

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 53, No. 4, pp.737—742, 2001 (平成13, 4月)

原 著

## 未培養羊水細胞を用いた FISH 法による迅速な出生前診断

名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室  
西川 尚実 種村 光代 鈴森 薫

Rapid Prenatal Diagnosis of Chromosome Aneuploidy by Uncultured Amniotic Fluid Cells by Means of Fluorescence In Situ Hybridization

Naomi NISHIKAWA, Mitsuyo TANEMURA and Kaoru SUZUMORI

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University Medical School, Nagoya

**概要** 目的：母体血清マーカー検査の普及に伴い、その結果により確定診断として羊水検査を行う機会が増えているが、受診妊娠週数が遅く従来の羊水細胞培養による核型分析を行う時間的余裕がない場合も少なくない。迅速な結果を得るために未培養羊水細胞を用いて FISH(fluorescence in situ hybridization)法を施行しその有用性を検討した。

方法：胎児染色体分析目的で羊水検査を受けた妊娠15～25週の110名の妊婦より採取した羊水のうち約2mlを遠沈し、未培養細胞をスライドに固定し標本を作製した。13, 18, 21番と X, Y 染色体に特異的な DNA プローブを用いて、multicolor FISH 法を行い蛍光顕微鏡下で観察し、G 分染法による核型分析と比較した。

成績：110例中全例で50細胞以上に各染色体に特異的なシグナルを検出することができた。後日得られた培養後の核型分析で1例に18番染色体のモザイクを認めたが、FISH 法による分析では92.0%の細胞で18番シグナルは2個認めるのみで、臍帯血による再検でもモザイクは否定された。他の109例では21trisomy の2症例と47, XXY, 46, XX/47, XXX を含め全例13, 18, 21, X, Y 染色体の数に関して培養による核型分析と86.0～93.2%の一一致率で同様の結果を得た。

結論：FISH 法を用いることにより羊水採取から2日であらかじめ設定した染色体の数的異常について診断が可能であった。本法にて新生児集団の染色体異常の95%を占める21, 18, 13trisomy と性染色体数的異常が迅速に分析でき、今後母体血清マーカー検査におけるスクリーニング陽性症例等に応用できると考えられた。

**Abstract** Objective : This study was performed to evaluate the effectiveness of rapid prenatal detection of numerical chromosome abnormalities by using fluorescence in situ hybridization (FISH) for uncultured amniotic fluid samples.

Methods : Samples of amniotic fluid from 110 pregnant women at 15—25 weeks gestation were evaluated in parallel by cytogenetic and FISH analyses. With DNA probes specific for chromosomes 21, 18, 13, X and Y, we prospectively compared the results of multicolor FISH on uncultured amniotic fluid cells and conventional cytogenetics.

Results : In all cases, signals specific for 21, 18, 13, X and Y chromosomes could be obtained in more than 50 scorable nuclei. The same signal count as with cytogenetic analysis was correctly detected in 109 samples including two trisomy 21, a 47, XXY and a 46, XX/47, XXX mosaic cases. The detection rate was 86.0—93.2%. One case of a trisomy 18 mosaic diagnosed by cytogenetic analysis was not found by FISH analysis or cord centesis. The rate of maternal cell contamination of male cases was 6.1%.

Conclusions : With the application of multicolor FISH to interphase cells, results are available within 2 days after amniocentesis. We can diagnose 21, 18, 13 trisomy and sex chromosome aneuploidies which account for more than 95% of chromosomal abnormalities in newborns. For cases with determination of in-

creased trisomy risk by serum screening or maternal age, FISH analysis can provide a rapid and accurate clinical method for prenatal diagnosis.

**Key words :**Prenatal diagnosis・Amniotic fluid・Fluorescence in situ hybridization・Chromosome aneuploidy

## 緒 言

羊水による胎児染色体検査は約2週間培養した羊水細胞から胎児の染色体分析を行う出生前診断の代表的な検査法で手技的にも安全が確立している。最近はさらに非侵襲的な母体血清マーカー検査が普及しているがその結果により確定診断が必要となる症例に対して羊水検査を行う機会も増えてきている。当院では年間400件以上、今まで計7,000件羊水検査を行っているが、検査の適応として昨年には約5%を母体血清マーカー検査の結果により確定診断を希望した例が占めていた。しかし受診週数が遅く羊水細胞培養による核型分析を行う時間的余裕がない場合も少なくない。一方、胎児発育遅延、胎児奇形などの治療や分娩様式決定の情報として迅速に結果を得たい症例も多々経験する。fluorescence in situ hybridization(FISH)法を羊水細胞の間期核に施行することにより指定した数種類の染色体の数的異常を迅速かつ正確に検出することが可能かどうかを検討した。

## 研究対象と方法

対象は妊娠15週から25週までの胎児染色体分析目的で羊水検査を受けた妊婦で同意を得た110名である。その内訳については母体高年齢、染色体異常児分娩の既往、患者の不安・希望に続いて、母体血清マーカー検査(ダブルまたはトリプルマーカー)で確率高値と胎児奇形が挙げられた(Table 1)。羊水採取時に肉眼的に明らかに母体血

が混入した症例は除外した。

### [標本作製法]

羊水を23G カテラン針にて12ml 採取し、うち10mlは核型分析に使用し残りの2mlにphosphate buffer saline(PBS)10mlを加えて遠心分離し(1,500rpm 10分)細胞ペレットの色を確認した。細胞ペレットを100μlのPBSに再浮遊し、スライドグラス上2カ所に滴下し円状に広げ37°Cで15分間インキュベートした。次に75mM KClを50ml加え低張処理をした。余分な液滴を吸い取り100μlの75mM KCl/カルノア液(7:3)をスライド上に滴下し5分間固定後100%カルノア液を滴下しスライドを60°Cで5分間乾燥させ70%/85%/100%のエタノールに2分ずつ浸し脱水した<sup>1)</sup>。

### [DNA プローブ]

DNA プローブは CEP X/Y/18 と LSI 13/21 (Vysis 社, USA)を使用し dual-color FISH, triple-color FISH を施行した。各々蛍光色素 Spectrum green, Spectrum orange, Spectrum aqua で直接標識されている(Table 2)。

### [FISH]

製品プロトコールに従いスライドを73°Cの70%ホルムアミド/2×standard saline citrate(SSC)液に5分間浸し変性させた後、70%/85%/100%のエタノールに2分ずつ浸し脱水、風乾した。あらかじめ変性させてあるプローブをそれぞれ10μlずつ標本に載せ37°Cで4時間から一晩インキュベー

Table 1 Indication of amniocentesis for analyzing fetal karyotypes

advanced maternal age(35—45y. o.)	80(72.7%)
history of fetus or child with chromosomal abnormality	9(8.2%)
hope or anxiety	7(6.4%)
increased trisomy risk detected in maternal serum screening	6(5.5%)
fetal anomaly	2(1.8%)
carrier of translocation	1(0.9%)
other	5(4.5%)
total	110

Table 2 DNA probes for FISH

CEP X/Y/18	
X ; D18Z1	— Spectrum green
Y ; DYZ3, alpha satellite	— Spectrum orange
18 ; D18Z1	— Spectrum aqua
LSI 13/21	
13 ; Retinoblastoma gene-1	— Spectrum green
21 ; D21S259, 341-342	— Spectrum orange

Table 3 The results of cytogenetic analysis(G-banding)

46, XY	53
46, XX	49
47, XXY	1
47, XY, +21	2
46, XY, t(8;20) (p21; p11.2)	1
46, XY, inv(9) (p11.2q13)	2
mos46, XX/47, XXX	1
mos46, XX/47, XX, +18	1
total	110

トした。45°Cの50%ホルムアミド/2×SSC液にて10分を3回と2×SSC/0.1%NP-40にて10分洗浄処理した。DAPI II counterstain(Vysis社, USA)にて対比染色後、蛍光顕微鏡(OPTIPHOTO-2; Nikon, JAPAN)下で観察、画像解析装置の Cytovision(Applied Imaging社, USA)で解析しそれぞれのシグナル数を各々50細胞につきカウントしG分染法による核型分析と比較した。

### 結果

G分染法による核型分析結果はTable 3に示すように正常核型が102例、Down症候群(47, XY, +21)が2例、9番染色体の逆位が2例、Klinefelter症候群(47, XXY)が1例、母親由来の相互転座が1例、モザイクが2例(46, XX/47, XXXと46, XX/47, XX, +18)であった。未培養羊水の間期細胞のFISH法による結果と写真をTable 4とFig. 1に示す。

110例全例で50細胞以上に各染色体に特異的なシグナルが検出できた。58例において88.0%の細胞にX, Yシグナルが1個ずつ観察され男児と診断、50例において94.6%に2個のXシグナルが観察され女児と診断した。男児において6.1%の細胞にXシグナルを2個のみ認めたことより母体リンパ球の混入と考えられた。86.0%の間期細胞で

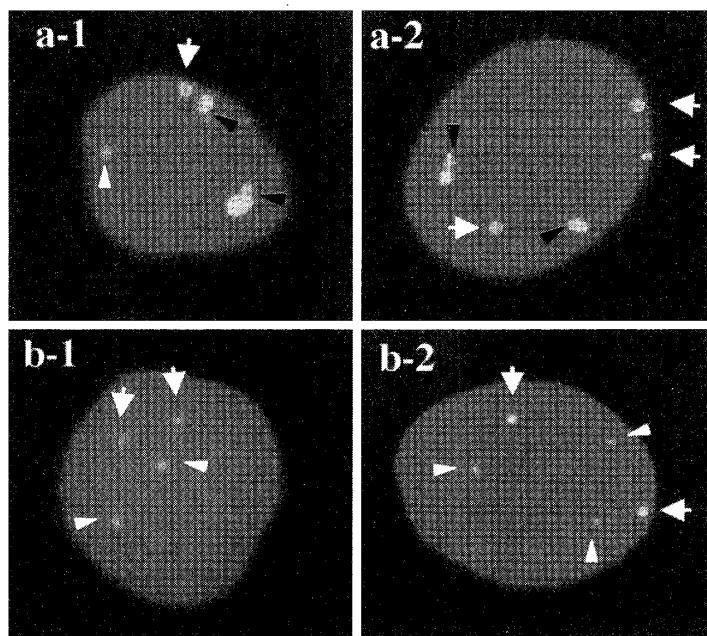


Fig. 1 Multicolor FISH on amniotic fluid cells

(a. Three color FISH, b. Two color FISH)

a-1. Male fetus shows one green(X△), one orange(Y△) and two aqua signals(18▲). a-2. Super female shows three green and two aqua signals. b-1. Showing two green(13△) and two orange signals(21△) is normal. b-2. 21 trisomy shows two green and three orange signals.

Xシグナル2個とYシグナル1個が認められた症例はKlinefelter症候群と診断した。また46, XX/47, XXXのモザイクの症例ではその比率もG分染法によるものとほぼ一致した結果を得ることができた。18番染色体は109例において93.2%の間期細胞にシグナルを2個認めた。G分染法による分析で18 trisomyのモザイクと診断された症例もFISH法による分析では92.0%の細胞で18番シグナルを2個認めるのみで、臍帯血による再検結果でもモザイクは否定された。13と21番染色体については2例で91.0%の細胞に21のシグナルが3個認められ、G分染法でも21 trisomyと診断された。他の108例では92.6%にそれぞれ2個ずつシグナルが認められた。

### 考察

ここ数十年の間に女性の結婚年齢の上昇が進み高齢妊婦の占める割合が増え、少子化と情報社会という現象も加わり胎児の染色体スクリーニング

Table 4 The results of FISH analysis of uncultured amniotic fluid cells

Chromosome X/Y	
46, XY (53 cases), 46, XY, t(8;20) (1 case), 46, XY, inv(9) (2 cases)	
47, XY,+21 (2 cases) — total 2,900 cells	
X×1/Y×1 signals ; 2,552 cells (88.0%)	
X×2 signals ; 177 cells (6.1%)	
X×1 signals ; 89 cells (3.1%)	
Y×1 signal ; 82 cells (2.8%)	
46, XX (49 case), 46, XX/47, XX,+18 (1 case) — total 2,500 cells	
X×2 signals ; 2,365 cells (94.6%)	
X×3 signals ; 58 cells (2.3%)	
X×1 signal ; 77 cells (3.1%)	
47, XXY (1 case) — total 50 cells	
X×2/Y×1 signals ; 43 cells (86.0%)	
X×1/Y×1 signals ; 5 cells (10.0%)	
X×2 signals ; 2 cells (4.0%)	
46, XX/47, XXX (1 case) — total 50 cells	
X×2 signals ; 19 cells (38.0%)	
X×3 signals ; 31 cells (62.0%)	
Chromosome 18	
normal (109 cases) — total 5,450 cells	
18×2 signals ; 5,084 cells (93.3%)	
18×1 signals ; 200 cells (3.7%)	
18×3 signal ; 166 cells (3.0%)	
46, XX/47, XX, +18 (1 case) — total 50 cells	
18×2 signals ; 46 cells (92.0%)	
18×1 signals ; 2 cells (4.0%)	
18×3 signal ; 2 cells (4.0%)	
chromosome 13/21	
normal (108 cases) — total 5,400 cells	
13×2/21×2 signals ; 5,003 cells (92.6%)	
13×1/21×2 signals ; 179 cells (3.3%)	
13×2/21×1 signals ; 139 cells (2.6%)	
13×2/21×3 signals ; 46 cells (0.9%)	
13×3/21×2 signals ; 33 cells (0.6%)	
47, XY,+21 (2 cases) — total 100 cells	
13×2/21×3 signals ; 91 cells (91.0%)	
13×2/21×2 signals ; 6 cells (6.0%)	
13×1/21×3 signals ; 3 cells (3.0%)	

検査のニーズが増している。羊水検査の適応も以前は染色体異常児分娩の既往が大部分を占めたが現在では7割以上が高年齢となっている。我が国では1994年より母体血清マーカー検査(ダブルまたはトリプルマーカーテスト)も普及しており、今回5.5%がマーカー検査後の確定診断のため羊水検査を受けている。この検査は結果が確率で示されるためその評価につき患者が理解しにくかった

りかえってとまどうケースもみられ、実施に際しては本スクリーニングの原理、目的、方法、結果の理解の仕方について十分な説明が求められる<sup>2)</sup>。

一方、1990年頃よりFISH法が開発され、胎児染色体異常の診断にも応用されるようになってきた。未培養羊水細胞にFISHを行った研究は1992年Klinger et al.によって報告されたのが最初であ

2001年4月

西川他

741

る<sup>3)</sup>。1993年のWard et al.の報告では異常検出率は73.3%であった<sup>4)</sup>がその後のDivane et al., Eiben et al.の報告ではより高い正診率が示されている<sup>5)6)</sup>。一方 Bryndorf et al.は hybridization の不成功またはシグナル陽性細胞が少ないと、母体血の高頻度の混入のためよい結果は出せなかつたとしている<sup>1)</sup>。

使用したプローブによっても雑種形成やシグナルの励起波長により、結果が左右される<sup>8)</sup>。今回我々が使用したプローブは CEP 18/X/Y と LSI 13/21で DNA が各々直接標識されており、従来使用していた  $\alpha$ -satellite probe や Tel 13q, 21q probe を使用した間接法に比べて簡便で迅速となった。FISH 法では異常のシグナル数をもつ細胞(たとえば21番シグナルが3個認められる細胞)が8割以上認められれば染色体異常と推定できると考えられるが、モザイクとの鑑別に核型分析が必須となる。

FISH 法による出生前診断の特徴として以下のような点が挙げられる。①一度に多数の細胞を分析でき羊水採取の当日か翌日に結果が得られる。②未培養での分析であるため培養過程で発生する偽モザイクを回避できる。③今回使用した13, 18, 21, X, Y 染色体に特異的なプローブを用いることにより、新生児集団の染色体異常の約95%が分析できる。Feldman et al. は染色体異常の危険性の高い胎児奇形例に対して行った FISH 法による診断で100%近くの特異度を示したとし、本法を標準的な出生前診断として使用できると報告している<sup>8)</sup>。

しかしこの方法ではあらかじめ設定した染色体についてのみの数的異常しか分析できず逆位、転座、欠失などの構造異常やマーカー染色体については分析できない。今回の対象には母親と同様の相互転座であることが判明した1例と、9番染色体の逆位2例が認められた。表現型は正常であり妊娠を継続するという点では問題なかったといえる。また母体血の混入による誤診を生じる可能性も否定できない。今回我々は遠沈後の細胞沈渣中に明らかに母体血を認める症例は除外して検討したが男児症例の6.1%に母体血由来と考えられる

細胞が認められた。細胞沈渣中の赤血球の有無について早田らは5段階に評価し、レベル1(赤血球は肉眼で全く存在しない)とレベル2(微血性；極少量の赤血球混在)のみ FISH 可能検体にするべきであるとしている<sup>7)</sup>。以上の点より FISH 法単独での確定診断は避け核型分析の補助的検査として応用することが望ましいと考えられた。Thein et al.は検査適応のうち胎児形態異常と nuchal translucency 症例に染色体異常率が20.1～34.5%と高く、母体高年齢と血清マーカーの検査結果による症例では異常率が2.7～3.5%と低かったことより、超音波で異常がない症例では FISH 法による出生前診断をまず行ってよいと述べている<sup>9)</sup>。加えて迅速に結果を得たい妊娠20週以降や周産期の胎児奇形症例なども補助診断として本法を応用したい。

ただし D' Alton et al. が妊娠33週以降の未培養羊水細胞での FISH では結果が不確実であると指摘しているように<sup>10)</sup>、我々も妊娠15～20週に比較すると25週以降の症例ではシグナル陽性細胞の率が少なからず母体血混入の頻度が高くなつた経験があり、正診率が低下する可能性がある点を留意しなくてはならない。

なお、本稿の要項は第51回日本産科婦人科学会学術講演会にて発表した。

## 文 獻

- Bryndorf T, Christensen B, Vad M, Parner J, Brocks V, Philip J. Prenatal detection of chromosome aneuploidies by Fluorescence in situ hybridization; Experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial. *Prenat Diagn* 1997; 17: 333—341
- 鈴森 薫. ダブル・トリプルマーカーテスト. 周産期医学 1999; 29: 291—295
- Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Pat L, Lerner T, Osathanondh R, Leverone B, Houseal T, Pavelka K, Dackowski W. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1992; 51: 55—65
- Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by Fluorescence in situ hy-

- bridization : Clinical experience with 4,500 specimens. Am J Hum Genet 1993 ; 52 : 854—865
5. Divane A, Carter NP, Spathas DH, Ferguson-Smith MA. Rapid diagnosis of aneuploidy from uncultured amniotic fluid cells using five-colour Fluorescence in situ hybridization. Prenat Diagn 1994 ; 14 : 1061—1069
6. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Eppelen JT. A prospective comparative study of fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. Prenat Diagn 1998 ; 18 : 901—906
7. 早田正和, 原田直樹, 西村知子, 野田一夫, 阿部京子, 新川詔夫. 未培養羊水細胞を用いたFISH法による染色体異数体の検出. 臨床病理 1998 ; 46 : 468—492
8. Feldman B, Ebrahim SAD, Hazan SL, Gyi K, Johnson MP, Johnson A, Evans MI. Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies. Am J Med Genet 2000 ; 90 : 233—238
9. Thein ATA, Abdel-Fattah SA, Kyle PM, Soothill PW. An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis. Prenat Diagn 2000 ; 20 : 275—280
10. D'Alton ME, Malone FD, Chalmow D, Ward BE, Bianchi DW. Defining the role of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies. Am J Obstet Gynecol 1997 ; 176 : 769—776  
(No. 8148 平12・7・21受付, 平12・12・18採用)