

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年10月5日(05.10.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/169240 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/005634
- (22) 国際出願日: 2017年2月16日(16.02.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-068199 2016年3月30日(30.03.2016) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社(FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目26番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 金子 泰久(KANEKO Yasuhisa); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 中島 順子, 外(NAKASHIMA Junko et al.); 〒2500111 神奈川県南足柄市竹松1250番地 F F T P M O 棟6F Kanagawa (JP).

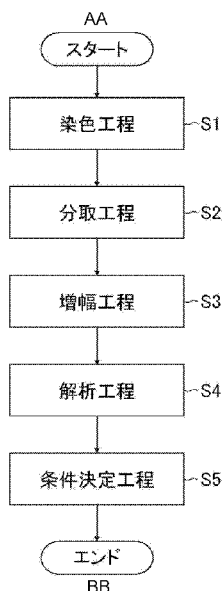
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: GENETIC ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称 : 遺伝子解析方法

[図1]



AA... START
S1... STAINING STEP
S2... SORTING STEP
S3... AMPLIFICATION STEP
S4... ANALYSIS STEP
S5... CONDITION DETERMINATION STEP
BB... END

(57) Abstract: Provided is a highly reliable genetic analysis method using flow cytometry. This genetic analysis method comprises: a staining step in which a cell is stained; a sorting step in which cell-derived first information of a sample solution is acquired by means of flow cytometry, said first information is analyzed in accordance with a determined extraction condition, and on the basis of the analysis result, a target cell is sorted into a container in which a plurality of wells are arrayed; an amplification step in which the DNA of the cell sorted into the container is amplified; and an analysis step in which genetic analysis is performed on the amplified DNA; and a condition determination step in which on the basis of second information acquired in the amplification step and/or third information acquired in the analysis step, the extraction condition is redetermined.

(57) 要約: フローサイトメトリー法を利用した信頼性の高い遺伝子解析方法を提供する。遺伝子解析方法は、細胞を染色する染色工程と、フローサイトメトリー法により試料液の細胞由来の第1情報を取得し、決定された抽出条件に従って第1情報を分析し、分析の結果から目的の細胞を、複数のウェルが配列された容器に分取する分取工程と、容器に分取された細胞のDNAを増幅する増幅工程と、増幅されたDNAを遺伝子解析する解析工程と、増幅工程において取得された第2情報、及び解析工程において取得された第3情報の少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定する条件決定工程と、を備える。

WO 2017/169240 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 遺伝子解析方法

技術分野

[0001] 本発明は遺伝子解析方法に関する。

背景技術

[0002] 試料液から目的の細胞を、フローサイトメトリー法を利用することにより、分離し分取することが知られている。

[0003] 例えば、特許文献1には、染色体異常に起因して生じる、細胞の一部が分離した微小な細胞（小核）を、フローサイトメータ（フローサイトメトリー法に用いられる装置）のソーティング機能を用いて、主核（親核）と小核に分離して回収することが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2000-157298号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] フローサイトメトリー法では、細胞から前方散乱光、側方散乱光、及び蛍光強度の情報を取得することにより細胞を選別し、目的の細胞を複数のウェルを有する容器に、1ウェルに1細胞を分取することが行われている。細胞が分取された容器が、PCR（Polymerase Chain Reaction）装置にセットされ、DNA（Deoxyribonucleic Acid）が増幅され、遺伝子解析が行われる。

[0006] しかしながら、フローサイトメトリー法では、蛍光強度の情報に基づいて、目的の細胞を選別しているため、染色の非特異性により誤選別される場合がある。また、細胞が分取する際に死細胞を選別できない場合がある。また、フローサイトメトリー法の蛍光強度の情報のみでは選別が難しい場合もある。例えば、フローサイトメトリー法では有核赤血球を選別可能な一方で、有核赤血球を、母体由来の有核赤血球と胎児由来の有核赤血球とに選別する

ことは困難であった。

[0007] 上述したように、フローサイトメトリー法において目的の細胞を正確に選別できない場合、その後の遺伝子解析の結果に対する信頼性が低下し、誤った判断を下す問題を含んでいる。

[0008] 本発明は、このような事情に鑑みてなされたもので、フローサイトメトリー法を利用した信頼性の高い遺伝子解析方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明の一態様によると、遺伝子解析方法は、細胞を染色する染色工程と、フローサイトメトリー法により試料液の細胞由来の第1情報を取得し、決定された抽出条件に従って第1情報を分析し、分析の結果から目的の細胞を、複数のウェルが配列された容器に分取する分取工程と、容器に分取された細胞のDNAを増幅する増幅工程と、増幅されたDNAを遺伝子解析する解析工程と、増幅工程において取得された第2情報、及び解析工程において取得された第3情報の少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定する条件決定工程と、を備える。

[0010] 好ましくは、細胞の染色は、抗原抗体反応による免疫染色である。

[0011] 好ましくは、第1情報は、免疫染色による蛍光発光、前方散乱光、及び側方散乱光のうちの少なくとも一つの情報である。

[0012] 好ましくは、分取工程と増幅工程との間に、容器に分取された細胞を撮像する撮像工程とを備え、撮像工程において取得された第4情報に基づいて、抽出条件を再決定する。

[0013] 好ましくは、第4情報は細胞の蛍光強度、形状、色、及び大きさの少なくとも一つを含む。

[0014] 好ましくは、第2情報はDNAの増幅の有無を含み、第3情報は目的の細胞の有無を含む。

[0015] 好ましくは、増幅工程が、ポリメラーゼ連鎖反応を含む。

[0016] 好ましくは、遺伝子解析が、DNAマイクロアレイ法、デジタルPCR法、リアルタイムPCR法、シーケンサー法及びその組合せよりなる群から

選択される。

[0017] 好ましくは、染色工程の前に、溶媒中の細胞の濃度を高める濃縮工程を備える。

[0018] 本発明の別の態様によると、遺伝子解析方法は、細胞を染色する工程と、フローサイトメトリー法により試料液の細胞由来の第1情報を取得し、決定された抽出条件に従って第1情報を分析し、分析の結果から目的の細胞を、複数のウェルが配列された容器に分取する分取工程と、容器に分取された細胞を撮像する撮像工程と、容器に分取された細胞のDNAを増幅する増幅工程と、増幅されたDNAを遺伝子解析する解析工程と、増幅工程において取得された第2情報、解析工程において取得された第3情報、及び撮像工程において取得された第4情報の少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定する条件決定工程と、を備える。

発明の効果

[0019] 本発明の遺伝子解析方法によれば、フローサイトメトリー法を利用した信頼性の高い遺伝子解析を実現することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]第1実施形態の遺伝子解析方法の手順を示したフローチャートである。

[図2]フローサイトメータの概念図である。

[図3]有核赤血球を含む領域を選択したスキャッタグラムである。

[図4]赤血球が出現すると考えられる領域を選択したスキャッタグラムである。

[図5]有核赤血球が出現すると考えられる領域を選択したスキャッタグラムである。

[図6]容器の斜視図である。

[図7]容器の斜視図である。

[図8]図5のスキャッタグラムに対し、増幅工程の第2情報に基づいて抽出条件を再決定した後のスキャッタグラムである。

[図9]図8のスキャッタグラムに対し、解析工程の第3情報に基づいて抽出条

件を再決定した後のスキッタグラムである。

[図10]第2実施形態の遺伝子解析方法の手順を示したフローチャートである。

[図11]画像撮像装置の概略構成図である。

[図12]図5のスキッタグラムに対し、撮像工程の第4情報に基づいて抽出条件を再決定した後のスキッタグラムである。

[図13]図12のスキッタグラムに対し、増幅工程の第2情報に基づいて抽出条件を再決定した後のスキッタグラムである。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、添付図面にしたがって本発明の好ましい実施形態について説明する。本発明は以下の好ましい実施形態により説明される。本発明の範囲を逸脱すること無く、多くの手法により変更を行うことができ、実施形態以外の他の実施形態を利用することができる。したがって、本発明の範囲内における全ての変更が特許請求の範囲に含まれる。

[0022] ここで、図中、同一の記号により示される部分は、同様の機能を有する同様の要素である。また、本明細書中で、数値範囲を“～”を用いて表す場合は、“～”により示される上限、下限の数値も数値範囲に含むものとする。

[0023] <遺伝子解析方法>

(第1実施形態)

第1実施形態の遺伝子解析方法について、図面を参照して説明する。なお、本実施形態では、試料液に血球細胞が含まれる場合であって、目的の細胞が胎児由来の有核赤血球である場合を例示して説明する。

[0024] 図1は、第1実施形態の遺伝子解析方法のフローチャートである。図1に示されるように、遺伝子解析方法は、染色工程（ステップS1）、分取工程（ステップS2）、増幅工程（ステップS3）、解析工程（ステップS4）、及び条件決定工程（ステップS5）を、少なくとも備える。

[0025] 染色工程（ステップS1）では、細胞を染色する。分取工程（ステップS

2) では、フローサイトメトリー法により試料液の細胞由来の第 1 情報を取得し、決定された抽出条件に従って第 1 情報を分析し、分析の結果から目的の細胞を、複数のウェルが配列された容器に分取する。増幅工程（ステップ S 3）では、容器に分取された細胞の DNA を増幅する。解析工程（ステップ S 4）では、増幅された DNA を遺伝子解析する。条件決定工程（ステップ S 5）では、増幅工程において取得された第 2 情報、及び解析工程において取得された第 3 情報の少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定する。以下、各工程について説明する。

[0026] <染色工程（ステップ S 1）>

本実施形態では、細胞を染色する工程を有している。細胞を染色することにより、後述するフローサイトメトリー法において、試料液の細胞由来の第 1 情報を取得することが可能になる。

[0027] 細胞の染色は、抗原抗体反応による免疫染色であることが好ましい。抗原抗体反応とは、抗体が相補的な構造を持つ抗原と特異的に結合することをいい、免疫染色とは、細胞に存在する抗原に、蛍光色素を連結した抗体を結合させることを意味する。

[0028] 免疫染色には、直接法と間接法とがあり、直接法は、蛍光色素を直接抗体に連結し、抗原と反応させる方法である。一方、間接法は、検出すべき抗原に特異的に結合できる抗体（1 次抗体）には蛍光色素を連結せず、その 1 次抗体に特異的に結合できる抗体（2 次抗体）に蛍光色素を連結して検出する方法である。

[0029] 細胞を抗原抗体反応により免疫染色するものとして、例えば、抗ヒト CD 抗体として、抗 CD 3 抗体、抗 CD 4 抗体、抗 CD 1 4 抗体、抗 CD 2 5 抗体、抗 CD 4 5 抗体、抗 CD 7 1 抗体、及び抗 CD 1 2 7 抗体等を例示することができ、蛍光色素として、4', 6-ジアミジン-2'-フェニルインドールジハイドロクロライド (DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole)、ヨウ化プロピジウム (PI : Propidium Iodide)、ピロニン Y (Pyronin Y)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC : fluorescein

isothiocyanate)、フィコエリスリン (P E : phycoerythrin)、アロフィコシアニン (A P C : allophycocyanin)、テキサスレッド (T R (登録商標))、Hoechst 33342、7-アミノ-アクチノマイシンD (7-AAD)、2'-デオキシシチジン5'-三リン酸 (C y 3)、スルホインドシアニンスクシンイミジルエステル (C y 5)、DRAQ5 (登録商標)、Brilliant Violet 570、及びBrilliant Violet 421等を挙げることができる。

[0030] 試料液は、次のように調製される。まず、目的の細胞を含む分析対象試料を準備する。分析対象試料に、例えば、免疫染色に用いる蛍光色素された抗体を混合し、インキュベーションすることにより、細胞が免疫染色される。抗原抗体反応による免疫染色された細胞を含む試料液が調製される。

[0031] <分取工程 (ステップS2)>

分取工程では、フローサイトメトリー法を実現するフローサイトメータ10が用いられ、試料液の細胞由来の第1情報が取得され、決定された抽出条件に従って第1情報が分析され、分析の結果から目的の細胞が、複数のウェルが配列された容器に分取される。

[0032] 抽出条件は、例えば、スキャッタグラムの分布を見て、過去の知見に基づいて決定される。

[0033] 図2は、フローサイトメータ10の概念図である。試料液Sには、抗原抗体反応による免疫染色された細胞Cを含む血球細胞が含まれている。

[0034] 試料液Sがノズル102からフローセル104に導入される。シース液Lがフローセル104に導入される。フローセル104内においてシース液Lにより試料液Sが絞られる。試料液Sが絞られることにより、細胞Cが一列に配列される。

[0035] 細胞Cに光源106から、例えばレーザー光が照射される。レーザー光の照射により細胞Cの免疫染色が励起され、細胞Cは免疫染色による蛍光を発光する。この蛍光発光の蛍光強度が検知器108により検知される。検知器108により検知された、細胞Cの蛍光発光が、細胞由来の第1情報として取得

され、制御部 120 に入力、及び記憶される。制御部 120 は、各種の処理を行う演算部、各種プログラム、及びデータ等が格納された記憶部等を備える。

[0036] 光源 106 からレーザ光が照射され、免疫染色による細胞 C からの前方散乱光、側方散乱光が検知器 110 により検知される。検知器 110 により検知された細胞 C からの前方散乱光、側方散乱光より蛍光強度が、細胞由来の第 1 情報として取得され、制御部 120 に入力、及び記憶される。

[0037] 第 1 情報として、免疫染色による蛍光発光、前方散乱光、及び側方散乱光の情報を取得する場合を例示したが、第 1 情報として、免疫染色による蛍光発光、前方散乱光、及び側方散乱光の少なくとも一つの情報を取得すれば良い。

[0038] なお、第 1 情報として取得された前方散乱光により測定対象の細胞の大きさが、また側方散乱光、及び蛍光発光により、測定対象物の細胞の構造などが測定される。

[0039] フローセル 104 には超音波が印加され、細胞 C を含む液滴が形成される。制御部 120 は、上記の検出結果に基づいて、液滴をプラス、又はマイナスに荷電する。制御部 120 は、廃棄する液滴については荷電しない。偏向電極板 112、114 を通過する際、荷電された液滴を何れかの偏向電極板 112、114 に引き寄せることにより、基本的には、容器 20 の 1 個のウェルに 1 個の細胞が分取される。

[0040] 免疫染色を励起させる光源 106 として、波長の異なる複数のレーザ光源を使用することが好ましい。例えば、405 nm の波長を持つレーザ光源と、488 nm の波長を持つレーザ光源と、561 nm の波長を持つレーザ光源と、683 nm の波長を持つレーザ光源と、を備えることが好ましい。波長の異なる複数のレーザ光源を使用することにより、細胞由来の第 1 情報として、複数の蛍光強度を得ることができる。

[0041] また、同時に蛍光強度を検出するためレーザ光源の励起光をカットし、免疫染色による蛍光色素の発光の波長を選択的に透過させる蛍光フィルタを使

用することが好ましい。

[0042] フローサイトメータ 10 の制御部 120 には、細胞由来の第 1 情報（免疫染色による蛍光発光、前方散乱光、及び側方散乱光）に基づいて、検出結果を解析するための解析プログラムが記憶されている。制御部 120 は、細胞由来の第 1 情報を取得し、決定された抽出条件に従って第 1 情報を分析する。

[0043] 例えば、制御部 120 は、例えば、細胞由来の第 1 情報に基づいて、蛍光発光、前方散乱光、及び側方散乱光の何れかを縦軸又は横軸とする、スキャッタグラム（散布図）を作成することができる。細胞由来の第 1 情報からスキャッタグラムを作成することにより、目的の細胞を分取するため、検知された全数の細胞を複数の集団に分離することができる。また、第 1 情報から作成されたスキャッタグラム上において、領域を指定する（いわゆるゲーティング）、又は領域を指定外とする（いわゆる、ゲートアウト）することにより、グラフ上の全数、又は集団から別の集団を分離することができ、目的の細胞が含まれる集団に絞り込みを実施することができる。

[0044] 本実施形態においては、第 1 情報の分析は、細胞由来の第 1 情報から目的の細胞が含まれる集団に絞り込むまでの一連の処理を含み、抽出条件はスキャッタグラムを作成するための縦軸又は横軸の選択や、集団から別の集団を分離するためのゲーティング、ゲートアウトなどを適宜組み合わせて決定することが可能である。

[0045] 図 3 から図 5 は、決定された抽出条件に従って第 1 情報を分析する場合の一例を示している。図 3 は有核赤血球を含む領域を選択したスキャッタグラムである。図 4 は赤血球が出現する領域を選択したスキャッタグラムである。図 5 は有核赤血球が出現する領域を選択したスキャッタグラムである。

[0046] 図 3 は、側方散乱光の蛍光強度を縦軸、前方散乱光の蛍光強度を横軸とするスキャッタグラムである。図 3 のスキャッタグラムには、フローセルを通過し、第 1 情報が取得された全数の細胞が表示されている。図 3 においては、ゲーティングにより有核赤血球を含むと考えられる領域 W1 が選択され、

一方、血小板は領域W1から除外されている。このゲーティングにより、全数の細胞から、有核赤血球を含む領域W1の集団が分離される。

[0047] 次に、図4は、図3において選択された領域W1の集団を対象とした、前方散乱光の蛍光強度を縦軸、CD45 : Brilliant Violet 421の蛍光強度を横軸とするスキャッタグラムである。CD45は白血球共通抗原であり、白血球はBrilliant Violet 421により免疫染色されている。したがって、CD45陰性をゲーティングすることにより、赤血球が出現すると考えられる領域W2が選択される。赤血球が出現すると考えられる集団が、他の集団から分離される。なお、領域W3は顆粒球が出現すると考えられる集団であり、領域W4はリンパ球と単球とが出現すると考えられる集団である。

[0048] 次に、図5は、図4において選択された領域W2の集団を対象とした、CD71 : FITCの蛍光強度を縦軸、DRAQ5 : APCの蛍光強度を横軸とするスキャッタグラムである。CD71 : FITCの蛍光強度は赤血球の幼弱性に関連し、DRAQ5 : APCの蛍光強度は核に関連する。したがって、DRAQ5 : APC陽性をゲーティングすることにより、有核赤血球が出現すると考えられる領域W5が選択される。有核赤血球が出現すると考えられる集団が、他の集団から分離される。

[0049] 本実施形態では、上述の分析の結果から領域W5により選択された有核赤血球が出現すると考えられる集団がフローサイトメータ10により容器20に分取される。

[0050] 次に、細胞が分取される容器20について説明する。図6、及び図7は容器20の斜視図である。

[0051] 図6に示されるように、容器20は、複数の細胞を回収するため、開口と底面とを有する複数のウェル202と、複数のウェル202と一体構造の側壁204と、を有している。複数のウェル202は行と列とに配置される。各々のウェル202の位置を特定するために、行を示す数値、及び列を示す英字が容器20のウェル202の開口側に表示されている。図6に示される

容器 20 では、各々のウェル 202 に細胞が回収される。容器 20 を特定するため、容器 20 の側壁には、例えば、バーコード等の識別標識 206 が表示される。

[0052] 図 7 に示されるように、図 6 とは別の形態の容器 20 は、複数の細胞を回収するための開口と底面とを有する複数のチューブ 208 と、複数のチューブ 208 を保持するための複数の孔 212 を備える支持部材 210 と、を有している。図 7 に示されるように容器 20 では、チューブ 208 がウェルの機能を果たしている。細胞を収納するための開口と底面とを有していれば、ウェルの形状等は限定されない。

[0053] 複数の孔 212 は行と列とに形成される。各々の孔 212 の位置を特定するために、行を示す数値、及び列を示す英字が、容器 20 の孔 212 の形成される側に表示されている。図 7 に示される容器 20 では、支持部材 210 に保持された各々のチューブ 208 に細胞が回収される。さらに、容器 20 を特定するため、支持部材 210 の側壁には、例えば、バーコード等の識別標識 206 が表示される。なお、チューブ 208 は、例えば、1 個単位のチューブであっても良いし、複数個が連結されたチューブであっても良い。また、チューブ 208 はキャップ（不図示）を有するチューブであっても良い。

[0054] 上述したように、フローサイトメータ 10 により、選択された領域 W5 の細胞が、目的の細胞として、容器 20 のウェル 202、又は容器 20 のチューブ 208 に基本的には細胞 1 個単位で分取される。

[0055] 制御部 120 は、好ましくは、細胞が収容された容器 20 の位置（ウェル 202 又はチューブ 208）と、その細胞由来の第 1 情報とを、関連付けて記憶する。細胞が収容された容器 20 の位置は、容器 20 に表示された行と列、及び識別標識 206 とにより、好ましくは、特定される。

[0056] <増幅工程（ステップ S3）>

増幅工程では容器に分取された細胞の DNA が増幅される。増幅工程はポリメラーゼ連鎖反応を含むことが好ましい。以下、ポリメラーゼ連鎖反応（

P C R : Polymerase Chain Reaction) を例に増幅工程を説明する。

[0057] 分取された細胞を含む容器 20 が、P C R 装置にセットされる。P C R 装置にセットされる容器は、フローサイトメータ 10 で使用された細胞が分取された容器 20 であっても良いし、又は容器 20 から細胞を移動させた P C R 用の容器であっても良い。容器に分取された細胞とは、分取工程において容器に分取された細胞を意味し、増幅工程においてその細胞が増幅されれば良く、分取工程の容器を使用することを意味するものではない。但し、P C R 装置にセットされる容器が、フローサイトメータ 10 で使用された容器 20 と異なる場合、分取工程での細胞由来の第 1 情報と細胞が分取された容器 20 の位置情報とは、P C R 装置にセットされる容器に関連付けて、例えば、制御部 120 に記憶される。

[0058] P C R 装置において、第 1 に、反応液を 94℃程度に加熱し、30秒から1分間温度を保ち、2本鎖DNAを1本鎖に分離する。第2に、反応液を60℃程度にまで急速冷却し、その一本鎖DNAとプライマーを所定の温度に加熱（アニーリング）し、一本鎖DNAとプライマーとを加熱する。第3に、プライマーにDNAポリメラーゼを反応させ、一本鎖DNAとプライマーの分離が起きず、DNAポリメラーゼ活性に適した温度（60～72℃程度）まで、加熱する。DNAが合成されるのに必要な時間（増幅する長さによるが通常1～2分）、この状態を継続する。

[0059] 第1から第3までを1サイクルとして、複数サイクル、例えば20サイクルを実行することにより特定のDNA断片を増幅することができる。一般的に、P C R 処理をn回のサイクル行くと、1つの2本鎖DNAから目的部分を2n倍に増幅することができる。

[0060] なお、上述の増幅手順はポリメラーゼ連鎖反応の一例を示したのであって、これ限定されることはない。

[0061] 増幅工程において、増幅の結果に関連する第2情報が取得される。例えば、第2情報として、目的の細胞のDNAが増幅されたか否か、つまり増幅の有無が第2情報として、好ましくは、取得される。増幅の有無に基づいて、

分取された細胞が生細胞か死細胞かを判断することができる。細胞由来の第1情報と増幅工程において取得された第2情報とは関連付けられ、例えば、制御部120に入力、及び記憶される。

[0062] DNA増幅の有無に関する第2情報は、好ましくは、DNA断片に対してアガロースゲルを用いた電気泳動を行うことにより取得することができる。電気泳動によりDNAの有無、又はDNAサイズからDNA増幅の有無を確認することができる。

[0063] <解析工程（ステップS4）>

解析工程では、増幅されたDNAを遺伝子解析する。遺伝子解析は、DNAマイクロアレイ法、デジタルPCR法、リアルタイムPCR法、シーケンサー法及びその組合せよりなる群から好ましくは、選択される。遺伝子解析として、特に限定されないが、さらに、nCounter System（NanoString社）を用いることが可能である。本実施形態においては、解析の精度、及び速さ、1度に処理可能な試料数の多さ等の点でいわゆる次世代シーケンサー法を用いることが好ましい。

[0064] DNAマイクロアレイ法は、基板上に細胞のDNA断片を高密度に配置し、板上のDNA配列に対して、ハイブリダイゼーションすることによって、細胞内において発現している遺伝子情報を分析する方法である。

[0065] デジタルPCR法は、対象のサンプルを複数のウェルに分配し、個別にPCRを並行して実行し、増幅の終了時に陽性反応の数をカウントする方法である。

[0066] 本実施形態において次世代シーケンサーは、サンガー法を利用したキャピラリーシーケンサー（第一世代シーケンサーと呼ばれる）に対比して分類されるシーケンサーを意味する。次世代シーケンサーは、第二世代、第三世代、第四世代を含む。現時点で最も普及している次世代シーケンサーは、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成又はDNAリガーゼによる相補鎖結合に連動した蛍光又は発光をとらえ塩基配列を決定する原理のシーケンサーである。具体的には、MiSeq（Illumina社）、HiS

eq 2000 (Illumina社、HiSeqは登録商標)、Roche 454 (Roche社)などが挙げられる。

[0067] 増幅工程で得られたDNAの増幅産物を次世代シーケンサーにより解析する場合、全ゲノムシーケンス、エキソームシーケンス、アンプリコンシーケンスを用いることが可能である。

[0068] 次世代シーケンサーにより得られた配列データをアライメントする手段としては、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) が挙げられ、BWAによって既知のヒトゲノム配列へ配列データをマッピングすることが好ましい。遺伝子を解析する手段としては、SAMtools及びBEDtoolsが挙げられ、これらの解析手段により遺伝子多型、遺伝子変異、及び染色体数を解析することが好ましい。

[0069] 増幅されたDNAを遺伝子解析することにより、遺伝子解析の結果に関連する第3情報が取得される。例えば、第3情報として、分取された細胞が目的の細胞であるか否か、つまり目的の細胞の有無が第3情報として、好ましくは、取得される。細胞由来の第1情報と、解析工程において取得された第3情報とは、例えば、関連付けて制御部120に入力、及び記憶される。

[0070] <条件決定工程(ステップS5)>

条件決定工程では、増幅工程において取得された第2情報、及び解析工程において取得された第3情報の少なくとも一つの情報に基づいて、分取工程における抽出条件を再決定する。

[0071] 抽出条件の再決定は、分取工程において決定された抽出条件を改めて決定することであり、分取工程において決定された抽出条件を変更する場合、及び分取工程において決定された抽出条件を変更しない場合を含む。抽出条件には、スキャッタグラムを作成するための縦軸又は横軸の選択や、集団から別の集団を分離するためのゲーティング、ゲートアウトなどを適宜組み合わせることが含まれる。

[0072] 分取工程では、例えば、免疫染色による蛍光発光、前方散乱光、及び側方散乱光を少なくとも一つを含む第1情報を取得し、決定された抽出条件に従

って第1情報を分析し、分析の結果から目的の細胞と考えられる細胞を分取している。そのため、通常の第1情報のみからでは、目的とされない細胞（例えば、死細胞）を分離した分取、及び複数の集団に分離することが難しい細胞等の分取は困難であった。

[0073] 本実施形態では、分取工程の後、第1情報と関連付けて、増幅工程、及び解析工程において第2情報、及び第3情報を少なくとも一つを取得する。増幅工程、及び解析工程を経ることにより、分取された細胞が、目的の細胞であるか否かを判断できる。好ましくは、第2情報は遺伝子の増幅の有無の情報を含んでいるので、分取された細胞が生細胞、又は死細胞であるかを判断できる。また、第3情報は遺伝子情報を含んでいるので、分取された細胞が目的の細胞であるかを判断できる。

[0074] 第2情報、及び第3情報の少なくとも一つが、第1情報と関連付けられているので、第2情報、及び第3情報に基づいて、分取工程において決定された抽出条件にフィードバックすることができる。したがって、より高い確率で目的の細胞を分取することが可能な抽出条件を再決定することができる。

[0075] 図8は、図5のスクアッタグラムに対し、増幅工程の第2情報に基づいて抽出条件を再決定した後のスクアッタグラムである。増幅工程において取得された第2情報に関連付けされた第1情報が、例えば、フローサイトメータ10の制御部120にフィードバックされる。制御部120は、フィードバックされた第2情報に基づいて、抽出条件を再決定することができる。

[0076] 再決定された抽出条件に基づいて第1情報を分析した結果、新たに領域W6が選択される。領域W5の中の第2情報に基づく結果が反映された領域W6は、増幅しなかった細胞（死細胞）が多く出現する領域であると推定される。領域W6をゲートアウトすることにより、新たな領域W7が選択される。領域W7には有核赤血球であって生細胞が多く出現すると推定される。

[0077] 第2情報に基づいて抽出条件を再決定することにより、有核赤血球であって生細胞が多く出現する領域W7を、他の集団から高い確率で分離することが可能になることが理解できる。

[0078] 図9は、図8のスクアッタグラムに対し、解析工程の第3情報に基づいて抽出条件を再決定した後のスクアッタグラムである。解析工程において取得された第3情報に関連付けされる第1情報が、例えば、フローサイトメータ10の制御部120にフィードバックされる。制御部120は、フィードバックされた第3情報に基づいて、抽出条件を再決定することができる。

[0079] 再決定された抽出条件に基づいて第1情報を分析した結果、新たに領域W8、領域W9が選択される。領域W7の中の第3情報に基づく結果が反映された領域W8は母体由来の有核赤血球が多く出現する領域であり、領域W9は胎児由来の有核赤血球が多く出現する領域であると推定される。第3情報に基づいて抽出条件を再決定することにより、目的の細胞（胎児由来の有核赤血球である場合）が多く出現する領域W9を他の集団から高い確率で分離することが可能となることが理解できる。

[0080] 本実施形態では、第2情報、及び第3情報に基づいて、抽出条件を再決定する場合について説明したが、第2情報、及び第3情報の少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定する場合でも良い。少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定することにより、目的の細胞をより高い確率で分取できるので、信頼性の高い遺伝子解析方法を実現することができる。

[0081] （第2実施形態）

次に、第2実施形態の遺伝子解析方法について、図面を参照して説明する。なお、本実施形態では、試料液に血球細胞が含まれる場合であって、目的の細胞が胎児由来の有核赤血球である場合を例示して説明する。

[0082] 図10は、第2実施形態の遺伝子解析方法のフローチャートである。図10に示されるように、遺伝子解析方法は、染色工程（ステップS21）、分取工程（ステップS22）、撮像工程（ステップS23）、増幅工程（ステップS24）、解析工程（ステップS25）、及び条件決定工程（ステップS26）を、少なくとも備える。

[0083] 染色工程（ステップS21）では、細胞を染色する。分取工程（ステップ

S 2 2) では、フローサイトメトリー法により試料液の細胞由来の第 1 情報を取得し、決定された抽出条件に従って第 1 情報を分析し、分析の結果から目的の細胞を、複数のウェルが配列された容器に分取する。撮像工程（ステップ S 2 3）では、容器に分取された細胞を撮像する。増幅工程（ステップ S 2 4）では、容器に分取された細胞の DNA を増幅する。解析工程（ステップ S 2 5）では、増幅された DNA を遺伝子解析する。条件決定工程（ステップ S 2 6）では、増幅工程において取得された第 2 情報、解析工程において取得された第 3 情報、及び撮像工程において取得された第 4 情報の少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定する。

[0084] 以下、各工程について説明する。なお、第 1 実施形態と同様の工程については、その説明を省略する場合がある。

[0085] 第 2 実施形態の遺伝子解析方法の染色工程（ステップ 2 1）、及び分取工程（ステップ S 2 2）について、第 1 実施形態と同様の染色工程（ステップ S 1）、及び分取工程（ステップ S 2）を実施することができる。次に撮像工程（ステップ S 2 3）について説明する。

[0086] <撮像工程（ステップ S 2 3）>

撮像工程では、容器に分取された細胞を撮像する。細胞を撮像するとは、細胞を対象として撮像する意味であって、目的の細胞、目的外の細胞、細胞ではない異物（ゴミ、細胞破片）を撮像する場合を含んでいる。撮像工程では、容器 2 0 に分取された細胞を撮像するため画像撮像装置 3 0 を用いることが好ましい。画像撮像装置 3 0 として、撮像装置を備える蛍光顕微鏡を挙げることができる。

[0087] 図 1 1 は画像撮像装置 3 0 の概略構成図である。画像撮像装置 3 0 は、容器 2 0 に回収された細胞 C を撮像することができる。画像撮像装置 3 0 は、細胞 C を撮像することにより、細胞由来の第 4 情報を得ることができるように構成されている。ここで、細胞由来の第 4 情報には、細胞からの蛍光強度、細胞の形状、色、及び大きさの少なくとも一つが含まれている。蛍光強度とは、励起光により励起された免疫染色による蛍光色素の蛍光発光を意味す

る。細胞の形状とは、細胞の外部、及び内部の形態を含む。細胞の色とは、細胞自身の色を意味する。細胞の大きさとは、細胞を二次元的に見た面積、細胞を三次元的に見た体積等を含む。

[0088] 本実施形態では、撮像工程において、容器 20 に分取された細胞を、容器 20 のウェル 202 の開口と反対の側（すなわち裏面）から細胞を撮像する場合について説明する。

[0089] 画像撮像装置 30 は、細胞 C の蛍光を測定するための励起用の第 1 光源 302 と、容器 20 を載置するためのテーブル 304 と、テーブル 304 から離間して容器 20 の反対側に配置されたレンズ 306 と、励起フィルタ 308、ダイクロイックミラー 310 及び蛍光フィルタ 312 とから構成されるフィルタ群と、容器 20 のウェル 202 の側に配置され、透過光を測定するための光を容器 20 に照射する第 2 光源 314 と、細胞 C を撮像する撮像装置 316 と、を備えている。

[0090] なお、撮像装置 316 は、容器 20 に分取された細胞 C を容器 20 のウェル 202 の開口（表面）と反対の側に配置されている。すなわち、撮像装置 316 は、容器 20 の裏面から細胞 C を撮像することができる。第 1 光源 302 からの励起光は、容器 20 の裏面からウェル 202 に照射され、第 2 光源 314 からの光は、容器 20 の表面からウェル 202 に照射される。

[0091] 容器 20 の裏面側から励起光を照射、又は容器 20 を透過して細胞からの蛍光、及び、透過光を受光するため、容器 20 の材料が透明であること、自家蛍光しないこと、散乱しないことが好ましい。

[0092] 画像撮像装置 30 は、好ましくは、蛍光発光する細胞 C を撮像した画像、及び明視野による細胞 C を撮像した画像を取得することができる。

[0093] 第 1 光源 302 として、例えば、高圧水銀ランプ、高圧キセノンランプ、発光ダイオード、レーザダイオード、タングステンランプ、ハロゲンランプ、白色発光ダイオードなどを用いることができる。これらの光源を用いても励起フィルタ 308 により、目的の波長のみ透過させることができる。免疫染色された細胞 C の蛍光色素に対して、目的の励起波長の光を照射させるこ

とができる。なお、第2光源314として、第1光源302と同様の光源を用いることができる。

[0094] 細胞Cの免疫染色による蛍光強度を撮像装置316により画像を取得する場合について説明する。第1光源302から照射された光は、励起フィルタ308により、目的とされる波長領域の光のみ透過される。励起フィルタ308を透過した光は、ダイクロイックミラー310により、容器20の方向に反射される。ダイクロイックミラー310により反射された光は、レンズ306を透過し、ウェル202に回収された細胞Cに照射される。細胞Cに照射される光は、免疫染色された細胞Cの蛍光色素を励起する波長領域とされている。免疫染色された細胞Cは励起光により励起され、照射された励起波長とは異なる波長の蛍光を発光する。細胞Cの免疫染色による蛍光は、レンズ306、ダイクロイックミラー310、及び蛍光フィルタ312を経て撮像装置316で撮像され、画像が取得される。励起光とその励起光により発する蛍光と比較すると、蛍光の波長が励起光の波長より長くなるので、ダイクロイックミラー310により、励起光の波長に光を容器20の側に反射させ、蛍光の波長の光を撮像装置316の側に透過させることができる。また、蛍光フィルタ312は、励起光を透過させず、蛍光のみを透過させることができる。したがって、撮像装置316において、免疫染色による蛍光発光する細胞Cを撮像することができる。蛍光フィルタ312により、蛍光のみを透過させることにより、撮像装置316で撮像される画像が励起光に影響されることがないので、正確な画像を取得することができる。

[0095] 本実施形態の画像撮像装置30は、容器20を任意の位置に移動（例えば、X方向、Y方向、及びZ方向）させるため、テーブル304と駆動装置（不図示）とを備えている。テーブル304と駆動装置とにより、容器20の特定のウェル202を、観察位置に移動させることができる。駆動装置は、テーブル304を、X方向、Y方向、及びZ方向に移動できることが好ましい。

[0096] 細胞Cが複数の蛍光色素により免疫染色されている場合、異なるフィルタ

群（励起フィルタ 308、ダイクロイックミラー 310 及び蛍光フィルタ 312）に切り替えることで、異なる蛍光発光する細胞 C を撮像でき、細胞 C の画像を取得することができる。

[0097] 撮像装置 316 としては、容器 20 のウェル 202 内の細胞の蛍光または透過光を撮像することができれば特に限定されず、例えば、CCD (charge-coupled device) カメラを用いることができる。

[0098] 本実施形態では、撮像装置 316 と第 1 光源 302 とフィルタ群とが容器 20 の裏面側に配置され、第 2 光源 314 が容器の表面側に配置されている画像撮像装置 30 について説明した。これに限定されず、撮像装置 316 と第 1 光源 302 とフィルタ群とが容器 20 の表面側に配置され、第 2 光源 314 が容器の裏面側に配置される画像撮像装置 30 を使用することもできる。

[0099] 撮像工程において細胞を撮像することにより取得された第 4 情報は、細胞由来の第 1 情報と関連付けて、例えばフローサイトメータ 10 の制御部 120 に入力、及び記憶される。撮像工程では細胞 C が撮像した画像が取得されているので、画像から第 4 情報として、細胞の蛍光強度、形状、色、及び大きさの少なくとも一つを含む情報を取得することができる。撮像工程では直接細胞を観察して第 4 情報を取得しているので、分取された細胞が、目的の細胞、目的外の細胞、ゴミ、又は細胞破片であるか否かを判断することが可能になる。

[0100] 本実施形態では、図 6 に示される容器 20 を使用した場合を説明したが、これに限定されず、図 7 に示される容器 20 を使用して細胞を撮像することができる。

[0101] 第 2 実施形態の遺伝子解析方法の増幅工程（ステップ S24）、及び解析工程（ステップ S25）について、第 1 実施形態と同様の増幅工程（ステップ S3）、及び解析工程（ステップ S4）を実施することができる。次に条件決定工程（ステップ S26）について説明する。

[0102] <条件決定工程（ステップ S26）>

条件決定工程では、増幅工程において取得された第2情報、解析工程において取得された第3情報、及び撮像工程において取得された第4情報の少なくとも一つの情報に基づいて、分取工程における抽出条件を再決定する。

[0103] 本実施形態では、分取工程の後、第1情報と関連付けて、増幅工程、解析工程、及び撮像工程において、第2情報、第3情報、及び第4情報を少なくとも一つを取得する。増幅工程、解析工程、及び撮像工程を経ることにより、分取された細胞が、目的の細胞であるか否かを判断できる。好ましくは、第2情報は遺伝子の増幅の有無を含んでいるので、分取された細胞が生細胞、死細胞であるかを判断できる。また、第3情報は遺伝子情報を含んでいるので、分取された細胞が目的の細胞であるかを判断できる。また、第4情報は細胞の蛍光強度等を含んでいるので、撮像した画像から目的の細胞であるかを判断できる。

[0104] 第2情報、第3情報、及び第4情報の少なくとも一つが、第1情報と関連付けられているので、第2情報、第3情報、及び第4情報に基づいて、分取工程における抽出条件にフィードバックすることができる。したがって、より高い確率で目的の細胞を分取することが可能な抽出条件を再決定することができる。

[0105] 図12は、図5のスクアッタグラムに対し、撮像工程の第4情報に基づいて抽出条件を再決定した後のスクアッタグラムである。撮像工程で取得された第4情報に関連付けされた第1情報が、例えば、フローサイトメータ10の制御部120にフィードバックされる。制御部120は、フィードバックされた第4情報に基づいて、抽出条件を再決定することができる。

[0106] 再決定された抽出条件に基づいて第1情報を分析した結果、新たに領域W10が選択される。領域W5の中の第4情報に基づく結果が反映された領域W10は、ゴミ又は細胞破片が多く出現する領域であると推定される。領域W10をゲートアウトすることにより、新たな領域W11が選択される。領域W11にはゴミ又は細胞破片を除く有核赤血球が多く出現すると推定される。

- [0107] 第4情報に基づいて抽出条件を再決定することにより、ゴミ又は細胞破片等を除く目的の細胞が多く出現する領域W11を、他の集団から高い確率で分離することが可能になることが理解できる。
- [0108] 図13は、図12のスクアッタグラムに対し、増幅工程の第2情報に基づいて抽出条件を再決定した後のスクアッタグラムである。増幅工程において取得された第2情報に関連付けされる第1情報が、例えば、フローサイトメータ10の制御部120にフィードバックされる。制御部120は、フィードバックされた第2情報に基づいて、抽出条件を再決定することができる。
- [0109] 再決定された抽出条件に基づいて第1情報を分析した結果、新たに領域W6が選択される。領域W11の中の第2情報に基づく結果が反映された領域W6は、増幅しなかった細胞（死細胞）が多く出現する領域であると推定される。領域W6をゲートアウトすることにより、領域W11の中に新たな領域W7が選択される。領域W7には有核赤血球であって生細胞が多く出現すると推定される。
- [0110] 第2情報に基づいて抽出条件を再決定することにより、有核赤血球であって生細胞が多く出現する領域W7を、他の集団から高い確率で分離することが可能になることが理解できる。
- [0111] さらに、解析工程において取得された第3情報に関連付けされる第1情報が、例えば、フローサイトメータ10の制御部120にフィードバックされる。制御部120は、フィードバックされた第3情報に基づいて、抽出条件を再決定することができる。
- [0112] その結果、図9のスクアッタグラムに示されるように、再決定された抽出条件に基づいて第1情報を分析した結果、新たに領域W8、領域W9が選択される。
- [0113] 領域W7の中の第3情報に基づく結果が反映された領域W8は母体由来の有核赤血球が多く出現する領域であり、領域W9は胎児由来の有核赤血球が多く出現する領域であると推定される。第3情報に基づいて抽出条件を再決定することにより、目的の細胞（胎児由来の有核赤血球である場合）が多く

出現する領域W9を他の集団から高い確率で分離することが可能となることが理解できる。

[0114] 本実施形態では、第2情報、第3情報、及び第4情報に基づいて、抽出条件を再決定する場合について説明したが、第2情報、第3情報、及び第4情報の少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定する場合でも良い。少なくとも一つの情報に基づいて、抽出条件を再決定することにより、目的の細胞をより高い確率で分取できるので、信頼性の高い遺伝子解析方法を実現することができる。

[0115] なお、本実施形態において、染色工程の前に、目的とする細胞の溶媒中の濃度を高める濃縮工程を備えることが好ましい。濃縮工程について、一例として母体血中の有核赤血球を濃縮する場合について説明する。

[0116] <濃縮工程>

染色工程より前に母体血中の有核赤血球の濃縮を行い、有核赤血球の密度を高めることが好ましい。濃縮工程としては、公知の方法、例えば、密度勾配遠心分離法、MACS (Magnetic activated cell sorting) 法、FACS (Fluorescence activated cell sorting) 法、レクチン法、あるいは、フィルタ濾過法などを用いることができる。なかでも、血球細胞の特性を利用し、簡便な濃縮方法として、密度勾配遠心分離法により濃縮を行うことが好ましい。濃縮工程の一例として、以下に、密度勾配遠心分離法について説明する。

[0117] [密度勾配遠心分離法]

密度勾配遠心分離法は、血液中の成分の密度の差を利用して分離する方法である。密度勾配遠心分離法は、分離用媒体を使用しない方法、また、1種の分離用媒体を使用してその分離用媒体の上下で分離する方法、あるいは、2種の分離用媒体を使用して目的の成分の密度領域を分離用媒体の間に挟み込むように分離する方法等を利用して、目的の成分（本実施形態においては有核赤血球）を集めることができる。そして、目的の成分を含む画分を採取

することにより、母体血から有核赤血球を濃縮することができる。

[0118] 分離用媒体を使用しない方法としては、血液試料である母体の末梢血（希釈液により希釈されていてもよい）を遠心管に充填し、遠心分離を行った後に、目的の成分を採取することにより有核赤血球の濃縮を行うことができる。

[0119] 1種の分離用媒体を使用する方法としては、遠心管の底部に分離用媒体を注入し、分離用媒体の上に血液試料である母体の末梢血（希釈液により希釈されていてもよい）を積層した後に遠心分離を行い、遠心分離後の分離用媒体の上部（分離用媒体の一部を含んでもよい）を採取することにより有核赤血球の濃縮を行うことができる。

[0120] 2種の分離用媒体を使用する方法では、遠心管の底部に第1の分離用媒体を注入し、第1の分離用媒体の上に第2の分離用媒体を積層し、第2の分離用媒体の上に血液試料である母体の末梢血（希釈液により希釈されていてもよい）を積層した後に遠心分離にかけ、遠心分離後の第1の分離用媒体と第2の分離用媒体の間の層（第1の分離用媒体及び第2の分離用媒体のそれぞれの一部、あるいはどちらかの一部を含んでもよい）を採取することにより有核赤血球の濃縮を行うことができる。なお、第1の分離用媒体を積層した遠心管を第2の分離用媒体を積層する前に冷却すると、第1と第2の分離用媒体の境界領域での混合を抑制できる。

[0121] 国際公開WO2012/023298号公報には、胎児の有核赤血球を含めた母体の血液の密度が記載されている。その記載によると、想定される胎児由来の有核赤血球の密度は、 $1.065 \sim 1.095 \text{ g/mL}$ 程度、母体の血球の密度は、赤血球が $1.070 \sim 1.120 \text{ g/mL}$ 程度、好酸球は $1.090 \sim 1.110 \text{ g/mL}$ 程度、好中球は $1.075 \sim 1.100 \text{ g/mL}$ 程度、好塩基球が $1.070 \sim 1.080 \text{ g/mL}$ 程度、リンパ球が $1.060 \sim 1.080 \text{ g/mL}$ 程度、単核球が $1.060 \sim 1.070 \text{ g/mL}$ 程度である。

[0122] 積層する分離用媒体の密度は、密度が $1.065 \sim 1.095 \text{ g/mL}$ 程

度の胎児由来の有核赤血球を、母体中の他の血球成分と分離するために設定される。例えば、2種の分離用媒体を使用する方法では、胎児由来の有核赤血球の中心の密度は、 1.080 g/mL 程度であるため、この密度を挟む2つの異なる密度の分離用媒体を作成し、隣接して重層することにより、その界面に所望の胎児由来の有核赤血球を集めることが可能となる。好ましくは、第1の分離用媒体の密度を 1.08 g/mL 以上 1.10 g/mL 以下、第2の分離用媒体の密度は 1.06 g/mL 以上 1.08 g/mL 以下として設定することが好ましい。さらに好ましくは、第1の分離用媒体の密度を 1.08 g/mL 以上 1.09 g/mL 以下、第2の分離用媒体の密度を 1.065 g/mL 以上 1.08 g/mL 以下である。具体的な例としては、第1の分離用媒体の密度を 1.085 g/mL 、第2の分離用媒体の密度を 1.075 g/mL に設定することにより、血漿成分、好酸球及び単核球を、回収する所望の画分から分離することが可能となる。また、赤血球、好中球、リンパ球の一部も分離することが可能となる。本実施形態では、第1の分離用媒体と、第2の分離用媒体は同じ種類でも、異なる種類でも、本発明の効果を実現できる限りにおいて制限はないが、同じ種類の媒体を用いることが好ましい態様である。

[0123] 濃縮工程で用いられる密度勾配遠心分離用の分離用媒体としては、ポリスクロースとジアトリゾ酸ナトリウムを含む溶液であるHistopaque（登録商標）、非透析性ポリビニルピロリドンをコーティングした直径 $15 \sim 30 \text{ nm}$ のシリカゾルを含む溶液であるPercoll（登録商標）、ショ糖から作られた側鎖に富んだ中性の親水性ポリマー溶液であるFicoll（登録商標）-Paqueなどの分離用媒体を使用することができる。本実施形態では、Histopaque及びPercollを使用することが好ましい。

[0124] 密度勾配遠心分離の分離用媒体は、希釈液あるいは密度（比重）の異なる分離用媒体の混合により所望の密度に調製することが可能である。例えば、Histopaque（登録商標）は、市販されている密度 1.077 の媒

体と、密度 1.119 の媒体を用いて、第 1 の分離用媒体及び第 2 の分離用媒体を所望の密度に調整することが可能である。また、これらの密度勾配遠心分離用媒体は、塩化ナトリウム (NaCl) などの添加により浸透圧を調節することができる。

符号の説明

- [0125] 10 フローサイトメータ
20 容器
30 画像撮像装置
102 ノズル
104 フローセル
106 光源
108、110 検知器
112、114 偏向電極板
120 制御部
202 ウェル
204 側壁
206 識別標識
208 チューブ
210 支持部材
212 孔
302 第 1 光源
304 テーブル
306 レンズ
308 励起フィルタ
310 ダイクロイックミラー
312 蛍光フィルタ
314 第 2 光源
316 撮像装置

C 細胞

L シース液

S 試料液

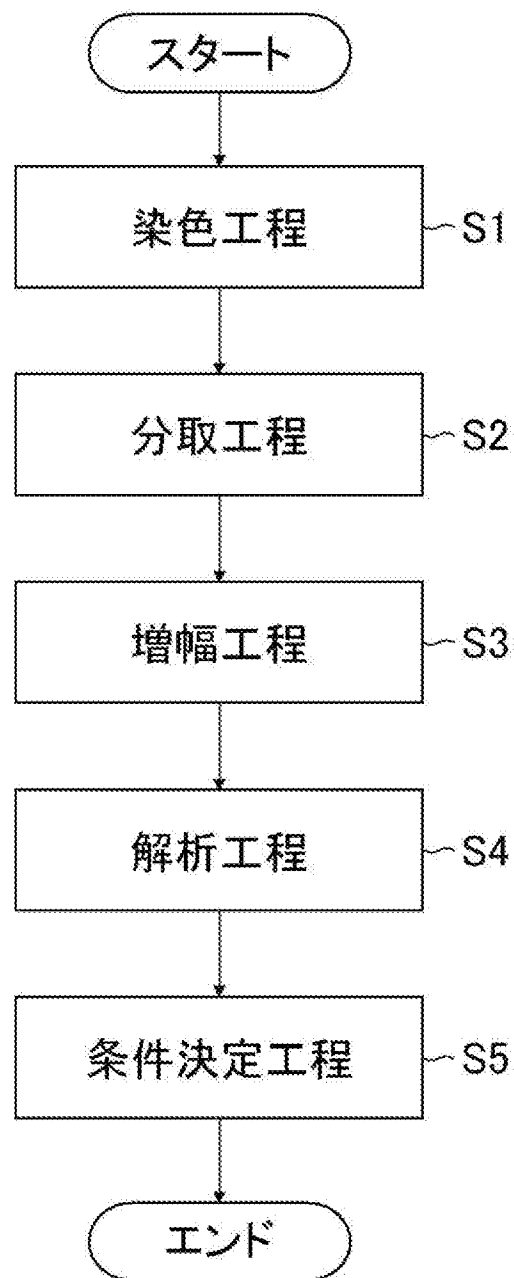
W1、W2、W3、W4、W5、W6、W7、W8、W9、W10、W11
領域

請求の範囲

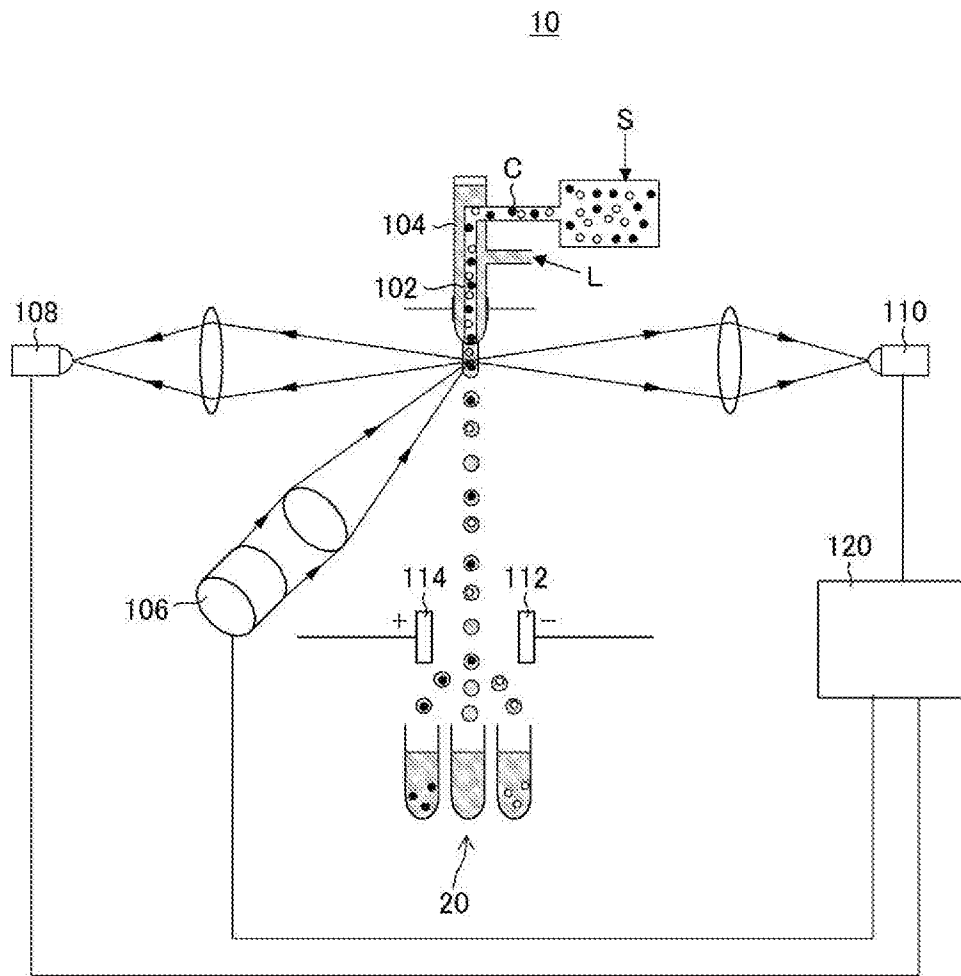
- [請求項1] 細胞を染色する染色工程と、
フローサイトメトリー法により試料液の細胞由来の第1情報を取得し、決定された抽出条件に従って前記第1情報を分析し、該分析の結果から目的の細胞を、複数のウェルが配列された容器に分取する分取工程と、
前記容器に分取された細胞のDNAを増幅する増幅工程と、
増幅された前記DNAを遺伝子解析する解析工程と、
前記増幅工程において取得された第2情報、及び前記解析工程において取得された第3情報の少なくとも一つの情報に基づいて、前記抽出条件を再決定する条件決定工程と、
を備える遺伝子解析方法。
- [請求項2] 前記細胞の染色は、抗原抗体反応による免疫染色である請求項1に記載の遺伝子解析方法。
- [請求項3] 前記第1情報は、前記免疫染色による蛍光発光、前方散乱光、及び側方散乱光のうちの少なくとも一つの情報である請求項2に記載の遺伝子解析方法。
- [請求項4] 前記分取工程と前記増幅工程との間に、前記容器に分取された細胞を撮像する撮像工程とを備え、前記撮像工程において取得された第4情報に基づいて、前記抽出条件を再決定する請求項1から3の何れか一項に記載の遺伝子解析方法。
- [請求項5] 前記第4情報は前記細胞の蛍光強度、形状、色、及び大きさの少なくとも一つを含む請求項4に記載の遺伝子解析方法。
- [請求項6] 前記第2情報は前記DNAの増幅の有無を含み、前記第3情報は目的の細胞の有無を含む請求項1から5の何れか一項に記載の遺伝子解析方法。
- [請求項7] 前記増幅工程が、ポリメラーゼ連鎖反応を含む請求項1から6の何れか一項に記載の遺伝子解析方法。

- [請求項8] 前記遺伝子解析が、DNAマイクロアレイ法、デジタルPCR法、リアルタイムPCR法、シーケンサー法及びその組合せよりなる群から選択される請求項1から7の何れか一項に記載の遺伝子解析方法。
- [請求項9] 前記染色工程の前に、前記細胞の溶媒中の濃度を高める濃縮工程を備える請求項1から8の何れか一項に記載の遺伝子解析方法。
- [請求項10] 細胞を染色する工程と、
フローサイトメトリー法により試料液の細胞由来の第1情報を取得し、決定された抽出条件に従って前記第1情報を分析し、該分析の結果から目的の細胞を、複数のウェルが配列された容器に分取する分取工程と、
前記容器に分取された細胞を撮像する撮像工程と、
前記容器に分取された細胞のDNAを増幅する増幅工程と、
増幅された前記DNAを遺伝子解析する解析工程と、
前記増幅工程において取得された第2情報、前記解析工程において取得された第3情報、及び前記撮像工程において取得された第4情報の少なくとも一つの情報に基づいて、前記抽出条件を再決定する条件決定工程と、
を備える遺伝子解析方法。

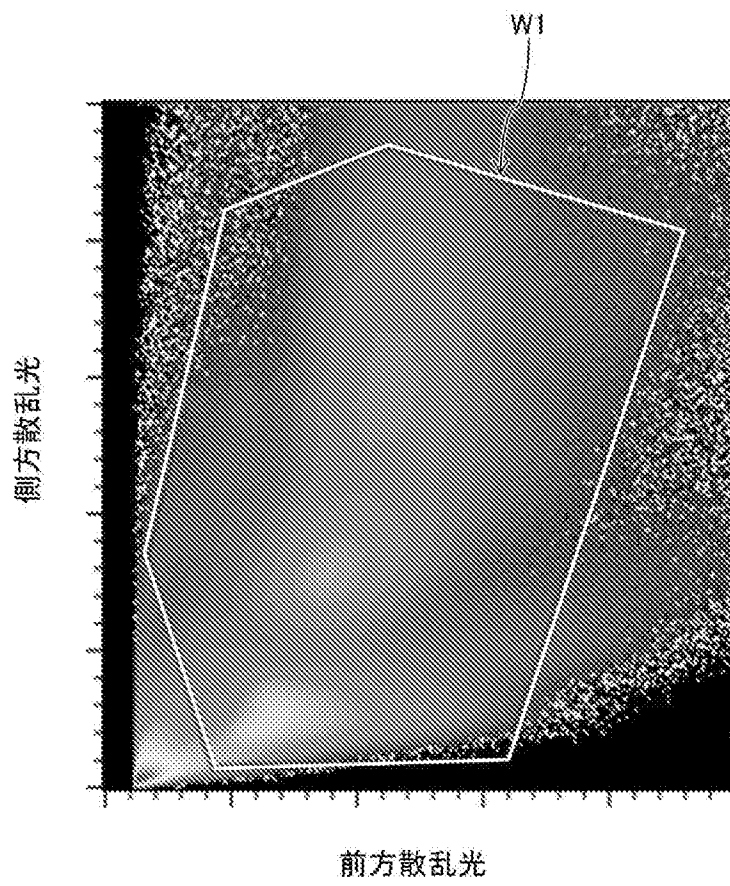
[図1]



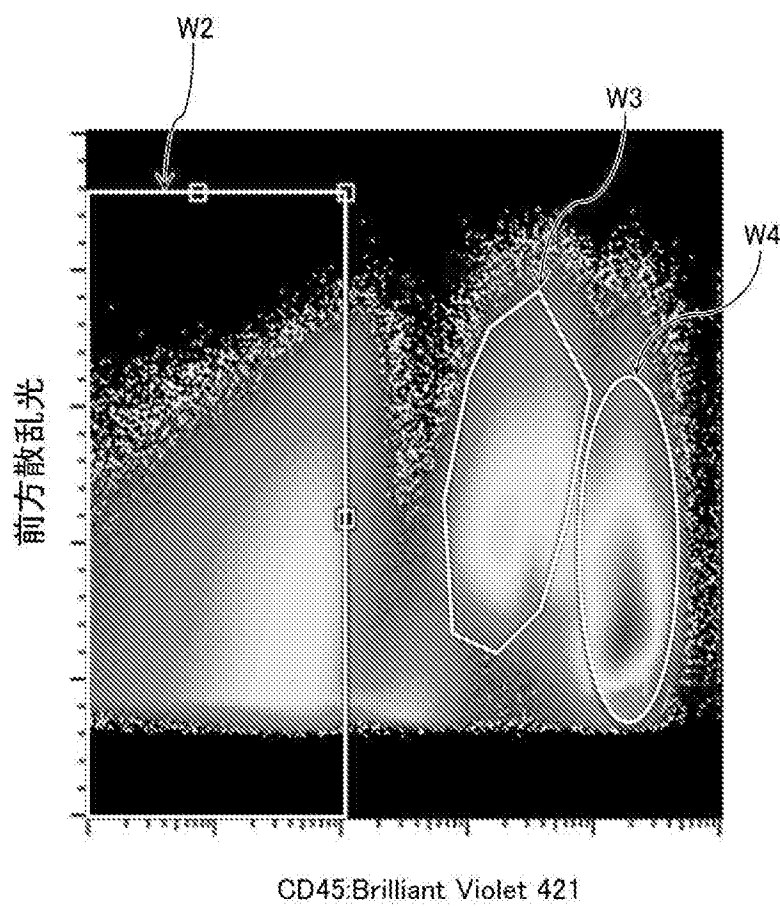
[図2]



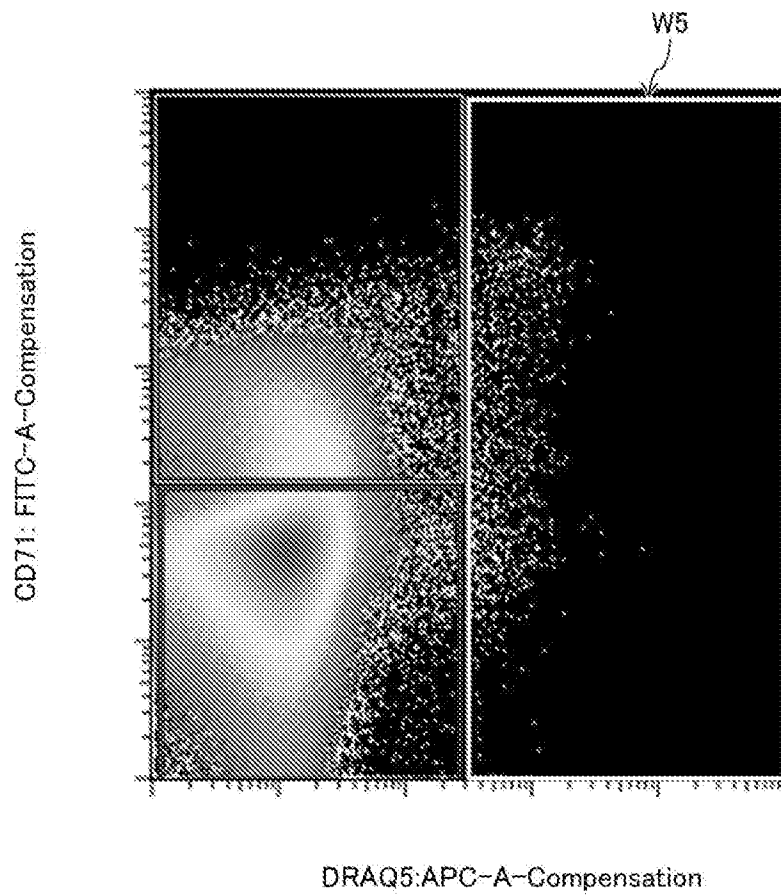
[図3]



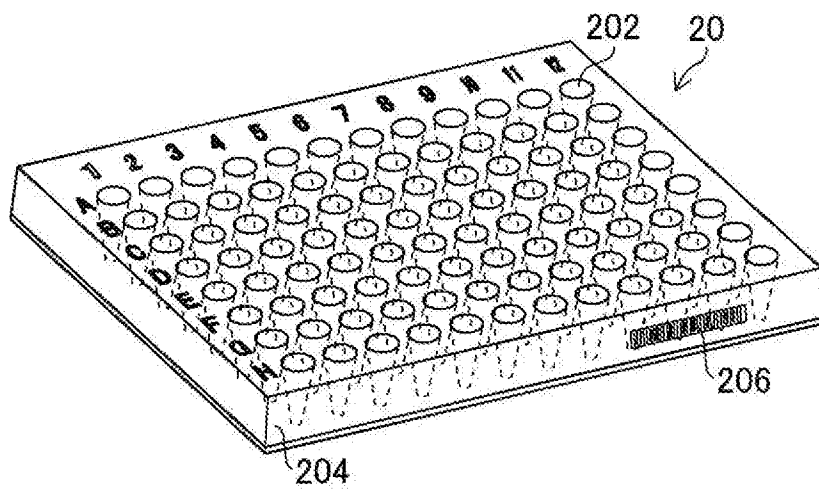
[図4]



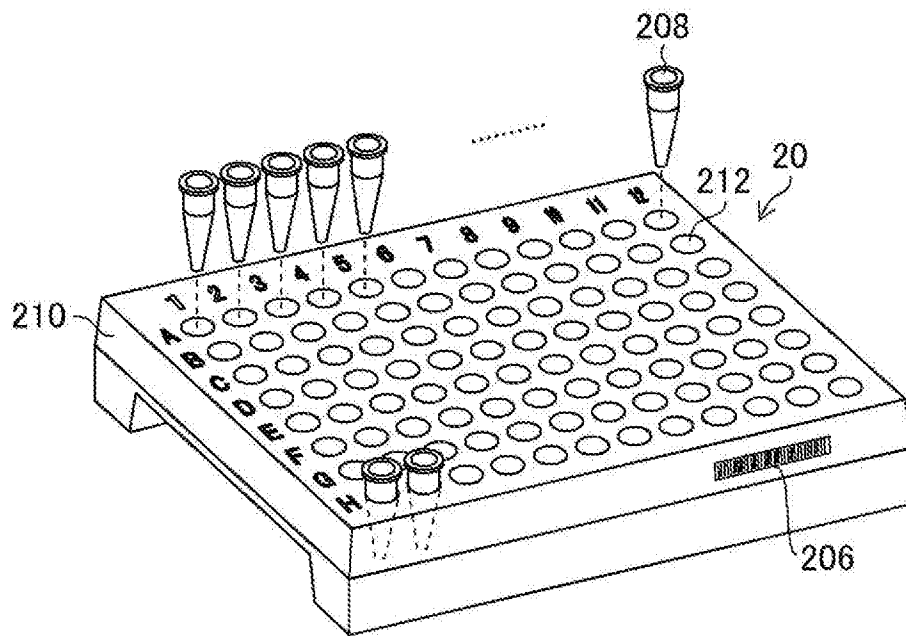
[図5]



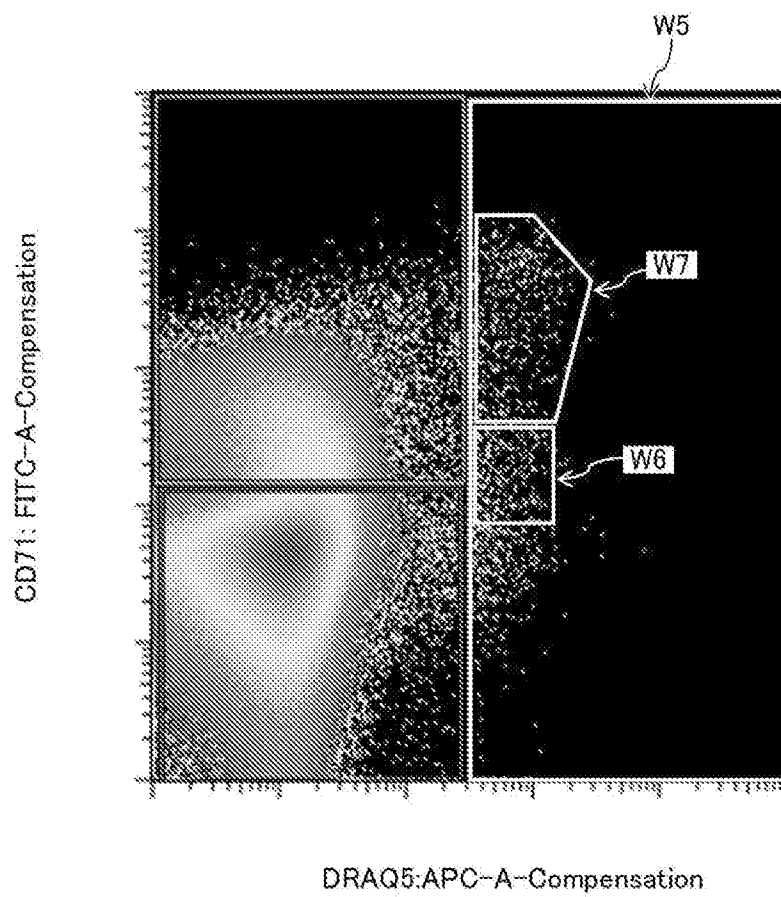
[図6]



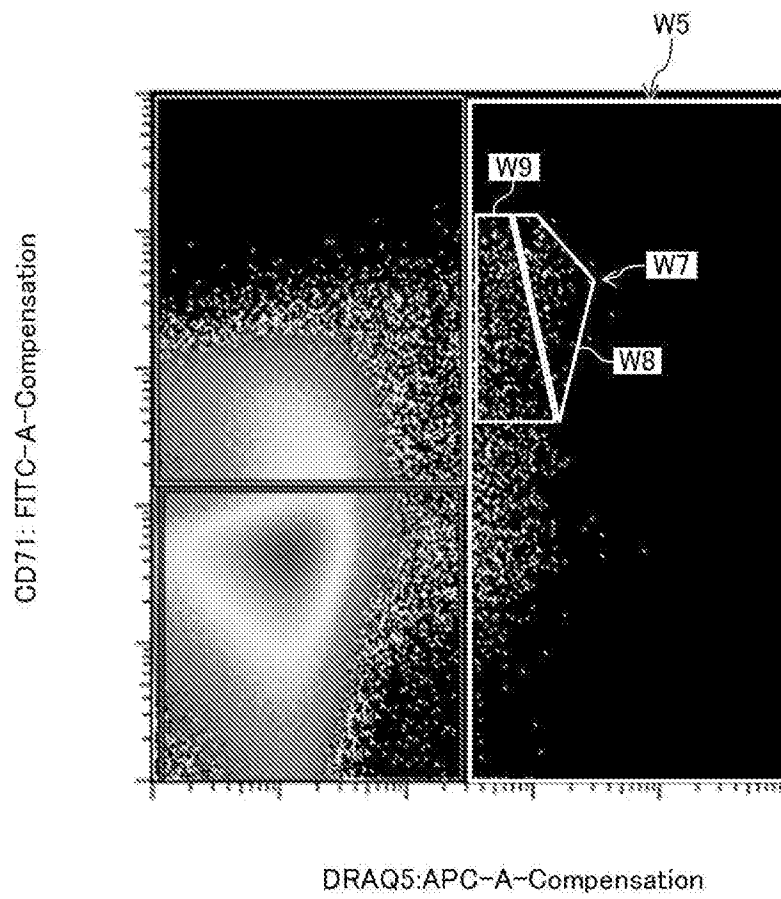
[図7]



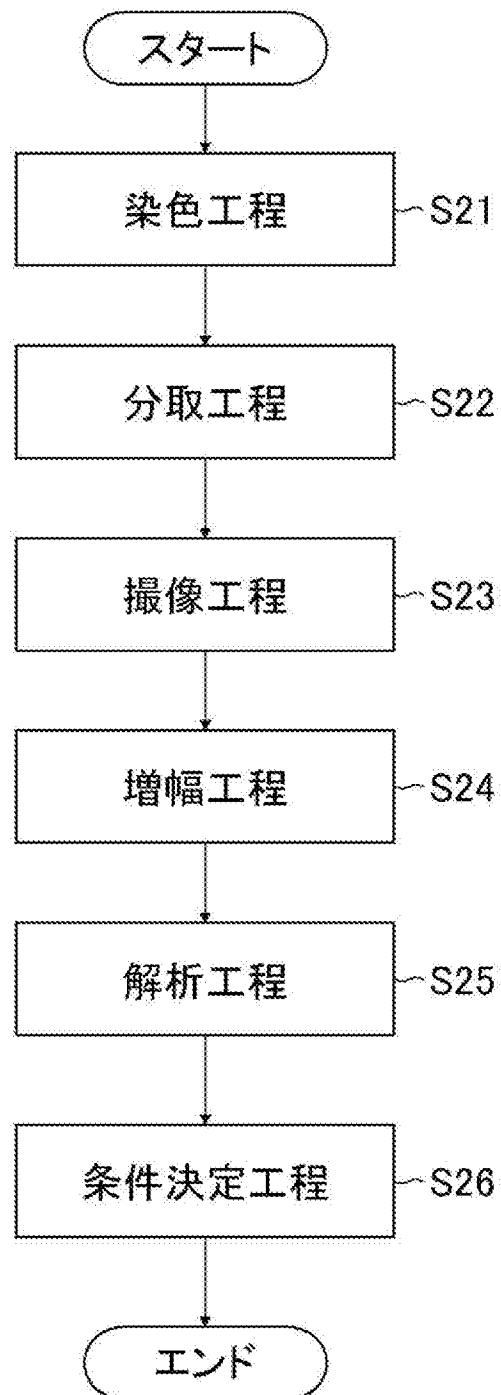
[図8]



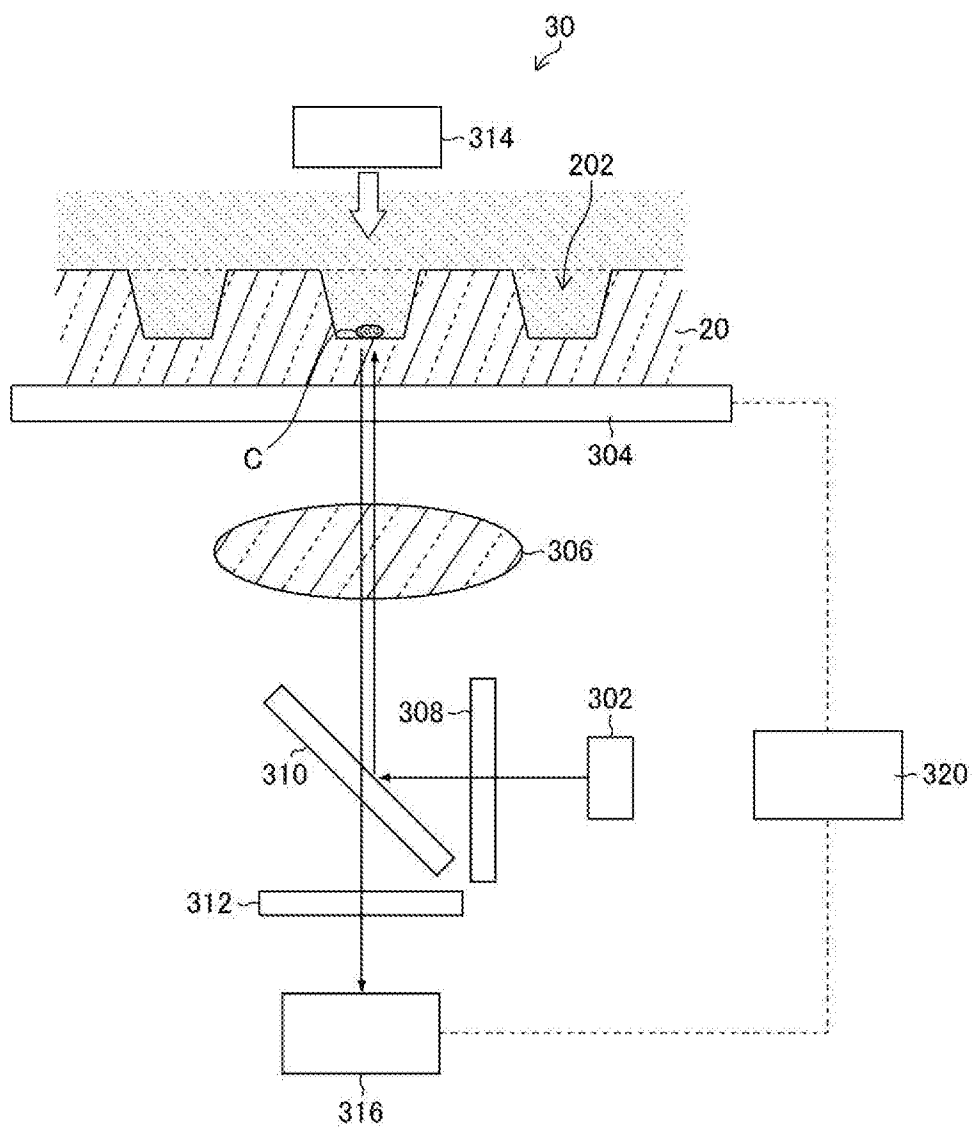
[図9]



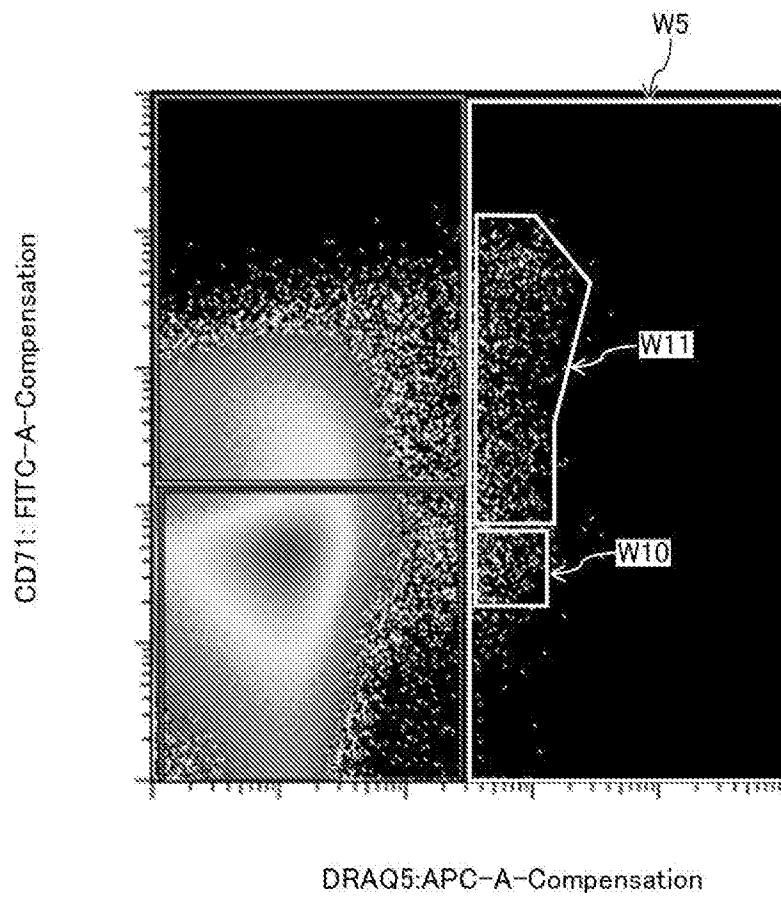
[図10]



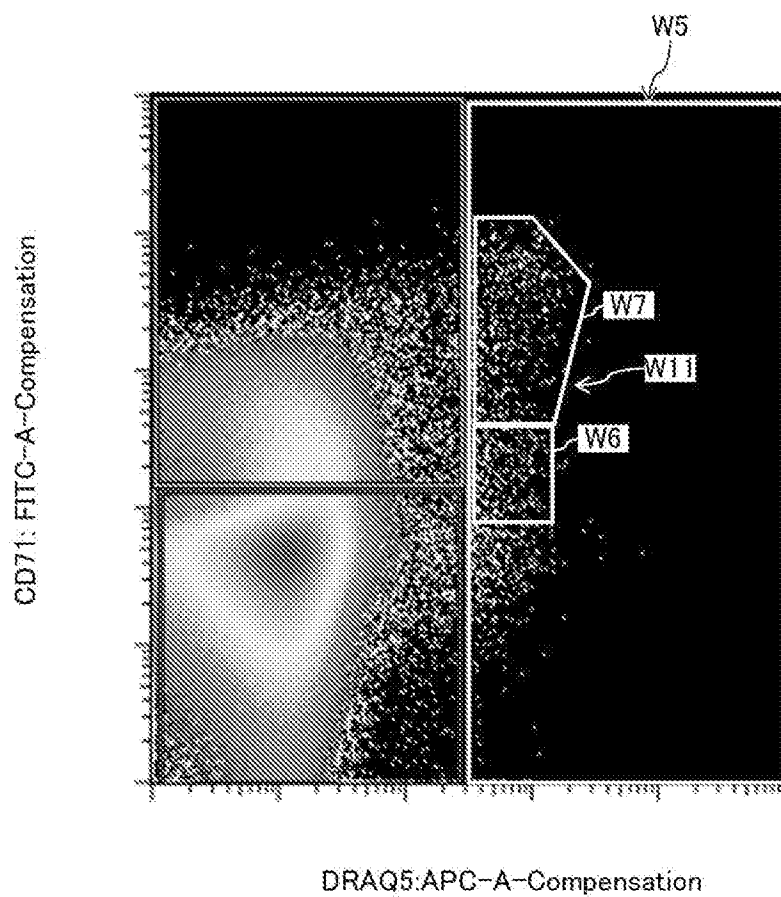
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ZIEGLER, Benedikt L. et al., Surface Antigen Expression on CD34+ Cord Blood Cells: Comparative Analysis by Flow Cytometry and Limiting Dilution (LD) RT-PCR of Chymopapain-Treated or untreated Cells, Cytometry, 1996, Vol.25, Pages 46-57	1-3, 6-9 4, 5, 10
X Y	HARVEY, Barrett R. et al., Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries, PNAS, 2004.06.22, Vol.101, No.25, Pages 9193-9198	1-3, 6-9 4, 5, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 April 2017 (19.04.17)

Date of mailing of the international search report
09 May 2017 (09.05.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005634

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-315862 A (Sysmex Corp.), 10 November 2005 (10.11.2005), claims & US 2005/0221399 A1 claims & EP 1586903 A1 & CN 1677109 A	4, 5, 10
A	JP 09-508270 A (Coulter Corp.), 26 August 1997 (26.08.1997), claims & WO 1995/020148 A1 claims & EP 745217 A1 & AU 1566995 A	1-10
A	JP 2009-207392 A (Olympus Corp.), 17 September 2009 (17.09.2009), claims (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68 (2006.01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	ZIEGLER, Benedikt L. et al., Surface Antigen Expression on CD34+ Cord Blood Cells: Comparative Analysis by Flow Cytometry and Limiting Dilution (LD) RT-PCR of Chymopapain-Treated or untreated Cells, Cytometry, 1996, Vol.25, Pages 46-57	1-3, 6-9 4, 5, 10
X Y	HARVEY, Barrett R. et al., Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries, PNAS, 2004.06.22, Vol.101, No.25, Pages 9193-9198	1-3, 6-9 4, 5, 10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.04.2017

国際調査報告の発送日

09.05.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松岡 徹

4 B

3347

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2005-315862 A (シスメックス株式会社) 2005.11.10, 特許請求の範囲 & US 2005/0221399 A1(Claims) & EP 1586903 A1 & CN 1677109 A	4, 5, 10
A	JP 09-508270 A (クールター コーポレイション) 1997.08.26, 特許請求の範囲 & WO 1995/020148 A1(Claims) & EP 745217 A1 & AU 1566995 A	1-10
A	JP 2009-207392 A (オリンパス株式会社) 2009.09.17, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-10