

周産期医療における遺伝子診断の応用

田中滋己¹⁾³⁾, 須 麗 清²⁾³⁾, 山本初実²⁾³⁾

IRYO Vol. 63 No. 8 (481-488) 2009

要 旨

周産期胎児診断における遺伝子解析技術の応用は、それまでタンパク質の生化学的解析や染色体の顕微鏡解析に頼っていた出生前診断の精度を著しく向上させた。FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法による染色体の異常部位の解析や PCR (polymerase chain reaction) 法による遺伝子増幅技術によって微量の検体から得られる情報量は飛躍的に増加し診断の精度と信頼性を高めることになった。遺伝子診断の応用により出生前の胎児細胞を採取して行う検査の診断精度は上がったが、検体採取による合併症のリスクは残されており、胎児診断における次の課題として侵襲の少ない診断法が注目されるようになってきている。非侵襲的出生前診断のための検体として用いられているのは母体血液中に微量に存在する胎児由来の細胞や細胞外 DNA である。実際にこれらのサンプルを用いた非侵襲的出生前診断が幾つか報告されている。胎児由来の DNA を用いた診断では単一遺伝子病をはじめ胎児の性別診断や Rh 血液型判定において応用例が報告されており、胎児由来の細胞からは鎌型赤血球症、嚢胞性線維症、βサラセミアなどの変異遺伝子の診断、血友病 A などの連鎖解析などの応用例が報告されている。しかし、母体血液中の胎児由来細胞外 DNA の場合は母体の DNA と混在するため母体遺伝子に認められない変異のみに限定され、母体血液中の胎児由来細胞の場合は半減期が長く前回妊娠の影響を受けやすく、母体の細胞からの分離濃縮が可能ではあるが効率に改善の余地があるなど非侵襲的出生前診断の一般化にはいまだ解決すべき問題点が多い。母体血液中の胎児由来細胞や胎児由来 DNA を用いた出生前診断にはおのおの一長一短があり、信頼できる診断法として確立されるためには細胞単離技術をはじめ DNA レベルでの分離技術等の開発が望まれる。

キーワード 出生前遺伝子診断, 非侵襲的出生前診断, 妊婦末梢血, 有核赤血球, 細胞外 DNA

はじめに

20世紀の半ば、周産期の障害を予測し適切な対応

が行えるように胎児診断法が発達した。胎児が有する障害の程度や胎内で受けるストレスなどの情報を得る技術は超音波診断や羊水穿刺により飛躍的に進

三重中央医療センター 1) 小児科, 2) 臨床研究部, 3) 三重大学連携大学院 病態解明医学講座新生児学
別刷請求先: 田中滋己 三重中央医療センター 小児科 〒514-1101 三重県津市久居明神町2158番地の5
(平成21年3月6日受付, 平成21年7月10日受理)

Applications of Genetic Diagnosis for Perinatal Health Care

Shigeki Tanaka¹⁾³⁾, Liqing Xu²⁾³⁾, and Hatsumi Yamamoto²⁾³⁾, 1) Department of Pediatrics, Mie-Chuo Medical Center, 2) Clinical Research Institute, Mie-Chuo Medical Center, 3) Department of Neonatal Science, Institute of Molecular and Experimental Medicine, Mie University Graduate School of Medicine

Key Words: prenatal genetic diagnosis, non-invasive prenatal diagnosis, maternal peripheral blood, nucleated erythrocytes, cell-free DNA

歩した。胎児細胞を用いた酵素定量やタンパク質定量といった生化学的な分析手法や核型分析により出生前の胎児診断は確立した診断法となった。しかし得られる胎児組織の量が限られていることや母体由来細胞の混入などから診断の精度に問題のあることが指摘されていた。

こうした状況のなか、最近の遺伝子診断の発展は出生前の胎児診断の精度を飛躍的に向上させることになった。異常遺伝子が母親にみられない配列の場合には遺伝子診断の技術を応用するとごくわずかな量の胎児 DNA からでも胎児の異常を診断できるまでになっている。出生前の胎児診断の精度が上がると次の段階として母体、胎児への侵襲を少なくして診断を行う、非侵襲的出生前診断に注目が集まるようになった。

非侵襲的出生前診断法としては超音波検査やスクリーニングを目的とした alpha fetoprotein (AFP) や human chorionic gonadotropin (hCG) などの母体血清マーカー検索のほか、特異的な遺伝疾患の確定診断を目的とした非侵襲的な遺伝子診断があげられる。胎児奇形をとともう形態異常は胎児の超音波検査によってかなりの精度で診断が可能であり、とくに心奇形における胎児超音波検査の発達は目を見張るものがある。母体血を利用した非侵襲的出生前診断は分子生物学的手法を用いて初めて可能になった診断概念で一部の特殊な遺伝疾患では実用化されているものの、普及にはいまだ乗り越えられなければならない諸問題を抱えている¹⁹⁾。一方、生殖補助医療の発展にともない、体外受精の初期胚の一部を取り出し遺伝子診断を行う着床前遺伝子診断：pre-implantation genetic diagnosis (PGD) の概念がつくられて遺伝性疾患や染色体異常の診断から男女産み分けの適応まで倫理、社会面での議論もなされている。本稿では最近、発展の著しい遺伝子診断の周産期医療における応用の現状について概説する。

胎児細胞の採取による侵襲的出生前診断

1. 胎児細胞の採取方法

1) 羊水穿刺 (amniocentesis) 実施時期は妊娠15-18週で胎児細胞採取法のなかで最も多く行われている。超音波断層法で胎児、胎盤の位置を確認し腹壁から穿刺針を挿入し羊水腔中の羊水を吸引する。羊水中の胎児細胞を回収し分析するが、他細胞の混入を防ぎ比較的安全に採取できることか

ら多用されている。判定に3-4週を要し、診断完了時が妊娠中期になる³⁴⁾。

2) 絨毛採取：chorionic villi sampling (CVS) 実施時期は妊娠9-11週で超音波断層法での観察下に子宮内に器具を挿入して胎児の絨毛を吸引し採取する方法。子宮頸部から吸引用カテーテルを挿入する場合と腹部エコー下に腹部から穿刺針を刺入する場合、経膈超音波下に穿刺針を刺入する場合などがある。判定には羊水穿刺と同様に3-4週を要すが、実施時期が早いため羊水穿刺に比べ早期の診断が可能で得られる細胞数も多い。しかし、出血など合併症の発症率が高く母体細胞の混入や絨毛組織に高頻度でみられるモザイクのため誤診を招く可能性がある。

3) 胎児血穿刺 (cord centesis) 超音波下に臍帯から胎児血を採取する。臍帯の胎盤附着部近傍を穿刺するため胎児へのリスクが高く最近あまり行われなくなっている。

2. 胎児由来細胞の分析方法

1) 染色体分析 現在、頻用されている染色体検査にはG-分染法 (G-banding) に代表される分染法やDNAプローブを用いるFISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法がある。分染法は細胞培養により染色体が観察できる分裂中期細胞を得た後、染色体のバンドを染色して解析するものでG-分染法はギムザ染色で分染され最も一般的に用いられる方法である。FISH法は分裂期細胞だけでなく間期核細胞でも解析が可能で染色体DNAを一本鎖に変性させた後、一本鎖DNAプローブでハイブリダイゼーションを行ってシグナルを検出する方法である。分裂期細胞が得られない場合やG-分染法で解析が困難な類似したバンドの転座、微細な異常の検出に有用である。

2) PCR (polymerase chain reaction) 法 遺伝子疾患の責任遺伝子の検出には核酸の相補性を利用したハイブリダイゼーション法と目的の塩基配列を増幅して解析を行うPCR法がある。PCR法は鋳型DNAにプライマーとヌクレオチド、至適バッファーに耐熱性DNAポリメラーゼを加えてプライマーのアニーリング、ポリメラーゼによるDNA合成、熱変性の3つのステップを数十回繰

表1 遺伝子異常と出生前遺伝子診断法

遺伝子異常	代表的疾患	出生前遺伝子診断法
欠失	Prader-Willi syndrome, Williams-beuren syndrome Duchenne型筋ジストロフィーなど	サザンブロット PCR MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)
微小変異	Tay-Sachs病, Gaucher病, Duchenne型筋ジストロフィーなど	塩基配列決定
重複	Charcot-Marie-Tooth病, Duchenne型筋ジストロフィー Pelizaeus-Merzbacher病など	サザンブロット MLPA
トリプレット リピート (3塩基リピート)	脆弱X症候群 (fragile X syndrome), Huntington病, 遺伝性脊髄小脳変性症, 筋緊張性ジストロフィーなど	サザンブロット PCR塩基配列決定 PCR-Gene scan
ミトコンドリア 遺伝子変異	Leigh 症候群 MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) など	制限酵素切断長多型 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

り返すことによりプライマー間の目的の配列を増幅する方法である。異常部位にプローブを作成し目的の配列を増幅できるかどうかの判定を行うほかに不十分な量のDNAを増幅して他の遺伝子解析に用いる方法がありさまざまな遺伝子解析における検体DNA増幅手段として多用されている。極微量のDNA検体からPCR法にて増幅されたDNAをこれまでのサザンブロットの原理と組み合わせ解析するPCR-RFLP(制限酵素断片長多形: restriction fragment length polymorphism)法や、一本鎖DNAの高次構造の変化による電気泳動パターンの違いを利用して解析するPCR-SSCP(一本鎖構造多形: single strand conformation polymorphism)法などがスクリーニング目的で用いられる。この他にもイギリスで行われているQF(quantitative fluorescence)-PCR法があるが、STR(short tandem repeat)DNAを個々の染色体マーカーとして分析を行う方法で迅速で再現性が高く染色体の異数体スクリーニングに応用されている⁵⁾。いずれの方法でも遺伝子異常の確定診断には目的の塩基配列を決定する必要があるが、これにもPCRによる遺伝子増幅を応用したT4クローニングなどが用いられる。表1に遺伝子異常をともなう代表的疾患と出生前の遺伝子診断法を示す。

母体血液中の胎児由来細胞およびDNAによる非侵襲的出生前診断

1. 母体血漿中の胎児DNAを用いた出生前遺伝子診断

血液中のDNAの存在については1948年Mandelらにより健康人やある種の疾患患者の血漿中に核酸が存在することがはじめて報告された⁶⁾。その後、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、がんなどの患者血清で高濃度のDNAが検出されることが報告されている⁷⁾⁻⁹⁾。新しい診断方法の材料として血清、血漿中のDNAの存在が注目されるようになり、1997年にはLo等が妊娠母体の血清及び血漿中に胎児由来DNAの存在を証明した¹⁰⁾。翌年にはリアルタイムPCR法を用いて母体血液中の胎児DNA量を測定し、母体血液中の総DNA量の3.4-6.2%を占めると報告している¹¹⁾。妊娠初期には母体血漿1ml中に約25コピーの胎児DNAが存在すると考えられ、この値は一般的な母体血液中の胎児細胞の出現頻度に比べ多い¹²⁾。さらに、胎児由来DNAの母体血液中での半減期は16.3分と短く前回妊娠の影響を受けないため出生前診断の材料として適している。表2に母体血液中の胎児細胞と胎児DNAを用いた出生前診断の特徴について示す。

表2 母体血液中の胎児細胞と胎児 DNA を用いた非侵襲性出生前診断の特徴

	胎児細胞	胎児 DNA
存在様式	母体血液中の栄養膜細胞, 白血球, 有核赤血球として存在し, 分娩後も数年-数十年におよび母体血中に存在する	母体血液中の細胞外 DNA 半減期は十数分
検出頻度	1-2個/ml	25-40 copies/ml
抽出方法	FACS, MACS, Lectin, 選択的培養など	血漿または血清から核酸抽出
適応	遺伝子異常の種類によらないが染色体異数性の診断やFISHに適している	胎児に特有の遺伝子, 配列, 多型に限られる
精度	栄養膜細胞や白血球は出産後も母体血中に永く残り, 以前の妊娠の影響を受ける半減期の短い有核赤血球を検体とする	以前の妊娠の影響を受けず精度は高い
再現性	複数の細胞の解析が困難で再現性は限られる	検体の保存性に優れ迅速で再現性が高い

1) 母体血液中の胎児 DNA の由来

母体血液中の胎児 DNA の由来については結論が出ていないが, (1)母体血液中に胎児細胞が破壊されて生じる, (2)胎児 DNA が胎盤を介して母体血液に移行する, (3)絨毛間腔に露出する合胞体栄養膜細胞が破壊されて母体血液に放出される, などの説があり結論は出ていない。免疫が抑制されている母体では細胞死が胎児由来細胞排除の主なメカニズムであると考えられるが, 母体血中有核赤血球の細胞死と胎児 DNA 量の間には相関は認められず, 母体血液での胎児細胞が DNA の起源とは考えがたい。胎盤を介した DNA の拡散を検討した結果, 胎児血液と母体血液の間では拡散に差があり一部はこの機構による可能性があると考えられる。胎盤絨毛の合胞体栄養膜細胞の細胞死を示す組織所見や母体血液中の胎児 DNA 量と HCG 量の相関から胎児 DNA の由来は胎盤絨毛の合胞体栄養膜細胞である可能性が高いと考えられている。

2) 胎児 DNA の塩基配列に基づく出生前診断

これまでの報告では胎児の性別診断, Rh 血型判定, 単一遺伝子病診断などで応用されている。

胎児の性別診断には SRY, DYS14, DAZ など Y 染色体特異的配列をマーカーに用いて男児の証明をする方法と父親由来の X 染色体の STR-DNA を利用して女児の証明を行う方法があるが, Y 染色体特異的配列を用いた男児の証明法が一般的である。Sekizawa 等は妊娠 7 週から 16 週の 302 例の母体血液

についてリアルタイム PCR を用いて DYS14 配列の定量を行った¹³⁾。その結果 298 例において性別診断が可能で, その感度は 97.2%, 特異度は 100% と考えられたが偽陰性の 4 例すべてにおいて再検で DYS14 配列が検出されたとしており, 妊娠 7 週以降の母体血を用いた場合, ほぼ確実に診断できたと報告している。先天性副腎過形成などの外性器異常, Duchenne 型筋ジストロフィーや血友病などの伴性劣性遺伝病の診断のための侵襲性検査を減らすことが可能である。

Rh 血液型判定については母体血を用いて非侵襲的に, ほぼ正確に診断されると報告されており, すでにイギリス, フランス, オランダではルーチン検査の一部として施行されているが, RhD locus にはバリエントがあり, これにともなう偽陽性, 偽陰性に注意する必要がある。この問題を解決するため欧州を中心にバリエントを有する人種差を考慮した新しい診断方法が検討されている。

単一遺伝子病では 2000 年に Sekizawa らにより軟骨無形成症 (achondroplasia) の診断が母体血の胎児由来 DNA を用いてはじめて行われた¹⁴⁾。その後, 嚢胞性線維症, β サラセミア, 先天性副腎過形成, 筋緊張性ジストロフィーなどの疾患やリスク妊娠での報告が続出している。リアルタイム PCR を用いた方法以外にも質量分析法やエビジェネティックな分析法を応用した一塩基多型の解析が試みられている。いずれにせよ母体血を用いた単一遺伝子病の出生前診断は母体遺伝子にはない胎児に特有の変異の

みに限定されているのが現状である。

3) 胎児 DNA 量の濃度変化をともなう病態

いくつかの病態において母体血液中の胎児由来 DNA 量の変化が報告されている。

(1) 子癇前症

1999年, Loらは子癇前症の患者血漿の胎児 DNA 量が上昇していることを報告し子癇前症の診断に有用であると結論付けている¹⁵⁾。その後も子癇前症の母体血漿や血清中の母体, 胎児由来の DNA 量は増加することが追認されている。子癇の病因は明確ではないが, 子宮内の胎盤を栄養する血管造成との関連が深く絨毛外栄養膜細胞による血管造成が不良になると絨毛組織の障害を引き起こして細胞死を誘導し, 母体血液中の DNA 量が増加すると考えられる。このように母体血液中の DNA 量は胎盤の障害の程度を反映すると考えられ, 子癇前症の病態と母体血液中の DNA 量との間には相関関係が成り立つ可能性がある。Sekizawaらの報告では子癇前症の患者における蛋白尿, 高血圧と血液中の胎児由来 DNA との間には相関関係が認められ, とくに蛋白尿との相関が強かったと報告している¹⁶⁾。さらに母体血液中の胎児由来 DNA 量が正常妊婦の2.39倍を超えると子癇に移行しやすいと結論付けている。

(2) 妊娠悪阻

妊娠悪阻と母体血 DNA 量に関しては Sekizawa らの報告によると症例数が十分でないものの症状の重症度と母体血液中の胎児由来 DNA 量の間には相関がみられるとしている。妊娠悪阻の病因についても不明な部分が多いが母体の NK 細胞や T 細胞の活性化がみられることから母体免疫の異常な活性化の一因となっていると考えられている。

(3) 癒着胎盤

母体の免疫学的攻撃により胎盤から子宮の脱落膜筋層に侵入する絨毛外栄養膜細胞が傷害され血液中の胎児由来 DNA 量が増加する。Sekizawa らは正常妊娠, 前置胎盤, 癒着胎盤症例で妊娠 9 カ月前後の時期に採血し母体血漿中の胎児 DNA 量を比較したところ, 前置胎盤, 癒着胎盤症例では胎児 DNA 量が正常妊娠例に比して, 高値となっていることを報告している¹⁷⁾。さらに出産後も11週間, 間欠的に不正出血がみられたが胎児 DNA が検出されなくなったと同時に症状の改善がみられたことから胎児 DNA のモニターは症状のフォローにも適していると述べている。

(4) 早産

Leung らは早産の母体血液中の胎児 DNA 量が正期産に比べ有意に高値を示したと報告し, その後30週未満の早産例で確認されている¹⁸⁾。

(5) 胎児染色体の異数性

Lo らは21トリソミーの胎児を妊娠した母体の血液中の胎児 DNA 量が増加していることを報告したが¹⁹⁾, その後の追試では一定した結果が得られていない。染色体異数体異常で胎児 DNA 量が増加しているとすれば出生前の胎児診断上有利な条件となり得る。

2. 母体血液中の胎児由来細胞を用いた出生前遺伝子診断

非侵襲的出生前診断の他の方法は母体血液中の胎児由来細胞を用いる方法である。1893年に Schmorl が死亡した妊婦の肺組織内に合胞体栄養細胞由来と考えられる細胞を発見し最初に報告した²⁰⁾。

その後, 母体血中の胎児由来細胞の存在は明確に証明されていなかったが1969年に Walknowska らが男児妊娠妊婦血中のリンパ球の培養染色体標本から Y 染色体を検出するに至り²¹⁾, 母体血中の胎児細胞の出生前診断への応用が注目されるようになった。絨毛採取や羊水検査に比べ侵襲性が低いが母体血液中に占める胎児由来細胞の比率はきわめて低く, 胎児細胞の濃縮, 回収はセルソーターによる技術に大きく依存する。

単一細胞から遺伝子解析を行う技術は向上し鎌型赤血球症, 嚢胞性線維症, β サラセミアなどの変異遺伝子の診断, 血友病 A などの連鎖解析などが行われる。

1) 母体血液中の胎児由来細胞

母体血液中の DNA を用いた胎児の遺伝子診断が母に認められない遺伝子変異についてのみ有効な手段であるが母親由来の遺伝子病の診断は不可能である。母親由来の遺伝子病の出生前診断を行うためには母体血液中の胎児由来細胞を用いる必要があるが, 母体血液中の胎児細胞の割合は極端に低く診断精度はいかに効率よく細胞を濃縮, 分離するかにかかっている。母体血液中に確認される胎児由来の細胞としては栄養膜細胞, 白血球, 有核赤血球が上げられるが, それぞれ母体血液中での半減期, マーカーとなる抗原分子の有無などに違いがみられる。

(1) 栄養膜細胞

1893年, Schmorl によって最初に報告されたのは子癩前症で死亡した妊婦肺組織の栄養膜細胞であった。しかし, その頻度は低く濃縮するための特別な抗原もないため診断への応用は困難をきわめる。さらに胎盤におけるモザイクの存在は診断への応用に制限生じることを示す。しかし, このような困難な条件下でも Y 染色体の特異配列を PCR や FISH 法を用いて胎児細胞の同定に利用し出生前診断への応用に成功するグループが散見されるようになった。Hawes らは母体血液中の栄養膜細胞から β サラセミアの出生前診断に成功している²²⁾。

(2) 白血球

1 世紀も前に Schmorl が母体血液中の栄養膜細胞の存在を報告したのにもかかわらず1969年に Walknoska らが男児を妊娠した妊婦血液細胞の培養から46XYの核形を示す細胞が確認されるまで母体血液中の胎児細胞を用いた出生前診断は疑問視されていた。その後, 次々に母体血液中の胎児由来細胞の存在が証明されたが含まれる細胞数のごくわずかで濃縮にはナイロンウールや選択的培養が応用されている。セルソーター (FACS) の登場は飛躍的に濃縮技術を高めたが父親由来の HLA に対する抗体を用いて濃縮するというものであった。白血球は in-vitro でも増殖が可能で純度の高い濃縮操作ができれば増殖後出生前診断に応用できるというメリットがあったが母体血液中の胎児由来細胞は分娩後も 5-27年間は存在することが証明され分娩歴のある場合には診断の精度に問題があることが指摘されている。

(3) 胎児赤血球 / 有核赤血球

1964年 Clayton らは初めて母体の循環血液中に胎児由来の有核赤血球が存在することを報告した²³⁾。胎児の有核赤血球は妊娠初期から胎盤を経由して母体循環血中に入るが栄養膜細胞や白血球など他の胎児由来細胞に比べ, その数は多い。

また有核赤血球の寿命はリンパ球などに比べ短く, 増殖能も低いため母体循環血液中に存在する期間は短いと考えられ, 他の胎児由来細胞に比し非侵襲性の出生前診断に適している。1990年に Bianchi らはトランスフェリンレセプター (CD71) に対する抗体と FACS を用いて胎児 DNA を有する有核赤血球の濃縮に成功した²⁴⁾。その後も MACS 磁気細胞分離法などさまざまな有核赤血球に対する抗体やテクニックを用いて胎児由来の有核赤血球の濃縮が確

認されている。胎児由来細胞の母体血液中の割合はきわめて低く 10^5 - 10^9 に1個程度と考えられている。1993年 Hamada らは FISH 法を用いて濃縮された有核赤血球の塗沫標本で144,000個の細胞から1個の Y 染色体を有する細胞を確認している²⁵⁾。妊娠初期の胎児細胞の存在比は 10^5 に1個だが満期には 10^4 に1個と10倍程度の増加がみられる。また胎児ヘモグロビンを有する有核赤血球の20%が母親由来であると考えられ, 母体血中の有核赤血球の約半分は胎児由来と報告されている。したがって臨床診断を下すに当たっては被検細胞が胎児由来であることを証明することが重要である。有核赤血球を培養する試みも報告されているが追試が確認されていない。

2) 胎児由来細胞の分離・濃縮

(1) 密度勾配遠心分離法

有核赤血球は白血球より比重が大きく有核赤血球を分離するには通常の単核球を分離する比重の1.077g/ml よりも高めの1.119g/ml を用いた密度勾配遠心分離のほうが効率よいことが明らかである。有核赤血球を濃縮する方法はほかにアビディン-ビオチンカラムや磁気コロイドなどのほか, 検体中の標的細胞の培養増殖などが試みられている。濃縮に用いられる抗体は胎児由来の有核赤血球に特異的な抗原が存在しないことから CD71や抗ガンマグロブリン抗体が用いられることが多い。

(2) レクチン

ガラクトース特異的レクチンを用いて有核赤血球を濃縮する。赤血球の前駆細胞が細胞表面にガラクトース分子を発現している。

レクチンカラムを用いて分離した有核赤血球の半数以上は胎児由来の細胞であったと報告されており現時点では有核赤血球を濃縮する上で最も効率のよい方法であると考えられる。

濃縮した細胞の中の胎児由来細胞の頻度は低く自動画像分析装置の応用が期待されるが完全な自動化にはいまだ問題が多くスクリーニングとしての使用された後は顕微鏡かで人が判定せざるを得ない。

(3) DNA 解析

有核赤血球を用いた出生前診断における DNA 解析は FISH 法が主流となる。胎児由来の有核赤血球の43%はアポトーシスをおこしており, 母体血液中の比較的高濃度の酸素にさらされたためと考えられる。アポトーシスをおこした細胞の核は凝縮してお

り FISH のシグナルが検出しにくくなっている。

PCR はごくわずかな DNA からでも目的の塩基配列を増幅でき、検出感度に優れるが、高感度のために検体の純度が問題となる。

ま と め

生まれてくる新しい命が重篤な遺伝病をともなっているのかの診断は遺伝病の病態が解明されてからは羊水中の胎児由来細胞や絨毛膜細胞の組織から生化学的か分析、染色体分析などから診断されてきた。しかし、これらは診断精度、母体、胎児に対する侵襲などの点から問題が多かった。1980年頃よりの遺伝子解析における技術革新は診断精度にかなりの改善をもたらしている。生化学的分析や染色体の核型分析に依存していた解析法も PCR、サザンブロット、塩基配列決定などの分子生物学的手法の応用によって診断精度が格段に上昇している。今後の目標は母体、胎児への非侵襲的で精度の高い解析である。現在でも、ある種の父親由来の遺伝子異常では母体血液を解析する非侵襲的な遺伝子診断により出生前診断がなされており、報告例も多い。問題は胎児由来の検体の選択である。非侵襲的な出生前診断における検体として一般に用いられるのは母体血液であるが血液中の胎児由来細胞を用いるか、血清、血漿中の胎児 DNA を用いるかがその後の解析特性に大きな影響を与える。比較的十分量あり半減期も短い血液中の胎児 DNA は再現性、迅速性に優れるが、母体 DNA との混合が問題となる。胎児由来細胞は母体血液中の存在頻度がきわめて低く、分離に成功すれば信頼性が高いが、半減期が長く胎児由来の証明が診断時に必要となる。

[文献]

- 1) Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R et al. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *J Obstet Gynaecol Res* 2007 ; 33 : 747-64.
- 2) 三春範夫, 佐村修, 大濱紘三. 母体血による胎児 DNA 診断. *日本産科婦人科学会雑誌* 2002 ; 54 : 1220-30.
- 3) 末岡浩, 吉村泰典. 出生前診断の最近の進歩. *産婦治療* 2004 ; 89 : 631-6.
- 4) 末岡浩. 出生前遺伝子診断の進歩. *小児科* 2008 ; 49 : 309-16.
- 5) Mann K, Fox SP, Abbs SJ et al. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet* 2001 ; 358 : 1057-61.
- 6) Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin ches l'homme. *CR Acad Sci Paris* 1948 ; 142 : 241-3.
- 7) Tan EM, Schur PH, Carr RI et al. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966 ; 45 : 1732-40.
- 8) Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B et al. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol* 1977 ; 4 : 139-43
- 9) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977 ; 37 : 646-50.
- 10) Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997 ; 350 : 485-7.
- 11) Lo YM, Tein MS, Lau TK et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum : implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998 ; 62 : 768-75.
- 12) 高林晴夫, 伊川和美, 彭文. 胎児由来細胞による遺伝子診断. *産と婦* 2006 ; 7 : 857-64.
- 13) Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M et al. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 1856-8.
- 14) Saito H, Sekizawa A, Morimoto T et al. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000 ; 356 : 1170.
- 15) Lo YM, Leung TN, Tein MS et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999 ; 45 : 184-8.
- 16) Sekizawa A, Farina A, Sugito Y et al. Proteinuria and hypertension are independent factors affecting fetal DNA values : a retrospective analysis of affected and unaffected patients. *Clin Chem* 2004 ; 50 : 221-4.
- 17) Sekizawa A, Jimbo M, Saito H et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with

- invasive placenta. *Clin Chem* 2002 ; 48 : 353-4 .
- 18) Leung TN, Zhang J, Lau TK et al. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998 ; 352 : 1904-5 .
- 19) Lo YM, Lau TK, Zhang J et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999 ; 45 : 1747-51.
- 20) Schmorl G. Pathologisch-anatomische untersuchungen uber puerperal-eklampsie. Leipzig: Vogel 1893.
- 21) Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969 ; 1 (7606) : 1119-22.
- 22) Hawes CS, Suskin HA, Kalionis B et al. Detection of paternally inherited mutations for beta-thalassemia in trophoblast isolated from peripheral maternal blood. *Ann N Y Acad Sci* 1994 ; 731 : 181-5 .
- 23) Clayton EM Jr, Feldhaus WD, Whitacre FE. Fetal erythrocytes in the maternal circulation of pregnant women. *Obstet Gynecol* 1964 ; 23 : 915-9 .
- 24) Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 ; 87 : 3279-83.
- 25) Hamada H, Arinami T, Kubo T et al. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 1993 ; 91 : 427-32.