

学 位 論 文 題 名

Liquid-phase binding assay を用いた
フコシル化アルファ-フェトプロテイン分画測定による、
胎児21トリソミー検出法に関する検討

学位論文内容の要旨

緒言

レクチン親和性電気泳動法を用いて母体血清中レンズ豆レクチン結合性 AFP 分画比 (AFP-L3%), すなわち非還元末端 N-アセチルグルコサミン残基にフコース残基の結合した糖鎖を持つ AFP 分画比の測定が、胎児 21 トリソミーの出生前検出に有用であることが報告されている。しかし、臨床応用する上でレクチン親和性電気泳動法の手技的煩雑さにより、大量サンプルの測定が困難であること。母体血清 AFP-L3% は、妊娠週数により変化するため、各妊娠日の中央値に対する比率 (multiple of the median, MoM) での評価が好ましいという問題点があった。

この点を解決するため、レクチンと抗 AFP モノクローナル抗体との競合反応を応用した liquid-phase binding assay にて母体血清 AFP-L3% を測定、AFP-L3% MoM を算出し、胎児 21 トリソミーの出生前診断の有用性を検討することを本研究の目的とした。

材料と方法

本研究では、羊水細胞染色体分析を行い、正常染色体核型と診断された 2,054 例 (母体年齢, 36.8 ± 4.2 歳; 妊娠週数 16.1 ± 1.3 週, mean \pm S.D.) (正常群) と、21 トリソミーと診断された 29 例 (37.7 ± 4.6 歳; 16.5 ± 3.1 週) (21 トリソミー群) の母体血清を材料とした。

各妊娠日の母体血清 AFP 値と AFP-L3% の中央値は、正常群から求めた回帰直線上近くにあるため、母体血清 AFP 値と AFP-L3% の MoM 値はこの回帰式より算出した。ただし正常群 2,054 例中 14 例が AFP の異常高値を示したため、母体血清 AFP 値を正規分布を示す log AFP に変換した後スミルノフ棄却検定を行い、検討からは棄却した。

統計学的有意差検定に Student's *t* test と Mann-Whitney U-test を用いた。AFP MoM と AFP-L3% MoM 値との出生前胎児 21 トリソミー検出における単一母体血清マーカーとしての有用性の比較は、ROC 曲線にて検討した。

AFP-L3% MoM, AFP MoM, hCG MoM, uE3 MoM 値の母体血清マーカーを測定し得た 431 例 (正常 402 例, 21 トリソミー 29 例) を対象に、母体血清マーカー値の組合わせによる診断効率を検討した。AFP MoM, hCG MoM, uE3 MoM はトリプルマーカーテスト® (SRL, Hachiohji, Japan) にて測定した。各母体血清マーカーに対し、それぞれの分布を考慮してスコアを、AFP-L3% MoM は 1.2 以上 1.6 未満を 1 点, 1.6 以上を 2 点, AFP MoM と uE3 MoM は 0.5 以上 1.0 未満を 1 点, 0.5 未満を 2 点, hCG MoM は 2.0 以上 2.5 未満を 1 点, 2.5 以上を 2 点と設定し、スコア合計が 2~5 点の場合の感度・偽陽性率・陽性反応的中率を求めた。

結果

正常群 2,040 例の母体血清 log AFP を y 軸に、妊娠日を x 軸に設定しグラフを作製する

と、回帰直線は $y=0.0093x + 0.6$ ($r=0.430, p<0.001$)となった。また正常群 2,054 例の AFP-L3% を y 軸に、妊娠日を x 軸にすると、回帰直線は $y=-0.1321x + 41.77$ ($r=-0.147, p<0.001$)となった。これより算出した正常群 AFP MoM の中央値は 1.0 (範囲; 0.6-1.5), AFP-L3% MoM の中央値は 1.0 (範囲; 0.0~2.4)で、21 トリソミーの AFP MoM の中央値は 0.9 (0.3-1.2), AFP-L3% MoM の中央値は 1.7 (1.1-2.1)であり、AFP MoM は、21 トリソミー群は正常群に比較し有意 ($p=0.0003$)に低値を示し、AFP-L3% MoM は、21 トリソミー群は正常群に比較し有意 ($p<0.00001$)に高値を示した。

ROC 曲線を用いた 21 トリソミー検出法としての有用性の検討では、AFP MoM と AFP-L3% MoM の AUC はそれぞれ 0.709 と 0.937 であり、AFP-L3% MoM の AUC が有意 ($p<0.000024$)に高値を示した。また偽陽性率を 5%に固定すると、AFP MoM のカットオフは $0.85>$ となり感度は 24%、AFP-L3% MoM のカットオフは $1.50<$ となり感度は 66%であった。

スコア化した母体血清マーカーの組合わせでは、合計スコアのカットオフ値を 4 点とした場合、21 トリソミー診断の感度は 86.2%、偽陽性率は 3.2%であった。また陽性反応的中率は 65.8%であった。

考察

Yamamoto らは、妊娠週数を一定期間に限定した 22 例の胎児 21 トリソミーと 227 例の正常妊婦を母集団とし、AFP, hCG, uE3 を RIA 法で、また AFP-L3%はレクチン親和性電気泳動法で測定し、それぞれの母体血清マーカーの有効性を解析した。結果は、AFP MoM, hCG MoM, uE3 MoM, AFP-L3%のカットオフ値を 0.54, 2.18, 0.50, 41.9%と設定し、偽陽性率を 5%としたときの感度はそれぞれ 27.7%, 27.7%, 31.8%, 54.5%であり、AFP-L3% は MoM を算出しなくても妊娠週数を一定期間に限定しただけで 21 トリソミーの母体血清マーカーとしての有用性が示された。一方、AFP-L3%は AFP 値と相関を示さない独立した母体血清マーカーであるため、これに AFP MoM, hCG MoM, uE3 MoM を加えた 4 種の母体血清マーカーによる検出を行うと、5.1% の偽陽性率において感度が 83.9%になることも明らかとされた。

レクチンと抗 AFP モノクローナル抗体との競合反応を応用した liquid-phase binding assay は、レクチン親和性電気泳動法に比較し簡便、迅速な手法である。AFP-L3%だけではなく総AFP値も同時に測定できるため、今回検討に用いた 2,054 例の血清総AFP値と AFP-L3% とを同時に測定し、同一母集団における AFP MoM と AFP-L3% MoM 値とを比較検討することが可能であった。結果は AFP MoM と AFP-L3% MoM のカットオフ値を 0.85 と 1.50 に設定し、偽陽性率を 5%とすると感度は 24.0%と 66.0%であり、AFP MoM 値に関しては妊娠期間を 15-17 週に限定した 249 症例による検討と同程度の感度を示していたが、AFP-L3% に関しては MoM を用いることで 5% 偽陽性率 で 54.5%から 66.0%への感度の改善が認められた。

妊娠 15-17 週の一定期間に限定して検討した場合、従来の検討では妊娠週数の違いによる AFP-L3%に有意差を認めないことを根拠とし、妊娠週数を無視して AFP-L3%の有用性が報告されてきた。しかし妊娠経過で変化を来す因子であれば、AFP-L3%を MoM で評価することが好ましく、今回 AFP-L3%MoM を採用することで、感度の上昇が証明された。このことは AFP-L3% MoM 値を他の母体血清マーカーと組合わせることで、従来のトリプルマーカーテストに比較し感度の改善が得られることを示唆している。

本研究においてスコア化した AFP-L3% MoM を含む 4 種の母体血清マーカーの組合わせにより、合計スコアのカットオフ値を 4 点とした場合、21 トリソミーの検出感度は 86.2%、偽陽性率 3.2%と高い診断効率を示したことで裏付けられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征 一 郎

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Liquid-phase binding assay を用いた フコシル化アルファ-フェトプロテイン分画測定による、 胎児21トリソミー検出法に関する検討

正常染色体核型と診断された 2,054 例 (母体年齢, 36.8 ± 4.2 歳; 妊娠週数 16.1 ± 1.3 週, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$) (正常群) と, 21 トリソミーと診断された 29 例 (37.7 ± 4.6 歳; 16.5 ± 3.1 週) (21 トリソミー群) の母体血清を材料として, liquid-phase binding assay にて母体血清 AFP-L3% を測定して, AFP-L3% MoM (multiple of the median) を算出し, 胎児 21 トリソミーの出生前診断の有用性を検討することを本研究の目的とした。

AFP MoM と AFP-L3% MoM 値との出生前胎児 21 トリソミー検出における単一母体血清マーカーとしての有用性の比較は, ROC 曲線にて検討した。AFP-L3% MoM, AFP MoM, hCG MoM, uE3 MoM 値の母体血清マーカーを測定し得た 431 例 (正常 402 例, 21 トリソミー 29 例) を対象に, 母体血清マーカー値の組み合わせによる診断効率を検討した。AFP MoM, hCG MoM, uE3 MoM はトリプルマーカーテスト® (SRL, Hachiohji, Japan) にて測定した。各母体血清マーカーに対し, それぞれの分布を考慮してスコアを, AFP-L3% MoM は 1.2 以上 1.6 未満を 1 点, 1.6 以上を 2 点, AFP MoM と uE3 MoM は 0.5 以上 1.0 未満を 1 点, 0.5 未満を 2 点, hCG MoM は 2.0 以上 2.5 未満を 1 点, 2.5 以上を 2 点と設定し, スコア合計が 2~5 点の場合の感度・偽陽性率・陽性反応的中率を求めた。

正常群 2,054 例の AFP-L3% を y 軸に, 妊娠日を x 軸にすると, 回帰直線は $y = -0.1321x + 41.77$ ($r = -0.147$, $p < 0.001$) となった。これより算出した正常群の AFP MoM の中央値は 1.0 (範囲; 0.6-1.5), AFP-L3% MoM の中央値は 1.0 (範囲; 0.0~2.4) で, 21 トリソミー群の AFP MoM の中央値は 0.9 (0.3-1.2), AFP-L3% MoM の中央値は 1.7 (1.1-2.1) であり, AFP MoM は, 21 トリソミー群は正常群に比較し有意 ($p = 0.0003$) に低値を示し, 逆に AFP-L3% MoM は, 21 トリソミー群は正常群に比較し有意 ($p < 0.00001$) に高値を示した。

ROC 曲線を用いた 21 トリソミー検出法としての有用性の検討では, AFP MoM と AFP-L3% MoM の AUC はそれぞれ 0.709 と 0.937 であり, AFP-L3% MoM の AUC が有意 ($p < 0.000024$) に高値を示した。

スコア化した母体血清マーカーの組み合わせでは, 合計スコアのカットオフ値を 4 点とした場合, 21 トリソミー診断の感度は 86.2%, 偽陽性率は 3.2% であった。

レクチンと抗 AFP モノクローナル抗体との競合反応を応用した liquid-phase binding assay は、レクチン親和性電気泳動法に比較し簡便、迅速な手法である。AFP-L3%だけではなく総 AFP 値も同時に測定できるため、今回検討に用いた 2,054 例の血清総 AFP 値と AFP-L3%とを同時に測定し、同一母集団における AFP MoM と AFP-L3% MoM 値とを比較検討することが可能であった。

公開発表に際し、西教授（副査）より 21 トリソミー妊婦の血清でフコースの結合しない AFP の割合について、AFP-L2 が属する測定上の complex について、21 トリソミーで AFP-L3%が上昇する機序について、さらに小林教授（副査）からは、本測定法と従来の電気泳動法との測定値における相関について、14 症例を棄却した理由について、胎児 21 トリソミー例の AFP-L3%の分布に 2 峰性が見られたことの理由について、それぞれ質問があった。藤本教授（主査）からは、本測定法の優位性、AFP 糖鎖の検体保存上の安定性、AFP-L3%が妊娠進行とともに低下する理由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、実験成績の解析結果、最新の文献情報、自身の研究経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、本研究の成果の臨床応用への可能性と申請者の研鑽を高く評価し、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。