

3) 対象とする試料(資料)と入手方法

同意が得られた正常妊婦および胎児サラセミア疑いの妊婦から妊娠初期検査時に末梢血 7ml を採取する(EDTA 採血)。

当該妊婦の胎児に関する臨床情報(羊水穿刺・出生後の状態などの情報)は、診断結果の確認のために用いる。具体的には児の性別、染色体核型、遺伝子診断結果(遺伝性疾患家系や胎児貧血症例において)など染色体・遺伝子診断の結果を確認するための情報を用いる。

4) 解析方法

母体血 7ml を採血し、比重遠心法で単核球を分離した後、レクチンを用いて赤血球系細胞を濃縮し、スライドグラス上に塗沫。形態学的に有核赤血球を解析・同定し、その細胞に X, Y 特異的なプローブを用いた FISH を行い、性別診断を行う。また、サラセミア疾患家系の妊婦や胎児貧血が疑われる妊婦を対象に胎児細胞を分離し、遺伝子異常を WGA (全遺伝子増幅) 後アレイ CGH 法にて診断を行う。

C. 研究結果

- 1、妊娠各週より採取した母体抹消血より分離・回収した NRBC は平均 3.2 個/ml であった。
- 2、回収された NRBC が胎児由来であるかを検討するため、妊娠 16 週以下の 12 名の 男児妊娠中の母体血

を用いて Y プローブを用いた FISH 法を行ったところ全例で Y シグナルが確認でき、胎児由来と考えられる NRBC は 49.1% であった。(表 1)

- 3、本年度は α サラセミアの 2 変異、 β サラセミアの 9 変異を組み込んだアレイを作成した。(表 2) 得られた NRBC を WGA 後アレイ CGH 法にて診断する予定である。

D. 考察

母体血中には妊娠初期より胎児由来 NRBC が混入することは以前から知られていた。その細胞が分離・回収できれば胎児遺伝子診断が可能となる。我々の研究で妊娠初期から胎児 NRBC を回収することが可能で、この細胞を用いることにより遺伝子解析が可能と考えられる。回収した NRBC はごく少数のため、WGA を行い DNA 量を増幅させ、変異を組み込んだアレイ CGH 法にてサラセミアの胎児遺伝子診断を行う予定である。現在、欧米で 5 例の胎児遺伝子治療が報告されているが、いずれも不成功に終わっている。我々も無侵襲胎児遺伝子診断法の開発後、胎児遺伝子治療の研究を行う予定である。

表1

男児妊娠におけるFISH (Y-chromosome)

症例	採血週数	回収NRBC(7ml)	Y chromosome陽性
1	11W2D	24	14 (58.3%)
2	16W4D	8	8 (100%)
3	12W6D	20	9 (45%)
4	13W1D	4	4 (100%)
5	15W6D	8	4 (50%)
6	14W3D	29	10 (34.4%)
7	14W5D	18	9 (50%)
8	12W0D	8	3 (35%)
9	15W2D	31	16 (51.6%)
10	13W3D	5	2 (40%)
11	9W5D	16	5 (31.2%)
12	8W1D	12	7 (58.2%)
			平均(49.1%)

表2

検査対象遺伝子

	変異種	染色体	備考
αサラセミア	SEA FIL	16番	20kbの決失
βサラセミア	-1A-G IVS-II-1 G-A Codon90 TGA -4 codon 41/42 IVS-II-654 C-T -3 codon 127/128 Codon 121 TAA +T codon 85/86 開始 GCT	11番	ATA(-31cap A →G):promoter G→A splicing GAT→TAG nonsense TTCTTT→TT: Flame shift C→T: Splicing CAGGCT→CCT: 不安定 GAA→TAA: nonsense ATG→GTG: 翻訳開始

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）
（分担研究報告書）

母体血中有核赤血球回収におけるプロトコールの最適化に関する研究

研究分担者 関沢 明彦 昭和大学産婦人科准教授
高林 晴夫 金沢医大 FDD-MB センター長

【研究概要】

母体血中から有核赤血球を回収するプロトコールの最適化を行った。このステップは、無侵襲的なサラセミアの出生前診断の基礎となる技術である。

まず、血液検体採取後の比重遠沈法で単核球の分離を行うが、どの比重で行うのが最適かの検討を行った。さらに、妊娠 8-12 週、妊娠 12-15 週、妊娠 16-20 週の時期別の有核赤血球回収数を検討し、妊娠 8 週以降 20 週まで母体血 1mL 当り 1 個程度と回収細胞数に変化がないことを確認した。

【学術的な意義】

母体血中から胎児由来の有核赤血球を回収し、胎児の遺伝子診断を行う技術は、母体胎児に対し侵襲がなく、理想的な検査法である。この分野は、1992 年に、母体血中有核赤血球を用いて胎児のダウン症の診断が報告されてきて以来、盛んに研究されてきたが、国際的にも未だに母体血中から有核赤血球を確実に回収する方法が開発されていない現状にある。そのような中、我々のグループは母体血中から確実に有核赤血球を回収している唯一のグループであり、国際的にみてもこ

の分野のリーダー的な立ち位置にある。

【当面の課題】

母体血中から有核赤血球を確実に回収することで、その後の遺伝子解析を可能にする。

【中長期的な課題】

母体血中から有核赤血球を確実に回収する系を確立し、順次自動化を図る。まず、塗抹標本を染色し、スライド上の細胞画像をコンピューターに取り込み、形態的に有核赤血球を自動認識する装置の開発で、安定した細胞回収を実現したい。また、次のステップとして同定した有核赤血球の自動回収装置の開発も検討している。

研究成果

論文報告なし

学会発表

The 6th World Congress of Perinatal
Medicine for Developing Countries
Jakarta, Mar 8, 2010

Recent Advances in Prenatal Diagnosis
(Special Lecture)

Akihiko Sekizawa

Ⅲ. 研究成果の発表に関する一覧表

1) 国内学会 :

北美紀子、高林晴夫、小木美恵子、関沢明彦、千葉博、北川道弘、伊川和美、松本由佳、末岡宗廣

母体血による胎児 DNA 診断のための有核赤血球分離法の基礎的検討

第 12 回胎児遺伝子診断研究会 (西宮 09/2 月)

伊川和美、北美紀子、高村禪、齋藤真人、民谷栄一、高林晴夫

Single cell からの Whole Genome Amplification(WGA)の検討

第 12 回胎児遺伝子診断研究会 (西宮 09/2 月)

仲村将光、関沢明彦、Yuditiya Purwosunu、岡崎志帆、千葉博、清水華子、齋藤裕、岡井崇

妊娠高血圧症候群における母体血中細胞成分中の抗酸化遺伝子発現についての検討

第 12 回胎児遺伝子診断研究会 (西宮 09/2 月)

雲健史、井手上公太郎、北美紀子、高林晴夫、民谷栄一、高村禪

微小間隙を用いた胎児由来有核赤血球の抽出

2009 年秋季第 70 回応用物理学会 学術講演会 (富山 09/9 月)

服部真周、富澤祐一、伊川和美、北美紀子、高林晴夫、民谷栄一、高村禪

有核赤血球を用いた胎児診断用の WGA チップの開発

第 20 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (金沢 09/11 月)

雲健史、北美紀子、高林晴夫、民谷栄一、高村禪

微小間隙とダイアフラム構造の組み合わせによる胎児由来有核赤血球の捕捉および回収

第 20 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (金沢 09/11 月)

2) 国際学会 :

Purwosunu Y, Tkabayashi H, Kita M, Ikawa K, Sekizawa A, Chiba H, Kitagawa M.

FDD-MB (Fetal DNA Diagnosis from Maternal Blood) 2.0 System

CNAPS-VI (6th International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum)

2009 (Hong Kong, November 9-11)

