

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6421123号
(P6421123)

(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/24 (2006.01)	C 1 2 Q	1/24
C 1 2 Q	1/6841 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6841 Z
C 1 2 Q	1/686 (2018.01)	C 1 2 Q	1/686 Z
C 1 2 N	5/073 (2010.01)	C 1 2 N	5/073
G O 1 N	33/48 (2006.01)	G O 1 N	33/48 M

請求項の数 14 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-538043 (P2015-538043)	(73) 特許権者	515108679
(86) (22) 出願日	平成25年10月18日(2013.10.18)		ウェイン ステイト ユニヴァーシティ
(65) 公表番号	特表2015-533504 (P2015-533504A)		アメリカ合衆国 48202 ミシガン州
(43) 公表日	平成27年11月26日(2015.11.26)		デトロイト ウッドワード 5057
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/065570		スイート 6306
(87) 国際公開番号	W02014/062995	(74) 代理人	100083806
(87) 国際公開日	平成26年4月24日(2014.4.24)		弁理士 三好 秀和
審査請求日	平成28年9月1日(2016.9.1)	(74) 代理人	100095500
(31) 優先権主張番号	61/715,854		弁理士 伊藤 正和
(32) 優先日	平成24年10月19日(2012.10.19)	(74) 代理人	100111235
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 原 裕子
		(72) 発明者	アルマント、 ディー、 ランドール
			アメリカ合衆国 48201 ミシガン州
			デトロイト ハンコック 275 シー
			. エス. モット センター
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 出生前診断のための頸管粘液における胎性栄養膜細胞の同定および分析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

子宮頸管内試料から胎児細胞を回収する方法であって、
子宮頸管内試料から粘液を除去し、それによって前記子宮頸管内試料中の胎児細胞と母体細胞とを分離する工程；および

胎児細胞特異的抗体に結合した磁気ナノ粒子による胎児細胞の免疫磁気標識を使用して、前記子宮頸管内試料中の他の細胞から分離された胎児細胞を単離する工程を含む方法。

【請求項2】

前記単離する工程は、胎児細胞をひとまとめに単離することを含む、請求項1に記載の方法。 10

【請求項3】

前記子宮頸管内試料は、子宮内洗浄、頸管粘液の吸引、および子宮頸管からの表面組織の除去からなる群から選択される方法により取得されたものである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記単離された胎児細胞を栄養膜培養培地中で培養する工程をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記粘液を除去する工程の前に前記試料を固定液中に置く工程をさらに含む、請求項1 20

～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記粘液を除去する工程は、酸性化によって前記子宮頸管内試料から前記粘液を除去することを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記試料において単離された細胞を診断目的のために同定することをさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記同定する工程は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、逆転写を伴ったポリメラーゼ連鎖反応、逆転写を伴わないポリメラーゼ連鎖反応、および免疫組織化学的検査からなる群から選択される方法を使用して細胞を分析することを含む、請求項7に記載の方法。

10

【請求項9】

同定された細胞を、全ゲノム増幅後のゲノムハイブリダイゼーションまたは配列決定、代謝物アッセイ、および小化合物アッセイからなる群から選択される方法を使用して分析することをさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項10】

子宮頸部細胞中からの胎児細胞の同定のための、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項11】

高リスク妊娠を予測するための胎児細胞密度の決定のための、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法の使用。

20

【請求項12】

胎児細胞の遺伝学的分析のための、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項13】

増殖因子、タンパク質、およびRNAからなる群から選択される産科学的障害のバイオマーカーの測定のための、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項14】

前記産科学的障害は、子癇前症および子宮内胎児発育遅延から選択され、前記バイオマーカーは、LGALS13、LGALS14、PAPPA、PGF、FLT-1、ENG、およびAFPから選択される、請求項13に記載の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞単離に関する。より具体的には、本発明は、細胞の回収および単離の非侵襲的方法に関する。

【背景技術】

【0002】

人口統計の変化、環境毒素への暴露の増加、および生殖過程への介入により、発生異常が増加しているかもしれないと考えられている。妊娠したカップルが染色体異常または構造的欠損を有する乳児を生産するリスクは3%～5%と以前見積もられた。この相当なリスクのため、ここ数十年間、妊娠期間の初期において染色体異常および遺伝性障害の危険性がある妊娠を同定するための多くの努力が費やされてきた。現在の標準治療は、母体の分析物および超音波マーカーを、それぞれ単独でまたは組み合わせでスクリーニングして、危険性のある妊娠を同定し、その後、羊水穿刺および絨毛採取を含む確定的診断検査に委託することを含む。前者のスクリーニング様式は偽陽性および偽陰性の率が相当高い一方、後者の診断検査は侵襲性であり胎児を損ない得るかなりのリスクを伴う。事実、Mujezino vicらは、45件の調査の体系的分析を行い、羊水穿刺については1.9%、絨毛採取については2%の胎児損失率を報告している。従って、胎児から遺伝物質を得るためのより安全な方法を開発するための探求が進行中であり、かつ切に求められている。

40

50

【0003】

出生前診断のためのもう一つの選択肢は、着床前遺伝子診断 (preimplantation genetic diagnosis : PGD) であり、これは、着床前の胚において染色体異常または個々の遺伝子障害についてスクリーニングすることを含む。その主要な利点は、随意妊娠中絶を回避しながら、胎児が特定の障害を有さないという高い可能性を提供することである。PGDは出生前診断のための魅力的な方法であるが、それは体外受精を要する生殖補助医療に付属するものであり、生殖補助医療自体もリスクと高い費用とを有する。従って、PGDは一般集団における遺伝的異常に関する普遍的診断ツールとしては不適である。

【0004】

母体血清中に胎児細胞を同定することが試みられてきたが、このアプローチは、母体血液中における胎児細胞は比較的稀少であること ($10^6 \sim 10^7$ 個の母体細胞当たり1個の胎児細胞)、ならびにそれらの単離および分析における付随的困難によって妨げられてきた。全般的に、その臨床的有効性を見通しは期待外れなものであった。それでも、最近における母体血漿中の胎児核酸の発見は、染色体異数性の非侵襲的出生前スクリーニングのいくつかの新たな可能性をもたらした。ヒトゲノムのコーディング領域における一塩基多型のアリール比を測定すること、胎児DNAと母体DNAとの間でDNAメチル化パターンが異なるDNA断片を分析すること、物理的または化学的方法を用いて母体血漿中の胎児DNAの画分濃度を濃化すること、および、胎児核酸分析のためのより正確なデジタルポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction : PCR) ベースの方法を開発することにより、妊娠の最初の10週間経過後に異常が明らかにされるようになった。特定の遺伝性疾患も胎児DNAを用いて診断できるが、循環する無細胞胎児DNAの断片化された性質のため、母体血漿スクリーニングは信頼性のあるアプローチとは考えられていない。

【0005】

妊娠13~15週間の前に、小さな領域の浸食によって栄養膜細胞 (trophoblast cells) が被包脱落膜を通過して子宮腔に達することが可能になると考えられている。この過程は、羊膜絨毛膜による子宮腔および内子宮口 (internal cervical os) の封鎖 (妊娠3ヶ月の時点で起こると考えられている) の後にはより可能性が低くなる。1971年にShettlesは、妊娠初期の際に子宮腔内への同様の脱離が起こって、退化する絨毛からの絨毛膜性細胞要素が子宮頸管中に見られるようになることを示唆していた。生殖器系のアクセス可能な領域から胎児細胞を捕えるという可能性は、初期出生前診断のための新たなアプローチを示唆するものである。子宮頸部および子宮内膜腔からの胎児細胞の単離は、非常に初期 (第6~14週、場合によっては第5週もあり得る) の診断のための魅力的な非侵襲性の選択肢を提供する。最初に記述されたとき以来、幾人かの研究者が、頸管粘液からあるいは子宮内膜腔の洗浄によって得られる液から胎児細胞を単離することの実行可能性を、様々な成功度において報告している。現在ある文献によれば、出生前診断における経子宮頸部細胞 (transcervical cell : TCC) 検体採取の現状は実験的段階にあるが、実験手法が洗練され標準化されるなか、遺伝学的診断および妊娠結果予測の両方に関して卓越した可能性を有していることが示唆されている。

【0006】

胎児細胞を感知できる量において確実に収穫する理想的な方法は、進行中の妊娠にネガティブな影響を有さず、感染性や外傷性の合併症を伴わないものであるべきである。また、簡便に実施され費用効率が良く、観察者間変動が最小限であるべきである。子宮頸管および子宮内膜腔からTCC検体を回収するための多数の技術が開発されており、これらには、綿スワブまたはサイトブラシ (cytobrush) を用いて得られるスメア、カテーテルを用いた頸管粘液の吸引、ピペル (Pipelle) を用いた子宮内膜生検、および子宮頸管または子宮腔の洗浄が含まれ、これらは全て成功の度合いがまちまちである。

【0007】

目下、胎児細胞を回収するために現在利用可能な方法の相対的な有効性を見通しにおいて、既存の文献は大きな差があり、しばしば相反している。以前には、最近報告されているようなランダム化比較試験において様々な方法の相対的な有効性を直接比較することより

10

20

30

40

50

もむしろ、胎児細胞を取得してそれらの診断的有用性を確立することの実現可能性の方に重点が置かれていた。TCC検体の回収後処理が個々の研究ごとに大きく異なっており、このことが有用な情報の収量に直接影響していることが指摘されている。胎児細胞を同定するために使用される技術および診断的エンドポイント（胎児の性別あるいは遺伝子障害）も異なっており、比較に関して異質である群を生じて不均一な結果をもたらしている。従って、よく記述されている検体の採取および分析のための技術について情報の欠如が存在し、個々の操作者の技術と技量とにかなり依存するという結果となっている。

【0008】

例えば、Shettlesによる1971年の画期的な報告においては、綿スワブを用いて得られた中頸部粘液試料から胎児の性別を決定するために、Y染色体の同定が用いられた。TCC検体を回収するために綿スワブを使用することにおける1つの制約は、綿の中に細胞が捕捉されてしまうことであり、これが収率を低下させ得る。子宮頸管粘液回収のためのサイトブラシの使用、または標準生理食塩水を用いた子宮頸管の洗浄は、TCC採取のための実行可能な代替選択肢を提供する。サイトブラシを外子宮口を通して最大深度2 cmまで挿入して、引き出す際に少なくとも1回転させると、診断に適する量の胎児細胞が提供される。しかしながら、この成功を再現できない研究者もいる。単一カニューレを用いた子宮頸管内粘液の吸引も、男性胎児を有する母親由来のTCC試料の最大70%において胎児細胞の検出をもたらした。さらに、Kingdomらは、子宮頸管の洗浄はサイトブラシよりも多くの栄養膜細胞を回収すること、ならびに、サイトブラシ試料は組織細片化および母体由来子宮頸管細胞の頻度がより高くなり得ることを実証した。胎児細胞収率という点でより効果的な方法は子宮内洗浄（intrauterine lavage：IUL）であり、これは、標準生理食塩水で充填された注射器につながれた柔軟性のカテーテルを使用して子宮内腔を洗い流すものである。IULその他のTCC検体採取法はAdinolfiとSherlockによる論文において説明されている。

【0009】

ヒト白血球抗原（HLA）-Gは、クラスIb主要組織適合遺伝子複合体タンパク質であり、ヒトの絨毛外栄養膜細胞層の細胞によって発現され、その他全ての子宮および胎盤の細胞群においては不在である。2003年にBulmerらは、HLA-Gに対するモノクローナル抗体（MAb）を使用して、IULにより回収されたTCC試料中に栄養膜細胞層細胞を同定した。大きくて不規則な過染色性核により特徴付けられる栄養膜細胞層細胞はHLA-G陽性であり、23例のTCC検体のうち12例（52%）において同定された。興味深いことに、患者のうちの4人からレーザーキャプチャーマイクロ切除法により採取されたHLA-G陽性の要素におけるQF-PCRによるDNAの分子的検査は胎児マーカーの存在を明らかにし、出生前遺伝子診断のためのこのアプローチの有用性が実証された。この研究で使用された免疫組織化学的および分子学的アプローチのこの組合せにより、検体間でかなりの変動があることが明らかになった。HLA-Gの反応性は胎児由来栄養膜細胞の同定に関して高い特異性を提供するものの、MAb標識の感度は比較的低かった。HLA-Gは絨毛外栄養膜細胞層細胞要素により発現されるが、合胞体性断片によっては発現されず、全ての胎児細胞を同定する能力が制限されている。胎児細胞を包括的に同定する免疫組織化学的アプローチのためには、栄養膜細胞の特定の亜集団において発現される抗原を専ら標的として反応する一群のMAbの必要性が決定的に重要となるであろう。より最近になって、サイトブラシによって固定液洗浄液中に採取され、邪魔になる粘液を伴わずに顕微鏡スライドガラス上に調製されたTCC検体において、HLA-Gを抗原マーカーとして使用して絨毛外栄養膜細胞層細胞を確実に（95%超の検体において）同定できることが実証された。Bulmerらによって使用されたものと同じ抗HLA-G抗体を用いて染色されヘマトキシリンで対比染色されたスライドガラスは、高密度の子宮頸部細胞核のバックグラウンド上に少数の抗体標識された栄養膜細胞層細胞を顕出させた。妊娠6～14週間のあいだに採取が成功した全ての妊娠について、栄養膜細胞の頻度は約2000個当たり1個であり、子宮外妊娠または枯死卵を有する女性から採取された検体においてはこの値は4～5倍低くなった。これらの発見は、遺伝学的検査に加えてTCC分析からも情報を収集して、危険性のある妊娠に対して臨床医の注意を喚起することができることを示唆している。

10

20

30

40

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0010】**

胎盤から子宮頸管中に脱離した胎児細胞を回収し分析することは、一般患者群に出生前遺伝子診断のより広い利用可能性を提供し得る。サイトブラシを用いたTCC検体採取による栄養膜回収の有効性および安全性における改善、ならびに、栄養膜マーカーを発現する細胞の同定および単離における改善により、少量の胎児DNAを遺伝学的検査のために容易に得ることができる。母体血清中の胎児DNAの分析のために現在開発されているもののような新しい高感度技術は、それほど多くない数の単離細胞から胎児ゲノムについての詳細な情報を得ることができる。早ければ妊娠6週間の時点からTCCにより栄養膜細胞層細胞を取得する能力は、この重要な情報を現在の技術（母体血清中の胎児DNAの分析を含む）よりもはるかに早く入手可能にし得る。従って、単離栄養膜のための非侵襲的方法を開発することは有益となる。

10

【課題を解決するための手段】**【0011】**

本発明により、子宮頸管内試料における胎児細胞と母体細胞とを分離して、分離された胎児細胞を子宮頸管内試料中の他の細胞から単離することによって、子宮頸管内試料から粘液を除去することにより子宮頸管内試料から胎児細胞を回収する方法が提供される。上記方法により調製された分離細胞の混合物を得て、その細胞を胎児特異的抗体で処理し、その胎児特異的抗体に結合した細胞を同定し、その同定された細胞を単離することによって、子宮頸管内試料から胎児細胞を回収する方法も提供される。

20

【0012】

上記方法により調製された分離細胞は様々な用途のために分析し使用することができ、その用途としては、子宮頸部細胞の中から胎児細胞を同定すること、高リスク妊娠を予測するために胎児細胞の密度を決定すること、胎児細胞を遺伝学的に分析すること、および産科学的障害（妊娠高血圧腎症を含む）を予測するために成長因子その他のバイオマーカーの発現を決定することが挙げられるが、これらに限定されない。

【0013】

本発明のその他の有利な点は、以下の詳細な説明を添付の図面と関連付けながら参照することによってよりよく理解され、容易に認識されるであろう。

30

【図面の簡単な説明】**【0014】**

【図1】図1は、-hCGを発現するTCSから単離された細胞を示す。各視野はDAPI核染色（左）または二次抗体（右）の蛍光を示すように画像化された。対になったDAPI画像とhCG画像における矢印により示されているように、結合画分中の細胞はすべて抗-hCGにより標識された一方、非結合細胞はいずれも標識されなかった。未免疫IgGで標識した結合細胞も蛍光を発しておらず、非特異的結合の低さを示している。

【0015】

【図2】図2は、単離された栄養膜細胞を用いた性別決定を示す。表示されているように、包皮線維芽（Fb）細胞、個別の固定されたFb細胞、または10個の個別の単離栄養膜細胞からの単離DNAを使用して、SRY用のプライマーのみ、DMD用のプライマーのみ、またはマルチプレックスアッセイで両方の遺伝子のプライマーを用いて行った、X染色体上（DMD）およびY染色体上（SRY）の遺伝子のPCR分析。上のゲルの患者の胎児は男性と見られる一方、下のゲルは女性の胎児を示している。下側の試料における反応のいくつかは不成功であったと見られるが、これはPCRチューブへ移す際に細胞が失われたためである可能性が高い。

40

【発明を実施するための形態】**【0016】**

本発明は、出生前診断を行うために妊娠第一期において子宮頸部または子宮腔からひとまとめ（en masse）に得られる胎児性物質を取得し使用するための方法を提供する。本方

50

法は、試料の粘液から胎児細胞と母体細胞とを分離すること、および分離された胎児細胞を子宮頸管内試料中の他の細胞から単離することを含む。さらに、本発明の方法は、EVT細胞の非侵襲的取得を可能にし、タンパク質発現レベルを妊娠結果と比較することを可能とする。これらの発見は、妊娠第一期および第二期のあいだにPEもしくはIUGRまたはその他の産科学的障害に関する患者リスクについて情報を提供し得る、信頼性のあるEVTバイオマーカー群を同定した。本発明の方法は、臨床検査サービスとして使用され得る。本方法は、細胞を回収する工程、回収された細胞を固定液中に置く工程、酸性化により粘液を除去する工程、遠心分離により残余細胞を洗浄する工程、および細胞を顕微鏡スライドガラス上に調製する工程を含む。

【0017】

検体は、当業者に知られる標準的な非侵襲的方法を使用して得ることができる。例としては、子宮内洗浄、頸管粘液の吸引、または子宮口もしくは子宮頸管からの表面組織の除去が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい方法は、外子宮口を約2 cm過ぎるまで挿入された細胞学用ブラシを使用して回転させて、頸部組織の削剥を最小限にしながら粘液栓を除去・捕獲して、子宮頸管から粘液を回収するものである。その後その細胞学用ブラシは、低pH(4~6)緩衝液とアルコールとから構成される固定液中でリンスされる。例えば、標準的な3%酢酸・7%酢酸ナトリウム・50%メタノールの混合物を使用することができる。臨床医は、妊娠が判明してまだ妊娠第一期または第二期にある女性からThinPrep(登録商標)キットを用いて検体を回収するよう指示され得る。このキットは細胞学用ブラシを含有し20 mlの固定液を含む。

【0018】

回収された細胞は酸性化によって粘液から単離される。酸性化は当業者に知られる方法を用いて達成できる。例えば、細胞を含む固定液に酢酸の3%溶液を加えてpHを2~4に低下させることができ、これはこの酢酸溶液を固定液中で10~20倍に希釈することに相当する。

【0019】

いったん検体が得られれば、採取試料中の胎児細胞、あるいは免疫細胞サブタイプのような臨床的に重要なその他の細胞種を、単離し同定することができる。これは当業者に知られる方法を用いて達成することができ、そのような方法としては、男性Y染色体の存在を示す証拠の使用、母体の対立遺伝子プロファイルとの対立遺伝子プロファイル比較の使用、および、栄養膜マーカー分子(例えば、サイトケラチン7、hCG、HLA-G、胎盤アルカリホスファターゼ、モノクローナル抗体NDOG1の標的であるヒアルロン酸、およびモノクローナル抗体FT141.1(FT1.41.1ともいう)の未知標的)の発現の使用が挙げられるが、これらに限定されない。ほとんどの場合、胎児細胞の分析は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による遺伝学的診断が関与する。これらの方法を使用して、ThinPrep(登録商標)キットを用いて回収された細胞に対して実施される検査に基づいて妊娠結果を予測することができる。

【0020】

頸管粘液栓中に沈着した胎児細胞を採取することの主な不利点は、そこには胎児細胞よりはるかに多い母体細胞が存在すること、および、細胞の凝集と粘液のバックグラウンド蛍光のために、粘液が多くの検査を妨害することである。上記第1の問題は、栄養膜細胞に対する信頼性の高い蛍光マーカーを使用して対処される。マーカーとしてのHLA-Gの制約は、すべての栄養膜細胞亜群を認識するわけではないことである(例えば合胞体性栄養膜断片)。サイトケラチンはすべての栄養膜細胞亜群によって発現されるが、いくつかの母体細胞種にも見出され得るので偽陽性をもたらす。上記粘液の問題は、酸性化によって粘液を溶解することによって解決された。試料中に存在する栄養膜細胞の数は、変動することがあり、方法を制限し得る。その数が少なすぎるとフローサイトメトリーは実用的でなくなる。しかしながら、最大1 mlまでの試料から調製された顕微鏡一視野中に数個のHLA-G陽性細胞が見出される限り、免疫蛍光顕微鏡法が実行可能なアプローチとなる。

【0021】

胎盤から子宮頸部管に脱離した胎児細胞を回収し分析することは、一般患者群に出生前遺伝学的診断のより広い利用可能性を提供する。サイトブラシを用いたTCC検体採取による栄養膜回収の有効性および安全性の改善、ならびに栄養膜マーカーを発現する細胞の同定および単離における改善により、少量の胎児DNAを遺伝学的検査のために容易に得ることができる。母体血清中の胎児DNAの分析のために現在開発されているもののような新しい高感度技術は、それほど多くない数の単離細胞から、胎児ゲノムについて詳細な情報を得ることができる。早ければ妊娠6週間の時点からTCCにより栄養膜細胞層細胞を取得する能力は、この重要な情報を現在の技術（母体血清中の胎児DNAの分析を含む）よりもはるかに早く入手可能にし得る。今後2、3年間で、染色体異常の出生前診断、父子鑑定、妊娠第一期における異常妊娠のスクリーニング、および産科学的問題の初期診断のためにTCC

10

【0022】

さらに、全妊娠の約1~2%において子宮外妊娠が問題となるが、子宮外妊娠は、発達中の胚盤胞が子宮腔の底以外の部位（最も一般的には卵管）に着床する場合に起こる。この異常の臨床診断が遅れると母体に深刻な結果をもたらされ得る。妊娠第一期のあいだにおける頸部管中の胎児栄養膜細胞の存在は、経子宮頸部検体採取を通じた異常妊娠予測のための非侵襲的アプローチを提供する。

【0023】

本実施態様においては、市販されているキット（ThinPrep（登録商標）、ホロジック社、マサチューセッツ州マールボロー）を使用して、妊娠第一期において子宮頸部から細胞が採取される。PAPスメアテストは妊娠中にルーチンの推奨されるのであるから、これは侵襲性が最小限のものである。ThinPrep（登録商標）キットを使用する場合、製造会社の説明通り、提供されるサイトブラシを用いて内子宮口と外子宮口の間の子宮頸部から粘液および細胞性物質が回収される。回収された細胞は、製造会社によってバイアル中に提供されるPreservCyt（登録商標）輸送媒体中へとリンスされる。PreservCyt（登録商標）輸送媒体はメタノール・酢酸ベースの固定液を含む。検体は分析時まで室温または冷蔵下で保存される。

20

【0024】

スライドガラス調製物は、検体をまず酸性化して粘液を溶解して、捉われていた細胞を免疫組織化学染色のために解き放つことによって作成され得る。この検体をその後、顕微鏡用スライドガラスに固定されたシャンドンEZメガファンネルに入れて、Cytospin3遠心分離機中で遠心分離する。この手順は、スライドガラス上の一定領域内に均一に分散されて邪魔な粘液を伴っていない細胞を生ずる。あるいは、細胞学スライドガラス調製用の自動処理機を使用し得る。ThinPrep2000（ホロジック社）が一例である。

30

【0025】

それからその細胞をHLA-G（胎児栄養膜細胞によってのみ発現される主要組織適合性タンパク質）に対する抗体で染色する。他の栄養膜マーカーを使用することもでき、例として絨毛性ゴナドトロピンのサブユニット（ β -CG）、または胎盤性ラクトゲン（PL）等が挙げられるが、特異性が低いもの（例えばサイトケラチン7）もある。免疫蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーを使用して、蛍光標識された栄養膜細胞を同定する。適切な抗体および異なる蛍光標識を有する二次抗体を使用して（二重標識）、HLA-G陽性細胞において意図するタンパク質を探知することができる。あるいは、HLA-G陽性細胞の遺伝学的分析のためにFISH手順を使用することができ、例えば、Y染色体の存在のように胎児細胞を同定する必要がある場合には、染色体数や特定の遺伝子配列を検出したりするためにFISHを使用し得る。しかしながら、女性胎児については異なった戦略が必要となる。明視野顕微鏡によって可視化され得る、HLA-G同定用の酵素結合二次抗体を（例えばペルオキシダーゼ標識についてはジアミノベンジジン基質とともに）使用することができ、PCRによる遺伝学的分析のために意図する細胞をレーザーキャプチャーマイクロ切除法により単離できることが実証されている（Imudia et al., 2009）。

40

50

【0026】

高血圧性障害である子癇前症を有する女性由来の胎盤は、いくつかのタンパク質（上皮増殖因子 [EGF]、形質転換増殖因子α [TGFA]、ヘパリン結合性EGF様増殖因子 [HBEGF]）の発現が改変していることが発見された。従って、蛍光二重標識法を使用して、何らかの臨床症状が現れる何か月も前の妊娠第一期のあいだに、子宮頸部採取物から単離された栄養膜細胞中のこれらのタンパク質の発現をスクリーニングすることができる。従ってこの方法は、より後の妊娠期において子癇前症を発症するリスクを有する女性を同定するための診断ツールを提供し得る。

【0027】

現在、胎児染色体異常の出生前診断のためには絨毛採取 (chorionic villous sampling : CVS) または羊水穿刺が使用され得る。どちらの方法も侵襲性であり、妊娠喪失の潜在的可能性を伴う。CVSは10週間を経過しなければ実施することができず、羊水穿刺は妊娠14週間を経過した後に行わなければならない。妊娠第二期が始まった後に妊娠中絶を行うことははるかに望ましくない。本発明の方法は、妊娠第一期の始めにおいて、かつ非侵襲的な様式で、検査を行うことを可能にする。

【0028】

別の実施態様において、本方法は、産科学的障害を示すバイオマーカーの発現を検査するために使用され得る。これらバイオマーカーは、成長ホルモン、タンパク質、およびRNAを含み得る。例として、本方法は、蛍光抗体で細胞を二重標識してEGF、TGFA、またはHBEGFが栄養膜細胞において低減しているか否かを決定することによってタンパク質発現を検査するために使用され得る。これらの変化は、子癇前症を有する女性からの分娩で得られた胎盤の栄養膜細胞において観察されてきた。すべての妊娠女性の5%が最終的に子癇前症を発症するので、これは妊娠検査陽性時にルーチン的に実施するべき有益な検査となる。この障害のリスクがあることが見出された女性には、臨床症状が最初に現れるよりはるか前に、高血圧の発生を避けるための予防措置をとるよう指示できる。

【0029】

別の実施態様において、本方法は、経子宮頸部栄養膜細胞の遺伝学的分析を行うことを含み得る。栄養膜DNAは、(1) 抗HLA-G標識細胞の（あるいは、子宮頸部に常在する母体細胞から栄養膜細胞を区別するその他の抗体を使用した）レーザーキャプチャー顕微鏡法により、または、(2) 抗HLA-G親和性磁気ビーズ/ナノ粒子を用いて、栄養膜細胞を単離することにより得ることができる。その後、様々な全細胞的アプローチにより、遺伝学的、免疫学的、またはその他の生化学的分析を実施することができる。例えば、逆転写有リまたは無しによるPCR、免疫組織化学、全ゲノム増幅 (whole genome amplification : WGA) 後の比較ゲノムハイブリダイゼーションまたは塩基配列決定、代謝物アッセイ、小化合物アッセイその他の試験が適合可能となる。あるいは、デジタルPCRアプローチを使用して、未分画の経子宮頸部試料において胎児および母体のDNAを評価し得る。

【0030】

遺伝学的分析は、例えば、FISH、塩基配列決定、またはPCRに基づく方法を含み得る。あるいは、意図する細胞を濃化させて分析を能率化するための手段として、免疫蛍光法の前に磁気ビーズを使用することもできる。二次抗体が結合している、または抗HLA-Gを結合させるために使用し得る化学カップリング基を有する、DynaI磁気ビーズは、インビトロジェン社（カリフォルニア州カールスバード）から入手できる。これらは酸性化および中和の後の細胞と混合されて、標的細胞（栄養膜細胞）をデコレートする。磁石を試験チューブに対して保持するか、またはチューブをDynaMag（商標）スピンマグネット（ライフテクノロジーズ社）のような装置に5分間挿入して、浮遊細胞を吸引すると、ビーズで被覆された磁石結合細胞があとに残る。3回の洗浄を経て、約1,000~10,000倍に濃化することが可能であり、これは栄養膜細胞のほとんどを単離するために十分なはずである。その細胞を顕微鏡で調べてビーズの存在を確認し、試料に混入した無ビーズの細胞を手作業で除去し得る。その後、本明細書においてより詳細に記述するようにさらなる検査を実施し得る。

10

20

30

40

50

【0031】

別の実施態様では、胎児栄養膜細胞は、遺伝学的または生化学的検査に使用することができるように、回収後に、常在する母体細胞から単離され得る。この目的のために、抗HLA-G抗体に栄養膜細胞単離用の磁気ナノ粒子をカップリングすることによってこの抗体の特異性を利用する。例えば、本方法は、抗マウスIgGまたはプロテインAにコンジュゲートされ5 μ gのマウスモノクローナル抗HLA-G抗体（クローン4H84、BDバイオサイエンス社、カリフォルニア州サンディエゴ；またはクローンG233、エックスバイオ社、プラハ）と4

にて回転式振盪機上で一晚インキュベートされた250 nmナノ粒子（クレメンテアソーシエーツ社、コネチカット州マディソン）を10 μ l使用し得る。チューブをDynaMag（商標）スピニングマグネット（ライフテクノロジー社）中に5分間置いた後に、磁気ナノ粒子を保持しながら液体を除去することによって、この粒子を未結合抗体から分離する。それから、経子宮頸部試料から回収された細胞をこのナノ粒子に添加し、4 の回転式振盪機上で1~24時間室温でインキュベートする。試料を磁化して未結合細胞を除去する。3回の洗浄後、保持された細胞を回収する。免疫磁氣的に単離された細胞を、栄養膜細胞を同定するための抗 hCGを用いた免疫蛍光顕微鏡法によって分析すると、単離細胞の95~100%が標識され、磁化の際に除去された枯渇細胞は染色されていないことが明らかとなる（表1）。

この方法論を使用して実施された1つの試験では、各患者検体から約500~2000個の細胞が回収された。栄養膜細胞を母体子宮頸部細胞から区別する抗体への結合に基づいて栄養膜細胞を単離するこのアプローチは、他のテクノロジーと共に使用することもできる。例えば、抗体にコンジュゲートされた磁気または蛍光マーカーに基づいて細胞を選別するためのマイクロ流体デバイスが構築され得る。

10

20

【0032】

免疫磁氣的単離後の -hCG発現細胞が高純度であったことに加えて、未結合画分中の細胞は抗 -hCGで標識されず、また、結合細胞も未免疫対照IgGでは標識されなかった（図1）。

【0033】

上述したように、本方法は、胎児または胎盤についての情報を得るための生化学的または遺伝学的検査のために、単離細胞を使用する。単離された細胞は、マルチウェルプレート（例えばテラサキマルチウェルプレート）中に分散させることおよびストリッパーマイクロピペッター（オリジオミッドアトランティックデバイス社、ニュージャージー州マウントローレル）を用いて選別することによって、試験のための個別または少数群の細胞に分別される。試験群においては、50細胞の群が、200 μ lのPBS中に懸濁され、シャンドン・サイトスピン3細胞遠心分離機を5分間1500 RPMで利用してスライドガラス上へと遠心分離される。これらの胎児細胞は、免疫蛍光顕微鏡によるタンパク質発現の解析、またはFISHによる分子的解析のために使用され得る。例えば、細胞は、栄養膜特異的タンパク質または様々な栄養膜細胞亜群によって発現されるタンパク質を認識する抗体を用いて標識された。その結果は、単離された細胞が、絨毛膜絨毛由来ではなく、深く浸潤してきた絨毛外栄養膜細胞であることを示していた（表2）。これは、胎盤の基底部において浸潤する栄養膜細胞が子宮頸部に至るまで移動し、そこで経子宮頸部検体採取により回収されることを示している。これは検査プロトコルのさらなる開発のために有益となり得、妊娠期間中に得ることができる情報の量を増加させる。同様のアプローチを臨床的に使用して、胎児の障害または母体の産科学的障害のタンパク質バイオマーカーに関して単離細胞をスクリーニングすることができる。

30

40

【0034】

あるいは、体外受精（in vitro fertilization：IVF）によって生じた着床前胚から生検採取された細胞の遺伝学的分析のために使用される単一細胞的方法から借用される方法を使用して、細胞を選別または同定し、分子生物学的分析のために単離することができる。単離された栄養膜細胞（最大100個）はストリッパーマイクロピペッターを用いて一つの細胞として選別することができ、これらの細胞は、2~6 μ lのRNaseフリー水を含む薄壁PCRチューブ中に個別に入れられ-80 で凍結される。これらの細胞は、PCRやWGAのよ

50

うな増幅方法を使用してそのRNAまたはDNAをプローブする試験のために使用され得る。RNA試験のためには、固定された細胞を固定液から取り出した後にRNAを安定化させることが必要である。従って、PBS中における最初の細胞洗浄、HLA-G結合ナノ粒子とともにするインキュベーション、および細胞の分注操作はすべて、RNA分解を防ぐために20 mMのリボヌクレオシド・バナジル複合体（ニューイングランドバイオラボ社）で補足されたPBSを使用して行われる。RNA精製のために細胞を直ちに溶解し、カオトロピック溶解溶液中で-80

で保存するかまたはcDNAに変換してから保存するべきである。単一または少数の細胞のためにスケールダウンされたタンパク質分析を行うことも可能である（例えばELISAあるいは質量分析）。WGAの後、DNA（5～50マイクログラム）をマイクロアレイまたはディープシーケンシングのアプローチに使用して、遺伝子突然変異についてスキャンし、染色体数異常（異数性）を同定し、または個人化医療のために全ゲノム配列を得ることができる。品質保証コントロールとして、親の多型との比較のために遺伝子多型を評価して、増幅されたDNAが胎児由来のものであって親由来のものではないことを確認することができる。

10

【0035】

別の実施態様では、キット中の保存剤を使用して、最初に固定をせずに経子宮頸部試料から胎児細胞を単離し得る。これは、細胞のより優れた回収、および安定性の劣る細胞成分（例えば代謝物、RNA）のより正確な分析、ならびに、胎児DNAを増量させて得たり核型分析用の分裂中期細胞を生じさせたりするために細胞を増殖させる能力を可能とする。

【0036】

20

単離は、サイトブラシ（本明細書で詳細に記述するように使用される）を、10%ウシ胎仔血清および50 μ g/ml ゲンタマイシンを含有する氷冷RPMI 1640組織培養培地、または同様な他の培地と抗生物質の組合せ中でリンスすることによって行うことができる。検体は迅速に実験室にもたらされ、遠心分離および4 時間の無菌PBS中の再懸濁によって3回洗浄され得る。その後、マウス抗HLA-Gに結合した抗マウスIgGコンジュゲート磁気ナノ粒子を細胞と混ぜ、4 時間で1時間インキュベートした。胎児細胞は、DynaMagスピンマグネット（ライフテクノロジー社）中で4 時間インキュベートして未結合細胞を除去することにより回収された。この工程をさらに2回繰り返す、結合細胞を100 μ lの氷冷PBS中に回収した。

【0037】

30

単離された胎児細胞は、標準的な栄養膜細胞培養培地中で培養するか（Kilburn et al., 2000）、または免疫組織化学のために固定した。培養された細胞は2～3日中に小さなコロニーを形成し、増殖していることが示された。固定された細胞は、hCGのベータサブユニットまたはBCL-2に対する抗体で標識した後、蛍光二次抗体で標識した。すべての単離細胞は両抗体による標識について陽性であり、これらの細胞は確かに栄養膜細胞であってアポトーシス性ではないことが示された。

【0038】

上記で概略を述べた有益性に加えて、一細胞アプローチの1つの有益性は、偽性の結果の可能性をほぼゼロまで低減させ得ることである。エラーの主な原因は、単離栄養膜細胞に母体細胞が混入することである。全般的に、5%を超える母体細胞の混入は見られていない。X染色体（DMD）およびY染色体（SRY）上の遺伝子由来する配列のマルチプレックス増幅のために、反復（複製）的な個別栄養膜細胞のアッセイを使用し、対応する胎児の性別を決定した。細胞が存在しておりPCRがはたらいているのであれば、全ての反応がXについての産物を生じるはずであるが、Y増幅物を生じるのは男性細胞だけであろう。従って、アガロースゲル電気泳動によるPCR産物の分析は、細胞が女性である場合は1つのバンドを生じ、男性である場合は2つのバンドを生じるはずである。各検体から10個ずつの細胞を分析し、全て1つのバンドを生じるか（女性胎児）または全て2重のバンドを生じるかのいずれかであった（図2）。男性試料に偶発する単一バンドは混入した母体細胞であると推定されるが、発明者らがこの方法で分析した18人の患者においてその例は見られなかった（表3）。女性試料における母体細胞は区別することができない。男性試料において単

40

50

ーバンドを生じた細胞がなかったことによって栄養膜細胞の純度の高さが明らかにされている。偽性の診断が生じるためには、すべての細胞が母体由来でなければならない。女性胎児の場合にはそれでも女性という診断となり正しい診断となる。男性胎児の場合には、1つでも胎児細胞があれば2重バンドを生じて、胎児がおそらく女性ではないということが示される。その後試験を繰り返すか試料をさらに調べることができる。全ての複製実験が母体細胞となる確率は、複製実験の数とともに指数関数的に減少し、単離された細胞は95%栄養膜細胞を含むと仮定すると、3つの複製実験だけでその確率は8,000分の1までに下がる。単離された細胞が90%しか栄養膜細胞を含まない場合でも、4つの複製実験でその保証レベルに達する。90%の純度において、偽性結果の確率(P)は、1つ(N)の複製実験で0.1であり、追加の単一細胞複製実験1つごとに10倍減少する($P = 10^{-N}$)。

10

【0039】

上記の考察は、本明細書に記載される方法および使用についての事実的根拠を提供する。本発明とともに使用される方法および本発明の有用性は、以下の非限定的実施例により示され得る。

【実施例】

【0040】

[実施例1]

材料と方法：

正常な子宮内妊娠(intrauterine pregnancy : IUP、n=37)、子宮外妊娠(ectopic pregnancy : EP、n=10)、または枯死卵(blighted ovum : BO、n=5)を有して初期妊婦ケアのために来院した18~40歳の患者が、細胞学用ブラシおよびThinPrep(登録商標)キット(ホロジック社)を使用した経子宮頸部検体採取に参加した。PreservCyt(登録商標)固定液中に回収された細胞は、酸性化により粘液が除去され、遠心分離により洗浄され、Cyto spin3遠心分離機を使用して顕微鏡スライドガラス上にアリコートが調製された。スライドガラスは、栄養膜細胞により特異的に発現されるMHC抗原であるHLA-Gを認識するモノクローナル抗体G233で標識された。各スライドガラス上の全てのHLA-G陽性細胞を同定してカウントした。ヘマトキシリンでの染色後、各スライドガラス上の細胞の総数を決定し、全細胞に対するHLA-G陽性細胞の比率を計算した。一元配置ANOVA、ステューデント・ニューマン・コイルスのポストホック検定、および受信者動作特性(receiver operating characteristic : ROC)解析を使用してデータを比較した。

20

30

【0041】

結果：

正常IUP、EP、およびBOの平均妊娠期間はそれぞれ9、8、および10週間であった。栄養膜細胞は、37例の正常IUP検体中35例、10例のEP検体中6例、5例のBO検体中4例において観察された。IUP子宮頸部試料中のHLA-G陽性細胞の頻度はほぼ2000個に1個であり、これはEPまたはBOの患者からの試料における平均頻度よりも5~10倍高かった($p < 0.001$)。後者の2つの群には有意な差がなかった。有意なことに、ROC解析は、93%の感度および95%の特異度においてEPおよびBOの妊娠が正常妊娠から区別可能であることを示した。

【0042】

結論：

HLA-Gについての免疫組織化学染色によって、妊娠第一期における子宮頸部細胞の中から栄養膜細胞を確実に同定することができる。異常妊娠は、栄養膜細胞の存在量に基づいて予測可能である。

40

【0043】

[実施例2]

子癇前症(Preeclampsia : PE)および子宮内胎児発育遅延(intrauterine growth restriction : IUGR)は、初期検出のための信頼性のある手段が存在しない、一般的な有害妊娠結果である。症状が呈するよりも早い段階で血清タンパク質群を使用してPEまたはIUGRの患者を同定する試みは成果が一貫していない。どちらの障害も、絨毛外栄養膜(extravillous trophoblast : EVT)細胞による子宮脈管構造の再構築における欠陥と関連付けら

50

れている。子宮頸管に存在するEVTは、PAP検査に類似する非侵襲的な手順において捕獲することができ、母体細胞を伴わずに単離され得る。IUGRおよびPEの血清バイオマーカーは、妊娠期間中において、血清中でそのレベルの変化が検出され得るより前の段階で、EVT中において調節不全となる。

【0044】

方法：

妊娠5～20週間の時点でサイトブラシを使用してPAP検体(N=23)を採取した。その後、PEまたはIUGRの診断に関して診療記録を調べた。EVT細胞(500～1500)は、磁気ナノ粒子に結合されたHLA-G抗体を用いて単離した。細胞(約50)は、Cytospin 3遠心分離機を使用してスライドガラスに固定し、抗-hCGを用いて純度についての評価を行い、ガレクチン13(LGALS13、PP13とも呼ばれる)、ガレクチン14(LGALS14)、胎盤増殖因子(PGF)、妊娠関連血漿タンパク質A(PAPPA)、アルファ胎児タンパク質(AFP)、エンドグリン(ENG)、またはfms関連チロシンキナーゼ1(FLT-1)に対する抗体(R&Dシステムズ社)を用いた免疫蛍光により標識した。画像解析により個々の細胞について蛍光強度(Fluorescence intensity: FI)を定量化した。各患者について20個の細胞のFI値を平均し、正常群と有害結果群との間でポストホック・チューキー検定を使用してANOVAによって比較した。

10

【0045】

結果：

9人の患者が最終的にPEまたはIUGRを発生した一方、14人は正常な妊娠を有していた。後にPE/IUGRを生じた妊娠からのEVTにおいては、正常妊娠と比較して、LGALS13、LGALS14、PAPPA、およびPGFの発現がそれぞれ減少していた($p < 0.05$)。PE/IUGRにおいてFLT-1、ENG、およびAFPはそれぞれ増加していた($p < 0.05$)。

20

【0046】

結論：

EVT細胞の非侵襲的獲得のための新規アプローチが、タンパク質発現レベルを妊娠結果と比較することを可能とする。これらの発見は、妊娠第一期および第二期においてPEまたはIUGRに関する患者リスクについて情報を提供し得るEVTバイオマーカーの確固たる一群を同定した。

【0047】

[実施例3]

妊娠5週間の時点で、サイトブラシを使用して子宮頸管から栄養膜細胞を非侵襲的に回収することができる。これらの細胞は、胎児特異的マーカーHLA-Gを使用して母体細胞から分離し得る。

30

【0048】

方法：

妊娠第一期および第二期において妊娠患者から栄養膜細胞を単離した後、HLA-G発現について検体を免疫組織化学により分析した。栄養膜細胞は、カラム不使用の磁気ナノ粒子分離手順を用いて母体細胞から分離した。栄養膜試料の純度は-hCGについて染色することにより算出した。母体細胞DNAおよび胎児細胞DNAの全ゲノム増幅(whole genome amplification: WGA)の後、ポリメラーゼ連鎖反応によって一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)アッセイおよび性別同定を行った。

40

【0049】

結果：

5人の患者の検体から単離された後、母体細胞と胎児細胞とが比較された。栄養膜細胞回収総数の平均は700細胞であり、平均純度は90%超であった。単一細胞または5～100細胞の群のどちらかを使用して、最少でも10 μ gのDNAがWGA後に得られた。SNPアッセイでは、全ての検体において、母体細胞と栄養膜細胞との間で対立遺伝子の差異が示された。性別が同定され、患者記録により確認された。

【0050】

50

結論：

栄養膜細胞は、その高い -hCG発現に基づいて、許容できる純度において子宮頸管から回収し単離し得る。さらに、胎児DNAは母体DNAとは異なっており、無傷の胎児ゲノムの非侵襲性出生前検査のためのプラットフォームとしてのその有用性が示された。

【 0 0 5 1 】

本願の開示は以下の実施形態を含む。

[1]

子宮頸管内試料から胎児細胞を回収する方法であって、

子宮頸管内試料を取得する工程；

前記子宮頸管内試料中の胎児細胞と母体細胞とを分離することによって前記子宮頸管内試料から粘液を除去する工程；および

前記子宮頸管内試料中の他の細胞から分離された胎児細胞を単離する工程を含む方法。

10

[2]

前記単離する工程は、胎児細胞をひとまとめに単離することを含む、[1]に記載の方法。

[3]

前記取得する工程は、子宮内洗浄、頸管粘液の吸引、および子宮頸管からの表面組織の除去から実質的になる群から選択される方法を使用して子宮頸管内試料を取得することを含む、[1]に記載の方法。

20

[4]

前記取得する工程は、前記試料を栄養膜培養培地中で培養することをさらに含む、[1]に記載の方法。

[5]

前記取得する工程は、前記試料を固定液中に置くことをさらに含む、[1]に記載の方法。

[6]

前記単離する工程は、細胞の単離を助けるために前記試料中の細胞を標識することをさらに含む、[1]に記載の方法。

[7]

同定された細胞をレーザーキャプチャー顕微鏡法により単離することをさらに含む、[6]に記載の方法。

30

[8]

前記標識する工程は、免疫磁気標識を使用して前記細胞を標識することを含む、[6]に記載の方法。

[9]

前記除去する工程は、酸性化によって前記子宮頸管内試料から前記粘液を除去することを含む、[1]に記載の方法。

[1 0]

前記試料において単離された細胞を診断目的のために同定することをさらに含む、[1]に記載の方法。

40

[1 1]

前記同定する工程は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、逆転写を伴ったポリメラーゼ連鎖反応、逆転写を伴わないポリメラーゼ連鎖反応、および免疫組織化学的検査から実質的になる群から選択される方法を使用して細胞を分析することを含む、[10]に記載の方法。

[1 2]

同定された細胞を、全ゲノム増幅後のゲノムハイブリダイゼーションまたは配列決定、代謝物アッセイ、および小化合物アッセイから実質的になる群から選択される方法を使用して分析することをさらに含む、[10]に記載の方法。

50

[1 3]

子宮頸管内試料から胎児細胞を回収する方法であって、

[1] に記載の方法を使用して調製された分離細胞の混合物を取得する工程；

前記細胞を胎児特異的抗体で処理する工程；

前記胎児特異的抗体に結合した細胞を同定する工程；および

前記同定された細胞を単離する工程

を含む方法。

[1 4]

子宮頸部細胞中からの胎児細胞の同定、高リスク妊娠を予測するための胎児細胞密度の決定、胎児細胞の遺伝学的分析、ならびに、増殖因子、タンパク質、およびRNAからなる群から選択される産科学的障害のバイオマーカーの測定から実質的になる群から選択されるものにおける、[1] に記載の方法の使用。

10

[1 5]

子宮頸管内試料から胎児細胞を回収する方法であって、

子宮頸管内試料を取得する工程；

胎児細胞を免疫磁氣的に標識して前記子宮頸管内試料中の母体細胞から胎児細胞を分離するために、前記子宮頸管内試料から粘液を除去する工程；および

分離された胎児細胞を前記試料から回収する工程

を含む方法。

本願を通じて、米国特許を含む様々な刊行物が、著者および発行年ならびに特許番号により言及される。これら刊行物の全体引用が包含される。これら刊行物および特許の開示は、その全体が、本発明に係る技術水準をより完全に記述するために参照により本願に組み入れられる。

20

【 0 0 5 2 】

本発明を説明的な様式において記述してきたが、使用された用語は限定的性質ではなく説明的な性質の言葉であることが意図されていることが理解されるべきである。

【 0 0 5 3 】

明らかに、上記の教示を参照すれば、本発明の多くの修正および改変が可能である。従って、添付の特許請求の範囲内において、具体的に記述されたものとは異なった態様で本発明を実施し得ることが理解されるべきである。

30

【 0 0 5 4 】**[参考文献]**

Imudia AN, Kumar S, Diamond MP, Decherney AH, Armant DR. Transcervical retrieval of fetal cells in the practice of modern medicine: a review of the current literature and future direction. *Fertil. Steril.* 2010; 93: 1725-1730.

Imudia AN, Suzuki Y, Kilburn BA, Yelian FD, Diamond MP, Romero R, Armant DR. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study. *Hum. Reprod.* 2009; 24: 2086-2092.

Orr JW, Jr., Barrett JM, Orr PF, Holloway RW, Holimon JL. The efficacy and safety of the cytobrush during pregnancy. *Gynecol. Oncol.* 1992; 44: 260-262.

40

Rivlin ME, Woodliff JM, Bowlin RB, Moore JL, Jr., Martin RW, Grossman JH, 3rd, Morrison JC. Comparison of cytobrush and cotton swab for Papanicolaou smears in pregnancy. *J. Reprod. Med.* 1993; 38: 147-150.

Paraiso MF, Brady K, Helmchen R, Roat TW. Evaluation of the endocervical Cytobrush and Cervex-Brush in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 1994; 84: 539-543.

Foster JC, Smith HL. Use of the Cytobrush for Papanicolaou smear screens in pregnant women. *J. Nurse. Midwifery* 1996; 41: 211-217.

Holt J, Stiltner L, Jamieson B, Fashner J. Clinical inquiries. Should a nylon brush be used for Pap smears from pregnant women? *J. Fam. Pract.* 2005; 54: 463-46

50

4.

O'Leary P, Breheny N, Dickinson JE, Bower C, Goldblatt J, Hewitt B, Murch A, Stock R. First-trimester combined screening for Down syndrome and other fetal anomalies. *Obstet. Gynecol.* 2006; 107: 869-876.

Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic techniques. *Semin. Perinatol.* 2005; 29: 401-404.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature (London)* 1990; 344: 768-770.

Munne S, Howles CM, Wells D. The role of preimplantation genetic diagnosis in diagnosing embryo aneuploidy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2009; 21: 442-449. 10

12. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105: 19920-19925.

Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM, Zee BC, Lau TK, Cantor CR, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105: 20458-20463. 20

Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011; 306: 627-636.

Cioni R, Bussani C, Bucciantini S, Scarselli G. Fetal cells in a transcervical cell sample collected at 5 weeks of gestation. *Journal of Maternal Fetal & Neonatal Medicine* 2005; 18: 271-273.

Kilburn BA, Wang J, Duniec-Dmuchowski ZM, Leach RE, Romero R, Armant DR. Extracellular matrix composition and hypoxia regulate the expression of HLA-G and integrins in a human trophoblast cell line. *Biol. Reprod.* 2000; 62:739-747.

【 0 0 5 5 】 30

[表 1 : 栄養膜細胞の精製]

妊娠女性からの24の経子宮頸管検体における栄養膜細胞を、抗ヒトIgGナノ粒子に結合したHLA-Gによって単離した。HLA-G標識細胞のカウントを使用して、精製後に期待される細胞数を予測し、回収率を推定した。精製された細胞は免疫蛍光顕微鏡によって -hCGの発現について評価し、標識陽性の細胞のパーセンテージが示されている（検体あたりn=55~1500カウント）。

【表1】

患者	栄養膜細胞の予測数	栄養膜細胞の回収数 (予測に対する%)	β -hCG+ %	
1	609	998 (164)	95	
2	1260	248 (20)	99	
3	466	660 (141)	99	
4	1108	345 (31)	98.8	
5	2467	832 (35)	99.2	
6	239	270 (116)	99.6	10
7	2222	1462 (66)	97.8	
8	1009	818 (81)	99.6	
9	677	855 (119)	99.6	
10	581	720 (124)	99.3	
11	570	570 (100)	99.5	
12	1027	622 (61)	100	
13	314	314 (282)	100	
14	850	578 (68)	98.9	
15	593	510 (86)	100	
16	820	705 (86)	100	
17	842	623 (74)	98	
18	575	593 (103)	100	
19	1045	728 (70)	98.9	20
20	1109	495 (45)	96.4	
21	879	758 (86)	100	
22	529	1463 (276)	98.4	
23	1095	1020 (93)	100	
24	609	660 (108)	100	
平均		101 ± 13%	99 ± 0.25%	

【0056】

[表2：サブタイプを区別するための抗体群に対する単離細胞の反応性]

試験された全ての細胞は、左列に列挙されたタンパク質に対する抗体によって、右列に示されているように染色されたかまたは染色されなかった。中央の3列は、ヒト栄養膜におけるこれらのタンパク質の既知発現パターンを示している。

【表 2】

タンパク質	絨毛 合胞体性栄養膜	絨毛 細胞性栄養膜	絨毛外栄養膜	HLA-G ⁺ 細胞
HLA-G	-	-	+	+
hCG, βサブユニット	+	+	+	+
KRT7	+	+	+	+
hPL	+	+	+	+
PSG-1	+	-	-	-
α6 インテグリン	+	+	-	-
E-カドヘリン	+	+	-/+	-
VE-カドヘリン	-	-	+	+
PECAM1	-	-	+	+
α1インテグリン	-	-	+	+
MMP9	-	+	+	+

10

20

【 0 0 5 7 】

[表 3 : 胎児性別決定結果の要約]

図2と同様にPCRアッセイを行って、X染色体およびY染色体上の配列を増幅した。P、患者番号。XおよびY染色体について、バンドを生じた細胞（陽性細胞）/アッセイされた全細胞を示している。胎児性別は超音波によって、または出生時において、確認された。

【表 3】

患者	妊娠期間の週	X染色体 陽性細胞(%)	Y染色体 陽性細胞(%)	確認された性別	
1	6	25/30 (83.3)	0/30 (0)	女性	
2	9.2	10/10 (100)	10/10 (100)	男性	
3	14.6	18/20 (90)	18/20 (90)	男性	10
4	7.6	25/25 (100)	0/25 (0)	女性	
6	17.6	10/10 (100)	0/10 (0)	女性	
7	10	10/10 (100)	10/10 (100)	男性	
8	17.5	10/10 (100)	10/10 (100)	男性	
9	7.3	5/5 (100)	5/5 (100)	男性	
10	11	10/10 (100)	10/10 (100)	男性	
11	15.2	9/10 (90)	9/10 (90)	男性	
13	7.5	10/10 (100)	10/10 (100)	男性	20
14	12	10/10 (100)	0/10 (0)	女性	
20	12.4	10/10 (100)	0/10 (0)	女性	
21	12	9/10 (90)	0/10 (0)	女性	
23	10	10/10 (100)	0/10 (0)	女性	
24	8	25/28 (89.3)	25/28 (89.3)	男性	
25	14	6/6 (100)	6/6 (100)	男性	
26	12	24/26 (92.3)	24/26 (92.3)	男性	30

【 図 1 】

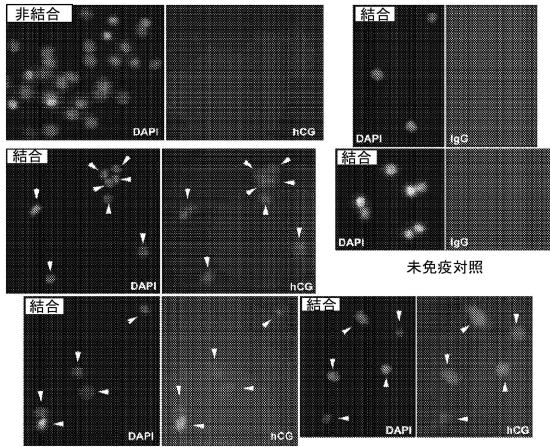


Fig. 1

【 図 2 】

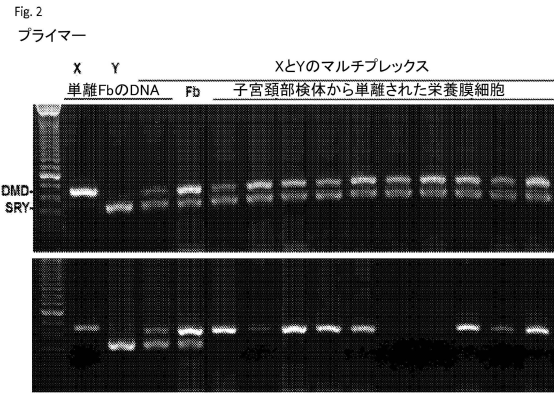


Fig. 2

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/543 (2006.01) G 0 1 N 33/543 5 4 1 A
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 Y

(72)発明者 ダイアモンド、 マイケル ピー .
アメリカ合衆国 4 8 2 0 1 ミシガン州 デトロイト ウェスト ハンコック 6 0

審査官 田名部 拓也

(56)参考文献 特表 2 0 0 5 - 5 0 0 8 6 1 (J P , A)
Human Reproduction , 2 0 0 9 年 , Vol.24, No.9 , pp.2086-2092

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
U n i P r o t / G e n e S e q
P u b M e d

专利名称(译)	宫颈粘液中滋养细胞的鉴定和分析用于产前诊断		
公开(公告)号	JP6421123B2	公开(公告)日	2018-11-07
申请号	JP2015538043	申请日	2013-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	韦恩州立大学		
申请(专利权)人(译)	韦恩州立盐湖城		
当前申请(专利权)人(译)	韦恩州立盐湖城		
[标]发明人	アルマントディーランドール ダイヤモンドマイケルピー		
发明人	アルマント、ディー.ランドール ダイヤモンド、マイケルピー.		
IPC分类号	C12Q1/24 C12Q1/6841 C12Q1/686 C12N5/073 G01N33/48 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	C12N5/0605 C12N2503/00 G01N33/56966 C12Q1/24 C12Q1/6888 C12Q2600/156 G01N2333/70539 G01N2800/368		
FI分类号	C12Q1/24 C12Q1/6841.Z C12Q1/686.Z C12N5/073 G01N33/48.M G01N33/543.541.A G01N33/53.Y		
代理人(译)	三好秀 伊藤雅一 原 裕子		
优先权	61/715854 2012-10-19 US		
其他公开文献	JP2015533504A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种从子宫颈内样本中取出胎儿细胞的方法，通过解除宫颈内膜样本中的胎儿细胞和母体细胞去除宫颈内膜样本中的粘液；从子宫颈内膜样本中分离出与其他细胞分离的胎儿细胞。还提供了一种从宫颈内膜样品中回收胎儿细胞的方法，通过获得通过上述方法制备的分离细胞的混合物，用胎儿特异性抗体处理细胞，鉴定与胎儿特异性抗体结合的细胞，和分离鉴定的细胞。通过上述方法制备的解离细胞可用于各种目的，包括但不限于宫颈细胞中胎儿细胞的鉴定，胎儿细胞密度的测定以预测高危妊娠，胎儿细胞的遗传分析，以及确定生长因子或其他生物标志物表达以预测产科疾病。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6421123号 (P6421123)
(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)	(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)	
(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/24 (2006.01)	C 1 2 Q 1/24	
C 1 2 Q 1/6841 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6841	Z
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z
C 1 2 N 5/073 (2010.01)	C 1 2 N 5/073	
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48	M
		請求項の数 14 (全 20 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2015-538043 (P2015-538043)	(73) 特許権者 515108679	
(86) (22) 出願日 平成25年10月18日(2013.10.18)	ウェイン ステイト ユニヴァーシティ	
(65) 公表番号 特表2015-533504 (P2015-533504A)	アメリカ合衆国 4 8 2 0 2 ミシガン州	
(43) 公表日 平成27年11月26日(2015.11.26)	デトロイト ウッドワード 5 0 5 7	
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/065570	シート 6 3 0 6	
(87) 国際公開番号 W02014/062995	(74) 代理人 100083806	
(87) 国際公開日 平成26年4月24日(2014.4.24)	弁理士 三好 秀和	
審査請求日 平成28年9月1日(2016.9.1)	(74) 代理人 100095500	
(31) 優先権主張番号 61/715,854	弁理士 伊藤 正和	
(32) 優先日 平成24年10月19日(2012.10.19)	(74) 代理人 10011235	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 原 裕子	
	(72) 発明者	
	アルマント、ディー.ランドール	
	アメリカ合衆国 4 8 2 0 1 ミシガン州	
	デトロイト ハンコック 2 7 5 シー	
	. エス. モット センター	
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 出生前診断のための頸管粘液における胎性栄養膜細胞の同定および分析