

## 羊水內胎兒細胞之染色體分析初步報告

阮正雄 黃閔輝 王漢洲

李正義 楊坤河

### 摘 要

近幾年來，台灣開始發展應用羊膜穿刺術於產前診斷胎兒的染色體異常。由民國71年4月至73年12月，作者等在台北市立婦幼綜合醫院一共收集了183例羊膜穿刺作產前診斷的病例，其主要的適應症有高齡產婦(99/183)，其次為曾經生產過畸型兒之正常父母(27/183)，曾經生產過不正常染色體嬰兒(9/183)及父母之一方有染色體異常者(6/183)。…我們一共發現4例胎兒染色體異常，其發現率為2.1857%(4/183)，詳細情形為：①46 XY-14+rob(14g, 21g)，是1例不平衡轉位的唐氏症候群；②45 XX, rob(14g, 21g)，是一平衡羅氏轉位；③45, XY, rob, (15g, 21g)，也是平衡羅氏轉位；④46, XX, rep, (P21, P13)，為一平衡相互轉位。本文就實驗方法的改進，異常病例的報告及其遺傳的機率等作報告，供大家參考。

關鍵語：染色體，羊膜穿刺，羅氏轉位，相互轉位。

### 緒 論

“優生保健”的工作在我國已愈來愈受到重視，大家都注意到人口膨脹的問題，夫婦所生子女數目已漸漸減少，希望“精簡”人口。隨着“優生保健法則”的通過，及社會形態的改變而有晚婚的趨勢，使得產前胎兒之檢查這項工作扮演一個很重要的角色<sup>(1-5)</sup>。在國外的研究報告，已知孕婦年齡的增加，其胎兒患有唐氏症候群或其它異常染色體的機率也增加<sup>(2-15)</sup>，所以產前的檢查愈趨重要。本文乃就實驗方法的改進，異常病例之報告，供大家參考。

### 材料與方法

#### I、個案的收集對象：

凡有下列適應症之妊娠婦女，在其妊娠滿16週至20週之間，抽取羊水，以作胎兒之染色體檢查。

- ①高齡妊娠婦女，生產時年齡滿35歲以上者。
- ②曾經有生產過不正常染色體嬰兒之妊娠婦女。
- ③夫婦兩人其中有一方具有平衡轉位 balanced translocation，或其他染色體方面之異常者。

- ④曾有過多次不明原因流死產或畸型兒者。
- ⑤母親焦慮不安，害怕生出畸型兒，因妊娠早期曾經曝露在 X 光下或服過藥物者。
- ⑥母親的家族曾有染色體異常的小孩者。
- ⑦要求檢查胎兒性別者。

## II、羊膜穿刺術抽取檢體：

對以上適應症之妊娠婦女，在其妊娠滿 16 週至 20 週之間，以超音波掃瞄檢查胎兒之大小、發育狀況、胎盤之位置、羊水量的多寡，以選定適當的時機與部位，抽取羊水。抽取羊水的步驟如下：

- ①以超音波定位適當的抽取位置及羊膜腔與腹部皮膚間之距離。
- ②以含酒精之優碘藥水消毒腹部皮膚 3 次。
- ③操作者戴手套，並在施術部位蓋上無菌洞巾。
- ④以 21 號或 22 號之腰椎穿刺針，經由腹部穿刺之。
- ⑤先以 5 cc 個針筒試抽，確定在羊膜腔內無誤時，再以 20 c.c. 針筒抽取 20 c.c. 的羊水。

## III、羊水細胞的培養：

- ①將取得的羊水平均分置於 3 支無菌試管內，以 800—1000 rpm 離心 10 分鐘。
- ②離心後抽出上清液，保留 3 c.c. 送檢驗胎兒甲種蛋白 ( $\alpha$ -fetoprotein)，餘丟棄。每支試管以 5 c.c. 培養液 (culture medium) 分次沉澱混合均勻，再以無菌吸管 (sterile pipette) 吸出放入 25 cm<sup>3</sup> 培養瓶 (culture flask)。
- ③培養液，以 500 c.c. RPMI-1640 (GIBCO)，125 c.c. fetal Bovine serum, 5 c.c., 7.5% Sodium Bicarbonate, 5 c.c., Penicilline streptomycin, 5 c.c. L-Glutamine 泡製而成。
- ④將培養瓶放入 37°C 5% CO<sub>2</sub> 保溫箱內 (Bellco Glass) 培養。
- ⑤第 5 天取出培養瓶，在倒立顯微鏡 (In-

verted light microscope olympus) 觀察細胞的生長情形，同時更換培養液。

- ⑥第 10 天至 14 天時，當細胞已生長到相當數目及有足夠的分裂中期之細胞核時 (約 0.5 ml—1 cm 大小的 colony 出現 6—7 個而每 HPF 下可見 12 個以上分裂細胞時)，則準備收成。
- ⑦收成時，先加入 0.1 c.c. 的秋水仙素 (colcemid) 於培養瓶內，再放入保溫箱內 2 小時。
- ⑧取出培養瓶，將培養液倒掉，加入胰蛋白酶, Trysin-EDTA (10X) 1 c.c. 靜置約兩分鐘。於倒立顯微鏡下可見細胞完全剝離脫離培養瓶的底部。
- ⑨分次將 5 c.c. 培養液加入培養瓶，將已剝落的細胞倒入培養管內，以 800—1000 rpm 離心十分鐘，吸去上清液，加入 5 c.c. Hypotonic Solution (0.075 M KCl)，搖盪均勻，放回保溫箱內放置 20 分鐘。
- ⑩取出試管，再以 800—1000 rpm 速度離心 10 分鐘，丟棄上清液。
- ⑪以 4 c.c. 固定液 (Fixative) (Acetic acid 1 份，加 Absolute Methanol 3 份配製而成) 緩緩加入混合均勻。
- ⑫重複⑩⑪ 2—3 次。

## IV、染色體玻片製作與染行：

- ①把乾淨之玻璃片浸於冰水中。
- ②以 800—1000 rpm，離心已有細胞之固定液，10 分鐘。
- ③吸去上清液，調整細胞濃度。
- ④約 150 cm 的高度，把細胞滴在冰冷的玻璃片上，使細胞爆破在玻璃片上，將此玻璃片放置在 60°C 烤箱中兩天。
- ⑤以 Giemsa banding 之染色法染色，封片即告完成。

## V、染色體的觀察，照相及剪製成核型圖：

把已完成的片子放在光學顯微鏡下，觀察

表 1 個案的適應症分佈

適 應 症	人 數
(1)高齡妊娠婦女(年齡滿 35 歲以上)	99
(2)曾經生產過畸型兒者	27
(3)父母之一方有染色體異常者	6
(4)曾經生產過不正常染色體嬰兒者	9
(5)家族內曾有染色體異常小孩者	3
(6)母親因害怕生出畸型兒，而焦慮不安者	8
(7)欲知胎兒的性別者	10
(8)表兄妹近親結婚	3
(9)其他不屬於上列適應症者	18
合 計	183

及攝影。每 1 個案例至少檢查 20 個分裂中期的細胞核的染色體。攝取 4—6 張照片，並剪製成核型圖。所使用的軟片為 Kodak, Panatomic-x film, 顯影液為 Kodak D-76, 相紙用 ILFORD No.4。相紙顯影液為 Kodak Dektal developer cat. 405—0926, 定影液用 Kodak fixer cat. 405—1595。

## 結 果

從民國 71 年 4 月起至 73 年 12 月止，作者等共收集了 183 個羊膜穿刺抽取羊水的病例。其適應症以高年齡妊娠婦女為最多，佔 54.098% (99/183)，其次為曾經生產過畸型兒者，佔 14.754% (27/183)，見表 1。這些接受羊膜穿刺術病例之年齡分佈，最年青的為 24 歲，年齡最大的為 43 歲，其中以 35 歲至 39 歲年齡群為最多，佔 49.180% (90/183)，見表 2，至於培養的成功率以民國 71 年 12 月為很大的分界，以前之成功率僅 5/27，在第 2 階段因技術之熟練及環境之改善，使失敗率明顯的降低，僅有 1 例因感染而失敗，即細胞培養成功率提高為 94.1%。至 72 年 12 月之後，培養基的更改，以張氏培養液取代 RPMI-1640，更使培養時間縮短為

表 2 個案的年齡分佈

年 齡	人 數
< 30	34
30—34	41
35—39	90
> 40	18

年齡最輕者 24，最大者 43 歲。

11 天，細胞培養的成功率提高為 97.84%，見表 3。

在 183 例檢查中，共發現 4 例不正常染色體的病例，其發率為 2.1857%，分別將此 4 稱敘述於後。

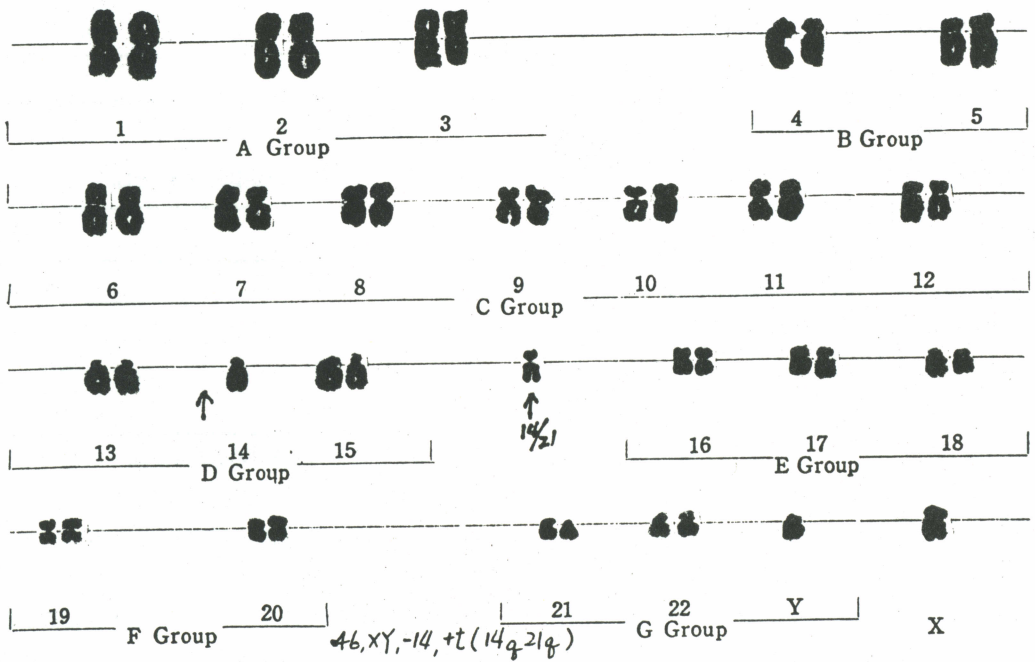
病例：

第 1 例：一位 24 歲女性，曾經生產過一個不平衡轉位的唐氏症候群小孩，因為我們的幫忙檢查病人及她先生的染色體，發現她是一位羅氏平衡轉位的攜帶者 45, XX, rob, (14g, 21g)，而他先生則為正常。在她隨即而來的懷孕，我們建議抽羊水檢查，發現胎兒又是一位不平衡轉位的唐氏症候群的男嬰，其染色體核型圖呈 46, XY, -14, +rob (14g, 21g) (圖 1)。追蹤他的家族史，發現他的父親是一個攜帶因子者，而她弟弟亦

表3 抽取羊水時的妊娠週數與培養所需時間的關係

	成 功 率	平均抽取羊水週數	培 養 所 需 日 數
第 1 例至第 27 例	失敗 22 成功 5 ( 18.5 % )	18.9 週 19.5 週	36 天
第 28 例至第 44 例	失敗 1 成功 16 ( 94.1 % )	20 週 18.7 週	21.9 天
第 45 例至第 183 例	失敗 * 成功 136 ( 97.84 % )	19.2 週	11 天

\* 第一次細胞培養失敗，第二次細胞培養才成功。



Name 秦○ (Amniotic Fluid Culture)  
Culture No.  
Date of Culture

Hosp No.  
Referred by  
Ward or Clinic

Chromosome Counts < 45 45 46 47 Other Total  
No. of Cells

Karyotypes

Interpretation

Signed \_\_\_\_\_

圖 1

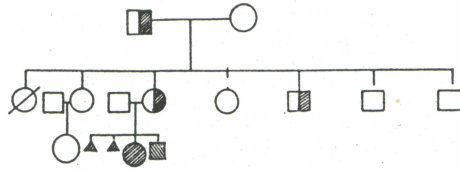
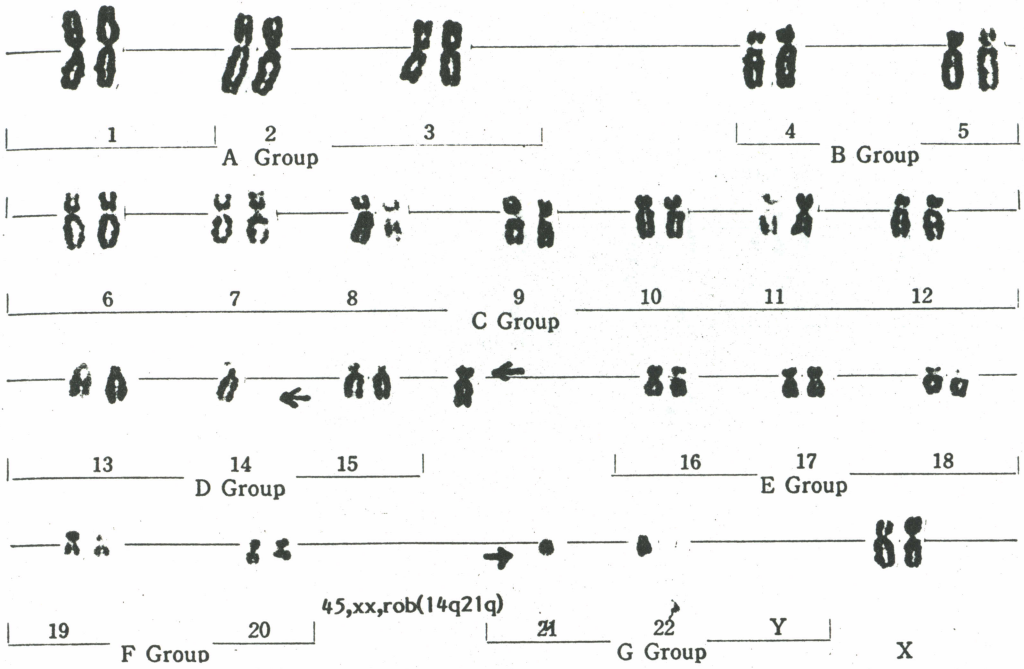


圖 2



Name 盧○美 (Amniotic Fluid)  
 Culture No.  
 Date of Culture A 83-002

Hosp No.  
 Referred by  
 Ward or Clinic

Chromosome Counts < 45 45 46 47 Other Total  
 No. of Cells

Karyotypes

Interpretation

Signed \_\_\_\_\_

圖 3

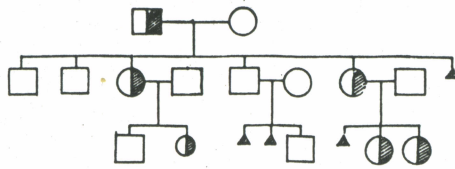
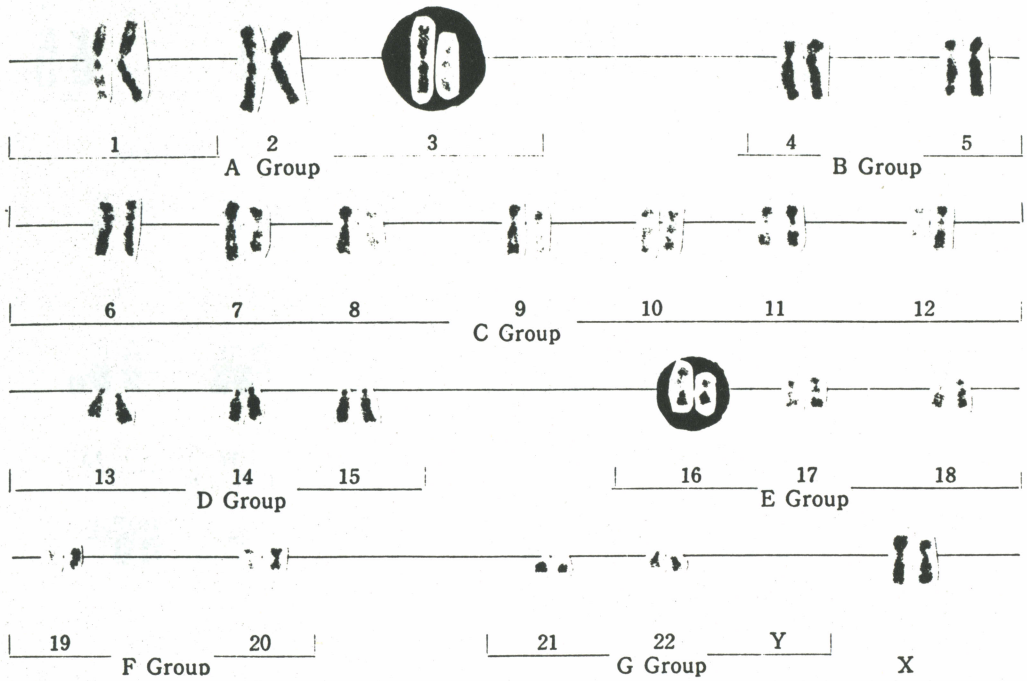


圖 4



Name  
Culture No.  
Date of Culture

Hosp No.  
Referred by  
Ward or Clinic

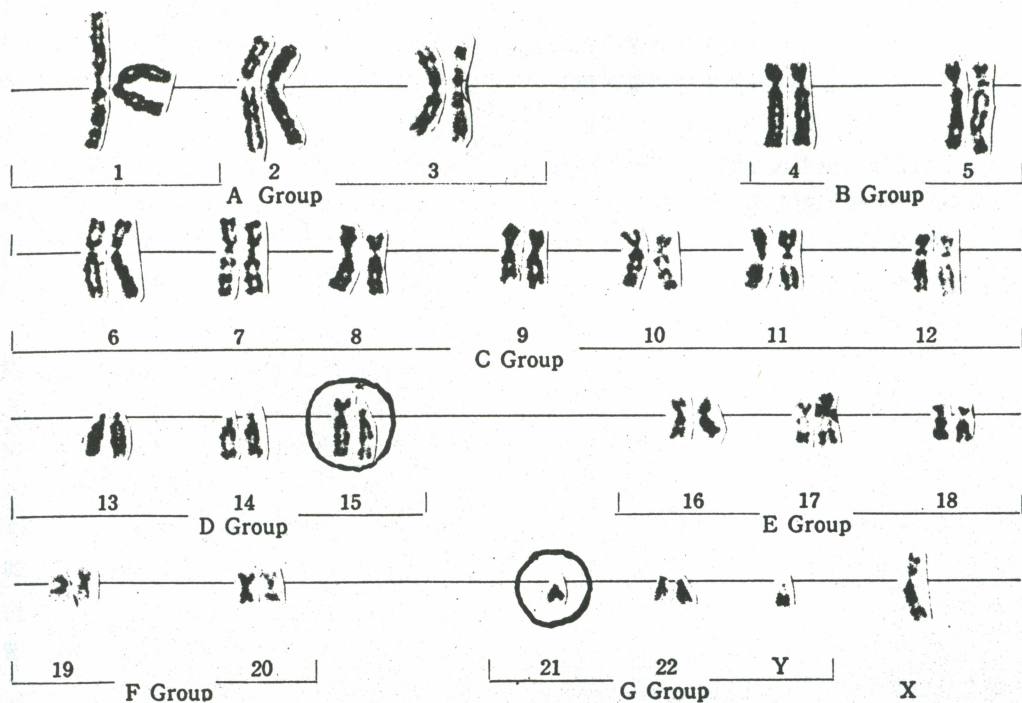
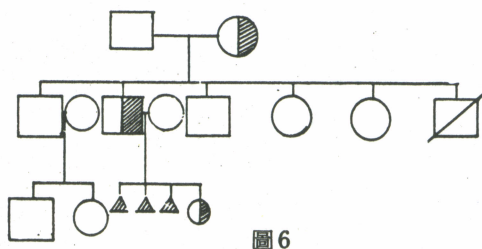
Chromosome Counts < 45 45 46 47 Other Total  
No. of Cells

Karyotypes

Interpretation

Signed \_\_\_\_\_

圖 5



Name  
 Culture No.  
 Date of Culture

Hosp No.  
 Referred by  
 Ward or Clinic

Chromosome Counts	< 45	45	46	47	Other	Total
No. of Cells						

Karyotypes

Interpretation



Signed \_\_\_\_\_

圖 7

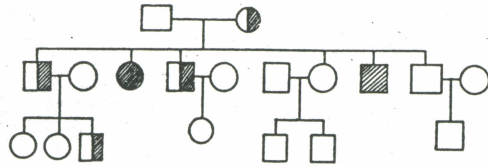


圖 8

是帶因者，其家族圖如圖 2。

第 2 例：病人為 39 歲，第 2 次懷孕的高齡孕婦，施行羊膜穿刺，檢查胎兒的染色體，發現胎兒之核型為 45, XX, rob, (14g, 21g) (圖 3)。檢查該夫婦之核型，此婦人為羅氏轉位染色體的攜帶因子者，其先生核型正常。其雙親共育子女 5 人，有 1 次流產，其兄長有兩人旅居美國，無法進行檢查外，其父親、弟妹各一人及妹妹的兩個女兒亦為轉位染色體攜帶因子，見家族圖 (圖 4)，帶因者均無外型異常及智力障礙。

第 3 例：病人為 25 歲婦女，結婚 3 年，有 3 次自然流產的經驗，到遺傳諮詢門診就診時正懷第 4 胎，且已有 22 週之大小，經羊膜穿刺術，羊水細培養及染色體分析，發現胎兒之核型圖為 46, XX, t(3:16)(P.21; P.12) (圖 5)，平衡相互轉位。追查病人夫婦之染色體亦呈同樣的相互轉位核型，病人的婆婆亦同樣為轉位核型的帶因者，其他家族成員拒絕檢查染色體。

第 4 例：病人為 31 歲的經產婦女，已有 2 女，因她先生具有羅氏轉位染色。因此病人在懷孕第 18 週時施行羊膜穿刺術，及羊水內胎兒細胞之染色體分析，發現胎兒之染色體核型圖 (圖 7)，為 45, XY, rob. (15g, 21g) 為羅氏轉位染色體的攜帶者，追查其家族中，發現病人的先生的弟妹各有一個唐氏症候群 (圖 8)。

## 討 論

由於科技的進步，研究遺傳的方法與技術的改進，許多有關遺傳的醫學問題，在生產以前即可得到診斷<sup>(1-5)</sup>。有關產前遺傳的診斷

，多要依靠羊水穿刺術在妊娠 16—20 週時抽取羊水來檢查。羊水的檢查，可分為羊水液的生化學檢查及細胞染色體篩檢<sup>(16, 17)</sup>。台灣在近幾年來亦已開始發展羊膜穿刺術，應用在產前胎兒之染色體異常。衛生署更撥經費在台大與榮總設立遺傳諮詢中心，來配合優生保健法的實施。婦幼綜合醫院肩負婦幼保健之重責，因而在民國 71 年 4 月即開始推展染色體的檢查<sup>(18)</sup>，並在門診開設遺傳諮詢特別門診，對高危險群的妊娠婦女，提供應有的服務。經由遺傳諮詢門診的篩選，自民國 71 年 4 月至 73 年 12 月，共收集了 183 例羊膜穿刺術的病例，所取得的羊水標本，經歷了許多困難的培養發展過程，才使工作穩定下來。在我們的經驗中，羊水的培養成功，可明顯的區分為 3 個階段。第 1 階段 (第 1 例至 27 例) 僅有 5 例成功 (5/27)，成功率只有 18.5%；第 2 階段 (第 28 例至 44 例) 有 16 例成功 (16/17)，其成功率提高至 94.1%；第 3 階段 (由第 45 例以後至 183 例) 有 136 例成功 (136/139)，3 例失敗例經第 2 次抽取羊水培養才成功，故其成功率為 97.84%。分析第一階段失敗率偏高的原因，有下列 3 項：

1. 黴菌或細菌的感染，整個操作的過程沒有完全達到無菌技術的要求，無菌操作是培養過程中很重要的關鍵。
2. 不穩定的細胞生存環境：適當的培養基、溫度、酸鹼度、及二氧化碳濃度的恒定，更是培養中細胞發育必備之條件。
3. 無法確定收取細胞的時機：在開始時 (第 1 階段) 往往等到細胞佈滿了一層培養瓶的底部時才收取細胞，因而浪費了許多時間，後來發現能有數個 Colony 生長且每個 HPF 下



表4 羅氏轉位攜帶者的下一代遺傳機率

	正 常	攜 帶 者	不平衡轉位
學 理 上 的 機 率	0.33	0.33	0.33
實際生產所觀察的			
女性 DgGg 攜帶者	0.49	0.40	0.11
男性 DgGg 攜帶者	0.39	0.59	0.02
女性 GgGg 攜帶者	0.46	0.52	0.01
男性 GgGg 攜帶者	0.34	0.66	—

有 10 個左右的 Mitotic cell 時即可收成，非但縮短了培養時間，且 Metaphase 的細胞也比較多。到了第 3 階段更以張氏培養基取代 RPMI-1640，而使培養時間再縮短為 11 天即可收取，成功率也提高到 97.84%。

在 183 例羊水穿刺檢體中，發現 4 例異常的染色體，其發現率為 2.1857% (4/183)，與外國的報告發生率為 2.5% 相近<sup>(13)</sup>。由於目前所取得之數量僅有 183 例，數目尚太少，不足以分析異常染色體社發生率，僅能提供一些異常病例所見及羊水細胞染色體實驗方法的改進經驗而已。在 183 羊膜穿刺例中，除了 1 例於 28 週時發生早產，另 1 例出生時發現有尿道下裂外，其餘皆無併發症發生，作者認為這些早產與尿道下裂均非羊膜穿刺所造成。

所檢查出的 4 例不正常染色體異常，均為轉位型染色體遺傳，其中 3 例為羅氏轉位 (Robertsonia translocation)，1 例為相互轉位 (Reciprocal translocation)。3 例羅氏轉位中，有 1 例為不平衡轉位的唐氏症候群。染色體轉位是指 2 個不同的染色體發生染色體斷裂，而發生交換的現象。根據 1971 年巴黎會議所採用的標準<sup>(19)</sup>，染色體斷裂的部份以中心珠來連接者稱為羅氏轉位 (Robertsonia translocation)。染色體斷裂後應有的部份均沒有短損時，稱為平衡轉位，有欠缺時稱為不平衡轉位。羅氏轉位通常發生在染色體 D 群與 G 群之間 (t Dg, Gg 來表示) 及 2 個 G 群之間 (用 t Gg, Gg 來表示)

表5 相互轉位攜帶者的下一代遺傳機率

	正 常	攜 帶 者	不平衡轉位
女 性	0.414	0.448	0.138
男 性	0.327	0.552	0.121

，有羅氏轉位時，其子代常發生唐氏症候群，且多半出現在染色體 14 或 15 與 21 之間，很少發生在染色體 13 上。羅氏平衡轉位帶因者所生下來的活產兒可能出現正常核型，平衡轉位及不平衡轉位型，學理上各佔 1/3 的發生率<sup>(14)</sup>，然而實際上的發生率是不平衡核型要比其餘兩者少很多 (表 4)，而男性是平衡轉位的攜帶因者，其子女中發生不平衡核型的機率比女性為帶因者之發生的機率少。對於一個相互平衡轉位的帶因者，無論男性或女性，其子女發生不平衡轉位的機率大約為 12—13%<sup>(15)</sup>。

目前由文獻中，可能見到染色體異常 (圖 9)，有刪減缺損 (Deletion)，逆轉 (Inversion)，重複 (Duplication) 及半染色體的形成 (Isochromosome Formation) 及轉位 (translocation) 等，其再傳遞下去的子代即會攜帶異常的染色體，而這些異常染色體，也將造成下一代的非正常與不幸。

## 結 論

我國的“優生保健法”於民國 74 年 1 月 1 日公佈實施，羊膜穿刺術應用於檢查胎兒的遺傳疾病，將為這項法案提供一種重要的檢查

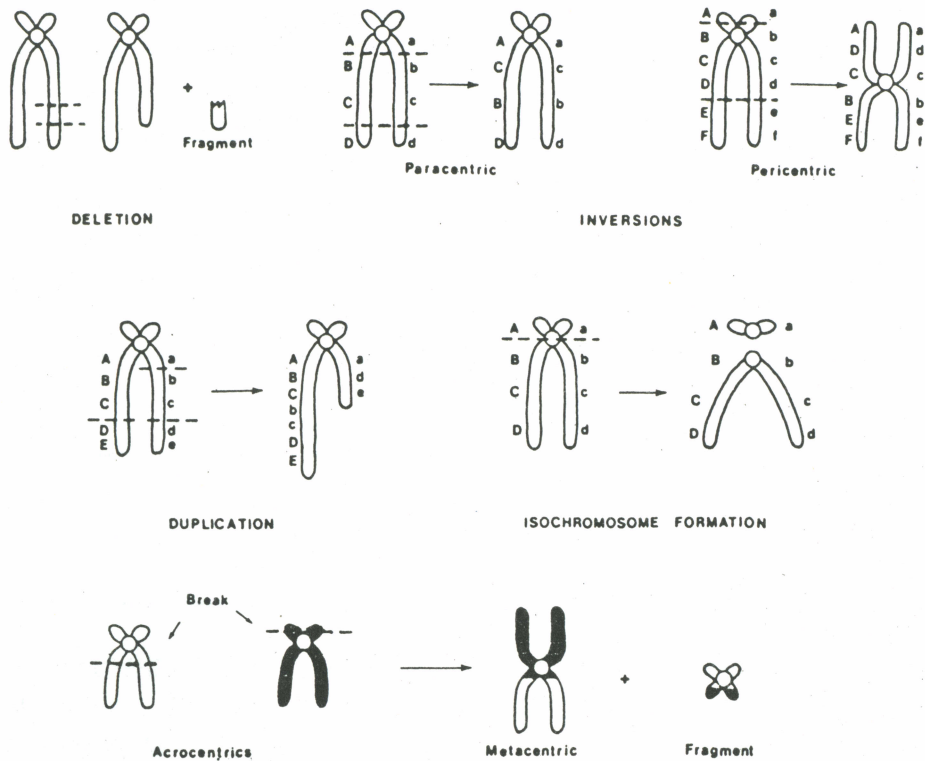


圖5 細胞分裂時發生染色體異常的形態

方法。台北市立婦幼綜合醫院為了配合優生保健法之推行，自民國 71 年 4 月之後，即極力推展染色體檢查之篩檢研究，而今在羊水中細胞染色體分析中，發現了 4 例異常染色體，雖然其中僅有 1 例為唐氏症候群，然而其餘 3 例為平衡轉位的帶因者，其遺傳給下一代，發生唐氏症候群及其他異常染色體的機率很大。為了培養出健康的下一代，避免先天性畸型及先天代謝異常，及痴呆症的唐氏症候群病例的出生，造成家庭、社會的負擔。對於高危險妊娠婦女應會診遺傳諮詢門診，施行染色體篩檢，在懷孕的週產期間，將染色體有問題之胎兒除去，而保存品質優良的胎兒。

### 參考文獻

1. 阮正雄：週產期的診斷基礎，台北嘉洲出版社，民國 73 年 4 月。
2. QUILLIGAN EJ, NORMAN KRE-

TCHMER: Fetal and Maternal Medicine. John Wiley & Sons Inc., New York, 1980.

3. NADLER HL: Prenatal detection of genetic defects in I. Schulmon (ed) Advance in Pediatrics. Year book Medical publishers Chicago. pp. 1-88, 1976.
4. MILUNSKY A: Prenatal diagnosis of genetic disorders. N Engl J Med 295; 377-380, 1976.
5. MILUNSKY A: The prenatal diagnosis of hereditary disorders. Charles C Thomas Springfield, 1973.
6. MILLER OJ, BREG WR: Autosomal chromosome disorders and variation. N Engl J Med 294; 596-598, 1976.
7. GERALD PS: Sex chromosome dis-

- orders. N Engl Med 294; 706-708, 1976.
8. DAY RW: The epidemiology of chromosome aberrations. AM J Human Genet 18; 70-80, 1966.
  9. GOOD WB, ROBINSON A, PUCK TT: Incidence of anencephordy in a human population. AM J Human Genet 28; 62-68, 1976.
  10. HARMERTON JL, CANNING N, RAY M, SMITH A: Cytogenetic survey of 14069 new born infant I Incidence of chromosome abnormalities. Clinical Genet 8; 223-243, 1975.
  11. NIELSEN J, SILLERSEN I: Incidence of chromosome aberration among 11148 new born children. Human Genet 30; 1-12, 1975.
  12. LAIRD G, JALKSON R, NEIL S: Clinical genetics. John Wiley & Sons Inc., New York, 1979.
  13. SMITH DW, WILSON AC: The child with Down's syndrome. WB Saunders Company Philadelphia, 1973.
  14. MIKKELSEN M: Down syndrome current stage of cytogenetic research. Human Genet 12; 1-5, 1971.
  15. BONE A: European collabartive study on structural chromosome anomalies in prenatal diagnosis proceeding 3rd quropean conference on prenatal diagnosis of genetic disorders. Stuttgart Ferdir & Enke p. 34, 1977.
  16. EVANS TN: Amniocentesis in genetic counseling. AM J Obst Gynecol 109; 768, 1971.
  17. NADLER HL, GERBIA A: Present state of amniocentesis in intrauterine diagnosis of genetic defects. Obst Gynecol 38; 389, 1971.
  18. 阮正雄：染色體檢查在婦幼醫學的臨床醫學應用，現階段在婦幼醫院二年來的染色體異常分析（第一報）中華民國助產學會、助產雜誌第19期，p. 5-15 民國72年12月。
  19. Paris Conference. 1971. Standardization in human cytogenetics. Birth Defects Original article series, Vol. 8, No. 7, National Foundation.
  20. 牧野佐二郎：染色體人類的細胞遺傳 東京 醫學院書院 1979.

## Chromosomal Study from the Cell of Amniotic Fluid

C. H. ROAN, M. F. HUANG, H. C. WANG, C. Y. LEE and  
K. H. YANG

### SUMMARY

*In the very near future, our government will take a big step by legalizing abortions along with the development of "Prenatal Diagnosis" studies, which means that couples who are suspected of having deformed babies, will have the option of abortion and trying again. In other words, prenatal diagnosis and abortion serve hand in hand to minimize the tragedy of deformed births.*

*The development of prenatal diagnosis in Taiwan has only been recent. Take as for example, 183 cases of prenatal chromosome diagnosis in TMWCH were performed from April 1982 to Dec. 1984. The main groups of indication were: advanced maternal age (99/183), previous child with congenital anomaly from parents with normal karyotype (27/183) and chromosome anomaly in one parent (6/183). We found 4 abnormal fetal karyotypes (2.1854%; 4/183), all abnormalities being on the translocation chromosome. These are listed as the following:*

- (1) 46, XY, -14, +rob (14q21q) - an unbalanced translocation Down's syndrome.
- (2) 45, XX, rob (14q21q) - a balanced translocation.
- (3) 45, XY, rob (15q21q) - also a balanced translocation.
- (4) 46, XX, rep (3;16) (P13) - a balanced reciprocal translocation.

---

Department of Pathology, Obs. & Gyn., Taipei Municipal Women & Children's Hospital.

Received for Publication: June 11, 1985.