◆トピックス◆

母体血による胎児 DNA 診断

関 沢 明 彦^{*1}, 斎 藤 裕^{*1,*2}, 矢 内 原 巧^{*1}

Fetal DNA Diagnosis from Maternal Blood

Akihiko SEKIZAWA^{*1}, Hiroshi SAITO^{*1,*2} and Takumi YANAIHARA^{*1}

Key words : maternal blood, noninvasive prenatal diagnosis, PCR, FISH

はじめに

母体血中に胎児細胞が存在することが明らかになり、それを用いた胎児出生前診断が注目を集めている。母体血中には絨毛細胞、白血球、赤血球などの胎児細胞の存在が報告されているが、妊娠早期胎児に豊富で成人血中には普通存在しないという理由で有核赤血球を標的にする研究グループが大半である。しかしながら、母体血中の胎児細胞は1ml当たり1個程度と推測されるきわめて稀な細胞である。胎児細胞を確実に回収できれば分子生物学の進歩によりFluorescence in-situ hybridization (FISH) や Polymerase chain reaction (PCR) 法などを用いた母体血中 DNA 診断が比較的簡単にでき、この稀な胎児細胞を如何に効率よく全ての症例で回収できるようにするかが現時点での課題である。

本法についての新しい研究成果の発表の場として「母体血による胎児 DNA 診断」研究会が昨年発足し、第2回の研究会が1月23日東京にて開催された。研究会の詳細についてはインター

ネット上 (<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~FDD-MB/>) に公開している。

本稿では現在われわれが行っている胎児細胞回収法とそれに引き続く DNA 診断法について概説する。

胎児細胞回収法

妊婦末梢血を採血し比重遠沈法で1.075~1.085 g/mlの比重を持つ細胞を回収し、塗沫、図1のようにGiemsa染色で形態的に有核赤血球を識別し、顕微鏡観察下、Micromanipulatorを用いて胎児細胞を回収する¹⁾。この方法は確実に胎児細胞を捕捉できるかわりに有核赤血球を探すのに多大な労力を要するなど問題点もある。一方、ガンマヘモグロビン抗体を用いてFluorescence Activated Cell Sorter (FACS) で胎児ヘモグロビン陽性細胞を回収する方法²⁾もあるが実際の胎児細胞数がきわめて少ないため回収ロスが多いが機械的に胎児細胞が回収できる利点は大きい。

*1 昭和大学医学部産科婦人科学教室〔〒142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8〕

Department of Ob/Gyn, Showa University School of Medicine [1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan.]

*2 第2回「母体血による胎児 DNA 診断」研究会当番世話人〔〒142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8〕

Second Meeting on Fetal DNA Diagnosis from Maternal Blood [Department of Ob/Gyn, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan.]

図 1 左写真は母体血中に同定した有核赤血球でこの細胞を Micromanipulator を用いてスライドガラス上より剥離し回収する(中央の写真)。Microcapillary 中で回収した細胞を確認する(右写真)。

Micromanipulation

図 2 回収した単一細胞の DNA を抽出し、総量 60 μ l 中で PEP 法で全遺伝子増幅を行い、その産物の一部ずつを用いて ZFX/ZFY, HLA-DQ α などその細胞が胎児由来であることを確認した上で RhD, DMD, OTC などの遺伝子を同一産物から増幅し目的の遺伝子診断を行う。

PCR を用いた胎児 DNA 診断法

胎児細胞を Micromanipulator を用いて個々に回収し DNA を抽出、50base の oligonucleotides からなる random primer を用い、個々の細胞で Primer extension preamplification (PEP) 法で全遺伝子増幅を行う。その上で、目的の遺伝子領域を PCR 法でさらに増幅し遺伝子診断を行う(図 2)。われわれは、まず PEP 産物の一部を用い ZFX/ZFY 遺伝子を用いた性別診断や HLA-DQ α Typing³⁾を行い、その細胞が胎児由来であることを確認した上で同一の PEP 産物の一部で DMD⁴⁾, RhD 血液型⁵⁾や OTC⁶⁾などの遺伝子を PCR で増幅し、遺伝子欠失や変異を同一細胞内で確認している(図 3)。

また、FACS 法で回収した Purity の高い胎

児ヘモグロビン陽性細胞に FISH 法を行い、性別診断や胎児染色体数の診断を行うこともできる。われわれの開発した Poly-FISH 法は、同一細胞に 9 サイクルの FISH を繰り返す方法で、理論的に 24 種の染色体全ての FISH 診断が可能である⁷⁾。また、FISH 後その細胞をさらに Micromanipulate し、PCR 診断する Fetal cell recycling 法で同一サンプルから染色体異常と遺伝子異常の両方の診断が行えるようになっている。

まとめ

母体血中胎児細胞を用いた無侵襲的な出生前診断法の実際について概説した。この方法の確立は出生前医療に革命的な変化をもたらすものと考えられる。

図3 OTC欠損症の出生前診断

前児がOTC欠損症のため高アンモニア血症を起こし生後3日で死亡した既往をもつ婦人が妊娠。前の患児DNAよりPCR-SSCP法でOTC遺伝子exon 9に変異があることを確認し、変異遺伝子を同定。PCR-RFLP法(変異遺伝子はTaq Iで切断されない)でこの家系および今回妊娠中採取した羊水、母体血中胎児細胞の分析を行った。レーン2に示す妊婦は272bpの変異遺伝子および135, 137bpの正常遺伝子を有しておりOTC欠損症保因者と確認できた。レーン4のOTC児では272bpの変異遺伝子のみであった。今回の胎児は母体血中から分離した胎児細胞で変異遺伝子を認めず正常であると診断した。また、この結果は羊水細胞、および出生後の臍帯血で確認された。写真右はZFX/ZFY遺伝子での胎児の性別診断の結果で、羊水細胞、母体血中胎児細胞とも胎児は男児という結果であった。

文 献

- 1) Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T: Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenatal Diagnosis* 15: 74-77, 1995.
- 2) DeMaria MA, Zheng Y, Zhen DK, Weinschenk NM, Vadnais TJ, Bianchi DW: Improved fetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular anti fetal hemoglobin and Hoechst 33342. *Cytometry* 25: 37-45, 1996.
- 3) Sekizawa A, Watanabe A, Kimura K, Saito H, Yanaihara T, Sato T: Analysis of HLA-DQ alpha sequences for prenatal diagnosis in single fetal cells from maternal blood. *Hum Genet* 102: 393-396, 1998.
- 4) Sekizawa A, Kimura T, Sasaki M, Nakamura S, Kobayashi R, Sato T: Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood. *Neurology* 46: 1350-1353, 1996.
- 5) Sekizawa A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanaihara T, Sato T: Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstet Gynecol* 87: 501-505, 1996.
- 6) Watanabe A, Sekizawa A, Taguchi A, Saito H, Yanaihara T, Shimazu M, Matsuda I: Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency by using a single nucleated erythrocyte from maternal blood. *Hum Genet* 102: 611-615, 1998.
- 7) Zhen DK, Wang JY, Falco VM, Weber W, Delli-Bovi L, Bianchi DW: Poly-FISH: A technique of repeated hybridizations that improves cytogenetic analysis of fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 18: 1181-1185, 1998.