

183 Single cellにおけるCell Recycling法の検討

鹿兒島大, 同医療短大*

川俣和弥, 池田敏郎, 野田芳人, 藤野敏則*,
永田行博

〔目的〕着床前遺伝子診断や母体血中胎児細胞を用いた遺伝子診断は主に単一細胞 (single cell) を対象としており, その有効な活用法が研究されてきている. 今回我々は, これらの診断精度の向上のため, ヒトリンパ球の同一単一細胞を用い, PCR法と, FISH法を順次行う Cell Recycling 法の可能性について検討した. 〔方法〕正常男性ヒトリンパ球単一細胞を用い, マイクロスライドガラス上に固定. まずPCR法は, Y染色体特異的配列DYZ-1を増幅目標としてdouble nested PCR法を行った. 1st PCRは, reaction volume が50 μ lで, スライドガラスをPCR反応液に浸した状態でいき, 2nd PCRは, 1st PCR後の反応液1 μ lをサンプルとして, reaction volume が10 μ lのcapillary PCR法にて行った. 増幅産物は電気泳動後, UV下にバンドの確認を行った. 1stPCR終了後, スライドガラスを洗浄, XおよびY染色体特異的プローブ CEP X Y (Vysis, VYS-32-131018)を用い, 72℃で2分間 denature, 42℃にて1時間 hybridizationを行った. 余剰プローブの洗浄後, 核をDAPIにて染色し, 蛍光顕微鏡下にシグナルの観察を行った. PCRとFISHの二行程終了に約4時間を要した. 〔成績〕単一細胞を材料として, double nested PCR法にてY染色体特異的領域の増幅が可能で, その正診率は88% (14/16)であった. つぎのFISH法では, PCR後の細胞の残存率88% (14/16), このうちXYのシグナルが86% (12/14)で確認可能であった. 〔結論〕PCRとFISHの2つの診断法を同一細胞に用いることが可能であることを明らかにした. この技術により, 診断精度の向上とともに, 単一細胞からより多くの遺伝情報を知ることができる.

184 母体血より有核赤血球を回収するための最適比重ウインドウの検討

-母体血による胎児DNA診断に関連して-

金沢医大, 金沢・うきた病院*

藤井亮太, 井浦俊彦, 高林晴夫, 桑原惣隆,
牧野田 知, 山藤 薫*, 浮田俊彦*

〔目的〕母体血より胎児DNA情報を得るための第1段階は, 胎児有核細胞を適切に回収することである. 我々は今回, 臍帯血を用い胎児有核赤血球(NRBC)が, 何処の比重層間により多く集まるか基礎的検討を行った.

〔方法〕Percollを1.060g/ml, 1.075g/ml, 1.080g/ml, 1.085g/ml, 1.090g/mlの比重に調整し, 各1mlずつ重層した. その上に臍帯血2ml(6例)をPBSで2倍に稀釈し, 4mlにしたものを重層した. さらに3000rpm, 30分で遠心し, 20分静置した後, 各層にわけ2000rpm, 10分で洗浄した. 集まった血球は塗抹標本を作製し乾燥固定後 May-Giemsa 染色を行った. 各層それぞれの標本からNRBCの割合を算定し比較を行った.

〔成績〕NRBCの平均出現率は全血では0.265%, 1.060g/mlより軽い層では0.272%, 1.060~1.075g/ml間では2.53%, 1.075~1.080g/ml間では2.32%, 1.080~1.085g/ml間では2.36%, 1.085~1.090g/ml間では0.015%, 1.090g/mlより重い層では0%であった. また1.060~1.075g/ml間は幼若なNRBCが多く, 1.075~1.080g/ml間では多染性のNRBCが多く, 1.080~1.085g/ml間では正染性のNRBCが多いことが確かめられた.

〔結論〕1.060~1.085g/ml間にNRBCが多く集まることが判明した. しかし1.060~1.075g/ml間は, 主にリンパ球が集まる比重であり幼若なNRBCとの区別が容易ではないと思われた. 従ってリンパ球や好中球と判別が容易な多染性, 正染性のNRBCをより多く含む1.075~1.085g/ml間をNRBCを回収するための最適比重ウインドウとした.