

細分課題 4.

羊水細胞培養法の研究

大阪市立大学医学部

須川 侑

研究 目 的

産科学への細胞遺伝学と遺伝生化学の導入は、自然流産の原因に対する新しい考察を加え、発生途上における変異が種の選択機構により自然淘汰されることを明らかにしたのみならず、羊水中に浮遊する胎児由来の細胞から、染色体異常や先天代謝異常を中心とした胎児の遺伝情報を出生前に把握することも可能にした。

この様な出生前診断は、従来の推計確率論にのみ立脚した遺伝相談に実証性をもたらし、重篤な遺伝的負荷を有する夫婦のもつ異常児出産に関する深刻な危惧を解消する一方、ひいては遺伝性疾患の出生前治療および出生後の早期治療の可能性を開くものとしてその意義が認められる。

しかしながら、現在、各種出生前診断法の基礎となる羊水細胞の培養は未だ困難なものとされ、その解決がまず大きな課題となっている。

そこで我々は、確実に迅速な診断法の開発を目指して、羊水細胞培養の成否を左右する因子と培養の至適条件および染色体分析法の検討を行い、略々満足する結果を得たので報告する。

研 究 方 法

(1) 羊水の採取

大阪市立大学付属病院産婦人科外来を訪れた妊婦および入院患者のうち、優生保護法に基づく中期人工妊娠中絶例、体表造影施行例、胎児成熟度の判定を必要とした例、および、染色体異常症ならびに先天代謝異常症を中心とした出生前診断を行った妊婦において経腹的羊水穿刺を行い、また分娩時の人工破膜により、妊娠13週から42週までの羊水を採取し材料とした。

(2) 羊水中の浮遊細胞数の算定

採取した羊水を 10 ml plastic製滅菌遠沈管(栄研)に分注し、よく混和した後 Bürker - Türk 板に滴下して位相差顕微鏡下に Türk の全区画 ($3 \times 3 \times 0.1$ mm)の細胞数を算定した。

(3) 生存細胞数の算定

生存細胞の証明は Pertoft et al, (1868)の dye-exclusion test を一部 modify して行った。すなわち、全細胞数算定後、遠沈管に 2 時間静置し、その上清を捨て、残った 0.5 ml の細胞浮遊液に 20% fetal calf serum (FCS) を含む生理食塩水に 0.4 mg/ml の濃度に trypan blue を溶解した染色液 0.5 ml を加え Bürker-türk 板に滴下した。その後約 15 分間室温に放置した後鏡検し、生存細胞の全細胞数に対する比率を求め、先きに求めた全細胞数とこの比率から生存細胞数を算定した。

(4) 羊水細胞の培養

(a) 培養液の種類

本実験結果に記載した通り、培養液は主に、FCS 10% 添加した DMEM を用いた。

(b) 培養操作

直径 3.5×1.0 mm の Falcon plastic petri dish を用い、気相 37°C 5% 炭酸ガス培養器内で単層静置培養を行った。

(5) colony 形成による培養成否の判定

10 日間の培養の後、倒立顕微鏡で増殖状態を観察し明らかな growth center の認められる dish とし、このうち直径 2 mm 以上の colony が少くとも 1 個以上認められる dish を培養成功 dish とし、(培養成功 dish 数 / 培養 dish 数) $\times 100$ で培養成功率 (%) を表わした。

(6) 羊水細胞培養における至適条件の検討

下記の因子の種々の条件下における培養成功率、細胞増殖率を検討し、その至適条件を求めた。

- (a) 接種細胞数
- (b) 細胞分離のための遠沈条件
- (c) 基礎培養液
- (d) 添加血清
- (e) 血球混入の影響と処理
- (f) 培養の成否に關与する他の要因

(7) 染色体標本作成手技に關する検討

標本作成の前日に新しい培養液に交換した後、当日 colcemid を最終濃度 $0.06 \sim 0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、さらに 4~5 時間培養し中期細胞を蓄積した。染色体標本作成に際しては、核型分析に必要な中期細胞の最大限の捕捉を目的として低張処理および固定操作の検討を行った。

研 究 成 果

(1) 妊娠経過にともなう羊水細胞数と生存細胞数の変動

羊水細胞は、直径 20μ 程度の小円形細胞から直径 50μ 程度の大型扁平な多角細胞まで、その大きさと形態は極めて多様であった。

羊水細胞数は図 1 に示す如く、全体的には妊娠の経過と共に増加するが個体差が著しく、出生前診断に適當な妊娠 15 週ないし 20 週では羊水 1 ml 当たり 5×10^3 個ないし 6×10^4 個の細胞が認められた。しかしながら、trypan blue による生存細胞数の総細胞数に対する比率は図 2 に示す如く妊娠の経過と共に低下し、妊娠 15 週ないし 20 週では平均 26% を示した。

(2) 接種細胞数と培養成績

同一検体につき 1 dish 当たり 0.5×10^4 個から 9×10^4 個まで 6 段階の細胞数を接種し、20% fetal calf serum (FCS) を含む F-10 培養液 2 ml を加えて培養し、培養後 10 日目の培養成功率について比較した。その結果、表 1 に示す如く、dish 当たり 0.5×10^4 個および 1×10^4 個の細胞数では培養は殆んど成功しないが 3×10^4 個以上では 25% ないし 42% の培養成功率を示した。

これを生存細胞数に關して検討すると表 2 に示す如く dish 当たり 1×10^4

個未満では培養成績は低いが、 1×10^4 個以上では 33%ないし 63%の培養成功率を示した。

これらの結果から 35×10 mm の petri dish を用いる場合 dish 当たり最低 1×10^4 個の生存細胞が存在することが必要であることが判明した。従って、羊水細胞の生存細胞比率から考えて、総接種細胞数は dish 当たり 3×10^4 個ないし 5×10^4 個とすることが、数少ない羊水細胞を有効に分析する点から適当であるとの結論を得た。

(3) 羊水細胞培養に及ぼす遠沈操作の影響

羊水より細胞を分離するための遠沈条件を検討するため、まず、遠沈速度と細胞収量およびその生存細胞比率の検討を行った。 10 ml plastic 遠沈管(栄研)に採取した羊水をよく攪拌した後、3時間静置および $200 \sim 3000$ r. p. m の回転数で5分間の遠沈操作を加えたものについて検討した。その結果図3に示す如く、3時間静置および 200 r. p. m では総細胞数の約 $\frac{1}{4}$ しか沈渣に移行しないが 500 r. p. m では 56%、 1000 r. p. m では 82%と上昇し以後平衡に達することが判明した。

一方生存細胞比率はどの回転数においても殆んど変化は認められず、 1500 r. p. m 以上では細胞の破片や細胞以外の固形物が多く沈渣に移行した。次に上記の遠沈条件で得た羊水細胞を 20% F. C. S を含む F-10 培養液で培養し、培養開始後 10 日目の培養成績を比較した。その結果、遠沈速度 0 (3時間静置) および 500 r. p. m. 5分間の遠沈では培養成功率はそれぞれ 42%、43%と有意差は認められないが、 1000 r. p. m では 29%とやや低下し、 1500 r. p. m 以上では著明に低下することが判明した(表3)。

以上の結果から、細胞収量の点からは 1000 r. p. m 以上の遠沈が望ましいが、重力による細胞損傷という点からは 500 r. p. m までが適当と判断された。

(4) 培養液の検討

(a) 基礎培養液の検討

比較的広く用いられている Ham's F-10 medium, Eagle's minimum essential medium (MEM), および Tc 199 medium にそれぞれ 20% FCS を加えた培養液で 10 日間培養し培養成績を比較した。

その結果、F-10 が 47% と最も優れた培養成功率を示し、MEM, Tc 199 の順に成績が低下した (表 4)。

以上の結果から、羊水細胞培養の基礎培地としては F-10 が優れていることが判明したので、さらに F-10 に種々の血清を添加し検討を行った。

(b) 添加血清の検討

F-10 を基礎培養液とし、これに 15% ないし 20% の濃度にそれぞれ、FCS, ヒト血清 (HS), 妊婦血清 (PS), 母血清 (MS), 父血清 (FS), 臍帯血清 (NCS) を加え、また homologous 羊水、および羊水中に FCS, MS を加えて培養し、それぞれの培養成績を比較した。その結果、F-10 を基礎培養液とした場合、MS の添加が 49% と有効で HS, FS, NCS の添加では FCS とほとんど差異はみられなかった。(表 5)

また、羊水自体も優れた培養液となり得ることが判明したが、これに FCS または MS を添加することにより 58% の培養成功率がそれぞれ 67%、75% と培養成績の向上がみられた。

以上の検討は羊水細胞の初代培養についての検討であるが、継代培養における対数増殖期にある羊水細胞には、図 4 に示す如く、基礎培養液、あるいは添加血清の種類による差異はみとめられなかった。

(5) 血球混入の影響

経腹的羊水穿刺の際、採取羊水中に血球が混入することがある。このような血球の混入は厳密に microscopic をものまで含めればほとんど全例に認められ、遠沈後沈渣が肉眼的に赤色に着色する程度の血性羊水は総穿刺数の約 10% に認められた。そこで、この混入血球の羊水細胞培養に及ぼす影響を検討するため、母体血を種々の濃度に混入し、羊水細胞の増殖状態を観察した。その結果、表 6 に示す如く、dish 当たり、 5×10^6 個の赤血球が混入し

た場合、培養成功率が著明に低下することが認められた。血球混入dishでの増殖状態を顕微鏡下の観察すると、fibroblastは血球存在部を超えて増殖せず、血球集団によってfibroblastの伸展が阻止されていることが認められた。そこで、この血球混入羊水細胞をHanks' BSS 1:蒸留水3よりなる低張液で処理し、混入赤血球を選択的に破壊した後培養すると、培養成功率は上昇し対照とした血球非混入群との間に差異は認められなかった。

(6) 培養の成否に關与する他の要因

同一培養手技であっても、細胞の増殖状態を観察するため頻回にわたり鏡検した群は、鏡検を必要最小限にとどめた群に比しcolony形成が悪く、培養開始後少くとも4日間は静置する必要を認めた。

培養容器の選択も重要となるがFalcon plastic petri dishでの成績は検討された他の容器に較べ良好であった。

また、細胞の培養容器への接種方法は、細胞の浮遊液0.1 mlをdishに接種し、30分間ないし60分間室温に静置して細胞の容器底面への静着を待った後、培養液を静かに加える方法が最も好成績を示した。

妊娠後期の羊水細胞は生存比率も低く、また胎脂等の細胞以外の固形物の混入のために培養は困難で、妊娠8カ月の羊水では15例中6例に成功したが、9カ月以降の羊水では13例中1例に成功したのみであった。また妊娠14週以前の羊水は細胞数が極めて少なく、5例中成功例は1例のみであった。

(7) 羊水細胞培養法の確立(図5)

以上に述べた培養の成否を左右する諸因子の検討と、至適条件の集約から成功率の高い下記の羊水細胞培養法を確立した。

- (a) 経腹的羊水穿刺により1.5 ml~2.0 mlの羊水を採取する。
- (b) 細胞の多寡に応じ、5.0:0.0~10.0:0.0 r.p.mで5分間遠沈し、沈渣中の細胞浮遊液を調整し、この0.1 mlをFalcon plastic petri dish(35 mm×1.0 mm)にdishの底面全体を覆うように接種し、室温に30分ないし60分間静置する。
- (c) 予め調整した20% maternal serum + 80% F-10 medium

からなる培養液 (MS, F-10) 及び 20% maternal serum + 80% homologous amniotic fluid からなる培養液 (MS, A-F) を 2-3 ml 静かに加え、37°C, 5% CO₂ incubator 内で培養する。

(d) 少なくとも 4 日間は静置し、通常、初回の培養液交換は 6 日目に行う。

(e) 血球混入羊水は、遠沈後、沈渣の血球混入細胞に Hanks' BSS 1: 蒸留水 3 よりなる低張液を加え、赤血球を瞬間的に溶血させた後、直ちに遠沈し、沈渣の細胞を前記の方法に従って培養する。

(8) 染色体分析法に関する検討

(a) 標本作成手技に関する検討

標本作成は dish 上の monolayer のまま行う所謂 *in situ processing* (Cox and Lay 1971) を用いた。

この場合 colchicine あるいは colcemid によって蓄積された分裂中期細胞は球形となり dish より極めて剥れ易くなっているため、低張処理後の固定液の注入に際して、分析に必要な中期細胞が固定液の界面張力により monolayer から剥脱されることが顕微鏡下に観察された。そこで、中期細胞の飛散損失を防止するため、低張処理後充分に低張液を除くと共に dish 表面層部を空気半乾燥した後静かにカルノア固定液を monolayer に浸漬させ固定する方法を用いた(半乾燥固定法)。

この結果、図 6 に示す如く中期細胞を効率よく捕捉することが可能となり、colony 1 個当り分析可能な良好なる Chromosome spread が 5 個ないし 10 個得られた。

培養に続く染色体標本作成法は下記の如くである(図 7)。

①最低直径 2 mm の colony が数個出現したところで培養液の交換を行いさらに 24 時間培養する。

② colcemid を最終濃度 0.06 ~ 0.12 $\mu\text{g/ml}$ となるように培地に加え、さらに 5 時間培養する。

③培養液を静かに捨て、予め 37°C に温めた Hanks' BSS 1: 蒸留水 4 よりなる低張液を静かに加え、37°C に 30 分間放置する。

- ④低張液をできる限り残らないように捨て斜台にて空気乾燥を行う。
- ⑤カルノア固定液を monolayer に静かに浸漬させた後、直接 colony に吹きつけないように注入し、15分間固定する。
- ⑥固定液を捨てた後、dish の裏面より温風をあてて乾燥させる。
- ⑦ギムザ染色液で染色する。
- ⑧染色液を捨て、蒸留水で1回洗浄の後アルコールでさらに2回洗浄する。
- ⑨dish の側壁を切りとる。
- ⑩鏡検する。

以上の in situ method と半乾燥後固定法により、従来行われてきた trypsin 処理による細胞の培養容器からの剥離という細胞損失の大きい操作を経る必要がなくなったので、直径 2 mm 程度の小さな colony でも染色体分析が可能となった。

(b) 胎盤穿刺血による染色体分析 (Ogita et al. 1974)

すでに述べた如く、血球の混入は羊水細胞培養を成功に終らせる原因となるので、低張液で赤血球を破壊し直ちに遠沈して得た羊水細胞を培養するか、多量の血球の混入、または血液自体とも見做れる場合には Zipursky et al. (1959) の方法を用い fetal erythrocyte の数を算定し、15% 以上を含む試料は通常の末梢白血球培養法に準じて培養し核型分析を行った。

その結果、表 7 に示す如く、胎児血が混在した 5 例のうち 46,XX と 46,XY が混在した 2 例については胎児は正常男子であると判定し、分析検査の対象となり得た。

(9) 染色体異常症の診断成績 (表 8)

以上の如き羊水細胞の培養法および染色体分析法を用いて、昭和 49 年 1 月より昭和 50 年 10 月迄に、染色体異常症および伴性遺伝性疾患の出生前診断の適応を有する妊婦 9.5 例について羊水細胞の染色体分析を行った。

培養成功は 9.5 例中 9.4 例で 99%、分析成功はその 9.4 例中 9.2 例で 98

%であった。分析成功例94例の培養日数は6日ないし18日間で平均9.4日であった。

染色体の異常が判明したものは4例で、その内訳はD/G 平衡型転座を示した2例と標準型およびD/G 転座型の21トリソミー各1例である。

要 約

- (1) 羊水細胞の培養に関し、妊娠各時期の羊水中細胞数の変動、生存細胞の占める比率などの検討を行い、羊水穿刺時期の設定に理論的根拠を与えることができた。
- (2) 採取した羊水よりの細胞分離、接種細胞数、培養条件の検討から、好適な羊水細胞培養法を創案し、殊に培養液への母体血清添加の効果を明らかとした。
- (3) 試料に混入した赤血球が羊水細胞培養に対し阻害的に作用する影響を検討し、その主たる原因は物理的要因によることを明らかとした。さらに胎盤穿刺により試料中に胎児血球が混入した場合、その試料から胎児白血球を培養し染色体分析を行なう方法を創案した。
- (4) 染色体核型分析に関し、in situ method および半乾燥後固定法を用いることから、分析結果の判定までに要する時間を短縮し得た。

図1 妊娠各時期における羊水細胞数の変動

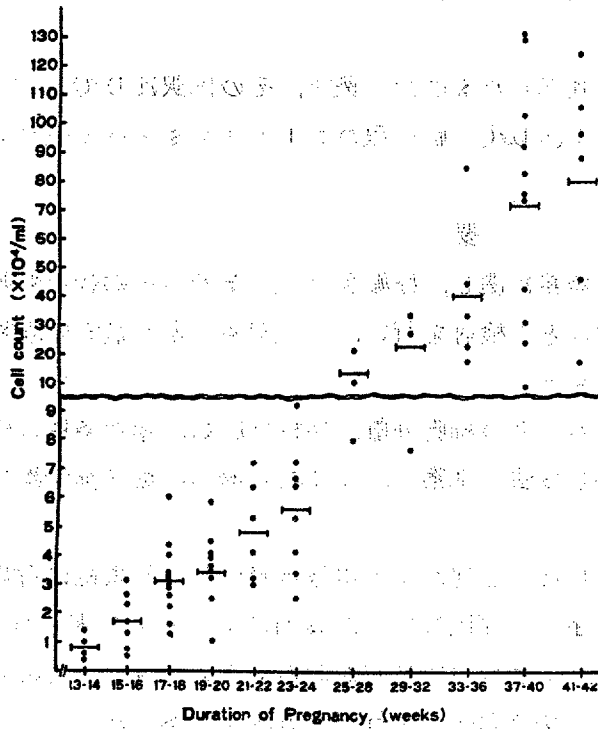


図2 妊娠各時期における羊水中の生存細胞数の比率

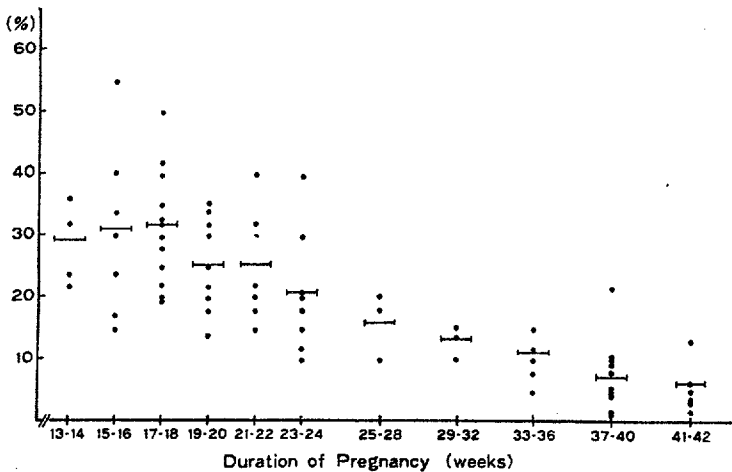


図3 遠沈条件と沈渣への細胞移行率

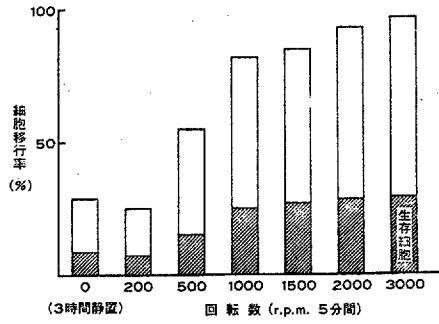


図4 継代羊水細胞の増殖に及ぼす培養液の影響

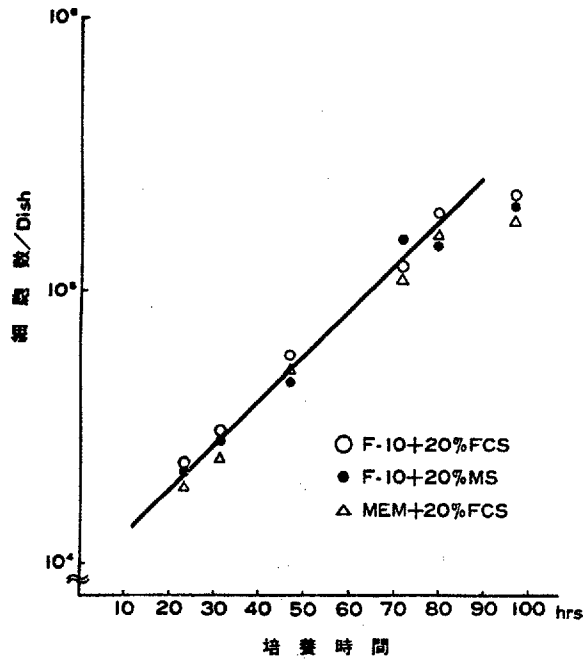


図5 羊水細胞培養法

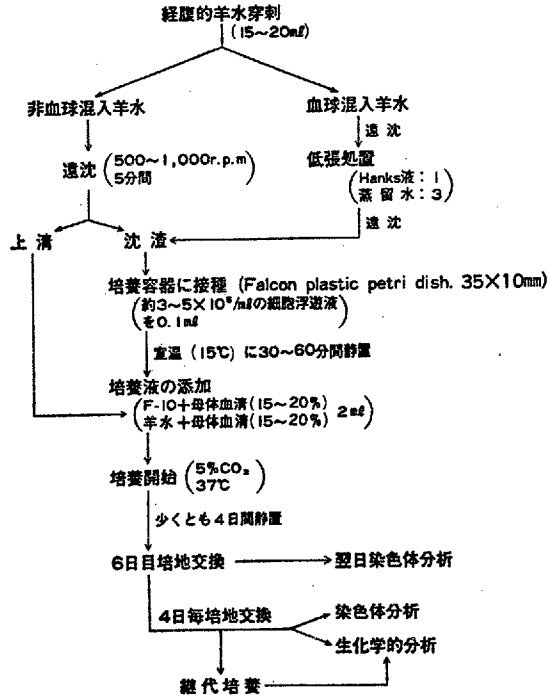


図6 半乾燥後固定法による分裂中期細胞残存率(%)

$$\left(\frac{\text{標本作成後の Chromosome spread数}}{\text{標本作成前の 分裂細胞数}} \right) \times 100$$

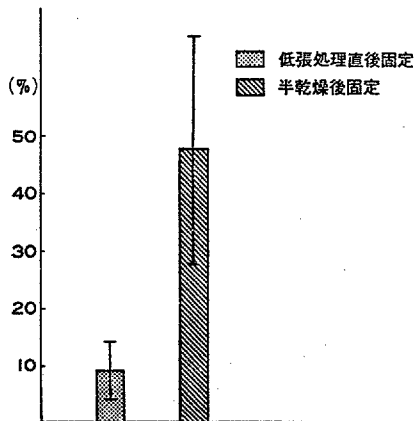


図7 染色体標本作成法

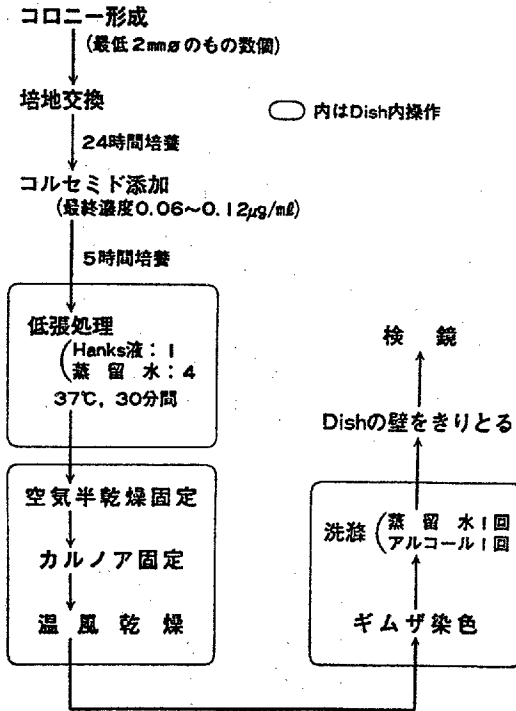


表1 接種総細胞数と培養成績

接種細胞数/Dish	培養Dish数	Colony 形成 Dish数	培養成功 Dish数	培養成功率
0.5×10^4	24	0	0	0%
1×10^4	24	2	0	0%
3×10^4	24	8	6	25%
5×10^4	24	12	10	42%
7×10^4	24	12	8	33%
9×10^4	24	10	10	42%

表2 接種生存細胞数と培養成績

生存細胞数/Dish	培養Dish数	Colony 形成 Dish数	培養成功 Dish数	培養成功率
$\sim 0.5 \times 10^4$	48	2	0	0%
$0.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^4$	20	4	2	10%
$1.0 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$	24	12	8	33%
$1.5 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^4$	24	10	10	42%
$2.0 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^4$	12	6	4	33%
$2.5 \times 10^4 \sim$	16	10	10	63%

表3 遠沈操作と培養成績

遠沈条件	培養Dish数	Colony 形成 Dish数	培養成功 Dish数	培養成功率
3時間静置	26	18	11	42%
500 r.p.m. 5分間	28	20	12	43%
1000 r.p.m. 5分間	28	16	8	29%
1500 r.p.m. 5分間	28	7	4	14%
2000 r.p.m. 5分間	28	9	5	18%

表4 基礎培養液と培養成績

	F-10+20%FCS	MEM+20%FCS	TC-199+20%FCS
例数	12	14	10
培養Dish数	34	38	28
培養成功Dish数	16	14	8
培養成功率	47%	37%	29%

表5 添加血清と羊水細胞培養成績

	例数	Dish数	培養成功 Dish数	培養成功率
F-10+FCS (15~20%)	42例	83個	32個	39%
F-10+人血清 (+)	14	21	9	43
F-10+妊婦血清 (+)	28	63	31	49
F-10+母血清 (+)	74	137	98	72
F-10+父血清 (+)	11	20	8	40
F-10+脐帯血清 (+)	12	22	10	45
羊 水	20	33	19	58
羊水+FCS (+)	23	43	29	67
羊水+母血清 (+)	21	40	30	75

表6 血球混入と培養成績

混入赤血球数/Dish	培養Dish数	Colony 形成 Dish数	培養成功 Dish数	培養成功率
0	27	15	12	44
5×10^5	27	18	12	44
1×10^6	27	13	9	33
5×10^6	27	9	4	15
1×10^7	27	2	2	7
5×10^7	27	2	0	0
低張処理群	27	18	11	41

表7 穿刺試料中の胎児血球を用いた核型分析

Case no.	Mean fetal cells per 100 erythrocytes	Chromosome constitution	Fetus expected	Infant outcome
1	36.4	46, XX & 46, XY	normal male	46, XY
2	28.5	46, XX & 46, XY	normal male	46, XY
3	56.7	46, XX -	normal female	46, XX
4	28.3	46, XX -	normal female	46, XX
5	18.8	46, XX -	normal female	46, XX

表8 臨床診断成績 (昭和49年1月~昭和50年10月)

通 称	診断例数	診 断 例
両親のどちらか一方が転座型保因者	3例	46, XX-D-t (DqGq) 1例 45, XY-D-G-t (DqGq) 2
前に染色体異常児を生んだ妊婦		
Down症候群	55	46, XX+G 1
D-トリソミー症候群	1	46, XY 22
E-トリソミー症候群	2	46, XX 35
?	1	
高令妊婦		
35才~39才	15	46, XY 11
40才以上	7	46, XX 9
伴性遺伝病の保因者		
血友病	1	46, XY 1
進行性筋ジストロフィー症	1	46, XX 1
その他 (家系に染色体異常など)	9	46, XY 4 46, XX 5
合 計	95例	92例

↓ **検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

研究目的

産科学への細胞遺伝学と遺伝生化学の導入は、自然流産の原因に対する新しい考察を加え、発生途上における変異が種の選択機構により自然淘汰されることを明らかにしたのみならず、羊水に浮遊する胎児由来の細胞から、染色体異常や先天代謝異常を中心とした胎児の遺伝情報を出生前に把握することも可能にした。