーターサンプルとして使用した。サンプルの各々のセットは、ドナー、レシピエント及び時間経過の混合キメリズムのサンプルを含む（表４を参照）。移植片状態は、ショートタンデムリピート（ＳＴＲ）の査定によってすべてのサンプルにおいて以前に決定されていた。しかしながら、研究者は、情報提供型ＣＮＶ多型を使用してキメリズムを査定する前に、移植片状態について盲検化された。ＳＴＲ及びＣＮＶによって査定された移植片状態が比較された。

表４：

患者	サンプル	Qubitにおけるng/ul
患者１	レシピエント	7.62
患者１	ドナー	6.54
患者１	試験Ａ	6.69
患者１	試験Ｂ	7.04
患者１	試験Ｃ	6.49
患者２	レシピエント	6.9
患者２	ドナー	7.18
患者２	試験Ａ	6.73
患者２	試験Ｂ	6.52
患者２	試験Ｃ	6.26
患者２	試験Ｄ	5.91
患者３	レシピエント	9.96
患者３	ドナー	6.69
患者３	試験Ａ	7.24
患者３	試験Ｂ	6.89
患者３	試験Ｃ	6.65
患者３	試験Ｄ	7.17
患者３	試験Ｅ	7.43
患者４	レシピエント	40.5
患者４	ドナー	39.6
患者４	試験Ａ	50.5
患者４	試験Ｂ	40.9
患者４	試験Ｃ	46.5

【０１６２】

すべてのサンプル（ドナー、レシピエント及びキメリズムのサンプルを含む）を、ホモ接合の対照（２コピーのＰＣＲ産物）と共に、１５のＣＮＤ多型マーカーを使用してスクリーニングした（図７～１０）。各々のサンプルのキメリズム結果を上述のように分析した。ＣＮＶキメリズム分析は、以前のＳＴＲ分析と良好に相関した（０．９９７）（図１１）。強い相関性から、ＣＮＶ分析が、ＳＴＲ分析と少なくとも同じくらい正確であることが指摘される。さらに、ＣＮＶキメリズム分析は、ＳＴＲ分析を超える以下の利点を有する。

ｉ）アッセイを、性別ミスマッチのＨＳＣＴへの制約なしに性別を超えた移植において使用することができる；

ｉｉ）情報提供型ＣＮＤマーカーは各々独立したキメリズム測定を提供する；

ｉｉｉ）アッセイは、堅実なアッセイ性能及び絶対的なＤＮＡコピー数定量化によって示されるように、技術的な重複測定に関して非常にロバストである；

ｉｖ）アッセイは、ゼロバックグラウンド及び超高感度に起因して、非常に低い検出限界を有する；

ｖ）３８のＣＮＤマーカーの大きなパネルが利用可能であり、それは任意の同一でないドナー－レシピエントの骨髄移植ペアにおいて使用することができる。

表５：

		マーカーのコピー／ｕｌ															
日	日付	ACE	CND12	CND13	CND14	CND15	CND16	CND18	CND1B	CND20	CND2B	CND3B	CND4B	CND5B	CND6B	CND7B	CND9B
木曜日	14052015	6700	0	0	4200	2	4670	4300	8460	1	0	1	1	4150	0	1	3750
金曜日	15052015	6880	3	0	4500	1	5130	4530	9400	1	0	3	1	4480	0	2	3870
月曜日	18052015	6830	0	0	4190	0	4500	4210	8860	2	0	3	0	4080	0	0	3710
火曜日	19052015	6460	0	0	4190	0	4560	4160	8410	1	0	2	1	3890	0	0	3860
水曜日	20052015	6380	1	0	3980	2	4770	4090	8480	3	0	3	1	4120	0	1	3980
木曜日１	21052015	6630	2	0	4110	0	4540	4250	9140	4	0	4	0	3950	0	2	3770
木曜日２	21052015	6420	1	0	4010	1	4480	3990	8600	4	0	3	0	3950	0	0	3710
	平均	6614	1	0	4169	1	4664	4219	8764	2	0	3	1	4112	0	1	3664
	標準偏差	200	1	0	171	1	229	172	383	2	0	1	1	207	0	1	363
	CV	3.0%			4.1%		4.9%	4.1%	4.4%					5.0%			9.9%

表６：

情報提供型マーカーの日々変動の結果

日	日付	ACE	レシピエントマーカー					ドナーマーカー					
			CND12	CND15	CND20	CND3B	CND4B	CND7B	CND1B	CND14	CND16	CND9B	CND5B	CND18
木曜日	14052015	6700	0	2	1	1	1	1	8460	4200	4670	3750	4150	4300
金曜日	15052015	6880	3	1	1	3	1	2	9400	4500	5130	2870	4480	4530
月曜日	18052015	6830	0	0	2	3	0	0	8860	4190	4500	3710	4080	4210
火曜日	19052015	6460	0	0	1	2	1	0	8410	4190	4560	3860	3890	4160
水曜日	20052015	6380	1	2	3	3	1	1	8480	3980	4770	3980	4120	4090
木曜日１	21052015	6630	2	0	4	4	0	2	9140	4110	4540	3770	3950	4250
木曜日２	21052015	6420	1	1	4	3	0	0	8600	4010	4480	3710	3950	3990

【０１６３】

ＦＩＳＨベースの方法との比較

全血サンプルを１名の女性及び１名の男性から得た。白血球数を各々のサンプルについ

て得た。サンプルを遠心分離し、バフィーコートを単離した。細胞をリン酸緩衝食塩水中で２回洗浄し、その後、もとのサンプル体積へリン酸緩衝食塩水中で希釈した。次いで女性のサンプル及び男性のサンプルを混合して、およそ１００％、８０％、６０％、４０％、２０％及び０％の女性の細胞からなる、スパイクされたシリーズを生成した。

【０１６４】

スライドをルーチンの手順に従ってＦＩＳＨのために調製し、ＣｙｔｏＣｅｌｌ　ＡｎｅｕＶｙｓｉｏｎのＸ動原体（ＤＸＺ１）及びＹ動原体（ＤＹＺ３）のプローブを使用し、同時にスタンダードの方法に従って、分析を遂行した。合計３００の間期細胞を、各々のキメラ画分で２名の独立した分析者によって（分析者によって２００及び点検者によって１００）分析した。

【０１６５】

スパイクされたシリーズに、記載されるようにＣＮＶキメリズム分析を行った。反応中の各々のＣＮＶマーカーの濃度を使用して、各々の希釈ステップでのＣＮＶマーカーＣＶを計算した。次いでキメラ画分を計算し、ＦＩＳＨ方法によって測定されたものと比較した。

【０１６６】

男性及び女性についての４つの一意的な情報提供型マーカーを使用して、ＣＮＶ方法によってキメリズム画分を決定した。各々の希釈ステップで、マーカーの中でのアッセイ間ＣＶは、８％未満であった。ＣＮＶ方法を使用して測定されたキメリズム画分と性別ミスマッチＦＩＳＨ分析によって決定されるようなキメリズム画分との間に強い直線状の相関性があった（ｒ＝０．９９５７、９５％信頼区間０．９５９１～０．９９９５、ｐ＜０．００１）（図１２、左側パネル）。

【０１６７】

ＳＮＰベースの方法との比較

単一のドナーのＢＭＴの４名のレシピエントからの１５の長期的に収集された末梢血サンプルに、Ｈａｒｒｉｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（３）を修飾した方法に基づいて、臨床的に示された施設のＳＮＰベースのｒｔＰＣＲキメリズム分析を行った。ドナー及び移植前のレシピエントの血液サンプルの遺伝子型を決定した。白血球を分離し、Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ａｃ－Ｔ　ｄｉｆｆ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、Ｌａｎｅ　Ｃｏｖｅ、Ｎｅｗ　Ｓｏｕｔｈ　Ｗａｌｅｓ、オーストラリア）を使用してカウントし、次いでおよそ２００ｕＬ中の5×10^{6}白血球の濃度へＰＢＳにより希釈した。製造者の指示に従ってＱＩＡａｍｐ　ＤＮＡ　Ｂｌｏｏｄ　Ｍｉｎｉ－Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ、Ｈｉｌｄｅｎ、ドイツ）を使用してＤＮＡ抽出を遂行し、ＮａｎｏＤｒｏｐ　２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ、米国）を使用して濃度を測定して、１０ｎｇ／ｕＬの使用溶液を得た。

【０１６８】

ＳＮＰベースの対立遺伝子識別は、ＴＳＣ０９５５２３４、ｒｓ３９１８３４４及びｒｓ３３８７７３（３）を標的とする３つのプライマープローブセットを使用して遂行した。移植前レシピエント及びドナーのサンプルからの遺伝子型決定を使用して、情報提供型の組み合わせを確認した。各々サンプル及び陽性対照（ドナー細胞及びレシピエント細胞の５０：５０の混合物）を、陰性対照と共に三重で実行した。各々の反応は、５ｕＬのＤＮＡの使用溶液、１０ｕＬのＴａｑＭａｎ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ、米国）、１ｕＬのプライマー／プローブ混合物及び４ｕＬの蒸留水からなった。ｒｔＰＣＲは、Ｃｏｒｂｅｔｔ　Ｒｏｔｏｒｇｅｎｅ　３０００（ＱＩＡＧＥＮ、Ｈｉｌｄｅｎ、ドイツ）を使用して、９５°で１０分間、続いて、９２°１５秒間及び６０°６０秒間の４０サイクルを実行して、遂行した。閾値定義及び分析は、ストックのＲｏｔｏｒ－Ｇｅｎｅ　６０００　Ｓｅｒｉｅｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅを使用して遂行した。キメリズム定量は、ΔΔサイクル閾値法を使用して遂行した。盲検化キメリズム分析をＣＮＶ方法も使用して同じサンプル上で遂行し、キメラ画分を比較した。

【０１６９】
ＳＮＰアッセイによって測定されたキメリズム画分は、１０～９５％（このアッセイについての検出限界）の範囲であった。一意的なドナー及びレシピエントの情報提供型ＣＮＶの数は、以下の通りであった。移植ペア１（レシピエント３、ドナー２）、ペア２（レシピエント３、ドナー４）、ペア３（レシピエント１、ドナー２）及びペア４（レシピエント５、ドナー２）。ＣＮＶ方法論を用いて測定されたキメリズム画分は、ＳＮＰアッセイ結果と直線的に相関していた（ｒ＝０．９９７、９５％信頼区間０．９９２～０．９９９、ｐ＜０．００１）（図１２、右側パネル）。
【０１７０】
情報提供性の分析
我々の施設での臨床指標のためにＣＮＶキメリズム分析を行った３２名のレシピエント（及び３５名のドナーのゲノム）のシリーズからの遺伝子型決定の結果を、精査した。試験されたマーカーの数、及び移植アレンジにおける各々の個体について情報提供型であったマーカーの数が決定された。３つの情報提供型マーカーの目標を満たす個体の数が計算された。多重ドナー移植アレンジ及び移植ペアの間の血縁度が、マーカー情報提供性の低減へ寄与することについて、試験された。
【０１７１】
少なくとも１つの情報提供型マーカーは、審査された６７のドナー及びレシピエントの遺伝子型決定データのすべてにおいて同定された（図１３）。５２／６７（７８％）は３つ以上の情報提供型マーカーを有していた。６３／６７（９４％）は２つ以上の情報提供型マーカーを有していた。３未満の情報提供型マーカーを備えた事例のうちの４／１５（２６％）において、１５～１６のマーカーパネルのみを使用する不完全な遺伝子型決定は、結果を促進する必要性に起因して遂行された。３未満の情報提供型マーカーを得る可能性は、ドナーとレシピエントとの間で差異はなかった（オッズ比１．３、９５％信頼区間０．３６～５、ｐ＝０．８４）。１１／６７（１６％）は多重のドナーの移植アレンジの一部であった（すなわち、キメリズム研究は、同時または以前の移植に起因して、レシピエントのゲノム及び２名以上の可能性のあるドナーのゲノムのいずれかを識別しなくてはならなかった）。血縁度データが利用可能であった５１名の個体において、１８／５１（３５％）が血縁であった。情報提供型であった試験されたＣＮＶ標的の比率は、多重ドナーの移植アレンジ（０．０９（０．０５～０．１３）対０．１８（０．１３～０．２３）、ｐ＝０．００３）及び血縁関係のペア（０．１０（０．０６～０．１６）対０．２（０．１３～０．２８、ｐ＜０．００１）においてより低かった。これにもかかわらず、多重ドナーの移植アレンジ（オッズ比３．７、９５％信頼区間０．７５～１８．３、ｐ＝０．１０）または血縁関係（オッズ比３．５、９５％信頼区間０．７６～１７．２、ｐ＝０．０８）の一部分では、３未満の情報提供型マーカーを備えた個体の数の有意な増加はなかった。
【０１７２】
実施例８　－　複雑な骨髄移植における生着及び微小残存病変のモニタリングのための、多型の「ホモ接合で欠失する」コピー数バリアントの使用は、ルーチンのモニタリングのための現在の方法を超える利点を例示する。
多型の「ホモ接合で欠失する」（０コピーのＰＣＲ産物）コピー数バリアントを使用して、ＨＳＣＴ後の患者における４つの異なるゲノムを識別した。患者は、Ｘ連鎖免疫不全症（ウィスコットーアルドリッチ症候群）に罹患する男性の１８歳であった。この患者は血縁関係のない男性ドナーからの第２の骨髄移植を最近受け、１５年前に同様に発症した彼の兄弟（彼自身おばから移植を受けていた（すなわちピギーバック方式の移植））からの移植（失敗）を受けていた。
【０１７３】
生着のモニタリングは、遍在的な高ヘテロ接合性のコピー数欠失に基づいた研究的なキメリズムアッセイの使用によって、この事例において調査された。液滴デジタルＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）を使用して、ＤＮＡサンプルにおける共通の大きなコピー数欠失のパネル（

表１）を査定した。

【０１７４】

血液サンプルは、兄弟、おば、及び１８歳の男性のレシピエント（移植前に得た）を入手可能であった。血液サンプルは、血縁関係のない男性ドナー及び１８歳齢の男性のレシピエント２回目の移植前（それはおば、兄弟、及び彼自身からのＤＮＡからなる可能性がある）からも収集した。

【０１７５】

ゲノムＤＮＡを、すべての血液サンプルからの細胞から単離した。「ホモ接合で欠失する」（０コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ、「ヘテロ接合で欠失する」（１コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ及び「ホモ接合で欠失していない」（２コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤを同定するために、表１中で示されるような３８のＣＮＤのパネルを使用し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＱＸ２００　Ｄｒｏｐｌｅｔ　Ｄｉｇｉｔａｌ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－ｒｅｄ、Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ、ＣＡ）を使用して、すべてのサンプルの遺伝子型を決定した。ＣＮＤプライマー配列を表７中で示す。アンジオテンシンＩ変換酵素（ＡＣＥ；＃ＮＭ＿０００７８９）内の非多型標的配列を、ホモ接合（２コピーのＰＣＲ産物）対照として使用した。

【０１７６】

オンラインのプライマーデザインツールのＰｒｉｍｅｒＱｕｅｓｔ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、すべてのｄｄＰＣＲアッセイのために、ＰＣＲプライマー及びＺｅｎダブルクエンチプローブ（ＤＱＰ－ＺＥＮ及びＩｏｗａ　Ｂｌａｃｋ　ＦＱクエンチャー）を生成した。各々のプライマーペアの特異性を、ｄｄＰＣＲ、またはＶｉｉＡ　７　Ｒｅａｌ　ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）上の高解像度融解曲線分析とゲル電気泳動のいずれかによって試験した。二重アッセイを遂行できるようにするために、ＣＮＤ及びＡＣＥのプローブを、蛍光レポート色素のＦＡＭまたはＨＥＸまたはＶＩＣのいずれかにより生成した。一意的なＣＮＤが、おば（３つのヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ）、兄弟（２つのヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ）及びレシピエント（１つのヘテロで接合欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ）について同定された。これらを使用して、２回目の移植前のサンプルにおける各々の割合の寄与率を決定した。ほとんどすべてのＤＮＡはレシピエント（９８．５％）を起源とすることが示され；残りの１．５％はおばを起源とし、兄弟の寄与は全くなかった。移植後サンプルにおける生着を測定するために、ヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）２つのＣＮＤ（図１４Ｂ）をドナーＤＮＡにおいて同定し、これらは２回目の移植前のＤＮＡサンプル中でホモ接合で欠失していた（０コピーのＰＣＲ産物）。移植後１８０日の期間にわたる５回の機会に際して、これらのマーカーの定量は、１００％の生着を示した（図１５）。図２は、このアプローチが、ＨＳＣＴ後の患者自身の骨髄の再建を経時的にモニタリングする能力を強調する。微小残存病変を測定するために、１つのホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ（ＣＮＤ１）及び５つのヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ（ＣＮＤ３、５、６、９及び１０；図１４Ａ）を、２回目の移植前のＤＮＡサンプル中で同定し、それらはドナー中でホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）。これらのマーカーのどれも移植後サンプルにおいて検出可能ではなかった（図１４）。

【０１７７】

この事例は、任意の同種異系骨髄移植における、生着及び残存病変のモニタリングのために多型ＣＮＤを使用する可能性を例示する。最初の「ピギーバック」のドナー及びレシピエントの近い遺伝的血縁関係にもかかわらず、一意的なＣＮＤマーカーは、第２の移植の作業及びモニタリングに関与する４名の個体すべてについて同定された。このことは、最近及び以前の移植に関与する４名の個体の各々についての一意的なマーカーを同定するために、３８のＣＮＤの拡張されたパネルのスクリーニングを要求した。典型的な単一ドナー状況において、１０の共通の高ヘテロ接合性のＣＮＤのみのパネルから、少なくとも５つのホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤが、おそらく同定されるだろ

う。これらのＣＮＤの半分が情報提供型である（つまり、ドナーにおいてヘテロ接合体で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）、ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物））と予想されるだろう（表１）。

【０１７８】

液滴デジタルＰＣＲとＣＮＤアプローチを組み合わせることは、低レベルのキメリズムの高感度の検出を提供する。配列多型（ＳＮＰ、インデルまたはマイクロサテライト等）を上回る多型ＣＮＤの使用の１つのユニークな利点は、ドナーＤＮＡが確実且つ高感度で定量化することができるゼロレシピエントバックグランドを理論及び実践の両方において提供する、ホモ接合で欠失する対立遺伝子（０コピーのＰＣＲ産物）の使用である。更に、複数のＣＮＤの使用は、ドナー、レシピエント及び全ＤＮＡのレベルの独立した測定を与える。したがって、上記の方法は、サンプルにおける全ＤＮＡレベルに対するクロスチェックによって、ドナー及びレシピエントのＤＮＡレベルの内部検証を可能にする。

【０１７９】

実施例９　－　臍帯血の混入

多型の「ホモ接合で欠失する」（０コピーのＰＣＲ産物）コピー数バリアントを使用して、遺伝的に別個の細胞集団（母親及び胎児）が臍帯血サンプル中に存在したかどうかを評価する。一意的なＣＮＤ多型を、母親から得られた血液サンプルから単離されたゲノムＤＮＡを査定することによって、母親について同定した（２つの、ヘテロ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ多型；ＣＮＤ１Ｂ、ＣＮＤ３Ｂ；図１６で＊でマークした）。これらの一意的なＣＮＤ多型を使用して、臍帯血サンプルへの母親（もしあれば）の割合の寄与率を査定した。アンジオテンシンＩ変換酵素内の非多型標的配列を、ホモ接合の対照（２コピーのＰＣＲ産物）として使用した。一意的な母親のＣＮＤ多型ＣＮＤ１Ｂ及びＣＮＤ３Ｂは、臍帯血サンプルから単離されたゲノムＤＮＡ中で検出されなかった。この結果は、臍帯血サンプルから単離されたすべてのＤＮＡが胎児を起源とすることを指摘する。一意的なＣＮＤ多型を胎児について同定した（ヘテロ接合で欠失する；ＣＮＤ１２）。母親及び胎児の両方において、ＣＮＤ７Ｂはホモ接合で欠失し（２コピーのＰＣＲ産物）、ＣＮＤ９Ｂはヘテロ接合で欠失していた（１コピーのＰＣＲ産物）。ＣＮＤ１５は、母親においてホモ接合で欠失し（０コピーのＰＣＲ産物）、胎児においてヘテロ接合で欠失していた（１コピーのＰＣＲ産物）（図１６）。

【０１８０】

この事例は、臍帯血サンプルの混入の同定のために多型ＣＮＤを使用する可能性を例示する。母親及び胎児の近い遺伝的血縁関係にもかかわらず、一意的なＣＮＤマーカーは両方の個体について同定された。

【０１８１】

実施例１０　－　材料及び方法

サンプル加工及びＤＮＡ抽出

血液サンプルは、一般的にはＥＤＴＡの存在下において静脈穿刺によって収集し、血液採取後４～６時間以内に加工する。血液サンプルを１５ｍＬのファルコンチューブ中で４℃で１０分間１６００ｇで遠心分離して、血漿から血球を分離する。Ｃｈｅｍａｇｉｃ　ＤＮＡ　Ｂｌｏｏｄ　Ｋｉｔ（ＣＭＧ－１０７４；Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）を使用して、製造者の指示に従って、ＤＮＡを抽出する。

【０１８２】

サンプルの遺伝子型決定

ホモ接合で欠失する（０コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤ、ヘテロ接合で欠失する（１コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤまたはホモ接合で欠失していない（２コピーのＰＣＲ産物）ＣＮＤを同定するために、表７中で示されるプライマーを使用して表１中で示される３８のパネルを査定することによって、サンプルの遺伝子型を決定することができる。遺伝子型決定アッセイは、デジタルＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）システム（例えばＢｉｏ－Ｒａｄ　ＱＸ２００　Ｄｒｏｐｌｅｔ　Ｄｉｇｉｔａｌ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－ｒｅｄ、Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ、ＣＡ））またはリアルタイムＰＣＲを使用して遂行することができる。アンジ

オテンシンＩ変換酵素（ＡＣＥ）内の非多型標的配列を、ホモ接合の対照（２コピーのＰＣＲ産物）として使用することができる。ＡＣＥプライマー配列を表７中でも示す。

【０１８３】

あるいは、オンラインのプライマーデザインツールのＰｒｉｍｅｒＱｕｅｓｔ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、すべてのｄｄＰＣＲアッセイのために、ＰＣＲプライマー及びＺｅｎダブルクエンチプローブ（ＤＱＰ－ＺＥＮ及びＩｏｗａ Ｂｌａｃｋ ＦＱクエンチャー）を生成することができる。表１中で示される連関するコピー数変動についての、表７中で示される各々のプライマーペアの特異性を、ＶｉｉＡ ７ Ｒｅａｌ ｔｉｍｅ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）上の高解像度融解曲線分析及びゲル電気泳動の両方によって試験した。二重アッセイを遂行できるようにするために、ＣＮＤ及びＡＣＥのプローブを、蛍光レポート色素のＦＡＭまたはＨＥＸのいずれかにより生成することができる。

【０１８４】

ｄｄＰＣＲ

ｄｄＰＣＲアッセイは製造者の指示に従って遂行することができる。簡潔には、２５ｕｌのｄｄＰＣＲ反応混合物を、２×Ｄｒｏｐｌｅｔ ＰＣＲ Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（Ｃａｔ＃１８６３０２４）、プライマー（９００ｎＭ）、プローブ（２５０ｎＭ）及び２．５ｕｌのＤＮＡ鋳型を含んでアセンブルする。次いで２０ｕｌのｄｄＰＣＲ混合物及び７０ｕｌの液滴ジェネレーターオイル（ｃａｔ＃１８６３００４）をＢｉｏ－Ｒａｄ ＤＧ８ Ｃａｒｔｒｉｄｇｅ（ｃａｔ＃１８６４００８）の中へロードし、設置されたカートリッジを、Ｂｉｏ－Ｒａｄ ＱＸ２００ Ｄｒｏｐｌｅｔ Ｇｅｎｅｒａｔｏｒの中へ設置する。液滴調製物を、Ｅｐｐｅｎｄｒｏｆ Ｔｗｉｎ Ｔｅｃ ＰＣＲ Ｓｅｍｉ－ｓｋｉｒｔｅｄ ９６ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（ｃａｔ＃Ｅｐｐ００３０１２８．６０５）へ転送し、それをＢｉｏ－Ｒａｄ ＰＸ１ ＰＣＲ Ｐｌａｔｅ Ｓｅａｌｅｒを使用して加熱シールし、次いでＰＣＲのためにＢｉｏ－Ｒａｄ Ｃ１０００ＴＭ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒの中へ設置する。「鋳型なしの対照」は各々のｄｄＰＣＲ実行において含まれていた。ＰＣＲ後に、プレートをＢｉｏ－Ｒａｄ ＱＸ２００ Ｄｒｏｐｌｅｔ Ｒｅａｄｅｒによって読み取る。

【０１８５】

ｄｄＰＣＲデータをＢｉｏ－Ｒａｄ ＱｕａｎｔａＳｏｆｔソフトウェアを使用して分析する。「鋳型のない対照」の液滴の振幅レベルを使用して振幅閾値を適用して、陽性の液滴と陰性の液滴を識別することができる。絶対濃度データ（コピー／μｌ）は、Ｌｏｅｔ ａｌ．Ａｍ Ｊ ＨｕｍＧｅｎｅｔ．６２：７６８ １９９８によって記載される式を使用して、ＧＥ／ｍＬに変換することができる。

【０１８６】

ＣＮＤのｄｄＰＣＲアッセイの開発

ＨＳＣＴ移植レシピエントサンプルのためのｄｄＰＣＲアッセイは、表１中で示される３８のコピー数欠失マーカーのパネルに基づいて、Ｚｅｎｐｒｏｂｅｓ（ＩＤＴ）により開発されている。プライマー配列を表７中で示す。各々のｄｄＰＣＲアッセイは、コピー数欠失特異的内部ＰＣＲプライマー及び標的特異的なＺｅｎプローブを使用する（表７）。ＣＮＤアッセイはＦＡＭまたはＨＥＸの蛍光レポーターにより標識される。定量的ＰＣＲを１０μＬの反応体積中で二重で遂行し、反応をＶｉｉＡ ７ Ｒｅａｌ Ｔｉｍｅ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ、オーストラリア）上で遂行する。ＶｉｉＡ ７ソフトウェアバージョン１．２（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）をデータ分析のために使用する。定量化サイクル（Ｃｑ）は、増幅曲線と経験的に補正した閾値との間の交差に基づいた。ＰＣＲ効率をすべての３８のＣＮＤのｑＰＣＲアッセイにわたって標準化し；すべてのアッセイは－３．３～－３．６の間（－３．４の平均）の勾配を有していた。

【０１８７】

一例として、１０００ＧＥ標準曲線点について、ＤＮＡのインプット体積は２．５μｌであり、したがってインプットＤＮＡの濃度は４００üＥ／μｌであった。反応体積におけるＤＮＡの最終濃度は１００ＧＥ／μｌ（全体で１０００ＧＥ）であった。Ｃｑは、増幅曲線と経験的に補正した閾値との間の交差に基づいた。

【０１８８】

プライマー及びプローブのデザイン

３８のＣＮＶ欠失（ＣＮＤ）マーカー及びアンジオテンシンＩ変換酵素（ＡＣＥ）対照のパネルは、ＤＤＰＣＲアッセイのために開発された。アンジオテンシンＩ変換酵素（ＡＣＥ）は２倍体ヒトゲノムＤＮＡあたりの２コピーで存在し、したがって単離される全ゲノムＤＮＡレベルを測定するために対照として使用することができる。Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからのオンラインのプライマーデザインツールのＰｒｉｍｅｒＱｕｅｓｔを使用して、すべてのｄｄＰＣＲアッセイのために、ＰＣＲプライマー及びＺｅｎダブルクエンチプローブ（ＤＱＰ－ＺＥＮ及びＩｏｗａ　Ｂｌａｃｋ　ＦＱクエンチャー）を生成した（ＩＤＴ　Ｚｅｎプローブは、５’ヌクレアーゼｑＰＣＲ実験の正確性及び信頼性を増加できることを示している）。各々のプライマーペアの特異性を、ＶｉｉＡ　７　Ｒｅａｌ　ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）上の高解像度融解曲線分析及びゲル電気泳動の両方によって試験した。１つのｄｄＰＣＲ反応中でｄｄＰＣＲアッセイを二重でできるようにするために、ＣＮＤマーカー及びＡＣＥを、蛍光レポート色素のＦＡＭまたはＨＥＸのいずれかにより無作為に生成した。３８のＣＮＤパネル及びＡＣＥ対照の配列の詳細を、表７中で以下に示す。

表７：

CND ID	染色体番号	内部 PCR				増幅サイズ (bp)	プローブ
		フォワードプライマー		リバースプライマー			
		配列		配列 (AS)			配列 (S)
12	7	AGCCTCAATTCAGGACCTA		CTCCTTGGAGAGCTTGTTATC		72	AATCTTAGGCACCCATCCACTGCC
13	10	TGTCATGTGCAATAGAGACTGTT		TTCTGGCCAGGGCAATTC		72	TCAAGGAAAGTATATGGACCACATCCAGAC
14	2	ACTGGCTTCCAAATGTGACTAA		TAACCTGCAGCTCTGGGA		69	ACAGTGCAACAGCCCTTGGC
15	13	ACTGACACACTCAAGCTATGG		AGCATAAATCTCTGCTCCCTTT		73	TTAAGCGCTCTCCATAACCACGCA
16	2	AGCAAATGATGATGTTGTATGAGC		TAAATGCCAGCACCCTGCTA		68	CACAGGCAGCTATTTCCATGCGTG
17	1	GCCATGCCTCCCACATT		TGGCCCTAACAGTTTGGATATG		76	TCAACATGAGATTTGAGCAGGGACA
18	9	TCACAGGTCCTACCAGCTTTA		GACGAAAGATGTCTTAATTTGGTTCAG		70	ACAACACCAGGCAGGTTGACAT
20	2	CCAGCGTCTTCTCTTATGTCAG		ACAAGCCAACAACGTACAGG		63	CCAGCCTGTGCCGATGTTCT
21	2	TTTGGTGACTGATACATGGCT		CCTAGCTACTATTCCCTCTAGAACA		80	TTGATGCATGCCTTTGCTTGTCCA
22	13	ATATCCTCTGGATTTGACAGTG		ATGTTGAGAGCATTGGACTT		66	TCCTTGTCTTCCTGGCATGACAGG
23	22	TTCCAAAGACACAAGGCAGTA		GGACATTCCTGATGGGAGAAA		70	ACCCTCCTTACCTCCTTTCACCCA
24	6	CCAAGTATGATGTTATTTGTGGGA		CACAAGTAGATTCAGATTAGAAGGG		83	TCATAGATGCTCTTTATCCAGTGCAGT
25	8	CATATTGAGATCCAGAAACAACCTT		AGAAATAAACTGAGGCCTGGATA		80	TCTAGGTAGGATCGTTGTACTCTAACA
26	1	CCTTACTGACACTCTCTGTTTCTT		GAGCACCCAGTAGGAATAGAATTAG		83	TCTGTTGCTTCCTGCAACTTGAGC
27	9	CAGGGAGAGAGTGTAGAAAGAATAG		GCCTGATCTCTAAACACTGGAG		83	AAGAACCAGGGTCTGGGAGTGAG
28	6	ACACTCCAATTCCAACTCTACC		GAGAAATCAGAGGCCCAAAGA		78	ACTCAGCTGTGTAATTGGGCACATGA
29	15	GCCTGTGCCTACCTGTTTAATA		AAATCCACAGCCAGTACCTTC		81	TCTGAGTCTGGGTTCAGTAGCCCA
30	15	GAGAAATCCATCTTCAGGTCAG		AAAGACCCTTCACACTTTGTT		72	TGTCCATCATCCAATGTTGATTGAGC
31	1	TACACCAGTGGAAGGACTAT		CCCTACTAATGACATCCAGAATAA		69	TGTAGGCCATTATCCCTGTTGGCC

		内部PCR			
32	1	GAGGAATGAGAGACAACACTTC	CCTTCTGTAGCCTCTTCCTA	74	TCATAGGGAGACCATGAGTTGCTGC
33	1	GGCAGCAATAATCACCTCTGA	CAATCTGATAAGCTTTCTAGGGTAGT	76	CCCAAAGGACCCATTTGGCTGAAT
34	20	TTCTTCCCTTTCCAGACTCA	GAAAGCCAGAGAATGAGAGAG	84	AAATACATGAGTCTAAGAGGACCAGTATCC
36	4	CTAGAACCTTCCATCCTTAATGT	GCTCCTACATGGCTACAAAG	83	TGATGACGCTGTTGGTGAAGGAGA
37	5	GCTTTGTTGGGAGAGTTAGA	CAATTCATTGAGAAGTGCCAA	71	TAGCAGCCCATGTCTCCAAACCAA
38	6	AAAGCAGCTCAACCTCTTAAT	TGAAAGATTCCTGAGTTATTAGCC	85	AGACAGTAAACCAAATTCCACATCCCAGT
39	7	CCGACTTTCTACTTATTCCACA	GCTGTATAAACCCTCCACAG	76	CGAACCACTGTTCTACGTGTGAGGC
41	5	CCCAAACTCCTCTCATCTTTC	AAGGCTGATTAGCCGTAATG	70	AAACCATGCCACATCCTGACGTTT
01B	1	AAAGTCAACTTCTCTGTGCGA	TTATTCTTCCACCATTATCCCTCAT	67	AATACACCAGCACCAGGGCT
02B	18	TGTCGTTTCTAAGGATGGGAAAG	GTTTCATGAAGCTGCCTCTCT	74	TGAAGTGCTTCTCCTCCCTGATCCA
03B	8	ATGCCTGGCTTCATGTTACT	AATTACTGACCTAGACCTTTCAAGA	75	TCTCCCTCTGCCCATAATATAGAGCA
04B	14	GTGTGGACATTGGTTCCTTT	TTAGGGCAAACAAGATGAGAAA	78	TCTGTGTATACACAAGAGGGAGCTATGC
05B	16	TTTCTTCCAGCAGAGCTCAC	GCCAGCCCTGGATGAAT	70	TTGCCTCCCACACATCTTCACTAGC
06B	7	TCACTCTTCCCACCCTCTTAT	CATCTCAAGAAAGAGGGCTCAA	72	TGTACAATGACTCAGTGGCTCATCAAC
07B	13	CCCAACTCAATTTCAAGCTG	CCAAAGATCCAATTAGCACATC	73	CCAATGTGACATCACTGAATTCAGAGGT
08B	8	ACCTATCAACTTGGTTACCCTAAA	TTTGTGTGGGAATCTTTATCTGTG	80	ACACCATGGACCTATAGAAATAGCTGGC
09B	18	TGTCCCAATGCACAGACTT	AAACAGGGTGGGCCTAAA	67	TGCATTCACCGTAAGGGAACAGAGC
10C	10	CTTTCGGTTCTCTCCAACCA	AACAACTTCCCTGAGACGTG	74	CCCATCCTCTCTTAGCACAACCATGA
19	2	CACACCAAATTGTTAAGAGTTACC	GTCCTGGTAACAAATCCAGTTAATA	80	AGACACAGGATTAGAGAAGATGCCT
ACE	ACE	GGTCTTTAGTGGGCGTACC	TCCTCTCACCGAAGATACCA		

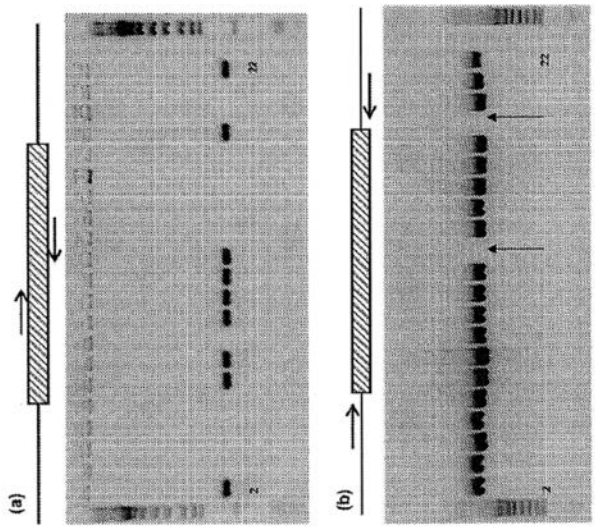
【０１８９】

統計解析

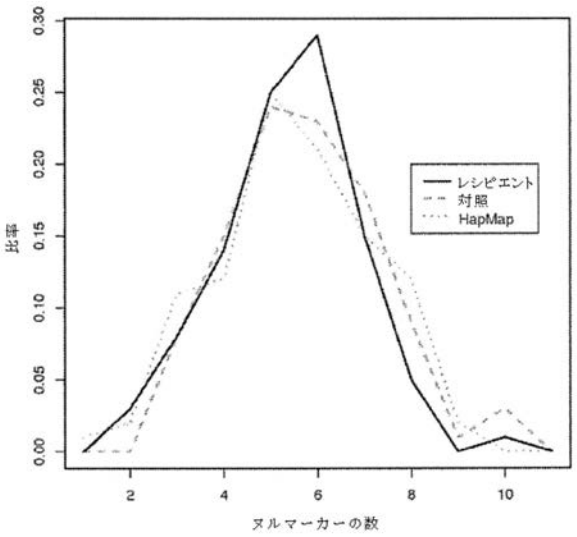
すべての統計解析は、Ｒ統計プログラミング言語（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｒ－－ｐｒ

ｏｊｅｃｔ．ｏｒｇ／）を使用して遂行する。

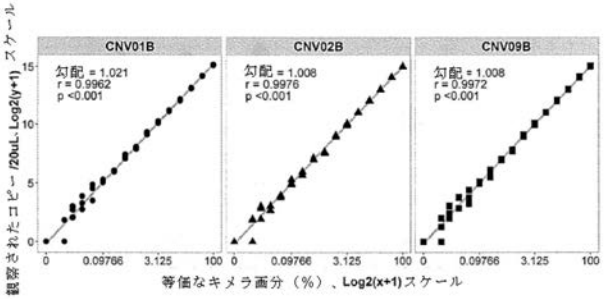
【図１】



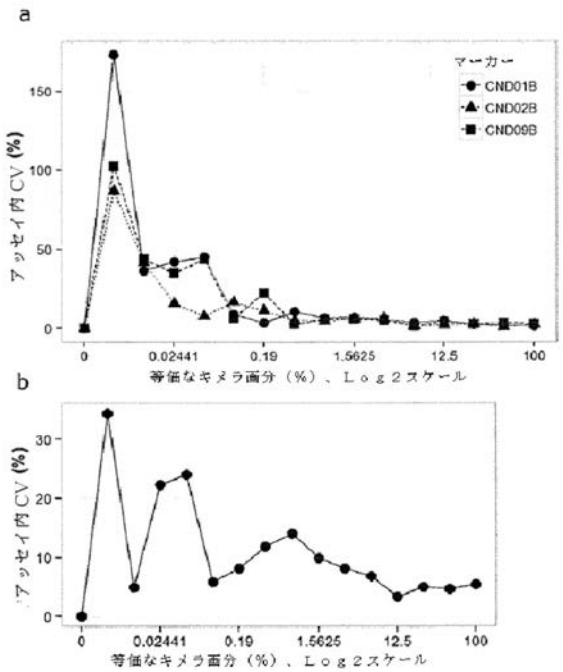
【図２】



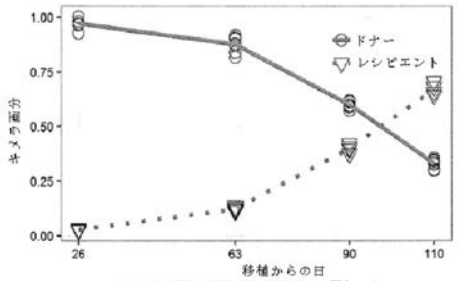
【図３】



【図４】



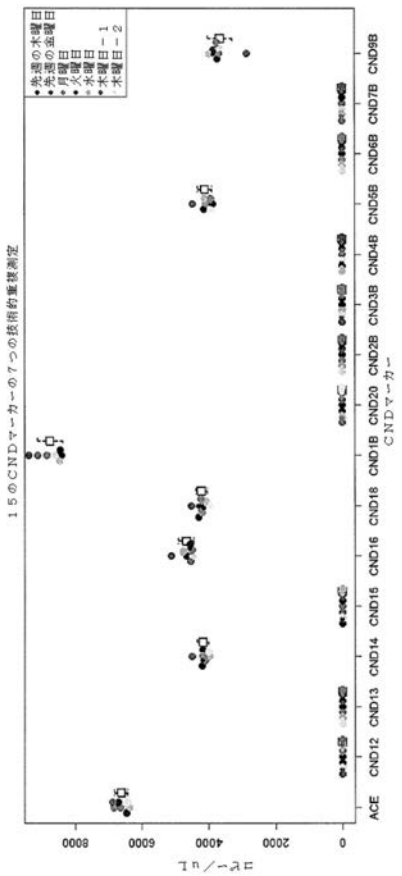
【図５】



アッセイ間の変動（標準偏差、　CV　）

ドナー	0.02, 6%	0.03, 2%	0.02, 4%	0.02, 3%
レシピエント	0.003, 4%	0.01, 11%	0.02, 8%	0.03, 4%

【図６】



【図７】

患者１の結果

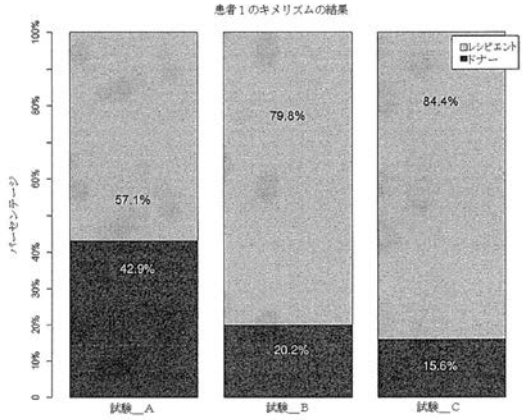
	情報提供型マーカー						
	レシピエント情報提供型					ドナー情報提供型	
	ACE	CND12	CND1B	CND20	CND4B*	CND2B	CND5B
P1_ドナー	4250	0	0	0	0	2090	2200
P1_レシピエント	3850	1910	1800	2000	1180	0	0
P1_試験_A	4420	1230	1270	1250	770	930	950
P1_試験_B	4230	1770	1660	1690	890	406	457
P1_試験_C	4430	1900	1930	1730	1080	328	359

* 性能の悪いマーカー

	レシピエント平均	相対標準偏差	ドナー平均	相対標準偏差	合計
P1_試験_A	1250	20	940	14	2190
P1_試験_B	1707	57	432	36	2138
P1_試験_C	1853	108	344	22	2197

	キメリズムの結果			
	レシピエント%	%標準偏差	ドナー%	%標準偏差
P1_試験_A	57.1%	0.9%	42.9%	0.6%
P1_試験_B	79.8%	2.7%	20.2%	1.7%
P1_試験_C	84.4%	4.9%	15.6%	1.0%

患者１のキメリズムの結果



【図８】

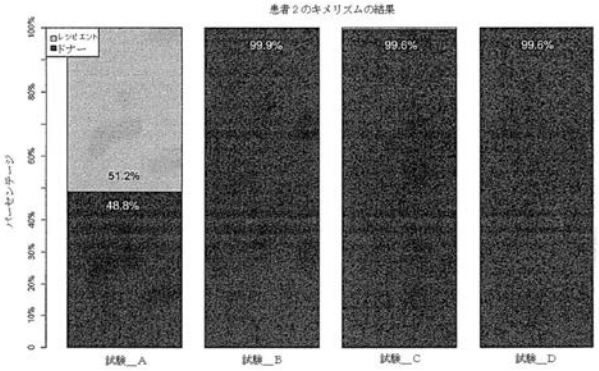
患者２の結果

		情報提供型マーカー						
		レシピエント情報提供型			ドナー情報提供型			
	ACE	CND20	CND78	CND98	CND12	CND13	CND38	CND68
P2_ドナー	4270	0	0	0	2090	2170	1990	1940
P2_レシピエント	4620	2390	2670	2060	0	0	0	0
P2_試験A	4690	1230	1050	1120	1080	1070	749	1090
P2_試験B	4440	3	3	3	2280	2220	2220	2170
P2_試験C	4360	11	10	5	2090	2000	1960	2060
P2_試験D	4460	9	6	10	2300	2360	2220	2220

	レシピエント平均	相対標準偏差	ドナー平均	相対標準偏差	合計
P2_試験A	1133	91	1080	14	2213
P2_試験B	3	0	2195	45	2198
P2_試験C	9	3	2030	59	2039
P2_試験D	8	2	2290	68	2298

	キメリズムの結果			
	レシピエント%	%標準偏差	ドナー%	%標準偏差
P2_試験A	51.20%	4.10%	48.80%	0.45%
P2_試験B	0.13%	0.01%	99.87%	2.05%
P2_試験C	0.42%	0.17%	99.58%	2.87%
P2_試験D	0.36%	0.09%	99.64%	2.96%

患者２のキメリズムの結果



【図９】

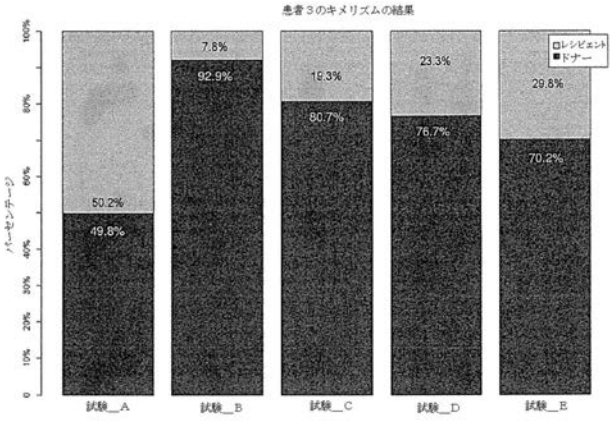
患者３の結果

		情報提供型マーカー		
		レシピエント情報提供型	ドナーマーカー	
	ACE	CND12	CND2B	CND3B
P3_ドナー	4400	0	1640	2190
P3レシピエント	3170	1570	0	0
P3_試験A	4420	1030	990	1050
P3_試験B	4660	180	2180	2050
P3_試験C	4030	395	1590	1710
P3_試験D	4050	466	1530	1540
P3_試験E	3950	596	1390	1420

	レシピエント平均	ドナー平均	相対標準偏差	合計
P3_試験B	180	2115	91.92388	2295
P3_試験C	395	1650	84.85281	2045
P3_試験D	466	1535	7.071068	2001
P3_試験E	596	1405	21.2132	2001

	キメリズムの結果		
	レシピエント%	ドナー%	% 標準偏差
P3_試験A	50.2%	49.8%	2.1%
P3_試験B	7.8%	92.2%	4.0%
P3_試験C	19.3%	80.7%	4.1%
P3_試験D	23.3%	76.7%	0.4%
P3_試験E	29.8%	70.2%	1.1%

患者３のキメリズムの結果



【図１０】

患者４の結果

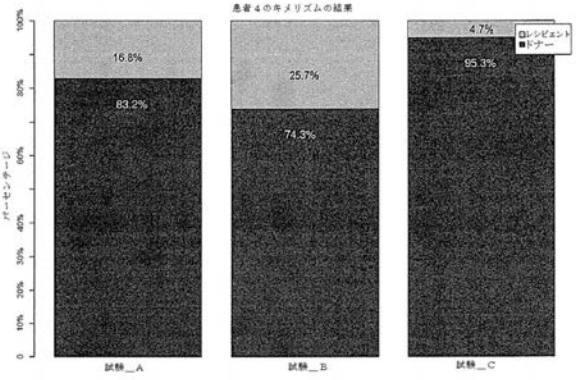
		情報提供型マーカー							
		レシピエント情報提供型マーカー					ドナー情報提供型マーカー		
	ACE	CND5B	CND6B	CND16	CND78	CND14	CND15	CND38	CND48*
P4ドナー	6390	0	0	0	0	0	3080	3140	2400
P4レシピエント	4630	2260	2290	2270	4370	4290	8	13	6
P4レシピエント_2							10	17	11
P4_試験A	3390	254	276	286	520	544	1380	1320	1070
P4_試験B	4160	465	489	518	950	1010	1410	1430	1110
P4_試験C	4520	103	85	114	207	226	2000	2110	1570

*性能の悪いマーカー

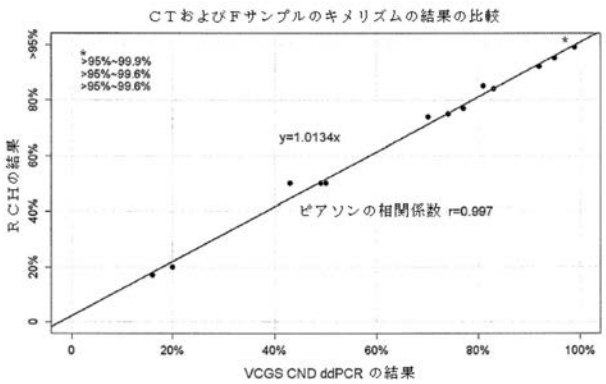
	レシピエント平均	相対標準偏差	ドナー平均	相対標準偏差	合計
P4_試験A	272	16	1350	42	1622
P4_試験B	491	27	1420	14	1911
P4_試験C	101	15	2055	78	2156

	キメリズムの結果			
	レシピエント%	%標準偏差	ドナー%	%標準偏差
P4_試験A	16.8%	1.0%	83.2%	2.6%
P4_試験B	25.7%	1.4%	74.3%	0.7%
P4_試験C	4.7%	0.7%	95.3%	3.6%

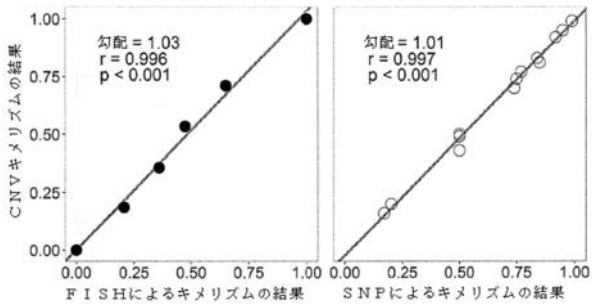
患者４のキメリズムの結果



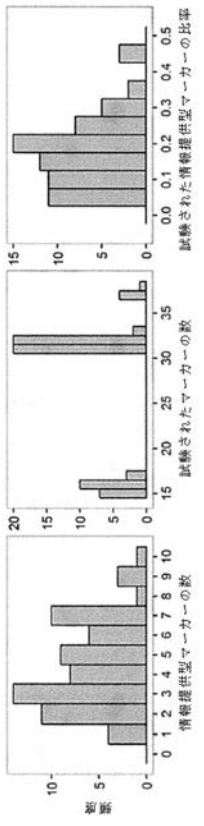
【図１１】



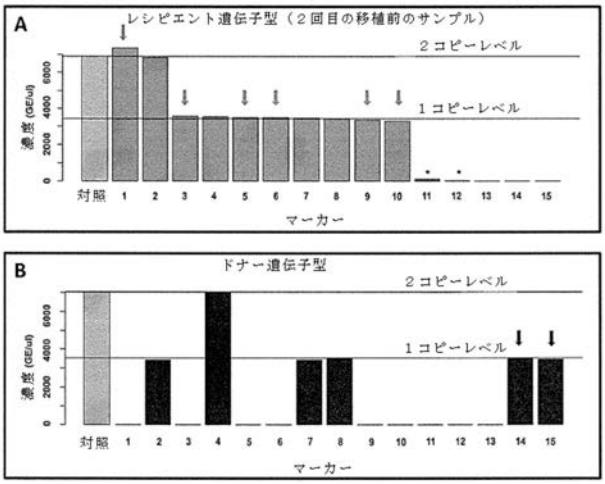
【図１２】



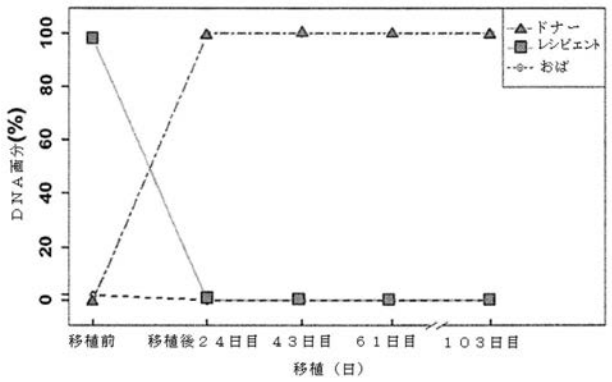
【図１３】



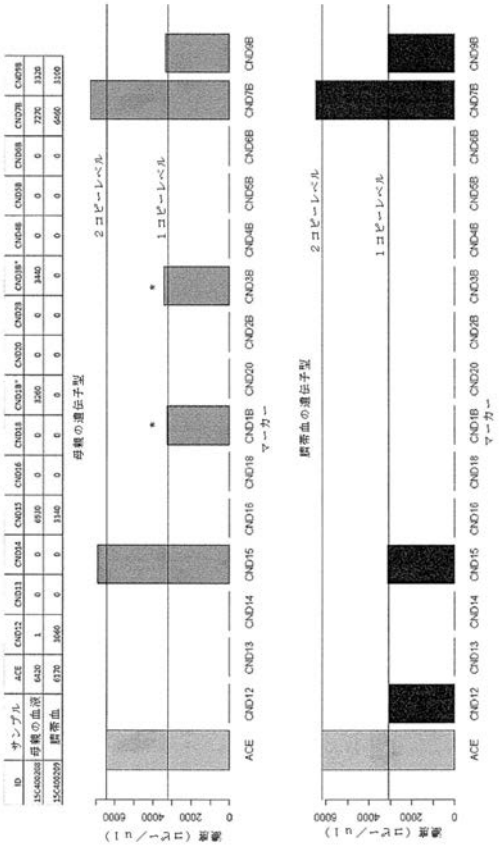
【図１４】



【図１５】



【図１６】



【配列表】
2018517421000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2016/050499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01)

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)

EPODOC, WPIAP, CAplus, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, Espacenet, Google Scholar: copy number, chimerism, transplant, cord blood and the like

Espacenet, PAMS (NOSE), INTESS: inventor/applicant search.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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
23 August 2016	23 August 2016
Name and mailing address of the ISA/AU	**Authorised officer**
AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Lorraine Gunnion AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2575

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/AU2016/050499
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/042649 A1 (MURDOCH CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE) 02 April 2015 Abstract; claims 1, 2, 24, 28; [0001]; [0008]; [0009]; [0014]-[0023]; [0026]; [0054]-[0061]; Table 7; page 72, Table 11	1-52
X	BRUNO, DL. et al., 'Use of Copy Number Deletion Polymorphisms to Assess DNA Chimerism', Clinical Chemistry. 2014, vol.60, no.8, pages 1105-1114 Whole document especially abstract; pages 1111-1112; Table 1; supplementary data, particularly Table 5	1-52
X	WO 2009/039589 A1 (MURDOCH CHILDRENS RESEARCH INSTITUTE) 02 April 2009 Abstract; claims 1, 3, 4, 39, 40; [0002]; [0008]; [0014]-[0015]; [0019]-[0023]; [0025]; [0041]; [0042]; [0045]; [0073]; [0080]; [0084]; [0085]; [0099]; [0110]; [0123]	1-14, 17-48, 50-52
X	WO 2012/012703 A2 (ESOTERIX GENETIC LABORATORIES, LLC) 26 January 2012 Abstract; page 17 line 20-29; page 18 lines 7-9; page 19 lines 9-10; page 21 line 15-20; page 25 lines 11-18; page 34 lines 8-11; claims 1, 8, 16-18, 23, 25, 28, 32, 42	1-14, 17-19, 29 and 45-47
X	WO 2012/142334 A2 (VERINATA HEALTH, INC.) 18 October 2012 Page 7 lines 15 and 16; page 9 lines 18-35; page 13 line 21; page 30 lines 15-23; page 31 lines 19-37; page 33 line 4; page 57 lines 30-37; pages 58 and 59; Figure 2; claim 1	1-14, 17-19, 29 and 45-47
A	BADER, P. et al., 'How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation?', Bone Marrow Transplantation. 2005, vol.35, pages 107-119 Whole document	
A	WU, D. et al., 'In situ genetic analysis of cellular chimerism', Nature Medicine. 2009, vol.15, no.2, pages 215-219 Whole document	
A	CONRAD, D. et al., 'Origins and functional impact of copy number variation in the human genome', Nature. 2010, vol.464, pages 704-712 Whole document	

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2016/050499

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 filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☐ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

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 tbat in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

   The sequence listing provided was not used for search purposes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/AU2016/050499

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
WO 2015/042649 A1	02 April 2015	WO 2015042649 A1	02 Apr 2015
WO 2009/039589 A1	02 April 2009	WO 2009039589 A1	02 Apr 2009
		AU 2008303080 A1	02 Apr 2009
		EP 2195454 A1	16 Jun 2010
		US 2011086347 A1	14 Apr 2011
WO 2012/012703 A2	26 January 2012	WO 2012012703 A2	26 Jan 2012
		CA 2802111 A1	26 Jan 2012
		CN 103069006 A	24 Apr 2013
		EP 2596127 A2	29 May 2013
		JP 2013530727 A	01 Aug 2013
		SG 186787 A1	28 Feb 2013
		US 2012021919 A1	26 Jan 2012
WO 2012/142334 A2	18 October 2012	WO 2012142334 A2	18 Oct 2012
		AU 2010343276 A1	06 Sep 2012
		AU 2010343276 B2	28 May 2015
		AU 2010343277 A1	06 Sep 2012
		AU 2010343277 B2	28 May 2015
		AU 2010343278 A1	06 Sep 2012
		AU 2010343278 B2	21 May 2015
		AU 2010343279 A1	06 Sep 2012
		AU 2010343279 B2	23 Apr 2015
		AU 2011207544 A1	06 Sep 2012
		AU 2011207561 A1	19 Jul 2012
		AU 2011207561 B2	20 Feb 2014
		AU 2012236200 A1	02 May 2013
		AU 2012236200 B2	14 May 2015
		AU 2012242698 A1	09 May 2013
		AU 2012242698 B2	04 Sep 2014
		AU 2013204536 A1	06 Feb 2014
		AU 2013204615 A1	06 Feb 2014
		CA 2785718 A1	28 Jul 2011
		CA 2786351 A1	28 Jul 2011

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/AU2016/050499

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		CA 2786357 A1	28 Jul 2011
		CA 2786544 A1	28 Jul 2011
		CA 2786564 A1	28 Jul 2011
		CA 2786565 A1	28 Jul 2011
		CA 2832468 A1	18 Oct 2012
		CA 2878246 A1	23 Jan 2014
		CN 103374518 A	30 Oct 2013
		CN 103797129 A	14 May 2014
		CN 103797129 B	17 Aug 2016
		EP 2366031 A1	21 Sep 2011
		EP 2366031 B1	21 Jan 2015
		EP 2370599 A1	05 Oct 2011
		EP 2370599 B1	21 Jan 2015
		EP 2376661 A1	19 Oct 2011
		EP 2376661 B1	21 Jan 2015
		EP 2513339 A1	24 Oct 2012
		EP 2513339 B1	09 Sep 2015
		EP 2513341 A1	24 Oct 2012
		EP 2526415 A1	28 Nov 2012
		EP 2691544 A2	05 Feb 2014
		EP 2697392 A2	19 Feb 2014
		EP 2697392 B1	02 Mar 2016
		EP 2848703 A1	18 Mar 2015
		EP 2848704 A1	18 Mar 2015
		EP 2875149 A1	27 May 2015
		EP 2877594 A1	03 Jun 2015
		EP 2883965 A1	17 Jun 2015
		EP 3006573 A1	13 Apr 2016
		GB 2479080 A	28 Sep 2011
		GB 2479080 B	18 Jan 2012
		GB 2479471 A	12 Oct 2011
		GB 2479471 B	08 Feb 2012
		GB 2479476 A	12 Oct 2011
		GB 2479476 B	13 Jun 2012
		GB 2484764 A	25 Apr 2012
		GB 2484764 B	05 Sep 2012

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/AU2016/050499

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		GB 2485644 A	23 May 2012
		GB 2485644 B	21 Nov 2012
		GB 2485645 A	23 May 2012
		GB 2485645 B	21 Nov 2012
		HK 1160185 A1	23 Nov 2012
		HK 1160186 A1	30 Nov 2012
		HK 1162197 A1	08 Feb 2013
		HK 1168388 A1	03 May 2013
		HK 1170269 A1	23 Aug 2013
		HK 1170270 A1	02 Aug 2013
		HK 1177232 A1	08 Jul 2016
		JP 2014512817 A	29 May 2014
		JP 5863946 B2	17 Feb 2016
		JP 2016101168 A	02 Jun 2016
		US 2012264115 A1	18 Oct 2012
		US 8532936 B2	10 Sep 2013
		US 2011177517 A1	21 Jul 2011
		US 8700341 B2	15 Apr 2014
		US 2014193818 A1	10 Jul 2014
		US 9115401 B2	25 Aug 2015
		US 2013029852 A1	31 Jan 2013
		US 9260745 B2	16 Feb 2016
		US 2013096011 A1	18 Apr 2013
		US 9323888 B2	26 Apr 2016
		US 2014038830 A1	06 Feb 2014
		US 9411937 B2	09 Aug 2016
		US 2011201507 A1	18 Aug 2011
		US 2011224087 A1	15 Sep 2011
		US 2011230358 A1	22 Sep 2011
		US 2011245085 A1	06 Oct 2011
		US 2012010085 A1	12 Jan 2012
		US 2012094849 A1	19 Apr 2012
		US 2012100548 A1	26 Apr 2012
		US 2012149582 A1	14 Jun 2012
		US 2012149583 A1	14 Jun 2012
		US 2012165203 A1	28 Jun 2012

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/AU2016/050499

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		US 2012214678 A1	23 Aug 2012
		US 2012237928 A1	20 Sep 2012
		US 2012264121 A1	18 Oct 2012
		US 2012270739 A1	25 Oct 2012
		US 2013034546 A1	07 Feb 2013
		US 2013324420 A1	05 Dec 2013
		US 2015065358 A1	05 Mar 2015
		US 2016194703 A1	07 Jul 2016
		US 2016210405 A1	21 Jul 2016
		US 2016232290 A1	11 Aug 2016
		WO 2011090556 A1	28 Jul 2011
		WO 2011090557 A1	28 Jul 2011
		WO 2011090558 A1	28 Jul 2011
		WO 2011090559 A1	28 Jul 2011
		WO 2011091046 A1	28 Jul 2011
		WO 2011091063 A1	28 Jul 2011
		WO 2012135730 A2	04 Oct 2012
		WO 2014014497 A1	23 Jan 2014
		WO 2014014498 A1	23 Jan 2014
		WO 2014015319 A1	23 Jan 2014

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	Ｚ	
		Ｃ１２Ｎ	15/09	ＺＮＡ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,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,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QR08 QR32 QR55
QR62 QS25 QS34 QX02