

200936161A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

CHARGE症候群の臨床診断基準の改訂と新基準にもとづく有病率調査  
およびDNAバンク・iPS細胞の確立

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎健次郎

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

CHARGE症候群の臨床診断基準の改訂と新基準にもとづく有病率調査  
およびDNAバンク・iPS細胞の確立に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎健次郎

平成22（2010）年3月

# 目 次

I. 平成21年度構成員名簿 .....	1
II. 総括研究報告	
平成21年度総括研究報告 .....	3
小崎 健次郎(慶應義塾大学・医学部・小児科)	
III. 分担研究報告	
1. 全国調査による遺伝子変異陽性例の臨床所見の要約と診断基準の改訂 .....	9
小崎 健次郎(慶應義塾大学・医学部・小児科)	
2. CHARGE Syndromeの耳鼻咽喉科学的視点からの臨床研究 .....	13
加我 君孝(東京医療センター・臨床研究(感覚器)センター)	
3. わが国におけるCHARGE症候群の発生頻度の推定 .....	16
黒澤 健司	
(独立地方行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター・遺伝診療科)	
4. アレイCGH法を用いたCHARGE症候群の遺伝子解析技術の開発 .....	21
小崎 里華(独立行政法人国立成育医療研究センター・内科系診療部・遺伝診療科)	
5. CHARGE症候群の有病率に関する検討 .....	23
岡本 伸彦(大阪府立母子保健総合医療センター・遺伝診療科)	
6. CHARGE症候群患者会アンケートにおける診断基準項目の評価 .....	27
及び遺伝子診断の意義についての検討	
水野 誠司(愛知県心身障害者コロニー中央病院・臨床第一部)	
7. 次世代シーケンサーを用いたCHARGE症候群の遺伝子解析技術の開発 .....	30
工藤 純(慶應義塾大学医学部共同利用研究室・遺伝子医学研究室)	
8. CHARGE症候群の眼合併症と視覚障害に関する研究 .....	34
仁科 幸子(独立行政法人国立成育医療研究センター外科系診療部眼科)	
9. CHARGE症候群患者由来のiPS細胞の樹立 .....	37
赤松 和土(慶應義塾大学医学部生理学教室)	
10. CHARGE症候群患者家族のニーズに関する研究 .....	39
中澤 恵江(国立特別支援教育総合研究所)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	45
V. 資 料	
1. CHARGE症候群アンケート(家族会).....	51
2. CHARGE症候群 調査票(小児科医用).....	57

〔 I 〕

平成21年度構成員名簿

平成21年度 厚生労働省難治性疾患克服研究事業

CHARGE症候群の臨床診断基準の改訂と新基準にもとづく有病率調査およびDNAバンク・iPS細胞の確立研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	小崎健次郎	慶應義塾大学医学部小児科学教室	准 教 授
研 究 分 担 者	加我君孝	独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究（感覚器）センター	センター長
	黒澤健司	神奈川県立こども医療センター遺伝科	科 長
	小崎里華	国立成育医療センター第一専門診療部遺伝診療科	医 長
	岡本伸彦	大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科	科 長
	水野誠司	愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部	部 長
	工藤純	慶應義塾大学医学部生命情報学センター	教 授
	仁科幸子	国立成育医療センター第二専門診療部眼科	医 員
	赤松和土	慶應義塾大学医学部生理学教室	講 師
	中澤恵江	独立行政法人国立特別支援教育総合研究所企画部	上級総括研究員
研 究 協 力 者	鳥居千春	慶應義塾大学医学部小児科学教室	技 師
	吉橋博史	群馬県立小児医療センター遺伝科	部 長
	坂田英明	目白大学保健医療学部言語聴覚科	教 授
	峯岸真千子	慶應義塾大学医学部小児科学教室	助 教
	高橋摩理	昭和大学歯学部口腔衛生学教室	非常勤講師
	清水厚志	慶應義塾大学医学部分子生物学教室	助 教
	奥野博庸	慶應義塾大学医学部小児科学教室	医 師

〔Ⅱ〕

總括研究報告

# 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

## 総括研究報告書

CHARGE症候群の臨床診断基準の改訂と新基準にもとづく有病率調査および

DNAバンク・iPS細胞の確立

研究代表者 小崎 健次郎

慶應義塾大学医学部小児科学教室 准教授

### 研究要旨

CHARGE 症候群は C=網膜や虹彩の部分欠損、H=心奇形、A=後鼻孔閉鎖、R=成長発達障害、G=性腺機能低下、E=耳奇形・難聴を主徴とする先天奇形症候群であり、CHD7 遺伝子の変異により発症する。循環器・呼吸器という生命維持に必須の臓器の障害と、コミュニケーションと学習を困難にする感覚器の二重障害(聴覚障害・視覚障害)を伴い、多臓器にわたる合併症を有するために、その多くが新生児期から成人期に至るまで医療の関わりが必須であり、また療育や教育の現場においても特別な支援が必要である。今回、我々は、全国調査を行い、詳細な臨床症状をデータベース化した後に、遺伝子変異陽性例 29 例のみの症状に基づいて臨床診断基準の改訂を試み、顔面神経麻痺・顔面の非対称および口蓋裂を重要視する改定案を作成した。上記の改訂診断基準を満たす症例が、遺伝子変異陽性例(29 例)に加え、41 例であった。これらを総合して、新規診断基準を満たす全国の CHARGE 症候群の患者数は 70 名程度と判断された。一方、神奈川・大阪地域における罹患率調査では、出生 1/20,000 と推定された。全国調査で確認された患者の数と乖離があることから、相当数の患者が未診断であると考えられた。また、臨床的には典型例と考えられる症例の中に CHD7 変異陰性例が含まれていた。遺伝子診断の感度が不十分であると考えられたため、遺伝子診断の感度を向上させるため、アレイ CGH 法や次世代シーケンサー法を用いた遺伝子診断法を開発した。平行して将来的な治療法の開発に向けて変異を有する患者由来組織からの iPS 細胞の作成、ゲノム DNA 等の生物試料のバンク化を行った。家族会のアンケート調査により、通園施設や学校への看護師の配置や非看護師による吸引や注入の容認などの厚生労働行政に対するニーズを明らかにした。

### 研究分担者

加我 君孝	独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究(感覚器)センター
黒澤 健司	神奈川県立こども医療センター遺伝科
小崎 里華	国立成育医療センター第一専門診療部遺伝診療科
岡本 伸彦	大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科
水野 誠司	愛知県立心身障害者コロニー中央病院臨床第一部
工藤 純慶	慶應義塾大学医学部生命情報センター
仁科 幸子	国立成育医療センター第二専門診療部眼科
赤松 和土	慶應義塾大学医学部生理学教室
中澤 恵江	独立行政法人国立特別支援教育総合研究所企画部

## A. 研究目的

CHARGE症候群はC=網膜や虹彩の部分欠損、H=心奇形、A=後鼻孔閉鎖、R=成長発達障害、G=性腺機能低下、E=耳奇形・難聴を主徴とする先天奇形症候群である。循環器・呼吸器という生命維持に必須の臓器の障害と、コミュニケーションと学習を困難にする感覚器の二重障害(聴覚障害・視覚障害)を伴う。わが国における患者数・罹患率は不明である。多臓器にわたる合併症を有するために、医療・療育・教育の現場においても特別な支援が必要であると考えられるが、患者・家族から見たニーズは十分に明らかになっていない。CHD7遺伝子の変異により発症する。現在、Blakeらによる診断基準が存在するが、CHD7遺伝子変異陽性の症例のうち、診断基準を満たさない症例があり、診断基準の改訂が必要である。また、典型例と考えられる症例の中で、遺伝子変異陰性例があり、現在の遺伝子診断技術では検出不能な種類の変異が存在すると考えられ、新たな遺伝子解析法の開発が必要である。また、根治療法の開発に向けて、変異陽性患者由来のiPS細胞の作成やゲノムDNA等の生物試料のバンク化を目指した。

## B. 研究方法

### (1) 患者家族会への財政的支援・教育的支援・

社会的支援・医療的支援に関するアンケート  
CHARGE症候群児・者の親の会「CHARGEの会」会員(会員数130名)に対して会を通じて、会員に国や行政に望む財政的支援・教育的支援・社会的支援・医療的支援について、無記名自記式質問紙調査を実施した。

### (2) 臨床診断基準の改訂

診断に誤りのないCHD7遺伝子変異陽性例のみの症状に基づいて臨床診断基準を決定した。

小児遺伝学会会員の所属する179箇所の小児医療専門施設に調査票を送付し、遺伝子変異有りと回答の得られた29例についてBlake基準に記載された徴候を含む50の徴候の有無を調査した(a値)。同時に、調査対象とした各徴候の奇形症候群診断における診断的価値を評価するため、奇形症候群診断のためのデータベースである

London Dysmorphology Database(以下、LDDb)を参照し、当該徴候を部分症状にもつ奇形症候群の数を評価した(c値)。

CHARGE症候群における頻度と他の奇形症候群における出現頻度を相対的に評価するために、b値をc値で除した(d値)。

① CHARGE症候群において必発だが、多数の疾患において認められる、極端に低いd値をとる発達遅滞・低身長は「必須症状」として「小症状」から分離した。

② 極めて高いd値をとる「顔面神経麻痺または非対称な顔」を「大症状」に格上げした。Blake基準では「顔面神経麻痺」および「嚥下障害」が「脳神経の異常」に含まれているが、「嚥下障害」はc値が高いため、「脳神経の異常」自体を診断基準から除外した。

### (3) 罹患率の算定

全国調査により全国患者数を、神奈川県と大阪府の調査により罹患率を算定した。

### (4) CHD7遺伝子解析法の開発(アレイCGH法)

患者に由来するゲノムDNAをCy5、正常対照者由来のゲノムDNAをCy3でラベル化し、アレイ上で65°C、40時間のハイブリダイゼーションを行い、マイクロアレイスキャナーにて、スキャンし、これを専用ソフトウェアにて数値化した後、各遺伝子のゲノムコピー数を解析した。

### (5) CHD7遺伝子解析の開発(次世代シーケンサー)

次世代シーケンサー法を用いてCHD7遺伝子解析法を開発した。

Sanger法により点変異があることが分かっている検体について、次世代シーケンサーを用いて、再解析した。CHD7遺伝子の全領域をエンリッチするベイト(ゲノム上のターゲット領域に相補的な配列を持つ120bpのシングルオリゴシーケンス)を設計し、SureSelectターゲットエンリッチメントシステムを用いた次世代シーケンサーの有用性を確認した。

### (6) CHD7患者由来iPS細胞の作成

CHD7変異陽性のCHARGE症候群患者由来の線維芽細胞からiPS細胞を作成した。インフォームド・コンセントを得たCHARGE症候群2症例(男児1、女児1)から線維芽細胞を樹立した。山中らの原法に従い、作成した線維芽細胞にレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターにより4遺伝子(Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc)を導入し、一週間後から霊長類ES細胞培養培地、フィーダー細胞上で培養を行い、iPS細胞を樹立した。

### (7) 眼科的合併症の検討

CHARGE症候群の患者・家族会を対象としたアンケート調査の一環として、眼合併症と視覚障害に関する実態を書面にて調査した。総計57例の調査結果を患者年齢によって区分し検討した。平行して、CHD7遺伝子変異陽性例に対する二次調査の一環として、眼異常の合併率と臨床像について調査・検討した。

### (8) 聴覚障害の検討

CHARGE Syndromeのmajor signとminor signの定義に合致する15症例を選び、①ABRによる聴力像、②側頭骨HRCT、③コミュニケーション手段(口話、補聴器、手話、人工内耳)、④CHARGE Syndromeの教育状況について調査・検討した。

本研究では、個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。変異陽性例の表現型の詳細な解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を、有病率に関する調査に際しては、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

### C. 研究結果

#### (1) 患者家族会への財政的支援・教育的支援・社会的支援・医療的支援に関するアンケート

福祉制度が複数の障害を有する患者・家族の負担を十分に補助し得る枠組みとなっていないこと、吸引や注入を必要とする患者が通園施設や学校に通う場合の医療的ケアを提供する体制の拡充(看護師の増員やヘルパーによる医療ケアの承認)が必要なこと、視覚と聴覚の重複障害を有する患者に対する教育環境の充実・摂食・嚥下障害に対する医療的支援と療育の充実の必要性などが明らかとなった。

#### (2) 臨床診断基準の改訂

主要徴候の出現頻度を算定し、各徴候の出現頻度を評価し、診断基準に反映させた、診断基準(案)を策定した。

##### 必発症状:

- ① 耳介奇形を伴う両側性難聴
- ② 低身長
- ③ 発達遅滞 有する症例のうち、

##### 大症状:

- ① 眼コロボーマ(種類を問わない)
- ② 「後鼻孔閉鎖または口蓋裂」
- ③ 顔面神経麻痺または非対称な顔

##### 小症状:

- ① 心奇形
- ② 食道気管奇形
- ③ 矮小陰茎または停留精巣(男児)または小陰唇低形成(女児)

→大症状2以上または大症状1+小症状2を有する症例をCHARGE症候群と診断。

#### (3) 罹病率の算定

13年間の神奈川県におけるDown症候群症例の平均遺伝科初診例数(55例)や、Down症候群推定発生頻度(10-12/10,000出生)とから、Down症候群685例に対して20例のCHARGE症候群症例の出生(平均34例のDown症例に対して1

例のCHARGE症例)と推定した。すなわちCHARGE症候群の発生頻度は、28,000-34,000出生に1例程度と推定した。

大阪府立母子保健センターには、過去20年間に、CHARGE症候群患者が20例受診しており、現在も15例がフォローされている。5年ごとに区分した年齢別の患者数を表に示した。初診時年齢は様々であるが、年間1例程度のCHARGE症候群患者が受診するという計算になる。ダウン症候群は年間約30例の初診があり、ほぼダウン症候群児30例に対して1例程度のCHARGE症候群の初診があることになる。ダウン症候群の有病率(出生率)は700-1000人に1人とされており、単純に30倍すればCHARGE症候群の有病率(出生率)は20,000-30,000人に1人程度となる。

#### (4) CHD7遺伝子解析法の開発(アレイCGH法)

アレイCGH法を用いてCHD7遺伝子解析法を開発した。

従来のシーケンス法では遺伝子変異が検出されなかった症例を対象にアレイCGH解析を行った。CHARGE症候群の原因遺伝子CHD7遺伝子の一部領域が1コピー減少している例が同定され、当該領域内の遺伝子内欠失と判断した。

#### (5) CHD7遺伝子解析の開発(次世代シーケンサー)

Sanger法により点変異があることが分かっている検体について、次世代シーケンサーを用いて、再解析したCHD7遺伝子の全領域をエンリッチするベイト(ゲノム上のターゲット領域に相補的な配列を持つ120bpのシングルオリゴシーケンス)を設計し、SureSelectターゲットエンリッチメントシステムをによって濃縮した。濃縮されたサンプルをGenome Analyzer(イルミナ社)のプロトコルに従い調製し、ペアエンドでシーケンシングを行った。遺伝子内の12箇所SNPが同定され、そのうち11箇所はイントロン内のSNPであった。イントロン内も含めた解析法の妥当性が確認された。

#### (6) CHD7患者由来iPS細胞の作成

遺伝子導入された繊維芽細胞から出現したコロニーの中で、ヒトES細胞様の形態を示すクローンを各症例25ラインずつ(計50ライン)単離することができた。

#### (7) 眼科的合併症

総計57例の調査結果を患者年齢によって区分し検討した。両眼に器質的眼合併症をもつ視覚障害者の比率は50~70%で、視力障害のほか視野障害、羞明をきたしている例が高率であった。

全年齢において大部分が眼科的管理を受けていたが、乳幼児期(0~3歳)に視覚障害の評価や

弱視訓練・ロービジョンケアを行っている例は少数であった。また乳幼児期～学童期に視覚の訓練や特別支援を受けた例の比率が低く、重複障害児に対する医療・療育・教育機関のさらなる連携体制が必要であることが示唆された。次にCHD7遺伝子変異陽性例に対する二次調査の一環として、眼異常の合併率と臨床像について調査・検討した。総計19例38眼の調査結果において、眼異常の合併率は95%と高率で、0.3未満の視力障害をきたしている例は65%であった。眼所見として眼底の網脈絡膜コロボーマ84%、視神経乳頭コロボーマ87%の比率が高く、黄斑欠損・部分欠損は55%に上った。CHD7遺伝子変異陽性例の眼合併症の臨床像として、視神経・黄斑を含む広汎な網脈絡膜コロボーマが高率に起こり、重篤な視覚障害をきたすことが示唆された。

(8) CHARGE Syndromeのmajor signとminor signの定義に合致する15症例を選び、①ABRによる聴力像、②側頭骨HRCT、③コミュニケーション手段(口話、補聴器、手話、人工内耳)、④CHARGE Syndromeの教育状況について調査・検討した。

本研究では、個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。変異陽性例の表現型の詳細な解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を、有病率に関する調査に際しては、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

#### D. 考察

患者アンケート結果で、患者家族が利用した情報源として、インターネット最多、最も有用だった情報源としても、やはりインターネット、家族会の順であった。稀少疾患の情報提供において、ボランティア的な当事者や一般の人が発する情報であって、公的組織による正確な情報提供や情報支援が充分ではない現状が浮き彫りにされた。家族会が無い疾患であれば情報の提供はさらに困難と推測される。稀少疾患の患者家族に対して正確で時代に即した情報(医学、教育、生活、福祉、制度を含め)を継続的に提供する枠組みの作成が喫緊の課題である。CHARGE症候群患児のように精神遅滞、身体障害、多系統の合併症を有することが多い疾患の場合には適用される制度が複数に及び年齢によっても異なるため、福祉制度に精通した専門職が早期から継続的に関わる必要があると考えられる。療育手帳が交付されている場合、単に知的障害の程度だけではなく医療を要する量の差を考慮すべきと考えられた。教育的支援については、学校や通園施設での医療的ケア(吸引・注入等)の提供の充実についての要望が多かった。本症に特有の合併症としての聴覚障

害・視覚障害の重複障害に対する教育・養育環境の整備を求める意見も目立った。重複障害を持つ家庭に対し、児のライフステージに応じた家族全体への支援を行える機関としての小児訪問看護ステーションの増設、ショートステイ先の増設が望まれる。また、肺炎の発症、経管栄養の長期化および継続、合併症として保護者からの摂食・嚥下に関する訴えが明らかになった。CHARGE症候群における摂食・嚥下障害に対する医療的支援と療育の充実が必要と思われる。

患者家族会のアンケート調査により、CHARGE症候群の診断(臨床診断)を告知された平均月齢は22ヶ月と遅いことから早期診断にむけて、医師へのCHARGE症候群に関する情報提供・啓発活動が喫緊の課題と考えられた。

今後、CHARGE症候群の一般小児科医への周知を通じて家族・一般小児科医への情報提供を通じた医療の均てん化と患者QOLの向上を図る必要がある。

平成21年度に行った神奈川県における罹患率の研究では、20,000-30,000出生に1人と推測された。今回の全国調査で確認された患者の数(70名程度)と乖離があり、相当数の患者が未診断であると考えられた。今後、診断基準を満たす成人患者を同定し、有病率・成人期に特有な合併症について解明することが必要である。

また、今後、本研究で開発したアレイCGH法や次世代シーケンサー法も含めてCHARGE症候群の遺伝子検査の精度の向上を図るとともに、先進医療への申請を通じて臨床応用を促進し、研究成果の社会還元を図る必要がある。同時に、本研究により開発されたiPS細胞を活用し、神経系細胞の誘導・新規薬剤の開発を目指す。

当研究班の研究活動について国際学会やホームページ・電子媒体を通じて広報をし、海外の研究機関等によるゲノムDNA・iPS等のリソースの利用を促進する。

#### E. 結論

家族会のアンケート調査により、通園施設や学校への看護師の配置や非看護師による吸引や注入の容認などの厚生労働行政に対するニーズを明らかにした。調査により得られた詳細な臨床症状をデータベース化した後に解析し、診断基準改定案を策定した。上記により全国のCHARGE症候群の患者数は70名程度と判断された。出生20,000から30,000人の出生数から、相当数の患者が未診断であると考えられた。今後、疾患の周知ならび新診断技術法を用いての診断の向上をうとともに、家族・一般小児科医への情報提供を通じた医療の均てん化と患者QOLの向上を目指す。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Inoue H, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. European Journal of Pediatrics, in press.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

〔Ⅲ〕

分担研究報告書

CHARGE症候群の全国調査による遺伝子変異陽性例の臨床所見の要約と診断基準の改訂

分担研究者 小崎健次郎

慶應義塾大学医学部小児科学教室 准教授

研究要旨

日本小児遺伝学会会員の所属する179の小児医療機関にCHARGE症候群に関する一次調査票を送付し、症例有りとの返答のあった18施設(総症例数132)に臨床症状に関する詳細な二次調査票を送付した。回収できた86症例の詳細な臨床症状をデータベース化した後に解析し、診断基準(案)を策定した。

診断基準の策定にあたっては、CHARGE症候群の原因遺伝子CHD7遺伝子変異陽性例29例の表現型を重視した。29例の変異陽性例のうち6例が、現在ひろく使用されているBlake基準(原因遺伝子CHD7の発見以前に策定)を満たさない事を示し、Blake基準改訂の必要性を実証した。遺伝子変異陽性例29例における主要徴候の出現頻度を評価し、新たな診断基準策定の根拠とした。

研究協力者

鳥居 千春(慶應義塾大学医学部小児科学教室)

A. 研究目的

CHARGE症候群はC=網膜部分欠損、H=心奇形、A=後鼻孔閉鎖、R=成長発達障害、G=性腺機能低下、E=耳奇形・難聴を主徴とする先天奇形症候群であり、CHD7遺伝子の変異により発症する。

現在、CHARGE症候群の臨床診断にはCHD7遺伝子の同定以前に作成されたBlakeらの基準(1998)が使用されている。申請者はCHD7の変異スクリーニング法を開発し、日本人症例90例の変異解析をおこなったが、60例のみが変異陽性であった。変異陽性例の相当数がBlakeの基準を満たさず、臨床診断基準の改訂が必須である事が示された。

本研究は診断に誤りのないこれらの遺伝子変異陽性例のみの症状に基づいて新たな臨床診断基準を策定し、わが国における有病率と合併症のスペクトラムを把握することを目指した。さらに根治療法の開発に向けて変異陽性患者のゲノムDNA等の生物試料をバンク化の準備を進めた。

B. 研究方法

(1) CHARGE症候群の臨床診断基準の改訂

① CHARGE症候群について豊富な診療経験を有する臨床遺伝専門医によりワーキンググループを結成した。グループのコンセンサスに基づき、臨床診断上、有用と考えられる臨床症状を基に調査票を作成した。

② 全国の小児遺伝学会会員(臨床遺伝専門医、約180名)に質問紙を送付し、過去3年間に所属施設を受診したCHARGE症候群症候群ないしCHARGE症候群の疑いの患者数の調査を依頼した(一次調査)。患者ありと報告し

た学会員に、調査票を送付し、詳細な臨床情報を収集した(二次調査)。調査手順は、「難病の患者数と臨床疫学増把握のための全国疫学調査マニュアル第二版」に準じた。二次調査にあたり、主任研究者の所属施設の倫理委員会にて「CHARGE症候群の臨床診断基準の改訂と新基準にもとづく有病率調査およびDNAバンク・iPS細胞の確立」を申請した。

- ③ ②の成績にもとづき、CHARGE症候群の臨床症状・遺伝子情報のデータベースを作成した。登録した項目は診断、性別、年齢、家族歴、発症にいたる経過、臨床症状、臨床・病理所見、遺伝子変異、選択した治療法、治療効果、臨床経過、転帰等である。
- ④ 同症候群の必須症状や随伴症状を明確にし、診断基準を作成診断の感度・特異度を100%に近づけるアルゴリズムを開発した。

(2) CHD7遺伝子変異陽性CHARGE症候群の患者の生体試料のバンク化

CHD7遺伝子変異陽性の末梢血リンパ球・ゲノムDNA等の生体試料の難病研究支援バンクへの寄託について倫理委員会の承認をえて、患者から再同意を得て、難病研究支援バンクへの供託の準備を進めた。

C. 研究結果

(1) 全国調査による遺伝子変異陽性例の臨床所見の要約と診断基準の策定

一次調査として日本小児遺伝学会会員の所属する179の医療機関にCHARGE症候群に関する

る調査票を送付した。

症例有りとの返答のあった18施設(132症例)に臨床症状に関する詳細な二次調査票を送付し、回収された86症例の詳細な臨床症状をデータベース化した後に解析し、診断基準改定案を策定した。診断基準の策定にあたっては、CHARGE症候群の原因遺伝子CHD7の遺伝子変異を有する29例(変異陽性例)の表現型を重視した。

現在の遺伝子診断技術によるCHARGE症候群の遺伝子診断の感度は70%程度にとどまるため、遺伝子診断結果が陰性でもCHARGE症候群をrule-outすることはできないため変異陽性例を重視した。遺伝子変異が陰性の症例における主要症状の出現頻度を算定しても、当該項目の特異度を評価した事にならないという考え方に立つ。

小児遺伝学会会員の所属す179箇所の小児医療専門施設に調査票を送付し、遺伝子変異有りと回答の得られた29例についてBlake基準に記載された徴候を含む50の徴候の有無を調査した(a

値)。同時に、調査対象とした各徴候の奇形症候群診断における診断的価値を評価するため、奇形症候群診断のためのデータベースであるLondon Dysmorphology Database(以下、LDDDB)を参照し、当該徴候を部分症状にもつ奇形症候群の数を評価した(c値)。

CHARGE症候群における頻度と他の奇形症候群における出現頻度を相対的に評価するために、b値をc値で除した(d値)。

① CHARGE症候群において必発だが、多数の疾患において認められる、極端に低いd値をとる発達遅滞・低身長は「必須症状」として「小症状」から分離した。

② 極めて高いd値をとる「顔面神経麻痺または非対称な顔」を「大症状」に格上げした。Blake基準では「顔面神経麻痺」および「嚥下障害」が「脳神経の異常」に含まれているが、「嚥下障害」はc値が高いため、「脳神経の異常」自体を診断基準から除外した。

診断基準策定根拠	a: 変異陽性者 29 名 における出現数	b: 同頻度 a/29	c: データベース における出現数	d: b/c x 100
後鼻孔閉鎖	8	0.28	74	0.37
眼コロボーマ	24	0.83	178	0.46
特徴的な外耳	29	1.00	202	0.50
口蓋裂	15	0.52	466	0.11
心奇形	20	0.69	817	0.08
停留精巣または矮小陰茎	13	0.45	427	0.10
食道気管奇形	7	0.24	104	0.23
顔面神経麻痺	26	0.90	103	0.87

主要徴候の出現頻度を算定し、各徴候の出現頻度を評価(別表1参照)し、診断基準に反映させた、診断基準(案)を策定した。

必発症状:

- ① 耳介奇形を伴う両側性難聴
- ② 低身長
- ③ 発達遅滞 有する症例のうち、

大症状:

- ① 眼コロボーマ(種類を問わない)
- ② 「後鼻孔閉鎖または口蓋裂」
- ③ 顔面神経麻痺または非対称な顔

小症状:

- ① 心奇形
  - ② 食道気管奇形
  - ③ 矮小陰茎または停留精巣(男児)または小陰唇低形成(女児)
- 大症状2以上または大症状1+小症状2を有する症例をCHARGE症候群と診断。

遺伝子検査実施済みで、変異を認めなかった症例10例と遺伝子検査のまだ実施していない47名を合わせた57名を対象として、新しい診断基準を満たすかどうか、検討しました。57名中、41名が診断基準を満たしました。遺伝子検査実施済みで変異を認めた29例と併

せて、国内の患者数は70例と算定した。

## (2) 生体試料のバンク化

参加施設の倫理委員会の承認と難病研究支援バンクの了承を得て、既存患者細胞由来DNAの試料のバンク利用への患者へのインフォームド・コンセントを実施し、2名の患者の検体を難病研究支援バンクに預託した。

## D. 考察

本研究班が平成21年度に行った神奈川県および大阪府における罹患率の研究では、30,000出生に1人と推測された。全国で毎年30~40人程度の新規患者が出生していると考えられる。CHARGE症候群の乳幼児死亡率はそれほど高くないことを考慮すると、全国の患者数は30人/年 x 数十年=数百人程度の患者が存在すると考えられるが、今回の全国調査で確認された患者の数(70名程度)と乖離があり、相当数の患者が未診断であると考えられた。今後、診断基準を満たす成人患者を同定し、有病率・成人期に特有な合併症について解明することが必要である。

また、遺伝子変異を認めなかった症例の相当数が本研究により策定した診断基準を満たしており、現行の遺伝子解析法では検出されない変異を有している可能性が強く示唆された。さらに、遺伝子検査感度を向上させるため、マイクロアレイ・次世代シーケンサー等の新技術による解析が望まれる。

本研究により得られたCHARGE症候群の臨床症状・遺伝子変異のデータベースや、これとリンクした患者由来生体試料の集積は世界に例がなく、正確な臨床診断方法の確立に際して有用性が高い。

## E. 結論

調査により得られた詳細な臨床症状をデータベース化した後に解析し、診断基準の改定案を策定した。

診断基準の策定にあたっては、CHARGE症候群の原因遺伝子CHD7遺伝子変異陽性例29例の表現型を重視した。29例の変異陽性例のうち6例が、現在ひろく使用されているBlake基準(原因遺伝子CHD7の発見以前に策定)を満たさない事を示し、Blake基準改訂の必要性を実証した。遺伝子変異陽性例29例における主要徴候の出現頻度を評価し、新たな診断基準策定の根拠とした。

上記により策定した診断基準を満たす症例が全国で41例であった。遺伝子変異陽性 29例とこれらを総合して、新規診断基準を満たす全国のCHARGE症候群患者数は70名程度と判断された。神奈川県および大阪地区における調査では罹患率は30,000出生に1人と推測されたことから相当数の患者が未診断であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Inoue H, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. European Journal of Pediatrics, in press.

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

CHARGE 症候群の診断基準改訂の根拠とした分析の要約  
(事後評価に係わる報告書 別表)

徴候	Blake 基準		Blake 基準		小症状		大症状				
	後鼻孔閉鎖	眼口一マ	特徴的な外耳	脳神経異常	口蓋裂	心奇形	停留精果または矮小陰莖	食道・気管奇形	顔面神経麻痺または非対称な顔	発達遅滞	低身長
a 徴候が陽性の症例数	8	24	29	29	15	20	13	7	26	29	29
b 変異陽性例での頻度 (a/29)	0.28	0.83	1.00	1.00	0.52	0.69	0.45	0.24	0.90	1	1
c LDDB 該当疾患数	74	178	202		466	817	427	104	103	1137	1392
d b/c x 100	0.37	0.46	0.50	※	0.11	0.08	0.10	0.23	0.87	0.088	0.072

本研究では、小児遺伝学会会員の所属する 179 箇所の小児医療専門施設に調査票を送付し、遺伝子変異ありと回答の得られた 29 例について Blake 基準に記載された徴候を含む 50 の徴候の有無を調査した(a 値)。同時に、調査対象とした各徴候の奇形症候群診断における診断的価値を評価するため、奇形症候群診断のためのデータベースである London Dysmorphology Database (以下、LDDB)を参照し、当該徴候を部分症状にもつ奇形症候群の数を評価した(c 値)。LDDB には 4000 を超える疾患が収載されている。CHARGE 症候群における頻度と他の奇形症候群における出現頻度を相対的に評価するために、b 値を c 値で除した (d 値)。

- ① CHARGE 症候群において必発だが、多数の疾患において認められる、極端に低い d 値をとる発達遅滞・低身長は「必須症状」として「小症状」から分離した。
- ② 極めて高い d 値をとる「顔面神経麻痺または非対称な顔」を「大症状」に格上げした。※Blake 基準では「顔面神経麻痺」および「嚥下障害」が「脳神経の異常」に含まれているが、「嚥下障害」は c 値が高いため、「脳神経の異常」自体を診断基準から除外した。

CHARGE Syndrome の耳鼻咽喉科学的視点からの臨床研究

分担研究者 加我 君孝

東京医療センター・臨床研究(感覚器)センター

研究要旨

CHARGE Association にはわれわれは 15 年前より注目し、その症例の集積を行い、かつ長期フォローアップを行ってきた。CHARGE Syndrome を耳鼻咽喉科の視点から 15 症例を検討し、どの異常がどの程度伴っているかを明らかにすることを研究の目的とした。CHARGE Syndrome の major sign と minor sign の定義に合致する 15 症例(男:5 人、女:10 人、年齢 11 ヶ月～29 歳・平均 12.8 歳)を選び、①ABR による聴力像、②側頭骨 HRCT、③コミュニケーション手段(口話、補聴器、手話、人工内耳)、④CHARGE Syndrome の教育について検討した。②14/15 人(93.3%) は両側中等度・高度難聴を有した。合併症の有無にかかわらず全員が補聴器を装着し、そのうち 1 人が人工内耳を施行した。側頭骨 CT においてさまざまな異常が認められた。特に蝸牛奇形(40%)、三半規管奇形(72%)があった。8 人がろう学校、3 人が通園施設、2 人が普通学校で教育を受けていた。内耳奇形による頻度が著しく高いことを示したそのための難聴が、補聴器あるいは人工内耳で補うことが出来る可能性が示唆された。

研究協力者

安達のどか 埼玉県立小児医療センター 耳鼻咽喉科

浅沼聡 埼玉県立小児医療センター 耳鼻咽喉科

坂田英明 目白大学クリニック

A. 研究目的

CHARGE Association にはわれわれは 15 年前より注目し、その症例の集積を行い、かつ長期フォローアップを行ってきた。CHARGE Association は CHARGE Syndrome と名称が変わり、その責任遺伝子も同定されたという。しかし、ここに報告するように耳鼻咽喉科の視点からは Syndrome より Association の方がよりふさわしいように思える。また、一つの遺伝子に責任があるか否かも今後の検討課題にしたい。以上の背景をもとに CHARGE Syndrome を耳鼻咽喉科の視点から 15 症例を検討し、どの異常がどの程度伴っているかを明らかにすることを研究の目的とした。

B. 研究方法

CHARGE Syndrome の major sign と minor sign の定義に合致する 15 症例を選んだ。

期間：1985～2007 年

人数：15 人(男：5 人、女：10 人)

年齢：11 ヶ月～29 歳(平均 12.8 歳)

検査項目：①ABR による聴力像

②側頭骨 HRCT

③コミュニケーション手段(口話、補聴器、手話、人工内耳)

④CHARGE Syndrome の教育  
(倫理面への配慮)

症例研究にあたって、両親より Informed Consent をとった。倫理委員会での申請は本研究の検査項目が最終決定されてから行う予定

である。

### C. D研究結果及び考察

#### 1) 難聴の有無について

ABRを用いて他覚的に評価した。その結果を表1に示す。13/15 (86.7%) が補聴器を必要とした。

表1: 聴力レベル (ABR)

両側難聴		片側難聴	
正常	1 (6.7%)	正常	0
21~40dB	0	21~40dB	0
41~70dB	6 (40.0%)	41~70dB	1 (6.7%)
71~100dB	2 (13.3%)	71~100dB	0
重度難聴	5 (33.3%)	重度難聴	0

#### 2) 側頭骨 CT 所見

表2に示すように、耳小骨奇形が63%、蝸牛の奇形が40%、前庭半規管の奇形が73%を示した。その内訳は表2に示した。

表2: 側頭骨CT所見

30耳 (重複あり)

①	孔突蜂巣 (70%)	Decreased	21 (70.0%)
②	耳小骨 (63%)	Deformed ossicular chain	7 (23.3%)
		Fixed incus	2 (6.7%)
		No stapes	10 (33.3%)
③	蝸牛 (40%)	Common cavity	4 (13.3%)
		Mondini	4 (13.3%)
		1.5 turns	4 (13.3%)
④	前庭 (73%)	Absent	6 (20.0%)
		Small	14 (46.7%)
		Large	2 (6.7%)
⑤	半規管 (73%)	Absent	14 (46.7%)
		Incomplete	8 (26.7%)
⑥	前庭水管 (27%)	Absent	7 (23.3%)
		Large	2 (6.7%)
⑦	その他 (20%)	Enussary vein	4 (13.3%)
		High jugular bulb	2 (6.7%)

#### 3) コミュニケーション手段と教育

表3に補聴器、人工内耳及び聴覚口話か手話

かを示した。学校教育をどこで受けているかも示した。

表3: コミュニケーション手段と教育

精神発達遅滞: 10/15 (66.7%)

難聴: 13/15 (86.7%)

コミュニケーション手段		教育	
口話	5 (33.3%)	未定 (入院中)	2 (13.3%)
手話	5 (33.3%)	普通学校	2 (13.3%)
補聴器	13 (86.7%)	ろう学校	8 (53.3%)
人工内耳	1 (6.7%)	通園施設 (発達遅滞対象)	3 (20.2%)

以上示した通り、難聴の頻度が高く、かつ内耳奇形の頻度が高いことがわかった。今後、嗅覚障害も調べることにする予定である。

#### 評価

##### 1) 達成度について

耳鼻咽喉科の視点から、難聴を中心とする問題についてはほぼ100%達成した。しかし嗅覚障害についてはまだである。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

学術的・国際的には、内耳奇形による頻度が著しく高いことを示したことは意義が大きい。そのための難聴が、補聴器あるいは人工内耳で補うことが出来ることを示した社会的意義は大きい。

##### 3) 今後の展望について

嗅覚障害の合併とその生活における困難を明らかにすることで、人工内耳で聴覚が再獲得出来れば大きな展望が得られるであろう。

##### 4) 研究内容の効率性

東京医療センター、埼玉県立小児医療センター、目白大学クリニックの共同研究により臨床研究の効率が高まる見込みである。

## E. 結論

- ①側頭骨 CTにおいてさまざまな異常が認められた。特に蝸牛奇形（40%）、三半規管奇形（72%）があった。
- ②14/15人（93.3%）は両側中等度・高度難聴を有した。合併症の有無にかかわらず全員が補聴器を装用し、そのうち1人が人工内耳を施行した。
- ③8人がろう学校、3人が通園施設、2人が普通学校で教育を受けていた。
- ④CHARGE Syndromeは症状がさまざまであり、その実態については再検討が必要である。

## F. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	9件
原著論文による発表	2件
それ以外（レビュー等）の発表	1件

そのうち主なもの

#### 1. 論文発表

加我君孝、内山勉、新正由紀子. 小児の中等度難聴ハンドブック. 2009. 金原出版 東京学会発表

2. 鈴木光也、櫻尾明憲、加我君孝他. 中・内耳奇形・内耳道狭窄を伴う CHARGE association の高度感音難聴症例に対する人工内耳埋め込み術の経験. 第54回日本聴覚医学会総会. 2009.10.22. 横浜

### 2) 海外

口頭発表	1件
原著論文による発表	8件
それ以外（レビュー等）の発表	3件

そのうち主なもの

#### 論文発表

1. Kaga K, Starr A (Ed). Neuropathies of the auditory and vestibular eighth cranial nerves. 2009 Springer
2. Murofushi T, Kaga K (Ed). Vestibular evoked myogenic potential-Its basics and clinical applications. 2009 Springer
- Kaga K (Ed). Central auditory pathway disorders. 2009 Springer

## 学会発表

1. Shinjo Y, Masuda T, Kaga K. Vestibular functions and motor development of congenitally deafblind children. The 7<sup>th</sup> Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Sciences. 2009.12.4. Singapore

## G. 知的所有権の出願・取得状況(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

わが国における CHARGE 症候群の発生頻度の推定

分担研究者 黒澤 健司 神奈川県立こども医療センター 遺伝科科長

研究要旨

小児病院における受診例および人口ベースの先天異常モニタリング調査のデータより、CHARGE 症候群の発生頻度について検討した。神奈川県立こども医療センター遺伝科へ受診歴のある 26 例の CHARGE 症候群症例を対象とし、出生を年次ごとにまとめ、出生状況に揺らぎがあるか検討した。比較対象として、これら対象症例の出生年次に遺伝科を初診となったダウン症候群症例を取り上げた。診断は、臨床症状の組み合わせから臨床遺伝専門医でもある Dysmorphology の専門家によってなされ、遺伝子解析が行われた 13 例のうち 10 例において *CHD7* 遺伝子の変異が確認された。1989 年以前の出生症例 6 例を除くと、13 年間に 20 例の出生があり、年次変化はあるもののほぼ一定で、1 ないしは 2 例の出生だった(平均 1.5 例/年)。この期間の Down 症候群症例の平均遺伝科初診例数(55 例)や、神奈川県における Down 症候群推定発生頻度(10-12/10,000 出生)とから、Down 症候群 685 例に対して 20 例の CHARGE 症候群症例の出生(平均 34 例の Down 症例に対して 1 例の CHARGE 症例)と推定した。すなわち CHARGE 症候群の発生頻度は、28,000-34,000 出生に 1 例で、診断の難易度を考慮し 15,000 出生に 1 例と推定した。今回の推定発生頻度に関する評価は、海外からの報告より正確に推定されたものであり、難治性疾患における医療施策において重要なデータと考えられた。

共同研究者

石川 亜貴(神奈川県立こども医療センター遺伝科)

榎本 啓典(同 遺伝科)

古谷 憲孝(同 遺伝科)

A. 研究目的

CHARGE 症候群(OMIM. 214800)は、後鼻腔閉鎖および心臓、内耳、網膜などの奇形を有する先天性多発奇形症候群である。その疾患名の由来は、特徴とする症状の頭文字を並べた形を取っている。すなわち、網脈絡膜視神経の欠損(Coloboma)、心奇形(Heart)、後鼻腔閉鎖(Atresia)、発達遅滞および成長障害(Retardation)、外性器異常(Genital)、耳介変形・難聴(Ear)である。Vissers ら(2004)によって原因遺伝子が chromatin helicase DNA-binding gene-7(*CHD7*, OMIM. 608892)と同定されて以降、遺伝子レベルでの診断が可能となり、その発症メカニズムや遺伝子型-表現型の相関に関する研究が急速に進みつつある<sup>1, 2)</sup>。

先天性多発奇形症候群の多くが遺伝子異常を原因としており、根本治療は困難である。こうした難治性疾患の代表である奇形症候群では、その自然歴を明らかにすることは極めて重要である。自然歴を明らかにすることにより、医療サイドの理解が得られ、合併症管理に有用となる。さらに自然歴に関する情報は、将来に対する親の不安を取り除くことを可能とし、結果として長期的予後の改善が

期待できるからである<sup>3)</sup>。同時に、こうした先天奇形症候群の発生頻度を明らかにすることも重要である<sup>4)</sup>。それは、多くの医療問題を抱えた患者および患者家族をサポートする上で、明確な理念にもとづいた医療施策の基本データとして必須となり、さらに、地域ごとの大きな発生頻度の違いが評価方法のバイアスによるものであることを指摘することができるからである。

今回、我々は小児病院受診症例および人口ベースの先天異常モニタリング調査のデータより、CHARGE 症候群の発生頻度について検討した。CHARGE 症候群の発生頻度に関して海外では、Blake ら(1998)<sup>5)</sup>、Kallen ら(1999)<sup>6)</sup>、Issekutz ら(2005)<sup>7)</sup>、の報告があるが、わが国においては現在までない。CHARGE 症候群の殆どは突然変異であり、この点から人種差はないと仮定した。これまでの海外からの報告と比較しつつ検討を加えた。

B. 研究方法

対象は、神奈川県立こども医療センター遺伝科へ受診歴のある 26 例の CHARGE 症候群症例である。診断は、臨床症状の組み合わせから臨床遺伝専門医でもある Dysmorphology の専門家によって