

速 報

妊婦末梢血中の胎児由来細胞検出
—磁気細胞分離 system の応用—

岩手医科大学医学部産婦人科学教室

*岩手医科大学医学部生化学教室

福島 明宗 盛合 佳代 井筒 俊彦
西谷 巖 水澤 典子* 堀内 三郎*The Detection of Fetal Cells from Maternal Peripheral Blood
—The Application of the Magnetic Cell Sorting System—Akimune FUKUSHIMA, Kayo MORIAI, Toshihiko IZUTSU, Iwao NISHIYA,
Noriko MIZUSAWA* and Saburo HORIUCHI**Department of Obstetrics and Gynecology, Iwate Medical University, Morioka***Department of Biochemistry, Iwate Medical University, Morioka***Key words:** Fetal cell isolation • Maternal peripheral blood • Magnetic cell sorting • PCR

緒 言

近年における検体採取法およびその解析法の進歩により、周産期医学の分野においても数々の出生前診断が可能になった。しかしそのために極めて侵襲度の高い検査法が用いられることも多い。1893年に Schmorl が子癇患者の肺より trophoblast を発見報告して以来¹⁾、妊娠中の妊婦末梢血には極微量の胎児由来細胞が存在していることが知られている^{2)~4)}。そしてこれら胎児由来細胞を採取し、母体内の胎児情報を非侵襲的に得ようとする試みも各種行われていたが、微量細胞採取の困難性ゆえにいまだに実用化には至っていない。我々は以前より効率のよい微量細胞検出・同定には比重遠心法や各種特異抗体を用いたサンプルの前処理(enrichment)が必要であると考えていた。今回それら方法を応用し、簡便かつ効率的な胎児由来有核赤血球検出方法を開発すべく各種検討を加えたので報告する。

方 法

超音波画像診断法にて男児と判定し、出生後確定した妊娠26~33週までの妊婦ボランティア9名から十分なるインフォームド Consentのもと、各々10mlの妊婦末梢血を採取した。これら血液より Histopaque™比重遠心法⁵⁾を用いて有核細胞集団を分離採取した。この有核細胞集団から磁気細胞分離 system (MACS)⁶⁾を用いて CD45 に反応しない細胞(CD45-)を第一段階として negative selection した後、さらに glycophorin A に反応する細胞(GA+)を第二段階として positive selecti-

on した。このように分離採取された細胞集団(CD45-/GA+)の DNA 全量から nested PCR の手法⁷⁾を用いて Y 染色体特異領域の増幅を行った。primer は Y 染色体特異性の高い Y1.5, Y1.6, Y1.7, Y1.8⁸⁾を使用した。まず Y1.5, Y1.6 を用いて増幅した 1st product を希釈後、さらに Y1.7, Y1.8 を用いて 198bp 領域の 2nd product を増幅、この領域が確認されたものを胎児由来細胞検出症例とした。なお本研究では 1st PCR 40 cycle, 2nd PCR は 20~50 cycles を比較検討した。これら臨床実験に先立ち、我々は比重遠心法と nested PCR を用いた本 system によってどのくらいの感度で胎児由来細胞が検出可能であるかの基礎実験を行った。すなわち非妊娠女性由来白血球 10⁶個中に男性由来白血球を 5~10³個まで混入させたサンプルを作成し、上記の nested PCR の手法を用いて 198bp 領域の検出を行った。

成 績

検出感度の検討から、2nd PCR 20 cycles では 10⁶個中10個以上のレベルより検出可能であり、10⁶個中5個以下のレベルでは 2nd PCR 45 cycles 以上でも検出はできなかった(図1)。以上の条件で妊婦末梢血9例について検討したところ、2nd PCR 45 cycles 以上では #1(妊娠32週)、#4(妊娠29週)以外すべての症例において 198bp 領域の増幅を認め、胎児由来細胞を確認した(図2)。

考 察

妊婦末梢血から採取された胎児由来細胞で各種遺伝子診断を行おうとする試みは、その非侵襲性

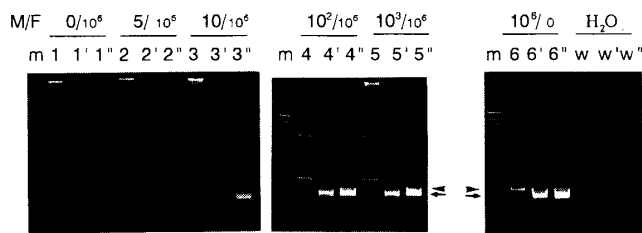


図1 微量 Y 染色体陽性細胞の検出. 非妊娠女性末梢血(F)より精製した有核細胞 10^6 個に対し, 男性末梢血(M)より精製した有核細胞を $5 \sim 10^3$ 個加えた. m: $\Psi \times 174$ /HaeIII 消化サイズマーカー, lane 1~6, W: 1st PCR products, lane 1'~6', W': 2nd PCR (20 cycles) products, lane 1''~6'', W'': 2nd PCR (45 cycles) products. PCR の条件: 1st PCR 95°C , 60°C , 72°C (各1分)40 cycles, 2nd PCR 95°C , 60°C , 72°C (各1分)20~45 cycles. 矢印頭は1st PCR による Y 染色体特異的なバンド(240bp, lane 4, 5, 6で検出). 矢印は nested PCR による Y 染色体特異的なバンド(198bp).

m 1 2 3 4 5 6 7 8 9 P N W

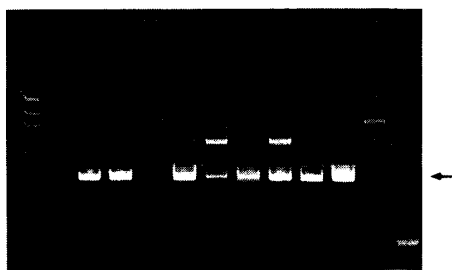


図2 妊婦末梢血中 Y 染色体陽性細胞の検出
m: pUC19/HaeIII 消化サイズマーカー, 1~9: 妊婦末梢血, P: positive control(男性末梢血), N: negative control(非妊娠女性末梢血), W: H_2O
PCR の条件: 図1に同じ(2nd PCR 45 cycles のみを掲載). 矢印は nested PCR による Y 染色体特異的なバンド(198bp).

からいって理想的な方法ではあるが, 実用化にあたっての問題は数多い. 特に従来報告されている方法^{8)~10)}では, 一般的に血液細胞の enrichment を行わず, 直接 FISH あるいは PCR により胎児由来細胞を検出しようとする場合が多く, その効率性や検出感度に問題があると考えられる. 今回我々が行った方法は, でき得るだけ目標とする細胞集団を enrichment することで検出効率や検出感度の向上をめざしたものであり, 今回胎児細胞確認に使用した nested PCR はもとより, 通常肉眼における scanning が必要な FISH による胎児由来細胞確認においても有効であると考えられる. 特にヘモグロビンやポルフィリン, その他の未知物質は PCR 反応を阻害するため¹¹⁾, でき得

るだけ無核赤血球を取り除く必要があり, 本 system のような前処理は必須であると考えられる. 今回検討した9例のうち, 2例(#1, #4)においては198bp 領域の増幅が認められなかったが, そのうち#4では, DNA 抽出量が極めて不十分であることが原因と考えられた. また#1は DNA 抽出量は十分あったが, 我々の system の測定感度は 10^6 個中10個以上であり, この症例ではそれ以下の胎児細胞しか存在していなかったことが予想された. 今回我々は超音波画像診断法より胎児が男児と判定した症例にのみ胎児由来細胞の検出を行ったが, 現在本 system のさらなる有用性を検討するため妊娠初期症例に限定し, 胎児の性別を問わずに検討しているところである. また同時に検出感度をさらに向上するための基礎的研究も継続中である.

文 献

1. Schmorl G. Pathologisch-anatomische untersuchungen uber puerperal eklampsie. Leipzig 1893; Vogel
2. Holzgreve W, Garritsen HSP, Ahlert DG. Fetal cells in the maternal circulation. J Rep Med 1992; 37: 410-418
3. Chueh J, Golbus MS. Prenatal diagnosis using fetal cells in the maternal circulation. Semin Perinatol 1990; 14: 471-482
4. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood. JAMA 1993; 17: 2357-2361
5. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 1968; 21: 77
6. Miltenyi A, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry 1990; 11: 231-238
7. Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 8998-9002
8. Lo YMD, Patel P, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. Lancet 1990; 335: 1463-1464
9. Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. Hum Genet 1993; 91: 427-432
10. Adkison LR, Andrews RH, Vowell NL, Koontz WL. Improved detection of fetal cells from maternal blood with polymerase chain reaction. Am J Obstet Gynecol 1994; 170: 952-955
11. Higuchi R. Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. Amplification, Perkin-Elmer Cetus 1989; 2: 1-3

(No. 7785 平8・7・15受付)