

261 母体血による無侵襲的胎児DNA診断法の開発－第2報－

金沢医科大学、うきた病院*、
博医館ホスピタル**
高林晴夫、桑原惣隆、浮田俊彦*、伊川和美*、
山藤 薫*、五十嵐辰博**

[目的] 昨年の本会において、我々は妊娠8-23週の母体血(2 ml)から有核赤血球が高率(85%)に発見され、かつmicromanipulatorを使い選択的に回収可能となったことを報告した。これまで母体血より胎児由来細胞を選択的に回収し、かつそれら細胞から胎児DNA情報が得られたとの報告はみられない。そこで、我々は前回報告した方法により母体血中から回収した有核赤血球を用い、それらからDNA情報を得ると同時にそれらが胎児由来細胞である可能性について検討した。[方法] 今回、正常妊娠中の母体血より11個の有核赤血球を単離し、それについてDYZ1領域のprimerを用いPCR法を行ない、性別を判定した。PCR法は、40サイクル増幅した後、電気泳動を行ない、染色し、DYZ1領域のバンドがみられたものを男性由来とし、バンドがみられないものを女性由来とした。コントロールは、男女それぞれの成人単離リンパ球、男女それぞれの胎児単離有核赤血球およびno DNAとした。PCR法により判定した性別と分娩後に判明した児の性別との一致率を算出した。

[成績] 1. 妊娠8-23週の母体血より有核赤血球の単離回収が可能であった。2. DYZ1領域のPCR法では、単離細胞レベルでの感度が得られた。3. PCR法による単離有核赤血球の性別判定と児の性別の一致率は91%(10/11)であった。[結論] 妊娠8-23週の母体血より単離回収された有核赤血球からPCR法によりDYZ1領域のDNA情報が得られることが示され、それら有核赤血球は高率(91%)に胎児由来と考えられた。本法、PCR法およびFISH法の応用により母体血より無侵襲的に多くの胎児DNA情報の獲得が可能となり、近い将来その臨床的な応用、普及が見込まれる。

262 母体血を使った新しい出生前診断法の開発—HLA遺伝子を利用した血中微量混入細胞の検出—

国立大蔵病院、北里大免疫*
尹熙玉、田中忠夫、堤紀夫、倉島富代、伊藤治英、
小幡文弥*、柏木登*

[目的] 出生前DNA診断には、胎児のDNAが必要である。妊娠血中を循環している微量の胎児由来細胞を分離・同定できれば、非侵襲的な出生前診断が可能となる。そこで、Y染色体遺伝子の場合と異なり胎児の性別には関わりのないHLA遺伝子を利用して胎児細胞を回収する方法の基礎的検討を行った。

[方法] (1) 血中混入細胞の検出感度を知るために、異なるHLA-DRタイプを持つ二人の末梢血から有核細胞を分離し、それらを相互に1:1から1:10⁶までの比率で混合した。混合細胞から型の如くDNAを抽出し、DR特異的プライマーによるPCRを行い遺伝子を增幅し、電気泳動後、ナイロン膜にプロットした。次いで、標識した特異的プローブでSouthern Hybridizationし、検出した。

(2) 妊娠13週から20週までの妊娠の末梢血を材料として、その中に含まれる夫特異的HLA-DRタイプを持つ胎児有核赤芽球の検出を、同様の方法で試みた。

[成績] (1) 26、30、40サイクルとPCRのサイクル数を増やすことにより、混合細胞の検出感度は、各々10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵倍と上昇した。しかし、疑陽性のない安定した結果は30サイクルで得られ、その時の検出感度は10⁻⁴倍であった。

(2) 10mlの妊娠末梢血中からは、密度勾配遠心法および細胞表面抗原を利用した細胞分画法を用いて胎児有核赤芽球を濃縮しない限り、胎児の遺伝子は検出し得なかった。

[結論] HLA遺伝子を利用することにより、血中に存在する微量混入細胞の検出が可能であった。しかし、臨床に用いるには、更に感度を上げるための工夫が必要である。