

Current Progress of Amniotic Fluid Proteome Analysis

Tamaki Jikyo and Fumiaki Uchiyama

*Department of Molecular Biosciences, Institute of Preventive and Medicinal Dietetics, Nakamura Gakuen University
(Received 31 March, 2011)*

Abstract

Down syndrome (DS) is associated with impairment of cognitive ability and physical growth, and congenital heart disease. Additionally, in patients with DS, it has an increased risk for diseases such as Alzheimer's disease and leukemia. DS is a congenital disorder caused by having an extra 21st chromosome. The overall rate of incidence of Down's syndrome is one in every 700 births. Currently, prenatal diagnosis for DS carried out, such as amniocentesis, chorionic villi sampling, ultrasonography and maternal serum screening tests. This screening test is desirable to a sensitive serum marker that can be measured a cheap, accurate, rapidly, and noninvasive test. Since a few years, proteomics allows the simultaneous analysis of hundreds of proteins, as well as the analysis of their structural modifications. It is aid in discovery of novel biomarkers for better screening. A total of 542 proteins have been identified from the triplicate analyses by the LTQ-Orbitrap mass spectrometer. Comparison between the two groups revealed 60 candidates that showed greater than 2-fold increase or decrease in the presence of DS. Among these candidates, amyloid precursor protein and tenascin-C were verified by ELISA. This review introduces the amniotic fluid proteome analysis from chromosomally normal and DS pregnancies.

ダウン症における羊水プロテオーム解析の現状

治京 玉記・内山 文昭

中村学園大学 薬膳科学研究所 分子栄養学部門

キーワード

羊水、プロテオーム解析、ダウン症候群、バイオマーカー

(2011年3月31日受理)

要 約

ダウン症 (DS) は、認知能力と身体発育の障害そして先天的心疾患を伴っている。さらに、DS の患者達では、アルツハイマー病そして白血病のような病気になる危険性が高い。ダウン症は、21番目の染色体が1本余分にあることによって生じる先天性異常である。ダウン症候群の発生の全体的な確率は、700の出産に対して1である。現在、ダウン症の出生前診断は、羊水穿刺、絨毛検査、超音波検査、母体血清マーカー検査等が行なわれているが、十分に機能している段階ではない。数年前から、プロテオーム解析が、構造修飾の分析と同様に、何百というタンパク質の同時分析を可能にしている。これは、より

良い診断のための新規バイオマーカーの発見に利用されている。染色体正常と DS 妊娠の羊水プロテオーム分析が行なわれ、合計542タンパク質が、LTQ-Orbitrap 質量分析計でトリプリケート分析から同定されている。これらのタンパク質から正常に比し、ダウン症で2倍に増加したアミロイド前駆体タンパク質とテネイシン-Cが発見されている。本総説では、これらの発見における経緯と今後の羊水プロテオームの発展について述べる。

緒 言

胎芽・胎児は成長発育を遂げつつ子宮内で生活するために、胎盤で母体から十分な栄養・水分・酸素を吸収し、母体に老廃物の排泄を行い、あるいは母体を妊娠維

持に都合がよくなるように変化させるためホルモンを分泌したりする。

胎芽・胎児の外にあって生育の環境をつかさどるものを胎児の付属物といい、胎盤・卵膜・臍帯・羊水・卵黄囊・尿膜からなる。

羊水の存在意義については、古来、その物理的側面が重要視されていた。一つは、胎児発育にともなう空間の確保である。羊水量の増大により、子宮腔を拡大させて発育空間を確保するとともに、胎児の自由な運動空間を保ち、一方では胎盤の早期剥離を防ぐ。また、胎児の運動による子宮壁への衝撃を柔らげるとともに、外圧による物理的衝撃からも、羊水のクッション的作用によって、胎児を損傷から防いでいる。さらに、羊水の恒温作用も認められている。陣痛発来に至れば、胎胞を形成し、産道を広げるとともに、破水により産道の潤滑油的役割も担っている。

しかしながら、このような役割は、むしろ羊水の受動的意義をとらえているにすぎない。現在では、羊水は、胎児の発育および生命の維持に欠くことのできない生活環境そのものとも考えられている。生物は、その生命を維持していく上で、環境と切り離して考えることは出来ないが、胎児にとっては、羊水にみだされた羊膜腔が、その生活環境であるといえる。事実、破水による環境の破壊は陣痛発来を引き起こす。また、羊膜腔内への高張食塩水注入は、陣痛発来とともに胎児の生命をも奪う結果となる。胎齢15日のラットでは、羊膜腔への侵襲により奇形の発生が認められる。このように羊水は、胎児の発育を守り、生命を維持するため、発育の過程に応じた至適環境を形づくっているともいえる。ここに、羊水の生理的意義が存在する。

胎児診断という臨床的立場からみると、現在のところ、胎児からの情報は、直接胎児から得ることは許されていない。したがって、物理的には代謝エネルギー(ME)による間接的な方法により、また、羊水検査によりその情報をもとめる以外に方法はない。羊水が胎児の生命現象をある程度反映すると考えると、ここに羊水診断の臨床的価値が位置づけられる。近年の医学における測定法や診断技術の急速な進歩により、羊水診断技術も新たな手法の導入により、今後、詳細な胎児情報を得ることが期待される。

本稿では、羊水の一般的所見から胎児異常の診断、さらに最先端技術として羊水プロテオーム解析について概説する。

羊水の発生

受精卵は分割によって、桑実胚から胞胚とすすむが、

この時期で着床する。胞胚は、外表は一層で栄養膜とよばれ、内層は細胞塊とよばれる細胞集団を形成する¹。内細胞塊は一側に片寄っており、この部分は embryonic pole という。他側は中空で網状粘液で満たされた胞胚腔を形成する。受精後5日目の胚胞では、羊膜腔の形成はみられない。Hertig と Rock によると、7.5日の胚胞では、わずかに羊膜腔の形成が認められ、9日では羊膜腔の存在が明らかとなる。

羊膜腔は、一側は、栄養膜からわかれた細胞(外胚葉性)により、他側は、胚部によりより囲まれている。この初期羊水の発生は、母体血漿から栄養膜を経由して羊膜上皮からはいる経路と、胎外体腔から胚部を通じてはいつてくる二つの経路が考えられているが、その詳細は不明である。Ogawa²は、初期羊水の発生を、胚部と羊膜間の外胚葉細胞の融解によって生ずるとしているが、初期発生のこの時期において、自己融解という細胞としては分化した機能を考えるとこの説には疑問が残る。

胎齢第3～4週にかけて羊膜腔はしだいに増大し、胎外体腔をみだすようになる。この胎外体腔(羊膜-絨毛膜間腔)が完全に閉鎖し消失するのは、妊娠4ヶ月初めである。Ogawa³によると、この羊膜-絨毛膜間腔をみだす仮羊水は、妊娠2ヶ月で全例、3ヶ月では1/2、4ヶ月では1/3例に存在が認められる。したがって、羊水穿刺による胎児診断の適当な時期は、技術的にも、副作用の点からみても、妊娠12週以降でなければならない。

羊水量とその測定法

(1) 羊水量

妊娠初期から中期にかけての羊水量は、直接測定により報告されている。Nelson⁴によると妊娠8週で7.5～22mL、妊娠12週では、40～210mLであるという。Ogawaらの日本人についての統計では、妊娠2ヶ月で真羊水10.4mL、仮羊水(羊膜絨毛膜間液)11.2mL、3ヶ月では、真羊水31.3mL、仮羊水18.4mL、4ヶ月では、真羊水72mL、仮羊水32.6mLである。

Wagner と Fuchs⁵による直接測定の成績では、妊娠各週の標準羊水量は、次の式から算出できるという。

$$V_1 = 25(W - 10)$$

$$V_2 = 50(W - 12.5)$$

W: 最終月経から数えた妊娠週数

V₁: 妊娠11週から15週までの羊水量 (mL)

V₂: 妊娠15週から20週までの羊水量 (mL)

Fuchs⁶は、paraaminohippuric acid による希釈測定によっても、V₂=50(W-12.5)の式は、妊娠28週までは通用するとしている。Queenanら⁷の同じ希釈法による測

定成績は、個体によるバラツキは大きい、平均値で見ると239mL (15～16週)、669mL (25～26週)と妊娠週数とともに増加し、33～34週で984mLとピークとなり、以後減少し、予定日近くでは836mL、予定日を過ぎた41～42週では544mLとなっている。日本人についてのInoueの成績では、325mL (妊娠5ヶ月)、587mL (6ヶ月)、689mL (7ヶ月)と妊娠7ヶ月でピークとなり、以後減少して598mL (8ヶ月)、408mL (9ヶ月)、245mL (10ヶ月)であった。なお、日本産婦人科学会では、正常羊水量の上限を800mLとし、これ以上を羊水過多と定義している。

妊娠末期における羊水量の減少は、胎盤機能の低下に関係があるとする説が多い。確かに、胎盤機能不全症候群では、予定日を超過するものほど、羊水量の減少が著明である。また、妊娠中毒症や高血圧症妊婦では、羊水量の減少に一致して胎盤不全症候群の早発傾向を認めることがある。また、尿中エストジオール値からみると、37～38週でピークとなり、以後減少する傾向があることから、この説を否定する事ができない。しかし一方で、妊娠中毒症で羊水過多をとともなう場合もみられ、羊水量減少の機構は不明である。

妊娠週数とともに増量する羊水量の意義もまた不明である。羊水量の増大は、子宮腔の拡大、子宮筋の肥大を促すととも、児の移住性を確保し、また、児のためのより重力の少ない場を提供しているとも推測されている。分娩発来直前における羊水量の減少が、分娩発来機序に対するなんらかの関与が推測されるが、その詳細は不明である。

(2) 羊水量の測定法

羊水量の測定法には、直接測定法と希釈法による間接測定法がある。

直接測定法は、妊娠初期および中期では、人口妊娠中絶の際、卵膜ごと流産させて、羊水を測定する方法である。帝王切開時の羊水吸引や、人工被膜による経膈的測定は、血液の混入もあり正確さに欠けるが、おおよその測定は可能である。

臨床的に、妊娠を中断させることなく、羊水量を測定するとなると、間接法によらざるを得ない。希釈法の原理は、dye-dilution methodと同じであり、羊膜腔内に注入し物質の希釈度を、一定時間後にとり出した羊水から算定する方法である。

現在までに使用された物質としては、congo red (Dickmann⁸, 1933)、phenol red (Albano⁹, 1933)、inulin (Lambiotte¹⁰, 1949)、RISA、重水、Evans blue (Nelson¹¹, 1965)、coomassie blue (Elliot^{12, 13}, 1961)、パラアミノ馬尿酸ソーダ para-aminohippuric acid (PAH, Charles¹⁴, 1965:

Fuchs⁶, 1966)などがあげられる。

希釈法に用いられる物質の条件としては、①母児に対し無害、②安定した物質で生理作用が無い、③羊水中での拡散が速い、④胎盤や羊膜を通らない大きさの分子量をもつ、⑤どの症例にも一定量、何時でも使用できる、の5点を満たすことが望ましい⁶。

この点からみると、congo redは、溶血があると不適當である。Evans blueはタンパク質と結合するので結果が不正確になりやすい。Evans blueおよびcoomassie blueは、胎児皮膚を青く染色するので好ましくない。また、その後の羊水診断を阻害する。放射性物質は、母児にとって好ましくないなど、それぞれ欠点があり、現在では、PAHが最も良いとされている。

羊水の性状

羊水は不溶性の物質を混在した不均一の液体である。妊娠4ヶ月までにみられる仮羊水では、比重、粘稠度、氷点降下度とも、いわゆる羊水よりは高い。仮羊水は淡黄色であるが、羊水は、無色にちかい。妊娠週数の増加とともに色調は多少変化するが、採取時の羊水の状態によっても多少の差がみられる²。

胎児は、妊娠後半期にはいれば、羊水内に生理的にも胎便を排出するが、妊娠前期においても、たとえば切迫流産など低酸素状態におちいるときには、羊水混濁が認められる。Ogawaらによると、胎便排出後まもなくの羊水は、淡緑色であるが、2時間後には淡褐色となり、4時間を経過すれば灰白色に、さらに6時間後では、正常の淡黄色にもどる。

胎盤機能不全では黄泥状羊水となることが知られており、羊水混濁が臨床上、胎児仮死の一徴候として重要であるが、陣痛発来以前の一過性のhypoxiaによる羊水混濁は、羊水の絶え間ない更新により、元にもどることもある。一方、胎児死亡では、羊水は暗赤褐色となる。

妊娠初期の羊水は、発生学的にも、母体の細胞外液ときわめて類似しているが、しだいに、胎児血清成分に近い値となり、さらに胎児皮膚の完成とともに、胎児尿成分の混入もあってhypotonicとなる。すなわち、物理学的性状は、妊娠経過とともに変動する。

浸透圧についてみると¹⁵、280～291m Osm/L (2～4ヶ月)であったものが、277～280 (4～6ヶ月)、260～273 (6～8ヶ月)と漸減し、予定日近くなると256～270m Osm/Lまで降下する。Cassady¹⁶ (1968)によると、周産期死亡と浸透圧には、ある程度関係があるという。子宮内胎児死亡の羊水では、浸透圧は極めて高く、この際には羊水中のナトリウムイオン濃度の上昇が見られる。

表1. 羊水中のpH, P_{CO₂}, HCO₃⁻

妊娠週数		H ⁺ (mEq/L)	pH	P _{CO₂} (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mM/L)
10-23週	平均値	59.34	7.227	41.1	16.57
(28)*	±S.E.M.	±1.25		±0.5	±0.37
25-31週	平均値	67.81	7.169	43.2	15.16
(8)*	±S.E.M.	±2.99		±1.4	±0.63
予定日	平均値	78.45	7.105	50.8	14.82
(12)*	±S.E.M.	±2.68		±0.9	±0.56

*()内は測定例数

羊水中のpHは、妊娠初期では母体細胞外液にちかいがしだいに減少傾向を示す(表1)。また、臨床的に破水診断にpHを応用する際には、pH7.4～7.6以上を破水と診断しているが、測定法と測定までの時間および条件によって差異が生じることがある。胎児尿は、分娩前ではpH6.2とされており、羊水のpHの下降傾向は胎児尿の影響を受けたものと考えられている。

分娩経過中の羊水は、pHの軽度の低下を示すという、また、P_{CO₂}は逆に上昇する¹⁷。一方、母体へのCO₂投与でも同様の現象が起こる¹⁸。

羊水中のHCO₃⁻は、妊娠経過とともに減少し、胎児がacidosisに陥っているときには、羊水中のHCO₃⁻の低下も著しい。実験的に、羊膜腔に重炭酸ソーダを注入すると、胎児血のpHは改善される¹⁹。

羊水中のP_{O₂}は、胎児血のP_{O₂}との相関はないとされている。予定日近くでのP_{O₂}は、8～25mmHgであるが²⁰⁻²²、母体に100%の酸素を投与しても、羊水中のP_{O₂}はほとんど変化しない²⁰。

羊水の化学的組成

妊娠初期の羊水組成は、母体および胎児の血液に類似しており、両者の細胞外液的性格をもっている。妊娠中期にかけては、タンパク質成分の中には、胎児由来のものが多く、羊膜の透析的作用を受けることになる。一方、ある種の成分では、胎児尿由来のものが増加する。羊水の組成の変化は、発育する胎児の生活環境が微妙に調整されている結果と推測される²³⁻²⁷。

(1) 電解質

ナトリウムおよび塩素は、妊娠経過とともに多少の減少傾向をみとめるが、この減少傾向は、羊水の浸透圧の下降とよく一致している。浸透圧の低い胎児尿(80～140mOsm/L)の影響を考えられている。

カリウムは、妊娠全期間を通じて殆ど濃度変化がみられない。

カルシウムは、胎児においては、きわめて必要度の高い成分であるため、胎児尿中へは殆ど出てこない。Nusbaum²⁸らによる妊娠11～19週の値は、6.70±0.48mg/dlで、母体血の9.10±0.47mg/dlに比べて有意に低い。

マグネシウムは、Nusbaum²⁸らの報告によると、同上の妊娠時期では1.13±0.42mg/dlとやはり母体血中濃度より低い値を示す。他の報告でも妊娠末期で1.0～3.1mg/dlとされている。

鉄については、Uyeno²⁹は8.5mg/dlと報じたがNusbaumらは、上記期間で31±20ug/dlであり、妊娠末期でも、19ug/dlであった。

銅の濃度は、Mischel³⁰の報告では134ug/dlであるが、Nusbaumらは、10ug/dlであった。

その他、リン(1.1～5.4mg/dl)、亜鉛(0.6～2mg/dl)、マンガン(0.64mg/dl)など報告されているが、これらの電解質の濃度のもつ意義は不明である。

(2) 炭水化物

糖質は、母体血清や胎児血清中濃度と比較してもかなり低値を示し、大部分を占めるブドウ糖でも、10～61mg/dlである。しかし、糖尿病母体の場合には23～139mg/dlを示す。

乳酸、焦性ブドウ酸は、fetal distressの程度に応じて高くなる。

(3) 脂質

妊娠末期における羊水中の総脂質は、Guthmann³¹によると、48mg/dlであり、そのうち脂肪酸が24mg/dl、リン脂質は3.0mg/dl、コレステロール2.0mg/dl、総アセトン体0.1mg/dlである。

妊娠経過における羊水中脂質の変化は、総脂質の含有量は、妊娠経過とともに増大し、分娩時に約15mg/dlと

最高になる³²。

分娩時羊水の脂質の組成についてみると phospholipids 25.5% で全体の 1/4 を占め遊離脂肪酸15.8%、コレステリールエステル15.0%、hydrocarbon 14.3% と、この四者で全体の70% を占め、コレステロールは約1割に過ぎない。

羊水中 phospholipids は、胎児肺成熟度を判定する指標として用いられている。このリン脂質の構成成分は、phosphatidyl colin (lecithin) が65%で、phospholipid の大部分を占め、これが、surfactant として注目されている。Phosphatidyl ethanolamine が12%、sphingomyelin 10.5%、となっており、lecithin 量は、36週を過ぎると急激に増加するが、sphingomyelin 量は、妊娠経過で変動を示さない。胎児肺成熟度は、lecithin/sphingomyelin 比 (L/S 比) を指標としている報告が多いが、この場合には、sphingomyelin 量が少ない場合にも、相対的に L/S 比が上昇するため、lecithin 量を指標としたほうが良いとする報告もある^{4, 33, 34}。Lecithin 量で見ると、lecithin に含まれるリンの含有量をも表すことが多い。一方、lecithin 量は、肺成熟度よりも、妊娠週数とよく相関するとか、呼吸窮迫症候群 (RDS) の発症は、lecithin よりも児体重による影響が大きいとの報告もある。しかし、Nelson の報告では、lecithin が、妊娠週数や児体重と関係なく、肺成熟度そのものを示している。

(4) タンパク質

羊水中のタンパク質については、報告が多いが、値のバラツキが以外に多い。妊娠初期では母体細胞外液とほぼ同様であるが、急激に減少し、妊娠中期では、0.2~0.35g/dl、妊娠後期では0.20~0.35g/dl、妊娠末期では、0.16~0.35g/dl と考えられている。タンパク質は羊水の膠質浸透圧を恒常的に保つ役割を持っているものの、羊水量そのものに個人差や日内変動があり、また、羊水浸透圧は、電解質濃度でコントロールされているため、測定時の状態や時期、個人差により、バラツキが大きいと考えられている。また、各報告によって測定法が異なっている。しかし、胎児奇形や不適合妊娠における胎児水腫など、胎児の異常をとまなうものでは、タンパク質含有量が多い傾向が認められ、胎児診断に利用されている。

電気泳動によるタンパク質構成をみると、pre-albumin、albumin、 α -globulin、 β -globulin、 γ -globulin の各分画が認められ、fibrinogen は殆ど無いとされている。また、この羊水中のタンパク質分画は、母体血より胎児血のタンパク質分画にちかい³⁵。

pre-albumin は、母体血より圧倒的に多く、胎児に由来すると考えられている。分画中で占める割合は妊娠経過

とともに漸増し、36週から40週にかけてピークに達し、予定日を過ぎると急減する。

Albumin は、羊水タンパク質分画中、もっとも多く、膠質浸透圧の保持に重要な役割を担っている。羊水中ビリルビンは、このタンパク質と結合していると考えられている。

α -globulin は、10~12% を占める。 α_2 -globulin に属する mucoprotein は、胎盤に多く含まれているが、重症妊娠中毒症や低体重児の際には、羊水中に増えるという³⁶。 α_2 -globulin に属する ceruloplasmin は羊水中の銅イオンと結合して存在する。

β -globulin は、15~16% を占める。 β_1 -globulin に属する transferrin について若干の報告がなされている。Transferrin は、鉄2分子と可逆的に結合するタンパク質で³⁷、分子量約73,200~76,000であり、生体内では、鉄を腸管から造血臓器に運ぶタンパク質である³⁸。羊水中では、妊娠経過を通じて、大きな変動はみられず、Larsen ら³⁹によると16週から42週の羊水で平均29.9mg/dl (14~44.5mg/dl) であった。羊水中における transferrin の意義としては、細菌増殖抑制の可能性を示唆している報告もある³⁹。

γ -globulin は、タンパク質分画中約11~12% を占めている。免疫 globulin の大部分はこれに属する。羊水中の免疫 globulin では、IgM は無いとされている。IgA および IgM については immunodiffusion や electroimmuno-diffusion technique の開発により、羊水中で証明されている。Curl⁴⁰は、分娩時羊水10例中8例に IgA を認めており、IgA の羊水中、母体血中、臍帯血中の各濃度を表3に示す。また不適合妊娠では、24週の羊水で IgA および IgG を高濃度に認めた。Monif ら⁴¹も IgG の存在を報告しているが、Cederqvist ら⁴²によると、この IgG は母体から由来したものであると報告している。

初期胎児の主要な血漿タンパク質である α -fetoprotein は、妊娠初期には、羊水中にも大量に含まれている。すなわち10~16週の羊水は、母体血清よりも1,000~20,000倍高い値を示す。65例の羊水について、radioimmunoassay により測定した Seppaelae⁴³の報告によると、妊娠中期では2,800~26,000ng/ml であるが、以後425ng/ml (32~34週)、316ng/ml (35~36週)、164ng/ml (37~38週)、115ng/ml (39~40週)、87ng/ml (41~42週) と減少し、妊娠週数と有意の相関を認めている。また先天性ネフローゼの胎児では、4,900ng/ml と高値を示した。Brock ら⁴⁴の報告では、無脳児妊娠でも高く、先天異常の出生前診断の可能性を推測している。

羊水中のアミノ酸分析に関する報告も多数みられる。イオン交換樹脂による液体クロマトグラフィーや、ガスクロマトグラフィーが使用されている。アミノ酸は、ど

れも妊娠週数とともに減少傾向を示し、とくにオルニチンで著しく、この減少傾向は23週前後で特に顕著である。セリン、タウリンではむしろ上昇傾向がある。ある種のアミノ酸は、先天的代謝異常症の出生前診断に利用されている。

非タンパク窒素化合物である尿素、尿酸、クレアチンは、妊娠初期では、母体血中濃度とほぼ同じであるが、妊娠週数とともに増加し、末期では、母児血清の約2倍になる。とくにクレアチンは、34週を過ぎると急激に増加し37週を過ぎると2mg/dl以上となる⁴⁵。羊水中のクレアチンの高値は、胎児尿によるものと考えられ、妊娠末期での上昇は、胎児の腎機能の成熟を反映すると考えられており、胎児成熟判定の指標として用いられている。なお、羊水過多症や糖尿病合併妊娠では、このクレアチン値は低く、また、サイアザイド系利尿薬を母体に投与した症例では、高値を示す⁴⁶。

(5) 酵素

羊水中には、多数の酵素が含まれており、このうちある種のもの、先天代謝異常の出生前診断に使用されている。しかしながら、羊水の origin そのものに関して定説がない状態においては、その酵素の由来も同じく不明な点が多く、複雑な factor の関与が示唆される。したがって、羊水中の酵素活性が胎児と1:1に対応するわけではない。

Alkaline phosphatase は、妊娠7ヶ月までは、漸増するが、以後はほぼ一定した値になる。しかし、羊水の胎糞による汚染があれば、母体血清の10~35倍にまで上昇する⁴⁷。

アミラーゼもまた妊娠後半期に急増する^{2,48}。32週前後までは、200IU/L以下であるが、末期では10~30倍にも上昇する例がみられ、末期でのバラツキは極めて大きい。アミラーゼは胎児尿や唾液分泌物由来と考えられている。

乳酸脱水素酵素 (LDH) は、羊水細胞、羊膜細胞に多く含まれている⁴⁹。羊水中にもわずかながら存在している。LDH isoenzyme 中、LDH₁、LDH₂は、妊娠経過とともに減少するが、LDH₅は増加する。また LDH₅は Rh 不適合妊娠の重症例では増加する。

羊水の bacteriostatic な作用が注目されているが、その中では、transferrin と並んで、lysozyme の存在が明らかにされている。Cherry ら⁵⁰によると、lysozyme は、妊娠経過とともに漸増し、末期では5.1~18.8ug/mL の値を示し、40週を過ぎると下降する。

Nedler⁵¹らは、Pompe 病の胎児をもつ妊婦から羊水において α -1,4-glucosidase の欠損を認め、該疾患の出生前診断への利用を示唆した。その後の報告によりこれは否

定された。これは、羊水中の α -glucosidase は腎のそれと同質のものであり、培養細胞、羊膜、肝、心臓、筋中のものとは異なることが認められている。すなわち、Pompe 病の欠損酵素と isozyme 的に異なる α -glucosidase が存在するという事なのである。同様のことは他の代謝異常性疾患の羊水診断の場合に常に念頭におくことが必要である。

(6) 羊水中のホルモン

絨毛性コナドロンピンは、羊水中に低い濃度ではあるが存在する母体尿、母体血、胎児血液中に比べても極めて微量である。

ヒト胎盤性ラクトジェン (HPL) も羊水中に存在するが、羊水中の量は妊娠経過とともにむしろ減少し母体に由来すると考えられる。胎児水腫のような胎児の重篤な状態では逆に増加がみられる。

成長ホルモン GH についてみると、母体血清では、妊娠全期間を通じて非妊時と変わりはないが、胎児血は、妊娠4ヶ月以降で母体血の20~30倍の高値を示し、7ヶ月で最高となり、8ヶ月以降漸減し、10ヶ月では母体血の約5倍となる。羊水中の GH は母体血とほぼ同じ値を示す。

Kaufman⁵²は、17~38週の羊水中のタンパク結合沃度 (PBI) を測定した結果、2.2mg/dl で、週数による変化は認められないと報告している。

分娩発来と関係して注目を集めているプロスタグランジン (PG) については、PGE は、妊娠早期に羊水に存在するが、分娩時羊水中では PGF_{2 α} が増加し、5~10ng/dl である⁵³。

これら各種ホルモンの羊水中における存在意義や、羊水への以降経路については、まだ不明の点が多く、今後の検討が期待されている。

羊水中のステロイドホルモンについては、多くの報告がある。羊水中のステロイド測定による先天性副腎過形成の出生前診断については、Jeffcoate⁵⁴によって報告されている。39週の羊水を150mL 採取して、17KS と pregnanetriol を測定したところ、正常値に比べて、約2倍 (100ug/L) に増加していた。Nichols⁵⁵も同様の報告をしている。Merkatz⁵⁶らは、妊娠早期および中期での測定では、副腎過形成を予測できなかったが、末期では増加を認めている。

羊水中のエストリオール値は、母体尿中エストリオール値との相関が認められており、羊水中のエストリオール測定の重要性が認識されつつある。Klopper⁵⁷によると、羊水中エストリオールは、妊娠全期間を通じて glucosiduronate 55%、sulfate 35%、free 10%、であり、この比率は、予定日近い胎児尿と同様である。一方、臍帯血では、

sulfate が最も多い。

Schindler ら⁵⁸によると、羊水中エストジオールは、185~300ug/L と幅が広く、20ug/L 以下は危険であるという。また、Berman ら⁵⁹は、100ug/L 以下は危険であり、妊娠中毒症で母体尿中エストジオール値の低い例でも、羊水中エストジオールが正常を示す例があると報告している。

羊水中のコルチゾールは、 $0.62 \pm 0.43 \text{ug/dl}$ (18~22週)、 $1.26 \pm 0.29 \text{ug/dl}$ (30~35週)、 $1.68 \pm 0.47 \text{ug/dl}$ (35~38週)、 $1.86 \pm 0.39 \text{ug/dl}$ (38~42週) で、妊娠経過とともに増加し、妊娠週数と有意の相関を示すが、羊水中エストジオール値との相関を見ると、妊娠週数よりもよく相関が得られている。

羊水中のプロゲステロンは、Schindler ら⁵⁸によると 40~170ug/L である。Younglai ら⁶⁰による progestin としての測定では、11~15週では、 $61.98 \pm 33.49 \text{ng/mL}$ であるが、妊娠週数とともに減少し、30週以後では $29.59 \pm 11.54 \text{ng/mL}$ であって、妊娠血中の増加と一致しない傾向を示している。

(7) その他

羊水中に見出される物質の中で、重要なものは、このほかに、ビリルビンがあげられる。羊水中のビリルビンを直接測定することもあるが、臨床的には、羊水吸光度曲線の450nmの波長における optical density difference で代用する。 ΔOD_{450} とも呼ばれるもので、胎児肝の機能的成熟と関係があるとされている。したがって、正常妊娠でも、16週から32週にかけて見出されるが、通常は36週を過ぎると0.02以下に減少するので、胎児成熟度判定の指標として使用されている⁶¹。Rh不適合妊娠においては、この ΔOD_{450} は、極めて重要な意義を持つ。無脳児妊娠では、妊娠末期においても高く、また、胎糞の漏出により410nmにピークを認めることが知られている。

羊水から得られる胎児異常の診断

羊水の性状・動態に関して、不明の点が多いとはいえ、胎児血液の直接採取による検査が困難である以上、胎児情報は、主として羊水検査に頼らざるを得ない。

先天異常の早期診断において羊水による診断は理論上、最も理想的なものである。1877年に Prochownik が羊水の重要性に着目してから1世紀以上が経ち、近年この分野の進歩はめざましい。家族性遺伝性疾患病態生理の解明と遺伝情報の重要性の認識が医学的・社会的にも高まってきており、それが胎児異常の診断の進歩に貢献していると言える。

胎児異常は、大別して、遺伝子異常、配偶子異常(染

色体異常)、先天奇形および胎児環境に加えられた外的因子の影響による異常の4つに分けられる。羊水穿刺により胎児異常を検索する試みは古く1930年代にはじまり、Rh同種免疫による胎児赤芽球症の診断と治療に用いられてきた。1956年、Fuchs ら⁶²が胎児の性別判断に利用し、Liley⁶³による羊水中ビリルビン様物質測定が行われ、以後、その臨床的応用は胎児異常の診断と妊婦分娩の安全管理の両分野で用いられてきた。

1966年、Steele ら⁶⁴は羊水浮遊細胞の培養に成功し、染色体異常の研究と結びつく事で、Down症候群を中心とする染色体異常の診断、病態生理の解明につづき早期診断への動向は組織培養による繊維芽細胞を用いる技術を保因者の検索と並んで羊水浮遊細胞にも応用し、出生前診断の発展に貢献した。以後、種々の先天性代謝異常の出生前診断は、羊水培養細胞による酵素活性測定、異常細胞構造による所見をもとにしてなされるようになった。

胎児異常は様々な形で羊水および羊水細胞(非培養細胞および培養細胞)に表現される。すなわち、浮遊細胞における酸素欠損、またはその結果としての異常物質の蓄積、培養細胞においても同様である。羊水上清には胎児内異常代謝の反映として胎児腎を介して排泄される代謝産物(ホルモン、タンパク質、アミノ酸、酵素、有機酸など)が含まれる。この場合、母体循環による異常物質の除去、また異常母体による正常胎児への影響も存在している。

胎児異常の診断をいかなる材料を用い、いかなる方法によって確定するかは個々の疾患の場合によって異なってくる。すでに判明している障害酵素の検索および酵素活性測定を行うにしても、酵素障害が皮膚組織を含めて全ての体組織に存在するpancyticなもの、血球や肝といった一部の臓器の組織のみに限定されるか、または、fibroblastにおいては活性が低くて実用に適さない場合もあり、現在における羊水診断の限界として間接的な方法に頼らざるを得ない。現在行なわれている羊水穿刺による主な検査と適応を表2に示す。

(1) 先天性代謝異常の診断

現在知られている先天性代謝異常は、分類の方法により多少異なるが、約150種以上と考えられ、今後さらに増加する傾向にある^{65,66}。このうち、羊水から直接判定できる疾患には、Tay-Sachs病、全身性ガングリオシドーシス、Hurler病、Pompe病、オロト酸尿症などが挙げられる。また、羊水細胞から直接酵素活性を測定する方法も、Nadlerらにより報告されているが、羊水細胞培養によっても出生前診断が可能なのがある。

先天性内分泌代謝異常のうち、タンパク質ホルモンに

表2. 羊水穿刺による検査法と適応

先天異常の出生前診断	羊水細胞培養による染色体分析 羊水・羊水細胞・羊水細胞培養による酵素活性分析 羊水細胞による性判定 羊水中ステロイドホルモン測定	染色体異常 先天性代謝異常 伴性遺伝性疾患 先天性副腎過形成
胎児奇形の診断	羊水造影法 胎表造影法	胎児奇形の疑い 羊水過多症 糖尿病合併妊娠
胎児成熟度の判定	羊水中クレアチニン 羊水中脂肪染色細胞発現率 羊水 lecithin/sphingomyelin 比 羊水の ΔOD_{450} mu	Rh 不適合妊娠 糖尿病合併妊娠 予定日不明妊娠 重症妊娠中毒症
羊水量の測定	羊水中色素希釈試験	羊水過多症
胎児－胎盤機能検査法	PAH、各種ステロイド負荷試験	胎児－胎盤機能低下の疑い
羊水分析	羊水中ビリルビン様物質判定	Rh 不適合妊娠

については、羊水検査の意義は、殆ど無い。これは、羊水中のタンパク質ホルモンの存在意義が不明であることによる。先天性副腎過形成における羊水中ステロイド測定の意義は、Jeffcoate⁵⁴以来、検討がなされている。

(2) 胎児奇形の診断

催奇形因子の関与が妊娠経過中に考える症例や、羊水過多症、高年妊娠、糖尿病合併妊娠、前回重症奇形児分娩妊婦などが検査の対象となる。羊水を利用した検査法としては、羊水造影法や胎表造影法がもっとも信頼性が高い。これらの方法は、外表奇形のみならず、消化管の異常、横隔膜ヘルニアなどの発見にも役立つことが知られている。

羊水造影法は、水溶性造影剤と主として用いる。羊水量が多く、脂肪の少ない妊娠中期の診断に適している。羊水内の拡散がはやく吸収すみやかで、1時間後には、羊水中から消失する。胎児は陰影欠損として認められ、胎児骨格と体表の関係がはっきりしている。羊水内注入から15～30分後に撮影を行なう。

胎表造影法は、羊水造影法より、はっきり胎児の細部まで映し出す点で胎児に近い印象を与える。Wiesenhaan⁶⁷は、先天奇形、胎児輸血、双胎診断、羊水過多症、性判定を適応として、ethyliodophenylundecylate 8mL、sodium methyl glucamine diatrizoate 12mL を羊水内に注入し、24時間後に撮影を行なう。胎表造影法は、造影剤拡散の時

間が個々によって異なるため、撮影枚数が増加する危険がある。条件検討により、X線被射量を少なくする努力が必要である。

(3) 胎児の成熟度判定

血液型不適合妊娠や糖尿病合併妊娠では、胎児は、常に危険にさらされている。このような場合には、児の早期娩出をはからなければならないが、その時期決定の一助として、胎児成熟度判定の必要性が高まってきている。月経不順や最終月経不明妊婦の予定日診断にも役立つ。

羊水中の組成は妊娠経過とともに変化し、そのうち、妊娠34～36週にかけて、とくにその変化が著しいものが、成熟度判定の指標になりうることから、多数の物質について、成熟度判定の試みがなされている。

羊水中クレアチニンと成熟度の関係を示唆したのはWoyton⁶⁸である。その後、Pitkin⁴⁵は、妊娠週数とともにクレアチニン値は上昇するが、37週以降は2mg/dlを超えるので成熟度判定に使えるとした。White⁶⁹は、109の症例から1.5mg/dl以上のものは体重2,500g以上あり、Begneaud⁷⁰によると1.5mg/dl以下なら37週以前、2.0mg/dl以上なら37週以後であった。2.0mg/dl以上あれば、大部分は37週以後で2,500g以上あり、胎児発育遅延のみられる妊娠中毒症や無脳児の羊水過多では低値を示す。

羊水中ビリルビン様物質と成熟度の関係は、Mandelbaum⁶¹によると ΔOD_{450} における ΔOD は、正常

妊娠では36~38週で消失し、逆に Δ ODが0にちかい分娩例の85%は6ポンド以上で、成熟度判定の指標になると示唆している。これは、胎児肝の成熟度と関係しており、fetal swallowingにより unconjugated bilirubin が、肝で抱合化され、胎盤より排出されるものと考えられる。

Brosens ら⁷¹は、0.1% Nile blue sulfate による、羊水細胞染色により、細胞中のオレンジ色に染まる細胞の出現率から、成熟度を判定した。Bishop ら⁷²によると、20%以上陽性の群は、36週以後で全例2,500g以上あり、2%以下の群では、その80~90%は2,500g以下か、36週前であった。Sharp⁷³は、本方法使用の際は、胎盤機能不全を考慮しなくてよいという。White は、技術的に、このオレンジ色に染まる脂肪陽性細胞は一塊となって細胞数を数えることができないことを指摘し、むしろ脂肪小滴の存在があれば38週以降とした方が正しいとした。本法は簡易であり、しかも羊水穿刺液が血液で contaminate していても、判定できるのが利点といえる。

この他、羊水中タンパク質の pre-albumin が38~40週にかけてピークとなることを利用し、羊水タンパク質濃度やアミノ酸分析による serine/phenylalanine 比、serine/proline 比、hydroxyproline 量測定など、胎齢と成熟度を報告した例が多数あるが、臨床応用には難しく、今後の検討が必要である。

(4) その他の臨床応用

羊水量の測定による羊水過多症の診断、羊水中エストロオール測定や、羊水中の酸・塩基平衡測定と、児の予後判定、羊水鏡による羊水混濁の有無による fetal distress の判定、羊水細胞による ABO 血液型判定などが臨床的に利用されている。さらに、胎児感染症と免疫グロブリンとの関係も検討されている。

羊水の生理、病理の解明とともに、胎児医学における羊水診断は、ますますその重要度が高まっている。しかも、今後は、心身障害児発生の予測という現段階から、さらに予防治療へと発展する可能性を秘めている。この方面での研究のよりいっそうの発展が望まれている。

羊水プロテオーム

これまで述べてきたように、羊水診断の意義は、出生前の胎児異常の有無を診断できるかという点にあるが、実際には、羊水培養細胞に酵素異常または代謝疾患が表現されているもの、染色体異常が検出されるもののみである。このように、羊水診断の可能な疾患はまだ微々たるものである。そこで、新たな手法を用いた羊水診断方法が望まれている。

ヒト全ゲノム配列が明らかになった今日、タンパク質

を理解することの重要性はこれまでになく高まっている。近年、タンパク質を解析する方法として、表面プラズモン共鳴法⁷⁴⁻⁷⁶、超遠心分析法^{77,78}、マイクロコロリメトリー法などマクロな分析法や原子レベルでの解析が可能なX線結晶解析、多次元核磁気共鳴法 (NMR)⁷⁹⁻⁸¹および質量分析法 (MS)⁸²⁻⁸⁴などミクロな分析法など多くの優れた方法論が開発されている。ここでは、高感度でかつ迅速な相互作用解析として有用な MS を用いたプロテオーム解析を紹介する。プロテオーム解析は、ゲノムプロジェクトで見出された遺伝子とタンパク質を対応させ、それらのタンパク質の機能を明らかにするために、タンパク質の分離精製、アミノ酸配列や立体構造の分析、翻訳後修飾の解析、タンパク質の生理活性の測定などを行う効率的かつ効果的な手法である。一般にプロテオーム解析には、二次元電気泳動などのタンパク質の分離精製法と MS による高感度アミノ酸配列分析法を組み合わせた超微量タンパク質構造解析法が用いられている⁸²。

生体において重要な機能を担っているタンパク質の解析は、質量分析法による技術基盤とゲノム情報の蓄積による情報基盤の構築により、急速な進歩を遂げてきた。さらに、種々の生体試料(血液、尿、組織、髄液、羊水、唾液等)をターゲットとしたプロテオーム解析方法の研究が盛んに行なわれている。そこで、最先端技術の紹介として、羊水プロテオーム解析を用いたダウン症候群に対するバイオマーカーの探索について記述する⁸⁵。

ダウン症候群は、常染色体異常の1つで、1866年 L. Down によって精神薄弱の特殊型として報告された。染色体異常のうちで最も頻度が高く、全出生の600ないし700人に1人が本症である。表現型は、認識機能障害、先天的障害、アルツハイマー病と白血病のようないくつかの病気との合併が多い。染色体分析では、①21番目の染色体が3本となった21トリソミー、②1個の染色体の一部が他の染色体に付着した転座型、③21トリソミーの細胞と正常細胞が一定の割合で同一個体に存在するモザイクの3種類に分類されている。本症は主として卵子形成過程における不分離により生ずる。その誘因としては母体への放射線の照射、ある種のウイルス感染、排卵後受精までの期間の延長その他いくつかの説が提唱されているが、母体の高年齢以外はいずれも決定的な証拠を欠く。ダウン症の出生頻度は、600ないし700人に1人であるが、母親の年齢が若い場合には頻度が低く、年齢とともに上昇する。とくに35歳を過ぎたころより急激な上昇がみられ、45歳を過ぎるとほぼ50人に1人の頻度となる。しかしながら、自然発生的な妊娠中絶を含まないため、この結果は、本当の発生率を過小評価している⁸⁶。

現在実施されているダウン症候群診断技術には、羊水検査、絨毛検査、超音波検査、母体血清マーカー検査等

がある。近年、母体血清マーカーとして、pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A)、ヒト絨毛性胎盤刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin ; hCG) の β サブユニット (β -hCG)、 α -fetoprotein (AFP)、unconjugated estriol (uE3) そしてインヒビンなどが用いられている⁸⁷⁻⁹⁰。母体血清マーカー検査のうち最も多く実施されているトリプルマーカー検査は、妊娠15～17週の間母体から数mL採血し、血液中の3つの成分 (AFP、hCG、uE3) を測定して、その値から胎児が21トリソミー (ダウン症候群) であるかどうかを推定する。胎児が21トリソミーである場合、AFP と uE3の中央値が正常対照群に比べて低く、hCG は高くなる。測定値は対照群 (21トリソミーでない群) の中央値の何倍であるか (multiple of the median, MoM 値) で表す。これを基に「母体年齢から推定された21トリソミーの児の出生確率」に、個々の MoM 値から換算される「21トリソミーである見込み率 (likelihood ratio)」をかけて、胎児が21トリソミーである確率を算出する。血清マーカー検査の精度は false positive rate (偽陽性率) ,detection rate (検出率) ,positive predictive value (真陽性の予測値) で説明されることが多い。このように胎児が21トリソミー等であるか否かが「確率」として示されることから、確率が低いとされても21トリソミーの児が生まれる場合があり、また、確率が高いとされてもほとんどの児は健常である。確定診断を希望する場合には、別途羊水検査等を行うことが必要となる。

最近、幾つかの代替的な染色体異数性の検出方法が、母体循環での胎児 DNA、RNA、あるいは細胞に基づいて、いくつかのグループによって研究されている。例えば、Lo らは、染色体21からの PLAC4 mRNA で一塩基多型 (SNP) の対立遺伝子の間に比率を見積もり、そして Dhallan らは、SNPs に基づいてユニークな胎児の対立遺伝子の比率を測定した^{91,92}。もう1つの新しいアプローチとして、母体血からの胎児の DNA のショットガンシーケンス法が、従来のテストより高感受性で、同じく、新規検出方法の可能性を示した⁹³。これらの新規方法が可能性を示すが、それらの有用性は、コスト、集団内の特定の多型性欠如、従来テストより低い検出率、あるいは、一貫して信頼性の高い結果を得るためには不十分な胎児材料などの要因で現在のところ制限されている。それ故、従来テストの感度と特異性を改善することができる新規バイオマーカーの発見は、低コスト、正確、迅速、そして非侵襲性スクリーニングテストのため開発が望まれている。

プロテオミクス分析のための質量分析の最近の改良が、複雑な生物学サンプルでタンパク質の広範囲検出を可能にしている。ハイスループット MS/MS 分析が、タ

ンパク質の同定と定量のために利用することができる。新規ダウン症バイオマーカーの発見のため、羊水プロテオーム分析し、さらに、染色体性正常とダウン症妊娠から血漿プロテオーム分析が行なわれた。Tsangaris ら⁹⁴は、二次元電気泳動 (2DE) を用いた羊水タンパク質解析を行い、28タンパク質を同定し、そしてそれらの7タンパク質に差を認めた事を報告した。さらに最近、Wang ら⁹⁵は、2次元液体クロマトグラフィー (2D-LC)、そしてそれに続いて、タンデム質量分析 (MS/MS) によって羊水タンパク質を分画し、そして、ウエスタンブロットと ELISA テストを行った。他のグループでは、母体血漿の 2DE 分析を用いて、バイオマーカー候補を報告している^{96,97}。さらに、新規羊水プロテオーム解析として、既に羊水中には800以上のタンパク質が存在することが知られているので、強陽イオン交換 (SCX)、逆相 LC 分画法、そしてそれに続いて、LTQ-Orbitrap 質量分析装置による MS/MS を伴うボトムアップ2D 分画法の戦略を利用した定量的ショットガンアプローチによる何百というタンパク質を比較することで、染色体性正常-羊水とダウン症-羊水間のタンパク質の差を見出すことが報告されている^{85,98}。この解析方法の利点は、スペクトルカウントを精査することで、半定量的で、ラベリング法より精度が低いけれども、スペクトルの合計数に基づいてハイスループット定量し、ラベリング効率が限定されない事である⁹⁹⁻¹⁰²。この手法を用い、ダウン症スクリーニングのためのマーカー候補を同定するために、トリプリケートで染色体性正常-羊水とダウン症-羊水から542のタンパク質を定量し、そして比較が行なわれた。使用した染色体性正常-羊水 (chromosomally normal-AF ; CN-AF) サンプルとダウン症-羊水 (Down syndrome-AF ; DS-AF) サンプルの臨床的特徴を表3に示す。

羊水は、生体体液同様に、高発現タンパク質による低発現タンパク質の同定が阻害され、プロテオミクス解析が複雑になっている。アルブミンと免疫グロブリンファミリーとで、羊水中の総タンパク質の70%が占められている。Cho らの実験では、高発現タンパク質除去のための幾つかの方法があるが、免疫グロブリン除去にターゲットを絞ることで低発現タンパク質の同定の改善に成功している⁹⁸。羊水低発現タンパク質解析には、10サンプルのプールされた試料 (染色体性正常-羊水とダウン症-羊水サンプル) が酵素消化され、そして、低発現量の信頼度の向上のために、ペプチドは、トリプリケートで SCX カラムで分取された。染色体性正常-羊水とダウン症-羊水両サンプルからのタンパク質の完全なリストが編集された。合計475タンパク質が、ダウン症-羊水サンプルから同定され、そして、染色体性正常-羊水から542のタンパク質リストが得られている (図1)。

表3. ダウン症患者（胎児）とコントロールの臨床的特徴

sample	karyotype	gestation	sample	karyotype	gestation
DS1	47, XY, +21	17.5	CN1	46, XY	17.5
DS2	47, XX, +21	16	CN2	46, XX	16
DS3	47, XX, +21	19.3	CN3	46, XX	18.2
DS4	47, XY, +21	19.6	CN4	46, XX	19.2
DS5	47, XX, +21	17	CN5	46, XX	18
DS6	47, XY, +21	18.5	CN6	46, XY	18.2
DS7	47, XX, +21	16.5	CN7	46, XY	16
DS8	47, XY, +21	16.3	CN8	46, XY	16.6
DS9	47, XX, +21	18.6	CN9	46, XX	18.5
DS10	47, XY, +21	19.2	CN10	46, XX	18

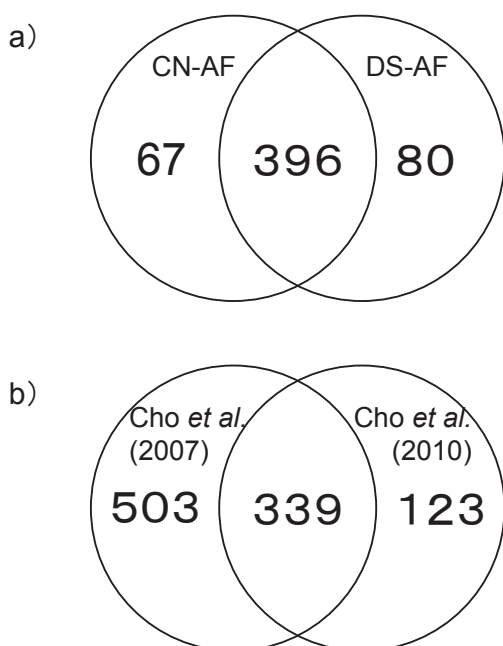


図1. 羊水プロテオームのベン図.

- (a) 合計542タンパク質が染色体性正常-羊水 (CN-AF) とダウン症-羊水 (DS-AF) から同定され、スペクトルカウントに基づいて定量された、そして396タンパク質が両方から同定された。
- (b) この研究は、852から965にヒト CN-AF タンパク質の数が増加し、CN-AF からさらに123個の追加のタンパク質を同定した。

先の研究報告では、羊水から842タンパク質が同定されている⁹⁸。正常羊水の新規リストと比較して、339タンパク質が2つのデータセットの間に重なり合うことが示され、そして、新たに123タンパク質が、この研究の染色体性正常-羊水から同定リストに加えられた。その結果、Choらは、合計1014タンパク質を同定し、ヒト羊水から172タンパク質を同定した。さらに、組織発現、染色体起源、細胞内局在と生物学的機能のためにこれらのタンパク質に注釈を付けるためにデータベース検索を行い、新たに同定した172タンパク質のうちの二つが、ヒト染色体21 (HSA21)、トロンボスポンジタイプ1のモチーフとADMAメタロペプチダーゼ (ADAMTS5)そして下垂体部腫瘍を変える1つと相互作用しているタンパク質 (PTTG1IP) に配置されていた。これら両方とも染色体性正常-羊水からではなく、ダウン症-羊水から同定されている。

HSA21の調節不全経路を明らかにするために、ダウン症-羊水で大幅に減少したタンパク質と大幅に増加したタンパク質リストを生成し検討が行なわれた。その結果、それぞれ91タンパク質 (ダウン症-羊水で減少) と115タンパク質 (ダウン症-羊水で増加) が得られた。さらに、2つの状態間の2倍差以上、あるいは染色体性正常-羊水、ダウン症-羊水でそれぞれユニークに表現されたタンパク質のリストが作成された。これらのタンパク質はさらに、発現差のあるタンパク質によって影響を受ける可能性がある基準的なそして機能的なパスウェイを同定するパスウェイ解析ソフト Ingenuity Pathways

表4. HSA21上コード化される羊水からの7タンパク質

gene	protein name	spectral count in DS-AF	spectral count in CN-AF	protein spectra/ total spectra in DS-AF (%)	protein spectra/ total spectra in CN-AF (%)	ratio %DS/%CN
ADAMTS1	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	29	10	0.076	0.035	2.2
ADAMTS5	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5	5	0	0.013	0.000	
APP	Isoform APP770 of Amyloid beta A4 protein	13	8	0.034	0.028	1.2
COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	188	101	0.491	0.349	1.4
COL6A2	Isoform 2C2 of Collagen alpha-2(VI) chain	13	6	0.034	0.021	1.6
PTTG1IP	Putative uncharacterized protein PTTG1IP	3	0	0.008	0.000	
TFF3	trefoil factor 3 precursor	7	0	0.018	0.000	

Analysis (IPA) v7.5 (Ingenuity Systems) を用いて解析された。その結果、染色体性正常-羊水プロテオームと比較して、ダウン症-羊水中で減少したタンパク質のリストの上位パスウェイが、タンパク質分解、造血、生命体の生存、生殖系発達と機能、栄養病を含む経路に大きな比率が占められた。過小評価された経路は、眼と神経系過程に関係していた。

最終的に、染色体21によってコード化されたタンパク質を見て、そして遺伝子量仮説が羊水プロテオームで観察されるかどうか決定するためにスペクトル訴因が調べられた(表4)。この定量化された542タンパク質から、7つのタンパク質が染色体21によってコード化されており、そして、染色体性正常-羊水プロテオームサンプルに見いだされたスペクトルの数と比較して、ダウン症-羊水サンプルからスペクトルの大きい番号として同定されている。

このパスウェイ解析では、ダウン症-羊水中で23個の有意に減少したスペクトルカウントを示し、そのネットワーク中で35タンパク質を有する。そして興味深いことに、それはhCGを含みおり、ダウン症の存在で別の異常に発現したタンパク質を見出した(図2)。発現減少を示すタンパク質上位11のパスウェイと増加したタンパク質上位10のパスウェイが、ダウン症で調節不全なパスウェイの幾つか提案するためにコンパイルされた。

選択基準を適用した後、60タンパク質のマーカー候補リスト(表5)を開発されおり、hCGがダウン症のため最も良い個体スクリーニングマーカーの1つであり^{103,104}、候補リストでのβ-hCGの存在は、スペクトルカウントが相対定量によって候補を選択する効果的な方法であるという仮説の確証をもたらした。

染色体性正常-羊水とダウン症-羊水の間のβ-hCG

の幾つかのスペクトルが比較されたとき、比率は、前の文献で報告されたβ-hCG濃度間の比率と一致した¹⁰⁵。この結果は、染色体性正常-羊水からhCGのための17スペクトル、そして、ダウン症-羊水から45スペクトルを示した。ノーマライゼーション後、ダウン症-羊水中でβ-hCGが2倍増加されることが示された。以前の研究では、胎児がダウン症で影響を受けているとき、β-hCGレベルが、母体血清で1.5倍、そして羊水中で2倍増加させられることが示されている^{105,106}。最も良いマーカー(β-hCG)と比較して同等か、あるいはより高い検出率を持つ新規バイオマーカー探索を狙っていたので、この知見は、候補選択プロセスの信頼が加わったと言える。

60タンパク質候補のリストから、バイオマーカーとしてそれらの可能性を調査し、そしてスペクトルカウントによって定量の品質を評価し、予備的にELISAによる2つの候補(APPとTNC-C)の実証が試みられた。APPは、細胞表面レセプターそして、異なったペプチドを生産する幾つかのセクターゼによって切断される膜貫通タンパク質である。遺伝子は21q21.2に局在化され、そしてそれは脳、脾臓、目、肺と多くの他の組織に表現されている。Aβ42でのAPP末端が、アルツハイマー病(AD)の不変的特徴で¹⁰⁷⁻¹⁰⁹、老人斑の初期段階で沈着されるので、このタンパク質は特に重要とされている¹¹⁰。APP突然変異が、アルツハイマー病の発症の起因となると考えられており、そして、ダウン症を持っている大多数の個人がADに罹るので¹¹¹、APPが、ダウン症-羊水中スペクトルカウントで2倍以下の増加にもかかわらず、正当性評価のための候補の1つとして選択される。選択された2番目のタンパク質は、テネイシンのファミリー、細胞外基質でのオリゴマーグリコプロテインに属するテネイシン-Cである¹¹²。テネイシン-Cが、細胞

Current Progress of Amniotic Fluid Proteome Analysis

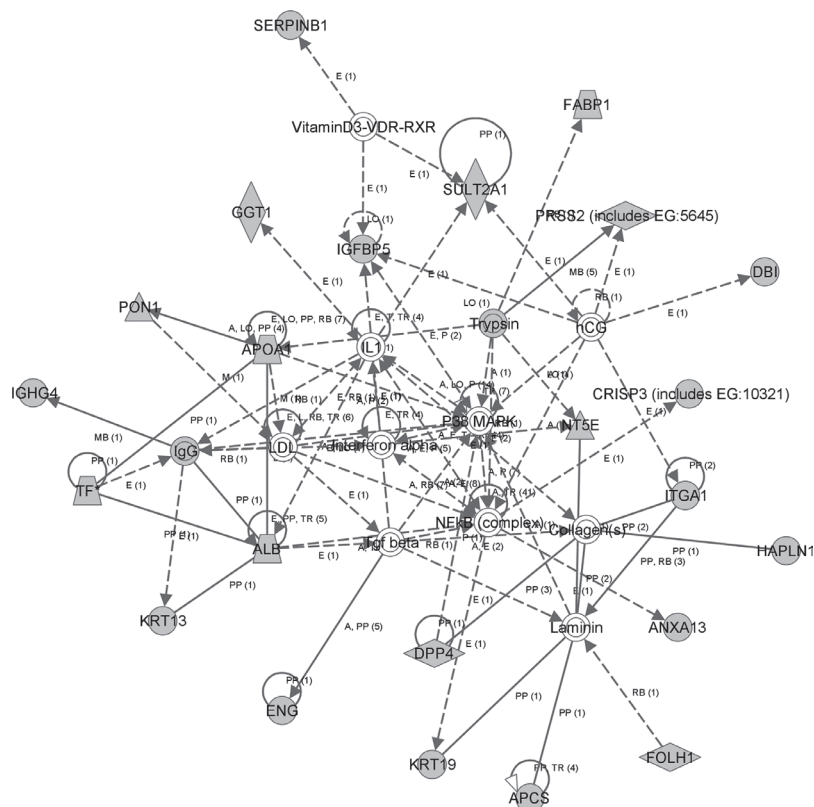


図2. DS-AFで際立って減少を示したタンパク質リストの上位パスウェイ。
このパスウェイは、臓器形態、生殖系発達と機能、脂質代謝に関係している。

表5. ダウン症の関連上位60バイオマーカー候補

gene	protein name	gene	protein name
ABI3BP	Isoform 2 of Target of Nesh-SH3	MME	Neprilysin
ABP1	Isoform 1 of Amiloride-sensitive amine oxidase	MMP2 7	2 kDa type IV collagenase
ADAMTS1	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	MUC13	Mucin-13
ANTXR1	Isoform 1 of Anthrax toxin receptor 1	MUC5AC	Mucin-5AC (Fragment)
APP	Isoform APP770 of Amyloid beta A4 protein	NID1	Isoform 1 of Nidogen-1
ATP6AP1	V-type proton ATPase subunit S1	NPC2	cDNA FLJ59142, highly similar to Epididymal secretory protein E1
C1RL	Complement C1r subcomponent-like protein	NRP1	Muscle type neuropilin 1
C8B	Complement component C8 beta chain	NT5E	5'-nucleotidase
CA1	Carbonic anhydrase 1	PDIA6	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6
CEL	carboxyl ester lipase precursor	PLOD1	cDNA FLJ59393, highly similar to Procollagen-lysine,2-oxoglutarate5-dioxygenase 1
CGB	Choriogonadotropin subunit beta	PLUNC	Protein Plunc
COL4A2	Collagen alpha-2(IV) chain	PSG2	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 2
COL5A2	Collagen alpha-2(V) chain	PSG9	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 9
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	SCGB3A2	Secretoglobin family 3A member 2
CPA1	Carboxypeptidase A1	SERPINA5	Plasma serine protease inhibitor
CRK	Isoform Crk-II of Proto-oncogene C-crk	SERPINC1	SERPINC1 protein
CRNN	Cornulin	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1
CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	SFN	Isoform 1 of 14-3-3 protein sigma
CST6	Cystatin-M	SI	Sucrase-isomaltase, intestinal
CTGF	Isoform 1 of Connective tissue growth factor	SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5
DPP4	Dipeptidyl peptidase 4	SPRR1B	Cornifin-B
FBN2	fibrillin 2 precursor	SPRR3	Small proline-rich protein 3
FLNA	Isoform 2 of Filamin-A	TAGLN2	Transgelin-2
FOLH1	Isoform PSMA-1 of Glutamate carboxypeptidase 2	TF	11 kDa protein
GC	vitamin D-binding protein precursor	TNC	Isoform 1 of Tenascin
GGT1	Isoform 1 of Gamma-glutamyltranspeptidase 1	TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain
HAPLN1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	TXN	Thioredoxin
IGFBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5	VCAM1	Isoform 1 of Vascular cell adhesion protein 1
LAMA5	Laminin subunit alpha-5	VCAN	Isoform V1 of Versican core protein
LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain		

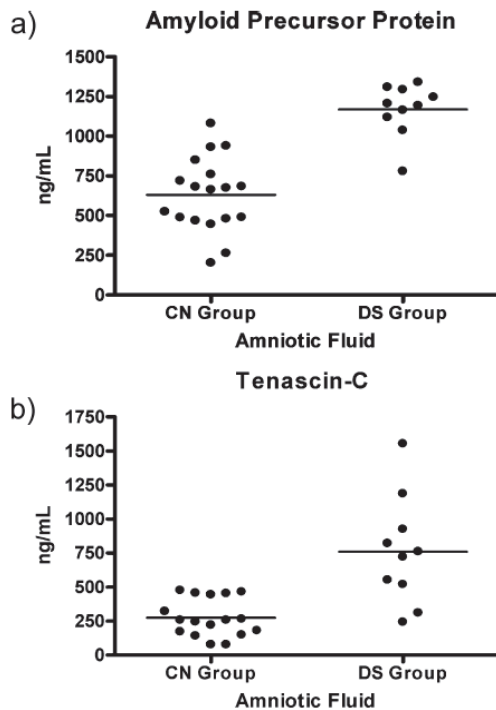


図3. ELISAによる羊水中2候補の検証。

(a) APP; (b) TNC-C, CN= 染色体性正常と DS= ダウン症妊娠

付着性そして細胞基質相互作用のための接着調整の役割を示す。テネイシン - Cが、形態学と生理学の微妙な制御と同様、大規模な生命体の開発における役割を持っていることが提案されている¹¹²⁻¹¹⁵。

スペクトルカウントを基にして、TNC- Cがダウン症-羊水サンプル中で2倍あるいは大きく増加を示し、そして、APPが、ダウン症-羊水サンプル中で2倍増加未満を示すことが予測された。結果は、ダウン症-羊水中のTNC- Cが上昇の範囲内であるのに対して、APPが、ダウン症-羊水中2倍でほぼ一貫した増加を示した(図3)。

実験デザインは、生物学的な変動の影響を減らすために、サンプルのプールを利用したが、これは一長一短の可能性があった。例えば、個別のサンプルがELISAのような正確な方法によって測定されるまで、バイオマーカー候補の強さを評価することは難しい。この研究で、APPレベルが比較的わずかな生物有効性を示したのに対して、TNC- Cが、染色体性正常-羊水サンプルの平均値と比較してダウン症-羊水サンプル中で6倍増加以上に有意な増加がなく、同じセットのサンプル中で多く変動性を示している。そのために、スペクトルカウントがマーカー候補の最初の選択のために使われた後、より正確な定量アッセイが個別のサンプルを使って実行すべきであることに注意が重要である。

染色体性正常-羊水とダウン症-羊水スペクトルカウ

ントが、ゲノムデータと組み合わせるとき、ダウン症の分子機構を理解する上で重要な興味深い知見が明らかにされた。マイクロアレイを用いた無細胞 mRNA レベルでの染色体性正常-羊水とダウン症-羊水の最近の研究が、大幅に異なる発現レベルを示した414の遺伝子を明らかにした¹¹⁶。この遺伝子リストとトップ60候補とを比較したとき、FLNA とVCAN の2つの遺伝子が共通に見いだされた。スペクトルカウント結果では、フィラミン - A (FLNA) で3.3倍の増加を、そしてペルシカンコアタンパク質 (VCAN) で2.5倍の増加が見られた。一方、FLNA mRNA で2.54倍の増加とVCAN で2.56倍の増加がSlonimら¹¹⁶によって観測されている。次に、60候補リストからHSA21によってコード化されたタンパク質のすべてを分析し、そして、正常羊水サンプルとダウン症-羊水サンプルを比較している(表4)。ノーマライゼーション後、これらのタンパク質の比率は、ダウン症-羊水でより発現することを示し、1.2:1~>7:1まで及んでいる。DSのよく知られている遺伝子量の仮説は、ダウン症の表現型が余分なコピーを存在させるためにHSA21中にある遺伝子の遺伝子発現で1.5倍の増加で引き起こされることが示唆されている¹¹⁷。この仮説は、ダウン症のヒトサンプルとマウスサンプル両方を使ってマイクロアレイ実験によって試され、そして、これらのトランスクリプトーム研究の結果は、HSA21によってコード化された遺伝子の50%以上のトランスクリプトが、1.5倍またはそれ以上に発現上昇したことを指摘している¹¹⁸⁻¹²⁰。Choらは、7タンパク質のスペクトルカウントデータが、HSA21によってコード化されたタンパク質の発現高進に関係し、そして、この発見は、タンパク質レベルにおいてHSA21の上の同義遺伝子のために遺伝子量の仮説を支持すると信じている⁸⁵。

Choらの研究では、スペクトルカウントを基本として、羊水の徹底的比較分析のため、まず2D-LC、そしてそれに続いて、MS/MSを使用している。これは、多くの低発現タンパク質を含む候補マーカーの最も大規模なリストをもたらし、羊水の定量的プロテオミクス分析のためにハイスループットLCベースの分画を組み込んだ最初の研究である。さらに、ダウン症のために差別的な表現を示し、タンパク質がダウン症の発病と遺伝子型 - 表現型関係を理解するために手がかりを提供することが可能である。APPとTNC-Cとは、血清バイオマーカーとして可能性を示さなかったが、血清の発現のためのELISA結果は、スペクトルカウントに基づいたハイスループットの半定量的分析が複雑なサンプルを分析する効果的な方法であることを示し、相対的な定量データの確認を行なった。多数の羊水と血清の臨床サンプルを用いて、もっと多くの改善された診断のための新規バイオ

マーカーが見いだされるべきである。このアプローチを使った羊水プロテオミクス解析は、他の妊娠関連の病理のバイオマーカーを同定する有望な方法であるかもしれない。

将来への展望

以上、羊水の一般的所見から胎児異常の診断、さらにダウン症候群に対する羊水プロテオーム解析を用いたバイオマーカー探索の現状について述べた。タンパク質は生命体の主要な機能分子であり、栄養学においても体タンパク質代謝は、タンパク質摂取量やエネルギー摂取量により、また成長、加齢、妊娠、授乳、運動など生理的状態や、ストレス、低栄養、疾病、外傷などの病的状態において適応的に変化しており、その根源はタンパク質の構造と機能からきている。

また、医学・医療技術の進歩に伴い、出生前診断技術が向上しており、一部の疾患については、胎児の状況を早期に診断し、子宮内で、あるいは出生後に早期に治療を行うことも可能になってきた。出生前診断は、胎児が出生する前に胎児及び母体の状況を把握するために行われており、現在実施されている診断技術には、羊水検査、絨毛検査、超音波検査、母体血清マーカー検査等がある。しかし、現状の出生前診断には、①妊婦が検査の内容や結果について十分な認識を持たずに検査が行われる傾向がある、②確率で示された検査結果に対し妊婦が誤解や不安を感じる、③胎児の疾患の発見を目的としたマススクリーニング検査として行われる懸念があるなどの問題点があり、新規バイオマーカーの探索が切望されている。

さらに、ポストゲノム世代におけるプロテオーム解析として、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-リガンド相互作用の同定解析から発現解析あるいはリン酸化部位、糖結合部位のような翻訳後修飾解析について定量的情報を得る定量解析へとシフトしてきている。このように、プロテオーム解析によるバイオマーカー探索はまだ発展途上段階にあり、今回紹介した、ダウン症候群に対する羊水プロテオーム解析のように、目的の疾患に応じたバイオマーカー探索研究の今後の発展に期待したい。

最後に我々は、バイオマーカー探索研究の一貫として、タンパク質に結合するペプチドの特異性を向上するために、ペプチドの選択的修飾法からバイオプローブ探索について基盤研究を行い、タンパク質-化学的リガンド化合物間の分子認識能の向上について検討を行っている。

参考文献

1. Hertig, A. T. On the development of the amnion and exocoelomic membrane in the previllous human ovum. *Yale J Biol Med* 18, 107-15 (1945).
2. Ogawa, G. 産婦世界 25, 705 (1973).
3. Ogawa, G. 産科データブック, 324 (1971).
4. Nelson, G. H. Relationship between amniotic fluid lecithin concentration and respiratory distress syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 112, 827-33 (1972).
5. Wagner, G. & Fuchs, F. The volume of amniotic fluid in the first half of human pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 69, 131-6 (1962).
6. Fuchs, F. Volume of amniotic fluid at various stages of pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 9, 449-60 (1966).
7. Queenan, J. T., Thompson, W., Whitfield, C. R. & Shah, S. I. Amniotic fluid volumes in normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 114, 34-8 (1972).
8. Dickmann, W. J. a. D., M.E. *Am J Obstet Gynecol* 25, 623 (1933).
9. Albano, G. *Gynec. et Obstet.* 27, 416 (1933).
10. Lambiotte, C., and Rosa, P. *Gynec. et Obstet.* 48, 161 (1949).
11. Nelson, E. D., Hutchinson, D.L., Hallet, R.L. and Plentl, A.A. *Obstet. Gynec.* 3, 598 (1954).
12. Elliott, P. M. & Inman, W. H. Volume of liquor amnii in normal and abnormal pregnancy. *Lancet* 2, 835-40 (1961).
13. Marsden, D. & Huntingford, P. J. An Appraisal Of The Coomassie Blue Dilution Technique For Measuring The Volume Of Liquor Amnii In Late Pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 72, 65-8 (1965).
14. Charles, D. & Jacoby, H. E. Preliminary data on the use of sodium aminohippurate to determine amniotic fluid volumes. *Am J Obstet Gynecol* 95, 266-9 (1966).
15. Seeds, A. E., Jr. Water Metabolism Of The Fetus. *Am J Obstet Gynecol* 92, 727-45 (1965).
16. Cassidy, G. & Barnett, R. Amniotic fluid electrolytes and perinatal outcome. *Biol Neonat* 13, 155-74 (1968).
17. Kittrich, M. Changes in the acid-base balance of amniotic fluid during labour. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 75, 1138-43 (1968).
18. Seeds, A. E., Kock, H. C., Myers, R. E., Stolte, L. A. & Hellegers, A. E. Changes in rhesus monkey amniotic fluid pH, pCO₂, and bicarbonate concentration following maternal and fetal hypercarbia and fetal death in utero. *Am J Obstet Gynecol* 97, 67-75 (1967).
19. Hamilton, L. A., Jr. & Behrman, R. E. Intra-amniotic infusion of bicarbonate in the treatment of human fetal acidosis. *Am J Obstet Gynecol* 112, 834-47 (1972).
20. Vasicka, A. Oxygen in the amniotic fluid. *Clin Obstet Gynecol* 9, 461-71 (1966).
21. Quilligan, E. J. Amniotic fluid gas tensions. *Am J Obstet Gynecol* 84, 20-4 (1962).

22. Romney, S. L., Kaneoka, T. & Gabel, P. V. Perinatal oxygen environment. I. Polarographic determinations of oxygen tension in umbilical cord blood and amniotic fluid of normal term newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 84, 25-31 (1962).
23. Makepeice, A. W. a. G., M.P. Surg. Gynec. Obstet. 53, 635 (1931).
24. Battaglia, F., Prystowsky, H., Smisson, C., Hellegers, A. & Bruns, P. Fetal blood studies. XVI. On the changes in total osmotic pressure and sodium and potassium concentrations of amniotic fluid during the course of human gestation. *Surg Gynecol Obstet* 109, 509-12 (1959).
25. Sozanskii, A. M. The biochemical composition of amniotic fluid and of maternal and fetal blood at various periods of pregnancy. *Biull Eksp Biol Med* 51, 323-6 (1961).
26. Friedberg, V. [Studies on fetal urine secretion]. *Gynaecologia* 140, 34-45 (1955).
27. Hanon, F. *Rev Fr Gynecol Obstet* 52, 57-80 (1957).
28. Nusbaum, M. J. & Zettner, A. The content of calcium, magnesium, copper, iron, sodium, and potassium in amniotic fluid from eleven to nineteen weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 115, 219-26 (1973).
29. Uyeno, D. J. *Biol. Chem.* 37, 77 (1919).
30. Michel, W. a. D., *R. Med. Welt* 32, 1594 (1963).
31. Guthmann, H. a. M., *W. Arch. Gynaek.* 141, 450 (1930).
32. Singh, E. J. & Zuspan, F. P. Amniotic fluid lipids in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 117, 919-25 (1973).
33. Nelson, G. H. & Lawson, S. W. Determination of amniotic fluid total phospholipid phosphorus as a test for fetal lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 115, 933-41 (1973).
34. Nelson, G. H., Lawson, S. W., Ho, W. L. & Freedman, D. S. Further observations on the relationship between the amniotic fluid lecithin concentration and fetal pulmonary maturity. *Am J Obstet Gynecol* 117, 577-8 (1973).
35. Touchstone, J. C., Glazer, L. G., Bolognese, R. J. & Corson, S. L. Gestational age and amniotic fluid protein patterns. *Am J Obstet Gynecol* 114, 58-61 (1972).
36. Mukerjee, A. K. & Sinha, H. B. Amniotic fluid mucoprotein in severe pre-eclamptic toxemia. *Am J Obstet Gynecol* 115, 858-9 (1973).
37. Asa, R. M., B.G. and Seale, U.S. *Biochem. Biophys. Acta* 75, 203 (1963).
38. Schade, A. L. & Caroline, L. An iron-binding component in human blood plasma. *Science* 104, 340 (1946).
39. Larsen, B., Snyder, I. S. & Galask, R. P. Transferrin concentration in human amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 117, 952-4 (1973).
40. Curl, C. W. Immunoglobulin levels in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 109, 408-10 (1971).
41. Monif, G. R. & Mendenhall, H. W. Immunoglobulin G levels and the titers of specific antiviral antibodies in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 108, 651-4 (1970).
42. Cederqvist, L. L., Queenan, J. T., Gadow, E. C. & Litwin, S. D. The origin of gamma G globulins in human amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 113, 838-40 (1972).
43. Seppala, M. & Ruoslahti, E. Alpha fetoprotein in amniotic fluid: an index of gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 114, 595-8 (1972).
44. Brock, D. J. H. a. S., *R.G. Lancet* 2, 197 (1970).
45. Pitkin, R. M. & Zwirek, S. J. Amniotic fluid creatinine. *Am J Obstet Gynecol* 98, 1135-9 (1967).
46. McAllister, C. J., Stull, C. G. & Courey, N. G. Amniotic fluid levels of uric acid and creatinine in toxemic patients--possible relation to diuretic use. *Am J Obstet Gynecol* 115, 560-3 (1973).
47. Bonsnes, R. W. Composition of amniotic fluid. *Clin Obstet Gynecol* 9, 440-8 (1966).
48. Fernandez de Castro, A., Usategui-Gomez, M. & Spellacy, W. N. Amniotic fluid amylase. *Am J Obstet Gynecol* 116, 931-6 (1973).
49. Miotti, A. B., Alter, A. A., Moltz, A. & Sabb, F. Serum and amniotic fluid lactic dehydrogenase in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 117, 1129-36 (1973).
50. Cherry, S. H., Filler, M. & Harvey, H. Lysozyme content of amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 116, 639-42 (1973).
51. Nadler, H. L. & Messina, A. M. In-utero detection of type-II glycogenosis (pompe's disease). *Lancet* 2, 1277-8 (1969).
52. Kaufman, S. Protein-bound iodine (pbi) in human amniotic fluid. *J Pediatr* 68, 990-1 (1966).
53. Karim, S. M. & Devlin, J. Prostaglandin content of amniotic fluid during pregnancy and labour. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 74, 230-4 (1967).
54. Jeffcoate, T. N., Fliegner, J. R., Russell, S. H., Davis, J. C. & Wade, A. P. Diagnosis of the adrenogenital syndrome before birth. *Lancet* 2, 553-5 (1965).
55. Nichols, J. & Gson, G. G. Antenatal diagnosis of the adrenogenital syndrome. *Lancet* 2, 1068-9 (1969).
56. Merkatz, I. R., New, M. I., Peterson, R. E. & Seaman, M. P. Prenatal diagnosis of adrenogenital syndrome by amniocentesis. *J Pediatr* 75, 977-82 (1969).
57. Klopfer, A. Estriol in liquor amnii. *Am J Obstet Gynecol* 112, 459-71 (1972).
58. Schindler, A. E. & Herrmann, W. L. Estriol in pregnancy urine and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 95, 301-7 (1966).
59. Berman, A. M., Kalchman, G. G., Chatteraj, S. C., Scommegna, A. & Petropoulou, M. Relationship of amniotic fluid estriol to maternal urinary estriol. *Am J Obstet Gynecol* 100, 15-23 (1968).
60. Younglai, E. V. & Effer, S. B. Amniotic fluid progesterins and estrogens in relation to length of gestation. *Am J Obstet Gynecol* 111, 833-9 (1971).
61. Mandelbaum, B., La Croix, G. C. & Robinson, A. R. Determination of fetal maturity by spectrophotometric analysis of amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 29, 471-4 (1967).
62. Fuchs, F. & Riis, P. Antenatal sex determination. *Nature* 177, 330 (1956).
63. Liley, A. W. Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by resus sensitization. *Am J Obstet Gynecol* 82, 1359-70 (1961).

64. Steele, M. W. & Breg, W. R., Jr. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet* 1, 383-5 (1966).
65. Zinbo, R. 産婦世界 24, 749 (1972).
66. Sakamoto, S. 産婦産 27, 9 (1973).
67. Wiesenhaan, P. F. Fetography. *Am J Obstet Gynecol* 113, 819-22 (1972).
68. Woyton, J. [Evaluation of the degree of maturity of the fetus on the basis of examination of the amniotic fluid. II. Determination of the creatinine and fat content and turbidity of the amniotic fluid]. *Zentralbl Gynakol* 85, 552-60 (1963).
69. White, C. A., Doorenbos, D. E. & Bradbury, J. T. Role of chemical and cytologic analysis of amniotic fluid in determination of fetal maturity. *Am J Obstet Gynecol* 104, 664-70 (1969).
70. Begneaud, W. P., Jr., Hawes, T. P., Jr., Mical, A. & Samuels, M. Amniotic fluid creatinine for prediction of fetal maturity. *Obstet Gynecol* 34, 7-13 (1969).
71. Brosens, I. & Gordon, H. The estimation of maturity by cytological examination of the liquor amnii. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 73, 88-90 (1966).
72. Bishop, E. H. & Corson, S. Estimation of fetal maturity by cytologic examination of amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 102, 654-64 (1968).
73. Sharp, F. Estimation of fetal maturity by amniotic fluid exfoliative cytology. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 75, 812-5 (1968).
74. Karlsson, R., Katsamba, P. S., Nordin, H., Pol, E. & Myszkka, D. G. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem* 349, 136-47 (2006).
75. Orlova, A. et al. Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule. *Cancer Res* 66, 4339-48 (2006).
76. Orlova, A. et al. Synthetic affibody molecules: a novel class of affinity ligands for molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors. *Cancer Res* 67, 2178-86 (2007).
77. Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J. & Schubert, D. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J* 82, 1096-111 (2002).
78. Brown, P. H., Balbo, A. & Schuck, P. A bayesian approach for quantifying trace amounts of antibody aggregates by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Aaps J* 10, 481-93 (2008).
79. Shimada, I. NMR techniques for identifying the interface of a larger protein-protein complex: cross-saturation and transferred cross-saturation experiments. *Methods Enzymol* 394, 483-506 (2005).
80. Muto, T. et al. NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences. *J Mol Biol* 306, 137-43 (2001).
81. Takeda, M. et al. Hyaluronan recognition mode of CD44 revealed by cross-saturation and chemical shift perturbation experiments. *J Biol Chem* 278, 43550-5 (2003).
82. 丹羽利充. ポストゲノム・マススペクトロメトリー. 化学同人 (2003).
83. 原田健一. 生命科学のための最新マススペクトロメトリー. 講談社 (2002).
84. 平野久. プロテオーム解析. 東京化学同人 (2001).
85. Cho, C. K., Smith, C. R. & Diamandis, E. P. Amniotic fluid proteome analysis from Down syndrome pregnancies for biomarker discovery. *J Proteome Res* 9, 3574-82 (2010).
86. Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Reymond, A. & Deutsch, S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 5, 725-38 (2004).
87. Knight, G. J. et al. Integrated serum screening for Down syndrome in primary obstetric practice. *Prenat Diagn* 25, 1162-7 (2005).
88. Malone, F. D. et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med* 353, 2001-11 (2005).
89. Wald, N. J. et al. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *J Med Screen* 10, 56-104 (2003).
90. Wald, N. J., Watt, H. C. & Hackshaw, A. K. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med* 341, 461-7 (1999).
91. Dhallan, R. et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 369, 474-81 (2007).
92. Lo, Y. M. et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 13, 218-23 (2007).
93. Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. & Quake, S. R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16266-71 (2008).
94. Tsangaris, G. T. et al. Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome. *Proteomics* 6, 4410-9 (2006).
95. Wang, T. H. et al. Network analyses of differentially expressed proteins in amniotic fluid supernatant associated with abnormal human karyotypes. *Fertil Steril* 92, 96-107 (2009).
96. Kolialexi, A. et al. Application of proteomics for the identification of differentially expressed protein markers for Down syndrome in maternal plasma. *Prenat Diagn* 28, 691-8 (2008).
97. Nagalla, S. R. et al. Proteomic analysis of maternal serum in down syndrome: identification of novel protein biomarkers. *J Proteome Res* 6, 1245-57 (2007).
98. Cho, C. K., Shan, S. J., Winsor, E. J. & Diamandis, E. P. Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics* 6, 1406-15 (2007).
99. Ong, S. E. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-86 (2002).
100. Ross, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric

- tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-69 (2004).
101. Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R., 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 19, 242-7 (2001).
 102. Vogel, C. & Marcotte, E. M. Calculating absolute and relative protein abundance from mass spectrometry-based protein expression data. *Nat Protoc* 3, 1444-51 (2008).
 103. Haddow, J. E. et al. Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers. *N Engl J Med* 327, 588-93 (1992).
 104. Heyl, P. S., Miller, W. & Canick, J. A. Maternal serum screening for aneuploid pregnancy by alpha-fetoprotein, hCG, and unconjugated estriol. *Obstet Gynecol* 76, 1025-31 (1990).
 105. Spencer, K., Muller, F. & Aitken, D. A. Biochemical markers of trisomy 21 in amniotic fluid. *Prenat Diagn* 17, 31-7 (1997).
 106. Bogart, M. H., Pandian, M. R. & Jones, O. W. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 7, 623-30 (1987).
 107. Busciglio, J. et al. Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* 33, 677-88 (2002).
 108. Citron, M. et al. Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11993-7 (1994).
 109. Mullan, M. et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1, 345-7 (1992).
 110. Iwatsubo, T., Mann, D. M., Odaka, A., Suzuki, N. & Ihara, Y. Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42 (43) precedes A beta 40 in Down syndrome. *Ann Neurol* 37, 294-9 (1995).
 111. Mann, S. K., Pinko, C. & Firtel, R. A. cAMP regulation of early gene expression in signal transduction mutants of *Dictyostelium*. *Dev Biol* 130, 294-303 (1988).
 112. Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C. A., Beck, K. & Chiquet, M. Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53, 383-90 (1988).
 113. Cohen, E. D. et al. Wnt signaling regulates smooth muscle precursor development in the mouse lung via a tenascin C/PDGFR pathway. *J Clin Invest* 119, 2538-49 (2009).
 114. Imanaka-Yoshida, K., Matsumoto, K., Hara, M., Sakakura, T. & Yoshida, T. The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. *Differentiation* 71, 291-8 (2003).
 115. Mackie, E. J. & Tucker, R. P. The tenascin-C knockout revisited. *J Cell Sci* 112 (Pt 22), 3847-53 (1999).
 116. Slonim, D. K. et al. Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down syndrome fetuses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9425-9 (2009).
 117. Lejeune, J. Autosomal Disorders. *Pediatrics* 32, 326-37 (1963).
 118. Chung, I. H. et al. Gene expression analysis of cultured amniotic fluid cell with Down syndrome by DNA microarray. *J Korean Med Sci* 20, 82-7 (2005).
 119. Lockstone, H. E. et al. Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics* 90, 647-60 (2007).
 120. Olson, L. E. et al. Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Dev Dyn* 230, 581-9 (2004).