

学位授与番号：甲 987 号

氏 名：上出 泰山

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 27 年 3 月 25 日

学位論文名：

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

主論文名：

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

学位審査委員長：教授 大橋十也

学位審査委員：教授 岩楯公晴 教授 井田博幸

論 文 要 旨

論文提出者名	上出 泰山	指導教授名	岡本 愛光
--------	-------	-------	-------

主 論 文 題 名

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、梅原永能、左合治彦
東京慈恵会医科大学雑誌、2015年；第130巻 1号(in press)

要 旨

非侵襲性出生前検査において、胎児有核赤血球は全ゲノム情報を持つ点で有用性が高いと考えられるが、母体血中に僅かにしか存在せず、その臨床応用について研究が続けられている。レクチンによる有核赤血球の単離 (lectin-based erythroblast isolation: LBEI) 法は有核赤血球に対するダメージが軽微な点で、非侵襲的出生前検査として実用性が高いと考えられる。本研究では LBEI 法の実用化の可能性を実証するため、抗 CD45 抗体結合ディッシュによる白血球除去と自動画像解析によって迅速に多くの赤芽球を検出することを目的とした。妊娠各期の主に男児を受胎している妊婦 39 名より母体末梢血を採取し、抗 CD45 抗体を用いた白血球除去を行った。LBEI 法による単離を行い、May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色によって得られた細胞画像から、細胞質と核の面積比に基づく分類を行い、画像解析システム Metafer の RCDetect により有核赤血球候補を自動選択し、更にその中から目視で有核赤血球を選別した。そして、FISH 法と PCR 法による SRY 遺伝子の検出によって胎児由来の細胞であることを確認した。その結果、抗 CD45 抗体結合ディッシュによる白血球除去は、白血球を凝集させることなく安定しており、RCDetect により全ての検体で多くの有核赤血球を得ることができた。14 症例は、X・Y 染色体特異的なプローブを用いて FISH 法を行い、全てで Y 染色体のシグナルを得ることができた。また、有核赤血球の位置情報によりレーザーマイクロダイセクション (Laser Captured Microdissection; LCM) を行い、スライドガラスから単一細胞として有核赤血球を回収することができた。FISH 法と PCR 法の両方を行った 7 例で、Y 染色体を同時に確認することができた。また、18 番および 21 番染色体トリソミーを受胎している母体血から単離した有核赤血球から、X・Y と 18 番 3 スポットおよび X・Y と 21 番 3 スポットのシグナルが確認された。LBEI 法に、抗 CD45 抗体による白血球除去と MGG 染色後の自動画像解析を行う事により、多くに胎児有核赤血球が得られると考えられた。また、LCM により単一細胞を獲得できるため、胎児の全ゲノム情報を持つ有核赤血球を得ることが可能である。cell-free DNA を用いた出生前検査は実用化されているが、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られた。

論文審査の結果の要旨

上出泰山氏の学位申請論文は主論文1編、参考論文2編からなり、主論文は「母体血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」と題され、2015年に東京慈恵会医科大学雑誌に発表された。以下、論文の要旨と審査委員会における審査結果を記載する。

非侵襲性出生前検査において、胎児有核赤血球は全ゲノム情報を持つ点で有用性が高いと考えられるが、母体血中に僅かにしか存在せず、その臨床応用について研究が続けられている。レクチンによる有核赤血球の単離 (lectin-based erythroblast isolation: LBEI) 法は有核赤血球に対するダメージが軽微な点で、非侵襲的出生前検査として実用性が高いと考えられているが未だに実用化には至っていない。上出氏はLBEI法の実用化の可能性を実証するため、抗CD45抗体結合ディッシュによる白血球除去と自動画像解析によって迅速に多くの赤芽球を検出することを目的とし研究を行った。方法は妊娠各期の主に男児を受胎している妊婦39名より母体末梢血を採取し、抗CD45抗体を用いた白血球除去を行った。LBEI法による有核赤芽球の濃縮を行った後、May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色によって得られた細胞画像から、細胞質と核の面積比に基づく分類を行い、画像解析システムMetaferのRCDetectにより有核赤血球候補を自動選択し、更の中から目視で有核赤血球を選別した。そして、FISH法とPCR法によるSRY遺伝子の検出によって胎児由来の細胞であることを確認した。その結果、抗CD45抗体結合ディッシュによる白血球除去は、白血球を凝集させることなく安定しており、RCDetectにより全ての検体で多くの有核赤血球を得ることができた。14症例は、X・Y染色体特異的なプローブを用いてFISH法を行い、全てでY染色体のシグナルを得ることができた。また、有核赤血球の位置情報によりレーザーマイクロダイセクション (Laser Captured Microdissection; LCM) を行い、スライドガラスから単一細胞として有核赤血球を回収することができた。FISH法とPCR法の両方を行った7例で、Y染色体を同時に確認することができた。また、18番および21番染色体トリソミーを受胎している母体血から単離した有核赤血球から、X・Yと18番3スポットおよびX・Yと21番3スポットのシグナルが確認された。

以上よりLBEI法に、抗CD45抗体による白血球除去とMGG染色後の自動画像解析を行う事により、多くに胎児有核赤血球が得られると結論している。本方法の利点としてはまず、単一細胞を獲得できるため、胎児の全ゲノム情報を持つ有核赤血球を得ることが可能であることが挙げられる。またcell-free DNAを用いた出生前検査は実用化されているが、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非侵襲的確定診断法として有用性が高いとも結論している。

平成27年3月5日、井田博幸、岩楯公晴両審査委員出席のもとに公開学位審査会を開催し、上出氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験を実施した。試験では以下のような質問があった。

1) NIPT に比べて優れている点はなにか？ 2) 現在、コンバイン検査、NIPT、トリプルテスト、クアトロテストなどがあるが本検査の位置づけは何か？ 3) 本院における出生前診断の全体の流れはどうなっているのか？ 4) 今回は抗CD45抗体プレート、レクチン、形態学的な手法を使用したところが新しいが、レクチン使用しないで抗CD45抗体プレートと形態額的手法のみの組み合わせと比較したか？ 5) 在胎週数と有核赤血球の回収率の関係を見るならで相関係数を求めるべきではないか？ 6) 妊娠週数が増えると有核赤

血球の回収率は増えるのか？7)染色体異常に関しては1例ずつしかないので症例を増やしてから結論を出すべきではないか？8)回収率をもっと増やす方法とは具体的には何か？9)全ての検体でPCR法をしなかったのは何故か？10)男児だけを対象とした理由は何か？11)女児と判定された場合母体細胞混入はどの様に否定するのか？11)男児におけるSRY遺伝子PCR法で、個人個人で陽性率が違う原因はなにか？

その後、井田、岩楯両教授と慎重に審議した結果、本研究は出生前診断における非侵襲的確定診断法として意義のあるものであり、学位を授与するに十分な価値があると認められた次第である。