

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-533509

(P2014-533509A)

(43) 公表日 平成26年12月15日(2014.12.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	2G045
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B029
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34 B	4B063
G01N 33/72 (2006.01)	G01N 33/72 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-542550 (P2014-542550)	(71) 出願人	514123406 セルスケープ・コーポレーション アメリカ合衆国・カリフォルニア・945 60-1156・ニューアーク・ゲートウ エイ・ブルバード・7979・スイート ・240
(86) (22) 出願日	平成24年11月19日(2012.11.19)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月8日(2014.7.8)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/065849	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(87) 国際公開番号	W02013/075100	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87) 国際公開日	平成25年5月23日(2013.5.23)		
(31) 優先権主張番号	61/561, 231		
(32) 優先日	平成23年11月17日(2011.11.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 細胞を取得し、解析するための方法、装置及びキット

(57) 【要約】

母親全血試料中の母親及び胎児有核赤血球(nRBC)などの有核細胞を濃縮し、単離する方法。本発明はまた、出生前遺伝子検査の一部としての胎児の遺伝物質の同定のために試料を解析する準備をし、解析するための方法及び装置を提供する。本発明はまた、妊娠女性から採取した血液試料から得られる胎児有核赤血球と母親有核赤血球とを区別するための方法及び装置に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

胎児の遺伝子状態を判定する方法であって、
母親細胞及び胎児細胞を含む母親血液試料を用意するステップと、
母親血液試料からの細胞の単層を面上に自己集合させるステップと、
単層について第1の解析を実施して、それにより、単層における潜在的な胎児細胞を識別するステップと、
単層から潜在的な胎児細胞を選択的に除去するステップと、
潜在的な胎児細胞からDNAを得るステップと、
DNAの特性を解析して、DNAに基づくシグナルを得るステップと、
シグナルを参照特性と比較して、それにより潜在的な胎児細胞の遺伝子状態を判定するステップと
を含む、方法。

10

【請求項 2】

自己集合ステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、母親白血球及び胎児細胞が濃縮された試料を得るステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

自己集合ステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、赤血球と白血球を5000:1~1:10の比で有し胎児細胞を有する試料を得るステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 4】

母親血液試料が生細胞を含み、細胞の単層を自己集合させるステップが生細胞を含む単層を自己集合させるステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

少なくとも選択的に除去するステップにより細胞の生存能力を維持するステップをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

細胞の単層を自己集合させるステップが細胞の第1の部分が互いに固定化されている細胞の単層を自己集合させるステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

細胞の単層を自己集合させるステップが細胞の第1の部分を面に除去可能に付着させるステップを含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 8】

細胞の単層を自己集合させるステップが細胞の第2の部分を面の近くに定着させるステップを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

細胞をアイデンティファイアー (identifier) で処理するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

第1の解析ステップを実施する前に細胞をSYBR Greenで処理するステップを含み、第1の解析を実施するステップが細胞の単層を解析して、SYBR Greenについて陽性である細胞を検出するステップを含む、請求項9に記載の方法。

40

【請求項 11】

照射するステップが細胞を青色光で照射するステップを含み、検出するステップが緑色光を検出するステップを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

細胞の単層について第1の解析を実施するステップがヘモグロビンを検出するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

ヘモグロビンを検出するステップが細胞の単層をヘモグロビン吸収性光で照射するステ

50

ップ及びヘモグロビンの光吸収に基づいて細胞の単層からの光を検出するステップを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

ヘモグロビンを検出するステップが単層を400nm～600nmの波長を有するヘモグロビン吸収性光で照射するステップを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

ヘモグロビンを検出するステップをさらに含み、SYBR Greenについて陽性でありヘモグロビンについて陽性である細胞が候補胎児細胞を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項16】

面上の細胞を固定するステップ並びに免疫細胞化学及びin situハイブリダイゼーションの少なくとも1つを用いて細胞を解析するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項17】

免疫細胞化学を含み、抗ヘモグロビン抗体を用いて解析して、それにより、ヘモグロビンを含む細胞を検出するステップをさらに含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

選択的に除去するステップの後に潜在的な胎児細胞を基材上に置くステップと、基材上の潜在的な胎児細胞について第2の解析を実施して、胎児細胞の同一性を確認するステップとをさらに含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項19】

第2の解析を実施するステップが免疫細胞化学を実施するステップを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

免疫細胞化学を実施するステップが抗ヘモグロビン抗体を用いて免疫細胞化学を実施するステップ及び免疫細胞化学的シグナルを得て、それにより、候補胎児細胞の同一性を確認するステップを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

免疫細胞化学を実施するステップが抗胎児ヘモグロビン抗体及び抗胚抗体の少なくとも1つを用いるステップ並びに免疫細胞化学的シグナルを得て、それにより、候補胎児細胞の同一性を確認するステップを含む、請求項20に記載の方法。

30

【請求項22】

免疫細胞化学的シグナルの値を閾値化するステップを含み、第1の閾値を上回るシグナル値が候補胎児細胞を同定する、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

免疫細胞化学的シグナルの値を閾値化するステップを含み、第2の閾値を下回るシグナル値が候補胎児細胞を同定する、請求項20に記載の方法。

【請求項24】

免疫細胞化学的シグナルの値を閾値化するステップを含み、第1の閾値を上回り、第2の閾値を下回るシグナル値が候補胎児細胞を同定する、請求項20に記載の方法。

40

【請求項25】

潜在的な胎児細胞からのDNAを増幅して、第1の増幅DNAを得るステップをさらに含み、解析するステップが第1の増幅DNAに基づくシグナルを得るステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

DNAを増幅するステップがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて増幅して、第1の増幅DNAを得るステップを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

定量的PCR(qPCR)及びデジタルPCR(dPCR)の少なくとも1つを用いて解析するステップをさらに含む、請求項25に記載の方法。

50

【請求項 28】

PCRを用いて増幅するステップが6サイクル未満で増幅して、第1の増幅DNAを得るステップを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 29】

DNAを解析するステップが胎児アイデンティファイアーに基づいて解析するステップを含み、第1の増幅DNAに基づく陽性シグナルが胎児細胞を同定する、請求項25に記載の方法。

【請求項 30】

胎児アイデンティファイアーが短鎖縦列反復配列 (STR) を含み、DNAを解析するステップが短鎖縦列反復配列を解析するステップを含む、請求項29に記載の方法。

10

【請求項 31】

複数の面上に母親血液試料からの細胞の単層を作製するステップをさらに含み、実施するステップが複数の潜在的な胎児細胞を識別するステップを含み、第1の潜在的な胎児細胞が第2の潜在的な胎児細胞と異なる面上にあり、増幅するステップが6サイクル未満で複数の潜在的な胎児細胞からのDNAの第1の部分を増幅して、複数のDNA試料を得るステップを含み、解析するステップが胎児アイデンティファイアーに基づいて複数のDNA試料を解析して、複数の胎児細胞を得るステップを含み、複数の胎児細胞からのDNAの第2の部分をプールし、増幅して、プールされた増幅DNAを得るステップをさらに含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 32】

PCRステップを用いる増幅ステップの前に潜在的な胎児細胞からのDNAを第1のアリコートと第2のアリコートに分割するステップと、
ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて第2のアリコートを増幅して、第2の増幅DNAを得るステップと、
第2の増幅DNAの特性を解析して、DNAに基づく第2のシグナルを得るステップと
第2のシグナルを参照特性と比較して、それにより、細胞の第2の特性を判定するステップと
をさらに含む、請求項28に記載の方法。

20

【請求項 33】

第2の増幅DNAの特性を解析するステップがDNA配列決定及びアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH) の1つを実施するステップを含む、請求項32に記載の方法。

30

【請求項 34】

シグナルを参照特性と比較するステップがシグナルを母親の核酸に基づく参照特性と比較するステップを含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

シグナルを参照特性と比較するステップが複数の個人を代表する核酸に基づく参照特性と比較するステップを含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 36】

母親血液試料が複数の胎児細胞を含み、自己集合ステップ、実施するステップ及び選択的に除去するステップを繰り返して、それにより少なくとも2つの異なる細胞単層から複数の潜在的な胎児細胞を得るステップをさらに含み、得るステップが複数の細胞からDNAを得て、プールされたDNAを得るステップを含み、解析するステップがプールされたDNAの特性を解析して、プールされたDNAに基づくシグナルを得るステップを含み、比較するステップが、シグナルを参照特性と比較して、それにより、潜在的な胎児細胞により共有される遺伝子状態を判定するステップを含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 37】

プールされたDNAの特性を解析するステップが36サイクル未満のPCRを用いる場合に少なくとも0.35 μg の細胞当たりの平均増幅DNA収量を得るステップを含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

50

解析するステップがDNAの少なくとも一部の配列を決定して、DNA配列を得るステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項39】

解析及び比較するステップがアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)を実施して、それにより、潜在的な胎児細胞の遺伝子状態を判定するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項40】

解析するステップが染色体数、DNA重複、DNA欠失及びSNPの少なくとも1つを検出するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項41】

解析するステップが13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体の少なくとも1つの染色体数を検出するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項42】

自己集合ステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、母親白血球及び少なくとも1つの胎児細胞が濃縮され、濃縮母親血液試料中赤血球と白血球との少なくとも5000:1~1:10の比を有する試料を得るステップと、

生細胞単層を自己集合させるステップであって、自己集合細胞の第1の部分が、面にゆるく付着したものと及び面に近いものの少なくとも1つであるステップと、

細胞を生細胞核アイデンティファイアーで処理するステップと、

生細胞核アイデンティファイアーに基づいて有核細胞を光学的に検出するステップと、単層を400nm~600nmの光で照射し、ヘモグロビンに基づく光を検出するステップであって、核アイデンティファイアーについて陽性でありヘモグロビンについて陽性である細胞が潜在的な胎児有核細胞を含むステップと、

選択的に除去するステップの後に潜在的な胎児細胞を多孔質基材上に置くステップと、選択的に除去するステップと置くステップを繰り返して、それにより、多孔質基材上の複数の潜在的な胎児細胞を得るステップと、

繰り返すステップの後に各細胞について第2の解析を実施するステップであって、第2の解析が複数の潜在的な胎児細胞について抗胎児ヘモグロビン及び抗胚抗体を用いて免疫細胞化学を実施するステップを含み、閾値を上回るシグナルが胎児細胞の同一性を確認するステップと、

DNAを増幅し、プールされた増幅DNAを得るステップと、

DNA配列決定及びアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションの少なくとも1つによりDNAプールを解析して、胎児DNAプロファイルシグナルを得るステップと、

胎児DNAプロファイルシグナルを参照特性と比較して、それにより、胎児細胞の遺伝子状態を判定するステップであって、遺伝子状態が13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体の異数性の少なくとも1つを含むステップと

をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項43】

胎児細胞の特性を判定する方法であって、

母親細胞及び胎児細胞を含む母親血液試料を用意するステップと、

母親血液試料からの細胞の単層を面上に作製するステップと、

細胞の単層について第1の解析を実施して、それにより、単層における潜在的な胎児細胞を識別するステップと、

単層から潜在的な胎児細胞を選択的に除去するステップと、

選択的に除去するステップの後に潜在的な胎児細胞を基材上に置くステップと、

細胞について第2の解析を実施して、それにより、胎児細胞の特性を判定するステップ

と

を含む、方法。

【請求項44】

作製するステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、有核細胞及び胎児細胞

が濃縮された試料を得るステップをさらに含む、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 5】

母親血液試料が生細胞を含み、細胞の単層を作製するステップが生細胞を含む単層を作製するステップを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 6】

細胞を染色するステップをさらに含む、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 7】

第1の解析ステップを実施する前に細胞を核アイデンティファイアーで処理するステップをさらに含む、第1の解析が細胞の単層を解析して、核アイデンティファイアーについて陽性である細胞を検出するステップを含む、請求項43に記載の方法。

10

【請求項 4 8】

核アイデンティファイアーがSYBR Greenを含み、第1の解析を実施するステップが細胞をSYBR Green励起光で照射し、細胞からのSYBR Green放射光を検出するステップを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項 4 9】

照射するステップが青色光で照射するステップを含み、検出するステップが緑色光を検出するステップを含む、請求項48に記載の方法。

【請求項 5 0】

細胞の単層について第1の解析を実施するステップがヘモグロビンを検出するステップを含む、請求項43に記載の方法。

20

【請求項 5 1】

ヘモグロビンを検出するステップが400nm~600nmの波長を有するヘモグロビン吸収性光で細胞の単層を照射するステップを含む、請求項50に記載の方法。

【請求項 5 2】

細胞を核アイデンティファイアーで処理し、核アイデンティファイアーについて陽性である細胞を検出するステップをさらに含む、核アイデンティファイアーについて陽性でありヘモグロビンについて陽性である細胞が候補胎児細胞を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項 5 3】

細胞について第2の解析を実施するステップが基材上の対照細胞について解析を実施するステップ及び対照細胞の解析の結果を胎児細胞の解析の結果と比較するステップをさらに含む、請求項43に記載の方法。

30

【請求項 5 4】

第2の解析を実施するステップが免疫細胞化学及びin situハイブリダイゼーションの少なくとも1つを実施するステップを含み、方法が第2の解析ステップを実施する前に基材上に細胞を固定するステップをさらに含む、請求項43に記載の方法。

【請求項 5 5】

第2の解析を実施するステップが免疫細胞化学を実施するステップを含み、方法が抗ヘモグロビン抗体を用いるステップ及び免疫細胞化学的シグナルを得て、それにより、候補胎児細胞の同一性を確認するステップをさらに含む、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 6】

第2の解析を実施するステップが免疫細胞化学を実施するステップを含み、方法が抗胎児ヘモグロビン抗体及び抗胚ヘモグロビン抗体の少なくとも1つを用いるステップ及び免疫細胞化学的シグナルを得て、それにより、候補胎児細胞の同一性を確認するステップをさらに含む、請求項54に記載の方法。

40

【請求項 5 7】

免疫細胞化学的シグナルの値を閾値化するステップをさらに含む、第1の閾値を上回るシグナル値が候補胎児細胞の同一性を確認する、請求項55に記載の方法。

【請求項 5 8】

免疫細胞化学的シグナルの値を閾値化するステップをさらに含む、第2の閾値を下回るシグナル値が候補胎児細胞の同一性を確認する、請求項55に記載の方法。

50

【請求項59】

細胞について第2の解析を実施するステップが、in situハイブリダイゼーションにより細胞DNAを解析し、DNAに基づくシグナルを得るステップと、シグナルを参照特性と比較し、それにより、潜在的な胎児細胞の遺伝的特性を判定するステップとを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項60】

シグナルを参照特性と比較するステップがシグナルを母親細胞からのDNAに基づく参照DNA特性と比較するステップを含む、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

シグナルを参照特性と比較するステップがシグナルを複数の個人からのDNAに基づく参照DNA特性と比較するステップを含む、請求項59に記載の方法。

【請求項62】

判定するステップが染色体数、DNA重複、SNP及びDNA欠失の少なくとも1つを判定するステップを含む、請求項59に記載の方法。

【請求項63】

判定するステップが13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体の少なくとも1つの染色体数を判定するステップを含む、請求項59に記載の方法。

【請求項64】

実施するステップの後に基材から第1の潜在的な胎児細胞を除去するステップと、細胞からDNAを得るステップと、細胞DNAを増幅するステップとをさらに含む、請求項43に記載の方法。

【請求項65】

増幅するステップがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて増幅するステップを含む、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

増幅するステップが定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)及びデジタルポリメラーゼ連鎖反応(dPCR)の少なくとも1つを実施するステップを含む、請求項64に記載の方法。

【請求項67】

PCRを用いて増幅するステップが30サイクル未満で増幅するステップを含む、請求項64に記載の方法。

【請求項68】

胎児アイデンティファイアーを用いてDNAを解析するステップをさらに含み、陽性シグナルが胎児細胞を示す、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

複数の面のそれぞれに母親血液試料からの細胞の単層を作製するステップをさらに含み、実施するステップが複数の潜在的な胎児細胞を識別するステップを含み、第1の潜在的な胎児細胞が第2の潜在的な胎児細胞と異なる面上にあり、増幅するステップが30サイクル未満で複数の潜在的な胎児細胞からのDNAを増幅して、複数のDNA試料を得るステップを含み、解析するステップが胎児アイデンティファイアーを用いて複数のDNA試料を解析して、複数の胎児細胞を得るステップを含み、方法が複数の胎児細胞からのDNAをプールするステップを含む、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

解析するステップがアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(アレイCGH)を実施するステップ及びアレイCGHシグナルを参照特性と比較するステップを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項71】

シグナルを参照特性と比較するステップがシグナルを母親DNAと比較するステップを含む、請求項70に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項72】

シグナルを参照特性と比較するステップがシグナルを複数の個人を代表するDNAを含む参照DNAと比較するステップを含む、請求項70に記載の方法。

【請求項73】

解析するステップが染色体数、DNA重複、DNA欠失及び一塩基多型(SNP)の少なくとも1つを検出するステップを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項74】

解析するステップが13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体の少なくとも1つの染色体数を検出するステップを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項75】

母親血液試料を濃縮して、それにより、母親白血球及び少なくとも1つの胎児細胞が濃縮され、濃縮母親血液試料中赤血球と白血球との少なくとも5000:1~1:10の比を有する試料を得るステップと、

生細胞単層を自己集合させるステップであって、集合細胞の少なくとも一部が面に除去可能に付着している又は面に付着していないステップと、

細胞を生細胞核染色で処理するステップと、

染色細胞を光学的に検出するステップと

細胞を400nm~600nmの光で照射し、ヘモグロビンを検出するステップであって、生細胞核染色について陽性でありヘモグロビンについて陽性である細胞が潜在的な胎児有核細胞を含むステップと、

選択的に除去するステップの後に潜在的な胎児細胞を基材上に置き、細胞について第2の解析を実施して、潜在的な胎児細胞を候補胎児細胞と同定するステップと、

選択的に除去するステップ及び置くステップを繰り返して、それにより、複数の候補胎児細胞を得るステップと

をさらに含み、

第2の解析を実施するステップが複数の潜在的な胎児細胞について抗胎児ヘモグロビン及び抗胚抗体を用いて免疫細胞化学を実施するステップを含み、閾値を上回る陽性シグナルが潜在的な胎児細胞が候補胎児細胞であることを示す、請求項43に記載の方法。

【請求項76】

少なくとも2つの候補胎児細胞からDNAを得るステップと、

細胞からのDNAを増幅するステップと、

DNA配列決定及びアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションの少なくとも1つにより増幅DNAを解析して、胎児DNAプロファイルを得るステップと、

胎児DNAプロファイルを参照特性と比較して、それにより、胎児細胞の遺伝的特性を判定するステップであって、遺伝的特性が13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体の異数性の少なくとも1つを含むステップと

をさらに含む、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

母親血液試料から候補胎児細胞を分離する方法であって、

胎児細胞が濃縮された母親血液の試料を面上に置くステップであって、試料が母親有核細胞及び胎児細胞を含むステップと、

試料中の細胞の少なくとも第1の部分に面に除去可能に付着させるステップと、

細胞について解析を実施して、候補胎児有核細胞を同定するステップと、

面から候補胎児有核細胞を除去して、それにより、残りの細胞から細胞を単離するステップと

を含む、方法。

【請求項78】

除去可能に付着させるステップがマイクロピペット及び部分的真空を用いて細胞を面から無傷で除去することができるように、細胞を面にゆるく接着するステップを含む、請求項77に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 79】
面への細胞の接着を低減するように構成されている物質を加えるステップをさらに含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 80】
除去可能に付着させるステップの前にウシ血清アルブミンをプレート及び試料の少なくとも1つに加えるステップをさらに含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 81】
細胞の第2の部分を面の近くに維持するステップをさらに含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 82】 10
母親血液の試料を面上に置くステップが生細胞を面上に置くステップを含み、方法が、細胞の生存能力を少なくとも除去可能に付着させるステップにより維持するステップをさらに含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 83】
候補胎児有核細胞を除去するステップが細胞を部分的真空下において、それにより候補胎児有核細胞を除去するステップを含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 84】
候補胎児有核細胞を除去するステップが30 μm未満の内径を有するマイクロピペットで細胞を集めるステップを含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 85】 20
候補胎児有核細胞を除去するステップがウシ血清アルブミン(BSA)を被覆したマイクロピペットで細胞を集めるステップを含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 86】
用意するステップが透明な硬質面を用意するステップを含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 87】
用意するステップが透明な裏張り上に官能化面を用意するステップを含む、請求項77に記載の方法。
- 【請求項 88】 30
候補細胞を同定する方法であって、
ヘモグロビン含有細胞を含む母親血液試料を用意するステップと、
第1の細胞における第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップと、
最小閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップと、
第1の細胞を、それが最小閾値ヘモグロビンレベルを下回るヘモグロビンレベルを有する場合には候補母親細胞と、それが最小閾ヘモグロビンレベルであるか又はそれを上回るヘモグロビンレベルを有する場合には候補胎児細胞と同定するステップと
を含む、方法。
- 【請求項 89】
用意するステップの後にアルゴリズムを適用するステップを含む、請求項88に記載の方法。
- 【請求項 90】 40
アッセイするステップの前に母親血液試料から単層を形成するステップをさらに含み、第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップが単層における細胞中の第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含む、請求項88に記載の方法。
- 【請求項 91】
アッセイするステップが免疫細胞化学を実施して、それにより、第1の細胞における胎児ヘモグロビンレベルを検出するステップを含む、請求項88に記載の方法。
- 【請求項 92】 50
第2の細胞における第2の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップをさらに含み、第2の細胞が候補胎児細胞を含み、閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップが胎児細胞ヘモグロビンレベルより低い閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップを

含む、請求項88に記載の方法。

【請求項93】

複数の候補胎児細胞のそれぞれにおける胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップをさらに含み、最小閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップが、複数の候補胎児細胞における胎児ヘモグロビンレベルに基づいてレベルを用意するステップを含む、請求項88に記載の方法。

【請求項94】

アッセイするステップが、プロセッサを用いてシグナルを数え上げ、アルゴリズムを適用して、それにより、候補細胞を同定するステップをさらに含み、請求項88に記載の方法。

10

【請求項95】

第1の細胞の境界を検出するステップをさらに含み、アッセイするステップが境界によって取り囲まれた第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含む、請求項88に記載の方法。

【請求項96】

胎児細胞を面に付着させる方法であって、
胎児細胞を完全な状態に維持するように構成された溶液を多孔質膜上に置くステップと、
潜在的な胎児細胞を膜上の溶液に入れるステップと、
溶液を除去し、それにより、潜在的な胎児細胞を多孔質膜に付着させるステップと
を含む、方法。

20

【請求項97】

溶液を除去するステップが溶液を蒸発させるステップを含む、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

置くステップが溶液を多孔質ポリエステル膜上に置くステップを含む、請求項96に記載の方法。

【請求項99】

置くステップが溶液をポリエチレンテレフタレート(PET)及びポリエチレンナフタレート(PEN)の1つを含む膜上に置くステップを含む、請求項96に記載の方法。

【請求項100】

溶液を置くステップが約50flから約10ulまでの溶液の容積を置くステップを含む、請求項96に記載の方法。

30

【請求項101】

溶液を置くステップ、潜在的な胎児細胞を置くステップ及び溶液を除去するステップを繰り返して、それにより、複数の細胞を膜に付着させるステップを含み、各細胞が、膜上で他の細胞から分離されている、請求項96に記載の方法。

【請求項102】

除去するステップの少なくとも一部の間多孔質膜を100%未満の湿度を有する制御された環境にするステップをさらに含み、請求項96に記載の方法。

【請求項103】

細胞を除去する方法であって、
柔軟面の一部に付着させた細胞を用意するステップと、
柔軟面の少なくとも一部を弾性基材に並置するステップと、
細胞を中空シャフトで取り囲むステップと、
中空シャフトと柔軟面との間に、弾性基材により抵抗される力をかけて、それにより、柔軟面の一部及びそれに付着させた細胞を柔軟面の残りの部分から分離するステップと
を含む、方法。

40

【請求項104】

細胞を用意するステップが柔軟面上の他の細胞から分離した細胞を用意するステップを含む、請求項103に記載の方法。

50

【請求項105】

細胞を用意するステップが二軸延伸ポリエチレンテレフタレート(mylar)に付着させた細胞を用意するステップを含む、請求項103に記載の方法。

【請求項106】

取り囲むステップの前に面に付着させた細胞の特性を解析するステップ及び細胞が除去の必要があることを判断するステップをさらに含む、請求項103に記載の方法。

【請求項107】

細胞の特性を解析するステップが取り囲むステップの前にDNA解析、RNA解析、タンパク質解析及び光学解析の少なくとも1つを実施して、それにより、細胞が除去の必要があることを判断するステップを含む、請求項106に記載の方法。

10

【請求項108】

取り囲むステップの前に中空シャフトを顕微鏡タレットと接続するステップをさらに含む、請求項106に記載の方法。

【請求項109】

中空シャフトの位置を柔軟な膜に対して校正するステップをさらに含む、請求項106に記載の方法。

【請求項110】

力をかけるステップの後に柔軟面の一部が柔軟面の残りの部分から分離されたことを示すステップをさらに含む、請求項106に記載の方法。

【請求項111】

力をかけるステップの後に真空をかけて、それにより、真空により柔軟面の分離された部分及びそれに付着させた細胞を保持するステップをさらに含む、請求項106に記載の方法。

20

【請求項112】

柔軟面の一部及びそれに付着させた細胞を、膜から細胞を脱離させるステップ及び細胞からDNAを抽出するステップの少なくとも1つを実施するように構成された溶液に入れるステップをさらに含む、請求項106に記載の方法。

【請求項113】

取り囲むステップ及びかけるステップをマイクロプロセッサにより制御する、請求項106に記載の方法。

30

【請求項114】

用意するステップ、並置するステップ、取り囲むステップ及びかけるステップを繰り返して、複数の細胞を得るステップと、

複数の細胞からDNAを得るステップと、

PCRを用いてDNAを増幅して、それにより、増幅DNAを得るステップと、

36サイクル未満のPCRを用いる場合に少なくとも0.35 µgの細胞当たりの平均増幅DNA収量を得るステップと

をさらに含む、請求項106に記載の方法。

【請求項115】

第1の中空末端及び第2の末端を含むシャフトと、

シャフトと接続され、第2の末端を顕微鏡における顕微鏡対物タレットと接続するように構成されたタレットハウジングとを含み、タレットハウジングが顕微鏡対物タレットに設置され、柔軟な基材が顕微鏡の顕微鏡ステージ上に設置されている場合にシャフトが柔軟な基材の一部を除去するように構成されている、細胞分離装置。

40

【請求項116】

中空末端が平らな末端を含む、請求項115に記載の装置。

【請求項117】

第1の中空末端の内径が約100µm～約300µmであり、第1の中空末端の外径が約300µm～約500µmであり、内径より大きい、請求項115に記載の装置。

【請求項118】

50

シャフトがステンレススチールを含む、請求項115に記載の装置。

【請求項 1 1 9】

第1の中空末端及び第2の末端を有するシャフトと、
シャフトと接続され、第2の末端を顕微鏡における顕微鏡対物タレットと接続するように構成されたタレットハウジングとを含み、タレットハウジングが顕微鏡対物タレットに設置され、柔軟な基材が顕微鏡の顕微鏡ステージ上に設置されている場合にシャフトが柔軟な基材の一部を除去するように構成されている、細胞分離装置、並びに
柔軟基材
を含む細胞分離システム。

【請求項 1 2 0】

柔軟な膜の一部が細胞分離装置により除去されたという表示をもたらすフィードバックソースをさらに含む、請求項119に記載のシステム。

【請求項 1 2 1】

フィードバックソースがマイクロホン、増幅器及びバンドパスフィルターの少なくとも1つを含む、請求項119に記載のシステム。

【請求項 1 2 2】

フィードバックソースからのフィードバックシグナルに自動的に応答して、それにより、モーター駆動ステージを第1の位置から第2の位置に移動させるように構成されたモーター駆動ステージをさらに含む、請求項119に記載のシステム。

【請求項 1 2 3】

顕微鏡をさらに含む、請求項119に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、2011年11月17日に出願した米国特許出願第61/561,231号の米国特許法第119条に基づく利益を主張するものである。

【0 0 0 2】

参照による組み込み

本明細書に記載するすべての刊行物及び特許出願は、各個別の刊行物又は特許出願が参照により組み込まれることが具体的且つ個別に示された場合と同じ程度に参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 3】

出生前遺伝子検査は、胎児DNAへのアクセスを必要とする。権利者共通の米国特許出願公開第2010/0159506号に記載されているように、胎児遺伝物質は、母親の循環血液に存在する胎児細胞内に見いだすことができる。これらの胎児細胞は、胎児に由来し、胎盤を通じて、母親の循環系に入る。

【0 0 0 4】

母親の循環における最も一般的な種類の胎児細胞は、血液細胞である。CFC(循環胎児細胞)は、胎盤絨毛上皮細胞、白血球、有核赤血球並びに他の幹及び前駆細胞を含む細胞の異種群である。すべてのCFCが現在の妊娠の遺伝子検査に有用であるとは限らない。胎盤絨毛上皮細胞の単離及び濃縮は、それらが多核形態を持ち、胎盤抗原に特異的な抗体の入手可能性が限られていることによって妨げられる可能性があり、さらに特定の白血球は、以前の妊娠から存続し、母体白血球と胎児白血球を識別するための特有の細胞マーカー又はHLA抗原を欠いている可能性がある。

【0 0 0 5】

解析のための最も魅力的なCFCは、短い半減期(約30日)を有し、妊娠中に比較的豊富にある、胎児有核赤血球(fnRBC)である。しかし、それらが非常にまれであり、nRBCが胎児性又は母体性であり得るので、fnRBCの信頼できる検出及び単離は、かなりの技術的難題

10

20

30

40

50

を招くものとなる。

【 0 0 0 6 】

全血中のfnRBCのおおよその濃度は、おおよそ1:1,000,000,000である。まれな事象についての全血の直接的解析は、医学診断応用を支えるのには遅く、費用がかかり過ぎる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 米国特許出願公開第2010/0159506号

【 特許文献 2 】 同時係属特許出願第13/046,543号

【 特許文献 3 】 米国特許第5,676,849号

10

【 特許文献 4 】 米国特許第5,662,813号

【 特許文献 5 】 米国特許第6,544,751号

【 特許文献 6 】 米国特許第4,923,620号

【 特許文献 7 】 米国特許第4,925,572号

【 特許文献 8 】 米国出願公開第2011/0311960号

【 特許文献 9 】 米国出願公開第2012/0021508号

【 特許文献 10 】 国際公開第2011/14055号

【 特許文献 11 】 米国特許出願公開第2007/0211460号

【 特許文献 12 】 米国特許第5,460,797号

【 特許文献 13 】 米国特許第5,459,073号

20

【 特許文献 14 】 国際公開第2004/083369号

【 特許文献 15 】 米国特許出願公開第2007/0072167号

【 特許文献 16 】 米国特許第6,042,874号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Comparison of Five Different Filters for Removal of Leukocytes from Red Cell Concentrates; VOX Sang 1992/62巻、76 ~ 81頁

【 非特許文献 2 】 Recovery of Human Leukocytes from a Leukodepletion Filter; Chang ら、J. Transfusion、1992/32頁(85)

【 非特許文献 3 】 Recovery of Functional Human Lymphocytes from Leukotrap Filters; Longley ら、J. Immunological Methods、1999/121巻、33 ~ 38頁

30

【 非特許文献 4 】 Biotechniques、31巻、464 ~ 466頁(2001)

【 非特許文献 5 】 S. Ebner ら、J. Immunological Methods、2001(252)、93 ~ 104頁

【 非特許文献 6 】 Species Differences in TSIX/Tsix Reveal the Roles of These Genes in X-Chromosome Inactivation、Migeon Barbara R.、Lee Catherine H.、Chowdhury Ashis K.、Carpenter Heather、doi:10.1086/341605(71巻、2号、286 ~ 293頁)

【 非特許文献 7 】 Cell Crushing: A Techniques for Greatly Reducing Errors in Microspectrometry、Davies H. G.、Wilkins M. H. F.、Boddy R. G. H. B.、Experimental Cell Research、6/(550 ~ 553頁);1954

【 非特許文献 8 】 Zheng ら、1999 Fetal cell identifiers: results of microscope slide-based immunocytochemical studies as a function of gestational age and abnormality、Am. J. Obstet. Gynecol.、180巻、1234 ~ 1239頁)

40

【 非特許文献 9 】 (Mevron ら、1999、Improved specificity of RBC detection in chorionic villus sample supernatant fluids using anti-zeta and anti-epsilon monoclonal antibodies、Feta. Diagn. Ther.、14巻、291 ~ 295頁)

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

したがって、出生前遺伝子検査の分野においてfnRBCを確実に検出し、単離するための新規且つ有用な方法及びシステムを創出する必要がある。本発明は、そのような新規且つ

50

有用な方法及びシステムを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本明細書で提供するのは、細胞並びに細胞から得ることができる例えば、核酸(例えば、DNA)、オルガネラ、膜及びタンパク質などの物質を採取し、同定し、解析するための方法、装置、システム及びキットである。該方法、装置、システム及びキットは、単一細胞及び/又はまれな細胞を採取又は解析するのに特に有用であり得る。採取し、解析することができるいくつかの特定の細胞は、母親の血液試料からの胎児細胞、血液試料からの循環腫瘍細胞、幹細胞、有核赤血球及び他のまれな細胞などである。

【0011】

本発明は、母親の全血試料からの母親及び胎児有核赤血球(nRBC)などの有核細胞を濃縮し、単離する方法を提供する。本発明はまた、出生前遺伝子検査の一部としての胎児遺伝物質の同定のために試料を解析する準備をし、解析するための方法及び装置を提供する。本発明はまた、妊娠女性から採取した血液試料から得られる胎児有核赤血球と母親有核赤血球を区別するための方法及び装置に関する。

【0012】

本発明の1つの態様は、母親血液試料から胎児有核細胞(例えば、有核赤血球など)を濃縮する方法を提供する。いくつかの実施形態において、該方法は、次のステップ、すなわち、母親有核細胞及び胎児有核細胞を含む母親血液試料をフィルター(例えば、白血球枯渇フィルターなど)に通すステップと、有核細胞をフィルター上に保持するステップと、溶出緩衝液により有核細胞をフィルターから溶出させるステップとを含み、有核細胞は、胎児有核細胞を含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、該方法はまた、例えば、核染色により血液試料を染色することなどにより、血液試料を染色するステップを含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、該方法はまた、例えば、遠心分離などにより、通すステップの前に血液試料を濃縮し、再懸濁するステップを含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、該方法はまた、例えば、血液試料中の細胞の量を標準化するために濃縮の前に血液試料を測定するステップを含む。

【0016】

本発明の他の態様は、次のステップ、すなわち、面に対して少なくとも2つの方向に細胞の試料を移動させて、面上に細胞の単層を作製するステップと、細胞を面に接着するステップとを含む面上に細胞の層を作製する方法を提供する。運動は、例えば、円運動、ジグザグ運動、対角線運動及び/又は蛇行運動を含み得る。相対運動は、試料の一部を面から離れて動かすことも含み得る。

【0017】

いくつかの実施形態は、運動ステップに塗抹用具を用いる。いくつかのそのような実施形態において、面に対する用具の角度を変化させることができる。面に対する用具の相対速度も例えば、0.1mm/秒~500mm/秒の範囲で変化させることができる。

【0018】

運動ステップは、一般的に均一な試料密度を発生させるステップを含み得る。いくつかの実施形態は、例えば、赤色又は青色光を用いることなどにより、面に対する試料の密度をモニターするステップも含む。

【0019】

本発明のさらに他の態様は、有核胎児細胞を同定する方法を提供する。いくつかの実施形態において、該方法は、母親血液試料からの有核細胞を、複数の部分を含む面に接着させるステップと、面の少なくとも1つの部分に対応する一対の画像を生成するステップと、該対にアルゴリズムを適用し、該部分が対象の細胞を含むかどうかを判定するステップ

10

20

30

40

50

と、対象の細胞を含む面の少なくとも1つの部分について胎児アイデンティファイア- (fetal identifier) を用いて解析を実施し、それにより、少なくとも1つの部分が胎児細胞を含むかどうかを判定するステップとを含む。いくつかの実施形態において、解析は、*in situ*ハイブリダイゼーション及び免疫組織化学からなる群から選択され、方法は、接着ステップの後の自動顕微鏡により面を走査するステップをさらに含む。いくつかの実施形態は、第3の画像を発生させるステップを含む。

【0020】

いくつかの実施形態において、一对の画像を生成するステップは、透過照射により第1の画像を、同軸照射により第2の画像を生成するステップをさらに含む。様々な実施形態において、透過照射の波長は、380nm~800nm、620nm超又は約420nmであり得る。同軸照射は、350nm~364nmであり得る。

10

【0021】

いくつかの実施形態において、解析を実施するステップは、胎児アイデンティファイア-を面の複数の部分に選択的に配置するステップを含み、各部分が候補胎児細胞を含む。

【0022】

いくつかの実施形態において、アルゴリズムを適用するステップは、少なくとも1つの画像を平坦化する(flattening)ステップと、少なくとも1つの画像を分割し、それにより、フォアグラウンド及びバックグラウンドピクセルを定義するステップと、少なくとも1つの画像からバックグラウンドピクセルを除去して、変換画像を得るステップと、変換画像における核を数え上げて、数え上げられた核を得るステップと、少なくとも1つの数え上げられた核の複雑さ及び輝度の少なくとも1つを計算するステップとを含み、低い複雑さ又は高い輝度が胎児細胞の特性を示す。

20

【0023】

いくつかの実施形態において、適用するステップは、面のバックグラウンドの輝度及び面のフォアグラウンドの輝度を計算するステップと、該一对の画像の測定値をバックグラウンド輝度及びフォアグラウンド輝度の1つ又は両方と比較するステップをさらに含む。

【0024】

いくつかの実施形態は、一对の画像の位置を保存するさらなるステップを含む。有核細胞は、そのような保存位置に基づいて位置を示すことができる。

【0025】

いくつかの実施形態は、解析ステップを実施する前に非架橋固定剤により試料を固定するステップ及び/又は解析ステップを実施する前に低温で試料を固定するステップを含む。

30

【0026】

いくつかの実施形態において、実施するステップは、安定剤で処理するステップ及び/又は解析が免疫組織化学である場合に抗ゼータヘモグロビン、抗ガンマ及び抗イプシロンヘモグロビンからなる群から選択される抗体で処理するステップを含み得る。

【0027】

本発明のさらに他の態様は、胎児の遺伝子状態を同定する方法を提供する。いくつかの実施形態において、該方法は、次のステップ、すなわち、母親血液試料からの有核細胞を、複数の部分を含む面に付着させるステップと、少なくとも1つの部分に対応する一对の画像を生成するステップと、該一对の画像にアルゴリズムを適用し、該部分が対象の細胞を含むかどうかを判定するステップと、対象の細胞を含む面の少なくとも1つの部分について胎児アイデンティファイア-を用いて解析を実施し、それにより、少なくとも1つの部分が胎児細胞を含むかどうかを判定するステップ(例えば、*in situ*ハイブリダイゼーション及び/又は免疫組織化学などにより)と、胎児細胞を含む面の少なくとも1つの部分について胎児アイデンティファイア-を用いて解析を実施し、それにより、胎児の遺伝子状態を判定するステップ(例えば、RNA *in situ*ハイブリダイゼーション、DNA *in situ*ハイブリダイゼーション及び/又は免疫組織化学などにより)とを含む。2つの実施するステップは、同時に実施することができる。

40

50

【0028】

いくつかの実施形態は、実施するステップ中に大気圧より低い圧力を面にかけるさらなるステップを含み得る。方法は、解析ステップを実施する前に対象の少なくとも1つの細胞及び関連核を圧壊するステップも含み得る。

【0029】

本発明のさらに他の態様は、胎児細胞を同定する方法を提供する。いくつかの実施形態において、該方法は、次のステップ、すなわち、母親の血液試料を用意するステップと、TSIXプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを実施して、シグナルを発生させるステップとを含み、TSIXプローブを用いた陽性シグナルが胎児の細胞物質の存在を示す。方法は、例えば、細胞の単層を得るためのステップを実施する前に試料を分離して、複数の部分を発生させるステップも含み得る。

10

【0030】

該方法の他の態様は、胎児の遺伝子状態を判定する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、母親細胞及び胎児細胞を含む母親血液試料を用意するステップと、母親血液試料からの細胞の単層を面上に自己集合させるステップと、単層について第1の解析を実施して、それにより、単層における潜在的な胎児細胞を識別するステップと、単層から潜在的な胎児細胞を選択的に除去するステップと、潜在的な胎児細胞からDNAを得るステップと、DNAの特性を解析して、DNAに基づくシグナルを得るステップと、シグナルを参照特性と比較して、それにより潜在的な胎児細胞の遺伝子状態を判定するステップとを含む。

20

【0031】

いくつかの実施形態において、方法は、自己集合ステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、有核細胞及び胎児細胞が濃縮された試料を得るステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、該方法は、自己集合ステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、母親白血球及び胎児細胞が濃縮された試料を得るステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、該方法は、自己集合ステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、赤血球と白血球を5000:1~1:10の比で有し胎児細胞を有する試料を得るステップをさらに含む。

【0032】

母親血液試料が生細胞を含むいくつかの実施形態において、細胞の単層を自己集合させるステップは、生細胞を含む単層を自己集合させるステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、方法は、少なくとも選択的に除去するステップにより細胞の生存能力を維持するステップをさらに含む。

30

【0033】

いくつかの実施形態において、細胞の単層を自己集合させるステップは、細胞の第1の部分互いに固定化されている細胞の単層を自己集合させるステップを含む。いくつかの実施形態において、細胞の単層を自己集合させるステップは、細胞の第1の部分面を除去可能に付着させるステップを含む。いくつかの実施形態において、細胞の単層を自己集合させるステップは、細胞の第2の部分面を近くに定着させるステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、該方法は、細胞の第2の部分面を近くに維持するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、維持するステップは、細胞の第2の部分面を近くに少なくとも15分間、少なくとも30分間、少なくとも45分間又は少なくとも1時間維持するステップを含む。

40

【0034】

いくつかの実施形態において、方法は、細胞をアイデンティファイアーで処理するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、第1の解析ステップを実施する前に細胞を核アイデンティファイアーで処理するステップを含み、第1の解析を実施するステップが細胞の単層を解析して、核アイデンティファイアーについて陽性である細胞を検出するステップを含む。核アイデンティファイアーがSYBR Greenを含む、いくつかのそのような実施形態において、第1の解析を実施するステップは、細胞をSYBR Green励起

50

光で照射し、細胞からのSYBR Green放射光を検出するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、照射するステップは、細胞を青色光で照射するステップを含み、検出するステップは、緑色光を検出するステップを含む。

【0035】

いくつかの実施形態において、細胞の単層について第1の解析を実施するステップは、ヘモグロビンを検出するステップを含む。いくつかの実施形態において、ヘモグロビンを検出するステップは、細胞の単層をヘモグロビン吸収性光(例えば、400nm~600nm又は400nm~450nmの波長を有するような)で照射するステップ及びヘモグロビンの光吸収に基づいて細胞の単層からの光を検出するステップを含む。いくつかの実施形態において、細胞の単層を照射するステップは、光を散乱させるステップを含む。

10

【0036】

いくつかの実施形態において、単層を解析するステップは、ヘモグロビンを検出するステップを含み、核アイデンティファイア-について陽性でありヘモグロビンアイデンティファイア-について陽性である細胞が候補胎児細胞を同定するものである。

【0037】

いくつかの実施形態において、方法は、面上の細胞を固定するステップ並びに免疫細胞化学及びin situハイブリダイゼーションの少なくとも1つを用いて細胞を解析するステップをさらに含む。方法が免疫細胞化学を含む、いくつかのそのような実施形態において、方法は、抗ヘモグロビン抗体を用いて解析して、それにより、ヘモグロビンを含む細胞を検出するステップをさらに含む。

20

【0038】

いくつかの実施形態において、方法は、選択的に除去するステップの後に潜在的な胎児細胞を基材上に置くステップと、基材上の潜在的な胎児細胞について第2の解析を実施して、胎児細胞の同一性を確認するステップとを含む。いくつかのそのような実施形態において、第2の解析を実施するステップは、免疫細胞化学を実施するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、免疫細胞化学を実施するステップは、抗ヘモグロビン抗体を用いて(例えば、抗胎児ヘモグロビン抗体及び抗胚抗体の少なくとも1つを用いることなど)免疫細胞化学を実施するステップ並びに免疫細胞化学的シグナルを得て、それにより、候補胎児細胞の同一性を確認するステップを含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、方法は、免疫細胞化学的シグナルの値を閾値化するステップをさらに含み、第1の閾値を上回るシグナル値、第2の閾値を下回るシグナル値又は両方が候補胎児細胞を同定するものである。

30

【0039】

いくつかの実施形態において、方法は、潜在的な胎児細胞からのDNAを増幅し(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて)第1の増幅DNAを得るステップをさらに含み、解析するステップが第1の増幅DNAに基づくシグナルを得るステップを含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、方法は、定量的PCR(qPCR)及びデジタルPCR(dPCR)の少なくとも1つを用いて解析するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、PCRを用いて増幅するステップは、6サイクル未満で増幅して、第1の増幅DNAを得るステップを含む。いくつかの実施形態において、DNAを解析するステップは、胎児アイデンティファイア-に基づいて解析するステップを含み、第1の増幅DNAに基づく陽性シグナルが胎児細胞を同定するものである。胎児アイデンティファイア-が短鎖縦列反復配列(STR)を含むいくつかのそのような実施形態において、DNAを解析するステップは、短鎖縦列反復配列を解析するステップを含む。

40

【0040】

いくつかの実施形態において、実施するステップは、複数の潜在的な胎児細胞(例えば、面上の同じ単層からの又は複数の面上の単層からのなど)を識別するステップをさらに含み、増幅するステップは、6サイクル未満で複数の細胞のうちの各潜在的な胎児細胞からのDNAの第1の部分を増幅して、複数のDNA試料を得るステップをさらに含み、解析するステップは、胎児アイデンティファイア-に基づいて複数のDNA試料を解析して、それぞ

50

れが陽性シグナルを有する複数の胎児細胞を得るステップをさらに含み、方法は、それぞれが陽性シグナルを有する複数の胎児細胞からのDNAの第2の部分プールし、増幅して、プールされた増幅DNAを得るステップをさらに含む。

【0041】

いくつかの実施形態は、PCRステップを用いる増幅ステップの前に潜在的な胎児細胞からのDNAを第1のアリコート(aliquot)と第2のアリコートに分割し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて第2のアリコートを増幅して、第2の増幅DNAを得るステップと、第2の増幅DNAの特性を解析して、DNAに基づく第2のシグナルを得るステップと、第2のシグナルを参照特性と比較して、それにより、細胞の第2の遺伝的特性を判定するステップをさらに含む。いくつかのそのような実施形態において、第2の増幅DNAの特性を解析するステップは、DNA配列決定及びアレイゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)の1つを実施するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、シグナルを参照特性と比較するステップは、シグナルを、例えば、母親の核酸などに基づく参照特性又は複数の個人を代表する核酸に基づく参照核酸と比較するステップを含む。

10

【0042】

母親血液試料が複数の胎児細胞を含むいくつかの実施形態において、実施するステップは、複数の潜在的な胎児細胞を識別するステップを含み、選択的に除去するステップは、複数の潜在的な胎児細胞を選択的に除去するステップを含み、得るステップは、複数の細胞からDNAを得て、プールされたDNAを得るステップを含み、解析するステップは、プールされたDNAの特性を解析して、プールされたDNAに基づくシグナルを得るステップを含み、比較するステップは、シグナルを参照特性と比較して、それにより、潜在的な胎児細胞により共有される遺伝子状態を判定するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、プールされたDNAの特性を解析するステップは、36サイクル未満のPCRを用いる場合に少なくとも0.35 µgの細胞当たりの平均増幅DNA収量を得るステップを含む。

20

【0043】

母親血液試料が複数の胎児細胞を含むいくつかの実施形態において、方法は、自己集合ステップ、実施するステップ、及び選択的に除去するステップを繰り返し、それにより少なくとも2つの異なる単層から複数の潜在的な胎児細胞を得るステップをさらに含み、得るステップは、複数の細胞からDNAを得て、プールされたDNAを得るステップを含み、解析するステップは、プールされたDNAの特性を解析して、プールされたDNAに基づくシグナルを得るステップを含み、比較するステップは、シグナルを参照特性と比較して、それにより、潜在的な胎児細胞により共有される遺伝子状態を判定するステップを含む。いくつかの実施形態において、プールされたDNAの特性を解析するステップは、36サイクル未満のPCRを用いる場合に少なくとも0.35 µgの細胞当たりの平均増幅DNA収量を得るステップを含む。

30

【0044】

いくつかの実施形態において、解析するステップは、DNAの少なくとも一部の配列を決定して、DNA配列を得るステップを含む。いくつかの実施形態において、解析及び比較するステップは、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)を実施して、それにより、潜在的な胎児細胞の遺伝子状態を判定するステップを含む。いくつかの実施形態において、解析するステップは、染色体数、DNA重複、DNA欠失及びSNPの少なくとも1つを検出するステップを含む。いくつかの実施形態において、解析するステップは、13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体の少なくとも1つの染色体数を検出するステップを含む。

40

【0045】

いくつかの実施形態において、方法は、自己集合ステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、母親白血球及び少なくとも1つの胎児細胞が濃縮され、濃縮母親血液試料中赤血球と白血球との比が少なくとも5000:1~1:10である試料を得るステップ、生細胞単層を自己集合させるステップであって、自己集合細胞の第1の部分が、面にゆるく付着したもの及び面に近いものの少なくとも1つであるステップ、細胞を生細胞核アイデンテ

50

ィファイアーで処理するステップ、生細胞核アイデンティファイアーに基づいて有核細胞を光学的に検出するステップ、単層を400nm~600nmの光で照射し、ヘモグロビンに基づく光を検出するステップであって、核アイデンティファイアーについて陽性でありヘモグロビンについて陽性である細胞が潜在的な胎児有核細胞を含むステップ、選択的に除去するステップの後に潜在的な胎児細胞を多孔質基材上に置くステップ、選択的に除去するステップと置くステップを繰り返して、それにより、多孔質基材上の複数の潜在的な胎児細胞を得るステップ、繰り返すステップの後に各細胞について第2の解析を実施するステップであって、第2の解析が複数の潜在的な胎児細胞について抗胎児ヘモグロビン及び抗胚抗体を用いて免疫細胞化学を実施するステップを含み、閾値を上回るシグナルが胎児細胞の同一性を確認するステップ、DNAを増幅し、プールされた増幅DNAを得るステップ、DNA配列決定及びアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションの少なくとも1つによりDNAプールを解析して、胎児DNAプロファイルシグナルを得るステップ、並びに胎児DNAプロファイルシグナルを参照特性と比較して、それにより、胎児細胞の遺伝子状態を判定するステップであって、遺伝子状態が13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体の異数性の少なくとも1つを含むステップをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0046】

本発明の他の態様は、胎児細胞の特性を判定する方法を提供する。いくつかの実施形態は、母親細胞及び胎児細胞を含む母親血液試料を用意するステップと、母親血液試料からの細胞の単層を面上に作製するステップと、細胞の単層について第1の解析を実施して、それにより、単層における潜在的な胎児細胞を識別するステップと、単層から潜在的な胎児細胞を選択的に除去するステップと、選択的に除去するステップの後に潜在的な胎児細胞を基材上に置くステップと、細胞について第2の解析を実施して、それにより、胎児細胞の特性を判定するステップとを含む。

【0047】

いくつかの実施形態は、作製するステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、有核細胞及び胎児細胞が濃縮された試料を得るステップをさらに含む。いくつかの実施形態は、作製するステップの前に母親血液試料を濃縮して、それにより、赤血球と白血球を5000:1~1:10の比で有し胎児細胞を有する試料を得るステップをさらに含む。

【0048】

母親血液試料が生細胞を含むいくつかの実施形態において、細胞の単層を作製するステップは、生細胞を含む単層を作製するステップを含む。いくつかの実施形態において、細胞の単層を作製するステップは、細胞の第1の部分が互いに固定化されている、細胞の単層を作製するステップを含む。いくつかの実施形態において、細胞の単層を作製するステップは、細胞の第1の部分が除去可能に面に付着している、細胞の単層を作製するステップを含む。いくつかのそのような実施形態は、細胞の第2の部分を面の近くに定着させるステップを含む。

【0049】

いくつかの実施形態において、方法は、細胞を染色するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、第1の解析ステップを実施する前に細胞を核アイデンティファイアーで処理するステップをさらに含み、第1の解析は、細胞の単層を解析して、核アイデンティファイアーについて陽性である細胞を検出するステップを含む。核アイデンティファイアーがSYBR Greenを含むいくつかのそのような実施形態において、第1の解析ステップを実施するステップは、細胞をSYBR Green励起光で照射し、細胞からのSYBR Green放射光を検出するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、照射するステップは、青色光で照射するステップを含み、検出するステップは、緑色光を検出するステップを含む。

【0050】

いくつかの実施形態において、細胞の単層について第1の解析を実施するステップは、ヘモグロビンを検出するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、ヘモグロビンを検出するステップは、ヘモグロビン吸収性光(400nm~600nm又は400nm~450nm

の波長を有するような)で細胞の単層を照射 (例えば、散光など)するステップ及びヘモグロビンの光吸収に基づいて細胞の単層からの光を検出するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、ヘモグロビンを検出するステップは、ヘモグロビン吸収性光で細胞の単層を照射するステップを含む。

【0051】

ヘモグロビンを検出するステップを含むいくつかの実施形態において、方法は、ヘモグロビンを検出するステップをさらに含み、核アイデンティファイアーについて陽性でありヘモグロビンについて陽性である細胞が候補胎児細胞を含む。

【0052】

いくつかの実施形態において、細胞について第2の解析を実施するステップは、基材上の対照細胞について解析を実施するステップ及び対照細胞の解析の結果を胎児細胞の解析の結果と比較するステップをさらに含む。

10

【0053】

いくつかの実施形態において、第2の解析を実施するステップは、免疫細胞化学及びin situハイブリダイゼーションの少なくとも1つを実施するステップを含み、方法は、第2の解析ステップを実施する前に基材上の細胞を固定するステップをさらに含む。第2の解析を実施するステップが免疫細胞化学を実施するステップを含むいくつかのそのような実施形態において、方法は、抗ヘモグロビン抗体を用いるステップ及び免疫細胞化学的シグナルを得て、それにより、候補胎児細胞の同一性を確認するステップをさらに含む。第2の解析を実施するステップが免疫細胞化学を実施するステップを含むいくつかの他のそのような実施形態において、方法は、抗胎児ヘモグロビン抗体及び抗胚ヘモグロビン抗体の少なくとも1つを用いるステップ及び免疫細胞化学的シグナルを得て、それにより、候補胎児細胞の同一性を確認するステップをさらに含む。いくつかの他の実施形態において、方法は、免疫細胞化学的シグナルの値を閾値化するステップをさらに含み、第1の閾値を上回るシグナル値、第2の閾値を下回るシグナル値又は両方が候補胎児細胞の同一性を確認する。いくつかのさらに他のそのような実施形態において、細胞について第2の解析を実施するステップは、in situハイブリダイゼーションにより細胞DNAを解析し、DNAに基づくシグナルを得るステップと、シグナルを参照特性(例えば、母親細胞からのDNAに基づく又は複数の個人からのDNAに基づく参照DNA特性)と比較し、それにより、潜在的な胎児細胞の遺伝的特性を判定するステップを含む。いくつかの実施形態において、判定するステップは、染色体数(例えば、13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体の少なくとも1つのなどの)、DNA重複及びDNA欠失の少なくとも1つを判定するステップを含む。

20

30

【0054】

いくつかの実施形態において、方法は、実施するステップの後に基材から第1の潜在的な胎児細胞を除去するステップと、細胞からDNAを得るステップと、細胞DNAを増幅する(例えば、30サイクル未満などのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いるなど)ステップとを含む。いくつかの実施形態において、増幅するステップは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応及びデジタルポリメラーゼ連鎖反応の少なくとも1つを実施するステップを含む。いくつかのそのような実施形態において、方法は、胎児アイデンティファイアーを用いてDNAを解析するステップをさらに含み、陽性シグナルは、胎児細胞を示す。いくつかのそのような実施形態において、実施するステップは、複数の潜在的な胎児細胞(例えば、同じ単層からの又は複数の単層からのなど)を識別するステップをさらに含み、増幅するステップは、複数の細胞の各潜在的な胎児細胞から30サイクル未満でDNAを増幅して、複数のDNA試料を得るステップをさらに含み、解析するステップは、胎児アイデンティファイアーを用いて複数のDNA試料を解析して、それぞれが陽性シグナルを有する複数の胎児細胞を得るステップをさらに含み、方法は、それぞれが陽性シグナルを有する複数の胎児細胞からのDNAをプールして、プールされた増幅DNAを得るステップをさらに含む。いくつかの実施形態は、DNAについて第2の増幅を実施するステップをさらに含む。

40

【0055】

50

いくつかの実施形態において、解析するステップは、DNAの少なくとも一部の配列決定を行う又はアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(アレイCGH)を実施するステップ及びシグナルを、例えば、母親のDNAシグナルから又は複数の個人を代表するDNAを含む参照DNAからなどの、参照特性と比較するステップを含む。

【0056】

いくつかの実施形態において、解析するステップは、染色体数(13番染色体、18番染色体、21番染色体、X染色体及びY染色体)、DNA重複、DNA欠失及び一塩基多型(SNP)の少なくとも1つを検出するステップを含む。

【0057】

いくつかの実施形態は、母親血液試料を濃縮して、それにより、母親白血球及び少なくとも1つの胎児細胞が濃縮され、濃縮母親血液試料中赤血球と白血球を少なくとも5000:1~1:10の比で有する試料を得るステップ、生細胞単層を自己集合させるステップであって、集合細胞の少なくとも一部が面に除去可能に付着している又は面に付着していないステップ、細胞を生細胞核染色で処理するステップ、染色細胞を光学的に検出するステップ、細胞を400nm~600nmの光(例えば、散光器により)で照射し、ヘモグロビンを検出するステップであって、核アイデンティファイアについて陽性でありヘモグロビンが陽性である細胞が潜在的な胎児有核細胞を含むステップ、選択的に除去するステップの後に潜在的な胎児細胞を基材上に置き、細胞について第2の解析を実施して、潜在的な胎児細胞が候補胎児細胞であるかどうかを判定するステップ、少なくとも選択的に除去するステップ及び置くステップを繰り返して、それにより、複数の候補胎児細胞を得るステップをさらに含み、第2の解析を実施するステップは、複数の潜在的な胎児細胞について抗胎児ヘモグロビン及び抗胚抗体を用いて免疫細胞化学を実施するステップを含み、閾値を上回る陽性シグナルは、潜在的な胎児細胞が候補胎児細胞であることを示す。いくつかの実施形態において、方法は、候補胎児細胞のそれぞれからDNAを得るステップ、候補胎児細胞のそれぞれからのDNAを増幅するステップ、DNA配列決定及びアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションの少なくとも1つによりDNAプールを解析して、胎児DNAプロファイルを得るステップ、並びに胎児DNAプロファイルを参照特性と比較して、それにより、胎児細胞の遺伝的特性を判定するステップであって、遺伝的特性が、13番、18番、21番、X及びY染色体の異数性の少なくとも1つを含むステップをさらに含む。

10

20

【0058】

本発明の他の態様は、母親血液試料から候補胎児細胞を分離する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、胎児細胞が濃縮された母親血液の試料を面上に置くステップであって、試料が母親有核細胞及び胎児細胞を含むステップ、試料中の細胞の少なくとも第1の部分に面に除去可能に付着させるステップ、細胞について解析を実施して、候補胎児有核細胞を同定するステップ、並びに面から候補胎児有核細胞を除去して、それにより、残りの細胞から細胞を単離するステップを含む。

30

【0059】

いくつかの実施形態において、除去可能に付着させるステップは、マイクロピペット及び部分的真空を用いて細胞を面から無傷で除去することができるように、細胞を面にゆるく接着するステップを含む。

40

【0060】

いくつかの実施形態において、方法は、面及び試料の少なくとも1つに物質(例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)など、0%~0.05%(重量/容積)BSAなど)を加えるステップをさらに含み、物質は、面への細胞の接着を低減するように構成されている。

【0061】

いくつかの実施形態において、方法は、細胞の第2の部分を面の近くに維持するステップをさらに含む。

【0062】

いくつかの実施形態において、方法は、母親血液の試料を面上に置くステップを含み、生細胞を面上に置くステップを含み、方法は、少なくとも除去可能に付着させるステップ

50

により細胞の生存能力を維持するステップをさらに含む。

【0063】

いくつかの実施形態において、方法は、候補胎児有核細胞を除去するステップを含み、細胞を部分的真空下において、それにより候補胎児有核細胞を除去するステップを含む。

【0064】

いくつかの実施形態において、候補胎児有核細胞を除去するステップは、30 μm未満の内径を有するマイクロピペットで細胞を集めるステップを含む。いくつかの実施形態において、候補胎児有核細胞を除去するステップは、例えば、約1%(重量/容積)未満のウシ血清アルブミンなどの、ウシ血清アルブミン(BSA)を被覆したマイクロピペットで細胞を集めるステップを含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、用意するステップは、透明な硬質面を用意するステップを含む。いくつかの実施形態において、用意するステップは、透明な裏張り上に官能化面を用意するステップを含む。いくつかの実施形態において、用意するステップは、ペグ化(ポリエチレングリコール官能化)面を用意するステップを含む。

【0066】

本発明のさらに他の態様は、候補細胞を同定する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、ヘモグロビン含有細胞を含む母親血液試料を用意するステップと、第1の細胞における第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップと、最小閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップと、第1の細胞を、それが最小閾値ヘモグロビンレベルを下回るヘモグロビンレベルを有する場合には候補母親細胞と、それが最小閾ヘモグロビンレベルであるか又はそれを上回るヘモグロビンレベルを有する場合には候補胎児細胞と同定するステップとを含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、方法は、用意するステップの後にアルゴリズムを適用するステップを含む。

【0068】

いくつかの実施形態において、方法は、アッセイするステップの前に母親血液試料から単層を形成するステップを含み、第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップは、単層における細胞中の第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含む。いくつかの実施形態において、方法は、免疫細胞化学を実施して、それにより、第1の細胞における胎児ヘモグロビンレベルを検出するステップを含む。いくつかの実施形態において、方法は、第2の細胞における第2の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含み、第2の細胞は、候補胎児細胞を含み、閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップは、胎児細胞ヘモグロビンレベルより低い閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップを含む。いくつかの実施形態において、方法は、複数の候補胎児細胞のそれぞれにおける胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含み、最小閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップは、複数の候補胎児細胞における胎児ヘモグロビンレベルに基づいてレベルを用意するステップを含む。

【0069】

いくつかの実施形態において、アッセイするステップは、プロセッサを用いてシグナルを数え上げ、アルゴリズムを適用して、それにより、候補細胞を同定するステップをさらに含む。

【0070】

いくつかの実施形態において、方法は、第1の細胞の境界を検出するステップをさらに含み、アッセイするステップは、境界によって取り囲まれた第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含む。

【0071】

本発明のさらに他の態様は、胎児細胞を多孔質膜に付着させる方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、胎児細胞を完全な状態に維持するように構成された溶液

10

20

30

40

50

を多孔質膜上に置くステップと、潜在的な胎児細胞を膜上の溶液に入れるステップと、溶液を除去し、それにより、潜在的な胎児細胞を多孔質膜に付着させるステップとを含む。

【0072】

いくつかの実施形態において、溶液を除去するステップは、溶液を蒸発させるステップを含む。いくつかの実施形態において、置くステップは、溶液を多孔質ポリエステル膜(例えば、ポリエチレンテレフタレート(PET)又はポリエチレンナフタレート(PEN)など)上に置くステップを含む。

【0073】

いくつかの実施形態において、溶液を置くステップは、約50flから約10ulまでの溶液の容積を置くステップを含む。細胞が溶液中に存在するいくつかの実施形態において、溶液を置くステップ及び細胞を置くステップを同時に実施する。

10

【0074】

いくつかの実施形態において、方法は、溶液を置くステップ、潜在的な胎児細胞を置くステップ及び溶液を除去するステップを繰り返して、それにより、複数の細胞を膜に付着させるステップを含み、各細胞は、膜上で他の細胞から分離されている。

【0075】

いくつかの実施形態において、方法は、除去するステップの少なくとも一部の間にも多孔質膜を100%未満の湿度(例えば、70%未満の湿度など)を有する制御された環境にするステップを含む。

【0076】

本発明のさらに他の態様は、細胞を除去する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、柔軟面の一部に付着させた細胞を用意するステップ、柔軟面の少なくとも一部を弾性基材に並置するステップ、細胞を中空シャフトで取り囲むステップ、並びに中空シャフトと柔軟面との間に、弾性基材により抵抗される力をかけて、それにより、柔軟面の一部及びそれに付着させた細胞を柔軟面の残りの部分から分離するステップを含む。

20

【0077】

いくつかの実施形態において、細胞を用意するステップは、柔軟面上の他の細胞から分離した細胞を用意するステップを含む。いくつかの実施形態において、細胞を用意するステップは、二軸延伸ポリエチレンテレフタレート(Mylar)に付着させた細胞を用意するステップを含む。

30

【0078】

いくつかの実施形態において、方法は、取り囲むステップの前に面に付着させた細胞の特性を解析して(例えば、DNA解析、RNA解析、タンパク質解析及び光学解析の少なくとも1つを実施するなど)、それにより、細胞を除去することを判断するステップをさらに含む。特性を解析するステップがタンパク質解析を実施するステップを含むいくつかの実施形態において、方法は、免疫細胞化学を実施するステップをさらに含む。細胞が胎児細胞を含むいくつかのこれらの実施形態において、免疫細胞化学を実施するステップは、胎児ヘモグロビン及び胚ヘモグロビンの少なくとも1つを解析するステップを含む。

【0079】

いくつかの実施形態において、方法は、取り囲むステップの前に中空シャフトを顕微鏡タレットと接続するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、中空シャフトの位置を柔軟な膜に対して較正するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、力をかけるステップの後に柔軟面の一部が柔軟面の残りの部分から分離されたことを示すシグナルを得るステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、力をかけるステップの後に真空をかけて、それにより、柔軟面の分離された部分及びそれに付着させた細胞を保持するステップをさらに含む。

40

【0080】

いくつかの実施形態において、方法は、柔軟面の一部及びそれに付着させた細胞を、膜から細胞を脱離させるステップ及び細胞からDNAを抽出するステップの少なくとも1つを実施するように構成された溶液に入れるステップをさらに含む。

50

【0081】

いくつかの実施形態において、方法は、取り囲むステップ及びかけるステップをマイクロプロセッサにより制御するステップをさらに含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、方法は、用意するステップ、並置するステップ、取り囲むステップ及びかけるステップを繰り返して、複数の細胞を得るステップ、複数の細胞からDNAを得るステップ、並びにPCRを用いてDNAを増幅して、それにより、増幅DNAを得るステップ、並びに36サイクル未満のPCRを用いる場合に少なくとも0.35 µgの細胞当たりの平均増幅DNA収量を得るステップをさらに含む。

【0083】

本発明の他の態様は、細胞分離装置を提供する。いくつかの実施形態において、装置は、第1の中空末端及び第2の末端を含むシャフト、並びにシャフトと接続され、第2の末端を顕微鏡における顕微鏡対物タレットと接続するように構成されたタレットハウジングを含み、シャフトは、タレットハウジングが顕微鏡対物タレットに設置され、柔軟な基材が顕微鏡の顕微鏡ステージ上に設置されている場合に柔軟な基材の一部を除去するように構成されている。

【0084】

いくつかの実施形態において、中空末端は、平らな末端又は斜めの末端を含む。

【0085】

いくつかの実施形態において、第1の中空末端の内径は、約200µm～約400µmであり、且つ/又は第1の中空末端の外径は、約300µm～約500µmであり、内径より大きい。いくつかの実施形態において、シャフトは、25ゲージ針の部分を含む。いくつかの実施形態において、シャフトは、ステンレススチールを含む。

【0086】

他の態様は、胎児有核細胞を濃縮するためのキットを提供する。いくつかの実施形態において、キットは、非有核赤血球の実質的な部分を通過させるが、胎児有核赤血球を捕捉するように構成されたフィルター及び使用説明書を含む。いくつかの実施形態において、キットは、溶出緩衝液を含む。いくつかの実施形態において、キットは、フィルターと接続し、フィルターの溶出速度を制御するように構成されたシリンジポンプをさらに含む。

【0087】

本発明の他の態様は、第1の中空末端及び第2の末端を有するシャフト並びにシャフトと接続され、第2の末端を顕微鏡における顕微鏡対物タレットと接続するように構成されたタレットハウジングを含み、シャフトが、タレットハウジングが顕微鏡対物タレットに設置され、柔軟な基材が顕微鏡の顕微鏡ステージ上に設置されている場合に柔軟な基材の一部を除去するように構成されている、細胞分離装置並びに柔軟な基材を含む細胞分離システムを提供する。

【0088】

いくつかの実施形態において、細胞分離システムは、柔軟な膜の一部が細胞分離装置により除去されたという表示をもたらすフィードバックソース(feedback source)をさらに含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、フィードバックソースは、マイクロホン、増幅器及びバンドパスフィルターの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、システムは、フィードバックソースからのフィードバックシグナルに応答して、それにより、モーター駆動ステージを第2の位置に移動させるように構成された制御されるモーター駆動ステージをさらに含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、システムは、顕微鏡をさらに含む。

【0089】

本発明の新規な特徴は、後続の特許請求の範囲における詳細により説明される。本発明の特徴及び利点のより十分な理解は、本発明の原理が活用されている、例示的实施形態を説明している以下の詳細な説明、及び以下の添付の図面を参照することによって得られる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】フィルターシステムを用いて血液試料からの胎児有核細胞を濃縮するための方法及びシステムを示す図である。

【図2】フィルターシステムを用いて血液試料からの胎児有核細胞を濃縮するための方法及びシステムを示す図である。

【図3】面上に細胞の層を作製するための細胞塗抹用具を示す図である。

【図4】図1の示すような装置を用いる方法を自動化するためのシステムを示す図である。

【図5】胎児有核細胞を同定するために用いた自動システムを示す図である。

10

【図6】本開示の1つの態様による胎児有核細胞を濃縮した後の細胞解析結果を示す図である。

【図7】図1の示すような装置を用いる方法を自動化するためのシステムを示す図である。

【図8】妊娠女性からの細胞塗抹標本を示す図である。

【図9】本開示により母親細胞から胎児細胞を検出し、識別する方法を示す図である。

【図10(1)】胎児細胞を得る方法を記載する図である。

【図10(2)】胎児細胞を得る方法を記載する図である。

【図11】各種段階におけるヘモグロビン発現を記載する図である。

【図12】種々の遺伝子状態時の胎児ヘモグロビンの発現を示す図である。

20

【図13】本発明の1つの態様による細胞を解析する方法を示す図である。

【図14】胎児細胞を特徴付けるためのプロトタイプシステムの性能を示す図である。

【図15A】胎児細胞を同定するための単鎖縦列反復配列(STR)解析の結果を示す図である。

【図15B】胎児細胞を同定するための単鎖縦列反復配列(STR)解析の結果を示す図である。

【図16A】本開示によるプールされた胎児細胞から胎児の特性を同定するためのアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

【図16B】本開示によるプールされた胎児細胞から胎児の特性を同定するためのアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

30

【図16C】本開示によるプールされた胎児細胞から胎児の特性を同定するためのアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

【図17A】ヘモグロビンを同定するために420nmの光で照射した細胞の単層を示す図である。

【図17B】核について蛍光により解析した細胞の単層を示す図である。

【図18A】ヘモグロビンについて420nmの光を用いた図17A～図17Bに示す単層の一部の詳細図である。

【図18B】核について蛍光を用いた図17A～図17Bに示す単層の一部の詳細図である。

【図18C】ヘモグロビンについて420nmの光及び核について蛍光の両方を用いた図17A～図17Bに示す単層の一部の詳細図である。

40

【図19】本発明の1つの態様による柔軟な膜から除去される細胞を示す図である。

【図20A】核及びヘモグロビンの存在について解析した柔軟な膜上の細胞を示す図である。

【図20B】核及びヘモグロビンの存在について解析した柔軟な膜上の細胞を示す図である。

【図21】ヘモグロビンについて420nmの光を、核について蛍光を、及び両方を一緒に用いて解析した単層の一部を示す図である。

【図22】本開示による自動解析システムを用いた種々の単層の解析の結果を示す図である。

【図23A】胎児有核赤血球を同定する同じ単層の2つの画像の1つを示す図である。

50

【図23B】胎児有核赤血球を同定する同じ単層の2つの画像の1つを示す図である。

【図24A】基材から細胞を除去するための装置及びシステムを示す図である。

【図24B】基材から細胞を除去するための図24Aの装置の断面を示す図である。

【図24C】基材から細胞を除去するための図24Aの装置の断面を示す図である。

【図25A】基材から細胞を除去するためのシステムの一部であり得る構成要素を示す図である。

【図25B】細胞を受けるための組立てられた図25Aの構成要素を示す図である。

【図26】基材から細胞を除去するためのシステムを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0091】

10

一般的に、意味のある結論を引き出すために正確で、信頼でき、再現性のあるデータをもたらす胎児の状態の解析が必要である。疑わしい又は全く誤った結果を得ることは、容認することができない。そのような結果は、親の苦悩、誤った結論並びに危険かつ/又は不必要な検査若しくは処置につながり得る。いくつかの胎児細胞の解析(例えば、本明細書に記載したいくつかを含む)は、意味のある結論を引き出すための必要な高い質のデータを得るために高い質のDNAを必要とする。特に、DNAが、その自然環境外にある又は非常に少量で存在する若しくは低い濃度で存在する細胞中にある場合にDNAの質は、熱、ヌクレアーゼ、化学的処理及び他の因子によって容易に危険にさらされ又は破壊され得る。時間の経過、過度の操作並びに固定液及び染色液への曝露は、すべてDNAの質の低下の一因であり得る。したがって、試料から高品質のDNAを得るために、より少数のステップ及びより少ない操作が一般的に好ましい。

20

【0092】

胎児血液細胞の検出について詳細に述べたが、方法、材料、キット及びシステムは、血液試料から循環腫瘍細胞、幹細胞、赤血球又は他の細胞(例えば、まれな細胞)などの他の種類の細胞を取得し、解析するのにも有用であり得る。方法、材料、キット及びシステムは、組織試料からの分散細胞などの他の種類の細胞を取得し、解析するのにも有用であり得る。

【0093】

発育中の胎児に関する正確な遺伝情報を容易に提供するために、多くの課題を克服する必要がある。1つの課題は、発育中の胎児への害を防ぐことにある。他の課題は、妊娠女性への害を最小限にすることにある。他の課題は、解析を実施するための十分な量の胎児の物質を有することにある。他の課題は、高度に正確な遺伝子解析のためのすべての最低限の品質要件を満たす又は超える胎児の物質を一貫して得ることにある。他の課題は、様々な健康状態のいずれかを有する妊娠女性からの信頼できる胎児の遺伝情報を提供することにある。他の課題は、非常に小さい試料から高度に正確な結果を得るために特定の遺伝子解析の技術的限界を克服することにある。さらに他の課題は、費用対効果が高い方法で遺伝学的結果を提供することにある。これらの課題のいずれか1つに対処するための最善の方法は、他の目標のいずれかに関する負の又は破滅的な結果をもたらし得る。例えば、固定などにより胎児細胞の形態を維持する方法は、分子生物学試験に用いるDNAの修復不可能な損傷を引き起こし得る。要するに、胎児の遺伝子状態を判定することは、依然として課題である。

30

40

【0094】

パートI

濃縮方法

胎児細胞及び胎児DNAは、妊娠女性の血流中で循環する。発育中の胎児に関する遺伝情報を提供することへの1つのアプローチは、妊娠女性の血流からの胎児細胞を解析することである。このアプローチは、さらなる一連の課題をもたらす。血流中の胎児細胞の数は、母親細胞の数と比較して非常に小さい。また、母親の血液が胎児細胞を含むことを示す最初の提唱及び科学的報告がなされて以来何十年もの研究にもかかわらず、胎児細胞から発育中の胎児に関する遺伝情報を得る信頼できる方法は、実現されなかった。1つの課題

50

は、遺伝子解析のための十分な物質を供給するのに十分な数の細胞を得ることにある。発育中の胎児に関する情報を提供するために、費用を最小限にし、処理能力を最大限にするために、解析のために探査する必要がある細胞の数を減少させるための濃縮方法を用いることができる。1つの課題は、後の同定を可能にするのに十分な形態を有する対象の細胞を保持することにある。さらに、細胞のクラスとしての有核赤血球(nRBC)は胎児性又は母体性であり得るので、他の課題は、母親細胞と比べて胎児細胞に対して高い(例えば、ある状況ではより低い値を許容し得るが、100%)特異性を有するマーカーを開発することに集中する。他の課題は、胎児細胞の解析を実施することを可能にするのに十分な量の十分に高い質の胎児細胞物質(例えば、タンパク質、核酸)を保持することにある。再び、これらの目標の1つを達成する最善の方法は、これらの目標のいずれか又は上記の一般的な目標のいずれかに関する負の又は破滅的な結果をもたらし得る。

10

【0095】

歴史的には、この問題を様々な成功の程度で解決するために、多くの濃縮方法が単独又は併用で用いられてきた。図10(1~2)にいくつかのアプローチ及びこれらのアプローチで遭遇した問題点を要約する。上述のように、濃縮に利用できる方法は、有効な細胞の濃縮(又は分離)及び回収のためのシステムにつながらなかった。

【0096】

濃縮

母親血液は、胎児及び母親の両方に由来する有核(すなわち、遺伝物質を含む)及び非有核細胞の両方を含む。最も興味のある細胞に注意を集中するために、胎児遺伝子検査における第1のステップは、したがって、試料中の有核細胞を濃縮することであり得る。1つの既往のアプローチは、米国特許出願公開第2010/0159506に記載されている。赤血球は白血球より密度が高いため、全血試料から、有核赤血球を含む、単核細胞を分離するための単一密度勾配により、赤血球の予備的分離が得られる。次いで、試料をスライドに単層で加え、染色し、解析する。

20

【0097】

単純重力ろ過方法を用いることにより細胞を得るためのさらなる方法が開発された。方法は、白血球枯渇技術に基づくものであり、有核(例えば、本質的にすべての有核)細胞を保持し、二次的濃縮は必要でない。方法を特定の作用機序に限定するものでないが、細胞分離は、電荷の関数として起こると考えられる。方法は、迅速であり(有核細胞を非有核細胞から分離するのに約15分を必要とし得る)、非常に安価である。

30

【0098】

今日使用されているほとんどの白血球枯渇フィルターは、「深層フィルター」と述べることができる。深層フィルターにおいて、ポリエステル及びポリプロピレンなどの様々な種類の繊維が層に織り込まれて、血液細胞が通過するための「蛇行経路」を形成する。繊維織物の平均「細孔径」は、サイズなどの機械的特性により細胞を捕捉することを避けるために、かなり大きく、40 μ m又はそれ以上の程度である。それよりむしろ、捕捉機構は、負に荷電した白血球がファンデルワールス及び静電的力により繊維に結合又は引きつけられる、主として「接着」の機構であると思われる。繊維は、その自然の正電荷のために選択することができ、又は非常に特異的な電荷プロファイルを作るように、また十分な疎水性を保証するために被覆することができる。密度の高い織物層及び荷電繊維面と組み合わせられた全体的な大細孔径は、繊維に付着し得る場合には個々の細胞がより遅い蛇行経路をたどるにもかかわらず、血液が速やかに通過し得るフィルターを形成する。

40

【0099】

いくつかの実施形態において、白血球枯渇フィルターを用いたところ、有核赤血球(nRBC)及びより具体的には胎児有核赤血球(fnRBC)が大部分の白血球の負電荷より小さいが、大多数の一般的な赤血球(RBC)より大きい負電荷を有することが判断された。nRBC及びfnRBCは、RBC集団の小部分(電荷特性が重複する)及びもちろんすべての白血球とともに白血球枯渇フィルターに保持される。

【0100】

50

る過程が完了し、十分な数(例えば、多く、大部分又はすべて)の試料の白血球、nRBC及びfnRBCが捕捉された(RBCの集団とともに)後、「溶出」技術を用いて、フィルターに捕捉された細胞を回収する。電荷中和液(デキストラン)の溶液をフィルターに逆流させて、正に荷電した繊維から細胞を脱離させ、収集容器(例えば、管又はバッグ)に入れることができる。いくつかの実施形態において、逆流配管及び適切な弁構造をフィルターに連結させて、対象の細胞の回収を可能にすることができる。

【0101】

濃縮が完了したならば、いくつかの実施形態において、次のステップは、対象の細胞を同定することである。いくつかの実施形態において、fnRBCは、100%の特異性で同定される。方法は、陽性確認のための胚及び胎児ヘモグロビンに対する抗体の組合せを用い、陰性確認としての母親赤血球アイデンティファイアーとともに用いることができる。以下は、マーカーの組合せの理論にまつわる考察である。

10

【0102】

胎児細胞の同定

赤血球は、ヒトにおける循環血液細胞の大部分を構成する。正常な血液細胞は、以下のようなライフサイクルを有する。

【0103】

1. 前赤芽球: 大きな細胞、直径が15~20 μm 、2~3個の核を有する大きな核、細胞質が非常に少なく、好塩基性で核周囲にハコを有し、時々「耳状」バルジを形成し、核クロマチンは非均一である。

20

【0104】

2. 早期正赤芽球: わずかにより小さな細胞、直径が12~17 μm 、核のサイズの減少、核の消失、細胞質は、中等度に好塩基性で、高タンパク質及びRNA含量を有し、染色体の凝縮が起こる。

【0105】

3. 中期正赤芽球: 細胞の直径が12~15 μm で、核のサイズがさらに減少し、「車輪」の外観を有し、染色体がさらに凝縮し、細胞分裂が完全に停止し、細胞質が多染性であり、ヘモグロビンの出現が起こる。

【0106】

4. 後期正赤芽球: 細胞のサイズが減少し、直径が8~12 μm で、「インクの染み」状の核を有し、最終的に消失し、ヘモグロビンの量が増加し、細胞質又は濃縮核が好酸性になる。

30

【0107】

5. 網状赤血球: 細胞のサイズは直径が8 μm で、ミトコンドリア、ER、リボソームRNAの残存物により高度に分岐したパターンの形成、それ故に、網状赤血球と命名されている。

【0108】

6. 赤血球: 直径が7.2 μm 、厚さが1.7 μm で、両凹面を有する成熟したRBCで、核が存在せず、高ヘモグロビン含量のため、細胞の色は一般的にピンクがかった赤である。

【0109】

各ヘモグロビン分子は、それが含まれる赤血球と等しい、約100~120日の寿命を有する。各成熟赤血球は、通常26~34ピコグラムのHbを310~360g/Lの濃度で含む。

40

【0110】

ヘモグロビンは、すべての除核(核を含まない)赤色血液細胞(赤血球)及び有核赤色血液細胞(赤芽球)に存在する。該タンパク質分子は、肺から身体組織の他の部位に酸素を輸送し、組織から肺に二酸化炭素を輸送する。ヘモグロビンは、高レベルで発現することができ、赤血球の固体成分の最大95%に相当する。

【0111】

ヘモグロビン分子は、4つのポリペプチドサブユニット又は鎖及び4つのヘム基から構成されている。

【0112】

50

ヘモグロビンの構造

ヘモグロビンのグロビン画分は、2対のポリペプチド鎖、1対のアルファ様鎖及び1対の非アルファ鎖を含む。鎖は、ギリシャ文字(アルファ-、ベータ-、デルタ-、イプシロン-及びガンマ-)により呼称される。

【0113】

ヘモグロビンの様々な鎖が種々の妊娠期において発現する。

【0114】

ヘモグロビンの遺伝子発現

胚赤血球に存在する優勢なヘモグロビンは、胚ヘモグロビン(イプシロン鎖)であり、胚期後の胎児赤血球に存在する優勢なヘモグロビンは、胎児ヘモグロビン(ガンマ鎖)である。したがって、方法の一部は、イプシロングロビン及びガンマグロビンに対する抗体の組合せを用いることができる。生じ得る干渉の原因は、正常成人の赤血球の一定のパーセント及びガンマグロビンの発現を促進するある種の状態に罹患した成人の赤血球の一定のパーセントに存在する、ガンマグロビンを含む細胞と定義されるF細胞によってもたらされる。

10

【0115】

正常成人:F細胞は、すべての成人に低い濃度で存在すると考えられている。1個の細胞当たりのガンマグロビンの量は、低い(例えば、<15%)が、胎児細胞の1個の細胞当たりのガンマグロビンの量は、高い(例えば、>90%)。これは、閾値法アルゴリズムにより母親F細胞からfnRBCを区別することを可能にするものである。

20

【0116】

罹患成人:F細胞は、ガンマグロビンの発現を促進する状態に罹患した成人にも存在する。各場合に、発現ガンマヘモグロビンのレベルが低く、閾値法を適用することができるか、又は発現のレベルが高く、陽性発現細胞の数に基づいてこれらの試料の排除を可能にする大濃度の母親細胞で優勢である。

【0117】

開発されたアルゴリズムは、母親RBC及び母親F細胞と比較して胎児細胞に対して特異的であるが、方法は、また、若しくは別法として、標的細胞が胎児細胞であって、母親細胞でないことを確認するために、母親細胞赤血球に特異的である第3の面マーカーである炭酸脱水酵素を用いる。

30

【0118】

母親F細胞干渉(図12参照)

一般的に、閾値法は、抗体染色について陽性又は陰性である細胞の区別のために(非特異的)バックグラウンド染色を効果的に差し引くために実施した。しかし、閾値法は、汚染に起因する非特異的染色又は標的の濃度が異なるレベルである場合の特異的染色を除外する目的では以前に用いられなかった。

【0119】

方法は、バックグラウンド、非特異的染色及び母親F細胞の特異的染色の存在下で胎児細胞を同定するために以下の技術を用いるものである。

【0120】

バックグラウンド:単純閾値法によって母親有核細胞上に存在するバックグラウンド染色を「差し引く」。

40

【0121】

非特異的染色:それが細胞であるかどうか、それが核を有するかどうか及びそれが細胞質を有する単核細胞であるかどうかを判定することによって非特異的染色を形態学的に同定する;420nmのもとで物体を検査することによりそれがデブリであるかどうかを判定し、それがすべての蛍光チャンネルで同じパターンで「染色される」かどうかを判定することによって非特異的染色を光学的に同定する。

【0122】

母親F細胞の特異的染色:特異的であるが、低いレベルの染色を呈する母親F細胞を単純

50

閾値法によって効果的に差し引く；多数の高発現するF細胞が「正常」患者に存在する試料について「罹患」しており、解析可能でないという除外基準を用いる。

【0123】

技術的課題が胎児有核赤血球の濃縮及び同定に集中しているが、濃縮法により、個別に解析する必要がある多数の細胞が得られることを考慮すると、これらの解決策を商業的に実現可能な方法に向けることも技術的課題をもたらす。したがって、多数の細胞を取り扱い、評価することに関わるシステムを構築する必要がある。1つの解決策は、胎児物質を含む試料、濃縮(非有核RBCを除去、有核細胞を保持)、安定化(形態を維持し、単層を可能にする)、単層(重複を最小限にすることによって有核細胞へのアクセスを保証する)、固定(遺伝子解析のためのDNAの生存を維持し、抗体染色を可能にする)、抗体染色(閾値法を可能にするためにシグナルのダイナミックレンジを拡大する)、走査法(均一な照射及び一貫性のある焦点をもたらす)、画像解析(閾値シグナルにアルゴリズムを適用する)、胎児細胞の同定(胎児細胞を確認するためのヒトレビュー)、胎児細胞抽出(同定済み細胞の市販のレーザーキャプチャーなどのキャプチャー)、DNA抽出、断片化、及び増幅(市販のキットを用いることなど)、精製(市販のキットを用いることなど)、遺伝子解析(市販のシステムを用いることなど)を含む。本発明から逸脱することなく、ステップを除外若しくは変更することができ又は新たなステップを加えることができる。ステップは、以下を含み得る。

10

【0124】

1. 20mlの母親血液をACDaバキューターチューブに採取することができる。EDTAを含める又は加えることができる。試料は、採取してから24時間以内に処理することができる。試料は、室温超、室温未満又は室温で保存することができる。室温超での保存は、劣化につながり得る。1つの例において、試料をほぼ室温(約24 ;約20 ~25 の範囲)に維持する。

20

【0125】

保存及び輸送:24時間を超える未遠心分離血液の保存は、試料の望ましくない変化をもたらし得る。例えば、血液濃縮をもたらす細胞内への水の移動、細胞内成分の漏れ及び凝固に起因する分析物の著しい変化が起こり得る。胎児細胞は、脆弱であり、したがって、これらの有害な変化をより受けやすい。

【0126】

2. 1つの実施形態において、単純ろ過による赤血球の予備的分離により、全血試料から有核赤血球を含む有核細胞を分離する。ろ過に用いるろ過装置は、あらゆる手段(例えば、サイズ、電荷又はイオン相互作用、非イオン性相互作用)により細胞を保持し得る。1つの実施形態において、フィルターは、電荷により有核細胞を保持する。流体を加えて、フィルターから細胞を除去することができる。流体は、フィルターから細胞を溶出するために細胞の面上(及び/又はフィルター上)の電荷を中和又は緩衝する役割を果たし得る。

30

【0127】

デキストラン及び糖:デキストランは、グルコースモノマーから製造される中性分枝多糖である。デキストランは、フィルター膜から白血球及び他の血液細胞を放出させる目的を果たし得る。細胞は、最初に細胞膜と荷電フィルター面との間の電荷親和性により収集することができる。デキストランは、非荷電であるが、細胞と荷電面との間のこの相互作用を減少させ、細胞を可溶化する役割を果たし得る。デキストランはまた、塩及び二糖による結晶化の程度を低下させ得る。トレハロース及びマルトースなどのその他の糖をその後の洗浄ステップに用いることができる。トレハロース及びマルトースは、バイオペラゼーション時の膜の安定性を改善するための物質として文献において公知の二糖である。二糖は、水素結合に起因するリン脂質二重層の相挙動に対して好ましい効果を有すると考えられている。これらの有益な効果は低温保存などの種々の状態時に認められたが、二糖は、遠心分離時の細胞膜の完全性の保存に有益な効果を有すると考えられる。いくつかの実施形態において、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を溶出液として用いることができる。

40

【0128】

50

3.細胞の完全性及び形態を保存するために安定化剤を用いることができる。単独又は組み合わせて加えることができる安定化剤及び他の物質の例は、以下を含むが、それらに限定されない。

【0129】

RNA Stable:細胞ペレットをRNA stable(Biomatrixia)を含む遠心管に移すことができる。該製品は、室温における核酸を含む試料を安定化するための安定化剤、非常に少量のフェノールレッド色素及びEDTAを含む。この製剤中の物質は、水溶性であり、スライドを処理した後に残存しないと思われる。

【0130】

フッ化ナトリウム:PBS中フッ化ナトリウムは、ペレットの再懸濁溶液に用いることができる。フッ化物塩は、変性の予防にタンパク質を安定化するのに有効である。この塩は、血液試料に対する二重の作用を有し得る。これは、血液の凝固作用又は凝固を防ぐためにシュウ酸とともに用いることができ、第2に、血液中のグルコースの分解に關与する糖分解酵素を阻害し得る。

【0131】

Numatrix:Numatrix(QC Sciences)は、細胞の広がり促進し得る。Numatrixは、約2重量%の高分子量ポリエチレンオキシドポリマー及び5%のエタノールを含む。ポリエチレンオキシドは、非常に生体適合性があり、非イオン性の高度に可溶性のポリエーテルである。細胞ペレットにおいて、ポリマーは、細胞を覆い、封入し、細胞面の親水性の破綻が最小限であると考えられている。広げる前にポリマーを懸濁液に混入することにより、懸濁液に試料にわたりより一貫性のある粘度を持たせることができる。粘度は、単層の密度及び沈着速度と相関する重要なパラメーターであり得る。より一貫性のある粘度を生ずることに加えて、ポリマーは、沈着しつつある細胞間の結果として生ずる相互作用及び面をより滑らかにし得る。より滑らかな面は、より均一な単層を得、面上に沈着しつつある細胞に対するせん断応力を減少させる助けとなり得る。少量のエタノールを混入し、初期の蒸発の速度を増大させることができる。

【0132】

トレハロース及びマルトースを含むDxH希釈剤:マルトース及びトレハロースを含む一定の容積のDxH溶液を懸濁液に加えることができる。二糖は、上述の同じ有益な理由のために保存剤に加えることができる。その理由は、遠心分離の前に存在する糖の大部分が細胞ペレットから傾斜され、したがって、追加を必要とするためである。DxH希釈剤(Beckman Coulter)は、相対量の減少する順序に硫酸ナトリウム、イミダゾール、塩化ナトリウム及びテトラカインHCLを含む。硫酸ナトリウム及び塩化ナトリウムは、溶液を血液細胞の適切な等張性希釈剤とするために含めることができる。イミダゾールは、非特異的結合を低減するためにヒスチジン塩基結合アッセイにおける洗浄に用いられる複素環式塩基であり、抗菌剤である。テトラカインHCLは、タンパク質のカルシウムの自発的放出を抑制する化合物である。

【0133】

4.試料を次いで、単層技術を用いてスライドに単層として加え、その後に風乾することができる。1つの目的は、重複なしに大部分又はすべての保持された細胞へのアクセスを維持することである。

【0134】

1つの目標 - 5000:1 ~ 1:10 RBC:WBC:濃縮により得られる胎児有核RBCの数を最適化するようにフィルター、試料の処理又はフィルター溶出プロトコールを選択することができる。母親血液試料からのより多くの又は本質的にすべての有核胎児赤血球を保持するために、比較的により高い数の非有核赤血球も保持される可能性があるか又はより少ない数が保持される可能性がある。したがって、5000:1 ~ 10:1、10:0 ~ 1:1、1:1 ~ 1:10のRBC:WBCの比を選択することができる。

【0135】

1つの目標 <2:1 RBC:WBC:機械的に広げられた単層の質は、とりわけ広げられる細胞混合

10

20

30

40

50

物のレオロジーの関数であり得る。本明細書で述べた血液塗抹法の1つの実施形態により、約2個の赤血球対1個の白血球の組成をいくつかの用途のために最適化することができる。より高い赤血球の比率では、間のより大きい自由ガラス空隙面積により細胞の二次元分離の傾向がある可能性がある。さらに、試料中に約1億2千万個の白血球が存在するため、より高い赤血球の比率は、実質的により大きい面積とより多数の細胞を走査し、解析しなければならないことを意味する。赤血球の濃度が小さすぎる場合、二重層及び細胞の積み重なるの発生頻度が増加する可能性がある。赤血球のサイズと形状が一貫していること及びそれらの沈降の傾向がより強いため、赤血球を白血球と約2:1の比率で混合するとき、場合によってより良好な単層が得られる可能性がある。

【0136】

レオロジー的利点に加えて、赤血球は、白血球の間の自然のスペーサーを構成する。本明細書及び2011年3月11日に出願した同時係属特許出願第13/046,543号に記載されている探査アルゴリズムは、有核細胞の領域を同定する。自然のスペーサーとしての役割を果たす赤血球により、個々の有核細胞をより十分に識別することができ、標的胎児細胞は、隣接する有核細胞からの核の汚染物を伴うことなく周囲の細胞からより容易に単離することができる。

【0137】

5. 後の解析のためにDNAの生存能力を維持し、抗体標識まで凍結するために、細胞を非架橋性固定剤を用いて固定することができる。Streck(STF)は、非架橋性薬剤であり、アルデヒド固定剤(例えば、ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒド)と異なり、さもなければ抗原の可用性及びプローブの浸透に影響を及ぼし得るタンパク質又は核酸の架橋は存在しない。STFは、アルコール性溶液に他の試薬とともに尿素を含む。尿素は、タンパク質を完全に巻き戻すのではなく、構造を不安定にすると考えられる弱い変性剤である。アルコール性溶液は、細胞膜を越える浸透及びスライドへの細胞/組織の固定を促進し得る。アルコールは、弱い固定剤であり、潜在的にタンパク質を変性/不安定化し、それらを粘着性にし得る。STF中に緩衝、浸透圧安定性のための他の薬剤、媒染剤、核定義及び浸透剤が存在する。

【0138】

6. 抗体標識は、予想される濃度のヘモグロビン(例えば、胚又はガンマ)又は妊娠中の他の細胞マーカーを標識するように最適化された方法を用いて行うことができる。後の走査時間を短縮するために増幅法を用いてシグナルを増大させることができる。

【0139】

7. 走査時間を短縮するように設計された、走査システムは、画像を取得するために用いることができる。システムは、曝露時間の短縮及び波長の多重化のためのチャンネルの独立した均衡を可能とする、高強度、狭帯域、多色励起源を含み得る。走査時間をさらに短縮する、高解像度の画面カメラを低倍率で画像を取得するために用いることができる。

【0140】

8. 本明細書で述べたものを含む、アルゴリズムを用いることができる。アルゴリズムは、さらなる解析又は後のヒトレビューのために可能な標的のリストを提供し得る。方法は、バックグラウンド及びガンマグロビンの発現が低い母親F細胞干渉を越えるシグナルを評価するために用いることができる。

【0141】

9. 操作者は、ヒットを評価し、策定された受入基準に基づいて細胞がfnRBCであるかどうかを判定することができる。受け入れられた細胞のX、Y座標のリストを後の処理のために保存することができる。

【0142】

10. 市販のレーザー捕捉システム又は他のシステムを用いて、基材から細胞を抽出することができる。

【0143】

11. 市販のキットをDNA抽出、断片化及び増幅に用いることができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 4 】

12.在庫の精製カラムを増幅産物を精製するのに用いることができる。

【 0 1 4 5 】

13.材料は、アレイCGH法により採取することができる。

【 0 1 4 6 】

プロトタイプのシステムを用いて、胎児マーカーの感度及び特異性に関する実現可能性データを収集した。該システムを用いた結果を図14に示す。該システムは、同定された細胞の胎児性(fetal-ness)を確認するためにX, Y FISH後抗体標識(X, Y FISH post antibody labeling)を含むように修正した。公知の男性試料上のYプローブを標準として用いる。

【 0 1 4 7 】

フローサイトメトリー

母親循環中のfnRBCの同定及び単離のために初期の濃縮技術及び胎児細胞の同定の方法が有効となる。「これを行う他の方法が存在するのか」という疑問が大学及び職業研究者を30年間悩ませた。フローサイトメトリーは、まれな細胞を含む細胞の選択のための強力な手段である。いくつかの現在のシステムは、20mlの全血からの1000億個の細胞を処理するのに必要な時間が並外れて長く、約2ヵ月であるので、一次濃縮を実施するためには遅すぎる可能性がある。しかし、方法を迅速化することができ、より少数の細胞を場合によって解析することができ、又は方法を本明細書で述べる方法のいずれかと組み合わせることができる。最初の濃縮の後(例えば、ろ過の後)の細胞の同定及び単離の代替法は、フローサイトメトリーであり得る。

【 0 1 4 8 】

しかし、細胞塗抹標本上の細胞の同定(例として抗体標識を用いた、ただし、この方法は任意の同定法に適用できる)は、フローサイトメトリーと比較して以下の利点を有し得る。

【 0 1 4 9 】

1.フローのための抗体標識は、アレイCGHの質に有害であり得る苛酷な固定と次に苛酷な浸透化を必要とし得る。

【 0 1 5 0 】

2.フローのための抗体標識は、溶液中で行うことができる。溶液ベースの方法は、追加の(例えば、6回の追加の)洗浄ステップを必要とする可能性があり、洗浄ステップは、それぞれが、苛酷であり、細胞損失、形態学的損傷及び凝集をもたらす可能性がある、遠心分離ステップを伴う。

【 0 1 5 1 】

3.フロー選別の特異性は、100%でない可能性があり、汚染の可能性は高く、これは、細胞の種類を確認するための可視化ステップ及び染色を必要とする可能性がある。したがって、フロー選別細胞は、基材への適用及びその後の抽出又はマイクロウエル技術への適用を依然として必要とする可能性がある。マイクロウエル技術は、収率の問題を免れ得ない。

【 0 1 5 2 】

4.既往のデータは、不十分な収率及び再現性を示した。

【 0 1 5 3 】

パートII

白血球枯渇フィルターは、全血から血液製剤をろ過するために用いることができる。白血球枯渇フィルターに関する情報は、以下に見いだすことができる:米国特許第5,676,849号;米国特許第5,662,813号;米国特許第6,544,751号;米国特許第4,923,620号;米国特許第4,925,572号; Comparison of Five Different Filters for Removal of Leukocytes from Red Cell Concentrates; VOX Sang 1992/62巻、76~81頁; Recovery of Human Leukocytes from a Leukodepletion Filter; Changら、J. Transfusion、1992/32頁(85); Recovery of Functional Human Lymphocytes from Leukotrap Filters; Longleyら、J. Immunological Methods、1999/121巻、33~38頁; Biotechniques、31巻、464~466頁(2001); S. Eb

10

20

30

40

50

nerら、J. Immunological Methods、2001(252)、93～104頁。例えば、米国出願公開第2011/0311960号、米国出願公開第2012/0021508号及び国際公開第2011/14055号を参照のこと。本発明の1つの態様において、そのようなフィルターは、非有核血液細胞から有核血液細胞を分離するのに用いることができる。

【0154】

1つの実施形態によれば、方法の第1のステップは、ろ過である。入ってくる血液試料を白血球枯濁フィルターを用いてろ過する(例えば、採取してから24時間以内に、好ましくは12時間以内に)。適切な白血球枯濁フィルターは、Pall Corporation製のPureCell(商標) Select Systemである。

【0155】

特化化学(custom chemistry)をろ過工程中の細胞懸濁液に用いることができる。該化学は、トレハロース、マルトース、デキストラン、プソイドエフェドリン、並びにフッ化物の塩、リン酸塩及び/又は硫酸塩を含み得る。該化学は、製造業者の推奨する方法を用いて処理中の細胞の分解に関連する問題に対処する可能性があり、最終試料中の細胞の形態を改善し、特有のDAPI+420nmイメージング工程を可能にする可能性があり、細胞が大面積単層に均一に広がる能力を改善する凝集及び球状化を低減し、細胞を安定化し、ろ過工程の開始と単層の形成との間の時間に関してより多くの余裕を与え、細胞破壊及びDNAの懸濁液中への放出を低減する。該化学は、大都市センターの近くでない地域の医師に試験を開放することによって候補患者の集団を拡大することとなる、血液採取と処理との間の許容時間を延長させるためにも用いることができる。

【0156】

図1～図2に本発明の1つの実施形態によるフィルターシステムを用いて血液試料からの胎児有核細胞を濃縮するための方法及び装置を示す。有核母親及び胎児有核赤血球などの胎児有核細胞7を含む赤色血液の様々な成分を含む母親血液試料6がバッグ4に含まれている。配管8を収集バッグ30に接続している弁28及び配管20を溶出用配管26に接続している弁24は、閉じている。配管8をフィルター12に接続している弁10は、開いており、血液試料6は、フィルター12を通る。有核胎児細胞7を含む、収集を目的とする細胞14は、フィルター12上に残るが、一部の成熟網状赤血球を含む、不要な血液製剤18は、フィルター12を通過し、廃棄物収集バッグ16に収集される。

【0157】

不要な血液製剤18(例えば、大部分の非有核細胞)がフィルターを通過した後、フィルター上に留まっている有核細胞集団は、亜集団としての対象の細胞であるnRNCを含んでいる。一部の非有核赤血球を含む、他の細胞もフィルター上に留まっている可能性がある。後期のステップ中に存在する一部の非有核赤血球を有することは、塗抹標本の質を改善し、且つ/又はより均一な単層を可能にする可能性がある。図2に示すように、弁10及び22は、閉じている。溶出溶液40を含む注射器36は、配管26に取り付けられている。弁24及び弁28は、開いている。溶出液40は、フィルター中に逆に押し込まれ、有核細胞7をフィルターから放出させる。フィルターの製造業者により推奨されているような溶出液を用いることができる。或いは、本発明の1つの態様は、フッ化ナトリウム若しくはカリウム(例えば、0.01～100mg/mL)、プソイドエフェドリン(例えば、0.1～100mg/L)、EDTA(例えば、1～10mM)、ACD-A(酸性クエン酸ブドウ糖(例えば、0.01～20%))、トレハロース(例えば、0.01～10g/L)、マルトース(例えば、0.01～10g/L)、デキストラン(例えば、0.01～10.0%、10,000～150,000ダルトン;例えば、1例において70,000ダルトン)、Pluronic(登録商標) F-68(例えば、0.001～10mg/mL)、硫酸ナトリウム若しくはカリウム(例えば、1～100mM)、リン酸水素ナトリウム若しくはカリウム又はリン酸二水素ナトリウム若しくはカリウムの混合物若しくは塩(例えば、1～100mM;約5～約9の範囲のpH)及びTetronic(登録商標) 1107(1～100mM)の1つ又は複数を含む溶出液の使用を含む。1つの実施形態において、溶出溶液は、約25mLのリン酸緩衝溶液(PBS)中約25mgのマルトース及び約75mgのトレハロースを含む。溶出液40及び細胞7は、収集バッグ30中に収集されて、濃縮胎児有核細胞集団42を生ずる。これらの放出された細胞及び溶出液を収集する(例えば、バイアル中に)。

10

20

30

40

50

【0158】

ろ過及び細胞放出工程を自動化するために、機械装置を提供することができる。機械装置は、フィルターシステム中を移動する流体の流量、圧力及び量のいずれか又はすべてを制御し得る。図3に弁10、28、22及び/又は24を経る試料、廃棄物、溶出液及び/又は胎児有核細胞を含む溶出液の流量を制御するように構成された本発明の実施形態による制御装置70を示す。0.2~50ml/秒に等しい流量を用いることができる。フィルターシステム中を移動する流体の容積は、5mL~500mLであり得る。流量を制御することは、回収される細胞集団に対して重大な影響を及ぼすものであり、流量がろ過時に高すぎる場合、対象の細胞がフィルターの深部に押し込まれ、そのため、それらを回収することがより困難となる可能性がある。また、流量がろ過、バックフラッシュ及び/又は溶出時に高すぎる場合、細胞は、流体力学的力による損傷を受ける可能性がある。流量が放出バックフラッシュ時に低すぎる場合、対象の細胞は、回収されない可能性があり、フィルターに捕捉されたままとなる可能性がある。ろ過及び細胞放出工程を自動化するための機械装置は、ろ過装置中の流体流路を一連の弁及びマニフォールドにより制御することができる、コンピュータ制御弁及びポンプシステムを含み得る。特に十分に適合する弁の1つのタイプは、ピンチチューブ弁である。その理由は、それが流体と接触せずに流体の流量を制御することができるためである。これは、試料間の交差汚染を回避するため、また弁のような高価な構成部品を廃棄又は洗浄する必要がない完全に使い捨てるろ過システムに役立つために有利である。ろ過装置中の流動は、流量及び流速プロファイルの両方をコンピュータハードウェア及びソフトウェアにより設定し、制御することができるような重力及び機械的ポンプシステムの組合せにより達成することができる。

10

20

【0159】

機械装置はまた、方法の再現性を改善し、サイクル時間を短縮し得る。例えば、自動化は、試料の取扱いの標準化を維持しながら高速処理を可能とし得る。また、ろ過工程は、工程中の弁、容積及び流量の制御を必要とする。自動化は、操作者/技術依存的変動を最小限にする。いくつかの実施形態において、容積、圧力及び/又は流量を制御するための機械装置は、シリンジポンプを含み得る。例えば、該ポンプは、特定の容積の流体を含み、特定の時間内に排出させ得る。特定の例として、30mLを3秒でろ過システム中に排出させ得る。ポンプは、手動ポンプ或いはコンピュータ及び/又はモーター作動ポンプであり得る。

30

【0160】

次のステップは、遠心分離による濃縮であり得る。細胞は、遠心分離の前に染色し、計数することができる(例えば、細胞数の尺度としての懸濁液の光学濃度を用いる)。別法として、又はさらに、細胞数は、遠心分離の前に染色を用いて又は用いずに血球計算により測定することができる。別法として、又はさらに、細胞は、遠心分離の後に染色することができる。細胞を遠心管(例えば、約50mlの希薄細胞懸濁液の総容積を有する)に採取した後、管を遠心分離機で遠心分離機で遠心して(例えば、室温で500xgで15分間)、細胞を管の底部におけるペレットに濃縮する。得られるペレットの容積は、約100 μ l~300 μ lである。遠心前の懸濁液中の細胞の数を計数することに加えてさらに、遠心分離の前に細胞を染色することが可能である。

40

【0161】

例えば、懸濁液の光学濃度を用いることにより又は血球計算板を用いることにより遠心前の懸濁液中の細胞数を測定することによって、上清の除去の自動化並びに安定化剤及び染色剤(例えば、0.01~20%ACD-A、0.01~10%の10K~400Kダルトンデキストラン、1~10mMEDTA、0.01~10g/Lマルトース、0.1~100mg/mLブソイドエフェドリン、0.01~10g/Lトレハロース、0.01~100mg/mLフッ化ナトリウム若しくはカリウム、1~100mMリン酸ナトリウム若しくはカリウム、及び/又は1~100mM硫酸ナトリウム若しくはカリウム)の添加の自動化が可能となる。1つの実施形態において、安定化流体は、硫酸ナトリウム(1L当たり約20g未満)、塩化ナトリウム(1L当たり約2g未満)、イミダゾール(1L当たり約3g未満)、フッ化ナトリウム(1L当たり約2g)及びブソイドエフェドリン(1L当たり約0.1g未満)を含み得る。

50

場合によって、遠心分離後に細胞数を測定することは、容積が非常に小さく、光学濃度が非常に高い(不透明)であるため、細胞数の大きな誤差につながり得る。別法として且つ/又はさらに、懸濁液のpH又はイオン強度を濃縮後に、ただし遠心分離前に調節することができる。別法として又はさらに、イオン性又は非イオン性界面活性剤を濃縮後且つ遠心分離前に加えることができる。

【0162】

遠心分離の前に懸濁液に加える安定化剤及び染色剤の容積を自動化することによって、染色剤及び安定化剤がより均一な様態ですべての細胞に到達し、作用することが可能となる。場合によって遠心分離後に染色剤及び安定化剤を加えることによって、細胞が既に凝集し始めており、ペレット中の固体対液体の大きい比率が添加物の均一な分布の妨げとなり得るため、不均一な染色及び安定化がもたらされる可能性がある。

10

【0163】

単層の作製の前に核染色剤を加えることによって、走査を可能にするのに必要な処理ステップの数が低減する。場合によって、単層を作製した後の染色では、試料の処理に複雑さ、取扱い及び費用を追加する固定ステップが必要となり、細胞の形態が変化し、自動デジタル顕微鏡法の有効性が低減する可能性がある。

【0164】

遠心分離後に除去される上清の量の自動化によって、単層を作製するのに用いる最終細胞懸濁液の再現性が改善する可能性がある。単層懸濁液の固体対液体の比率を標準化することによって、各基材上の細胞のより均一な分布が得られ、スライド上の個々の塗抹標本間の変動も改善される。細胞分布の均一性を最大限にすることによって、1つのスライドの結果を単一患者セットにおけるすべてのスライドに外挿することが可能になる。結果を正確に外挿するこの能力は、より少数のスライドをイメージングシステムにかけなければならないことと患者当たりの必要なサイクル時間が短縮されることを意味する。さらに、懸濁液密度の厳格な制御によって、自動デジタル顕微鏡法に供する適切な細胞密度を有する単層の作製への試行錯誤アプローチの必要が最小限となるか又は無くなる。

20

【0165】

いくつかの実施形態において、遠心分離機での濃縮の後に、細胞を再懸濁する。細胞数を必要な最終液体容積のガイドとして用いて、所望の総容積のみがバイアルに残るまで、不要な懸濁液流体を遠心バイアルから除去する。残りの上清及び細胞を次に緩やかに混合する(例えば、攪拌又はピペットを用いた反復吸引及び分散サイクルにより)。遠心分離前細胞数に基づく上清の自動除去によって、自動デジタル顕微鏡法及びまれな細胞の同定のために最適化されている単層の作製が可能となる。細胞は、基材上に細胞の層を調製するのに適する組成で再懸濁することができる。細胞は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、フッ化ナトリウム、Coulter(登録商標)希釈剤(DxH)、アルコール(例えば、イソプロパノール)及び/又はアルコール性アガロース(例えば、QC Sciences NuMatrix(商標))に再懸濁し且つ/又はさらに準備することができる。別法として且つ/又はさらに、再懸濁ペレットの組成は、固体対液体の比率を調節することにより、粘度を変化させるためにポリエチレンオキシドなどのポリマーを加えることにより、pHを変化させるために緩衝剤を変更することにより、細胞の面親和性に影響を及ぼすために接着促進剤又は接着抑制剤を加えることにより、封鎖二価陽イオンにキレート化剤を加え、イオン強度を変化させることにより、制御することができる。

30

40

【0166】

次に、単層を作製する。単層は、いずれかの方法又はいずれかの装置を用いて作製することができる。単層は、塗抹用具を用いて作製することができ、又は自己集合させることができ、又は両方により作製することができる。単層を作製するための細胞の試料は、非生細胞(例えば、固定細胞)又は生細胞又は両方を含み得る。単層は、任意の面上に作製することができる。いくつかの実施形態において、細胞の生存能力は、単層を自己集合させるステップにより維持することができる。

【0167】

50

単層を作製するための1つの実施形態において、再懸濁ペレット(又はフィルター溶出液)を基材上に分注する。単層が形成されることを可能にし、それにおける解析を実施することを可能にする、ガラス、ポリn-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)、パーマノックス、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート(PETG)、ポリスチレン及びサーマノックスなどのあらゆる基材を用いることができる。面は、ガラス基材上のペグ化(ポリエチレングリコール被覆)又は共有結合面などの異なる基材上の官能化面であり得る。いくつかの実施形態において、単層を作製するための基材は、透明な硬質面である。透明な面は、光が通ることを可能にするものであり、これは、いくつかの実施形態において例えば、基材の下から光を照射又は検出するような光学解析を実施するのに有用である。1つの例において、標準的な顕微鏡スライドの厚さの透明ガラスを用いる。自動塗抹用具を用いて、単位面積当たりの細胞の数を最大限としながら細胞のクラスタリング及び重複を最小限にする方法で、この液滴を基材面にわたり均一に広げる。図4及び図7に本発明のいくつかの実施形態による細胞塗抹用具50の変形形態を示す。濃縮胎児有核細胞の試料52を面54上に置く。細胞塗抹用具制御装置60により細胞塗抹ブレード56を濃縮胎児有核細胞の試料52にわたり移動させて、面54上に細胞66の層を作製する。

10

20

30

40

50

【0168】

以前の自動塗抹用具は、1軸における単一機構線速度運動(例えば、スライドのY長軸に沿った)によってのみ動かすことによって血液塗抹標本を作製するために歴史的に用いられてきたヒトの動作を単に再現したものであった。本発明の1つの態様において、自動塗抹用具は、単層塗抹標本を本質的に作製しながらX及びYの両方に移動する。コンピュータソフトウェアにより制御されるステージ(例えば、XYモーター駆動ステージ)の運動パターンは、独特である。いくつかの実施形態において、運動は、スライドのX短軸を横断して前方に進む。X短軸運動の使用は、塗抹標本の実際の前方への運動が始まる前に塗抹標本スライドに沿って懸濁液を構築する際に有益であり得る。いくつかの実施形態において、ソフトウェアは、オープンループで作動する(細胞密度をモニターせずに)。

【0169】

他の実施形態において、細胞密度をモニターする。図4において、光62が細胞66の層を照射し、画像が検出器64により捕捉され、細胞密度を測定するために用いられる。1つの実施形態において、検出器64からのフィードバックは、面54上の細胞66の密度を制御するために細胞塗抹ブレード56のパラメータを変更するように制御装置60をガイドするために用いる。塗抹標本の密度は、例えば、青色光(ヘモグロビンにより吸収される)又は赤色光(すべての細胞を測定する)を用いることによってモニターすることができた。光のより高い減衰は、より高密度の細胞層を示すものであり、より低い減衰は、より低密度の細胞層を示すものである。いくつかの実施形態において、システムは、単層の均一性が維持されることを保証するために実時間における塗抹標本の角度及び/又は塗抹標本の速度などのパラメータを変化させるように構成されている。

【0170】

自動塗抹用具は、基材に単位面積当たり加えられる細胞の密度を制御するために単層塗抹工程中にその速度を変化させる。ソフトウェア速度は、例えば、0.1mm/秒から500mm/秒まで変化し得る。ソフトウェアは、同じであるか、又は互いに異なってもよい塗抹用具の開始速度及び終了速度を有し得る。開始速度と終了速度が異なる場合、塗抹用具は、塗抹工程中に実時間で速度を自動的に変更し得る。変化の速度は、直線的又は指数関数的であり得る。それはまた、塗抹中に正弦波的に変化又は他の連続関数を用いて変化し得る。自動塗抹用具は、最初の液滴の収集を最適化し、塗抹標本の主方向に対して多少垂直に広げる。これにより、塗抹標本の主方向に対して垂直な塗抹標本の全体的な均一性が改善され得る。

【0171】

自動塗抹用具は、懸濁細胞集団の均一性及び単位面積当たりの細胞集団分布の均一性を改善するために塗抹工程中にジグザグパターンで移動し得る。自動塗抹用具は、1"x2"又は5"x5"(125mmx125mm)などの任意のサイズの塗抹標本を作製し得る。

【0172】

塗抹用具は、細胞を分配することを促進するあらゆる運動を有し得る。塗抹用具は、最初の細胞液滴の収集時及び実際の塗抹工程自体の期間中の両方においてX及びY方向の両方に移動し得る。塗抹用具の運動は、円状、ジグザグ、前方、後方、前方又は後方運動を伴わない左右、対角線、蛇行(+Xに移動、+Yに移動、-Xに移動、+Yに移動、繰返し)であり得る。これらの運動は、次の2つの理由で有用である。すなわち、それらは、塗抹用具の面全域でメニスカスの高さを一様にし、塗抹標本の主軸に垂直な方向の細胞密度の均一性を改善する。第2に、開始及び停止運動は、細胞を懸濁液中に上方に移動させる助けとなり、塗抹用具の背後のメニスカス内の細胞集団の分布の均一性を改善する。

【0173】

自動塗抹用具は、使用者が塗抹速度、速度プロファイル、交差運動Y軸懸濁液パラメーター及び運動距離などのパラメーターを設定することを可能にするGUIにより制御することができる。パラメーターは、最初のテスト塗抹標本に基づいて設定し、保存することができる。

【0174】

塗抹用具は、刻み目のある端若しくは研磨された端を有していてもよく、又は非電荷若しくは様々な面電荷を有していてもよい。塗抹用具及び/又は塗抹スライドは、ガラス又はガラス以外の材料製であり得る。

【0175】

いくつかの実施形態において、単層は、部分的又は完全に自己集合性であり得る。濃縮され、希釈され、濃縮され、染色され、且つ/又は本明細書で(上で)述べた方法及び/又は材料のいずれかを用いるなどにより他の方法で処理されていてもよい、母親血液の試料を基材上に置くことができ、移動又は広げて、それにより、単層を自己集合させることができる。試料の(及び後の単層の)細胞は、生存若しくは非生存であってもよく、又は混合(生存及び非生存)であってもよい。細胞は、いずれかの原理に基づいて単層に自己集合し得る。例えば、細胞は、移動し得る(例えば、基材にわたってはう、他の細胞を通り過ぎてはう、拡散により移動し得る、対流により移動し得る、沈降し得る等)。基材は、相対的に不動の状態に保つことができ、又は単層の自己集合中に移動させることができる。基材は、単層の形成を促進するために単層の自己集合中に細胞に対して揺らし、旋回させ又は傾斜させることができる。細胞は、溶液を運動させる又は溶液を基材にわたり引っ張ることなどによって、基材に対して動かすことができる。いくつかの実施形態において、細胞が単層内で積み重なっている(例えば、細胞の望ましくない積み重なりは、赤血球の上の白血球を含むことがあり得る)場合に上の細胞が下にある細胞からたたき落とされるように、基材は、最初の基材形成の後に動かすことができる。下文で述べるように、対象の細胞が同定されたならば、対象の細胞を可視化しながら基材を移動させて、対象の細胞が実際に対象の細胞の特性を模倣する他の細胞の上の1つの細胞でないことを確認することができる。

【0176】

自己集合性単層は、ある長さの時間に(例えば、5分未満、10分未満、20分未満、30分未満、1時間分未満、2時間未満、又は5時間未満に)形成し得る。自己集合性単層は、自己集合温度が室温(68°)、室温超又は室温未満であるかどうか、細胞懸濁液又は材料の性質(例えば、水性、ゲル、油等)及び基材の性質を含むが、これらに限定されない、集合条件によって速く又はゆっくり形成し得る。

【0177】

本発明の1つの態様は、胎児細胞が濃縮された母親血液の試料を面上に置き、試料が母親有核細胞及び胎児有核細胞を含み、試料中の細胞の少なくとも第1の部分に除去可能に付着させ、細胞における解析を実施して、対象の細胞を同定し、候補胎児有核細胞を面から除去して、それにより、細胞を残りの細胞から単離する方法を提供する。

【0178】

単層における細胞は、面に付着させることができ、面に除去可能に付着させることがで

10

20

30

40

50

き、又は面に近接して存在し得る。細胞は、面に近接して定着させることができる。面に近接して定着させた細胞は、例えば、少なくとも5分間、少なくとも15分間、少なくとも30分間、少なくとも45分間、少なくとも1時間又は1時間未満、2時間未満、3時間未満若しくは数時間未満面の近くに維持することができる。細胞は、面につなぎ止めることができる。単層における細胞は、面にゆるくつなぎ止める(ゆるく接着させる若しくはゆるく付着させる)ことができる又は面に付着させなくてもよい。除去可能に付着させた又は除去可能につなぎ止めた細胞は、細胞の完全性を維持しながらピペット(マイクロピペット)及び部分的真空を用いて容易に除去することができる。除去不可能につなぎ止めた細胞は、任意の手段を用いて除去することができるが、除去不可能につなぎ止めた細胞は、除去の前又は除去中に部分的又は完全に溶解し得る。例えば、つなぎ止めた細胞は、外部刺激(NIPAM基材による温度変化など)又は酵素処理(例えば、トリプシン)を用いて除去することができる。細胞を除去可能に付着させることは、細胞を(例えば、細胞の完全性を維持しながら)マイクロピペット及び部分的真空を用いて面から完全な状態で除去することができるように面に細胞をゆるく接着することを含む。いくつかの実施形態において、面に除去可能につなぎ止められた細胞の少なくとも一部を有することが望ましい。どの細胞も面に除去可能につなぎ止められていない場合、細胞は、単層内で移動させることができる。細胞が移動している間に下記のように対象の細胞を走査及び同定することは、困難であり得る。細胞の一部が面に除去可能につなぎ止められている場合、それらの細胞は、面につなぎ止められていない細胞を閉じ込める又は別の状態でその動きを妨げる機能を果たし得る。

10

20

【0179】

細胞単層は、任意の細胞の密度を有し得る。細胞は、他の細胞と接触若しくは密接に接触するように間隔をおいて配置することができ又は他の細胞から実質的に分離させることができる。いくつかの実施形態において、単層は、好ましい細胞の密度を有し得る。例えば、過度に少数の細胞は、平均細胞移動度を増加させ得る。例えば、より少数の細胞が単層内に存在する場合、それらは、あちこち移動するより大きい空間を有する。細胞が単層内を移動している場合、下で述べるようにそれらを走査し、対象の細胞を同定することは、困難であり得る。或いは、過度に多くの細胞が存在する場合、細胞は、過度に詰められ、凝集し且つ/又は互いに積み重なる傾向がより大きくなる可能性がある。これは、下で述べる走査及び同定ステップ中の偽陽性につながり得る。例えば、いくつかの実施形態において、他の細胞の上の1つの細胞(例えば、赤血球の上の白血球)は、対象の細胞の特性を模倣し、それにより、偽陽性をもたらし得る。さらに、いくつかの実施形態において、単層内の細胞数が増加するにつれて、走査及び同定ステップは、より長時間を必要とする。時間の延長は、細胞の生存能力並びに走査及び同定ステップの正確度に負の影響を及ぼし得る。単層の形成及び/又は接着を制御するために、細胞の試料又は基材を処理することができる。細胞が面に過度に強固に接着している場合、それを除去するのが困難であり得る。細胞は、損傷を受けている可能性があり、その後細胞の形態を解析することが困難である可能性があるか、又はそのDNAを失っている可能性があり、且つ/又はDNAが損傷を受けている可能性がある。1つの実施形態において、母親血液試料から候補胎児細胞を分離する方法は、面への細胞の接着を低減させるように構成されている物質を加えるステップを含み得る。細胞の試料は、面への接着を低減させる又は例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)のような面への接着を増大させる物質で処理することができる。細胞が自己集合性単層を形成し、面に近接して細胞を付着させる、除去可能に付着させ、且つ/又は定着させることを可能にする量のBSAを加えることができる。0%と0.05%(同%を含む)までの間のBSA、0.05%と0.1%(同%を含む)までの間の、0.1%と0.5%(同%を含む)までの間の、0.5%と1.0%(同%を含む)までの間の、1.0%と2%(同%を含む)までの間の又は2重量/容積%を超えるBSAを加えることができる。1つの例において、約0.02重量/容積%のBSAを加える(例えば、0.02gBSA/100mIPBS)。

30

40

【0180】

50

単層形成、DNAの質及び/又は細胞回収を改善し、全体として解析に負の影響を及ぼさない限り、あらゆる物質を用いることができる。試料又は基材は、例えば、細胞接着分子、コラーゲン、他の細胞外マトリックス成分、フィブロネクチン、他のタンパク質、血清、ウシ血清アルブミンなどの血清アルブミン及び/又はビトロネクトリンなどで処理することができる。

【0181】

特定の実施形態において、母親血液試料は、胎児有核赤血球が濃縮されており、白血球及び母親赤血球を含む。0.02%のウシ血清アルブミン(BSA)を含む溶液中の生細胞を基材上で約1時間自己集合させて、単層を形成させる。一部の細胞が面に付着しているが、他の細胞が面に近接している(付着していない)。いくつかの実施形態において、方法は、面に近接している細胞の第2の部分維持するステップを含む。

10

【0182】

いくつかの実施形態において、細胞の生存能力は、妊娠女性から血液試料を採取したときから単層の形成まで維持することができる。いくつかの実施形態において、母親血液の試料を面に置くステップは、生細胞を面に置くステップを含み、方法は、少なくとも除去可能に付着させるステップまで細胞の生存能力を維持するステップをさらに含む。

【0183】

細胞単層は、固定し、撮像することができるか又は固定せずに撮像することができる(又は固定の前及び後に撮像することができる)。撮像は、自動顕微鏡検査プラットフォームを用いて実施することができる。一般的に、あらゆる顕微鏡検査プラットフォームを用いることができる。1つの特定の実施形態において、透過照射(例えば、380nm~800nm範囲)及び同軸照射(例えば、核染色を励起するための350nm~364nm範囲にある)を行う能力を有する顕微鏡検査プラットフォームを用いることができる。図5に本発明の1つの態様による胎児有核細胞を同定するために用いることができる自動顕微鏡システムを示す。光86又は光94を胎児有核細胞84及び他の細胞を含む面82に送達させる。面82上の細胞からの光を顕微鏡90により検出する。顕微鏡90は、制御装置92により面82に対して移動させる。面又は顕微鏡を移動させることができる。例えば、細胞が溶液中にあり、且つ/又は単層にあり若しくは単層を形成しており、且つ/又は面にゆるくつなぎ止められている若しくはつなぎ止められていない場合、細胞の移動を最小限にするために、面を静止させたままとし、顕微鏡を面にわたって移動させることができる。

20

30

【0184】

光成形器(light shaper)を光源とともに用いて、画質を改善することができる。散光器などの光成形器は、光が多く角度から細胞に当たるように光を散乱させ得る。散光器を用いることにより、例えば、影を減少させ、且つ/又は細胞に対するエッジ効果を低減させることができる。散光器は、すりガラス、オパールガラス、「乳白ガラス」など、又は参照によりその全体として本明細書に組み込まれる、Ilya Ravkinの米国特許出願公開第2007/0211460号に記載されているものなどの材料であり得る。

【0185】

光源又は複数の光源を用いたかなり多数の画像を収集することができる。例えば、基材当たり100を超える画像を撮影することができる。いくつかの実施形態において、500を超える画像、1000を超える画像又は2000を超える画像を撮影することができる。基材上のXY位置又は視点は、基材の全範囲が撮像される又は基材の一部が撮像されるような方法で選択することができる。撮影される画像の数及び/又は撮影される各画像のサイズは、細胞又は対象の特定の細胞の平均直径に基づいて決定することができる。例えば、視点又はXY位置のサイズは、細胞が第1の画像に捕捉されていないか又は部分的に捕捉されている場合、それが隣接する画像に完全に又は少なくとも部分的に捕捉されるように決定することができる。1つの実施形態において、基材上の各XY位置について一对の画像を取得する。いくつかの実施形態において、画像を取得するシステム及び/又はカメラは、画像を取得する前に自動焦点処置を行う。例えば、最も鮮明な画像を撮影することができるZ位置が特定されるまでカメラ(又は顕微鏡ステージ)をZ方向(上/下)に移動させる。いくつかの実

40

50

施形態において、自動焦点ルーチンは、各画像を撮影する前又は各XY位置における一対の画像を撮影する前に繰り返される。

【0186】

1つの実施形態において、候補有核赤血球(この例では、胎児有核赤血球であり得る又は母親有核赤血球であり得る)を同定するために、各XY位置について取得する各画像は、それぞれ核を検出し、ヘモグロビンを検出するのに有用である2つ(又は2つを超える)の異なる波長で取得することができる。核染色を用いることができる。いくつかの実施形態において、DAPI又はSYBR Green(非対称シアニン色素)を用いることができる。例えば、第1の画像を420nm又はその前後での照射を用いて検出することができ、第2の画像を蛍光検出に基づいて検出することができる。蛍光検出は、DAPI染色については約358nm又はSYBR Green染色については497nmでの照射及びそれぞれ約461nm又は520nmでの検出に基づくことができる。各位置について、画像対を用いて、ヘモグロビンの存在の可能性を示す、420nm光が吸収される位置を決定することができる。蛍光画像を用いて、視野における核物質の位置を決定することができる。核の形状及び輝度の特性がnRBCの公知の特性と一致し、ヘモグロビンも存在する場合、nRBC候補が発見された。この候補は、候補細胞のリストに加えることができる。ヘモグロビンは、一連の波長を吸収する。いくつかの実施形態は、ヘモグロビン吸収性光で細胞の単層を照射するステップ及びヘモグロビンの光吸収に基づいて単層からの光を検出するステップを含む。細胞(単層における)は、300nm~650nm、400nm~600nm、400nm~450nm又はこれらの波長の範囲内のピークのいずれか(414nm若しくはその周囲(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10nm以内)、542nm若しくはその周囲及び576nm若しくはその周囲)又は560nm、580nm若しくは600nmの周囲などのヘモグロビンが吸収するいずれかの波長の光で照射することができる。細胞をSYBR Greenで処理した単層をSYBR Green励起光波長を用いて照射し、SYBR Green放射光(例えば、いずれかの波長)を検出することができる。特定の例において、青色光(例えば、約497nm)をSYBR Greenの励起に用い、緑色光(例えば、約520nm)を検出する。

10

20

【0187】

620nm又は650nm又はより高い波長の範囲内の赤色光も(又は代わりに)解析のために用いることができることに注意すること。その理由は、この赤色光が核物質又はヘモグロビンにより吸収されないからである。赤色画像は、したがって、細胞の実際の物理的構造、すなわち、細胞端、テクスチャ又は懸濁媒体からのバックグラウンドアーチファクト及びスライド上の非細胞粒子(のみ)を含む。この真実の構造情報は、核の位置と一致しているヘモグロビンシグナルの量を測定する場合に用いることができ、また偽陽性を低減するために用いることができる。(場合によっては、構造上の端によって発生したシグナルを420nm吸光度により発生したシグナルから分離するためにのみ420nm/蛍光画像対を用いることが可能でないことがある。)

30

【0188】

いくつかの実施形態において、光(例えば、OED光又は任意の光)は、散光器などの光成形器を用いて成形することができる。例えば、散光器は、細胞又は細胞単層をヘモグロビンの存在(例えば、ヘモグロビン吸収)について解析する場合に有益であり得る。散光器が存在しない場合、ヘモグロビン非含有細胞(例えば、母親白血球)は、光を散乱又は他の状態に変化させ、ヘモグロビン含有細胞(例えば、有核赤血球)と誤って見える可能性がある。例えば、細胞の端は、光を散乱させ、したがって、ヘモグロビンのリングに類似した、暗いリングとして見える。散光器は、干渉白血球光異常(interfering white blood cell light anomalies)を低減又は排除し得る。通常、細胞を2枚の板ガラスの間に置く。細胞は、一般的にガラスと同様な屈折率を有する媒体とともに置き、それにより、細胞の端が光を散乱することを防ぐ。しかし、生細胞又は自己集合性単層の場合、これは望ましくない可能性がある。したがって、散乱を排除する代替法は、特に有用であり得る。いくつかの実施形態において、散乱を最小限にしながら、ヘモグロビンの吸収ピークに近い代替波長を用いることができる。いくつかの代替波長は、410nm、420nm、550nm、580nm、600nm等を含む。いくつかの実施形態において、光散乱の問題は、後処理及び/又は機械学習に

40

50

より解決され、それにより、システムが、標準LED光源で照射された白血球と赤血球とを識別することが可能となる。

【0189】

最初の撮像は、システムの速度及び最高評点を改善するために低倍率(例えば、10X)で行うことができる。nRBC候補は、状態を真のnRBCであると立証するためにより高倍率で再訪することができる。さらに又は代わりに、候補nRBCをヒトレビューにかけることができる。

【0190】

高速自動デジタル顕微鏡検査プラットフォームを用いて画像を収集することができる。画像対(例えば、420nm/蛍光)又は三つ組(例えば、420nm、620nm、蛍光)の組を用いて、細胞を白血球、非有核赤血球及び有核赤血球に選別することができる。細胞同定及び亜集団分類アルゴリズムは、対象の集団外であることが公知である細胞をインターロゲーションしない。

10

【0191】

単層の作製を通して細胞の形態を保存し、ヘモグロビンを完全な状態に維持する試料調製ステップのため、420nm及び蛍光撮像の組合せが可能となり得る。独自のアルゴリズムを用いて、あらゆる細胞のnRBC特性を判定することができる。1つの実施形態において、アルゴリズムの核心は、核蛍光に対する420nm吸収の近接性に加えて、420nm吸収と核蛍光との一致(完全に暗いnRBC)を判定する能力である。アルゴリズムのステップは、以下を含み得る。

20

【0192】

照射を平坦化する(光学系の異常により生じ得る画像の隅部の暗さを補正するために画像の輝度を完全な画像にわたり一様にする)。

【0193】

画像平坦化を蛍光及び420nm透過像に適用する。

【0194】

画像を分割して、どのピクセルがフォアグラウンド(核及びヘモグロビン)に属し、どのピクセルがバックグラウンドに属するかを判定する。画像分割によって、画像からノイズが除去され、残りのステップにおいて処理しなければならないピクセルの数が減少し得る。

30

【0195】

蛍光像における個々の核を数え上げる(数え、連続的に番号付けする)。

【0196】

完全に丸い核では4又は12.56になる傾向がある、それらの複雑度及び平均輝度(#端ピクセル2)/(#内部ピクセル)を計算する。nRBC核は、丸く(低複雑度)、明るい。

【0197】

最低の複雑度を有する核の亜集団について、核に一致するヘモグロビン吸光度及び核の周辺の周りのヘモグロビン吸光度を測定する。例えば、50%、25%又は10%の最小の複雑度を検査する。(最高の核は検査する必要はない。)

40

【0198】

核のあらゆるパラメーターを検討することができる。いくつかの実施形態において、核の輝度、複雑度及び/又はヘモグロビン吸光度を測定する。高ヘモグロビン吸光度、低複雑度及び高輝度の3空間領域に集合する細胞は、nRBCである高い可能性を有し、nRBCである非常に可能性が高い候補と格付けされる。

【0199】

同様な方法で、白血球は、それらの亜集団へとピンに区分することができ(例えば、分葉核好中球は、高複雑度及び大白色度(whites)を有する)、特定のピンに入れられるすべてのWBCは、nRBC候補プールからの他の細胞を除去する。

【0200】

いくつかの実施形態において、ヘモグロビン吸光度及び核蛍光シグナルの両方をフォア

50

グラウンドの平均輝度及び/又はバックグラウンドの平均若しくは局所輝度と比較して計算することができる。この方法で、部位内比較を行うことが可能である(420nm/蛍光像の1つの対を420nm/蛍光像の他の対と比較することができる)。相対尺度を用いない場合、単一視野より大きい変動がスライド全体にわたり対象の細胞を正しく検出する能力に影響を及ぼす可能性がある。大規模変動の例は、非特異的バックグラウンド、蛍光染色の変動、RBCヘモグロビン溶解の変動及び照射の変化(ランプのウォーミングアップ又は欠陥)などである。

【0201】

場合によっては、nRBC候補のXY位置の保存によって、費用を削減するより少量のFISH又は他の試薬の使用が可能になり得る。FISH又は他の試薬は、nRBCの所在位置が確認された部位にのみ適用することができる。FISHが完了した後、これらのXY位置を再び用いて、nRBCを再訪し、最終遺伝子検査結果をインターロゲーションする。

10

【0202】

次いで、画像を解析することができる。nRBC候補を見いだすための420nm及び蛍光画像対(又は420nm、630nm及び蛍光画像トリオ)の使用は、nRBCの以下の特性に依存している。

【0203】

(1)nRBCは、ヘモグロビン吸光度(420nm画像における暗いピクセル)に関連する。時折、ヘモグロビン吸光度の範囲が核蛍光と同じ組のピクセルを包含する。他の場合には、ヘモグロビン吸光度が核物質の蛍光シグネチャーに隣接している。

【0204】

(2)nRBC核は、単核である傾向があり、丸い(低複雑度)傾向がある。

20

【0205】

(3)nRBC核は、同じ画像における他の細胞核より明るい蛍光シグナルを有する傾向がある。

【0206】

(4)nRBC核は、凝縮の過程にあり、細胞から強制的に外に出される(例えば、アポトーシスにより)ため、ほとんどの他の核より小さい傾向がある。

【0207】

いくつかの実施形態において、候補細胞が単層から選択されたならば、次のステップは、固定ステップである。細胞をさらなる解析に備えて非架橋性固定剤で処理する。核酸、タンパク質(例えば、抗原部位)又は他の細胞成分の質を改善する役割を果たし得る安定剤の存在下での非架橋性固定剤又は固定剤の使用によって、増幅DNA、RNA又は他の成分の質が改善され、FISH、PCR(例えば、dPCR、qPCR、smPCR)及び/又はアレイ若しくはマイクロアレイ解析(例えば、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション)による核酸、タンパク質又は他の細胞成分に関するその後の解析が改善される。固定は、以前に保存されたXY位置を用いた胎児nRBCの後の再位置決め/再訪のためにRBCの形態及びヘモグロビンシグナルを維持し得る。非架橋性であるか又は限定された架橋をもたらす固定法を用いることができる。固定は、(15秒~10分)間のEtOH(40~90%)、グリオキサール(0.1~25%)、メタノール(0.1~10%)及び/又はイソプロパノール(0.1~10%)を含み、30秒~2日間にわたる-20℃メタノール浸漬が先行し得る。適切な固定剤の例は、Streck固定剤(Streck Inc.、Omaha、NE; Ryanの米国特許第5,460,797号及びRyanの米国特許第5,459,073号に記載されているものなど)、RCL2(登録商標)アルコールベースのホルマリン非含有固定剤(Alphelys、Plaisir、France; 国際公開第2004/083369号及びRochaixの米国特許出願公開第2007/0072167号に記載されているものなど)及びFineFIX(Milestone Microwave Laboratory System、Italy; Visinoriらの米国特許第6,042,874号に記載されているものなど)を含むが、これらに限定されない。

30

40

【0208】

安定剤は、フッ化ナトリウム若しくはカリウム(0.01~100mg/mL)、ブソイドエフェドリン(0.1~100.0mg/mL)、EDTA(1~10mM)、ACD-A(0.01~10.0%)、トレハロース(0.01~10gm/L)、マルトース(0.01~10.0gm/L)、デキストラン(0.01~3.0%、100~500MW)、F-68(0.001

50

~10mg/mL)、硫酸ナトリウム若しくはカリウム(1~100mM)、リン酸ナトリウム若しくはカリウム(1~100mM)を含み得る。

【0209】

1つの適切な固定法は、次のステップを含む: -20 MeOH中で置換プレフィックス(substitution prefix)を10分間凍結、並びにEtOH、グリオキサール、MeOH及びイソプロパノールでポストフィックス(postfix)処理。この方法は、ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドの使用を回避する点が有益である。廃棄物の処分の問題がなく、交差結合が起こらないため、DNA及びRNAの回収がより容易に行われる。

【0210】

さらに、ヒトTSIX配列を用いて、細胞を母親でなく、女性胎児として決定的に同定することができる。TSIX発現は、2歳から4歳までの間に両ヒトX染色体上で停止する。成人女性は、TSIX遺伝子を発現しない。したがって、FISH法にTSIXのプロープを含めることによって、インターロゲーションされるすべての候補nRBCについて母親状態と対比して女性胎児の明確な判定が可能となる。核のTSIX領域におけるFISHシグナルは、細胞が胎児性である場合にのみ存在する。Y染色体の存在は、有核赤血球が男性胎児からのものであるかを決定する。

10

【0211】

nRBCの核は、アポトーシスの過程にあり、細胞からの排出に備えて凝縮していることを注意することも重要である。高度に凝縮した核は、非凝縮核よりもFISH処理による低い効率を有する傾向がある。凝縮核に対するFISH効率の改善への2つの新規なアプローチは、以下の通りである。

20

(1)真空中又は大気圧より低い圧力下でFISHを実施する。又は

(2)候補のXY位置を再訪することによってFISHプロープを適用する前に細胞及び核を物理的に圧壊し、制御された仕方ですれらを圧迫する。圧壊又は平坦化すべき細胞は、DAPI/420nmスキャンにより同定されたnRBCであるものとする。DAPI/420nm走査を行った同じ顕微鏡プラットフォーム上で、モーター駆動ノーズピースが「圧壊ヘッド」上で回転し得る。これは、例えば、スプリングが装着された平坦な末端の小径鋼鉄ロッドであり、圧壊すべきnRBCの位置においてスライド上に自動的に下降し得る。加えられる圧壊力は、圧壊ロッドのばね力定数により制御され得る。ロッド径は、小さく、例えば、直径が100µmであり得、したがって、それは、標的nRBC及びその周りの細胞の周辺を圧壊することとなる。絶対的なXY位置の正確さは、必要であり得ない。小径はまた、局所部位に非常に高い圧壊力をかけることが可能となる。

30

【0212】

ヒト年齢と対比したTSIX発現及びTSIX発現の変動は、Species Differences in TSIX/Tsix Reveal the Roles of These Genes in X-Chromosome Inactivation、Migeon、Barbara R.、Lee Catherine H.、Chowdhury、Ashis K.、Carpenter、Heather、doi:10.1086/341605(71巻、2号、286~293頁)に記載されている。

【0213】

核物質へのアクセスを改善するために細胞を圧壊することは、Cell Crushing: A Techniques for Greatly Reducing Errors in Microspectrometry、Davies、H. G.、Wilkins、M. H. F.、Boddy、R. G. H. B.、Experimental Cell Research、6/(550~553頁);1954に記載されている。

40

【0214】

本発明の新規な態様は、細胞の女性胎児/母親状態の明確な判定のためのTSIXとFISHの組合せ、胎児遺伝子検査におけるFISH結果を改善するための真空の使用及び核物質へのアクセスを改善するための細胞の物理的圧壊の使用を含む。

【0215】

遺伝子検査結果を記録するために、保存されたXY位置を用いることができる。候補nRBCのXY位置は、遺伝子検査のための細胞の処理を通して用いる。対象の細胞のみにFISHプロープを適用し、それにより、患者当たりの検査当たりの総費用を削減することが可能であ

50

る。細胞を再訪し、非nRBCの集団からの物理的な分離のために基材からそれらを物理的に除去し、それにより、母親DNAに対する胎児DNAの百分率を増大させることも可能である。nRBC候補のXY位置を再訪して、FISH結果及び胎児/母親判定をインターロゲーションすることが可能である。nRBC候補のXY位置を再訪し、核を物理的に脱凝縮することも可能である。

【0216】

本明細書で述べた方法により調製される細胞は、抗体解析に供することができる。例えば、いくつかの特異的赤血球ヘモグロビン抗体は、母親末梢血液中に存在する胎児RBCの示差的同定のために利用可能である(Zhengら、1999 Fetal cell identifiers: results of microscope slide-based immunocytochemical studies as a function of gestational age and abnormality、Am. J. Obstet. Gynecol.、180巻、1234~1239頁)。胎児及び胚ヘモグロビンに対する標準抗体染色技術は、試料をろ過し、スライド上に単層を調製し、自動細胞同定アルゴリズムソフトウェアによりnRBCの所在位置を確認することによって母親血液に見いだされるnRBCについて実施することができる。成人は、胚ヘモグロビンイプシロンを発現しないが、胎児nRBCは、この胚ヘモグロビンを妊娠第1期の終了まで含み得る(Mevronら、1999、Improved specificity of RBC detection in chorionic villus sample supernatant fluids using anti-zeta and anti-epsilon monoclonal antibodies、Feta. Diagn. Ther.、14巻、291~295頁)。胎児nRBCの同定の特異性を増大させるために、他の胚(ガンマ、ゼータ)及び胎児ヘモグロビンを抗イプシロンとともに(又はその代わりに)用いることができるが、これらの抗体は、成人鎌状赤血球貧血及び地中海貧血におけるゼータ及び/又は胎児ヘモグロビン発現も認識し得る。胎児ヘモグロビンは、妊娠の最後の2期に発現し、出生後にベータヘモグロビンに転換する。図12に胎児、正常成人及び様々な遺伝子状態を有する成人における胎児ヘモグロビン(ヘモグロビンF又はHbF)の発現レベルを示す。これらの状態又は遺伝子状態の1つを有する妊娠女性からの血液試料の胎児ヘモグロビン染色は、胎児及び母親細胞の両方を陽性、すなわち、細胞を特異的に染色していると同定する。

【0217】

本開示の1つの目的は、胎児細胞と胎児ヘモグロビンを発現する妊娠女性からの細胞とを識別することを含む、胎児細胞と妊娠女性からの細胞とを識別することを含む。

【0218】

本開示の1つの態様である候補母親細胞を同定する方法は、ヘモグロビン含有細胞を含む母親血液試料を用意するステップと、第1の細胞中の第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップと、最小閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップと、第1の細胞を、それが最小閾値ヘモグロビンレベルを下回るヘモグロビンレベルを有する場合には候補母親細胞と、それが最小閾値ヘモグロビンレベル又はそれを上回るヘモグロビンレベルを有する場合には対象の候補細胞と同定するステップとを含む。いくつかの実施形態は、用意するステップの後にアルゴリズムを適用するステップを含む。方法はまた、アッセイするステップの前に母親血液試料から単層を形成するステップを含み、第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップは、単層における細胞中の第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含む。方法は、免疫細胞化学を実施して、それにより、第1の細胞中の胎児ヘモグロビンレベルを検出するステップを含み得る。

【0219】

いくつかの実施形態において、方法はさらに、第2の細胞中の第2の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含み、第2の細胞は候補胎児細胞を含み、閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップは、胎児細胞ヘモグロビンレベルより低い閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップを含む。いくつかの実施形態において、方法はさらに、複数の候補胎児細胞のそれぞれにおける胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含み、最小閾値胎児ヘモグロビンレベルを用意するステップは、複数の候補胎児細胞における胎児ヘモグロビンレベルに基づいてレベルを用意するステップを含む。いくつかの実施形態において、アッセイするステップは、プロセッサを用いてシグナルを数え上

10

20

30

40

50

げ、アルゴリズムを適用して、それにより、候補細胞を同定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態は、第1の細胞の境界を検出するステップを含み、アッセイするステップは、境界によって取り囲まれた第1の胎児ヘモグロビンレベルをアッセイするステップを含む。

【0220】

本開示によるいくつかの方法は、シグナル(例えば、ピクセル、スーパーピクセル又は画像からの)から非特異的シグナルの一部又はすべてを差し引く又は除去するステップを含み得る。いくつかの方法は、第1の非特異的シグナルを用いて、第2のシグナルの強度又は輝度を考慮から除去又は減じるステップを含み得る。顕微鏡システムと接続されたプロセッサは、抗ヘモグロビン染色スライドから得られるシグナル値を解析し、独自の同定アルゴリズムを適用し、考慮から非特異的シグナルを除去し得る。非特異的シグナルは、何らかの原因によってもたらされ得る。非特異的シグナルは、特異的シグナルより暗い可能性があるか又は特異的シグナルより明るい可能性がある。非特異的シグナルは、細胞によってもたらされる干渉シグナル(例えば、自己蛍光又はアルカリホスファターゼ活性を含むが、これに限定されない酵素活性)、抗体の弱い交差反応性若しくは他の粘着性、抗体若しくは他の試薬の非均一適用、要求されない試薬(例えば、抗体、検出試薬又は他の試薬)の非均一若しくは不完全洗浄若しくは除去、取扱い若しくは塗抹アーチファクト、又は細胞に残存する染色試薬に起因するバックグラウンド染色を含むが、これらに限定されない原因に起因する1つ又は複数の細胞における染色によってもたらされ得る。より暗い非特異的シグナルは、スライド又は基材によってもたらされるシグナルなどの、スライド又は基材上で起こるシグナル又は染色によってもたらされ得る。非特異的シグナルはまた、破壊細胞又は他のデブリ、重複している細胞又は細胞の一部によってもたらされ得る。

10

20

【0221】

特異的シグナルより強いシグナルは、上記の原因のいずれかを含むが、それらに限定されない、いずれかの要求されない原因によってもたらされ得る。本開示による方法は、閾値より最小限2X、5X、10X又は50X明るいシグナル又は画像を考慮から除去するアルゴリズムを適用するステップを含み得る。

【0222】

方法は、胎児又は胚ヘモグロビンの実際の検出又は染色に起因する特異的シグナルを除去するステップを含み得る。顕微鏡システムと接続されたプロセッサは、考慮から特異的シグナル又は特異的画像を除去し得る。

30

【0223】

図8に母親血液試料からの細胞の解析を示す。図8に本開示による妊娠女性からの血液塗抹標本からの血液細胞を含むスライド100を示す。胎児ヘモグロビンを検出し、自動検出器を用いて解析するために、スライドを抗体及び検出/染色試薬で処理した。核112を有する胎児赤血球113は、細胞が胎児赤血球であることを示す、一定のレベルの所望のヘモグロビン特異的シグナル114を含む。スライド100はまた、胎児ヘモグロビンを含み、一定のレベルの望ましくないが、ヘモグロビン特異的シグナル118を有する母親赤血球104を含む。母親赤血球104は、例えば、胎児ヘモグロビンの遺伝性持続、鎌状赤血球貧血、アルファ地中海貧血又はベータ地中海貧血を有する妊娠女性からのF細胞である可能性があった。スライド100はまた、低レベルの非特異的シグナル(染色)を有する母親赤血球108及び白血球106を含む。母親赤血球108は、或いはシグナル(染色)を有さない可能性がある。基材100は、第1のレベルの非特異的シグナル120、第2のレベルの非特異的シグナル124を有する可能性があるか又は染色を有さない可能性がある。基材100はまた、要求されない非特異的シグナル122を有するデブリ又はジャンク110を含む可能性がある。場合によって、非特異的シグナルは、特異的シグナルより強い可能性があり、胎児細胞の解析を妨げる可能性がある。妨害は、自動検出システムを用いる場合に重大である可能性がある。

40

【0224】

図9に妊娠女性からの細胞塗抹標本上の胎児細胞を検出又は識別する方法130におけるステップを示す。図8に示すように、妊娠女性からの血液試料からの細胞をスライド又は基

50

材上に塗抹し、抗胎児ヘモグロビン抗体で処理し、胎児ヘモグロビンを検出するために処理する(例えば、染色する)。細胞は、DAPIなどの核染色で染色することもできる。検出器134は、DAPI処理済み核からの第1のシグナル及びヘモグロビン検出処理からの第2のシグナル並びに他の特異的及び非特異的シグナルを検出する。検出器134は、胎児細胞113の核112からのDAPI特異的シグナル及び細胞質114からの非(又は暗い)DAPIシグナルを検出する。検出器134はまた、母親F細胞118からの暗い特異的シグナル104を検出する。検出器134は、基材100からの胎児細胞113の近くのバックグラウンド124及び/又は基材100上の種々のレベルのバックグラウンド120、122も検出し得る。プロセッサ136は、スライド(又はスライドの一部)の1つ又は複数のシグナル強度レベル及び1つ又は複数のシグナル閾値を計算する。閾値若しくはそれを下回るスライド若しくは基材上のピクセル、スーパーピクセル若しくは画像は、考慮から除去され、又はさらなる解析のためにフラグが立てられる。スライド上の位置及び位置に関するシグナル画像値は、データ記憶装置142に保存される。

10

【0225】

基材100上、基材100上の細胞上又は他の要素(例えば、デブリ)上の各X、Y位置は、検出し、値を保存し、解析することができることを理解すべきである。図8に示すシグナル値のような平均又は蓄積細胞及び基材シグナル値は、当技術分野で公知の方法及びアルゴリズムを用いて計算することができる。

【0226】

対象の特異的シグナル値を下回るシグナル閾値は、カットオフレベルとして選択することができる。対象の特異的シグナルの1%、5%、10%、15%、20%、25%若しくは50%より低い要求されない特異的シグナルは、考慮から除去することができる、又はさらなる解析のためにフラグを立てることができる。特異的シグナルに関する閾値シグナルレベルは、あらゆる方法で決定することができる。1つの例において、特異的シグナルを除去する又はフラグを立てるための閾値シグナルレベルは、得られた特異的シグナルの総数に基づいて(又は得られた特異的シグナルの総数のパーセントとして)決定される。1つの例において、閾値シグナルレベルは、胎児若しくは母親の特定の状態又は危険因子(例えば、家族歴、医学診断、症状)に(少なくとも一部)基づいて選択することができる。1つの例において、妊娠女性が鎌状赤血球貧血を有する場合、15%の閾値シグナルレベルが選択される。

20

【0227】

考慮から除去される特異的シグナル(例えば、細胞)の数は、1を上回り、10を上回り、100を上回り、1000を上回り又は10,000を上回り得る。

30

【0228】

考慮から除去されるシグナル又は画像(例えば、細胞)は、妊娠女性の細胞に対応し得る。細胞は、胎児ヘモグロビンの遺伝性持続、鎌状赤血球貧血、アルファ地中海貧血、ベータ地中海貧血、白血病、骨髄増殖性疾患、他の骨髄障害又は癌を含むが、これらに限定されない、いずれかの理由による妊娠女性の状態又は遺伝子状態に起因して胎児ヘモグロビンを産生し得る。

【0229】

方法のステップは、第1の閾値シグナル輝度レベル及び第2の閾値シグナル輝度レベルを計算又は用いるステップを含み得る。方法は、第1の閾値レベルを下回る第1のシグナルを除去するステップ及び/又は第2の閾値レベルを上回る第2のシグナルを除去するステップを含み得る。

40

【0230】

本開示による方法は、特異的シグナルに関する警報を出す、フラグを立てる又は情報を報告するステップを含み得る。警報を出すステップは、同定された特異的シグナルの数又は考慮から除去される特異的シグナルの数に関する解析者(例えば、医療提供者)に可用性であり得る警報を提供し得る。解析者は、結果の特異性をさらに確認(例えば、手作業により)することができ又は妊娠女性若しくは医療提供者に結果を伝達することができる。高い数の特異的シグナル(例えば、10,000)は、妊娠女性が医療提供者による治療又は助言

50

を必要とし得る出血問題を有することを示し得る。

【0231】

ヘモグロビンを検出するために処理したスライドから得られるより暗い又はより明るいシグナル又は画像(例えば、細胞)を除去するための方法を詳細に述べるが、該方法は、要求されないシグナルが得られる基材又はスライド上の解析に適用することができる。該方法は、異なるヘモグロビン抗体、非ヘモグロビン抗体、in situハイブリダイゼーションなどのRNA検出方法及びガラス、プラスチック、ポリマー、フィルター、紙又は他の基材を含むが、これらに限定されない、異なる面、異なる検出剤又は異なる検出技術とともに用いることができる。

【0232】

いくつかの実施形態において、細胞は、基材から物理的に除去し、非nRBC及び他の細胞の集団から物理的に分離することができる。いくつかの実施形態において、細胞及び基材の一部は、非nRBC及び他の細胞の集団から物理的に分離することができる。候補nRBCのXY位置は、マイクロダイセクションシステム(microdissection system)を制御するためにも用いることができる。マイクロダイセクションは、候補nRBCを捕捉し、非nRBC細胞集団からそれらを物理的に分離するために用いることができる。

【0233】

細胞は、何らかの方法又は方法の組合せ若しくは系列を用いて、また細胞又は細胞の内容物の一部若しくはすべてのさらなる使用を可能にする物質を用いて基材から分離することができる。細胞は、完全な状態で除去することができ又は部分的に(in portions)除去することができ、或いは細胞の一部のみ(例えば、核又は染色体)を除去することができる。細胞は、剥離、かき混ぜ、真空除去及びこすり落としを含むが、これらに限定されない、機械的手段を用いて除去することができる。

【0234】

いくつかの実施形態において、部分的真空(大気圧より低い圧力)を用いて候補胎児細胞を基材から除去する。母親血液試料から候補胎児細胞を分離する方法は、細胞を大気圧より低い圧力のもとにおき、それにより、候補胎児有核細胞を除去するステップを含む面から候補胎児有核細胞を除去するステップを含み得る。例えば、基材にゆるく付着している又は付着していない(例えば、それに近接している)候補細胞は、マイクロピペットを用いて除去することができる。候補細胞は、手作業で除去することができる。或いは、候補細胞は、自動的に除去することができる。例えば、候補nRBCのXY位置を認識するプロセッサ及びアルゴリズムは、細胞を除去するためのマイクロダイセクションシステムを制御するために用いることができる。

【0235】

マイクロピペットは、基材から細胞を除去し(捕捉し)、追加の解析のために異なる位置に細胞を置くために用いることができる。細胞は、プレート上に、基材(例えば、スライド又は膜)上に、ウェル中に、管中に、又は他の適切な面若しくは容器に置くことができる。真空除去は、細胞の除去の助けとなる処理により単層の形成の前、形成時、及び/又は形成後に細胞を処理すること(上文及び下文で述べるように)により促進することができる。いくつかの実施形態において、単層の形成の前にウシ血清アルブミンで処理した細胞は、部分的真空とともにマイクロピペットを用いて容易に除去することができる。マイクロピペットは、基材から細胞(サイズが変化し得るが、平均で約 $5\mu\text{m}$ ~ $8\mu\text{m}$ の直径を有する)を捕捉する(又は細胞及び基材を捕捉する)ことができる限り任意の内径及び任意の外径を有し得る。マイクロピペットは、 $4\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ ~ $20\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$ ~ $30\mu\text{m}$ 、 $30\mu\text{m}$ ~ $40\mu\text{m}$ 、 $40\mu\text{m}$ ~ $50\mu\text{m}$ 又は $50\mu\text{m}$ より大きな内径を有し得る。1つの例において、マイクロピペットは、 $30\mu\text{m}$ 未満の内径を有する。マイクロピペットの任意の部分ではなく、とりわけ内側部分を細胞が粘着することを防止するための物質又は溶液でコーティングすることができる。例えば、マイクロピペットをウシ血清アルブミン(例えば、1%未満、2%未満、3%未満又は3%又は3%(重量/容積)を超える)でコーティングすることができる。1つの例において、候補胎児有核細胞を除去するステップは、約1%(重量/容積)のウシ血清アル

10

20

30

40

50

ブミンでコーティングされたマイクロピペットで細胞を集めるステップを含む。マイクロピペットは、使用時に使える状態に回復させることができる(例えば、上で示したように追加のBSAで再コーティングする)。

【0236】

細胞は、細胞の化学処理又は基材の化学処理を含むが、これらに限定されない、化学的手段を用いて除去することができる。細胞は、その分離の助けとするために硬化又は軟化することができる。細胞及び/又は基材は、分離工程を促進するために温度変化(例えば、冷却、凍結又は加熱)にさらすことができる。細胞は、細胞と基材との間の結合相互作用の性質を変化させることによって、緩めることができよう。基材は、単純ガラス面又は修飾ガラス面であり得る。いくつかの実施形態において、修飾ガラス面は、細胞の制御された除去に適し得る。その理由は、面と基材との間の相互作用に特有の化学的性質があるためである。面の修飾は、ガラス面より容易にエッチング、加水分解又は可溶化することができる接着剤を含む1つ又は複数のポリマーを用いる又は置くことを含み得る。ポリマーは、標識工程により面上に細胞を一方で保持した細胞基材相互作用を単に十分に弱くする目的を果たし得るが、他方で裸のガラス面と比較して相互作用を小さくした。ポリマーに加えて(又はその代わりに)に、非シラン面をもたらず自己集合単層の導入によって、面の化学的性質を調節することができる。ポリマー又はモノマー、修飾などの、これらの面のいずれも、非特異的なガラスと細胞との相互作用の代わりに公知の特異的な共有結合、イオン又は他の結合相互作用を代用することによって細胞の除去を促進する役割を果たし得る。特異的結合化学への変化は、選択的な化学的除去を促進し得る。その理由は、特異的結合化学が公知であるからである。特異的なポリマー又はモノマーの変化は、特異的な化学選択性を促進するだけでなく、ポリマー又はモノマーの変化は、選択的熱脱離、光支援脱離も(又は代わりに)促進し得る。光支援脱離は、いくつかのレーザー捕捉法に用いられるような光-熱脱離、又は別法として、フリーラジカル若しくはイオンラジカル化学によるような結合次数の変化によって細胞と基材との間の結合相互作用を変化させる光化学反応を含み得る。モノマー又はポリマー修飾により導入することができる結合相互作用に影響を及ぼし得る化学官能基の例は、チオール、アクリレート、メタクリレート、ビニル、エポキシ、エチレングリコール、ヒドロキシル、イソシアネート、ピリジン、アクリル酸、アミン、カルボアミド(carbamide)、スルホン及びビオチンを含むが、これらに限定されない。除去の前に細胞を軟化又は硬化するための化学的手段に加えて、ポリマーは、機械的、化学的、熱的若しくは光化学的又は光熱脱離の前に細胞を選択的に封入するために導入することができる。封入剤は、分離の過程における細胞の完全性を保護する手段としての役割を果たし得る。

【0237】

細胞は、レーザー捕捉マイクロダイセクション、例えば、Zeiss Laser Microdissection System、Applied Biosystem(登録商標)Arcturus^{XT}(商標) Microdissection System、Molecular Machines and Industries Laser Microdissection System又はLeica Laser Microdissection Systemなどの市販のマイクロダイセクションシステムを用いて除去することができる。しかし、場合によって、組織試料を取り扱い、除去するために設計されたレーザー捕捉システムは、単一細胞を除去又は単離するように機能しない可能性がある。単一細胞は、組織試料と比較して低い重量(若しくは質量)又はたぶん小さいサイズを有する可能性があり、したがって、異なる挙動を示す可能性がある。

【0238】

いくつかの実施形態において、細胞及びそれが付着している基材の一部と一緒に除去することができる。それらは、任意の手段により基材の残りの部分から除去することができる。手段は、上述の方法及び/又は物質のいずれかを、或いは基材又はフィルターの残りの部分からそれを除去するためにフィルターなどの基材の一部を切断することによるなどの他の方法によるものを含み得る。基材は、鋭利な物体(例えば、はさみ若しくはナイフ)、レーザー又は他の手段を用いて切断することができる。

【0239】

10

20

30

40

50

細胞は、次に追加の解析の前に基材から除去することができる。

【0240】

基材から分離された胎児細胞は、さらに別個に解析することができる。或いは、2つ以上の分離胎児細胞を合わせて、さらなる解析に供することができる。

【0241】

いくつかの実施形態において、候補胎児細胞(又は一連の候補胎児細胞)を溶液中に入れ、固定し、解析する。いくつかの実施形態において、細胞を溶解させることができる。溶解細胞からのタンパク質をELISA(例えば、胎児特性を確定するために)などにより解析することができる。DNAを本明細書で述べる解析のいずれかに供することができる。

【0242】

本発明の1つの態様は、胎児細胞を完全な状態に維持するように構成された溶液を多孔質膜上に置くステップと、細胞を膜上の溶液に入れるステップと、溶液を除去し、それにより、細胞を多孔質膜に付着させるステップとを含む、胎児細胞を面に付着させる方法を提供する。

【0243】

1つの実施形態において、候補細胞(又は一連の候補細胞)を基材又は面から除去し、第2の基材又は第2の面上に置く。細胞は、面に付着させる、面に除去可能に付着させる、又は面に近接して定着させ若しくは置く(ただし面に付着させない)ことができる。任意の供給元からの細胞を面上に置くことができる。細胞は、第1の面(本明細書で述べた)から除去することができる。又は例えば、FACS解析、MACS解析、マイクロ流体解析若しくは他の任意の供給元から得ることができる。胎児細胞について本明細書で例示したが、本明細書で述べた方法及び材料は、対象の細胞及び/又は幹細胞若しくは腫瘍細胞などのまれな細胞を含む対象のあらゆる種類の細胞について用いることができる。

【0244】

上で述べた材料のいずれか(又は第1の基材若しくは面)を用いることができる。いくつかの実施形態において、第2の基材若しくは第2の面は、柔軟な膜、親水性膜、多孔質膜及び/又は弾性膜であり得る。いくつかの実施形態において、溶液を置くステップ及び/又は細胞(例えば、胎児細胞若しくは候補胎児細胞)を置くステップは、溶液及び/又は細胞を例えば、ポリエチレンテレフタレート(PET)、二軸延伸ポリエチレンテレフタレート(mylar)又はポリエチレンナフトレート(PEN)などの多孔質ポリエステル膜に置くステップを含む。

【0245】

細胞は、第1の基材から除去した少量の溶液を含み得る、第2の基材上に直接置くことができる。いくつかの実施形態において、溶液のアリコート(一滴)を第2の基材上に置き、細胞を溶液のアリコートに入れる。アリコートは、細胞の完全性を維持するように構成された溶液であり得る。いくつかの実施形態において、溶液は、細胞を溶解し、それにより、細胞内容物を曝露するように構成することができる。或いは、溶液は、細胞の完全性を維持するように構成することができる。任意の溶液を用いることができる。いくつかの実施形態において、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて、第2の基材上にアリコートを形成する。いくつかの実施形態において、溶液(又は面)は、亜鉛(例えば、5~50mM、30~50mM又は42mM硫酸亜鉛)を含み得る。第2の基材上に置いた溶液は、20 μ l未満、10 μ l未満、1 μ l未満、0.1 μ l未満であり得る。1つの例において、一滴は、約10 μ l~約50flである。溶液は、細胞を膜上に置く前若しくは後に膜上に置くことができる、又は同時に置くことができる。1つの実施形態において、細胞が溶液中に存在し、溶液を置くステップと細胞を置くステップを同時に実施する。

【0246】

1つ又は複数の対照細胞も膜に付着させることができる。対照細胞は、公知の同一性を有し得る。対照細胞は、母親赤血球、胎児赤血球、胎児赤血球系、胚赤血球、胚赤血球系、母親白血球、生殖細胞、トランスフェクト細胞及び/又は、ヘモグロビンを発現する又は他のマーカーを発現若しくは有するものなどの、細胞若しくは細胞系などの、任意のも

10

20

30

40

50

のであり得る。対照細胞は、胎児ヘモグロビンを発現し、抗胎児ヘモグロビン抗体免疫細胞化学の陽性対照として用いられ得る。対照細胞は、胚ヘモグロビンを発現し、抗胎児ヘモグロビン抗体免疫細胞化学の陽性対照として用いられ得る。対照細胞は、X又はY染色体又は両方を有すると同定することができる。

【0247】

いくつかの実施形態は、細胞を置き、溶液を除去するステップを繰り返して、それにより、複数の胎児細胞を面に付着させるステップを含む。いくつかの実施形態において、各細胞は、膜上で任意の他の細胞から分離されている。細胞を分離された状態にすることによって、より十分な解析が可能となり、また、後の使用又は解析に備えて単一の単離された細胞を除去することがより容易となり得る。

10

【0248】

細胞を多孔質膜上に置いた後、細胞を膜に付着させることができる。細胞は、溶液を除去すること又は溶液を加えること又は処理によるなどの、いずれかの方法で付着させることができる。溶液は、溶液を蒸発させることによるなどの、いずれかの方法で除去することができる。溶液は、室温(ほぼ又は68)で、又は室温を上回る温度(例えば、熱を加えることにより)で、又は室温を下回る温度で蒸発させることができる。いくつかの実施形態において、細胞を含む膜を100%未満の湿度、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満又は50%未満の湿度を有するなどの制御された環境に置くことができる。いくつかの実施形態は、緩衝液を除去するステップの少なくとも一部において100%未満の湿度又は70%未満の湿度を含む制御された環境中で多孔質膜を保有することを含む。

20

【0249】

いくつかの実施形態において、膜は、オゾンを含む制御された環境に置くことができる。いくつかの処理は、蒸発過程を遅くし得るものであり、これは、細胞の完全性を維持し、細胞溶解を防ぐ助けとなり得る。1つ又は複数の塩が後に残り得る。1つの実施形態において、溶液は、リン酸緩衝生理食塩水を含み、蒸発するステップは、リン酸緩衝生理食塩水から水を除去し、多孔質膜上にリン酸塩を残すステップを含む。

【0250】

別法として又はさらに、細胞を膜に固定する溶液を加えることができる。溶液はまた、さらなる解析に備えて細胞を固定し得る。別法として、細胞を処理により付着させることができる(紫外(UV)光固定など)。複数の候補細胞を膜に同様に付着させることができる。細胞を互いに隣接又は接触させることができ、或いは細胞を互いに分離させることができる。細胞を分離させることは、解析及びその後の膜からの細胞の収集に助けとなり得る。

30

【0251】

遺伝子解析を可能にする、細胞を付着させ、遺伝子の完全性を維持するあらゆる種類の多孔質膜を用いることができる。いくつかの実施形態において、バックグラウンド蛍光が低い材料を用いる。これにより、蛍光ベースの解析を膜上の細胞について実施することが可能になる。いくつかの実施形態において、UV処理膜のような親水性膜を用いる。いくつかの実施形態において、ポリエチレンナフトレート(PEN、二軸延伸ポリエチレンテレフレート若しくはMylar)及び/又はポリアミン若しくはポリリシン面を用いる。細胞を面に保持する他の材料を用いることができる(例えば、フィブロネクチン、フィブリン)。

40

【0252】

多孔質膜上の候補胎児細胞又は複数の候補胎児細胞を固定及びさらなる解析に供する。細胞は、本明細書で述べた固定剤のいずれかを含むいずれかの固定剤及び/又は塩(例えばクエン酸ナトリウム)、亜鉛(例えば、硫酸亜鉛)を含む固定剤、及び/又は2-プロモ-2-ニトロ-1,3-ジオール関連材料を用いて固定することができる。膜上の細胞は、あらゆる目的のために解析することができる。細胞は、遺伝的特性を決定するために解析することができる。細胞は、胎児の同一性を判定又は確認するために解析することができる。細胞は、*in situ*ハイブリダイゼーションを用いて又は免疫細胞化学により解析することができる。1つの実施形態において、胎児細胞を同定するために本明細書の他所で述べたように、細胞又は複数の細胞を抗胎児ヘモグロビン抗体及び/又は抗胚ヘモグロビン抗体を用い

50

て解析する。いくつかの実施形態において、細胞は、抗グリコホリン、抗HLA-G及び/又は抗FECH抗体を用いて解析することができる。

【0253】

細胞の内容物又は内容物の一部(オルガネラ、膜、核酸(本明細書に示したいずれかを含むいずれかの核酸)、タンパク質)を膜から除去することができる。例えば、細胞を膜上で溶解し、ピペットを用い且つ/又は真空源を用いることなどにより内容物を他の面、膜、管又はホルダーに除去することができる。

【0254】

図13に多孔質膜上の細胞を解析するための方法及び材料を示す。対象の細胞(潜在的な胎児細胞を含む)を母親血液試料から調製した細胞の単層から除去し、溶液のアリコート中の膜200上に置いた。(膜200は、単層基材が「第1の基材」であるこの例における「第2の基材」とみなすことができる)。溶液を蒸発させて、それにより、胎児細胞202、その核207を有する母親細胞206及び母親細胞208を基材に付着させた。対照細胞212、対照細胞214、対照細胞216及び対照細胞224も付着させる。細胞を膜上で固定し、免疫細胞化学を抗胎児ヘモグロビン抗体及び抗胚ヘモグロビン抗体の組合せを用いて実施した。胎児細胞202は、ヘモグロビンシグナル204により示されるように陽性に染色されている。対照細胞212は、胚ヘモグロビンを発現し、胚ヘモグロビンに関するような、ヘモグロビンシグナル214について陽性である。対照細胞216は、胎児ヘモグロビンを発現し、胎児ヘモグロビンに関するような、ヘモグロビンシグナル218についても陽性である。対照細胞220は、比較的により低いレベルのヘモグロビンシグナル222を示すF細胞である。母親細胞208も比較的により低いレベルのヘモグロビンシグナル210を示し、これもF細胞である。母親細胞206も陰性対照細胞224もヘモグロビンシグナルを示さない。

10

20

【0255】

対象の細胞(例えば、胎児細胞又は候補胎児細胞)は、多孔質膜から完全な状態で若しくはおおむね完全な状態で除去することができ又は多孔質膜の一部とともに除去することができる。除去された細胞は、さらなる解析に供することができる。基材又は面から細胞を除去するための本明細書で述べた方法のいずれかを用いることができる。

【0256】

本発明の1つの態様において、柔軟な多孔質及び/又は弾性面の一部に付着した細胞を用意するステップと、柔軟な多孔質及び/又は弾性面の少なくとも一部を弾性基材と並置するステップと、細胞を中空シャフトにより取り囲むステップと、中空シャフトと柔軟面との間に力かけるステップとを含み、力は、弾性基材及び/又は顕微鏡ステージ若しくは他の硬質(非弾性)面により対抗されて、それにより柔軟な多孔質及び/又は弾性面の一部及びそれに付着した細胞を柔軟な多孔質及び/又は弾性面の残りの部分から分離する、細胞(例えば、胎児細胞)を除去する方法を提供する。

30

【0257】

本発明の1つの態様において、細胞を除去するための装置及びシステムを提供する。図24A~Cから図26までに示すように、細胞分離装置301は、第1の中空末端302及び第2の末端303を有するシャフトを含み得る。中空端302は、膜の一部を除去するように構成されている。示すように、第2の末端303は、シャフトと接続され、第2の末端を顕微鏡対物タレットと接続するように構成されたタレットハウジングを含み得る。一般的に、シャフトは、タレットハウジングが顕微鏡対物タレットに設置されており、柔軟な膜が顕微鏡ステージ329上に配置されているときに膜の一部を除去するように構成されている。

40

【0258】

図24Aに示すように、細胞を除去するための装置301は、中空シャフト302を含み得る。いくつかの実施形態において、除去装置301は、アダプタ303をさらに含み得る。アダプタ303は、除去装置を標準顕微鏡に連結するように構成することができる。いくつかの実施形態において、アダプタは、除去装置を顕微鏡の対物タレットに連結するように構成することができる。或いは、除去装置は、アダプタを使用せずに標準顕微鏡に直接接続するように構成することができる。いくつかの実施形態において、中空シャフトを交換し、新た

50

な中空シャフトを、除去すべき各新たな細胞及び/又は細胞の各新たな試料について用いる。いくつかの実施形態において、アダプタは、複数の細胞について再使用することができ、或いは、アダプタは、各新たな細胞の除去及び/又は各新たな試料からの細胞の除去のために交換することができる。

【0259】

図24B及び図24Cにおける断面に示すように、中空シャフト302は、いくつかの適切な構成のうちの1つに構成することができる。図24Bにおける断面に示すように、中空シャフト302は、遠位鈍端を有し得る。下でさらに詳細に述べるように、力は、中空シャフト302と柔軟面(図25A及び図25Bにおける304)との間に加えられ、力は、弾性基材(図25A及び図25Bにおける306)及び/又は顕微鏡ステージのような非弾性面により対抗される。中空シャフト302が遠位鈍端を有するため、中空シャフトは、中空シャフトの外径とほぼ等しい外径を有する、柔軟面から円を打ち抜く。中空シャフトは、面の円形部分が中空シャフト内に押し上げられないように、面の円形部分を弾性基材上に押し下げる。しかし、いくつかの実施形態において、柔軟面の円形部分(及びそれに付着している細胞)が中空シャフトの遠位端に対して保持することができるように、中空シャフトを通して真空をかけることができる。或いは、細胞及び柔軟面の一部をPCRチューブなどの収集又は試料チューブに入れることができるように、ピンセット又は他の適切な把持器具を用いて、周囲の柔軟面から柔軟面の押し抜き部分(及びそれに付着している細胞)を採集することができる。

10

【0260】

或いは、図24Cにおける断面に示すように、中空シャフト302'は、レーザーパンチに類似した形削りされた末端を有し得る。再び、下でさらに詳細に述べるように、力は、中空シャフト302'と柔軟面との間に加えられ、力は、弾性基材及び/又は顕微鏡ステージのような非弾性面により対抗される。中空シャフト302'が形削り遠位端を有するため、中空シャフトは、中空シャフトの内径とほぼ等しい外径を有する、柔軟面から円を押し抜く。中空シャフトは、面の円形部分が中空シャフト内に押し上げられるように、柔軟面及び/又は弾性基材に押し通る。いくつかの実施形態において、単一の中空シャフトを複数の細胞の除去のために用いることができる。したがって、細胞のそれぞれを中空シャフトに押し込み、所望の細胞のすべて又は一部が収集されるまで、そこに保持することができる。この実施形態において、複数の細胞を中空シャフトからPCRチューブなどの収集容器に移すことができる。

20

30

【0261】

いくつかの実施形態において、中空シャフト302の第1の中空末端の内径は、約200um~約400umであり得る。いくつかの実施形態において、中空シャフト302の第1の中空末端の外径は、約300um~約500umであり得る。いくつかの実施形態において、第1の中空末端の内径は、約100um~約300umであり、第1の中空末端の外径は、約300um~約500umであり、内径より大きい。いくつかの実施形態において、シャフト302は、25ゲージ針であり得る。いくつかの実施形態において、シャフトは、ステンレススチールである。

【0262】

図25A及び図25Bに示すように、細胞を除去するためのシステムは、弾性基材306及び柔軟面304をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、柔軟面304は、多孔質膜スライドであり得る。いくつかの特定の実施形態において、柔軟面は、厚さが約1umであり得る。いくつかの実施形態において、柔軟面は、二軸延伸PET又はMYLARなどのポリエチレンテレフタレート(PET)材料であり得る。或いは、柔軟面は、ポリフェニレンサルファイド(PPS)材料であり得る。いくつかの実施形態において、材料は、好ましくは低い自己蛍光特性を有する。さらに、柔軟面の一部が対象の細胞とともに収集チューブ(例えば、PCRチューブ)に含まれ得る。したがって、柔軟面の材料は、好ましくは細胞について実施される処置及び解析(例えば、増幅及び遺伝子解析)を妨げない。図25A及び図25Bに示すように、いくつかの実施形態において、柔軟面を枠305により囲むことができる。枠305は、金属(アルミニウムなど)又は他の適切な材料であり得る。図25A及び図25Bに示すように、細胞を除去するためのシステムは、柔軟面304と連結された弾性基材306をさらに含み得る。弾性

40

50

基材は、シリコン又は他の適切な弾性材料であり得る。

【0263】

図26に示すように、細胞を除去するためのシステムは、顕微鏡システム327及びフィードバックソース330をさらに含み得る。顕微鏡システムは、カメラ328及び顕微鏡ステージ329をさらに含み得る。図26に示すように、柔軟面324、枠325及び弾性基材326が、顕微鏡ステージ329上に置かれ、又は他の場合に連結されている。いくつかの実施形態において、ステージ329は、顕微鏡327に対して移動するように構成されている。例えば、ステージ329は、柔軟面324をシャフト322と接触させるように上昇させることができる。中空シャフト322は、上述のように顕微鏡327の対物タレットに連結することができる。柔軟面が顕微鏡ステージ上に設置され、シャフト322が顕微鏡に連結されたならば、シャフトの位置を顕微鏡に対して較正することができる。1つの例において、シャフト322を柔軟面の位置に導くことによって、試料の押し抜きを実施することができる。柔軟面の位置は、好ましくはそれに付着している細胞を含み得ない。試料の押し抜きを実施したならば、カメラ328が柔軟面304上に位置決めされるように顕微鏡327を回転させることができる。使用者は、カメラを介して柔軟面上の試料押し抜き位置を見ることができ、顕微鏡カメラを介して見ながら押し抜き位置を十字線の中心に位置合わせすることができる。使用者は、次いでボタンを選択するか、又は他の場合に、現在の位置がシャフトの位置であり、押し抜きが行われる場所であることをプログラム、ソフトウェア又はマイクロプロセッサ等に示すことができる。シャフトの位置が柔軟面に対して較正されたならば、細胞の除去工程が始まり得る。好ましくは柔軟面の位置は、細胞除去工程中に変更しない。いくつかの実施形態において、上述のように、除去される各新たな細胞ごとに新たなシャフトを用いることができる。新たなシャフトは、例えば、試料の汚染を防ぐために用いることができる。いくつかの実施形態において、シャフトの位置は、顕微鏡に連結される各新たなシャフトについて再較正することができる。

10

20

【0264】

柔軟面に対するシャフトの位置がシステムによって知られたならば、使用者は、細胞除去工程を開始することができる。上述のように、それに付着した少なくとも1つの細胞を有する柔軟面を顕微鏡ステージに連結する。いくつかの実施形態において、柔軟面に付着させた各細胞を柔軟面上の他の細胞から分離することができる。細胞除去工程は、対象の特定の細胞を探しながら、柔軟面上の少なくとも一部の細胞を柔軟面上に位置合わせした顕微鏡カメラにより調査するステップから開始することができる。例えば、対象の細胞は、胎児細胞であり得る。特定の例において、対象の細胞は、胎児有核赤血球であり得る。対象の細胞は、例を本明細書で述べる、適切な方法により同定することができる。例えば、使用者は、囲むステップ(例えば、対象の細胞をシャフト302で囲む)の前に面に付着した細胞の特性を解析することができる。いくつかの実施形態において、細胞の特性を解析するステップは、加えるステップの前のDNA解析、RNA解析、タンパク質解析及び光学解析の少なくとも1つを実施するステップを含み得る。いくつかの実施形態において、タンパク質解析を実施するステップは、免疫細胞化学を実施するステップを含み得る。例えば、免疫細胞化学を実施するステップは、胎児ヘモグロビン及び胚ヘモグロビンの少なくとも1つを解析するステップを含み得る。

30

40

【0265】

カメラ328を柔軟面上に設置した状態で、使用者は、ステージを細胞ごとに移動させることができる。或いは、システムは、ステージを位置ごとに自動的に移動させ得る。対象の細胞が同定されたならば、使用者は、シャフト322が対象の細胞上に位置決めされるように顕微鏡327を回転させることができる。或いは、システムは、自動的にシャフトを対象の細胞上を回転させ得る。シャフトが設置されたならば、ステージを上昇させて、柔軟面をシャフトと接触させることができる。ステージは、柔軟面の一部が周囲の柔軟面から押し抜かれるまで上昇させることができる。ステージは、使用者によって、又は押し抜きが完了したというフィードバックの受信時に自動的にシステムによって停止され得る。

【0266】

50

フィードバックソース330は、いくつかの適切な実施形態の1つであり得る。例えば、フィードバックソースは、押し抜きが完了したことを示す可聴表示、例えば、「パチン」のような音を感知するように構成されている、マイクロホン又は他の適切な電子振動センサであり得る。いくつかの実施形態において、マイクロホンは、顕微鏡ステージに連結することができる。いくつかの実施形態において、マイクロホンは、柔軟面又は枠に直接連結することができる。いくつかの実施形態において、マイクロホンは自動ゲイン制御付き増幅器に連結することができる。例えば、周波数特性は、上述のような「パチン」という音により検出される集束周波数帯(focused band of frequencies)を受信するように調節することができる。例えば、帯域通過フィルターは、「パチン」という音の範囲内の周波数を通し、当範囲外の周波数を阻止又は減衰するために用いることができる。いくつかの実施形態において、「パチン」は、ヒトの耳により明瞭に聞くことができるように拡大することができる。或いは、音は、モーター駆動ステージを制御するシステムにフィードバックすることができるデジタルフィードバックシグナルに変換することができる。システムは、デジタルフィードバックシグナルを受信時に自動的にステージを上昇させることを停止し、且つ/又はステージを下降させ始め得る。

10

20

30

40

50

【0267】

代替実施形態において、フィードバックソースは、シャフト322に連結したひずみゲージを介して得ることができる。この実施形態において、ひずみゲージは、柔軟基材を貫く押し抜きの完了時にシャフトにより検出される力又は圧力の突然の低下を検出し得る。さらなる代替実施形態において、フィードバックソースは、レーザーにより光学的に得ることができる。レーザー、例えば、レーザー変位センサなどは、柔軟面及び/又は弾性基材の圧縮並びに押し抜きの完了時の当圧縮の解放を検知するために用いることができる。

【0268】

対象の細胞の周りの押し抜きの完了時に、柔軟面の(円形)部分及びそれに付着した細胞を周囲の柔軟面から回収し、膜から細胞を分離するステップ及び細胞からDNAを抽出するステップの少なくとも1つを実施するように構成された溶液中に入れることができる。上述のステップを繰り返して、対象の複数の細胞を得ることができる。いくつかの実施形態において、DNAを複数の細胞から得ることができ、DNAを例えばPCRを用いて増幅することができ、36サイクル未満のPCRを用いる場合に少なくとも0.35 µgの細胞当たりの平均増幅DNA収量を得ることができる。

【0269】

いくつかの実施形態において、母親血液試料を得るステップ、母親血液試料を濃縮して、母親細胞及び少なくとも1つの胎児細胞を得るステップ、母親血液試料から単層を作製するステップ、細胞を特徴付けるステップ、個々の胎児細胞を得るステップ及び細胞をさらに解析するステップなどの、方法の様々なステップ中にDNAの質及びDNAの収量を維持しなければならない。いくつかの実施形態において、PCRは、十分な材料を得るために胎児細胞の解析又は特徴付けの一部として実施することができる。他の場合には、PCRベースの解析を実施することは、DNAの質の代用としての役割を果たし得る。

【0270】

いくつかの実施形態は、方法のステップ(例えば、用意するステップ、並置するステップ、囲むステップ及び適用するステップ)を繰り返して、複数の細胞を得るステップ、複数の細胞からDNAを得るステップ、並びに増幅DNAを得るためにPCRを用いてDNAを増幅するステップ、並びに36サイクル未満のPCR、35サイクル未満のPCR、34サイクル未満のPCR、33サイクル未満のPCR、32サイクル未満のPCR、31サイクル未満のPCR、又は30サイクル未満のPCRを用いる場合に少なくとも0.20 µg、少なくとも0.25 µg、少なくとも0.30 µg、少なくとも0.35 µg、又は少なくとも0.40 µgの増幅DNAの細胞当たりの平均収量を得るステップを含む。増幅は、例えば、PicoPlexなどのRubicon Genomicsキットを用いて実施ことができ、DNA収量は、Nanodrop分光光度計を用いて測定することができる。

【0271】

細胞(及び面の一部)を分離するための細胞分離装置は、細胞(又は細胞の群)を囲み、膜

の一部を分離するために力がかかるように構成された中空シャフトを含み得る。中空シャフトは、一端が中空であり得る(例えば、くぼんだ末端を有する)か又は第1の末端から第2の末端まで中空であり得る。シャフトは、顕微鏡から柔軟面上の細胞までのような、それを通して可視化を可能にするように中空であり得る。第1の末端(例えば、膜接触端)は、実質的に平坦(垂直)であってよく或いは傾斜させ(例えば、内径から外径まで傾斜した)且つ/又は他の状態に成形してよい(例えば、ぎざぎざ状、鋸歯状、形削り、歯状)。傾斜は、内側に角度がついているか又は外側に角度がついていてよい。いくつかの実施形態において、細胞及び/又は面の一部を面の残りの部分から分離する助けとするように、末端は、弾性基材上の接続構造と接続し得る。中空シャフトは、それが膜の一部を除去することができる限りは、任意の形状をとり得る。例えば、中空シャフトは、実質的に円筒状であってよく、又は第1の中空末端から第2の末端まで先細りにしてよい。シャフトの第1の中空末端は、膜の一部を除去するのに十分な強度を備えている材料製であり得る。1つの例において、第1の中空末端は、ステンレススチールを含む。

10

20

30

40

50

【0272】

いくつかの実施形態において、細胞分離装置は、手持ち式であるように構成することができる。いくつかの実施形態において、細胞分離装置は、顕微鏡と接続させることができ、又は対物タレットに対してタレットハウジングを介するなどにより、顕微鏡と接続させるように構成することができる。本発明の1つの態様において、細胞分離装置は、内径及び外径を有する中空末端を有するシャフト、並びにシャフトと接続され、シャフトを顕微鏡対物タレットに取り付けるように構成されたタレットハウジングを含み得、シャフトは、タレットハウジングが顕微鏡対物タレットに設置され、柔軟な膜が顕微鏡ステージ上に設置されている場合に膜の一部を除去するように構成されている。

【0273】

当技術分野で公知の顕微鏡を用いることができる。用いることができる顕微鏡のいくつかの非限定的な例は、Bausch and Lomb、Celestron、Leica、Olympus等により製造されたような光学顕微鏡である。

【0274】

弾性基材は、面を切断する力に対抗するのに十分な支えを与える面の下で基材であり得る。1つの実施形態において、基材は、厚いシリコン層である。

【0275】

いくつかの実施形態において、細胞を面上の他の細胞から分離し、1個の細胞を中空シャフトを用いて除去する。いくつかの他の実施形態において、2個の細胞、3個の細胞、4個の細胞、5個の細胞、5個から10個までの細胞、10個の細胞又は10個を超える細胞を同時に除去することができる(例えば、中空シャフトを用いて)。該方法を繰り返して、複数の細胞を得ることができる。いくつかの実施形態において、除去される細胞(例えば、対象の細胞)は、要求されない細胞であってよく(例えば、胎児細胞が望まれる場合、母親細胞であってよい)、膜全体をさらなる解析に供することができるように、要求されない細胞のすべて又は本質的にすべてを除去し、それにより、所望の細胞(例えば、胎児細胞)のみを含む膜を残すことができる。

【0276】

いくつかの実施形態において、細胞を除去する方法は、囲むステップ又は力かけるステップを実施する前に面に付着した細胞の特性を解析するステップを含み得、細胞の特性に基づいて除去すべき細胞を判定するステップをさらに含み得る。細胞の特性を解析ことができ、DNA解析、RNA解析(in situハイブリダイゼーションを含むが、これに限定されない)、タンパク質解析(胎児ヘモグロビン及び/又は胚ヘモグロビンなどのヘモグロビンを解析することを含む免疫細胞化学を含むが、これに限定されない)及び光学解析などの解析方法を用いることができる。

【0277】

いくつかの実施形態において、細胞を除去する方法は、面、基材又は膜の一部及びそれに付着した細胞を、細胞を膜から分離するステップ及び細胞からDNAを抽出するステップ

の少なくとも1つを実施するように構成された溶液に入れるステップをさらに含み得る。

【0278】

細胞を解析し、除去することに関わるステップは、マイクロプロセッサにより制御することができ、自動的に実施することができる。1つの実施形態において、細胞を中空シャフトで囲み、力をかけるステップを自動的に制御することができる。

【0279】

いくつかの実施形態において、細胞を第2の多孔質膜上に置き、追加の解析に供することができる。いくつかの実施形態において、核酸(ゲノムDNA(gDNA)などのDNA、ミトコンドリアDNA、アンチセンスRNA、マイクロRNA(miRNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)、非コーディングRNA(ncRNA)、piwi相互作用性RNA(piRNA)、リボソームRNA(rRNA)、小干渉RNA(siRNA)、転移RNA(tRNA))を細胞から抽出し、単離し、又は別の方法で得ることができる。

【0280】

胎児の遺伝子状態を判定する方法は、母親血液の試料を用意するステップと、母親血液試料中の胎児及び母親有核赤血球の両方を含む有核赤血球を濃縮するステップと、濃縮試料中の胎児赤血球とすべての他の細胞又はすべての他の血液細胞とを識別するステップとを含み得る。方法は、少なくとも1つの胎児細胞を試料の残りから分離するステップをさらに含む。方法は、2つ以上の単離された胎児細胞を合わせるステップを含み得る。

【0281】

マイクロダイセクション濃縮法は、マイクロアレイ応用(例えば、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション及び/又はPCR(例えば、単一分子(smPCR)、デジタルPCR(dPCR)、定量的PCR(qPCR))、配列決定法若しくは他のDNA増幅及び/又は解析法に用いる高純度DNA試料を用意するために用いることができる。

【0282】

遺伝子検査及び胎児/母親識別を今や実施することができる。標準FISH、PCR(例えば、dPCR若しくはqPCR)及び/又はアレイ若しくはマイクロアレイ解析(例えば、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション)は、自動細胞同定アルゴリズムを用いて見いだされるnRBCについて実施することができる。

【0283】

分離された胎児細胞をあらゆる方法でさらに解析することができる。単一細胞を解析することができ、又は細胞の群(例えば、2~10個、11~50個若しくは50個を超える)をさらなる解析のために合わせるすることができる。2個以上の細胞又は細胞の2以上の群を解析し、結果を比較することができる。いくつかの実施形態において、解析のための胎児細胞の群は、10個の細胞の群中1個、2個又はそれ以上の母親細胞を含む可能性があり、母親細胞に対応するデータを最終解析時に識別し、考慮から除去することができる。1つの例において、胎児細胞は、PCR(例えば、dPCR若しくはqPCR、RT-PCR)、in situハイブリダイゼーション、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションを含むアレイ若しくはマイクロアレイ解析及び/又は配列決定法を用いて解析することができる(少なくとも1個の胎児細胞からDNA若しくはRNAを得るステップ、解析するステップ及び/又は増幅するステップを含む)。1つの実施形態において、アレイCGH及び配列決定法の両方を実施する。

【0284】

細胞又は細胞の群からのDNAをPCRにより増幅することができる。高い質のDNAは、いくつかの解析に必要であり得る。例えば、DNAは、非架橋性である必要があり、又は十分に長く、十分な収量のものである必要があることがあり得る。いくつかの実施形態において、DNAの質は、光学解析などにより解析することができ、PCR増幅などの他のステップを含み得る。いくつかの実施形態のために、非常に高い質のDNAが得られる。いくつかの実施形態において、本明細書で述べたいずれかの方法又は方法の組合せにより得られる胎児細胞又は胎児細胞の群からのDNAをPCRにより増幅し、DNAの特性を解析する。いくつかの実施形態は、36サイクルのPCRを用いる場合に少なくとも0.35ugの細胞当たりの平均増幅DNA収量を得るステップを含む。

【0285】

10

20

30

40

50

胎児細胞の細胞(又はその群)からのDNAは、胎児の特性について解析することができる。いくつかの実施形態において、方法は、複数の細胞の各潜在的な胎児細胞から6サイクル未満で胎児DNAの第1の部分を増幅するステップと、胎児アイデンティファイアーを用いてDNAを解析し、胎児アイデンティファイアーについて陽性である試料を得るステップとを含む。方法は、複数の細胞からのDNAの第2部分をプールし、増幅して、プールされた増幅DNAを得るステップを含み得る。DNAは、胎児特異的配列の存在について解析することができる。1つの実施形態において、DNAを短鎖縦列反復配列(STR)について解析する。Pro mega STR Analysisキット(PowerPlex)などのキットを用いることができる。

【0286】

1つの実施形態において、複数の胎児細胞(例えば、約10個)をPCRにより増幅する。特化プロトコール及び材料を用いるか、又は入手可能なキット(例えば、Rubicon Genomics PicoPlex)を用いて、アレイCGH解析、配列決定法又は他の解析に供するのに十分なDNAを得ることができる。アレイCGHを実施するために任意の種類のアレイを用いることができる。当技術分野で公知の方法を用いる在庫のあるアレイ(例えば、Agilent、Affymetrix、Life Technologies Inc.等)を用いることができ又は特化アレイを用いることができる。解析用の参照DNAは、1人の個人(母親DNA、父親DNA、兄弟姉妹、他の血縁者、対象の遺伝子状態を有し得る若しくは有し得ない者のいずれか)からのものであってよく、又は上述の個人のいずれかを含む個人の群からのものであってよい。

【0287】

胎児細胞又は複数の胎児細胞は、遺伝子、部分又は全染色体コピー数変化(ゲノムDNAの一部の欠失又は重複(反復/縦列反復を含む);トリソミー-1、2、3、4、5、6、7、8(ウォーカー症候群)、9、10、11、12、13(パトウ症候群)、14、15、16、17、18(例えば、エドワード症候群)、19、20、21(ダウン症候群)、22、XY((ターナー症候群:単-X);クラインフェルター、トリプルX、XYY)を含む(例えば、異数性、トリソミー、テトラソミー)を含むが、これらに限定されないコピー数多型(CNV));欠失、転座、逆位、環;一塩基多型(SNP)の検出;モザイク現象を含むが、これらに限定しない遺伝子状態、疾患又は状態について解析することができる。1つの例において、T13、T18、T21、XY並びに嚢胞性線維症、テイ-サックス、鎌状赤血球、デュシェンヌ型筋ジストロフィー及び血友病から選択される1つ若しくは複数の遺伝子状態又は状態を解析する。他の例において、T13、T18、T21及びXYから選択される1つ若しくは複数の遺伝子状態又は状態を解析する。

【0288】

本明細書で述べた方法を実施するための且つ/又は本明細書で述べた構成要素(組成物を含む)を含むキットを提供する。構成要素(組成物を含む)のいずれかをキットにおける他のものと組み合わせることができる。

【0289】

本明細書で述べた胎児有核細胞を濃縮するためのフィルターシステムを用いて血液試料からの胎児有核細胞を濃縮するためのキットを提供することができる。キットは、本明細書で述べた1つ又は複数の構成要素(組成物を含む)を含み得る。キットは、フィルターシステムを用いて血液試料からの胎児有核細胞を濃縮するための方法を実施するための説明書を含み得る。1つの例において、キットは、フィルター及び溶出緩衝液を含む。溶出緩衝液は、トレハロース及びマルトースを含み得る。他の例において、キットは、母親有核細胞及び胎児有核細胞を含む母親血液試料をフィルターに通すステップと、有核細胞をフィルターに保持するステップと、溶出緩衝液によりフィルターから有核細胞を溶出するステップとを含む、有核細胞が胎児有核細胞を含む、方法を実施することに関する説明書を含み得る。いくつかの実施形態において、キットはまた、溶出液をフィルターを通して送出するためのポンプを含み得る。例えば、上述のように、ポンプは、あらかじめ定められた容積の溶出液をフィルターを通してあらかじめ定められた時間送出するために用いることができる。

【0290】

面上に細胞の単層を作製するためのキットを提供する。キットは、屈曲部を有する塗抹

ブレード及び/又は細胞希釈及び/又は再懸濁溶液を含み得る。キットは、細胞を固定し、洗淨するための1つ又は複数の溶液を含み得る。キットは、方法を実施するための説明書を含み得、方法は、塗抹ブレードによって面に対して少なくとも二方向に細胞の試料を移動させて、面上に細胞の単層を作製するステップと、細胞を面に付着させるステップとを含む。

【0291】

胎児細胞を同定するために試料を試験するためのキットを提供する。キットは、抗胎児ヘモグロビン(ガンマ及び/又はゼータ)及び/又は抗イプシロンヘモグロビンを含み得、使用説明書を含み得る。1つの例において、説明書には胎児細胞を同定するために試料を試験する方法が記載され得る。説明書は、本明細書で述べた方法のいずれかを含み得る。キットは、抗体を検出する助けとなる1つ又は複数の作用剤(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、Alexa Fluor 488チラミド)をさらに含み得る。キットは、核検出剤(例えば、DAPIを含むが、これに限定されない、核染色剤)をさらに含み得る。キットは、細胞を調製するため組成物(例えば、緩衝液)及び/又は細胞を洗淨するため組成物(例えば、緩衝液)を含み得る。キットは、細胞を固定し、洗淨するための1つ又は複数の溶液を含み得る。

10

【0292】

(実施例)

図6に本開示の1つの実施形態による胎児有核細胞の濃縮の後の母親血液試料から得られたデータを示す。母親血液試料を白血球枯渇フィルターに通し、フィルター上に残存した細胞を上述のような溶出緩衝液を用いて溶出した。細胞をスライド上に塗抹し、DAPIで染色して、有核細胞を検出し、抗イプシロンヘモグロビン抗体を用いた免疫細胞化学に供して、胎児細胞の存在を検出した。スライドの一部(解析した試料の割合)を420nm及びUV光で照射して、有核細胞と非有核細胞とを、またヘモグロビンを有する細胞とヘモグロビンを有さない細胞とを識別した。細胞を非有核赤血球(RBC)、白血球(WBC)及び候補有核赤血球と分類し、試料中の赤血球対白血球の比(RBC:WBC)を計算した。計数した細胞の総数に基づいて充填密度%を計算した。解析した視野における胎児有核赤血球を抗イプシロンヘモグロビン抗体を用いて確認し(同定#fnRBC)、各試料中の胎児有核赤血球の予測数(外挿#fnRBC)を外挿した。

20

【0293】

図15A~図15Bに本開示に従って胎児細胞を胎児細胞と同定するための短鎖縦列反復配列(STR)の結果を示す。短鎖縦列反復配列は、ゲノムに見いだされるDNAの反復配列である。STRは、2つ(又はそれ以上)の間で異なる可能性があるが、同じである可能性もある。2つの試料の間の異なるSTRの数の変化を見いだすことは、試料が互いに異なっていることを意味する。各変化は、対立遺伝子と考えることができる。この実験で一連のSTRを用いて、母親血液試料からの単一胎児及び単一母親細胞を互いに識別することができるかどうかを判定し、「胎児性」を細胞に割り当てるのに用いることができた。STRの代表的な試料を図15Aに示す。母親血液試料から細胞の単層を基材上に作製し、ヘモグロビン及び核の存在について解析した。陽性細胞を基材から個別に除去した。本明細書で述べた方法によって得られた細胞からのDNAを、限定されたサイクル数(例えば6)を用いてRubicon Genomics製の全ゲノム増幅キットを用いて増幅した。次いで、この全ゲノム増幅DNAからの並びに公知の胎児組織(F712)及び公知の母親組織(M712)から抽出したDNAからのSTRのパネルをPromega STR解析キットを用いてPCR増幅した。

30

40

【0294】

図15Aに試料のサブセット及びSTRマーカーのサブセットからの代表的なデータを示す。対立遺伝子の同一性を左に示す。個々の細胞に関する結果を胎児及び母親組織に関する結果と比較することができる。固有の対立遺伝子及び母親固有の対立遺伝子の数は、すべての結果の要約であって、STRマーカーのサブセットからの示した代表的なデータからのものではないことに注意すること。図15Bに同定された対立遺伝子の総数並びに胎児固有の対立遺伝子の数はどれほどであるのか及び母親固有の対立遺伝子の数はどれほどであるの

50

かを含む、個々の細胞の結果を示す。(他の対立遺伝子は、共有されており、胎児の特性を判定するためのこの解析に用いないものとした)。これらの結果に基づいて、細胞を胎児(F)、母親(M)又は非同定(N)と同定した。対立遺伝子の総数は、確率的増幅事象、DNAの質等のような技術的限界のため、試料間で異なっている。

【0295】

図16A～図16Cに本開示による2人の個人からのプールした胎児細胞の異なる試料の胎児特性を同定するためのアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション解析の結果を示す。性別を別の方法で決定した2つの別個の試料を解析した。手短に述べると、自己集合性単層を母親血液試料から作製し(それぞれについて)、ヘモグロビン含有細胞を同定するために420nm光を用い、核を検出するために蛍光を用いて単層を解析した。ヘモグロビン及び蛍光の同時存在を示す個々の細胞(第1の試料における35個及び第2の試料における42個)を単層から除去し、柔軟な膜に移した。細胞を抗胎児ヘモグロビン抗体及び抗胚ヘモグロビン抗体を用いて免疫細胞化学により解析して、ヘモグロビンを検出し、細胞を胎児性と同定した。同定された胎児細胞をプールし、全ゲノム増幅を用いてPCRにより増幅した。増幅胎児DNA及び参照試料を異なる色の色素で別個に標識し、試料をAgilentアレイ上で比較ゲノムハイブリダイゼーションにより解析した。試料間の差を解析するために参照DNAを性ミスマッチとして選択した(例えば、男性胎児に対して女性参照試料)。結果を図16B及び図16CのイデオグラムにおけるY(試料785)及びX(試料813)染色体について示す。

10

【0296】

図17A～図17Bにヘモグロビン含有細胞を同定するために420nm LED光を用いて照射し(図17A)、SYBR Greenを用いて核について蛍光により解析した(図17B)細胞の単層の1つの視野を示す。ヘモグロビン含有細胞は、赤血球である。有核細胞は、母親白血球及び有核赤血球を含む。

20

【0297】

図23A～図23Bにヘモグロビン(図23A)について及び核の存在(図23B)について解析した母親血液試料からの単層の2つの画像を示す。円270は、その中心におけるヘモグロビン陽性を示す。同じ細胞272は、核シグナルについて検出されたことが図23Aに示されている。2つのシグナルが1つの細胞に存在する場合、それらは、他の細胞と比べて互いに影響又は干渉し、撮像したときの予想より比較的強く又は弱く見える可能性がある。図18A～図18Cに420nm光ヘモグロビン(図18A)、核について蛍光(図18B)及び両方(図18C)を用いた図17A～図17Bに示す単層の一部の詳細な図を示す。照射及び撮像条件によって、異なる条件下で解析した同じ細胞の他の画像と比較した場合に、核がその予想されたサイズより大きく見える可能性がある。

30

【0298】

図19に照射核により同定された細胞232及び本開示の一態様により柔軟膜から除去される膜の円形部分230を示す。該細胞及び一部は、本開示の一態様により押し抜きを用いて除去した。除去される膜の一部は、直径が約400umである。

【0299】

図20A～図20Bに核及びヘモグロビンの存在について解析した柔軟膜上の濃縮母親血液試料からの単層から得られた細胞を示す。図20Aに染色核を検出するための蛍光照射下の膜上の細胞核の画像を示す。図20Bに膜上の他の細胞を示す。細胞は、混合抗イプシロンヘモグロビン抗体及び抗胚ヘモグロビン抗体を用いた免疫細胞化学を用いて解析した。細胞は、胎児ヘモグロビン260及び核262の両方について陽性であり、候補胎児細胞である。

40

【0300】

図21にヘモグロビンについて420nm光(256)、核について蛍光(254)及び両方(252)を用いて解析した母親血液試料からの自己集合性単層の一部を示す。ヘモグロビン及び核シグナルの同時存在は、有核赤血球(潜在的な胎児赤血球)を示すものであり得る。蛍光像246及び蛍光像248は、第1の細胞が有核性であることを示しているが、ブランクスポット250は、細胞がヘモグロビンを欠いていることを示している。細胞は、白血球のような有核性で、ヘモグロビンを含まない細胞である。両チャンネルにおいて重複して、ハイブリッドシ

50

グナル240を形成している、蛍光像242及び420nmシグナル244は、第2の細胞が有核赤血球(潜在的な胎児赤血球)であることを示している。

【0301】

図22に本開示による自動解析システムを用いた様々な単層解析の最初の結果を示す。視野(FOV)は、解析した単層の視野の数を示す。潜在的な有核細胞(白血球及び有核赤血球)を同定するためにさらに解析することができる認められた蛍光物体の数が示されている。非有核赤血球を示すと思われる420nm陽性物体(ただし核シグナルはなし)の数が示されている。

【0302】

本発明に関するさらなる詳細に関しては、材料及び製造技術に関連技術分野の技術者のレベルの範囲内として用いることができる。同じことは、一般的に又は必然的に用いられるさらなる行為に関する本発明の方法をベースとする態様について当てはまる。また、記載した本発明による変形形態の任意選択的な特徴は、独立に又は本明細書で述べた1つ又は複数の特徴と組み合わせて説明し、請求することができると考えられる。同様に、単数の項目への言及は、存在する複数の同じ項目があるという可能性を含む。より具体的には、本明細書及び添付の特許請求の範囲で用いているように、単数形「a」、「an」、「said」及び「the」は、文脈上他の状態が明確に示されない限り、複数の指示対象を含む。特許請求の範囲は、任意選択の要素を除外するように起草することができることがさらに注目される。したがって、この陳述は、請求要素の列挙に関連して「単に」、「のみ」等のような排他的用語の使用、又は「消極的」限定の使用の根拠となるものである。本明細書で特に定義しない限り、本明細書で用いたすべての科学及び技術用語は、本発明が属する技術分野の技術者により理解されているのと同じ意味を有する。本発明の広さは、対象の明細書により限定されるものではなく、用いられる請求項の明白な意味によってのみ限定される。

10

20

【図1】

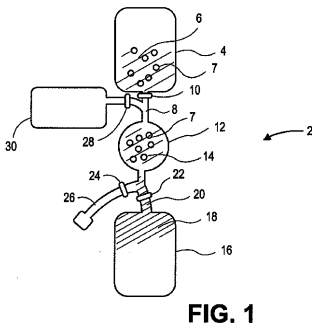


FIG. 1

【図2】

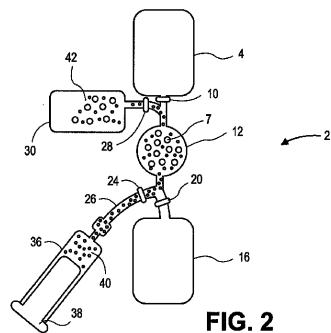


FIG. 2

【図3】

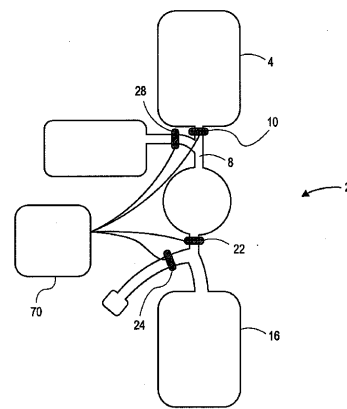


FIG. 3

【 図 4 】

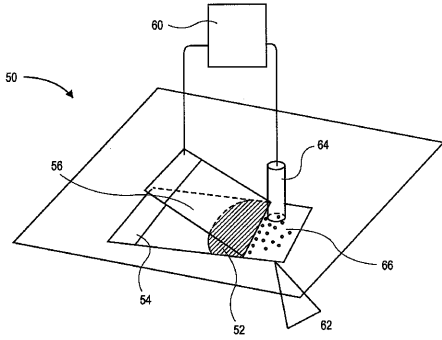


FIG. 4

【 図 5 】

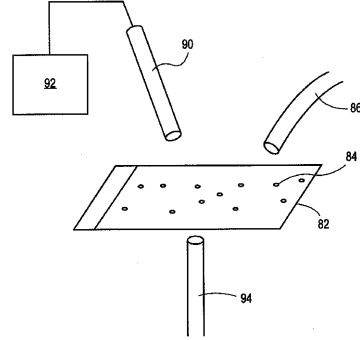


FIG. 5

【 図 6 】

・20ml 開始 ・150ul 最終 ・90%スキャン可能	1	2	3	4	5	6	7	8
RBC:WBC	2.6:1	1.4:1	1.2:1	1.7:1	1.2:1	1.7:1	1.5:1	1.1:1
スキャンする総面積 (cm ²)	302	324	324	324	205	302	400	324
充填密度(%)	43%	53%	70%	40%	70%	50%	30%	50%
解析した試料の割合	3/28	3/30	4/30	6/30	1/19	4/28	1/37	
同定された fnRBC 数	8	3	4	4	4	4	3	
外挿された fnRBC 数	73	30	30	25	76	28	111	

図 6

【 図 7 】

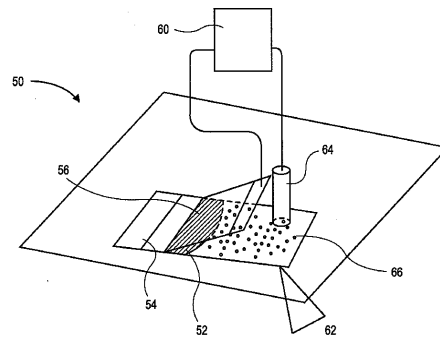
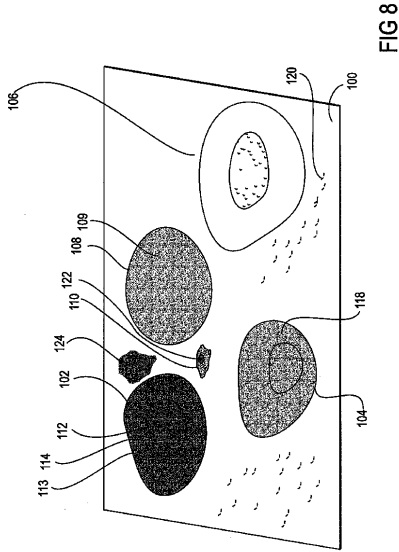


FIG. 7

【 図 8 】



【 図 9 】

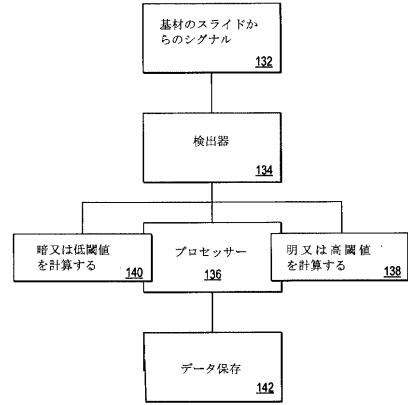


図 9

【 図 10 (1) 】

Method	Description	Issues
赤血球溶解	赤血球膜の溶解	RBC及びnRBCを溶解する可能性がある。nRBCが溶解すると、胎児nRBCと母親nRBCとを識別できない可能性がある。
選択的母親赤血球溶解 (KB法)	母への胎児ヘモグロビンの差別的抵抗に基づく母親赤血球膜の選択的溶解	選択的溶解パラメータは、挿入全血特性によって試料ごとに異なる可能性があり、過度に多くの母親RBCを残す可能性があり、或いは胎児RBC(nRBCを含む)の集団を溶解する可能性がある。
MACS	細胞表面抗原への磁気ビーズの付着による磁気選別	一度に1つの細胞表面マーカーを使用した。細胞表面マーカーはnRBC又はfnRBCに特異的でない可能性がある。
FACS	細胞抗原(細胞内又は細胞外)への蛍光タグの付着による蛍光選別	試料の処理が非常に遅い可能性がある。システムは、高価で、扱いにくい可能性がある。
レクチン	赤血球の発生及び成熟に関連する細胞表面ガラクトースは、赤血球前駆細胞上に高発現するので、基材をnRBCが選択的に付着するガラクトース特異的部位で被覆する。	RBC及び白血球と比べてnRBCに対して特異的でない可能性がある；nRBCの保持の効率は、基材上のsba(ダイズアグルチニン)の濃度に基づいていた。
サイズ	有核細胞と非有核細胞とのサイズの差に基づく	nRBCは、発生時に大きく、大きな核、低い細胞質核比及び低いヘモグロビンの「量」を有する。nRBCが成熟するとき、核が凝縮するのでサイズが減少し、細胞質核比が増加し、ヘモグロビンの「量」が増加する。したがって、細胞のサイズは時間とともに減少する。高レベルのRBC汚染が許容されない限り、サイズベースの細胞選別では、すべて大部分十分なnRBCが保持されない可能性がある。
密度	有核WBC、nRBC及びRBCのクラス間の密度差に基づく	サイズベースの細胞選別の場合と同様の問題。nRBCの密度はnRBCの年齢とともに変化する可能性があり、高レベルのRBC汚染が許容されない限り、大部分すべてのnRBCが保持されない可能性がある。

図 10(1)

【 図 10 (2) 】

① 連鎖	連鎖は、細胞の独特の内腔状の形状のために形成される赤血球の積み重なり(RBC)である。円盤状RBCが平らな表面を持っているため、接触する面積が大きく、互いに密着し、それにより連鎖を形成する。有核細胞は連鎖を形成しない。連鎖促進剤は、凝集を促進するために用いられる。	RBCの連鎖を促進するために用いられるグリコホリンA(又は他の一般的表面抗原)に対する抗体は、それらを鎖に捕捉し得る胎児nRBCに見いだされる表面抗原でもある。連鎖鎖は、形成及び沈降時に有核細胞を捕捉する2次元メッシュ構造をしばしば形成する。完全な連鎖鎖を伴う沈降は、いくつかの有核細胞を捕捉する。
電荷ベースの分離	有核細胞と非有核細胞との電荷の差に基づく	分離を可能にするために流動を用いることは全血については遅すぎるため、追加の(前濃縮ステップ)を必要とし得る。システムは、高価で、扱いにくい。

図 10(2)

【 図 11 】

ステージ	名称
胚	Portland 1(ゼータ、ガンマ)
	Gower 1(ゼータ、イプシロン)
半胚	Gower 2(アルファ、イプシロン)
	Portland 2(ゼータ、ベータ)
胎児	胎児(アルファ、ガンマA)
	胎児(アルファ、ガンマG)
成人	成人(アルファ、ベータ)
	成人(アルファ、デルタ)

図 11

【 図 1 2 】

	F 細胞(%)(F 細胞である総 RBC の割合)	HbF(%)(HbF である F 細胞中の Hb の割合)	HbF/細胞 (pg)	総 Hb(pg)	発生率	根拠	診断
胎児(10~20 週)	100%	90%	30	32~34Hb			
健康人	0.1~7%	<15%	4.3+/-0.2	27~31 Hb		閾値	
胎児ヘモグロビンの遺伝性持続 (HPFH)	100%	10~100%	5(1~10)	30	1.5%	高割合の+細胞の+閾値	診断前でない可能性あり・無症候性
鎌状赤血球貧血	2~80%	10~30%	5(1~10)	30	1:500 アフリカ系アメリカ人	高割合の+細胞の+閾値	診断前である可能性あり
ベータ地中海貧血	100%	ベータが70~100% デルタ/ベータが5~15%	20~30	25~30	1:100000	高割合の発現+細胞の+閾値	診断前である可能性あり

図 12

【 図 1 3 】

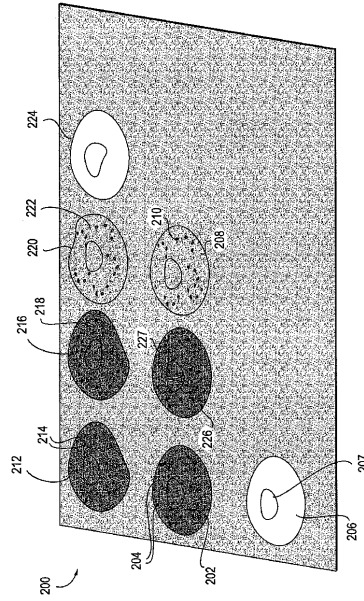


FIG 13

【 図 1 4 】

既知男性試料におけるプロトタイプシステムの性能、Yプロープによる検証	
試料数	34
妊娠期間	10~18
fmRBC の平均数	87
fmRBC の範囲(試料の一部の同定割合に基づき外挿)	10~350
マーカーの特異性	100%

図 14

【 図 1 5 B 】

細胞 ID	対立遺伝子総数	胎児固有の対立遺伝子総数	母親固有の対立遺伝子総数	胎児同定判定(F/M/N)
513	16	6	0	F
514	7	3	0	F
515	1	0	0	N
516	17	6	1	F
517	0	0	0	N
525	14	4	1	F
526	13	1	2	N
527	14	2	1	N
528	1	0	0	N
529	9	3	1	F
537	14	3	1	F
538	10	1	0	N
539	20	5	1	F
540	17	4	2	F
541	19	5	1	F
549	12	3	0	F
550	1	0	0	N
551	16	4	2	F
552	15	5	0	F
553	12	1	0	N
554	4	2	0	F
555	13	4	1	F
556	14	5	1	F
557	1	0	0	N
558	17	4	2	F
561	23	5	1	F
562	7	2	0	F
563	12	1	0	N
564	17	5	0	F
565	2	0	0	N
576	11	1	2	N
577	16	3	0	F
578	20	5	2	F
579	1	0	0	N
580	13	3	1	F
586	17	7	1	F
587	7	1	0	N
588	7	2	0	F
589	1	0	0	N
590	1	0	0	N

図 15B

【 図 1 5 A 】

	M712	F712	525	586	527	556	578
D3S1358	15	15	15		15		15
		16	16		16		16
PENTA_E	17			17			17
	13	13		13			13
D2S1338	17		17				
	16	16	16		16	18	
CSF1P0	19			25		25	25
	9						
PENTA_D	11	11	11	11	11		9
	9					10	
THO1	12	12	12		12	12	7
	7						
胎児固有の数	9.3				9.3		
	10	10		10			
母親固有の数	NA	12	4	7	2	5	5
	15	NA	1	1	1	1	2
分類		F	F	F	N	F	F

図 15A

【 図 1 6 A 】

患者	妊娠期間(週)	胎児の性	胎児同定方法	採取した nRBC 数	同定し、 プールした fnRBC 数
785	11	雄	抗体	35	17
813	12	雌	抗体	42	5

図 16A

【 図 1 7 B 】



FIG. 17B

【 図 1 7 A 】

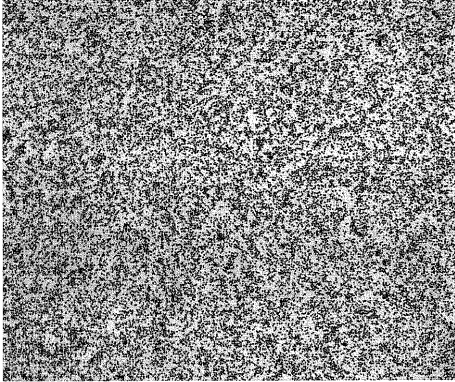


FIG. 17A

【 図 1 8 A 】

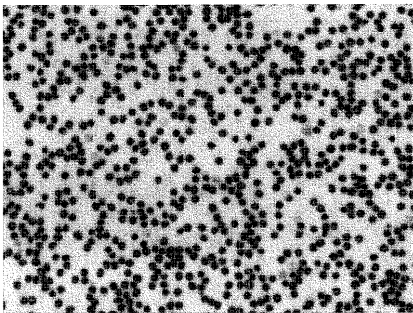


FIG. 18A

【 図 1 8 B 】

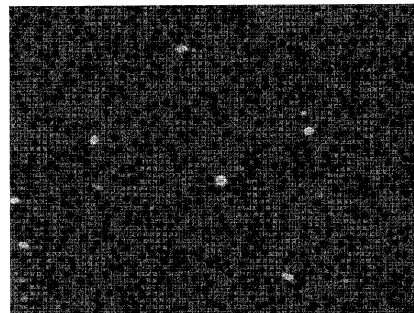


FIG. 18B

【 図 1 8 C 】

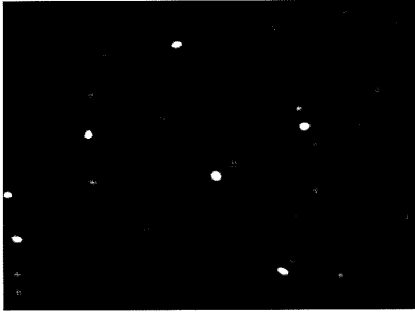


FIG. 18C

【 図 1 9 】



FIG. 19

【 図 2 0 A 】

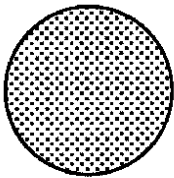


FIG. 20A

【 図 2 0 B 】

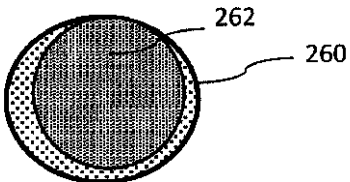


FIG. 20B

【 図 2 1 】

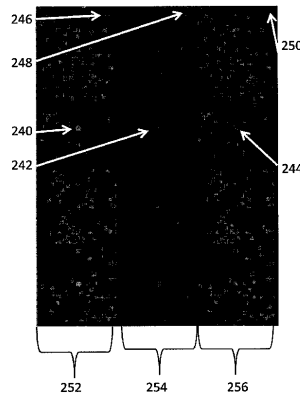


FIG. 21

【 図 2 2 】

スライド ID	スキャン数	視野	蛍光 Objects	420 nm Objects
002	1	209	14598	6573192
002	3	1419	471394	103248953
003	1	1419	3247574	46873407
003	3	1419	146307	70034173
003	4	1376	332958	92397140
003	5	1271	2545975	104473915
556	1	1419	4528949	52175909
557	1	1419	1986307	30202516
558	1	1001	2629815	40159281
558	2	1462	3667114	59381187
559	1	1462	3831224	49814015
559	2	1419	4668997	42529533
559	3	1419	5077587	43978188
560	1	1419	4083740	52104344
561	1	1376	2545521	69194038
561	2	1376	2308341	68293102
561	3	1344	2160422	68265028
569	2	1485	4785828	94960494
569	3	1485	4452108	82371148
574	2	1364	119335	120271240
579	1	1530	5864401	75083793
579	2	1485	189421	129046655
587	5	1344	6202283	50613864
592	1	1271	3442287	76246128
592	2	1271	6133158	66084409
592-2	1	1271	6918156	80793397

図 22

【 図 2 3 A 】

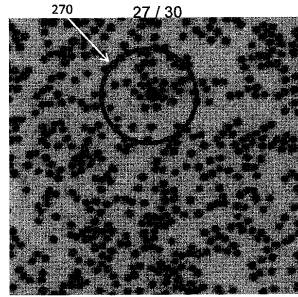


FIG. 23A

【 図 2 3 B 】

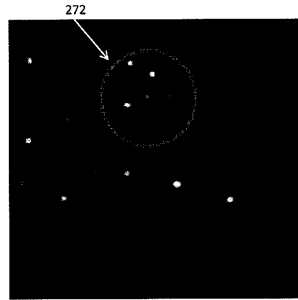


FIG. 23B

【 図 2 4 A 】

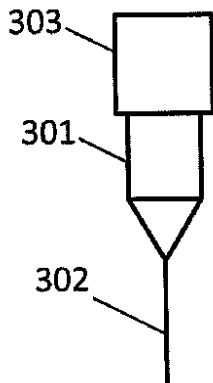


FIGURE 24A

【 図 2 4 C 】

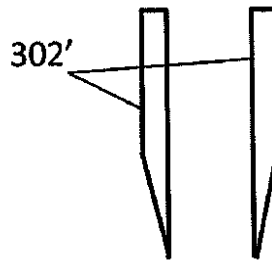


FIGURE 24C

【 図 2 4 B 】

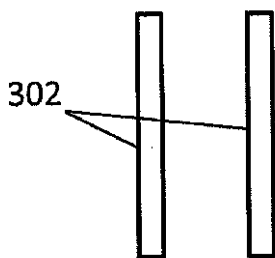


FIGURE 24B

【 図 2 5 A 】

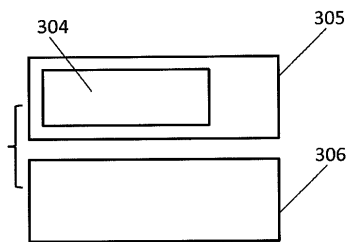


FIGURE 25A

【 図 2 5 B 】

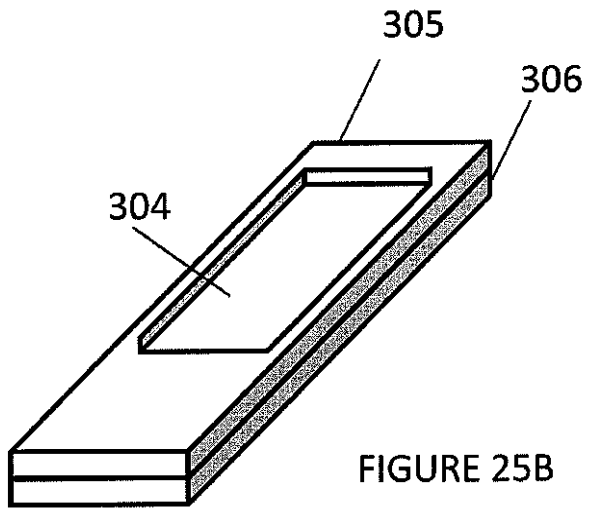


FIGURE 25B

【 図 2 6 】

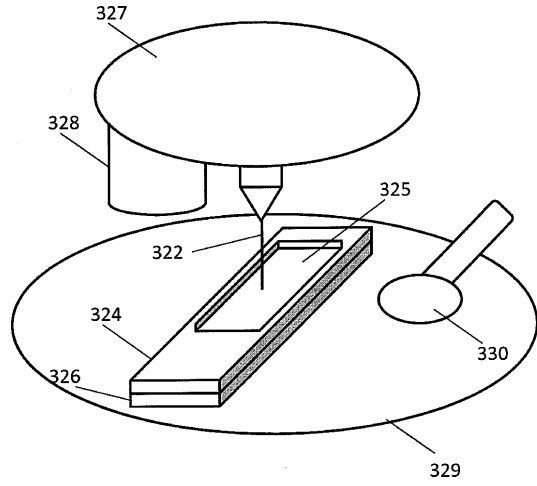


FIGURE 26

【 図 1 6 B 】

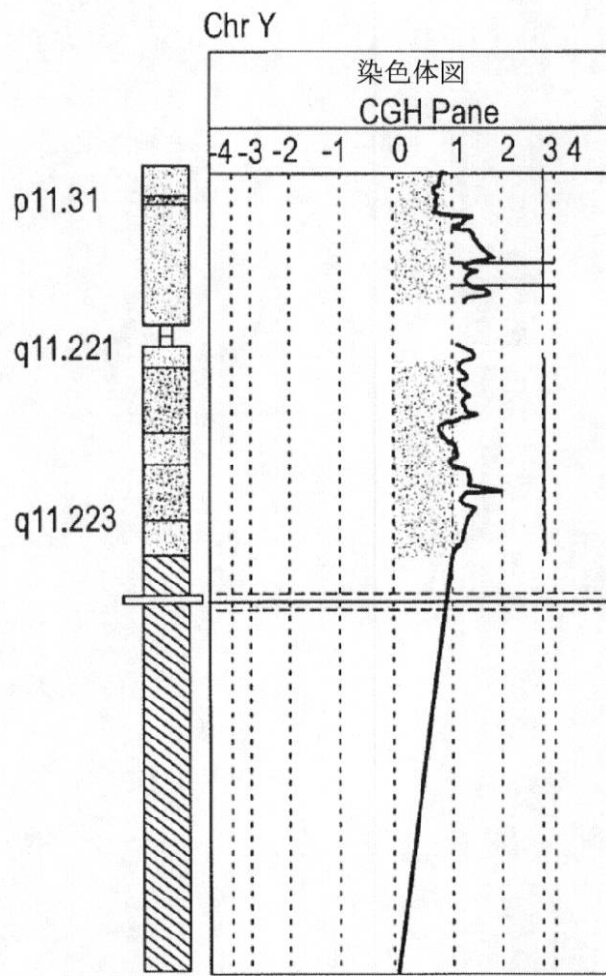


図 16B

【 図 1 6 C 】

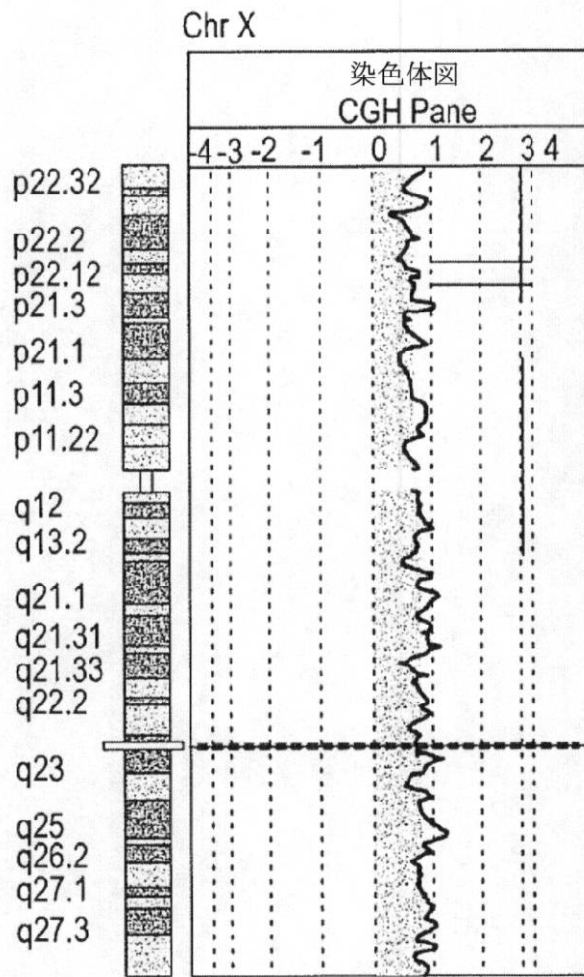




図 16C

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/065849
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/02(2006.01)i, C12Q 1/24(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/72(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i</i>		
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) C12Q 1/02, C12Q 1/24, C12Q 1/68, G01N 33/72, G01N 33/53, C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & keywords: fetus, genetic status, characteristic, separating, identifying, attaching, removing, nucleated cell, shaft, turret		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010-0159506 A1 (PARIKH et al.) 24 June 2010 See claims 1-43.	1-123
A	US 2005-0164241 A1 (HAHN et al.) 28 July 2005 See claims 1, 6 and 15.	1-123
A	US 2010-0035246 A1 (LUSHI et al.) 11 February 2010 See claim 1.	1-123
A	WO 00-62247 A1 (CHROMAVISION MEDICAL SYSTEMS, INC.) 19 October 2000 See claim 1; page 30, lines 1-2; page 36, lines 10-13.	1-123
A	US 2006-0134599 A1 (TONER et al.) 22 June 2006 See claim 1.	1-123
A	US 2003-0180762 A1 (TUMA et al.) 25 September 2003 See claim 1.	1-123
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 22 FEBRUARY 2013 (22.02.2013)		Date of mailing of the international search report 25 FEBRUARY 2013 (25.02.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. 82-42-481-3371 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/065849

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006-0072805 A1 (TSIPOURAS et al.) 06 April 2006 See claims 1 and 3.	1-123
A	US 2003-0165927 A1 (HULTEN) 04 September 2003 See claims 1, 2, 5, 8 and 29.	1-123

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/065849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0159506 A1	24.06.2010	WO 2010-012002 A1	28.01.2010
US 2005-0164241 A1	28.07.2005	AT 435301 T	15.07.2009
		DE 60328193 D1	13.08.2009
		EP 1524321 A1	20.04.2005
		EP 1524321 B1	01.07.2009
		JP 04705774 B2	22.06.2011
		JP 2005-160470 A	23.06.2005
		JP 2011-087584 A	06.05.2011
		US 7838647 B2	23.11.2010
		US 2008-0071076 A1	20.03.2008
		US 2011-0245482 A1	06.10.2011
		US 2011-0251076 A1	13.10.2011
US 2010-0035246 A1	11.02.2010	CA 2626757 A1	26.04.2007
		EP 1943354 A2	16.07.2008
		WO 2007-046108 A2	26.04.2007
		WO 2007-046108 A3	11.10.2007
WO 00-62247 A1	19.10.2000	AU 2000-53400 A	14.11.2000
		AU 762085 B2	19.06.2003
		CA 2366524 A1	19.10.2000
		CN 1384949 A	11.12.2002
		EP 1177523 A1	06.02.2002
		EP 1177523 A4	22.11.2006
		JP 2002-541494 A	03.12.2002
		US 6631203 B2	07.10.2003
		US 6947583 B2	20.09.2005
		US 2002-0076092 A1	20.06.2002
		US 2004-0071327 A1	15.04.2004
		WO 00-62247 A9	13.06.2002
US 2006-0134599 A1	22.06.2006	AT 531257 T	15.11.2011
		AU 2004-277153 A1	19.04.2004
		AU 2010-212376 A1	09.09.2010
		AU 212376 B2	13.10.2011
		CA 2500392 A1	08.04.2004
		EP 1569510 A2	07.09.2005
		EP 1569510 A4	30.08.2006
		EP 1569510 B1	02.11.2011
		EP 2359689 A1	24.08.2011
		ES 2375724 T3	05.03.2012
		JP 2006-501449 A	12.01.2006
		JP 2010-075191 A	08.04.2010
		US 8304230 B2	06.11.2012
		US 2007-0172903 A1	26.07.2007
		US 2007-0231851 A1	04.10.2007
		US 2007-0259424 A1	08.11.2007
		US 2007-0264675 A1	15.11.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/065849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2012-0006760 A1	12.01.2012
		WO 2004-029221 A2	08.04.2004
		WO 2004-029221 A3	13.05.2004
US 2003-0180762 A1	25.09.2003	AU 2002-568301 A	05.02.2002
		DE 10035433 A1	07.02.2002
		DE 10035433 C2	18.07.2002
		EP 1301798 A2	16.04.2003
		JP 2004-504818 A	19.02.2004
		WO 02-008751 A2	31.01.2002
		WO 02-008751 A3	15.08.2002
US 2006-0072805 A1	06.04.2006	AU 2001-918100 A	30.05.2001
		US 7346200 B1	18.03.2008
		US 7522757 B2	21.04.2009
		WO 01-37192 A1	25.05.2001
US 2003-0165927 A1	04.09.2003	AT 404694 T	15.08.2008
		AU 2001-860701 A	07.11.2001
		AU 784952 B2	10.08.2006
		CA 2406463 A1	01.11.2001
		CN 1436247 A	13.08.2003
		CN 1250742 C	12.04.2006
		DE 60135321 D1	25.09.2008
		EP 1282728 A2	12.02.2003
		EP 1282728 B1	13.08.2008
		GB 0009784 D0	07.06.2000
		HK 1055447 A1	01.12.2006
		JP 2003-530892 A	21.10.2003
		US 7279277 B2	09.10.2007
		WO 01-81626 A2	01.11.2001
		WO 01-081626 A3	12.09.2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/48		P
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		Y
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		M
		G 0 1 N 33/48		M
		G 0 1 N 37/00	1 0 2	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

- (72) 発明者 バイラビ・パリク
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 5 6 0 - 1 1 5 6 ・ニューアーク・ゲートウェイ・ブルバード・7 9 7 9 ・スイート・2 4 0
- (72) 発明者 マイケル・ディー・プロディー
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 5 6 0 - 1 1 5 6 ・ニューアーク・ゲートウェイ・ブルバード・7 9 7 9 ・スイート・2 4 0
- (72) 発明者 ジェームズ・ストーン
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 5 6 0 - 1 1 5 6 ・ニューアーク・ゲートウェイ・ブルバード・7 9 7 9 ・スイート・2 4 0
- (72) 発明者 ブライアン・アワブディ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 5 6 0 - 1 1 5 6 ・ニューアーク・ゲートウェイ・ブルバード・7 9 7 9 ・スイート・2 4 0
- (72) 発明者 ウルヴィ・ヴェド
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 5 6 0 - 1 1 5 6 ・ニューアーク・ゲートウェイ・ブルバード・7 9 7 9 ・スイート・2 4 0
- (72) 発明者 アン・トラン
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 5 6 0 - 1 1 5 6 ・ニューアーク・ゲートウェイ・ブルバード・7 9 7 9 ・スイート・2 4 0
- (72) 発明者 パトリック・ジェイ・コリンズ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 5 6 0 - 1 1 5 6 ・ニューアーク・ゲートウェイ・ブルバード・7 9 7 9 ・スイート・2 4 0
- (72) 発明者 デイヴィッド・ジェイ・アンヴァル
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 5 6 0 - 1 1 5 6 ・ニューアーク・ゲートウェイ・ブルバード・7 9 7 9 ・スイート・2 4 0

F ターム(参考) 2G045 BA13 BB15 CA25 DA13 DA51 FA14 FB02 FB03
4B024 AA11 CA01 DA03 HA14 HA15
4B029 AA07 AA09 BB11 BB20 CC08 FA04 FA05 FA12 HA02 HA09
4B063 QA13 QA18 QQ03 QQ08 QQ42 QQ79 QR32 QR48 QR62 QR72
QR77 QS02 QS07 QS25 QS33 QS34 QS39 QX01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014533509A5	公开(公告)日	2016-02-12
申请号	JP2014542550	申请日	2012-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	花萼电池公司		
申请(专利权)人(译)	单元音景·集团		
[标]发明人	バイラビバリク マイケルディープロディー ジェームズストーン ブライアンアワブディ ウルヴィヴェド アントラン パトリックジェイコリンズ デイヴィッドジェイアンヴァル		
发明人	バイラビ・パリク マイケル・ディー・プロディー ジェームズ・ストーン ブライアン・アワブディ ウルヴィ・ヴェド アン・トラン パトリック・ジェイ・コリンズ デイヴィッド・ジェイ・アンヴァル		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/04 C12N15/09 C12M1/34 G01N33/72 G01N33/48 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/5005 C12Q1/68 C12Q1/6806 C12Q1/686 C12Q1/6883 G01N33/689		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/04 C12N15/00.A C12M1/34.B G01N33/72.A G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.M G01N33/48.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/BA13 2G045/BB15 2G045/CA25 2G045/DA13 2G045/DA51 2G045/FA14 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/DA03 4B024/HA14 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/AA09 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/CC08 4B029/FA04 4B029/FA05 4B029/FA12 4B029/HA02 4B029/HA09 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	61/561231 2011-11-17 US		
其他公开文献	JP2014533509A		

摘要(译)

一种在母体全血样品中浓缩和分离有核细胞如母体和胎儿有核红细胞 (nRBC) 的方法。本发明还提供了用于制备和分析用于鉴定胎儿遗传物质的样品的方法和装置，作为产前基因测试的一部分。本发明还涉及用于区分从取自孕妇的血液样品中获得的胎儿有核红细胞和母体有核红细胞的方法和装置。

