

平成17年度学術奨励賞受賞講演

1. 母体血を用いた無侵襲的な胎児遺伝子診断法研究の進歩

昭和大学講師 関 沢 明 彦

胎児の染色体異常や遺伝子異常を診断するためには、羊水穿刺や絨毛採取などにより胎児細胞を採取する必要がある。しかし、これらの方法には僅かながら流産などのリスクがあることから、リスクを伴わない胎児遺伝子検査法の開発が期待されている。母体血中には、血漿成分に胎児由来の cell-free DNA が、また、細胞成分にも胎児由来の細胞が存在し、それらを胎児遺伝子診断に応用する研究が行われ、一定の成果を挙げている。

[母体血漿中胎児由来 cell-free DNA]

1997年、母体血漿中に胎児由来の DNA が循環していることが初めて報告された。我々は、302例の妊娠7~16週の妊婦血漿より DNA を抽出し、Y染色体特異的な DYS14 遺伝子を PCR 法で増幅し、その遺伝子の同定を行った。その結果、女兒を妊娠している159例には DYS14 遺伝子は検出されず、男児妊娠例の143例中139例で DYS14 遺伝子が同定された。また、母体血漿中胎児 DNA 濃度は平均で37細胞相当量/mLと比較的に高濃度に存在した。さらに、偽陰性であった4例について再度 DNA 抽出を行い分析したところ、DYS14 遺伝子が同定できたことから、妊娠7週以降、確実に胎児 DNA が母体血漿中に存在し、母体が、持たない遺伝子を対象とすることで、確実な胎児遺伝子診断が可能であることを示した。この方法は、Rh陰性妊婦での胎児 RhD 血液型診断にも応用され、精度の高い診断法として確立している。さらに、我々は胎児の単一遺伝子病の診断にも応用した。この症例は、超音波検査で四肢の発育不全があり、胎児の四肢短縮症の中の軟骨無形成症を疑った。この疾患は、90%以上が特定の1塩基の突然変異により起こることが知られており、我々はこの妊婦の血漿中にその変異遺伝子を同定することで、胎児の遺伝子診断に成功した。

しかし、母体血漿中 cell-free DNA は、その中の5%程が胎児由来のみであり、胎児由来 DNA のみを分離することはできない。その為、母

体血中胎児 DNA を用いた出生前診断の対象は、母体が持たない遺伝子を母体血中で同定する方法に限定され、胎児染色体異常や母が保因者の遺伝性疾患への応用は不可能である。そこで、その制限がなく、広く胎児の遺伝子診断や染色体診断が可能と考えられる母体血中の胎児細胞を用いた方法の開発が必要となる。

[母体血中胎児由来細胞]

母体血中に胎児細胞が存在することが最初に報告されたのは19世紀に遡るが、僅かな数しか存在しないため、それを出生前診断に用いる試みはなかった。1980年代後半になり、PCR法やFISH法のような高感度な遺伝子分析法が利用できるようになり、無侵襲的な出生前診断法の標的として、注目され、研究されるようになった。母体血中の胎児由来細胞としては、絨毛細胞、白血球、有核赤血球などが証明されている。それらの中で、有核赤血球は、成人血中には通常存在しないこと、妊娠初期の胎児血中に豊富に存在し、母体循環への移行数も多いこと、母体血中での lifespan が短いため前の妊娠の影響を受けないこと、細胞の識別が比較的容易であることなどの特色を有するため、現在の主な標的となっている。

この分野の研究を先駆けたのが Bianchi らのグループ(米国)である。彼女らは、1990年に、蛍光標識した細胞表面抗原(CD71)を用いた FACS 法で妊婦末梢血から有核赤血球の濃縮に成功した。それ以降、欧米を中心にこの FACS 法や磁気ビーズを用いた MACS 法などで、抗原抗体反応を用いて有核赤血球を濃縮し、胎児診断する方法が研究された。そして、それらの方法の臨床応用を目指し、1995年から5年間、米国 NIH が主導する多施設研究(NIFTY study)が行われた。この研究は母体血中有核赤血球を用いた胎児染色体異常の診断精度を検討することが目的で、2744例の染色体異常のリスクが高い妊婦を対象に、FACS、

MACS法で回収した胎児有核赤血球優位の細胞分画にFISH法を行い、胎児の性別及び染色体数の異常の有無について検討した。しかし、その結果、FACSで13%、MACSで48%の症例でXY細胞が同定できたに過ぎず、XY細胞の偽陽性率も11%に及ぶという惨憺たる結果であった。また、この検討で、胎児染色体異常の検出率は44%に留まり、胎児細胞が6倍以上あるはずの染色体異常例においても半数以上の症例で胎児細胞の回収ができなかった。これらの結果は、抗原抗体反応により極めて低頻度の細胞の回収を行っても細胞ロスが避けられず確実な標的細胞の分離は難しいことを示しており、本目的でのFACS、MACS法による細胞濃縮の限界を示した。

国内では、1995年、高林らが、有核赤血球 rich な分画を非連続密度比重遠沈法を用いて分離し、それを塗抹染色後、形態的に有核赤血球を識別し、その細胞を顕微鏡観察下に micromanipulator を用いて回収、その個々の単一細胞のDNAからY染色体特異的の遺伝子をPCR法で増幅することで、母体血を用いた胎児DNA診断の可能性を示した。我々は、その手法を応用し、母体血中有核赤血球から胎児のDuchenne型筋ジストロフィーやOrnithine Transcarbamylase欠損症の診断を行い報告した。また、2002年、北川らは、ガラクトース特異的なレクチンが赤血球系細胞に選択性を持って結合することを利用した全く新しい有核赤血球濃縮法を開発した。さらに、高林らは有核赤血球自動判別装置の試作機を完成させた。そのような中、上記の特徴ある研究成果を結集統合・一本化し、母体血中有核赤血球を用いた日本独自の出生前診断法の確立をめざし、2005年、「母体血による胎児DNA診断研究グループ」(FDD-MB Study Group)を組織し、有核赤血球分離の最適化・細胞レベルのDNA診断法の確立などに取り組んでいる。

現在、母体血からの有核赤血球濃縮の最適化が終了した。有核赤血球は白血球より高比重の細胞であるため、母体血から1.095g/mLの高い比重の分離液を用い、単核球成分を分離した後、白血球系細胞全般を取り除くレクチン法で処理することで、効率的に白血球を除去し、有核赤血球の濃縮が可能である。実際、55例の妊婦末梢血を用い、

この方法で有核赤血球の分離を試みた。その結果、全例で確実に有核赤血球の回収ができることを確認した。回収できた有核赤血球数は、正常妊婦末梢血6mL当たり平均12.8細胞であり、その後の遺伝子解析に十分な数の細胞回収ができることが分かった。

次に、このレクチン法で濃縮し、同定した有核赤血球を個々に micromanipulator で分離し、一枚の別のスライドグラス上に移してFISH法で染色体診断する方法を確立した。20例の正常の妊婦を対象に、末梢血から有核赤血球を分離し、X、Y染色体特異的なFISHプローブを用いて、胎児の性別診断を行った。その結果、男児を妊娠している8例で、XY細胞を複数同定し胎児が男児と診断できた。また、女児妊娠例ではXY細胞は同定できなかった。有核赤血球を用いて行った性別診断の結果は、全例、胎児の性別に一致し、有核赤血球を用いて正確な出生前診断が可能で、及び、母体血中には胎児由来の有核赤血球が確実に存在することがわかった。さらに、男児妊娠例で、有核赤血球の66%はXX、44%はXYであったことから、母体血中有核赤血球の約半数は母体由来であり、出生前診断においてはその細胞の由来を考慮した上で診断する必要があることが分かった。この結果は、FISH法で21番・18番・13番染色体特異的のプローブを用いれば、ダウン症をはじめとする胎児期に問題となる大部分の染色体異常の診断が可能であることを意味しており、現在、羊水検査を行う妊婦を対象に、妊娠15—18週に末梢血を採取し、有核赤血球から胎児性別、21番、18番、13番染色体の数的異常の診断の精度を検討する多施設研究を行っており、その研究の途中経過についても報告する予定である。

母体血中から胎児由来の有核赤血球を回収し、遺伝子解析する技術は、長い間研究されてきたが、ようやく臨床応用が視野に入る状況に至っている。母体血中胎児有核赤血球を用いる検査は、染色体異常だけではなく、遺伝性疾患の診断にも幅広く応用可能であり、従来の羊水穿刺や絨毛採取に代わる検査と位置付けられ、母体・胎児への侵襲のない日本初の理想的な検査法として周産期医療の更なる発展に貢献すると考える。