

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4245666号  
(P4245666)

(45) 発行日 平成21年3月25日(2009.3.25)

(24) 登録日 平成21年1月16日(2009.1.16)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q</b> 1/68	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/68 A
<b>C 1 2 N</b> 15/09	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00 Z N A A

請求項の数 15 (全 23 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平10-538290                  (86) (22) 出願日 平成10年3月4日(1998.3.4)                  (65) 公表番号 特表2001-513648(P2001-513648A)                  (43) 公表日 平成13年9月4日(2001.9.4)                  (86) 国際出願番号 PCT/GB1998/000690                  (87) 国際公開番号 W01998/039474                  (87) 国際公開日 平成10年9月11日(1998.9.11)                  審査請求日 平成17年1月25日(2005.1.25)                  (31) 優先権主張番号 9704444.0                  (32) 優先日 平成9年3月4日(1997.3.4)                  (33) 優先権主張国 英国(GB)</p>	<p>(73) 特許権者                  アイシス・イノベーション・リミテッド                  イギリス国オックスフォード オーエック                  ス1・3ユービー, サウス・パークス・ロ                  ード 2                  (74) 代理人                  弁理士 社本 一夫                  (74) 代理人                  弁理士 今井 庄亮                  (74) 代理人                  弁理士 増井 忠式                  (74) 代理人                  弁理士 栗田 忠彦                  (74) 代理人                  弁理士 小林 泰</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非侵入性の出生前診断

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中の胎児起源の父系遺伝する核酸の存在を検出することからなる、妊婦からの母親の血清または血漿サンプルに実施される検出方法。

【請求項2】

検出できるように胎児核酸を増幅することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

ポリメラーゼチェーンリアクションにより胎児核酸を増幅する、請求項2記載の方法。

【請求項4】

少なくとも一つの胎児配列特有のオリゴヌクレオチドプライマーを増幅において使用する、請求項2または3記載の方法。

【請求項5】

Y染色体からの胎児核酸配列の存在を検出する、請求項1ないし4の何れか1項記載の方法。

【請求項6】

父系遺伝の非Y染色体の胎児核酸の存在を検出する、請求項1ないし4の何れか1項記載の方法。

【請求項7】

核酸がRhD遺伝子である、請求項6記載の方法。

【請求項8】

10

20

RhD陰性母親において胎児のRhD遺伝子型決定をするための、請求項7記載の方法。

【請求項9】

胎児の性別を決定するための、請求項5記載の方法。

【請求項10】

母親の血清または血漿中の胎児核酸配列の濃度を測定することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項11】

母親の血清または血漿中の胎児核酸配列の濃度の測定を定量性PCRにより行う、請求項10記載の方法。

【請求項12】

母親の血清または血漿中の胎児DNAレベルが正常よりも高いかまたは低い場合の、母親または胎児の状態を検出するための、請求項10または11記載の方法。

【請求項13】

子癇前症の検出のための、請求項12記載の方法。

【請求項14】

胎児の染色体異数性の検出のための、請求項12記載の方法。

【請求項15】

胎児の染色体異数性がダウン症候群である、請求項14記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、非侵入性技術を用いた出生前検出方法に関する。特に、本発明は、母親の血液サンプル中からの血清または血漿中の胎児の(foetal)核酸を検出することによる出生前診断に関する。

胎児の異常を検出するためおよび性決定のための慣用の出生前スクリーニング方法は、羊水穿刺および絨毛膜絨毛サンプリングのような侵入性技術に由来する胎児サンプルを用いる。これらの技術は、注意深い扱いを必要とし、母親および妊娠に対してある程度の危険を提示する。

より最近、母親の血液または血清サンプルを用いる、胎児の異常および起こり得る合併症を予測する技術が工夫されてきた。共通に用いられる3つのマーカーは、ダウン症候群および神経管欠損をスクリーニングするための、アルファ-フェトプロテイン(AFP-胎児起源の)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)およびエストリオールを含む。母親の血清も、染色体異数性および神経管欠損の生化学上のスクリーニングに共通に用いられる。母親と胎児の間の有核細胞の通過は、現在よく知られている現象である(Lo et al 1989; Lo et al 1996)。非侵入性出生前診断のための母親の血液中の胎児細胞の使用(Simpson and Elias 1993)は、慣用の侵入性技術に関連する危険を回避する。WO 91/08304は、母親の血液中の胎児細胞から得られた胎児DNAを用いた出生前遺伝決定法を記載する。分析のための胎児細胞の富裕化および単離において、顕著な前進があった(Simpson and Elias 1993; Cheung et al 1996)。しかしながら、これらの技術は時間を浪費するかまたは高価な装置を必要とする。

最近、分子診断のための血漿または血清に由来するDNAの使用に興味が増がれてきた(Mulcahy et al 1996)。特に、腫瘍DNAが、数人の患者の血漿または血清においてポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)により検出できることを証明した(Chen et al 1996; Nawroz et al 1996)。

GB 2 299 166は、PCRに基づく技術を用いたK-rasおよびN-ras遺伝子の変異の検出による、非侵入性の癌診断を記載する。

今発見されたのは、胎児のDNAが母親の血清または血漿サンプル中で検出可能なことである。これは驚くべき且つ予測されない発見である;母親の血漿は、まさに、母親の血液の中の胎児細胞を用いた非侵入性出生前診断を研究する研究者により日常的に捨てられる物質である。検出速度は、匹敵する体積の全血から抽出された有核血液細胞DNAを用いたよりも、血清または血漿を用いた方が、かなり高い。事実、全DNAの%として表現される母親の血漿中の胎児DNAの濃度は、細胞画分に関して、ほぼ0.001%からたった0.025%までの

10

20

30

40

50

通常の比率に比して、0.39%（妊娠初期に測定された最低濃度）から11.4%（妊娠後期）と測定された（Hamada et al 1993）。胎児DNAが母親の血漿または血清において見いだされることは重要であるが、なぜならば、これは、そのDNAが凝血過程の人工物でないことを示唆するからである。

本発明は、妊娠したメスからの母親の血清または血漿サンプルに実施される検出方法を提供し、該方法は、サンプル中の胎児起源の核酸の存在を検出することからなる。本発明は、即ち、出生前診断方法を提供する。

本明細書にて用いられる用語「出生前診断」は、母親の血清または血漿中の胎児DNA自身または胎児DNAの量と質の何れかに関する、あらゆる母親または胎児の症状または特性の測定を包含する。包含されるのは、性決定、および胎児の異常の検出であり、例えば、染色体の異数性または単純な変異であってよい。母親の血清または血漿に存在する胎児DNAの正常量よりも高くするかまたは低くする子癩前症等の妊娠に関連する症状の検出および監視も含まれる。本発明にしたがった方法において検出される核酸はDNA以外の種類、例えばmRNAであってよい。

母親の血清または血漿サンプルは、母親の血液に由来する。10  $\mu$  l ほどの血清または血漿を用いることができる。しかしながら、正確さを増すためには、より豊富なサンプルを用いることが好ましい。必要なサンプルの量は、検出される症状または特性に依存してよい。何れにせよ、採取に必要とされる母親の血液量は少ない。

母親の血液サンプルからの血清または血漿の調製は、標準技術により実施される。血清または血漿は、通常は次に核酸抽出工程に供される。適切な方法は、本明細書中の実施例に記載された方法類およびそれらの方法の変更物を含む。可能な別法は、Frickhofen and Young (1991) により記載された、制御された加熱方法を含む。他の適切な血清および血漿の抽出方法は、プロティナーゼK処理、続くフェノール/クロロホルム抽出である。大量の母親のサンプルからのDNAまたはRNAの精製を可能にする、血清または血漿の核酸の抽出方法は、分析のための胎児核酸の量を増加させ、即ち正確性を改良する。配列に基づく富裕化方法も、特に胎児核酸配列を富裕化するために、母親の血清または血漿に用いることができた。

サンプル中の胎児DNA配列の増幅を通常は実施する。標準核酸増幅系を用いることができ、PCR、ライゲースチェインリアクション、核酸配列に基づく増幅（NASBA）、分枝化DNA法等を含む。好ましい増幅方法はPCRを含む。

本発明による方法は、Y染色体の存在を検出することにより実施してよい性決定に特に有用であってよい。本明細書において証明されるのは、ほんの10  $\mu$  l ほどの血清または血漿を用いることにより、血漿に関しては80%、そして血清に関しては70%の検出速度が達成できる。1 ml より多い母親血漿または血清の使用は、100%の正確な検出速度を達成することが示された。

本発明による方法は、母親には所有されず、しかも例えば胎児に疾患表現型を付与する遺伝子であるかもしれない、あらゆる父系遺伝配列の検出に適用することができる。例が包含するのは、

a) Rh陰性（rhesus negative）の母における胎児RhD体質測定（Lo et al 1993）。これは可能であるが、なぜならば、RhD陰性の人において不在のRhD遺伝子をRhD陽性の人所有するからである。よって、RhD陰性の母の血漿および血清中のRhD遺伝子配列の検出が、RhD陽性胎児の存在の指標となる。このアプローチは、母親の血漿および血清中の胎児のRhDのmRNAの検出に適用してもよい。

b) ヘモグロビノパシー（Camaschella et al 1990）。ベータグロビン遺伝子中の450以上の変異がベータ地中海貧血を引き起こすことが知られてきた。父親および母親が別の変異を有するなら、父系変異を母親の血漿および血清上の増幅標的として使用することができ、それにより、胎児が冒されているかもしれない危険性を評価する。

c) 父系遺伝DNA多形または変異。Yまたは非Y染色体の何れかの上に存在する父系遺伝DNA多形または変異は、母親の血漿および血清中で検出されて連鎖分析により特定の疾患により冒されている胎児の危険性を評価することができる。さらに、この種の分析を用

10

20

30

40

50

いて、性決定等の診断分析の前に、特定の母親の血漿または血清サンプル中の胎児の核酸の存在を確認することもできる。この適用は、多形マーカーのパネルを用いて父親および母親の予めの遺伝子型決定を必要とし、次に父親には存在して母親には存在しない検出用対立遺伝子が選択される。

血漿または血清に基づく本発明による非侵入性出生前診断方法は、ダウン症候群および他の染色体異数性のスクリーニングに適用することができる。これがなされるかもしれない2つの可能な方法は以下のとおりである：

a) 染色体異数性、例えばダウン症候群を有する胎児の妊娠においては、母親の血液中に循環する胎児細胞のレベルが正常胎児の妊娠におけるよりも高いことが見いだされた ( Bianchi et al 1996 )。胎児DNAが母親の血漿および血清中に存在するとの本明細書に開示された驚くべき発見に続き、母親の血漿および血清中の胎児DNAレベルが、正常の妊娠におけるよりも、胎児が染色体異数性を有する妊娠におけるほうが高いことも証明された。母親の血漿および血清中の胎児核酸の定量性検出、例えば定量性PCRアッセイを使用することにより、染色体異数性に関して妊娠女性をスクリーニングすることができる。

b) 第2の方法は、別の染色体上の胎児DNAマーカーの定量を含む。例えば、ダウン症候群に冒された胎児に関しては、胎児の染色体21に由来するDNAの絶対量は、他の染色体の量よりも通常は大きい。極めて正確な定量性PCR技術、例えばリアルタイム定量性PCR ( Heid et al 1996 ) の最近の開発は、この種の分析を促進する。

母親の血清または血漿中の胎児の核酸のレベルの正確な定量の他の適用は、特定の胎盤病理学、例えば前子癇症の分子の監視における。母親の血清および血漿中の胎児DNAの濃度は、前子癇症において上昇する。これは、おそらく、生じる胎盤の損傷による。

本明細書に記載された核酸に基づく診断法を存在する出生前スクリーニングプログラムに取り込むことが可能であることは認識される。性決定は妊娠 ( gestation ) の7から40週の妊娠 ( pregnancies ) に首尾よく実施されてきた。

添付の図面において、

図1は、対照の妊娠に比した異数体妊娠における増加した胎児DNAを示し；

図2は、対照の妊娠に比した前子癇症における増加した胎児DNAを示し；

図3は、リアルタイム定量PCRのための増幅曲線および閾値サイクルを示し；

図4は、妊娠の異なる段階における多くの対象に関する母親サンプル中の胎児DNA濃度を示す。

本発明は、以下の実施例において例示されるが、実施例は如何なる意味においても本発明を限定することを意味しない。

実施例

#### 実施例 1

性決定のための胎児DNAの分析

患者

Nuffield Department of Obstetrics & Gynaecology, John Radcliffe Hospital, Oxford に入院した妊婦を、羊水穿刺または分娩前に募集した。この計画の倫理的承認は、Central Oxfordshire Research Ethics Committeeから得た。インフォームドコンセントは、各々のケースにおいて求められた。5から10mlの母親の末梢血をEDTAチューブおよび素のチューブ中に回収した。羊水穿刺を経た女性については、手続の前に母親の血液をいつも集め、10mlの羊水も胎児の性決定のために回収した。出産直前に補充された女性に関しては、出産の時に胎児の性別を知らせた。対照の血液サンプルも10人の非妊婦から得て、さらに妊婦から得た生検のように、サンプル処理した。

サンプル調製

母親の血液サンプルを静脈切開から1～3時間の間に処理した。血液サンプルは3000gにおいて遠心分離して、血漿および血清は、それぞれEDTAチューブおよび無地のチューブ中に注意深く回収し、そして無地のポリプロピレンチューブに移した。血漿サンプルまたは血清サンプルを取り出す際に、それぞれ白血球層 ( buffy coat ) または血液クロットが壊れないことを確実にするために多大な注意を払った。血漿サンプルの取り出しの後に、二

10

20

30

40

50

ユークレオン (Nucleon) DNA抽出キット (Scotlabs, Strathclyde, Scotland, U.K.) のために、赤血球沈殿物と白血球層を取っておいた。血漿および血清サンプルは、次に3000 gにおける第2の遠心分離に供して、遠心分離した血漿および血清サンプルを新しいポリプロピレンチューブ中に回収した。サンプルは、次の加工まで、-20 °Cにおいて保存した。

#### 血漿および血清サンプルからのDNA抽出

血漿および血清サンプルは、Emanuel and Pestka (1993) の方法の修飾法を用いてPCR用に加工した。簡単にいえば、200  $\mu$ lの血漿または血漿サンプルを0.5mlのエッペンドルフチューブに入れた。次に、サンプルを99 °Cにおいて5分間ヒートブロック上で加熱した。次に、加熱サンプルはマイクロ遠心分離機を用いて最大スピードにおいて遠心分離した。次に、透明な上清を回収して、10  $\mu$ lをPCRに用いた。

10

#### 羊水からのDNA抽出

羊水サンプルを、Rebello et al (1991) の方法を用いてPCR用に加工した。100  $\mu$ lの羊水を0.5mlのエッペンドルフチューブに移して、等量の10%Chelex-100 (Bio-Rad) と混合した。蒸発を避けるために20  $\mu$ lのミネラルオイルを添加した後に、チューブを56 °Cにおいて、30分間ヒートブロック上でインキュベートした。次に、チューブを簡単に渦巻き攪拌して、99 °Cにて20分間インキュベートした。処理した羊水はPCRまで4 °Cにおいて保存して、10  $\mu$ lを100  $\mu$ l反応物中で使用した。

#### ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR)

ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) は、GeneAmp DNA増幅キット (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) から得た試薬を用いて本質的には記載された方法 (Saiki et al 1988) に従い実施した。母親の血漿、血清および細胞のDNAからのY特異的胎児配列の検出は上記の通りに実施し、単一コピーのY配列 (DYS14) を増幅するためにデザインされた、プライマーY1.7およびY1.8を用いた (Lo et al 1990)。Y1.7の配列は、5' CAT CCA GAG CGT CCC TGG CTT 3' (配列番号: 1) であり、Y1.8の配列は、5' CTT TCC ACA GCC ACA TTT GTC 3' (配列番号: 2) である。Y特異的生成物は198bpであった。60サイクルのホットスタートPCRをAmpliwax技術を用いて10  $\mu$ lの母親血漿または血清あるいは100ngの母親有核赤血球細胞DNAに対して用いた (94 °C、1分間の変性工程および57 °C、1分間の再アニーリング/伸長を組み合わせた工程)。40サイクルを羊水の増幅に用いた。PCR産物はアガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色により分析した。PCRの結果は、胎児の性別が調査者に明らかになる前にしるしをつけた。

20

30

#### 結果

##### PCRアッセイの感度

1  $\mu$ gのメスゲノミックDNA中でオスゲノミックDNAの連続希釈を行い、60サイクルの増幅を用いてY-PCR系により増幅した。陽性シグナルは100,000希釈、即ち単一のオス細胞にほぼ等しいところまで検出された。

##### 母親の血漿および血清からの胎児DNA配列の増幅

母親の血漿および血清サンプルを、12から40週の妊娠段階の43人の妊婦から回収した。30の男の胎児および13の女の胎児があった。男の胎児を有する30人の妊娠のうち、各サンプル10  $\mu$ lをPCRに用いて、Y陽性シグナルが24の血漿サンプル中および21の血清サンプル中において検出された。有核赤血球DNAをY-PCRに用いた場合、陽性シグナルは30ケースのうち5ケースにおいてしか検出されなかった。女の胎児を有する13人の妊娠の何れもが、そして10人の非妊婦対照の何れもが、血漿、血清または細胞の何れかのDNAを増幅した際に陽性Yシグナルをもたらさなかった。この技術の厳密さは、たった10  $\mu$ lの血清/血漿サンプルでさえも、極めて高く、そしてもっとも重要なのは使用に十分であった。例えば、より多い量の血清または血漿により、厳密さは100%または100%近くに改良できることは明らかである。

40

#### 実施例 2

##### 異数体妊娠における母親血清中の胎児DNAの定量分析

胎児染色体の異数性の出生前スクリーニングおよび診断は、現在の産科の配慮の重要な部

50

分である。羊水穿刺のような侵入性方法に関連した危険並びに侵入性方法を用いたスクリーニングを実施する実行不可能性のため、胎児染色体の異数性を非侵入によりスクリーニングする方法の開発に多大な努力が捧げられてきた。開発された2つの主要な非侵入性方法は、母親の血清の生化学スクリーニングおよび頸部半透明性 (nuchal translucency) に関する超音波検査である。これらの方法は、両方とも、顕著な偽陽性ならびに偽陰性の率に関連する。

母親の血行中の胎児有核細胞の証明は、胎児染色体異数性の非侵入性診断のための胎児の物質の新しい源を提供する (Simpson et al 1993)。胎児有核細胞富裕化プロトコルの使用により、いくつかのグループは母親血液から単離した異数性胎児有核細胞の検出を報告した (Elias et al 1992 ; Bianchi et al 1992)。最近、胎児が染色体異数性を罹患する 10  
場合に、母親の血行中に胎児有核細胞の数が増加することが証明された (Bianchi et al 1997)。

#### 患者サンプル

出生前試験を経た妊婦からの血液サンプルを、侵入性方法の前に回収した。胎児の核型は、羊水の細胞遺伝学分析または絨毛膜絨毛サンプルにより確認した。承認は、Research Ethics Committee of The Chinese University of Hong Kongから得た。血液サンプルは無地のチューブに回収した。血液の凝固後に、サンプルを3000gで遠心分離して、血清を注意深く取り出して無地のポリプロピレンチューブに移した。サンプルは、さらに加工するまで -70 から -20 で保存した。

#### 血漿および血清からのDNA抽出

血清サンプルからのDNAはQIAamp Bloodキット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、製造者により勧められた「血液および体液プロトコル」を用いて抽出した (Chen et al 1996)。400 µl から800 µl の血漿 / 血清サンプルをカラムあたりのDNA抽出に用いた。用いられた正確な量は標的DNA濃度の計算を確実にするために記録した。

#### リアルタイム定量PCR

リアルタイム定量PCRの理論上および実際上の側面は、Heid et al (1996) により以前に記載された。リアルタイム定量PCR分析は、PE Applied Biosystems 7700 Sequence Detector (Foster City, CA, U.S.A.) を用いて実施し、本質的には、個々のPCR反応の進行を視覚により監視する能力を具備した、組み合わされた温度循環器 / 蛍光検出器である。用いられた増幅並びに生成物報告系は、5' ヌクレアーゼアッセイに基づく (Holland et al 1991) (Perkin-Elmerにより販売されたTaqManアッセイ)。この系においては、慣用のPCRにおけるとおり2つの増幅プライマーとは別に、二重標識蛍光源ハイブリダイゼーションプローブも含まれる (Lee et al 1993 ; Livak et al 1995)。一つの蛍光染料がリポーターとして機能し (FAM, 即ち、6-カルボキシフルオレセイン)、そしてその放射スペクトルが第2の蛍光染料 (TAMRA, 即ち、6-カルボキシ-テトラメチルローダミン) により、静められる (quenched)。PCRの伸長相の間、Taq DNAポリメラーゼの5' から3' へのエキソヌクレアーゼ活性がプローブからリポーターを分割して、即ちクエンチャーからそれを放出して、518nmにおける蛍光放射の増加をもたらす。PE Applied Biosystems 7700 Sequence Detectorは、DNA増幅の間連続して96ウエルの蛍光スペクトルを測定することができ、データはMacintoshコンピューター (Apple Computer, Cupertino, CA, U.S.A.) 40  
に取られる。

SRY TaqMan系は、増幅プライマー-SRY-109F, 5' -TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-3' [ 配列番号 : 3 ] ; SRY-245R, 5' -CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3' [ 配列番号 : 4 ] ; および二重標識蛍光TaqManプローブSRY-142T, 5' - (FAM) AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA (TAMRA) -3' [ 配列番号 : 5 ] からなった。プライマー / プローブの組み合わせは、Primer Expressソフトウェア (Perkin-Elmer, Foster City, CA, U.S.A.) を用いてデザインされた。SRY遺伝子に関する配列データは、GenBank Sequence Database (受託番号 : L08063) から得た。

TaqMan増幅反応は、TaqMan PCR Core Reagent Kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, U.S.A.) 50  
において供給された成分 (TaqManプローブおよび増幅プライマーは除く) を用いて5

0  $\mu$ lの反応量で設定した。SRY TaqManプローブはPE Applied Biosystemsによりカスタム合成した。PCRプライマーは、Life Technologies (Gaithersburg, MD, U.S.A)により合成された。各反応物は、5  $\mu$ lの10 $\times$ バッファA、300nMの増幅プライマー、100nMのSRY TaqManプローブ、4mMのMgCl<sub>2</sub>、各200  $\mu$ MのdATP、dCTPおよびdGTP、400  $\mu$ MのdUTP、1.25ユニットのAmpliAq Goldおよび0.5ユニットのAmpEraseウラシルN-グリコシラーゼを含んだ。5から10  $\mu$ lの抽出された血清DNAを増幅に用いた。用いられた抽出量は、次の濃度計算のために記録した。DNA増幅は、光の反射を防ぐために製造者により凍らされて、光散乱を防ぐためにデザインされたキャップを用いて閉められた96ウエルの反応プレート中で実施した (Perkin-Elmer, Foster City, CA, U.S.A.)。各サンプルは2通り分析した。検量曲線は各分析とも閉口にかつ2通りに描いた。細胞あたり6.6pgのDNAの変換因子を、コピー数として結果を表すために使用した。

温度循環はウラシルN-グリコシラーゼが作用するために50  $^{\circ}$ Cにおいて2分間のインキュベーションから開始し、95  $^{\circ}$ C 10分間の第1の変性工程へと続いた。次に、40サイクルの95  $^{\circ}$ C 15分間および60  $^{\circ}$ C 1分間を実施した。

7700 Sequence Detectorにより回収されてMacintoshコンピュータに保存された増幅データは、次にPE Applied Biosystemsにより開発されたSequence Detection System (SDS)を用いて分析した。コピー/mlにより表される濃度は、以下の方程式：

$$C = Q \times \frac{V_{DNA}}{V_{PCR}} \times \frac{1}{V_{ext}}$$

(式中、Cは血漿または血清中の標的濃度 (コピー/ml)；

Qは配列決定機により測定されたPCR中の標的濃度 (コピー)；

V<sub>DNA</sub>は抽出後に得られたDNA全体積、典型的にはQiagen抽出あたり50  $\mu$ l；

V<sub>PCR</sub>はPCRに使用するためのDNA溶液体積、典型的には5 - 10  $\mu$ l；V<sub>ext</sub>は抽出された血漿/血清の体積、典型的には400-800  $\mu$ l)

を用いて計算された。

#### 抗汚染測定

PCR汚染に対する厳密な用心が払われた (Kwok et al 1989)。エアロゾル抵抗性ピペットチップを全ての液体操作に用いた。増幅反応の設定、DNA鋳型の添加および増幅反応の実施には別々の領域を用いた。7700 Sequence Detectorは、その光学検出系が増幅反応の完了後に反応チューブを再び開く必要性を取り除き、即ち持ち込みの汚染の可能性を減じるように特別の保護レベルを提供した。さらに、TaqManアッセイはウラシル含有PCR産物を破壊したウラシルN-グリコシラーゼを用いた予めの増幅処理の形態での抗汚染測定の別のレベルも含んだ (Longo et al 1990)。複数の陰性の水ブランクも各分析に含まれた。

#### 結果

##### リアルタイム定量PCRの開発

リアルタイム定量PCRのダイナミックレンジを測定するために、オスDNAの連続希釈を、1,000細胞から1細胞と等量のDNAからなる水の中に作成して、SRY TaqMan系による分析に供した。標的分子の数が少なければ少ないほど、特定の量のリポーター分子を生成するのに、より多くの増幅サイクルが必要であった。この系は、単一の標的細胞から均等なDNAを検出するのに十分な感度である。

閾値サイクル (C<sub>T</sub>) と呼ぶパラメーターを定義することができ、サイクル1から15により計算された平均基底ラインの蛍光以上の10の標準偏差として設定され、且つ増幅に使用される初期標的コピー数に比例した (Heid et al 1996)。閾値サイクル (C<sub>T</sub>) を投入標的濃度に対してプロットしたが、後者は共通logスケール上にプロットし、リアルタイム定量PCRの大きなダイナミックレンジ並びに厳密さを証明した。

リアルタイム定量PCR系は0から12,800のメスゲノム等量のバックグラウンドのメスDNAの存在に対して非感受性であった。胎児および母親のDNAの異なる濃度の存在のために、別の検量曲線を異なるケースのために構築しなければならないので、これはこの系を大きく単純化させた。

10

20

30

40

50

異数性妊娠および対照の妊娠からの母親血清の胎児SRY遺伝子の定量分析

リアルタイム定量性SRY PCRを異数性胎児および正常胎児を有する妊婦から抽出した血清DNAに関して実施した。個々の場合のデータを図1にプロットする。胎児DNA濃度は、正常妊娠に比して異数性において高かった (Mann-Whitney U Test,  $p=0.06$ )。

考察

この研究において、我々は、母親血清中の胎児DNA濃度が異数性妊娠において上昇することを証明した。これらの結果は、胎児DNAの定量が胎児染色体異数性のための新規なスクリーニングマーカーとして使用される可能性を有することを示す。大きなスケールの集団に基づいた研究を実施することにより、スクリーニングの目的のためのカットオフ値を開発することができた。母親血清の生化学スクリーニングのために、他の生化学マーカーと胎児DNA濃度の相関を調査するのにも有用なはずである。

増量した胎児DNAが異数体妊娠において母親の血行中に遊離されることによる機構がさらに研究される必要がある。一つの可能性は、異数体妊娠において母親血液中に放出された胎児有核細胞の数の増加に関連する (Bianchi et al 1997)。他の可能性のある機構は、染色体異数性と関連するかもしれない増大した細胞死と代謝回転であるかもしれない。

実施例3

RhD-陰性妊婦の血漿からの胎児RhD状態の非侵入性出生前測定

序論

Rh式血液型は輸血および臨床医学において重要であり、新生児の血液疾患、輸血副作用 (transfusion reactions) および自己免疫性溶血性貧血に關与する。リーザスD (RhD) 陰性母親におけるRhイムノグロブリン予防の広範囲な使用にも拘わらず、Rhの同種免疫はまだ起こる。父親がRhD遺伝子に関して異型接合であるか否かのそれらの場合において、胎児がRhD陽性である50%のチャンスと胎児がRhD陰性である50%のチャンスがある。これらの場合における胎児RhD状態の出生前の決定は臨床上有用であるが、なぜならば、胎児がRhD陰性であることを示すことができたなら、さらなる出生前侵入性試験または治療上の用手分娩 (manoeuvres) を必要としないからである。

この到達点に対する前進は、ヒトRhD遺伝子のクローニングにより (Le Van Kim et al 1992) そしてRhD陰性患者がRhD遺伝子を欠くとの証明 (Colin et al 1991) により、最近可能となった。胎児RhDの状態の出生前の測定は羊水サンプル上でのPCRに基づく技術の使用により実施された (Bennett et al 1993)。

多くのグループも、胎児RhD状態の測定のための母親血液中の胎児細胞の使用の可能性を調査した (Lo et al 1993)。このアプローチの主要な問題は、非富裕化サンプル中における高い偽陽性および偽陰性率により証明されるとおり、この系が胎児細胞富裕化または単離法なしには十分信頼されないことである。胎児細胞の富裕化または単離の方法は、一方、実施するのに退屈であり高価である (Geifman-Holtzman et al 1996; Sekizawa et al 1996)。

母親血漿中の胎児DNAの存在の我々の発見は、非侵入性出生前診断のための新規なアプローチを提供する。

材料と方法

患者

Nuffield Department of Obstetrics & Gynaecologyに入院した妊婦を、インフォームド Consentと共に募集した。この計画の承認は、Central Oxfordshire Research Ethics Committeeから得た。妊娠3分の2の時期の妊婦を羊水穿刺前に募集した。血液サンプルはあらゆる侵入性方法の前に回収した。10mlの羊水も胎児RhD遺伝子型決定のために回収した。妊娠3分の3の時期の妊婦を分娩直前に募集した。血清学の方法による胎児のRhDの状態の確認のために、分娩後に臍帯血サンプルを採取した。

サンプル調製

血液サンプルをEDTA含有チューブに回収した。サンプルは3000gにおいて遠心分離して、血漿を無地のチューブ中に注意深く回収した。白血球層 (buffy coat) が壊れないことを確実にするために多大な注意を払った。白血球層は次の加工まで -20 において保存した

10

20

30

40

50

。血漿サンプルは、次に3000 gの遠心分離に供して、血漿サンプルを取り出して、新しい一連の無地のポリプロピレンチューブ中に移した。サンプルは、次の加工まで - 20 において保存した。

#### 血漿および血清サンプルからのDNA抽出

血漿および白血球層サンプルは、QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて製造者により推奨されるとおりに " blood and body fluid protocol " を用いて抽出した (Cher et al 1996)。800  $\mu$ lの血漿サンプルおよび200  $\mu$ lの白血球層サンプルをカラムあたりのDNA抽出のために使用した。

#### リアルタイム定量PCR

リアルタイム定量PCR分析は、実施例 2 に記載されるとおりにして、以下の修飾を加えて実施した。

RhD TaqMan系は、増幅プライマーRD-A : 5' -CCT CTC ACT GTT GCC TGC ATT-3' [ 配列番号 : 6 ] ; RD-B : 5' -AGT GCC TGC GCG AAC ATT-3' [ 配列番号 : 7 ] ; および二重標識された蛍光TaqManプローブRD-T, 5' - (FAM) TAC GTG AGA AAC GCT CAT GAC AGC AAA GTC T (TAMRA) -3' [ 配列番号 : 8 ] からなった。プライマー/プローブの組み合わせは、Primer Expressソフトウェア (Perkin-Elmer, Foster City, CA, U.S.A.) を用いてデザインした。RhD遺伝子に関する配列データは以前に記載されたとおりである (Le Van Kim et al 1992)。

ベータ - グロビンのTaqMan系は、増幅プライマーベータ - グロビン-354F, 5' -GTG CAC C TG ACT CCT GAG GAG A-3' [ 配列番号 : 9 ] ; ベータ - グロビン-455R, 5' -CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3' [ 配列番号 : 10 ] ; および二重標識された蛍光TaqManプローブベータ - グロビン-402T, 5' - (FAM) AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG (TAMRA) -3' [ 配列番号 : 11 ] からなった。プライマー/プローブの組み合わせは、Primer Expressソフトウェア (Perkin-Elmer, Foster City, CA, U.S.A.) を用いてデザインした。配列データは、GenBank Sequence Database : 受託番号U01317から得た。

#### 結果

##### リアルタイムTaqMan PCRの開発

リアルタイム配列検出器は、1 サイクル 1 サイクル、遊離したリポーター分子の蛍光強度を測定することができる。閾値サイクル ( $C_T$ ) と呼ぶパラメーターを定義することができ、サイクル 1 から15により計算された平均基底ラインの蛍光以上の10の標準偏差として設定された (Heid et al 1996)。温度循環の連続の間に閾値以上に蛍光強度が上昇する場合の増幅反応を、陽性反応と定義する。

TaqMan PCRの感度を測定するために、RhD-陽性患者から単離したゲノミックDNAの連続希釈を、1,000細胞から1細胞と等量のDNAからなる水の中に作成して、SRY TaqMan系による分析に供した。標的分子の数が少なければ少ないほど、特定の量のリポーター分子を生成するのに、より多くの増幅サイクルが必要であった。この系は、単一の標的細胞から均等なDNAを検出するのに十分な感度である。

##### RhD-陰性女性の血清学と遺伝子型決定の相関

この研究に記録された21人の妊婦は、全て血清学上RhD-陰性であった。各女性の白血球層から得たゲノミックDNA (10ng) をRhD TaqManアッセイに供したところ、各場合において、陰性の結果が見いだされた ; 即ち、血清学と遺伝子型の間には完全な相関が証明される。母親の血漿から単離されたDNAのRhD遺伝子型決定

21人のRhD陰性の妊婦の血漿から抽出したDNAをTaqManアッセイに供した。母親の血漿分析から予測された胎児のRhD遺伝子型と、羊水の遺伝子型決定および臍帯血の血清学試験から得た結果の間には完全な相関があった (表 1)。

母親の血漿から抽出したDNAの増幅に関する対照として、これらのサンプルもベータ - グロビンTaqManアッセイに供した。いずれの場合も、TaqManシグナルが生じた。

#### 考察

この研究において、我々は母親血漿から非侵入性胎児RhD遺伝子型決定を実行する可能性を証明した。これは、母親血漿からの単一の遺伝子診断の最初の記載を表す。我々の結果

10

20

30

40

50

は、この種の遺伝子型決定が高度に正確であり且つ臨床診断に可能に使用されうることを示す。この高度な正確さは、おそらく、母親血漿中の胎児DNAの高い濃度の結果である。ポリペプチドのRhファミリーは、2つの関連遺伝子：CcEe遺伝子およびRhD遺伝子（Le Van Kim et al 1992；Cherif-Zahar et al 1990）によりコードされる。Rhの遺伝系の複雑さゆえに、多くのプライマーセットがRhD遺伝子型決定のために記載された（Bennet et al 1993；Lo et al 1993；Aubin et al 1997）。この研究サンプルにおける我々の遺伝子型決定系の正確さを証明するために、我々は、我々の親の集団の白血球層DNAの対照遺伝子型決定を実施した。すべての場合において、血清学と遺伝子型の間には完全な相関があった。しっかりした臨床診断のためには、複数のプライマーセットが好ましいらしい。TaqMan化学は、複数のプライマー/プローブセットの包含を容易に調節することができる。胎児の血液疾患の重篤度と母親およびDレベルの間の相関は、さらなる調査が必要なエリアである。増量した胎児DNAが増加した胎児の溶血の存在下にて母親の血行中に遊離する可能性がある。

表 1

## RhD-陰性妊婦からの血漿のRhDd遺伝子型決定

ケース	胎児RhD遺伝子型	母親の血漿のRhD TaqManシグナル	
1	-	-	
2	-	-	
3	-	-	10
4	+	+	
5	+	+	
6	-	-	
7	-	-	
8	+	+	
9	+	+	20
10	-	-	
11	+	+	
12	+	+	
13	+	+	
14	+	+	
15	-	-	30
16	+	+	
17	+	+	
18	+	+	
19	+	+	
20	+	+	
21	+	+	40

## 実施例 4

子癇前症妊娠における母親血清中の胎児DNA濃度の評価

## 序論

子癇前症は母親および胎児の死亡率および罹患率の重大な原因である。多大な研究にも拘わらず、この症状の病原はまだ明らかでない。この障害は、主に、分娩後には復帰する妊娠誘導性の変化の発生により認識され、高血圧と蛋白尿がもっとも共通に用いられている規準である。幾人かの研究者は、子癇前症が、おそらく免疫機構により媒介される、異常栄養膜の着床 (implantation) の結果であると示唆した。他の研究者は、フィブリン様の物質による部分的な閉塞が一つの特徴である、脱落膜および子宮筋層のらせん動脈内の病原性の変化を見いだした。

この実施例において、我々は、リアルタイム定量性PCRアッセイを用いることにより、子癩前症を罹患する女性の血清中の胎児DNAの濃度を示す。男の胎児のY染色体配列を胎児マーカーとして用いた。

#### 材料と方法

##### 患者

Prince of Wales Hospital, Shatin, Hong KongのDepartment of Obstetrics & GynaecologyおよびNuffield Department of Obstetrics & Gynaecology, John Radcliffe Hospital, Oxford, U.K.に入院した妊婦を、インフォームドコンセントと共に募集した。承認は、Research Ethics Committee of The Chinese University of Hong KongおよびCentral Oxfordshire Research Ethics Committeeから得た。子癩前症は、尿路感染の不在下での新たにそして持続された蛋白尿を伴う、以前の低い値から90mmHgまたはそれ以上への弛緩期の血圧の持続された上昇として定義される。対照の妊娠は、薬物治療中ではなく且つ高血圧および蛋白尿を有さなかった（ディップスティック尿分析における極微量（trace）よりも高いと定義される）。子癩前症および対照の被検者は、妊娠齢に関して調和させた。

10

##### サンプル調製

血液サンプルは無地のチューブに回収した。凝血後に、サンプルを3000gにおいて遠心分離し、血清を注意深く回収し、そして無地のポリプロピレンチューブに移した。血清サンプルは、次の加工まで、-70 または -20 において保存した。

##### 血漿および血清サンプルからのDNA抽出

血清サンプルからのDNAは、QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて製造者により推奨されるとおりに "blood and body fluid protocol" を用いて抽出した (Chen et al 1996)。400  $\mu$ l から800  $\mu$ l の血漿 / 血清サンプルをカラムあたりのDNA抽出のために使用した。

20

##### リアルタイム定量性PCR

リアルタイム定量性PCR分析は、実施例 2 に記載されるとおりに実施した。

##### 結果

##### 母親の血清からの胎児SRY遺伝子の定量分析

子癩前症および対照の患者から抽出した血清DNAに関してリアルタイム定量性SRY PCRを実施した。個々のケースのデータを図 2 にプロットする。子癩前症および対照の妊娠における中央の胎児DNA濃度は、それぞれ381コピー / mlおよび76コピー / mlであった。胎児のDNA濃度は、対照妊婦におけるよりも子癩前症妊婦における方が高かった (Mann-Whitney U Test,  $p < 0.0001$ )。

30

##### 考察

我々のデータは、胎児DNAの濃度は非子癩前症妊婦におけるよりも子癩前症妊婦において高いことを示す。これらの結果は、母親の血漿中の胎児のDNAの濃度の測定を子癩前症のための新たなマーカーとして用いてよいことを示す。子癩前症のための他のマーカーと比べると、アクチビンAおよびインヒピンA等の他のマーカーが一般的なホルモンマーカーであるのに対して、胎児のDNAの測定は遺伝子マーカーである点において唯一である。その性質から、遺伝子マーカーに基づく試験は、完全に胎児特異的であるとの利点を有する。

40

胎児DNAのレベルが子癩前症の重篤度と関連するか否かを調査するためのさらなる研究が必要となる。我々の発見は、高血圧および蛋白尿等の臨床シグナルの発症の前に、子癩前症の発症を予測するために胎児のDNAの定量の有力な応用の研究も開発する。

現在のところ、増量した胎児DNAが子癩前症の女性の血行に遊離される機構は明らかでない。可能性のある機構は、胎児の細胞死および結果としての母親の血行への胎児DNAの放出をもたらす、胎盤の境界への障害を含む。第2の機構は、子癩前症における母親の血行への胎児細胞の増大した通行 (trafficking) による。胎児DNAは次に母親の血行中でのこれらの破壊に続いて遊離する。胎児細胞および胎児DNAのレベルに関する今後の研究が、これらの問題に立ち向かうために必要なはずである。

#### 実施例 5

50

## 母親の血漿および血清中の胎児DNAの定量分析

### 序論

我々は、胎児DNAが母親の血漿および血清中に存在することを証明した。胎児DNA配列の検出は、ちょうど10 $\mu$ lの沸騰させた血漿および血清を用いて、それぞれ80%および70%のケースで可能であった(Lo et al. 1997)。

これらの観察は、母親の血漿/血清DNAが特定の遺伝疾患の非侵入性出生前診断のための材料の有用な源になるかもしれないことを示唆する。臨床応用が可能か否かを証明するために、多くの重要な疑問に答える必要がある。第1に、母親の血漿および血清中の胎児DNAが、信頼できる分子診断が実施されるのに十分な量存在することを示す必要がある。第2に、妊娠齢に関する母親の血漿および血清中の胎児DNAの変動に関するデータが、初期出生前診断へのこの技術の応用可能性を決定するのに必要である。

この実施例において、我々は、母親の血漿および血清中の胎児DNA分子のコピー数を測定するためのリアルタイム定量性TaqManポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)アッセイ(Heid et al. 1996)を開発することにより、これらの問題の両者に立ち向かった。この技術は、増幅反応の進行の連続的な光学上の監視を可能にし、広い濃度範囲にわたって正確な標的定量を提供する。我々のデータは、多くの胎児細胞富裕化プロトコルにより達成されるのと同様な濃度で、母親の血漿および血清中に存在することを示す。我々は、異なる妊娠齢における母親血清中の胎児DNA濃度の変化も調査した。この血漿または血清に基づくアプローチを用いることにより、我々は、胎児DNAの信頼できる検出が達成可能であり、よって、選択された遺伝疾患の非侵入性出生前診断に有用であることを示す。

### 被験者と方法

#### 患者

Prince of Wales Hospital, Shatin, Hong KongのDepartment of Obstetrics & Gynaecologyに入院した妊婦を、インフォームドコンセントと共に募集した。承認は、Research Ethics Committee of The Chinese University of Hong Kongから得た。単一の時間点において研究された女性に関しては、初期妊娠サンプルを羊水穿刺または絨毛膜絨毛サンプリング前に得て、後期妊娠サンプルは分娩直前に回収した。5から10mlの母親末梢血を、一つのEDTA含有チューブおよび一つの無地のチューブ各々に回収した。複数時間点において研究された人は、妊娠前に、インビトロ受精プログラムから募集した。出生前診断を経験した女性に関しては、羊水穿刺または絨毛膜絨毛サンプルからの細胞遺伝学の結果から新生児の性別を確認した。分娩直前またはインビトロ受精プログラムから募集した女性に関しては、胎児の性別は分娩時に知らせた。

#### サンプル調製

血液サンプルを3000gにおいて遠心分離して、血漿および血清を、注意深くそれぞれEDTA含有チューブおよび無地のチューブから回収し、そして無地のポリプロピレンチューブに移した。血漿または血清サンプルを取り出す際には、それぞれ白血球層または血液クロットが破壊されないように注意を払った。血漿および血清サンプルは3000gにおいて遠心分離して、上清を新しいポリプロピレンチューブに移した。サンプルは、次の加工まで、-20において保存した。

#### 血漿および血清サンプルからのDNA抽出

血漿および血清サンプルからのDNAは、QIAamp Blood Kit(Qiagen, Hilden, Germany)を用いて製造者により推奨されるとおりに"blood and body fluid protocol"を用いて抽出した(Chen et al. 1996)。400 $\mu$ lから800 $\mu$ lの血漿/血清サンプルをカラムあたりのDNA抽出のために使用した。用いられた正確な量は標的DNA濃度の計算を可能にするために記録した。

#### リアルタイム定量性PCR

リアルタイム定量性PCR分析は、実施例2に記載されるとおりに実施し、前の実施例に記載されたSRY TaqMan系およびベータ-グロビンTaqMan系を用いた。

同一の温度プロフィールをSRYとベータ-グロビンTaqMan系の両方に使用した。温度循環は、ウラシルN-グリコシラーゼを作用させるために50における2分間のインキュベーション

ョンから開始し、10分間95 の第1の変性工程へと続いた。次に、95 における15秒間および60 における1分間の40サイクルを実施した。

#### 結果

リアルタイム定量性PCRのダイナミックレンジを測定するために、男性のDNAの連続希釈を、1,000細胞から1細胞と等量のDNAからなる水の中に作成して、SRY TaqMan系による分析に供した。図3 Aは、入れた標的量が減るにつれて、増幅曲線が右にシフトしたことを示す。より少ない標的分子を用いた反応が、より多くの標的分子を用いた反応に比して、特定の量のリポーター分子を生成するためにより多くの増幅サイクルを必要としたとおり、これは予測された。この系は、単一の標的細胞から均等なDNAを検出するのに十分な感度である。

10

図3 Bは、閾値サイクル( $C_T$ )の投入標的量に対するプロットを示し、後者は共通logスケール上にプロットされた。リアルタイム定量性PCRの大きなダイナミックレンジ並びに厳密さを証明した。 $C_T$ は、サイクル1から15により計算された平均基底ラインの蛍光以上の10の標準偏差として設定され、且つ増幅に使用される初期標的コピー数に比例した(Heid et al. 1996)。グラフの直線性は、リアルタイム定量性PCRの大きなダイナミックレンジおよび正確さを証明する。同様な結果がベータ-グロビンTaqMan系を用いて得られた(結果は示さず)。

リアルタイム定量性SRY系は、0から12,800のメスゲノム等量からのバックグラウンドのメスDNAの存在に非感受性であった。胎児DNAと母親DNAの異なる濃度の存在の為に、この範囲においては異なるケースのために別の検量曲線を構築する必要がないため、これはこの系の応用を極めて単純化した。

20

Qiagenプロトコルを用いた血漿および血清からのDNA抽出の再現性を、正常者からの血漿および血清サンプルからの複製抽出を実施することにより(各々のケースに関して10)試験した。これらの複製抽出物は、次に、ベータ-グロビン系を用いたリアルタイム定量性PCRに供した。これらの複製抽出物の $C_T$ 値の変動係数(CV)は1.1%であった。

#### リアルタイムベータ-グロビンTaqMan系を用いた定量分析

母親の血漿および血清サンプル中のベータ-グロビン配列の濃度は、抽出されたDNA全量の測定値とした用いたが、即ち、50人の妊婦からの血漿および血清サンプルから抽出した母親および胎児のDNAをベータ-グロビンTaqMan系を用いて分析した。25ケースが、妊娠3分の1から3分の2時期の間(妊娠齢:11から17週)に募集され、表2において初期妊娠サンプルとして記された。別の25ケースは分娩直前(妊娠齢:37から43週)に募集され、表1において後期妊娠サンプルとして記された。母親の血漿および血清中のベータ-グロビン配列の濃度は表2に掲載される。これらの結果は、血清は血漿よりも多くのDNAを含み(Wilcoxon Signed Rank Test,  $p < 0.0005$ )、我々が研究した集団においては、血清DNAの平均濃度は血漿DNAのその14.6倍であることを示す。初期および後期の妊娠サンプルからの母親の血漿中のベータ-グロビン配列の濃度を表2において比較する。これらのデータは、血漿DNAの全量が妊娠の進行に伴って増加することを示す(Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0.0005$ )。

30

#### 母親の血漿および血清からなお胎児SRY遺伝子の定量分析

SRY TaqMan系を用いたリアルタイム定量分析を母親血漿および血清から抽出したDNAに実施して、胎児DNAの量を測定した。25の初期妊娠サンプル(妊娠齢:11から17週)のうち、13は男の胎児を有する女性からであり、12は女の胎児を有する女性からであった。25の後期妊娠サンプル(妊娠齢:37から43週)のうち、14は男の胎児を有する女性からであり、11は女の胎児を有する女性からであった。陽性シグナルが男の胎児を有する27人の女性各々において得られ、そしてシグナル無しが女の胎児を有する23人の女性各々において得られた。14人の女性は以前に男児を分娩したことがあって、そのうち5人は現在研究された妊娠において女兒を有した。

40

男の胎児を有する27人の女性からの定量性SRYのデータを表3に要約する。これらのデータは、血漿および血清中の胎児DNAの濃度が妊娠初期よりも妊娠後期においてより高いことを示す(Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0.0005$ )。母親の血漿および血清中の胎児DN

50

Aの平均濃度は、妊娠後期においては妊娠初期に比して、それぞれ11.5倍および11.9倍高い。母親の血漿および血清中の胎児DNAの絶対濃度は、個々のケースで同様であった。妊娠初期における胎児DNAの部分濃度 (fractional concentration) は、血漿中で0.39%から11.9%の範囲であり (平均3.4%)、血清中で0.014%から0.54%の範囲である (平均0.13%)。妊娠後期においては、胎児DNAの部分は、血漿中で2.33%から11.4%の範囲であり (平均6.2%)、血清中で0.032%から3.97%の範囲である (平均1.0%)。

インビトロ受精により妊娠した女性の継続追跡

インビトロ受精により妊娠した20人の女性を、妊娠前において、および妊娠中における複数の時間点において追跡した。20人の全患者は超音波スキャンニングにより測定されたとあり、単一児の妊娠を有した。12人の妊婦は男児を分娩し、8人の妊婦は女児を分娩した。男の胎児を有する妊婦の誰も妊娠関連合併症を罹患した経験がなかった。患者S-51 (図4) は、12週目に絨毛膜絨毛サンプルを受けた。患者S-1およびS-56 (図4) は、それぞれ、16週目および17週目に羊水穿刺を受けた。これら20人の女性からの163の血清サンプル全てをリアルタイム定量性SRY TaqMan系を用いて分析した。女児を有する8人の女性からの65の血清サンプルの何れもが、陽性SRYシグナルを与えなかった。男児を有する女性からの98の血清サンプル中の胎児DNA濃度は図4にプロットされる。

考察

我々は、母親の血漿および血清中の胎児DNAの濃度を測定するための正確なリアルタイム定量性PCR系を開発した。この系は、多くの利点：(1) 10万倍を超える大きなダイナミックレンジ (Heid et al. 1996)；(2) 高い処理情報量および迅速なタムアラウンド (tumoround) 時間 - 96サンプルを同時に増幅して約2時間で定量することができる；および(3) 後PCRプロセッシングを必要としなく、よって持ち込み汚染の危険を最小化する均質の増幅/検出系の使用を有する。

この研究におけるもっとも重要な観察は、母親の血漿および血清中の極めて高い濃度の胎児DNAである。Bianchi et al. は、正常の妊娠における母親の血液中の胎児細胞の平均数が16mlの母親血液中19、即ち妊娠3分の2時期の間1.2細胞/mlであったことを報告した (Bianchi et al. 1997)。よって、母親の血漿および血清中の胎児DNAの平均濃度は、それぞれ21.2 (25.4/1.2) および23.9 (28.7/1.2) 倍であり、同じ妊娠における母親の血液の細胞画分中のそれよりも高い。全血漿DNAに対する胎児の相対濃度はいっそう高い。即ち、妊娠初期においては、母親の血漿中の胎児DNAは全血漿DNAの平均3.4%を占める。妊娠後期における数字は6.2%である。Hamada et al. は、妊娠3分の2時期の胎児細胞の頻度は0.0035%であり、妊娠3分の3時期のそれは0.008%であったことを報告した (Hamada et al. 1993)。胎児の母親比 (fetomaternal ratio) は、よって、母親血漿中においては、それぞれの妊娠齢における細胞画分の975倍および775倍高い。事実、血漿DNA中の胎児の母親比は多くの胎児細胞富裕化プロトコルに従った比に匹敵する。例えば、Bianchi et al. は、蛍光活性化細胞分類を用いた胎児有核赤血球細胞富裕化に従い、定量性PCR分析により測定したところ、その結果の胎児細胞は分類された細胞集団の0.001% ~ 5%を構成した (Bianchi et al. 1994)。細胞分類を用いた同様な研究および蛍光インサイチュハイブリダイゼーションを用いた胎児細胞検出において、Sohda et al. は、分類された細胞の平均4.6%が胎児を起源とする細胞であったことを見いだした (Sohda et al. 1997)。

我々は、母親の血漿中の胎児DNAの絶対濃度が母親の血清中のそれと類似することを証明した。大きな相違は、血漿に比して血清における多量のバックグラウンド母親DNAの存在にあり、おそらくは、凝血プロセスの間のDNAの放出による。これは、リアルタイムTaqMan系を用いた胎児DNA検出の効率に対して顕著な影響を及ぼさないが、感度の劣る方法、例えば慣用のPCR並びにエチジウム染色されたアガロースゲル電気泳動の使用を伴う場合、母親の血漿は、健康な胎児DNA検出のためには母親の血清よりはましかもしれない可能性がある。

母親の血漿および血清中の高濃度の胎児DNAは、我々に対して胎児の遺伝物質の存在を信

10

20

30

40

50

頼をもって検出させた。この研究において分析された263の血清または血漿サンプルのうちで、我々は、漏血時に男児を有した各患者からの母親の血漿および血清中において胎児SRV遺伝子を検出することができた。この健康の検出率は、ちょうど40から80 $\mu$ lの母親血漿および血清から抽出されたDNAを用いて得られた。この体積は、我々の以前の研究(Lo et al. 1997)において報告された沸騰させた母親血漿または血清の10 $\mu$ lを4 - 8倍の増加を示し、そして感度における顕著な改良をもたらす。我々は妊娠前に得たサンプルまたは女の胎児を有する患者から得たサンプルから増幅シグナルを観察しなかったため、この特異性は保持された。ここまで得られたデータから、血漿/血清分析は、以前の妊娠からの胎児細胞の存続(persistence)により優位に影響されなかったらしい(Bianchi et al. 1996)。即ち、我々は、以前に男児を有したがこの研究のために血液サンプリングをした時には女児を有していた女性から、何ら偽陽性の結果を得なかった。

IVFを経験した患者における次の研究は多くの重要な結果を与えた。第1に、男児を有する12人の患者全ては、妊娠前に彼らの血清におけるSRV配列に関して陰性であると示された。これは、TaqManアッセイにより検出されたSRV配列が、事実、現在の妊娠における男の胎児を起源としたという、確信される証拠を提供した。第2に、我々は、妊娠7週目より早い時期に胎児SRV配列を検出することができた；即ち、母親の血漿/血清中の胎児の遺伝分析が妊娠3分の1時期において用いることができることを示す。第3に、我々は、妊娠の進行に伴って胎児DNA濃度が増加したことを示した(図4)。この最後の点は、単一時間点において研究された女性から得られたデータによっても確認された。妊娠後期に募集された女性は、彼らの血漿および血清中において高い胎児DNA濃度を有した(表3)

妊娠の進行に伴う胎児DNA濃度の増加に加えて、我々のデータは、母親の血漿DNAも妊娠と共に増加することを示す(表2)。この現象の生物学上の根拠は、現在明らかではない。可能な説明は、妊娠の進行に伴う胎児母親間の境界のサイズの増加および妊娠における他の生理学上の変化に関連したDNAクリアランスの可能な低下を包含する。

選択された疾患に関して、胎児の遺伝情報が、母親血液から単離された胎児細胞を使用するよりも、経済的並びに迅速に母親の血漿および血清から獲得できた。我々は、胎児由来の父系遺伝した多形/変異または遺伝子の測定が臨床上の出生前診断の補助となる状況においては、母親の血漿および血清における胎児のDNAの分析がもっとも有用であるともくろむ(Lo et al. 1994)。例は、性別連鎖疾患の出生前診断のための胎児性別決定、感作されたRh陰性妊婦における胎児のRhDの状態の測定(Lo et al. 1993)、父親が変異を有する場合の常染色体優性疾患および父親と母親が異なる変異を有する場合の常染色体劣性疾患(Lo et al. 1994)、例えば特定の異常血球色素症(Camaschella et al. 1990)および脾嚢胞性繊維炎を含む。大いに低下した母親のバックグラウンド並びに母親の血漿および血清中の高い濃度の胎児DNAのため、我々は、この種の分析が母親血液にて分類されていない胎児細胞を検出するためのそれらの応用に比較してより堅固なはずであると予測する。対立遺伝子識別の能力(Lee et al. 1993; Livak et al. 1995)は、均質性TaqManアッセイがこの目的に使用されることを可能にする。この系の高い処理情報量および抗汚染能力は、この系を、大規模な臨床応用の魅力的な候補となす。

Bianchi et alは、最近、母親の血液中の胎児細胞が異数性妊娠において増加したことを報告し(Bianchi et al. 1997)、そして母親血漿および血清中の胎児DNA濃度もこれらの妊娠において上昇することが証明された(実施例2)。これは、胎児染色体疾患のための新規なスクリーニング試験を提供する。この応用のために、Y染色体外の多形性マーカーに関して胎児DNA定量系が開発でき、そのため女の胎児に対して定量が適用できる。この目的に使用してよい常染色体多形系は既に記載されている(Lo et al. 1996)。しかしながら、決定的な細胞質遺伝の診断のためには胎児細胞単離技術がまだ必要である。同様に、胎児細胞単離は、単一の変異により引き起こされる常染色体劣性疾患の直接の変異分析のためにも必要である。胎児細胞単離および母親血漿および血清中の胎児DNAの分析は、非侵入性出生前診断のための補足技術として使用可能であるらしい。

胎児DNAが母親の血漿中に放出される生物学上の根拠はまだ解明されていない。物理的お

10

20

30

40

50

よび免疫学上の損傷によりもたらされるか、または胎児組織の分化に関連したアポトーシスを通して、細胞溶解により胎児DNAが放出される可能性がある。また、胎盤の損傷に関連した症状、例えば子癇前症において増量した胎児DNAが見いだされるかもしれない。本明細書において記載されたリアルタイム定量PCR系は母親の血漿中の胎児DNAのこれらの未探索の病理生理学の側面の研究のための強力な手段を提供し、そして胎児と母親の間の関係の我々の理解を改善するかもしれない。

## 表2

### ベータグロビンTaqManアッセイを用いた母親血漿および血清の定量分析

	平均 (コピー/ml)	中点 (コピー/ml)	範囲 (コピー/ml)
血漿 (初期+後期妊娠)	3466	1594	356-31875
血清 (初期+後期妊娠)	50651	34688	5818-243750
血漿 (初期妊娠)	986	975	356-1856
血漿 (後期妊娠)	5945	4313	1125-31875

10

## 表3

### 母親血漿および血清中の胎児DNAの定量：妊娠齢との関係

	SRY濃度 (コピー/ml)			
	妊娠初期		妊娠後期	
	血漿	血清	血漿	血清
範囲	3.3-69.4	4.0-58.1	76.9-769	33.8-900
平均	25.4	28.7	292.2	342.1
中点	20.6	19.5	244.0	286.0

20

30

#### 図面の説明

図1. 異数体胎児および正常胎児を有する女性からの母親血清中の胎児DNA。対照および異数体群はx軸上に示されるとおりである。コピー/mlで表現された胎児SRY DNA濃度をy軸上にプロットする。

図2. 子癇前症妊娠および非子癇前症妊娠における母親血清中の胎児DNA。子癇前症および対照群はx軸上に示されるとおりである。コピー/mlで表現された胎児SRY DNA濃度をy軸上にプロットする。

図3. リアルタイム定量PCR。

A, SRY遺伝子に関するリアルタイム定量PCRを用いて得られた増幅プロット。各プロットは対応するシンボルによりマークされた特定の投入標的量に対応する。x軸は定量PCR反応のサイクル数を示す。y軸はバックグラウンドを越える蛍光強度である  $R_n$  を示す (Heid et al. 1996)。

B, 投入標的量に対する閾値サイクル ( $C_T$ ) のプロット (共通対数スケール)。相関係数は0.986である。

図4. インビトロ受精を受けた、男の胎児を有する12人の女性の継続研究。各ケースは唯一の募集ケース番号により記録した。x軸は血清サンプルを得た認識齢を示す。ゼロの妊娠齢は妊娠前サンプルを示す。y軸はコピー/mlにより表現された母親血清中の胎児SRYの濃度を示す。スケールは各ケースの濃度範囲に関して最適化された。

40

50

## 文献

**Aubin J T**, Le Van Kim C, Mouro I, *et al.* Specificity and sensitivity of RhD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br J Haematol* 1997; **98**: 356-364.

**Bennett P R**, Le Van Kim C, Colin Y, *et al.* Prenatal determination of foetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med* 1993; **329**: 607-610.

**Bianchi D W**, Mahr A, Zickwolf GK, Houseal TW, Flint AF, Klinger KW. Detection of foetal cells with 47,XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood. *Hum Genet* 1992; **90**:368-370. 10

**Bianchi D W**, Shuber AP, DeMaria MA, Fougner AC, Klinger KW (1994) Foetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative PCR. *Am J Obstet Gynecol* **171**: 922-926

**Bianchi D W**, Williams J M, Pelletier C, Klinger K W, Shuber A P. Foetal cell quantitation in maternal blood samples from normal and aneuploid pregnancies. *Pediatr Res* 1996; **39**: 142A. 20

- Bianchi D W, Williams J M, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of foetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997; **61**:822-829.
- Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, *et al.* Prenatal diagnosis of foetal hemoglobin Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood. *Blood* 1990; **75**: 2102-106.
- Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, *et al.* Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 6243-6247. 10
- Chen X Q, Stroun M, Magnenat J-L, *et al.* Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996; **2**: 1033-35.
- Cheung M C, Goldberg JD, Kan YW. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and thalassemia by analysis of foetal cells in maternal blood. *Nat Genet* 1996; **14**: 264-68. 20
- Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, van Huffel V, Cartron J-P. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991; **78**: 2747-2752.
- Elias S, Price J, Dockter M, Wachtel S, Tharapel A, Simpson JL. First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in foetal cells from maternal blood. *Lancet* 1992; **340**: 1033. 30
- Emanuel S L, Pestka S. Amplification of specific gene products from human serum. *GATA* 1993; **10**: 144-46.
- Frickhofen N. & Young N.S. A rapid method of sample preparation for detection of DNA viruses in human serum by polymerase chain reaction. *J.Virological Methods* 1991; **35**: 65-72.
- Geifman-Holtzman O, Bernstein IM, Berry SM, *et al.* Petal RhD genotyping in foetal cells flow-sorted from maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1996; **174**: 818-822. 40
- Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H (1993) Foetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* **91**: 427432

- Heid C. A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; **6**: 986-994.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilising the 5'-3' exonuclease activity of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7276-7280.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; **339**: 237-238. 10
- Le Van Kim C, Mouro I, Cherif-Zahar B, *et al.* Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10925-10929.
- Lee L G, Connell CR, Bloch W. Alldic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 3761-3766. 20
- Livak K J, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; **4**: 357-362.
- Lo Y M D, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS (1997) Presence of foetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350**: 485-487. 30
- Lo Y M D, Fleming KA, Wainscoat JS (1994) Strategies for the detection of autosomal foetal DNA sequence from maternal peripheral blood. *Ann NY Acad Sci* **731**: 204-213
- Lo Y M D, Patel P, Wainscoat J S, Sampietro M, Gillmer M D G, Fleming K A. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989; **2**: 1363-65.
- Lo Y M D, Lo E S F, Watson N, *et al.* Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1996; **88**: 4390-95. 40
- Lo Y M D, Patel P, Sampietro M, Gillmer M D G, Fleming K A, Wainscoat JS. Detection of single-copy foetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1990; **335**: 1463-64.
- Lo Y M D, Howell P J, Selinger M, *et al.* Prenatal determination of foetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers.

Lancet 1993; **341**: 1147-48.

**Longo M C**, Berninger MS, Hardey JL. Use of uracil DNA glycosylase to control calTy-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; **93**: 125-128.

**Mulcahy H E**, Croke DT, Farthing M J G. Cancer and mutant DNA in blood plasma. *Lancet* 1996; **348**: 628.

**Nawroz H**, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996; **2**: 1035-37. 10

**Rebello M T**, Hackett G, Smith J, *et al.* Extraction of DNA from amniotic fluid cells for the early prenatal diagnosis of genetic disease. *Prenat Diagn* 1991; **11**: 41-46.

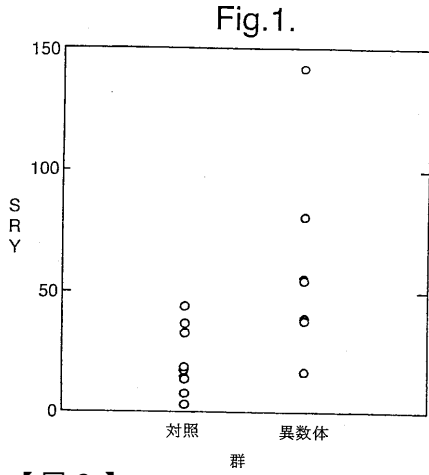
**Saiki R K**, Gelfand D H, Stoffel S, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239**: 487-91. 20

**Sekizawa A**, Watanabe A, T. K, Saito H, Yanaihara T, Sato T. Prenatal diagnosis of the foetal RhD blood type using a single foetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstet Gynecol* 1996; **87**: 501-505.

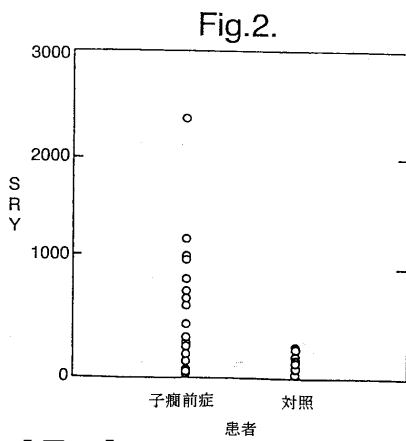
**Simpson J L**, Elias S. Isolating foetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1993; **270**: 2357-61. 30

**Sohda S**, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, The proportion of foetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat Diagn* **17**: 743-752

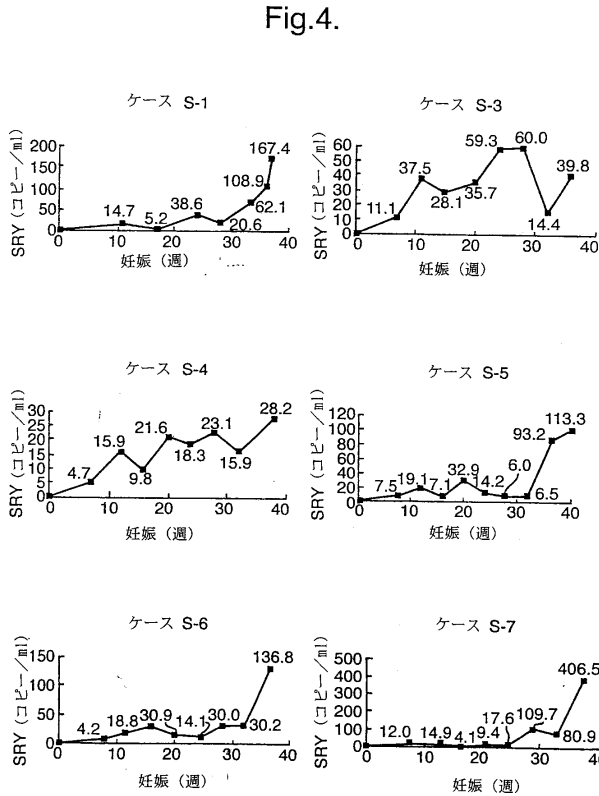
【図1】



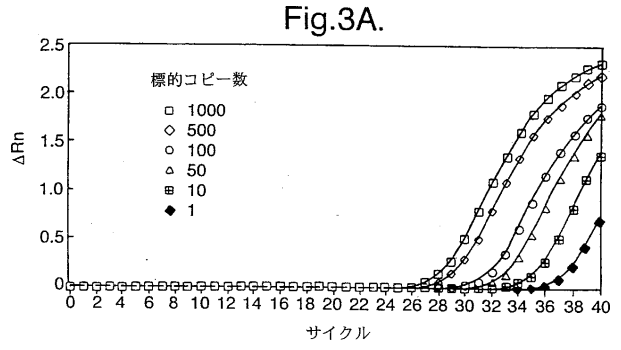
【図2】



【図4】



【図3A】



【図3B】

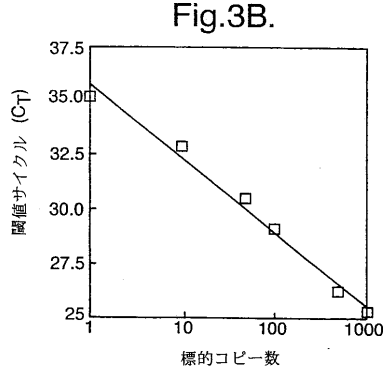
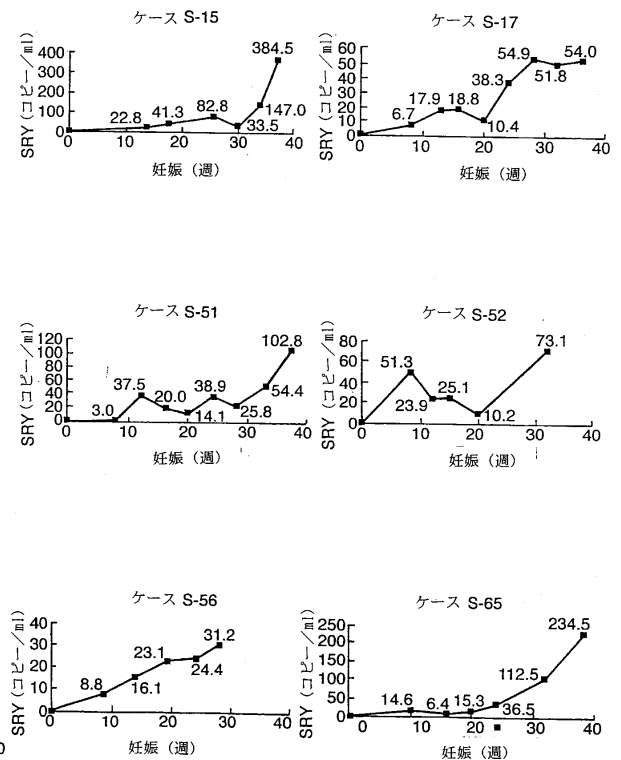


Fig.4 (続き)



## フロントページの続き

## (74)代理人

弁理士 富田 博行

## (72)発明者 ロ, ユク - ミン・デニス

香港ニュー・テリトリーズ, シャティン, プリンズ・オブ・ウェールズ・ホスピタル, ザ・チャイ  
ニーズ・ユニバーシティ・オブ・ホンコン, デPARTMENT・オブ・ケミカル・パソロジー

## (72)発明者 ウェインズコート, ジェームズ・スティーブン

イギリス国オックスフォード オーエックス3・7アールワイ, ウッドランズ・クローズ 14

審査官 三原 健治

## (56)参考文献 Lancet, Vol. 350(Aug. 1997)p. 485-487

Hum. Genet. Vol. 90(1993)p. 483-488

Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 731(1994)p. 229-236

J. Immunol. Methods, Vol. 180(1995)p. 45-51

Clin. Obstet. Gynecol., Vol. 39, No. 4(1996)p. 801-813

## (58)調査した分野(Int. Cl., D B 名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus/EMBASE(STN)

PubMed