

母体血中からの胎児有核赤血球の効率的回収に向けた新たな試み

上 出 泰 山¹ 梅 原 永 能² 左 合 治 彦²

¹ 東京慈恵会医科大学産婦人科学講座

² 国立成育医療研究センター周産期・母性診療センター

(受付 平成 27 年 1 月 28 日)

NEW TRIALS FOR EFFICIENT ERYTHROBLAST ISOLATION FROM MATERNAL BLOOD

Taizan KAMIDE¹, Nagayoshi UMEHARA², and Haruhiko SAGO²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, The Jikei University School of Medicine

²Center of Maternal-Fetal, Neonatal and Reproductive Medicine, National Center for Child Health and Development

The lectin method is believed to be a practical, noninvasive prenatal test that minimizes the damage to erythroblasts. In this study, maternal peripheral blood was collected from 39 women at each stage of pregnancy, and white blood cells were removed using anti-CD45 antibodies. After lectin treatment, cells were classified based on the nuclear:cytoplasmic ratio in cell images, and the nucleated erythrocytes were visually selected from the candidate cells that were automatically detected by Metafer RCDetect. The fetal origin of the selected erythroblasts was confirmed by detecting the SRY gene by fluorescence in situ hybridization (FISH) and polymerase chain reaction (PCR). Panning with anti-CD45 antibodies resulted in the stable removal of leukocytes without aggregation. The positional information of the erythroblasts provided by Metafer was revealed by laser dissection and the erythroblasts could be easily collected as single cells. Male chromosomes could be identified by FISH and PCR in seven of seven cases. In addition, the signals of XY and chromosome 18 (No. 3 spot) as well as XY and chromosome 21 (No. 3 spot) were detected in the erythroblasts isolated from the mothers who delivered male infants with trisomy 18 and trisomy 21. The results of the isolation method strongly suggest that it could become a useful test that could improve prenatal testing.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2015;130:11-7)

Key words: lectin method, antiCD45antibody, erythroblast, FISH

I. 緒 言

非侵襲性出生前診断を行うために、母体血中の胎児有核赤血球を用いた染色体検査や遺伝子検査研究が欧米で続けられている。この方法では、母体血中にわずしか存在しない胎児有核赤血球を単離し、それが本当に胎児由来であるかを確認しなければならない。母体血中の胎児有核赤血球を獲得するための一般的な方法は、細胞膜抗体を用いる方法であり、この検査の歴史や有用性について

多数報告がある¹⁾。

一方で、我々は細胞表面の糖鎖を認識できるレクチンを用いることにより、母体血中より有核赤血球を抽出する方法を確立してきた²⁾。加えて、赤血球系はベンチジンによって染色されることが経験的に知られている。そのため我々は抗体を用いず、染色を行い蛍光顕微鏡下で画像解析を行う方法を行ってきた。以前、我々はレクチンを用いた有核赤血球の単離 (lectin-based erythroblast isolation: LBEI) 法を試みた。そして、男児を妊

娠している8人の妊婦より得られた母体血56 mlより、形態学的に71個の有核赤血球と思われる細胞が同定され、そのうち46個がFISH法によりXY陽性細胞であった³⁾。この結果は、形態学的に有核赤血球を同定する染色法は重要であり、臨床診断に必要な胎児DNAを得られる可能性を示すものであった。形態学的に小さいリンパ球や異型リンパ球等是有核赤血球と酷似しているが、ベンチジン染色は赤血球系のポルフィリンを赤く染めることで明確に区別することが可能である。しかし、ベンチジンは発がん性物質であるため使用が制限され、一般的な検査として継続していくことは難しい。

そのため今回、ベンチジン染色に代わりMay-Grunwald Giemsa (MGG) 染色を用いて、形態学的に有核赤血球を画像解析にて検出し、レクチン法による胎児遺伝子検査が行えるかを検討した。また新たに、母体由来の白血球を最大限排除するためにLBEI法の前処理として抗CD45抗体による白血球除去を追加して行い、また自動画像解析による有核赤血球の同定を試みた。

II. 対象と方法

1. 血液採取および有核赤血球の分離

超音波断層法検査や染色体検査により男児を受胎していることが判明している妊婦35名と女児を受胎している2名とトリソミーを受胎している2名、計39名より静脈採血を行った。全血は、EDTA管 (TERUMO Corp, Tokyo Japan) を用い14 mlずつ採取した。18トリソミー、21トリソミーの胎児を受胎している人を含め、全ての妊婦にインフォームドコンセントを行い、血液採取は、国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得て行った。

LBEI法による精製過程は、ガラクトース特異的レクチン (Soybean Agglutinin, SBA) を用いている³⁾。従来では前処理として、1.095 g/mlの密度溶液を用いて比重密度遠心法を行った後、ウシ胎児血清 (FBS) による白血球除去を行っていた⁴⁾。比重密度遠心法により、母体血より多量の赤血球や一部の白血球が除去され、FBS処理を37°C、30分行うことにより、白血球や血小板を枯渇させる。

今回の研究では、白血球をより多く除去するために、FBSに代わり抗CD45抗体結合ディッシュ (Fujikurakasei, Tokyo Japan) を用いた。遠心法後、9 cmディッシュに細胞が $0.5 \sim 1.5 \times 10^7$ になるようにまき、18°C、30分でインキュベートした。その後の行程は、LBEI法として以前報告されている方法で行った³⁾⁻⁴⁾。LBEI法後に、胎児有核赤血球と除去できなかったリンパ球をスライドガラス上に固定し、MGG染色を行った。

2. 有核赤血球の同定

画像解析ソフトであるMetafer 4 (MetaSystems, Altlussheim, Germany) を組み込んだAXIO imagerZ2 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) により、MGG染色された有核赤血球を自動的に検出した。MGG染色は、MG原液 (May-Grunwald Eosin Methylene Blue Solution, Wako, Osaka, Japan) 3分、1/15Mリン酸緩衝液に1分、25倍ギムザ希釈液に7分で行った。

MGG染色を行ったスライドガラスをAXIOの自動ステージにのせ、スライドガラス上のすべての細胞が写るように撮像した。その後、Metafer4のRCDetectを用いることで、自動的に有核赤血球候補細胞を選択した。最後に、保存した画像より得られた細胞の面積や径の計算を行い、候補細胞より形態学的に有核赤血球の区別を行った (Fig. 1, 2)。

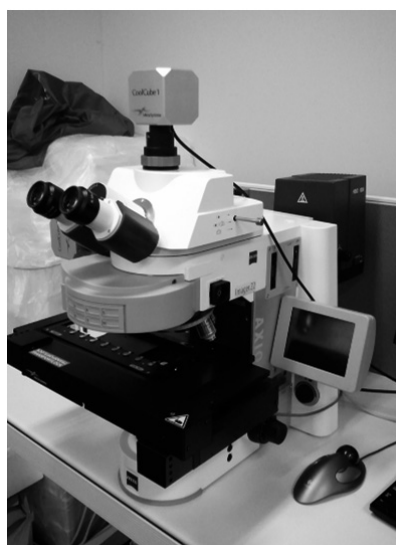


Fig. 1. RCDetect in Metafer, automatically selected the candidate erythroblasts.

3. FISH法

FISH法は、Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois, U.S.A) のプロトコールに従って行った。FISHプローブはGSP Laboratory製の3色プローブ [CEN13q (FITC)/18q (TexRed)/21q (R6G), CEN21 (R6G)/Xp (FITC)/Yq (TexRed)] を用いた。今回の研究では、ハイブリダイゼーション後の界面活性剤による洗浄は行わなかった。スライドガラスを対比染色した後、再度オートステージ上にした後、Metfer4で処理を行うと自動的に重ね合わせた画像を得ることができた。

4. DNA増幅

RCDetectで得られた位置データを、PALM MBIV (Carl Zeiss Microscopy) に読み込み、レーザーマイクロダイセクション (Laser Captured Microdissection; LCM) により単一細胞を回収した。細胞は、Ampdirect Puls (SHIMADZU, Kyoto, Japan) に回収し、2分間、4000回転で遠心を行った。PCR法は、SRYプライマー (forward: 5'-TCTCTCTGTGCATGGCCTGT-3' reverse: 5'-AACATCTTGGGGCATAGCAC-3', Life Technologies Corporation, Tokyo, Japan) を1 μ l, Bio Taq (Bioline, London, UK) を0.1 μ l, 10 μ lの回収した試料とMilliQを5.9 μ l混ぜ、サーマルサイクラーにて増幅を35サイクル行った (94°C 30秒, 64°C 30秒, 72°C 120秒)。増幅産物を、内因性コントロールとしてGAPDHを用い、Agilent 2100

BioanalyzerのDNA 1000 kit (Agilent Technologies, California, USA) にて確認した。

III. 結 果

39人の妊婦より母体血を採取し、抗CD45抗体による白血球除去を行い、LBEI法を施行した。得られた細胞を染色し画像解析を行った。有核赤血球を形態学的な核の位置により、maldistribution : A, center : B, projection : Cに分類した (Fig. 3)。有核赤血球とリンパ球は、大きさや形が似ているため、区別することが困難であるものの核・細胞比 (N/W) を用いて、リンパ球 (0.68) と血漿細胞 (0.23) を有核赤血球 (0.35-0.40) と明確に区別することが可能であった (Table 1)。また、分類することにより候補細胞を選別することがより容易になり、Aが半分以上でC,Bと続いた。今回の研究では、RCDetectによりN/Wが0.3から0.5で、面積が40 μ m²である有核赤血球の候補細胞を自動的に選択し、細胞遺伝学的検査を行った。

Table 2は母体血10 mlより検出できる有核赤血球細胞数を示しているが、妊娠週数が進む程、検出細胞数は増加した。妊娠後期に採取した検体では、1 ml当たり500細胞以上の有核赤血球を得ることができた。妊娠18週以前の検体では、平均60個の有核赤血球を検出でき、LBEI法に必要な

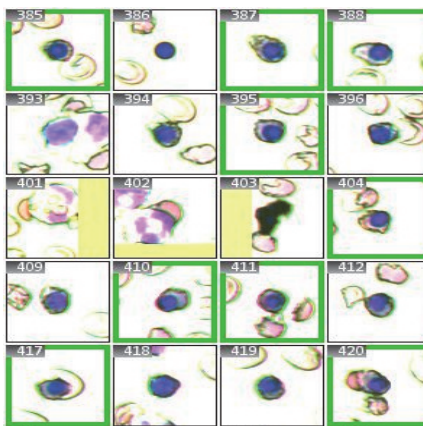


Fig. 2. The candidate erythroblasts automatically selected (green frame) and a technician sorted out the morphological erythroblasts from the candidate cells.

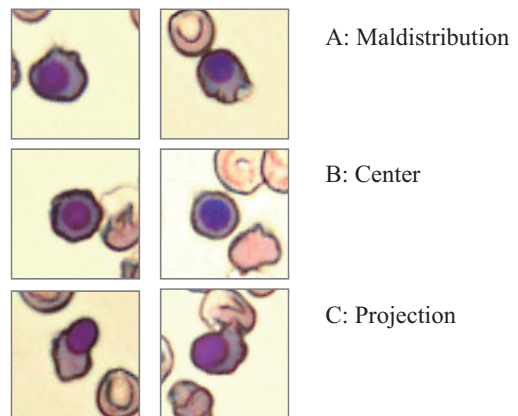


Fig. 3. Representative morphologies of erythroblasts classified

Table 1. Comparison of morphological values between erythroblasts and lymphocytes

Cell type	Area (μm^2)				Axis (μm)				
	whole (Mean) \pm (SD)		Nucleus (Mean) \pm (SD)		N/W	Major (Mean) \pm (SD)		Minor (Mean) \pm (SD)	
Erythroblasts									
Maldistribution	38.8	± 3.6	13.9	± 2.3	0.36	7.2	± 0.5	6.4	± 0.4
Center	41.7	± 7.3	14.5	± 3.3	0.35	7.3	± 0.7	6.8	± 0.7
Projection	41.3	± 7	16.7	± 4.3	0.4	8.2	± 0.5	5.9	± 0.8
Erythrocytes	46.5	± 5.2	- \pm -	-	-	8.1	± 0.4	7.2	± 0.8
Lymphocytes									
cytoplasm -	42.7	± 10.1	42.7	± 10.1	1	7.6	± 0.9	6.9	± 0.9
+	38.8	± 5.3	26.3	± 6.4	0.68	7	± 0.6	6.5	± 0.7
Plasma cells	71.7	± 10.2	16.8	± 7.2	0.23	9.5	± 1.2	9.1	± 1.0

The values of area and axis concerning 10 to 20 cells were calculated from pixel data of cellular images.

Cytoplasm -/+ indicates the absence/presence of cytoplasm of lymphocytes.

N/W indicates the ratio of nucleus area to whole area.

Table 2. Detection of morphological erythroblasts by using auto image analyzer

Pregnat period (wks)	(n)	Number of detected		Slides prepared	
		Mean	Range	Mean	Range
4 ~ 12	3	36	18 ~ 67	1.7	1 ~ 2
13 ~ 23	19	287	20 ~ 2,043	2.5	1 ~ 5
24 ~ 27	4	261	46 ~ 769	3.3	2 ~ 6
28 ~ 38	13	2,168	10 ~ 6,000	4.1	2 ~ 6
~ 18	15	60	18 ~ 240	1.9	1 ~ 3

The detected number of erythroblasts per 10 mL of blood. The detected number increased in accordance with the advancing stage of pregnancy.

Table 3. The number of erythroblasts (EB) after LBEI and fetal erythroblasts defined by FISH (per 10 mL blood)

Case	Period	Gender	Drawing blood (ml)	No of EB	XY	(%)	SRY ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
1	30W	M	6.5	600	124	7.5	-
2	33W	M	3.8	57.3	113	43.6	-
3	31W	M	7	73	229	39.6	2.79
4	20W	F	7	5.9	-	-	NA
5	20W	M	10.5	29	66	24.5	16.26
6	34W	M	5.8	9238	2914	31.8	10.84
7	20W	M	10	6.4	23	35.9	-
8	34W	M	7	44.6	68	18.1	12.63
9	25W	M	11	76.9	141	37.1	16.32
10	11W	F	7	6.7	-	-	-
11	17W	M	7	24	64	38.3	14.88
12	19W	M	6.7	40.7	60	18	-
13	26W	M	6.3	7.4	14	29.2	-
14	12W	M	6.3	1.8	10	71.4	-
15	28W	M	8.3	457.2	791	31.5	8.86
16	30W	M	13.5	536.4	117	2.2	-

Symbol "-" indicates the sample without examination.

SRY: Sex-determining region Y was amplified by PCR.

NA indicates the sample that was not amplified.

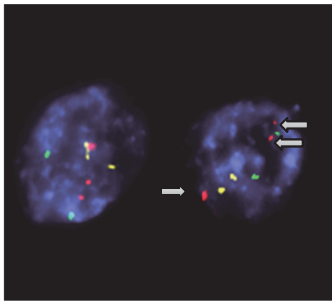
スライドガラスは2枚以下であった。39症例中、有核赤血球を検出できなかった症例はなかった。

胎児由来であることを確認するため、39症例中16症例より獲得した有核赤血球に対しFISH法やPCR法を行った (Table 3)。男児を妊娠している母体より得られた14検体は、X染色体、Y染色体特異的なプローブを用いてFISHを行った。男児の7検体と女兒の1検体はLCM処理により単一細胞を獲得し、SRY領域をPCR法で増幅することで性別を判断した。そのため男児の7検体は、FISH法とPCR法の両方で確認した。その結果、FISH法を行った男児の14検体すべてにおいて10個以上の有核赤血球で、XとYのシグナルを確認できた。FISH法とSRY領域のPCR法どちらも行った7症例全てでSRY領域の増幅が認められたが、女兒を妊娠している母体より得られた症例4では、SRY領域の増幅はなく、女兒と判定できた。

羊水検査で胎児が、男児の18トリソミー、21

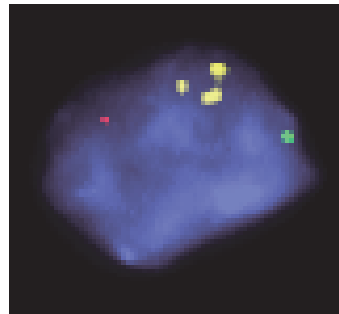
トリソミーと診断がついている検体に対して、FISH法を行った。胎児18トリソミーの母体より得られた検体 (症例7) では、RCDetectにより64個の有核赤血球を得ることができた。それを14個と50個に分け、それぞれにX、Y、21染色体と13、18、21染色体に対するカクテルプローブを用いた。結果としてXとYのシグナルが得られたのは、35.7%で、18番染色体のシグナルが3つ得られたのは36.0%であり、2つの数字は一致していた (Table 4)。今回異数体に対して行ったFISH法において、自動画像解析で、13、18、21番染色体のシグナルを検出することができた (Fig. 4-1)。

胎児21トリソミーより得られた検体 (症例16) では、536.4 /ml個の赤芽球を得ることができた。そのうち、21番のシグナルが3つとX、Yのシグナルが1つずつ得られたのは95個、21番のシグナルが3つとXのシグナルが1つ得られたのは21個であった (Fig. 4-2, Table 4)。



probes : 21(green), 18(red), 13(yellow)

Fig.4-1. FISH images of chromosome 18 trisomy



probes : X(green), Y(red), 21(yellow)

Fig.4-2. FISH images of chromosome 21 trisomy

Table 4. FISH analysis of 21trisomy and 18trisomy

FISH Probe			Erythroblast		
			XY21Trisomy	XX21Disomy	Not Detect
21Trisomy	X, Y, 21Probe	Number	95	3812	403
		%	2.2	87.8	9.3
18Trisomy	13, 18, 21Probe	Number	18	20	12
		%	36	40	24

X/Y/21: cocktail probe to chromosome X, Y, and 21

13/18/21: cocktail probe to chromosome 13, 18, and 21

IV. 考 察

母体、胎児に危険を及ぼさず、再現性の高い胎児遺伝子診断法の開発が長年待ち望まれてきた。我々の行ってきた胎児遺伝子診断のTarget Cellは胎児由来の有核赤血球である。この有核赤血球は通常、成人血中にはほとんど存在しないか、ごく僅かしか認められていないため検出が難しく、現在まだ臨床応用はされていない。一方で、母体血中の胎児cell-free DNAを用いた、胎児の性別や異数体検査は、既に臨床応用されている。しかし、cell-free DNAとは異なり、有核赤血球は胎児の全ゲノムを有するため、そのゲノム情報を元に他の遺伝子疾患を診断することが可能である。またcell-free DNAを用いた検査は、精度が向上しても非確定的検査であるため、将来的に確定診断になりうる有核赤血球を用いた検査法が確立されれば有用性が高いと考える。

今回行ったLBEI法の利点は、分離操作による有核赤血球はもちろんのこと、白血球へのダメージが最大限少なくなっていることである。物理的ストレスや化学的ダメージにより、白血球より溶血を引き起こす過酸化水素やプロテアーゼのような化学物質が放出される。細胞洗浄やサイトスピンの過程で、高速遠心分離を行うと、有核赤血球の脱核を認める。さらにいくつかの報告では、母体血中の胎児有核赤血球は、成人血中の高い酸素濃度に曝露されており、そのことでアポトーシスが引き起こされると考える⁶⁾⁻⁷⁾。

今回6つの症例で、抗CD45抗体の磁気ビーズを用いた方法を試みましたが、XY陽性細胞は3%以下であった(データ提示なし)。このことは溶液を4℃で攪拌することにより、有核赤血球の脱核が起きている可能性が考えられた。また磁気ビーズ法では、血漿細胞や変性した好中球を誤って胎児有核赤血球と判断する割合が増加する⁸⁾。

以上により磁気ビーズを用いた方法では有核赤血球の単離が難しいと判断した。磁気ビーズの代わりに用いた抗CD45抗体結合ディッシュは、白血球が集団化せずディッシュに付着することが可能であり有望であった。

以前我々は、有核赤血球の分離を行った34症例について報告を行っているが、検者の目視によ

り有核赤血球を選択しており、4例で有核赤血球を得ることができなかった⁴⁾。またその報告で、母体血10 mlあたりの有核赤血球数は、妊娠初期では平均34個、後半では117個であったのに対し、今回の研究では、LBEI法後にRCDetectによる自動画像解析により全ての症例で多くの有核赤血球を得ることができた。また、今回LBEI法により大量の有核赤血球を得た症例を経験したが、これらは切迫早産のような病的な状態の妊婦であった。いくつかの報告では、前置胎盤や糖尿病合併妊娠と同様に、妊娠高血圧症候群を発症しやすい全身性エリテマトーデスや抗リン脂質抗体症候群等でも、母体血中の胎児有核赤血球数が増加するとされている⁹⁾⁻¹¹⁾。高血圧により母体胎児間の細胞輸送が高まるためと考えられている¹²⁾⁻¹³⁾。

本研究では、形態学的に有核赤血球の同定をするためMGG染色を行った。LBEIにより集められた有核赤血球は、赤血球やリンパ球より小さく、リンパ球に比べ辺縁が乱れ、しわが寄り、暗い細胞質と核を持つ。形態学的に同定した多くの有核赤血球が、FISH法においてX、Y染色体のシグナルを1つずつ得ることができた。この方法により類似する母体由来のリンパ球(46, XX)の含有割合を抑制していると考えられ、FISH法の成功率を上げている。

また今回胎児トリソミー症例においても、FISH法で3つのシグナルを得ることができ、胎児の異数体診断に適應できる可能性が示唆された。とくに18トリソミーの症例では、多くのトリソミーシグナルを観察することができた。LBEI法を用いたMGG染色は、十分な量の有核赤血球を得ることが可能で、これはKurabuchiらが報告した方法を同程度であった¹⁴⁾。また、Puewosunuら¹⁵⁾やBabochkinaら⁷⁾は、MGG染色により有核赤血球を同定した方法でFISHが可能であったことを報告している。

PCRによる解析法は、性別だけではなく先天異常の検査にも有用である。今回の研究では、自動画像解析により得られた同一個体からのサンプルを、FISH法とSRY領域のPCR法の両方で行った。ダブルチェックで男児と判断することにより、LBEI法で得られた有核赤血球が胎児由来であることを証明し、胎児ゲノムとして使用できる可能

性を示した。しかし、現在のPCR法では、同一個体よりSRY領域の増幅があるスライドとないスライドが同時に作成されることがあり、さらなる研究が必要である。

LCMと画像解析の組み合わせは、位置データに基づき簡単に単一細胞を獲得できるため、将来の胎児DNA診断において有望視されている。将来、LBEI法とLCMで、単一細胞より全ゲノムを獲得し、少量の検体からでも解析できるデジタルPCR¹⁶⁾を行うことで、非侵襲的の出生前検査は飛躍的に発展すると考えられる。

V. 結 語

母体血より胎児有核赤血球を単離するために、抗CD45抗体結合ディッシュは細胞へのダメージを減らす可能性があり、適切な染色法と自動画像解析により効率良く有核赤血球を回収し、正確にFISH法を行う事が可能であった。また、機器の自動化によるLBEI法に関しては、解決していかねばならない問題もあるが、LBEI法は胎児有核赤血球を用いた非侵襲性胎児診断に有用であることが示唆された。

著者の利益相反 (conflict of interest:COI) 開示:

本論文の研究内容に関連して特に申告なし

文 献

- Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2006; 45: 10-20.
- Kanatani Y, Ishihara M, Takase B, Nambu M, Kishimoto S, Kitagawa M, et al. Selection of hematopoietic stem cells with a combination of galactose-bound vinyl polymer and soybean agglutinin, a galactose-specific lectin. *Transfusion.* 2008; 48: 561-6.
- Kitagawa M, Sugiura K, Omi H, Akiyama Y, Kanayama K, Shinya M, et al. New technique using galactose-specific lectin for isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn.* 2002; 22: 17-21.
- Wada S, Kitagawa M. Method of separation and concentration of fetal nucleated red blood cells in maternal blood and its application to fetal diagnosis. *Congenit Anom.* 2004; 44: 72-8.
- Sowemimo C, Samuel O. Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus Med Rev.* 2002; 16: 46-60.
- Kondo T, Sekizawa A, Saito S, Jimbo M, Sugito Y, Okai T. Fate of fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood: apoptosis is induced by maternal oxygen concentration. *Clin Chem.* 2002; 48: 1618-20.
- Babochkina T, Mergenthaler S, De Napoli G, Hristoskova S, Tercanli S, Holzgreve W, et al. Numerous erythroblasts in maternal blood are impervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to a dense compact nucleus with apoptotic character. *Hematologica.* 2005; 90: 740-5.
- Dragon S, Saffar AS, Shan L, Gounni AS. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol.* 2008; 45: 160-8.
- Ikeya M, Shinya M, Kitagawa M. Basic investigation of the lectin method for separation and recovery of nucleated red blood cells in maternal blood, and a study into the frequency of nucleated red blood cells in fetomaternal disorders. *Congenit Anom.* 2005; 45: 26-31.
- Davari-Tanha F, Mohammad Pour J, Kaveh M, Shariat M. Prediction of preeclampsia with elevation in erythroblast count in maternal blood. *Shiraz E-Medical Journal.* 2008; 9: 120-8.
- Fernández A, Prieto B, Escudero A, Ladenson JH, Alvarez FV. A monoclonal antibody with potential for aiding non-invasive prenatal diagnosis: utility in screening of pregnant women at risk of preeclampsia. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53: 345-50.
- Wright D, Akolekar R, Syngelaki A, Poon LC, Nicolaides KH. A competing risks model in early screening for preeclampsia. *Fetal Diagn Ther* 2012; 32: 171-8.
- Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh H, Nicolaides KH. Fetal and embryonic hemoglobins in erythroblasts from fetal blood and fetal cells enriched from maternal blood in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2004; 15: 109-14.
- Krabchi K, Gadjji M, Samassekou O, Grégoire MC, Forest JC, Drouin R. Quantification of fetal nucleated cells in maternal blood of pregnant women with a male trisomy 21 fetus using molecular cytogenetic techniques. *Prenat Diagn.* 2006; 26: 28-34.
- Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Okai T, Takabayashi H, Wen P, et al. Enrichment of NRBC in maternal blood: a more feasible method for noninvasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2006; 26: 545-7.
- Shen F, Du W, Kreutz JE, Fok A. Digital PCR on a SlipChip. *Lab Chip.* 2010; 10: 2666-72.