

P-907 母体末梢血中の胎児細胞除去における Fas 抗原-Fas リガンド系の関与筑波大¹, 茨城西南医療センター病院²宗田 聡¹, 濱田洋実¹, 漆川 邦¹, 小倉 剛¹, 安岡真奈¹, 渡邊秀樹¹, 藤木 豊¹, 山田直樹², 吉川裕之¹

【目的】妊娠初期より母体血漿中には胎児 DNA が存在しており, これには母体末梢血中の極微量の胎児細胞のアポトーシスが深く関与していることが, 最近 TUNEL 法によって証明された。ただし, それに関わるアポトーシス系が Fas 抗原-Fas リガンド系であるかは不明である。そこで本研究は, Fas 抗原-Fas リガンド系が母体末梢血中胎児細胞のアポトーシスによる細胞除去に関与しているかを明らかにすることを目的とした。【方法】十分なインフォームドコンセントにより同意の得られた妊娠6~21週の妊婦21例から末梢血を採取し, Percoll 比重遠沈法にて有核細胞を分取, アポトーシスの Fas 抗原-Fas リガンド系解析のため, fluorescein isothiocyanate 標識した抗 Fas 抗体ならびに抗 Fas リガンド抗体で染色。さらに, phycoerythrin 標識した有核赤血球マーカー- γ -Hemoglobin antibody (γ -Hb) で二重染色した。これらをフローサイトメトリーにより解析し, 胎児由来細胞の確認には X, Y 染色体特異的なプローブを用いた FISH 法を用いた。【成績】母体末梢血中の γ -Hb 陽性細胞における Fas 抗原の発現は8.9%で, 形態学的に有核赤血球と確認された細胞における Fas 抗原の発現は2.6%であった。さらに, FISH 法により胎児由来と同定できた細胞における Fas 抗原の発現は0.8%であった。【結論】母体末梢血中の胎児由来有核赤血球における Fas 抗原の発現頻度は低く, 母体末梢血中胎児細胞のアポトーシスに Fas 抗原-Fas リガンド系がほとんど関与していないことが初めて示され, 他のアポトーシス系の関与が示唆された。

P-908 母体血有核赤血球の回収における高分子フィルター・レクチン法と胎児診断への応用

国立成育医療センター周産期科

和田誠司, 松本隆万, 尾見裕子, 林 聡, 藤井絵里子, 塚原優己, 小澤伸晃, 左合治彦, 久保隆彦, 北川道弘, 名取道也

【目的】母体血を用いた胎児診断を成功に導くためにはいかに多くの胎児細胞を分離・回収するかにかかっているといっても過言ではない。我々は母体血有核赤血球(NRBC)の回収に際し, これまで報告してきたパーコール・レクチン法での回収ロスの抑制ならびに回収操作の簡便化をはかるため新たに高分子フィルター法を開発し, 胎児診断へ応用することを目的とした。【方法】同意の得られた妊娠各期の妊婦40名を対象とし, 母体末梢血7mlを採取した。高分子フィルターを用いて赤血球をpurgeした後, 有核細胞を洗浄・回収し, 従来のレクチン法にてNRBCをチャンバースライド上で分離を行った。次に, 超音波エコーにて Trisomy 18が疑われた症例4例ならびに羊水染色体分析にて Trisomy 18と診断された3例に対し本法を用いて母体末梢血よりNRBCを回収し, FISH法にて診断を行った。【成績】NRBCの回収はこれまでの Ficoll を用いた方法では母体血1mlあたり 3.9 ± 2.8 であったが高分子フィルター法では 9.2 ± 2.7 と高率に回収された。また, Trisomy 18の症例に対するFISH法で Trisomy 18の診断が可能であった。【結論】今回新しく開発した高分子フィルター・レクチン法ではNRBCの高い回収率が示され, また直接母体末梢血を処理できるという簡便な方法で, 今後胎児診断の臨床応用に有用な方法であると考えられた。

★P-909 母体血中胎児 DNA 量の妊娠経過に伴う変化についての検討

長崎大

平木宏一, 増崎英明, 三浦清徳, 中山大介, 石丸忠之

【目的】母体血漿ないし血清中には胎児由来のフリーのDNAが相当量存在しており, 母体血からの胎児細胞の分離という過程を経ることなく, より簡便に胎児のDNA診断を行い得る可能性が示唆されている。今回, 男児を妊娠した母体の血漿から, 胎児のY染色体に特異的なDNA配列(SRY領域)のDNA量を定量し, 症例毎の妊娠週数に伴う推移を検討した。【方法】妊娠経過の正常な妊婦からインフォームドコンセントを得た後, 妊娠中静脈血4mlをEDTA加採血し, 2,000gで5分間遠心した。そして, 細胞成分を混じらないように慎重に血漿を分取した。この血漿1,600 μ lからQIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)によりDNAを抽出した。そして, 抽出したDNA量約100 μ lのうち2 μ lをDNAサンプルとした。Y染色体上のSRY遺伝子に特異的なPCRプライマーを用いて, ABI PRISM 7900 Sequence Detection Systemで定量的PCR法によりSRY領域のDNA量を定量した。【成績】現在までに男児を出産した2例について, 妊娠中に複数回のDNA量についての検討が可能であった。1例は母体血漿中の胎児DNA量は妊娠15週で0.373pg/ μ l, 妊娠26週で186 pg/ μ l, 妊娠28週で87.5 pg/ μ l, 妊娠30週で157.5 pg/ μ lであった。もう1例は妊娠19週で0.203 pg/ μ l, 妊娠28週で13.4 pg/ μ lであった。【結論】母体血中胎児DNAは妊娠経過に伴い増加する傾向が認められた。現在さらに症例を追加して検討中である。