

## 母体血漿中に流入する胎盤由来 mRNA の同定と その臨床的意義

三浦生子 三浦清徳 吉田 敦 山崎健太郎 増崎英明

## 臨床 経験

# 母体血漿中に流入する胎盤由来 mRNA の同定とその臨床的意義

三浦生子\* 三浦清徳\* 吉田 敦\* 山崎健太郎\* 増崎英明\*

母体血漿中に流入している cell-free placental mRNA は、母体血を通じて得られる胎児・胎盤の分子情報である。その定量化は、癒着胎盤、双胎間輸血症候群、妊娠高血圧症候群などの産科合併症のリスクを推定する分子マーカーである可能性が示唆されている。

最近の分子生物学的解析法の技術進歩はめざましく、母体血中 cell-free placental mRNA をターゲットにした網羅的解析が可能になれば、これまで困難であった胎盤機能を推定する非侵襲的な検査法が確立されると期待される。

### はじめに

母体血漿中に流入する胎盤由来の cell-free mRNA (cell-free placental mRNA ; cfp-mRNA) は、妊娠中に母体を通じて得られる胎盤の分子情報である (図 1)<sup>1)</sup>。最近、cfp-mRNA 流入量の変化と妊娠高血圧症候群などの産科合併症との関連が示唆されており、母体血漿中 cfp-mRNA 定量化の分子マーカーとしての可能性が指摘されている<sup>1)~3)</sup>。本稿ではわれわれの研究成果をもとに、まず cfp-mRNA 定量化と産科疾患との関連を紹介し、次いで母体血漿中に流入する胎盤由来 mRNA の同定とその臨床的意義について考察する。

### 1. 母体血漿中 cfp-mRNA と産科合併症との関連

#### 1. 癒着胎盤

われわれは、膀胱への浸潤を伴う穿通胎盤の

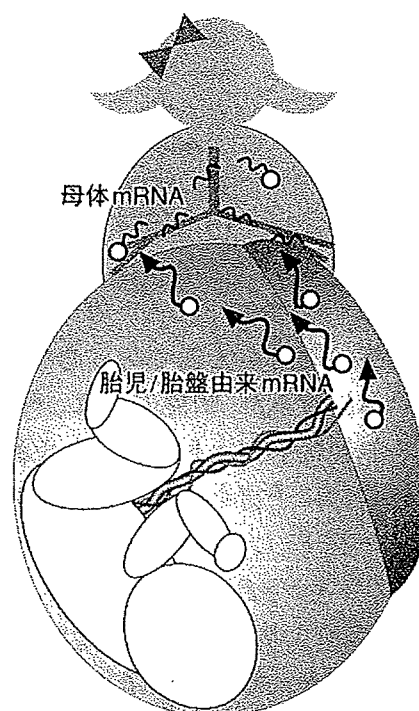


図 1 母体血漿中 cell-free mRNA の模式図

母体血漿中には母体由来の cell-free mRNA に混入して胎児/胎盤由来の cell-free mRNA が認められる。

\*Shoko MIURA, Kiyonori MIURA, Atsushi YOSHIDA, Kentaro YAMASAKI, Hideaki MASUZAKI  
長崎大学医学部産科婦人科学教室  
〒 852-8501 長崎市坂本 1-7-1

症例を経験した<sup>4)</sup>。本例は前壁付着の前置胎盤で帝王切開の既往がある。妊娠 37 週に多量の性器出血を認め、緊急帝王切開術を施行された。

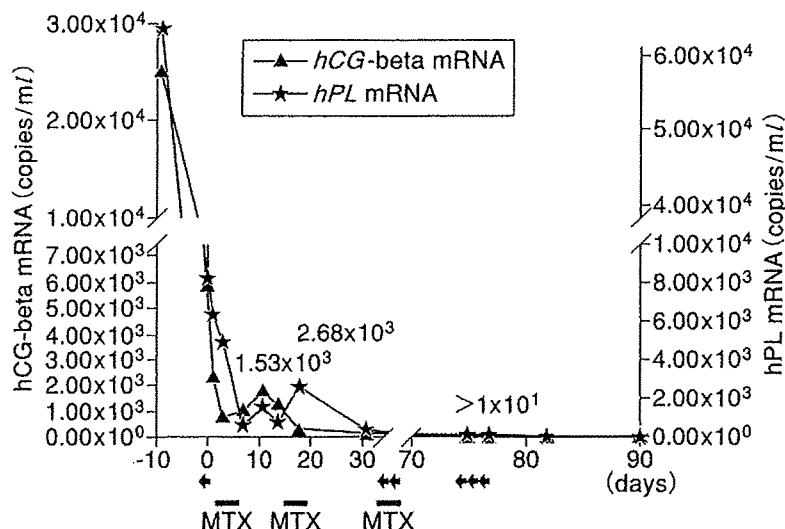


図2 穿通胎盤の治療経過に伴う血漿中  $hCG-\beta$  mRNA および  $hPL$  mRNA レベルの推移

初回 MTX 治療に伴い血漿中  $hCG-\beta$  mRNA および  $hPL$  mRNA レベルは一過性の上昇を示している。一方、2回目以降の治療後には  $hPL$  mRNA のみ一過性の上昇を認めている。これは初回の MTX 療法で  $hCG-\beta$  を分泌する cytotrophoblast の活性が低下した、つまり治療が奏効したことを示している。

▲は  $hCG-\beta$  mRNA レベルを、★は  $hPL$  mRNA レベルを示す。MTX はメソトレキセート療法を示し、\*は初回治療 (day 0) を示す。

(文献 4, 5 より引用)

この際、膀胱の剝離が困難であったため、膈上部切断術のみ施行され、胎盤の一部は残存した。その後、メソトレキセート (MTX) 療法を3回施行し、二期的に子宮を摘出した。本例の治療経過に伴い採取した血漿中の  $cfp-hCG-\beta$  mRNA および  $cfp-hPL$  mRNA レベルを定量し、同時に IRMA 法を用いて測定した  $hCG$  プロテインレベルと比較した。その結果、治療経過に伴い  $hCG$  プロテインは減少傾向を示す一方、 $cfp-hCG$  mRNA および  $cfp-hPL$  mRNA は低下傾向を示したもののメソトレキセートの治療後に一過性の流入量の増加を示していた (図2)<sup>4)5)</sup>。これは、抗癌剤の細胞に対する治療効果をリアルタイムに反映したものと考えられた。

本例のように前置胎盤の妊婦は常に癒着胎盤のリスクを伴い、帝王切開ののち胎盤剝離が困難で単純子宮全摘術を必要とすることがある。超音波検査や MRI 検査などの画像診断を用い

て癒着胎盤を出生前に診断する試みがなされるが、そのリスク予測については困難な状況にある。つまり、母体・胎児にとって極めて重篤な合併症であるにもかかわらず、癒着胎盤の有無は分娩時に初めて診断されているのが現状である。

すなわち、癒着胎盤の有無を推定するマーカーの同定は、前置胎盤の管理において最重要課題の一つである。穿通胎盤に対する治療効果を  $cfp$ -mRNA 定量化でモニターすることが可能であったことから、 $cfp$ -mRNA 定量化は前置胎盤における癒着胎盤のリスクを予測する分子マーカーとして臨床応用できる可能性が高いと思われる<sup>6)</sup>。

## 2. 双胎間輸血症候群

妊娠高血圧症候群における  $cfp$ -mRNA 流入量の変化は重症度と関連しており、母体血漿中へ流入する  $cfp$ -mRNA 量は様々な病態の変化

を鋭敏に反映しているものと考えられる<sup>7)</sup>。従って、様々な病態が関連している症候群では、病態が顕在化する以前の母体血漿中 cfp-mRNA 流入量を計測することで疾患の発症を予測できる可能性がある。

そこで、われわれは胎盤特異的遺伝子として *hPL* mRNA を選択し、妊娠初期における cfp-*hPL* mRNA 量が、その後の双胎間輸血症候群の発症の有無を推定し得るのか否かについて検証した。一絨毛膜性双胎を対象として妊娠 12~22 週に母体血を採血し、1.6 ml の血漿成分から cell-free mRNA を抽出した。採血時点では、いずれの例も双胎間輸血症候群を発症していなかった。その後、双胎間輸血症候群を発症した例を TTTS (twin-twin transfusion syndrome) 群と分類し、発症しなかったものを no-TTTS 群として、両群間の cell-free mRNA 量を比較検討した<sup>7)</sup>。その結果、TTTS 群における cfp-*hPL* mRNA 流入量は、no-TTTS 群におけるそれと比較して、双胎間輸血症候群を発症する以前にすでに有意に増加していた (図 3)。すなわち、母体血漿中へ流入する cfp-mRNA の定量は、双胎間輸血症候群の発症リスクを推定する分子マーカーになりうるものと考えられる<sup>8)</sup>。

双胎間輸血症候群の治療は、すでに発症してしまった状態を評価して、吻合血管レーザー凝固術などの治療を行っているのが現状である。わが国におけるレーザー治療の成績は世界水準以上であるが、将来は双胎間輸血症候群の発症を予測し、何らかの手段で予防することが期待される<sup>9)</sup>。

## II. 母体血漿中胎盤特異的 cfp-mRNA の同定

以上より、母体血漿中 cfp-mRNA 流入量の定量化は、産科合併症の発症を予測する分子マーカーとして期待される。一方、産科合併症は単一遺伝子の影響で発症するのではなく、複数の遺伝子が影響する多因子疾患と考えられる。例えば、産科合併症の発症予測に際しては、

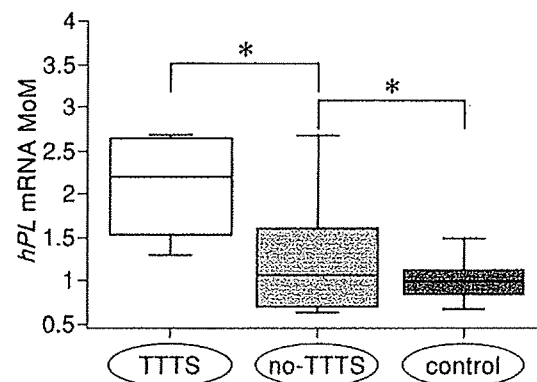


図 3 Cell-free *hPL* mRNA 量と双胎間輸血症候群の発症

将来 TTTS を発症する群は TTTS を発症しない群と比較して、発症する前から cfp-*hPL* mRNA 流入量の有意な上昇を認める。これは症状が顕在化する以前の TTTS に関連した病態を反映している可能性が考えられる。

TTTS は双胎間輸血症候群、\* は有意差ありを示す。

(文献 8, 10 より引用改変)

個々の遺伝子について母体血漿中 cfp-mRNA 量を定量して評価するのではなく、複数の胎盤特異的遺伝子についての定量値を総合的に評価することが重要である。そこで、より多くの分子マーカーを同定するため、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて約 54,000 個の遺伝子の発現状態を網羅的に解析した (図 4)。この際、母体血球に比して胎盤で強発現している遺伝子が、母体血漿中における胎盤特異的 cfp-mRNA と考えられる<sup>9)10)</sup>。まず、母体血球における発現量は低く胎盤組織では発現量が高い遺伝子群のうち、胎盤組織における発現量が血球におけるそれと比較して 5,000 倍以上の遺伝子 50 個を選定した (図 5)。

50 個の遺伝子それぞれの cfp-mRNA 流入量を市販の TaqMan プローブを用いてリアルタイム RT-PCR 法で定量解析した結果、母体血漿中で定量可能であった遺伝子 9 個を同定した。その内訳は妊娠性蛋白である *PSG2*, *PSG3*, *hPL*, *CGB* および *CGA*, 絨毛の侵入あるいは母体・胎盤循環の形成に重要なヒトレトロウイルスである *Syncytin* および *Syncytin-2*, そして

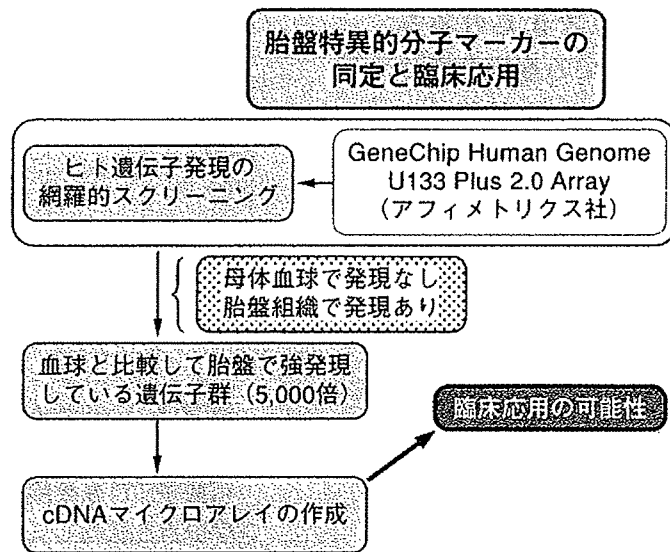
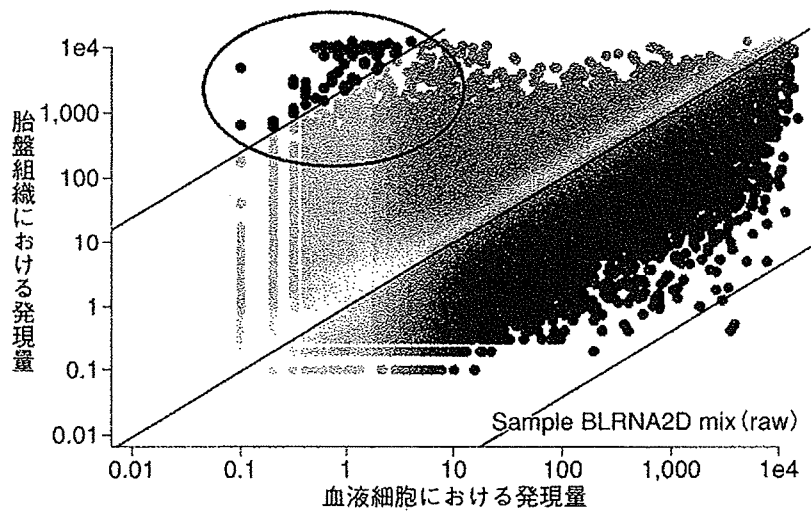


図4 胎盤特異的 mRNA の網羅的スクリーニングとその臨床応用

母体血漿中における胎盤特異的 mRNA の定量は、産科合併症の分子マーカーとなりうる。一方、臨床応用に際しては、マイクロアレイ法による網羅的な解析法の応用が望まれる。



X-axis: BLRNA2D mix vs PLR... Colored by: BLRNA2D mix vs ...  
 Y-axis: BLRNA2D mix vs PLR... Gene List: all genes (54675) ...

図5 マイクロアレイ解析による母体白血球および胎盤組織における遺伝子発現量の散布図

ドットは、解析した 54,000 個の遺伝子を表している。母体血液中で胎盤由来の mRNA を区別するためには、血液細胞における発現は低く、胎盤における発現は強発現しているものを選択する必要がある。そのような遺伝子群は、散布図の左上のサークル内の遺伝子群である。

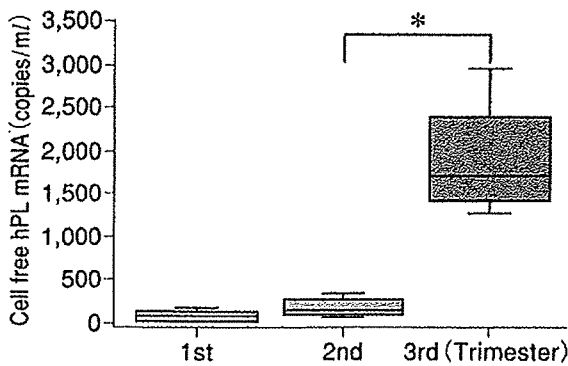


図6 妊娠経過に伴う cell-free hPL mRNA 流入量の変化

妊娠経過に伴い母体血漿中へ流入する cell-free hPL mRNA 量は増加している。このことは、臨床応用に際して流入量の計測値を評価するには、採血した妊娠週数を考慮する必要があることを示している。

\*は有意差ありを示す。

絨毛間の接着因子の働きをする *ADAM12* および胎盤組織で強発現している *RAI14* であった (特願 2007-106595)。これらは、胎盤異常のリスクを推定するための分子マーカーの候補であり、将来の臨床応用が期待できる。

また、それぞれの遺伝子の母体血漿中への cfp-mRNA 流入量は妊娠経時的に変化している (図6)。これは、サンプルを比較検討する際には、それぞれの妊娠週数を考慮する必要があることを示唆している。われわれは、cfp-mRNA 流入量を評価する際には、まず各妊娠週数における正常妊婦の基準値を設定し、その中央値をもとにサンプルの定量値を Multiple of Median (MoM) 値で算出している。MoM 値は中央値からどれくらい離れているのかを評価しているため、週数間の流入量の差を補正することができる。

### III. cfp-mRNA 定量化の臨床応用を目指して

最先端技術の cDNA マイクロアレイ法を用いれば、一度に網羅的にターゲット遺伝子をスクリーニングすることが可能である。われわれはマイクロアレイ Comparative Genomic Hybridization パネルを作製し、羊水中に混入して

いる cff-DNA を用いた羊水染色体検査に成功している<sup>11)</sup>。従って、本法を母体血漿中の cfp-mRNA 定量化に応用すると、これまでリアルタイム RT-PCR 法で個々の cfp-mRNA をそれぞれ定量化し比較検討していたのに対し、その解析効率および情報が飛躍的に向上すると考えられる (図4)。将来、マイクロアレイ CGH 法を用いた cfp-mRNA 定量化が可能になれば、母体の末梢血で胎児あるいは胎盤の分子診断を低侵襲にできるため、妊婦検診の一環として受け入れられることが期待される。

### おわりに

cfp-mRNA の網羅的解析により、母体血球に比して胎盤特異的に強発現している 50 個の遺伝子が同定された。これらをターゲットにしたマイクロアレイ CGH 法による cfp-mRNA 定量化の確立は、基礎的には胎盤機能・循環の分子メカニズムの解明へとつながり、臨床的には胎盤機能を推定する非侵襲的な検査法の確立へとつながる。さらに本法は、習慣流産や絨毛性疾患の新たな分子 (腫瘍) マーカーの研究へと発展する可能性が考えられる。

### 文 献

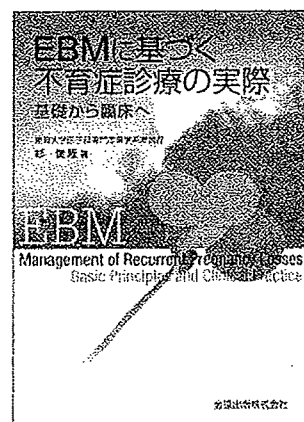
- 1) Lo YM, Chiu RW : Prenatal diagnosis : progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet*, 8 : 71-77, 2007.
- 2) Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, et al : Cell-free mRNA concentrations of CRH, PLAC1, and selectin-P are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Prenat Diagn*, 27 : 772-777, 2007.
- 3) Maron JL, Bianchi DW : Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal body fluids : a decade of progress. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 15 : 145 : 5-17, 2007.
- 4) Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, et al : Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin Chem*, 51 : 923-925, 2005.
- 5) 三浦清徳, 石丸忠之 : 特集/絨毛性疾患—最前

- 線一、絨毛性疾患のフォローアップにおける血漿中 hCG- $\beta$  mRNA の定量. 産婦の実際, 55 (4): 671-678, 2006.
- 6) Mazouni C, Gorincour G, Juhan V, et al : Placenta accreta : a review of current advances in prenatal diagnosis. Placenta, 28 : 599-603, 2007.
- 7) Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, et al : Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. Clin Chem, 53 : 399-404, 2007.
- 8) Miura K, Yamasaki K, Miura S, et al : Circulating cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome. Clin Chem, 53 : 1167-1168, 2007.
- 9) Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, et al : Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma : towards non-invasive prenatal gene expression profiling. J Med Genet, 41 : 461-467, 2004.
- 10) 三浦清徳 : (5) 双胎形成のメカニズムとその異常に関する分子遺伝学的検討. 日産婦誌, 59 (10): 1814-1825, 2007.
- 11) Miura S, Miura K, Masuzaki H, et al : Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. J Hum Genet, 51 : 412-417, 2006.

不育症を解明し、新しい生命誕生に一役!!

# EBMに基づく 不育症診療の実際 基礎から臨床へ

東海大学医学部専門診療学系准教授 杉 俊隆 著



ISBN978-4-307-30091-9 A5判 78頁 26図 定価2,415円(本体2,300円+税5%)

不育症の分野は、生殖医学の発展とともに臨床も進化しており、常に新しい不育症の原因仮説が提唱され、その検査が開発され、その治療が検討されてきた。そのため、昨日の検査・治療は今日は否定されているといった具合で、病院・医師の間で検査・治療方針がまちまちであり、不育症患者の間に多々なる混乱を招いていた。

最近、日本産科婦人科学会生殖内分泌委員会の不育症の小委員会において、不育症の検査、治療に関する指針が提示された。本書は現時点での不育症診療の実際をまとめたもので、主に著者の不育症の研究と臨床経験に基づき、EBMを重視して解説されている。新しい生命誕生の一助として、お役立ていただきたい。

## おもな内容

流産の基本的知識 流産とは/流産の頻度/習慣流産・不育症とは/流産の処置と待機療法 不育症の検査 不育症のスクリーニング検査/不育症検査の注意点 不育症の検査異常とその治療 子宮奇形/黄体機能不全/糖尿病/甲状腺機能異常/高プロラクチン血症/LH分泌過剰/染色体異常/同種免疫異常/Thrombophilia(血栓症素因)と胎盤血管病変/易血栓性患者の妊娠中の予防的抗凝固治療 不育症の新しい概念 カリクレイン-キニン系の破綻と流産/トロンボモジュリン/プロテインC/プロテインS/第V因子系の破綻と不育症

2007・2

 金原出版

〒113-8687 東京都文京区湯島2-31-14 電話03-3811-7184(営業部直通) FAX 03-3813-0288  
振替00120-4-151494 ホームページ <http://www.kanehara-shuppan.co.jp/>

—総説—

特集：選択的単一胚移植

# Assisted Reproductive Technologyにおける キメラ発生の危険性

## Chimerism in Pregnancy by Assisted Reproductive Technology

三浦 清徳<sup>1\*</sup>・増崎 英明<sup>1</sup>

Kiyonori Miura<sup>1\*</sup> and Hideaki Masuzaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>長崎大学医学部産科婦人科学教室 〒852-8501 長崎市

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan

**要旨：** Assisted Reproductive Technology(ART)による妊娠のなかには、卵性診断を行うことでキメラを伴う症例が見出され、ARTは単に多胎率を上昇させるだけでなく、キメラに伴う問題も内包していると指摘されている。二卵性一絨毛膜双胎では血液キメラによる輸血あるいは移植医療への影響が指摘され、また血液キメラの状態はおそらく生涯継続すると考えられるため、心理的な負担を考慮した生殖遺伝カウンセリングが必要である。ARTでは複数の受精卵が偶然にきわめて接近した位置に存在した可能性が考えられ、胚発生中に受精胚どうしの融合を生じてキメラの危険性が上昇すると思われる。ARTに伴うキメラの危険性に関して、少なくとも胚移植後に複数の受精胚が融合して生じるキメラの可能性は単一胚移植により回避しうると考えられる。しかし、既に胚移植前に受精胚がキメラを生じている場合には、たとえ移植胚を1個に制限してもキメラの個体は生じうる。ARTに伴うキメラの危険性を把握し安全な対策を見出すためには児の長期観察と共に分子遺伝学的解析を用いた診断が重要であろう。

**キーワード：**キメラ、モザイク、生殖補助医療、二卵性一絨毛膜双胎、分子遺伝学的解析

**Abstract:** As several cases of chimerism have been reported in pregnancy by assisted reproductive technology (ART), ART-related problems include not only an increased risk of multiple pregnancy but also a possibility of chimerism. In particular, confined blood chimerism (CBC), which is attributable to placental vessel anastomosis between twins, has been detected in 11 cases of monozygotic dizygotic twins. It is possible that three or four alleles could be detected in patients with CBC, misleading physicians at the time of blood transfusion or genotyping for transplantation of an allograft. Therefore, sufficient informed consent and genetic counseling prior to ART are absolutely necessary for patient quality of life. ART may increase the chance of cell fusion (or cell cleavage) during embryogenesis, causing an increased risk of chimerism. Elective single-embryo transfer could avoid chimerism caused by cell-fusion after embryo transfer, but not chimerism generated before embryo transfer. To clarify the problem of chimerism in pregnancy by ART and determine solutions for this problem, both long-term follow-up of cases of chimerism and molecular genetic analysis using DNA polymorphic markers are essential.

**Key words:** Chimerism, Mosaicism, Assisted Reproductive Technology, Monozygotic dizygotic twin, Molecular analysis

(受付 2008年3月7日/受理 2008年8月21日)

別刷請求先：〒852-8501 長崎県長崎市坂本1-7-1

長崎大学医学部産科婦人科学教室

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: kiyonori@nagasaki-u.ac.jp

はじめに

生殖補助医療に伴う多胎妊娠のリスクを回避するため、日本生殖医学会のガイドラインでは35歳未満で初回の胚移植例には原則として単一胚移植を行うよう定めている。



一方、不妊治療による妊娠のなかには、卵性診断を行うことでキメラを伴う症例が見出され、不妊治療は単に多胎率を上昇させるだけでなく、キメラに伴う問題も内包していることが指摘されている。

本稿では、症例報告をもとに生殖補助医療に伴うキメラの発生機序、診断、臨床上の問題点を整理して、移植胚数を1個に制限することでキメラの危険性を回避しうるのか否かについて考察する。

## 1. キメラと移植胚数

キメラ (chimera) は、「複数の受精卵に由来する複数の異なる遺伝子型あるいは核型の細胞が混在する1個体」と定義され、単一の受精卵に由来した異なる遺伝子型・核型が混在する個体であるモザイク (mosaic) とは区別される (図1)。したがって、キメラは複数の胚が存在する状態で生じやすく、複数個の胚移植はキメラ発生のリスク因子であることが理解できる。近年、生殖補助医療に伴うキメラの問題が明らかになり、個体を形成する全ての組織にキメラを認めるものから、血液細胞に限局してキメラを認めるもの (confined blood chimerism: CBC; 以下、血液キメラ) や胎盤に限局してキメラを認めるもの (confined placental chimerism: CPC; 以下、胎盤キメラ) まで様々な程度のものが報告されている。以下に症例を呈示して、それぞれのキメラに伴う問題点を指摘する。

## 2. 複数個の胚移植で生じた真性半陰陽の一例

妻は31歳で原発性不妊症、夫は41歳で乏精子症と診断され、プセリリンとhMGを用いた排卵誘発ののち精子提供を受けて体外受精が行われた<sup>1)</sup>。3個の胚移植が行われて単胎妊娠が成立し、3,460 gの児を正期産で分娩した。児の外生殖器は正常男性であったが、のちに左側鼠径ヘルニアで摘出された組織に卵巣組織が認められたため真性半陰陽と診断された。

### 2-1. キメラの分子診断

真性半陰陽の発生機序を明らかにするためには、まず個体が複数の受精胚に由来しているのか否かについて卵性診断する必要がある。診断にはX染色体上のDNA多型マーカーを用いた分子遺伝学的解析が有用であり、減数分裂に特有の染色体組み換えの頻度が高い染色体中部からテロメア付近のマーカーを用いる (図2a)。X染色体における複数の遺伝子座位について、児は母親由来の異なる遺伝子型を有していたので、複数の受精胚が融合したキメラであると診断された。

### 2-2. キメラの発生時期を推定する

つぎに、生殖補助医療におけるキメラのリスクを知るためには、治療のどの過程でキメラが発生したのか同定する必要がある。2つの精子が受精する可能性がある卵の組み合わせとして、1) 第一減数分裂後の卵と第一極体、2) 第二減

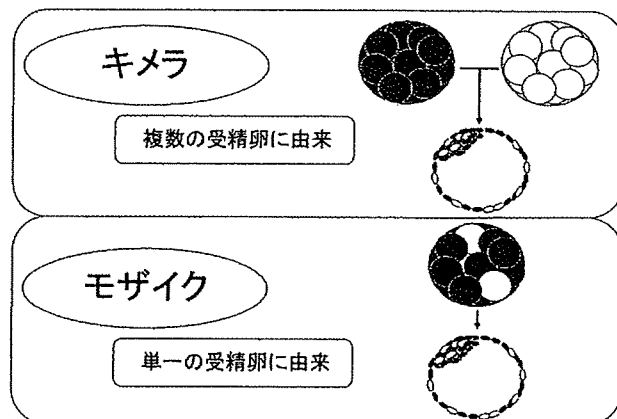


図1 キメラとモザイクの模式図

数分裂後の卵と第二極体および3) それぞれ異なる成熟卵の3つの組み合わせが考えられる。これらは染色体組み換え頻度が極めて低いセントロメア付近のDNA多型マーカーを用いた遺伝子型解析を行うことで区別できる (図2b)。1) の場合はセントロメア付近の遺伝子多型マーカーの遺伝子型が完全に一致しない。2) の場合は、すべての遺伝子型が一致する。3) の場合には、遺伝子多型マーカーの中に一致するものと一致しないものが混在する。1) あるいは2) の組み合わせであれば胚移植前にすでに受精胚自体がキメラであった可能性があり、3) の組み合わせであれば胚移植後に受精胚が融合してキメラが生じたことを確認できる。本例においては、複数の繊維芽細胞の培養細胞を15種類の多型マーカーで解析し、児は母親の遺伝子型がヘテロ接合であった5つの多型マーカーのうち3つの多型マーカーで完全に遺伝子型が一致し、2つの多型マーカーでは一致しなかった。したがって、本例は胚移植後に受精胚が融合した可能性が高いと考察されている。

### 2-3. 予想されるキメラの発症頻度と問題点

本例は融合した受精胚の性別が異なっていたため、左側鼠径ヘルニアを手術したことがきっかけになり、病理検査により真性半陰陽と診断され卵性診断でキメラを伴うことが見出された。一方、融合した受精胚の性別が同一であっても、染色体レベルではchi 46,XX/46,XXあるいはchi 46,XY/46,XYであり真性半陰陽を生じることはないが、DNAレベルでは複数の異なる遺伝子型が混在するキメラを生じるため、HLAタイピングなどの判定が困難になると思われる。

2つの受精胚が同性の場合や2つの精子がそれぞれ卵と極体とに受精して互いに融合して生じるキメラの可能性も考慮すると、不妊治療に伴い全ての組織にキメラを認める個体の発生頻度は実際の報告よりも高いことが考えられる。

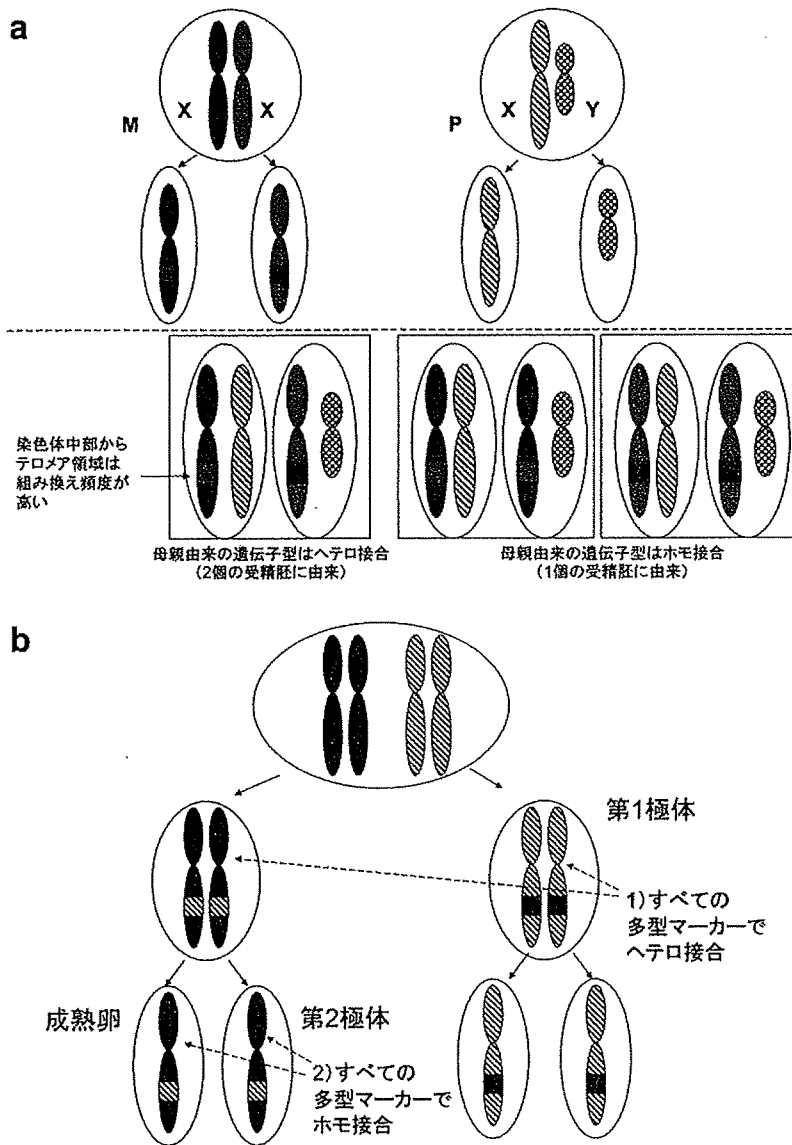


図2 DNA多型解析の模式図

a. 卵性診断：母親 (M) は2本のX染色体を有し、父親 (P) はX染色体とY染色体を一本ずつ有する。したがって、多型頻度の高いDNA多型マーカーを複数個組み合わせて遺伝子型解析すれば、一個体に母親由来の2本のアレルを検出すると複数の受精胚に由来するキメラと判定される。一方、すべての母親由来の遺伝子型がホモ接合の場合には、1個の受精胚に由来する一個体である可能性が高い。b. キメラの発生時期の推定 (三浦, 増崎 臨床婦人科産科 印刷中より引用<sup>8)</sup>)：多型頻度の極めて低いセントロメア領域のマーカーを用いると、個体が減数分裂過程のどの時期に由来するのか推定することができる。

### 3. 二卵性一絨毛膜双胎の臨床像

一絨毛膜双胎であれば一卵性であると考えられてきたが、2003年から現在までに10例以上の不妊治療に関連した二卵性一絨毛膜双胎が報告されている (表1)<sup>2-6)</sup>。症例1, 症例2, 症例3, 症例6, 症例7および症例11は体外受精-胚移植 (IVF-ET), 症例5は精巣精子採取術ののち顕微授精-胚移植

で妊娠しており、移植胚数が明らかであった4例すべてにおいて2個あるいは3個の複数個胚移植が行われていた。一方、症例4は排卵誘発および子宮内人工授精, 症例8, 症例9および症例10はクロミッドで妊娠しており、いずれも複数個の受精胚が生じていた可能性が考えられた。症例1から9は一絨毛膜双胎であるにも関わらず双胎間の性別が一致しな

表1 二卵性一絨毛膜双胎の報告例 (Miura K and Niikawa N, J Hum Genet 2005, Walkerら Prenat Diagn. 2007より改変引用<sup>3,4)</sup>)

症例	生殖補助技術	末梢血の核型	膜性診断	キメラ	臨床所見
1	体外受精-3個胚移植	Chi XX/XY	一絨毛膜	白血球:キメラ(+)/皮膚:キメラ(-)	男児/女児
2	体外受精-ICSI hatching-2個胚移植	Chi XX/XY	一絨毛膜	白血球:キメラ(+)/皮膚:キメラ(-)	男児/女児 女児に陰核肥大
3	体外受精-胚移植*	Chi XX/XY	一絨毛膜	白血球:キメラ(+)/皮膚:キメラ(-)	男児/女児
4	過排卵-子宮内人工授精	Chi XX/XY	一絨毛膜	不明	男児/女児
5	精巣精子採取術 顕微授精-3胚移植	Chi XX/XY	一絨毛膜	白血球:キメラ(+)/皮膚:キメラ(-)	男児/女児 多血症/貧血症
6	体外受精-胚移植*	Chi XX/XY	一絨毛膜	不明	男児/女児
7	体外受精-胚移植*	Chi XX/XY	一絨毛膜	ABO血液型:キメラ(+)	男児/女児
8	クロミッド	Chi XX/XY	一絨毛膜	白血球:キメラ(+)/皮膚:キメラ(-)	男児/女児
9	クロミッド	Chi XX/XY	一絨毛膜	不明	男児/女児
10	クロミッド	なし	一絨毛膜	ABO血液型:キメラ(+)	男児/男児
11	体外受精-2個胚移植	なし	一絨毛膜	白血球:キメラ(+)/皮膚:キメラ(-)	男児/男児

\*移植胚数は不明。

いため、末梢血の染色体核型を調べると双胎児にキメラ (chi 46,XX/46,XY) が認められた。症例10および症例11では、性別は一致するが出生後の検査で血液型や遺伝子型が一致しないため、偶然に二卵性一絨毛膜双胎と診断されている。症例1, 症例2, 症例3, 症例5, 症例8および症例11では、他の組織は正常核型あるいは遺伝子型を示したことから、血液に限局したキメラ (血液キメラ) であることが確認された。症例7および症例10では出生後にABO型のキメラが認められている。以上のように、ほとんどの症例が一絨毛膜であるが双胎間の性別が異なることがきっかけになり、卵性診断を行うことではじめて二卵性一絨毛膜双胎と診断されている。性別が同一のケースを考慮すると、二卵性一絨毛膜双胎は把握されている症例の少なくとも2倍は存在するものと推定される。

### 3-1. 発生機序

不妊治療に用いられた手法は、必ずしも胚移植や顕微授精などの胚操作が加えられたものばかりではなく、複数の受精卵が偶然にきわめて接近した位置に存在した可能性が考えられる<sup>3)</sup>。二卵性一絨毛膜双胎の形成時期は、一卵性双胎における絨毛膜形成のタイミングを参考にすると、絨毛膜を形成する以前の発生初期と思われ、着床前に外細胞層のみが融合して二卵性一絨毛膜双胎が形成されることが推定される (図3a)。

### 3-2. 診断における留意点

#### 1) 卵性診断

二卵性一絨毛膜双胎はDNA遺伝子多型を用いた卵性診断を行うことで初めて診断される。診断に際して最も注意すべきことの一つにDNAを抽出する組織の選択が挙げられる。本双胎は、一絨毛膜双胎であるため血管吻合を介して双胎間の血液細胞が相互に交通しており、双胎児の臍帯血はキメラを生じている (図3b)。さらに、血液幹細胞が相互に

生着すると、双胎児の血中に卵性の相違による異なる遺伝子型が混在し、血液細胞の遺伝子型を比較しても完全に一致するため、一卵性と誤診されるか3アレルもしくは4アレルが検出され、卵性の判定が不可能になることが考えられる。したがって、二卵性一絨毛膜双胎を疑って卵性診断する際には、幹細胞に由来する血液細胞ではなく、幹細胞に由来していない口腔粘膜、臍帯あるいは皮膚組織などの体細胞から抽出されたDNAを用いることが重要である。

#### 2) 血液キメラの診断

血液限局性キメラは、血液細胞と幹細胞に由来しない体細胞の双方について染色体核型、染色体異型あるいは遺伝子型を比較することにより診断される。

インフォームドコンセントを得て、1. 病理診断で膜性を確定するために胎盤組織、2. 双胎児それぞれの血液と臍帯、3. 双胎児それぞれの口腔粘膜の擦過細胞、4. 両親の血液を採取して、胎盤の膜性診断で一絨毛膜二羊膜と確認し、双胎児の血液ではいずれもキメラ (染色体核型あるいは遺伝子型の混在) を認めるが、それぞれの皮膚や臍帯組織では個々の受精卵に由来する染色体核型あるいは遺伝子型を示す状態を確認することで診断される。私どもは双胎間の性別が異なれば、XおよびY染色体特異的なプローブを用いたFISH (fluorescent in situ hybridization) 法あるいはY染色体特異的なプライマーを用いた定量的PCR (polymerase chain reaction) 法によりキメラの程度を推察している<sup>5-8)</sup>。

### 3-3. 臨床上の問題点

#### 1) 双胎間輸血症候群

双胎間の性別が異なる二卵性一絨毛膜双胎における臍帯血の染色体核型はキメラ (chi46,XX/46,XY) を呈しており、胎盤上の吻合を介した双胎間の輸血を生じていることがわかる。これまでにも二卵性一絨毛膜双胎に双胎間輸血症候群を発症したとの報告があり<sup>9)</sup>、本症候群を念頭においた妊娠管理が必要である。

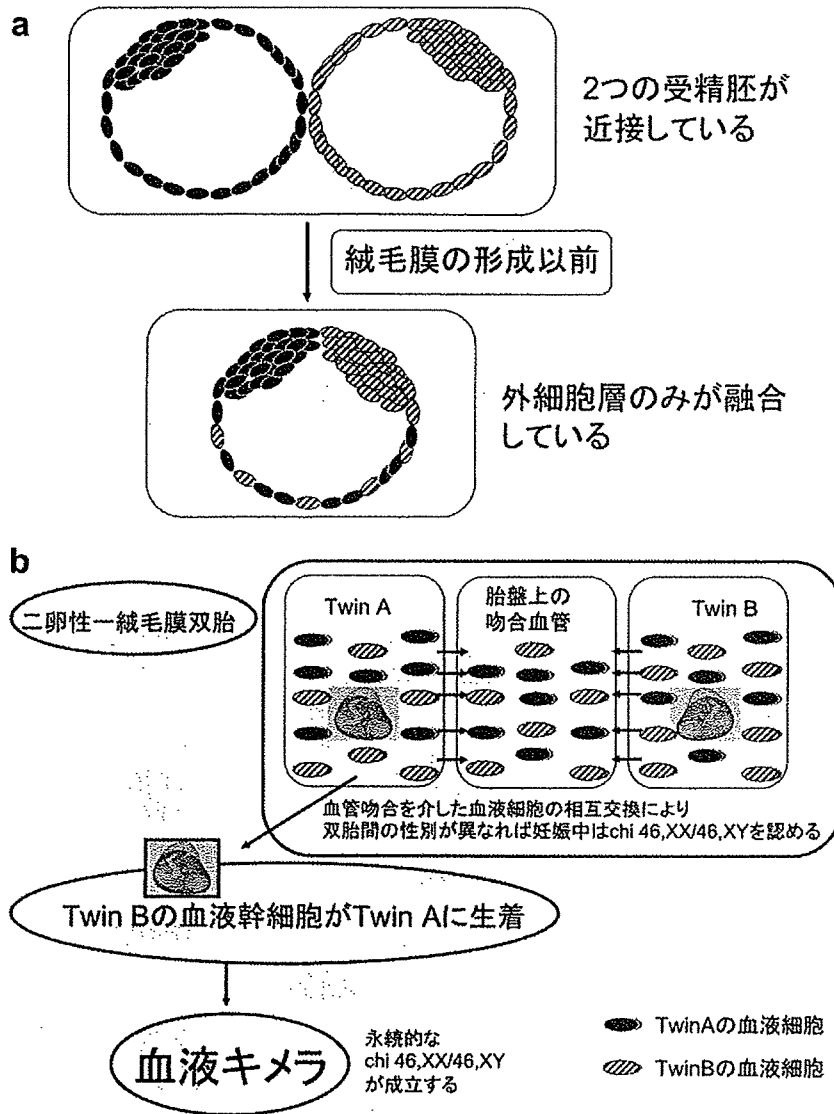


図3 二卵性一絨毛膜双胎と血液キメラの発生機序 (三浦 日産婦誌59巻10号より引用<sup>7)</sup>)

a. 二卵性一絨毛膜双胎は、二つの受精胚が偶然に近接して存在し絨毛膜形成以前に外細胞層のみが融合して発生すると推定される。b. 血液キメラの状態は、一絨毛膜の胎盤上に存在する双胎間の血管吻合を介して二卵性双胎児の血液細胞が相互に交換される中、例えばTwin Bの血液幹細胞がTwin Aに生着すると形成される。

2) 血液キメラに伴う問題

血液キメラは、性別判定、血液型判定、輸血および移植医療などの身近な医療の問題から将来のテーラーメイド医療における遺伝子型判定を困難にすることまで多くの問題を内包している。慢性的な血液キメラの状態は免疫学的に寛容な状態と考えられるが、輸血あるいは移植医療への影響は未だ不明である。血液キメラの状態はおそらく生涯継続すると考えられるため、心理的な負担を考慮した生殖遺伝カウンセリングが必要である。最近の報告では、血液中のマ

イクロキメリズムと強皮症などの自己免疫疾患との関連が示唆されるなど新たな問題も指摘されている<sup>10)</sup>。

3) フリーマーチン

フリーマーチンとは、性別の異なる二卵性双胎の家畜において、雌個体に先天性な性腺異常をきたし不妊症を呈する現象である<sup>11,12)</sup>。これは、双胎間の血管吻合を介してキメラ (chi 60,XX/60,XY) を生じたことに起因しており、雄から雌への男性ホルモンの移行が原因の一つに挙げられている。しかし、ヒトでもキメラ (chi 46,XX/46,XY) を生じているが、

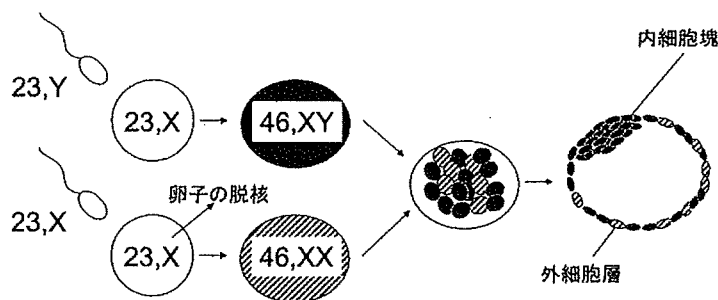


図4 confined placental chimerismの発生機序 (Surtiら Prenat Diag 2005より改変引用<sup>14)</sup>)  
 キメラの受精胚が発生過程で、偶然に内細胞塊を形成する細胞が一つの受精胚のみに由来しているが外細胞層を形成する細胞が複数の受精胚に由来する場合に confined placental chimerismが生じる。

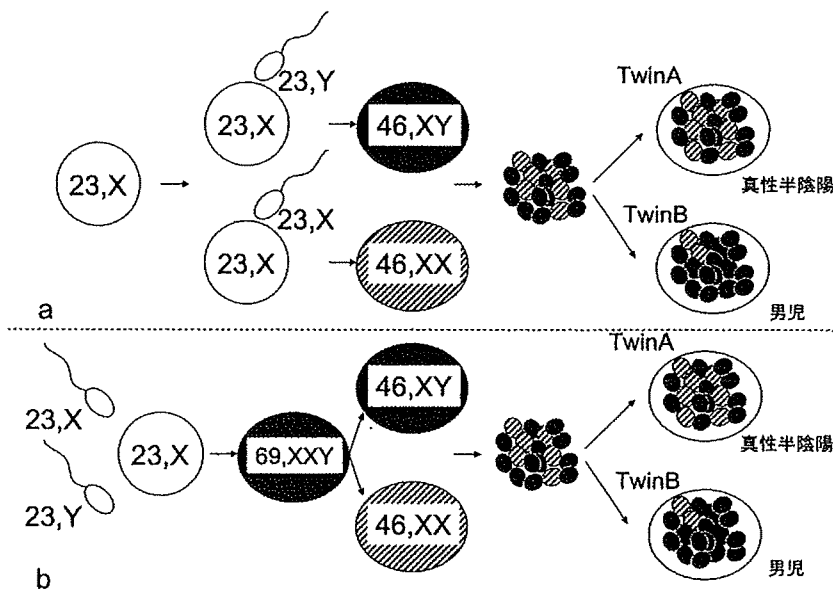


図5 一児に真性半陰陽を認めた双胎妊娠の発生機序 (Souterら Hum Genet 2007より改変引用<sup>13)</sup>)  
 a. 分割した卵子にX染色体とY染色体の精子がそれぞれ受精してXXおよびXYの胚が生じた可能性, b. 2精子受精して生じた3倍体の受精胚から2倍体化することによりXXおよびXYの胚が生じた可能性。

性別の異なる二卵性一絨毛膜双胎に伴うフリーマーチンの報告はない<sup>3, 5-7)</sup>。産科および小児科と連携した長期観察が必要であるが、今のところヒトと家畜とでは血液キメラに伴う影響は異なるものと考えられる。

#### 4. Confined placental chimerism (CPC: 胎盤キメラ)

胎盤キメラとは、胎児は正常核型で胎盤組織に局限して核型の混在を認め、かつ混在する核型が異なる受精胚に由来するものをいう。これまで不妊治療に伴う胎盤キメラの2症例が報告されている<sup>13, 14)</sup>。一例目はクロミフェンを用い

た排卵誘発、2例目は子宮内人工授精で妊娠している。いずれもキメラの受精胚を生じたが、偶然に正常受精胚に由来した細胞のみが内細胞塊を形成し、胎盤にのみキメラが生じたものと考えられる (図4)<sup>8, 14)</sup>。

いずれの症例も双胎間の性別が異なることがきっかけになり、染色体核型あるいは遺伝子型解析を行うことでキメラが同定された。双胎間の性別が一致している場合 (46,XX/46,XXまたは46,XX/46,XY) は見逃されている可能性が大きいと考えられる。また、妊娠初期の絨毛検査で認められる confined placental mosaicismの頻度が1-2%である

ことから、胎盤キメラの頻度は confined placental mosaicism よりさらに稀であろうと考えられている。

#### 5. 卵性診断できない双胎発生機序の可能性

最近、自然妊娠による真性半陰陽 (Twin A) と正常男児 (Twin B) の双胎妊娠が報告され、両児の染色体核型はいずれも 46,XX/46,XY を呈していた<sup>15)</sup>。マイクロアレイ SNP 解析により、双胎児は共通の母親由来の X 染色体と父親由来の X 染色体あるいは Y 染色体を有していることが示された。その発生機序として、1) 分割した卵子に X 染色体と Y 染色体の精子がそれぞれ受精して XX および XY の胚が生じた、あるいは 2) 2 精子受精して生じた 3 倍体の受精卵から 2 倍体化することにより XX および XY の胚が生じたという二つの可能性が指摘されている (図 5)<sup>8, 15)</sup>。そして、Twin B では男性核型の占める割合が高くして男児の表現型を呈し、Twin A では男性核型と女性核型の割合がほぼ均等なため真性半陰陽を認めたと考察されている。

本例については受精卵が 1 個なのか複数個なのか判定できないため、モザイクなのかキメラなのかの分類はできない。しかし、複数の異なる遺伝子型が混在するため、前述の症例と同様に遺伝子型判定を用いる検査で問題を生じる可能性がある。また、性別が同一の場合には真性半陰陽を認めないため、正常妊娠として見逃される可能性も高い。本症例のような発生機序が不妊治療で生じた場合、すでに胚移植以前にキメラもしくはモザイクが形成されている可能性があり単一胚移植では回避できないことも考えられる。

#### おわりに

ART に伴うキメラの危険性に関して、少なくとも胚移植後に複数の受精卵が融合して生じるキメラの可能性は単一胚移植により回避しようと考えられる<sup>16)</sup>。しかし、既に胚移植前に受精卵がキメラを生じている場合には、たとえ移植胚を 1 個に制限してもキメラの個体は生じうる<sup>15, 16)</sup>。

様々な症例報告から明らかのように、不妊治療は単に多胎率を上昇させるだけでなく、自然妊娠では稀なキメラが生じやすい環境を作り出している。したがって、不妊治療の際には生殖遺伝カウンセリングが必須であり、ART に伴うキメラのリスクを把握し安全な対策を見出すためには児の長期観察と共に分子遺伝学的解析を用いた診断が重要であろう。

#### 文 献

- 1) Strain, L., Dean, J.C., Hamilton, M.P. and Bonthron, D.T. (1998): A true hermaphrodite chimera resulting from embryo amalgamation after in vitro fertilization. *N. Engl. J. Med.*, 338, 166–169.
- 2) Souter, V.L., Kapur, R.P., Nyholt, D.R., Skogerboe, K., Myerson, D., Ton, C.C., Opheim, K.E., Easterling,

- T.R., Shields, L.E., Montgomery, G.W. and Glass, I.A. (2003): A report of dizygous monozygotic twins. *N. Engl. J. Med.*, 349, 154–158.
- 3) Miura, K. and Niikawa, N. (2005): Do monozygotic dizygotic twins increase after pregnancy by assisted reproductive technology? *J. Hum. Genet.*, 50, 1–6.
- 4) Walker, S.P., Meagher, S. and White, S.M. (2007): Confined blood chimerism in monozygotic dizygous (MCDZ) twins. *Prenat. Diagn.*, 27, 369–372.
- 5) 三浦清徳・新川詔夫 (2005) : 特集/生殖補助医療と双胎妊娠 二卵性一絨毛膜性双胎の臨床的問題点とそのフォローアップ. *産科と婦人科*, 72 (6): 741–747.
- 6) 三浦清徳・新川詔夫 (2005) : 特集/生殖補助医療のリスク 生殖補助医療とキメラ症. *ホルモンと臨床*, 53 (7): 39–44.
- 7) 三浦清徳 (2007) : (5) 双胎形成のメカニズムとその異常に関する分子遺伝学的検討. *日本産科婦人科学会雑誌*, 59 (10): 1814–1825.
- 8) 三浦清徳・増崎英明 (2008) : 今月の臨床 不妊治療と多胎/不妊治療と双胎妊娠発生機序. *臨床婦人科産科*, 62 (3): (印刷中).
- 9) Quintero, R.A., Mueller, O.T., Martinez, J.M., Arroyo, J., Gilbert-Barness, E., Hilbelink, D., Papenhausen, P. and Sutcliffe, M. (2003): Twin-twin transfusion syndrome in a dizygotic monozygotic-diamniotic twin pregnancy. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 14, 279–281.
- 10) Lambert, N. and Nelson, J.L. (2003): Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmun. Rev.*, 2, 133–139.
- 11) Hinrichs, K., Buoen, L.C. and Ruth, G.R. (1999): XX/XY chimerism and freemartinism in a female llama co-twin to a male. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 215, 1140–1141.
- 12) Rejdach, B., Słota, E. and Gustavsson, I. (2000): 60,XY/60,XX chimerism in the germ cell line of mature bulls born in heterosexual twinning. *Theriogenology*, 54, 621–627.
- 13) Falik-Borenstein, T.C., Korenberg, J.R. and Schreck, R.R. (1994): Confined placental chimerism: prenatal and postnatal cytogenetic and molecular analysis, and pregnancy outcome. *Am. J. Med. Genet.*, 50, 51–56.
- 14) Surti, U., Hill, L.M., Dunn, J., Prosen, T. and Hoffner, L. (2005): Twin pregnancy with a chimeric androgenetic and biparental placenta in one twin displaying placental mesenchymal dysplasia phenotype. *Prenat. Diagn.*, 25, 1048–1056.
- 15) Souter, V.L., Parisi, M.A., Nyholt, D.R., Kapur, R.P., Henders, A.K., Opheim, K.E., Gunther, D.F., Mitchell, M.E., Glass, I.A. and Montgomery, G.W. (2007): A case of true hermaphroditism reveals an unusual mechanism of twinning. *Hum. Genet.*, 121, 179–185.
- 16) Malan, V., Vekemans, M. and Turleau, C. (2006): Chimera and other fertilization errors. *Clin. Genet.*, 70, 363–373.

表 題

---

著 者 名

---

醫學のあゆみ 別刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

# 周産期医療における胎児・胎盤由来cell-free DNA/ mRNAの臨床的意義とその応用

Clinical significance of cell-free fetal/placental DNA/mRNA in the management of pregnant women



三浦清徳(写真) 増崎英明

Kiyonori MIURA and Hideaki MASUZAKI

長崎大学医学部産科婦人科学教室

◎母体と胎児の血液は胎盤関門によりたがいに混じり合わないと考えられていた。しかし、1997年にはじめて母体血中に胎児DNAが検出されたことをきっかけにして、採血した母体血を通じて胎児の遺伝情報を得ることが可能であることが示された<sup>1)</sup>。以来10年間の研究により、母体の血漿中に流入している胎児・胎盤由来のcell-free DNAは妊娠7週ごろから検出されることが明らかになり、胎児の性別診断、RhD型判定、染色体異常あるいは父親由来の遺伝子変異の検出などの出生前診断に用いられている<sup>2,3)</sup>。一方、母体血漿中への胎児・胎盤由来cell-free mRNA流入量は、妊娠高血圧症候群、癒着胎盤、双胎間輸血症候群などの妊娠合併症と関連していることが報告され、その定量化はabnormal placentationと関連する妊娠合併症を予測し管理する新たな分子マーカーとして注目されている<sup>2,4,5)</sup>。今後、マイクロアレイ技術を用いた母体血漿中cell-free mRNA量の網羅的な定量化により、胎児・胎盤機能の推定が可能になると期待される。



cell-free DNA, cell-free mRNA, 出生前診断, 分子マーカー, 胎盤機能

出生前に胎児の遺伝情報を得るためには、羊水穿刺、絨毛採取および臍帯穿刺などの侵襲的な検査が行われている。いずれも破水や流産などのリスクを伴うため、その回避には大きな意義がある。また、妊娠合併症のうち、妊娠高血圧症候群などには遺伝的要因の関与が知られているが、その病態には複数の因子が関与しているため、疾患発症の予測は困難である。また、胎児・胎盤機能は、超音波検査によるドプラ所見や羊水量の計測、胎児心拍数図あるいは血清hPL値や尿中E3値などのbiologicalマーカーを指標にして評価されるが、より有用な検査法の確立が望まれている。

一方、母体血漿中には胎児・胎盤由来のDNAおよびmRNA(cell-free fetal/placental DNAおよびmRNA: cff-DNAおよびcff-mRNA)が流入しており、これらは母体を通じて得られる胎児・胎盤の分子遺伝情報であり、出生前検査や胎児・胎盤機能の評価への応用が期待されている(図1)<sup>1-5)</sup>。

本稿ではまず、自験例をもとにcff-DNAを用いた出生前診断について述べる。ついで、妊娠合併症の発症予測マーカーとしてのcff-mRNA定量化の有用性と胎盤機能の推定へ向けた今後の展望について紹介する。

## cff-DNAの出生前診断への応用

母体血漿中へ流入するcff-DNAは妊娠7週ごろから検出可能であり、分娩後は速やかに血漿中から消失する<sup>2,3)</sup>。母体血漿中cff-DNAをターゲットにした出生前診断は低侵襲かつ短期間のうちに結果を得ることができるため、本検査は絨毛採取や羊水穿刺などの侵襲的検査の前に施行することが可能であるが、母体血漿中には胎児成分と母体成分とが混在しているため、両者を正確に区別して診断しなくてはならない。これまで、Y染色体上の遺伝子領域をターゲットにした胎児の性別診断、RhD遺伝子領域をターゲットにしたRhDマ



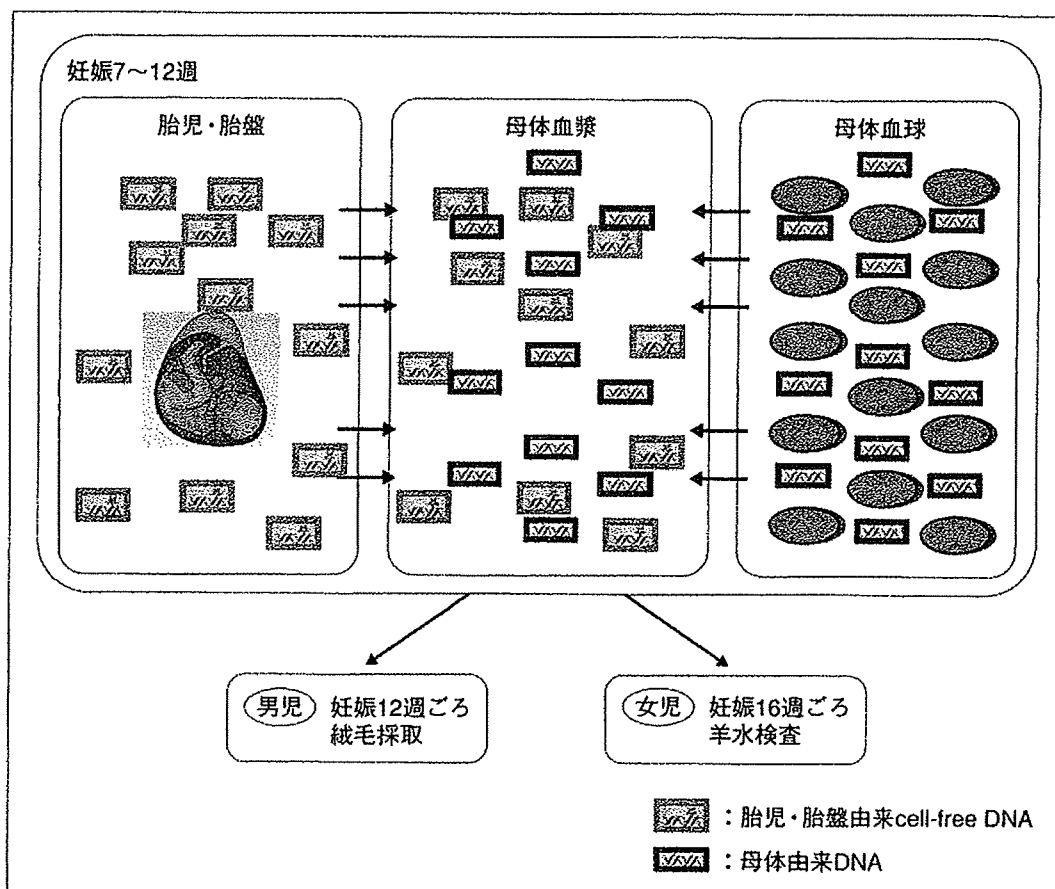


図 1 母体血漿中のcell-free DNA/mRNAとその臨床応用<sup>2)</sup>

母体血漿中には、母体および胎児・胎盤に由来した cell-free fetal/placental DNA/mRNA (cff-DNA/mRNA) が混在している。cff-DNA は妊娠 7 週から検出されるため、cff-DNA を用いた胎児の性別診断などは侵襲的検査の前に行うことが可能である。X 連鎖性疾患の出生前診断では、cff-DNA による性別診断で胎児が女児であれば、絨毛採取のリスクを回避して妊娠 16 週に羊水検査で性別を確認するという方法が考えられる。

イナスの妊婦における胎児の Rh 型判定、あるいは DNA 多型を利用した父親由来の遺伝子異常の検出などで臨床応用されている。ここでは前二者について紹介する。

### 1. X連鎖性疾患における侵襲的検査法のリスク回避

遺伝子病の出生前診断には十分な DNA 量が必要であるため絨毛採取が行われているが、本検査は羊水穿刺と比較して流産や感染などの危険性が高いため、その回避には大きな意義がある。妊婦が X 連鎖性劣性遺伝病の保因者である場合には、胎児が男児であれば正常児あるいは罹患者、女児であれば正常児あるいは保因者である。つまり、女児を妊娠していることが確認できれば、遺伝子検査を受けるために絨毛採取を行う必要はなくなる。

そこで、X 連鎖性劣性遺伝病の保因者である妊婦に対して遺伝カウンセリングを行い、イン

フォームドコンセントを得て、①まず絨毛採取を行う妊娠 11~12 週以前に母体血漿中の胎児 DNA を用いて性別診断を行い、②男児であれば妊娠 12 週に絨毛採取を行い、③女児であれば妊娠 16 週に羊水検査で性別を確認する(図 1)。そして胎児が男児であればバンドが 2 本、女児であればバンドが 1 本検出されるように、X 染色体および Y 染色体それぞれに由来した増幅産物の大きさが異なる特異的プライマーを設計した<sup>6)</sup>。レーン 1 は母体全血 DNA、レーン 2 とレーン 3 はそれぞれ妊娠 11 週と妊娠 12 週の母体血漿中 cff-DNA、レーン 4 は男児を妊娠している母体血漿中 cff-DNA、レーン 5 およびレーン 6 はそれぞれ正常核型の女性および男性の DNA コントロールである。レーン 1 からレーン 3 は X 染色体特異的なバンド(261 bp)のみが検出され、男児を妊娠している妊婦のコントロールでは X 染色体特異的なバ

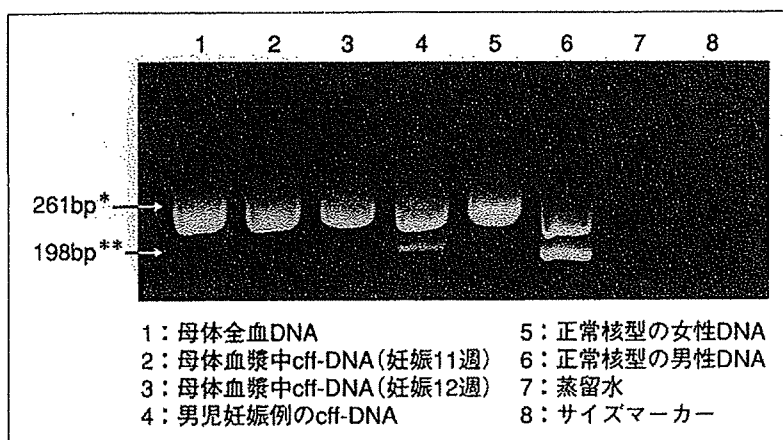


図 2 母体血漿中cff-DNAを用いた胎児の性別診断

レーン1～レーン3とレーン5ではX染色体特異的なバンド(261 bp)のみが検出され、レーン4とレーン6ではX染色体特異的なバンド(261 bp)とY染色体特異的なバンド(198 bp)の2本のバンドが認められた。したがって、妊娠中の胎児は女児であると診断された。

\*: X染色体由来のPCR産物, \*\*: Y染色体由来のPCR産物。

ンド(261 bp)とY染色体特異的なバンド(198 bp)の2本のバンドが認められた。したがって、妊娠中の胎児は女児であると診断された(図2)。本例は妊娠16週に羊水検査を行い、胎児は女児と確認され、母体血漿中cff-DNAを用いた胎児性別診断により絨毛採取に伴うリスクは回避された。

## 2. 胎児のRhD型判定

RhD マイナスの妊婦では胎児がRhD プラスの場合にはRhD型不適合妊娠となり、妊婦が抗D抗体を有していると、胎児が溶血性貧血から胎児水腫などの重篤な疾患を発症する危険性がある。胎児のRh型を知る方法として羊水穿刺あるいは絨毛採取があるが、流産などのリスク以外にも検査により母体の感作を引き起こすリスクが知られている。また、妊娠管理において免疫グロブリンを投与する場合には、その副作用もまたリスクである。一方、母体血を通じて胎児のRhD型を判定できれば、侵襲的検査によるリスクを回避できるため有用である。

そこで、胎児がRhDプラスであればバンドが2本、RhDマイナスであればバンドが1本検出されるように、それぞれRhD遺伝子とRhCcEe遺伝子に由来した増幅産物の大きさが異なる特異的なプライマーを設計した<sup>7)</sup>。RhDマイナスの妊婦2例について、レーン1～3には症例1、レーン4～6には症例2の解析結果を示す(図3)。それぞれ妊

娠中の母体全血DNAと母体血漿cff-DNAおよび分娩後の母体血漿cff-DNAをテンプレートにしてPCRを行った。症例1の妊婦血漿中には、RhD遺伝子領域の増幅産物(186 bp)とRhCcEe遺伝子領域の増幅産物(136 bp)が検出されているが、分娩後の血漿中にはRhD遺伝子領域の増幅産物が消失している。一方、症例2の妊婦ではレーン4～6にはいずれも136 bpのバンドのみが検出されているので、胎児はRhマイナスと判定された。よって、母体血漿中のcff-DNAを用いて胎児のRhD型を低侵襲的に診断しうることが確認された。

## ● cff-mRNA定量化と妊娠合併症の発症予測

妊娠悪阻、児が21トリソミー、子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群(pregnancy induced hypertension: PIH)、あるいは癒着胎盤を伴う妊婦の血漿中へ流入しているcff-DNA量は、正常妊婦におけるそれと比較して有意に上昇する<sup>2,3)</sup>。また、cff-DNAのおもな供給源は胎盤であることが報告され<sup>8)</sup>、cff-DNA定量化は妊娠合併症の分子マーカーとして期待されている。しかし、cff-DNAの定量は妊婦が男児を妊娠している場合に制限されるため、すべての妊婦に適用できないという問題点が指摘されている。その後、母体血漿中にはcff-DNAと同様にcff-mRNAも流入しており、血漿中

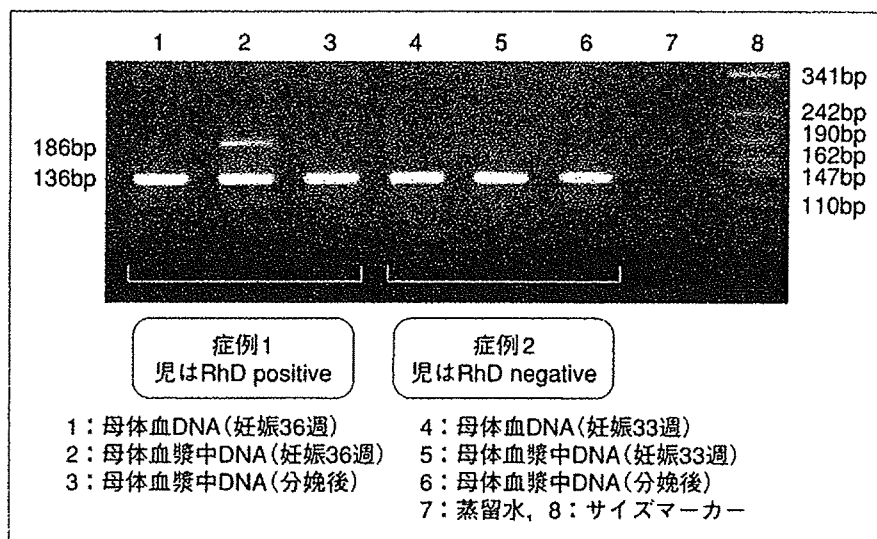


図3 母体血漿中へ流入するcff-DNAを用いたRhD型判定

症例1の妊婦血漿中には、RhD遺伝子領域の増幅産物(186bp)とRhCcEe遺伝子領域の増幅産物(136bp)が検出されているが、分娩後の血漿中にはRhD遺伝子領域の増幅産物が消失している。一方、症例2の妊婦ではレーン4~6までいずれも136bpのバンドのみが検出されているので、胎児はRhマイナスと判定された。

の cff-mRNA は断片化(degradation)に対して安定、かつリアルタイム RT-PCR 法で定量可能であることが報告された<sup>9)</sup>。胎盤特異的 cff-mRNA をターゲットにすると、胎児の性別に依存することなくすべての妊婦に応用可能であるため、cff-mRNA 定量化と妊娠合併症との関連が検討されている。

### 1. 妊娠高血圧症候群(PIH)

PIHは「妊娠20週以降、分娩後12週まで高血圧がみられる場合、または高血圧に蛋白尿を伴う場合のいずれかで、かつこれらの症状が単なる妊娠の偶発合併症によるものではないもの」と定義されている。コントロール不良の場合には、極端な子宮内胎児発育遅延、子癇発作などを発症するなど、母体・胎児の双方にとってハイリスクな疾患である。病態には血管の攣縮と子宮胎盤循環不全が関連していることが知られているが、PIHの発症を予測することは困難であり、いったん発症すると胎児成熟と母体の状態を考慮した嚴重な妊娠管理が必要になる。

母体血漿中へ流入している胎盤由来 mRNA である hCG-β, CRH および PLAC1 mRNA 量は、いずれも正常妊婦のコントロール群と比較して妊娠高血圧症候群を伴う症例において上昇する<sup>10)</sup>。

また、血管関連因子である vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor-1 (VEGFR-1), および endoglin cff-mRNA 量は PIH の重症度と関連する<sup>11)</sup>。このことから、胎盤由来 cff-mRNA 定量化は PIH 発症を推定する分子マーカーとして注目されている。

### 2. 前置胎盤を伴う症例における癒着胎盤の予測

癒着胎盤は、胎盤・絨毛が子宮筋層内に侵入することにより、胎盤の剥離が困難になる疾患である。本疾患のリスク因子のひとつに子宮組織損傷の既往が関連しており、とくに帝王切開の既往がある前壁付着の前置胎盤はハイリスクとされる<sup>12,13)</sup>。しかし、癒着胎盤の診断は胎盤娩出時にはじめて確定され、大出血している状況下では子宮摘出も考慮されるため、産科医にとって本疾患の有無を予測することは重要である。これまでも超音波ドプラ法や MRI 検査などを用いて出生前に癒着胎盤の有無を推定する試みがなされているが、その発症予知はきわめて困難といえる。

著者らは、帝王切開術の既往がある前壁付着の前置胎盤において、帝王切開時に穿通胎盤を認めたと症例を経験した<sup>4)</sup>。本例では胎盤は膀胱へ侵入しており、剥離することが不可能であったため、胎盤を子宮に残したまま帝王切開を終了した。術後

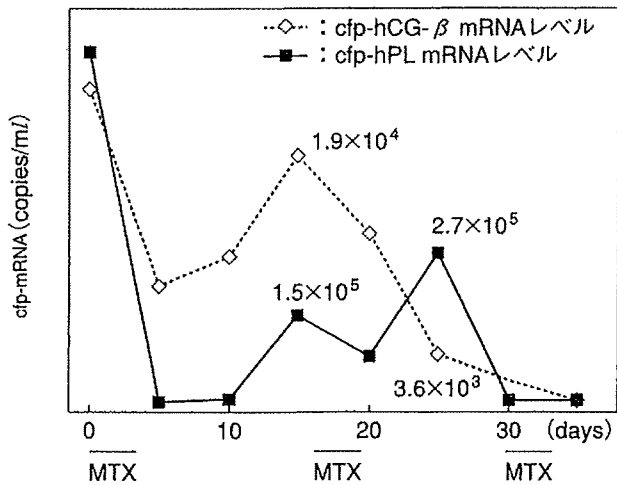


図 4 穿通胎盤の治療経過に伴うcell-free placental mRNAレベルの推移<sup>4)</sup>

MTX:メソトレキセート療法, 初回治療を day 0 とした.

にメソトレキセートを用いた化学療法を行った後, 二期的に子宮を摘出した. この間, IRMA 法による血中 hCG レベルを指標にして胎盤の状態を推定し, 同時に血漿中 cfp-hCG-β mRNA および cfp-hPL mRNA の定量化も行った. その結果, 血中 hCG レベルと血漿中 cfp-hCG-β mRNA 量は治療経過とともに低下し, 胎盤の状況を推定することが可能であった. とくに血中 hCG レベルと血漿中 cfp-hCG-β mRNA 量は, cytotrophoblast および syncytiotrophoblast における細胞効果をリアルタイムにモニターすることが可能であり, 血漿中 cfp-mRNA レベルの定量化は治療に伴う細胞の活性を鋭敏にモニターしうる可能性がある点において, 従来の IRMA 法より優れていると考えられた(図 4)<sup>4,14)</sup>. 以上のように, 血漿中 cfp-mRNA レベルの定量化は癒着胎盤の発症予測にも有用であることが期待される.

### 3. 双胎間輸血症候群(TTTS)の発症予測

TTTS は一絨毛膜双胎の 10~15%に発症する疾患で, 一児に羊水過多を, 他方の児に羊水過少を認めることで診断される. 胎盤上に存在する双胎間の血管吻合を介して循環血液量の不均衡が生じることにより発症するため, 妊娠 16~26 週末満に TTTS を発症した症例には吻合血管レーザー凝固術が行われている. しかし, 重症例の周産期予後は不良であるため, その予測は発症予防につながることを期待される. これまでに, TTTS のレー

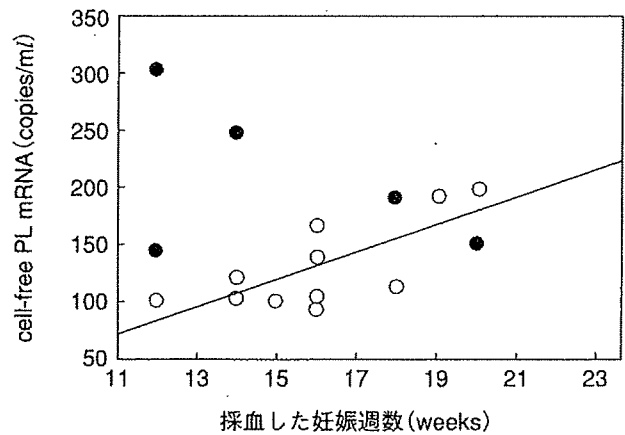


図 5 一絨毛膜双胎における母体血漿中cff-PL mRNA 量の散布図<sup>5)</sup>

いずれの症例も採血時には TTTS を発症していなかった. TTTS 群における cff-PL mRNA 流入量は, no-TTTS 群におけるそれより有意に上昇していた.

○: TTTS を発症しなかった群(no-TTTS 群),  
●: TTTS を発症した群(TTTS 群).

ザー凝固術後に cff-DNA の持続的な上昇を認めたことが報告されている<sup>15)</sup>. したがって, 遺伝子発現を反映する mRNA マーカーは TTTS に伴う循環動態の変化を予測しうるものと期待される.

著者らは一絨毛膜双胎妊娠と診断された妊婦から TTTS を発症する以前に採血して, 後に TTTS を発症した例(TTTS 群)における cff-hPL mRNA 流入量と発症しない例(no-TTTS 群)におけるそれとを比較した. すると, 前者は後者に比べて有意に cff-hPL mRNA 流入量が上昇していた(図 5)<sup>5)</sup>. さらに, 他の胎盤特異的遺伝子について検討すると<sup>16)</sup>, PSG2 および PSG3 について, TTTS 群における流入量は no-TTTS 群におけるそれと比較して有意に上昇していた. 一方, ヒトレトロウイルスについては, cff-Syncytin および cff-Syncytin-2 mRNA の TTTS 群における流入量は no-TTTS 群におけるそれと比較して有意に低下し, ADAM12 についても同様に, TTTS 群における有意な cff-mRNA 流入量の低下を認めた. いずれも trophoblast の機能あるいは胎盤形成に重要な役割を担う遺伝子群であり, 母体血漿中への cff-mRNA 流入量が遺伝子の種類により増加するものと低下するものが存在したことから, 本疾患にはさまざまな因子が影響しているものと推察され, 母体血漿中へ流入する cff-mRNA 定量化は, TTTS の発症を予測する分子マーカーになりうる