

生じた疾病双胎群であることを示しており、S児においては、単胎妊娠における子宮内発育遅延症と同様の子宮内循環動態の偏位が招来されていたと考えられる。

E. 結論

今回の検討から、子宮内において双胎胎児の心動作および末梢循環動態を非侵襲的に観察することによって、二つの疾病双胎群を識別することが可能であることが明らかとなった。さらに、各々の群における臨床像の検討から、疾病双胎群の一つは、子宮内でL児に心機能不全の徴候を呈し、かつ、S児に腎および胎盤循環不全を認める双胎間輸血症候群に類似した群、他方は、S児にのみ胎盤循環不全および子宮内発育遅延を招来した群であることが判った。

参考文献

- 1) Fabre E, et al.: Perinatal mortality in twin pregnancy: An analysis of birth weight-specific mortality rates and adjusted mortality rates for birth weight distribution. *J.Perinat.Med.*,16:85,1988.
- 2) Medearis AL, et al.: Perinatal death in twin pregnancy: A five-year analysis of statewide statistics in Missouri. *Am.J.Obstet.Gynecol.*,134:413,1979.
- 3) Allan LD, et al.: Echocardiographic and anatomical correlations in fetal congenital heart disease. *Br.Heart J.*,52:542,1984.
- 4) Bovicelli L, et al.: Prenatal diagnosis of endocardial fibroelastosis. *Prenat.Diagn.*,4:67,1984.
- 5) Koyanagi T, et al.: Relationship between heart rate and rhythm, and cardiac performance assessed in the human fetus in utero. *Int.J.Cardiol.*,28:163,1990.

6) Satoh S, et al.: Changes in vascular resistance in the umbilical and middle cerebral arteries in the human intrauterine growth-retarded fetus, measured with pulsed Doppler ultrasound.

Early.Hum.Dev.,20:213,1989.

7) Takeuchi H, et al.: Fetal urine production at different gestational ages: Correlation to various compromised fetuses in utero. *Early.Hum.Dev.*,40:1,1994.

8) Anderberg MR.: In: Cluster analysis for applications. Academic Press, New York, 1973.

9) Armitage P and Berry G.: In: Statistical methods in medical research., 2nd Ed., Armitage P and Berry G (eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1987.

10) Babson SG. and Phillips DS.: Growth and development of twins dissimilar in size at birth.

N.Engl.J.Med.,289:937,1973.

11) Allan LD, et al.: Aetiology of non-immune hydrops: The value of echocardiography.

Br.J.Obstet.Gynaecol.,93:223,1986.

12) Kirshon B.: Fetal urine output in hydramnios. *Obstet.Gynecol.*,73:240,1989.

13) Naeve RL.: Human intrauterine parabiocytic syndrome and its complications.

N.Engl.J.Med.,268:804,1963.

14) McCallum WD, et al.: Fetal blood velocity waveforms. *Am.J.Obstet.Gynecol.*,132:425,1978.

15) Koyanagi T, et al.: Developmental characteristics of fetal arrhythmias during the period from intrauterine to early extrauterine life assessed using dual echocardiography. *Int.J.Gynecol.Obstet.*,28:13,1989.

16) McCowan LM, et al.: Umbilical artery flow velocity waveforms and the placental vascular bed.

Am.J.Obstet.Gynecol.,157:900,1987.

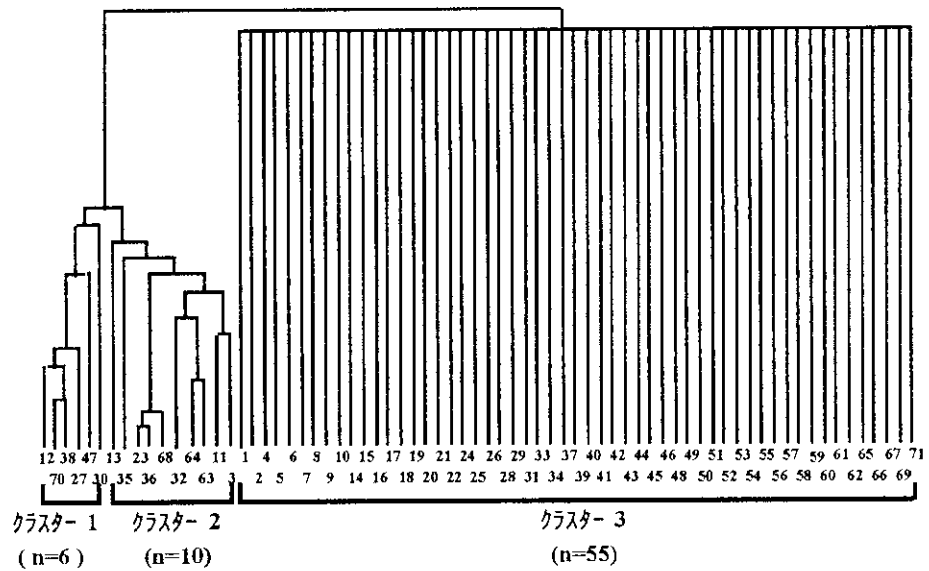


図1 対象71例のクラスター分析
 対象例はクラスター1～3の3群に分類される。
 No. : 症例番号

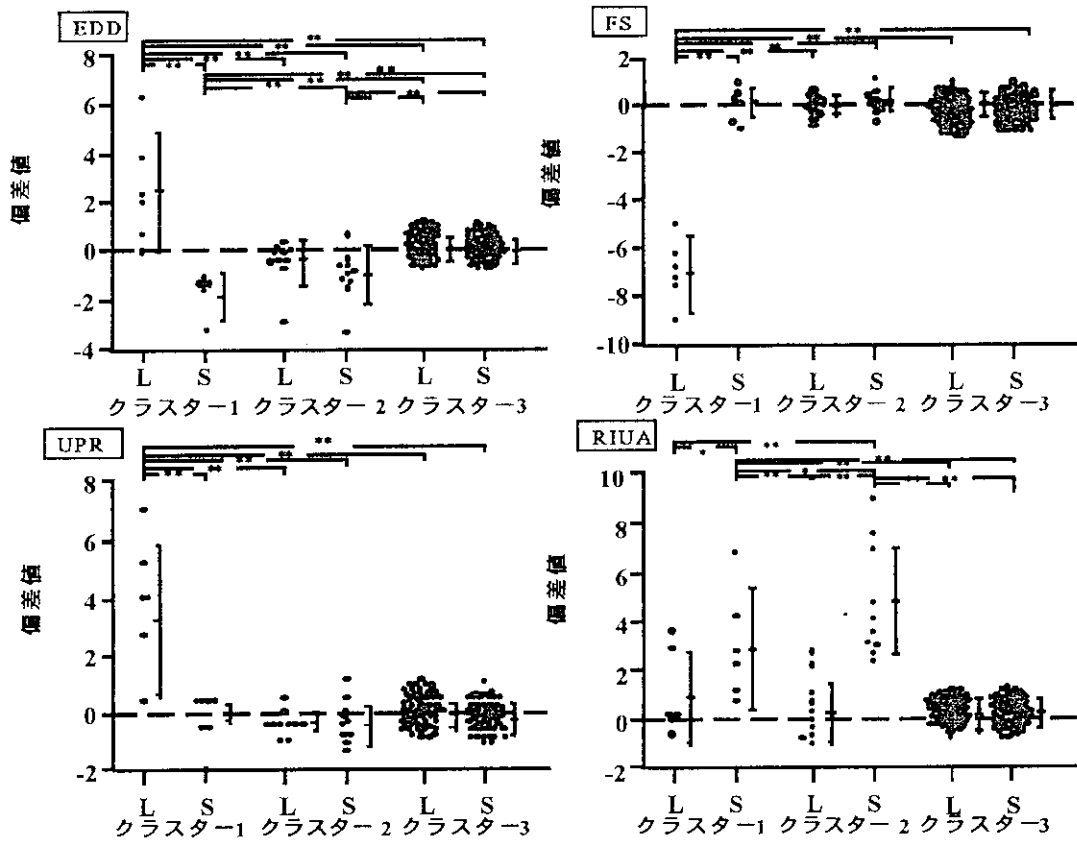


図2 各クラスターの偏差値の分布
 EDD : 右心室拡張終期径, FS : 右心室 Fractional Shortening, UPR : 尿産生率
 RIUA : 臍帯動脈 RI 値, L : 大きい方の児, S : 小さい方の児
 **: $p < 0.01$, * : $p < 0.05$

表1 各クラスターにおける臨床像

	クラスター1 (n=6)	クラスター2 (n=10)	クラスター3 (n=55)
分娩時妊娠週数(週)	28.2±1.3 ^{*#}	33.1±4.0	35.4±3.2
L児	1,189±125 ^{*#}	1,977±508	2,265±560
出産体重(g)			
S児	747±162 [#]	1,200±582 [#]	2,007±558
新生児死亡	1 1 ^{*#}	4	2
心不全	6	0	0
腎不全	5	0	0
呼吸不全	0	4	2
SGA	5 [#]	1 0 [#]	2 0
Discordancy (体重差>25%)	5 [#]	8 [#]	6
Hb 差> 5 g/dl	3 [#]	0	0

L児：大きい方の児， S児：小さい方の児

*：クラスター2に対して有意差あり(p<0.05)

#：クラスター3に対して有意差あり(p<0.05)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担 研究報告書

ヒト中枢神経系の発生・分化異常におけるカドヘリン遺伝子群の関与に関する基礎的研究役割
分担研究者：下山 豊 国立大蔵病院外科

（研究要旨）カドヘリン分子群のcDNAクローニングおよび塩基配列の解析を行った。
また、カドヘリン分子群の遺伝子および組織レベルでの解析手段を開発した。

A. 研究目的

カドヘリン分子群はヒトの発生、分化において極めて重大な役割を果たしていると考えられ、その遺伝子異常は中枢神経系を始めとする様々な家族性遺伝性疾患の原因に成り得ると考えられる。しかし、ヒトにおいてこの分野は現在まで全く研究されていないばかりか、ヒトカドヘリン分子群の全貌も明らかになっていない。そこでヒトカドヘリン分子群の解析を行うための基礎研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

既知のカドヘリン分子との相同性やカドヘリン分子群の高度保存領域に対するdegeneratePCRにより得たcDNA断片を利用して、未知のカドヘリン分子のcDNAクローニングを行った。次に、この塩基配列を解析して未知のカドヘリン分子の同定を行った。さらに、遺伝子および組織レベルでの解析を目的として様々なカドヘリンサブクラスに対する特異的プローブおよび抗体を作製した。

C. 研究結果

他の種との比較などより存在が予想されるがまだ同定されていなかったヒトカドヘリンサブクラスであるカドヘリン-7、-9および-10のcDNAクローニングを行った。それぞれについて翻訳領域を完全に含むcDNAを得て、塩基配列の解析を行った。カドヘリン-7についてはこれを完了し、新規のタイプI古典的カドヘリンであることが判明した。カドヘリン-9および-10については現在塩基配列解析を続行中である。以上を含み現在までに存在が確認されている16種類のヒトカドヘリンサブクラスに対する特異的プローブを作製した。特異的抗体の作製に関してはまず中枢神経系に発現する主要なカドヘリンであるN-カドヘリンについて行った。その細胞外領域

に対する融合タンパクを大腸菌に発現させ、これを精製して免疫元とし、特異的ウサギポリクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体の作製に成功した。現在、カドヘリン-11および-13に対する特異的抗体作製の準備を行っている。

D. 考察

本年度はカドヘリン分子群と家族性遺伝性疾患とのかかわりを解析するために分子の同定、解析手段の開発という基礎的研究を重点的に行った。上記の通り新規分子の同定、解析手段の開発ともに順調な成果をおさめることができたと考えられる。今後さらにこれらを推進し、次いで本研究班に登録された中枢神経系を始めとする様々な家族性遺伝性疾患症例の検体におけるカドヘリン分子群の発現解析や遺伝子異常の解析を行うことが重要であると考えられる。

E. 結論

カドヘリン分子群はいまだに原因が不明である様々な家族性遺伝性疾患の内のいくつかの原因遺伝子である可能性があると考えられる。これらを明かにするために本研究をさらに進めることが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shimoyama, Y., Shibata et al. Molecular cloning and characterization of a novel human classic cadherin homologous with mouse muscle cadherin. J. Biol. Chem., 273: 10011-10018, 1998.

2. 学会発表 なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）分担研究報告書
染色体異常（21、18、13トリソミー）の先天性心奇形に関する病理組織学的研究

分担研究者 由谷親夫
国立循環器病センター臨床検査部長

研究要旨：トリソミーにおいては、高率に先天性心奇形を合併することが知られている。その中でも特に13トリソミーに焦点をあて、病理形態学的手法を用いて検討した。

A. 研究目的

13トリソミーにおける心奇形の病理形態学的な特徴を詳細に検討し、21、18トリソミーと比較するとともに、発生段階における各種の組織構成成分の関与について明らかにする。

B. 研究方法

1978年から1998年までに、当施設で剖検された症例中、21トリソミー27例、18トリソミー14例、13トリソミー4例を対象とし、形態学的ならびに組織学的に検討を行った。

C. 研究結果

13トリソミーにおいて、二次孔型心房中隔欠損および心室中隔欠損（VSD）をそれぞれ2例ずつ認め、VSDはいずれも大動脈弁下型であった。その他、房室弁の血液嚢腫を2例、冠状動脈高位起始と大動脈二尖弁の合併を2例認め、これらについては、21トリソミーよりも18、13トリソミーで高率に認められた。逆に、21トリソミーに高率に認められた房室中隔欠損（40.7%）は18、13トリソミーではみられなかった。

D. 考察

血液嚢腫については、胎児期の弁形成の過程で、弁の腱索付着部間の血液が、内皮細胞に囲まれて、弁組織に埋入するとされている。冠状動脈起始異常と二尖大動脈弁との合併は以前より指摘されており、さらに今回検討した症例で、VSDが大動脈弁下にみられたこととあわせて、13トリソミーにおいては弁およびその近傍組織の発生過程における異常の存在が示唆される。

E. 結論

13トリソミーの心奇形においては、従来の報告に加えて弁およびその近傍組織の発生過程における異常の存在が示唆される。

F. 研究発表

1. 学会発表

染色体異常（21、18、13トリソミー）における病理組織学的検討。第87回日本病理学会総会，広島，1998。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワーク構築に関する研究 分担研究報告書

- 検体バンクの構築と情報バンクとの連携、および

胎内感染による先天異常発症機序についての研究-

分担研究者 種村 光代

名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室助手

<研究要旨>

遺伝子研究情報の検索・集積を行い、分野別研究者リストを作成して遺伝子解析部門を構成した。他の分担研究者らと既存の症例数や検体数を参考にしてバンクのシュミレーションを行い、年間症例数や検体数を予測し、検体バンクを整備した。円滑な検体輸送方法を検討し、検体輸送用のフローチャートを作成し、他の分担研究者や研究協力者らに配布した。環境因子としての胎内感染による先天異常の発症機序の解明にむけて風疹ウイルス、トキソプラズマの胎内感染について分子生物学的手法により診断を行い症例の追跡検討を行った。

A. 研究目的

1. 遺伝子研究情報の検索・集積と、検体バンク構築とその管理を行う。
2. 地方・地域拠点施設の統括と、情報バンクとの連携をはかる。
3. 環境因子としての胎内感染による先天異常発症機序の解明

B. 研究方法

1. 分担研究者戸田と協力して各分担研究者の遺伝子研究情報の検索・集積を行い、専門分野別研究者リストを作成する。研究協力者千葉と協力し、既存の症例数や検体数を参考にしバンクのシュミレーションを行う。
2. 検体輸送用のフローチャートを作成し、安全で円滑な検体輸送を図る。
3. 風疹ウイルス、トキソプラズマなどの胎内感染による先天異常の診断と発症機序の解明を、分子生物学的手法により検討する。

C. 研究結果

1. 分担研究者の遺伝子解析分野を調査、リストアップし専門分野別研究者リストを作成した。不足している領域については、主任研究者と協力して研究協力者を補充して解析部門を拡充した。339 症例のバンクのシュミレーション結果を参考に、検体バンクに必要な研究・検体保存スペースを名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室第3研究室内に整備し、施設管理を徹底して、安定した品質管理が行えるようにした。
2. まず、一定した温度管理のもとに検体輸送を行うために、施設リストを作成して民間の検査業者に依頼し、病院間メールシステムを利用できるように手配した。本システムが利用不可能な地域、週末については、宅急便を利用することとした。インフォームド・コンセントの徹底、症例登録、検体種別の

輸送先、バンクでの DNA 抽出方法などを明示した検体輸送フローチャートを作成し、ネットワーク関連施設の研究分担者および研究協力者へ配布した。なお、円滑に輸送・受け取りを行うための検体輸送お知らせ用 FAX フォームも添付した。

3. 風疹とトキソプラズマについて妊娠初期の母体約 140 名の抗体保有状況を検討した。風疹 HI 抗体については 6.3% が抗体陰性で、そのうち 67% が中学生でワクチン接種を受けているはずの年齢層であった。また再感染のリスクが高いと予想される低抗体保有者は 18.3% に及んだ。トキソプラズマ抗体の保有率は、9.6% と低値であったが、その大半がペット飼育歴がなく、食物など他の感染ルートが多いことが予想された。風疹ウイルスとトキソプラズマの胎内感染が疑われた症例より同意を得て、絨毛、羊水、胎児血を採取して PCR 法により胎児診断を行い、経過を観察して出生児の追跡調査を行った。風疹 7 例では、一例が胎児感染陽性であったが、出生児には、先天異常の所見は認められなかった。母体の感染時期が比較的遅かったためと予想される。ただし出生児からはウイルスは検出されているため経過観察が必要である。トキソプラズマ抗体が陽性で、特異的 IgM 抗体も検出された妊婦 4 例には、希望により同意を得て、アセチルスピラマイシンの投与を行った。羊水からトキソプラズマが検出された症例はなく、既に 1 例が分娩に至ったが胎内感染は認められなかった。他の 3 例は妊娠継続中であり、いずれの症例も経過観察を継続中である。

D. 考察

1. 遺伝子研究者情報の検索・集積を継続し、

未知の遺伝子解析に向けて、専門分野別研究者リストをさらに充実させる必要がある。既存の症例をもとにしたバンクのシュミレーションは、検体バンク構築上有用であった。今後の臨床実用化や参加施設の増加に向けて、症例数の増化に対応すべく次年度へ研究を継続する。

2. 民間業者の病院間メールシステムは有用であるが、本システムが利用不可能な地域や週末についての輸送方法をさらに検討する必要がある。検体輸送フローチャートについては今後の実用化にともない改良を加える予定である。
3. 風疹ウイルスとトキソプラズマの胎内感染については胎児診断方法はほぼ確立してきたが、まだ先天異常発症機序は不明であり、今後も、症例を追跡検討する必要がある。トキソプラズマについては薬剤による胎内感染予防効果が期待できることが明らかとなってきている。さらに、既に感染した胎児への治療法も検討しながら病態の解明をめざしてゆく。

E. 結論

検体バンクの準備は整ったが、各種の手順マニュアルやリストなどは実用化にともない、改良を加えてゆく必要がある。なお、バンクとしての品質やセキュリティ管理については、次年度以降の課題である。風疹ウイルス、トキソプラズマなどの胎内感染による先天異常の発症機序の解明も継続課題とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

妊娠とウイルス感染症

ペリネイタルケア 17(6)、16-21、1998

種村光代

2. 学会発表

SUBCLINICAL RUBELLA OF PREGNANT

WOMAN. XIV International Congress

"The Fetus As A Patient". (Amsterdam-the
Netherlands 99年5月12日-15日)

M. Tanemura, K. Suzumori

Current status of prenatal diagnosis in

Japan. Taipei International Symposium

on Prenatal Diagnosis. (Taipei -Taiwan、99
年1月22-24日)

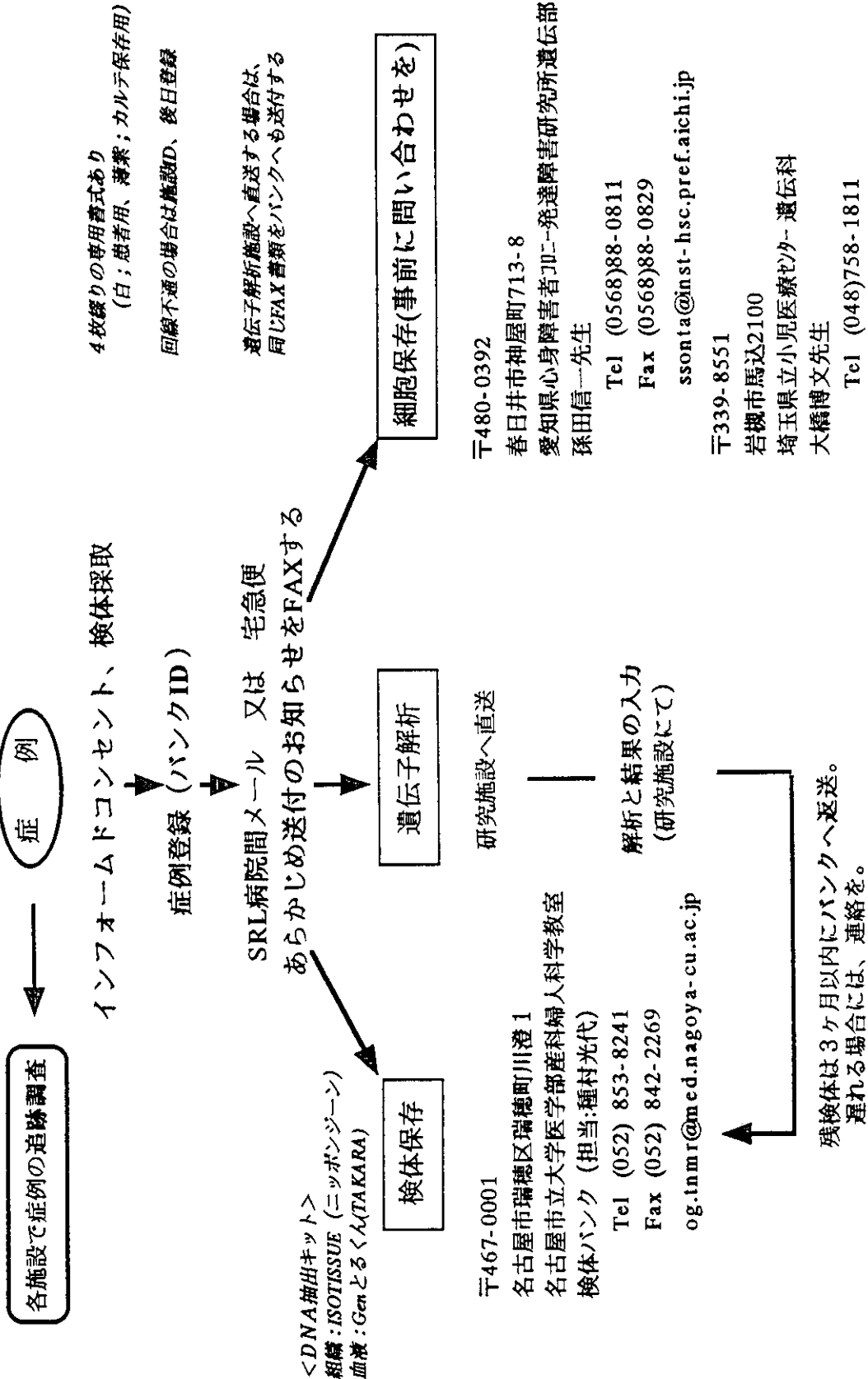
M. Tanemura

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

<検体送付フローチャート>

厚生科学研究ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業 主任研究者 鈴森薫
「家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワーク構築に関する研究」



各施設で症例の追跡調査

症例

インフォームドコンセント、検体採取

症例登録 (バンクID)

SRL病院間メール 又は 宅急便
あらかじめ送付のお知らせをFAXする

<DNA抽出キット>
組織: ISOTISSUE (ニッポンジーン)
血液: Genとるくん(TAKARA)

検体保存

遺伝子解析

細胞保存(事前に問い合わせを)

〒467-0001

名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1
名古屋大学医学部産科婦人科学教室
検体バンク (担当: 種村光代)

Tel (052) 853-8241
Fax (052) 842-2269

og.tnmi@med.nagoya-cu.ac.jp

研究施設へ直送

解析と結果の入り力
(研究施設にて)

残検体は3ヶ月以内にバンクへ返送。
遅れる場合には、連絡を。

〒480-0392

春日井市神屋町713-8
愛知県心身障害者II-E発達障害研究所遺伝部
孫田信一先生

Tel (0568)88-0811
Fax (0568)88-0829

ssonta@inst-hsc.pref.aichi.jp

〒339-8551

岩槻市馬込2100
埼玉県立小児医療センター 遺伝科
大橋博文先生

Tel (048)758-1811
Fax (048)758-1818

ohashih@peach.ocn.ne.jp

<平成11年3月現在>

脳神経系遺伝性疾患の連鎖解析と遺伝子解析に関する研究

分担研究者 戸田 達史 東京大学医科学研究所 助教授

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)原因遺伝子を特定した。FCMDはレトロトランスポゾンの挿入が遠い祖先から伝わった疾患であった。FCMD患者において多数のフクチン遺伝子変異が見い出されたことは、この遺伝子が本疾患の原因遺伝子であるということ強く支持する。レトロトランスポゾン挿入と点変異との複合ヘテロの患者は重症の傾向を示していた。情報・検体の集配システムをよりよく構築するため、遺伝子解析・臨床診断得意技リストの作成を行った。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、福山によって報告・確立された先天性筋ジストロフィーの一型であり、重度の筋ジストロフィーに脳奇形を伴う常染色体劣性遺伝性神経筋疾患である。その頻度は我が国の筋ジストロフィーの中ではデュシャンヌ型に次いで多く我々の約80人に1人が保因者である。患児は生涯歩行不能であり、同時に精神発達遅延を伴い、多くは20歳以前に死亡する難病である。また、本症の脳病変は神経細胞遊走障害による脳奇形と考えられ、本症の原因遺伝子産物は脳で働く未知の機能分子である。我々は本症原因遺伝子が第9番染色体長腕31領域に存在することを初めて見い出した。さらに我々はポジショナルクローニング法により、遺伝子の同定を行った。ここでは家系集積により祖先変異以外の変異を明らかにするとともに福山型のルーツを辿る。

B. 研究方法、研究結果

(1) 福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子

我々は病気の創始者は1人でありそれが全国に広がったこと、日本のFCMD変異はそれ以外に数回起きたこと、FCMD患者の95%以上が予想領域にDNA insertionを持つことを報告してきた。このinsertionプローブをもとにcDNAライブラリーから得られた候補cDNAにおいて、患者における変異を発見し、福山型遺伝子を同定し、遺伝子産物をフクチンと命名した。FCMDcDNAは7349bp、フクチンは461アミノ酸からなる。

87%のFCMD染色体が単一の創始者由来と思われる同一のハプロタイプを示し、これらの創始者由来染色体にあるフクチン遺伝子の3'非翻訳領域

内には、約3kbのレトロトランスポゾンのinsertionが存在することでmRNA量が著しく低下していることがわかった。また、このinsertionを示す染色体以外においては、exon3でのノンセンス変異(C250T→Arg47Stop)、exon4での2塩基の欠失によるフレームシフト変異(298-299delAT, Met63Val→75Stop)の2種類が見い出されている。

FCMDはレトロトランスポゾンの挿入が遠い祖先から伝わった初めての疾患であった。

(2) 福山型の祖先について

共通ハプロタイプが1世代ごとに組換えにより失われる確率（もし仮にDNA多型マーカーが病気の遺伝子から0.2cM=200kb離れていると、1世代につき0.2%失われる、n世代たった現在患者の80%が共通パターンをもっているとする、およそ $(1-0.002)^n=0.80$ が成り立つ）から計算すると、この創始者は約100世代前、1世代20~25年として約2000-2500年前に存在していたと推定された。

(3) 遺伝型-重症度の関連

解析症例数増加に伴い、創始者ハプロタイプは同様に約85%で認められるものの、それ以外のハプロタイプを示す症例も増加してきた。一方、FCMDの臨床像には多様性があり、広い臨床的スペクトラムを持つ疾患であることが提唱されつつある。新たなフクチン遺伝子変異を検索するとともに、その臨床症状との関連についても検討を試みた。

insertionをヘテロに持つ患者を解析したところ、新たに4家系4種類の変異が見い出された。症例1: intron7におけるL1リピートinsertion、症例2: exon6でのミスセンス変異(T859G→

Cys250Gly), 症例3: exon9での1塩基挿入によるフレームシフト変異(1279insA, Phe390Ile→403Stop), 症例4: exon7でのノンセンス変異(T1017A→Cys302Stop), であった。症例1は定額不完全なFCMD重症例、症例2は坐位保持困難な比較的重症例、症例3は小眼球、瞳孔膜遺残を合併し、Walker-Warburg症候群(WWS)との鑑別が困難だった重症例、症例4は典型例であった。すでに報告したexon3でのノンセンス変異の患者(7例)は全例重症例であり、exon4でのフレームシフト変異の患者も定額未獲得の重症例であった。また、insertionを全く持たない患者でも同様の解析を進めているが、興味深いことに1種類として(つまり片アレルだけでも)点変異を有する症例は未だ見つかっていない。

(4) 遺伝子解析・臨床診断得意技リストの作成

遺伝情報の解析や発生過程の環境因子の評価を、広範な研究協力の元を実施するための情報・検体の集配システムを構築するため、まずは各班員における遺伝子解析・臨床診断得意技リストを作成し、これを各班員間のネットワーク上に公開することを行った。

C. 考察

FCMDはレトロトランスポゾンの挿入が遠い祖先から伝わった初めての疾患であった。FCMD遺伝子の発見は、筋ジストロフィーの病態解明、治療法の開発だけでなく、脳の発生の理解にも貴重な一歩となることは明らかである。

レトロトランスポゾン挿入変異をもっていた創始者が存在した時期はちょうど日本では縄文時代から弥生時代に移行するところである。この祖先のレトロトランスポゾン挿入変異が、すでに日本に住んでいる縄文人に起きたか、あるいは弥生時代に大陸から渡ってきた渡来人が運んできたのであろう。今後の東アジア各地域のレトロトランスポゾン挿入変異の検索が興味深い。一方で縄文由来と考えられる沖縄などの患者・保因者検索を行いたい。

またその後FCMD患者において多数のフクチン遺伝子変異が見い出されたことは、この遺伝子が本疾患の原因遺伝子であるということを強く支持する。レトロトランスポゾンinsertionと点変異とのcompound heterozygoteの表現型は重症の傾向を示していたのは、レトロトランスポゾンinsertionではフクチン蛋白はRNAが不安定といっても微量に存在しうるが、点変異によりtruncate

されたフクチンは全く機能しないため、点変異が入ったほうが全体の蛋白量はより少なくなるためと考えられる。

小眼球、瞳孔膜遺残を合併するWWS類似症例にもFCMD変異が証明されたことは、本疾患のより広い臨床的スペクトラムを示唆した。insertionを全く持たない患者が別の先天性筋ジストロフィーとすれば、点変異を2つ有する症例は、胎生致死である可能性も推測される。

一方で遺伝子解析・臨床診断得意技リストの作成は、臨床の現場で解析の必要な症例に遭遇した時の非常に有用なツールとなる。

D. 結論

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)原因遺伝子を特定し、ゲノム構造を決定した。FCMDはレトロトランスポゾンの挿入が遠い祖先から伝わった疾患であった。FCMD患者において多数のフクチン遺伝子変異が見い出されたことは、この遺伝子が本疾患の原因遺伝子であるということを強く支持する。レトロトランスポゾン挿入と点変異との複合ヘテロの患者は重症の傾向を示していた。情報・検体の集配システムをよりよく構築するため、遺伝子解析・臨床診断得意技リストの作成を行った。

E. 研究発表

1. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392, 1998
2. Kobayashi K, Nakahori Y, Mizuno K, Miyake M, Kumagai T, Honma A, Nonaka I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T. Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Genet* 103:323-327, 1998

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療 研究事業）
分担研究報告書

多因子遺伝病の家系および遺伝子解析

分担研究者 羽田 明 旭川医科大学公衆衛生学講座

研究要旨：旭川市近郊の鷹栖町における住民健診を利用して，本態性高血圧における遺伝要因と環境要因の交互作用を検討した。その結果，遺伝要因としてアンジオテンシノーゲン遺伝子の G-6A 多型，環境要因として飲酒，BMI(24<)，中性脂肪値が危険要因であった。

A. 研究目的

一般に本態性高血圧に代表される生活習慣病は，遺伝素因保有者が長期間，環境要因に暴露することにより，主に中年期以降に発症してくる疾患群である。その遺伝素因は，1-2 個の主要効果遺伝子と，比較的小さな効果をもった遺伝子群で形成されると考えられる。環境要因として食生活，運動不足，飲酒，喫煙などの生活習慣，ストレス，感染などの外的環境要因がその発症・進行に関与する。一方，遺伝要因は，個々にはメンデル遺伝形式で遺伝する複数の原因遺伝子の変異により説明できると考えられるが，その具体的な遺伝子名およびメカニズムはまだほとんどわかっていないのが現状である。遺伝要因の寄与率は，家系調査および双生児による研究から，本態性高血圧では 40-50%程度であろうと推定されている。我々は本態性高血圧においてアンジオテンシノーゲン(AGT)遺伝子(AGT)の関与が罹患同胞対法により明らかになって以来，その発生メカニズムを *in vitro* および *in vivo* で検討してきた。その結果，AGT 遺伝子のプロモーター領域に位置する G-6A 変異が，AGT の産生に関与す

ることを見いだした。すなわち-6A の allele では AGT の血中あるいは組織中の濃度が-6G の allele よりも 20%程度高かった。これは長期間にわたる AGT 発現の差が，疾患感受性に関与しているのではないかとの仮説を支持するものであった。本研究では，住民健診を利用して，AGT 遺伝子多型を含む候補遺伝子多型，問診による生活習慣要因，および検査データから本態性高血圧に関連する要因を抽出し，危険要因間の交互作用を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

北海道鷹栖町の住民健診受診者，1615 人のデータを利用して検討した。受診者は 30 歳以上の対象者のうち約 40%に相当する。過去の健診データ，降圧剤内服歴などから 130 人の男性本態性高血圧症例を抽出した。それに対する対照群として年齢をマッチさせた男性正常血圧群 146 人を選んだ。保健婦による聞き取り調査により，既往歴，家族歴および生活習慣を調べた。遺伝子多型のタイピングとして AGT 遺伝子の 4 種類の多型 (M235T, A-20C, G-6A, A2045C)，アンジオテンシン変換酵素遺伝子の I/D 多型，

アンジオテンシン I 型受容体遺伝子の A1166C 多型, パラオキシナーゼ遺伝子の Q192R 多型, α アデューシン遺伝子の G460W 多型の 5 遺伝子 8 多型を検討した. 統計解析は SAS ver.6 を使用した.

C. 研究結果

単解析の結果, 有意となった要因は問診票の項目では, 高血圧の家族歴と飲酒であった. 遺伝子多型では AGT の G-6A と M235T であったが, この二つの多型は, ほぼ 100%連鎖していること, *in vitro* および *in vivo* の実験結果から G-6A が本態である可能性が高いと判断している. 検査データで有意であったのは血清中性脂肪値と BMI (body mass index) 値が 24 以上の 2 要因であった.

有意な要因を多変量解析で分析した結果, このモデルでは AGT 要因がある群で

は肥満のみで高血圧を発症するのに対し, AGT 要因がない群においては, 肥満および飲酒が発症に関与していることがわかった.

D. 考察

本研究においても AGT 遺伝子の本態性高血圧発症への関与が明らかであった. また, これまで言われている飲酒, 肥満などの生活習慣要因とは独立の要因であり, 発症前予知および発症予防の一つの目安として利用できる可能性がある. しかし, AGT の発症におけるメカニズムの解明および今回の研究では検出できなかった塩分摂取との関連を検討していく必要がある. その為には, AGT 以外の遺伝的要因を同一にしたマウスを使うなどの研究手法が必要であると考えている.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）
（分担研究報告書）

ヒトゲノム遺伝子治療に関する研究
分担研究者 清水 宏 慶應義塾大学医学部皮膚科助教授

研究要旨

家族性遺伝性疾患の解析のための情報、検体の集積分配ネットワークにより紹介受診した重症型表皮水疱症家系を対象に、効率的に遺伝子変異同定を行えるようなシステムの構築を試みた。本研究によるネットワークがさらに整備されれば、より効率的に皮膚症状を呈する遺伝性疾患のDNAレベルでの解析が進むと考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は、皮膚に症状を生ずるような様々な家族性遺伝性疾患に対して、その原因遺伝子を同定し、確実な遺伝子診断法を設定し、重症型に対してはDNAレベルでの出生前診断法も確立する基礎準備をすることである。

B. 研究方法

本年の研究は、主に重症型表皮水疱症である劣性栄養障害型ならびに Herlitz 致死型表皮水疱症患者にまとをしぼった。本研究グループから紹介のあった患者を集積し、患者の皮膚を基質として、VII型コラーゲン、および laminin 5 に対するモノクローナル抗体を用いてタンパクレベルの異常を確認した。次に、免疫電顕にてVII型コラーゲン、ならびに laminin 5 の各構成成分が正常皮膚基底膜部のどの部位に局在し、それぞれどのような立体的相互関係を呈しているのかを同定した。

続いて、個々の劣性栄養障害型、ならびに Herlitz 型表皮水疱症患者からDNAを抽出し、個々の症例におけるVII型コラーゲン、あるいは laminin 5 における遺伝子変異部位をDNAレベルで確認した。

C. 研究結果

劣性栄養障害型表皮水疱症では、日本人に特有なVII型コラーゲン遺伝子変異部位が同定された。また Herlitz 致死接合部型表皮水疱症においては、LAMB3 遺伝子において、これまで報告されていない新しい変異が日本人患者に同定された。

VII型コラーゲン遺伝子変異が証明された劣性栄養障害型表皮水疱症家系、あるいは laminin 5 遺伝子の変異部位が同定された Herlitz 致死型表皮水疱症の家系について、罹患児出産の既往がある母親が再

び妊娠し出生前診断を希望した場合、出生前診断も実施した。すなわち、妊娠11週での絨毛膜生検により胎児由来細胞を採取し、胎児DNAを抽出した。上述の計画にて確立した遺伝子診断法に基づき胎児DNAを検索し、出生前診断を施行することが出来た。

D. 考察

表皮水疱症は稀少難治性疾患に指定されており、多くの病型に分類されるが、いずれの病型においても先天的に皮膚が脆弱であり、軽度の機械的刺激で容易に水疱、潰瘍を生ずる。その中でも劣性栄養障害型と Herlitz 致死接合部型は最重症型であり、表皮水疱症の中でも最も予後の悪いタイプである。両者はともに常染色体劣性に遺伝するため、通常は健康な両親から突然罹患児が生まれるケースが大半を占める。

本症の正確な診断、ならびに病型分類法の確立とその対策が大きな課題となっていた。また現時点では有効な治療法がない最重症型に関しては国際的にも出生前診断が適応とされており、DNAレベルでの出生前診断が本邦でも可能となったことにより、妊娠早期に正確な出生前診断を下すことができ、妊婦の精神的、肉体的負担を今後、大きくやわらげられることが期待された。

E. 結論

家族性遺伝性疾患の解析のための情報、検体の集積分配ネットワーク構築がさらに整備されることにより、より効率的に皮膚症状を呈する遺伝性疾患の解析が進むと思われた。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

分担研究報告書

Bリンパ芽球様細胞株の樹立、染色体不均衡の発生・分化に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 孫田信一 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学部室長

研究要旨 家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワークの構築に着手し、特に遺伝性疾患のBリンパ芽球様細胞株の樹立と保存を担当した。今年度は集積検体から効率的に細胞株化する方法を検討し、細胞株樹立のための検体収集マニュアルを作成した。また、保存細胞の品質管理に関する基礎的調査を実施した。収集した原因不明の遺伝性疾患や染色体異常症例についてマイクロサテライト多型を用いて解析し、異常領域と発生メカニズムについて一部明らかにした。

研究協力者 小野教夫
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所遺伝学部 研究員
川本隆之
同遺伝学部 研究助手

A. 研究目的

原因不明の遺伝性疾患における責任遺伝子や病態発現のメカニズム解明の研究にとって、各症例に関する情報収集と貴重な検体の保存は極めて重要である。しかし、このようなネットワークはまだ十分に確立されていない。本研究では家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワークの構築をめざす。我々はこれまでの実績を活かし、特に各種遺伝性疾患の細胞株化とその保存を行なうことを主な分担課題として研究を進める。また、遺伝子解析にとって臨床症状を伴う均衡型染色体構造異常は貴重であり、これらに関する情報と検体の収集に努める。さらに、集積される検体を用いて、染色体起源や遺伝性疾患の連鎖解析を試みる。

B. 研究方法

以下の研究方法・計画に沿って研究を進めた。

1) 家族性遺伝性疾患の情報収集・交換、および検体集積のためのネットワーク構築をめざして、これらに関する諸問題を他の研究者と共同で検討していく。

2) リンパ芽球細胞の株化とその保存のための拠点施設として環境を整備し、受け入れ体制

を整えるとともに、検体収集のためのマニュアルを作成する。また、各研究・臨床施設等における遺伝性疾患、特に家族性染色体異常症の集積状況を調査し、現状を把握する。

3) 各種遺伝性疾患の家系から得られる検体に関して効率的な細胞株化方法を検討し、それらの保存を進める。また、集積した細胞株の品質を管理し、遺伝子解析などを進めるため各研究者に保存細胞に関する情報を提供していく。

4) 染色体構造異常等の起源と発生メカニズムについてマイクロサテライト多型などを用いて解析を行う。今年度は染色体構成が異なるモザイク例や組み換え点が3ヵ所以上ある複雑な構造異常に関して、患児および両親由来の末梢血からそれぞれDNAを抽出し、各異常領域のマイクロサテライト多型によりその由来を決定する。個々の染色体の起源については、疾患細胞とマウス変異細胞株との雑種細胞を作製して解析し、染色体部位別の起源と発生メカニズムを明らかにする。

5) 実験哺乳動物（チャイニーズハムスター）を用いてヒトで見られる染色体異常と同様の異常を放射線照射により誘発し、ゲノムインプリンが関わる異常や片親性ダイソミーについて実験的に検証を試みる。

6) 発症機序が未知の遺伝性疾患家系（Rett症候群など）についてマイクロサテライト多型解析を実施し、それぞれの原因遺伝子の座位や発症メカニズムの解明をめざす。

以上の研究方法・計画のうち、今年度は主に1)～4)の研究について進めた。

C. 研究結果

1) Bリンパ芽球様細胞株の樹立

家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワーク構築を他の研究者と協力して進めた。この中で特に検体の細胞株化と保存を担当した。検体収集に先立ち、埼玉県立小児医療センター（分担研究者：大橋博文医長）と共同で細胞保存のための検体収集方法のマニュアルを作成し、(1)取り扱う組織・細胞の種類、(2)検体採取方法、(3)輸送法、(4)送付連絡等についてまとめた。このマニュアルに従って収集した検体から、Bリンパ芽球様細胞の株化とその保存を実施した。これまで各分担研究者から搬走されたいくつかの検体について、細胞株化の作業を開始した。末梢血からリンパ芽球細胞を分離し、EBウイルスを感染後24穴プレートで培養し、増殖の見られた細胞を保存した。一方、より簡便で効率的な細胞株化方法の開発・改良を試みた。

2) 保存細胞の品質管理

細胞株が長期間の保存で受ける障害を調査するため、長期間保存した細胞株を培養に戻して細胞の生存率などを比較し、保存方法等との関係を検討した。また、当施設にける結果と細胞株化を実施している埼玉県小児医療センターのデータとを比較し、細胞株化、保存および品質管理の問題点を検討する予定である。

3) 検体集積状況の調査

国内の各研究・臨床施設等における家族性遺伝性疾患、特に家族性染色体異常症の集積状況について現状を把握するための調査方法を検討した。これらの情報を整理するためのアンケート用紙を検討し、各大学、研究機関の中から発送先の選定を行なった。

4) 染色体異常の発生メカニズム解析

今年度収集した症例の中で、染色体異常の起源が不明なものについて、FISH法や患者及び両親のマイクロサテライト多型解析を用いて異常領域の起源を調査し、発生メカニズムを検討した。その中には複雑な染色体構成のモザイク例や切断点が3箇所以上ある複雑な構造異常などが含まれる。これらの症例では、構造異常染色体またはそれに関わる正常染色体をそれぞれ1個有する雑種細胞を作製し、それぞれのマイクロサテライト多型の比較により各構造異常の起源を調べた。結果の得られた8例中3例では、

その構造異常染色体は母親と父親の両方の染色体起源を示すことが判明した。すなわち、第一体細胞分裂において卵子及び精子由来の染色体間で組み換えが生じて成立した異常であることを示す。

5) 遺伝性疾患の責任遺伝子および異常メカニズムの解析

原因遺伝子がまだ不明な遺伝性疾患（Rett症候群など）について、患児およびその両親、同胞の末梢血由来のリンパ芽球様細胞株から抽出したDNAを研究材料として解析を進めた。現在のところ、特定の異常を示唆する結果は得られていない。家族性心房中隔欠損（ASD）の家系については他施設と共同で全染色体をカバーするマイクロサテライトに対応するプライマーを用いて連鎖解析を進めたが、また疾患遺伝子座位を特定するに至っていない。また、皮様嚢腫（dermoid cyst）に関してもマイクロサテライト多型を用いて起源解析を行なった。分析した皮様嚢腫の多くは46,XXの正常核型であったが、1例に47,XX,+7の異常核型を認めた。マイクロサテライト多型解析の結果、ほとんどの皮様嚢腫は末梢血と同じ多型パターンを示すことから、これらは卵子形成の減数第一分裂期以前の細胞起源であることが明らかになった。

D. 考察

家族性遺伝性疾患の責任遺伝子を含む原因の追求や病態発現のメカニズム研究にとって、同一疾患の家系の集積は極めて重要である。しかし、各疾患の頻度は低いものが多い。したがって広いネットワークをとおして情報や検体が集積され、それらが効果的に使用されるような集積・分配システムの確立が不可欠である。また、臨床異常を伴うde novoの均衡型構造異常などは遺伝子解明に直接つながる貴重な材料になる。これまで特定の疾患に関しては厚生省、文部省、科学技術庁などにおける各研究班や組織でネットワーク構築が試みられてきたが、各構成や期間は限定され、ネットワーク間の情報交換が乏しく、一般には非公開のものが多いなど、種々の問題点が残されていると思われる。遺伝性疾患の集積に関する現状の把握と、各ネットワーク間の情報交換が求められている。

そこで、他の研究機関や組織による検体・細胞集積に関する調査を計画している。この調査

をとおして、本研究班がめざす「家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワークの構築」をさらに意義あるものにするために、国内の現状とネットワーク構築における問題点を明らかにしていく。ネットワークが成果を発揮するにはネットワークが網羅する範囲と持続期間が重要な要素であると思われる。本研究班で構築されるネットワークが短期間のモデルに終わることなく、何らかの形で継続するよう期待したい。

一方、このようなネットワークをとおして、研究や臨床にいかにか還元できるかが最も重要な点でもある。そのためにも今回の研究班において集積された検体によって具体的な成果、あるいはそのための基盤を築くことが望まれていると思われる。我々は他の研究者と共同で染色体起源や発生メカニズムを解析して新しい知見を得てきた。また、原因不明の遺伝性疾患家系由来の細胞・DNAを用いて遺伝病家系の解析を進め、一定の成果を上げてきた。

我々は当施設および東海地区で発見された各種染色体異常症、およびLesch Nyhan症候群、Rett症候群などを含む種々の遺伝性疾患について昭和55年頃から細胞保存を実施してきた。また、科学技術庁バイオサイエンス研究班（昭和60～62年度「染色体の解析・利用技術の開発に関する研究」）などに参加して細胞培養技術を開発し、染色体異常の発生メカニズム解析やいくつかの遺伝性疾患の原因遺伝子解析に向けて研究を進めてきた。これらの技術と経験を活かして、さらに効率的な細胞保存システムの確立とネットワーク構築をめざしている。

今年度は家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワークの構築に関する諸問題について検討してきた。特に、埼玉県小児医療センターと分担して遺伝性疾患のBリンパ芽球様細胞株の樹立を担当し、検体収集のためのマニュアルを完成し、細胞株化と保存の体制を整えてきた。遺伝性疾患の検体集積はまだ端緒に着いたばかりであるが、今後各研究者および臨床医の協力を得てさらに進めていく。

E. 結論

他の研究者とともに家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワークの構築に着手し、種々の問題点について検討した。

特に、我々は埼玉県小児医療センターと分担して、主に遺伝性疾患のBリンパ芽球様細胞株の樹立を担当し、集積される検体の効率的な培養細胞株化の方法を検討した。今年度は細胞株樹立のための検体収集のマニュアルを作成した。また、保存細胞の品質管理のための基礎的調査を実施したが、細胞の長期保存にとって品質管理は極めて重要である。また、収集した染色体異常症例について異常領域の解析と発生メカニズムについて検討した。研究班が構築する「家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワーク」をさらに充実したものに整備し持続して具体的成果を上げていくことは今後の重要な課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujimoto, M., Kantaputra, P.N., Ikegawa, S., Fukushima, Y., Sonta, S., Matsuo, M., Ishida, T., Matsumoto, T., Kondo, S., Tomita, H., Deng, H-X., Ventruto, V., Takagi, T., Nakamura, Y., Niikawa, N.: The gene for mesomelic dysplasia Kantaputra type is mapped to chromosome 2q24-q32. *J. Hum. Genet.* 43:32-36, 1998.
- 2) Okamoto, T., Ono, T., Hori, M., Yang, J-P., Tetsuka, Y., Kawabe, T., Sonta, S.: Assignment of the I κ B- β gene NFKB1B to human chromosome band 19q13.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 82:105-106, 1998.
- 3) Yasuda, Y., Tokita, Y., Aono, S., Matsui, F., Ono, T., Sonta, S., Watanabe, E., Nakanishi, Y., Oohira, A.: Cloning and chromosomal mapping of human gene of peuroglycan C (NGC), a neural transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan with an EGF module. *Neurosci. Res.* 32:313-322, 1998.

2. 学会発表

- 1) 川本隆之、小野教夫、孫田信一：マイクロサテライト多型を指標にしたヒト症例の染色体起源の解析。第49回染色体学会（1998. 10. 29広島）

G. 知的所有権の取得状況

該当事項なし

先天性高アンモニア血症家系の調査に関する研究

分担研究者 遠藤文夫 熊本大学医学部小児科学教室教授

研究要旨

様々な遺伝性代謝疾患のなかで、先天性尿素サイクル異常症、先天性門脈シャント、リジン尿症などの小児期に高アンモニア血症を示す疾患について検討した。これらの疾患では遺伝的な原因が未だ不明の疾患がいくつか存在するが、その責任遺伝子を明らかにする上で、症例と家系の調査は重要である。本年度の研究ではリジン尿症と門脈シャントの家系について調査したので報告する。

A 研究目的

先天性アミノ酸代謝異常症では、病態を明かにし、より効果的な治療を達成することが重要である。しかし、病態を明らかにするには責任遺伝子の単離は欠かせない段階である。

リジン尿症はまれな常染色体性劣性遺伝性疾患で、乳幼児期から中等度の高アンモニア血症をしめし、中枢神経障害を併発する。この疾患の原因は不明であるが、これまでの病態の研究から小腸におけるリジン、アルギニン、オルニチンの吸収障害および腎尿細管での上記アミノ酸の再吸収障害が知られている。また培養細胞を用いた検討からは、培養線維芽細胞内へのアルギニンの転送障害あるいは赤血球からのアルギニンの細胞内から細胞外への転送障害が報告されている。しかし、患者では複雑な症状が見られ、治療に対する反応も一様ではない。そ

こで、この疾患の症例の解析と病態の解析は責任遺伝子の単離に関しても重要である。本研究ではリジン尿症の症例の病態解析を行い、重要な所見をえた。一方、先天性門脈体循環シャントは最近乳幼児時期の高アンモニア血症の原因疾患として注目されてきている。胎生期に形成された門脈体循環シャントが生後も持続するところから消化管由来のアンモニアが体循環に放出されるところにある。この疾患では遺伝形式、病因、自然史、などが不明である。本研究では先天性門脈体循環シャントのわが国における発生状況とじけんれいにおける病態の解析を行ったので報告する。

B 研究方法

リジン尿症については熊本、沖縄で発生した3症例について検討を行った。また先天性門脈シャント症例の発生

状況の調査では全国の大学病院を含む主な病院（約2000病院）への郵便によるアンケート調査を行った。シャント症例の病態の解析では自験例8症例について検討した。

C 研究結果

(1) リジン尿症患者ではアルギニンの静脈内投与に対する反応が異なることを見出した。症例1 21才 症例2 8才の2症例ではアルギニン静脈内投与に対して血中アンモニアは低下した。しかし症例3 13才ではアルギニン投与によって血中アンモニアは上昇し、臨床症状は悪化した。これらの結果から、リジン尿症には2種の病型が内在する可能性が示唆された。

(2) 門脈下大静脈シャント

わが国での発生状況を知る目的で、全国の主な病院約2000を対象に、成人における先天性門脈下大静脈シャント症例の集計を行った。その結果、14例の新たな症例を確認した。我々の以前の小児科を中心とした全国集計では57例を確認していたので、合計71例となった。これらの患者の臨床症状をまとめてみると (i) 食後の高アンモニア血症 (ii) 肝硬変を含む肝機能障害が共通してみられることが判明した。

D 考案

高アンモニア血症をきたす疾患の中

で、これまでわが国には比較的希とされてきたリジン尿症と先天性門脈シャントについて病態と発生状況の調査を行った。

その結果、これらの疾患では、臨床的な異質性が強く、同一の疾患と考えられている中に、複数の疾患が含まれている可能性が示唆された。特にリジン尿症は単一の疾患とこれまで考えられてきたが、病態の解析を通して、2種の亜形が存在を示唆する結果を得た。今後はこれまでわが国で同定されている疾患での亜形の検索を進め、責任遺伝子の単離に発展させたいと考えている。

E 結論

原因不明の代謝疾患のなかで、異質性に富んだ疾患の解析は今後の課題であり、症例の集積と家系の解析を続ける必要がある。

F 研究発表

1 Shimadzu, M., Matsumoto, H., Matsuura, T., Kobayashi, K., Komaki S., Kiwaki, K., Hoshide, R., Endo, F., Saeki, T., and Matsuda, I.: Ten novel mutations of ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency . Human Mutation Suppl 1(1998) 5-7

2 Nagano, K., Nakamura, K., Urakami, K., Umeyama K., Uchiyama, H., Koiwai, K.,

Hattori, S., Yamamoto.T., Matsuda, I., and Endo, F.: Intracellular distribution of the Wilson,s disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC Rat, an animal model of Wilson,s disease. *Hepatology* 27 (1998) 799-807

3 Kimura A., Endo F., Kagimoto S., Inoue T., Suzuki M., Kurosawa T., Tohma M., Fujisawa T., Kato H.: Tyrosinemia type I-like disease: A possible manifestation of 3-oxo-(4-steroid 5b-reductase deficiency. *Acta Paediat. Jap.* 40 (1998) 211-217

4 Kubo S., Sun M., Miyahara M., Umeyama K., Urakami K., Yamamoto T., Jakobs C., Matsuda I., Endo F.: Hepatocyte injury in tyrosinemia type 1 is induced by fumarylacetoacetate and is inhibited by caspase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 9552-9557

5 Uchino, T., Endo, F., Matsuda,I.: Neurodevelopmental outcome of long-term therapy of urea cycle disorders in Japan. *J. Inher. Metab. Dis* 21(1998) 151-159

6 Yorifuji T., Muroi J., Uematsu A., Tanaka K., Kiwaki K., Endo F., Matsuda I., Nagasaka H., Furusho K.: X-inactivation pattern in the liver of a manifesting female with ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. *Clin. Genet.* 54:349-353, 1998