

263 PCR法による着床前性別診断法の基礎的検討

東邦大第1, 都立荏原病院*

片桐由起子, 城下 佳子, 矢野ともね*,
竹下 直樹, 安部 裕司, 片山 進,
久保 春海, 平川 舜

[目的] ヒトX-連鎖劣性遺伝性疾患の出生前診断では性別判定が重要である。そこでPCR法による単一細胞レベルでの、より確実に信頼性の高い着床前性別診断法の可能性を検討した。[方法] Y染色体特異的SRY配列とX染色体特異的ZFX配列を増幅目標とした。Outer targetはSRY・421bp, ZFX・217bpとし、Inner targetはSRY・266bp, ZFX・150bpとした。まずヒトgenomic DNAを希釈して2領域の同時増幅を行い、singleおよびnested PCR法の感度を検討した。次に患者の同意のもとに、染色体検査の目的で採取したヒト羊水中の羊水細胞1個をmicromanipulator下に採取し、さらに体外受精余剰胚から分離した単一割球を検体として増幅を行った。検体は凍結後94°Cで加熱し、PCR法で至適条件下で30回増幅したのち、polyacrylamide gelで電気泳動し、染色後増幅の有無を確認した。[成績] Inner primerでSRYおよびZFX配列を増幅したところ、single PCR法でtemplate DNA 1/10 pgまで増幅可能であった。Nested PCR法では増幅感度は同じであったが、より明瞭なbandが出現し性別判定が確実となった。そこでnested PCR法で1個の羊水細胞および割球をtemplate DNAとして増幅したところ、18個中17個の羊水細胞(2症例)と10個の割球(5細胞期胚2個)のすべてでSRY, ZFX配列が増幅され、いずれも男児と判定可能であった。[結論] Nested PCR法により単一細胞での性別診断は可能であり、着床前期胚の単一割球を用いた性別診断に応用できる可能性が示唆された。

264 胎盤性凝固抑制物質 (annexin V) の血小板における存在と凝集反応による変動の検討

秋田大微生物、山本組合総合病院*

軽部彰宏、木村菜桜子*

[目的] 胎盤性凝固抑制物質 (annexin V) は胎盤組織から分離精製された血液凝固抑制能、phospholipase A₂抑制能等を有する物質である。本研究ではannexin Vの血小板における存在、および血小板凝集能に対する影響について検討することを目的とした。

[方法] ①volunteersから得た正常洗浄血小板溶液を凍結・融解・超音波処理した後、western blotを施行し、annexin Vの検出を行った。②洗浄血小板浮遊液400μlに、生食 (control, ct) ; 500μg/ml, annexin V ; 100μg/ml, 抗annexin V抗体をそれぞれ50μl加えた後、ADP血小板凝集能を測定した。③洗浄血小板400μlにADP50μlを加え、凝集反応を惹起した後、血小板annexin V濃度をELISA法にて測定した。また、同一検体に生食を加えた溶液の血小板annexin V濃度を凝集前値とし、凝集前後の変動を比較検討した。

[成績] ①破碎血小板中に抗annexin V抗体によるバンドを認めた。②annexin V、および抗annexin V抗体を加えた洗浄血小板のADP血小板凝集能は、ctと差を認めなかった。③凝集反応前に比較して凝集後の血小板annexin V濃度は(凝集前16.28±6.57; 凝集後11.04±7.26、M±SD, n=6) 有意に減少していた (p<0.005)。

[結論] ①血小板中にannexin Vが存在することを始めて明らかにした。②annexin Vは血小板凝集反応に関与していることが示唆された。今後、各種血小板凝集異常症におけるannexin Vの発現について検討する必要があると考えられた。