

発症前診断の精度向上に関する研究 —PCR法を用いた母体血による胎児性別判定の検討— (分担研究: 遺伝性疾患をもつ小児の生活管理・指導に関する研究)

足立立子, 鈴森 薫

要約: PCR法を用い母体血より胎児性別判定が可能であるかを検討するために, 男児あるいは女児を分娩した褥婦の末梢血各々15例よりDNAを抽出しPCR法でY染色体特異塩基配列102bp領域を増幅した。男児を分娩した母体血の全例より102bpが増幅されたが, 女児を分娩した母体血15例中7例及び女性コントロール5例中2例にも102bpが増幅された。母体血による性別判定が可能であることが示唆されたが, 増幅領域やコンタミネーションの問題など今後の検討が必要である。

見出し語: PCR法, 胎児性別判定, 母体血DNA

(目的) 従来より胎児と母体の間でごく少量の血液交流があり, 母体血中に胎児細胞が循環している事が知られている。最近PCR法(polymerase chain reaction法)が確立され, 標的DNAを増幅させ微量DNAを検出することが可能となった(図1)。今回我々はこのPCR法を用い分娩後母体血DNAよりY染色体特異塩基配列領域を増幅し, 母体血を用いた胎児性別判定が可能であるかを検討した。

(方法) 対象は男児あるいは女児を分娩した褥婦各々15例ずつで, 分娩2~5日後に母体末梢血を採取し赤血球溶血法によりDNAを抽出した。コントロールとして非妊時女性末梢血より同様にDNA

を抽出した。DNAは2 μ l 約1ngとなるように調整し試料とした(図2)。DNAを変性後PCR法を用い, 女性血中には存在しないY染色体特異塩基配列3.5kbのうち, まず154bp領域の両端Y 1.1, 1.2のプライマーを使用し, 80サイクルまで増幅したが154bpのバンドを検出できなかった。そこでさらに40サイクル増幅させたDNA2 μ lを用い, 154bp領域の内部領域である102bp領域の両端Y 1.3, 1.4のプライマーを使用し, 20サイクル増幅し102bpのバンドの有無を検討した(図3)。

(結果) 男児を分娩した母体血DNA15例より全例102bpの増幅が可能であった(図4)。しかし女児を分娩した母体血DNA15例中7例より102bpが

名古屋市立大学産科婦人科学教室: Department of obstetrics and Gynecology, Nagoya City University Medical School

増幅され、8例からは増幅されなかった。また女性コントロール5例中2例からも102bpが増幅された(表)。

(結論) PCR法は1985年に報告されて以来、DNA診断に留まらず、遺伝子操作の基礎技術として分子生物学の研究にも大きな影響を与えつつある。その利点として微量の検体で迅速かつ高感度に解析が可能であることが挙げられるが、その反面微量の試料を扱うためにコンタミネーションによる影響は無視できない。今回の実験に関しても女兒を分娩した母親及び女性コントロールの約半数にも102bpが増幅されたことを考えると、操作中に高率にコンタミネーションが起こったものと思われる。特にプライマーの種類を変え増幅を行う場合、操作手順も増えより一層のコンタミネーションに対する厳重な注意が必要となる。

今回の結果により母体血を用いた胎児性別判定の可能性が示唆された。母体血による胎児性別判定が可能となれば、胎児への危険性がなく安全な

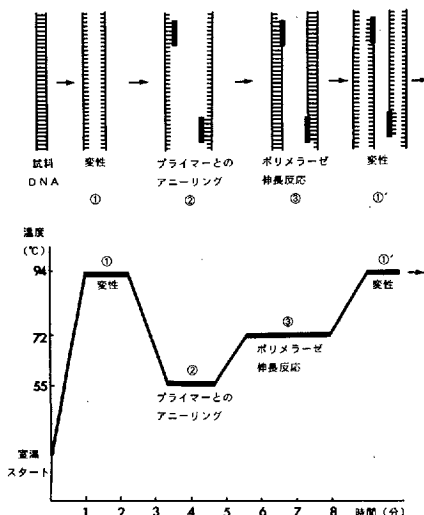


図1 PCR法の原理

点有用である。今後の問題点としていかにfalse positiveを少なくするか、又Y染色体を判別するためにより特異性の高い領域が存在するかを検討する必要がある。

鑄型DNA	1 ng	2 μ l
10xbuffer		10 μ l
dNTP MIX (dCTP, dGTP, dATP, dTTP それぞれ200 μ M)		16 μ l
プライマー1	1 μ M	5 μ l
プライマー2	1 μ M	5 μ l
Taq ポリメラーゼ	2.5units	0.5 μ l
水		61.5 μ l
		計 100 μ l

10xbuffer 100 mM Tris-HCl pH8.3
500 mM KCl
15 mM MgCl₂
0.1% (W/V) gelatin

図2 試薬の調整

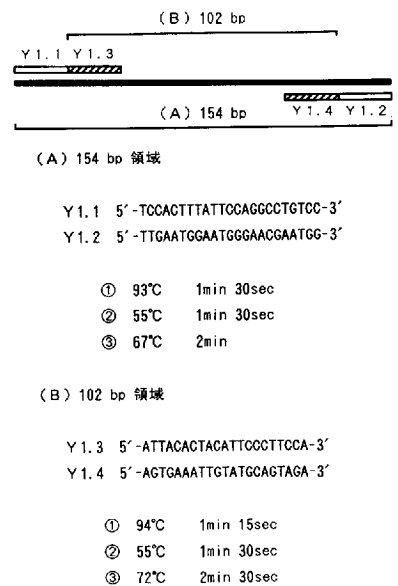


図3 プライマーの塩基配列及び温度スケジュール

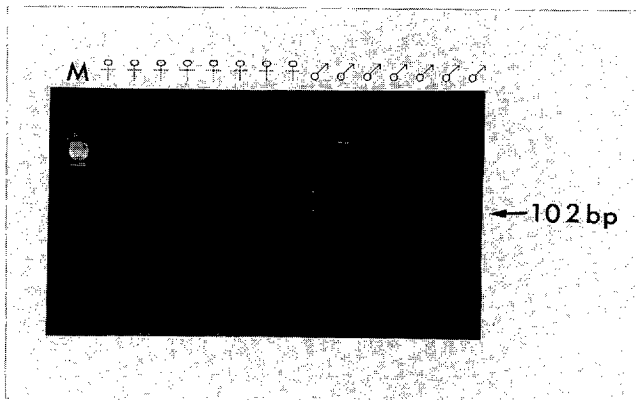


図4 Y染色体上102bpの増幅

	Y染色体上 102bp領域	
	陽性	陰性
男児を持つ母親	15/15	0/15
女兒を持つ母親	7/15	8/15
女性コントロール	2/5	3/5

表 PCR法による増幅結果



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



要約:PCR 法を用い母体血より胎児性別判定が可能であるかを検討するために,男児あるいは女児を分娩した褥婦の末梢血各々15例よりDNAを抽出しPCR法でY染色体特異塩基配列102bp領域を増幅した。男児を分娩した母体血の全例より102bpが増幅されたが,女児を分娩した母体血15例中7例及び女性コントロール5例中2例にも102bpが増幅された。母体血による性別判定が可能であることが示唆されたが,増幅領域やコンタミネーションの問題など今後の検討が必要である。