

マイクロアレイCGH法の結果については、ご希望がありましたら検体採取後約半年以内の予定で開示いたします。

17. 遺伝カウンセリングについて

本研究で得られた遺伝学的な解析結果を開示するときなど、ご希望がありましたら遺伝カウンセリングを受けることも可能です。遺伝カウンセリングは遺伝診療科の専門医が担当します。

18. 研究へのご協力について

この研究へ協力するかどうかは、あなた方の自由な意思で決めることができます。協力されると決められた場合は同意書に署名していただきます。もちろん協力されない場合でも、その後の診療で不利益を受けることはありません。また、一旦同意した後でも、いつでも途中で同意を取り消すことができます。その場合は、お渡しする書式「検体の（使用，保存）についての中止請求」に署名のうえ、担当者にお渡しいただければ、迅速に処理し、以後の研究には使用いたしません。また研究期間内であればすべての試料は直ちに破棄させていただきます。ただし、同意を取り消した時にすでに研究結果が論文などで公表されていた場合は、取り下げることができない場合もあります。

なお、ご希望があればいつでも研究計画書の内容を見ることができます。また遺伝学的検査に関する資料が必要な場合は用意いたします。

以上の点をご理解いただいた上、研究へのご協力をお願い申し上げます。

平成 ____年 ____月 ____日

説明者 国立成育医療センター 周産期診療部

(自著)

職名 _____

氏名 _____

なお、この研究に対するご質問は、以下にお願いします。

国立成育医療センター 周産期診療部不育診療科医長 小澤伸晃

157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

電話：03-3416-0181

FAX: 03-3416-2222

研究（流死産組織の解析）への同意文書

国立成育医療センター 総長 殿

私たちは、「流死産に対するCGHマイクロアレイ法を用いた微細染色体異常の探索」研究における、流死産組織の解析について、以下の項目について十分説明を受け理解しました。また、本研究の同意はいつでも撤回でき、撤回した場合でも何ら不利益な扱いを受けないことなどを確認しました。

下記の項目の中で理解できたものにチェックしてください。

(□の中に レを付けてください)。

- 研究の目的
- 対象、期間、組織
- 研究の概要
- 研究で協力して頂きたいこと（流死産検体について）
- 研究に協力することの利益および不利益
- プライバシー（個人情報）は保護されること
- 実際の解析は他施設で行われること
- 研究終了後の試料等の取扱い方針
- 研究成果が学術論文や学術学会で公表されること
- 研究から生じる知的財産権の帰属について
- 費用負担がないこと
- 希望すれば結果の開示を受けられること
- 遺伝カウンセリングの体制について
- 協力の同意はいつでも撤回できること
- 研究計画書等をみるのが可能なこと

1. 私たちは、自らの自由意思により本研究に協力することに同意します。

・はい ・いいえ

2. 私たちは、研究終了後に流死産検体や抽出したゲノムDNAが保存されることに同意します。

・はい ・いいえ

3. 私たちは、流死産検体に対する解析結果の開示を希望します。

・はい ・いいえ

平成_____年_____月_____日

患者様の氏名 _____

(自著)

平成_____年_____月_____日

配偶者の氏名 _____

(自著)

説明者

国立成育医療センター 周産期診療部

(自著)

職名 _____

氏名 _____

研究（ご夫婦の検査）への同意文書

国立成育医療センター 総長 殿

私たちは、「流死産に対するCGHマイクロアレイ法を用いた微細染色体異常の探索」研究における、ご夫婦の検査について、以下の項目について十分説明を受け理解しました。また、本研究の同意はいつでも撤回でき、撤回した場合でも何ら不利益な扱いを受けないことなどを確認しました。

下記の項目の中で理解できたものにチェックしてください。

（□の中に レを付けてください）。

- 研究の目的
- 対象、期間、組織
- 研究の概要
- 研究で協力して頂きたいこと（ご夫婦の検査について）
- 研究に協力することの利益および不利益
- プライバシー（個人情報）は保護されること
- 実際の解析は他施設で行われること
- 研究終了後の試料等の取扱い方針
- 研究成果が学術論文や学術学会で公表されること
- 研究から生じる知的財産権の帰属について
- 費用負担がないこと
- 希望すれば結果の開示を受けられること
- 遺伝カウンセリングの体制について
- 協力の同意はいつでも撤回できること
- 研究計画書等を見ることが可能なこと

1. 私たちは、自らの自由意思により本研究に協力することに同意します。

・はい ・いいえ

2. 私たちは、研究終了後に血液検体から抽出したゲノムDNAが保存されることに同意します。

・はい ・いいえ

3. 私たちは、私たちの血液検体に対する解析結果の開示を希望します。

・はい ・いいえ

平成____年____月____日

患者様の氏名 _____

(自著)

平成____年____月____日

配偶者の氏名 _____

(自著)

説明者 国立成育医療センター 周産期診療部

(自著)

職名 _____

氏名 _____

II. 分担研究報告

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合事業）

分担研究報告書

アレイCGH法による流死産の原因解明と不育症に対する治療戦略の確立

流死産の遺伝学的解明を目的としたアレイCGH法の開発

分担研究者 井本 逸勢 東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授

分担研究者 小澤 伸晃 国立成育医療センター 周産期診療部 医長

研究要旨

遺伝学的機序による流死産の病態の全容を解明するために、染色体を作成することなく、流産検体から抽出したゲノムDNAを用いて潜在的なゲノムコピー数異常を網羅的・体系的に解析できるアレイCGH法を開発し導入した。本法は従来の染色体分析法を補完する精度を有すると同時に、従来の染色体分析で検出不能な潜在的異常の検出に関しても解析が可能となることが明らかになり、遺伝学的機序による流死産の病態をより詳細に明らかにできることが示唆された。

A. 研究目的

流死産の病態における遺伝学的機序の関与に関してより詳細かつ正確な解析を行うために、分担研究者らが開発、自作したbacterial artificial chromosome (BAC)アレイを用いたアレイ comparative genomic hybridization (CGH)法が有用であるかどうか検討した。

B. 研究方法

BACアレイCGH法には、主に東京医科歯科大学で開発、自作された遺伝疾患解析用のターゲットアレイ「MCG Genome Disorder Array Ver.1」（561クローン）をベースに改良を加えた「MCG Genome Disorder Array Ver.2」（550クローン）を用いた。本アレイは31のゲノムコピー数異常が知られる既知の遺伝性疾患の責任

領域ならびに全染色体のサブテロメア領域をカバーするBACクローンからアダプターPCR法により調整されたDNAが、各々三箇所ずつスライドガラス上にインクジェット方式のスポッターによりスポットされている。検体DNAは、従来の染色体分析により性の判別しているものは性を一致させたコントロールDNAを対照に、不明なものは男性のコントロールDNAを対照にして、それぞれ異なる色素で蛍光ラベルして、Cot-1とともに混合し、半自動ハイブリダイゼーション機（Hybrimaster HS-300、ALOKA社）を用いてアレイに対してハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後のスライドガラスは、GenePix4000Bスキャナー（Axon社）を用いて画像として取り込み、GenePix6.0ソフトウェアにより、蛍光強度比に変換し解析を行った（図1）。必要な症例（モザ

イクが疑われる症例や微細コピー数異常が疑われる症例)についてはdye-swapによる確認を追加して行った。本法はこれまで先天異常児や腫瘍の原因検索や疾患遺伝子の同定に応用され、成果を挙げている。

「MCG Genome Disorder Array Ver.2」アレイにより潜在的ゲノムコピー数異常が検出された例、あるいは全く異常が検出されないが習慣性流産例など既往歴や病理学的所見から遺伝的要因が強く疑われる例に対しては、より網羅的なゲノムワイドのコピー数異常を検出する目的で、全ゲノムを平均0.7Mb間隔でカバーするスクリーニング用の「MCG Whole Genome Array-4500」をさらに施行した。必要な症例(モザイクが疑われる症例や微細コピー数異常が疑われる症例)についてはdye-swapによる確認を追加して行った。

C. 研究結果

1) 「MCG Genome Disorder Array Ver.2」を用いた解析

図2~5に実際の解析結果の例を示す。図2は、染色体検査では正常男性核型を示した症例のアレイCGHの結果で、コントロールとしては正常男性のDNAが用いられている。全染色体にわたって蛍光強度比に過不足が認められず、アレイCGH法によっても異常が認められなかったことがわかる。図3は流産でもっとも高頻度に遭遇するトリソミー症例(49, XY, +7, +21, +22)の例である。コントロールに比べて、7番、21番、22番のBACクローンの部位でコピー数の過剰が検体側で認められており、アレイCGH法によっても7、21、22トリソミーであることが確かめられた。図4は親が転座保因者で流産絨毛に不均衡型の構造異常が染色体分析で認められた症例である(46, XY, der(6)t(6;7)(q25.1;p21))。アレイ

CGH法によっても6q末端の欠失、7p末端の過剰が確認され、構造異常であることが診断可能であった。図5は染色体検査では異常が認められなかった症例であるが(46, XY)、アレイCGH法によって微細な染色体異常が疑われた。

2) 「MCG Whole Genome Array-4500」を用いた解析

染色体検査ならびにGenome Disorder Arrayで正常を示した症例について、「MCG Whole Genome Array-4500」を用いた解析を現在行っている。

D. 考察

今回、分担研究者らが開発した「MCG Genome Disorder Array Ver.2」(550クローン)により、絨毛細胞から抽出したDNAを用いた検索を行ったが、染色体検査結果を追試することが可能であった。したがって、本法は流産の遺伝学的検索にも有用であると考えられる。

また、通常の染色体検索では検出不可能であった微細なコピー数異常も検出されたことより、異常領域の詳細なマッピングを通じて遺伝学的機序による流産の病態解明が将来可能になるとも考えられる。

一方、「MCG Whole Genome Array-4500」でも異常が検出されない症例に対しては、より微細なゲノム構造異常あるいはエピゲノム異常などの関与について今後検索すべきであると考えられる。

E. 結論

分担研究者らが開発したBACアレイを用いたアレイCGH法は、流産検体の遺伝学的検索に対しても応用可能であり、今後流産の遺伝学的原因を詳細に検索する手段として適用していく

ことにより、流死産の遺伝学的期序が解明されることが期待される。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

「アレイCGH診断活用ガイドブック 12. 流死産物を試料とした解析」(医薬ジャーナル社 2008. 2. 15)

「22q13 Microduplication in two patients with common clinical manifestations: a recognizable syndrome?」(Okamoto N, Imoto I, et al, Am J Med Genet A. 143(23):2804-9, 2007)

「Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer.」(Kikuchi R, Imoto I, et al, Cancer Res. 67(15):7095-105, 2007)

「Fortuitous detection of a submicroscopic deletion at 1q25 in a girl with Cornelia-de Lange syndrome carrying t(5;13)(p13.1;q12.1) by array-based comparative genomic hybridization」

(Hayashi S, Imoto I, et al, Am J Med Genet A. 143(11):1191-7, 2007)

「Construction of a high-density and high-

resolution human chromosome X array for comparative genomic hybridization analysis」(Hayashi S, Imoto I, et al, J Hum Genet. 52(5):397-405, 2007)

「Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with non-mutational aberrations of the FMR2 gene」(Honda S, Imoto I, et al, Am J Med Genet A. 143(7):687-93, 2007)

2. 学会発表

「Cancer genomic and epigenomic analyses on BAC-array platform」(第66回日本癌学会学術総会 2007. 10. 5)

「RGC32, a novel p53-inducible tumor-suppressor gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest」(98th annual meeting of American Association for Cancer Research 2007 2007. 4. 16)

H. 知的財産件の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図1 アレイCGH法

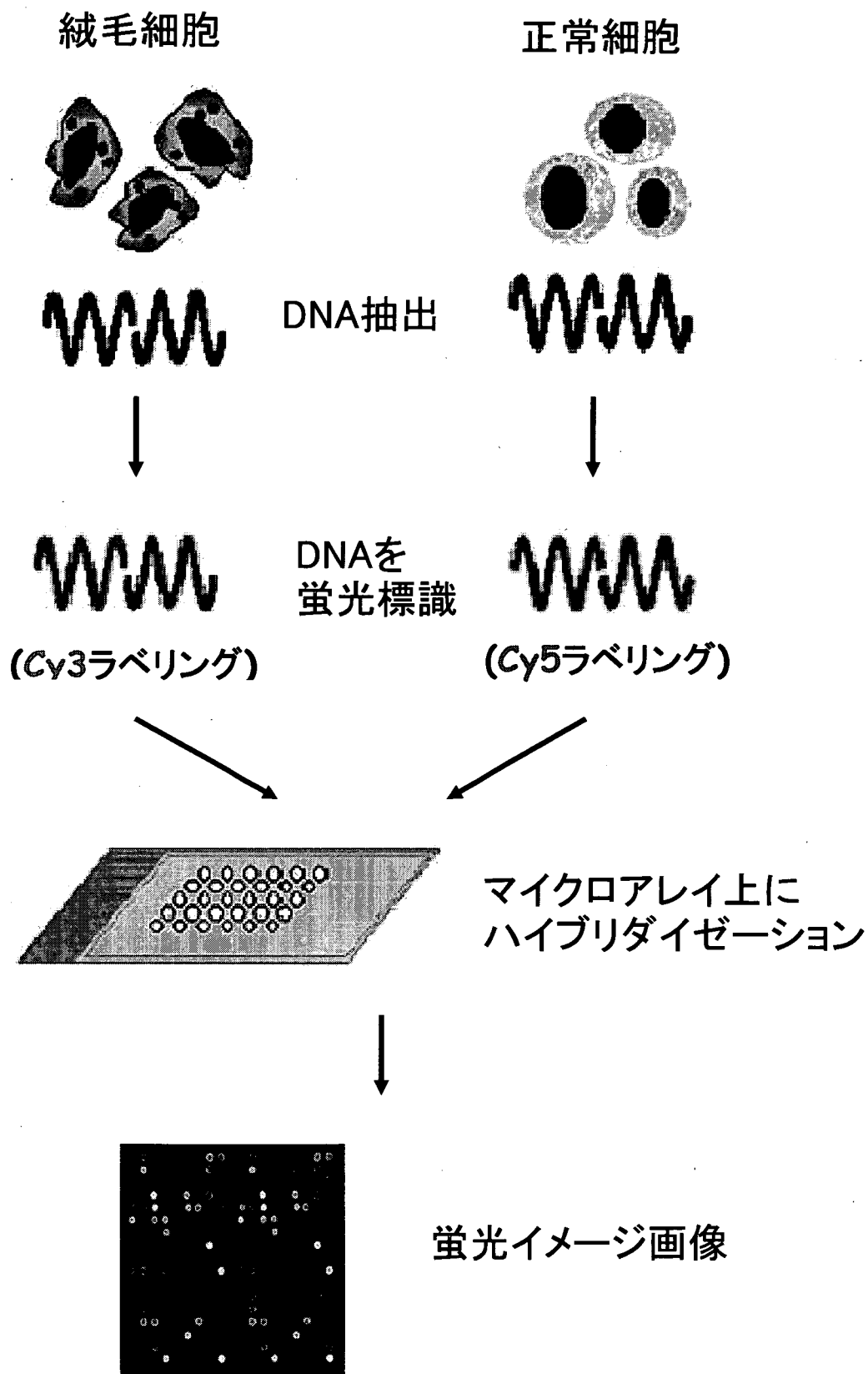


図2 正常例、染色体検査で正常核型：46, XY

Cy3/Cy5 = 流産検体/正常男性コントロール

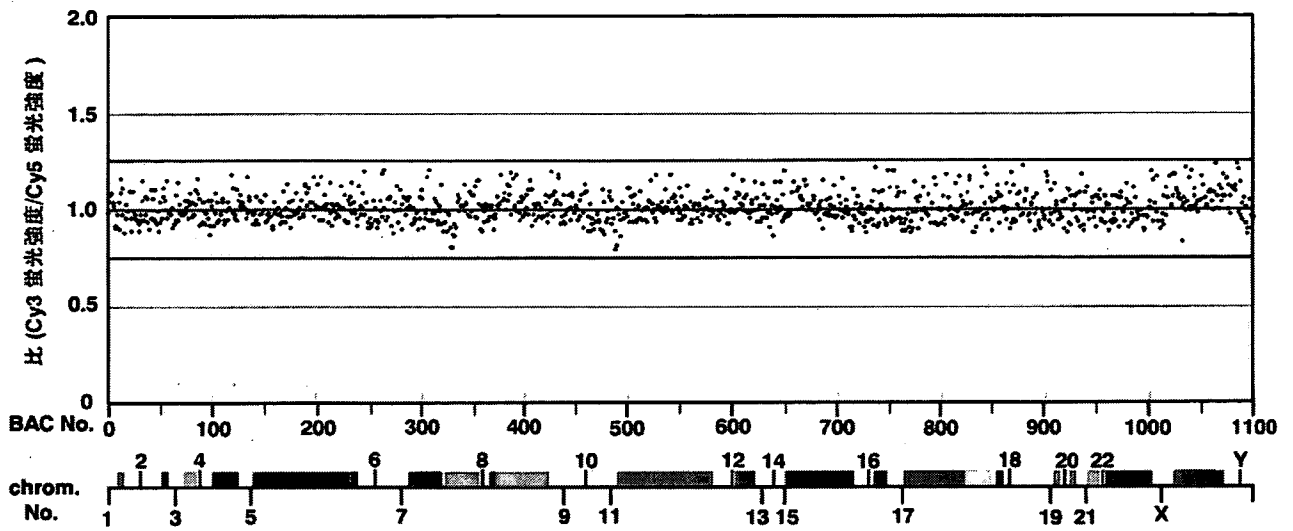


図3 トリソミー例、染色体検査でtriple trisomy：49, XY, +7, +21, +22

Cy3/Cy5 = 流産検体/正常男性コントロール

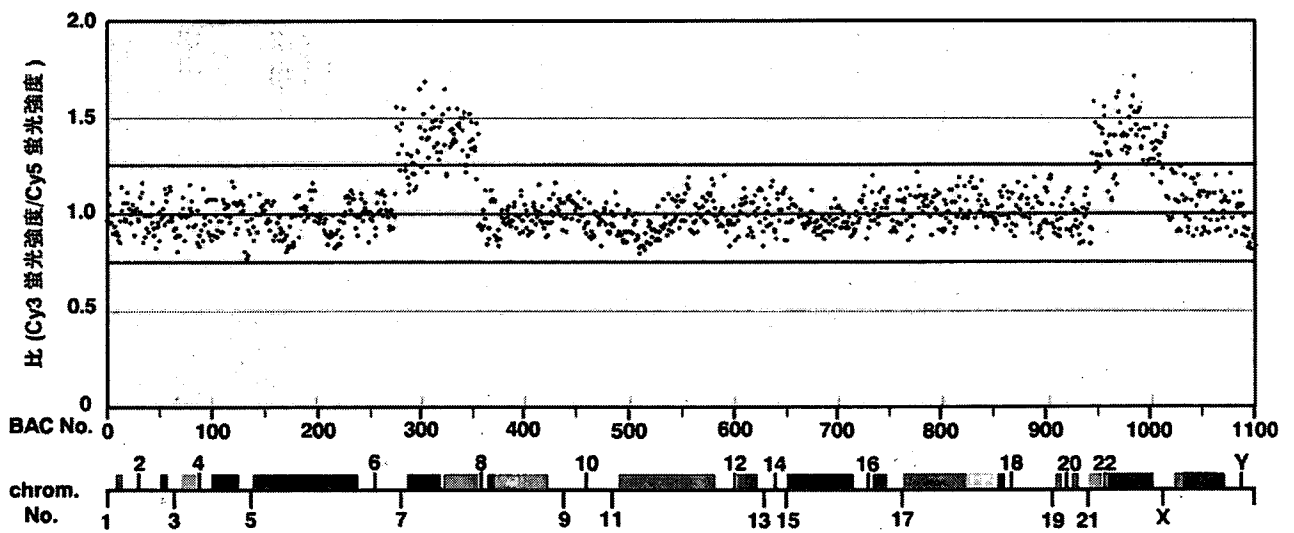


図4 構造異常例、染色体検査で不均衡型転座：46, XY, der(6)t(6;7)(q25.1;p21)

Cy3/Cy5 = 流産検体/正常男性コントロール

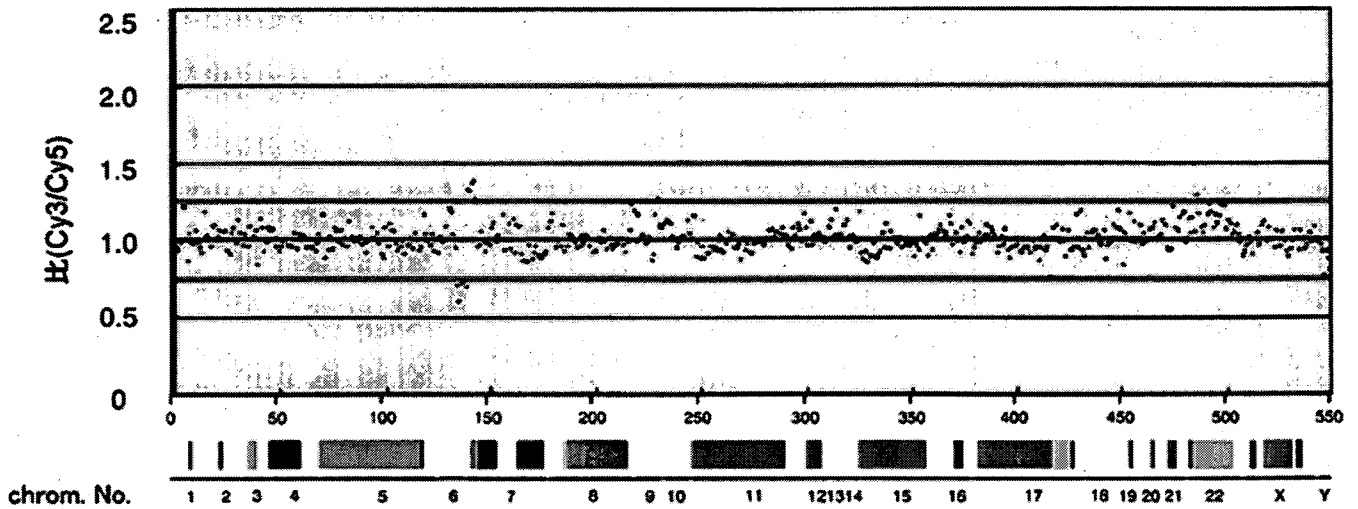
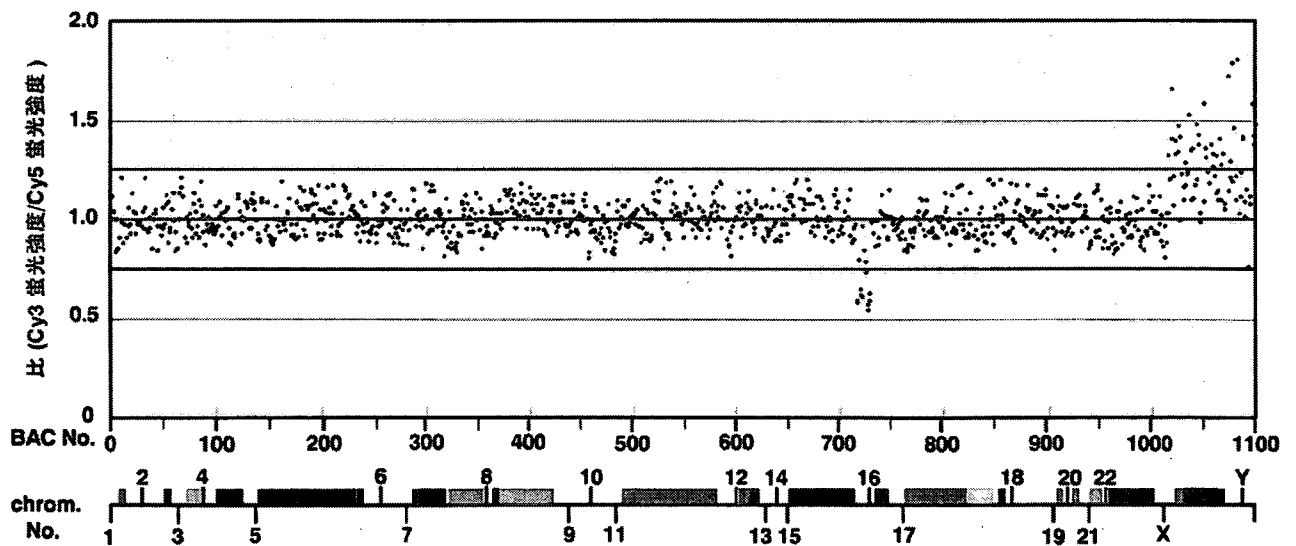


図5 微細異常例、染色体検査で正常核型：46, XY

Cy3/Cy5 = 流産検体/正常男性コントロール



厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合事業）

分担研究報告書

アレイCGH法による流死産の原因解明と不育症に対する治療戦略の確立

医療者に対する着床前診断に関するアンケート

主任研究者	井原 規公	国立成育医療センター	周産期診療部	臨床研究員
分担研究者	小澤 伸晃	国立成育医療センター	周産期診療部	医長
分担研究者	左合 治彦	国立成育医療センター	周産期診療部	医長

研究要旨

着床前診断は1990年代より体外受精の進歩とともに欧米を中心に導入された生殖医療技術で、体外受精の際に遺伝子疾患あるいは染色体異常児の有無を胚移植の前に確認して、遺伝学的正常胚の妊娠を目指すものである。我が国でも重篤な遺伝子疾患、染色体異常を伴う不育症患者カップルに対して適応が承認されている。アレイCGH法による流死産の遺伝学的検索が進んだ場合、これまで検索が不可能であった遺伝学的異常についても解明されるため、着床前診断の適応となる症例が増えていくことが予想される。しかしながら、今回の成育医療に携わる医療スタッフへのアンケート結果では、着床前診断に対して否定的な見解も多くみられ、今後解決すべき課題が山積していることが窺えた。また実際の疾患小児をフォローしている小児科医とその親をフォローする産科医とでは、着床前診断や出生前診断に対する見解が若干異なっていることも明らかとなった。

A. 研究目的

本研究の主眼は流死産の原因を徹底的に解明し、その流死産を予防するための治療戦略を構築することにある。そして遺伝学的な要因が発見された場合は、根本的な治療法として着床前診断を用いたART（生殖補助医療）の可能性が考えられる。着床前診断は1990年代より体外受精の進歩とともに欧米を中心に導入された生殖医療技術で、体外受精した胚から1～2個の細胞を取り出し、遺伝学的な診断を行い、正常な胚

を子宮内に戻して妊娠させようとするものである。遺伝病の診断、転座保因者に対する不均衡型胚の診断、さらに最近では妊娠率の向上あるいは流産予防のための異数性胚のスクリーニングや性別判定などにも用いられており、すでに世界各国のPGD施行症例は5000例を越えている。日本では、1998年に日本産科婦人科学会が重篤な遺伝性疾患に対するPGDを臨床研究として承認し、症例毎に審議が行われ施行の許可が与えられて、これまでに遺伝病としてはDuchenne型

筋ジストロフィーなどに対する着床前診断が行われており、昨年には着床前診断後初の出産例も報告されている。2006年には転座保因者に対する着床前診断も承認されたため、今後施行症例が飛躍的に増加すると予想されている。

今回は将来の不育症治療としての着床前診断導入の可能性も考えて、現場の医療スタッフの意識調査を行うことを本分担研究の目的とした。

B. 研究方法

国立成育医療センターに在籍する医療スタッフを対象に現場の臨床医が実際に着床前診断をどう考えているのか意識調査を行い、今後の着床前診断の方向性について考えた。国立成育医療センターでは、小児科、産科診療など成育医療に携わるエキスパートが多数在籍している。資料に、アンケートの際に用いた質問用紙を示す。

C. 研究結果

国立成育医療センターに在籍する55名の医療スタッフより回答を頂くことができた（回収率：27.5%）。

Question 1：着床前診断（PGD）についてご存知ですか？（図1）

全体の約20%のスタッフは着床前診断に対する知識がなく、世代による差は特に認められなかったものの、女性医師また小児を専門とするスタッフにその傾向は強かった。

Question 2：PGDの是非についてはいかが考えられますか？（図2）

着床前診断の是非に関しては、約90%のスタッフが”認めるべき”という意向であったが、男性医師、高年齢層、小児専門医の方で否定的な見解を持つスタッフが多かった。

Question 3：なぜ行うべきではないとお考えで

すか？（図3）

Question 4：出生前診断が許可されて、なぜPGDが制限されるべきだとお考えですか？（図4）

否定的な見解の理由としては、胚をモノ化、選別すべきでなく棄却する権利も認められないというものが多かった。また着床前診断を否定するスタッフは出生前診断に関しても否定的な立場をとっているものが多かった。

Question 5：適応症例を制限する理由は何ですか？（図5）

Question 6：どういう場合に認められるべきだとお考えですか？（図6）

着床前診断の適応を制限する場合は、倫理的問題や安全性が未確立であることなどがその理由としては多くみられ、適応症例としては性別判定や高齢による適応は全体的に否定的であり、他の疾患に関しては、一定の傾向は認められなかった。

Question 7：PGDを推進すべきだと考える理由は何ですか？（図7）

Question 8：適応の判断が学会レベルで行われていることをどう考えますか？（図8）

着床前診断を推進する理由としては、患者自身の意思決定が重要であるとの回答が多く、適応の判断は現行の産婦人科学会だけに任せるべきではないという意見が多くみられた。

Question 9：一般に、疾患の“重篤性”を決める判断材料は何であると考えますか？（図9）

Question 10：“重篤な遺伝性疾患”としては、主にどのような疾患を思い浮かべますか？（図10）

疾患の重篤性の基準はスタッフにより異なっており、統一した見解は得られず、具体的な疾患に関してもトリソミー以外は様々な意見があるようであった。

D. 考察

着床前診断は羊水検査などの出生前診断と異なり異常児の中絶を回避することが可能である一方で、様々な未解決な問題点を抱えていることも指摘されている。例えば、技術の安全性は必ずしも確立されていないこと、自然妊娠が本来可能であるはずのカップルでも体外受精が必要となること（コストの問題、低い妊娠率、肉体的・精神的負担など）、転座保因者に対する着床前診断では自然妊娠との有用性の比較が不十分であることなどが挙げられる。また着床前診断自体が倫理的に許されるのかといった根本的な問題も存在している（胚はヒトとして捉えるべきか、異常胚の棄却が許されるのかなど）。今回の研究結果も着床前診断の有する問題点を浮き彫りすることとなり、特に男性医師、高年齢層、小児専門医の先生方においては否定的な見解が多かった。

着床前診断の適応となる症例の選択が今後重要になると思われるが、重篤性ということで基準を設けた場合は、今回の研究結果からも統一した見解を得ることは難しいとも思われた。

E. 結論

今後、流死産原因が染色体の構造異常やある種の遺伝子異常で、反復する可能性があることが判明した場合には、着床前診断がその予防のために適応となる可能性があるが、着床前診断の導入に関しては倫理的な問題も含めて解決す

べき課題が山積していると思われた。

現在、産婦人科学会より染色体異常不育症患者に対する着床前診断が承認されているが、今後アレイCGH法などの詳細な遺伝学的検索手段が流死産の原因解析に応用されていくと、着床前診断の適応となる不育症患者カップルが増えて行くことも予想され、早急に着床前診断に関する諸問題を検討していく必要性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

「不育診療における遺伝学的検査と着床前診断」（第52回日本人類遺伝学会シンポジウム 2007. 9. 12-15）

H. 知的財産件の出願・登録状況

（予定も含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

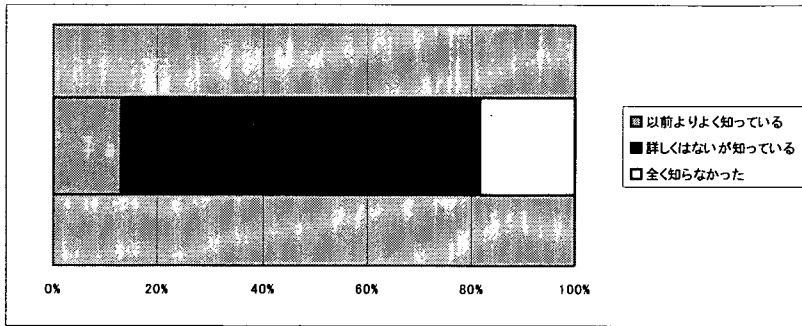
なし。

3. その他

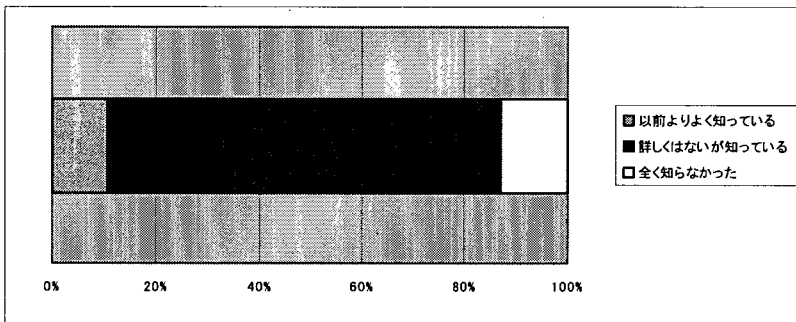
なし。

図1 着床前診断 (PGD) についてご存知ですか？

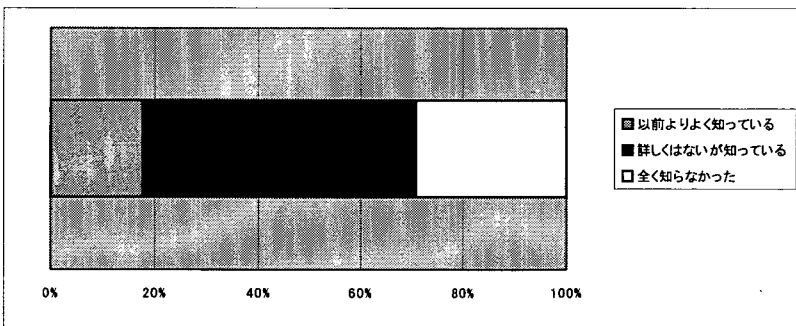
合計



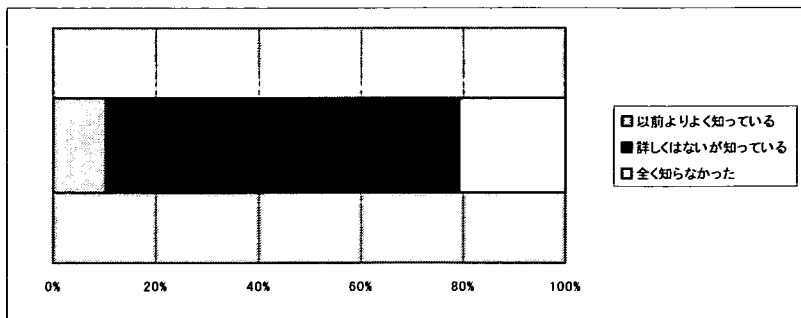
男性医師



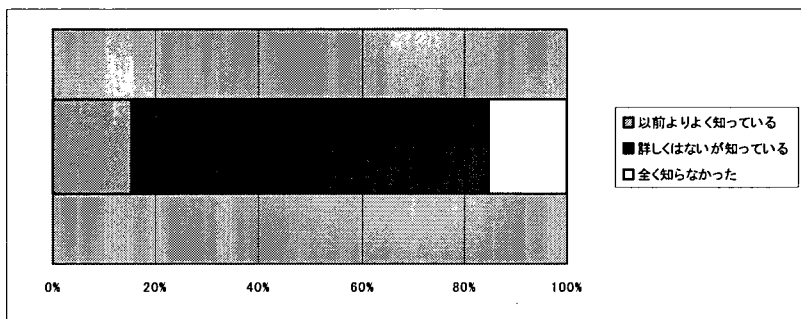
女性医師



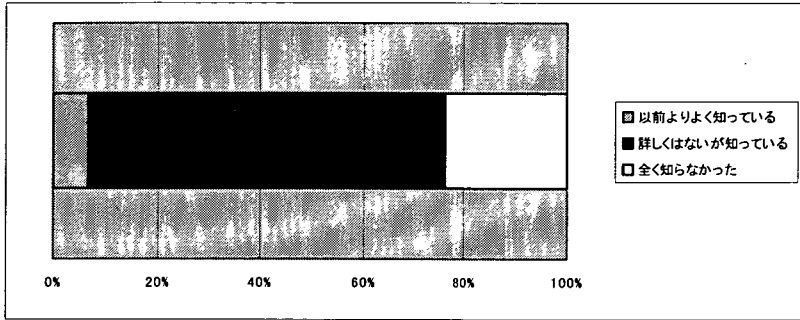
20～30代



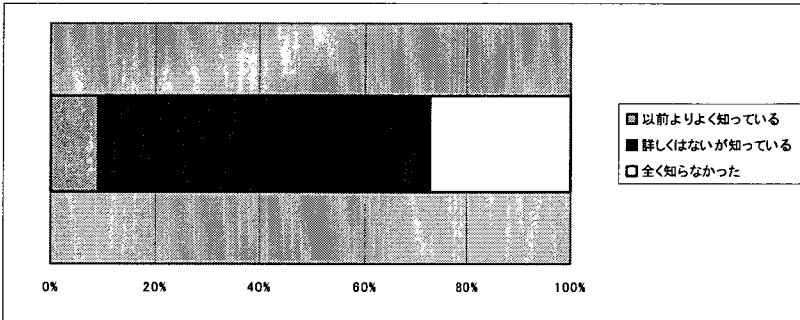
40～50代



小児専門



小児/成人専門



成人専門

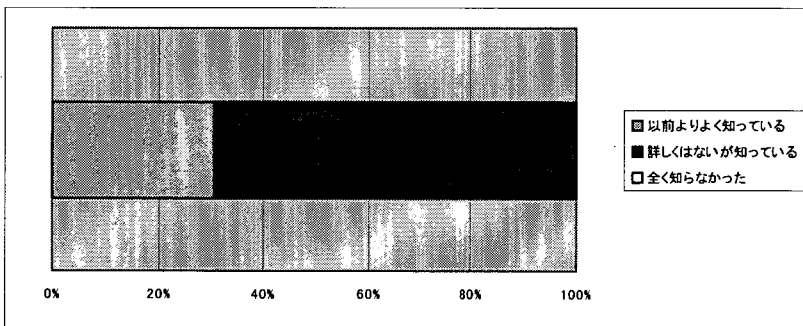
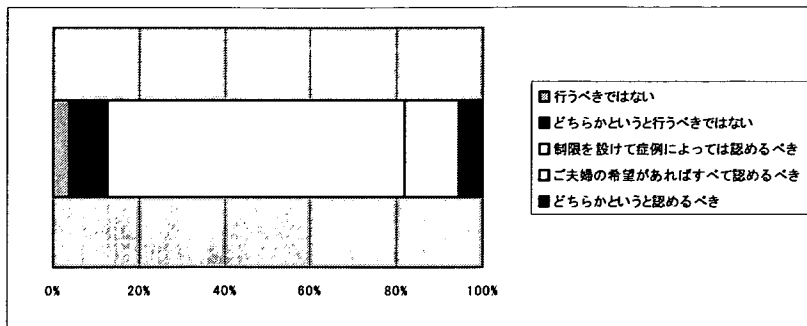
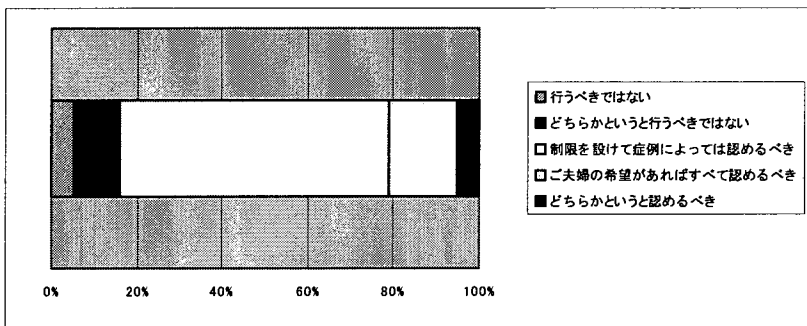


図2 PGDの是非についてはいかがが考えられますか？

合計



男性医師



女性医師

