

クリニカルカンファレンス3(周産期)

周産期出生前診断

4) 母体血中胎児 DNA 検査の現状と課題

座長：愛育病院
岡井 崇昭和大学医学部産婦人科
関沢 明彦横浜市立大学
平原 史樹

はじめに

1997年、母体血漿中に cell-free DNA(cfDNA)が循環しており、その中に胎児由来成分が含まれていることが報告された。以降、PCR法により母体がもたない遺伝子を母体血中で増幅し、胎児の遺伝子診断が行われていたが、2008年、次世代シーケンサーを用いた胎児染色体異常検査が報告され、2010年10月に米国で臨床応用された。この無侵襲的出生前遺伝学的検査(Non-Invasive Prenatal Genetic Testing : NIPT)の現状について報告する。

1. 母体血漿中胎児 cfDNA の由来

母体血は胎盤の絨毛間腔を循環するが、そこで広い面積で絨毛と接し、母児間での酸素交換や物質交換を行っている。絨毛表面は絨毛細胞で覆われ、その細胞は新陳代謝を繰り返している。この破壊・剥脱した絨毛細胞が母体血中に流入し、胎児 cfDNA の由来となる。そのため、母体血中の胎児 cfDNA の大部分は直接的に胎児に由来せず、絨毛細胞由来である。そのため、低頻度ながら存在する胎盤性モザイクに対する注意は必要である。

母体血漿中 cfDNA 中の胎児由来成分は PCR 法などを用いて5~8%程度と推定されていた。これは PCR 法では100~200bp の DNA 断片を定量していたためである。しかし、次世代シーケンサーではさらに断片化された DNA をもシーケンスしているため、胎児由来成分は妊娠10週以降25週までの時期に10~15%に及ぶとされており、これまでに考えられていたより高濃度であった。

2. PCR 法を用いた胎児遺伝子診断

1997年、母体血漿中に胎児 cfDNA が循環していることが報告された¹⁾。女性である母体の血液中に存在しない遺伝子を母体血漿中に同定すれば、それは胎児由来ということに

Current Status of Non-Invasive Fetal DNA Diagnosis from Maternal Plasma

Akihiko SEKIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine, Tokyo

Key words : NIPT · Noninvasive · Prenatal diagnosis · Down syndrome

今回の論文に関連して、開示すべき利益相反状態はありません。

なる。Y染色体特異的な遺伝子であるSRY遺伝子などを同定すれば、それは胎児由来である。そこで、我々は302例の妊娠7～16週の妊婦血漿中からPCR法でY染色体特異的なDYS14遺伝子の検出を試みた²⁾。その結果、女児妊娠の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遺伝子が検出された。偽陰性であった4例について再度DNAを抽出して分析したところ、同遺伝子は検出可能であった。このことから、妊娠7週以降、母体血漿中には確実に胎児cfDNAが存在し、正確に胎児の性別診断が可能なが分った²⁾。この方法による性別診断は、妊娠7週から可能であるため、性の選別に用いられる可能性があるなど倫理的な問題点を有している一方、母体が致死性のX連鎖性遺伝性疾患の保因者である場合など、胎児の性別診断を行うことで侵襲的な羊水検査や絨毛検査が回避できるなど、臨床的に有用な症例は存在する。

母体血漿中cfDNAを用いた胎児診断法は、Rh陰性妊婦での胎児Rh血液型診断にも応用されている³⁾。欧米人では、1番染色体にある*RhD*遺伝子の欠失であるRh陰性は約10%に存在し、残りの半数が同遺伝子のヘテロであるため、Rh陰性妊娠で夫がRh陽性の場合、児がRh陰性になる確率は理論上、25%となる。妊娠中に胎児がRh陰性であることがわかれば、妊娠中にRhD抗原への感作の可能性はなくなり、妊娠中の検査や抗D免疫グロブリンの投与が不要になるため、臨床上有用な検査であり、既に、欧米では臨床応用されている。一方、日本ではRh陰性妊娠は0.5%程度、*RhD*遺伝子のヘテロは約10%といわれているため、Rh陰性妊娠の児の90%以上がRh陽性になり、欧米に比較し、本検査の実際的な必要性は低いと考えられるが有用であることに変わりはない。

母体血漿中cfDNAは胎児の単一遺伝子病の診断にも応用されている。我々は2000年、単一遺伝子病として初めて、母体血cfDNAを用いた胎児の軟骨無形成症の出生前遺伝子診断を行い、報告した⁴⁾。この症例では、超音波検査で胎児の四肢の発育不全があり、軟骨無形成症を疑い、他の致死性四肢短縮症との鑑別のため、出生前診断を試みた。この軟骨無形成症の大部分は、*Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3)*遺伝子の特定の一塩基の突然変異(nt1138)により発症する。この症例の場合、母に低身長はなく、遺伝子変異は持っていないと考えられる。我々は、母体血漿中から抽出したDNAを用い、その遺伝子領域をPCR法で増幅し、変異遺伝子が制限酵素で切断されるような系を作成した。その上で、母体血漿中に当該遺伝子変異(G1138A)を同定することで、胎児が軟骨無形成症であることの遺伝子診断に成功した⁴⁾。その後、サラセミアや嚢胞性線維症などの遺伝子診断の実例が多数報告されている。

3. 胎児染色体異常の無侵襲的検査法の開発

無侵襲的な胎児出生前染色体検査法として、現在、わが国で臨床応用されているのは次世代シーケンサーを用いたMassively parallel sequencing(MPS)法による検査のみであるが、その他にも、①母体血中胎児cfDNAの由来が胎盤であるという特徴を利用して胎盤特異的DNAメチル化を利用する方法、②21番染色体上のSNPsを解析する方法などがある。MPS法について概略を示す。

a) MPS法の概要

2008年、次世代シーケンサーを用いて、母体血漿中のcfDNA断片を網羅的にシーケンシングし、個々の断片の由来をヒトゲノム情報と照合して確認し、21番染色体由来の断片の量的な変化を評価することで染色体の数的異常を診断するMassively parallel sequencing(MPS)法が開発された⁵⁾。母体血漿中cfDNA中の21番染色体由来のDNA断片の割合は、胎児が正常核型の場合には1.3%である。胎児がダウン症候群の場合にcfDNA

の胎児由来成分が1.5倍に増加するため、cfDNA に占める21番染色体由来の DNA の割合は1.42%に増加するというわずかな変化を診断に繋げている。実際に、MPS 法でシーケンシングする DNA 断片数は1,000万断片程度である。解析断片数を増やすほど、全体の DNA 断片に占める21番染色体由来断片の濃度の正確性は高まるが、コストと時間はかかる。その上で、その DNA 断片濃度の違いを数値化するために Z-score が用いられる。Z-score とは個々のデータが平均値から標準偏差何個分離しているかを評価して数値化する方法で、Z-score が3以上の場合に、胎児をトリソミーと診断している。

b) 検査の精度

本法の臨床応用を前に、米国をはじめとする世界の27施設で採血するコホート研究(WI-HRI Large Validation Study)が行われた。対象は、①高年妊婦、②染色体異常児を出産した既往歴や家族歴がある、③超音波検査で胎児の染色体異常のリスクが高いと判断された、④血清マーカー検査で胎児の染色体異常のリスクが高いと判断された、の4条件のいずれかを満たし、羊水染色体検査を受ける妊婦である。医療機関で20mL の採血を行い、血漿を分離した上で凍結して米国の2か所の検査センターへ送付し、4,664検体を採取した⁶⁾。この中に羊水検査で286例に染色体異常を認め、1,702例の正常コントロールとともに計1,988例について分析が行われ、診断精度が検討された。その結果、1,988検体中で検査不成功は17例0.9%であり、残りの1,977例についての cfDNA 解析が行われた。ダウン症は212例中210例で検出でき(検出率・感度は99.1%)、偽陽性は1,688例中の1例(偽陽性率0.1%以下)であった。また、18-トリソミー、13-トリソミーの感度も100%(59/59)、91.7%(11/12)であった。しかし、高精度といっても、偽陰性、偽陽性が低率ながらある。さらに、陽性的中率は、例えばダウン症の場合、母体が42歳で罹患率が1/50の集団では、97.1%になるが、40歳で1/100の罹患率では94.3%、35歳(1/300)では84.2%と低下する。そのため、本検査が陽性の場合には羊水検査による診断確定が必要になる。一方、陰性的中率は99.9%と高く、この検査が陰性であった場合の信頼性は高いと考えられ、その意味で本検査は優れたスクリーニング検査である。

この臨床研究を受けて、2011年10月、米国で母体血を用いたダウン症の検査が、また、2012年3月に18トリソミーと13トリソミーの検査が Sequenom 社によって開始された。臨床研究が染色体異常のハイリスク妊婦を対象にしていたため、現在も同様な条件のハイリスク妊婦が検査対象となっている。この検査の特徴は、胎児に無侵襲であること、妊娠10週から行えること、ダウン症候群の検出率が99.1%であり、偽陽性率も0.1%と精度が高いことである。検査開始後2013年4月までに10万件以上の検査が行われた。実際に Sequenom 社で2012年に行われた約6万件の検査の結果で、2.9%を陽性と判定している。日本では年間16,000件の羊水検査が行われていると推定されるが、羊水検査を行う症例を対象に本検査を行ったと仮定すると、検査の97%は減少することになり、羊水検査の結果起こるかもしれない流産を一定数減少させると考えられる。

この検査では、母体血漿中の胎児 cfDNA 濃度が高いほど、検査の診断精度は上昇する。ハイリスク妊娠では胎盤形成の問題から胎児 cfDNA 濃度が高いと考えられたが、母体年齢、胎児の性別、人種、居住地、ハイリスク妊娠が否か、体外受精が否かなどは、母体血漿中胎児 cfDNA 濃度に影響しないことが確認されている。さらに、胎児 cfDNA 濃度は妊娠週数とともに増加すること、低体重の女性で高値を示すこと、児に染色体異常がある場合に高値を示すことが確認されている。このことから、ハイリスク症例を対象に行っている検査であるが、ローリスクの症例を対象としても、検出率(感度)や特異度などの検査精度への影響は少ないと考えられている。現在、米国ではローリスクを対象にした臨床研

究が進行しており、近いうちにそのデータが公表されるであろう。

まとめ

NIPT においては検査前後での遺伝カウンセリングがなにより重要である。遺伝カウンセリングで大切なことは、公平で正しくかつ十分な情報の提供である。妊婦が正しく理解し、十分に考えたうえで、検査を受けるかどうかについて自律的に判断することが重要である。

この母体血胎児染色体検査が臨床研究として限定された施設で開始されたが、今後、この手法は胎児染色体の数的異常の診断から染色体の微小欠失や重複などの検出、単一遺伝子病の検出まで大きく広がることが予想される。このような広汎な出生前検査が臨床の場で利用できるようになる前に、遺伝カウンセリング体制を整備する必要があると考える。本検査の開始を契機に、日本全国で周産期の遺伝カウンセリング体制の整備が進むことを期待している。

《参考文献》

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997 ; 350 : 485—487
2. Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H, Okai T. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry* 2001 ; 47 : 1856—1858
3. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women : prospective feasibility study. *Bmj* 2008 ; 336 : 816—818
4. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000 ; 356 : 1170
5. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008 ; 105 : 20458—20463
6. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome : an international collaborative study. *Genetics in medicine. Official Journal of the American College of Medical Genetics* 2012 ; 14 : 296—305