

氏 名(本 籍)	濱 田 洋 美 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,278 号
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age (母体末梢血中の胎児有核細胞—存在比率とその妊娠期間との関係—)
主 査	筑波大学教授 医学博士 三 澤 章 吾
副 査	筑波大学教授 医学博士 阿 部 帥
副 査	筑波大学教授 医学博士 稲 田 哲 雄
副 査	筑波大学教授 薬学博士 後 藤 勝 年
副 査	筑波大学助教授 医学博士 松 井 良 樹

論 文 の 要 旨

〈目的〉

現在、遺伝性疾患の出生前診断は、絨毛採取、羊水穿刺あるいは胎児採血により胎児由来の細胞を得て、これらを分析することにより行われている。しかしながら、これらの方法は母体および胎児に対して侵襲的である欠点がある。一方、妊娠中の母体末梢血中には、生理的にごく微量の胎児由来の有核細胞が存在していることが知られている。そこで、この胎児有核細胞を母体の末梢血採血により得て、この核内の DNA を用いて遺伝性疾患の出生前診断を行うことができれば、胎児に対して非侵襲的でありきわめて有用であると考えられる。しかしながら、現在のところ本法は一般的には可能とはなっていない。その大きな理由のひとつには、ごく微量の胎児有核細胞を得るにあたって、それらの細胞が妊娠のどの時期から母体末梢血中に存在し、その存在量はどのくらいで、また妊娠の進行に伴ってどのように変化するかについて、その結論が得られていないことがあげられる。そこで本研究は、母体末梢血中胎児有核細胞の母体有核細胞に対する存在比率とその妊娠経過の変化について明らかにすることを目的とした。

〈対象および方法〉

妊娠経過が正常な50名の初妊婦(妊娠7～40週)の末梢血中に、Y染色体を持つ細胞あるいはY染色体特異的 DNA を同定し、その存在量を求めた。なお、胎児の性別は男児が35名、女児が15名であった。方法としては、同一検体について以下の3つの方法を用いて検討しそれぞれの結果を比較した。(1)母体末梢血を低張処理後スライドガラス上に固定し、Y特異的反復配列 DYZ1を検出する DNA プロー

ブを用いて fluorescence in situ hybridization (FISH)を行い、蛍光顕微鏡下に初妊婦1名あたり47,000~157,000(平均110,000)細胞を分析して、その核内に hybridization signal を有する細胞数を測定した。そして signal のない細胞数に対する比率を算出した。(2)同じ末梢血中の DNA を抽出し、polymerase chain reaction (PCR)により FISH で用いたのと同じ DYZ1領域の102 base pairs (bp)の塩基配列の増幅・検出を行い、別に行った微量の男性 DNA を女性 DNA に一定量人為的に混ぜた検体で行った結果と比較して、末梢血中の母体 DNA に対する Y 特異的 DNA の比率を算定した。(3)さらに、抽出した同じ DNA から PCR によって DYZ1に比してより Y 特異的である single copy 198 bp の塩基配列を増幅・検出し、(2)の方法で比率を算定した。いずれの実験においても正常な未妊娠女性15名および正常男子新生児5名の末梢血を対照とした。

〈結果〉

FISH による正常な未妊娠女性15名および正常男子新生児5名から得た検体の検討にて、本法による偽陽性はなく、偽陰性率も26%と低値であった。また、微量の男性末梢血を女性末梢血に一定量人為的に混ぜた検体の検討では、FISH の結果は人為的に混ぜた比率と平均97.3%一致した。さらに、初妊婦から得た検体(計3検体)で行った一定期間をおいた計3回の同一検体の解析結果は、いずれの初妊婦においても3回の結果はほぼ一致した。この FISH により、男児を妊娠中の妊娠15週以降の初妊婦全例で signal 陽性細胞が同定された。それらの signal 陽性細胞の陰性細胞に対する比率は最小1/144,000、最大1/4,000で、妊娠の進行に伴い増加し妊娠満期には1/10,000前後に分布した。妊娠15週未満の8名中6名では signal 陽性細胞は全く同定されず、残り2名の計214,000細胞中に2細胞のみ認められた。一方、いずれの PCR においても、正常な未妊娠女性15名では偽陽性は全くなかった。男児を妊娠中の初妊婦に関する PCR の結果は、2種類の Y 染色特異的塩基配列の増幅実験とも FISH の結果と有意の相関($r_s=0.62$, $p<0.001$ および $r_s=0.70$, $p<0.001$)を示し、また有意差を認めなかった。女兒を妊娠中の初妊婦15名において、FISH で1例、DYZ1領域の PCR で2例の陽性結果が観察されたが、single copy 塩基配列の PCR では陽性結果は観察されなかった。

〈考察〉

本研究により、妊娠の進行とともに胎児有核細胞は母体末梢血中に増加し、その母体有核細胞に対する存在比率は妊娠前期には1/100,000未満、妊娠満期には約1/10,000と推定された。女兒を妊娠中の初妊婦における FISH および DYZ1領域の PCR で観察された陽性結果は、これらの方法で用いた DYZ1領域が常染色体上に類似の配列を持つ例があるとの報告がなされている領域であること、あるいはごく僅かの男性細胞の混入による偽陽性結果と考えられた。しかしながら、より Y 特異的な single copy の塩基配列の PCR では偽陽性結果は観察されず、また3つの方法の結果は互いに有意の相関を示し有意差もなかったことから、本研究で算定された胎児有核細胞の存在比率は信頼性があると考えられた。胎児有核細胞は遺伝性疾患の出生前診断を行うのに望ましい時期である妊娠前期には母体末梢血中に1/100,000未満とごく僅かしか存在しないため、これらの細胞を用いた正確な出生前診断のためにはこれらの細胞を有効に分離・濃縮する必要があると考えられた。

審 査 の 要 旨

本研究は、妊娠中の母体末梢血中に生理的に微量に存在する胎児由来の有核細胞について、その核内 DNA を用いて非侵襲的に遺伝性疾患の出生前診断を行うことを最終の目的としている。

その目的のために、胎児有核細胞が妊娠のどの時期から母体末梢血中に出現し、その量はどの程度か、また妊娠の進行に伴ってどのように変化するかについての基礎的な検討を行った論文である。

男児妊娠中の母体末梢血を処理し、Y 特異的 DNA プローブ DYZ1 を用いての fluorescence in situ hybridization や PCR などの新しい手法を駆使して、十分な実験計画のもとに研究が実施されている。得られた成績も妥当なものと思われる。

しかし本研究の最終目的である核内 DNA による遺伝性疾患の出生前診断ということには、本研究だけではなお到達し難いが、その目的のための基礎的な研究という点からは質の高い研究と評価される。一級の国際誌である Human Genetics に掲載されたことからこのことは窺える。

今後臨床的な応用を行うためには、より実証的な研究が必要であり、従来法との十分な比較検討もなされなければならないが、研究者として活躍できることを確信させる価値ある論文と評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。