

特集

出生前・着床前診断の進歩と問題点

倉橋浩樹*

はじめに

近年の分子遺伝学的解析技術の進歩により、マイクロアレイ、次世代シーケンス(next generation sequencer: NGS)などの染色体・遺伝子疾患の診断への応用が進み、臨床検査のひとつとして広く普及したことで、出生前診断における遺伝学的検査は大きく変化した。出生前染色体検査は、顕微鏡から分子へ、すなわちアナログからデジタルへと進化し、解像度が劇的に高くなった。単一遺伝子病に対する遺伝学的検査は、単一遺伝子解析から網羅的ゲノム解析の時代へと進歩した。さらに、母体血胎児染色体検査が登場し、サンプル採取の無侵襲性という角度から大きく時代を変化させた。

一方で、胎児情報の採取が無侵襲になったとしても、胎児が罹患と判定された場合の妊娠中絶の可能性に伴う胎児の生命の問題、夫婦の心理的・身体的負担の問題は解決しない。それらを回避するための着床前診断に関しても、分子遺伝学的解析技術の進歩によって大きく精度が向上し、急速に普及しつつある。

本稿では、近年の出生前診断・着床前診断の技術的進歩と問題点について概説する。

I. マイクロアレイと出生前診断

晩婚化に伴う妊娠年齢の高年化により、染色体異数体児の出生や流産となるような染色体異数体妊娠のリスクが増加している。これらは、卵子の加齢依存性第一減数分裂分離異常に起因しており、出生前染色体検査を希望する夫婦が増加している。

従来からの出生前診断における染色体検査では、絨毛検査もしくは羊水検査で胎児・胎盤由来の細胞を得て、G分染法やFISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法で得られた染色体像やシグナルを顕微鏡で観察する手法が主流であった。現在でも多くの施設が、羊水・絨毛採取で得た細胞に対して、まず13番、18番、21番の数的異常を各々の染色体特異的プローブを用いたFISH法により迅速診断し、その後、数日間の細胞培養後にG分染法で結果を確認すると同時に、その他の染色体異常の有無を解析するという手法を採用している。高年妊娠で増加する異数体の検出が目的の場合は、この方法で十分である。

一方で、染色体微細欠失・重複症候群に関しては、超音波所見等から得られた表現型から特定の疾患を疑う場合、または前児が染色体微細欠失・重複症候群で、その次回妊娠で夫婦が心配している場合は、その疾患の責任領域特異的プローブを用いたFISH法による診断が可能である。しかし、多くの場合は特定の疾患が想定できず、欠失・重複領域のサイズによってはG分染法でも検出可能であるが、一般に見つかる染色体微細欠失・重複は数Mb以下のサイズであり、G分染法レベルでは

— Key words —
出生前診断, 着床前診断, 母体血胎児染色体検査,
マイクロアレイ, 次世代シーケンス

* Hiroki Kurahashi: 藤田医科大学総合医科学研究所
分子遺伝学研究部門

検出が困難である。

近年の分子遺伝学的解析技術の進歩により、ゲノムコピー数の変化を高解像度に、かつ網羅的に検出できるマイクロアレイ染色体検査が開発され、染色体微細欠失・重複症候群の診断に応用されている。

マイクロアレイとは、基板の上に全ゲノム領域にわたる染色体領域特異的 DNA プローブを配置したツールである。比較ゲノムハイブリダイゼーション (comparative genomic hybridization : CGH) 法では、患者ゲノム DNA と、参照とする正常ゲノム DNA を別々の色の蛍光でラベルし、同じマイクロアレイに競合的にハイブリダイゼーションして蛍光強度を測定し比較することで、患者ゲノムにおける染色体コピー数を決定する (図 1 A)。すでに小児科領域の先天異常の分野では、マイクロアレイ染色体検査は診断の第一選択とされており、本邦でも近い将来には保険診療として実装される¹⁾。私たちが 2020 年に発出した「診療において実施するマイクロアレイ染色体検査のガイダンス」を参考にされたい²⁾。マイクロアレイ染色体検査は、疾患の責任領域としてのコピー数変化を同定できるだけでなく、その領域にある表現型の責任遺伝子を特定することも可能である。

出生前診断の領域においては、米国産科婦人科学会から、超音波による胎児の形態異常を検出した場合の遺伝学的検査として、マイクロアレイ染色体検査の有用性が提唱されている³⁾。ただ、マイクロアレイ染色体検査をスクリーニング検査として行うことには、まだ越えなければならないハードルがいくつかある。

健常集団でも表現型に影響しない大きなコピー数バリエーション (copy number variation : CNV) が存在するため、マイクロアレイ染色体検査で見つかったバリエーションの正確な臨床的意義づけは難しい。疾患との関連情報や健常人のデータベースとの照合により総合的に判定するが、臨床的意義不明のコピー数バリエーション (variant of unknown significance : VUS) が数多く検出される可能性がある。本邦においては、①超音波検査などにより表現型が明らかで、G 分染法で異常が見つからな

かった場合に、さらなる高解像度の二次検査として、もしくは、② G 分染法で由来不明の異常が見つかった場合に、その由来を確定させるための二次検査としてという使われ方がされている。SNP (single nucleotide polymorphism) アレイを用いれば、コピー数が判定できるだけでなく、片親性ダイソミーや倍数体の検出も可能である (図 1 B)。

II. 母体血胎児出生前診断

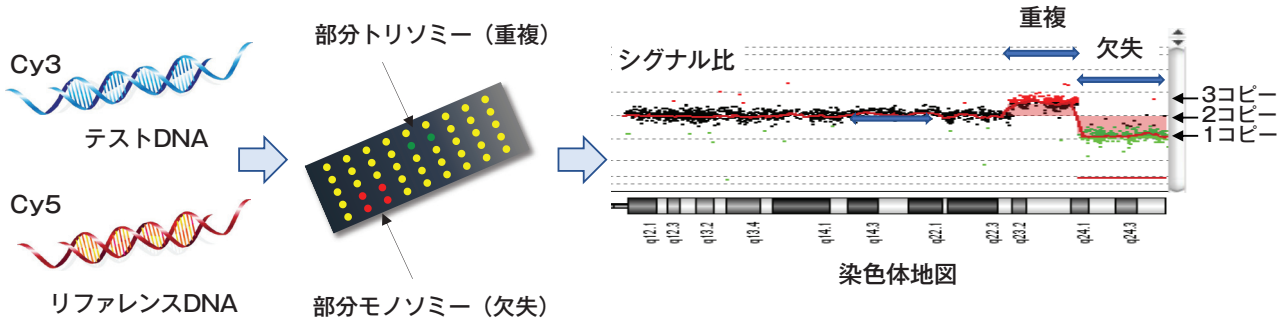
出生前染色体検査におけるもうひとつの大きな進歩は、NGS による母体血胎児染色体検査の普及である。血中に循環している短い DNA 断片のことをセルフリー DNA (cfDNA) と呼び、がんのリキッドバイオプシーに応用されているが、妊婦を採血すると、cfDNA の 5~10% 程度は胎盤絨毛シンシチオトロホプラスト細胞由来の DNA である。

妊婦の血中 cfDNA を NGS を用いて大量に解読し、染色体ごとに定量する MPS (massively parallel sequencing) 法により、胎児の染色体の核型を推定することができる (図 2 A, B)。

この方法は無侵襲的出生前遺伝学的検査 (non-invasive prenatal genetic test : NIPT) とも呼ばれ、母体の採血により無侵襲的にできる出生前診断の方法として普及し、大きく時代を変化させた。本邦では、妊娠 10~16 週に行われ、重篤な症状をもって出生する可能性のある異数体である 13 番、18 番、21 番のトリソミーに関してのみ結果開示される。

この検査の利点は陰性的中率がきわめて高いことで、検査が陰性の場合、胎児はほぼ 100% の確率でトリソミーではないため、NIPT を受検することで、妊婦の 99% 以上は羊水・絨毛検査のような侵襲的な出生前診断を回避することができる。一方で、胎児以外に原因のある偽陽性があり得るため、陽性的中率は 100% に届かず、検査が陽性の場合には確定検査としての羊水検査が必要である。採血という容易な手法で検体採取ができてしまうがために、安易に検査を受ける夫婦が増えないように、普段トリソミー児の診療をしている小

A アレイCGH法



B SNPアレイ

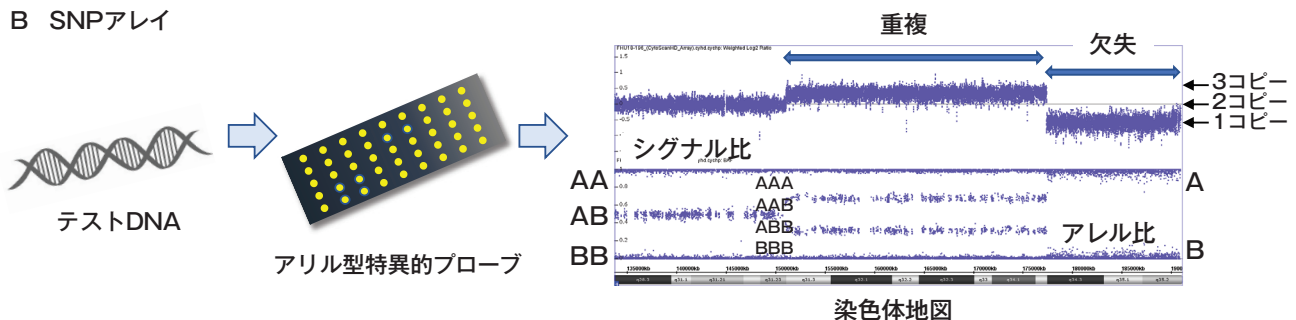


図1 2種類のマイクロアレイ・プラットフォーム

A: アレイ CGH。テスト DNA (緑ラベル) の微細欠失・重複は、参照 DNA (赤ラベル) とのシグナル値の比較でコピー数を判定する。B: SNP アレイ。AA, AB, BB は各 SNP の遺伝子型。微細欠失はヘテロ接合性の消失 (LOH) として検出されている。微細重複は逆に組み合わせパターンが増加する。各染色体領域の由来親も同定できるため、片親性ダイソミーによる LOH などの判定も可能である。

(文献8より引用改変)

児科医等も交えて、検査前に十分な遺伝カウンセリングを行うことを必須としている。日本産科婦人科学会らが策定した指針を遵守し、日本医学会の認定を受けた施設で行っている⁴⁾。ところが、本検査を提供する認定外施設が出現しビジネス化しており、NIPT 陽性者に対する十分なフォローアップが成されていないケースもあり、社会問題となっている。

前述の染色体微細欠失・重複症候群や、新生変異によるバリエーションに起因する単一遺伝子疾患を NIPT を利用して診断することも技術的には可能であり、海外の一部の地域ではすでに提供されており、本邦でも臨床研究が計画されている (図2C)⁵⁾。

Ⅲ. エクソーム解析と出生前診断

重篤な単一遺伝子病の家系における出生前診断では、個々の家系において当該疾患に対する遺伝子診断、すなわち発端者の病的バリエーションを前もって検出しておき、絨毛や羊水検査でそのバリエーションの有無を検討することにより、胎児の罹患、非罹患を判定する。したがって、個々の家系において責任バリエーションが同定されていることが必須である。多くの単一遺伝子病ではすでに原因遺伝子が同定されており、発端者の遺伝子診断も比較的容易になっている。

疾患と遺伝子が1対1対応の場合、全翻訳領域とその周辺を解析することにより、80~90%の高率で病的バリエーションが同定される。同定されたバリエーションは米国臨床遺伝ゲノム学会 (American

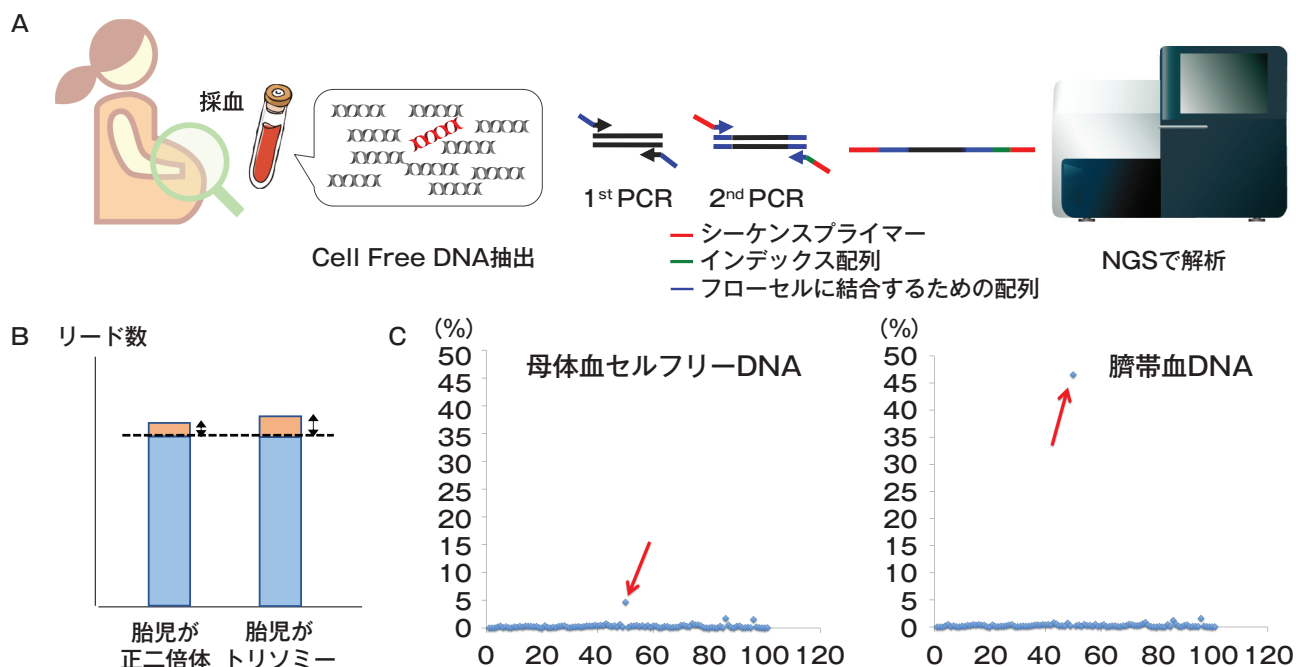


図2 無侵襲的出生前遺伝学的検査(NIPT)

A: NIPTの流れ。母体の採血を行い血漿中のセルフリーDNAをNGSで解析する。B: MPS法。染色体ごとのリード数の定量を行う。青が母体由来、赤が胎児由来。実際には区別はできず、合計として定量する。C: 新生変異によるバリエーションに起因する疾患のNIPT。NGSによるdeep sequenceを行うと、母体血中にわずかに病的バリエーションを検出する(左)。出生後の臍帯血ではヘテロで検出される(右)。

(文献8より引用改変)

College of Medical Genetics and Genomics: ACMG)の基準に従って評価され、pathogenic, likely pathogenic, VUS (variant of unknown significance), likely benign, benignの5段階に分類され、pathogenic(病的), likely pathogenic(準病的)の場合に出生前診断に応用されている⁶⁾。責任バリエーションが同定できなかった場合においても、染色体上で責任遺伝子をはさみ込むように、上流、下流に位置する多型マーカーを用いてあらかじめ責任ハプロタイプを見出しておき、連鎖解析により胎児を診断する間接法も可能である。SNV (single nucleotide variant) マーカーやマイクロサテライトマーカーのようなSTR (short tandem repeat) マーカーが用いられる。組換えに注意さえすれば、診断精度は十分に高い。

近年は、NGSによるヒトゲノムの全遺伝子、すなわち約2万種類の遺伝子の全翻訳領域の塩基配列を一度に分析する全エクソーム解析の進歩に

より、従来は診断がつかなかった希少疾患の遺伝子診断が可能となっている。本邦では未診断疾患イニシアチブ(Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases: IRUD)というオールジャパンの多施設共同研究事業の成果として、未診断の孤発性希少疾患の患者において、両親と罹患者のトリオサンプルに対して全エクソーム解析を行うことで、30~40%の症例に責任バリエーションが同定されている。

診断結果は、予後・合併症予測、治療情報のみならず、両親には次子再発率の情報提供ができる。健康な両親から生まれた孤発例の場合、新生変異による優性(顕性)遺伝病か、劣性(潜性)遺伝病かで次子再発率の違いが大きいため、両親にとって早期に遺伝学的診断がつくことは重要である。重篤な症状で次子再発率の高い遺伝形式の場合、出生前診断や、次項で述べる着床前診断を提案できる環境も整いつつある。出生前診断自体においても、いずれは網羅的出生前診断として全エクソ-

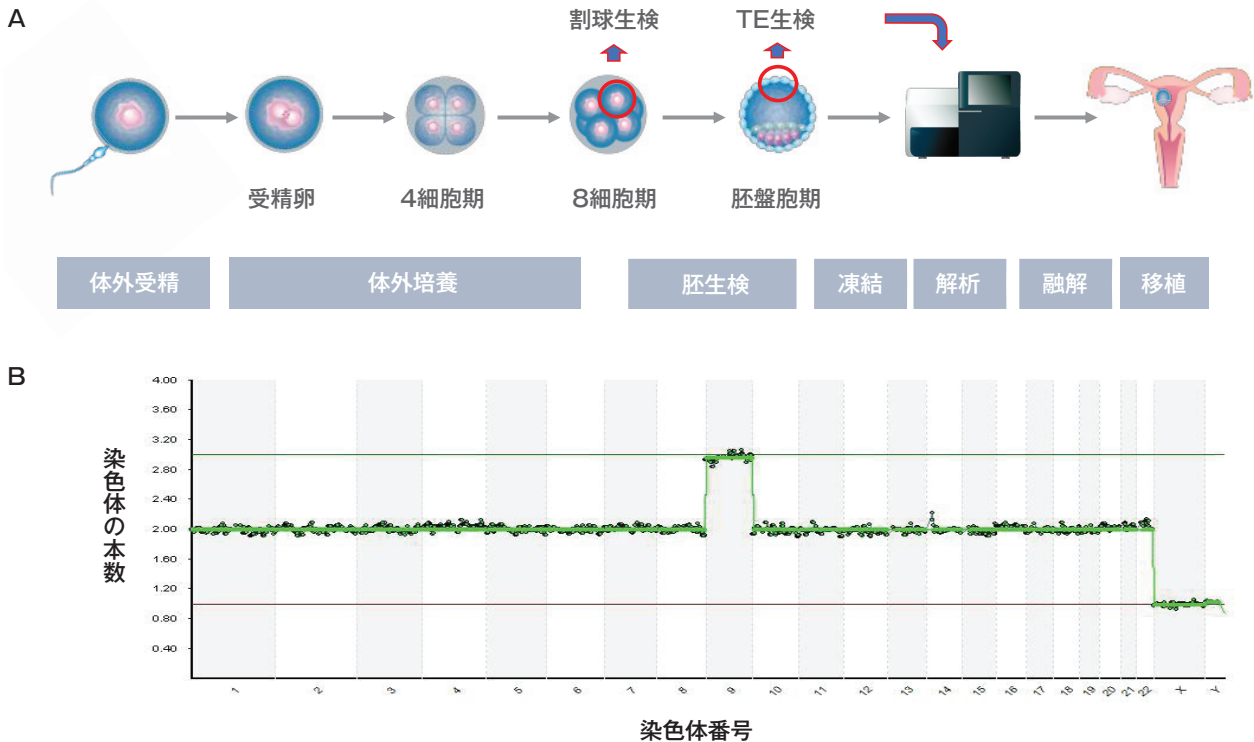


図3 着床前診断(PGT)

A: 着床前診断の流れ。体外受精を行い複数の受精卵を作成する。数日後に各々の受精卵から生検を行い、遺伝子・染色体解析し、罹患・非罹患を決定、非罹患胚を子宮に移植する。B: NGS 染色体検査。TE 生検によって得た5細胞からDNAを抽出し、全ゲノム増幅後、NGSを行い染色体に配置したウインドごとのリードの定量を行う。図は9番トリソミー

(文献8より引用改変)

ムが使われる時代が来る可能性はあるが、現時点ではマイクロアレイと同様に、VUSと判定されるバリエントが結果報告書にリスト化される可能性があり、かえって悩ましい状況を作り出すことが懸念される。網羅的解析に必ず随伴する二次的所見の問題も含め、その実用化にはまだ解決しなければならない問題が残っている。

IV. 網羅的ゲノム解析手法と着床前診断

出生前診断においては、胎児が罹患と判定された場合の妊娠中絶の可能性に伴う胎児の生命の問題、夫婦の心理的・身体的負担の問題が大きく、NIPTの普及により胎児の遺伝情報が無侵襲的に入手できたとしても、それらの問題が解決するわけではない。その重大な問題を回避することができる方法が着床前診断である。

重篤な遺伝性疾患や染色体疾患の罹患児が出生

するリスクの高い夫婦に対し、体外受精を行い複数の受精卵を作成する。体外で数日間培養した後、それぞれから一部の細胞を生検サンプルとして採取し、遺伝子・染色体分析を行い、非罹患胚を子宮に移植するという方法である(図3)。従来は3日胚、すなわち8細胞期において割球生検を行い、割球1細胞を材料に、単一遺伝子疾患の遺伝子解析や、FISH法を用いた染色体分析を行っていた。しかし、たった1細胞を材料にしていることに起因する問題点、すなわちFISH法の場合は、シグナル数のカウント時のテクニカルエラー、遺伝子解析の場合は、アレルドロップアウトと呼ばれるアレル間の増幅バイアスによる誤判定があり、診断精度は高くなかった。

近年、体外での受精卵の培養技術の進歩により胚盤胞まで培養可能となり、5日胚、すなわち約100細胞から将来の胎児発生に寄与しない栄養外

胚葉(trophectoderm: TE)細胞を 5~10 個採取し、その全ゲノム増幅産物で遺伝子・染色体解析を行うことにより、診断精度が格段に向上した⁷⁾。

着床前診断は日本産科婦人科学会の「着床前診断に関する見解」という指針に基づいて実施され、重篤な単一遺伝子疾患(preimplantation genetic testing for monogenic: PGT-M)、均衡型染色体構造異常に起因する反復流産(preimplantation genetic testing for structural rearrangement: PGT-SR)に対して、学会による症例ごとの個別審査で、技術的、倫理的観点から審議され、承認を受けたのちに実施される。

一部の反復性不妊治療不成功例や、染色体構造異常とは無関係の反復流産に対しても、受精卵の染色体異数性が原因である可能性があり、最近、それらの不妊治療の効率を上げる目的で、受精卵の網羅的染色体検査が学会の特別臨床研究として開始され、着床前胚染色体異数体検査(preimplantation genetic testing for aneuploidy: PGT-A)と呼ばれている。このように急速に普及しつつある着床前診断に関して、その適応疾患の見直しが議論されている。

前述のように、着床前診断は出生前診断の問題点の一部を回避できる技術であるため、出生前診断よりも適応は広くとるべきであるという考えもある一方で、酵素補充や遺伝子治療などの進歩に伴い不適応となる可能性のある疾患の存在も含めて議論されている。

おわりに

NIPT や着床前診断のような技術革新によって、出生前診断はいろいろな意味でハードルが低くなりつつある。その一方で、検査を受ける夫婦が一旦立ち止まって、生命の重みや、罹患者の思いなどに考えを巡らせる機会を失う可能性がある。すなわち、優生学的な考えが意識の下に潜り込むことが懸念され、大変危険である。

今後、ポリジェニックリスクスコア等の遺伝統計学が進歩すれば、子どもの将来の体格や才能などの特性まで診断可能になり、エンハンスメントを求める夫婦も現れるであろう。さらには受精卵

ゲノム編集と組み合わせたデザイナーベビーという概念も技術的には可能であり、立法化も視野に入れた国際的論争となっている。このような革新的科学技術の応用は、常に倫理問題と一体化させて議論するべきであり、特にこの出生前診断の分野では、障がい者差別の禁止を望む患者側、そして、リプロダクティブライツといった検査を望む側、両当事者の思いが相容れない部分があり、議論は尽きない。よりよい出生前診断の社会実装を目指して、一般人への遺伝教育のような啓発活動や、遺伝カウンセラーなどの人材育成を平行して進めていくことが重要になってくるであろう。

利益相反

本論文に関して、筆者が開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Miller DT, et al: Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; **86**: 749-764.
- 2) 診療において実施するマイクロアレイ染色体検査のガイダンス. https://plaza.umin.ac.jp/p-genet/downloads/20200330_microarray_guidance.pdf. 2021 年 2 月 2 日閲覧
- 3) American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 581: the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 2013; **122**: 1374-1377.
- 4) 母体血を用いた新しい出生前遺伝学的検査に関する指針. http://jams.med.or.jp/rinshobukai_ghs/policy.pdf. 2020 年 2 月 2 日閲覧
- 5) Terasawa S, et al: Multiplex PCR in noninvasive prenatal diagnosis for FGFR3-related disorders. *Congenit Anom (Kyoto)* 2019; **59**: 4-10.
- 6) Richards S, et al: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; **17**: 405-424.
- 7) Kurahashi H, et al: Preimplantation genetic diagnosis/screening by comprehensive molecular testing. *Reprod Med Biol* 2015; **15**: 13-19.
- 8) 倉橋浩樹: 遺伝子診断の臨床応用 出生前診断. *日本医師会雑誌* 2021; **149**(11): 1970-1974.