

# 厚生労働科学研究研究費補助金

(子ども家庭総合研究事業)

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17年(2005年)3月

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)の発生日防効果に関する基礎的研究)

# 厚生労働科学研究研究費補助金

(子ども家庭総合研究事業)

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17年(2005年)3月

主任研究者 鈴木 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)の発生予防効果に関する基礎的研究)

# 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 ..... 1

## 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 ..... 5

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  
染色体構成及び遺伝子多型に関する研究

孫田信一 ..... 7

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 ..... 10

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 ..... 13

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 研究成果の刊行物・別冊

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
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。平成 14 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ー島の集団で報告された。平成 15 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 名の母親の解析を実施したが有意差は認めなかった。平成 16 年度は、自然流産症例（染色体異常を検出できた 20 例、検出できなかった 20 例の合計 40 例とその母親の検体）において葉酸関連酵素群遺伝子の多型について調査を実施した。その結果、染色体異常をもつ流産胎児の母親を対照の母親と比較したところ、MTHFR の 677T アレルの頻度が有意に高い事が分かった。他の遺伝子多型、および染色体異常を検出できなかった流産胎児の母親では有意な差を検出できなかった。胎児 DNA の解析でも特に有意な差は検出されなかった。677T アレルはホモシステインの高値とも関連している為、染色体異常発生に関与している可能性がある。なお、本年度は本研究協力者へのアンケート調査も実施した。

## A. 研究目的

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。本研究事業では、神経管閉鎖障害、ダウン症候群およびその他の先天異常児出産や、自然流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、わ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。とくに平成 16 年度は、流産に焦点をあてて検討をすすめる。

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。神経管閉鎖障害の症例の遺伝カウンセリングと追跡調査は継続して、予防的葉酸投与の実施状況、次子における再発について検討する。

#### 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>

本年度は、母体の合併症などが存在しない原因不明流産の母体、及び流産絨毛や胎児由来細胞などの検体採取を行い、まず詳細な染色体分析を実施した。次に、染色体異常を持つ流産胎児 20 例、染色体異常を検出できなかった流産（神経管閉鎖障害も含め原因不明の先天異常が含まれる可能性あり）胎児 20 例の双方の母親における遺伝子多型の関連について検討した。解析した遺伝子および多型は、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の C677T および A1298C 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) 遺伝子の A2756G 多型（D→G）の合計 5 種類である。

#### 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 B<sub>12</sub> 濃度の測定

血清葉酸、およびビタミン B<sub>12</sub> 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(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遺伝子との関連についても検討する。(孫田)

#### <教育、啓蒙活動>

研究に協力したダウン症児をもつ母親 89 名(3年間合計)を対象に、研究協力を依頼する際に行った説明と同意の実効性を評価するためにアンケート調査を行った。さらに、平成 17 年 2 月 5 日には、研究成果の一部を、一般公開の講演会で説明した。

(大橋、種村)

### C. 研究結果と D. 考察

平成 16 年度は平成 14、15 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。予防的葉酸投与をした追跡症例からの先天異常児分娩例はなかった。

これまでに蓄積された、無脳症を含む神経管閉鎖障害を伴う核型正常の症例における、片親性ダイソミーの関与については、マイクロサテライト多型解析によって調査したが、これまで解析した 4 例ではこの異常は認められなかった。

染色体異常をもつ流産胎児の母親を対照の母親と比較したところ、MTHFR の 677T アレルの頻度が有意に高い事が分かった ( $P=0.0096$ )。他の遺伝子多型および、染色体異常を検出できなかった流産胎児の母親では有意な差を検出できなかった。胎児 DNA の解析でも特に有意な差は検出されなかった。677T アレルはホモシステインの高値とも関連しているため、染色体異常発生に関与している可能性がある。

アンケート調査では、42 名(47%)より有効回答

を得た。結果としては、研究説明の理解度では、“大体判った”以上が 29 名(69%)であり、“あまり判らなかつた”以下の不十分な理解が 13 名(31%)であった。不十分な理解の群の協力理由(複数回答を含め計 14 件)は、“医学の発展のため”8件、“あまり深く考えなかつた”2件、“通院している病院なので断りにくかつた”1件、その他 3 件であった。対象が母親のみにてであったことについては、“抵抗なかつた”23 名(55%)、“母親だけはおかしい”6 名(14%)、“やはり自分に責任があると感じた”10 名(24%)であった。本調査から、多数でないにしても、不十分な理解での研究協力や、協力にまつわる不安感の存在が示唆された。

### E. 結論

前方視的な予防的葉酸投与の追跡調査は、3 年という研究期間ではなかなか困難であったが、以前から追跡調査を継続してきて本年度に分娩となった神経管閉鎖障害児の分娩既往母体のうち、予防的投与群の症例からは、再発は認めなかつたことは評価できる。

自然流産胎児の解析で、染色体異常をもつ流産胎児の母親において、MTHFR 遺伝子多型の有意差が観察できたことは興味深い。本研究は基礎的なものであり、まだ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、患者および家族等が先天異常・出生前診断を理解する助けとなる情報提供を心がけた。依然として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いが、神経管閉鎖障害のみならず、流産予防の見地からも有用性があることをふまえ、葉酸摂取啓蒙活動の推進をおし進める必要がある。そのためにも有用な基礎データであると考えらる。

臨床的有用性の証明には、葉酸を予防的に投与された症例の長期的な大規模追跡調査が必須であろう。

### F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tsukishiro S, Li QY, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Paternal uniparental disomy of chromosome 14 and unique exchange of chromosome 7 in cases of spontaneous abortion. J. Hum. Genet. (in press)

Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Parental origin and cell stage of nondisjunction of double trisomy in spontaneous abortion. Congen. Anom. (in press)

### 2. 学会発表

月城沙美, 李 青英, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木 薫, 孫田信一: マイクロサテライト多型解析により染色体の微細欠失が示唆される自然流産. 日本産婦

人科学会 (東京) 2004. 4. 11.

Suzumori K, Kondo Y, Tsukishiro S, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Sonta S: Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion. Inter-national Congress on Prenatal Diagnosis and Therapy (Budapest, Hungary) 2004. 6. 25.

孫田信一, 中川千玲, 李 青英, 月城沙美, 千葉喜英, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木 薫: 典型的な染色体異常を伴わない自然流産における染色体構成異常及びエピジェネティックな異常の関与. 日本人類遺伝学会 (東京) 2004. 10. 13.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

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

本研究で行った協力者への“説明と同意”の実効性を評価するために、協力者 89 名に対して郵送によるアンケート調査を行い 42 名（47%）より有効回答を得た。研究説明の理解度では、“大体判った”以上が 29 名（69%）であり、“あまり判らなかつた”以下の不十分な理解が 13 名（31%）であった。不十分な理解の群の協力理由（複数回答を含め計 14 件）は、“医学の発展のため” 8 件、“あまり深く考えなかつた” 2 件、“通院している病院なので断りにくかつた” 1 件、その他 3 件であった。対象が母親のみであったことについては、“抵抗なかつた” 23 名（55%）、“母親だけはおかしい” 6 名（14%）、“やはり自分に責任があると感じた” 10 名（24%）であった。本調査から、多数でないにしても、不十分な理解での研究協力や、協力にまつわる不安感の存在が示唆された。研究協力要請にあたっては、わかりやすい説明と協力の任意性の保証、並びに協力者への重大な不利益や不安を回避すべく、少なくとも研究推進に利害関係のない機関（倫理委員会等）による事前の検討が欠かせないと思われる。

A. 研究目的

ダウン症出産経験のある 89 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。このような基礎的研究への協力にあたって行った“説明と同意”がどの程度実効性があつたのかを評価するために協力者にアンケート調査を行った。

B. 研究方法

外来健診時に書式（倫理委員会承認）を用いて協力要請し同意を得た 89 名に対して郵送によるアンケート調査を行った。アンケートの内容は、1）研究内容説明の理解しやすさについて、2）不十分な理解での協力者がそれでも協力をした理由、3）母親のみを対象としていたことから受けた印象、とした。



## C. 研究結果

42名(47%)より有効回答を得た。研究説明の理解度では、“大体判った”以上が29名(69%)であり、“あまり判らなかつた”以下の不十分な理解が13名(31%)であった。不十分な理解の群の協力理由(複数回答を含め計14件)は、“医学の発展のため”8件、“あまり深く考えなかつた”2件、“通院している病院なので断りにくかつた”1件、その他3件であった。対象が母親のみにであったことについては、“抵抗なかつた”23名(55%)、“母親だけはおかしい”6名(14%)、“やはり自分に責任があると感じた”10名(24%)であった。

## D. 考察

本調査から、多数でないにしても、不十分な理解での研究協力や、協力にまつわる不安感の存在が示唆された。研究協力要請にあたっては、わかりやすい説明と協力の任意性の保証、並びに協力者への重大な不利益や不安を回避すべく、少なくとも研究推進に利害関係のない機関(倫理委員会等)による事前の検討が欠かせないと思われる。

## E. 結論

基礎的研究の推進にあたっては、研究推進に利害関係のない機関(倫理委員会等)による事前の慎重な検討が必須である。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

発表準備中。

### 2. 学会発表

志田裕子、大橋博文、大橋裕子、鈴木正二、坂下英明：ダウン症児の母親を対象とした基礎研究協力の説明と同意：アンケート調査による実効性の評価。平成17年度日本カウンセリング学会で発表予定。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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染色体構成及び  
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、遺伝子異常及び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。本年度は引き続いて、トリソミーなど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（胎児）とそれを有する女性由来の細胞を多数集積した。これら各症例の染色体構成を詳細に解析し、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する調査のための基礎的な染色体情報を提供した。染色体異常を反復する母親のマイクロサテライト多型解析を実施して、特定の多型あるいは微細欠失等の関与を調査した。さらに、神経管形成異常等において片親性ダイソミーの関与を調査した。

A. 研究目的

分担研究課題では、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に関連する研究を進めるために、これらの異常を有する症例とその両親、及び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、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ことを目的に、研究を継続した。

B. 研究方法・対象

今年度は以下の方法と対象で研究を実施した。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両親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。③これら全症例についてバンド法を用いて詳細に染色体解析を行った。④染色体異常を有する自然流産と染色体異常を示さない流産、及びその母親と葉酸関連酵素群遺伝子多型との関連を他の研究者と共同で調査した。⑤de novo 染色体構造異常等の切断点遺伝子と神経管形成異常及び反復自然流産との関連について検討した。

（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：今年度は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 25 症例とその両親（家族）由来の細胞を集積した。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。一方、自然流産では約半数が各種のトリソミー（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 モノソミーなどを有していた。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：染色体異常症例等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、我々はその染色体構成を調査した。遺伝子多型の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症例から共通する切断点の情報収集を試みた。de novo 均衡型転座を有する症例はロバートソン型転座以外には認められなかった。また、マイクロサテライト多型解析の結果、X 染色体の微細欠失と思われる症例を 3 例発見した。この微細欠失のサイズとそこに含まれる遺伝子の検索を実施している。

#### D. 考察

遺伝子多型には人種等により偏りがあり、日本人における葉酸代謝関連の酵素群遺伝

子の多型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り、その関係が明らかになるものと思われる。

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。マイクロサテライト多型などを用いて、通常の解析法では見つからない微細欠失等の有無を調査した結果、X 染色体の 3 箇所と常染色体の 2 箇所に微細欠失と考えられる症例を発見した。

#### 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て解析した。今後これらの研究を進めて、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との関係が明らかにできる。

（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、名古屋市立大学大学院医学研究科、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

Tsukishiro S, Li QY, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Paternal uniparental disomy of chromosome 14 and unique exchange of chromosome 7 in cases of spontaneous abortion. *J. Hum. Genet.* (in press)

Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Parental origin and cell stage of nondisjunction of double trisomy in spontaneous abortion. *Congen. Anom.* 45:27-32, 2005.

##### 2. 学会発表

月城沙美, 李 青英, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木 薫, 孫田信一: マイクロサテライト多型解析により染色体の微細欠失が示唆される自然流産. 日本産婦人科学会 (東京) 2004. 4. 11.

Suzumori K, Kondo Y, Tsukishiro S, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Sonta S: Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion. *Inter-*

*national Congress on Prenatal Diagnosis and Therapy* (Budapest, Hungary) 2004. 6. 25.

孫田信一, 中川千玲, 李 青英, 小野教夫, 月城沙美, 千葉喜英, 種村光代, 鈴木 薫: 典型的な染色体異常を伴わない自然流産における染色体構造異常及びエピジェネティックな異常の関与 (シンポジウム). 日本先天異常学会 (佐賀) 2004. 7. 15.

水野誠司, 田中修一, 新見教弘, 加藤純爾, 飯尾賢治, 長屋昌宏, 孫田信一: 四倍体 (92, XXYY) の生産児例. 日本先天異常学会 (佐賀) 2004. 7. 16.

孫田信一, 中川千玲, 李 青英, 月城沙美, 千葉喜英, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木 薫: 典型的な染色体異常を伴わない自然流産における染色体構成異常及びエピジェネティックな異常の関与. 日本人類遺伝学会 (東京) 2004. 10. 13.

孫田信一, 李 青英, 月城沙美, 中川千玲, 鈴木 薫: 片親性ダイソミーの発生機序に関する検討. 染色体学会 (岡山) 2004. 11. 3.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

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

昨年度までに、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た。検討した遺伝子多型はすべて、葉酸代謝関連酵素である。昨年までに、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)の C677T 多型、A1298C 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)遺伝子多型の 5 種類を解析した。本年度は、流産胎児の母親を対象としてこれらの遺伝子多型の関与を検討した。流産胎児の内訳は染色体異常を検出した流産胎児 20 例、通常の方法では遺伝子異常を検出できなかった 20 例を解析した。その結果、染色体異常をもつ流産胎児の母親は MTHFR 677T アレルの頻度が有意に高い事がわかった。

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よくわかっていない。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 の前駆体合成に必須のビタミンである。これまでの *in vivo* および *in vitro* の研究によると、葉酸の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お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に基づき 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 C677T のうち 677T 遺伝子型頻度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。さらに、Bosco et al. (2003)は、シシリー島の集団で、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。16年度は主に、流産胎児の母親について検討した。

## 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。昨年までに、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)のC677T多型、A1298C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PEAT回数の多型(2回または3回)、Methionine synthase (MTR)のA2756G多型の5種類を解析した。16年度は、流産胎児の母親40名から、研究への同意を得て、上記の5種類の遺伝子多型を解析した。流産胎児自体の解析も併せて行った。流産胎児の染色体解析結果は20検体で染色体異常を検出、残りの20検体は正常核型であった。染色体異常の内訳は、45,Xが5例、ダウン症などトリソミーが9例、Triploidyが4例、Tetraploidyが2例であった。

## C. 研究結果

流産胎児のうち、染色体異常検出例と非検出例をそれぞれ、対照群と比較し、Chi-square検定を行った。その結果、染色体異常を検出した流産胎児との比較で、MTHFR C677T多型頻度の有意差を検出した。具体的にはCC vs CT+TT ( $p=0.0190$ )、アレル ( $p=0.0096$ ) で有意にCT+TT遺伝子型、Tアレルの頻度が高かった。染色体異常非検出例および流産胎児の多型頻度に有意差は認められなかった。

## D. 考察

染色体解析結果が判明している流産胎児例の収集は難しく、今回の解析でも合計40例と検体数としては少ない。しかし、研究目的で述べたように、葉酸の欠乏状態では染色体異常がおこる可能性が指摘されている。これまでもMTHFR 677Tアレルは葉酸欠乏状態との関連が指摘されているため、今回の結果は、この仮説と合致する。今後、症例を増やして解析する必要はあるが、興味深い結果と言って良いだろう。

## E. 結論

葉酸代謝関連酵素遺伝子多型のうち、慢性欠乏状態との関連が指摘されているMTHFR C677T多型の677Tアレルが、染色体異常をもった流産胎児の母親に有意に多く、染色体異常発生との関連の可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

1. Ohmori H, Ando Y, Makita Y, Onouchi Y, Nakajima T, Saraiva MJM, Terazaki H, Suhr O, Sobue G, Nakamura M, Yamaizumi M, Munar-Ques M, Inoue I, Uchino M, Hata A. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. J Med Genet, 41, e51, 2004
2. Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Hirayama E, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K. A1166C variant of angiotensinogen II type 1 receptor

- gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet*, 49, 182-186, 2004
3. Onouchi Y, Onoue S, Tamari M, Wakui K, Fukushima Y, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H, Kishi F, Ouchi K, Terai M, Hamamoto K, Kudo F, Aotsuka H, Sato Y, Nariai A, Kaburagi Y, Miura M, Saji T, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A. CD40 ligand gene and Kawasaki disease. *Eur J Hum Genet*, 12, 1062-1068, 2004
4. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y. Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet*, 49, 664-668, 2004
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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。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 20 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実施した。しかし、症例数がまだ少ないためか多型頻度の有意差は明らかでなかった。また、これまでに集積してきた自然流産症例（染色体異常を検出できた 20 例、検出できなかった 20 例の合計 40 例の流産絨毛とその母親の検体）についても、葉酸関連酵素群遺伝子の多型について検討した。染色体異常をもつ流産胎児の母親を対照の母親と比較したところ、MTHFR の 677T アレルの頻度が有意に高いことが分かった。他の遺伝子多型、および染色体異常を検出できなかった流産胎児の母親では有意な差を検出できなかった。流産絨毛 DNA の解析でも特に有意な差は検出されなかった。677T アレルはホモシステインの高値とも関連しているため、染色体異常発生に関与している可能性がある。なお、追跡調査を継続してきた、神経管閉鎖障害の分娩既往母体の症例のうち、すでに葉酸内服を開始して、現在までに分娩に至った 6 症例の全例が健児を得ている。全国的にみれば葉酸の予防的投与はまだ十分に普及していないが、染色体異常流産の予防的効果の可能性も含めて教育・啓蒙活動をすすめてゆくことで、一般にもその有用性が浸透して実施効果が上がる可能性があると思われる。

A. 研究目的

近年の画像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。

特に本年度はこれまでに集積した自然流産症例に焦点をあてて、染色体異常群と染色体正常群に分けて、その母児の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型について検討する。

## 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。神経管欠損症患児（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、および原因不明自然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**

葉酸代謝関連酵素の遺伝子多型分析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**

当施設では臨床遺伝医療部を設けており、先天異常児の出生に関する相談、遺伝カウンセリングに対応している。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については、分娩まで追跡調査を行う。

**\* 教育・啓蒙活動**

分担研究者大橋に依頼して、第8回中部出生前医療研究会（平成17年2月5日、名古屋市）の特別講演（一般公開講座）において研究成果の一部、とくに葉酸の有用性について報告した。

## C. 研究結果

これまでに集積した症例のうち、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20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、羽田に依頼して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実施した。しかし、まだ症例数が少ないこともあり、健常児を分娩したコントロール群の母親の結果との間には多型頻度の有意差は認めなかった。なお、1 例を除き、これらの母体の血中の葉酸値は正常範囲であった。

これまでに集積した自然流産症例については、孫田に染色体分析を依頼して、染色体異常群 20 例と染色体正常群 20 例に分け、羽田に送付してその母児の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型について検討した。その結果、コントロール群と染色体異常を検出した流産胎児の母親との比較で、MTHFR C677T 多型頻度の有意差が確認された。しかし、流産胎児の多型頻度には有意差は認められなかった。

当施設では、追跡調査継続中の症例のうち、神経管閉鎖障害分娩既往のある 6 例の妊婦が、次の妊娠前より葉酸 (2.5~5mg) を内服して現在までに分娩に至り、全例で健児を得た。

#### D. 考察 および E. 結論

神経管閉鎖障害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。しかし、以前から追跡調査を継続してきて本年度までに分娩となった神経管閉鎖障害の分娩既往母体のうち、予防的投与群の症例からは、再発例は認めなかったことは評価できる。まだ妊娠・分娩に至っていない症例についても、全例で次妊娠前からの葉酸の予防的内服を希望されている。

染色体異常流産群で MTHFR C677T 多型頻

度の有意差が認められたことは新しい知見である。当院で以前に染色体異常の有無を分類せずに自然流産例での多型解析を試みた際には、明らかな有意差は確認されなかったため、今回の結果は、葉酸不足の状態により染色体異常流産が起きる可能性を示唆するものと思われる。

全国的には葉酸の予防的投与を行っている施設はまだ少ない。流産への関与も考慮して一般に啓蒙すれば、予防的な葉酸内服が広く普及して、その結果として、流産も神経管閉鎖障害の発生も抑制される可能性があると思われた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

種村光代；胎児染色体異常の診断およびスクリーニング. 小児科診療 67(2), 45-49, 2004.

Yuko Kondo, Sami Tsukishiro, Mitsuyo Tanemura, Mayumi Sugiura-Ogasawara, Kaoru Suzumori, Sinichi Sonta ; Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion. J Hum Genet 49, 177-181, 2004

##### 2. 学会発表

月城沙美、種村光代、杉浦真弓、松田義雄、鈴森薫、孫田信一；第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会 (4 月 10 日-13 日、東京)。染色体の微細欠失を有する自然流産  
種村光代；第 22 回日本染色体遺伝子検査学会総会 (11 月 5~6 日、名古屋)。市民公開セミナー1 妊婦さんに知って欲しい染色体や遺伝子の話

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S	Parental origin and cell stage of nondisjunction of double trisomy in spontaneous abortion.	Congen. Anom.	45	27-32	2005
Tsukishiro S, Li QY, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S	Paternal uniparental disomy of chromosome 14 and unique exchange of chromosome 7 in cases of spontaneous abortion.	J. Hum. Genet.			in press
Miyake N, Harada N, Shimokawa O, Ohashi H, Kurosawa K, Matsumoto T, Fukushima Y, Nagai T, Shotelersuk V, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N	On the reported 8p22-p23.1 duplication in Kabuki make-up syndrome (KMS) and its absence in patients with typical KMS	Am J Med Genet	A128(2)	170-2	2004
Akahoshi K, Ohashi H, Hattori Y, Saitoh S, Fukushima Y, Wada T	A woman with 46,XX,dup(16)(p13.11 p13.3) and the ATR-X phenotype	Am J Med Genet	A132(4)	414-8	2005
Ohmori H, Ando Y, Makita Y, Onouchi Y, Nakajima T, Saraiva MJM, Terazaki H, Suhr O, Sobue G, Nakamura M, Yamaizumi M, Munar-Ques M, Inoue I, Uchino M, Hata A	Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy	J Med Genet	41	e51	2004
Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Hirayama E, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K	All66C variant of angiotensinogen II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene	J Hum Genet	49	182-186	2004
Onouchi Y, Onoue S, Tamari M, Wakui K, Fukushima Y, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H, Kishi F, Ouchi K, Terai M, Hamamoto K, Kudo F, Aotsuka H, Sato Y, Nariai A, Kaburagi Y, Miura M, Saji T, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A	CD40 ligand gene and Kawasaki disease	Eur J Hum Genet	12	1062-1068	2004
Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y	Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease	J Hum Genet	49	664-668	2004
種村光代	胎児染色体異常の診断およびスクリーニング	小児科診療	67	209-213	2004

**ORIGINAL ARTICLE****Parental origin and cell stage of non-disjunction of double trisomy in spontaneous abortion**

Qing Ying Li<sup>1</sup>, Sami Tsukishiro<sup>1</sup>, Chiaki Nakagawa<sup>2</sup>, Mitsuyo Tanemura<sup>1</sup>, Mayumi Sugiura<sup>1</sup>, Kaoru Suzumori<sup>1</sup>, and Shin-ichi Sonta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University Medical School, Nagoya and <sup>2</sup>Department of Genetics, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, Kasugai, Japan

**ABSTRACT** Using polymorphic analysis of microsatellites, we investigated the parental origin and mechanism of double trisomies seen in cases of spontaneous abortion. We obtained chorionic villi from spontaneous abortions, and peripheral blood from females who experienced abortion and their spouses. Chromosomal analysis of 170 cases revealed four cases with double trisomy. The karyotypes of these cases are 48,XX,+16,+22, 48,XXY,+18, 48,XX,+15,+21 and 48,XX,+2,+5. In the present study, the incidence of double trisomy was 2.4% of spontaneous abortions. Polymorphic analysis of microsatellites indicated that extra chromosomes were all of maternal origin in the four cases of double trisomy. The predominance of maternal origin in cases of double trisomy is similar to cases of single trisomy. The result also indicated that both extra chromosomes in two cases occurred by non-disjunction at the first meiotic division, and extra chromosomes in the other two cases occurred by non-disjunction at the first mitotic division. The mean maternal age in cases of double trisomy was significantly higher than that in cases of single trisomy. These findings suggest the possibility that abnormal separation of two or more chromosomes may occur simultaneously in oogenesis, and that this phenomenon may increase in relation to the increase in age of women.

**Key Words:** double trisomy, microsatellite, non-disjunction, origin, spontaneous abortion

**INTRODUCTION**

Chromosomal aneuploidy is one of the major causes of pregnancy wastage. About a half of spontaneous abortions before 15 weeks of gestation have chromosomal abnormalities. Around 50% of these abnormalities are aneuploidies (Hassold *et al.* 1980). Most of them are single trisomy for various chromosomes; double trisomies are rarely observed in cases of spontaneous abortion (Creasy *et al.* 1976; Hassold *et al.* 1980; Kajii *et al.* 1980; Eiben *et al.* 1990; Reddy 1997).

Following the development of reproductive diagnosis in humans and methods for tissue culture, the detectable probability of double trisomy among successfully karyotyped cases of spontaneous abortion may increase (Reddy 1997). Recently, polymorphic DNA markers have been used to investigate the parental origin of extra chromosomes and the stages at which the extra chromosomes occurred in cases of spontaneous abortion with trisomy. These studies have indicated that the majority of extra chromosomes in cases of single trisomy are maternal in origin. Advanced maternal age remains the only well-documented risk factor in non-disjunction (Epstein 1986). On the other hand, few data are available to investigate the genetic mechanisms of double trisomy (Zaragoza *et al.* 1994; Park *et al.* 1995; Devriendt *et al.* 1998; Chen *et al.* 2000). In the present study, polymorphic analysis of microsatellites was performed to ascertain the parental origin and genetic mechanisms of the extra chromosomes of double trisomies found in four cases of spontaneous abortions.

**MATERIALS AND METHODS****Cases of abortions analyzed**

We obtained information from 174 cases of spontaneous abortion from patients admitted to the Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University School of Medicine, Nagoya, Japan, and from Cell Bank, constructed

Correspondence: Shin-ichi Sonta, PhD, Department of Genetics, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, 713-8 Kamiyacho, Kasugai, Aichi 480-0392, Japan. Email: ssonta@inst-hsc.jp

Received September 10, 2004; revised and accepted November 22, 2004.