

(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2016-518811

(P2016-518811A)

(43) 公表日 平成28年6月30日(2016.6.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
G O 6 F 19/18 (2011.01)	G O 6 F 19/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2015-561932 (P2015-561932)	(71) 出願人	515177387
(86) (22) 出願日	平成26年3月17日 (2014. 3. 17)		ザ チャイニーズ ユニバーシティ オブ ホンコン
(85) 翻訳文提出日	平成27年9月2日 (2015. 9. 2)		中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー テリトリーズ, シャー ティン
(86) 国際出願番号	PCT/CN2014/073506	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02014/139477		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014. 9. 18)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	61/789, 992		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多胎妊娠における胎児ゲノムの決定

(57) 【要約】

多胎妊娠において、母性および父性ハプロタイプの遺伝を決定するための技術を提供する。母性遺伝は、母親がヘテロ接合型で父親の遺伝性アレルが分かっている（例えば父親がホモ接合型の）遺伝子座で決定することができる。一方が第一の母性ハプロタイプに見られる父性アレルを有し、もう一方が第二の母性ハプロタイプに見られる父性アレルを有する2種類の遺伝子座を利用してもよい。父性遺伝は、父親がヘテロ接合型で母親がホモ接合型の遺伝子座から決定することができる。各遺伝子座について、異なるアレルの量を測定することができる。その量を比較することで（例えば、各アレルの分画濃度とカットオフ値を用いて）ハプロタイプの遺伝を決定することができる。ハプロタイプを目的の条件と関連付けることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

男性によって受精した女性における 2 人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法であって、

- ・ 第一の染色体上にある 1 つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定すること、ここで、前記女性は各第一の遺伝子座について、対応する第一のアレルと対応する第二のアレルのヘテロ接合型であり、第一の母性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでおり；

- ・ 前記 2 人の胎児が、前記第一の遺伝子座の前記対応する第一のアレルを前記男性から受け継いでいることを決定すること；

- ・ 第一の染色体上にある 1 つ以上の第二の遺伝子座を含む第二の群を同定すること、ここで、前記第二の群の第二の遺伝子座のそれぞれについて、前記第一の母性ハプロタイプは対応する第三のアレルを含み、前記第二の母性ハプロタイプは対応する第四のアレルを含んでいる；

- ・ 前記 2 人の胎児が、前記第二の遺伝子座の前記対応する第三のアレルを前記男性から受け継いでいることを決定すること；

- ・ 前記女性から得られた生体試料に含まれている DNA 断片中の前記第一の遺伝子座に存在する、前記対応する第一のアレルの第一の量および前記対応する第二のアレルの第二の量を測定すること、ここで前記生体試料は前記女性および前記 2 人の胎児に由来する細胞を伴わない DNA を含むものであり；

- ・ 前記生体試料に含まれている DNA 断片上にある前記第二の遺伝子に存在する、前記対応する第三のアレルの第三の量および前記対応する第四のアレルの第四の量を測定すること；

- ・ 以下のように、前記 2 人の胎児における母性ハプロタイプの遺伝を決定すること；

- (i) 前記第一の量が前記第二の量よりも統計的に高く、かつ、前記第三の量と前記第四の量が統計的に等しい場合、胎児が 2 人とも前記第一の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定すること、

- (i i) 前記第一の量と前記第二の量が統計的に等しく、かつ、前記第四の量が前記第三の量よりも統計的に大きい場合、胎児が 2 人とも前記第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定すること、

または、(i i i) 前記第一の量が前記第二の量よりも統計的に大きく、かつ、前記第四の量が前記第三の量よりも統計的に大きい場合、前記胎児のうちの 1 人が前記第一の母性ハプロタイプを受け継いでおり、もう 1 人が前記第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定すること、

を含む、2 人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法。

【請求項 2】

さらに、前記第一の量が前記第二の量よりも統計的に大きく、かつ、前記第三の量と前記第四の量が統計的に等しいことを、

- ・ 前記第一の量と前記第二の量に関する第一の比を算出すること、
- ・ 前記第三の量と前記第四の量に関する第二の比を算出すること、
- ・ 前記第一の比と前記第二の比に関する第三の比を算出すること、および
- ・ 前記第三の比をカットオフ値と比較すること

によって決定することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

さらに、前記第一の量が前記第二の量よりも統計的に大きく、かつ、前記第四の量が前記第三の量よりも統計的に大きいことを、

- ・ 前記第一の量と前記第二の量に関する第一の比を算出すること、
- ・ 前記第四の量と前記第三の量に関する第二の比を算出すること、
- ・ 前記第一の比と前記第二の比に関する第三の比を算出すること、および
- ・ 前記第三の比をカットオフ値と比較すること

によって決定することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

前記第三の比と前記カットオフ値の前記比較することが、前記第三の比が 1 と統計的に等しいか否かを決定する、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

第一の染色体上にある 1 つ以上の第一の遺伝子座を含んでいる前記第一の群を同定することが、前記生体試料中の前記対応する第一のアレルおよび第二のアレルを検出することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 6】

男性が前記第一の群に含まれている各第一の遺伝子座の前記対応する第一のアレルについてホモ接合型で、かつ、前記男性が前記第二の群に含まれている各第二の遺伝子座の前記対応する第四のアレルについてホモ接合型である、請求項 1 の方法。

10

【請求項 7】

前記対応する第一のアレルの前記第一の量および前記対応する第二のアレルの前記第二の量を測定することが、

第一の遺伝子座のそれぞれについて；

- ・前記対応する第一のアレルを含んでいる DNA 断片の第一の数と、前記対応する第二のアレルを含んでいる DNA 断片の第二の数に関する比を決定すること；および
- ・前記比の平均の比を決定すること、

を含む、請求項 1 の方法。

20

【請求項 8】

前記平均の比をカットオフ値と比較することで、前記第一の量が前記第二の量よりも統計的に大きいことを決定することをさらに含む、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

さらに、前記第一の量が前記第二の量よりも統計的に大きいことを、

- ・前記第一の量と前記第二の量から第一の指標を算出すること；および
- ・前記第一の指標をカットオフ値と比較すること、

によって決定することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 10】

前記第一のアレルのうちの 1 つ以上、前記第二のアレルのうちの 1 つ以上、前記第三のアレルのうちの 1 つ以上および / または前記第四のアレルのうちの 1 つ以上が目的の表現型と関連付けられている、請求項 1 の方法。

30

【請求項 11】

前記第二のアレルのうちの 1 つ以上および / または前記第四のアレルのうちの 1 つ以上が常染色体優性の疾患または疾患感受性と関連付けられている、請求項 1 の方法。

【請求項 12】

前記第一のアレルのうちの 1 つ以上および / または前記第二のアレルのうちの 1 つ以上が常染色体劣性の疾患または疾患感受性と関連付けられている、請求項 1 の方法。

【請求項 13】

前記第三のアレルのうちの 1 つ以上および / または前記第四のアレルのうちの 1 つ以上が常染色体劣性の疾患または疾患感受性と関連付けられている、請求項 1 の方法。

40

【請求項 14】

男性によって受精した女性における 2 人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法であって、

- ・第一の染色体上にある 1 つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定すること、ここで、前記女性は各第一の遺伝子座について、対応する第一のアレルと対応する第二のアレルのヘテロ接合型であり、第一の母性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでおり；
- ・前記 2 人の胎児が、前記第一の遺伝子座の前記対応する第一のアレルを前記男性から受け継いでいることを決定すること；

50

・前記女性から得られた生体試料に含まれているDNA断片中の前記第一の遺伝子座に存在する、前記対応する第一のアレルの第一の量および前記対応する第二のアレルの第二の量を測定すること、ここで前記生体試料は前記女性および前記2人の胎児に由来する細胞を伴わないDNAを含むものであり；

・前記第一の量と前記第二の量に関する比を算出すること、

・以下のように、前記2人の胎児における母性ハプロタイプの遺伝を決定すること：

(i) 比が第一のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する、

(ii) 比が第二のカットオフ値よりも小さい場合、両方の胎児が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する、または

(iii) 比が第三のカットオフ値よりは小さく、かつ、第四のカットオフ値よりは大きく、ここで第三のカットオフ値は第一のカットオフ値と等しいかそれ未満で、さらに、第四のカットオフ値が第二のカットオフ値と等しいかそれより大きく、かつ、第三のカットオフ値よりも小さい場合、胎児のうちの1人が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいて、もう1人が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する、を含む、2人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法。

【請求項15】

前記第一の量と前記第二の量に関する前記比を算出することが、

・第一の遺伝子座のそれぞれについて、前記対応する第一のアレルの量と前記対応する第二のアレルの量に対応する比を算出すること；および

・前記対応する比に基づいて前記比をコンピューターで計算することを含む、請求項14の方法。

【請求項16】

前記対応する比に基づく比が、前記対応する比の平均または中央値をコンピューターで計算することを含む、請求項15の方法。

【請求項17】

前記女性が3人の胎児を妊娠していて、前記2人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定することが、

・前記第一の量が前記第二の量と統計的に等しい場合に、前記1つ以上第一の遺伝子座に関し前記3人の胎児がヘテロ接合型であると同定すること、

・前記比が前記第三のカットオフ値よりも小さく、かつ、前記第四のカットオフ値よりも大きい場合に、前記1つ以上の第一の遺伝子座の前記第一のアレルについて、胎児のうちの2人がヘテロ接合型で、胎児のうちの1人がホモ接合型であると同定すること、または

・前記比が前記第一のカットオフ値よりも大きく、かつ、前記第五のカットオフ値よりも小さい場合に、前記1つ以上の第一の遺伝子座の前記第一のアレルについて、胎児のうちの2人がホモ接合型で、胎児のうちの1人がヘテロ接合型であると同定すること、または

・比が第五のカットオフ値よりも大きい場合、第一のアレルについて胎児が3人ともホモ接合型であると同定すること、をさらに含む、請求項14の方法。

【請求項18】

前記第一の群に含まれている前記第一のアレルのうちの1つ以上が状態または感受性に関連付けられており、

・前記ハプロタイプの前記遺伝に基づく前記状態または感受性を、前記胎児のうちの両方が受け継いでいる、どちらも受け継いでいない、または1人が受け継いでいるか否かを決定すること、

をさらに含む、請求項14の方法。

【請求項19】

前記女性が、常染色体劣性の状態または感受性に関連付けられているハプロタイプを有し、かつ、前記胎児のうちの1人または両方が、前記状態または感受性の保因者であると決定される、請求項14の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

男性によって受精した女性における 2 人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法であって、

- ・第一の染色体上にある 1 つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定すること、ここで、前記女性は各第一の遺伝子座について、対応する第一のアレルと対応する第二のアレルのヘテロ接合型であり、第一の母性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでおり；

- ・前記 2 人の胎児が、前記第一の遺伝子座の前記対応する第一のアレルを前記男性から受け継いでいることを決定すること；

- ・第一の染色体上にある 1 つ以上の第二の遺伝子座を含む第二の群を同定すること、ここで、前記第二の群の第二の遺伝子座のそれぞれについて、前記第一の母性ハプロタイプは対応する第三のアレルを含み、前記第二の母性ハプロタイプは対応する第四のアレルを含んでいる；

- ・前記 2 人の胎児が、前記第二の遺伝子座の前記対応する第四のアレルを前記男性から受け継いでいることを決定すること；

- ・前記女性から得られた生体試料に含まれている DNA 断片中の前記第一の遺伝子座に存在する、前記対応する第一のアレルの第一の量および前記対応する第二のアレルの第二の量に関する第一の比を算出すること、ここで前記生体試料は前記女性および前記 2 人の胎児に由来する細胞を伴わない DNA を含むものであり；

- ・前記生体試料に含まれている DNA 断片中の前記第二の遺伝子座に存在する、前記対応する第三のアレルの第三の量および前記対応する第四のアレルの第四の量に関する第二の比を算出すること、ここで前記第一、第二、第三および第四の量は、前記生体試料の測定から得られるものであり；

- ・前記第一の比と第二の比に関する第三の比を算出すること；

- ・以下のように、前記 2 人の胎児における母性ハプロタイプの遺伝を決定すること：

- (i) 第三の比が第一のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する、

- (i i) 第三の比が第二のカットオフ値よりも小さく、ここで第一のカットオフ値が第二のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する、

- (i i i) 第三の比が第三のカットオフ値よりは小さく、かつ、第四のカットオフ値よりは大きく、ここで第三のカットオフ値は第一のカットオフ値と等しいかそれ未満で、さらに、第四のカットオフ値が第二のカットオフ値と等しいかそれより大きく、かつ、第三のカットオフ値よりも小さい場合、胎児のうちの 1 人が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいて、もう 1 人が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する、

を含む、2 人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法。

【請求項 21】

前記第三のカットオフ値が前記第一のカットオフ値と等しく、前記第四のカットオフ値が前記第二のカットオフ値と等しい、請求項 20 の方法。

【請求項 22】

さらに、前記第三の比が第一のカットオフ値よりも大きいことを、

- ・前記第三の比を 1 と比較すること；および

- ・前記第三の比が 1 よりも大きいときに、前記第三の比を前記第一のカットオフ値と比較すること、

によって決定することを含む、請求項 20 の方法。

【請求項 23】

さらに、前記第三の比が第三のカットオフ値よりも小さく、かつ、第四のカットオフ値よりも大きいことを、

- ・前記第三の比が 1 と統計的に等しいと決定すること、

によって決定することを含む、請求項 20 の方法。

【請求項 24】

さらに、

・第一の胎児が寄与している胎児DNAパーセンテージの第一の割合 ($a\%$) および第二の胎児が寄与している胎児DNAパーセンテージの第二の割合 ($b\%$) を決定すること、ここで前記第一、第二、第三、および第四のカットオフ値は、 $a\%$ および $b\%$ に基づいて決定される、

を含む、請求項 20 の方法。

【請求項 25】

前記第一のカットオフ値が、 $(1 + a\% + b\%) / 1$ と $(50\% + a\% / 2) / (50\% + b\% / 2)$ を区別するものである、請求項 24 の方法。

10

【請求項 26】

前記第二のカットオフ値が、 $1 / (1 + a\% + b\%)$ と $(50\% + a\% / 2) / (50\% + b\% / 2)$ を区別するものである、請求項 24 の方法。

【請求項 27】

工程 (i) が前記第一の比が前記第二の比よりも統計的に大きいかなんかを決定することを含み、工程 (ii) が第二の比が前記第一の比よりも統計的に大きいかなんかを決定することを含み、および工程 (iii) が前記第一の比と前記第三の比が統計的に等しいと決定することを含む、請求項 20 の方法。

【請求項 28】

男性によって受精した女性における 2 人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法であって、

20

・第一の染色体上にある 1 つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定すること、ここで、前記女性は各第一の遺伝子座について、対応する第一のアレルと対応する第二のアレルのヘテロ接合型であり、第一の母性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでいて、かつ、前記男性は前記第一の遺伝子座についてヘテロ接合型であり；

・前記女性から得られた生体試料に含まれている DNA 断片中の前記第一の遺伝子座に存在する、前記対応する第一のアレルの第一の量を測定すること、ここで前記生体試料は前記女性および前記 2 人の胎児に由来する細胞を伴わない DNA を含むものであり；

30

・第一の遺伝子座から、生体試料に含まれている DNA 断片の第二の量を測定すること；

・前記第一の量と前記第二の量に関する比を算出すること、

・以下のように、前記 2 人の胎児における母性ハプロタイプの遺伝を決定すること：

(i) 比が第一のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する、および

(ii) 比が第二のカットオフ値よりも小さい場合、両方の胎児が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する、

を含む、2 人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法。

【請求項 29】

第一の父性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでいる、請求項 28 の方法。

40

【請求項 30】

前記 2 人の胎児における母性ハプロタイプの遺伝を決定することが、前記比が 50% と統計的に等しい場合に、

・前記 1 つ以上の第一の遺伝子座について、胎児が両方ヘテロ接合型である、または

・胎児のうちの 1 人が前記第一のアレルについてホモ接合型で、もう 1 人の胎児が前記第二のアレルについてホモ接合型である、

ことの 2 つの可能性を同定することを含む、請求項 29 の方法。

【請求項 31】

前記 2 人の胎児における母性ハプロタイプの遺伝を決定することが、

・前記比が前記第二のカットオフ値より大きく、第三のカットオフ値より小さく、かつ、

50

前記第三のカットオフ値が前記第一のカットオフ値より小さいときに、胎児のうちの1人が前記第二のアレルについてホモ接合型で、もう1人の胎児が前記1つ以上の第一の遺伝子座についてヘテロ接合型であると同定すること、を含む、請求項29の方法。

【請求項32】

前記2人の胎児における母性ハプロタイプの遺伝を決定することが、
・前記比が前記第一のカットオフ値より小さく、第四のカットオフ値より大きく、かつ、前記第四のカットオフ値が前記第三のカットオフ値より大きいときに、胎児のうちの1人が前記第一のアレルについてホモ接合型で、もう1人の胎児が前記1つ以上の第一の遺伝子座についてヘテロ接合型であると同定することを含む、請求項31の方法。

10

【請求項33】

第一の父性ハプロタイプが対応する第三のアレルを含み、第二の父性ハプロタイプが対応する第四のアレルを含んでいる、請求項28の方法。

【請求項34】

前記2人の胎児における母性ハプロタイプの遺伝を決定することが、前記比が前記第一のカットオフ値より小さく、かつ、前記第二のカットオフ値よりも大きいときに、
・胎児のうちの1人が、前記第一のアレルと、前記第三のアレルまたは第四のアレルのいずれかについてヘテロ接合型である、および
・もう1人の胎児が、前記第二のアレルと、前記第三のアレルまたは第四のアレルのいずれかについてヘテロ接合型である可能性を同定することを含む、請求項33の方法。

20

【請求項35】

男性によって受精した女性における2人の胎児の父性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法であって、
・第一の染色体上にある1つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定すること、ここで、前記男性は各第一の遺伝子座について、対応する第一のアレルと対応する第二のアレルのヘテロ接合型であり、第一の父性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の父性ハプロタイプは第二のアレルを含んでいて、かつ、前記女性は前記第二のアレルのホモ接合型であり；
・前記女性から得られた生体試料に含まれているDNA断片中の前記第一の遺伝子座に存在する、前記対応する第一のアレルの第一の量を測定すること、ここで前記生体試料は前記女性および前記2人の胎児に由来する細胞を伴わないDNAを含むものであり；
・前記第一の量を正規化して、正規化された第一の量を得ること；
・前記正規化された第一の量を1つ以上のカットオフ値と比較すること；
・前記比較に基づいて、前記第一の父性ハプロタイプを前記胎児のうちの1人が受け継いでいる、胎児両方が受け継いでいる、またはどちらの胎児も受け継いでいない、のいずれかであると決定すること；
を含む、2人の胎児の父性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法。

30

【請求項36】

さらに、
・前記生体試料における、前記2人の胎児のうちの片方または両方の胎児に由来する胎児DNAのパーセンテージを決定すること；および
・前記胎児DNAのパーセンテージに基づいて、前記1つ以上のカットオフ値を決定すること、を含む、請求項35の方法。

40

【請求項37】

前記正規化された第一の量を第一のカットオフ値および第二のカットオフ値と比較し、前記正規化された第一の量が前記第二のカットオフ値よりも小さい場合には前記胎児はいずれも前記第一の父性ハプロタイプを受け継いでいないと決定し、前記正規化された第一

50

の量が前記第二のカットオフ値よりも大きく、かつ、前記第一のカットオフ値よりも小さい場合には、前記胎児のうちの 1 人が前記第一の父性ハプロタイプを受け継いでいると決定し、ならびに前記正規化された第一の量が前記第一のカットオフ値よりも大きい場合には前記胎児は 2 人とも前記第一の父性ハプロタイプを受け継いでいると決定する、請求項 35 の方法。

【請求項 38】

前記第一の量を正規化し、正規化された第一の量を得ることが、

- ・前記生体試料に含まれている DNA 断片上にある第一の遺伝子座に存在している、前記対応する第二のアレルの第二の量を測定すること；および
- ・前記第一の量の前記第二の量に対する比を算出し、前記正規化された第一の量を得ること

を含む、請求項 35 の方法。

10

【請求項 39】

前記比が、第一の量と第二の量の和で割った第一の量である、請求項 38 の方法。

【請求項 40】

前記比較に基づいて、前記第一の父性ハプロタイプを前記胎児のうちの 1 人が受け継いでいる、胎児両方が受け継いでいる、またはどちらの胎児も受け継いでいない、のいずれかであると決定することが、

- ・前記正規化された第一の量が 0 よりも統計的に大きい、第一のカットオフ値よりも小さい場合に、前記胎児のうちの 1 人だけが前記ハプロタイプを受け継いでいると同定すること；または
- ・前記正規化された第一の量が第二のカットオフ値よりも大きい場合に、前記胎児が 2 人とも前記ハプロタイプを受け継いでいると同定すること、

を含む、請求項 35 の方法。

20

【請求項 41】

さらに、

- ・前記第一の染色体上にある 1 つ以上の第二の遺伝子座を含む第二の群を同定すること、ここで、前記男性は各第二の遺伝子座について、対応する第三のアレルと対応する第四のアレルのヘテロ接合型であり、前記第一の父性ハプロタイプは第三のアレルを含み、前記第二の父性ハプロタイプは第四のアレルを含んでいて、かつ、前記女性は前記第三のアレルについてホモ接合型であり；
- ・前記生体試料に含まれている DNA 断片上にある第二の遺伝子座に存在している、前記対応する第四のアレルの第二の量を測定すること；
- ・前記第二の量を正規化して、正規化された第二の量を得ること；
- ・前記正規化された第二の量を 1 つ以上のカットオフ値と比較すること；
- ・前記比較に基づいて、前記第二の父性ハプロタイプを前記胎児のうちの 1 人が受け継いでいる、胎児両方が受け継いでいる、またはどちらの胎児も受け継いでいない、のいずれかであると決定すること、

を含む、請求項 35 の方法。

30

【請求項 42】

さらに、

- ・前記第一のおよび第二の父性ハプロタイプの遺伝に関する前記決定を利用して、前記第一のおよび第二の父性ハプロタイプを、胎児のうちの 1 人が受け継いでいる、胎児両方が受け継いでいる、または前記胎児は 2 人ともそれらを受け継いでいない、のいずれかであると決定すること、

を含む、請求項 41 の方法。

40

【請求項 43】

前記第一のアレルのうちの 1 つ以上および / または前記第二のアレルのうちの 1 つ以上が目的の表現型と関連付けられている、請求項 35 の方法。

【請求項 44】

50

前記目的の表現型が疾患または疾患感受性である、請求項 35 の方法。

【請求項 45】

前記父性ハプロタイプが常染色体劣性の状態または感受性に関連付けられており、かつ、前記胎児のうちの 1 人または両方が、前記状態または感受性の保因者であると決定される、請求項 35 の方法。

【請求項 46】

前記生体試料が血漿である、請求項 1 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

測定する工程が、前記生体試料に含まれている DNA の配列決定を含む、請求項 1 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 48】

操作を実施するようにコンピューターシステムを制御するための複数の指示を格納しているコンピューターで読み込み可能なメディアを備えている、コンピュータープログラム製品であって、前記指示は、請求項 1 ~ 47 のいずれか 1 項に記載の方法を含む、コンピュータープログラム製品。

【請求項 49】

請求項 1 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するように構成された 1 つ以上のプロセッサを含む、システム。

【請求項 50】

生体試料に含まれている DNA の配列を決定するように構成されている装置をさらに含む、請求項 49 のシステム。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本発明は基本的に母体試料に基づく胎児ゲノムの解析に関し、より具体的には、母体試料に含まれているゲノム断片の解析に基づく多胎妊娠における胎児ゲノム全体または一部を決定することに関する。

【背景技術】

【0002】

30

関連出願への相互参照

本出願は、2013 年 3 月 15 日に出願の、名称を「多胎妊娠に関する胎児ゲノムの決定 (Determining Fetal Genomes For Multiple Fetus Pregnancies)」とする米国仮特許出願第 61/789,992 号の優先権を主張し、その全体は全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本出願は、Lo らによる、名称を「母体生体試料による胎児ゲノム解析 (Fetal Genomic Analysis From A Maternal Biological Sample)」とする共有の米国特許出願第 2011/0105353 号および Lo らによる、名称を「多胎妊娠の分子検査 (Molecular Testing Of Multiple Pregnancies)」とする米国特許出願第 2013/0059733 号に関連し、それら開示は全体として参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0004】

背景

1997 年、母体血漿中に細胞を伴わない胎児の核酸が存在することが発見されたことから、非侵襲性出生前診断に関する新たな可能性が広がった (Lo Y M D et al Lancet 1997; 350: 485-487 および米国特許第 6,258,540 号)。この技術は直ちに、胎児由来の、部分的に遺伝性の遺伝子または配列を用いた臨床上の応用、例えば胎児の性別判定、胎児の RhD の状態の判定、および胎児が遺伝性もしくは部分的に遺伝性の変異を持っているか否かの判定などに変換された (Amicucci P et al Clin Chem 2000; 46: 301-302; Saito H et al Lancet 2000; 356: 1170; and Chiu R W K et al Lancet 2002; 360: 9

50

98-1000)。近年のこの分野における進歩から、母体の血漿中に含まれる核酸の解析による胎児の染色体異常、例えば21番染色体トリソミーの出生前診断が可能になった(Lo Y M D et al Nat Med 2007; 13: 218-223; Tong Y K et al Clin Chem 2006; 52: 2194-2202; 米国特許公開第2006/0252071号; Lo Y M D et al Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 13116-13121; Chiu R W K et al Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 20458-20463; Fan H C et al Proc Natl Acad Sci 2008; 105: 16266-16271; 米国特許公開第2007/0202525号; および同第2009/0029377号)。

【0005】

別の分野における最近の成果の中では、母親と父親の双方が同じ変異を有する単一遺伝子疾患の非侵襲的な出生前診断に関する単一分子カウント法、例えばデジタルPCRの使用が有効である。これは、母体血漿に含まれる相対的な変異量(RMD)の解析によって達成された(米国特許出願第2009/0087847号; Lun F M F et al Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 19920-19925; およびChiu R W K et al. Trends Genet 2009; 25: 324-331)。

【0006】

しかしながらこのような方法では、突然変異が起こる可能性に関して既に分かっている知識を使用してゲノムの特定の部分を解析するため、不顕性のもしくは珍しい突然変異または遺伝的疾患を同定できない可能性がある。さらに、在胎している双子の接合型に関する情報は一般的に、超音波スキャン(Chauhan SP et al. Am J Obstet Gynecol 2010; 203: 305-315)または侵襲性の出生前診断(例えば羊水穿刺)(Chen CP et al. Hum Reprod 2000; 15: 929-934)によって得られてきた。

【0007】

そのため、非侵襲性の技術を使って多胎妊娠における胎児ゲノムの全体または一部を同定することが可能な新しい方法、システム、および装置の提供が望まれている。

【発明の概要】

【0008】

概要

本発明の態様では、多胎妊娠におけるハプロタイプの母性および父性遺伝を決定するための方法、システム、および装置を提供する。母性遺伝は、母親がヘテロ接合型で父親の遺伝性アレルが分かっている(例えば父親がホモ接合型の)遺伝子座で決定することができる。一方が第一の母性ハプロタイプに見られる父性アレルを有し、もう一方が第二の母性ハプロタイプに見られる父性アレルを有する2種類の遺伝子座を利用してよい。父性遺伝は、父親がヘテロ接合型で母親がホモ接合型の遺伝子座から決定することができる。各遺伝子座について、異なるアレルの量を測定することができる。その量を比較することで(例えば、各アレルとカットオフ値の分画濃度(fractional concentration)を用いて)ハプロタイプの遺伝を決定することができる。ハプロタイプを目的的条件と関連づけることができる。

【0009】

いくつかの態様は、本明細書に記載の方法に関連するシステムおよびコンピューターで読み込み可能なメディアに関する。

【0010】

以下に示す詳細な説明および添付の図面を参照することで、本発明の態様の本質および利点をより深く理解することができるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1では、本発明の態様による、母親がホモ接合型で、父親がヘテロ接合型の遺伝子座の例を2つ示している。

【図2】図2は、本発明の態様による、多胎妊娠の胎児における父性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法200のフローチャートである。

【図3】図3は、本発明の態様による、2種類の遺伝子座の同定を利用した、父性および

10

20

30

40

50

母性ハプロタイプの仮説を示している。

【図 4 A】図 4 A では、図 3 に示した遺伝子座について、両方の胎児が母親由来の H a p I を有している例を示している。

【図 4 B】図 4 B は、両方の胎児が母親由来の H a p I を有している場合の、父親と母親で共通のアレル (A アレル) の母体血漿中での分画濃度の算出の例を示している。

【図 5 A】図 5 A では、図 3 に示した遺伝子座について、両方の胎児が母親由来の H a p I I を有している例を示している。

【図 5 B】図 5 B は、両方の胎児が母親由来の H a p I I を有している場合の、父親と母親で共通のアレル (A アレル) の母体血漿中での分画濃度の算出の例を示している。

【図 6 A】図 6 A では、図 3 に示した遺伝子座について、片方の胎児が母親由来の H a p I を有しており、もう片方の胎児が母親由来の H a p I I を有している例を示している。

【図 6 B】図 6 B は、片方の胎児が母親由来の H a p I を有しており、もう片方の胎児が母親由来の H a p I I を有している場合の、父親と母親で共通のアレル (A アレル) の母体血漿中での分画濃度の算出の例を示している。

【図 7 A】図 7 A では、2 人の胎児が母親由来のハプロタイプを有している 3 種類の状況に関して、母性特異的アレル (B アレル) および父親と母親に共通のアレル (A アレル) の分画濃度を示している。

【図 7 B】図 7 B は、特定の種類の全ての遺伝子座について、各情報 S N P 遺伝子座のそれぞれの分画濃度をどのように利用すれば共通のアレル (A アレル) の分画濃度が予測できるかを示している。

【図 8】図 8 は、本発明の態様による、両方の遺伝子座を利用した母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法 8 0 0 のフローチャートである。

【図 9】図 9 は、本発明の態様による、片方の遺伝子座を利用した母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法 9 0 0 のフローチャートである。

【図 1 0 A】図 1 0 A は、両方の胎児が母親由来の H a p I を有しており、各胎児が異なるパーセンテージの胎児 D N A に寄与している場合の、母体血漿中に含まれている 型および 型 S N P における共通アレル (A アレル) の分画濃度を示している。

【図 1 0 B】図 1 0 B は、両方の胎児が母親由来の H a p I I を有しており、各胎児が異なるパーセンテージの胎児 D N A に寄与している場合の、母体血漿中に含まれている 型および 型 S N P における共通アレル (A アレル) の分画濃度を示している。

【図 1 1 A】図 1 1 A は、片方の胎児が母親由来の H a p I を有しており、もう片方の胎児が母親由来の H a p I I を有している、各胎児が異なるパーセンテージの胎児 D N A に寄与している場合の、母体血漿中に含まれている 型および 型 S N P における共通アレル (A アレル) の分画濃度を示している。

【図 1 1 B】図 1 1 B は、3 つの条件における、 および 型 S N P を用いた A アレルの分画濃度、ならびにこれら 2 つの濃度の比に関する表 1 1 5 0 を示している。

【図 1 2】図 1 2 は、本発明の態様による、両方の遺伝子座から得られる値の比を利用した母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法 1 2 0 0 のフローチャートである。

【図 1 3】図 1 3 は、本発明の態様による、母親と父親の両方がヘテロ接合で、男性によって受精した女性における 2 人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法 1 3 0 0 のフローチャートである。

【図 1 4 A】図 1 4 A は、例 1 に関して予想される / 比の分布を示している。

【図 1 4 B】図 1 4 B は、例 2 に関して予想される / 比の分布を示している。

【図 1 5】図 1 5 は、例 1 について、4 番染色体長腕にある染色体セグメントを R H D O 解析した結果を示している表 1 5 0 0 である。

【図 1 6】図 1 6 は、例 2 について、4 番染色体長腕にある染色体セグメントを R H D O 解析した結果を示している表 1 6 0 0 である。

【図 1 7】図 1 7 は、本発明の態様によるシステムおよび方法で使用可能なコンピュータシステム 1 0 の例をブロック図で示している。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

定義

本開示で使用する場合「生体試料」という用語は、対象（例えば、妊娠している女性などのヒト）から得られ、かつ、目的の核酸分子を1種以上含んでいる全ての試料を指す。本発明の実施に有用な試料としては血漿、血清、血液細胞、白血球、網状赤血球、および全血が挙げられる。いくつかの目的では、唾液、胸膜液、汗、腹水、胆汁、尿、腓液、便または子宮頸スミア試料も使用することができる。

【 0 0 1 3 】

「遺伝子座」またはその複数形の「遺伝子座」という用語は、ゲノム全体の中で差異のある任意の長さのヌクレオチド（または塩基対）の位置、つまり配置されている場所である。

10

【 0 0 1 4 】

本明細書で使用する場合「遺伝子座」またはその複数形の「遺伝子座」という用語は、ゲノム全体の中で差異のある任意の長さのヌクレオチド（または塩基対）の位置、つまり配置されている場所である。「アレル」という用語は、物理的にゲノムの同じ位置にある遺伝子座の、別のDNA配列を指し、アレルは場合によって、異なる表現型を生じ得る。各染色体について（ヒト男性対象の性染色体は除く）2つのコピーを有する任意の特定の二倍体生物では、各遺伝子の遺伝子型はその遺伝子座に、ホモ接合型では同じでヘテロ接合型では異なる1対のアレルを含む。ある生物の集団または種は通常、各遺伝子座に、個体ごとにことなる複数のアレルを含んでいる。その集団で2つ以上のアレルが存在するゲノム遺伝子座を多型部位と呼ぶ。遺伝子座のアレル変異は、存在するアレルの数（つまり多型の程度）、またはその集団に占めるヘテロ接合型の部分（つまりヘテロ接合型の割合）として測定することができる。ある遺伝子座が配列を含む場合も、またはその配列を含まない可能性もあるため、ある配列（例えば遺伝子）が存在することまたは欠損していることもアレル変異の一種と考えられている。そのような配列（例えばRHD遺伝子）の欠損は、例えば、通常は欠失している配列の前後にある配列の接合部によって、同定することができる。本明細書で使用する場合「多型」という用語は、その頻度にかかわらず、ヒトゲノム中に見られる個体間のいずれもの変異を指す。そのような変異の例としては、これらには限定されないが、一塩基多型、単純縦型反復多型、挿入 - 欠損型多型、突然変異（これは疾患の原因となりうる）およびコピー数多型が挙げられる。

20

30

【 0 0 1 5 】

「ハプロタイプ」という用語は、同じ染色体または染色体領域に共に伝達される複数の遺伝子座のアレルの組み合わせを指す。ハプロタイプは、わずか1対の遺伝子座もしくは染色体領域、または染色体の全体を指す場合もある。

【 0 0 1 6 】

「染色体領域」とは、特定の染色体に関する複数のヌクレオチドのある位置を指す。染色体領域は染色体全体であっても、それよりは小さい小区分であってもよい。正常なヒトの染色体領域には、それぞれがその領域を含んでいる染色体のどちらかのコピーに位置している、2つのハプロタイプがある。2つのハプロタイプはその染色体領域中で同じであってもまたは異なってもよい。

40

【 0 0 1 7 】

本開示で使用する場合「カットオフ値」または「量」という用語は、生物試料の2つ以上の分類（例えば、特定の表現型の状態または疾患に関連しているまたは関係している遺伝配列の存在または欠損、あるいは表現型の状態または疾患に対する感受性の有無）を区別するのに用いられる数値または量を意味する。例えば、指標がカットオフ値を超える場合には、定量データの第一の分類が生成され、または、指標がカットオフ値に満たない場合には、定量データの別の分類が生成される。

【 0 0 1 8 】

詳細な説明

態様によって、多胎妊娠における母性および父性ハプロタイプの遺伝を決定することが

50

できる。父性遺伝は、父親がヘテロ接合型で母親がホモ接合型の遺伝子座から決定することができる。父親特異的アレルの量（例えば、それらアレルの分画濃度）を利用して、何人の胎児に父親特異的アレルを有するハプロタイプが遺伝しているのかを決定することができる。胎児における父親由来のハプロタイプについて知ること、胎児に受け継がれた母親由来のハプロタイプを決定することができる。

【0019】

母性遺伝は、母親がヘテロ接合型で父親の遺伝性アレルが分かっている（例えば、父親がホモ接合型であるか、父親由来のハプロタイプが決定されている）遺伝子座で決定することができる。2種類の遺伝子座を利用することができる。一方が第一の母性ハプロタイプに見られる父性アレルを有し、もう一方が第二の母性ハプロタイプに見られる父性アレルを有する。各遺伝子座について、異なるアレルの量を測定することができる。その量を比較することで（例えば、各アレルとカットオフ値の分画濃度を用いて）ハプロタイプの遺伝を決定することができる。また、ハプロタイプを目的の条件に関連づけることができ、この目的のハプロタイプに関しては、どの父性および/または母性ハプロタイプが遺伝性であるかの否かの決定に基づいて、遺伝性であるかまたは遺伝性でないかを決定することができる。

10

【0020】

I．接合性

多胎妊娠とは、女性が2人以上の胎児を妊娠していることを指す。多胎妊娠の中で最も多く見られるのは双胎である。双胎は、一卵性（同一）および二卵性（同一ではない）によって特徴付けることができる。主に双子について議論しているが、より多い数の胎児についても側面を応用することができる。

20

【0021】

母体血漿中に含まれているDNA断片の解析は、双胎妊娠、特に二卵性（同一でない）の場合により複雑になる。母体血漿中の特定のハプロタイプまたは特定の疾患に関連している多型が胎児由来だと同定されたとしても、両方の胎児が影響しているのか、あるいは一方の胎児が影響しているのかをどうやって決定すれば良いのかという新たな問題が生じる。

【0022】

A．一卵性双生児

女性が、一卵性双生児を妊娠している場合、その胎児の遺伝解析は単胎妊娠の場合と同様になる可能性がある。けれども、二卵性双生児の可能性があるために、解析はより複雑になる。父性遺伝の解析については、母方のゲノムには存在していない父性アレルを、どの父性アレルが胎児に受け継がれているかを決定するためのマーカーとして利用することができる。特定のアレルが、父親の特定のハプロタイプにのっていることが分かっている場合には、特定のハプロタイプが少なくとも1人の胎児に（一卵性の場合には両方の胎児に）受け継がれているかを決定することができる。

30

【0023】

どの母性アレルが胎児に受け継がれているにかかわらず、2つの母性アレルが母体血漿中で検出できるため、母性アレルの遺伝を解析するには、複雑な定量的なアプローチが必要である。母体血漿に含まれている2つの母性アレルの相対量を比較し、胎児に受け継がれているアレルがより高濃度で含まれるだろうと予測することができる。別の態様では、母体血漿に含まれている2つの母性ハプロタイプの相対量を比較する。血漿試料中のDNA量が限られている場合には、このハプロタイプの相対量を利用するアプローチによってより正確な結果が得られるだろう。ハプロタイプの相対量を利用するアプローチの詳細については、米国特許第8,467,976号に見ることができ、これは参照することにより本明細書に組み込まれる。

40

【0024】

B．二卵性双生児

胎児が二卵性双生児の場合、この2人の胎児は両親のそれぞれから、同じまたは異なる

50

アレルを受け継ぐ可能性がある。この場合、どの父性および母性アレルがそれぞれの胎児に遺伝しているかを決定するためには、より複雑な遺伝解析が必要になる。この情報は、一遺伝性の疾患や他の状態の解析に有用である。

【 0 0 2 5 】

態様では、多胎妊娠の場合に、親から胎児に受け継がれるハプロタイプの解析のための技術を説明する。この解析は父性遺伝の解析と、母性遺伝の解析に分けられる。

【 0 0 2 6 】

I I . 父性遺伝の解析

どの父性ハプロタイプが胎児に受け継がれているかの決定は、父親に関する遺伝子型および / またはハプロタイプ情報が分かっている場合に実施することができる。いくつかの態様では、父性特異的ハプロタイプの同定と測定による、父性遺伝の決定方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

A . 父性特異的ハプロタイプの同定

父性遺伝の決定は、母親がホモ接合型で、父親がヘテロ接合型の遺伝子座を解析することで実施することができる。そのような例では、胎児特異的アレルは父親から、胎児のうちの一方または両方に受け継がれたものである可能性がある。

【 0 0 2 8 】

図 1 では、本発明の態様による、母親がホモ接合型で、父親がヘテロ接合型の遺伝子座の例を 2 つ示している。これら 2 つの遺伝子座、1 1 0 と 1 2 0 は互いに近接しており、一回の減数分裂の間に、これら 2 つの遺伝子座の間で組換えが起こる可能性は低い。この例では、遺伝子座 1 1 0 の父性 A アレルは母性アレルと同じで、父性 B アレルは母親には存在しないため父親特異的である。同様に、遺伝子座 1 2 0 の C アレルの父親特異的である。

【 0 0 2 9 】

一態様では、2 つの遺伝子座の父親特異的アレルの相 (phase) を決定することができる。アレルの相は、これらのアレルが同じ染色体上にあるか、または相同ではあるが異なる染色体上にあるかに関する、これらアレルの関係を指す。同じ染色体上にある種々の遺伝子座のアレルがハプロタイプを形成する。各父性ハプロタイプについて解析された特定の遺伝子座の数が増えると、より多くの父親特異的アレルを検出することができるため、母体血漿に含まれる父親特異的アレルの検出感度も上がる可能性がある。検出された父親 - 特異的アレルの数が増えれば、胎児の父性遺伝の予測精度が上がる。

【 0 0 3 0 】

次に、これら 2 つの遺伝子座の父親特異的アレルについて母体血漿 DNA を解析する。母体血漿中のこれら父親特異的アレルの検出には、当業者に知られている種々の技術を使用することができる。これらの方法の例としては、これらには限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、デジタル PCR、アレル特異的 PCR、DNA 配列決定、プライマーエクステンション反応、質量分析を利用する方法および次世代シーケンシングが挙げられる。

【 0 0 3 1 】

2 人の胎児が同じ父性ハプロタイプを受け継いでいるかを決定するためには、2 つの父性ハプロタイプのそれぞれについて、少なくとも 1 つの父親特異的アレルを解析することができる。図 1 では、2 つの父性ハプロタイプである H a p I I と H a p I V を示している。一例では、母体血漿の解析で遺伝子座 1 1 0 に関して B アレルが検出されれば、父性ハプロタイプの H a p I V が少なくとも 1 人の胎児に遺伝していると予測される。同様に、母体血漿の解析で遺伝子座 1 2 0 に関して C アレルが検出されれば、父性ハプロタイプの H a p I I I が少なくとも 1 人の胎児に遺伝している。双胎妊娠では、母体血漿中に 2 つの父性ハプロタイプのそれぞれに位置している父親特異的アレルが含まれていれば、これは、2 人の胎児が遺伝的に異なる父性ハプロタイプを有することを示している。母体血漿中に、遺伝子座 1 1 0 の父親特異的アレル (B アレル) だけが認められ、遺伝子座 1 2

10

20

30

40

50

0 の父親特異的アレルが (C アレル) 認められなかった場合には、胎児は 2 人とも父性 H a p I V を受け継いでいる。同様に、母体血漿中に、遺伝子座 1 2 0 の父親特異的アレル (C アレル) だけが認められ、遺伝子座 1 1 0 の父親特異的アレルが (B アレル) 認められなかった場合には、胎児は 2 人とも父性 H a p I I I を受け継いでいる。

【0032】

母体血漿を使った父性ハプロタイプにおける父親特異的アレルの検出性は、それぞれの胎児に由来する D N A の分画濃度、および各父親特異的アレルの検出感度に影響を受ける可能性がある。胎児 D N A 濃度の割合が低い場合には、胎児が父親特異的アレルを受け継いでいるとしても、そのアレルが母体血漿からは検出されない可能性がある。父性ハプロタイプが胎児に遺伝していないと誤った結論を下す可能性を下げるためには、父性ハプロタイプを形成しているより多くの数の父親特異的アレルを解析することができる。

10

【0033】

B . 父性遺伝の決定方法

図 2 は、本発明の態様による、多胎妊娠の胎児における父性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法 2 0 0 のフローチャートである。態様では、二卵性双生児における父性遺伝を解析することができる。方法 2 0 0 では、2 人以上の胎児を妊娠している女性から得られた生体試料を使用することができる。この生体試料は、女性と 2 人の胎児に由来する、細胞を伴わない D N A を含むものである。血液関連試料、例えば血漿、血清、血液細胞、白血球、網状赤血球、または全血が使用されることが多い。他の種類の試料としては、尿、唾液、膣液、女性生殖器洗浄液、涙および汗がある。

20

【0034】

生体試料を、デジタル P C R、配列決定、または他の好適な技術などの様々な技術によって解析することができる。この解析から、ゲノム中にある測定の遺伝子座のアレル数カウントを得ることができる。例えば、配列リードを参照ゲノムと整列させ、配列リード中にあるアレルをメモリに保存することができる。別の態様では、特定の遺伝子座およびアレルに関する標識したプローブに対応する D N A 断片を含んでいるウェルの数 (または R T - P C R に用いた特定のウェル中の量) が、P C R シグナルで示される可能性がある。方法 2 0 0 はコンピューターシステムによって遂行することができる。

【0035】

ブロック 2 1 0 では、第一の染色体上にある 1 つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定する。各遺伝子座で、父親は第一のアレルと第二のアレルのヘテロ接合型であり、母親は第一のアレルのホモ接合型である。第一のアレルは、第一の染色体領域 (例えば、染色体全体または染色体の一部) の第一のハプロタイプに含まれる。第二の父性ハプロタイプは第二のアレルを含んでいる。

30

【0036】

母親の遺伝子型を当業者に知られている様々な方法で解析することができる。例えば、母親の細胞から抽出した D N A を解析し、アレルが 1 つだけ検出された遺伝子座をホモ接合型と同定することができる。

【0037】

父親の第一のハプロタイプを様々な方法で決定することができる。一態様では、父親の遺伝型を同定し、ハプロタイプを、父親に対応する特定の集団から決定することができる参照ハプロタイプ (例えば、特定の人種について決定された参照) に基づいて決定することができる。別の態様では、父親の生体試料を解析し、第一のハプロタイプを決定することができる。

40

【0038】

ブロック 2 2 0 では、生体試料に含まれている D N A 断片上にある第一の遺伝子座に関し、第一のアレルそれぞれの第一の量を測定する。前述の通り、第二の量は配列リードまたは P C R リードを受け取るコンピューターによって決定することができる (例えば、ウェルの数に対応する色シグナルによって)。コンピューターによって、特定の第一の遺伝子座に対応する D N A 断片の数を決定することができ、また、第二のアレルを含んでいる

50

そのようなDNA断片の数を計数することができる（例えば、特定の色を示しているウェルの数、または整列させた配列リードの中で、第二のアレルを含んでいる配列リードの数によって）。

【0039】

いくつかの態様において解析は、コンピューターによって、これまでに得られている配列データを利用して行われる。好適な技術の選択肢には、米国特許第2011/0105353号A1および米国特許第2013/0059733号A1に記載されているものが含まれる。各遺伝子座を介した配列決定の他に、特異的なプローブまたはPCRプライマーを使って、特定のアレルを試験してもよい。目的のハプロタイプおよび/またはハプロタイプが関連しているアレル自体のまたはそれら周辺のリードを得るために、実際の物理的配列決定の工程および/またはこの工程から得られた配列データをマスキングし、選別し、さもなければ選択するという点で、測定を「選択的」に行ってもよい。

10

【0040】

ブロック230では、必要に応じて第一の量を正規化する。他の態様では、第一の量を正規化しない。一態様では、第一の遺伝子座にある第二のアレルの第二の量で割ることで、第一の量を正規化する。別の態様では、第一の量を、第一の遺伝子座に関するDNA断片の総量で割ることで、正規化を実施することができる。その結果が、第一のアレルの分画濃度となり得る。

【0041】

次に、各遺伝子座にあるアレルの分画濃度を、それぞれのアレルカウントを別々に全アレルカウントの総数で割ることで算出する。生体（母性）試料のリード数が増えれば、評価の精度が上がる。各遺伝子座を個別に分析し、その結果をまとめて、結果同士が一致しているかを決定する。あるいは、全遺伝子座上のアレルのカウントを、それらが第一のハプロタイプと関連しているか否かに従ってまとめる。

20

【0042】

ブロック240では、正規化した第一の量を第一のカットオフ値と比較する。第一の量に関する未処理の値を使用する一態様では、第一のカットオフ値は0（または他の、相対的に小さい正規化していない値）であってよく、この場合、第一のアレルが検出された時はいつでも、母体試料中に第一のハプロタイプが含まれていることを示している可能性がある。第一のハプロタイプの存在が、第一のアレルがいくつか存在することにのみ基づいて（そのパーセンテージまたは第一のアレルに関する正規化された他の値についての知識を伴わずに）想定されるため、この解析は本質的に、より定性的であってよい。また、両方の胎児が第一のアレルを遺伝的に受け継いでいるか否かも分かっていない。

30

【0043】

他の態様では、カットオフ値をより高く設定して、1つ以上の第一のアレルの検出が不正確な場合に（例えば、配列決定またはPCRなどの使用した生化学的過程中に起きたエラーが原因で）、偽陽性を生じ得る誤ったデータを回避することができる。

【0044】

ブロック250では、比較に基づいて第一のハプロタイプの遺伝を決定することができる。前述の通り、第一の量または正規化した第一の量が第一のカットオフ値を超えた場合に、少なくとも1人の胎児が第一のハプロタイプを受け継いでいると決定してもよい。

40

【0045】

いくつかの態様では、2つ以上のカットオフ値を使用することができる。第一のアレルの分画濃度が決定されている場合、そのようになる可能性がある。生体試料中の胎児由来および/または個人由来のDNAの総パーセンテージが分かっている場合、この定量的な測定によって、胎児のうち的一方がまたは両方が目的のハプロタイプをもっているか否かを決定することができる。

【0046】

例えば、分画濃度が第一のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児がハプロタイプを受け継いでいると同定することができる。分画濃度が0よりも有意に大きくない場合に

50

は（例えば、第二のカットオフ値に満たない場合には）、両方の胎児がハプロタイプを受け継いでいないと同定する。分画濃度が第一のカットオフ値を超えていないが、第二のカットオフ値よりは大きい場合、一方の胎児は第一のハプロタイプを受け継いでいるが、もう一方の胎児は受け継いでいないと決定することができる。

【 0 0 4 7 】

具体例の一つでは、胎児由来 DNA の総パーセンテージが 10 % で、各胎児が 5 % ずつ寄与していると仮定する。第一のカットオフ値は 7 ~ 9 % の間であってよく、または測定の所与の統計的正確さである 5 % と 10 % を判別できるいかなる好適なパーセンテージであってよい。第二のカットオフ値は 2 ~ 4 % の間であってよく、または測定の所与の統計的正確さである 0 % と 5 % を判別できるいかなる好適なパーセンテージであってよい。いくつかの態様では、各胎児のそれぞれが寄与している DNA のパーセンテージは分かっている場合があるが、他の試料の測定に基づいて、典型的な範囲を想定することができる。従ってそのような例でも、カットオフ値を決定することができる。

【 0 0 4 8 】

この解析で利用するカットオフ値は母体試料中の各胎児に由来する DNA の相対量またはパーセンテージから決定することができる。カットオフ値によって、いずれの胎児もアレルに寄与していない、一方の胎児がアレルに寄与している、両方の胎児がアレルに寄与している、ことを判別できる。それぞれの患者、または集団全体についてのカットオフ値の設定に関するより詳細な情報は、米国特許第 2 0 1 1 / 0 1 0 5 3 5 3 号 A 1 および米国特許第 2 0 1 3 / 0 0 5 9 7 3 3 号 A 1 に記載されている。

【 0 0 4 9 】

ブロック 2 6 0 では、第一の染色体領域上の第二のハプロタイプについて、ブロック 2 1 0 ~ 2 5 0 を繰り返して実行することができる。例えば、第二のハプロタイプに父親特異的アレル（図 1 の H a p I I I ）を有する遺伝子座 1 2 0 などの 1 つ以上の第二の遺伝子座を同定することができる。少なくとも 1 人の胎児が第二のハプロタイプを受け継いでいるか否かを決定することができる。そして、この決定を第一のハプロタイプの遺伝に関する決定と合わせることができる。両方のハプロタイプが受け継がれていると決定されれば、1 人の胎児がハプロタイプのうちの一方を受け継いでいることになる。1 つのハプロタイプだけが受け継がれていると決定されれば、両方の胎児が同じハプロタイプを受け継いでいると決定することができる。その結果、両方の胎児について遺伝に関する決定を下すことができる。

【 0 0 5 0 】

分画濃度を決定し、第一のハプロタイプに適用すれば、第二のハプロタイプの分画濃度を利用して、分画濃度と第一の遺伝子座の閾値から、遺伝に関する決定を確認することができる。

【 0 0 5 1 】

父性ハプロタイプの遺伝が決定されれば、母親がヘテロ接合の遺伝子座において受け継がれたアレルを決定することができる。父親から受け継がれるアレルに関するこの情報を利用して、胎児に母性ハプロタイプが受け継がれているかを決定することができる。

【 0 0 5 2 】

C . 遺伝子座の同定

両親のゲノムに関するデータは、母体および胎児 DNA の混合物を含んでいる生体試料の解析を行う前、行っている最中、または解析後に得ることができる。父性ゲノム配列は、父親から採取した生体試料の配列決定を行うことで得ることができる。母性ゲノム配列は、妊娠前に採取した別の生体試料、または本質的に胎児 DNA を含んでいない生体試料、例えば失血した組織または毛包の配列決定を行うことで得ることができる。あるいは、母体血漿または妊娠中に採取された試料の定量的評価から、父親および/または母親のゲノム中で関連している部分を予測してもよい。

【 0 0 5 3 】

いくつかの態様では、どちらかの親の遺伝子型に関する情報を、家族の他のメンバー、

10

20

30

40

50

例えば現在妊娠している胎児の兄弟の遺伝子型情報、または祖父母などの遺伝子型と比較することによって、その両親のハプロタイプに広げることができる。また、両親のハプロタイプは当業者であれば知っている他の方法でも構築することができる。そのような方法の例としては、単一分子解析に基づく方法、例えばデジタルPCR (Ding C and Cantor CR. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 7449-7453; Ruano G et al. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 6296-6300)、精子を使ったハプロタイプ解析 (Lien S et al. Curr Protoc Hum Genet 2002; 第1章: 1.6) および画像化技術 (Xiao M et al. Hum Mutat 2007; 28: 913-921) がある。他の方法としては、アレル特異的PCRに基づくもの (Michalatos-Beloin S et al. Nucleic Acids Res 1996; 24: 4841-4843; Lo YMD et al. Nucleic Acids Res 1991; Nucleic Acids Res 19: 3561-3567)、クローニングと制限酵素消化に基づくもの (Smirnova AS et al. Immunogenetics 2007; 59: 93-8) などがあげられる。さらに他の方法には、集団におけるハプロタイプ・ブロック構造の分布および連鎖不平衡に基づく方法があり、この方法では、統計的な評価から母性ハプロタイプを推測することができる (Clark AG. Mol Biol Evol 1990; 7:111-22; 10:13-9; Salem RM et al. Hum Genomics 2005; 2:39-66)。

10

20

30

40

50

【0054】

解析する遺伝子座は、特定の領域、例えばハプロタイプが分かっている遺伝子座または目的の遺伝学的な特徴が存在している遺伝子座との近さによって選択することもできる。従って、ハプロタイプが分かっている領域中にある遺伝子座を選択することができる。互いが近接している遺伝子座を同じハプロタイプと関連づけることができ、また、遺伝子座同士の間には染色体の交差がなければ、別のハプロタイプとしてもよい。使用者は、解析する染色体領域を拡大してもまたは縮小してもよい。母体試料中のより多くのDNAが関連している可能性があるため、領域を拡大することで、解析の正確性を高めることができる。しかしながら、領域を拡大すると重複が生じる危険性もあり、その場合には、アレルの遺伝からはハプロタイプの遺伝を正確に予測することができない。

【0055】

一態様では、解析する遺伝子座は病原遺伝子である。この場合、2つの目的の父性アレルは、病原性の変異体であっても非病原性のアレルであってもよい。別の態様では、解析する遺伝子座は、遺伝性疾患に関係のある遺伝子に関連づけられている多型である。この場合、2つの目的の父性アレルのうち、1つのアレルは突然変異体遺伝子に、もう一方は正常な(つまり非突然変異)遺伝子に関連づけられているアレルである。

【0056】

D. 臨床評価

父性遺伝性の常染色体優性状態は、どの父性ハプロタイプが遺伝的に受け継がれた状態と関連があるかを突き止めることで評価することができる。これは例えば、デジタルPCR、染色体ソーティング、家系調査を用いることおよび集団のハプロタイプ情報から推測することで実施することができる。その後、母体血漿中に含まれている、特定のハプロタイプに関連づけられている父性特異的疾患を同定することができる。目的のハプロタイプに位置している父親特異的アレルが母体試料(例えば母体血漿)中に存在しているということは、片方または両方の胎児がこの条件を受け継いでいることを示している可能性がある。

【0057】

常染色体劣性の条件は、母体血漿を使って、同じ父性ハプロタイプを形成しているアレルを同定し、一方の胎児が父性ハプロタイプを受け継いでいるかを決定することによって、評価することができる。疾患関連アレルを検出することで、胎児のうちの少なくとも1人が、疾患関連父性ハプロタイプを受け継いでいることを示すことができる。従って、第一のアレルのうちの1つ以上および/または第二のアレルのうちの1つ以上が目的の表現型と関連している。また、目的の表現型が疾患であるかまたは疾患感受性である場合がある。

【0058】

I I I . 母性遺伝の解析

母親の血漿に含まれているDNAの大部分が母体由来であるため、在胎している複数の胎児の母性遺伝の解析は複雑である。胎児由来のDNAの割合は小さく（例えば10パーセント程度であり）、双胎の場合には、両方の胎児由来のDNAが混ざっている。従って、以下に記載するような定量的なアプローチを利用して胎児DNAを区別し、特徴づける。

【0059】

A . 相対ハプロタイプ量 (RHDO) 解析

RHDO解析について本発明の一態様では、遺伝子座の分類の中でも、母親がヘテロ接合型で、かつ、父親がホモ接合型の遺伝子座に注目する。これによって、母性および父性アレルの両方を同時に解析する必要性を排除する。そうして、ホモ接合型のSNPをRHDO解析に関する情報と定義する。

【0060】

図3は、本発明の態様による、2種類の遺伝子座の同定を利用した、父性および母性ハプロタイプの仮説を示している。母親がヘテロ接合型で、かつ、父親がホモ接合型の遺伝子座だけを示している。この図では、これらの情報遺伝子座について、2つのアレル（例えば一塩基多型（SNP））を同定している。他の種の多型、例えばマイクロサテライト多型を利用することもできる。一部ではSNPについて考察しているが、他の種の多型（変異）を利用してもよい。

【0061】

RHDO解析の一環として、SNPを型と型の2つに分類することができる。型のSNPは、父性アレルが、HapIにある母性アレルと同一のSNP遺伝子座であり、型SNPは、父性アレルが、HapIIにある母性アレルと同一のSNP遺伝子座である。HapIおよびHapIIの割り当ては任意であり、解析の前にHapIとHapIIを互換的に定義することができる。

【0062】

この例では、その遺伝子座に関しては父親がホモ接合型であるため、HapIIIとHapIVは同一である。しかしながら他の態様では、父親はホモ接合型ではないが、父性ハプロタイプの遺伝を決定することで、父性遺伝性アレルが分かっている。

【0063】

二卵性の双胎妊娠では、母性ハプロタイプは以下の3通りのように遺伝する可能性がある。

- ・胎児が2人とも母親からHapIを受け継いでいる（図4A）
- ・胎児が2人とも母親からHapIIを受け継いでいる（図5A）
- ・母親から、1人の胎児がHapIを受け継いでおり、もう1人の胎児がHapIIを受け継いでいる（図6A）

【0064】

図4Aでは、図3と同じ、母親と父親のハプロタイプを示している。胎児が2人とも母親からHapIを受け継いでいることを示している。ここで示す遺伝子座ではHapIIIとHapIVが均等であるため、それぞれの胎児のその他のハプロタイプはHapIIまたはHapIVのいずれかに対応している。

【0065】

図4Bは、両方の胎児が母親由来のHapIを有している場合の、父親と母親で共通のアレル（Aアレル）の母体血漿中での分画濃度の算出の例を示している。母体血漿中に含まれているDNAの総量に対し、各胎児が10%ずつ寄与しており、母親が総血漿DNAの80%に寄与していると仮定する。型SNPについては、母体ゲノム中にBアレルが存在しない。その結果、母体血漿中のBアレルの分画濃度は40%で、Aアレル（母親と父親に共通のアレル）の分画濃度は60%となる。型SNPについては、胎児の両方と母親は、AおよびBアレルのヘテロ接合型である。その結果、母体血漿中のAアレルの分画濃度は50%となる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

図 5 B は、両方の胎児が母親由来の H a p I I を有している場合の、父親と母親で共通のアレル (A アレル) の母体血漿中での分画濃度の算出の例を示している。母体血漿中に含まれている D N A の総量に対し、各胎児が 1 0 % ずつ、母親が 8 0 % 寄与していると仮定する。型 S N P については、胎児の両方と母親は、A および B アレルのヘテロ接合型である。その結果、母体血漿中の A アレルと B アレルの分画濃度はいずれも 5 0 % となる。型 S N P については、B アレルは母体のゲノム中にしか存在せず、胎児には存在しない。その結果、母体血漿中の B アレルの分画濃度は 4 0 % で、A アレルの分画濃度は 6 0 % となる。

【 0 0 6 7 】

図 6 B は、片方の胎児が母親由来の H a p I I を有しており、もう片方の胎児が母親由来の H a p I I を有している場合の、父親と母親で共通のアレル (A アレル) の母体血漿中での分画濃度の算出の例を示している。母体血漿中に含まれている D N A の総量に対し、各胎児が 1 0 % ずつ寄与しており、母親が総血漿 D N A の 8 0 % に寄与していると仮定すると、型および型両方の S N P に関し、A アレルの分画濃度は 5 5 % となる。

【 0 0 6 8 】

B . 予測した値と実際に分画濃度との比較

前述の例では、胎児 D N A の特定に分画濃度を推測した。胎児 D N A の分画濃度は、胎児特異的後成的マーカーの解析や他の遺伝子座における母親と父親の多型マーカーの解析など、複数の方法によって決定することができる。母体血漿における双子両方の分画濃度および各胎児の寄与率の測定方法は米国特許第 2 0 1 3 / 0 0 5 9 7 3 3 号 A 1 に記載されている。

【 0 0 6 9 】

これら 3 つの例を区別するために、A アレルまたは B アレルのそれぞれ (または両方の) 分画濃度について統計分析を行うことができる。以下の議論については今後も、胎児それぞれが試料中の総 D N A 断片量に対して 1 0 % ずつ寄与していると仮定する。それぞれの胎児が、異なるパーセンテージで D N A に寄与している態様については後の項で取り扱う。

【 0 0 7 0 】

図 7 A では、2 人の胎児が母親由来のハプロタイプを有している 3 種類の状況に関して、母性特異的アレル (B アレル) および父親と母親に共通のアレル (A アレル) の分画濃度を示している。図 7 A では、2 人の胎児それぞれが、総母体血漿 D N A に 1 0 % ずつ寄与していると仮定し、型 S N P と型 S N P について共通アレル (A アレル) の分画濃度を推測した。S N P 遺伝子座の A アレルの分画濃度は実験的に測定することが可能で、その後予測した値と比較して、どの遺伝パターンが生じる可能性が最も高いかを決定することができる。

【 0 0 7 1 】

目的の領域内にある同じ種類 (または) の全 S N P に関する A アレルと B アレルのアレルカウントをまとめ、型および型 S N P のまとめた分画濃度を算出することができる。予測した値に由来するまとめた分画濃度の偏差を決定することができる。偏差の合計が最も小さかったパターンをその双子の母性遺伝として推定することができる。

【 0 0 7 2 】

図 7 A では、胎児のうちの 1 人が母親から H a p I I を受け継いでいて、もう 1 人が H a p I I を受け継いでいる場合には、型および型 S N P から決定した共通アレル (A アレル) の分画濃度は同じになる。胎児が 2 人とも母親から H a p I I を受け継いでいる場合には、型 S N P の A アレルの分画濃度は型 S N P のものよりも高くなる。対照的に、胎児が 2 人とも母親から H a p I I を受け継いでいる場合には、型 S N P の分画濃度が型 S N P のものよりも高くなる。

【 0 0 7 3 】

型および型 S N P の共通アレル (A アレル) の分画濃度同士を比較して、それらに

10

20

30

40

50

統計的な差があるか否かを決定することができる。例えば、型および型SNPから決定した共通アレルの分画濃度に統計的な差がない場合には、胎児のうちの1人が母親からHapIを受け継いでいて、もう1人がHapIIを受け継いでいることになる。一方、型SNPの共通アレルの分画濃度が型SNPのものよりも高い場合、胎児は2人とも母親からHapIを受け継いでいる。型SNPの共通アレルの分画濃度が型SNPのものよりも有意に低い場合、これは、胎児が2人とも母親からHapIIを受け継いでいることを示している。

【0074】

別の態様では、型遺伝子座および型遺伝子座の分画濃度（または他の量）の比をコンピューターで計算することができる。この比をカラム710の比と比較することができる。

10

【0075】

別の検定法によっても、型および型SNPの共通アレルの分画濃度に有意差があるか否かを決定することができる。このような方法の例としては（これらには限定されないが）逐次確率比検定（SPRT）、スチューデントのt検定、マンホイットニーの順位和検定、二乗検定がある。

【0076】

図7Bは、特定の種類の全ての遺伝子座について、各情報SNP遺伝子座のそれぞれの分画濃度をどのように利用すれば共通のアレル（Aアレル）の分画濃度が予測できるかを示している。その後、全SNP遺伝子座の分画濃度の分布を構築し、分布の最も多いところから、測定した分画濃度を決定することができる。この統計分析は、全Aアレルカウントと全Bアレルを加算することの代わりに実施することができる。

20

【0077】

従って、各遺伝子座における量の個々の比（例えば分画濃度）をコンピューターで計算することができる。その後、これら個々の比を利用して全体の比（例えば全体の分画濃度）を得ることができる。そのため、個々の比の平均、中央値、または他の統計学的な値（例えば分布のピーク）を治療して全体の比を決定することができ、この全体の比をカットオフ値と比較してもよい。

【0078】

C. 両方の種の遺伝子座を利用して母性遺伝を決定するための図式

30

一態様では、定量的な過程において両種の遺伝子座を利用して、母性ハプロタイプの遺伝を決定することができる。例えば、型の遺伝子座を利用して、両方の胎児が同じハプロタイプを受け継いでいるか否かを決定することができる。また、型の遺伝子座を利用して、それぞれの胎児が別のハプロタイプを受け継いでいるか否かを決定することができる。

【0079】

図8は、本発明の態様による、両方の遺伝子座を利用した母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法800のフローチャートである。方法800では、二卵性双生児における母性遺伝を解析することができる。この解析は、母体DNAと、各胎児に由来する胎児DNA（例えば細胞を伴わないDNA）を含んでいる、母親から採取した試料について行われる。胎児DNAを含んでいる生体試料（例えば本明細書で定義する生体試料）であればいずれをも用いることができる。他の方法と同様に、方法800ではコンピューターシステムを使用する。

40

【0080】

ブロック810では、第一の染色体上にある1つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定する。女性では、第一の遺伝子座のそれぞれで、対応する第一のアレルと対応する第二のアレルのヘテロ接合型である。第一の母性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでいる。第一の遺伝子座は、特定の染色体上にある目的の遺伝的特性に隣接していてもよい。遺伝子座の第一の群は、本発明の例で説明した型遺伝子座に相当するものであってもよい。

50

【 0 0 8 1 】

ブロック 8 2 0 では、2 人の胎児が、第一の遺伝子座の対応する第一のアレルを父親から受け継いでいることを決定する。一態様では、父親が対応する第一のアレルについてはホモ接合型であると決定してもよく、この場合、どの父性ハプロタイプが遺伝するかにかかわらず、第一のアレルが受け継がれる。この父親の遺伝子型判定は父親由来の試料を使って実施することができる。別の態様では、方法 2 0 0 を利用して、遺伝した父性ハプロタイプを決定することができる。父性ハプロタイプが決定すれば、第一の遺伝子座について父親がヘテロ接合型であっても、第一の遺伝子座にある父親から受け継いだアレルを決定することができる。

【 0 0 8 2 】

従って、最初に父性遺伝を決定すれば、父親がホモ接合型で母親がヘテロ接合型の遺伝子座については母性遺伝の解析を制限する必要はない。両親の遺伝によって、どの父性アレルが 2 人の胎児に受け継がれたかが分かるので、両親がヘテロ接合型の遺伝子座も利用することができる。この情報に基づいて、遺伝子座が第一の群か第二の群に分類することができる。

【 0 0 8 3 】

ブロック 8 3 0 では、第一の染色体上にある 1 つ以上の第二の遺伝子座を含む第二の群を同定する。第二の群の第二の遺伝子座のそれぞれについて、第一の母性ハプロタイプは対応する第三のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは対応する第四のアレルを含む。遺伝子座の第一の群は、本発明の例で説明した型遺伝子座に相当するものであってもよい。

【 0 0 8 4 】

ブロック 8 4 0 では、2 人の胎児が、第二の遺伝子座の対応する第四のアレルを父親から受け継いでいることを決定する。父親から第四のアレルが遺伝したことの決定は、ブロック 8 2 0 について前述したのと同様に決定することができる。例えば、父親が、第二の遺伝子座の各遺伝子座について、対応する第四のアレルではホモ接合型の場合がある。別の態様では、父親は第二の遺伝子座についてはヘテロ接合型の可能性があるが、別のセットの遺伝子（例えば母親がホモ接合型の遺伝子のセット）を利用する方法 2 0 0 を使い、他の遺伝子座を利用して、対応する第四のアレルが特定の父性ハプロタイプから遺伝していることを決定することができる。

【 0 0 8 5 】

ブロック 8 5 0 では、コンピューターシステムによって、女性から採取した生体試料に含まれている DNA 断片上にある第一の遺伝子座に関し、対応する第一のアレルの第一の量と、対応する第二のアレルの第二の量を測定する。例えば、DNA 断片の配列決定を行って配列リードを得ることができ、リードを参照ゲノムと整列させて第一の遺伝子座に整列するリードを同定することができる。第一のアレルおよび第二のアレルを含んでいるリードの数を計数し、第一の量と第二の量をそれぞれ決定することができる。他の態様では、本明細書または組み込んだ文書で言及しているように他の技術を使用する。

【 0 0 8 6 】

ブロック 8 6 0 では、コンピューターシステムによって、生体試料に含まれている DNA 断片上にある第二の遺伝子座に関し、対応する第三のアレルの第三の量と、対応する第四のアレルの第四の量を測定する。第三の量と第四の量は第一の量および第二の量と同様の様式で、コンピューターによって計算することができる。

【 0 0 8 7 】

いくつかの態様では、量を、例えば特定のアレルの分画濃度を決定するために、正規化することができる。従って、第一の量は、全第一の遺伝子座にある DNA 断片の総数で割った、第一のアレルの含む DNA 断片のカウントに相当する場合がある。第二の量の正規化も同様の様式で決定することができる。第三の量および第四の量の正規化は、第二の遺伝子座にある DNA 断片の総数を使って決定することができる。

【 0 0 8 8 】

ブロック 870 では、4 つの量を利用して、2 人の胎児に遺伝した母性ハプロタイプを決定する。一態様ではその後、測定した 4 つ量から、以下のように母性遺伝を決定する。

(i) 第一の量が第二の量よりも統計的に大きく、かつ、第三の量と第四の量が統計的に等しい場合、胎児は 2 人とも、第一の母性ハプロタイプを受け継いでいる。

(i) 第一の量と第二の量が統計的に等しく、かつ、第四の量が第三の量よりも統計的に大きい場合、胎児は 2 人とも、第二の母性ハプロタイプを受け継いでいる。

または、

(i i i) 第一の量が第二の量よりも統計的に大きく、かつ、第四の量が第三の量よりも統計的に大きい場合、胎児のうちの 1 人は第一の母性ハプロタイプを受け継いでおり、もう 1 人は第二の母性ハプロタイプを受け継いでいる。

10

【 0 0 8 9 】

ある量が統計的により大きいかな否かは、カットオフ値を利用することで、例えば、指定された数の標準偏差を要求することで、決定することができる。カットオフ値は、胎児全員について算出されるおよび / または個々の胎児について算出され得る胎児 DNA 濃度の割合に依存する可能性がある。

【 0 0 9 0 】

一態様では、第一の量を、第二の量にカットオフ値を加えたものと直接比較することができる。この様式では、第一の量が、第二の量にカットオフ値を加えたものよりも大きい場合、2 つの量の差が統計的に大きいと見なすことができる。

【 0 0 9 1 】

別の態様では、第一の量と第二の量から、指標 (例えば差または比) を決定し、この指標をカットオフ値と比較して、第一の量が第二の量よりも統計的に大きいかどうかを見る。同じことを、他の統計的な差または統計的に等しいことの決定についても行うことができる。一実施形態では、差を決定するためのカットオフ値は多様であり得る。例えば、(i i i) のカットオフ値は、(i) および (i i) のカットオフ値よりも必要とされる統計的な偏差は小さくてよい。

20

【 0 0 9 2 】

前述したように、胎児 DNA のパーセンテージが 20 % で、それぞれの胎児がこれに 10 % ずつ寄与している場合、(i) および (i i) に関する統計的に等しいことおよび統計的に大きいことの決定から、50 % (等しい) および 60 % (大きい) を区別することができる。従って、統計的に大きいことを決定するためのカットオフ値は、指標 (例えば分画濃度) が、50 % と 60 % の中間である 55 % を超える場合に、真であり得る。第一の量の第二の量に対する比を使用することもできる。この比は、型遺伝子座で A アレルが 60 % を占める例では 1.5 になる。

30

【 0 0 9 3 】

(i i i) では、統計的に大きいことを決定すれば、50 % と 55 % を区別することができる。従ってカットオフ値は、所望の感度および特異性によって 51 ~ 54 % の間になる。第一の量の第二の量に対する比を使用することもできる。この比は、型遺伝子座で A アレルが 55 % を占める例では 1.22 になる。

D. 一種の遺伝子座を利用して母性遺伝を決定するための方法

40

【 0 0 9 4 】

いくつかの態様では、一方の遺伝子座だけを利用する。例えば図 7A では、型遺伝子座についての 3 つの異なる比、50 %、55 %、および 60 % を示している。比を様々なカットオフ値と比較して、このような異なる分類を区別することができる。

【 0 0 9 5 】

図 9 は、本発明の態様による、片方の遺伝子座を利用した母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法 900 のフローチャートである。方法 900 では、母親と胎児の DNA (例えば細胞を伴わない DNA) を含んでいる母体の生体試料から得られたデータを利用する。

【 0 0 9 6 】

50

ブロック 9 1 0 では、第一の染色体上にある 1 つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定する。母親は、第一の遺伝子座のそれぞれで、対応する第一のアレルと対応する第二のアレルのヘテロ接合型である。第一の母性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでいる。ブロック 9 1 0 は、ブロック 8 1 0 と同様の様式で実施することができる。

【 0 0 9 7 】

ブロック 9 2 0 では、2 人の胎児が、第一の遺伝子座の対応する第一のアレルを父親から受け継いでいることを決定する。ブロック 9 2 0 は、ブロック 8 2 0 と同様の様式で実施することができる。前述したように、様々な工程は様々な順序で実施することができる。例えば、母体試料の解析を行う前、行っている間、またはその後に、両親のゲノムに関するデータを得ることができ、また、任意の好適な DNA 技術（例えば、配列決定または PCR）を利用してよい。

【 0 0 9 8 】

ブロック 9 3 0 では、コンピューターシステムによって、母体生体試料に含まれている DNA 断片上にある第一の遺伝子座に関し、対応する第一のアレルの第一の量と、対応する第二のアレルの第二の量を測定する。ブロック 9 2 0 は、ブロック 8 5 0 と同様の様式で実施することができる。

【 0 0 9 9 】

ブロック 9 4 0 では、第一の量と第二の量の比を算出する。比は様々な形式にある可能性がある。例えば、第二の量で割った第一の量；第一の量で割った第二の量；第一の量と第二の量の和で割った第一の量；または第一の量と第二の量の和で割った第二の量など。

【 0 1 0 0 】

ブロック 9 5 0 では、4 つの比を利用して、2 人の胎児に遺伝した母性ハプロタイプを決定する。一態様では、次に、測定した 4 つ量から、以下のように母性遺伝を決定する。

(i) 比が第一のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する；

(i i) 比が第二のカットオフ値よりも小さい場合、両方の胎児が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する；

(i i i) 比が第三のカットオフ値よりは小さく、かつ、第四のカットオフ値よりは大きく、ここで第三のカットオフ値は第一のカットオフ値と等しいかそれ未満で、さらに、第四のカットオフ値が第二のカットオフ値と等しいかそれより大きく、かつ、第三のカットオフ値よりも小さい場合、胎児のうちの 1 人が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいて、もう 1 人が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する。

【 0 1 0 1 】

この解析で利用するカットオフ値は母体試料中の各胎児に由来する DNA の相対量またはパーセンテージから決定することができる。カットオフ値によって、様々な分類を区別することができる。図 7 A の例では、第一のカットオフ値によって 6 0 % と 5 5 % を区別することができる。具体的には、この試料を両方の胎児が H a p I を受け継いでいると分類することができるか否かを決定することができる。決定されていない範囲がある場合には、特異性を高めるために、第三のカットオフ値が第一のカットオフ値より小さくなる可能性がある。第二のカットオフ値によって 5 0 % と 5 5 % を区別することができる。具体的には、この試料を両方の胎児が H a p I I を受け継いでいると分類することができるか否かを決定することができる。決定されていない範囲がある場合には、特異性を高めるために、第四のカットオフ値が第二のカットオフ値より大きくなる可能性がある。

【 0 1 0 2 】

一態様では、男性および女性患者で共通しているアレルの分画濃度から、直接母性遺伝を決定するために、2 つのカットオフ値を確立する。対応するハプロタイプを、両方の胎児が受け継いでいる、片方の胎児が受け継いでいる、またはどちらの胎児も受け継いでいないという 3 つの状況がある。それぞれの状況で、図 7 B に示したような特徴をもつ、関連付けられたアレルに関する分画濃度の分布がそれぞれ形成される（中央値が小さくなっ

10

20

30

40

50

ていく)。例えば、両方の胎児が生体試料に含まれるDNAの5%ずつに寄与している場合、この3つの状況における分画濃度の中央値はそれぞれ、約60%、55%、および50%になる(図7A)。これらの条件を区別するようにカットオフ値を設定する。第一のカットオフ値またはより大きいカットオフ値は、2人の胎児の受け継がれていることと、1人の胎児に受け継がれていることを区別するもので、約57.5%に設定される。第二のカットオフ値またはより小さいカットオフ値は、1人の胎児の受け継がれていることと、いずれの胎児にも受け継がれていないことを区別するもので、約52.5%に設定される。

【0103】

父性ゲノム配列は、父親から採取した生体試料の配列決定を行うことで得ることができる。母性ゲノム配列は、妊娠前に採取した生体試料、または本質的に胎児DNAを含んでいない生体試料、例えば失血した組織または毛包の配列決定を行うことで得ることができる。あるいは、母体血漿または妊娠中に採取された試料の定量的評価から、父親および/または母親のゲノム中で関連している部分を予測してもよい。

【0104】

解析する遺伝子座は、特定の染色体領域との近さまたは目的の遺伝学的な特徴によっても選択される。互いが隣接しているという理由で第一の遺伝子座を選択してもよく、また、遺伝子座同士の間には染色体の交差がなければ、第一の遺伝子座によって両親のハプロタイプを分離する。使用者は、解析する染色体領域を拡大してもまたは縮小してもよい。母体試料中のより多くのDNAが関連している可能性があるため、領域を拡大することで、解析の正確性を高めることができる。しかしながら、領域を拡大すると重複が生じる危険性もあり、その場合には、アレルの遺伝からはハプロタイプの遺伝を正確に予測することができない。

【0105】

一態様では次に、各遺伝子座にあるアレルの比を、それぞれのアレルカウントを別々に全アレルカウントの総数で割ることで算出する。母体試料のリード数が増えれば、評価の精度が上がる。各遺伝子座を個別に分析し、その結果をまとめてコンセンサスを得る(例えば図7Bに図示しているように)。あるいは、全遺伝子座のアレルカウントを合計する。

【0106】

E. 母体血漿に寄与しているDNAの量が胎児毎に異なる場合

女性が双子を妊娠している場合、この2人の胎児が異なる量のDNAを母体血中に放出する可能性がある。その結果、2人の胎児に由来する胎児DNA濃度の割合は異なる可能性がある。

【0107】

図10Aは、両方の胎児が母親由来のHapIを有しており、各胎児が異なるパーセンテージの胎児DNAに寄与している場合の、母体血漿中に含まれている型および型SNPにおける共通アレル(Aアレル)の分画濃度を示している。この例では、胎児1がa%、胎児2がb%寄与している。型遺伝子座については、両方のアレルが等しいため、そのパーセンテージは50%に維持されている。しかしながらAアレルがより多いため、型遺伝子座のパーセンテージは変わっている。そのパーセンテージは、式 $F = 50\% + (a\% + b\%) / 2$ に従う。

【0108】

図10Bは、両方の胎児が母親由来のHapIIを有しており、各胎児が異なるパーセンテージの胎児DNAに寄与している場合の、母体血漿中に含まれている型および型SNPにおける共通アレル(Aアレル)の分画濃度を示している。この例では、胎児1がa%、胎児2がb%寄与している。型遺伝子座については、両方のアレルが等しいため、そのパーセンテージは50%に維持されている。しかしながらAアレルがより多いため、型遺伝子座のパーセンテージは変わっている。そのパーセンテージは、式 $F = 50\% + (a\% + b\%) / 2$ に従う。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 9 】

図 1 1 A は、片方の胎児が母親由来の H a p I を有しており、もう片方の胎児が母親由来の H a p I I を有していて、各胎児が異なるパーセンテージの胎児 D N A に寄与している場合の、母体血漿中に含まれている 型および 型 S N P における共通アレル (A アレル) の分画濃度を示している。この例では、胎児 1 が a %、胎児 2 が b % 寄与している。いずれの遺伝子座についても、量の多いアレルのパーセンテージは胎児寄与率によって変化する。 型遺伝子座に関しては、そのパーセンテージは $F = 50 \% + a \% / 2$ となる。また、 型遺伝子座のパーセンテージは $F = 50 \% + b \% / 2$ となる。

【 0 1 1 0 】

図 1 1 B は、 型および 型 S N P を利用して決定した A アレルの分画濃度に関する表 1 1 5 0、ならびに、3つの状況、すなわち胎児が2人とも母性 H a p I を受け継いでいる、胎児が2人とも母性 H a p I I を受け継いでいる、および2人の胎児が別の母性ハプロタイプを受け継いでいるという状況におけるこれら2つの濃度の比を示している。カラム 1 1 6 0 では、 型遺伝子座の共通アレル A について、3つの状況で予測される比を示している。カラム 1 1 6 0 では、 型遺伝子座の共通アレル A について、3つの状況で予測される比を示している。カラム 1 1 8 0 では、その他のカラムから得られた指標の比、すなわち、 型の値と比較した 型の値の比を示している。次項で説明するように、態様では、両方の型の遺伝子から得られた濃度の比に関するカットオフ値を決定するためにカラム 1 1 8 0 の値を利用することができる。

【 0 1 1 1 】

F . 比の比を用いる方法

一態様では、方法 9 0 0 では比を (例えば、カラム 1 1 8 0 と同様に 型と 型の比を) 利用することができる。例えば、ブロック 9 4 0 で利用する比はカラム 1 1 8 0 の比であってもよい。そのような比を利用するために、両方の型の遺伝子座を使用する。加えて、方法 8 0 0 は、カラム 1 1 8 0 の比を利用して実行することができる。そのような方法について以下で説明する。

【 0 1 1 2 】

図 1 2 は、本発明の態様による、両方の遺伝子座から得られる値の比を利用した母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法 1 2 0 0 のフローチャートである。方法 1 2 0 0 では、母親と胎児の D N A (例えば細胞を伴わない D N A) を含んでいる母体の生体試料から得られたデータを利用する。

【 0 1 1 3 】

ブロック 1 2 1 0 ~ 1 2 4 0 は、方法 8 0 0 のブロック 8 1 0 ~ 8 4 0 と同じ様式で実行することができる。

【 0 1 1 4 】

ブロック 1 2 5 0 では、母体生体試料に含まれている D N A 断片上の第一の遺伝子座に存在する、対応する第一のアレルの第一の量と対応する第二のアレルの第二の量に関する第一の比を算出する。一態様において第一の比は、第二の量で割った第一の量である。別の態様では、第一の比は、第一のアレルの分画濃度を得るための、第一の量と第二の量の和で割った第一の量である。

【 0 1 1 5 】

ブロック 1 2 6 0 では、生体試料に含まれている D N A 断片の第二の遺伝子座に存在する、対応する第三のアレルの第三の量と対応する第四のアレルの第四の量に関する第二の比を算出する。本明細書に記載したように、第一、第二、第三、および第四の量は、生体試料の測定から、例えば配列決定または P C R データから得られる。

【 0 1 1 6 】

ブロック 1 2 7 0 では、第一の比と第二の比に関する第三の比を算出する。一態様では、第三の比は、図 1 1 B に示すように、第四の量で割った第三の量である。別の態様では、第三の比は、第三の量と第四の量の和で割った第三の量である。

【 0 1 1 7 】

ブロック 1 2 8 0 では、4 つの比を利用して、2 人の胎児に遺伝した母性ハプロタイプを決定する。一態様では、次に、測定した 4 つ量から、以下のように母性遺伝を決定する。

(i) 第三の比が第一のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する；

(i i) 第三の比が第二のカットオフ値よりも小さく、ここで第一のカットオフ値が第二のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する；

(i i i) 第三の比が第三のカットオフ値よりは小さく、かつ、第四のカットオフ値よりは大きく、ここで第三のカットオフ値は第一のカットオフ値と等しいかそれ未満で、さらに、第四のカットオフ値が第二のカットオフ値と等しいかそれより大きく、かつ、第三のカットオフ値よりも小さい場合、胎児のうちの 1 人が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいて、もう 1 人が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する。

【 0 1 1 8 】

一態様では、ブロック 1 2 8 0 は、第一の比 (型) または第二の比 (型) のどちらが大きいのかに関する第一の決定によって実行することができる。これによって、胎児が 2 人とも H a p I または H a p I I を受け継いでいるか否かを区別することができる。そのような決定をした後には、選択肢のうちの 1 つだけが残る。その後、第三の比が残る 2 つの値に近いかな否かを決定することができる。例えば a が b よりも大きい場合、 型および 型遺伝子座の濃度の比が、以下の 2 つの値のうちの 1 つに近いかなを決定することができる；

【 0 1 1 9 】

【 数 1 】

$$(1 + a \% + b \%) \text{ または } \frac{(50\% + \frac{a\%}{2})}{(50\% + \frac{b\%}{2})}。$$

【 0 1 2 0 】

使用される特定のカットオフ値または閾値は、任意の好適な統計検定によって決定することができる。逐次確率比検定 (S P R T) , 正規混合分布モデル (McLachlan G and Peel D. Multivariate normal mixtures. Finite mixture models 2004: p81-116. John Wiley & Sons Press) , 二項混合分布モデルおよびボワソン混合分布モデル (McLachlan G and Peel D. Mixtures with non-normal components, Finite mixture models 2004: p135-174. John Wiley & Sons Press) などを含むがこれらには限定されない統計検定を本明細書で記載の方法において使用することができる。例えば、第三の比と前述した 2 つの値との間に有意差があれば、カットオフ値を決定することができる。あるいは、コンピューターによるシミュレーションによって、どの真値が、試験した例における比の値に最も適合するかを決定することができる (Qu JZ et al. Clin Chem. 2013;59:427-35) 。

【 0 1 2 1 】

G . 臨床評価

母性遺伝性の常染色体疾患を、疾患遺伝子座に関連付けられている染色体領域を解析することによって評価することができる。疾患アレルに関連している母性ハプロタイプが両方の胎児に遺伝している場合、胎児は 2 人とも、その条件に罹患する可能性がある。2 人の胎児が異なる母性ハプロタイプを受け継いでいると推定される場合、胎児のうちの 1 人だけが罹患する可能性がある。胎児が 2 人とも、正常なアレルに関連付けられている母性ハプロタイプを受け継いでいる場合、胎児は 2 人ともその状態に罹患しないだろう。

【 0 1 2 2 】

常染色体劣性の疾患は、父性ハプロタイプの遺伝を考慮に入れることで評価することができる。胎児が2人とも疾患アレルと関連付けられている父性ハプロタイプを受け継いでいる場合、母性ハプロタイプの遺伝に関する解析に基づいて、胎児がその条件に罹患しているか、または保因者であるかを決定することができる。胎児が2人とも正常な父性アレルを受け継いでいる場合、母性ハプロタイプの遺伝に関する解析によって、胎児がその状態の保因者であるか否かを決定することができる。2人の胎児がそれぞれ異なる父性ハプロタイプと異なる母性ハプロタイプを受け継いでいる場合、胎児のうちの1人が罹患していて、もう1人が正常である可能性が50%であり、胎児が2人ともその条件の保因者である可能性が50%である。

【0123】

10

IV. 母親も父親もヘテロ接合型である場合

その延長線上で、前述した態様の根底にある原理を他の遺伝様式にも当てはめることができる。前述の通り、同じ父性遺伝性アレルが両方の胎児に受け継がれる可能性がある。また、父性遺伝性アレルは、父親がヘテロ接合型の例でも決定することができる。例えば、父性遺伝性のハプロタイプを、母親がホモ接合型で父親がヘテロ接合型の遺伝子座から決定することができ、その後、ハプロタイプを形成している他の遺伝子座の父性遺伝性アレルを決定することができる。しかしながらいくつかの態様は、父性遺伝性アレルが分かっているときにしか使用することができない。

【0124】

一態様では、母親と父親の両方の遺伝子型が両方ともAアレルとBアレルのヘテロ接合型で、かつ、父性遺伝性のアレルが両方の胎児で異なっているまたは分かっていない遺伝子座を利用して母性遺伝を決定することができる。これら2つのハプロタイプの母体血漿中での有無を測定することで、5つの範囲が分かる。例えば、2人の胎児が母体血漿に含まれているDNAに対してそれぞれ10%ずつ寄与している場合、測定されるAアレルの寄与率は、胎児が2人ともホモ接合型Bの場合にはおよそ40%、1人の胎児がホモ接合型Bでもう1人の胎児がヘテロ接合型の場合には45%；胎児が2人ともヘテロ接合型であるか、または1人がホモ接合型Aでもう1人がホモ接合型Bの場合には50%；1人の胎児がホモ接合型Aでもう1人がヘテロ接合型の場合には55%；および胎児が2人ともホモ接合型Aの場合には60%となる。生じ得るこの5つの状況を区別するためには、4つのカットオフ量を定義する。この複雑さを解消するためには通常、両親の遺伝子座がホモ接合型Aのときよりも、血漿試料に関してより多くのDNAリードが必要となる。

20

30

【0125】

各遺伝子座に2を超えるアレル変異が存在する母性遺伝も決定することができる。従って、特定の遺伝子座について、母性遺伝子型がABで父性遺伝子型がCDの場合、測定される母体血漿のDNA量は、Aアレルの寄与率が、胎児が2人ともBCまたはBDの場合には40%、胎児がACまたはADとBCまたはBDの組み合わせの場合には45%、および胎児が2人ともACまたはADの場合には50%になるように分けられる。母性遺伝子型がABで父性遺伝子型がACの場合、測定される母体血漿中のDNA量は、漁師の遺伝子型がAアレルについてABの例と同様に、5つの範囲に分けられるが、Bアレルについてはより少なくなる。

40

【0126】

図13は、本発明の態様による、母親と父親の両方がヘテロ接合で、男性によって受精した女性における2人の胎児の母性ハプロタイプの遺伝を決定するための方法1300のフローチャートである。方法1300では母親から採取した生体試料、例えば女性と2人の胎児由来の細胞を伴わないDNAを含む試料を使用する。

【0127】

ブロック1310では、第一の染色体上にある1つ以上の第一の遺伝子座を含む第一の群を同定する。女性は、第一の遺伝子座のそれぞれで、対応する第一のアレルと対応する第二のアレルのヘテロ接合型である。第一の母性ハプロタイプは第一のアレルを含み、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでいる。男性も第一の遺伝子座のヘテロ接合

50

型である。第一の群はどちらの型の遺伝子座であってもよい。

【0128】

ブロック1320では、生体試料に含まれているDNA断片上にある第一の遺伝子座に関し、第一のアレルそれぞれの第一の量を測定する。ブロック1320は、他の測定操作と同様の様式で実施することができる。

【0129】

ブロック1330では、生体試料に含まれているDNA断片の第一の遺伝子座から第二の量を測定する。第二の量は、第一の遺伝子座のうちの1つに配置されている任意のDNA断片に相当する可能性がある。あるDNA断片（任意のアレルを含む）が第一の遺伝子座のうちの1つに由来するものであることを示す任意のシグナルを利用して第二の量を決定することができる。そのようなシグナルは例えば、第一の遺伝子座のうちの1つに整列する配列リードであってもまたは、PCRを行っているウェルの、第一の遺伝子座のうちの1つに対するプローブに対応している色であってもよい。

10

【0130】

ブロック1340では、第一の量と第二の量の比を算出する。比は例えば、本明細書に記載したような任意の比であってもよい。

【0131】

ブロック1350ではこの比を利用して、2人の胎児に遺伝した母性ハプロタイプを決定する。一態様では、次に、以下のように母性遺伝を決定する。

(i) 比が第一のカットオフ値よりも大きい場合、両方の胎児が第一の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する；および

20

(ii) 比が第二のカットオフ値よりも小さい場合、両方の胎児が第二の母性ハプロタイプを受け継いでいると同定する。

【0132】

他の母性遺伝を決定することができる。いくつかの態様では、第一の父性ハプロタイプは第一のアレルを含み、前述の第一の例のように、第二の母性ハプロタイプは第二のアレルを含んでいる。比が50%と統計的に等しい場合、胎児は2人とも1つ以上の第一の遺伝子座でヘテロ接合型（例えばA_tブロック）であるか、または胎児のうちの1人は第一のアレルがホモ接合型（例えばAA）で、もう1人の胎児は第二のアレルがホモ接合型（例えばBB）であると同定することができる。別の例には、比が第二のカットオフ値（例えば、前述の例における40%と45%を区別するための値）よりも大きく、かつ、第三のカットオフ値（例えば、前述の例における45%と50%を区別するための値）よりも小さいのときに、1つ以上の第一の遺伝子座について、1人の胎児は第二のアレルがホモ接合型（例えばBB）でその他の胎児がヘテロ接合型（例えばAB）であると同定することが含まれる。従って、第三のカットオフ値は第一のカットオフ値よりも小さい。別の例には、比が第一のカットオフ値（例えば、前述の例における60%と55%を区別するための値）よりも小さく、かつ、第四のカットオフ値（例えば、前述の例における50%と55%を区別するための値）よりも大きいときに、1つ以上の第一の遺伝子座について、1人の胎児は第一のアレルがホモ接合型（例えばAA）でその他の胎児がヘテロ接合型（例えばA_tブロック）であると同定することが含まれる。従って、第四のカットオフ値は第三のカットオフ値よりも大きい。

30

40

【0133】

いくつかの態様では、第一の父性ハプロタイプが対応する第三のアレル（例えばC）を含み、第二の父性ハプロタイプが対応する第四のアレル（例えばD）を含む。比が第一のカットオフ値よりも小さく、かつ、第二のカットオフ値よりも大きい場合、1人の胎児は第一のアレルと第三のまたは第四のアレルのいずれかのヘテロ接合型（例えばACまたはAD）であると同定することができる。もう1人の胎児は、第二のアレルと第三のまたは第四のアレルのいずれかのヘテロ接合型（例えばBCまたはBD）であると同定することができる。

【0134】

50

V. 品胎

本発明の原理に従えば、3人以上の胎児が在胎している妊娠での母性遺伝についても理解することができる。例えば、母親がヘテロ接合型 A B、父親がホモ接合型 A A であり、3人の胎児（三つ子）が母体血漿試料中に含まれる D N A にそれぞれ 1 0 % ずつ寄与している例について検討する。A の寄与率は、三つ子全員がヘテロ接合型の場合は 5 0 % ; 胎児のうちの 2 人がヘテロ接合型で 1 人がホモ接合型 A の場合には 5 5 % ; 胎児のうちの 1 人がヘテロ接合型で 2 人がホモ接合型 A の場合には 6 0 % ; および胎児が 3 人ともホモ接合型 A の場合には 6 5 % であると理解される。品胎以上の多胎妊娠の場合、試料の理解には通常、血漿試料に関するより多くの D N A リードが必要になる。

【 0 1 3 5 】

従って、一態様では、第一の量が第二の量（例えば、およそ 5 0 % の値の比）と統計的に等しい場合、胎児が 3 人とも、1 つ以上の第一の遺伝子座についてヘテロ接合型であると同定することができる。比が第三のカットオフ値（例えば、6 0 % と 5 5 % を区別するための値）よりも小さく、かつ、第四のカットオフ値（例えば、5 0 % と 5 5 % を区別するための値）よりも大きい場合、1 つ以上の第一の遺伝子座の第一のアレルについて、胎児のうちの 2 人がヘテロ接合型で、1 人の胎児がホモ接合型であると同定することができる。比が第一のカットオフ値（例えば、6 0 % と 5 5 % を区別するための値）よりも大きく、かつ、第五のカットオフ値（例えば、6 5 % と 6 0 % を区別するための値）よりも小さい場合、1 つ以上の第一の遺伝子座について、胎児のうちの 2 人は第一のアレルがホモ接合型で、1 人の胎児がヘテロ接合型であると同定することができる。比が第五のカット

10

20

【 実施例 】

【 0 1 3 6 】

以後の項では、本発明のいくつかの原理を例証する、非限定的な実施例を提供する。

A. 双子からの胎児 D N A の採取および測定

プリンスオブウェールズ病院（Prince of Wales Hospital、香港）の産婦人科で、それぞれ双子を妊娠している 2 人の妊婦を募集し、インフォームド・コンセントを得た。血液試料を妊娠 2 1 週と 2 5 週の時点で採取した。出産後、それぞれの胎児から別々に臍帯血を採取した。本試験は、香港中文大学・新界東病院連網臨床研究倫理連席委員会（Joint Chinese University of Hong Kong Hospital Authority New Territories East Cluster Clinical Research Ethics Committee）による認可を受けた。

30

【 0 1 3 7 】

母体血液試料を 4 、 1 , 6 0 0 g で 1 0 分間遠心した。血漿画分を再度、4 、 1 6 , 0 0 0 g で 1 0 分間遠心し、残っている血液細胞を除去した。血液細胞を再度、室温、2 , 5 0 0 g で 5 分間遠心し、残っている血漿を除去した。D S P（商標）D N A B l o o d M i n i キット（商標）（Q i a g e n）を使用して血漿 D N A を抽出した。D S P（商標）D N A B l o o d M i n i キット（商標）（Q i a g e n）を使用して臍帯血から D N A を抽出した。臍帯血試料から抽出したゲノム D N A の遺伝子型を、A f f y m e t r i x（商標）G e n o m e - W i d e H u m a n S N P アレイ 6 . 0 システム（商標）（A f f y m e t r i x）によって判定した。遺伝子型解析から、各対象が妊娠している 2 対の双子が二卵性であることを確認した。

40

【 0 1 3 8 】

P a i r e d - E n d S a m p l e P r e p a r a t i o n キット（商標）（I l l u m i n a）を使用して、血漿 D N A の配列決定用ライブラリーを構築した。それぞれのライブラリーの調製におよそ 3 0 n g の D N A を使用した。これらのライブラリーを次に、特注した S u r e S e l e c t T a r g e t E n r i c h m e n t システム（商標）（A g i l e n t T e c h n o l o g i e s）を使用した標的化濃縮にかけた。この補足用ライブラリーは、以下のように 1 4 の染色体（c h r）に分布している 5 . 5 M b のゲノム領域をカバーするものであった：c h r 1（0 . 3 3 M b）、c h r 2（0 .

50

30 Mb)、chr3(0.62 Mb)、chr4(0.32 Mb)、chr5(0.33 Mb)、chr7(0.31 Mb)、chr8(0.62 Mb)、chr9(0.31 Mb)、chr13(0.30 Mb)、chr15(0.33 Mb)、chr17(0.66 Mb)、chr19(0.35 Mb)、chr20(0.34 Mb)、およびchr22(0.30 Mb)。

【0139】

このライブラリーの配列を、標準的なペアエンド手法(Illumina)により、Hi-Seq 2000シーケンサー(Illumina)を使って決定した。それぞれのリードの各末端を50bpずつ読んだ。配列決用のフローセルを2レーンずつ使って、それぞれのライブラリーの配列を決定した。SOAP2アルゴリズムを使い、配列を決定した全リードと、マスクされていない非反復ヒト参照ゲノム(Hg18)とを整列させた。

10

【0140】

母体血漿中の胎児DNAの分画濃度を、父性遺伝性胎児アレルの分画濃度から決定した。2種類のアレルを含む任意のSNP遺伝子座でのマイナーアレルとしての出現に基づいて、母体血漿中の父性遺伝性の胎児アレルを同定した。

【0141】

母体血漿中の父性遺伝性胎児アレルの分画濃度の分布に基づいて、母体血漿中の胎児DNAの総分画濃度を予測した。胎児DNAの分画濃度は症例1および2のそれぞれについて、22.6%および30.6%であると決定された。全情報遺伝子座についての胎児DNA分画濃度の分布を使用して、母体血漿DNAに対する双子のそれぞれの寄与率を決定した。

20

【0142】

B. 解析および結論

この解析では、母親がホモ接合型であるが、少なくとも1人の胎児がヘテロ接合型で、父親から別のアレルを受け継いでいるSNP遺伝子座を情報遺伝子座とした。症例1では、母体血漿に対するそれぞれの胎児の胎児DNAの分画濃度は、10%および11.6%であった。症例2では、母体血漿に対するそれぞれの胎児の胎児DNAの分画濃度は、12.4%および18.2%であった。

【0143】

それぞれの妊婦についてRHDO解析を行い、2人の胎児が同じまたは別の母性ハプロタイプを受け継いでいるのかどうかを決定した。この実施例では、第4染色体長腕に位置している領域を使ってRHDO解析について説明する。胎児由来の臍帯血を使った遺伝子型解析から、症例1の2人の胎児が、この領域については異なる母性ハプロタイプを受け継いでいることが分かった。症例2では、胎児は2人とも同じ母性ハプロタイプを受け継いでいた。家系解析から、父性遺伝子型を決定した。このRHDO解析では、母親がヘテロ接合型で、父親がホモ接合型のSNP遺伝子座だけを利用した。他の態様では、遺伝している父性ハプロタイプが決定されていれば、母親と父親の両方がヘテロ接合型のSNP遺伝子座もRHDO解析に利用することができる。

30

【0144】

この解析では尤度比の閾値を使って、型および型SNP(/ 比)から決定した分画濃度が、双子のどの母性ハプロタイプ遺伝と最も適合するかを決定した。それぞれの例で / 比についてのシミュレーション分析を、2人の胎児の分画濃度に基づいて行った。型SNPおよび型SNPの共通アレルに関する分画濃度分布の配列リードをシミュレーションするために、二項分布では、5,000のデータ点を生成した。(a)胎児が2人とも同じ母性ハプロタイプを受け継いでいる、または(b)2人の胎児が異なる母性ハプロタイプを受け継いでいるという状況の / 比の分布を決定した。

40

【0145】

図14Aおよび14Bはそれぞれ、例1および例2に関して予想される / 比の分布を示している。生じ得る2つの遺伝様式について予測した / 比の分布から、この2人の胎児が同じまたは異なる母性ハプロタイプを受け継いでいるか否かを区別するための力

50

ットオフ値量を決定した。この具体例では、オッズ比を 1 2 0 0 として、上下のカットオフ値を算出した。 / 比が上のカットオフ値より大きい場合には、2 人の胎児が同じ母性ハプロタイプを受け継いでいることが示唆され、 / 比が下のカットオフ値よりも小さい場合には、2 人の胎児が異なる母性ハプロタイプを受け継いでいることが示唆される。症例 1 のシミュレーション分析では、上下のカットオフ値がそれぞれ、1 . 1 1 3 および 1 . 0 9 8 であると推測された。症例 2 のシミュレーション分析では、上下のカットオフ値がそれぞれ、1 . 1 7 0 および 1 . 1 5 8 であると推測された。

【 0 1 4 6 】

図 1 5 は、例 1 について、4 番染色体長腕にある染色体セグメントを R H D O 解析した結果を示している表 1 5 0 0 である。この解析の統計的検出力が分析した配列リードの数に依存することから、必要とされる配列リード数の閾値を、分類ブロック当たり 5 , 0 0 0 とした。言い換えると、R H D O の各分類ブロックに含まれる S N P の数は多様であるが、これらの S N P 遺伝子座について配列を決定するリードの総数が、1 解析当たり 5 , 0 0 0 を上回るようにするということである。第一の R H D O 分類ブロックでは、 / 比は 0 . 9 7 8 3 7 と決定され、これはシミュレーション分析から推定された下のカットオフ値、1 . 0 9 8 、よりも小さかった。

10

【 0 1 4 7 】

この結果から、2 人の胎児がこの領域については異なる母性ハプロタイプを受け継いでいることが示された。次の R H D O 解析には、第一の分類ブロックの下流にある S N P を使用した。この結果は、2 人の胎児が異なる母性ハプロタイプを受け継いでいることを示唆するものであった。この領域にある合計 9 つの R H D O 分類ブロックを使った実験から、同じ結果が得られた。これらの結果が正しいことを、2 人の胎児の遺伝子型判定から確認した。

20

【 0 1 4 8 】

図 1 6 は、例 2 について、4 番染色体長腕にある染色体セグメントを R H D O 解析した結果を示している表 1 6 0 0 である。R H D O 分類ブロック 1 では、 / 比は 1 . 2 9 9 と決定され、これはシミュレーション分析から推定された上のカットオフ値、1 . 1 7 0 、よりも大きかった。

【 0 1 4 9 】

この結果は、この領域については胎児は 2 人とも同じ母性ハプロタイプを受け継いでいることを示している。加えて、型 S N P から決定した分画濃度は型 S N P から決定した分画濃度よりも高かった。このことは、胎児が 2 人とも、母性 H a p I を受け継いでいることを示している (図 1 0 A) 。

30

【 0 1 5 0 】

次の R H D O 解析には、第一の分類ブロックに含まれている領域の下流にある S N P を利用し、この領域にある合計 9 つの R H D O 分類ブロックを使った実験から、同じ結果が得られた。これらの結果が正しいことを、2 人の胎児の遺伝子型判定から確認した。

【 0 1 5 1 】

V I I I . コンピューターシステム

本明細書で言及するコンピューターシステムはいずれも、好適な数のサブシステムを使用し得る。コンピューター装置 1 0 に含まれるそのようなサブシステムの例を図 1 7 に示している。いくつかの態様では、コンピューターシステムは単一のコンピューター装置を含み、この場合、サブシステムはコンピューター装置の構成要素であってよい。他の態様では、コンピューターシステムは複数のコンピューター装置を含み、コンピューター装置はそれぞれがサブシステムであって、内部コンポーネントを有している。

40

【 0 1 5 2 】

図 1 7 に示しているサブシステムはシステムバス 7 5 を介して相互に接続している。その他のサブシステム、例えば印刷装置 7 4 、キーボード 7 8 、記憶装置 7 9 、モニター 7 6 (ディスプレーアダプター 8 2 に接続されている) など示している。周辺機器および入力 / 出力 (I / O) 装置 (I / O 制御装置 7 1 に接続されている) は、任意の数の当該

50

分野で知られている手段、例えば入力／出力（Ｉ／Ｏ）ポート９７７（ＵＳＢ、ファイアーワイヤー（登録商標）など）によってコンピューターシステムに接続することができる。例えば、Ｉ／Ｏポート７７または外部インターフェース８１（例えばイーサネット、Ｗｉ－Ｆｉなど）を使用して、コンピューターシステム１０を、インターネット、マウス入力装置、またはスキャナーなどの広域ネットワークに接続することができる。システムバス７５を使った相互接続により、中央処理装置７３は各サブシステムとの通信およびシステムメモリー７２または記憶装置７９（例えば、ハードドライブなどの固定ディスクまたは光学ディスク）からの指示の実行の制御が可能になり、ならびに、各サブシステム間での情報のやりとりが可能になる。システムメモリー７２および／または記憶装置７９は読み込み可能なメディアを内蔵していてもよい。本明細書で言及するデータは全て、ある構成要素から別の構成要素に出力することができ、また、利用者に対して出力することができる。

10

【０１５３】

コンピューターシステムは複数の同じ構成要素またはサブシステムを含む場合があり、これらは例えば、外部インターフェース８１または内部インターフェースによって接続されている。いくつかの態様では、コンピューターシステム、サブシステム、または装置は、ネットワーク越しに通信している場合もある。そのような例では、１つのコンピューターはクライアントで別のコンピューターはサーバーであって、いずれもが同じコンピューターの一部であってもよいと考えることができる。クライアントとサーバーはそれぞれが複数のシステム、サブシステムまたは構成要素を含んでいてもよい。

20

【０１５４】

本発明の態様はいずれも、ハードウェア（例えばアプリケーションに特異的な集積回路またはフィールド・プログラマブル・ゲート・アレイ）および／またはモジュラー式または統合式に通常プログラム可能なプロセッサを備えたコンピューターソフトウェアを使った制御理論の形式で実装することが可能であると理解される。本明細書で使用されるプロセッサには、同じ集積チップ上にあるマルチコア・プロセッサ、または単一の回路基板上にあるかもしくはネットワークで繋がれた複数の処理装置が含まれる。当業者は本明細書で提供する技術や教示に基づいて、ハードウェアおよびハードウェアとソフトウェアの組み合わせを用いて本発明の態様を実行するための別の手段および／または方法を理解・認識することができるだろう。

30

【０１５５】

本出願に記載のソフトウェアの構成要素または機能はいずれも、プロセッサによって実行されるソフトウェアコードであって、コンピューター言語（例えば、Ｊａｖａ、Ｃ、Ｃ＋＋、Ｃ＃）またはスクリプト言語（例えばＰｅｒｌもしくはＰｙｔｈｏｎ）等の好適な言語のいずれかを使用し、例えば、標準的なまたは目的に沿った技術によってプログラムされたソフトウェアコードとして実装してもよい。ソフトウェアコードは、一連の指示またはコマンドとして、保存および／または伝達用のコンピューターで読み込み可能なメディアに保存してもよく、好適なメディアとしては、ランダム・アクセス・メモリ（ＲＡＭ）、読み出し専用メモリ（ＲＯＭ）、ハードドライブもしくはフロッピーディスクなどの磁気媒体、またはコンパクトディスク（ＣＤ）もしくはＤＶＤ（デジタル多用途ディスク）などの光媒体、フラッシュメモリなどが挙げられる。コンピューターで読み込み可能なメディアは、そのような記憶または送信装置のいかなる組み合わせであってもよい。

40

【０１５６】

そのようなプログラムは、様々なプロトコールに共通の有線、光学および／または無線のネットワーク、例えばインターネットに適応している搬送波信号を用いてコードおよび送信してもよい。つまり、そのようなプログラムでコードされたデータ信号を使って本発明の態様によるコンピューターで読み込み可能なメディアを作成してもよい。プログラムコードでコードされているコンピューターで読み込み可能なメディアを互換性のある装置とともに梱包してもよく、または他の装置とは別個に提供してもよい（例えば、インターネット上でのダウンロードによって）。そのようなコンピューターで読み込み可能なメデ

50

ィアはいずれも、単一のコンピューター製品（例えばハードドライブ、ＣＤ、もしくはコンピューターシステム全体）に置くことまたは組み込むこともでき、システムもしくはネットワーク上の複数のコンピューター製品に置くこともまたは組み込むこともできる。コンピューターシステムには、モニター、印刷装置、または本明細書で言及したいいずれかの結果を利用者に提供するための他の好適なディスプレイを含めることもできる。

【０１５７】

本明細書に記載の方法はいずれも完全にまたは部分的に、１つ以上のプロセッサを含むコンピューターシステムを利用して実施してもよく、工程を実行するようにコンピューターシステムを構成することができる。従って態様は、本明細書に記載の方法のいずれかに
10
おける工程を実行するように構成されたコンピューターシステムに関する場合があり、コンピューターシステムは、それぞれの工程またはそれぞれの工程群を実施する異なる構成要素を含む場合がある。工程に番号を付けて示しているが、本明細書の方法の工程は、同時にまたは異なる順序で実施することができる。加えて、これらの工程の一部分を、他の方法に由来する他の工程の一部分と共に使用してもよい。また、工程のうちの全てまたは一部は随意選択であってもよい。加えて、いずれかの方法のうちのいずれかの工程は、モジュール、回路、またはこれらの工程を実施するための他の手段を利用して実施することができる。

【０１５８】

特定の態様の具体的な項目は、本発明の態様の精神および範囲から逸脱することなく、
20
任意の好適な様式で組み合わせることができる。しかしながら、本発明の他の態様は、それぞれ個別の側面、またはこれら個別の側面の特定の組み合わせに関する具体的な態様に関する場合もある。

【０１５９】

本発明の例示的な態様に関するこれまでの記載は、例を示し、説明する目的で提示したものである。これらは完全なものでも、記載した形態に本発明を限定するものでもなく、
前述の教示を考慮すれば多数の修正形態および変更形態が可能である。態様は、本発明の原理およびその実用化を最もよく説明するための選択・記載されたものである。従って、当業者が様々な態様において本発明を最もよく実施することができ、また、想定される特定の使用に適している様々な変更を施すことができる。

【０１６０】

「１つ」、「１種」または「この」という記載は、そうではないことが具体的に示されていない限り、「１つ以上」を意味することを意図している。
30

【０１６１】

本明細書で言及した全ての特許、特許出願、出版物、および記述は、全ての目的のために参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。いずれも先行技術であるとは認められない。

【図 1】

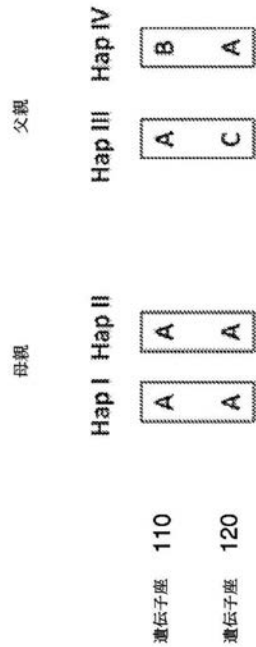


図 1

【図 2】

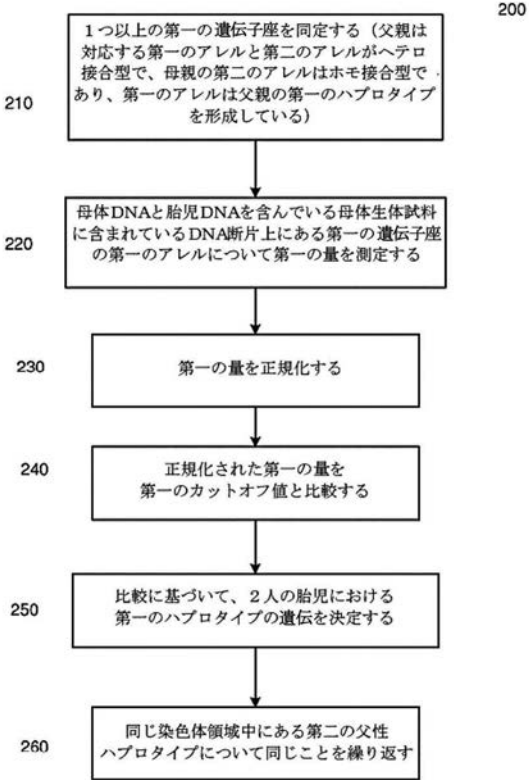


図 2

【図 3】

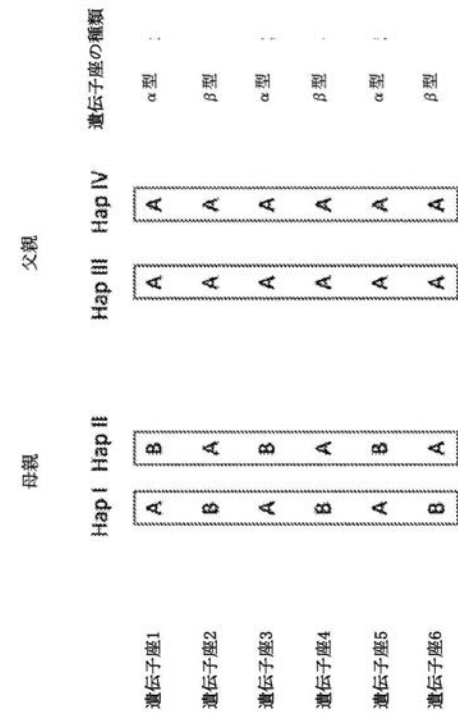


図 3

【図 4 A】

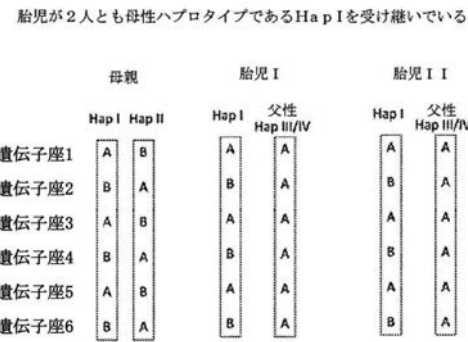


図 4 A

【図 4 B】

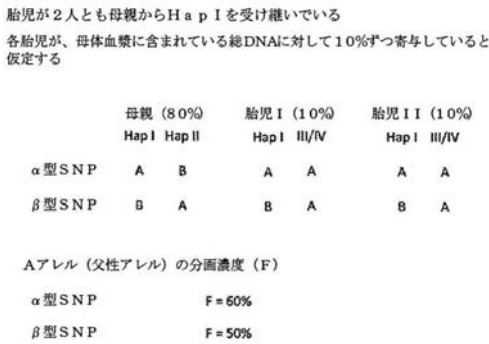


図 4 B

【図 5 A】

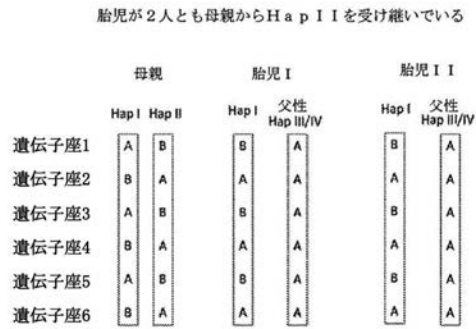


図 5 A

【図 6 A】



図 6 A

【図 5 B】

胎児が2人とも母親からHap I Iを受け継いでいる
各胎児が、母体血漿に含まれている総DNAに対して10%ずつ寄与していると仮定する

	母親 (80%)		胎児 I (10%)		胎児 I I (10%)	
	Hap I	Hap II	Hap I	父性 Hap III/IV	Hap II	父性 Hap III/IV
α型 SNP	A	B	B	A	B	A
β型 SNP	B	A	A	A	A	A

Aアレル (父性アレル) の分画濃度 (F)

α型 SNP	F = 50%
β型 SNP	F = 60%

図 5 B

【図 6 B】

母親から、胎児のうちの1人がHap Iを受け継いでいて、もう1人がHap IIを受け継いでいる

各胎児が、母体血漿に含まれている総DNAに対して10%ずつ寄与していると仮定する

	母親 (80%)		胎児 I (10%)		胎児 I I (10%)	
	Hap I	Hap II	Hap I	父性 Hap III/IV	Hap II	父性 Hap III/IV
α型 SNP	A	B	A	A	B	A
β型 SNP	B	A	B	A	A	A

Aアレル (父性アレル) の分画濃度 (F)

α型 SNP	F = 55%
β型 SNP	F = 55%

図 6 B

【図 7 B】

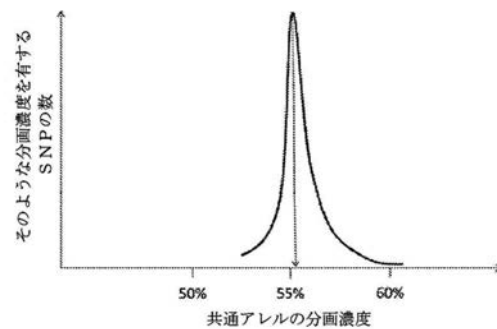


図 7 B

【図 7 A】

共通アレル (Aアレル) の母体血漿中での分画濃度

状況	α型 SNP による Aアレルの分画濃度	β型 SNP による Aアレルの分画濃度	α型 : β型の比
胎児が2人ともHap Iを受け継いでいる	60%	50%	1.2 : 1
胎児が2人ともHap IIを受け継いでいる	50%	60%	1 : 1.2
胎児のうちの1人がHap Iを、もう1人がHap IIを受け継いでいる	55%	55%	1 : 1

図 7 A

【 図 8 】

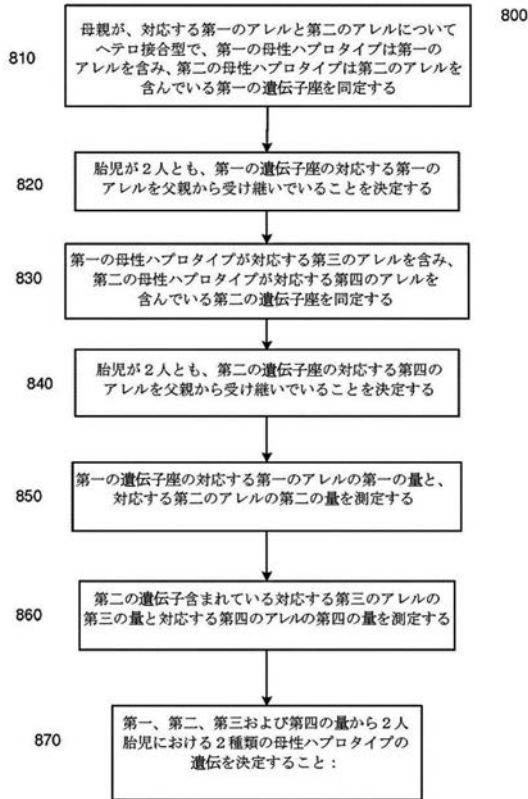


図 8

【 図 9 】

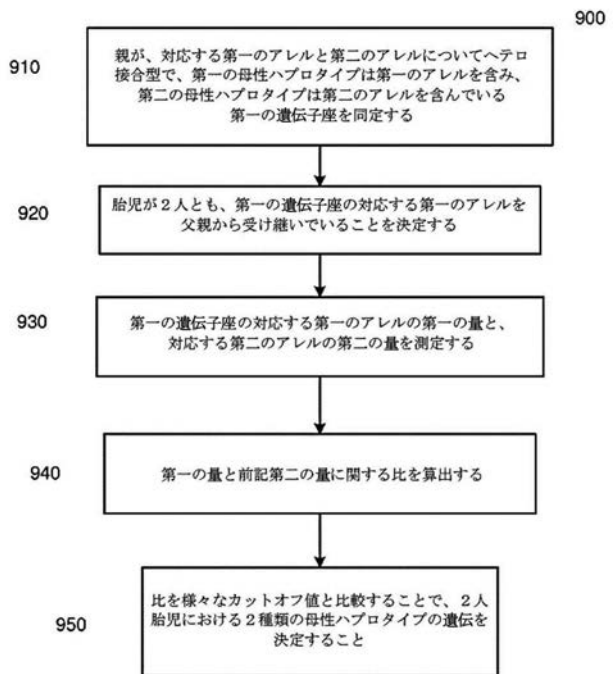


図 9

【 図 10 A 】

胎児が2人とも母親から H a p I を受け継いでいる
胎児 I と I I が、母体血漿に含まれている総DNAに対して a %および b %寄与していると仮定する

	母親 (100% - a% - b%)		胎児 I (a%)		胎児 I I (b%)	
	Hap I	Hap II	Hap I	Hap II/IV	Hap I	Hap II/IV
α 型 SNP	A	B	A	A	A	A
β 型 SNP	B	A	B	A	B	A

Aアレル（父性アレル）の分画濃度（F）

$$\begin{aligned} \alpha \text{ 型 SNP} \quad F &= \frac{100\% - a\% - b\%}{2} + a\% + b\% = 50\% + \frac{a\% + b\%}{2} \\ \beta \text{ 型 SNP} \quad F &= 50\% \end{aligned}$$

図 10 A

【 図 10 B 】

胎児が2人とも母親から H a p I I を受け継いでいる
胎児 I と I I が、母体血漿に含まれている総DNAに対して a %および b %寄与していると仮定する

	母親 (100% - a% - b%)		胎児 I (a%)		胎児 I I (b%)	
	Hap I	Hap II	Hap II	父性 Hap III/IV	Hap II	父性 Hap III/IV
α 型 SNP	A	B	B	A	B	A
β 型 SNP	B	A	A	A	A	A

Aアレル（父性アレル）の分画濃度（F）

$$\begin{aligned} \alpha \text{ 型 SNP} \quad F &= 50\% \\ \beta \text{ 型 SNP} \quad F &= \frac{100\% - a\% - b\%}{2} + a\% + b\% = 50\% + \frac{a\% + b\%}{2} \end{aligned}$$

図 10 B

【 図 11 A 】

母親から、胎児のうちの1人が H a p I を、もう1人が H a p I I を受け継いだ
胎児 I と I I が、母体血漿に含まれている総DNAに対して a %および b %寄与していると仮定する

	母親 (100% - a% - b%)		胎児 I (a%)		胎児 I I (b%)	
	Hap I	Hap II	Hap I	父性 Hap III/IV	Hap II	父性 Hap III/IV
α 型 SNP	A	B	A	A	B	A
β 型 SNP	B	A	B	A	A	A

Aアレル（父性アレル）の分画濃度（F）

$$\begin{aligned} \alpha \text{ 型 SNP} \quad F &= \frac{100\% - a\% - b\%}{2} + a\% + \frac{b\%}{2} = 50\% + \frac{a\%}{2} \\ \beta \text{ 型 SNP} \quad F &= \frac{100\% - a\% - b\%}{2} + \frac{a\%}{2} + b\% = 50\% + \frac{b\%}{2} \end{aligned}$$

図 11 A

【 図 1 1 B 】

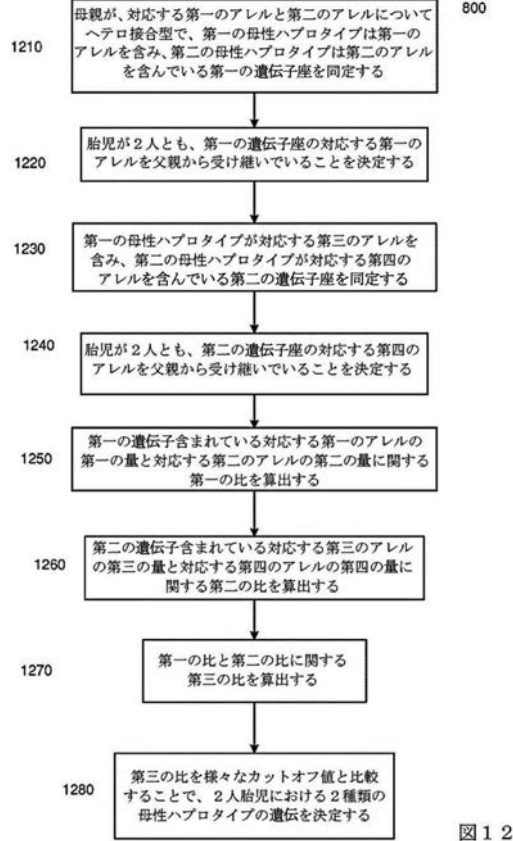
母体血漿中の共通アレル（Aアレル）の
分画濃度 1150

状況	α 型SNPに よるAアレルの 分画濃度	β 型SNPに よるAアレルの 分画濃度	α 型： β 型の比
胎児が2人ともHap I を受け継いでいる	$50\% + \frac{a\% + b\%}{2}$	50%	$(1 + a\% + b\%) : 1$
胎児が2人ともHap II を受け継いでいる	50%	$50\% + \frac{a\% + b\%}{2}$	$1 : (1 + a\% + b\%)$
胎児のうちの1人が Hap Iを、もう1人が Hap IIを受け継いで いる	$50\% + \frac{a\%}{2}$	$50\% + \frac{b\%}{2}$	$(50\% + \frac{a\%}{2}) : (50\% + \frac{b\%}{2})$

1160 1170 1180

図 1 1 B

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

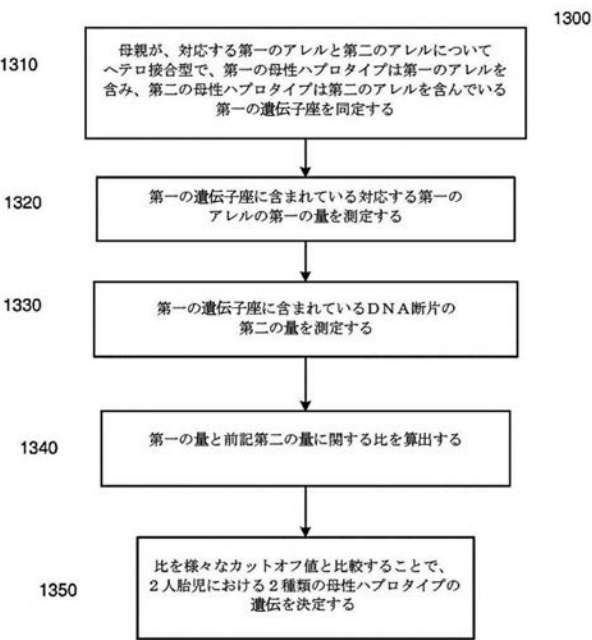
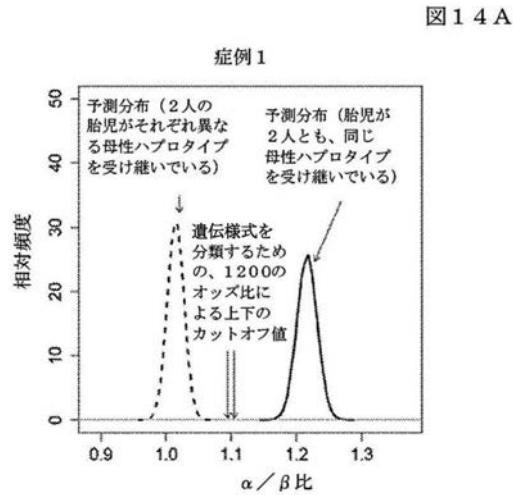
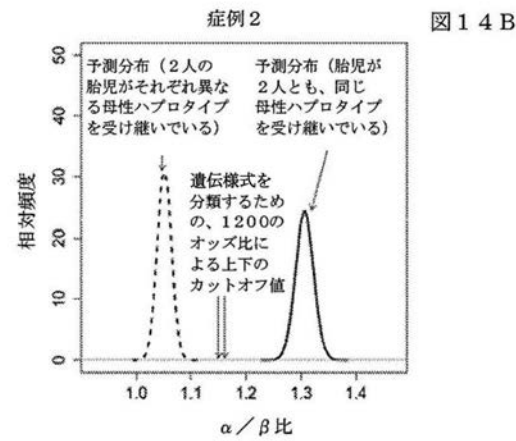


図 1 3

【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】



【 図 1 5 】

表 1 5 0 0 . 症例 1 の母性ハプロタイプの遺伝に関するRRHDO解析

分類ブロック	分類ブロックに含まれているα型およびβ型SNP遺伝子座それぞれの数	α型SNP				β型SNP				α/β 比	胎児に遺伝したものを
		共通アレルの総カウント数	非父性アレルの総カウント数	共通アレルの分面濃度	共通アレルの分面濃度	共通アレルの総カウント数	非父性アレルの総カウント数	共通アレルの分面濃度	共通アレルの分面濃度		
1	15	3609	2782	0.564	0.564	2965	2172	0.577	0.577	0.978	Hap I/Hap II
2	12	2840	2562	0.525	0.525	3132	1966	0.614	0.614	0.855	Hap I/Hap II
3	16	3360	2428	0.580	0.580	2881	2194	0.567	0.567	1.023	Hap I/Hap II
4	15	3034	2486	0.549	0.549	3109	2418	0.562	0.562	0.977	Hap I/Hap II
5	17	4503	3555	0.558	0.558	2829	2346	0.546	0.546	1.022	Hap I/Hap II
6	11	3173	2400	0.569	0.569	2739	2308	0.542	0.542	1.049	Hap I/Hap II
7	18	4452	3503	0.559	0.559	2809	2377	0.541	0.541	1.033	Hap I/Hap II
8	20	5770	4166	0.580	0.580	2924	2562	0.532	0.532	1.089	Hap I/Hap II
9	18	3209	2507	0.561	0.561	4589	3425	0.572	0.572	0.980	Hap I/Hap II

図 1 5

【 図 1 6 】

表 1 6 0 0 . 症例 2 の母性ハプロタイプの遺伝に関するRRHDO解析

分類ブロック	分類ブロックに含まれているα型およびβ型SNP遺伝子座それぞれの数	α型SNP				β型SNP				α/β 比	胎児に遺伝したものを
		共通アレルの総カウント数	非父性アレルの総カウント数	共通アレルの分面濃度	共通アレルの分面濃度	共通アレルの総カウント数	非父性アレルの総カウント数	共通アレルの分面濃度	共通アレルの分面濃度		
1	13	3963	1813	0.686	0.686	2815	2515	0.528	0.528	1.299	Hap I/Hap I
2	15	3148	1869	0.627	0.627	2790	2621	0.515	0.515	1.217	Hap I/Hap I
3	18	3571	1988	0.642	0.642	2754	2618	0.512	0.512	1.253	Hap I/Hap I
4	22	6281	3127	0.667	0.667	2659	2653	0.500	0.500	1.333	Hap I/Hap I
5	20	3998	2161	0.649	0.649	2692	2662	0.502	0.502	1.291	Hap I/Hap I
6	19	4523	2040	0.689	0.689	2517	2495	0.502	0.502	1.372	Hap I/Hap I
7	17	4268	2221	0.657	0.657	2810	2647	0.514	0.514	1.277	Hap I/Hap I
8	20	3310	1717	0.658	0.658	3652	3546	0.507	0.507	1.298	Hap I/Hap I
9	18	3704	2257	0.621	0.621	2638	2558	0.507	0.507	1.224	Hap I/Hap I

図 1 6

【 図 1 7 】

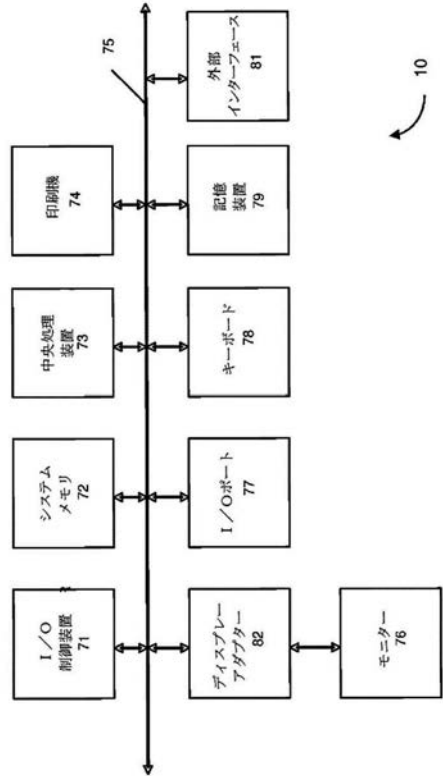


図 1 7

【 国 際 調 査 報 告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/073506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/68(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) C12Q 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) DWPI, EPODOC, GOOGLESCHOLAR, PUBMED, NCBI, CNPAT:HONG, KONG, CHINESE, fetus+, allele, locus, haplotype, heterozygous, homozygous		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TW 201243326A (UNIV. HONG KONG CHINESE) 01 November 2012 (2012-11-01) claims 29-34, 54, 55, page 21 paragraph 2-page 27 paragraph 1, figures 2A, 2B	1-27, 35-50
Y	TW 201243326A (UNIV. HONG KONG CHINESE) 01 November 2012 (2012-11-01) claims 29-34, 54, 55, page 21 paragraph 2-page 27 paragraph 1, figures 2A, 2B	28-34, 46-50
Y	CN 102770558A (UNIV. HONG KONG CHINESE ET AL.) 07 November 2012 (2012-11-07) claim 25	28-34, 46-50
A	WO 2010075459A1 (CELULA INC.) 01 July 2010 (2010-07-01) the whole document	1-50
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 28 May 2014		Date of mailing of the international search report 27 June 2014
Name and mailing address of the ISA/ STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA(ISA/CN) 6,Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer ZHONG,Hui Telephone No. (86-10)62413728

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/073506

Patent document cited in search report		Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
TW	201243326A	01 November 2012	WO 2013041921A1	28 March 2013
			US 2013059733A1	07 March 2013
			CN 103492589A	01 January 2014
			CA 2827873A1	28 March 2013
			EP 2678451A1	01 January 2014
			AU 2012311262A1	02 May 2013
			EP 2682887A2	08 January 2014
CN	102770558A	07 November 2012	IL 219521D0	28 June 2012
			EP 2496717A1	12 September 2012
			US 2013253844A1	26 September 2013
			AU 2010315037A8	12 July 2012
			US 8467976B2	18 June 2013
			CA 2779695A1	12 May 2011
			MX 2012005214A	21 September 2012
			TW 201122470A	01 July 2011
			US 2013323731A1	05 December 2013
			WO 2011057094A1	12 May 2011
			EA 201200690A1	30 May 2013
			AU 2010315037A1	07 June 2012
			US 2011105353A1	05 May 2011
			JP 2013509884A	21 March 2013
WO	2010075459A1	01 July 2010	EP 2379746A1	26 October 2011
			AU 2009329946A1	11 August 2011
			SG 172345A1	28 July 2011
			CN 102325901A	18 January 2012
			CA 2748030A1	01 July 2010
			KR 20110137286A	22 December 2011
			JP 2012513217A	14 June 2012
			US 2011086769A1	14 April 2011

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . J A V A

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ロー ユク ミン デニス

中華人民共和国, 香港特別行政区, カウルーン, ホマンティン, キング タク ストリート 7, 4 / エフ

(72)発明者 チウ ロッサ ワイ クン

中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー テリトリーズ, シャーティン, マー ロク パス 5 2, ダブル ヘブン, ハウス 3 1

(72)発明者 チャン クワン チー

中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー テリトリーズ, シャーティン, メイ ティン ロード, ピーク ワン, ブロック 5, フィフティーンズ フロア, フラット シー

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ42 QS25