

# Isolation of fetal cells from maternal circulation and prenatal DNA analysis

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2020-02-10<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: Tanishima, Kiyoh<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="https://doi.org/10.24517/00056921">https://doi.org/10.24517/00056921</a>                            |

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN

1994

47

---

母体血よりの胎児DNA分離による出生前遺伝子解析

---

研究課題番号 05671918

平成6年度科学研究費補助金（一般研究（C））  
研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 谷島清郎  
(金沢大学医療技術短期大学部 教授)

金沢大学図書

## は し が き

遺伝性代謝疾患の病因解析や診断は、近年の分子生物学の発展により著しく進歩し、遺伝子異常による病態の確定診断を可能とする一方、早期診断、出生前診断への道を開き、発症の予防や治療へ大きく貢献できるようになった。

遺伝性メトヘモグロビン血症についても、従来、酸化還元酵素である Cytochrome b5 reductase (b5R) の活性異常による3タイプの病型が確認されてきたが、確定診断は主として血液細胞を材料とした酵素活性の測定によってなされてきた。すなわち、酵素活性が赤血球のみに欠損のみられる赤血球型 (Type I)、活性の欠損が全身組織に及び重篤な臨床症状を呈する全身型 (Type II)、赤血球や白血球など血球系のみ欠損のみられる部分型 (Type III) があり、これらの出生前診断についても羊水細胞、微絨毛膜細胞が用いられてきた。しかし、このような方法は母体と胎児の両方にとって安全とは言い難く、酵素活性測定の特異性の面でも問題が残されていた。最近、本症の遺伝子異常の解明が進むにつれて、b5R遺伝子の塩基配列の異常がこれら3タイプの病型でそれぞれ異なることが明らかとなり、病型別の確定診断への道が開かれた。

以上のような研究成果を本症の出生前診断に応用するため、b5RのDNA解析法の標準化と危険性のない胎児組織、細胞の収集法について検討することとした。



8000-37175-8

金沢大学附属図書館

## 目 次

はしがき

研究組織 ----- 1

研究発表 ----- 2

研究成果 ----- 3

第 1 章    Cytochrome b5 reductase (b5R)    4 ~ 5  
             遺伝子エクソン部位の塩基配列  
             異常と P C R 法

第 2 章    胎児細胞の収集法の検討            6 ~ 1 6

第 3 章    D N A 抽出法の検討            1 7 ~ 2 0

謝        辞 ----- 2 1

## 研 究 組 織

研究代表者：

谷島清郎（金沢大学医療技術短期大学部 教授）

研究分担者：

坂井明美（金沢大学医療技術短期大学部 教授）

島田啓子（金沢大学医療技術短期大学部 助教授）

田淵紀子（金沢大学医療技術短期大学部 助手）

生水真紀夫（金沢大学医療技術短期大学部 講師）

研究経費：

平成 5 年度 1、000 千円

平成 6 年度 1、200 千円

## 研 究 発 表

生水真紀夫、濱崎 裕、中島 優、窪田興志、山城 玄、  
胎児の運動制限をきたした子宮腔癒着の一例。  
産婦人科治療 67、585～589、1993

Makio Shozu, Katsutomo Akasofu, Gen Yamashiro,  
Kenji Omura,  
Changing ultrasonographic appearance of a fetal ovarian  
cyst twisted in utero.  
Journal of Ultrasound Medicine 12, 415～417, 1993

谷島清郎、有賀美紀子、七海裕子、  
ラット組織由来乳酸脱水素酵素アイソエンザイムの  
酵素学的性状と酵素標準としての有用性。  
臨床化学 23、93b、1994

Kiyoh Tanishima, Sun Xian Gao,  
Biochemical and enzymological study on lactate dehydro-  
genase isoenzymes from several animal tissue sources  
for preferable quality control material.  
The 8th International Symposium on Quality Control  
June 17, 1995, Kobe (Japan ), Exepta Medica in Press.

## 研 究 成 果

Cytochrome b5 reductase (b5R) 遺伝子の異常による遺伝性メトヘモグロビン血症の出生前診断を目的として、異常部位の塩基配列の解明と確定診断への遺伝子増幅技術 (PCR法) の適用を試み、胎児細胞を安全に収集する方法として母体流血中に含まれる胎児有核赤血球を対象とし、そのDNAを分析する標準的な操作を検討した。b5R遺伝子の解明から、本症の3種の病型に対してそれぞれ異なったエクソン部位の塩基配列異常の対応することが明らかとなり、それぞれのPCR法におけるプライマーを用意することが可能となった。

母体流血中からの胎児有核赤血球の分離収集については臍帯血を利用して比重法による分離法、有核赤血球に対する抗体を用いる免疫法を検討した。有核赤血球の確認には顕微鏡によるほか、比較的含有量の多い酵素の親和定数や活性化エネルギーのちがい等を用いた。

DNAの抽出法については、蛋白水解酵素を用いる方法、市販の各種抽出キットによる方法を比較した結果、有機溶剤や酵素を使用しないものが簡便、迅速で回収率が高いので推奨された。

以上の抽出法を臍帯血から分離した有核赤血球に適用し、b5R遺伝子のPCR法による増幅を試みた。しかしながら、母体流血中からの有核赤血球の比重法による単離にはバラツキが多く、胎児細胞採取の確実性を期すためには、むしろマイクロマニピュレータを用いて一個一個の有核赤血球を顕微鏡下に捕集する方法が理想的と考えられた。

結果を第1章から第3章に分けて記録したが、一部は外国誌に発表するのに英文となっているため、その概要を前文に日本語で記載した。

## 第1章 Cytochrome b5 reductase (b5R) 遺伝子の 塩基配列異常とPCR法

遺伝性メトヘモグロビン血症のType I, II, IIIの3病型におけるb5R酵素の活性異常には、b5R遺伝子の3つのエクソン部位における塩基配列の変異によるアミノ酸の置換がそれぞれ対応する。すなわち、Type Iでは、エクソン3における塩基のグアニンGからアデニンAへの変異によるアルギニンからグルタミンへの置換、Type IIでは、エクソン5のチミンTからシトシンCへの変異によるセリンからプロリンへの置換、Type IIIでは、同じエクソン5における別のコドンにおけるTからCへの変異によるロイシンからプロリンへの置換である。

各エクソン部位に対応するプライマーは表1の通りであり、T5、T6のプライマーを用いてFucharoen等の方法(1)に従ってPCR法を実施した。DNAの抽出は、Takahara等の方法(2)により、先ず白血球を用いて行い、得られたDNAを段階的に希釈してPCR法に適用した。PCR産物はアガロース電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド蛍光染色を型のごとく施した。

結果は図1のごとく、DNA量0.16pgまでアガロースゲル上の蛍光バンドとして確認された。

## 文 献

1. SP Fucharoen, G Fucharoen, P Fucharoen, et al. A novel ochre mutation in the  $\beta$ -thalassemia gene of a Thai: identification by direct cloning of the entire  $\beta$ -globin gene amplified using polymerase chain reaction. J Biol Chem 264: 7780-7783, 1989.
2. Y Takihara, T Nakamura, H Yamada, et al. A novel mutation in the TATA box in a Japanese patient with  $\beta^+$ -thalassemia. Blood 67: 547-550, 1986.



表 1 Cytochrome b5 reductase 遺伝子のエクソン  
部位と P C R 法におけるプライマー

| エクソン部位       | サイズ(bp) | Primer | Sequence (5'to3')    |
|--------------|---------|--------|----------------------|
| Exon 2       | 290     | T3     | TAGTGTGGACAAGCCGGTGT |
|              |         | T4     | TACTTCAGAGCAGACCATGC |
| Exon 3 and 4 | 1,121   | T5     | ATCCAGCCCTCGAGTTCTTC |
|              |         | T6     | ATGGACTCGAGAGGGGCTCT |
| Exon 5 -7    | 1,203   | T8     | TGCAGAAGAGGCACCTTGTC |
|              |         | T9     | GCCAGTGCACAGAACATTCG |

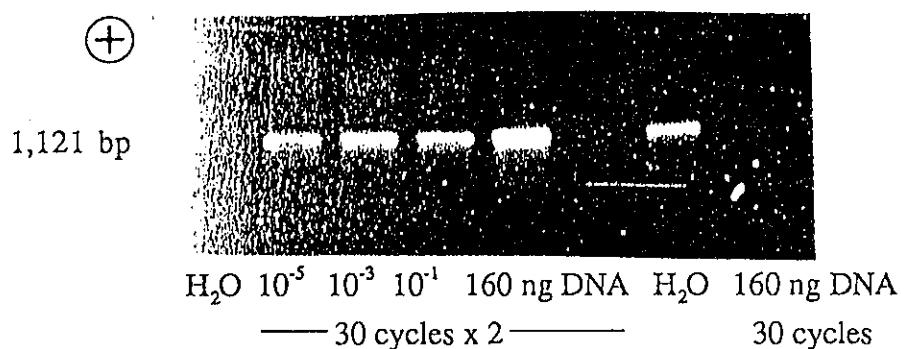


図 1 P C R 産成物のアガロース電気泳動像

DNA : ヒト白血球より抽出 (1 μl を P C R 法へ)  
 b 5 R gene の fragment C に対する P C R 増幅 :  
 Primer (T 5、T 6)、Denaturation (94 °C、1 min )  
 Annealing (60 °C、1 min)、Extension (73 °C、  
 1 min)、Cycles (30)、泳動 (2 % アガロース、  
 産成物 5 μl 添加、エチジウムブロマイド染色)

## 第2章 胎児細胞の収集法の検討

遺伝性代謝疾患の出生前診断にとって、胎児の組織や細胞を安全に採取することは最も重要な課題であったが、近年は、母体の末梢血液中に胎児由来の細胞（微絨毛膜細胞、trophoblast）の存在することが明らかにされ、それに対する抗体を用いて分離採取し、遺伝子異常を検出する方法が発達した（1～3）。しかし、最近では、これらの細胞の胎児由来については特異性の点で問題のあることが指摘されている（4～5）。

今回は、母体末梢血液中の胎児有核赤血球を分離採取することを目的として、先ず、臍帯血を用いた基礎的検討を行った。方法は、有核赤血球膜の transferrin receptor に対する抗体を用いる抗体法と比重の違いを利用して遠心分離する比重勾配法を比較した。分離された有核赤血球は、乳酸脱水素酵素活性を指標として、親和定数（ $K_m$ ）、活性化エネルギーの違いにより純度を比較したが、いずれも顕微鏡による確認には及ばなかった。したがって、妊娠母体の末梢血液からの有核赤血球の分離法としては、比重勾配法により分別した後（比重 1.083 g/ml の浮遊部分）、顕微鏡下に確認しながら分離採取する方法が最も確実であるという結論を得た。

## 文 献

1. A E Covone, R Kozma, PM Johnson, et al. Analysis of peripheral maternal blood samples for the presence of placenta-derived cells using Y-specific probes and McAb H315. *Prenat Diagnos* 8: 591-607, 1988.
2. MT Bertero, C Camaschella, A Serra, et al. Circulating trophoblast cells in pregnancy have maternal genetic markers. *Prenat Diagnos* 8: 585-590, 1988.
3. UW Mueller, CS Hawes, AE Wright, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 336: 197-200, 1990.
4. DJ Anderson, PM Johnson, NJ Alexander, et al. Monoclonal antibodies to human trophoblast and sperm antigens: Report of two WHO-sponsored workshops, June 30, 1986 - Toronto, Canada. *J Reprod Immunol* 10: 231-257, 1987.
5. DW Bianchi, AF Flint, MF Pizzimenti, et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3279-3283, 1990.

Study on human nucleated erythrocytes and their gene analysis. (1) Isolation of human nucleated erythrocytes and comparison of their enzymological properties according to age dependent density increasing

Kiyoh Tanishima, Makio Shozu, Akemi Sakai,  
Keiko Shimada and Noriko Tabuchi

Department of Clinical Laboratory Sciences and  
Midwifery, School of Allied Medical Professions,  
Kanazawa University, 5-11-80 Kodatsuno,  
Kanazawa, Ishikawa 920, Japan

## ABSTRACT

Non invasive collection of fetal tissue cells was studied for prenatal diagnosis of hereditary methemoglobinemia due to cytochrome b5 reductase (b5R) deficiency.

To apply a fetal tissue material to polymerase chain reaction (PCR) amplification of b5R gene, we examined the evidence which suggested that maternal peripheral blood might be used as a source of fetal cells. From the results studied on cord blood by discontinuous density gradient method, selective enrichment of fetal nucleated erythrocytes was observed in a fraction of 1.083 g/ml density of Percoll solution. We compared some age-dependent erythrocyte enzyme activities such as lactate dehydrogenase between several erythrocyte fractions with different density to determine the specificity of nucleated erythrocytes separated.

## INTRODUCTION

Non invasive collection of fetal tissue cells is an important means of evaluating the prenatal diagnosis of genetic disorders. To apply a fetal material to polymerase chain reaction ( PCR ) amplification of gene, most laboratories have used trophoblasts present in maternal circulation by immunological method using the monoclonal antibody, which recognizes a glycoprotein on the surface of the human trophoblast cell populations ( 1 ~ 3 ). However, Anderson, et al. and other investigators reported that this antibody was not specific for trophoblasts ( 4 ~ 5 ).

Recently, Bianchi et al. used a monoclonal antibody against the transferrin receptor to identify nucleated erythrocytes in the peripheral blood of pregnant women ( 6 ). It is well known that erythrocyte density increases during its aging ( 7 ). Density gradient centrifugation is the technique most generally used for fractionating erythrocytes of different mean age ( 8 ).

We studied an enrichment procedure using discontinuous density gradient centrifugation for collecting nucleated erythrocytes. We also compared some age-dependent erythrocyte enzyme activities such as lactate dehydrogenase ( EC 1.1.1.27, LD ) between several erythrocyte fractions with different density to determine the specificity of nucleated erythrocytes separated.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of blood samples

Normal human blood samples were obtained from healthy student volunteers at our University with informed consent. Cord blood samples were collected from the Department of Gynecology in our University Hospital.

### Erythrocyte separation on a density gradient

According to the modified method of Salvo et al. ( 8 ), Blood samples were filtered through a cotton column in HEPES buffered isotonic saline. We separated nucleated erythrocytes from human cord blood with discontinuous gradient density ( three - step gradients were prepared by Percoll and HEPES buffered solution, pH 7.3, 310 - 320 mOsm/kg H<sub>2</sub>O at 3.5 % BSA final concentration; 1.079, 1.083 and 1.095 g/ml of each density ). We used Percoll from Sigma Chem. Co. ( Density: 1.13 g/ml ) and HEPES ( N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulphonic acid ) from Dojin Pharm. Lab. in buffered solution.

Four ml of filtered erythrocyte suspension were layered on top of the gradient. Centrifugation was carried out in a swing rotor at 1000 x g for 10 min at 20 °C . Cell fractions were washed three times with HEPES buffered isotonic saline at 4 °C to remove Percoll.

### Measurement of LD activity

LD activity was measured automatically ( Monarch Chemistry System, Instrumentation Lab. Inc., Lexington, MA ) using a commercial kit with pyruvate as a substrate ( LDH - HA Test WAKO, Wako Pure Chem. Ind. LTd., Ohsaka ). We also performed a spectrophotometric rate assay of LD activity using a Hitachi 150-20 Spectrophotometer ( Hitachi Ltd., Tokyo ) for the purpose of plotting velocity vs substrate for an enzyme-catalyzed reaction ( S/V plot ) and to determine the Km value and activation energy. The reduction of pyruvate was monitored by following the NADH oxidation at 340 nm and 30 °C. The assay mixture consisted of 50 µl of enzyme, 2.0 ml of Sodium phosphate buffer ( 67 mmol/L, pH 7.4 ) containing 0.22 mmol of NADH per liter and 100 µl of various concentration of pyruvate.

## Electrophoresis of LD isoenzymes

LD isoenzymes were separated electrophoretically on a buffered agarose gel at pH 8.2 using a commercially available kit ( Beckman Paragon LD, Beckman Instruments Inc., La Brea, CA ). After electrophoresis the isoenzymes were detected by measuring the production of nitroblue formazan dye, according to the instructions provided with the kit.

## Commercial reference materials

We used 3 commercially available reference materials ;  
1) Enzyme Reference WAKO ( Wako Pure Chem. Ind. Ltd., Osaka ),  
2) Seraclea-HE ( Kaketsuken Lab., Kumamoto )  
3) Liquid Reference ( Ciba Corning Diagnos. Co., Irvine, CA ).

## RESULTS

The discontinuous Percoll gradient produced four red cell fractions ; 1st fraction with Low Density, 2nd fraction with nucleated erythrocytes, 3rd fraction with High Density and bottom fractions with Super Density red cells. The enrichment fraction in nucleated erythrocytes was compared with LDR and HDR fractions for several biochemical and enzymological properties.

## Electrophoretic profile of LD isoenzymes in reference materials

We compared the electrophoretic patterns of LD isoenzymes in the erythrocyte fractions separated with those of reference materials. The results showed that hemolysate of each erythrocyte fraction migrated with the same profile as those of human serum and reference material 1 ~ 3 ( Fig. 1 ).



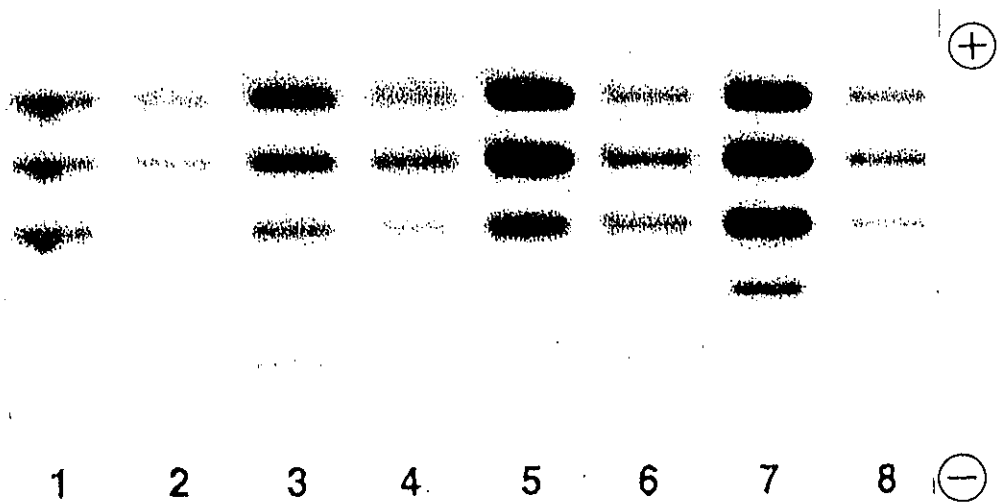


Figure 1 Electrophoretic patterns of lactate dehydrogenase isoenzymes in human erythrocyte fractions and reference materials

1. Reference material (1), 2. Reference material (2 - normal ), 3. Reference material (2 - pathological ), 4. Normal human serum, 5. Normal human adult whole red cells, 6. Low Density Red Cell fraction, 7. High Density Red Cell fraction, 8. Fetal nucleated erythrocytes

### Km value and activation energy

For further studies on properties of the specific LD isoenzyme fractions in each erythrocyte fraction, we compared their Km values and activation energies with those of reference materials 1 ~ 3 which contained human erythrocyte hemolysates as indicated in the manufacturer's instructions.

Km value and activation energy of hemolysate from HDR fraction was different from other LDR fraction, SDR fraction and reference materials ( Table 1 ).

Table 1 Km values and activation energies of human erythrocyte fractions and reference materials

|                                | Km Value<br>( $\times 10^{-4}$ mol/L ) | Activation Energy<br>( KJ/mol ) |
|--------------------------------|--|---------------------------------|
| Normal human serum             | 0.53                                   | 22.8                            |
| Reference material ( 1 )       | 0.88                                   | 27.7                            |
| Reference material ( 2 )       |  |                                 |
| Normal                         | 0.56                                   | 35.6                            |
| Pathological                   | 0.81                                   | 25.4                            |
| Normal human erythrocytes      |  |                                 |
| Adult whole red cells          | 0.82                                   | 121.4                           |
| Fetal nucleated cell fraction  | 1.19                                   | 226.3                           |
| Low density red cell fraction  | 0.81                                   | 75.2                            |
| High density red cell fraction | 0.82                                   | 128.0                           |

## DISCUSSION

Erythrocyte hemolysates from density gradient fractions had similar electrophoretic profiles to those of normal human serum and human erythrocyte type reference materials, but the enzymic characteristics such as  $K_m$  values and activation energies were different each others among these specimens. The plot of velocity vs substrate concentrations for HDR fraction enriched in nucleated erythrocytes and for other fractions and reference materials revealed the same effects according to substrate concentration. Krijnen et al. ( 9 ) investigated LD isoenzymes prepared from human erythrocytes and the placenta, and found that all preparations were heterogeneous both with respect to the protein and isoenzyme content.

It would be possible to prepare a nucleated erythrocyte fraction by comparing its density with those of other fractions and reference materials as internal standard.

## REFERENCES

1. AE Covone, R Kozma, PM Johnson, et al. Analysis of peripheral maternal blood samples for the presence of placenta - derived cells using Y-specific probes and McAb H315. *Prenat Diagnos* 8: 591-607, 1988.
2. MT Bertero, C Camaschella, A Serra, et al. Circulating trophoblast cells in pregnancy have maternal genetic markers. *Prenat Diagnos* 8: 585-590, 1988.
3. UW Mueller, CS Hawes, AE Wright, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 336: 197-200, 1990.
4. DJ Anderson, PM Johnson, NJ Alexander, et al. Monoclonal antibodies to human trophoblast and sperm antigens: Report of two WHO-sponsored workshops, June 30, 1986 - Toronto, Canada. *J Reprod Immunol* 10: 231-257, 1987.
5. Y-MD Lo, P Patel, JS Wainscoat, et al. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* ii: 1363-1365, 1989.
6. DW Bianchi, AF Flint, MF Pizzimenti, et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3279-3283, 1990.
7. C Seaman, S Wyss, S Piomelli, et al. The decline in energetic metabolism with aging of the erythrocyte and its relationship to cell death. *Am J Hematol* 8: 31-42, 1980.
8. G Salvo, P Caprari, P Samoggia, et al. Human erythrocyte separation according to age on a discontinuous Percoll density gradient. *Clin Chim Acta* 122: 293-300, 1982.
9. PMW Krijnen, FY Leung, AR Henderson. Commercial preparations of human lactate dehydrogenase isoenzymes are not homogeneous [ Letters ]. *Clin Chem* 33: 1289, 1987.

### 第3章 DNA抽出法の検討

遺伝性代謝疾患の出生前診断に母体末梢血液中を循環する少数の胎児有核赤血球を分離して、そのDNAを分析することの有効性は由来細胞の确实性、特異性の面や母体と胎児の両者に対する安全性の面で有望視されている(1~3)。

今回は、少量の有核赤血球よりDNAを抽出する方法の標準化を目標として、最初に白血球及び臍帯血より分離した有核赤血球を用いて基礎的検討を行った。

#### 材料と方法

白血球は本学学生有志より、臍帯血は本大学医学部産科婦人科学教室により、2K-EDTA添加採血されたものを使用した。

DNAの抽出法は、市販の各種抽出キットとしてIsoQuick(種橋器械)、Micromix(バイオロジカ)、WBキット(和光純薬)、セバジーン(三光純薬)を用いる一方、蛋白水解酵素を用いる方法(4)によった。すなわち、0.05 mg/ml Proteinase Kを使用し、20 mM DTT、1.7  $\mu$ M SDSを含むPCR用トリス緩衝液(宝酒造)中にて、37°C、60分間溶解を行った。反応終了後は、85°C、15分間加熱、冷却し、DNA量を紫外波長260 nmで測定した。

PCRの条件は、primer (T3, T4)、denaturation (93°C、1 min)、annealing (60°C、1 min)、extension (73°C、1 min)、cycles (30)、泳動(2%アガロース、PCR産物5  $\mu$ l 添加、エチジウムブロマイド染色)である。

## 結 果

不連続比重勾配遠心法によって分離した白血球分画を10 mmol/L リン酸緩衝食塩水 (pH 7.2, 10 mmol/L EDTA-2K) にて洗浄した後、 $10^4$  個の血球浮遊液としてDNA抽出に使用した。各抽出法によって得られたDNA量を吸光度260 nmと280 nmとの比により測定し、純度を比較した。

各回収量は、Proteinase K抽出では5~7  $\mu\text{g}/10^4\text{Cells}$ 、WBキット、セパジーン抽出では5~10  $\mu\text{g}/10^4\text{Cells}$  とほとんど差がなく、純度は260 nm/280 nm比として1.7~1.8であった。IsoQuick抽出、Micromix抽出では、これらに比べて回収のバラツキが大きく、また、十分な回収量が得られなかった。

同じく臍帯血より分離された有核赤血球分画は、顕微鏡下に血球数を計測し、段階希釈した後に同様のDNA抽出を行ったが、PCR法では5~10個までしか陽性結果が得られなかった(図1)。

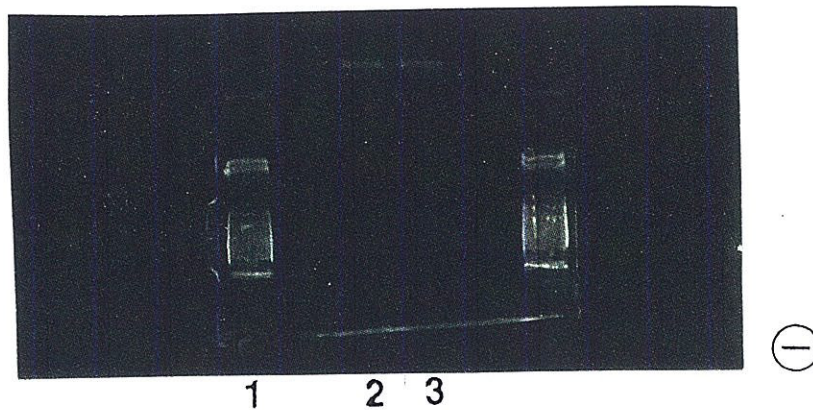


Figure 1 PCR amplification products of cytochrome b5 reductase gene on agarose gel electrophoresis

Primer specific exon 2 of the b5R control regions were used for amplification. Amplification and electrophoretic conditions are described in Materials and Methods. Lane 1, molecular size marker; Lane 2 and 3, 290 - bp amplified product for DNA extracted from 10 of the nucleated erythrocytes by WB -Kit and Sepagene Kit.

## 文 献

1. Y-MD Lo, P Patel, JS Wainscoat, et al. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* ii : 1363-1365, 1989.
2. DW Bianchi, AF Flint, MF Pizzimenti, et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3279-3283, 1990.
3. H Takabayashi, S Kuwabara, T Ukita, et al. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenatl Diagnos* 15: 74-77, 1995.
4. VB Gyllensten, HA Erlich. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7652-7656, 1988.

Study on human nucleated erythrocytes and their gene analysis. (2) Extraction of DNA from nucleated erythrocytes and DNA amplification by polymerase chain reaction

Kiyoh Tanishima, Makio Shozu, Akemi Sakai, Keiko Shimada  
Noriko Tabuchi

Department of Clinical Laboratory Sciences and Midwifery,  
School of Allied Medical Professions, Kanazawa University  
5-11-80 Kodatsuno, Kanazawa, Ishikawa 920, Japan

We analysed the NADH-cytochrome b5 reductase gene of hereditary methemoglobinemia type I, type II and type III , and applied these results to prenatal diagnosis of this disorder.

An alternative and noninvasive method for obtaining fetal cells from maternal circulation was studied. It was evident that nucleated erythrocytes were most desirable for this purpose. We studied also the methods for collecting nucleated erythrocytes for extraction of DNA and for polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA by using cord blood. Discontinuous density gradient centrifugation of nucleated erythrocytes and selection of the cells by micromanipulator were found to be most reliable for analysing DNA of the nucleated erythrocytes.

PCR technique allowed the primers to anneal to their respective binding sites of Exon 2 of b5R gene and showed a positive PCR signal for amplified product of DNA extracted from 5 ~ 10 of the nucleated erythrocytes.



## 謝 辞

本研究に際し、遺伝子解析に関して終始ご指導いただき、また、プライマーを提供していただきました九州大学遺伝情報実験施設の服巻保幸教授、岩城明子博士、その他実験施設の方々、胎児有核赤血球を単離して提供していただき、いろいろご助言いただきました金沢医科大学産科婦人科学教室の高林晴夫助教授に厚く御礼申し上げます。

なお、臍帯血及び妊娠母体の末梢血液を金沢大学医学部産科婦人科学教室より提供していただきました。ここに深謝申し上げます。また、正常成人血液の提供にご協力いただきました本学学生のみなさまに深謝いたします。