博士（医　学）　東　　正　樹

学 位 論 文 題 名

A novel method for detection of Down syndrome using four serum markers

（4種類の血清マーカーを用いた新しいダウン症の検出方法）

学位論文内容の要旨

I. 緒言

近年、胎児ダウン症において母体血清 alpha-fetoprotein(AFP), unconjugated estriol (uE3)が低値を、また human chorionic gonadotropin (hCG)が高値を示すことが報告され、出生前にこれらの母体血清マーカーによる胎児ダウン症の検出が試みられている。現在、胎児ダウン症の危険率を母体血清 AFP , uE3 , hCG に年齢を組み合わせ、それに妊娠週数・母体体重・人種などの因子を加えて算出したものが、"トリプルマーカーテスト"として多くの国々で汎用されているが、この算出法は、母体の年齢固有の危険率が大きく反映されるため、ハイリスクグループである高齢妊娠では検出感度は高いが、偽陽性率も高値を示すという欠点を持つ。

本研究では、レクチン親和性電気泳動法により、レンズマメレクチンと親和性をもつ AFP の分画比(AFP-L3(%))の測定が、出生前における胎児ダウン症の検出において有用か否かを検討すると同時に、従来用いられてきた母体血清マーカー(AFP, hCG, uE3)に AFP-L3 を加え、これらをスコアリングして比較することで、年齢因子に影響を受けることなく胎児ダウン症の検出効率を向上させ得るかを検討した。

II. 材料と方法

対象は、1989 年から 1999 年の期間に、北海道大学医学部附属病院産婦人科において、胎児ダウン症のハイリスクグループとして羊水穿刺を施行し、得られた胎児細胞の染色体分析により胎児ダウン症と診断された妊婦 31 例（母体年齢 38.0±3.9 歳、妊娠週数 17.1±1.8 週、mean±SD）と胎児染色体核型が正常と診断された妊婦 530 例（母体年齢 35.9±4.8 歳、妊娠週数 16.3±1.0 週）とした。妊娠 14 週から 20 週の間に、文書によるインフォームドコンセントを得た後母体血清を採取し、測定まで-20 ^{0}C で凍結保存した。AFP-L3%は、レンズマメレクチンを用いたレクチン親和性電気泳動後、可視化したバンドをデンシトメーターで測定し、各分画比を全バンドの総和に対する比率で表した。AFP, hCG, uE3 は市販の測定キットにより測定し、multiple of the median (MoM) 値で表した。

年齢因子を排除し母体血清マーカーのみで診断するため、各母体血清マーカーをスコアリングした。スコア 1 点は、胎児正常群での各マーカーの中央値に基づき、30.0 < AFP-L3(%) ≦ 43.0、0.5 ≦ AFP(MoM)<1.0, 0.5 ≦ uE3(MoM) < 1.0、を 1 点とした。hCG は胎児正常群でも広範囲に分布しているため、2.0 ≦ hCG(MoM) < 2.5 を 1 点とした。スコア 2 点は、各母体血清マーカーを単独で用いたときの約 5%の偽陽性率でのカットオフ値をもとに決定し、43.0 < AFP-L3(%)、AFP(MoM) < 0.5、2.5 ≦ hCG(MoM)、uE3(MoM) < 0.5 を 2 点とした。これらの総和を用いて、胎児ダウン症検出おける感度と偽陽性率を検討した。また、本検出法を 35 歳未満、35 歳以上、40 歳以上と母体年齢別に分け診断効率を検討した。

解析は後方視的におこない、統計学的検定には、Mann-Whitny U-test を用いた。

III. 結果

1. AFP-L3(%)の有用性

AFP-L3(%)は、胎児正常群では 30.4（4.7-54.5）（median, range)、胎児ダウン症群では 42.0（26.5-54.3）で、胎児ダウン症群で有意に高値を示した（$p<0.0001$)。AFP-L3(%)を単独で用いた場合、5%の偽陽性率で感度は 45.2%であった。

2. 各母体血清マーカーのスコアリングによる胎児ダウン症の検出

スコアリングした AFP、hCG、uE3 の 3 種の母体血清マーカーによる検討では、カットオフ値 3 点で感度 61.3%、偽陽性率 7.0%であった。AFP-L3(%)を加えた 4 種の母体血清マーカーでは、カットオフ値を 4 点とした場合、偽陽性率 5.1%で 83.9%の感度が得られた。また、カットオフ値を 3 点とした場合、20.9%の偽陽性率で 90.3%の感度が得られた。

3 母体年齢別の診断効率

4 種類の母体血清マーカーを用い、カットオフ値を 4 点とした場合、35 歳未満では、感度 100%、偽陽性率 7.7%、35 歳以上では、感度 81.5%、偽陽性率 4.1%、40 歳以上では、感度 83.3%、偽陽性率 2.0%であり、高齢妊娠で偽陽性率の上昇は認められなかった。

IV. 考察

胎児ダウン症の発生率は母体年齢の上昇とともに増加する。35 歳以上もしくは、40 歳以上の高齢妊婦に対し、希望があれば羊水穿刺による胎児染色体検査が行われている。しかしながら羊水穿刺は、流産、破水などの胎児損失のリスクを伴うことが知られており、1984 年 Merkatz らにより胎児ダウン症において母体血清 AFP 値が低値を示すことが報告されて以来、胎児ダウン症と関連のある多くの母体血清マーカーが研究されてきた。

本研究において、胎児ダウン症では母体血清 AFP-L3(%)は有意に高値を示し、胎児ダウン症検出の有用な母体血清マーカーの一つであることが確認された。AFP-L3(%)の増加は、レンズマメレクチンと結合性を持つ AFP 分画、すなわち糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコース残基が結合した AFP 分画の増加を示しているが、正常妊娠における母体血清の AFP-L3(%)は、妊娠の経過に伴い漸減することが知られており、これは妊娠経過に伴う胎児肝臓の成熟度を表していると考えられている。したがって、胎児ダウン症における母体血清 AFP-L3(%)の高値は、ダウン症胎児の肝臓の未熟性を反映していると考えられる。また、血清 AFP 濃度と AFP-L3(%)の間には相関は認められないことが報告されており、AFP と AFP-L3(%)は互いに独立した母体血清マーカーになる得ると考えられる。

出生前の胎児ダウン症の検出において、母体血清マーカーは単独で用いると検出率が低く、そのためそれらのいくつかを組み合わせて用いられている。現在、我が国の産科臨床の場においては、AFP, hCG, uE3 を組み合わせたトリプルマーカーテストは、羊水検査を希望しないハイリスク妊婦や、ローリスク妊婦であっても本人と家族の強い希望がある場合、検査結果の持つ意味を十分に説明し理解を得た後に、一つの診療情報として提供されている。しかし本邦におけるトリプルマーカーテストは、その診断効率が十分であるとは言い難く、また先に述べたような高齢妊娠における偽陽性率が高値という問題点を持つため、より信頼性の高い検出方法が求められてきた。本研究により、AFP, hCG, uE3 の MoM 値に AFP-L3(%)を加えた 4 種の母体血清マーカーを出生前にスコアリングして比較する方法は、従来の方法とは異なり母体年齢に影響を受けることなく、より高い診断効率により胎児ダウン症を検出しうる方法であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　西　　信　三

副　査　　教　授　　石　橋　輝　雄

副　査　　教　授　　藤　本　征一郎

学 位 論 文 題 名

A novel method for detection of Down syndrome using four serum markers

（4種類の血清マーカーを用いた新しいダウン症の検出方法）

胎児ダウン症において母体血清 alpha-fetoprotein(AFP)、unconjugated estriol (uE3)が低値を、また human chorionic gonadotropin (hCG)が高値を示すことから、これらの母体血清マーカーによる胎児ダウン症の出生前検出が多くの国々で試みられている。この検出法には、母体の年齢固有の危険率が大きく反映されるため、ハイリスクグループである高齢妊娠では検出感度は高いが、偽陽性率も高値を示すという欠点を持つ。

本研究では、レンズマメレクチンと親和性をもつ AFP の分画比（AFP-L3(%))の測定が、出生前における胎児ダウン症の検出において有用か否かを検討すると同時に、従来用いられてきた母体血清マーカー(AFP, hCG, uE3)に AFP-L3 を加え、これらをスコアリングすることで、年齢因子に影響を受けることなく胎児ダウン症の検出効率を向上させ得るかを検討した。

1989 年から 1999 年の期間に、北海道大学医学部附属病院産婦人科において、胎児ダウン症のハイリスクグループとして羊水穿刺を施行し、染色体分析により胎児ダウン症と診断された妊婦 31 例（母体年齢 38.0±3.9 歳、妊娠週数 17.1±1.8 週、mean±SD）と胎児染色体核型が正常と診断された妊婦 530 例（母体年齢 35.9±4.8 歳、妊娠週数 16.3±1.0 週）を対象とした。母体血清 AFP-L3 は、レンズマメレクチンを用いたレクチン親和性電気泳動後、各分画比を全バンドの総和に対する比率（%）で表した。AFP, hCG, uE3 は市販の測定キットにより測定し、multiple of the median (MoM) 値で表した。

年齢因子を排除し母体血清マーカーのみで診断するため、各母体血清マーカーをスコアリングした。スコア 1 点は、胎児正常群での各マーカーの中央値に基づき、30.0<AFP-L3(%)≦43.0、0.5≦AFP(MoM)<1.0、0.5≦uE3(MoM)<1.0、を 1 点とした。hCG は胎児正常群でも広範囲に分布しているため、2.0≦hCG(MoM)<2.5 を 1 点とした。スコア 2 点は、各母体血清マーカーを単独で用いたときの約 5%の偽陽性率でのカットオフ値をもとに決定し、43.0<AFP-L3(%)、AFP(MoM)<0.5、2.5≦hCG(MoM)、uE3(MoM)<0.5 を 2 点とした。これらの総和を用いて、胎児ダウン症検出における感度と偽陽性率を検討した。

AFP-L3(%)は、胎児正常群では 30.4（4.7-54.5）（median, range)、胎児ダウン症群

では 42.0（26.5-54.3）で、胎児ダウン症群で有意に高値を示した（p<0.0001）。スコアリングによる胎児ダウン症の検出は、カットオフ値 3 点で感度 61.3%、偽陽性率 7.0%であった。3 種の母体血清マーカーに AFP-L3(%)を加えた 4 種では、カットオフ値を 4 点とした場合、偽陽性率 5.1%で 83.9%の感度が得られた。4 種類の母体血清マーカーを用い、カットオフ値を 4 点とした場合、35 歳未満では、感度 100%、偽陽性率 7.7%、35 歳以上では、感度 81.5%、偽陽性率 4.1%、40 歳以上では、感度 83.3%、偽陽性率 2.0%であり、高齢妊娠で偽陽性率の上昇は認められなかった。

公開発表に際し、副査の石橋教授より、AFP-L3 (%)算出式の分母について、分母を AFP 濃度にした場合の感度の上昇について、胎児ダウン症での AFP-L3 の絶対量の増加について、胎児ダウン症での AFP-L3 以外の糖鎖分画について、3 種の各血清マーカーが母体・胎盤・胎児の何を反映しているのかについて、などの質問があった。主査の西教授から、羊水中の AFP-L3 濃度について、胎児ダウン症児の血清中の AFP-L3 の測定について、AFP-L2 と AFP-L3 の電気泳動上の位置差が出る理由について、質問があった。次いで副査の藤本教授からは、AFP-L2 によるダウン症診断の可能性、臨床上好ましい偽陽性率の範囲、ダウン症以外の染色体異常の本スコアリングシステムによる検出、などについて質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例の統計学的解析結果、これまでの文献的情報、自身の臨床研究の経験などをもとに概ね妥当な回答をなしえた。

審査員一同は、胎児ダウン症の母体血清マーカーによる検出効率の向上を可能にした本研究の臨床的意義を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。