

#### 細分課題 4.

### 羊水細胞培養法の研究, 並びに出生前診断法に関する研究

大阪市立大学医学部

須川 侑  
荻田 幸雄

#### 研 究 目 的

産科学への遺伝学的手法の導入は, 胎児の病態あるいは成熟度の把握等の産科臨床的課題に加えて, 胎児遺伝情報の把握をも可能とし, 従来の推計確率論に立脚した妊婦の遺伝相談に実証性をもたせ重篤な遺伝素因を有する夫婦の異常児出産の深刻な危惧を解消する一方, ある種の疾患に関しては, 出生前診断, さらに早期治療(出生前治療)への道程を開拓しつつある。

しかしながら, この出生前診断の基礎となる羊水細胞の培養は, これが剝離細胞であるが故に他の新鮮な培養素材と異なり, 必ずしも容易ではない。

そこで, まず, 羊水細胞の特性をふまえ培養の成否を左右する因子を解析しその至適培養条件を検討することにより, 培養成功率の高い母血清添加培養法を確立し, これを基に遺伝的異常児の出生前診断例数を蓄積すると共に, 羊水細胞を用いない診断法, 並びに形態学的アプローチによる診断法の開発を目指した。

さらに, 多目的的に同一穿刺で得た羊水試料を用いて, 周生期あるいは新生児期に起り得べき心身障害疾患の早期診断, 早期治療に資するべく新しい胎児診断法を開発せんとした。

#### 研 究 成 果

##### (1) 羊水細胞培養法の確立(母血清添加培養法)

生存細胞が少く, 分裂増殖能の低い羊水細胞の特性をふまえ, ①接種細胞数, ②遠沈条件, ③基礎培養液, ④添加血清, ⑤血球混入の影響と処理, ⑥その他の因子の解析から, その至適条件を求め, 母血清添加による確度高い羊水細胞培養法を確立した。(図1)

この結果100%近い培養成功率を収め、分析に要する日数も短縮することができた。

#### (2) 染色体分析法の改良(半乾燥後固定法)

蓄積された分析に必要な中期細胞は球形となり、低張処理後の固定液注入に際し、殆んど中期細胞は界面張力によって飛散する。そこで低張処理後dish表層を一旦半乾燥させた後固定することにより中期細胞を数倍も効率よく捕捉することができ、小さなcolonyでの分析を可能とした。

#### (3) 血性羊水処理法の考案(低張処理法)

羊水に混入した血球は、培養容器底に沈着することにより細胞の静着、線維芽細胞の伸展増殖を著るしく阻害する。そこで、これにHanks液1容、蒸留水3容からなる低張液を加える事により、以後の羊水細胞の増殖を障害することなく赤血球のみを選択的に破壊する方法を考案し培養不成功の要因を克服しえた。

#### (4) 胎児血培養法の創案(羊水細胞を用いない診断法-1)

穿刺に際して血液自体を吸引することがある。(bloody tap)この際、試料中のHb-F存在の有無を検索し、胎児血の混入が確認されれば、この試料を通常の末梢白血球培養法に準じて培養し核型分析を行う方法を考案し、現在迄に8例の診断に成功した。本法により、胎児核型の分析を短時日に成し得るのみでなく、再穿刺を避け得る利点がある。

#### (5) Hb-F簡易迅速測定法の開発

bloody tapに際して直ちに混入血液の由来(穿刺部位)を胎児血(Hb-F)の有無で知ることは産科管理上重要である。従来Singer法、Betke法では、測定装置、操作、所要時間(約1時間)の点で難がある。そこでSinger法に基づき①試料血1滴(容)に対し0.1NKOH5滴容を加え激しく2分間振盪することにより、溶血とアルカリ変性を同時に行い、②これを半飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えて濾紙上に滴下することにより、変性Hb(Hb-A)を滴下点に止め、未変性Hb(Hb-F)のring色調からHb-F濃度を半定量する方法を開発した。本法はbed sideで何等装置を要せず数分内に測定し得るので再穿刺の決定ばかりでなく他の診断用途にも価値が認められた。

以上の方法により、この3年間に適応ある妊婦141例に対し染色体異常の出生前診断を行い、138例の胎児核型分析に成功し(診断率98%)、異常児4例を診断し得た。(表1)(図2)(図3)

(6) 遺伝的異常児診断への形態学的 approach (胎表造影法—羊水細胞を用いない診断法—Ⅱ)

未だ病因不明の遺伝性疾患が多数存在する現況に於て、羊水細胞あるいは羊水自体の分析も限界があり、児の形態学的検索が直達的な診断論拠となる例が少ない。この観点から、胎脂と油性造影剤との親和性を利用して胎児体表を造影する fetography の諸条件を検討したうえで、fetogram の系統的読影法を確立した。本法を用いて、児の系統的形態異常の読影から、染色体異常症(E-, G- trisomy)の診断、AGSの否定、遺伝性骨系統疾患(先天性骨形成不全症、胎児性軟骨異栄養症)の確診をなし、適切な分娩様式選択の根拠となすと共に、本法の胎児視診としての意義を明らかにした。

(7) 胎児体重予測法の創案(Size把握)

発展的に本法の胎児軟部組織の解像力を利用し、胎児肥満度を胎児大腿中点に於ける軟部組織厚(Fs)/骨径(Fmd)により係数化し、これを用いて胎児体重を測定する回帰式( $r=0.94$ )を導き、胎児発育度の診断など産科臨床上極めて有効なSize把握法を考案した。

(8) 胎児遺伝形質の分析(胎児血液型の出生前診断)

羊水中への母体成分の混入を否定することは、出生前診断に際する根本的な課題となる。この目的を含め、さらに、児形質の発現過程を明らかにすべく、羊水、母体、胎児(新生児)との関連に於て、個体特異的な遺伝性標識物質としてABO式血液型をとりあげ、型分質の羊水中への分泌能の有無を検索した。表1に示す如き方法で、羊水114例のA.B.Hを検索したところ、分泌型では全例児固有の型物質が見い出され、また、胎令20週以前ではaberrant発現頻度が著じるしく高いことが明らかとなった。以上の成績から、羊水は母体から隔絶され、児形質依存性であることを明らかとすると共に、母児血液型不適合発症を予測することを可能とした。現在尚胎児発育に伴う羊水への児形質発現につき解析中である。

## (9) 胎児發育に伴う羊水中アミラーゼアイソザイムの分化

### (胎児成熟度の把握)

遺伝生化学的な立場から、羊水中 amylase isozyme の変動が児發育と如何なる関連を有するかの検討を加えた。その結果、図4の如く、膵型及び唾液型 isozyme は児發育に関連し一定の比率で変動すること、さらに、膵型/唾液型アイソザイムの比率が胎令と高い相関 ( $r=0.93$ ) を有することを明らかとした。この意は、同一酵素間の比率をとる事により、個体差を生ずる要因である羊水量の差を除外し得たこと、さらに酵素の量的変動よりむしろ質的分化が児成熟を反映することを意味するものと理解される。

## (10) 胎児赤血球の不均一性と新生児黄疸発症(新生児黄疸重症度予知法の創案)

(羊水細胞培養法に関する添加血清の検討の際、臍帯血血清の細胞増殖に及ぼす影響検索の過程で、胎児血(臍帯血)が著じるしく溶血し易い現象を認められた。この現象に着目し、胎児血の易溶血性と新生児黄疸発症との関連を追求し、新生児重症黄疸並びに核黄疸発症予防法を創案せんと試みた。)

新生児 黄疸の発症要因は、その一つを肝解毒処理機構の未熟性に求められるが、赤血球崩壊に起因するビリルビンの絶対的、あるいは相対的生成過剰も重要な因子として考慮されねばならない。それ故、児生体内における崩壊赤血球量、あるいは易溶液性を出生直後に把握できれば黄疸重症度を予測し得るばかりか、有効な治療法を早期に開発でき、発症を最小限に防止し得る。

この観点から、臍帯血、新生児血の赤血球膜透過圧抵抗の経日的推移を、溶血誘起の機作が質的に異った coil planet centrifuge system (CPC 法)を用いて観察した。

その結果、図5に示す如く、臍帯赤血球の溶血域は、成人のそれに比して広く分布する即ち、動的透過圧抵抗の脆弱血球及び抵抗性血球がより多く含有することが明らかとなった。一方、これらの脆弱血球は出生後急速に児循環から消失し、一週間以内に成人の溶血値に近づくが、逆に、児血中ビリルビンは経日的に上昇し、生後5日目に最高値を示した。

また、coil 内容血血液を5分画し成人の溶血開始値  $110 \text{ mosmol}$  以上を占める脆弱血球内の酵素、電解質、及び ATP 量を測定したところ、表3の如

く、これらの血球はHb-F含有血球であり、同時に老化及至機能障害血球であることを明らかとした。以上の実験結果、並びに新生児に於けるHb-F含量の減少、一過性の貧血等の臨床的事実から、動的滲透圧抵抗に関する脆弱血球の経日的消失は、生体内容血に基づくものであるとの結論を得た。

そこで、retrospectiveに臍帯血中脆弱血球量と、新生児期に於ける最高ビリルビン値との関連を検討した結果、脆弱血球量が7.0%以上の場合、高ビリルビン血症(15mg/dl以上)を惹起することを認めた。以上のことから臍帯血中の110 mosmol以上の脆弱血球量を測定することにより、児黄疸発症の重症度を予測することが可能であることを明らかにした。

さらに、胎児血の動的滲透圧抵抗性の検索過程で、血清中に赤血球膜抵抗安定化因子を見出し、この物性(分子量 $1.5 \times 10^4$ 以下、 $5.0 \sim 7.0 \times 10^4$ )を明らかにすると共に、胎児発育に伴う動的滲透圧抵抗性並びに膜安定化因子の推移を明らかにし得た。また、その特徴あるpatternの解析から、成人の正規型分布は赤血球産生能と処理能との調和を意味し、胎児血にみる脆弱血球の存在は、胎児脾機能の未熟を意味することを推論し、実験的に胎児脾を灌流することによりこれを証明し得た。

## 要 約

厚生省心身障害研究遺伝研究費により、昭和49年、50年、51年度に下記成果を得た。

- 1) 母血清添加羊水細胞培養法の確立
- 2) 染色体標本作成法の改良(半乾燥後固定法)
- 3) 血性羊水処理法の考案(低張処理法)
- 4) 胎児血培養法の創案(羊水細胞を用いない診断法-I)
- 5) Hb-F簡易迅速測定法の開発
- 6) 遺伝的異常児診断へのapproach(胎表造影法-羊水細胞を用いない診断法-II)
- 7) 胎児体重予測法の創案(Sizeの把握法)
- 8) 胎児遺伝形質の分析(胎児血液型の出生前診断)

- 9) 胎児発育に伴う羊水中アミラーゼアイソザイムの分化(胎児成熟度の把握)
- 10) 胎児赤血球動的滲透圧抵抗の不均一性と新生児黄疸発症(新生児黄疸重症度予知法の創案)

以上の報告内容は初期の課題の範囲を脱したものであるが、主題を中心として展開される今後の出生前診断の方向を包含するものとして取りあげたものであり、この点御了解いただきたい。

#### 発 表 論 文

- 1) 須川 侑, 荻田幸男, 松本雅彦.(1974).羊水検査による染色体異常の早期診断:産婦人科の実際:23, 201,
- 2) T.Sugawa, et al.(1974).Prenatal diagnosis of E trisomy syndrome by fetography : Obstet.Gynecol.:42, 887,
- 3) T.Sugawa, et al.(1974).Prenatal diagnosis of genetic anomalies by placental puncture:Obstet.Gynecol:43, 709,
- 4) 須川 侑, 荻田幸雄.(1974).先天異常児の出生前診断, その適応と実際:産婦人科の実際:23, 1287,
- 5) 須川 侑.(1974).出生前診断:総合臨床:24, 91,
- 6) K.Tada, S.Ogita et al.(1974). Free aminoacid levels in amniotic fluid of fetuses affected with Low's syndrome or phenylketonuria :Tohoku J.exp.Med.113, 169,
- 7) 須川 侑他.(1974).Down 症の出生前診断:産婦人科の進歩:26, 309,
- 8) 須川 侑他.(1975).胎児造影法とその臨床応用に関する研究:産婦人科の進歩:27, 17,
- 9) 須川 侑他.(1975).出生前診断法 産科と婦人科:42, 47,
- 10) 須川 侑他.(1975).新生児溶血性黄疸発症に関する研究—Coil planet centrifuge systemによる新生児の赤血球膜滲透圧抵抗の経白的推移について:日本産科婦人科学会誌:27, 1099,

- 11) 荻田幸雄, 須川 信他. (1975). 出生前医学の臨床—羊水細胞培養条件の検討—第19回日本医学会総会シンポジウム別冊
- 12) 多田啓也, 荻田幸雄. (1975). 先天異常の出生前診断: 医学のあゆみ: 94, 200,
- 13) T. Sugawa et al. (1976). Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta congenita by means of fetography, *Europ. J. Pediat.* 123, 179,
- 14) T. Sugawa et al. (1976). A Simplified method for measuring fetal hemoglobin: *Obstet. Gynecol.*: 48, 237,
- 15) 須川 信他. (1976). 新生児溶血性黄疸発症に関する研究—HbF 含有血球の赤血球膜透過圧抵抗性について—: *日産婦誌*: 28, 37,
- 16) 須川 信他. (1976). 新生児溶血性黄疸発症に関する研究—CPC 法による赤血球膜抵抗測定と新生児血中ビリルビン値の推移について—: *日産婦誌*: 28, 466,
- 17) 須川 信, 荻田幸雄, 石河 修. (1976). HbF 簡易迅速測定法—本法の特徴とその臨床的価値: *産婦人科治療*: 32, 11,
- 18) 荻田幸雄. (1976). 胎児赤血球の動的透過圧抵抗 *医学のあゆみ*: 97, 847,
- 19) 荻田幸雄他. (1976). 反復した21-trisomy型Down症の出生前診断: *産婦人科の進歩*: 28, 75,
- 20) 荻田幸雄他. (1976). HbF, *産科と婦人科*: 43, 37,
- 21) 荻田幸雄. (1977). 新生児重症黄疸, *臨床婦人科産科*: 31, 3,
- 22) T. Sugawa et al. (1977). Estimation of fetal weight by fetography: *Am. J. Obstet. Gynecol.*: 127, 37,
- 23) T. Sugawa et al. Differentiation of amylase isozymes in the amniotic fluid with fetal development: in press
- 24) 須川 信, 荻田幸雄, 松本雅彦. わが遺伝クリニックにおける出生前診断の現況: *産婦人科治療*: 投稿中
- 25) 須川 信他. 新生児溶血性黄疸発症に関する研究—新生児黄疸重症度予知法について—: *日産婦誌*: 投稿中.

- 26) 須川 侑他. 新生児溶血性黄疸発症に関する研究—血漿中赤血球膜安定化因子について—: 日産婦誌: 投稿中
- 27) T. Sugawa et al. Prediction of the degree of neonatal jaundice by means of coil planet centrifuge system : in preparation
- 28) 荻田幸雄. 胎児性軟骨異栄養症の出生前診断, 日本新生児学会誌, 投稿中
- 29) 松本雅彦. (1977). 出生前診断における羊水細胞の培養法と染色体分析法に関する研究, 産婦人科の進歩, 1,

図1 羊水細胞培養法

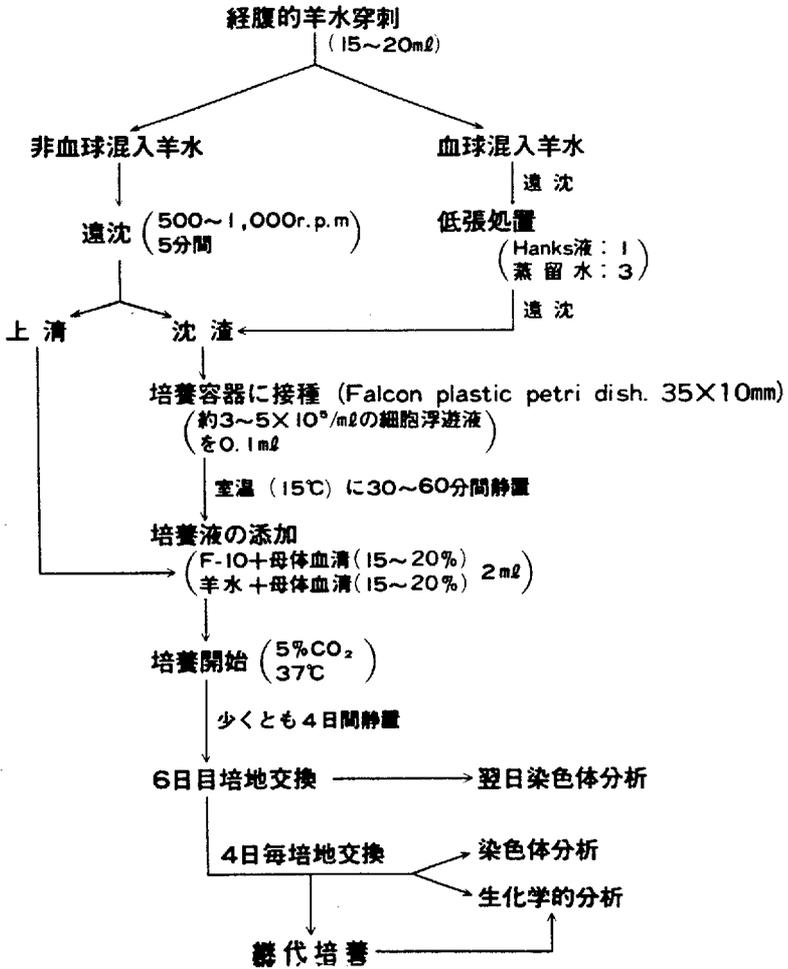


表1 染色体異常の出生前診断

羊水細胞染色体分析 (昭和49年1月~昭和51年9月)

適 応	診断例数	診 断 例
両親のどちらか一方が転座型保因者*	5例	46, XY 1例 46, XX 1 46, XX, -D, +t(DqGq) 1 45, XY, -D, -G, +t(DqGq) 2
前に染色体異常児を出生した妊婦**	80	46, XY 36 46, XX 46 (46, XX, Gp+?) 1*** 47, XX, +G 1
Down 症候群		
D-トリソミー症候群	1	
E-トリソミー症候群	3	
?	1	
高令妊婦		
35才~39才	20	46, XY 13 46, XX 13 (46, XY / 46, XXY?) 1****
40才以上	9	
伴性遺伝性疾患の保因者		
血友病	2	46, XY 1 46, XX 2
進行性筋ジストロフィー症	1	
そ の 他 (家系に染色体異常など)	19	46, XY 8 46, XX 11
合 計	141例	138例

注 ※ 図2参照

※※ 図3参照

※※※ normal variant と判定, 正常女児出産

※※※※ 正常男児出産

図2 転座型保因者に対する出生前診断

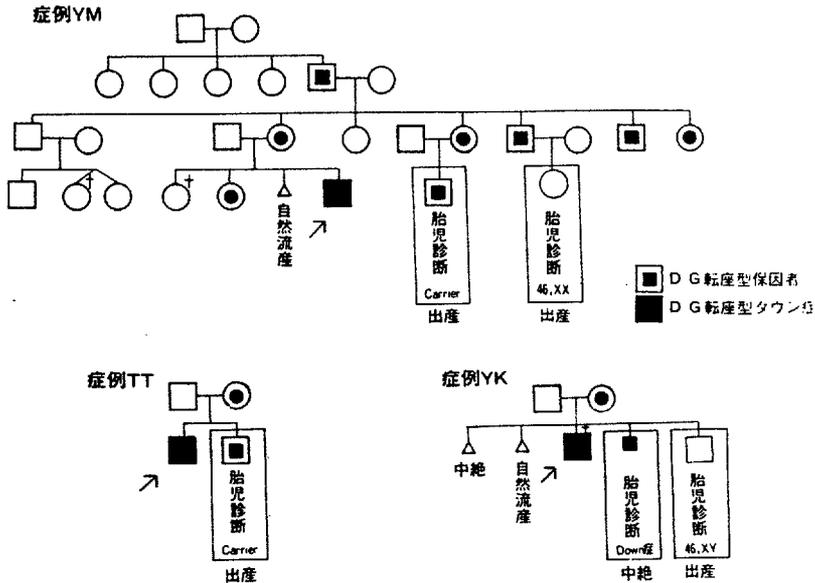


図3 21トリソミーの反復例の出生前診断

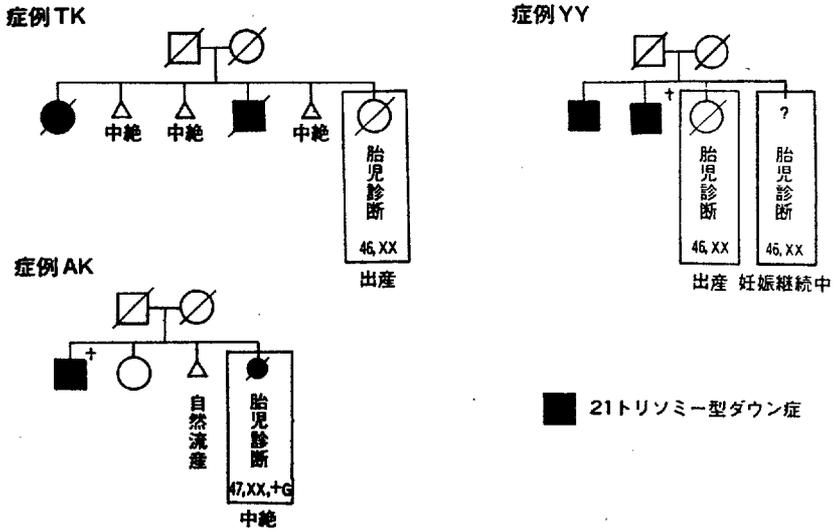


図4 妊娠各時期における羊水の Amylase isozyme pattern

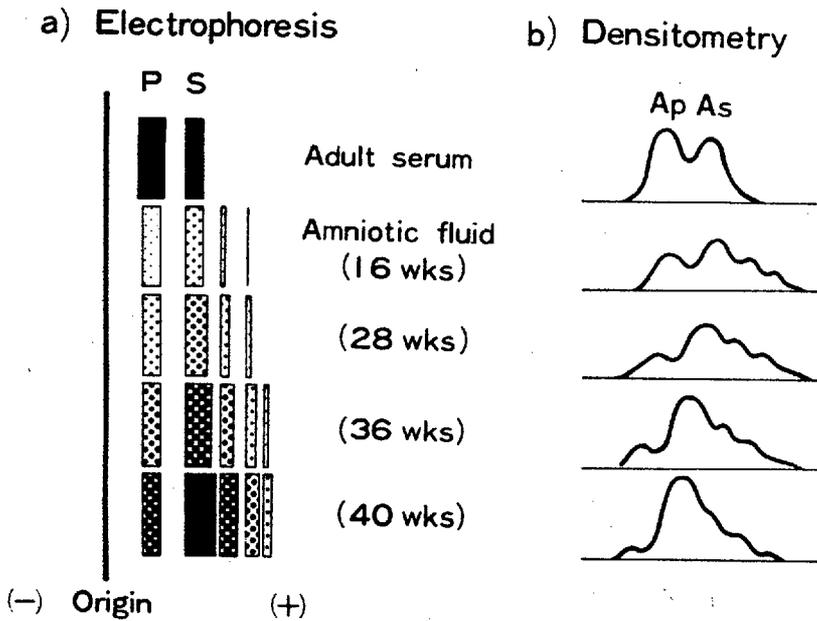


表 2. 羊水による胎児血液型判定法

1. 羊水約 1 ml, 100 °C 10 分間加熱後遠沈。
2. 上清 0.1 ml を生食にて倍数希釈 ( 3 系列試験管 a, b, h, )
3. 各系列に 8 倍希釈抗 A, 抗 B 標準血清並びに 32 倍希釈抗 H ( レクチン ) を加えて 15 分間放置。
4. 2% A B 型血球及び 2% O 型血球を対応する a, b, h に入れリング形成の有無を知る。

図 5 Hemolytic patten of cord blood and the newborn blood by dynamic osmotic fragility test

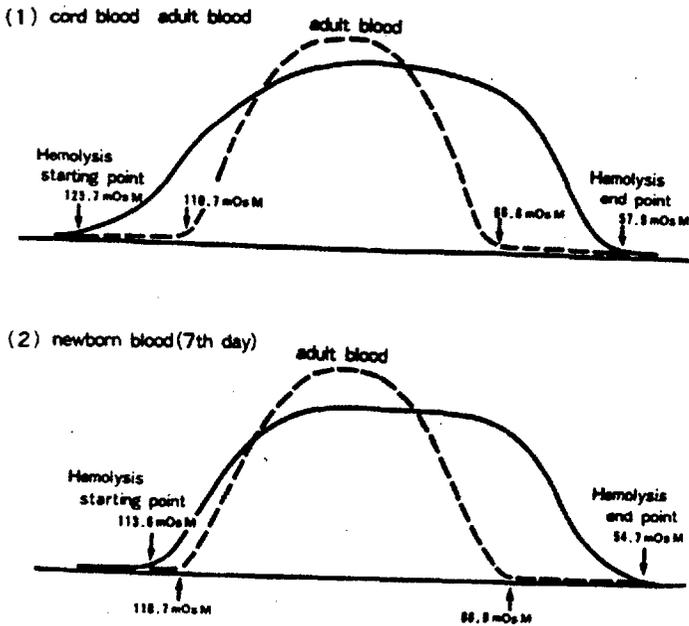
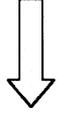


表 3

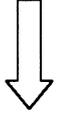
## Analysis of the hemolysate fractionated by C.P.C system

fraction No. (mOsM)	I (below 70)	II (70~85)	III (85~95)	IV (95~110)	V (over 110)
Ch.E ( $\mu\text{M}/\lambda/\text{hr}/\text{g}\cdot\text{Hb}$ )	16.7 $\pm$ 1.0	13.6 $\pm$ 1.3	11.8 $\pm$ 1.0	11.9 $\pm$ 2.1	8.8 $\pm$ 0.8
G-6-PDH ( $\text{miu}/\text{Hb}/\text{dl}$ )	434.1 $\pm$ 25.3	347.6 $\pm$ 66.5	310.2 $\pm$ 60.7	262.8 $\pm$ 60.6	166.8 $\pm$ 55.6
LDH (Wróblewski u/g·Hb)	1078.8 $\pm$ 138.5	1016.4 $\pm$ 27.0	1036.6 $\pm$ 65.7	1116.5 $\pm$ 81.9	1129.8 $\pm$ 127.5
CPK (iu/g·Hb)	54.2 $\pm$ 2.0	49.2 $\pm$ 4.9	49.1 $\pm$ 4.1	55.9 $\pm$ 1.4	50.3 $\pm$ 2.6
Ca (mEq/g·Hb)	14.6 $\pm$ 3.0	15.2 $\pm$ 5.8	17.2 $\pm$ 4.2	20.0 $\pm$ 5.1	22.6 $\pm$ 6.3
ATP (mg/g·Hb)	15.8 $\pm$ 2.2	15.2 $\pm$ 2.3	13.0 $\pm$ 2.7	12.0 $\pm$ 1.4	8.3 $\pm$ 0.6
Totallipid (mg/g·Hb)	54.7 $\pm$ 8.2	45.9 $\pm$ 8.9	41.4 $\pm$ 8.8	36.7 $\pm$ 5.6	34.0 $\pm$ 5.0
Cholesterol (mg/g·Hb)	40.6 $\pm$ 10.3	36.9 $\pm$ 8.3	31.2 $\pm$ 5.8	28.1 $\pm$ 7.2	24.5 $\pm$ 1.5



## 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

産科学への遺伝学的手法の導入は、胎児の病態あるいは成熟度の把握等の産科臨床的課題に加えて、胎児遺伝情報の把握をも可能とし、従来の推計確率論に立脚した妊婦の遺伝相談に実証性をもたらせ重篤な遺伝素因を有する夫婦の異常児出産の深刻な危惧を解消する一方、ある種の疾患に関しては、出生前診断、さらに早期治療(出生前治療)への道程を開拓しつつある。