

平成15年度厚生労働科学研究 (子ども家庭総合研究事業)

報告書 (第5 / 11)

- 0030318 主任研究者 吉村 泰典
(配偶子・胚提供を含む総合的生殖補助技術のシステム構築に関する研究)
- 20030319 主任研究者 中村 好一
(快適な妊娠・出産を支援する基盤整備に関する研究)
- 0030320 主任研究者 鈴森 薫
(日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生子防効果に関する基礎的研究)
- 20030321 主任研究者 日暮 眞
(子育て時における両親の相談ニーズ把握及び保健医療福祉スタッフ支援モデル研究事業)
- 20030323 主任研究者 天野 恵子
(日本における女性医療の課題に関する医療社会学的研究ならびに性差を加味した健康度および生活習慣の測定手法の評価に関する研究)
- 0030291 主任研究者 鴨下 重彦
(小児科産科若手医師の確保・育成に関する研究)

厚生労働科学研究
(子ども家庭総合研究事業)

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と
先天異常(神経管欠損症およびダウン症候群等)の
発生予防効果に関する基礎的研究

平成15年度研究報告書

平成16年3月

主任研究者 鈴 森 薫

目 次

I. 総括研究報告書

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常
(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生予防効果
に関する基礎的研究

鈴森薫 _____ 171

II. 分担研究報告書

1. 日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常
(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生予防に
関する基礎的研究

大橋博文 _____ 175

2. 神経管形成異常・各種染色体異常等の症例の細胞集積と
各種異常の起源及び遺伝子多型に関する研究

孫田信一 _____ 177

3. 日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常
(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生予防効果
に関する基礎的研究

羽田 明 _____ 180

4. 葉酸による先天異常発生予防効果の検討と
予防的葉酸投与の実施・現状調査・啓蒙

種村光代 _____ 182

総括研究報告書

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常
（神経管欠損症およびダウン症候群等）の発生予防効果に関する基礎的研究

主任研究者 鈴森 薫 名古屋市立大学大学院医学研究科
生殖・遺伝医学講座生殖・発生医学分野教授

研究要旨

欧米諸国では、母体への葉酸投与が神経管閉鎖障害を減少させることが疫学的調査により報告されている。大規模な randomized control study 試験によるデータは少ないが、ハンガリーで実施された 4000 人規模の投与試験の報告では、神経管欠損症の有意な減少を認めるとともに、有意ではないものの、先天性心疾患や口唇口蓋裂、ダウン症候群の発生の低下が観察されている。一方、葉酸投与がダウン症発症予防になることの裏付けとなる報告もおこなわれた。ダウン症候群を出産した母親の葉酸代謝に関連するふたつの酵素の遺伝子多型を解析したところ、ある多型頻度が対照群に比べて有意に高いというものである。葉酸代謝に関しては MTHFR 遺伝子などの多型が報告されているが、遺伝子多型には人種差が存在するため、その結果の解釈にはより多くの症例の蓄積と人種毎の検討が必須である。本研究事業では、神経管欠損症、ダウン症候群およびその他の先天異常児を出産した日本人女性の血中葉酸、葉酸代謝関連酵素群遺伝子多型を対照群と比較検討することにより、我が国で葉酸がこれらの先天異常の発症の一次予防薬となる可能性があるかを検討する。

昨年度は、ダウン症出産既往のある母親 68 人と対照の母親 175 人の協力を得て、葉酸代謝に関与する 3 酵素の遺伝子多型頻度を検討した。対象とした遺伝子多型は MTHFR C677T, MTRR A60G、Thymidylate synthase (TS) 5' UTR である。このうち症例群で MTRR 遺伝子の GG 型は対照群に比べ、有意に頻度が少ないことがわかった ($P=0.03$)。さらに、Methionine synthase (MTR) 遺伝子の 2756 番目の A が G に置換する多型が知られているが、この多型によりアスパラギン酸 (D) のコドンがグリシン (G) に代わる D アレルでは G アレルよりも血中ホモシステインレベルが高いことが報告されている。最近、ダウン症を持つ母親では DD に比べて DG+GG が有意に多いことがイタリアのシシリャ島の集団で報告された。本年度はこの遺伝子多型について検討してみた結果、G アレルの頻度は症例で 22%、コントロールで 15%であり、同様の傾向が見られ、 $p=0.06$ と 5%水準では有意とはならなかったものの、症例数が増えれば有意になる可能性がある。神経管欠損症についても 17 家系のうち同意の得られた 12 名の母親の解析を開始している。反復流産や染色体異常症例において葉酸関連酵素群遺伝子の多型について系統的な調査を実施したが、特定の偏りとの関連は明確でなかった。神経管形成異常や流産に関わる新たな遺伝子の解明を目指して de novo 均衡型転座を有する多数の症例から共通する切断点の情報も収集し、特に今回焦点を当てている遺伝子との関連性を検討したが、共通する座位には含まれていなかった。なお、本年度は本研究協力者への研究結果の還元を目的として結果報告研修会も実施した。平成 16 年度にはさらに遺伝子多型の調査を追加継続して、日本における葉酸摂取啓蒙活動の必要性を明らかにしてゆく。

A. 研究目的

神経管欠損症（無脳症や二分脊椎）、ダウン症候群（母体の高齢化が関与していない若年齢層からの症例）、およびその他の先天異常児を出産した日本人女性の血清葉酸及びビタミン B₁₂ 濃度、葉酸代謝関連酵素群遺伝子多型を、対照群と比較検討することにより、日本人女性において、葉酸がこれらの先天異常の発症の一次予防薬となる可能性があるかを検討する。

さらに、実際に予防的葉酸投与を施行して追跡調査を行うとともに、全国的なアンケート調査や教育啓蒙を行い、日本における葉酸摂取啓蒙活動の浸透度を明らかにして、その現状を医療行政に提言してゆく。

B. 研究方法

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」を遵守し、さらに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実施される。研究計画、インフォームドコンセント書式については所属施設の倫理委員会の承認を得た書式を用い研究を実施する。

<対象>

1. 神経管欠損症患児と両親の検体採取

神経管欠損症患児（出生児以外に流・死産児も含む）を分娩した症例の母親より検体を採取する（種村）。患者が解析結果の告知を希望する場合に備え、検体、臨床情報は検体採取機関で連結可能匿名化し、ID 番号のみとする。母体の葉酸値は可能な限り測定する。

2. ダウン症候群出産母体の検体採取

愛知県心身障害者コロニー（孫田）や、埼玉県立小児医療センターで経過をみているダウン症候群患児の母親（大橋）、名古屋市立大学病院産科婦人科でダウン症候群を出産した母親（鈴森、種村）を中心に検体を収集する。患者が解析結果の告知を希望する場合に備え、検体、臨床情報は血液採取機関で連結可能匿名化し、ID 番号のみとする。

3. 葉酸代謝の関連が推定される先天異常児出産

母体、および原因不明流産母体などからの検体採取

2. と同様に検体を採取・保存し、症例の集積につとめる（鈴森、種村、孫田）。

<試料>

血液は、EDTA 採血管で約 5.0 ml 採血、血清分離採血管に 2 ml 計 7 ml 採血し、冷凍保存して千葉大に送付する。対象 1. 3. に関しては染色体異常の有無の確認のために染色体分析にも対応するべく同意が得られればへパリン採血も行い、細胞株の樹立を試みる（孫田、大橋）。

<解析方法>

昨年度は、ダウン症出産既往のある母親 68 人と対照の母親 175 人の協力を得て、葉酸代謝に関与する 3 酵素の遺伝子多型、

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の C677T 多型、Methionine synthase reductase (MTRR) の A66G 多型、Thymidylate synthase (TS) のプロモーター領域にある 28bp のリピート回数の多型（2 回または 3 回）の合計 3 種類の多型を中心に解析した。さらに、Methionine synthase (MTR) 遺伝子の 2756 番目の A が G に置換する多型が知られているが、この多型によりアスパラギン酸 (D) のコドンがグリシン (G) に代わる D アレルでは G アレルよりも血中ホモシステインレベルが高いことが報告されている。最近、ダウン症を持つ母親では DD に比べて DG+GG が有意に多いことがイタリアのシシリー島の集団で報告された。本年度はこの遺伝子多型についても追加検討してみた。

1. 葉酸代謝関連遺伝子の解析

葉酸代謝関連酵素である MTHFR の C677T 多型と MTRR の A66G 多型、TS 5' UTR 多型、MTR 遺伝子の 2756 番目の A が G に置換する多型を検出し、その遺伝子頻度と遺伝子型を決定し、疾患群と対照群と比較する（羽田）。

2. 血清葉酸、ビタミン B₁₂ 濃度の測定

血清葉酸、およびビタミン B₁₂ 濃度は、化学発光法にて測定する。その濃度分布を対照群と比較する（大橋、種村）。

3. 染色体分析と遺伝子多型

各種染色体異常及び神経管欠損症を示す症例で同意が得られた症例では自然流産の絨毛細胞及びその夫婦の末梢血細胞を集積する。細胞株化の必要な症例については、末梢血リンパ芽球細胞を EBV により形質転換して保存する。全症例について詳細に染色体解析を行い、反復自然流産の症例、及び染色体異常児を有する症例において葉酸関連酵素群遺伝子の多型を調査し、対照群と比較して多型の偏りを解析する。de novo 染色体構造異常等の切断点遺伝子と葉酸関連酵素群遺伝子との関連についても検討する。(孫田)

<調査、教育、啓蒙活動>

1. 全国的な予防的葉酸投与の実施状況とその効果に関するデータ収集

学会ホームページを通じての産科医への広報活動と、症例登録状況の調査を継続する(種村)。

2. 教育、啓蒙活動

本研究協力者への研究結果の還元を目的として結果報告研修会を企画した。研修会は、平成 15 年 7 月 16 日に埼玉県立小児医療センターにおいて実施した。内容は、1) 結果説明報告(大橋)、2) 『先天異常と出生前診断～現状と展望』をテーマとした講演(種村)とした。研究に協力したダウン症児出産経験のある母親 70 名と、埼玉県内の保健所、保健センター、療育施設、児童相談所関連者を対象に案内を通知し、参加費は無料とした。

C. 研究結果と D. 考察

平成 15 年度は平成 14 年度に続き症例と検体を追加収集し、遺伝子多型解析、葉酸測定等を継続した。ダウン症出産の既往がある母親に研究の趣旨を説明したところ、現在までに 70 名の母親から同意が得られた。正常対照の母親として、同様に説明し収集した検体の中から年齢と経産回数をマッチさせた 182 例を使用し、MTR 遺伝子多型の解析を追加した。

タイピングの結果、症例群では DD 型 43 例、DG 型 23 例、GG 型 4 例であった。一方、対照群では DD、DG、GG 型はそれぞれ 132 例、45 例、5 例であった。

G アレルの頻度は症例で 22%、コントロールで 15% であり($p=0.06$)、遺伝子型 DD と DG+GG を比較したところ、DG+GG が症例群で多い傾向($P=0.08$)にあったが、いずれも 5%水準では有意とはならなかった。Bosco et al. (2003)によると、シシリー島の集団では、G アレル頻度が症例では 24.6%、対照では 18.7% でありその差は有意であった($p=0.016$)と報告している。頻度は、我々の日本人の結果とほぼ同じであり、人種差は認められないと言って良いだろう。症例に G アレルが多いとの傾向も似ているので、今後、症例を増やして検討すると、有意な結果になる可能性があると思われる。

“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”システムより、神経管欠損症については 17 家系集まり、12 名の母親からの同意を得て遺伝子多型の解析を開始している。なお、これらの母親のうち葉酸値が低い症例は 1 例のみであったが、多くの母親が次子に向けての予防的葉酸内服(妊娠前より 2.5~5mg)を希望して開始しており、追跡調査を行ってこれまでに出生した児は全例正常であった。

神経管欠損症(2 例)及び染色体異常の患者及び自然流産の症例合わせて 71 症例とその家族由来細胞を集積し、細胞株化が必要な症例について末梢血リンパ芽球細胞を EBV 形質転換により株化して保存した。全症例について詳細な染色体解析を実施したが、これまで調査した無脳児等を含む神経管閉鎖障害症例については、染色体異常が認められなかった。自然流産には各種のトリソミー(トリソミー 9、16、18、21 など)、ダブルトリソミー、三倍体、四倍体、X モノソミーなどが含まれていた。またトリソミーを示す流産を反復する症例も多数含まれていた。染色体異常症例において葉酸関連酵素群遺伝子の多型について系統的な調査を実施したが、特定の偏りとの関連は明確でなかった。神経管形成異常や流産に関わる新たな遺伝子の解明を目指して de novo 均衡型転座を有する多数の症例から共通する切断点の情報を収集した。特に今回焦点を当てている遺伝子との関連性を検討したが、共通する座位には含まれていなかった。

埼玉県立小児医療センターにて開催された研修会の参加申込者内訳は、母親が10名、関係者が14名（保健所保健センター6名；療育施設6名、児童相談所2名）だった。研修会で作成した資料をより一般化したパンフレットに改良し、講演会のビデオとあわせて、ダウン症児の家族等が先天異常・出生前診断を理解する助けとなる情報資源の一つとして活用を考えている。わが国における予防的葉酸投与の実施状況はかんばしくなく、遺伝カウンセリングの普及、葉酸摂取啓蒙活動の推進とともに、学会や医会などとも連携を図り、予防的葉酸投与症例の集積・追跡調査をすすめてゆく必要がある。

E. 結論

Methionine synthase (MTR) はホモシステイン代謝の重要な酵素で、ホモシステインの再メチル化を行ってメチオニンを産生する。従って MTR の機能亢進によりホモシステイン濃度は減少する。MTR 遺伝子の 2756 番目の A が G に置換する多型が知られているが、この多型によりアスパラギン酸 (D) のコドンがグリシン (G) に代わる。D アレルでは G アレルよりも血中ホモシステインレベルが高いことが報告されているが、最近、ダウン症を持つ母親では DD に比べて DG+GG が有意に多いことがイタリアのシシリ島の集団で報告された。我々が収集した検体でも、G アレルの頻度は症例で 22%、コントロールで 15% であり、同様の傾向が見られたが、 $p=0.06$ と 5% 水準では有意とはならなかった。DD vs DG+GG では $p=0.08$ であり、有意な差とまではならなかったが、シシリ島の集団とほぼ同様に、G アレルが危険要因になりうる可能性を示唆するものと思われる。

神経管欠損症は稀な先天異常で、本年度末によく遺伝子解析を開始したばかりである。さらに全国レベルでの症例収集、追跡調査が必要であり、次年度も学会広報活動やネットワークシステム等を利用して症例の集積につとめる。日本では、葉酸投与については医療サイドにも患者サイドにも普及していると言いが難いが、情報を得た母親は予防的葉酸内服に積極的であり、既に健児を得た症例もあり、

その効果が実証されつつある。ヒト検体を必要とする基礎的研究では、検体提供協力者への直接的なメリットの還元は難しいことが稀ではない。しかしながら、例えば直接的利益還元ではなくても、結果の報告の機会を設け、何だかの利益還元を目指す工夫、あるいは研究結果を基礎とした教育啓蒙活動は、研究の社会的認知と将来的発展のために大切な点であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

鈴木薫：流産・死産・先天異常の原因検索と遺伝カウンセリングに有用な Spectral karyotyping (SKY) 法について 特集/胎児・新生児医療-02 年のトピックス、産婦人科の世界 55: 31-38, 2003
Kondo, Y., Tsukishiro, S., Tanemura, M., Sugiura-Ogasawara, M., Suzu-mori, K., Sonta, S.: Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion. J. Hum. Genet. (in press) 2004.

2. 学会発表

李 青英, 月城沙美, 中川千玲, 野村紀子, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木薫, 孫田信一: 自然流産に見られたダブルトリソミーの起源と発生機序. 中部出生前医療研究会 (名古屋) 2004. 2. 28.

孫田信一, 李 青英, 赤井美津代, 月野隆一³, 鈴木薫, 中川千玲: 母由来の転座派生染色体と正常核型をもつ細胞のモザイクの形成機序. 日本人類遺伝学会 (長崎) 2003. 10. 24.

孫田信一, 月城沙美, 李 青英, 鈴木薫, 中川千玲, 野村紀子: 原因不明の自然流産に見られた片親性ダイソミーとその発生機序. 染色体学会年会 (東京) 2003. 10. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常（神経管欠損症およびダウン症候群等）の発生予防に関する基礎的研究

分担研究者 大橋 博文 埼玉県立小児医療センター遺伝科医長

研究要旨

ダウン症出産経験のある70名の母親が本研究に同意して血液検体を提供し遺伝子多型解析が行われた。本研究は基礎的なものであり、遺伝子検査の結果が直接検体提供者に利益還元される性質のものではないが、協力した母親への研究結果の還元を目的に結果報告研修会を企画した。内容は、1) 研究結果の報告、2) 先天異常と出生前診断についての講演とし、本研究の意義のみならず、広く先天異常と出生前診断の現状と展望についての知識を得られる機会とした。さらに、研修会で作成した資料をより一般化したパンフレットに改訂し、講演会のビデオとあわせて、ダウン症児の家族等が先天異常・出生前診断を理解する助けとなる情報資源の一つとした。基礎的研究であっても協力者に対してさまざまな形での成果の還元のあり方を工夫することは、研究の社会的認知と将来的発展のために大切な点であると考えます。

A. 研究目的

ダウン症出産経験のある70名の母親から、倫理委員会で承認された文書によって説明し同意を得て採血し、遺伝子多型解析に供した。本研究は基礎的なものであり、遺伝子検査の結果が直接検体提供者に利益還元されるものではないことをその説明文書によって予め伝えていたが、本研究に協力した母親への研究結果の還元を目的として、結果報告研修会を企画した。

B. 研究方法

研修会は、平成15年7月16日に埼玉県立小児医療センターにおいて実施した。

研修会内容は、1) 結果説明報告（大橋分担研究者）、2) 『先天異常と出生前診断～現状と展望』をテーマとした講演（種村分担研究者）とした。研究に協力したダウン症児出産経験のある母親70名と、埼玉県内の保健所、保健センター、療育施設、児童相談所関連者を対象として案内を通知した。参加費は無料とした。

C. 研究結果

研修会参加申込者内訳は、母親が10名、関連者が14名（保健所保健センター6名；療育施設6名、児童相談所2名）だった。

D. 考察

ヒト検体を必要とする基礎的研究では、検体提供協力者への直接的なメリットの還元は難しいことが稀ではない。しかしながら、例え直接的利益還元ではなくても、結果の報告の機会を設け、何だかの利益還元を目指す工夫は、研究の社会的認知と将来的発展のために大切な点であると考え。さらに、研修会で作成した資料をより一般化したパンフレットに改良し、講演会のビデオとあわせて、ダウン症児の家族等が先天異常・出生前診断を理解する助けとなる情報資源の一つとして活用を考えている。

E. 結論

基礎的研究である本研究にインフォームドコンセントのもとに同意をし、血液検体を提供したダウン症候群の児をもつ母親を対象に、研究結果の還元を目的として、結果報告研修会を開催した。さらに、研修会で作成した資料をより一般化したパンフレットに改訂し、講演会のビデオとあわせて、ダウン症児の家族等が先天異常・出生前診断を理解する助けとなる情報資源の一つとした。基礎的研究であっても協力者に対してさまざまな形での成果の還元のあり方を工夫することは、研究の社会的認知と将来的発展のために大切な点であると考え。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

大橋博文、小崎里華、中野玲子、水村たか子、大野勉：埼玉県遺伝相談モデル事業の報告。埼小医セ誌 20:65-71, 2003

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

神経管形成異常・各種染色体異常等の症例の細胞集積と
各種異常の起源及び遺伝子多型に関する研究

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
遺伝性疾患研究室長

研究要旨 神経管形成異常児及び染色体異常児等の出産歴のある日本人女性における葉酸代謝関連酵素群の遺伝子多型を解析し、遺伝子多型と各種疾患との関連を明らかにすることを目的にして研究を継続した。本年度は、トリソミー等の異常児を有する症例、染色体異常の流産を反復する症例、及び神経管形成異常児を有する女性由来の細胞を多数集積した。また、各症例の染色体構成を詳細に解析するとともに、各症例における葉酸関連酵素群遺伝子の多型とその偏りに関して調査した。さらに、*de novo* 染色体構造異常の切断点遺伝子について検討した。これらの研究により染色体異常及び神経管形成異常等に関わる遺伝子異常あるいは遺伝子多型の解明を図った。

A. 研究目的

二分脊椎等を含む神経管形成異常や染色体異常の患児出産と葉酸代謝関連酵素遺伝子の多型の偏りとの関連について議論されている。しかし、日本人における葉酸代謝関連遺伝子に関するデータはほとんどなかった。本研究では神経管形成異常児及びダウン症候群児の出生歴のある日本人女性において、葉酸代謝関連酵素群遺伝子の異常または多型との疾患との関連を調査することにある。分担研究課題では、神経管形成異常や染色体異常症例とその家族、染色体異常を反復する流産とその夫婦由来の細胞の集積を図った。これらの症例における詳細な染色体解析を実施し、葉酸関連酵素の遺伝子多型調査と合わせて、染色体異常及び神経管形成異常に関わる遺伝子異常または遺伝子多型を明らかにする。

B. 研究方法・対象

以下の方法で各種解析を実施した。①各種染色体異常及び神経管形成異常を示す症例とその家族由来の細胞を集積した。②染色体異常を反復する自然流産の絨毛細胞及びその夫婦の末梢血細胞を集積した。細胞株化の必要な症例については、末梢血リンパ球細胞を EBV により形質転換で保存した。③これら全症例についてバンド法等を用いて詳細に染色体解析を行った。④反復自然流産の症例、及び染色体異常児を有する症例において葉酸関連酵素群遺伝子の多型を他の研究者と共同で調査し、対照群と比較して多型の偏りを解析した。⑤*de novo* 染色体構造異常等の切断点遺伝子と葉酸関連酵素遺伝子との関連について検討した。これらの研究をとおして染色体異常及び神

経管形成異常に関わる遺伝子異常・多型を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究では三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」を遵守し、日本医学会分科会等の倫理規定に準じて実施した。研究者は患者及びその家族の人権擁護に配慮し、患者及びその家族に対して本研究の目的を十分に説明しインフォームドコンセントを経て協力を得た。なお、本研究計画、実施要領等について所属機関の倫理委員会において承認を得て実施した。

C. 研究結果

細胞の集積：神経管形成異常及び染色体異常の患者及び自然流産の症例合わせて71症例とその家族由来細胞を集積した。細胞株化が必要な症例については、末梢血リンパ球細胞をEBV形質転換により株化して保存した。②染色体解析：全症例について詳細な染色体解析を実施した。これまで調査した無脳児等を含む神経管形成異常症例については、染色体異常が認められなかった。自然流産には各種のトリソミー(トリソミー9、16、18、21など)、ダブルトリソミー、三倍体、四倍体、Xモノソミーなどが含まれていた。またトリソミーを示す流産を反復する症例も多数含まれていた。③遺伝子多型との関連解析：染色体異常症例において葉酸関連酵素群遺伝子の多型について系統的な調査を共同で実施したが、特定の偏りとの関連は明確でなかった。④構造異常切断点遺伝子の検討：神経管形成異常や流産に関わる新たな遺伝子の解明を目指してde novo 均衡型転座を有する多数の症例から共通する切断点の情報を収集し

た。特に今回焦点を当てている遺伝子との関連性を検討したが、共通する座位には含まれていなかった。

D. 考察

神経管形成異常及び染色体異常患児の出産歴のある母親に葉酸代謝関連の酵素群遺伝子の多型パターンに高い偏りが見られるという報告がこれまで出されている。しかし、遺伝子多型には人種等により偏りがあり、日本人におけるこれらの遺伝子に関する情報は極めて少ない。したがって神経管形成異常児及び染色体異常児妊娠歴のある日本人女性において葉酸代謝関連酵素群遺伝子の多型を解析し、これら遺伝子の異常や変異と疾患原因との関連性を検討することは重要である。

今年度は神経管形成異常及び染色体異常を示す症例とその家族由来の細胞の集積を進め、多数の自然流産の症例を集積することができた。この中で特にトリソミーを反復する自然流産の症例は、染色体異常と葉酸関連酵素群遺伝子との関係を明らかにするための貴重な研究対象である。これらを用いて染色体異常及び神経管形成異常に関わる遺伝子及び遺伝子多型を解析したが、特定するには至っていない。

各症例について詳細な染色体解析を実施したが、これまで調査した無脳児等を含む神経管閉鎖異常症については染色体異常が認められなかった。現在、マイクロサテライト多型などを用いて、通常解析法では見つからない微細欠失等の有無をさらに調査中である。最近、反復する自然流産の中に、染色体14の片親性(母親性)ダイソミーが発見された。この異常はダイソミー

卵子形成が原因で成立したが、この胎児を妊娠した女性においても葉酸代謝関連酵素群遺伝子の多型を精査中である。今後、葉酸代謝関連酵素群遺伝子のみならず、他の代謝関連遺伝子や、染色体構築・細胞分裂等に関わる遺伝子等の検索についても検討が必要である。

E. 結論

本研究では神経管形成異常及び各種染色体異常等の発生要因と葉酸代謝関連酵素群遺伝子の異常または多型との関連を明らかにするため、神経管形成異常症例、染色体異常症例及び自然流産由来の細胞を集積した。今後これらの症例の研究により、染色体異常及び神経管形成異常等に関わる遺伝子異常または多型との関係が明らかになる。

(謝辞)

研究対象の症例の集積において多大な援助をいただいた名古屋市立大学医学部産婦人科、種村光代講師、杉浦真弓助教授、鈴木薫教授、各種解析に援助頂いた愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所研究助手、中川千玲、野村紀子、名古屋市立大学大学院医学研究科、月城沙美、李青英の各氏に深謝申し上げます。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kondo, Y., Tsukishiro, S., Tanemura, M., Sugiura-Ogasawara, M., Suzumori, K., Sonta, S.: Maternal uniparental disomy of chromosome

16 in a case of spontaneous abortion.

J. Hum. Genet. (In press) 2004..

Yamada Y, Yamada K, Sonta S et al.:

Mutations in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene (HPRT1) in Asian HPRT deficient families. Nucleoside Nucleic Acid, In press, 2004.

2. 学会発表

李青英, 月城沙美, 中川千玲, 野村紀子, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木薫, 孫田信一: 自然流産に見られたダブルトリソミーの起源と発生機序. 中部出生前医療研究会 (名古屋) 2004.2.28.

Yamada K, Ono T, Sonta S, et al.:

Identification and characterization of a causal gene responsible for severe developmental delay and a pharyngeal anomaly from a patient with a *de novo* translocation [46, XY, t(6;12)(q16;p12)]. Annual Meeting of The American Society of Human Genetics (Los Angeles, USA) 2003.11.6.

孫田信一, 李青英, 赤井美津代, 月野隆一³, 鈴木薫, 中川千玲: 母由来の転座派生染色体と正常核型をもつ細胞のモザイクの形成機序. 日本人類遺伝学会 (長崎) 2003.10.24.

孫田信一, 月城沙美, 李青英, 鈴木薫, 中川千玲, 野村紀子: 原因不明の自然流産に見られた片親性ダイソミーとその発生機序. 染色体学会年会 (東京) 2003.10.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当事項なし

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常
(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生予防効果に関する基礎的研究

分担研究者 羽田 明 千葉大学大学院医学研究院教授

研究要旨

ダウン症出産経験のある70名の母親と、妊娠、分娩をとおして母子ともに特に問題の無かった年齢と経産回数をマッチさせた182例の母親を対象として遺伝子多型による関連解析をおこなっている。昨年度までに、葉酸代謝関連酵素として、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)のC677T多型、Methionine synthase reductase (MTRR)のA66G多型、Thymidylate synthase (TS)のプロモーター領域にある28bpのリピート回数の多型(2回または3回)の合計3種類の多型を検討した。本年度はMethionine synthase (MTR)遺伝子多型の検討をおこなった。MTRはホモシステインの再メチル化によりメチオニンを産生する酵素である。従ってMTRの機能が低いと血中ホモシステイン濃度が上昇する。MTR遺伝子には2756番目の塩基がAからGに置換する多型が知られていて、この多型によりアスパラギン酸(D)がグリシン(G)になる。今回の解析の結果、Gアレルの頻度は症例で22%、コントロールで15%であり($p=0.06$)、遺伝子型DDとDG+GGを比較したところ、DG+GGが多い傾向($P=0.08$)にあったが、いずれも5%水準では有意とはならなかった。

A. 研究目的

トリソミー型ダウン症では、症例の93%において過剰21番染色体は母親由来である。卵子形成の減数分裂における染色体不分離が原因であるが、その発生メカニズムはわかっていない。また、ダウン症発生の危険因子として妊娠時の母親の高年齢がよく知られているが、他の要因は不明である。葉酸はDNA合成の前駆体整合性に必須のビタミンである。これまでin vivo およびin vitro で慢性的な欠乏状態では、DNAメチル化の異常、DNA鎖の破断、染色体組み換え異常、染色体分離の異常などが起こることが知られている。James et al. (1999)は、

母親の葉酸欠乏状態が染色体不分離の危険因子となりダウン症発生が増加するという仮説の基に57人のダウン症出生の母親と対照50人を比較し、前者では血中ホモシステイン値の軽度上昇と葉酸代謝に関係するMethylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)酵素の遺伝子多型677Tが有意に高いことを見いだした。その後、Hobbs et al. (2000)、O'Leary et al. (2002)はMTHFRに加え、Methionine synthase reductase (MTRR)酵素の遺伝子多型(A66G)の66Gも有意に高く、両者は独立の危険要因であると報告している。また最近、シシリー島の集団で、Bosco et al. (2003)はMethionine synthase

(MTR)の遺伝子多型(A2756G)を解析したところ、ダウン症の母親では AG+GG 遺伝子型の頻度が有意に高いと報告した。

本研究では、日本人集団において、葉酸投与による先天異常発生予防の可能性を探ることを目的として、葉酸関連酵素遺伝子の遺伝子多型との関連を研究している。

B. 研究方法

倫理委員会の承認後、ダウン症出産の既往がある母親に研究の趣旨を説明したところ、70名の母親から同意が得られた。正常対照の母親として、同様に説明し収集した検体の中から年齢と経産回数をマッチさせた182例を使用した。昨年度までに Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) の C677T 多型, Methionine synthase reductase (MTRR) の A66G 多型, Thymidylate synthase (TS) のプロモーター領域にある 28bp のリピート回数の多型 (2回または3回) の合計3種類の多型を検討した。本年度は MTR 遺伝子多型との関連を検討した。この多型は 2756番目の塩基が A または G であり、これにより アスパラギン酸(D) が グリシン(G) に置換する。遺伝子タイピングは、5'-GGATGAATACTTTGAGGAAATCATGG-3' と 5'-AAAGC-CTTTTACTCTCCTCAAACC-3' のプライマーセットで PCR を行い、HaeIII で切断後、4%アガロースゲル電気泳動で遺伝子型を判定した。

C. 研究結果

タイピングの結果、症例群では DD 型 43 例, DG 型 23 例, GG 型 4 例であった。一方、対照群では DD, DG, GG 型はそれぞれ

132 例, 45 例, 5 例であった。G アレルの頻度は症例で 22%, コントロールで 15% であり ($p=0.06$)、遺伝子型 DD と DG+GG を比較したところ、DG+GG が症例群で多い傾向 ($P=0.08$) にあったが、いずれも 5%水準では有意とはならなかった。

D. 考察

Bosco et al. (2003)によると、シシリー島の集団では、G アレル頻度が症例では 24.6%, 対照では 18.7% でありその差は有意であった ($p=0.016$) と報告している。頻度は、我々の日本人の結果とほぼ同じであり、人種差は認められないと言って良いだろう。症例に G アレルが多いとの傾向も似ているので、今後、症例を増やして検討すると、有意な結果になる可能性があると思われる。

E. 結論

今回、検討した MTR 遺伝子の結果は、有意な差とはならなかったが、シシリー島の集団とほぼ同様に、G アレルが危険要因になりうる可能性を示唆するものと思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

現在、投稿準備中。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

葉酸による先天異常発生予防効果の検討と
予防的葉酸投与の実施・現状調査・啓蒙

分担研究者 種村光代 名古屋市立大学大学院医学研究科
生殖・遺伝医学講座 生殖・発生医学分野講師

研究要旨

葉酸による先天異常（神経管欠損症およびダウン症候群等）の発生予防効果に関する検討を目的として、これらの症例の収集と正確な臨床診断、葉酸代謝関連酵素遺伝子多型の解析、予防的葉酸投与の実施・現状調査・啓蒙をおこなう。胎児の先天異常を主訴に受診した妊婦 53 名のうち頭部の形態異常を疑われたものは 13 例存在した。超音波検査および胎児 MRI 等による診断の結果、水頭症 3 例、全前脳胞症 3 例、無頭蓋症 2 例、滑脳症 1 例、クモ膜嚢胞 1 例、脳ヘルニア 1 例、脳梁低形成 1 例、正常 1 例であった。全前脳胞症については水頭症あるいは小頭症として、無頭蓋症については小頭症として紹介されたケースが大半であった。滑脳症、クモ膜嚢胞、脳ヘルニア、脳梁低形成、正常例はいずれも水頭症疑いとして紹介されていた。これらの症例のうち神経管閉鎖障害が原因と予想され、染色体異常や他の遺伝子異常が確認出来なかった症例と、既存の“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”システムを経由して他施設より遺伝子解析を目的として当施設へ送付された無頭蓋症と無脳症、あわせて 17 家系のうち、12 名の母親より同意を得て検体より DNA を採取して、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の C677T 多型、Methionine synthase reductase (MTRR) の A66G 多型、Thymidylate synthase (TS) のプロモーター領域にある 28bp のリピート回数の多型（2 回または 3 回）、Methionine synthase (MTR) の 2756 番目の A が G に置換する多型などの解析を開始した。他院にて診断された胎児の頭部形態異常のうち、画像診断が正確ではない症例が多いことがまず問題であったが、神経管欠損症のうち無脳症、無頭蓋症については最近では妊娠の早期に正確に診断、紹介されるようになり、皆、次妊娠時の葉酸予防的内服に期待を寄せている。なお、これまでにすでに葉酸内服を開始、追跡調査した 4 症例の全例が健児を得ている。全国的には葉酸の予防的投与を行っている施設が少なくないと推察されるが、学会や医会レベルでの症例登録システムの構築、教育・啓蒙活動が望まれる。

A. 研究目的

近年の超音波検査機器および診断技術の発展により、胎児の重篤な先天異常が出生前に診断されるケースが増加している。先天異常の一次予防は重要な課題であり、

その関与因子の同定が望まれている。諸外国の疫学研究で明らかになった唯一の例は、葉酸投与が二分脊椎症や無脳症を減少させることであり、日本においても葉酸摂取の啓蒙が始まったが、我が国では、未だ何ら

疫学研究が進行していない。葉酸の予防的投与は望ましいものと期待されるが、近年の日本人一般女性と先天異常児を出産した日本人女性の血中葉酸値、遺伝子多型に基づく薬剤有用性も比較検討した上で、その必要性を明確にしてゆく必要がある。

葉酸による先天異常（神経管欠損症およびダウン症候群等）の発生予防効果に関する検討を目的として、これらの症例の収集と正確な臨床診断、葉酸代謝関連酵素遺伝子多型の解析、予防的葉酸投与の実施・現状調査・啓蒙を行う。

B. 研究方法

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」を遵守し、さらに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実施される。研究計画、インフォームドコンセント書式については所属施設の倫理委員会より承認を得た書式を用いて研究を実施する。

* 先天異常（神経管欠損症およびダウン症候群等）の症例収集

胎児の先天異常を主訴に当施設を受診した妊婦を対象に、超音波検査や胎児MRIを導入して、出生後の追跡調査や、死産や新生児死亡症例には病理解剖も可能な限り実施して正確な臨床診断を行う。神経管欠損症患者（流・死産児も含む）を分娩した症例の検体を採取する。患者が解析結果の告知を希望する場合に備え、検体、臨床情報は検体採取機関で連結可能匿名化しID番号のみとする。さらに、葉酸代謝の関連が推定される先天異常児出産母体、および原因不明流産母体の検体も収集する。他施設からの症例の収集は、“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”（厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「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」主任研究者：鈴木薫）にて構築したネットワークシステムを基盤として、産科婦人科拠点施設に症例情報と検体の集積を依頼する。

* 葉酸代謝関連遺伝子等の遺伝子多型及び染色体分析

葉酸代謝関連遺伝子多型は分担研究者の羽田、染色体分析は孫田に依頼する。

* 予防的葉酸投与の実施

当施設産科婦人科では遺伝カウンセリング専門外来を設けており、先天異常児の出生に関する相談に対応している。これらの症例のうち、妊娠前より予防的葉酸投与を施行した症例の追跡調査を行う。

* 教育・啓蒙活動

分担研究者大橋の企画に協力して、本研究に協力した母親への研究結果の還元を目的として、結果報告研修会を実施した。

C. 研究結果および考察

平成14年12月1日より平成15年11月30日までの一年間に、胎児の先天異常を主訴に受診した妊婦は53名で、そのうち頭部の形態異常（水頭症や小頭症疑いなど）を疑われたものが最も多く13例存在した。超音波検査および胎児MRI等による診断の結果、水頭症3例、全前脳胞症3例、無頭蓋症2例、滑脳症1例、クモ膜嚢胞1例、脳ヘルニア1例、脳梁低形成1例、正常1例であった。全前脳胞症については水頭症あるいは小頭症として、無頭蓋症については小頭症として紹介されたケースが大半であった。滑脳症、クモ膜嚢胞、脳ヘルニア、脳梁低形成、正常例はいずれも水頭症疑いとして紹介されていた。無頭蓋症と脳ヘルニアの全例、水頭症の2例、全前脳胞症の2例（1例は染色体検査正常、もう1例は検査を希望せず）は母体保護法のもとに人工妊娠中絶に至った。出生に至った

水頭症の1例は胎児期より4~5分間欠に痙攣様発作を認め、出生直後に呼吸不全のため昇天した。これらの症例のうち神経管閉鎖障害が原因と予想され、染色体異常や他の遺伝子異常が確認出来なかった症例と、他施設より遺伝子解析を目的として当施設へ送付された無頭蓋症と無脳症、あわせて17家系のうち、12名の母親より同意を得て検体よりDNAを採取して、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)のC677T多型、Methionine synthase reductase (MTRR)のA66G多型、Thymidylate synthase (TS)のプロモーター領域にある28bpのリピート回数の多型(2回または3回)、Methionine synthase(MTR)の2756番目のAがGに置換する多型などの解析を開始した。

神経管欠損症に関してはようやく症例が集まり始め、遺伝子多型解析を開始することができたが、発生頻度が低くさらなる症例収集が必要である。日本産科婦人科学会のホームページ内に、神経管欠損症を含む遺伝性先天性疾患に関するホームページ

「周産期遺伝子診療のためのサポート」の掲載を開始しているが、まだ問い合わせや症例紹介は少なく、日本産科婦人科医会への呼びかけも検討している。

なお、当施設では、ネットワーク内外の症例を含め、これまでに神経管欠損症児分娩既往のある4例の妊婦が、次の妊娠前より葉酸(2.5~5mg)を内服して分娩に至っているが、全例で健児を得ている。まだ妊娠に至っていない症例の母親も葉酸の予防的内服を希望している。本年度に埼玉県立小児医療センターで開催したような結果報告研修会などを通じて、患者サイドへの積極的な情報提供が望まれる。

D. 結論

神経管欠損症は稀な先天異常で全国レベルでの症例収集が必要であり、次年度もさらなる症例の集積が必要であるが、他院にて診断された胎児の頭部形態異常のうち、臨床診断が正確ではない症例が多いことがまず問題である。また、人工妊娠中絶や出生直後死亡も多く、胎児超音波検査や遺伝カウンセリングの困難さが浮き彫りとなった。一方、無脳症、無頭蓋症については最近ではかなり妊娠の早期に正確に診断、紹介されるようになり、皆、次妊娠時の葉酸予防的内服に期待を寄せている。全国的には葉酸の予防的投与を行っている施設が少なくないと推察されるが、学会や医会レベルでの症例登録システムの構築や教育・啓蒙活動が望まれる。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kondo, Y., Tsukishiro, S., Tanemura, M., Sugiura-Ogasawara, M., Suzu-mori, K., Sonta, S.: Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion. J. Hum. Genet. (in press) 2004.

2. 学会発表

李 青英, 月城沙美, 中川千玲, 野村紀子, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴森 薫, 孫田信一: 自然流産に見られたダブルトリソミーの起源と発生機序. 中部出生前医療研究会(名古屋) 2004. 2. 28.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし