

19990335

厚生科学研究

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

平成11年度研究報告書

平成12年 3月

主任研究者 鈴 森 薫

名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室

厚生科学研究ヒトゲノム・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

平成11年度研究報告書

総括研究報告

鈴森 薫

名古屋市立大学医学部産科婦人科、教授

分担研究者報告

千葉 喜英

国立循環器病センター周産期科、部長 ✓

名取 道也

国立大蔵病院臨床研究部、部長 ✓

堀尾 裕幸

国立循環器病センター研究所疫学部、室長 ✓

石川 睦男

旭川医科大学産婦人科、教授 ✓

佐藤 昌司

九州大学医学部付属病院周産母子センター、助手 ✓

下山 豊

国立大蔵病院外科、医員 ✓

由谷 親夫

国立循環器病センター臨床検査部、部長 ✓

種村 光代

名古屋市立大学医学部産科婦人科、助手 ✓

戸田 達史

東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター、助教授 ✓

羽田 明

旭川医科大学公衆衛生学、教授 ✓

清水 宏

北海道大学医学部皮膚科、教授 ✓

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部、室長 ✓

遠藤 文夫

熊本大学医学部付属病院小児科、教授 ✓

大橋 博文

埼玉県立小児医療センター内科、医長 ✓

田中 一

信楽園病院神経内科、医長 ✓

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業） 総括研究報告書

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

主任研究者 鈴森 薫 名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室教授

<研究要旨>

ヒト遺伝子・染色体分析技術、胎児形態診断手技、胎児由来細胞採取技術の進歩に呼応し、遺伝情報、環境因子、形態情報により標識された病的胎児の個体情報を集配するデータバンクと胎児由来細胞の検体バンクを構築する。情報の登録及び検体の集配規模は全国レベルとし、各地方、地域に分担研究者あるいは協力者が所属する地方・地域拠点施設を置く。情報ネットワークを用いて、世界及び日本のヒト遺伝子・染色体分析、胎児形態診断の情報を広く生殖医療、周産期医療の現場に公開し、本研究班の存在を認知させる。地方拠点施設では症例登録を行い、家系情報、環境、形態情報で登録された病的胎児の胎児由来細胞を採取する。胎児の個体情報と検体は、データバンク（国立循環器病センター）と検体バンク（名古屋市立大学）より診断・解析目的に応じて全国の遺伝子解析、胎児形態診断、胎児環境因子分析を行う分担研究者、研究協力者に配布される。なお、十分なインフォームドコンセントと個体情報についての秘守義務を十分に討議し実行する。平成10年度は、個体標識情報と検体の収集のため、多数の研究分担者、協力者とともに全国レベルのネットワークを構築し、過去の症例を用いシュミレーションをおこなった。平成11年度には、平成10年度に作成した本研究用の倫理ガイドラインやインフォームドコンセント書式について、関連施設の倫理審査委員会に審議を依頼し承認を得た。データおよび検体バンク、集配システムを整備し、各研究者は本システムを実際に稼働して、個別研究として遺伝子・染色体分析、胎児形態診断、環境因子解析に関する研究を開始した。現在までに約90症例300検体がバンクに登録、保存され、無脳症や全前脳胞症、四肢短縮症、心奇形などの関連遺伝子の解析、病因の解明、疾患の予防方法などが研究されている。また、システム運用に伴って明らかとなってきた問題点について検討し、現行システムの改善を図り新システムへの移行を試みている。さらに、今後の周産期医療への関わりと診療形態の予測、胎児管理・治療、早期療育への可能性を検討し、医療行政への提案を行う。

<分担研究者>

- 千葉喜英：国立循環器病センター周産期科、部長
- 名取道也：国立大蔵病院臨床研究部、部長
- 堀尾裕幸：国立循環器病センター研究所疫学部、室長
- 石川睦男：旭川医科大学産婦人科、教授
- 佐藤昌司：九州大学医学部附属病院周産母子センター、助手
- 下山 豊：国立大蔵病院外科、医員
- 由谷親夫：国立循環器病センター臨床検査部、部長
- 種村光代：名古屋市立大学医学部産科婦人科、助手
- 戸田達史：東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター、助教授
- 羽田 明：旭川医科大学公衆衛生学、教授
- 清水 宏：北海道大学医学部皮膚科、教授
- 孫田信一：愛知県心身障害者ユニバーサル発達障害研究所遺伝部、室長
- 遠藤文夫：熊本大学医学部付属病院小児科、教授
- 大橋博文：埼玉県立小児医療センター内科、医長
- 田中 一：信楽園病院神経内科、医長

A. 研究目的

胎児由来細胞による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。本システムを用いて胎児病や胎芽・胎児死亡素因の広範な解明を行うとともに、先天性疾患、家族性疾患にかかわるヒト胎児遺伝子、胎芽胎児形態学研究の世界的情報、およびわが国における研究実施施設を、広く周産期医療施設へ知らせる情報ネットワークを構築し、生殖医療の現場にリアルタイムに正しい情報を伝えることを最終目標とする。

B. 研究方法

本研究は患者への十分な説明と同意の上に行われるものであり、日本産科婦人科学会、人類遺伝学会をはじめとする日本医学会分科会、及び関連組織の倫理規定の元に推進する。臨床応用に先だて、関連施設の倫理委員会に審議を依頼し承認を得た施設からのみ、インフォームドコンセントを得て患者検体を採取した。

遺伝子・染色体診断研究状況の調査は主任研究者；鈴木と分担研究者；下山、由谷、種村、戸田、羽田、清水、孫田、遠藤、大橋、田中と、遺伝子研究にかかわる研究協力者が担当する。個体標識情報と検体の収集：胎内で形態診断がなされた先天性疾患、もしくは流・死産した胎芽・胎児由来細胞（以下検体）を、家系、環境、形態情報と共に集積する。胎児異常の診断、検体の採取、個体標識情報の収集は、各地方ごとに設ける地方・地域拠点施設の周産期部門が担当する。主任研究者；鈴木は中部地区、分担研究者；佐藤は九

州地区、千葉は近畿地区、名取は関東地区、石川は北海道地区の地域拠点施設の運営にあたる。他の地方、地域については研究協力者を配置する。なお、検体バンク用に分担研究者；孫田、大橋は患者細胞株をBリンパ芽球様細胞株樹立法にて樹立する。データバンクと検体バンク：データバンクに家系、環境、形態情報で標識登録された胎芽・胎児由来細胞、DNAは、検体バンクに保管され、遺伝子、形態、環境因子を研究する分担研究者、研究協力者に送付され解析される。解析されたデータもデータバンクに保管される。情報回線はISDN回線を使用し、データバンクのホストコンピュータには国立循環器病センター研究所のコンピュータを用い、分担研究者；千葉、堀尾がシステムの整備・管理を行う。検体バンクは名古屋市立大学医学部産科婦人科に置き、主任研究者；鈴木と分担研究者；種村が管理する。追跡情報：死亡児や死亡胎芽・胎児については剖検、先存児は乳児期まで追跡調査を行う。これには地方・地域拠点病院の元に定点観測病院を依頼する。追跡情報は実時間でデータバンクに登録される。平成11年度は、平成10年度より集積されつつある患者データと検体をもとに疾患関連遺伝子の解析等の個別研究を推進する。また、システム運用とともに明らかとなる問題点の解決を図り、さらなるシステムの精度管理、質的向上に努める。

C. 研究結果

平成10年度の本研究事業では、産婦人科、小児科、内科などの臨床医と、遺伝分野の専門家とともに全国レベルのネットワークを構築し、国立循環器病センター研究所にデータ

バンクを設置し、ISDN回線による直接ダイヤルアップにて、ホストコンピュータと各研究者が日々利用しているパソコンと接続した。過去の症例を用いてシュミレーションを行った後、検体数を予測して名古屋市立大学産科婦人科学教室に検体バンクを整備し、システムの臨床運用を開始した。現在までに約90症例300検体がバンクに登録、保存され、無脳症や全前脳胞症、四肢短縮症、心奇形などの関連遺伝子の解析、環境因子との比較、疾患予防法等について検討されている。さらに流産や奇形症候群の染色体分析なども全国レベルで進行している。また、各拠点施設では、個々の症例追跡を継続中である。なお、本システムを実際に運用開始して、データ入力や検体送付システムの煩雑さなどが明らかとなってきた。さらに、検体バンクとデータバンクの連携を図るためにもシステム設計の変更が必要となり、現行のシステムをそのまま維持しつつ、改変した新システムを導入して、現在シュミレーション稼働を行っている。

D. 考察および結論

データバンク、検体バンクが整備されネットワークがほぼ完成したが、参加施設の増加や検体の多様化もあり、実際の運営に伴って幾つかの問題点が明らかとなってきた。新たに導入するシステムではその大半が解決されると予想される。なお、倫理規定についての討議や、インフォームドコンセントの徹底、カウンセリング方法などについては、今後も常に検討してゆく必要がある。なお、各個別研究については徐々にすすみつつある段階であり次年度への継続課題である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Akiyama M., OSuzumori K., Shimizu H.: Prenatal diagnosis of Harlequin Ichthyosis by the examination of keratinized hair canals and amniotic fluid cells at 19 weeks estimated gestational age. Prenat Diang 1999 19:167-171.

2) Wakui K., Tanemura M., OSuzumori K., Hidaka E., Ishikawa M., Kubota T., Fukushima Y.: Clinical application of two-color telomeric fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis: Identification of chromosomal translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. J Hum Genet 1999 44:85-90.

2. 学会発表

なし

F. 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

研究要旨； 家族性遺伝疾患の解析のための情報集積と検体集積がなされた症例を解析し、システム上の問題点を浮上させた。登録状況の施設間差が問題となった。一つには、通信システム等の技術的、会計処理上の課題がある。本年度の新システム提案により技術的課題は解決が見込まれる。施設倫理委員会の個人情報保護に関する見解に温度差がある。これは、今後このシステムを拡大する場合も問題となるので、施設によりシステム運用面での対応方法に柔軟性を持たせる必要がある。

A.研究目的

家族性遺伝疾患の解析のための情報集積と検体集積がなされた188個票を解析し、システム上の問題点を浮上させ登録システムの改変に寄与する事を目的とした。

B.研究方法

本研究のために作成したデータ通信システムとデータファイルを用い、2000年2月末までに集積された188個票をもとに集計し、情報システムの運用状況を解析した。登録された症例は、本研究の目的である遺伝情報解析のためDNAを集積保存する事が必要であると各施設が判断した症例である。対象施設は分担研究者および研究協力者の産科施設とした。

C.研究結果

施設ごとの登録件数は図-1に示す。名古屋市大の89件から登録0件の4施設まで施設間のばらつきが見られる。

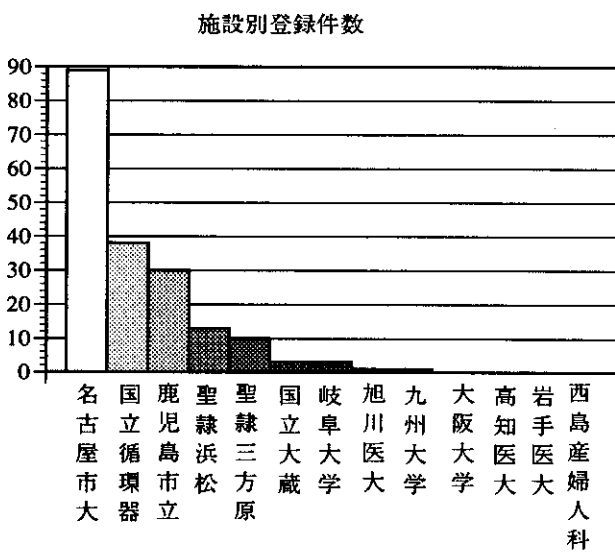


図-1

大阪大学、高知医科大学の2施設は本システムの運用に施設倫理委員会了承の手続きが終了していない事が、登録0の理由であると推定される。九州大学も同様に倫理委員会了承までに時間がかかった。

岩手医大は当システムへの参加時期が遅く、唯一

の個人開業施設の西島産婦人科は、開業故の登録の困難さが推量された。IDなど個人情報の入力を完全に禁止された鹿児島市立病院も運用により30件の登録が可能であった。

登録理由別集計は図-2に示す。流産検体の他はほとんどが妊娠中に診断された胎児病である。

検体集積データ登録の理由（重複）

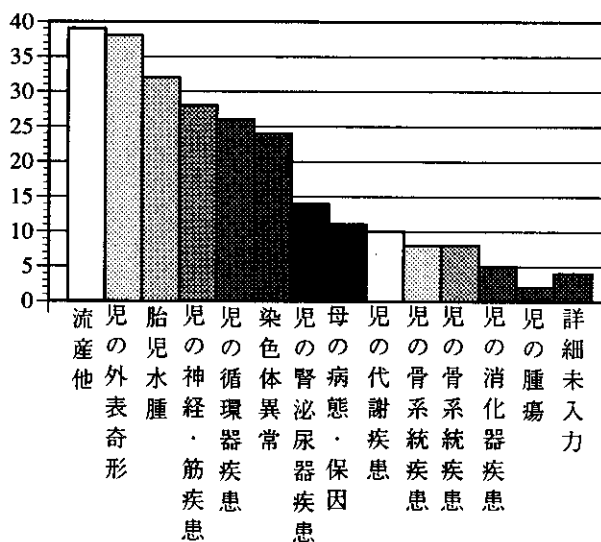


図-2

D.考察

施設による登録数の差は、施設倫理委員会の対応の違いによる。また、通信の技術的困難さにより、立ち上げの遅れた施設もある。施設間の倫理委員会の対応差が今後の運用に問題となる。

E.結論

登録システムの改変がこの集計によりなされたので技術的課題は解決する。各施設倫理委員会の対応差にはシステム運用で対応することが求められる。

F.研究発表

Y Chiba; The future of biomedical ultrasound, Fetal intervention. Ultrasound in Medicine and Biol. 2000, inpress.

G.知的所有権取得状況

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

本研究班における倫理面での取り組み
分担研究者：名取 道也 国立大蔵病院臨床研究部

(研究要旨) 遺伝情報、環境因子、形態情報からなる個人情報を集配するデータバンクを構築し、家族性遺伝性疾患解析のための情報・検体の集積分配ネットワークを構築する上での倫理的問題につき、各施設の倫理委員会審査状況を中心に分析した。

A. 研究目的

「家族性遺伝性疾患のための情報・検体の集積分配ネットワーク構築に関する研究」研究班参加施設において、各施設倫理委員会での討議の経過を分析し、本研究班における倫理問題への取り組みに関する状況を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

本研究班参加施設へ倫理委員会への審査請求状況及びその結果につき、書面によりアンケートを行い回答を分析した。(倫理面への配慮：本研究課題は研究班の倫理面を検討するものである)

C. 研究結果

アンケートを本研究参加の16施設に送付した。この内3施設は検体を収集する施設から解析依頼のみを受ける施設であり、所属する施設での遺伝子解析一般についての倫理性の審議は別として、検体を送付する施設で倫理性に関する審査は終了しているとの観点から、倫理委員会へ書式の提出は行われていなかった。

患者から検体の収集を行う13施設中12施設が各施設の倫理委員会に審査を求めている。1施設は担当者が新しい施設に赴任直後であり、未だその手続きは行われていない。12施設中4施設は審査申請後、修正を要求され、再申請して審議中、または再申請の準備中である。12施設中8施設は倫理委員会の承認を得ている。

8施設中、本研究班の書式がそのまま了承された施設が5施設、本研究班の書式を提出し修正を要求され、修正後再申請して認められた施設が2施設、本研究班配布とは異なる書式を倫理委員会へ提出して認められた施設が1施設であった。

これら8施設において、倫理委員会への審査申請から了承までの時間は、1カ月(以内を含む)から5カ月で平均2.6カ月であった。

D. 考察

研究の倫理性に問題点が提起された場合、内容によってはその研究の実施自体に係わる問題となる。従って研究を企画する段階で倫理性の検討を行い、その後に研究補助金を申請する手順が考えられる。しかし実際には、多くのプロジェクトは研究費の補助を申請しており、ファンドに採用決定されてから各施設の倫理委員会の審査を受ける場合がほとんどである。本研究班でも研究課題が採用決定されてから、研究プロジェクトに参加する施設がそれぞれの施設の倫理委員会に審査を申請した。この経過の中で、

- 1) 多施設共同研究では、研究自体の倫理的妥当性について、適切な倫理委員会で事前に審査する方式の検討
 - 2) 各施設の倫理委員会が審議すべき内容を研究班全体として明確に示す
- の2点が今後の課題として明かとなった。

E. 結論

evidence based medicine(EBM)の重要性が認識され、今後多施設が共同しての臨床研究でevidenceの蓄積が求められていくと思われる。臨床研究においては、研究内容が患者の診断や治療と密接に関連し、企画された研究の倫理性の審査は益々その重要性が高まると考える。しかし現在研究の企画段階での倫理性の審議、倫理委員会での迅速な審議、複数の倫理委員会での判断の相違など解決すべき問題も少なくない。

F. 研究発表

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

データベースの構築と保守、集積データの数理解析に関する研究

分担研究者 堀尾裕幸 国立循環器病センター研究所 疫学部統計調査研究室 室長

研究要旨

前年度に開発したWWW (World Wide Web) を使った家族性遺伝性疾患解析のための情報・検体の集積分配ネットワークデータベースをふまえ、そこでは課題として残った検体バンクでの検体情報の管理と遺伝子研究者による解析結果の入力までを可能とする新たなWebデータベースを実現した。これにより、臨床医が採取した検体が検体バンクに保存されている状況、および、その保存検体の解析状況・解析結果が、検体発生側においても検索・表示可能となり、検体発生側から遺伝子研究者まで検体状況の把握を容易にすることができた。

A. 研究目的

遺伝情報、環境因子、形態情報からなる病的胎児の検体と個体情報を集積するデータベースを構築して、日本における家族性遺伝性疾患解析のための情報・検体の集積分配ネットワーク構築を行う。これを実現するためのデータベース、集積データの数理解析のためのシステムを構築する。今年度は検体の発生から保存、解析までの一連の検体の移動とそれに付随するデータをデータベース化することを目的とした。

B. 方法

前年度に開発したWWW(World Wide Web) を使った家族性遺伝性疾患解析のための情報・検体の集積分配ネットワークデータベース、およびその1年間にわたる実際の運用から、課題として残っていた検体バンクでの検体の保存と連動した検体情報の管理と遺伝子研究者による解析結果の入力までを可能とするシステムの開発をめざした。

1) 改造遺伝子データベースの概要

前年度に開発したデータベースは単一データベースファイルで構成したため、同一患者の複数回の検体採取についても、多くのデータ重複項目が発生した。そこで、データを患者ファイルと原検体ファイルに分離することとした。また、検体の保存を担当する検体バンクでの検体の管理と遺伝子研究者による解析結果の記録もデータベースに取り込むために、新たな保存検体ファイルを作成し、それぞれの必要項目はお互いにリレーショナルデータベースとして保持させ、重複データ項目はできる限り排除する設計とした。これに対応して、それぞれのファイルへのアクセス権限を、症例発生グループ・解析グループ・バンクグループ・管理グループに分けることにより入力責任の範囲を明確化した（図1参照のこと）。

2) データベースIDに関する変更

最終的な1つの保存検体についてのIDは

という形で指定される。

1は地域ID、2は年号、3は患者ID、4は原検体ID、5は保存検体IDを表す。これまでとの相違は5番目の保存検体IDが追加されたことである。

地域IDは

北海道：100 東北：200 関東：300 中部：400
近畿：500 中四国：600 九州：700

として3桁で表し、100の桁は地域、10の桁は施設、1の桁は代表個人を示すように改めた。なお、患者IDには必ず先頭3桁に地域IDがセットされる。

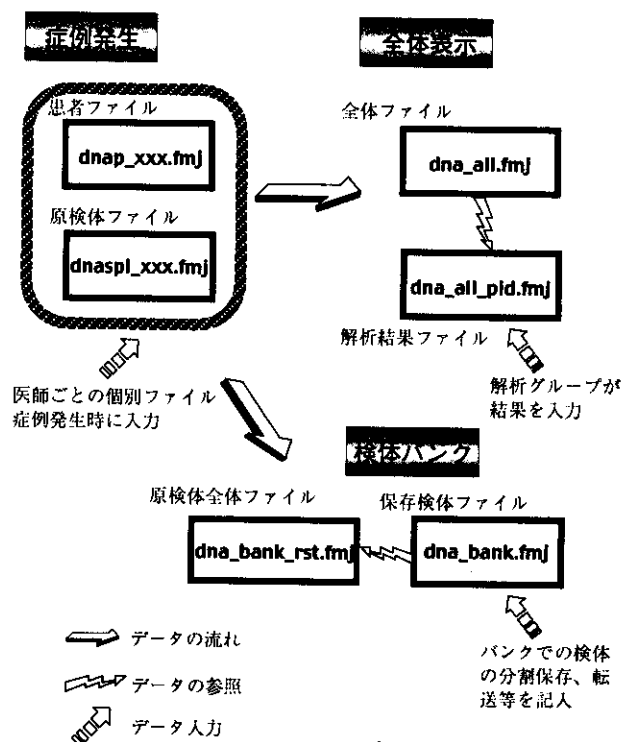


図1. 遺伝子データベースの構成

3) その詳細

3-1) 症例発生グループ

これまで検体発生側では原則として各参加組織につき1つのデータベースファイルを持ち、そこに患者個人情報も含めたデータを入力していた(このデータはその組織の参加者のみが閲覧可能)。この各組織ごとのファイルのデータを集めて1本化し、この研究班の参加者全員が患者個人情報を除くデータを検索やブラウズすることを可能としていた。また、検体採取ごとに1個のデータレコードを作っていたが、この中の患者情報と検体情報とを分離して、それぞれ患者ファイルと原検体ファイルとし、必須事項は患者ファイルをリレーショナルファイルとしてデータを参照し、その患者の繰り返しの検体採取や、縁者の検体採取では原検体ファイルのみにアクセスし、データを登録することとした。この2つのファイルは原則的には各地域の施設ごとに存在し、最終的にはこれらがすべて合体されて全体ファイルとなる。また、これまで検体バンクへの検体登録のお知らせは手書き、またはプリント出力を検体バンクにファックスしていたが、循環器病センター研究所に設置したファックスを原検体登録時にWebブラウザ上のボタンをクリックして自動発信することにより、各自が個別にファックスする必要はなくなった。さらに新たに登録された患者症例はプライバシーを除かれた形で、この研究班のメイリングリストに報告される。

3-1-1) 患者ファイル

原則的に1患者1妊娠1レコードとする。すなわち時間をおいての2回目の妊娠時には新規の登録となる。患者は児を発生源として未妊娠でも記入する。データフィールドは再検討の結果70個(これまでは82個)、その中で自動入力11個である。

3-1-2) 原検体ファイル

これは検体発生時に入力し、1検体1レコードとする。複数回もしくは検体の種類が異なるときはそれぞれ新規レコードに記録する。また、両親など縁者の検体サンプルでは患者ファイルが児を発生源としているため、児からみた関係(本人、母、父、祖母、祖父、兄、姉、叔父、叔母、従兄弟、従姉妹、その他)を指定すること(未妊娠であっても)。データフィールドは28個(すべて新設)、その中で入力が必要なものは8個である。

3-2) バンクグループ

検体バンクではこれまで手書きもしくは個人ファイルにより、保存検体データを管理してきたが、これをWebブラウザからデータベースをアクセスすることにより管理できるようになる。送られてきた検体のデータは検体発生側ですでに必要な事項は入力されて保存検体ファイルに入っており、バンク側ではこれを基に保存条件・方法や、現在の状況、消滅すればその記録等を入力することでその管理が可能となる。

3-3) 解析グループ

遺伝子研究者が行ったDNA解析の結果については、これを研究者が直接Webブラウザを経由して解析結果ファイルに書き込む。これが書き込まれると、全体ファイルから参照されるとともに、メイリ

ングリストに報告される。

C. 研究結果

臨床医が採取した検体がDNAバンクに保存されている状況、およびその保存検体の移動・解析状況、さらには解析結果がデータベース化できるようになった。その結果、検体の発生する臨床医側においても、DNAバンクにおける保存検体の解析状況・結果が検索・表示可能となり、検体発生側から遺伝子研究者まで検体状況の把握が容易になった。今回の変更でこれまで人手を介して行われていた部分が、データベースにあらかじめ入力されたデータを操作することにより完了する。このことは、検体発生側で入力されていない検体が検体バンクに送付された場合にはシステムは機能しなくなることを意味する。また、データベースが複雑化したため、データレコードの消去は関連する別のグループからの入力結果も消去する可能性があるため、管理者だけが行えるように設計した。

D. 考察

これまでのシステムの運用上、ISDN回線を使ったハードウェアとそれを制御するソフトウェアのトラブルによる接続不能が散発した。今後、このシステムに参加する研究者の増加や、参加研究者の負担を軽減させることを考慮すると、インターネット経由でのデータベースへのアクセスを可能にすべきと考える。これにより、通常のインターネットと同様の操作で遺伝子データベースにアクセス可能となり、新たな通信ソフトの導入とそのセッティングなど、このデータベースにアクセスするための設定変更と新たな回線設備を不要にする。これを実現する上で一番大きな問題点であるセキュリティについても、インターネットバンキングやインターネットショッピングなど、お金に関わる情報が各個人まで利用できるインターネット環境が急速に普及しつつあることから、インターネットでのセキュリティについても十分考慮されたシステムを構築可能なことを示している。このような状況の中で、ISDN回線を利用した隔離ネットワークでの運用は時間とコストを浪費するシステムになりつつある。なお、現在使用中のデータベースソフトに関しても、SSL(Secure Socket Layer)対応となったものが、バージョンアップ版として市販され始めた。

E. 結論

今年度の目標とした検体の発生から保存、解析までの一連の検体の移動とそれに付随するデータをデータベース化することが可能となった。

F. 研究発表

堀尾裕幸; 川俣 和弥; 千葉 喜英; 名取道也; 鈴森 薫: "家族性遺伝性疾患解析のためのデータベースおよびネットワークの構築", 第19回医療情報学連合大会論文集, pp.988-989 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成 11 年度 鈴森班研究報告

分担研究者	石川睦男	旭川医科大学産婦人科教授
研究協力者	山下剛	旭川医科大学産婦人科
	石郷岡哲郎	同上
	加藤育民	同上

<研究の要旨>

ヒト遺伝子・染色体分析技術，胎児形態診断手技，胎児由来細胞採取技術の進歩に呼応し，病的胎児および家族性疾患の予想される妊婦らの個体情報を集配するデータバンクと胎児由来細胞を主とする検体バンクを構築する．これを全国レベルでネットワークとし，保守された情報と検体の速やかでかつ効率的な運用によって，周産期における家族性遺伝性疾患の解析を行う．

<研究の目的>

我々は，“家族性遺伝性疾患の解析のためのネットワーク”の北海道地方における中核施設として検体の集積と分配を運営し，同時に検体及び付随する情報の管理と保守を確立し，この活用によって周産期領域の新たな治療方法の提案と生殖医療における遺伝・環境因子の世界的情報発信を行うための一端となる．

<研究方法>

全国の各地方ごとに設けられた地方・地域拠点施設として，(1)個体標識情報の収集とデータバンク登録，およびその情報の保守を，(2)検体の収集および検体バンクを通じての分配を行いネットワークを構築する．

研究事業として，中枢神経系の発生異常とその責任遺伝子の解明を行う．

<平成 11 年度結果>

ネットワークの構築

：データベースの作成および集配・分配システムの実行

検体採取に伴うプライバシーの保守とインフォームドコンセント

：本研究実施に必要な説明書および承諾書（倫理委員会による承認済み）

を用いて口頭・文章で行った．

検体採取

：Cystic Hygroma, Anencephaly など 8 症例に関して検体採取（複数種類の検体，母・父親の血液を含む）を行った．

<遺伝子研究（研究事業）>

胎児中枢神経系の発生異常に関し，前脳胞の発生異常におけるホメオボックス遺伝子の役割について解析することを主眼にして，神経管閉鎖不全のうちの無脳症について解析を進めている．

①研究の背景

神経管閉鎖不全 (NTDs) は古くから疫学的解析などにより原因究明が努められているが、未だ明らかになってはいない。原因の一端として出産順位や一部の染色体異常の関連から遺伝的因子が考えられているものの、地域差やビタミンなどの関連から多因子遺伝に様々な環境因子が影響していると考えられ究明を困難にしている。最近では葉酸との関連性に関する種々の研究結果からは、同じ神経管閉鎖不全に分類されていても無脳症、外脳症などでは二分脊椎とは原因論的に異なるとも考えられてきている (NTDs と MTHFR, 5,10-methylentetrahydrofolate reductase の研究報告)。現に神経管の形成・分化の時期からの考察では神経管閉鎖が完了する以前と以後ではその障害による表現型に差がみられる (例えば正常な皮膚の欠損の合併有無の点)。

一方で、近年の分子生物学的研究のめざましい進歩からヒト発生における遺伝子の役割が解明されつつあり、特定の体節構造に特有な器官形成の情報を与え、体づくりの基本的役割を担っている遺伝子が見つかっている。さらに脊椎動物の体軸の形成に重要な役割を担うオーガナイザーの形成に関与する転写因子やその機能を担うシグナル分子が種々同定されてきている。例えばマウスにおける頭部発生に寄与するオーガナイザー関連遺伝子として、Lim1 や Otx2, Hesx1/Rpx などが報告されており、我々の教室でも LIM ホメオボックス遺伝子について研究を行ってきた。LIM ホメオボックス遺伝子がコードする転写制御因子、すなわち LIM-HD 蛋白質 (LIM クラスのホメオドメイン蛋白質) は脊椎動物の頭部形成や他の組織・器官形成においてさまざまな役割を担っており、ニューロンの分化に関しては線虫から脊椎動物まで共通して関与していることが特徴的とされている。特に Lim1 ノックアウトマウスでは少なくともロンボメア 2 から上部が欠失し、あたかもヒトの無脳児様の頭部を呈する。

②研究内容

オーガナイザー形成に関与する転写因子のうちマウス Lim1 遺伝子、ヒトにおける Lhx1 について無脳児の発生要因的検討を行った。マウス Lim1 遺伝子のノックアウトマウスでは中脳より前方部の頭部欠失がみられるが、これの無脳児との類似性から、まず Lhx1 について検討を行った。

方法として、正常組織のコントロールとして正常胎盤における Lhx1 の発現がない (Lhx1 は神経に特異的に発現する) ことを確認したあとに、無脳児症例の神経組織 (延髄～中脳の部分より採取) における発現を検討した。

Lhx1 の発現状態の解析方法は、検体より total RNA を注出し、cDNA に逆転写した後に PCR 法を行い発現の有無を確認し、さらに Lhx1 の全コード領域をカバーするように設計されたプライマーを用いて PCR 法が行われた後、プラスミドにサブクローンして sequence 法にて cDNA の構造異常の有無を確認した。

③研究結果

今回検討した無脳児症例のからは、
(1)ニューロンにおいて Lhx1 遺伝子の mRNA の発現が認められた。

(2)また Lim ドメイン, ホメオドメインをコードする領域でのシーケンスでは cDNA には point mutation を認めなかったが, non-coding 領域の部分に mutation を認めた. また両ドメインを連結するリンカー配列のシーケンスは現在解読中である.

④考察

現時点で LIM および Homeobox における一次構造には異常を認めていないが, さらに症例を増やして検討を行いたい. また, 上記 2 つの機能ドメインの他にもリンカー配列及び genomicDNA 上の調節領域の構造異常の有無に関しても今後検討を予定している.

<研究発表>

1. 論文発表

Hasuike s., Miura K., Miyoshi O., Miyamoto T., Niikawa N., Jinno Y., Ishikawa M. Isolation and localization of an IDDMK1, 2-22-related human endogenous retroviral gene, and identification of a CA repeat marker at its locus. J. Hum. Genet 44 (5) : 343-347, 1999

2. 学会発表

- ①石郷岡哲郎, 石川睦男 他 : Cantrell 症候群の一例
第 22 回 日本産科婦人科 ME 懇話会 (1999.8.1 大阪)
- ②石郷岡哲郎, 石川睦男 他 : 当院における母体搬送
…先天異常をはじめとする小児外科疾患を中心に
第 1 回 先天異常遺伝子解析研究会 (1999.5.14 旭川)

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

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
—胎児環境因子と形態の研究:子宮内発育遅延胎児および胎児仮死症例における
臍帯動脈・中大脳動脈血流計測の有用性に関する検討—

分担研究者 佐藤 昌司 九州大学医学部附属病院周産母子センター 講師

研究要旨: 正常発育胎児における臍帯動脈および中大脳動脈の血管抵抗の指標の妊娠進行にともなう推移を明らかにすること、ならびに子宮内発育遅延 (IUGR) および胎児仮死に対する胎内血流評価の有用性を明らかにすることを本研究の目的とした。妊娠 22-41 週の正常胎児 505 例および intensive care を要したハイリスク胎児 684 例の計 1,189 例を対象として、胎児の臍帯動脈および中大脳動脈の Resistance Index (RI)、Pulsatility Index (PI) および両動脈の RI 比 ($RI_{UA/MCA}$) と PI 比 ($PI_{UA/MCA}$) を求めた。正常胎児について妊娠進行にともなう nomogram を作成し、一方、IUGR および胎児仮死の存否に対する最も efficacy の高い指標ならびに S.D. の cut-off 値を算出した。その結果、IUGR および胎児仮死に対して最も efficacy の高かった指標はそれぞれ、(平均値+1.5S.D.) を cut-off 値とした場合の PI_{UA} 、(平均値+2.0S.D.) を cut-off 値とした場合の $PI_{UA/MCA}$ であった。さらに、胎児仮死例における $PI_{UA/MCA}$ 異常の出現～胎児仮死の期間は 1 時間～33 日 (中央値: 4 日) であった。以上から、IUGR および胎児仮死例においては、胎盤循環不全および脳循環を保持する血流再分配機構が発現されていること、ドプラ血流計測は本現象を評価する臨床的手法として有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的: ドプラ法を用いてヒト胎児における血流速度波形の定量的な評価が可能になってきた。その結果、子宮内発育遅延症 (IUGR) あるいは胎児仮死などの疾病状態においては、臍帯動脈の血管抵抗の上昇と脳血管抵抗の減少が生ずることが報告されており、定量的指標として諸種の index が提唱されている。しかしながら、これらの血行動態の指標のいずれが最も有用であるかはいまだに明らかにされていない。このような背景から、本研究では、正常発育胎児における臍帯動脈および中大脳動脈の血管抵抗の指標の妊娠進行にともなう推移を明らかにすること、およびそれを基礎にして IUGR および胎児仮死に対する胎内における血流評価の有用性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法: 対象は妊娠 22-41 週の正常胎児 505 例および妊娠合併症を有し、intensive care を要したハイリスク胎児 684 例の、計 1,189 例である。方法は、カラードプラ法を用いて胎児の臍帯動脈 (UA) および中大脳動脈 (MCA) の血流原波形

をコンピュータに入力して記録した。ついで、両動脈における Resistance Index (RI) [(最高血流速度 - 拡張終期血流速度) / (最高血流速度)] (RI_{UA} , RI_{MCA})、Pulsatility Index (PI) [(最高血流速度 - 拡張終期血流速度) / (平均血流速度)] (PI_{UA} , PI_{MCA})、および両動脈の RI 比 ($RI_{UA/MCA}$) ならびに PI 比 ($PI_{UA/MCA}$) を求めた。正常胎児について RI_{UA} , RI_{MCA} , PI_{UA} , PI_{MCA} , $RI_{UA/MCA}$ および $PI_{UA/MCA}$ の 6 つの指標に関して、2 週毎の平均値および標準偏差 (S.D.) を算出し、妊娠進行にともなう nomogram を作成した。出産体重が妊娠週数毎の標準体重分布の (平均-1.5SD) 未満の値を示した症例を IUGR、また、胎児心拍数陣痛図で心拍数基線細変動の消失、反復する遅発一過性徐脈あるいは高度変動一過性徐脈が認められた症例を胎児仮死と判定した。ROC curve を用いて、IUGR および胎児仮死の存否に対する最も efficacy の高い指標ならびに S.D. の cut-off 値を算出した。

C. 研究結果: 1) 正常胎児では、妊娠進行に伴い

RI_{UA}, PI_{UA}は単調に減少した。一方、RI_{MCA}, PI_{MCA}は妊娠30-31週まで増加し、以後は減少した。RI_{UA/MCA}およびPI_{UA/MCA}は妊娠30-31週まで減少し、以後は増加した(図1)。2) ハイリスク胎児684例のなかで、IUGR例は170例(24.9%)であった。最もefficacyの高かった指標はPI_{UA}で、(平均値+1.5S.D.)をcut-off値とした場合、sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) およびaccuracyは各々、60.6%, 93.3%, 75.2%, 87.6%および85.0%であった(表1、図2)。3) 684例のなかで、胎児仮死に至った症例は52例(7.6%)であった。最もefficacyの高かった指標はPI_{UA/MCA}で、(平均値+2.0S.D.)をcut-off値とした場合、sensitivity, specificity, PPV, NPVおよびaccuracyは各々、67.3%, 97.4%, 72.9%, 96.7%および94.6%であった(表2、図3)。4) PI_{UA/MCA}が(平均値+2.0S.D.)以上を示した胎児仮死例35例におけるPI_{UA/MCA}異常の出現から胎児仮死に至るまでの期間は1時間~33日(中央値: 4日)であった(図4)。

D.E.考察および結論: 本研究を通じて、1) IUGRの存否に対する最も有用な指標は臍帯動脈PI値(cut-off値: 1.5S.D.)であり、胎盤血管抵抗の上昇が存在していること、2) 胎児仮死の存否に対する最も有用な指標は臍帯動脈PI/中大脳動脈PI比(cut-off値: 2.0S.D.)であり、本症では胎盤循環不全によって生じた胎児低酸素状態に起因した脳血管抵抗の減少により、脳循環を保持する血流再分配機構が発現されていることが明らかとなった。以上から、ドプラ血流計測は本現象を評価する臨床的手法として有用と考えられた。

F.研究発表

1. 論文発表:

S. Satoh, H. Nakano: Clinical applications of the Doppler technique in monitoring the fetus. Clinics in Perinatology, 26,853-867, 1999.

2. 学会発表:なし

G. 知的所有権の取得状況:なし

表1 IUGRに対する各指標の検出精度

	RI UA	PI UA	RI MCA	PI MCA	RI UA / MCA	PI UA / MCA
cut-off (S.D.)	1.25	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0
sensitivity (%)	62.4	60.6	41.8	40.6	64.7	60.0
specificity (%)	91.5	93.3	89.1	87.3	85.7	88.3
PPV (%)	71.1	75.2	56.4	51.9	60.4	63.4
NPV (%)	87.8	87.6	82.0	81.4	87.8	86.8
accuracy	84.2	85.0	77.2	75.6	80.4	81.2

表2 胎児仮死に対する各指標の検出精度

	RI UA	PI UA	RI MCA	PI MCA	RI UA / MCA	PI UA / MCA
cut-off (S.D.)	1.5	1.75	1.0	1.0	1.75	2.0
sensitivity (%)	67.3	69.2	61.5	63.5	69.2	67.3
specificity (%)	93.7	96.2	89.1	87.3	96.8	97.4
PPV (%)	52.2	65.5	36.8	34.0	69.2	72.9
NPV (%)	96.5	96.8	95.7	95.9	96.8	96.7
accuracy	91.2	93.7	86.5	85.1	94.3	94.6

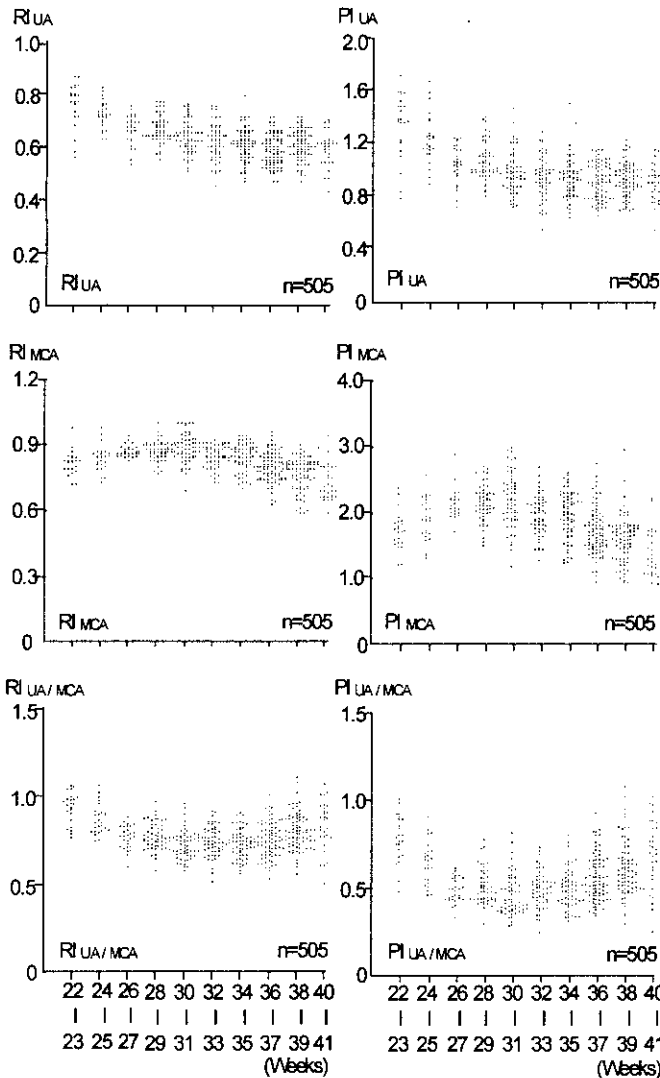


図1 妊娠進行にともなう各指標の推移

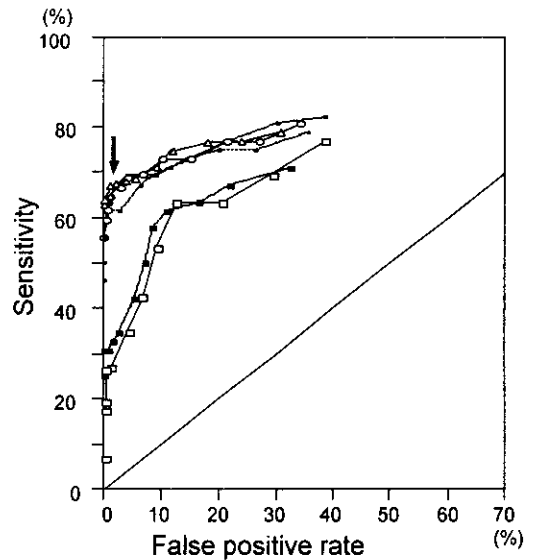


図2 IUGR に対する各指標の ROC curve

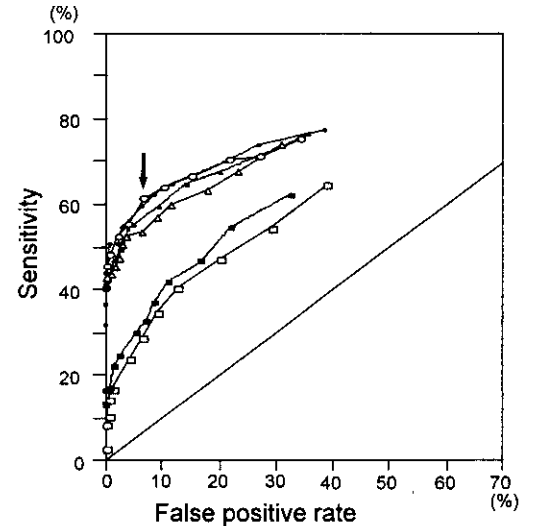


図3 胎児仮死に対する各指標の ROC curve

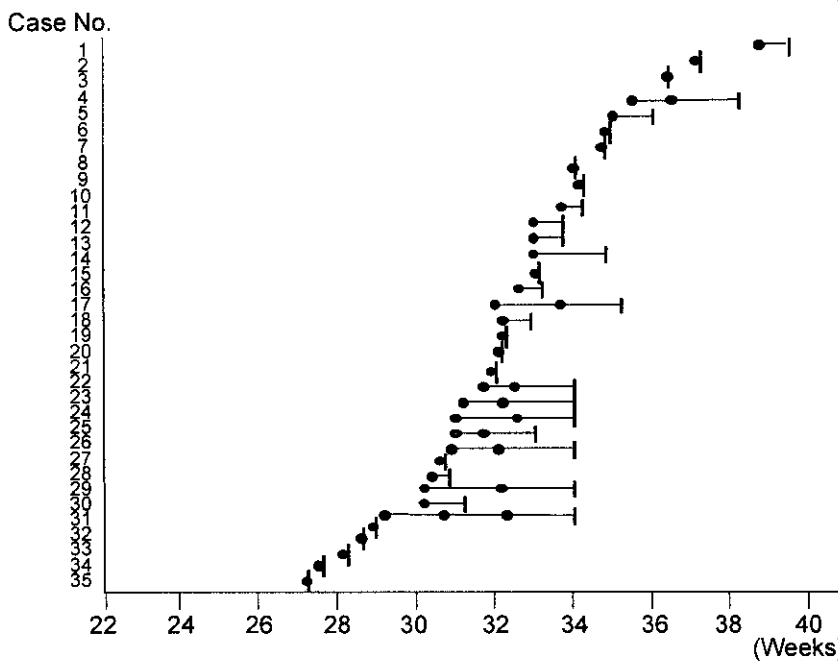


図4
胎児仮死症例における血流異常
—胎児仮死所見の出現までの
時間
●: 血流異常、I: 胎児仮死

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

家族性遺伝性疾患におけるカドヘリン細胞間接着システムの関与に関する基礎的研究
分担研究者：下山 豊 国立大蔵病院外科

（研究要旨）新規カドヘリン分子の同定および機能解析を行った。また、カドヘリン分子群の組織レベルでの発現解析手段を開発し、家族性遺伝性疾患における解析を開始した。

A. 研究目的

様々な家族性遺伝性疾患の成立とカドヘリン細胞間接着システムとの関連を解明する。

B. 研究方法

cDNA塩基配列の決定およびcDNAトランスフェクションを用いた発現実験により未同定であったカドヘリン-9および-10の解析を行う。家族性遺伝性疾患における組織レベルでのカドヘリン発現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抗体を作製し、その染色条件を決定する。

（倫理面への配慮）

研究に使用する臨床サンプルはインフォームド・コンセントの得られた剖検病理組織切片を使用した。

C. 研究結果

存在が予想されていたが未同定であったヒトカドヘリンサブクラスであるカドヘリン-9および-10のcDNA塩基配列の決定および解析を行った。さらにcDNAトランスフェクションを用いた発現実験により両分子の機能解析を行い、両分子が細胞間接着分子として機能することを確認した。平行してホルマリン・パラフィン切片に対して使用可能な抗カドヘリン特異的抗体の作製および免疫組織染色の条件設定を行った。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（カドヘリン-9および-10を含む）の内、E-、N-、P-カドヘリン、カドヘリン-11および-13の染色が可能となり、種々の家族性遺伝性疾患剖検病理組織切片におけるこれらの発現の検討を開始した。これらの抗体の内、抗カドヘリン-11および-13抗体は本年度に作製した。現在さらに、カドヘリン-6等に対する特異的抗体作製

も行っている。また、カドヘリン細胞間接着システムを構成するカテニンおよびアクチンの染色条件も決定した。

D. 考察

カドヘリン分子群はヒトの発生、分化における細胞の離散・集合に極めて重大な役割を果たしていると考えられる細胞間接着分子群であり、その遺伝子異常や接着システムの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、現在までにそれらの検討は全く行われていない。本研究では前年度に引き続きカドヘリン分子群と家族性遺伝性疾患との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行った。カドヘリン-9および-10の同定・機能解析および特異的抗カドヘリン-11および-13抗体の作製に成功し、また、現時点で使用可能な抗カドヘリン抗体等によるホルマリン・パラフィン切片を用いた免疫組織染色の条件設定を行うことができた。以上、一定の成果をおさめることができたと考えられる。

E. 結論

カドヘリン分子群およびその接着システムを構成する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。今後、本研究の主目的の達成のために家族性遺伝性疾患における組織レベルでのカドヘリン細胞間接着システムの解析をさらに推進することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shimoyama, Y., Takeda, H., et al. Biochemical characterization and functional analysis of two

typell classic cadherins, cadherin-6 and-14,
and comparison with E-cadherin. J. Biol. Chem.,
274: 11987-11994, 1999.

Takeda, H., Shimoyama, Y., et al. E-cadherin
functions as a *cis*-dimer at the cell-cell

adhesive interface *in vivo*. Nat. Struct. Biol., 6:
310-312, 1999.

2.学会発表 なし

G.知的所有権の取得状況
なし

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：cadherin superfamilyの中で、human classic cadherinの一つであるN-cadherinは心筋細胞間の介在板に存在する。心疾患におけるN-cadherinの局在性に焦点をあて、病理形態学的手法を用いて検討した。

A. 研究目的

拡張型心筋症（DCM）および肥大型心筋症（HCM）におけるN-cadherinの局在性について病理組織学的に検討する。

B. 研究方法

1978年から1999年までに、当施設で剖検された症例中、

家族性DCM群3例（ 32.3 ± 7.5 歳、M2、F1）、
家族性HCM群3例（ 37 ± 14 歳、M3、F0）、
正常群3例（ 52.7 ± 20.7 歳、M1、F2）を対象とし、抗ヒト・N-cadherin抗体を用いて免疫染色を施行した。

C. 研究結果

正常群においては、全例で心筋細胞の介在板に染色性が認められた。家族性DCM群で1例、家族性HCM群で2例において、介在板の染色性の低下がみられ、心筋細胞周囲に染色性が認められた。また、HCMの心筋錯綜配列部においては、介在板での染色性が保持されていた。

D. 考察

近年、遺伝性のDCMについては細胞骨格およびミトコンドリアの異常が示唆されており、細胞骨格に関わる蛋白として、アクチン、デスミン、タイチンの異常が報告されている。アクチンの異常では、Z帯や介在板に存在するアクチニンとの結合部位に突然変異が認められており、DCMにおける収縮能低下の原因として、力の伝達障害が考えられている。DCMにおけるN-cadherinは、カテニン分子を介してアクチンと結合している細胞接着分子であり、その分布異常は、それ自体の異常もしくは細胞骨格の異常を反映している可能性が示唆される。また、HCMにおいても分布異常が認められたことは、DCMと共通の蛋白質異常が存在する可能性が示唆される。

E. 結論

心筋症における一部の症例では、収縮能低下の一因として心筋細胞接着分子の異常が関与していると考えられた。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

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. 検体バンクの管理・整備を行い、データバンクとの連携を図る。
2. 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。

2. 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。また、昨年度に引き続き妊婦の抗体保有率を継続調査する。

B. 研究方法

1. 1) 平成10年度のシュミレーション結果をもとに検体バンクを整備し、臨床運用開始後はサンプルの管理、保身に努める。2) 検体輸送用のフローチャートを改良し、安全で円滑な検体輸送を図る。3) 分担研究者からの依頼を受けて適切な検体を送付するとともに、検査終了後の検体の回収、結果報告書提出の徹底を図る。4) 症例の集積状況を観察し、適切な解析が可能と予想される研究分担者や協力者へ情報の提示を行う。5) 検体バンクのサンプル情報もデータバンクへ登録し、検体の保存や解析の進行状況がネットワーク上で検索できるようなシステムへの改変を目指す。

C. 研究結果

1. 1) 3) 現在、約60症例300検体がバンクに登録され、無脳症や全前脳胞症の遺伝子解析、流産や奇形症候群の染色体分析などが進行している。全ての検体は、検体の内容、保存条件、解析担当者、現在地（どの施設にて解析進行中か）などの情報とともに管理されている。2) 3) 4) 5) システムの運用とともに、検体輸送時の手続きの煩雑さや解析結果の入力システムに問題があることが明らかとなった。また、新たな症例が登録された場合や、新しい解析結果が入力された場合に、各研究者へ通知できるようなシステムが望ましいと指摘された。さらに、検体に付随する情報（内容、保存条件、解析担当者、現在地など）につい