

母体血中への有核赤血球の出現

金沢医科大学産科婦人科学教室

*うきた病院

**石川県予防医学協会

高林 晴夫 桑原 惣隆 浮田 俊彦*

山藤 薫* 伊川 和美**

Appearance of Nucleated Erythrocytes in Maternal Blood

Haruo TAKABAYASHI, Soryu KUWABARA, Toshihiko UKITA*,

Kaoru YAMAFUJI* and Kazumi IKAWA**

Department of Obstetrics and Gynecology, Kanazawa Medical University, Ishikawa

**Ukita Hospital, Ishikawa*

***Ishikawa Health Service Association, Ishikawa*

概要 近年、新しい胎児 DNA 診断法として母体血中の胎児有核細胞による DNA 分析が強い関心を集めている。標的細胞として胎児白血球、胎児有核赤血球、絨毛細胞が考えられるが、なかでも実際には胎児有核赤血球を標的とした研究が多く進められている。我々は以前に母体血中の胎児有核赤血球の回収法として、新しく Percoll 不連続密度勾配比重遠心法を開発し報告を行ってきたが、今回、本法を用いて母体血中への有核赤血球の出現状況を正常妊婦91例、正常褥婦19例、コントロール20例について検討を行った。その結果、健康成人男女20例からは有核赤血球の出現はみられず、母体血中からは妊娠5週よりその出現がみられ始め、8週以降は全例にみられた。

母体血 (7ml) 中に出現する有核赤血球数についても検討を行った。妊娠初期では5週より出現がみられ、20週に向けて漸増し、中期では平均20個台で推移し、分娩前に急増し、分娩後は速やかに減少する傾向を示した。

以上より、母体血中の胎児有核細胞による胎児 DNA 診断を進める場合、胎児有核赤血球を標的細胞とすることの有用性が示された。

Synopsis Several attempts have been made to detect and retrieve fetal nucleated cells including nucleated erythrocytes (NRBCs), leukocytes and trophoblasts in maternal blood. We have recently developed a new method for non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. Peripheral blood granulocytes including NRBCs were isolated by a discontinuous density gradient method using Percoll (Pharmacia). And then NRBCs were found under a microscope.

Nobody yet knows exactly how many NRBCs appear in the maternal blood. So the presence of NRBCs in the enriched cellular elements from 91 maternal blood samples, as well as from normal adult controls, was analyzed. NRBCs were found in 82 out of 91 maternal samples. The earliest stage of gestation at which nucleated erythrocytes were detected was 5 weeks. And then NRBCs were detected in all cases later than 8 weeks of gestation. Nucleated erythrocytes were found in 13 out of 19 puerpera blood samples. No NRBCs were found in the 20 adult controls.

The average number of NRBCs detected in 7 ml of maternal blood increases according to gestational weeks and then decreases after delivery.

In conclusion, NRBCs constantly appear in the maternal blood later than 8 weeks of gestation and disappear soon after delivery. So NRBCs in the maternal blood seem very useful for non-invasive fetal DNA diagnosis. Our technique opens up fetal DNA diagnosis from maternal blood during the first trimester of pregnancy to all pregnant women because there is no risk to the fetus or the

mother.

Key words: Maternal blood • Nucleated erythrocyte • Percoll method

緒言

新しい胎児 DNA 診断法として母体血中の胎児有核細胞を回収し, polymerase chain reaction (PCR) や fluorescence in situ hybridization (FISH) による分析が試みられている. 母体血中に出現する胎児有核細胞として胎児リンパ球, 胎児顆粒球, 胎児有核赤血球, 絨毛細胞があげられるが, 現状では胎児有核赤血球を標的にした研究^{1)~5)}が多い. 我々は, これまで母体血中より胎児有核赤血球を回収し, PCR による分析が可能であることを発表してきた^{6)~12)}が, 今回は, 母体血中に有核赤血球がどの程度に出現するか, またその期間について検討を行った.

研究方法

正常妊婦91例, 正常褥婦19例, コントロールとして健康成人男性10例, 健康成人女性10例より末梢血を7ml 採血し, 検体とした. 検体は我々が開発した方法⁹⁾により処理を行った. まず Percoll 不連続密度勾配比重遠心法(図1)により有核赤血球を多数含む層を分離し, プレパラートを2枚作製し, May-Giemsa 染色を行った. 染色したプレパラートを鏡検し, プレパラート上の有核赤血球数を算出した. Percoll 液は, 比重1.075と1.085に調製し, それぞれ10ml を2層に重ね, その上に全血7ml を生理食塩水で2倍に希釈し重層した.

研究成績

Percoll 不連続密度勾配比重遠心法により母体血から分離した有核赤血球を図2に示す. 通常, 背景には顆粒球, 若干の赤血球がみられた. 末梢

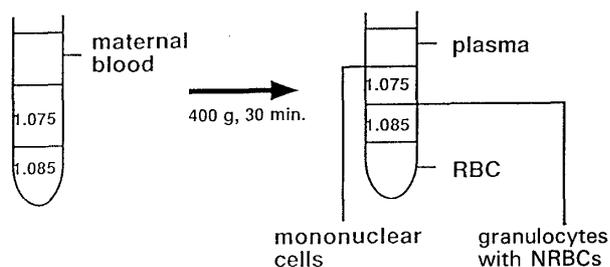


図1 Percoll 不連続密度勾配比重遠心法

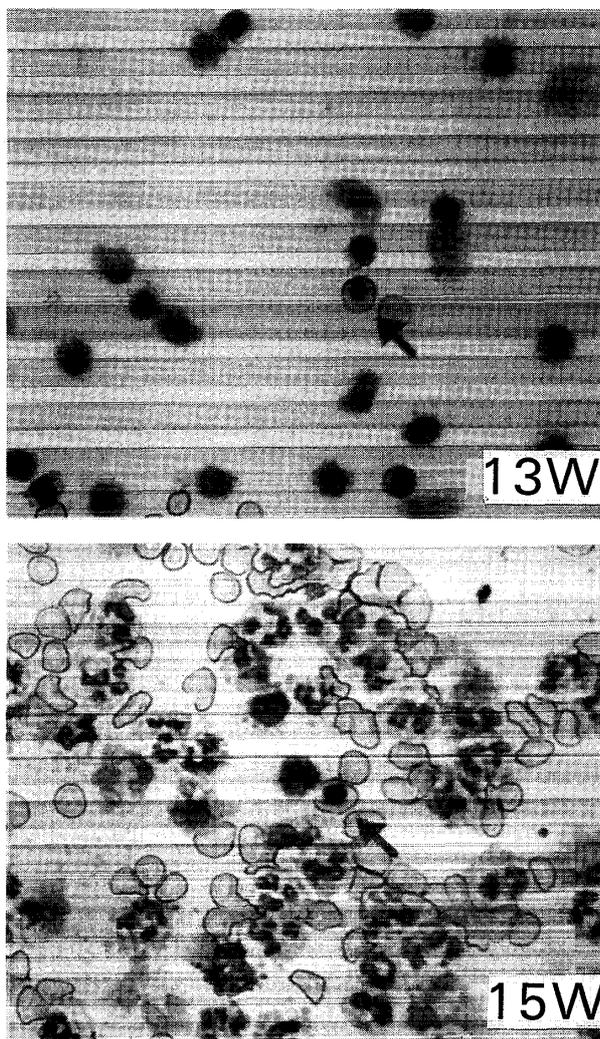


図2 母体血から分離後の有核赤血球(矢印)

血液中への有核赤血球の出現を図3に示す. 健康成人男性, 女性ともに全例(20例)において有核赤血球の出現はみられなかった. 母体血中への有核赤血球の出現は, 妊娠5週よりみられ, 妊娠8週以降では妊娠中全期間を通して100%(75/75)にみられた. また, 正常褥婦においては, 産褥3日では11例中10例(91%), 産褥1カ月では8例中3例(38%)に有核赤血球の出現がみられた.

次に, 妊娠, 産褥の各時期に母体血(7ml)中に出現した有核赤血球数(平均±SD)を示す(図4). 妊娠4~7週では, 2.8 ± 4.0 , 妊娠8~11週では, 5.1 ± 2.4 , 妊娠12~15週では, 8.4 ± 6.9 , 妊娠

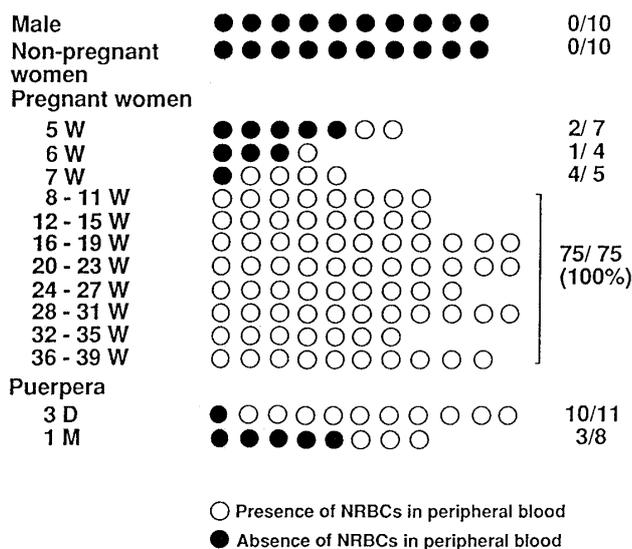


図3 母体血中への有核赤血球の出現の有無

16～19週では、 12.4 ± 7.4 、妊娠20～23週では、 25.4 ± 24.5 、妊娠24～27週では、 22.1 ± 26.0 、妊娠28～31週では、 25.5 ± 23.7 、妊娠32～35週では、 48.4 ± 58.4 、妊娠36週以降では 112.6 ± 59.3 、産褥3日では、 47.4 ± 54.7 、産褥1カ月では、 1.0 ± 1.5 であった。妊娠初期では5週より出現がみられ、20週に向けて漸増し、中期では平均20個台で推移し、分娩前に急増し、分娩後は速やかに減少する傾向を示した。

考 察

近年、母体血中の胎児有核細胞による胎児DNA診断への関心が高まってきている。母体血中の胎児有核細胞としては、胎児リンパ球、胎児顆粒球、胎児有核赤血球、絨毛細胞があげられ、それぞれに回収の試みが行われ、一定の成果が得られている。胎児白血球、なかでも胎児リンパ球は現状ではその分離がかなり困難であり、また母体血中での長期の残存例が報告¹³⁾¹⁴⁾されており、胎児DNA診断の標的細胞としては現状では問題がある。

一方、絨毛細胞は形態的特徴による識別は容易である反面、多核細胞の出現、mosaicismの出現、また胎児細胞による診断と比較した場合に約1%の不一致例がみられるとの報告¹⁵⁾もあり、標的細胞としては理想的とはいえない。

発見された有核赤血球の由来について今回は検

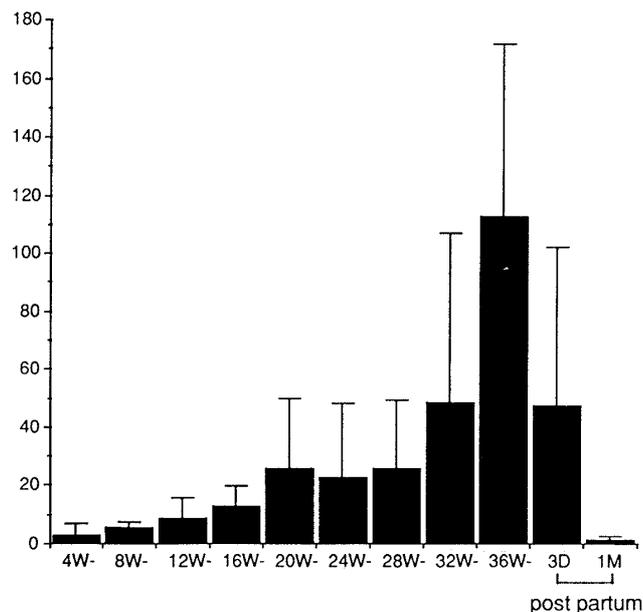


図4 母体血(7ml)中に出現した有核赤血球数 (平均±SD)

討を行わなかったが、以前行った検討結果⁹⁾から、そのほとんどが胎児由来であると思われる。胎児有核赤血球は、母体血中に妊娠初期から比較的多数出現し、形態的特徴がはっきりしており、life spanが4～5日と推定されている。現在のところ他の胎児有核細胞と較べて胎児DNA診断の標的細胞として最もその条件を満たしており、ほとんどの研究は有核赤血球を標的にしているといえる現状である。しかし、多くの有核赤血球を標的とした研究も、その分離法として fluorescence activated cell sorting (FACS) 又は magnetic activated cell sorting (MACS) により行われているものがほとんどである。FACSおよびMACSの場合、胎児有核赤血球に対する特異的モノクローナル抗体は現状では発見されておらず、胎児有核赤血球の選択的回収は難しく、母体由来細胞のコンタミネーションは免れ得ない。そうした事情を背景として、今回、我々の開発した有核赤血球の Percoll 不連続密度勾配比重遠心法に基づいて母体血中への有核赤血球の出現状況の検討を行ったが、妊娠5週から出現がみられ始め、8週以降では全例に出現が確認された。その結果、妊娠8週以降では、いつでも母体血中の胎児有核赤血球を使った胎児DNA診断が可能であることが示さ

れた。

また、正常妊娠であっても恒常的に胎児有核細胞成分の母体血への移行があることが確認されたことになり、その生物学的意味、意義についても今後検討を要すると思われる。分娩周辺時期の有核赤血球の推移も興味深く、分娩期前にその数は急増し、分娩後速やかに減少した。以上より、分娩後の有核赤血球の長期残存は無視し得ると考えられる。

以上、今回の成績より母体血中の胎児有核細胞による胎児DNA診断を進める場合、胎児有核赤血球を標的細胞とするのが、最も合理的であると考えられた。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金(05807101)および平成7年度金沢医科大学プロジェクト研究費により行われた。

文 献

1. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JHM, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3279—3283
2. Wachtel S, Elias S, Price J, Wachtel G, Phillips O, Shulman L, Meyers C, Simpson JL, Dockter M. Fetal cells in the maternal circulation: Isolation by multiparameter flow cytometry and confirmation by polymerase chain reaction. *Human Reprod* 1991; 6: 1466—1469
3. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood: Advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1993; 270: 2357—2361
4. Bianchi DW, Zickwolf GK, Yih MC, Flint AF, Geifman OH, Erikson MS, Williams JM. Erythroid-specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat Diagn* 1993; 3: 293—300
5. Gänshirt-Ahlert D, Burschyk M, Garritsen HSP, Helmer L, Miny P, Horst J, Schneider HPG, Holzgreve W. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1350—1355
6. Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis on maternal blood. In: Cosmi EW, ed. 2nd World Conference of Prenatal Medicine. Bologna: Monduzzi Editore, 1993; 143—148
7. 高林晴夫. 胎児診断の近未来. *日本医事新報* 1993; 3633: 8—13
8. Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Igarashi T. Fetal nucleated erythrocyte retrieval from maternal blood. In: Zakut H, ed. 7th International Conference on Early Prenatal Diagnosis. Bologna: Monduzzi Editore, 1994; 45—52
9. Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn* 1995; 15: 74—77
10. 高林晴夫. 母体血による胎児DNA診断. *治療* 1995; 77: 120—123
11. 高林晴夫. 母体血による胎児DNA診断法の開発と臨床応用. *病態生理* 1995; 14: 809—815
12. 高林晴夫. 母体血中の胎児有核細胞による出生前診断. *ペリネイタルケア* 1996; 15: 135—141
13. Schröder J, Tiilikainen A, de la Chapelle A. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. *Transplantation* 1974; 17: 346—354
14. Ciaranfi A, Curchod A, Odartchenko N. Survie de lymphocytes foetaux dans le sang maternel postpartum. *Schweiz Med Wochenschr* 1977; 107: 134—143
15. Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, Golbus MS, Pergament E, Jackson L, Mahoney MJ, Desnick RJ, Schulman J, Copeland KL, Verlinsky Y, Yang-Feng T, Schonberg SA, Babu A, Tharapel A, Dorfmann A, Lubs HA, Rhoads GG, Fowler SE, De la Cruz F. Cytogenetic results from the U.S. collaborative study on CVS. *Prenat Diagn* 1992; 12: 317—345

(No. 7830 平8・12・16受付)