

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591602

研究課題名(和文)母体血中有核赤血球の効率的回収法とその無侵襲胎児診断への応用に関する研究

研究課題名(英文)Development of noninvasive prenatal diagnosis using nucleated erythrocyte in maternal blood

研究代表者

松岡 隆(Matsuoka, Ryu)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20349111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：母体血からの効率的な有核赤血球回収法の確立を目的に、Percollの細胞障害性を、また、レクチン法とCD45を用いた磁気ビーズ法の回収効率が同等であることを確認した。また、自動有核赤血球識別装置は順調に稼働しており、予定通りのパフォーマンスを実現していることを確認した。遺伝子解析は、FISH法を用いているが、血球の由来同定も含めた、SNP解析の基礎検討を行った。自動有核赤血球識別装置を用いることで、有核赤血球の回収数は飛躍的に向上し、14mLの血液から100細胞以上回収される状況にある。

次に、無侵襲的出生前検査の臨床応用への意識調査で、検査前後の遺伝カウンセリング体制の必要性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Considerable effort has been made to develop non-invasive prenatal diagnostic procedures using nucleated erythrocytes (NRBCs) within the maternal circulation. Since a limited number of NRBCs circulate within maternal blood, procedures to enrich the cells and enable single cell analysis with high sensitivity are required. We have developed the optimized separation methods of NRBCs, including a lectin-based method and autoimage analyzing. Furthermore, we optimized every step of separation procedures to maximize the recovery.

Next, we assessed the attitudes toward non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) in Japan. As results, we revealed that pregnant women place importance on the safety and non-invasiveness of the NIPD tests, whereas medical professionals consider the diagnostic accuracy and reliability of the test to be the most important. Health professionals pointed out that the tests might be frequently performed without the pregnant women having adequate knowledge or counseling.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：胎児新生児

キーワード：有核赤血球 出生前診断 無侵襲

1. 研究開始当初の背景

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。母体血中に胎児細胞が存在することの最初の報告は19世紀に遡るが、その胎児細胞数は極端に少ないため、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ったことで母体血中胎児細胞は、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から、現在、出生前診断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の有核赤血球濃縮に成功した。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、1995年から5年間、母体血中有核赤血球を用いた出生前診断法の臨床応用を目指し、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て胎児染色体異常を診断する検査の精度を明らかにすることが目的で、染色体異常のリスクの高い妊娠10-24週の2744例の妊婦を対象に、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X、Y染色体、及び21番、18番染色体の数的異常の有無について検討した。

しかし、結果的には、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%に及ぶという散々たる結果であった。この結果は、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が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、我々は、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染色体特異的遺伝子をPCR法で増幅することで、母体血を用いた胎児診断の可能性を示した(Prenat Diagn 1995)。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欠損症などの診断を行い報告している(Neurology 1996, Hum Genet 1998)。そのような中、2006年、日本国内のこれまでの研究成果を統合し、母体血中有核赤血球を用いた出生前診断を日本発で確立するため、「母体血による胎児DNA診断」研究グループを作り、有核赤血球分離法の最適化・細胞レベルの遺伝子診断法の確立に取り組み、現状で最適な有核赤血球分離・回収・診断プロトコールが完成している。このプロトコールを用いた出生前診断のClinical Trialとして97例の羊水染色体検査を行う妊婦を対象に胎児の性別と21番及び18番染色体の数的な異常の診断を行った。その結果、平均18週の妊婦の血液平均12mLから中央値12個(range:1-98)の有核赤血球が回収され、FISH解析された。この97例の中で男

児妊娠例は 39 例あり、合計 356 細胞中 158 細胞が XY シグナルを有し、男児細胞であり胎児由来と確認された。男児の診断精度は疑陽性が 1 例あり、偽陰性が 5 例あった。性別診断の正診率は 93.8%であったが、回収細胞数が 3 細胞以下であった 13 症例中の 4 例は偽陽性、偽陰性であり、回収細胞数を増やす必要性が再認識された。さらに、この 97 例中に 9 例の 18-トリソミー、6 例のダウン症候群があったが、これらの染色体異常の症例は 100%正確に診断できた。その理由の一つが、胎児がダウン症候群の場合に平均 31.3 細胞の有核赤血球の同定ができたことである。逆に言うと、正常染色体症例の中で、回収細胞数が極端に少ない症例があることを意味している。

そのような状況から母体血からの有核赤血球同定の自動化に向けた研究に取り組んでおり、その研究の成果として、今まで目視で行われていた血液塗抹標本からの有核赤血球の同定の自動化システムが完成した。このシステムは、顕微鏡のスライド全体の像をデジタルカメラで撮影し、その画像の中から形態的に有核赤血球を識別する装置(有核赤血球自動識別装置)で NIKON(株)と FUJI XEROX(株)、スギノマシン(株)の協力で開発された独自の装置である。この装置の開発により、母体血中から有核赤血球の同定と有核赤血球数の信頼性の高い定量が可能になった。このことは、従来にない画期的な状況で、どのような有核赤血球分離条件が最適かを定量的に比較できるばかりか、どのような症例で有核赤血球回収数が増加し、また、減少するかが客観的に評価可能である。

この装置を用いて、より多くの有核赤血球を採取できる条件の最適化を再度行う。我々が以前行った単一の比重液で一次分離を行い、そのあと FACS を用いて有核赤血球を濃縮する系での検討では、1.083g/ml に比較し、1.090g/ml の比重液で 3 倍以上、1.119g/ml

の比重液で更に 3 倍の有核赤血球の回収ができることを示している(Fetal Diagn Ther 1999)。今回、有核赤血球数の定量化が容易になったことで、これらの初期分離条件の最適化が可能になってくる。最適な比重条件、PMP などのその他の比重液を検討し、有核赤血球回収条件の最適化をする。さらに、血液サンプル個々で各血球成分の比重にかなりの違いがあることが予想される。低球性低色素性貧血などが影響しているものとも考えられる。このような実際の患者サンプルを用いた具体的な比較を通じ、より最適な有核赤血球の分離プロトコルの最適化を行う。さらに、有核赤血球のサイズと応形能の無さを利用して、新しい有核赤血球濃縮装置についてもその可能性を評価する。その上で、再度、妊娠 6 週から 40 週まで幅広い妊娠週数の多数例での母体血を採取し、妊婦の基礎疾患、貧血、肝機能、腎機能、耐糖能異常、妊娠中の胎児発育、胎児染色体異常、胎児奇形、妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症、胎盤異常などの臨床的なデータと有核赤血球数の変化を幅広く検討し、母体血中有核赤血球数に影響する因子の抽出を行っていくことで、より確実な有核赤血球抽出法の確定を行う。この検討は、精度の高い出生前診断法の確立には不可欠のステップと考える。

羊水穿刺や絨毛採取により出生前診断を行うことは、胎児にとっても流産リスクがあり、母体にとっても精神的な負担になり、また、医師側にとっても神経を使う検査である。

また、2013 年 4 月から臨床研究として利用が開始された母体血漿中 cell-free DNA を用いた無侵襲的染色体疾患の検査は、非確定的であり、羊水検査を回避できない検査である。今回検討している母体血中胎児細胞を用いた出生前遺伝子診断検査は、従来の侵襲検査、および母体血漿中 cell-free DNA を用いた無侵襲的染色体検査に置き換わる確定的

検査との位置づけで研究されている。この検査法の研究の最大の障壁は母体血中に存在する細胞数のごく僅かであることで、いろいろな分離法を組み合わせる有核赤血球の濃縮が行われているが、濃縮法の調整時の単純な有核赤血球分離数の比較にも相当な労力が必要であり、実際の評価、最適化には限界があった。しかし、今回、世界で初めて赤血球自動識別装置が利用できるようになったことで、各種条件の比較が格段に容易となった。そのことで、有核赤血球分離プロトコルの最適化や有核赤血球数に影響を与える要因の抽出も可能となった。本検討は、無侵襲的な母体血を用いた胎児遺伝子検査法の確立には不可欠のものである。

母体血を用いた胎児遺伝子診断法の開発は、1990年代後半から世界中で盛んに取り組まれてきている。しかし、その数が僅かであるため、それを実用化もっていったグループは今のところ存在しない。今回の研究成果で、分離の最適化ができれば、それ以外の高精度な遺伝子解析法の検討などは既に確立しており、世界に先駆けた無侵襲な胎児遺伝子検査法としての実用化に大きく近づくと考える。

さらに、無侵襲的出生前検査法が臨床応用された場合の社会的なインパクトは、特に我が国では大きいと考えられる。この検査を受け入れる妊婦や医療者が、この検査についてどのような意見を持っているかを明らかにすることも、本法の実用化にとって重要である。

2. 研究の目的

1) 母体血からの効率的な有核赤血球回収法の確立

有核赤血球回収条件の最適化：実際の患者サンプルを用いた具体的な比較を通じ、より最適な有核赤血球の分離プロトコルの最適化を行う。

2) 無侵襲的出生前検査の臨床応用にむけての意識調査

我が国における無侵襲的出生前検査の臨床応用についての妊婦および医療者がどのような意識を持っているかを調査する。

3. 研究の方法

1) 母体血からの効率的な有核赤血球回収法の確立

母体血中より有核赤血球を回収する工程は、比重遠沈法、有核赤血球の濃縮、塗抹標本作成と自動分析装置での有核赤血球同定、遺伝子解析からなる。各ステップについて問題点を整理して、その最適化を行った。

2) 無侵襲的出生前検査の臨床応用にむけての意識調査

妊婦および医療者にアンケート調査を行った。アンケートで、検査についての意識、懸念、期待についての質問を行った。

4. 研究成果

1) 母体血からの効率的な有核赤血球回収法の確立

については、Percollの細胞障害性を確認し、Ficoll液の使用に切り替えた。有核赤血球の濃縮については、レクチン法による赤血球除去効率が不良で、以前の有核赤血球回収率が確保できないため、CD45を用いた磁気ビーズ法の検討を行い、レクチン法と同様の回収効率が確認された。また、自動有核赤血球識別装置は順調に稼働しており、予定通りのパフォーマンスを実現していることを確認した。遺伝子解析は、FISH法で胎児の性別および21番と18番染色体の数的異常のみを検討している。自動有核赤血球識別装置を用いることで、有核赤血球の回収数は飛躍的に向上し、14mLの血液から100細胞以上回収される状況にある。そうするとその全細胞のFISH診断を行うと非特異的なシグナ

ルが多く検出され、診断を決定しきれない状況が発生している。そのような状況の打開策として、シグナル洗浄後に別の蛍光色を用いた FISH を再度行うなどの検討を行っているが、効率面での課題もあり、血球の由来同定も含めた、SNP 解析の基礎検討を行っている。

2) 無侵襲的出生前検査の臨床応用にむけての意識調査

252 人からアンケートを回収した。その結果、妊婦は医療者に比較し、NIPT に対してより積極的な意識を持っていることが分かった。加えて、両者間には NIPT についての懸念や期待することに大きな違いを認めた。さらに、NIPT についての知識がないものほど積極的に、NIPT の臨床応用を肯定的に捉えていることがわかった。また、医療者からは、十分な知識がないままこの検査が受検されることへの懸念が示され、検査前後での遺伝カウンセリングの充実が期待されていることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Development of a fibrous DNA chip for cost-effective β -thalassemia genotyping. Suzuki W, Osaka T, Sekizawa A, Kitagawa M, Honma I. Int J Hematol. 2012 Sep;96(3):301-7.

Attitudes toward non-invasive prenatal diagnosis among pregnant women and health professionals in Japan. Yotsumoto J, Sekizawa A, Koide K, Purwosunu Y, Ichizuka K, Matsuoka R, Kawame H, Okai T. Prenat Diagn. 2012 Jul;32(7):674-9.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 22nd Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology, Taipei, Taiwan, Sep 25, 2011 Non-invasive prenatal determination of fetal gender and single-gene disorder from plasma of pregnant women. Yotsumoto J, Sekizawa A, Fukuda A, et al.

2. 第 38 回日本産婦人科医会学術講演会 H23.10.9. 浜松. 母体血中有核赤血球を用いた胎児診断法の開発. 関沢明彦、松岡隆、岡井崇、高林晴夫、北美紀子、北川道弘

3. 第 56 回日本人類遺伝学会 千葉 2011.11.10. 無侵襲的出生前遺伝学的検査・診断に関する意識調査. 四元淳子、関沢明彦、小出馨子、長船奈津美、堀尾留里子、廣瀬達子、犬塚真由子、松岡隆、市塚清健、岡井崇

第 15 回胎児遺伝子診断研究会 2012.2.4.東京

4. Prenatal diagnosis using fetal-cell: recent update (FDD-MB). Yuditiya Purwosunu, Akihiko Sekizawa, Michihiro Kitagawa, Haruo Takabayashi

5. 無侵襲的出生前診断の臨床応用に向けた問題点について. 四元淳子、関沢明彦、小出馨子、市塚清健、松岡隆、岡井崇

6. 母体血から分離・濃縮された赤芽球の機器検出. 由良洋文、桜庭喜行、森下和代、関沢明彦、秦健一郎、北川道弘

7. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012.10.25. 妊婦の遺伝学的検査の最近の動向と問題点: 母体血を用いた胎児遺伝子診断の現状. 関沢明彦

FDD-MB WWRC 2012 (Fetal DND Diagnosis from Maternal Blood Worldwide Researchers Conference 2012) KANAZAWA 2012. 11.24.

8. Recent advances in noninvasive prenatal DNA diagnosis from erythrocytes in maternal blood. Sekizawa A, Purwosunu Y, Takabayashi H, Kitagawa M

9. Attitude toward NIPT in Japan.
Yotsumoto J, Sekizawa A, Okai T
10. International Joint Symposium on single-cell analysis. KYOTO 2012.11.28.
FDD-MB System, the Present and the Future Takabayashi H, Sekizawa A
11. 第49回日本周産期・新生児医学会学術集会
母体血胎児染色体検査の現状. 関沢明彦 平成25年7月16日・横浜
12. 日本学術会議主催学術フォーラム 新型出生前診断の広がりや遺伝医療の発展への対応：非侵襲的出生前検査の現状と課題 関沢明彦
平成25年9月7日 東京
13. 第23回遺伝医学セミナー 平成25年9月8日
母体血出生前診断 関沢明彦
14. 第5回福岡胎児医療フォーラム 平成25年5月22日
母体血胎児染色体検査の現状 関沢明彦
15. 日本染色体遺伝子検査学会第31回学術集会
母体血胎児染色体検査の現状と課題 関沢明彦
平成25年11月16日 福岡
16. 第11回 全国遺伝子医療部門連絡会議
NIPTを開始して 関沢明彦 平成25年11月23日 宮城・仙台
17. 第58回日本人類遺伝学会 シンポジウム
NIPT コンソーシアムの立場 関沢明彦 平成25年11月22日 宮城・仙台
18. 信州大学医学部・大学院医学系研究科 生命倫理公開授業:シンポジウム(平成25年7月6日長野) 母体血を用いた新しい出生前診断(NIPT)をめぐって 産婦人科の立場から 関沢明彦
19. 第20回臨床細胞遺伝学セミナー 母体血胎児染色体検査の現状 関沢明彦 平成25年8月24日 東京・新宿

20. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会: クリニカルカンファレンス3(周産期) 母体血中胎児DNA検査の現状と課題 関沢明彦 平成25年5月10日 札幌
21. 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 シンポジウム2 「出生前診断新時代を迎えて」母体血胎児染色体検査とNIPT コンソーシアムの取り組み(平成25年6月22日川崎市) 関沢明彦

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1)研究代表者 松岡 隆
(Ryu Matsuoka)
昭和大学医学部(講師)
研究者番号: 20349111
- (2)研究分担者 関沢明彦
(Akihiko Sekizawa)
昭和大学医学部(教授)
研究者番号: 10245839
- (3)研究分担者 四元 淳子
(Junko Yotsumoto)
昭和大学医学部(特別研究生)
研究者番号: 30553648