

請求の範囲

[請求項1]

胎児由来の核酸を取得するための方法であって、

a. 母体血試料中の血球をその密度及び大きさのいずれか又は両方によって分画することで母体血試料中から取得された画分であって全血球を基準として有核赤血球の濃縮された画分Aを、白血球及び細胞核に対して特異的に標識し、

b. 標識した前記画分A中の血球を少なくともセルソーティングによって選別することで母体由来及び胎児由来の有核赤血球を含む画分Bを取得するところ、前記白血球に対して特異的な標識により標識された血球を除外するとともに、細胞核に対して特異的な標識によりに標識された血球を回収するように選別を行い、

c. 前記画分B中の血球のそれぞれを各血球が有核赤血球であるか否かを問わず一細胞レベルで分離するとともに、前記一細胞レベルで分離された血球のそれぞれに対して各血球が有核赤血球であるか否かを問わず核酸の抽出処理を行うことにより一細胞レベルで区別可能な核酸を各々含有する画分Cを取得し、

d. 前記画分Cのそれぞれに対して分子生物学的解析を行うことで、前記画分Cの群の中から、一細胞レベルで区別可能な胎児由来の核酸を含有する画分Dを選別する、

方法。

[請求項2]

前記c.において、血球が有核赤血球に由来するか否かを問わない方法で前記画分Cが取得されたことから、前記画分Dに含有される核酸が一細胞レベルで分離された有核赤血球に由来することは、前記d.において当該核酸が胎児由来であることを同定したことに基づき事後的に推定されることを特徴とする、

請求項1に記載の方法。

[請求項3]

前記母体血試料は、母体血それ自体、又は母体血に比べて全血球数を基準として有核赤血球が濃縮されていない未濃縮試料であり、

前記画分 A は前記母体血試料中の血球をその大きさによって分画することで母体血試料中から取得された画分であるとともに、母体血試料中の血球から無核赤血球の少なくとも一部が取り除かれてなるものである、

請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[請求項 4]

前記母体血試料を血球分離チップで処理することで前記母体血試料中の血球をその大きさによって分画し、

前記血球分離チップは、主流路と、前記主流路の側方に接続する副流路と、前記副流路の下流において前記副流路とは反対側の前記主流路の側方に接続する除去流路とを備えるマイクロ流路構造を有し、

前記主流路には前記母体血試料が流れ、

副流路から流れ出す液が前記主流路を流れる血球を、前記主流路の側方から前記除去流路に向かって押し込み、

前記除去流路において前記母体血試料から無核赤血球が除去されるとともに、前記主流路における前記除去流路の接続部の下流において前記母体血試料から有核赤血球が回収されることで、前記画分 A が取得され、

前記除去流路の内接径が $12 \sim 19 \mu\text{m}$ である、

請求項 3 に記載の方法。

[請求項 5]

前記血球分離チップは、前記除去流路の下流において前記副流路とは反対側の前記主流路の側方に接続する回収流路をさらに備え、

副流路から流れ出す液が前記主流路を流れる血球を、前記主流路の側方からさらに前記回収流路に向かって押し込み、

前記回収流路において前記母体血試料から有核赤血球が回収されることで、前記回収流路から前記画分 A が取得され、

前記回収流路の内接径が $20 \sim 30 \mu\text{m}$ である、

請求項 4 に記載の方法。

[請求項 6]

前記 c. において、前記画分 B を限界希釈法で分画することで、一

細胞レベルで分離された血球を各々有する画分Eを取得するとともに、前記画分Eのそれぞれに対して、前記核酸の抽出処理を行うことで前記画分Cを取得する、

請求項1～5のいずれかに記載の方法。

[請求項7]

前記画分Bから有核赤血球であるか否かを問わず血球を分取することで画分Fを取得し、

前記画分Fを撮像し、

前記画分Fに一細胞レベルで分離された血球の含まれることを、前記画分Fの像を用いて確認することで、前記画分Eとして前記画分Fが取得されたか否かを判定するところ、前記一細胞レベルで分離された血球が有核赤血球であるか否かは前記画分Fの像から判定しない、

請求項6に記載の方法。

[請求項8]

前記c.において、流路、前記流路に沿って連続的に配置されるとともに前記流路に接続する複数の捕捉構造及び各前記捕捉構造に付随した反応構造を備える流体デバイスを用いて前記画分Cを取得するところ、

前記流路を通じて各前記捕捉構造に前記画分Bに含まれる血球を分配することで血球を一細胞レベルで互いに分離するとともに、各前記捕捉構造に捕捉した後、捕捉した各細胞を溶解するとともに前記捕捉構造から前記反応構造に向かって溶解物を押し流すことで前記画分Cを前記反応構造内に取得する、

請求項1～5のいずれかに方法。

[請求項9]

前記a.において、少なくとも細胞核に対する標識を核酸に対する蛍光標識によって行い、

前記b.において、少なくとも細胞核に対して特異的に蛍光標識された前記画分A中の血球を蛍光標示式細胞分取法に基づくセルソーティングによって選別する、

請求項1～8のいずれかに記載の方法。

- [請求項10] 前記 c. において前記画分 C に含有される前記核酸は染色体 DNA であり、
- 前記 d. において分子生物学的解析を行うために、前記染色体 DNA に対して全ゲノム又はゲノム中の一部領域の増幅を行い、
- 前記胎児由来の核酸として増幅産物である DNA を含有する前記画分 D を選別する、
- 請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法。
- [請求項11] 前記 c. において前記画分 C に含有される前記核酸は RNA であり、
- 、
- 前記 RNA は mRNA 及びノンコーディング RNA のいずれか又は両方であり、
- 前記 d. において分子生物学的解析を行うために、前記 RNA に対して逆転写を行い、
- 前記胎児由来の核酸として逆転写産物である cDNA を含有する前記画分 D を選別する、
- 請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法。
- [請求項12] さらに前記 c. において前記 RNA の抽出と同時に、各血球に対して染色体 DNA の抽出を行うことで各画分 C に紐付けられた画分 W を取得し、
- 前記画分 W の群の中から、前記画分 D に紐付けられた画分 Z を一細胞レベルで区別可能な胎児由来の染色体 DNA を含有する画分として得る、
- 請求項 11 に記載の方法。
- [請求項13] 請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の方法により得た前記画分 D 中の前記核酸の配列をマイクロアレイ解析又は配列決定法により解析し、
- 前記解析の結果から非侵襲的出生前遺伝学的検査における診断に供するデータを取得する方法。
- [請求項14] 胎児細胞由来染色体 DNA を取得するための方法であって、

a. 母体血試料中から取得された画分であって全血球を基準として有核赤血球の濃縮された画分Aを、赤血球及び核酸に対して特異的に標識するところ、少なくとも核酸に対する標識を蛍光標識によって行い、

b. 標識した前記画分A中の血球を少なくともセルソーティングによって選別することで、有核赤血球の純度が高められた画分Bを取得するところ、少なくとも核酸に対して特異的に蛍光標識された前記画分A中の血球を蛍光標示式細胞分取法に基づくセルソーティングによって選別し、

c. 前記画分B中の血球を一細胞レベルでそれぞれ無差別に分離するとともに、前記分離された血球の各々に対して、無差別かつ独立に染色体DNAの抽出処理を行うことで、一細胞レベルで区別可能な染色体DNAを各々含有する画分Cを取得し、

d. 前記画分Cのそれぞれに対して分子生物学的解析を行うことで、前記画分Cの群の中から、一細胞レベルで区別可能な胎児由来の染色体DNAを含有する画分Dを選別する、

方法であって、

前記画分Cが無差別に取得されたものであることから、前記画分Dに含有される染色体DNAが一細胞レベルで分離された有核赤血球に由来することは、前記d.において当該染色体DNAが胎児由来であることを同定したことに基づき事後的に推定されることを特徴とし、

前記画分Aは、母体血試料中の血球をその密度及び大きさのいずれかによって分画することで取得されたものであり、

前記c.において、前記画分Bを限界希釈法で分画することで、一細胞レベルで分離された血球を各々有する画分Eを取得するとともに、前記画分Eのそれぞれに対して、前記染色体DNAの抽出処理を行うことで前記画分Cを取得し、

前記画分Bには母体由来及び胎児由来の有核赤血球が含まれている

、

方法。

[請求項15] 前記 a. において、前記画分 A を、追加的に白血球に対して特異的に標識し、

前記 b. において標識した前記画分 A 中の血球をセルソーティングによって選別することで、前記白血球に対して特異的な標識により標識された血球が除外された前記画分 B を取得する、

請求項 14 に記載の方法。

[請求項16] 前記 a. において、赤血球に対する標識を磁気標識によって行い、
前記 b. において、前記蛍光標示式細胞分取法に基づくセルソーティングの前若しくは後に、赤血球に対して特異的に磁気標識された前記画分 A 中の血球を磁気標識による細胞分取法に基づくセルソーティングによって選別する、

又は

前記 a. において、赤血球に対する標識を蛍光標識によって行い、
前記 b. において、核酸及び赤血球に対して特異的に蛍光標識された前記画分 A 中の血球を前記蛍光標示式細胞分取法に基づくセルソーティングによって選別する、

請求項 14 又は 15 に記載の方法。