

(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2006-523100
(P2006-523100A)

(43) 公表日 平成18年10月12日(2006.10.12)

(51) Int.CI.	F I	テーマコード (参考)
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	A 2 G O 4 5
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48	P 2 G O 5 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	Y 4 B O 6 3
G O 1 N 21/78 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
	G O 1 N 33/53	M

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-507600 (P2006-507600)	(71) 出願人	505368933 モナリザ メディカル, リミテッド イスラエル, 43 650 ラーナ, ハサドナ ストリート 11
(86) (22) 出願日	平成16年4月1日 (2004.4.1)	(74) 代理人	100103816 弁理士 風早 信昭
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月2日 (2005.12.2)	(74) 代理人	100120927 弁理士 浅野 典子
(86) 國際出願番号	PCT/IL2004/000304	(72) 発明者	アミエル, アリザ イスラエル, 40697 エインーサリ ド, ピー. オー. ボックス 213
(87) 國際公開番号	W02004/087863	(72) 発明者	フェジュギン, モシエ, ディー. イスラエル, 67676 テルーアヴィ ヴ, ローセンブルム ストリート 6, スイート 6113
(87) 國際公開日	平成16年10月14日 (2004.10.14)		
(31) 優先権主張番号	10/405,698		
(32) 優先日	平成15年4月3日 (2003.4.3)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】経子宮頸細胞を使用する非侵襲的の出生前遺伝子診断

(57) 【要約】

非侵襲的で危険を有さない出生前診断方法が提供される。本発明の方法によれば、胎児の性別を決定するために、かつ / または、胎児の染色体異常を同定するために、経子宮頸標本は、栄養膜特異的免疫染色に供され、続いて FISH および / または PRINS 分析に供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

胎児の性別を決定し、かつ／または、胎児の少なくとも1つの染色体異常を同定する方法であって、

(a) 栄養膜含有細胞サンプルを免疫学的に染色して、それにより、少なくとも1個の栄養膜細胞を同定すること、および

(b) 前記少なくとも1個の栄養膜細胞をインシチュウ染色体分析および／またはDNA分析に供して、それにより、胎児の性別を決定し、かつ／または、少なくとも1つの染色体異常を同定すること

を含む方法。

10

【請求項 2】

前記栄養膜含有細胞サンプルは子宮頸部および／または子宮から得られる請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記栄養膜含有細胞サンプルは、吸引、細胞採取用ブラシ、綿棒、子宮頸内洗浄および子宮内洗浄からなる群から選択される方法を使用して得られる請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記栄養膜細胞サンプルは妊娠の第6週～第15週の妊婦から得られる請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫学的に染色することは、栄養膜特異的抗原に対する抗体を使用して行われる請求項1に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記栄養膜特異的抗原は、HLA-G、PLAP、PAR-1、Glut12、H315、FT1.41.1、I03、NDOG-1、NDOG-5、BC1、AB-340、AB-154および第XIII因子からなる群から選択される請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記インシチュウ染色体分析および／またはDNA分析は、蛍光インシチュウハイブリダイゼーション(FISH)および／またはプライムド・インシチュウ標識化(PRINS)を使用して行われる請求項1に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記少なくとも1つの染色体異常は、異数性、転座、サブテロメア再配置、欠失、微小欠損、逆位および重複化からなる群から選択される請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記染色体異数性は完全トリソミーおよび／または部分的トリソミーである請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記トリソミーは、21トリソミー、18トリソミー、13トリソミー、16トリソミー、XXY、XYYおよびXXXからなる群から選択される請求項9に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記染色体異数性は完全モノソミーおよび／または部分的モノソミーである請求項8に記載の方法。

【請求項 12】

前記モノソミーは、Xモノソミー、21モノソミー、22モノソミー、16モノソミーおよび15モノソミーからなる群から選択される請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、経子宮頸試料に由来する栄養膜細胞を使用して遺伝的異常を診断する方法に関連し、より具体的には、胎児の性別および／または胎児における染色体異常を明らかに

50

するための栄養膜細胞の生化学的分析および遺伝子分析に関連する。

【背景技術】

【0002】

出生前診断では、ヒト胎児に存在する重大または軽度の胎児の奇形または遺伝的疾患の同定を必要とする。超音波走査では、通常、神経管、心臓、腎臓および四肢などに関わる奇形などの構造的奇形を検出することができる。他方で、様々な染色体異常、例えば、過剰染色体の存在 [例えば、21トリソミー (ダウントリソミー) ; クラインフェルター症候群 (47、XXY) ; 13トリソミー (パトース症候群) ; 18トリソミー (エドワーズ症候群) ; 47、XYY; 47、XXX] 、染色体の非存在 [例えば、ターナー症候群 (45、X0)] 、または、様々な転座および欠失などを、現在、绒毛生検 (CVS) および / または羊水穿刺を使用して検出することができる。10

【0003】

現在、出生前診断は、35歳を超える女性に対して、かつ / または、平衡転座または微小欠損 (例えば、アンゲルマン症候群) などの遺伝的疾患の知られている保因者である女性に対して勧められている。従って、ダウントリソミーなどに対する染色体異常を有する子供を出産する35歳を超える女性の割合が劇的に減少してきている。しかしながら、出生前検査がより若い女性では行われていないということにより、ダウントリソミー新生児の80%が実際には35歳未満の女性に生まれているという驚くべき統計がもたらされた。

【0004】

CVSは通常、カテーテルを子宮頸部から挿入するか、または、ニードルを腹部内に挿入し、胎盤の少量のサンプル (すなわち、绒毛) を取り出すことによって妊娠の第9週～第14週の間で行われる。胎児の核型が通常、CVS処置の1週間～2週間の間に明らかにされる。しかしながら、CVSは、侵襲的な処置であるので、処置に関連した流産の危険性が2%～4%あり、また、おそらくは、吸引された胎盤組織からの出血または塞栓形成に起因すると考えられるが、不完全な四肢発達などの胎児異常の危険性の増大を伴い得る (Miller D他、1999、Human Reproduction, 2:521～531)。20

【0005】

他方で、羊水穿刺は、薄いニードルを腹腔から子宮内に挿入することによって妊娠の第16週～第20週の間で行われる。羊水穿刺処置は、処置に関連した流産の危険性が0.5%～1.0%ある。羊水を吸引した後、胎児の纖維芽細胞が1週間～2週間さらに培養され、その後、纖維芽細胞が細胞遺伝的分析 (例えば、Gバンド染色) および / またはFISH分析に供される。従って、胎児の核型分析が、細胞をサンプリングした2週間～3週間の内に得られる。しかしながら、異常を発見した場合、妊娠中絶が通常、妊娠の第18週～第22週の間で行われ、これには、Boero手技 (心理学的および臨床的な側面の点でより複雑な処置) を伴う。30

【0006】

これらの制限を克服するために、非侵襲的処置を使用して胎児細胞を同定および分析するいくつかの方法が開発されていた。

【0007】

1つの方法は、妊娠第一期の期間中の母体血液における、胎児の栄養膜、白血球および有核赤血球などの胎児細胞の発見に基づいている。しかしながら、母体血液からの栄養膜の単離はその多核化した形態および抗体の入手性によって制限される一方で、白血球の単離は、母体の白血球を胎児の白血球から区別する特異な細胞マーカーがないことによって制限される。さらに、白血球は27年もの長い期間にわたって母体血液中に存続し得る (Schroeder J他、1974、Transplantation, 17:346～360; Bianchi DW他、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. 93:705～708) ので、残存細胞が、以前の妊娠期間から母体血液中に存在している可能性があり、そのような細胞に対する出生前診断を事実上不可能にしている。40

【0008】

他方で、有核赤血球（N R B C）は90日の比較的短い半減期を有しており、このことは有核赤血球を出生前診断のための優れた候補にしている。しかしながら、いくつかの研究では、母体血液から単離されたN R B Cの少なくとも50%が母体起源であることが見出されている（S lunga - T al l b erg A他、1995、Hum Genet、96：53～7）。さらに、母体血液中の有核胎児細胞の頻度がこのほか低い（0.0035%）ので、N R B C細胞を、（例えば、F ic ol - Pa que遠心分離またはP ercol 1勾配密度遠心分離を使用して）最初に精製し、次いで、例えば、磁気活性化細胞分取（M A C S、B usch, J.他、1994、P renat. Diagn.、14：1129～1140）、強磁性流体懸濁（S tee le , C. D.他、1996、C lin. O bstet. Gynecol.、39：801～813）、電荷流分離（W achtel , S. S.他、1996、Hum. Genet.、98：162～166）またはF A C S（W ang , J. Y.他、2000、C ytometry、39：224～230）を使用して濃縮しなければならない。しかしながら、そのような精製工程および濃縮工程は胎児細胞の回収が一定せず、また、胎児の性別の診断する際の感度を制限していた（B ischoff , F. Z.他、2002、Hum. Repr. Update、8：493～500に総説される）。従って、技術的問題、大きな費用、および、細胞の起源の不確実さの組合せにより、この方法が臨床的に受け入れられることを妨げている。

【0009】

別の方法は、子宮頸管における（胎盤から脱落した）栄養膜細胞の存在に基づく[S ettles LB(1971)、Nature London、230：52～53；R hine SA他(1975)、Am J Obstet Gynecol、122：155～160；H olzg r e veおよびH ahn(2000)、C kin O bstet and Gynaecol、14：709～722]。栄養膜細胞は、（i）吸引、（ii）細胞採取用ブラシまたは綿棒、（iii）子宮頸管内洗浄、または（vi）子宮内洗浄を使用して子宮頸管から取り出すことができる。

【0010】

栄養膜細胞が得られると、栄養膜細胞は、遺伝子疾患または染色体異常を明らかにする様々な方法に供することができる。

【0011】

G riffith - Jones他[B ritish J O bstet. and G ynaecol. (1992)、99：508～511]は、綿棒を用いて、または、生理食塩水で下部子宮頸管を洗浄することにより取り出された栄養膜細胞を使用して胎児の性別をP C Rに基づいて決定することを提示した。しかしながら、この方法は、子宮頸部における残存精液の結果としての偽陽性によって制限された。これらの制限を克服するために、ネスティドP C R法が、粘膜吸引または細胞採取用ブラシにより得られたサンプルに対して用いられた。これらの分析は胎児の性別予測のより大きな成功率をもたらした（F alcinelli C.他、1998、P renat. Diagn.、18：1109～1116）。しかしながら、精製されていない経子宮頸細胞からの直接的なP C R増幅は母体細胞の混入をもたらす可能性がある。

【0012】

経子宮頸細胞に対するP C R分析およびF I S H分析を使用するより近年の研究は胎児性別の不良な検出率をもたらしていた（C ion i R.他、2003、P renat. Diagn.、23：168～171）。

【0013】

従って、栄養膜細胞を経子宮頸細胞サンプルにおける優勢な母体細胞集団から識別するために、胎盤抗原に対する抗体が用いられた。

【0014】

M iller他(H uman Reproduction、1999、14：521～531)は、経子宮頸による吸引または洗浄を使用して取り出された経子宮頸細胞から栄養膜細胞を同定するために様々な栄養膜特異的抗体（例えば、F t 1 . 4 1 . 1 、N C L

10

20

30

40

50

- P L A P、N D O G - 1、N D O G - 5 および 3 4 0) を使用した。これらの分析は 2 5 % ~ 7 9 % の全体的な検出率をもたらし、3 4 0 抗体が最も効果的な抗体であった。

【 0 0 1 5 】

B u l m e r , J . N . 他 (P r e n a t . D i a g n . 、 2 0 0 3 、 2 3 : 3 4 ~ 3 9) による別の研究では、胎児の性別を決定するために経子宮頸細胞における F I S H 分析が用いられた。この研究では、男の胎児を有する母体から取り出されたサンプルはすべてが、Y 特異的シグナルを有する少数の細胞を含有することが見出された。同時に、二連での経子宮頸サンプルを、絨毛外栄養膜のすべての集団を認識することができるヒト白血球抗原 (H L A - G) 抗体 (G 2 3 3) (L o k e 、 Y . W . 他、 1 9 9 7 、 T i s s u e A n t i g e n 、 5 0 : 1 3 5 ~ 1 4 6 ; L o k e および K i n g 、 2 0 0 0 、 B a l l i e r e s B e s t P r a c t C l i n O b s t e t G y n a e c o l 、 1 4 : 8 2 7 ~ 8 3 7) を使用する I H C に供した。H L A - G 陽性細胞がサンプルの 5 0 % に存在していた (B u l m e r , J . N . 他 (2 0 0 3) 、上掲) 。しかしながら、F I S H 分析および栄養膜特異的 I H C アッセイが別個のスライドガラスに対して行われたので、胎児の染色体異常を診断するためにこの方法を使用することは実際的ではなかった。

【 0 0 1 6 】

従って、上記の制限を有しない、胎児の性別を決定し、かつ / または胎児における染色体異常を同定する方法が必要であることは広く認められており、そのような方法を有することは非常に好都合である。

【 発明の開示 】

【 0 0 1 7 】

本発明の 1 つの局面によれば、胎児の性別を決定し、かつ / または、胎児の少なくとも 1 つの染色体異常を同定する方法が提供され、この方法は、(a) 栄養膜含有細胞サンプルを免疫学的に染色して、それにより、少なくとも 1 個の栄養膜細胞を同定すること、および (b) 前記少なくとも 1 個の栄養膜細胞をインシチュウ染色体分析および / または D N A 分析に供して、それにより、胎児の性別を決定し、かつ / または、少なくとも 1 つの染色体異常を同定することを含む。

【 0 0 1 8 】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、栄養膜含有細胞サンプルは子宮頸部および / または子宮から得られる。

【 0 0 1 9 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、栄養膜含有細胞サンプルは、吸引、細胞採取用ブラシ、綿棒、子宮頸内洗浄および子宮内洗浄からなる群から選択される方法を使用して得られる。

【 0 0 2 0 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、栄養膜細胞サンプルは妊娠の第 6 週 ~ 第 1 5 週の妊婦から得られる。

【 0 0 2 1 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、免疫学的に染色することは、栄養膜特異的抗原に対する抗体を使用して行われる。

【 0 0 2 2 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、栄養膜特異的抗原は、H L A - G 、 P L A P 、 P A R - 1 、 G l u t 1 2 、 H 3 1 5 、 F T 1 . 4 1 . 1 、 I 0 3 、 N D O G - 1 、 N D O G - 5 、 B C 1 、 A B - 3 4 0 、 A B - 1 5 4 および第 X I I I 因子からなる群から選択される。

【 0 0 2 3 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、インシチュウ染色体分析および / または D N A 分析は、蛍光インシチュウハイブリダイゼーション (F I S H) および / またはプライムド・インシチュウ標識化 (P R I N S) を使用して行われる

。

【 0 0 2 4 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、少なくとも1つの染色体異常は、異数性、転座、サブテロメア再配置、欠失、微小欠損、逆位および重複化からなる群から選択される。

【 0 0 2 5 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、染色体異数性は完全トリソミーおよび／または部分的トリソミーである。

【 0 0 2 6 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、トリソミーは、21トリソミー、18トリソミー、13トリソミー、16トリソミー、XYY、XY_YおよびXXXからなる群から選択される。 10

【 0 0 2 7 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、染色体異数性は完全モノソミーおよび／または部分的モノソミーである。

【 0 0 2 8 】

記載された好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、モノソミーは、Xモノソミー、21モノソミー、22モノソミー、16モノソミーおよび15モノソミーからなる群から選択される。

【 0 0 2 9 】

本発明は、非侵襲的で、危険性のない出生前診断方法を提供することによって、現在知られている形態の欠点に対処することに成功している。 20

【 0 0 3 0 】

別途定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が下記に記載される。矛盾する場合、定義を含めて、本特許明細書が優先する。また、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【 0 0 3 1 】

図面の簡単な記述 30

本発明は、例としてだけであるが、添付されている図面を参照して、本明細書中に記載される。次に図面を詳しく具体的に参照して、示されている細目は、例としてであり、また、本発明の好ましい実施形態の例示的な議論のためだけのものであり、従って、本発明の原理および概念的局面の最も有用かつ容易に理解された記述であると考えられるものを提供するために示されていることが強調される。これに関して、記述を図面と一緒に理解することにより、本発明のいくつかの形態が実際にどのように具体化され得るかが当業者には明らかになるので、発明の構造的詳細を、発明の基本的な理解のために必要であるよりも詳細に示すことは試みられていない。

図1は経子宮頸細胞のIHC分析(図1a、図1c)およびFISH分析(図1b、図1d)を例示する顕微鏡写真である。2名の妊婦から妊娠の第7週(図1a～図1b、表1における事例73)および第9週(図1c～図1d、表1における事例80)で得られた経子宮頸細胞を、HLA-G抗体(mAb7759、Abcam)を使用するIHCに供し、その後、CEP-XグリーンおよびYオレンジ(Abbott、カタログ5J10-51)のプローブを使用するFISH分析に供した。赤みを帯びた細胞質を有するHLA-G陽性の絨毛外栄養膜細胞が示される(図1a、黒色の矢印がつけられた細胞；図1c、2つの黒色の矢印がつけられた細胞分裂前の2つの細胞)。Y染色体およびX染色体にそれぞれ対応する、それぞれの栄養膜細胞における1つのだけのオレンジ色シグナルおよび緑色シグナルに留意すること(図1bおよび図1d、白色の矢)。このことは、それぞれの場合において、正常な男胎児の存在を明らかにしている。 40 50

図2は経子宮頸細胞のIHC分析(図2a)およびFISH分析(図2b)を例示する顕微鏡写真である。妊娠第11週の妊婦(図2a～図2b、表1における事例223)から得られた経子宮頸細胞を、PLAP抗体(Zymed、カタログ番号18-0099)を使用するIHCに供し、その後、CEP XグリーンおよびYオレンジ(Abbott、カタログ#5J10-51)のプローブを使用するFISH分析に供した。赤みを帯びた細胞質を有するPLAP陽性の絨毛細胞栄養芽層細胞が示される(図2a、黒色の矢)。Y染色体およびX染色体にそれぞれ対応する、絨毛の細胞栄養芽層細胞における1つのだけのオレンジ色シグナルおよび緑色シグナルに留意すること(図2b、白色の矢)。このことは、正常な男胎児の存在を明らかにしている。

図3は経子宮頸細胞のIHC分析(図3a)およびFISH分析(図3b)を例示する顕微鏡写真である。妊娠第8週の妊婦(表1における事例71)から得られた経子宮頸細胞を、HLA-G抗体(mAb7759、Abcam)を使用するIHCに供し、その後、LSI 21q22オレンジプローブおよびCEP Yグリーンプローブ(Abbott、カタログ番号#5J10-24および#5J13-02)を使用するFISH分析に供した。HLA-G抗体の反応の後における栄養膜細胞の赤みを帯びた細胞質(図3a、白色の矢)、ならびに、第21染色体およびY染色体にそれぞれ対応する3つのオレンジ色シグナルおよび1つの緑色シグナルの存在(図3b、白色の矢)に留意すること。このことは男の胎児における21トリソミーの存在を明らかにしている。

図4は経子宮頸細胞のIHC分析(図4a)およびFISH分析(図4b)を例示する顕微鏡写真である。妊娠第6週の妊婦(表1における事例76)から得られた経子宮頸細胞を、HLA-G抗体を使用するIHCに供し、その後、CEP XグリーンおよびYオレンジ(Abbott、カタログ#5J10-51)のプローブを使用するFISH分析に供した。HLA-G抗体の反応の後における栄養膜細胞の細胞質における赤みを帯びた色(図4a、黒色の矢)、ならびに、1つだけのX染色体に対応する1つだけの緑色シグナル(図4b、白色の矢)に留意すること。このことは、ターナー症候群を有する女胎児の存在を明らかにしている。

図5は妊娠第7週の妊婦(表1における事例161)から得られた経子宮頸細胞(図5a～図5b)または胎盤細胞(図5c)のIHC分析(図5a)およびFISH分析(図5b、図5c)を例示する顕微鏡写真である。図5a～図5b-経子宮頸細胞を、HLA-G抗体(mAb7759、Abcam)を使用するIHCに供し、次いで、CEP XグリーンおよびYオレンジ(Abbott、カタログ#5J10-51)のプローブを使用するFISH分析に供した。2つの栄養膜細胞の細胞質における赤みを帯びた色(図5a、細胞番号1および2)、ならびに、1つの栄養膜細胞における2つのX染色体および1つだけのY染色に対応する2つの緑色シグナルおよび1つだけのオレンジ色シグナルの存在(図5b、細胞番号1)、そして、別の栄養膜細胞における1つだけのX染色体および1つだけのY染色体に対応する1つだけの緑色シグナルおよび1つだけのオレンジ色シグナルの存在(図5b、細胞番号2)に留意すること。このことは、栄養膜細胞におけるクラインフェルター症候群についてのモザイク現象を示している。図5c-胎盤細胞を、CEP XグリーンおよびYオレンジ(Abbott、カタログ#5J10-51)のプローブを使用するFISH分析に供した。1つの胎盤細胞における1つだけのX染色体および1つだけのY染色体に対応する1つだけの緑色シグナルおよび1つだけのオレンジ色シグナルの存在(図5c、細胞番号1)、ならびに、別の胎盤細胞における2つのX染色体および1つだけのY染色体に対応する2つの緑色シグナルおよび1つだけのオレンジ色シグナルの存在(図5c、細胞番号2)に留意すること。このことは、胎盤細胞におけるクラインフェルター症候群についてのモザイク現象を示している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

本発明は、胎児の性別を決定し、かつ/または、胎児における少なくとも1つの染色体異常を同定する方法であって、出生前診断において使用することができる方法に関する。具体的には、本発明は、胎児に存在する遺伝子異常(例えば、染色体異数性、転座、逆位

10

20

30

40

50

、欠失および微小欠損など)を明らかにするために使用することができる非侵襲性で、危険性のない出生前診断方法を提供する。

【0033】

本発明の原理および操作は、図面および付随する説明を参照して、より良好に理解することができる。

【0034】

発明の少なくとも1つの実施形態を詳しく説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明において示される細部、または実施例によって例示される細部に限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、または様々な方法で実施することができ、または様々な方法で実施される。また、本明細書中で用いられる表現法および用語法は記述のためであり、従って、限定であると見なしてはならないことを理解しなければならない。

10

【0035】

胎児の異常の早期検出および遺伝的異常の出生前診断は、一般的な転座(例えば、ロバートソン転座)、染色体の欠失および/または微小欠損(例えば、アンゲルマン症候群、ディジヨージ症候群)などの遺伝的疾患の保因者についても、様々な染色体異数性(例えば、ダウントン症候群)について増大した危険性にさらされている(例えば、35歳を超える)高齢の母体年齢の夫婦の場合と同様に非常に重要である。

20

【0036】

出生前診断の現在の方法では、羊水穿刺または絨毛生検(CVS)によって得られた胎児細胞について行われる細胞遺伝学的分析およびFISH分析が含まれる。しかしながら、羊水穿刺処置またはCVS処置は、染色体異常を予測することにおいて効率的ではあるが、処置に関連した流産の危険性がそれぞれ0.5%~1%または2%~4%ある。流産の危険性が比較的大きいので、羊水穿刺またはCVSは35歳未満の女性には勧められていない。このため、検査されていないことの結果として、ダウントン症候群新生児の圧倒的多数(80%)が実際には35歳未満の女性に生まれている。従って、どの母体年齢においても、すべての女性に勧めることができる非侵襲的で、危険性のない出生前診断方法を開発することは重要である。

20

【0037】

妊娠早期の母体血液における胎児の有核赤血球の発見は、多くの研究者に、これらの細胞を単離し、その細胞を遺伝子分析(例えば、PCR、FISH)に供する方法を開発することを促している。しかしながら、母体血液中の有核胎児細胞の頻度はこのほか低い(0.0035%)ので、NRBC細胞を、(例えば、Ficoll-Paque遠心分離またはPercol勾配密度遠心分離を使用して)最初に精製し、次いで、例えば、磁気活性化細胞分取(MACS、Busch, J.他、1994、Prenat. Diagn.、14:1129~1140)、強磁性流体懸濁(Steele, C.D.他、1996、Clin. Obstet. Gynecol.、39:801~813)、電荷流分離(Wachtel, S.S.他、1996、Hum. Genet.、98:162~166)またはFACS分析(Wang, J.Y.他、2000、Cytometry、39:224~230)を使用して濃縮しなければならなかった。胎児NRBCの回収は、そのような方法を使用して行うことができるが、限られた感度と運動した一定しない回収率は、胎児NRBCを使用する診断技術の臨床適用を妨げていた(Bischoff, F.Z.他、2002、Hum. Reprod. Update、8:493~500)。

30

【0038】

診断のための潜在的標的として同定されている別の胎児細胞タイプは栄養膜である。先行技術研究では、様々な抗体例えば、HLA-G(Bulmer, J.N.他、2003、Prenat. Diagn.、23:34~39)、PLAP、FT1.41.1、NDG-1、NDG-5および340(Miller他、1999、Human Reproduction、14:521~531)などを使用する、経子宮頸試料における栄養膜細胞の同定が記載される。これらの研究において、抗体は経子宮頸試料の30%~

40

50

79%で栄養膜細胞を認識した。また、FISH分析、PCR分析および／または定量的蛍光PCR(QF-PCR)分析は、二連の経子宮頸試料に対して行われたが、すべての男胎児のほぼ80%～90%を同定することができた。しかしながら、DNA分析(例えば、FISH分析および／またはPCR分析)および免疫学的分析(例えば、IHC分析)は別個のスライドガラスに対して行われたので、これらの方法は、胎児の染色体異常を診断するために実施することができなかった。

【0039】

本発明を実施に移し、胎児の遺伝子診断を改善するために様々な取り組みにより実験しているとき、本発明者らは、胎児の性別を決定し、かつ／または、胎児の染色体異常を同定する非侵襲的で、危険性のない方法を考案している。

10

【0040】

本明細書中下記、および下記の実施例の節の実施例1において記載されるように、本発明者らは、栄養膜特異的抗体(例えば、HLA-GまたはPLAPに対する栄養膜特異的抗体)で経子宮頸細胞を連續して染色し、その後、染色された細胞のFISH分析を行う方法を考案している。表1および下記の実施例の節の実施例1において示されるように、本発明の方法を使用することにより、胎児の染色体FISHパターンの正しい決定が、継続中の妊婦から、かつ／または妊娠中絶前に得られた栄養膜を含有する経子宮頸試料の92.89%において達成された。従って、このことは、結論として、本発明の方法は、胎児の遺伝子異常の診断において、先行技術の方法よりも実質的に正確であることを示している。

20

【0041】

従って、本発明の1つの局面によれば、胎児の性別を決定し、かつ／または、胎児の少なくとも1つの染色体異常を同定する方法が提供される。本明細書中で使用される用語「胎児」は、任意の胚段階にある生まれる前のヒト子孫(すなわち、胚および／または胎児)を示す。

【0042】

本明細書中で使用される「胎児の性別」は、胎児におけるX染色体および／またはY染色体の存在または非存在を示す。

【0043】

本明細書中で使用される「染色体異常」は、異常な数の染色体(例えば、21トリソミー、Xモノソミー)または染色体構造の異常(例えば、欠失、転座など)を示す。

30

【0044】

本発明の方法によれば、胎児の性別および／または少なくとも1つの染色体異常の同定は、最初に栄養膜含有細胞サンプルを免疫学的に染色して、それにより、少なくとも1個の栄養膜細胞を同定し、続いて、同定された栄養膜細胞をインシチュウ染色体分析および／またはDNA分析に供して、それにより、胎児の性別を決定し、かつ／または、少なくとも1つの染色体異常を同定することによって行われる。

【0045】

用語「栄養膜」は、哺乳動物の胚または胎児の胎盤に由来する上皮細胞を示す(栄養膜は典型的には子宮壁と接觸している)。胎盤組織には3つのタイプの栄養膜細胞が存在する(絨毛細胞栄養芽層、合胞体栄養細胞および絨毛外栄養膜)。そのため、本明細書中で使用される用語「栄養膜」はこれらの細胞のいずれをも包含する。絨毛細胞栄養芽層細胞は、分化し、増殖し、子宮壁に侵入して、絨毛を形成する専門化した胎盤上皮細胞である。付着絨毛に存在する細胞栄養芽層は融合して、合胞体栄養細胞層を形成することができるか、または絨毛外栄養膜の柱状体を形成することができる(Cohen S.他、2003、J. Pathol.、200:47～52)。

40

【0046】

栄養膜含有細胞サンプルは、生存または非生存であっても、栄養膜を含む任意の生物学的サンプルであり得る。好ましくは、栄養膜含有細胞サンプルは、様々な妊娠段階の妊婦に由来する血液サンプルあるいは経子宮頸サンプルおよび／または子宮内サンプルである

50

。

【0047】

現在好ましい栄養膜サンプルは、妊婦の子宮頸部および／または子宮から得られるサンプル（それぞれ、経子宮頸サンプルおよび子宮内サンプル）である。

【0048】

本発明の方法によって利用される栄養膜含有細胞サンプルは、数々の広く知られている細胞採取技術のいずれか1つを使用して得ることができる。

【0049】

本発明の好ましい実施形態によれば、栄養膜含有細胞サンプルは、粘膜吸引（Sherlock, J.他、1997、J. Med. Genet., 34:302~305; Miller, D. および Briggs, J.、1996、Early Human Development, 47:S99~S102）、細胞採取用ブラシ（Cioni, R.他、2003、Prenat. Diagn., 23:168~171; Fejgin, M. D. 他、2001、Prenat. Diagn., 21:619~621）、綿棒（Griffith-Jones, M. D. 他、1992、上掲）、子宮頸内洗浄（Massarini, A. 他、1996、Hum. Genet., 97:150~155; Griffith-Jones, M. D. 他、1992、上掲；Schueler, P. A. 他、2001、22:688~701）、および子宮内洗浄（Cioni, R. 他、2002、Prenat. Diagn., 22:52~55; Ishai, D. 他、1995、Prenat. Diagn., 15:961~965; Chang, S.-D. 他、1997、Prenat. Diagn., 17:1019~1025; Sherlock, J. 他、1997、上掲；Bussani, C. 他、2002、Prenat. Diagn., 22:1098~1101）を使用して得られる。様々な方法の比較については、Adinolfi, M. および Sherlock, J. (Human Reprod. Update, 1997, 3:383~392、および、J. Hum. Genet., 2001, 46:99~104)、Rodeck, C. 他 (Prenat. Diagn., 1995, 15:933~942) を参照のこと。細胞採取用ブラシ法は、本発明の栄養膜含有細胞サンプルを得る現時点での好ましい方法である。

【0050】

細胞採取用ブラシ法において、Pap塗沫標本のための細胞採取用ブラシ（例えば、MedScand-AB、Malmo、スウェーデン）が外側子宮口から2cmの最大深さに挿入され、そして、細胞採取用ブラシを完全に1回転（すなわち、360°）回転せながら取り出される。ブラシに捕捉された経子宮頸細胞を取り出すために、ブラシは、1%のベニシリン-ストレプトマイシン抗生物質の存在下、2ml~3mlの組織培養培地（例えば、RPMI-1640培地、これはBeth Haemek（イスラエル）から入手可能である）を含有する試験管の中に振り入れられる。経子宮頸細胞を顕微鏡用スライドガラス上で濃縮するために、サイトスピinn（cytospin）スライドガラスが、例えば、Cytofunnel Chamber Cytocentrifuge（Thermo-Shandon、英国）を使用して調製される。細胞遠心分離のために使用される条件は経子宮頸試料の濁度に依存することが理解される。試料がほんの少数の細胞を含有したならば、細胞は、最初に5分間遠心分離され、次いで、1mlの新鮮な培地に懸濁される。調製されると、サイトスピnnスライドガラスは、さらなる使用まで、95%アルコールにおいて保存することができる。

【0051】

表1および下記の実施例の節の実施例1において示されるように、細胞採取用ブラシ法を使用することにより、本発明者らは、採取された255個の経子宮頸試料のうちの230個において栄養膜含有細胞サンプルを得た。

【0052】

栄養膜細胞は胎盤から子宮腔内に剥落するので、栄養膜含有細胞サンプルが、妊娠のおよそ第13週~15週までであるが、子宮腔が存続する限り、取り出されるにちがいない

10

20

30

40

50

(Adinolfi, M. および Sherlock, J. (2001、上掲) に総説される)。

【0053】

従って、本発明の好ましい実施形態によれば、栄養膜含有細胞サンプルは妊娠の第6週～15週の妊婦から得られる。好ましくは、細胞は妊娠の第6週～第13週の間の妊婦から得られ、より好ましくは妊娠の第7週～第11週の間の妊婦から得られ、最も好ましくは妊娠の第7週～第8週の間の妊婦から得られる。

【0054】

妊娠期間中の正確な妊娠週の決定は十分に婦人科学および産科学の当業者の能力の範囲内であることが理解される。

【0055】

栄養膜含有細胞サンプル(例えば、そのサイトスピニン調製物)が得られると、栄養膜含有細胞サンプルは免疫学的染色に供される。

【0056】

本発明の好ましい実施形態によれば、免疫学的染色は、栄養膜特異的抗原に対する抗体を使用して行われる。

【0057】

栄養膜特異的抗原に対する様々な抗体がこの分野では知られており、これらには、例えば、絨毛外栄養膜細胞に対して特異的な非古典的クラスI主要組織適合性複合体(MHC)抗原の一部分に対するHLA-G(Loke, Y.W.他、1997、Tissue Antigens、50:135～146)、合胞体栄養細胞および/または細胞栄養芽層に対して特異的である抗ヒト胎盤アルカリホスファターゼ(PLAP)抗体(Leitner, K.他、2001、絨毛栄養膜に関する先端原形質膜および基底原形質膜における胎盤アルカリホスファターゼの発現、J. Histochemistry and Cytochemistry、49:1155～1164)、胎児細胞の表面に存在するヒト栄養膜の膜糖タンパク質と反応するH315抗体(Covone AEおよびJohnson PM、1986、Hum. Genet.、72:172～173)、合胞体栄養細胞について特異的であるFT1.41.1抗体、および、I03抗体(Rodeck, C.他、1995、Prenat. Diagn.、15:933～942)、合胞体栄養細胞について特異的であるNDOG-1抗体(Miller D.他、Human Reproduction、1999、14:521～531)、絨毛外細胞栄養芽層について特異的であるNDOG-5抗体(Miller D.他、1999、上掲)、BC1抗体(Bulmer, J.N.他、Prenat. Diagn.、1995、15:1143～1153)、合胞体栄養細胞および細胞栄養芽層、または合胞体栄養細胞に対してそれぞれ特異的であるAB-154抗体またはAB-340抗体(Durrant L.他、1994、Prenat. Diagn.、14:131～140)、妊娠の第7週～第10週の期間中の胎盤細胞について特異的であるプロテアーゼ活性化受容体(PAR)-1抗体(Cohen S.他、2003、J. Pathol.、200:47～52)、妊娠の第10週～第12週の期間中の合胞体栄養細胞および絨毛外栄養膜に対して特異的であるグルコース輸送体タンパク質(GLUT)-12抗体(Gude NM他、2003、Placenta、24:566～570)、そして、細胞栄養芽層外皮に対して特異的である抗第XII因子抗体(Asahina, T.他、2000、Placenta、21:388～393; Kappelmayr, J.他、1994、Placenta、15:613～623)が含まれる。

【0058】

免疫学的染色は、細胞表面に存在する抗原に対する標識抗体の結合に基づく。免疫学的染色手法の例には、蛍光標識された免疫組織化学(抗体にコンジュゲート化された蛍光性色素を使用する)、放射能標識された免疫組織化学(放射能標識(例えば、¹²⁵I)抗体を使用する)、および免疫細胞化学[酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)および発色性基質を使用する]が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明

によって使用される免疫学的染色は免疫組織化学および／または免疫細胞化学である。

【0059】

免疫学的染色の後には、好ましくは、染色されていない細胞成分に結合する色素を使用して細胞を対比染色することが続く。例えば、標識抗体が細胞の細胞質に存在する抗原に結合するならば、核染色（例えば、ヘマトキシリン・エオシン染色）が適切な対比染色である。

【0060】

細胞に対する免疫学的染色を用いる様々な方法がこの分野では知られている。簡単に記載すると、経子宮頸試料における栄養膜細胞を検出するために、サイトスピンドライドガラスが70%アルコール溶液で洗浄され、蒸留水に5分間浸けられる。その後、スライドガラスは加湿チャンバーに移され、リン酸塩緩衝化生理的食塩水（PBS）で3回洗浄される。顕微鏡用スライドガラスにおける経子宮頸細胞の位置を可視化するために、経子宮頸試料の境界に、例えば、Pap Pen (Zymed Laboratories Inc.、San Francisco、CA、米国)を使用して印がつけられる。内因性の細胞ペルオキシダーゼ活性を阻止するために、50μlの3%過酸化水素（Merck、ドイツ）溶液が室温での10分間のインキュベーションのために各スライドガラスに加えられ、その後、スライドガラスをPBSにおいて3回洗浄する。抗体の非特異的な結合を避けるために、2滴のブロッキング試薬（例えば、Zymed HISTOSTAIN（登録商標）-PLUSキット、カタログ番号858943）が加湿チャンバーでの10分間のインキュベーションのために各スライドガラスに加えられる。経子宮頸サンプル中の胎児栄養膜細胞を同定するために、アリコート（例えば、50μl）の栄養膜特異的抗体〔例えば、抗HLA-G抗体（mAb7759、Abcam Ltd.、Cambridge、英国）または抗ヒト胎盤アルカリホスファターゼ抗体（PLAP、カタログ番号18-0099、Zymed）〕がスライドガラスに加えられる。その後、スライドガラスを加湿チャンバーにおいて60分間、抗体とインキュベーションし、その後、スライドガラスをPBSで3回洗浄する。結合した一次抗体を検出するために、2滴のビオチン化二次抗体（例えば、Zymedから入手可能なヤギ抗マウスIgG抗体）が加湿チャンバーでの10分間のインキュベーションのために各スライドガラスに加えられる。二次抗体がPBSで3回洗浄され、除かれる。ビオチン化二次抗体を明らかにするために、2滴の西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）-ストレプトアビジンコンジュゲート（Zymedから入手可能）が加湿チャンバーでの10分間のインキュベーションのために加えられ、その後、PBSにおける3回の洗浄が行われる。最後に、HRP-コンジュゲート化ストレプトアビジンを検出するために、2滴のアミノエチルカルバゾール（ABC Single Solution Chromogen/Substrate、Zymed）HRP基質が加湿チャンバーでの6分間のインキュベーションのために加えられ、その後、PBSによる3回の洗浄が行われる。対比染色が、スライドガラスを2%のヘマトキシリン溶液（Sigma-Aldrich Corp.、St Louis、MO、米国、カタログ番号GHS-2-32）に25秒間浸けることによって行われる。その後、スライドガラスは水道水で洗浄され、カバーガラスで覆われた。

【0061】

図1～図5および下記の実施例の節の実施例における表1に示されるように、栄養膜細胞が、抗HLA-G抗体（MEM-G/1、Abcam、カタログ番号ab7759、Cambridge、英国）および／または抗PLAP抗体（Zymed、カタログ番号18-0099、San Francisco、CA、米国）を使用して、255個中230個の経子宮頸試料において検出された。

【0062】

免疫学的染色の後、免疫学的に陽性の細胞（すなわち、栄養膜）が、（染色方法に依存して）蛍光顕微鏡または光学顕微鏡のもとで調べられ、また、好ましくは、例えば、CCDカメラを使用して写真撮影されることが理解される。同じサンプルの同じ栄養膜細胞をさらなる染色体分析および／またはDNA分析に供するために、スライドガラス上のその

10

20

30

40

50

のような細胞の位置（すなわち、座標）が、その後の参照のために、顕微鏡または顕微鏡に接続されたコンピューターに保存される。同定および細胞座標の保存を可能にする顕微鏡システムの例には、Bio View Duet（商標）（Bio View Ltd.、Rehovot、イスラエル）、および、本質的にはMerchant, F. A. およびCastleman K. R. (Hum. Repr. Update, 2002, 8: 509~521) に記載されるような Applied Imaging System (Newcastle、英国) が含まれる。

【0063】

前述されたように、栄養膜細胞が栄養膜含有細胞サンプルにおいて同定されると、栄養膜細胞はインシチュウ染色体分析および／またはDNA分析に供される。

10

【0064】

本明細書中で使用される「インシチュウ染色体分析および／またはDNA分析」は、蛍光インシチュウハイブリダイゼーション（FISH）および／またはプライムド・インシチュウ標識化（PRINS）を使用する細胞内部の染色体および／またはDNAの分析を示す。

【0065】

本発明の方法によれば、免疫学的染色ならびにインシチュウ染色体分析および／またはDNA分析は同じ栄養膜含有細胞サンプルに対して連続して行われる。

【0066】

特別な処理が、既に免疫学的に染色された細胞を別の染色方法（例えば、FISH）のために修正可能にするために要求されることが理解される。そのような処理には、例えば、本質的には、下記の実施例の節の実施例1における「材料および実験方法」に、また、Strehl S.、Ambros PF (Cytogenet. Cell Genet.、1993、63: 24~8) に記載されるように、結合した抗体の洗浄除去（例えば、水および段階的なエタノール系列を使用する）、細胞核の露出（例えば、メタノール-酢酸固定処理液を使用する）、および、タンパク質の消化（例えば、ペプシンを使用する）が含まれる。

20

【0067】

間期染色体に対するFISH分析を用いる様々な方法がこの分野では知られている。簡単に記載すると、直接的に標識されたプローブ[例えば、CEP XグリーンおよびYオレンジ (Abbott、カタログ番号5J10-51)]がハイブリダイゼーション緩衝液（例えば、LSI/WCP、Abbott）およびキャリアDNA（例えば、ヒトCot1 DNA、Abbottから入手可能）と混合される。このプローブ溶液を、例えば、経子宮頸サイトスピン試料を含有する顕微鏡スライドガラスに加え、スライドガラスをカバーガラスで覆う。プローブを含有するスライドガラスを70°で3分間変性し、さらに、ハイブリダイゼーション装置（例えば、HYBrizite、Abbottカタログ番号2J11-04）を使用して37°で48時間インキュベーションする。ハイブリダイゼーション後、スライドガラスを、60mMのNaClおよび6mMのクエン酸Na(0.4XSSC)における0.3%NP-40 (Abbott) の溶液において72°で2分間洗浄する。その後、スライドガラスを、2XSSCにおける0.1%NP-40の溶液に室温で1分間浸け、その後、スライドガラスを暗所で乾燥させる。対比染色を、例えば、DAPI II対比染色剤 (Abbott) を使用して行う。

30

【0068】

PRINS分析が、遺伝子欠失の検出 (Tharapel SAおよびKadandale JS、2002、Am. J. Med. Genet.、107: 123~126)、胎児の性別の決定 (Orselli, B.他、1998、Prenat. Diagn.、18: 1014~1022)、および染色体異数性の同定 (Mennicke, K.他、2003、Fetal Diagn. Ther.、18: 114~121)において用いられている。

40

【0069】

50

P R I N S 分析を行う様々な方法がこの分野では知られており、これらには、例えば、C ou l l i n , P . 他 (A m . J . M e d . G e n e t . , 2 0 0 2 , 1 0 7 : 1 2 7 ~ 1 3 5) ; F i n d l a y , L . 他 (J . A s s i s t . R e p r o d . G e n e t . , 1 9 9 8 , 1 5 : 2 5 8 ~ 2 6 5) ; M u s i o , A . 他 (G e n o m e , 1 9 9 8 , 4 1 : 7 3 9 ~ 7 4 1) ; M e n n i c k e , K . 他 (F e t a l D i a g n . T h e r . , 1 8 : 1 1 4 ~ 1 2 1) ; O r s e t t i , B . 他 (P r e n a t . D i a g n . , 1 9 9 8 , 1 8 : 1 0 1 4 ~ 1 0 2 2) に記載される方法が含まれる。簡単に記載すると、間期染色体を含有するスライドガラスが、2 X S S C (pH 7 . 2) における 7 0 % ホルムアミドの溶液において 7 1 °で 2 分間変性させられ、エタノール系列 (7 0 % , 8 0 % , 9 0 % および 1 0 0 %) で脱水され、プログラム可能な温度サイクラー (例えば、M J R e s e a r c h (W a l t h a m , M a s s a c h u s e t t s 、米国) から入手可能な、ガラス製スライドガラスのために改造された P T C - 2 0 0 サーマルサイクラーなど) の平らなプレートブロックに置かれる。P R I N S 反応は通常、非標識プライマーと、標識された d U T P (例えば、直接的または間接的な検出のためにそれぞれ、フルオレセイン - 1 2 - d U T P またはジゴキシゲニン - 1 1 - d U T P) を伴う各 d N T P の混合物との存在下で行われる。あるいは、またはさらに、配列特異的なプライマーを、例えば、1 - 3 フルオレセイン分子またはシアニン 3 (C y 3) 分子を使用して 5 ' 末端において標識することができる。従って、典型的な P R I N S 反応混合物は、配列特異的なプライマー (5 0 μl の反応体積において 5 0 p m o l ~ 2 0 0 p m o l) 、非標識の各 d N T P (0 . 1 m M の d A T P 、 d C T P 、 d G T P および 0 . 0 0 2 m M の d T T P) 、標識された d U T P (0 . 0 2 5 m M) 、および T a q D N A ポリメラーゼ (2 ユニット) を適切な反応緩衝液とともに含む。スライドガラスが所望のアニーリング温度に達すると、反応混合物がスライドガラスに加えられ、スライドガラスが、カバーガラスを使用して覆われる。配列特異的なプライマーのアニーリングを 1 5 分間行うことができ、その後、プライマーが結合した鎖を 7 2 °でさらに 1 5 分間伸長させる。伸長後、スライドガラスを 4 X S S C / 0 . 5 % T w e e n - 2 0 の溶液において室温で 3 回 (それぞれ 4 分ずつ) 洗浄し、続いて P B S で 4 分洗浄する。その後、スライドガラスは、D A P I またはヨウ化プロピジウムを使用する核の対比染色に供される。蛍光染色されたスライドガラスは、蛍光顕微鏡および適切なフィルター組合せ (例えば、D A P I 、 F I T C 、 T R I T C 、 F I T C - ローダミン) を使用して調べることができる。

【 0 0 7 0 】

数個の標的について特異的である数個のプライマーが、異なる 5 ' コンジュゲートを使用して同じ P R I N S 処理について使用され得ることが理解される。従って、P R I N S 分析は、数個の遺伝子または染色体遺伝子座の存在および / または存在位置を明らかにするための多色アッセイとして使用することができる。

【 0 0 7 1 】

また、C ou l l i n 他 (2 0 0 2 、上掲) において記載されるように、P R I N S 分析は、F I S H 分析と同じスライドガラスに対して、好ましくは F I S H 分析の前に行うことができる。

【 0 0 7 2 】

まとめると、表 1 および下記の実施例の節の実施例 1 においてさらに示されるように、成功した F I S H 結果が、胎盤生検、羊水穿刺または C V S の胎児細胞を使用して得られた核型決定の結果によって確認されるように、栄養膜を含有する経子宮頸試料の 9 2 . 8 9 % において得られた。

【 0 0 7 3 】

染色体分析および / または D N A 分析が、栄養膜特異的抗体を使用して免疫学的に染色された同じ細胞に対して行われるので、本発明の方法は、胎児の性別を決定し、かつ / または胎児における少なくとも 1 つの染色体異常を同定するために使用することができる。

【 0 0 7 4 】

本発明の好ましい実施形態によれば、染色体異常は、染色体異数性 (すなわち、完全お

10

20

30

40

50

および／または部分的なトリソミーおよび／またはモノソミー）、転座、サブテロメア再配置、欠失、微小欠損、逆位、および／または重複化（すなわち、完全および／または部分的な染色体重複化）であり得る。

【0075】

本発明の好ましい実施形態によれば、本発明によって検出されるトリソミーは、21トリソミー[例えば、LSI 21q22オレンジで標識されたプローブ(Abbott、カタログ番号5J13-02)を使用して]、18トリソミー[例えば、CEP18グリーンで標識されたプローブ(Abbott、カタログ番号5J10-18)；CEP(登録商標)18(D18Z1、サテライト)Spectrum Orange(商標)プローブ(Abbott、カタログ番号5J08-18)を使用して]、16トリソミー[例えば、CEP16プローブ(Abbott、カタログ番号6J37-17)を使用して]、13トリソミー[例えば、LSI(登録商標)13Spectrum Green(商標)プローブ(Abbott、カタログ番号5J14-18)を使用して]、および、XYトリソミー、XYYトリソミーまたはXXXトリソミー(これらは、例えば、CEP XグリーンおよびYオレンジのプローブ(Abbott、カタログ番号5J10-51)；および／またはCEP(登録商標)X Spectrum Green(商標)/CEP(登録商標)Y(μサテライト)Spectrum Orange(商標)プローブ(Abbott、カタログ番号5J10-51)を使用して検出することができる)であり得る。

【0076】

様々な染色体特異的なFISHプローブまたはPRINSプライマーを使用することにより、様々な他のトリソミーおよび部分的なトリソミーが本発明の教示に従って胎児細胞において検出され得ることが理解される。これらには、部分的な1q32-44トリソミー(Kimya Y他、Prenat Diagn.、2002、22:957~61)、10pトリソミーを伴う9pトリソミー(Hengstschlager M他、Fetal Diagn Ther.、2002、17:243~6)、4トリソミーのモザイク現象(Zaslav AL他、Am J Med Genet.、2000、95:381~4)、17pトリソミー(De Pater JM他、Genet Couns.、2000、11:241~7)、部分的な4q26-qterトリソミー(Petek E他、Prenat Diagn.、2000、20:349~52)、9トリソミー(Vanden Berg C他、Prenat. Diagn.、1997、17:933~40)、部分的な2pトリソミー(Siffroi JP他、Prenat Diagn.、1994、14:1097~9)、部分的な1qトリソミー(DuPont BR他、Am J Med Genet.、1994、50:21~7)、および部分的な6pトリソミー/6qモノソミー(Wauters JG他、Clin Genet.、1993、44:262~9)が含まれるが、これらに限定されない。

【0077】

本発明の方法はまた、流産に関与することが知られているいくつかの染色体モノソミー(例えば、22モノソミー、16モノソミー、21モノソミーおよび15モノソミーなどを検出するために使用することができる(Munne, S.他、2004、Reprod Biomed Online、8:81~90))。

【0078】

本発明の好ましい実施形態によれば、本発明の方法によって検出されるモノソミーは、Xモノソミー、21モノソミー、22モノソミー[例えば、LSI 22(BCR)プローブ(Abbott、カタログ番号5J17-24)を使用して]、16モノソミー(例えば、CEP16(D16Z3)(Abbott、カタログ番号6J36-17)を使用して)、および15モノソミー[例えば、CEP15(D15Z4)プローブ(Abbott、カタログ番号6J36-15)を使用して]であり得る。

【0079】

いくつかの転座および微小欠損は保因者患者において無症状であり得るが、それにもか

10

20

30

40

50

かわらず、重大な遺伝的疾患を子孫において引き起こし得ることが理解される。例えば、15g11-q13の微小欠損を保有する健康な母体は、重症な神経変性障害であるアンゲルマン症候群の子供を出産する可能性がある。従って、本発明は、例えば、そのような欠失について特異的であるFISHプローブを使用して、胎児におけるそのような欠失を同定するために使用することができる(Erdel M他、Hum Genet, 1996, 97: 784~93)。

【0080】

従って、本発明はまた、親の一方がそのような異常の既知の保因者であるならば、何らかの染色体異常を検出するために使用することができる。これらには、下記のものが含まれるが、それらに限定されない：小さい過剰マーカー染色体(SMC)についてのモザイク(Giardino D他、Am J Med Genet, 2002, 111: 319~23)；t(11;14)(p15;p13)転座(Benzacken B他、Prenat Diagn, 2001, 21: 96~8)；非平衡転座t(8;11)(p23.2;p15.5)(Fert-Ferrer S他、Prenat Diagn, 2000, 20: 511~5)；11q23微小欠損(Matsubara K, Yuraku K, Rinsho Ketsueki, 2004, 45: 61~5)；スミス-マゲニス症候群17p11.2.欠失(Potocki L他、Genet Med, 2003, 5: 430~4)；22q13.3欠失(Chen CP他、Prenat Diagn, 2003, 23: 504~8)；Xp22.3微小欠損(Enright F他、Pediatr Dermatol, 2003, 20: 153~7)；10p14欠失(Bartsch O他、Am J Med Genet, 2003, 117A: 1~5)；20p微小欠損(Laufer-Cahana A, Am J Med Genet, 2002, 112: 190~3)、ディ・ジョージ症候群[del(22)(q11.2q11.23)]、ウィリアムズ症候群[7q11.23および7q36の欠失、Wouters CH他、Am J Med Genet, 2001, 102: 261~5]；1p36欠失(Zenker M他、Clin Dysmorphol, 2002, 11: 43~8)；2p微小欠損(Dee SL他、J Med Genet, 2001, 38: E32)；神経線維腫症タイプ1(17q11.2微小欠損、Jenne DE他、Am J Hum Genet, 2001, 69: 516~27)；Yq欠失(Toth A他、Prenat Diagn, 2001, 21: 253~5)；ウォルフ-ヒルシュホルン症候群(WHS, 4p16.3微小欠損、Rauch A他、Am J Med Genet, 2001, 99: 338~42)；1p36.2微小欠損(Fineili P, Am J Med Genet, 2001, 99: 308~13)；11q14欠失(Coupry I他、J Med Genet, 2001, 38: 35~8)；19q13.2微小欠損(Tentler D他、J Med Genet, 2000, 37: 128~31)；ルビンシュタイン-テービ(16p13.3微小欠損、Blough RI他、Am J Med Genet, 2000, 90: 29~34)；7p21微小欠損(Johnson D他、Am J Hum Genet, 1998, 63: 1282~93)；ミラー・ディーカー症候群(17p13.3)、17p11.2欠失(Juyal RC他、Am J Hum Genet, 1996, 58: 998~1007)；2q37微小欠损(Wilson LC他、Am J Hum Genet, 1995, 56: 400~7)。

【0081】

本発明は、逆位[例えば、逆転したX染色体(Lepretre, F.他、Cytogenet. Genome Res., 2003, 101: 124~129; Xu, W.他、Am. J. Med. Genet., 2003, 120A: 434~436)、逆転した第10染色体(Helszer, Z.他、2003, J. Appl. Genet., 44: 225~229)]、突発的なサブテロメア染色体再配置(Engels, H.他、2003, Eur. J. Hum. Genet., 11: 643~651; Bocian, E.他、2004, Med. Sci. Monit., 10: CR143~CR151)、およ

び／または重複化（Soler, A. 他、Prenat. Diagn.、2003、23：319～322）を検出するために使用することができる。

【0082】

従って、本発明の教示は、侵襲的で、危険性のある処置に母体をさらすことなく、胎児における染色体異常を同定するために使用することができる。

【0083】

例えば、胎児の性別および／またはダウン症候群胎児（すなわち、21トリソミー）の存在を本発明の教示に従って決定するために、経子宮頸細胞が、Pap塗沫標本のための細胞採取ブラシを使用して妊娠の第7週～第11週の妊婦から得られる。細胞を1%ペニシリン・ストレプトマイシン抗生物質の存在下でRPMI-1640培地の組織培養培地（Beth Haemek、イスラエル）に懸濁し、サイトスピンドライドガラスを、Centrifuge（Thermo-Shandon、英国）を製造者の説明書に従って使用して調製する。サイトスピンドライドガラスを、免疫組織化学的分析が行われるまで95%アルコールにおいて脱水する。

【0084】

免疫組織化学に先だって、サイトスピンドライドガラスは70%アルコールおよび水において水和され、PBSで洗浄され、3%過酸化水素で処理され、その後、PBSにおいて3回洗浄され、ブロッキング試薬（Zymed HISTOSTAIN（登録商標）-PLUSキット、カタログ番号858943）とインキュベーションされる。HLA-G抗体（mAb7759、Abcam Ltd.、Cambridge、英国）が、60分間のインキュベーションのために、製造者の説明書に従ってスライドガラスに加えられ、その後、PBSにおける3回の洗浄が行われる。二次のビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体（Zymed HISTOSTAIN（登録商標）-PLUSキット、カタログ番号858943）が10分間のインキュベーションのためにスライドガラスに加えられ、その後、PBSにおける3回の洗浄が行われる。その後、二次抗体が、HRP-ストレプトアビジンコンジュゲート（Zymed HISTOSTAIN（登録商標）-PLUSキット、カタログ番号858943）およびアミノエチルカルバゾール（ABC Single Solution Chromogen/Substrate、Zymed）HRP基質を製造者の説明書に従って使用して読み取られる。対比染色が、ヘマトキシリソ溶液（Sigma-Aldrich Corp.、St Louis、MO、米国、カタログ番号GHS-2-32）を使用して行われる。免疫学的に染色された経子宮頸サンプルが、光学顕微鏡（AX 70 Provis、オリンパス、日本）およびそれに接続されたCCDカメラ（Applied Imaging、Newcastle、英国）を使用して調べられ、写真撮影され、そして、HLA-G陽性栄養膜細胞の位置に、顕微鏡座標を使用して印が付けられる。

【0085】

その後、HLA-G陽性細胞を含有するスライドガラスは水で洗浄され、70%エタノールおよび100%エタノールにおいて脱水され、メタノール・酢酸（3:1の比率）固定処理液において10分間固定処理され、その後、スライドガラスは2×SSCの（37の）温溶液において洗浄され、PBSにおける0.9%のホルムアルデヒドにおいて固定処理され、PBSにおいて洗浄される。FISH分析の前に、スライドガラスはペプシン溶液（0.1N HClにおいて0.15%）で消化され、エタノール系列において脱水され、乾燥される。

【0086】

胎児の性別を決定するために、7μlのLSI/WCPハイブリダイゼーション緩衝液（Abbott）が、XP11.1-q11.1（DXZ1）およびYp11.1-q11.1（DYZ3）の動原体領域を含有する直接的に標識されたCEP XグリーンおよびYオレンジのプローブ（Abbott、カタログ番号5J10-51）の1μl、1μlのヒトCot1DNA（1μg/μl、Abbott、カタログ番号06J31-001）、および、2μlの精製された2回蒸留水と混合される。プローブ-ハイブリダイゼ

10

20

30

40

50

ーション溶液を1秒間～3秒間遠心分離し、 $11\mu l$ のプローブ-ハイブリダイゼーション溶液が各スライドガラスに加えられ、その後、スライドガラスは、カバーガラスを使用して直ちに覆われる。その後、スライドガラスを70で3分間変性させ、さらに、HYBrite装置(ABBOTT、カタログ番号2J11-04)において37で48時間インキュベーションする。インキュベーション後、スライドガラスを0.4×SSCにおける0.3%NP-40において洗浄し、続いて2×SSCにおける0.1%NP-40において洗浄して、暗所において乾燥させる。対比染色を、DAPI II(ABBOTT)を使用して行う。その後、スライドガラスを、蛍光顕微鏡(AX-70 Privis、オリンパス、日本)をHLA-G陽性細胞の以前に印が付けられた位置に従って使用して調べ、写真撮影する。

10

【0087】

ダウン症候群胎児の存在または非存在を決定するために、最初の1組のFISH分析の後、スライドガラスは1×SSCにおいて洗浄され(20分間、室温)、その後、スライドガラスは精製された2回蒸留水に71で10秒間浸けられる。その後、スライドガラスはエタノール系列において脱水され、乾燥される。ハイブリダイゼーションが、21q22.13～21q22.2領域内のD21S259、D21S341およびD21S342の遺伝子座を含有するLSI 21q22オレンジ標識プローブ(ABBOTT、カタログ番号5J13-02)と、最初の1組のFISHプローブについて使用されたのと同じハイブリダイゼーション条件および洗浄条件とを使用して行われる。2組目のFISHプローブの後に得られるFISHシグナルが、蛍光顕微鏡およびHLA-G陽性栄養膜細胞の同じ座標を使用して調べられる。

20

【0088】

間期染色体に対する第13染色体、第18染色体、第21染色体、X染色体およびY染色体についてのFISHプローブの使用は、臨床的に重要な異常についての残存危険性を、間期FISHアッセイ前の0.9%～10.1%から、正常な間期FISHパターンの後において0.6%～1.5%に低下することが見出された[Homer J他、2003、インシチュウハイブリダイゼーション(FISH)における間期蛍光による出生前診断後の細胞遺伝学的異常についての残存危険性、Prenat Diagn、23：566～71]。従って、本発明の教示は、出生前診断の効率的な方法を提供することによって、臨床的に異常な乳児を有する危険性を著しく低下させるために使用することができる。

30

【0089】

出生前の父子鑑定が現在、PCRに基づく分析またはRFLP分析を使用して、CVSおよび/または羊水穿刺による細胞サンプルに由来するDNAサンプルに対して行われている(Strom CM他、Am J Obstet Gynecol、1996、174：1894～53；Yamada Y他、2001、J Forensic Dentostomatol.、19：1～4)。

【0090】

出生前の父子鑑定もまた、レーザー捕捉顕微解剖を使用して、経子宮頸試料および/または子宮内試料に存在する栄養膜細胞に対して行われ得ることが理解される。

40

【0091】

細胞のレーザー捕捉顕微解剖は、スライドガラス上に含有される不均一な細胞集団から特定の細胞タイプを選択的に単離するために使用される。レーザー捕捉顕微解剖を行う様々な方法がこの分野では知られている(例えば、米国特許出願第20030227611号(Fein, Howard他)；Mickel P他、2004、J. Pathol.、202：130～8；Evans EA他、2003、Reprod. Biol. Endocrinol.、1：54；Bauer M他、2002、絨毛のレーザー顕微解剖を使用する妊娠中絶後の父子鑑定、Int. J. Legal Med.、116：39～42；Fend F.およびRaffeld M.、2000、J. Clin. Pathol.、53：666～72)。

50

【0092】

例えば、栄養膜含有細胞サンプル（例えば、経子宮頸細胞のサイトスピンドライドガラス）が、レーザー活性化のときに特定の細胞に接着することができる選択的に活性化された表面（例えば、熱可塑性膜）と接触させられる。細胞サンプルは、本質的には下記の実施例の節の実施例1に記載されるように、（例えば、HLA-G抗体またはPLAP抗体を使用する）免疫学的染色に供される。免疫学的染色の後、細胞サンプルは、免疫学的に染色された栄養膜細胞（すなわち、それぞれHLA-G陽性細胞またはPLAP陽性細胞）を同定するために顕微鏡を使用して調べられる。同定されると、[例えば、PALM Microbeamシステム(PALM Microlaser Technologies AG、Bernreid、ドイツ)を使用して]光ファイバーを通じて送られるレーザービームにより、選択された栄養膜細胞に接着する表面が活性化され、これにより、その顕微解剖および単離がもたらされる。

10

【0093】

栄養膜細胞が単離されると、栄養膜細胞は、本質的にはStrom CM他（上掲）およびYamada Y他（上掲）に記載されるように、例えば、短いタンデム反復(STR)および/またはD1S80遺伝子座に対して特異的なPCRプライマー、ならびに/あるいは、多重遺伝子座(Myo)および単一遺伝子座(pYNH24)に対して特異的なRFLPプローブを使用するPCR分析および/またはRFLP分析に供することができる。

20

【0094】

本特許の存続期間中において、多くの関連した染色方法が開発されることが予想され、従って、染色するという用語の範囲は、推測されるすべてのそのような新しい技術を包含することが意図される。

【0095】

本明細書中で使用される用語「約」は±10%を示す。

【0096】

本発明の追加の目的、利点及び新規な特徴は、下記実施例を考察すれば、当業技術者には明らかになるであろう。なおこれら実施例は本発明を限定するものではない。さらに、先に詳述されかつ本願の特許請求の範囲の項に特許請求されている本発明の各種実施態様と側面は各々、下記実施例の実験によって支持されている。

30

【実施例】

【0097】

上記説明とともに、以下の実施例を参照して本発明を例示する。なおこれら実施例によって本発明は限定されない。

【0098】

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学及び組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技法は文献に詳細に説明されている[例えば以下の諸文献を参照されたい。「Molecular Cloning: A laboratory Manual」Sambrookら1989年; Ausubel, R.M.編1994年「Current Protocols in Molecular Biology」I~III巻; Ausubelら著1989年「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley and Sons, 米国メリーランド州バルチモア; Perbal著「A Practical Guide to Molecular Cloning」John Wiley & Sons, 米国ニューヨーク1988年; Watsonら、「Recombinant DNA」Scientific American Books、米国ニューヨーク; Birrenら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国ニューヨーク1998年; 米国特許の4666828号、4683202号、4801531号、5192659号及び527

40

50

2057号に記載される方法；Cellis, J. E. 編「Cell Biology : A Laboratory Handbook」I~III巻1994年；Freshney, Wiley-Liss著、「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」(第3版)N.Y.(1994年)；Coligan, J. E. 編「Current Protocols in Immunology」I~III巻1994年；Stitesら編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク1994年；MishellとShiggi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W.H. Freeman and Co.、米国ニューヨーク1980年；また利用可能な免疫検定法は、例えば以下の特許と科学文献に広範囲にわたって記載されている。米国特許の3791932号、3839153号、3850752号、3850578号、3853987号、3867517号、3879262号、3901654号、3935074号、3984533号、3996345号、4034074号、4098876号、4879219号、5011771号及び5281521号；Gait, M. J. 編「Oligonucleotide Synthesis」1984年；Hames, B. D. 及びHiggins S. J. 編「Nucleic Acid Hybridization」1985年；Hames, B. D. 及びHiggins S. J. 編「Transcription and Translation」1984年；Freshney, R. I. 編「Animal Cell Culture」1986年；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press 1986年；Perbal, B. 著「A Practical Guide to Molecular Cloning」1984年及び「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press；「PCR Protocols : A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ1990年；Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」、CSHL Press、1996年；Choo, K. H. A. 編「In Situ Hybridization Protocols」Human Press, Totowa, New Jersey(1994年)；なおこれらの文献類は、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである]。その外の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。本明細書に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。本明細書に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

【0099】

(実施例1)

経子宮頸試料から得られた絨毛外栄養膜細胞からの胎児FISHパターンの決定

妊娠の第6週～第15週の間の妊婦から得られた経子宮頸細胞を、下記のように、免疫学的染色、続くFISH分析を使用して分析した。

【0100】

材料および実験方法

研究被験者 - 妊娠中絶を受ける予定であるか、または進行中の妊娠の日常的な健康診断のために呼ばれた妊娠の第6週～第15週の間の妊婦が、そのインフォームドコンセントを与えた後で本研究に登録された。

【0101】

経子宮頸細胞のサンプル採取 - Pap塗沫標本のための細胞採取用ブラシ(Medical and AB、Malmo、スウェーデン)を外側子宮口から2cmの最大深さ(ブラシの長さ)に挿入し、細胞採取用ブラシを完全に1回転(すなわち、360°)回転させながら取り出した。ブラシに捕捉された経子宮頸細胞を取り出すために、ブラシを、1%

10

20

30

40

40

50

のペニシリン - ストレプトマイシン抗生物質の存在下、2 ml ~ 3 ml の RPMI - 1640 培地 (Beth Haemek、イスラエル) を含有する試験管の中に振り入れた。その後、サイトスピンドライドガラス (それぞれの経子宮頸試料から 6 枚のスライドガラス) を、経子宮頸細胞を含有する RPMI - 1640 培地の 1 滴 ~ 3 滴を Cytoskeleton Chamber Cytocentrifuge (Thermo-Shandon、英国) に浸けることによって調製した。細胞遠心分離のために使用される条件は経子宮頸試料の濁度に依存した; 試料がほんの少数の細胞を含有したならば、細胞は最初に 5 分間遠心分離され、次いで、1 ml の新鮮な RPMI - 1640 培地とともに懸濁された。サイトスピンドライドガラスは 95 % アルコールにおいて保存された。

【0102】

10

経子宮頸細胞の免疫組織化学的 (IHC) 染色 - 経子宮頸細胞を含有するサイトスピンドライドガラスを 70 % アルコール溶液において洗浄し、蒸留水に 5 分間浸けた。プロッキング試薬を含めて、PBS における洗浄はすべて、スライドガラスを穏やかに振とうしながら行われた。その後、スライドガラスを加湿チャンバーに移し、リン酸塩緩衝化生理的食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した。顕微鏡用スライドガラスにおける経子宮頸細胞の位置を可視化するために、経子宮頸試料の境界に、例えば、Pap Pen (Zymed Laboratories Inc.、San Francisco、CA、米国) を使用して印をつけた。50 μl の 3 % 過酸化水素 (Merck、ドイツ) 溶液を室温での 10 分間のインキュベーションのために各スライドガラスに加え、その後、スライドガラスを PBS において 3 回洗浄した。抗体の非特異的な結合を避けるために、2 滴のプロッキング試薬 (Zymed HISTOSTAIN (登録商標) - PLUS キット、カタログ番号 858943) を加湿チャンバーでの 10 分間のインキュベーションのために各スライドガラスに加えた。経子宮頸サンプルにおける胎児栄養膜細胞を同定するために、抗体希釈溶液 (Zymed) において 1 : 200 希釈された、絨毛外栄養膜細胞に対して特異的な非古典的クラス I 主要組織適合性複合体 (MHC) 抗原の HLA - G 抗体 (mAb 7759、Abcam Ltd.、Cambridge、英国) 部 (Loke, Y.W. 他、1997、Tissue Antigens、50 : 135 ~ 146) の 50 μl、あるいは、抗体希釈溶液において 1 : 200 希釈された、合胞体栄養細胞および / または細胞栄養芽層に対して特異的な抗ヒト胎盤アルカリホスファターゼ抗体 (PLAP、カタログ番号 18-0099、Zymed) (Leitner, K. 他、2001、絨毛栄養膜に関する先端原形質膜および基底原形質膜における胎盤アルカリホスファターゼ発現、J. Histochemistry and Cytochemistry、49 : 1155 ~ 1164) の 50 μl をスライドガラスに加えた。スライドガラスを加湿チャンバーにおいて 60 分間、抗体とインキュベーションし、その後、PBS で 3 回洗浄した。結合した一次 HLA - G 特異的抗体を検出するために、2 滴の二次のビオチン化ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Zymed HISTOSTAIN (登録商標) - PLUS キット、カタログ番号 858943) を加湿チャンバーでの 10 分間のインキュベーションのために各スライドガラスに加えた。二次抗体を PBS で 3 回洗浄した。ビオチン化二次抗体を明らかにするために、2 滴の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) - ストレプトアビジンコンジュゲート (Zymed、HISTOSTAIN (登録商標) - PLUS キット、カタログ番号 858943) を加湿チャンバーでの 10 分間のインキュベーションのために各スライドガラスに加え、その後、PBS において 3 回洗浄した。最後に、HRP - コンジュゲート化ストレプトアビジンを検出するために、2 滴のアミノエチルカルバゾール (AEC Single Solution Chromogen / Substrate、Zymed) HRP 基質を加湿チャンバーでの 6 分間のインキュベーションのために各スライドガラスに加え、その後、PBS で 3 回洗浄した。対比染色を、スライドガラスを 2 % のヘマトキシリン溶液 (Sigma-Aldrich Corp.、St Louis、MO、米国、カタログ番号 GHS - 2 - 32) に 25 秒間浸けることによって行い、その後、スライドガラスを水道水で洗浄し、カバーガラスで覆った。

20

30

40

【0103】

50

免疫組織化学的染色の顕微鏡分析 - 経子宮頸細胞を含有する免疫染色されたスライドガラスを、光学顕微鏡（AX-70, Provis、オリンパス、日本）を使用して走査し、染色された細胞（栄養膜）の存在位置に顕微鏡での座標数値を使用して印を付けた。

【0104】

FISH分析前の免疫組織化学的染色スライドガラスの前処理 - 免疫染色の後、スライドガラスを2回蒸留水に5分間浸け、70%エタノールおよび100%エタノールにおいてそれぞれ5分ずつ脱水し、メタノール・酢酸（3:1の比率で、Merck）固定処理剤溶液において10分間、固定処理した。その後、スライドガラスを、pH7.0~7.5における300mMのNaCl、30mMのクエン酸Na（2×SSC）の（37の）温溶液において10分間、浸けた。インキュベーション後、過剰な2×SSC溶液を捨て、スライドガラスをPBSにおける0.9%ホルムアルデヒドの溶液において室温で15分間固定処理した。その後、スライドガラスをPBSにおいて10分間洗浄し、細胞を0.01NのHClにおける0.15%のペプシン（Sigma）の溶液において37度15分間消化した。ペプシン消化後、スライドガラスをPBSにおいて10分間洗浄し、乾燥させた。完全な脱水を確実にするために、スライドガラスを、70%エタノール、85%エタノールおよび100%エタノールに浸け（それぞれ1分ずつ）、45~50のインキュベーションにおいて乾燥した。

【0105】

FISHプローブ - FISH分析を、二色技術および下記の直接的に標識されたプローブ（Abbott、Illinois、米国）を使用して行った：

【0106】

性染色体：CEP XグリーンおよびYオレンジ（Abbott、カタログ番号5J10-51）；CEP（登録商標）X Spectrum Green（商標）/ CEP（登録商標）Y（μサテライト）Spectrum Orange（商標）（Abbott、カタログ番号5J10-51）；CEP X/Yは、Spectrum Orange（商標）で直接的に標識された、動原体領域Yp11.1-q11.1（DYZ3）内に含有されるμサテライトDNAに対して特異的なプローブと混合された、Spectrum Green（商標）で直接的に標識された動原体領域Xp11.1-q11.1（DXZ1）特異的なμサテライトDNAからなる。

【0107】

第21染色体：LSI 21q22オレンジで標識化されたもの（Abbott、カタログ番号5J13-02）。このLSI 21q22プローブは、第21染色体の長腕における21q22.13~21q22.2の領域に存在するD21S259遺伝子座、D21S341遺伝子座およびD21S342遺伝子座に対して相補的な特異なDNA配列を含有する。

【0108】

第13染色体：網膜芽細胞腫遺伝子座（RB-113）と、第13染色体の13q14領域に対して特異的な配列とを含むLSI（登録商標）13Spectrum Green（商標）プローブ（Abbott、カタログ番号5J14-18）。

【0109】

第18染色体：CEP18グリーンで標識されたもの（Abbott、カタログ番号5J10-18）；CEP（登録商標）18（D18Z1、サテライト）Spectrum Orange（商標）（ABBOTT、カタログ番号5J08-18）。このCEP18プローブは、第18染色体の動原体領域（18p11.1-q11.1）に含有されるサテライトDNA（D18Z1）に対して特異的なDNA配列からなる。

【0110】

第16染色体：CEP16（Abbott、カタログ番号6J37-17）プローブは第16染色体の動原体領域（サテライトII、D16Z3）（16q11.2）にハイブリダイゼーションする。このCEP16プローブはスペクトルグリーン蛍光團により直接的に標識されている。

10

20

30

40

50

【0111】

AneuVision プローブ：第 18 染色体のための CEP プローブ（水色）、X 染色体のための CEP プローブ（緑色）、Y 染色体のための CEP プローブ（オレンジ色）、ならびに、第 13 染色体のための LSI プローブ（緑色）、および第 21 染色体のための LSI プローブ（オレンジ色）。この FDA 承認キット（Abbott、カタログ番号 5J37-01）は、陽性および陰性のコントロールスライドガラス、20×SSC、NP-40、DAPI II 対比染色剤、および詳細な添付文書を含む。

【0112】

免疫組織化学染色されたスライドガラスに対する FISH 分析 - ハイブリダイゼーションに先だって、7 μl の LSI / WCP ハイブリダイゼーション緩衝液（Abbott）を、1 μl の直接的に標識されたプローブ（本明細書中上記参照）、1 μl のヒト Cot 1 DNA（1 μl / μl）（Abbott、カタログ番号 06J31-001）、および 2 μl の精製 2 回蒸留水と混合した。このプローブハイブリダイゼーション溶液を 1 秒間～3 秒間遠心分離し、11 μl のプローブハイブリダイゼーション溶液を各スライドガラスに加え、その後、スライドガラスを、カバースリップを使用して直ちに覆った。

【0113】

インシチュウハイブリダイゼーションを、融解温度を 70 に設定し、融解時間を 3 分間にすることによって HYBriz e 装置（Abbott、カタログ番号 2J11-04）において行った。ハイブリダイゼーションを 37 で 48 時間行った。

【0114】

ハイブリダイゼーション後、スライドガラスを、60 mM の NaCl および 6 mM のクエン酸 Na（0.4×SSC）における 0.3% の NP-40（Abbott）の溶液において 72 で 2 分間洗浄した。その後、スライドガラスを 2×SSC における 0.1% の NP-40 の溶液に室温で 1 分間浸け、その後、スライドガラスを暗所で乾燥させた。対比染色を、10 μl の DAPI II 対比染色剤（Abbott）を使用して行い、その後、スライドガラスを、カバースリップを使用して覆った。

【0115】

反復した FISH 分析にスライドガラスを供すること - 数枚のスライドガラスについては、FISH 分析を、異なる組のプローブを使用して繰り返した。最初の 1 組の FISH プローブによるハイブリダイゼーションの後、スライドガラスを、150 mM の NaCl および 15 mM のクエン酸 Na（1×SSC）において 20 分間洗浄し、その後、スライドガラスを、精製された 2 回蒸留水に 10 秒間、71 で浸けた。その後、スライドガラスを、70%、85% および 100% のエタノール系列においてそれぞれ 2 分間ずつ脱水し、45～50 のインキュベーターにおいて乾燥した。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション後の洗浄は、本明細書中上記に記載されるように行われた。

【0116】

FISH 結果の顕微鏡評価 - FISH 分析後、栄養膜細胞（すなわち、HLA-G 陽性細胞）を、免疫組織化学的染色の後で得られた印が付けられた座標を使用して同定し、そのような細胞における FISH シグナルを、蛍光顕微鏡（AX-70 Provis、オリンパス、日本）を使用して調べた。

【0117】

胎盤組織のサンプル採取および加工 - 約 0.25 cm² の生検胎盤組織片を妊娠中絶の後で得た。胎盤組織を、メスを使用して小片に押しつぶし、KCl（43 mM）およびクエン酸ナトリウム（20 mM）を 1:1 の比率で含有する溶液において 3 回洗浄して、室温で 13 分間インキュベーションした。その後、胎盤組織を、3 滴のメタノール・酢酸（3:1 の比率での）固定処理剤溶液を 3 分間のインキュベーションのために加えることによって固定処理し、その後、溶液を室温での 45 分間のインキュベーションのために新鮮な 3 ml の固定処理剤溶液で置き換えた。胎盤組織を細胞懸濁物に解離するために、固定処理剤溶液を、振とうしながら 10 秒間のインキュベーションのために 1 ml～2 ml の 60% 酢酸で置き換えた。その後、胎盤細胞懸濁物をスライドガラスに載せ、風乾し

10

20

30

40

50

た。

【 0 1 1 8 】

進行中の妊娠における染色体 F I S H 分析の確認 - 羊水穿刺および絨毛生検 (C V S) を、染色体の核型を明らかにするために使用し、超音波走査 (U S) を、進行中の妊娠における胎児の性別を決定するために使用した。

【 0 1 1 9 】

実験結果

絨毛外栄養膜細胞が母体の経子宮頸細胞の中に同定された - 絨毛外栄養膜を同定するために、経子宮頸試料を妊婦（妊娠の第 6 週～第 15 週）から調製し、経子宮頸細胞を、 H L A - G 抗体を使用する免疫組織化学的染色に供した。表 1 (本明細書中下記) に示されるように、 H L A - G 抗体および / または P L A P 抗体を使用する I H C 染色は、 255 個のうちの 230 個の経子宮頸試料において絨毛外細胞、合胞体栄養細胞または細胞栄養芽層細胞を同定することができた。 25 個の経子宮頸試料 (全事例の 10 %) において、経子宮頸細胞は栄養膜細胞を含まなかった。数例において、患者は、反復した経子宮頸サンプル採取のために呼ばれ、栄養膜の存在が確認された (示されず) 。表 1 (本明細書中下記) から計算され得るように、 H L A - G 陽性細胞の平均数は経子宮頸試料あたり 6.67 個であった (6 枚のサイトスピンスライドガラスのすべてを含む) 。

【 0 1 2 0 】

絨毛外栄養膜細胞が F I S H 分析に供された - I H C 染色後、 H L A - G 陽性細胞または P L A P 陽性細胞を含有するスライドガラスをホルムアルデヒド処理およびペプシン処理に供し、その後、 F I S H 分析を、直接的に標識された F I S H プローブを使用して行った。表 1 (本明細書中下記) のデータから計算され得るように、 F I S H プローブを使用して印が付けられた細胞の平均数は 3.44 であった。ほとんどの場合、 F I S H の結果は、胎盤組織の細胞の核型決定から得られた結果 (妊娠中絶の場合) 、あるいは、 C V S および / または羊水穿刺の細胞の核型決定から得られた結果 (進行中の妊娠の場合) と比較された。一部の事例では、胎児の性別の確認が、超音波走査を使用して行われた。

【表1】

表1:

経子宮頸試料の栄養膜における FISHパターンの決定

事例番号	Gest. 週	IHC 陽性細胞 の数	FISH 陽性細胞 の数	性別および／また は染色体異常	経子宮頸試験の 成功／失敗
1	9	0	0	XY	-
2	10	3	1	XX/XXX	+
3	12	8	3	XX/21トリソミー	+
4	9	4	0	XXY	-
5	10	9	1	XX/21トリソミー	+
6	10	10	8	XX/X0	+
7	10	1	0	XY	-
8	7	9	1	XY	+
9	9	12	4	XY	+
10	8	1	0	XX/XXX	-
11	8.5	21	15	XX/X0	+
12	9	4	1	XY	+
13	9.5	3	2	XY	+
14	7.5	5	2	XX/21トリソミー	+
15	7	2	1	XY	+
16	6	1	1	XXX	偽
17	5	1	0	XY	-
18	6	1	0	XY	-
19	6	0	0	XY	-
20	8	6	2	XY	+
21	8	6	2	XX/13トリソミー	偽
22	13	0	0	3倍体(XXX)	-
23	9	5	1	XY	+
24	9.5	4	3	XY	+
25	10.5	13	5	3倍体(XXY)	+
26	9	10	4	XY	+
27	7.5	10	2	XY	+
28	9	7	0	XY/13トリソミー	-
29	12	4	0	XY	-
30	9.5	11	1	XY	+
31	11	2	1	XY	偽

10

20

30

40

32	8	0	0	3倍体(XXY)	-
33	10	1	1	XY	+
34	8.5	1	0	XY	-
35	10	7	2	XY	+
36	8	8	5	XY	+
37	11	2	2	XY	+
38	8	12	6	XY 双子	+
39	6	3	2	XX/21トリソミー	+
40	13	9	5	3倍体(XXX)	+
41	10	14	3	XY	+
42	12	31	17	XY/18トリソミー	+
43	8	9	7	XX/21トリソミー	+
44	9	1	1	XY	偽
45	14	1	0	XY	-
46	8	13	9	X0	+
47	7	4	2	XY	+
48	9	26	12	XY	+
49	12	3	0	XY/XXY	-
50	10	5	1	XX/13トリソミー	+
51	10	10	5	XX/ 21トリソミー	+
52	7	4	2	XY	+
53	8	6	2	XXYY	+
54	10	7	6	XY/21トリソミー	+
55	7	7	0	XY	-
56	8	3	1	3倍体(XXX)	+
57	8.5	4	2	X0	+
58	8.5	18	7	XY	+
59	8	22	6	XY	+
60	9	2	0	XX/21トリソミー	-
61	7	3	0	XXX	-
62	7	10	10	XY	+
63	11	7	2	X0	+
64	8	5	3	XXX	+
65	7	9	2	XY	+
66	9	4	2	XY	+

10

20

30

40

67	10	8	2	XY	+
68	9.5	2	1	XY	+
69	9	8	1	XXX	+
70	7.5	5	1	XY	+
71	8.5	8	2	XY/21トリソミー	+
72	7	20	9	XY	+
73	7	5	2	XY	+
74	10	5	1	X0	+
75	9	15	2	3倍体(XXX)	+
76	6	11	3	X0	+
77	8	8	0	XXX	-
78	7	19	5	XY	+
79	9	6	2	X0	+
80	9	9	2	XY	+
81	6	2	1	X0	+
82	11	4	1	3倍体(XXX)	+
83	8	8	1	XX	+
84	11	5	2	XY	+
85	10	2	0	XX	-
86	11	5	1	XY	+
87	11	13	8	XY	+
88	8	9	3	XY	+
89	8	17	2	XY	+
90	8	1	1	XY	+
91	11	20	2	XY	+
92	7	19	6	XY	+
93	8	10	5	X0	+
94	8	15	7	XY	+
95	8	16	6	XY	+
96	9	0	0	XY	-
97	11	16	13	XY	+
98	10	7	1	XY	+
99	6	14	3	XY	+
100	8	13	4	XY	+
101	10	14	3	XY	+

10

20

30

40

102	9	11	3	XY	+
103	10	11	3	XY	+
104	8	8	4	XY	+
105	11	3	1	XY	+
106	9	6	2	XY	+
107	8	8	3	XY	+
108	7	4	2	XX	+
109	7	9	3	X0	+
110	8	8	2	XY	+
111	9	18	3	XY	+
112	10	4	3	XY	偽
113	9.5	14	7	XY	+
114	11	4	1	XY	+
115	6.5	13	3	XX	+
116	8	5	1	XY	+
117	7	2	2	XY	+
118	11	3	2	XY	+
119	11	4	2	XX	+
120	7	1	0	XX	-
121	8	19	12	XY	+
122	8	3	2	XX	+
123	7	4	1	XX	+
124	8	2	0	XY	-
125	8	0	0	XX	-
126	8	2	1	XX	+
127	8	3	1	X0	+
128	9	3	1	X0	+
129	8	0	0	XY	-
130	7	5	2	XY	+
131	8	0	0	XY	-
132	12	1	1	XX	+
133	7	18	10	XY	+
134	8	20	17	XX	+
135	13	6	3	XX	+
136	10	0	0	XX	-

10

20

30

40

137	7	0	0	XY	-
138	8	4	4	XX	+
139	10	5	4	XY	+
140	9	3	2	X0	+
141	8	3	3	XY	+
142	6	6	5	XY	+
143	7	3	3	XY	+
144	7	0	0	XX	-
145	9	4	4	XX	+
146	10	1	1	XY	+
147	12	3	2	XY	偽
148	7	2	2	XY	+
149	10	1	1	X0	+
150	9	0	0	XY	-
151	11	0	0	XX	-
152	8	2	2	XX	+
153	12	2	1	XY	+
154	10	0	0	XX	-
155	11	2	2	XY	偽
156	8	2	2	XY	+
157	7.5	4	2	XY	+
158	8	13	10	XY	+
159	7	8	8	XY	+
160	10	4	3	XY	+
161	7	8	6	XXY/XY	+
162	7	3	3	XY	+
163	10	5	4	X0	+
164	7	5	5	XY	+
165	8	6	4	XX	+
166	11	36	5	XX	+
167	8	12	1	XY	偽
168	10	5	2	XY	+
169	9	16	6	XX	+
170	12	14	4	XY	+
171	10	11	4	XX	+
172	10	30	20	XX	+

10

20

30

40

173	10	12	10	XY	+
174	12	18	0	XX	-
175	11	17	5	XY	+
176	14	7	2	XY	偽
177	10	9	4	XY	+
178	12	2	2	XY	+
179	11	13	5	XY	+
180	10	4	2	XX	+
181	9	14	5	XY	+
182	10.5	12	4	XY	+
183	7	11	5	XX	+
184	11	3	2	XX	+
185	10	5	4	XY	+
186	10	2	2	XY	+
187	6	6	3	XY	+
188	10	7	4	XY	+
189	8	6	5	XX	+
190	8	1	1	XY	+
191	8	1	1	XY	+
192	9	1	1	XY	+
193	8	0	0	XX	-
194	9	5	2	XY	+
195	6.5	8	5	XY	+
196	13	3	2	XX	+
197	9	6	5	XX	+
198	9	8	4	XY	偽
199	9.5	7	6	XY	+
200	15	15	10	XY	+
201	15	8	7	XY/21トリソミー	+
202	13.5	0	0	XY	-
203	15	0	0	XX	-
204	7	7	7	XY	+
205	12	0	0	XX	-
206	15	3	2	XY	+
207	10.5	14	10	XY	+
208	9.5	10	5	XY	偽

10

20

30

40

209	9	12	10	XY	+
210	12	10	8	X0	+
211	9.5	1	1	XY	+
212	8	10	9	XY	+
213	8	16	16	XY	+
214	12	10	8	XX	+
215	10.5	12	12	XY	+
216	9	3	2	XY	+
217	8	8	7	XX	+
218	6.5	10	10	XX	+
219	9	1	1	XY	+
220	12	0	0	XX	-
221	8.5	8	7	XX	+
222	9	9	6	XX	+
223	9	0	0	XY	-
224	8	13	13	XY	+
225	12	2	1	XY	+
226	10	3	2	XY	偽
227	12	0	0	XX	-
228	9	0	0	XY	-
229	11	3	2	XY	偽
230	11.5	7	7	XY	+
231	14.5	0	0	XX	-
232	7	12	12	XY	+
233	9.5	0	0	XX	-
234	12.5	4	3	XY	+
235	8	8	8	XX	+
236	8.5	11	10	XX	+
237	13	0	0	XY	-
238	9	10	9	XY	+
239	11	4	3	XY	偽
240	10	5	4	XX	+
241	11	3	3	XX	+
242	7	6	6	XY	+
243	11.5	5	5	XX	+
244	11	9	8	XY	+

10

20

30

40

245	10	4	4	XX	+
246	11	8	6	XX	偽
247	6.5	5	3	XY/XXY	(XY) -
248	7	9	8	XY	+
249	8.5	9	9	XX	+
250	9.5	5	5	XY	+
251	12.5	6	5	XY	+
252	7	5	5	XX	+
253	6.5	12	11	XY	+
254	8	10	5	XX	+
255	7.5	2	2	XX	+

10

表1：胎児FISHパターンの決定の成功(+)または失敗(-)が、胎盤生検、CVSまたは羊水穿刺を使用して、IHC陽性細胞およびFISH陽性細胞の数、ならびに、性別および/または染色体異常の決定とともに示される。Gest.=妊娠期間；「偽」=母体細胞に対するHLA-G抗体もしくはPLAP抗体の非特異的な結合、および/または、FISH分析後の残存抗体由来のシグナル；* =細胞数が少ないためにモザイク現象の同定の失敗。

20

【0121】

経子宮頸試料に存在する絨毛外栄養膜における正常な男胎児の同定 - 妊娠の第7週および第9週の2名の異なる妊婦（それぞれ、本明細書中上記の表1の事例73および事例80）から得られた経子宮頸細胞を含有するスライドガラスをHLA-GのIHC染色に供した。図1aおよび図1cに示されるように、両方の経子宮頸試料はHLA-G陽性細胞（すなわち、絨毛外栄養膜）を含んでいた。胎児の性別を決定するために、IHC染色の後、スライドガラスを、CEP-XプローブおよびYプローブを使用するFISH分析に供した。図1bおよび図1dに示されるように、男胎児に対応する正常なFISHパターンがそれぞれの場合において検出された。これらの結果は、胎児細胞のFISHパターンを決定することにおける経子宮頸試料の使用を明らかにしている。

30

【0122】

FISHパターンを、PLAP抗体を使用して、経子宮頸試料に存在する細胞栄養芽層細胞において首尾良く決定することができる - 妊娠第11週の妊婦から得られた経子宮頸細胞を、合胞体栄養細胞および絨毛細胞栄養芽層細胞を同定することができる抗ヒト胎盤アルカリホスファターゼ(PLAP)抗体(Millier他、1999、Hum. Reprod.、14:521~531)を使用するIHC染色に供した。図2aに示されるように、PLAP抗体は経子宮頸試料における絨毛細胞栄養芽層細胞を同定することができた。CEP-XプローブおよびYプローブを使用するFISH分析の後、絨毛細胞栄養芽層細胞における1つだけのオレンジ色シグナルおよび1つだけの緑色シグナルの存在(図2b、白色の矢)により、正常な男胎児の存在が確認された。

40

【0123】

経子宮頸試料における絨毛外栄養膜を使用するダウン症候群(21トリソミー)の診断 - 妊娠第8週の妊婦(本明細書中上記の表1の事例71)から得られた経子宮頸細胞をHLA-GのIHC染色に供し、続いて、Y染色体および第21染色体に対して特異的なプローブを使用するFISH分析に供した。図3a～図3bに示されるように、HLA-G陽性細胞(図3a、白色の矢で印が付けられた細胞)は、3つのオレンジ色シグナルと、1つだけの緑色シグナルとを含有した(図3b)。このことは、男胎児の絨毛外栄養膜における21トリソミー(すなわち、ダウン症候群)の存在を示している。これらの結果は、経子宮頸試料調製物においてダウン症候群を有する胎児を同定するという使用を示唆

50

している。

【0124】

経子宮頸細胞を使用するターナー症候群(X0)の診断 - 妊娠第6週の妊娠(本明細書中上記の表1の事例76)から得られた経子宮頸細胞をHLA-GのIHC染色に供し、続いて、X染色体およびY染色体に対して特異的なプローブを使用するFISH分析に供した。図4a～図4bに示されるように、HLA-G陽性の絨毛外栄養膜細胞におけるFISH分析後の1つだけの緑色シグナルの存在(図4a)は、女胎児におけるターナー症候群(すなわち、X0)の存在を示していた。これらの結果は、経子宮頸試料調製物においてターナー症候群を有する胎児を同定するという使用を示唆している。

【0125】

経子宮頸細胞を使用するクラインフェルター・モザイク現象の診断 - 経子宮頸細胞のサイトスピンスライドガラスを、妊娠中絶を受ける予定である妊娠第7週の妊娠(本明細書中上記の表1の事例161)から調製した。図5a～図5bに示されるように、1つの絨毛外栄養膜細胞(図5b、細胞番号2)は正常なFISHパターン(すなわち、1つだけのX染色体および1つだけのY染色体)を示した一方で、別の栄養膜細胞(図5b、細胞番号1)は、2つのX染色体および1つだけのY染色体を有する異常なFISHパターンを示した。これらの結果は、男胎児におけるクラインフェルター・モザイク現象の存在を示唆していた。これらの結果を確認するために、妊娠中絶後に得られた胎盤組織に由来する細胞を同じFISH分析に供した。図5cに示されるように、クラインフェルター・モザイク現象の存在が胎盤細胞において確認された。従って、染色体のモザイク現象を経子宮頸試料において検出することができる。しかしながら、そのような同定は、栄養膜細胞内のモザイク細胞の割合だけでなく、経子宮頸試料に存在する栄養膜細胞(すなわち、IHC陽性細胞)の総数に依存し得ることが理解される。

【0126】

本発明の組み合わされた検出方法により、進行中の妊娠から、また、妊娠中絶の前に得られた栄養膜を含有する経子宮頸試料の92.89%において胎児FISHパターンが首尾良く決定された - 表1(本明細書中上記)には、妊娠中絶前の妊娠の第6週～第15週の間の妊娠(事例1～165、表1)から、または、日常的な健康診断のときの妊娠(事例166～255、表1、進行中の妊娠)から調製された255個の経子宮頸試料に対して行われたIHC分析およびFISH分析の結果がまとめられている。経子宮頸試料において胎児のFISHパターンを決定することにおける本発明の組み合わせられた検出方法(すなわち、IHC分析およびFISH分析)の全体的な成功率は76.86%である。255例中25例において、FISH分析は、不十分なIHC陽性細胞のために行われなわれず、また、255例中19例において、FISHパターンが、FISHアッセイの失敗の結果として決定されなかった(表1、「-」で印が付けられた事例)。残る211例の中で、92.89%において、胎児のFISHパターンが、胎盤生検、羊水穿刺またはCVSの胎児細胞を使用して得られる核型の結果によって確認されるように、栄養膜を含有する経子宮頸試料において首尾良く決定された(表1、「+」で印が付けられた事例)。211例中15例(すなわち、7.11%)において、FISH分析が、HLA-G抗体またはPLAP抗体と非特異的に相互作用し、従って、母体細胞に対するFISHハイブリダイゼーションをもたらした細胞に対して行われた(表1、「偽」で印が付けられた事例)。栄養膜特異的抗体(例えば、HLA-GまたはPLAP)と非特異的に相互作用した細胞の割合は、抗体調製またはIHCアッセイ条件を改善することによって低下することが予想されることが理解される。

【0127】

本発明の組み合わされた検出方法により、進行中の妊娠に由来する栄養膜を含有する経子宮頸試料の87.34%において胎児FISHパターンが首尾良く決定された - 表1(本明細書中上記)から計算され得るように、進行中の妊娠に由来する栄養膜を含有する経子宮頸試料を使用して胎児細胞におけるFISHパターンを決定することにおける全体的な成功率は76.67%である。日常的な健康診断(すなわち、進行中の妊娠)のとき

10

20

30

40

50

の妊娠から得られた合計で 90 個の経子宮頸試料（事例 166 ~ 255、表 1）のうち、11 個の経子宮頸試料（12.2%）が IHC 陰性細胞を含んでいた。残る 79 個の経子宮頸試料の中で、8 個の IHC 陽性サンプルにおいて、抗体が母体細胞と非特異的に相互作用し、これにより、母体染色体の FISH パターンがもたらされ、（「偽」と印が付けられた事例、表 1）、1 個の経子宮頸試料（事例番号 247、表 1）は、サンプルにおける栄養膜細胞の数が少ないために、XY / XXY モザイク現象を同定することができず、しかしながら、XY 細胞を同定することができ、また、1 個の経子宮頸試料（事例番号 174、表 1）は、FISH アッセイに伴う技術的問題のために失敗した。まとめると、FISH パターンを、79 例中 69 例（87.34%）の IHC 陽性（すなわち、栄養膜含有）経子宮頸試料において決定することに成功した。

10

【0128】

まとめると、これらの結果は、胎児栄養膜の FISH パターンを決定するための経子宮頸細胞の使用を明らかにしている。さらに、進行中の妊娠における経子宮頸試料から得られた結果は、胎児の性別および一般的な染色体異常（例えば、トリソミーおよびモザイク現象など）を明らかにするために、日常的な出生前診断における経子宮頸細胞の使用を示唆している。より具体的には、本発明の組み合わせられた検出方法は、FISH 分析を使用して検出することができる染色体異常に関連する疾患の出生前診断において使用することができ、特に、親の一方がそのような疾患の保因者（例えば、ロバートソン転座 t（14；21）、平衡した相互転座 t（1；19）、微小欠損症候群（例えば、ディジョージ症候群、ミラー・ディーカー症候群）、既知の逆位（例えば、第 7 染色体、第 10 染色体）などの保因者）である場合において使用することができる。

20

【0129】

分かりやすくするために別個の実施態様で説明されている本発明のいくつもの特徴は、組み合わせて単一の実施態様にして提供することもできることは分かるであろう。逆に簡略化するため単一の実施態様で説明されている本発明の各種特徴は、別個に又は適切なサブコンビネーションで提供することもできる。

【0130】

本発明を、その具体的実施態様とともに説明してきたが、多くの変形と変更が当業技術者には明らかであることは明白である。したがって、本発明は、本願の特許請求の範囲の精神と広い範囲内に入っているこのような変形と変更をすべて含むものである。本明細書に記載のすべての刊行物、特許及び特許願は、あたかも、個々の刊行物、特許又は特許願各々が、本願に具体的にかつ個々に参照して示されているように、本願に援用するものである。さらに、本願における任意の文献の引用もしくは確認は、このような文献が本発明に対する従来技術として利用できるという自白とみなすべきではない。

30

【図面の簡単な説明】

【0131】

【図 1 a - b】経子宮頸細胞の IHC 分析（図 1 a）および FISH 分析（図 1 b）を示す顕微鏡写真である。

40

【図 1 c - d】経子宮頸細胞の IHC 分析（図 1 c）および FISH 分析（図 1 d）を示す顕微鏡写真である。

【図 2】経子宮頸細胞の IHC 分析（図 2 a）および FISH 分析（図 2 b）を示す顕微鏡写真である。

【図 3】経子宮頸細胞の IHC 分析（図 3 a）および FISH 分析（図 3 b）を示す顕微鏡写真である。

【図 4】経子宮頸細胞の IHC 分析（図 4 a）および FISH 分析（図 4 b）を示す顕微鏡写真である。

【図 5 a - b】妊娠第 7 週の妊娠（表 1 における事例 161）から得られた経子宮頸細胞の IHC 分析（図 5 a）および FISH 分析（図 5 b）を示す顕微鏡写真である。

【図 5 c】妊娠第 7 週の妊娠（表 1 における事例 161）から得られた胎盤細胞の FISH 分析を示す顕微鏡写真である。

50

【図 1 a - b】

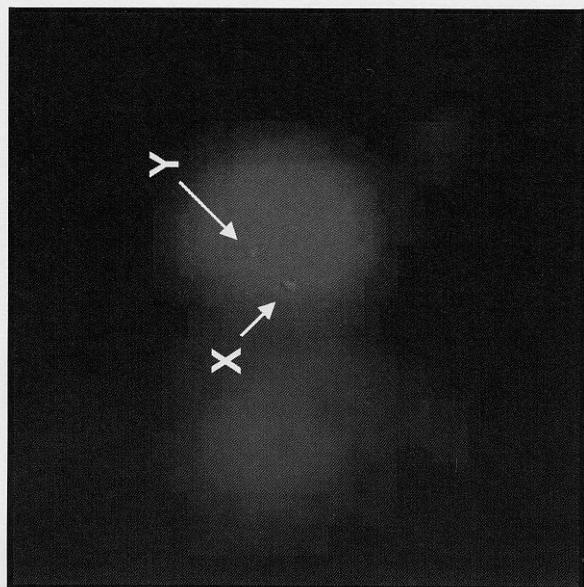


Figure 1b

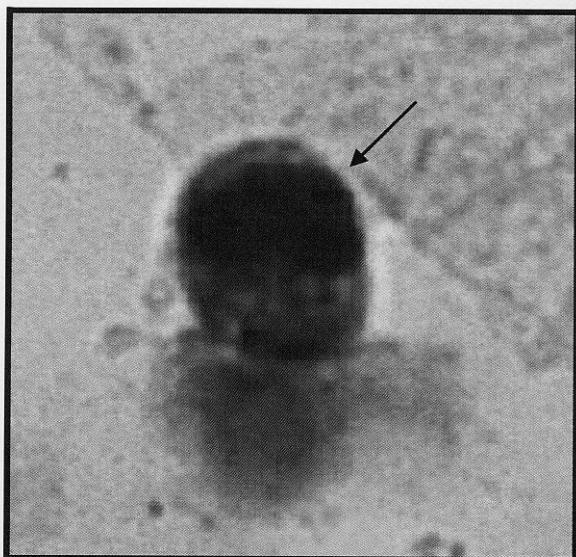


Figure 1a

【図 1 c - d】

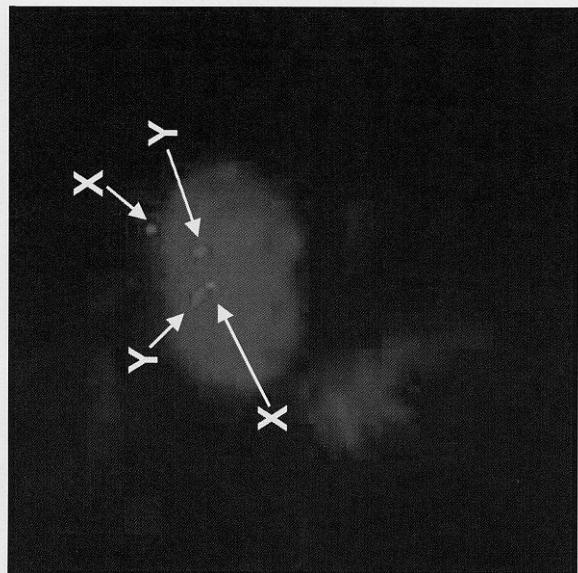


Figure 1d

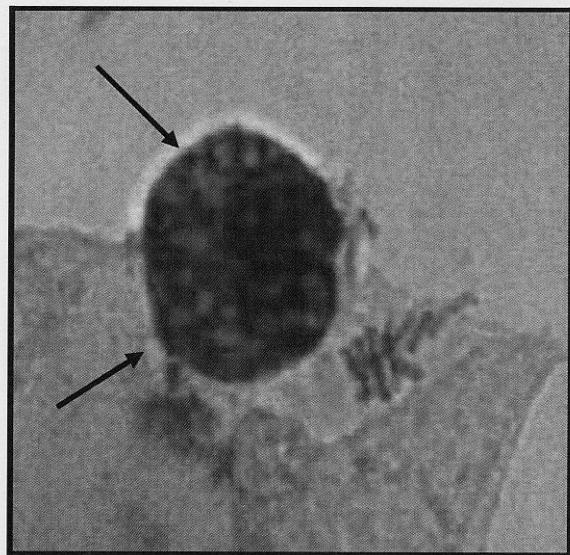


Figure 1c

【図2】

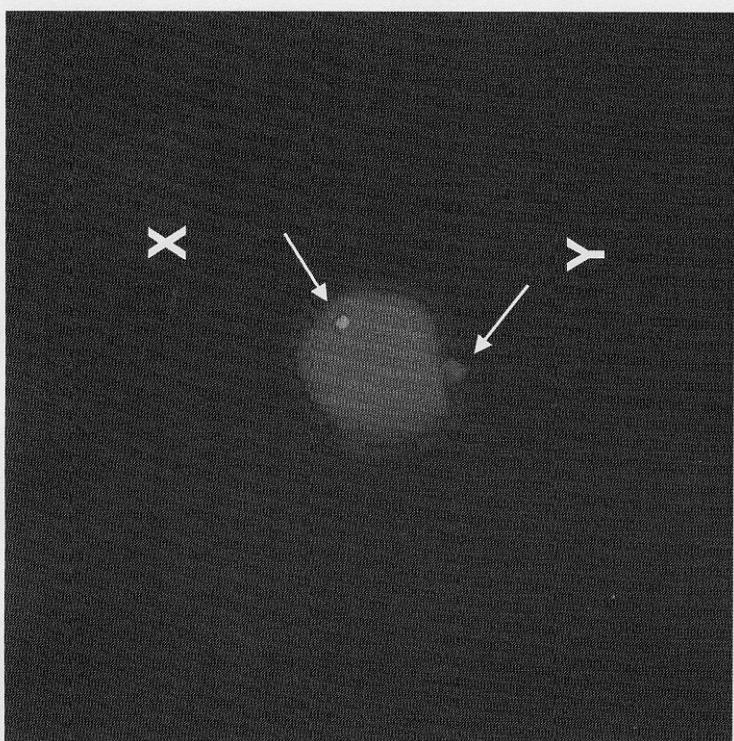


Figure 2b

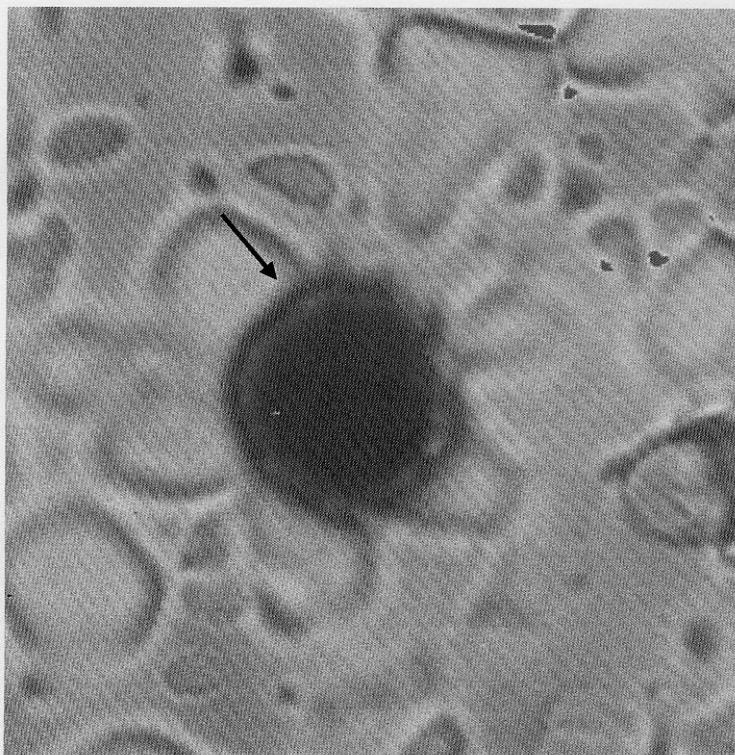


Figure 2a

【図3】

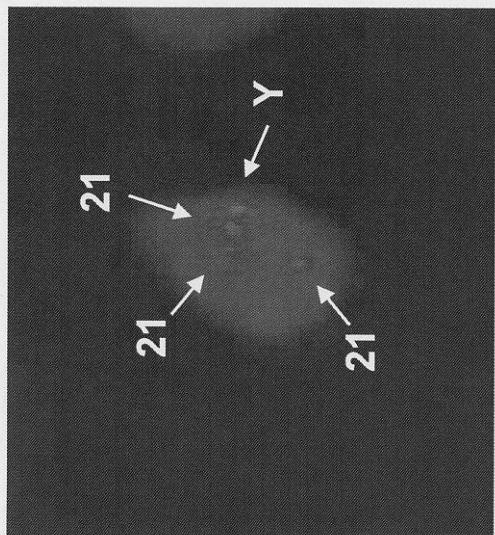


Figure 3b

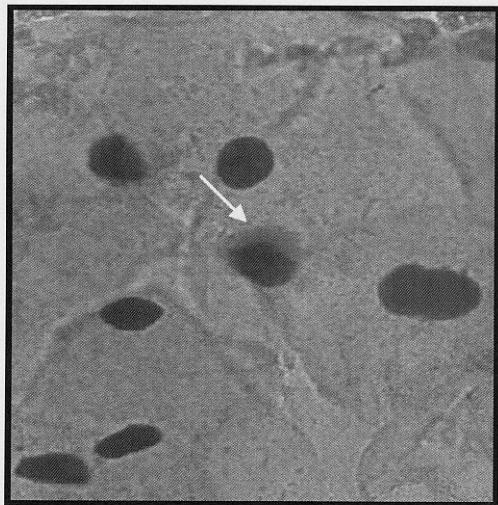


Figure 3a

【図4】

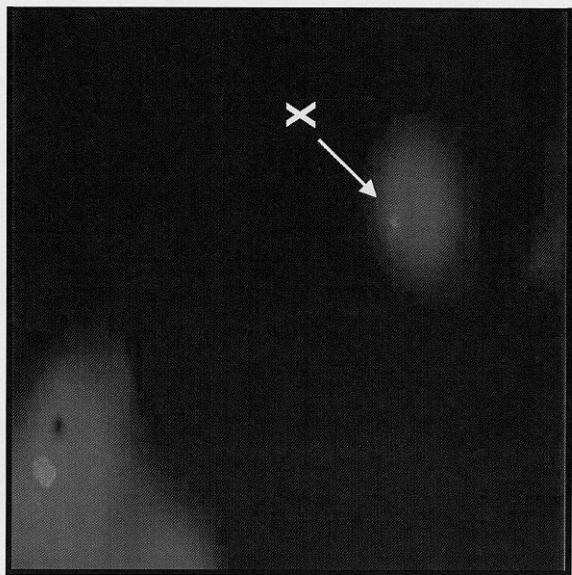


Figure 4b

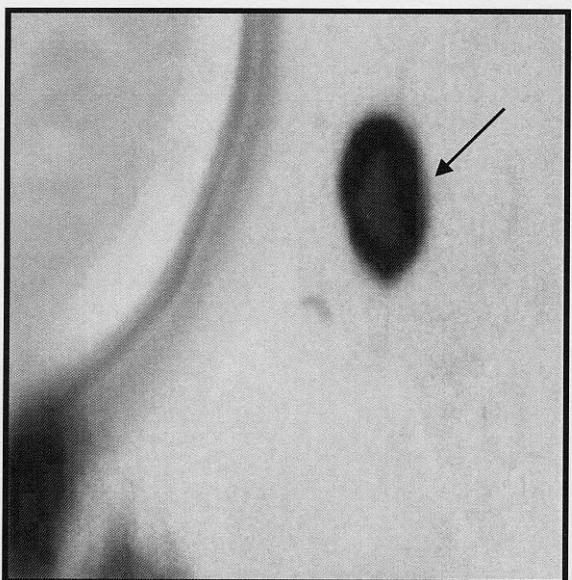


Figure 4a

【図 5 a - b】

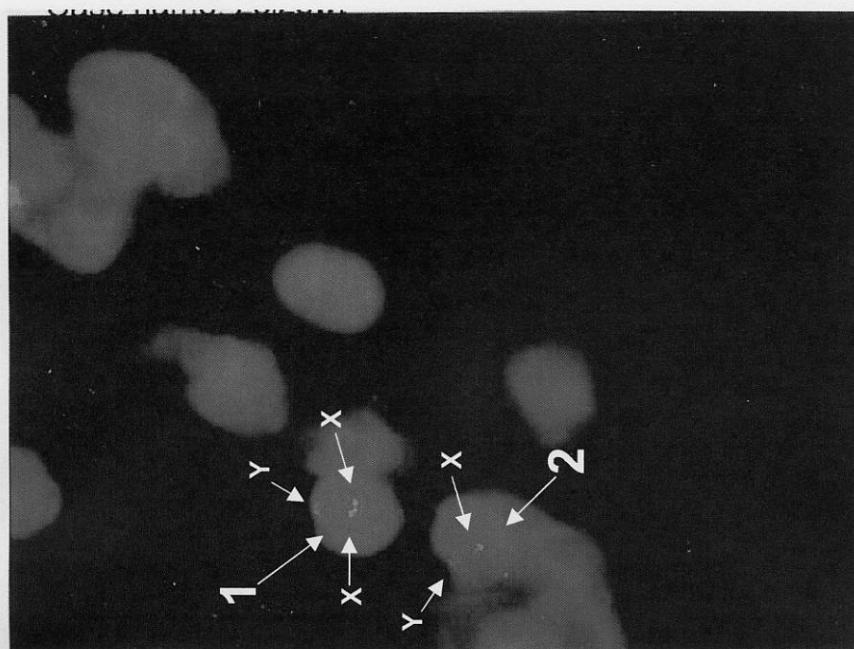


Figure 5b

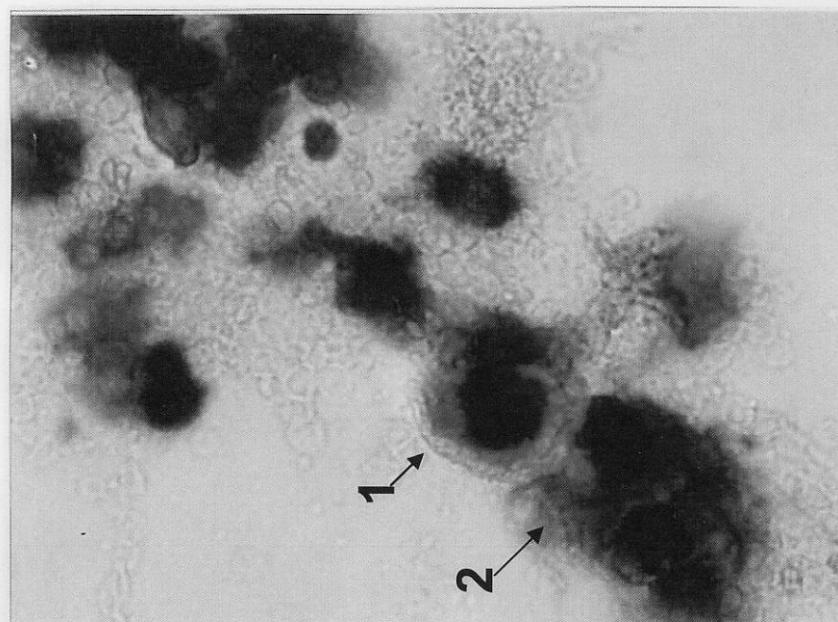


Figure 5a

【図 5 c】

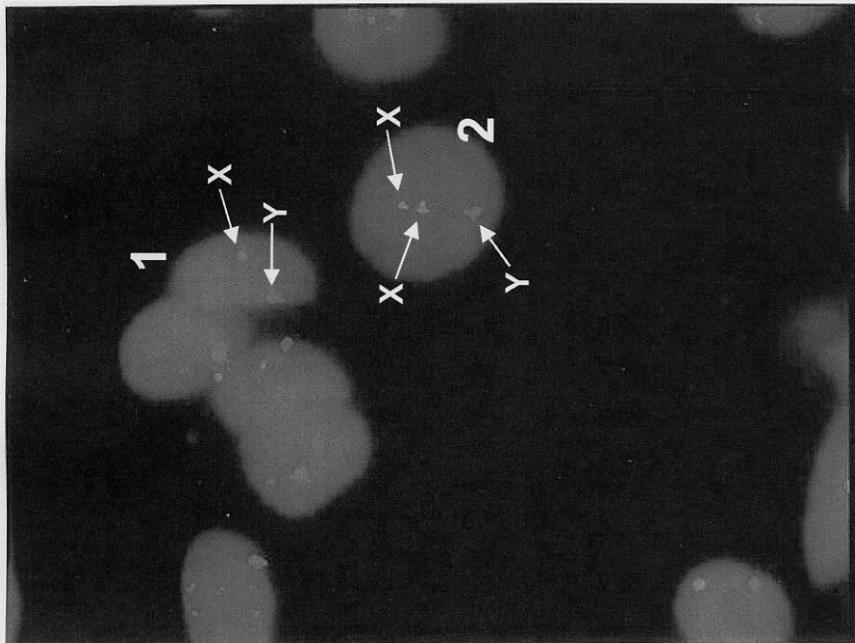


Figure 5c

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IL04/00304
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12Q 1/68 US CL : 435/6		
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) U.S. : 435/6		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RODECK et al. Method for the transcervical collection of fetal cells during the first trimester of pregnancy. Prenatal Diagnosis. 1995, Vol. 15, pages 933-942.	1-4, 7-12
Y	US 5,750,339 A (SMITH) 12 May 1998 (12.05.1998), col. 6 lines 13-16.	5-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date		"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
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"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
"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 05 October 2004 (05.10.2004)	Date of mailing of the international search report 20 OCT 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Heather G. Calamita <i>H. Roberts for</i> Telephone No. 571.272.1600	

Form PCT/ISA 210 (second sheet) (January 2004)

フロントページの続き

(51) Int.CI.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 21/78

C

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

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA25 AA27 BA14 BB24 CB01 DA13 DA36 FB02
2G054 AA08 AB04 AB05 BB08 CA22 CA23 CE02 EA03 GA04
4B063 QA08 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ60 QR32 QR35
QR55 QR62 QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	使用经宫颈细胞的无创产前基因诊断		
公开(公告)号	JP2006523100A	公开(公告)日	2006-10-12
申请号	JP2006507600	申请日	2004-04-01
申请(专利权)人(译)	蒙娜丽莎医疗，有限的		
[标]发明人	アミエルアリザ フェジュギンモシェディー		
发明人	アミエル, アリザ フェジュギン, モシェ, ディー.		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/53 G01N21/78 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6879 C12Q1/6841 C12Q1/6883 C12Q2600/156 G01N33/689 G01N2800/36 G01N2800/368 G01N2800/387		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N33/53.M G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA27 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045 /DA36 2G045/FB02 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/BB08 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063 /QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ60 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	10/405698 2003-04-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)		(P2006-5231) (43) 公表日 平成18年10月12日(2006.10.12)	
提供了一种用于确定性别和/或染色体异常的方法，例如，胎儿的染色体非整倍性包括鉴定从孕妇获得的经宫颈细胞样品中的胎儿细胞，例如用仅由绒毛外滋养层细胞表达的HLA-G抗原特异性抗体，然后使鉴定的胎儿细胞原位荧光用一种或多种探针杂交(FISH)用于检测胎儿性别或染色体异常，例如单体型，三体型或多倍性，例如三倍体。			
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)	
C12Q 1/68 G01N 33/48 G01N 33/63 G01N 21/78	(2006.01) (2006.01) (2006.01) (2006.01)	C12Q 1/68 G01N 33/48 G01N 33/53 G01N 33/53	A 2G045 P 2G054 Y 4B063 D M
(21) 出願番号		(71) 出願人	
(22) 出願日	特願2006-507600 (P2006-507600)	(71) 出願人	505368833 モナリザ メディカル, リミテッド
(36) (22) 出願日	平成16年4月1日 (2004.4.1)		イスラエル, 43-650 ラーナ ハサドナ ストリート 11
(35) 翻訳文提出日	平成17年12月2日 (2005.12.2)	(74) 代理人	100103816 弁理士 風早 信昭
(36) 国際出願番号	PCT/IL2004/000304	(74) 代理人	100120927 弁理士 浅野 典子
(37) 国際公開番号	W02004/087863	(72) 発明者	アミエル, アリザ イスラエル, 40697 エイン- ド, ビー, オー, ボックス 21: フェジュギン, モシェ, ディー, イスラエル, 67676 テル-ア- ビ, ローセンブルム ストリート 1 スイート 6113
(37) 国際公報日	平成16年10月14日 (2004.10.14)		最終頁に統
(31) 優先権主張番号	10/405,698		
(32) 優先日	平成15年4月3日 (2003.4.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		