

なされた。診断は Verloes (2005) の診断基準⁸⁾を参考としたが、Blake ら(1998)の基準も参考とし、総合的に Dysmorphology を専門とする遺伝科医師によってなされている。13 例で遺伝子解析がなされ 10 例において CHD7 遺伝子の変異が確認されている。26 例の出生状況や合併症、医療管理状況は、臨床病歴を中心にまとめた。なお、この臨床症状スペクトラムおよび合併症状の医療管理状況に関しては、別報(石川亜貴ほか⁹⁾)となる。これら 26 例の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。ダウン症候群は最も頻度の高い常染色体異常症であり、一般集団における発生頻度は約 800 出生に 1 例で、人種差はない。発生頻度が比較的一定で、診断が容易であるダウン症候群との比を観察することにより、発生頻度を推定した。また、ダウン症候群の発生頻度が県内において一定であることを確認するために、神奈川県における先天異常モニタリング調査のデータ^{10、11)}も参考とした。

(倫理面への配慮)

解析にあたっては全ての個人情報と潜在化させた。遺伝子解析は十分なインフォームドコンセントの後に文書により承諾を得た。

C, D. 研究結果と考察

26 例の CHARGE 症候群症例を出生年別にまとめた。1990 年以前の出生症例は 6 例いたが、当時の診断精度、疾患の知名度の影響で、かなり低い発生頻度となっている。現時点で 20 歳以上、つまり 1989 年以前の出生症例 6 例を除いた 20 例について検討を行った。20 例の出生期間は 1990—2002 年であり、逆にこれ以降の出生群についても解析対象から除外した。理由はこれまでの受診例から判明したこととして、新生児期の診断確定は極めて難しく、殆どの症例が幼児期ないしは学童期に診断告知を受けているため、正確に診断に至っていない症例が潜在しているからである(院内併診紹介制のシステムでは担当医が症状の組み合わせに奇形症候群を想定して遺伝科に紹介するが、その時期が他の奇形症候群と比較して極めて遅れるのも CHARGE 症候群の特徴といえるかもしれない(石川亜貴ほか、報告準備中))。対象群を出生年別(1990—2002 年)に図 1 にまとめた。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あり 1 ないしは 2 例の出生で、平均 1.5 例/年の出生が認められた。この期間の Down 症候群症例の遺伝科初診例数を図 2 にまとめた。1990 年代前半に若干の低下傾向を認めるものの、55 例前後で推移している。この間の神奈川県先天異常モニタリング調査(KAMP)での Down 症候群発生動向を確認すると、同様に 1990 年代前半に若干の

低下傾向を見ているが、その後 10,000 出生あたり 5—6 で推移する(KAMP での Down 症候群把握率は、奇形児発生頻度が 1.14%と評価されていた 1980 年代には 67%と推定されている。その後、評価方法の変遷により奇形児発生頻度が 0.8%へ低下しており、奇形全体の発生頻度から考えると、Down 症候群把握率も 50%程度へ低下した可能性が考えられ、この期間の Down 症候群発生頻度は 10—12/10,000 出生と考えられる。)。したがって、人口ベースのモニタリング調査の傾向は、小児病院遺伝外来の患者分布にも反映されていることがわかる。しかも、今回検討した 1990—2002 年については、Down 症候群受診数と CHARGE 症候群数がほぼ一定比率となっていることがわかる。つまり、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)である。Down 症候群出生が上述のモニタリングデータに従うと、CHARGE 症候群の発生頻度は、28,000—34,000 出生に 1 例の頻度となる。これは、Issekutz ら(2005)の Canada における疫学調査(3.5/100,000 出生)⁷⁾とほぼ一致した値となっている。Issekutz ら(2005)は地域差を考慮して最大 8,500 出生に 1 例と述べているが、やや過大評価の印象がある。Blake ら(1998)⁵⁾は発生頻度を 10,000—15,000 出生に 1 例と推測しているが、正確な人口ベースでの疫学調査にもとづくデータではない。ただし、CHARGE 症候群の診断は、必ずしも Down 症候群のように小児医療に関わるものであるなら誰でも診断が可能であるわけではなく、ときに臨床専門医でも診断に躊躇することがあり、評価バイアスは考慮する必要がある。診断の難易度を考慮すると実際に診断されている例は全体の半数程度になることを考慮してもいいかもしれない。したがってまとめると、15,000 出生に 1 例が妥当な推定発生頻度かもしれない。

E. 結論

神奈川県における小児病院遺伝外来の先天異常・奇形症候群症例の受診状況から、CHARGE 症候群の発生頻度を推定した。小児病院(神奈川県立こども医療センター)は県内唯一の小児専門医療機関であり、発生頻度は低いものの極めて高度で専門的な医療を必要とする先天性多発奇形症例が集中する。観察期間 1990—2002 年の 13 年間に出生した 20 例の CHARGE 症候群を経験し、この間に 685 例の Down 症候群新患症例の受診があった。神奈川県におけるこの期間の Down 症候群発生頻度はほぼ一定で推移していて、遺伝外来 Down 症候群受診群は神奈川県一般集団を反映していた。CHARGE 症例 20 例の出生は 13 年間で偏りは少なく、年間 1—2 例の出生で平均 1.5/年であった。Down 症受診例と CHARGE 症例の発

生頻度の比が一定と仮定すると、その比は 1:34 となり、この期間の神奈川県における推定の Down 症候群発生頻度(10-12/10,000 出生)を考慮すると、確定診断例の発生頻度は最小限の推定値は 28,000-34,000 出生に 1 例で、診断の難易度による診断未確定例がその倍潜在している可能性を考慮すると 15,000 出生に 1 例と推測される。

謝辞

本研究の資料の一部は、神奈川県産科婦人科医学会の協力による神奈川県新生児特別地域保健事業によっている。引用した先天異常モニタリング調査による研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「本邦における先天異常モニタリングの構築と外的・環境因子サーベイランスに関する研究(主任研究者 平原史樹)」(H19-子ども一般 007)によっている。

文献

- 1) Vissers LE, van Raverswaaij CM, Admiraal R, et al.: Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 2004;36:955-957.
- 2) Aramaki M, Uda T, Kosaki R, et al.: Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *J Pediatr* 2006;148:410-404.
- 3) 黒澤健司, 今泉清, 升野光雄, 黒木良和: Rubinstein-Taybi 症候群の自然歴. *日児誌* 1993;97:1442-8.
- 4) Kurosawa K, Imaizumi K, Masuno M, Kuroki Y: Epidemiology of limb-body wall complex in Japan. *Am J Med Genet* 1994;51:143-46.
- 5) Blake KD, Davenport SL, Hall BD, et al.: CHARGE association: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)* 1998;37:159-173.
- 6) Kallen K, Robert E, Mastriacovo P, Castilla EE, Kallen B: CHARGE association in newborns: A registry-based study. *Teratology* 1999;60:334-343.
- 7) Issekutz KA, Graham JM, Prasad C, Smith IM, Blake KD: An epidemiological analysis of CHARGE syndrome: Preliminary results from a Canadian study. *Am J Med Genet* 2005;133A:3-9-317.
- 8) Verloes A: Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: A proposal. *Am J Med Genet* 2005;133A:306-308.
- 9) 石川亜貴, 榎本啓典, 古谷憲孝, 朝倉由美, 室谷浩二, 安達昌功, 黒澤健司, 小崎健次郎: CHARGE 症候群の 24 例の臨床的検討。(準備中)

- 10) Kuroki Y, Konishi H: Current status and perspectives in the Kanagawa Birth Defects Monitoring Program (KAMP). *Cong Anom* 1984;24:385-394.
- 11) 黒澤健司, 黒木良和: 神奈川県における人口ベース先天異常モニタリングに関する研究. 厚生労働省科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「本邦における先天異常モニタリングの構築と外的・環境因子サーベイランスに関する研究(主任研究者 平原史樹)」(H19-子ども一般 007)平成 20 年度報告書 p22-28, 2009.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto K, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Ito S, Tanaka Y, Masuno M, Chiyo H, Kurosawa K. Further delineation of 9q22 deletion syndrome associated with basal cell nevus (Gorlin) syndrome: Report of two cases and review of the literature. *Cong Anom* 2009;49:8-14.
2. Fujita K, Aida N, Asakura Y, Kurosawa K, Niwa T, Muroya K et al. Abnormal basiocciput development in CHARGE syndrome. *Am J Neuroradiol* 2009;30: 629-634.
3. Kuniba H, Yoshiura KI, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H et al. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet* 2009;54:304-309.
4. Saito H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matsumoto N. Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split-foot malformation and hearing loss. *Am J Med Genet Part A* 2009;149A:1224-1230.
5. Yamanaka M, Ishikawa H, Saito K, Maruyama Y, Ozawa K, Shibasaki J, Nishimura G, Kurosawa K. Prenatal Findings of Paternal Uniparental Disomy 14: Report of Four Patients. *Am J Med Genet Part A* 2010;152A:789-791.
6. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M. et al. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *J Pediatr*. 2009 Dec;155(6): 900-903.e1. Epub 2009 Oct 1.
7. Tsuji M, Aida N, Obata T, Tomiyasu M, Furuya N, Kurosawa K, Errami A, Gibson KM, Salomons GS, Jakobs C, Osaka H. A new case of GABA transaminase deficiency detected with

proton MR spectroscopy. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:85-90.

8. Osaka H, Koizume S, Aoyama H, Iwamoto H, Kimura S, Nagai J, Kurosawa K, Yamashita S. Mild phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a PLP1-specific mutation. *Brain Dev* (in press)
9. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi N, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int* (in press)
10. 金子実基子, 鮫島希代子, 西川智子, 古谷憲孝, 吉橋博史, 蒔田芳男, 羽田明, 稲澤譲治, 千代豪昭, 黒澤健司 原因不明多発奇形・精神遅滞例を対象とした染色体微細構造異常解析における遺伝カウンセリング予備調査からー. *日本遺伝カウンセリング学会誌* 2009;29:57-61.
11. 小澤克典, 石川浩史, 丸山康世, 永田智子, 長瀬寛美, 古谷憲孝, 吉橋博史, 黒澤健司, 柴崎淳, 山中美智子 胎児期から14番染色体父性片親ダイソミーを強く疑った1例 *日本遺伝カウンセリング学会誌* 2009;30:19-22.
12. Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillissen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat* 2010; 31:284-94.

2. 学会発表

1. Enomoto K, Iju K, Kurosawa K, Ohta M. A new case of Double Aneuploidy Mosaicism: 47,XX,+8 / 45,X. *American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting, 2009. 10. 20-14, Honolulu.*
2. Saito H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N et al. Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split-foot malformation and hearing loss. *American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting, 2009.10.20-14, Honolulu.*
3. Kurosawa K, Tanaka M, Osaka H, Ohashi H, Hamano S, Enomoto K, et al. Complex chromosomal rearrangements in a girl with Pelizaeus-Merzbacher disease. *American*

Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting, 2009.10.20-14, Honolulu.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

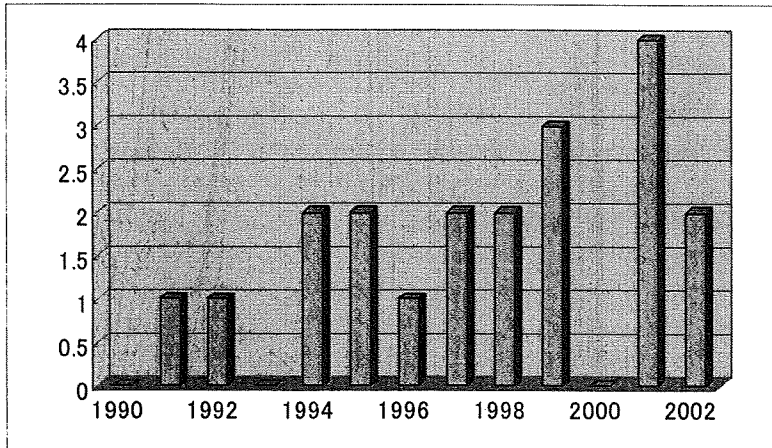


図 1. 遺伝外来を受診した CHARGE 症候群症例出生年

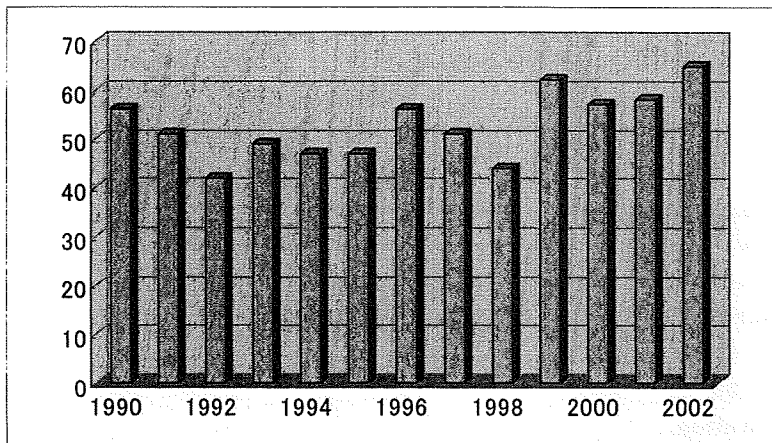


図 2. 遺伝外来を受診した Down 症候群症例数の動向

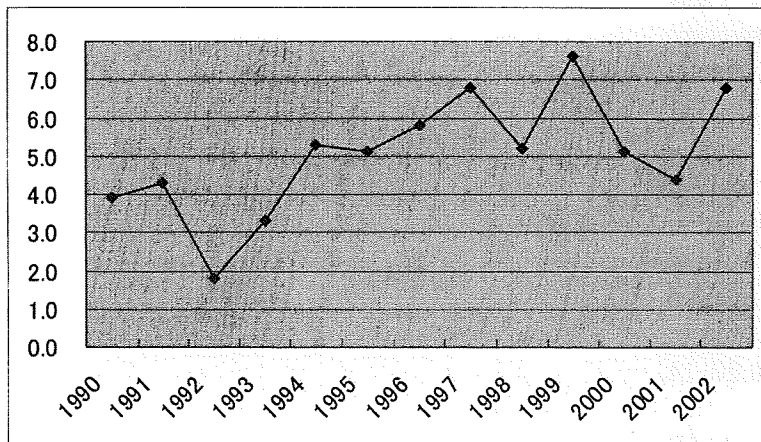


図 3. 神奈川県先天異常モニタリング調査からみた Down 症候群発生頻度の推移 (対 10,000 出生)

アレイCGH法を用いたCHARGE症候群の遺伝子解析技術の開発

研究分担者 小崎里華
国立成育医療センター 遺伝診療科 医長

研究要旨

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る。現在、原因遺伝子としてCHD7が同定されているが、変異が同定される症例は全体の70%程度とされている。全例に変異が同定されない理由として、① 患者がCHARGE症候群以外の疾患を有している、② CHD7遺伝子以外の原因遺伝子が存在する、③ 現在使われている遺伝子診断法(PCR-シーケンシング法)では検出し得ないタイプの遺伝子異常が存在するなどの可能性が考えられる。③については、特に数十塩基から数百キロ塩基程度の欠失ないし重複や、イントロン等翻訳領域以外の部分の変異が原因と考えられている。

本研究ではアレイCGH技術を利用して、CHD7遺伝子内の微小な遺伝子内欠失を網羅的に同定する方法を開発し、遺伝子診断の感度を向上させることができた。今後の研究推進において、CHD7変異陽性患者コホートの確保は不可欠であり、今回、遺伝子診断の精度の向上に成功したことは、今後の本研究の遂行のために、大きな意義を有していると考えられた。

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る。現在、原因遺伝子としてCHD7が同定されているが、変異が同定される症例は全体の70%程度とされている。われわれの先行研究でも日本人症例90例の変異解析をおこなったが、60例に変異が認められたが、30例には変異を認めなかった。全例に変異が同定されない理由として、① 患者がCHARGE症候群以外の疾患を有している、② CHD7遺伝子以外の原因遺伝子が存在する、③ 現在使われている遺伝子診断法(PCR-シーケンシング法)では検出し得ないタイプの遺伝子異常が存在するなどの可能性が考えられる。③については、特に数十塩基から数百キロ塩基程度の欠失ないし重複や、イントロン等翻訳領域以外の部分の変異が原因と考えられている。

本研究では、アレイCGH法を用いて、現在、検出が困難な種類のCHD7遺伝子変異の検出法の開発を進めた。アレイCGHの技術により、これまでの染色体解析では検出し得なかった微細な欠失が同定可能となった。

従来の染色体検査法よりも解像度が高い検査としてアレイCGH法検査が注目されている。ゲノム全領域に由来する数十塩基の配列をガラス板上に配置したマイクロアレイに、患者由来ゲノムDNAをハイブリダイズさせ、欠失や重複の有無を調べる技

術である。

B. 研究方法

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。ハイブリダイゼーションおよびデータの数値解析にはアジレント社のマイクロアレイシステムを利用した。QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN社)を用いて血液からDNAを抽出、その後アジレント社のダイレクト法プロトコルに沿ってサンプルを調整、65°C、40時間ハイブリダイゼーションを行い洗浄後スキャンし、これをFeature Extractionソフトウェアにて数値化した。Agilent Genomic Workbenchソフトウェアによって解析を行った。

個人情報の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 アレイCGH法解析

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。図1にアレイCGH解析により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を示す。図の左側が8番染色体長腕の中心体方向、右側が8番染色体長腕のテロメア方向、縦軸は、ゲノムコピー数である。異常のない部分のゲノムコピー数は2だが、図の中央部分のゲノムコピー数は1を呈し、当該領域内の遺伝子内欠失と判断した。

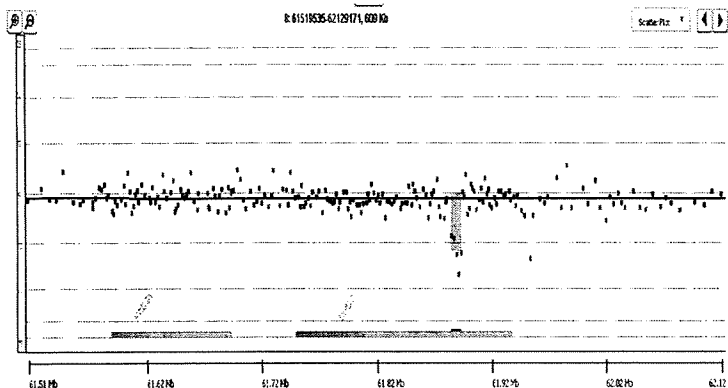


図1

D. 考察

アレイCGH技術および次世代シーケンサー技術を利用して、CHD7遺伝子内の微小な遺伝子内欠失やイントロン内の変異を網羅的に同定する方法を開発し、遺伝子診断の感度を向上させることができた。

今後の研究推進において、CHD7変異陽性患者コホート確保は不可欠であり、そのために今回、遺伝子診断の精度の向上に成功したことは、今後の本研究の遂行のために、大きな意義を有していると考えられた。本研究班活動の中で行った患者家族会のアンケート中で、遺伝子検査の有用性に関する質問を行ったところ、下記のような理由で遺伝子検査は有用との回答が得られている。

病名が確定できたことにより、療育や医療面でより積極的になれた/関わってくれる人に症状や先の見通しを説明しやすくなった/病名が確定していると、いろいろな情報に振り回されなくなるのが良い/他の病気ではないことがわかった。今まで複数の障害があるということで各科を単体で受診し、トータル的に診てくれる病院もなく、また適切な療育も受けられなかったが、確定診断がついたことで医療機関や療育園に対して、適切なサービスを受けていないことを説明できた/CHD7因子に変異があった事がわかり両親も同じ診断を受けて変異がなかった事など判った/兄弟児には遺伝的影響はないとわかったこと/現在まで、いろいろな病気が起きるのが疑問だったが、原因が分かってスッキリした。

今回、従来法より精度の高い遺伝診断法の開発に成功したことは、患者・家族にも還元可能な有用な結果であると考えます。先進医療への申請をはかり、研究成果の社会還元を図ってゆきたい。

E. 結論

アレイCGH技術を利用して、CHD7遺伝子内の微小な遺伝子内欠失を同定する方法を確立し、遺伝子診断の感度を向上させた。

F. 研究発表

1. 論文発表
 2. 学会発表
- 特になし

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 症候群の有病率に関する検討
研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科 岡本伸彦

研究要旨

主要な疾患の患者数との比較という方法で CHARGE 症候群の有病率と患者数の推測を試みた。その結果、CHARGE 症候群は出生 2 万から 3 万人に 1 人の有病率と推測された。全国では年間 40-60 例の新規患者が誕生していると考えられた。未診断例も多く存在すると考えられ、CHARGE 症候群をめぐる医療体制の充実が急務である。

A. 研究目的

CHARGE 症候群は下記に示す主要症候の頭文字からできた病名で、Pagon らによって疾患概念が確立した。染色体には異常なく、責任遺伝子 *CHD7* の異常による、先天異常症候群である。男女1:1の割合でみられる。診断基準はBlakeら¹⁾やVerloseら²⁾の記載がある。症状は多器官におよび、的確な診断により可能性のある合併症を早期に診断し対応することが患者のQOL向上に重要である。

C: coloboma of the eye 眼のコロボーマ

H: heart defect 心疾患

A: atresia of the choanae 後鼻孔閉鎖

R: retardation of growth and/or development 成長・発達の遅れ

G: genital and urinary abnormalities 外性器・尿路系異常

E: ear malformation and/or hearing loss 耳介奇形、聴力障害

CHARGE 症候群の有病率について、Issekutz ら³⁾は、カナダで出生 8,500 人に 1 人と報告した。欧米では 1 万人に 1 人程度といわれている。CHARGE 症候群はほとんどが新生突然変異であり、人種間の差はそれほど大きくないと思われるが、日本での有病率・患者数に関するデータは存在しない。CHARGE 症候群は特定疾患に指定されているわけでもなく、患者を正確に把握する方法は存在しない。しかし、有病率を明確にすることは、CHARGE 症候群に必要な医療供給体制の整備に重要である。小児専門病院の患者数から、大阪府域での CHARGE 症候群の有病率の推測を試みた。

B. 研究方法

大阪府立母子保健総合医療センターは大阪府の中核的な小児専門医療機関である。CHARGE 症候群のような多発先天異常症候群や外科系疾患を持つ小児は、専門的医療をもとめて受診するため、患者が集積する。比較的頻度の高い先天異常症候群やダウン症候群など、有病率に関するデータが存在する既知の疾患と比較することにより、およその有病率や患者数を推測できる。CHARGE 症候群の診断は診断基準¹⁾²⁾に基づいて行い、典型例のみを対象とした。最近の症例は *CHD7* 遺伝子診断を実施している例が多いが、過去の例は臨床診断によった。また、第2遺伝子変異の可能性もあるため、典型例であれば遺伝子診断で変異陰性の場合も診断を否定しなかった。臨床診断は分担研究者である岡本伸彦が実施した。遺伝子診断は研究代表者である慶應義塾大学小児科学小崎健次郎准教授の研究グループが実施した。

C. 研究結果

執筆者は 20 年の当センター勤務期間中に CHARGE 症候群患者を 20 例経験し、現在も 15 例をフォロー中である。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。

一方、有病率に関する文献データが存在し、比較

的頻度の高い他の先天異常症候群との有病率の比較を行った。当センターで20例のCHARGE症候群を診断したのと同じ期間に、22例のRubinstein-Taybi症候群(RTS)、48例のPrader-Willi症候群(PWS)、22例のSotos症候群(STS)、20例のWilliams症候群(WS)、21例のBeckwith-Wiedemann症候群(BWS)が受診した。PWSは主要な症候群の中では患者数が多く、他の症候群の2倍強であった。他4疾患とCHARGE症候群の患者数はほぼ同数であった。PWSは過去の報告で出生約12,000人に1人の有病率とされている。少なめの報告では25,000人に1人である⁴⁾⁵⁾。RTSに関する報告は少ないが、Hennekamらは、オランダで出生10万人から12万5千人に1人の有病率を報告した⁶⁾。STSはGene testsに14,000人に1人という記載があるが、日本での罹患率の報告はない。WSは一般的に20,000人に1人程度とされている。WSはノルウェイでは7500人に1人という報告⁷⁾があるが、日常臨床ではそれほど多くない印象が強い。WSも日本での有病率の報告はない。BWSはジャマイカでは13,700人に1人という報告⁸⁾があり、日本ではこれと軽症例を含めるとやや多いと考えられている。これから推測を行うとCHARGE症候群の有病率は出生2万から3万人に1人と推測される。日本の出生数を110万人とすると、年間40-60名程度のCHARGE症候群が出生していることになる。なお、経過観察中に2例の死亡例を経験した。

D. 考察

ある疾患の患者数を把握することは、特定疾患などでは登録患者数を調査により可能である。しかし、CHARGE症候群のような稀少な疾患においては悉皆調査は困難である。医療機関ごとの患者数は把握可能であるが、稀少疾患では一般の小児医療機関では正確な診断がついていない場合も少なくない。多数の患者が集積する専門医療機関での患者数からの推測は有用な手段となる。諸外国においてもCHARGE症候群の有病率に関する報告は少ない。Issekutzらは、カナダで出生8,500人に1人の有病率を報告した。欧米では1万人に1人程度といわれている。今回の検討結果と比較すると欧米の有病率は若干多めである。ほとんどの症例が新生突然変異であるので、人種間による有病率の差はほとんどないと予想されるので、未診断例が存在する可能性は否定できない。今回の調査の対象は大阪地区であるが、他の地域での同様な調査と比較することにより、CHARGE症候群の有病率はさらに正確に推測できると考えられる。

表 主要な先天異常症候群の出生年別患者数 (大阪府立母子保健総合医療センター患者統計)

症候群 出生年	CHARGE 症候群	Rubinstein- Taybi 症候群	Prader- Willi 症候群	Sotos 症候群	Williams 症候 群	Beckwith- Wiedemann 症候群
2005-	7	6	8	5	4	5
2000-2004	2	7	16	5	3	7
1995-1999	6	5	10	5	9	4
-1994	5	4	14	7	4	5
合計	20	22	48	22	20	21

E. 結論

今回の検討において、日本における CHARGE 症候群の罹患率は出生 2 万から 3 万人に 1 人と推測された。全国では年間 40-60 名程度の CHARGE 症候群を持つ小児が出生していることになる。一部の小児期死亡例もあるが、成人例も多数知られており、CHARGE 症候群患者は全国で数千人存在すると考えられる。CHARGE 症候群の概念が小児医療で浸透してきたのは最近 20 年ほどであるので、正確な診断を受けていない成人例が多いと思われる。

CHARGE 症候群は生後早期に診断して関連各科で適切な対応をすすめる体制構築が必要である。人工内耳手術の適応例も今後増加すると考えられる。患者の QOL 向上のためさまざまな工夫が必要な疾患である。長期的な予後の把握のための継続的な研究が必要である。

引用文献

- 1) Blake KD, Davenport SL, Hall BD, Hefner MA, Pagon RA, Williams MS, Lin AE, Graham JM. CHARGE association: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)*. 1998; 37: 159-73.
- 2) Verloes A. Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: a proposal. *Am J Med Genet A*. 2005; 133A: 306-8.
- 3) Issekutz KA, Graham JM, Prasad C, Smith IM, Blake KD. An epidemiological analysis of CHARGE syndrome: preliminary results from a Canadian study. *Am J Med Genet A*. 2005; 133A: 309-17.
- 4) Smith A, Egan J, Ridley G, Haan E, Montgomery P, Williams K, Elliott E. Birth prevalence of Prader-Willi syndrome in Australia. *Arch Dis Child*. 2003 ;88:263-4.
- 5) Vogels A, Van Den Ende J, Keymolen K, Mortier G, Devriendt K, Legius E, Fryns JP. Minimum prevalence, birth incidence and cause of death for Prader-Willi syndrome in Flanders. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:238-40.
- 6) Hennekam RC, Van Den Boogaard MJ, Sibbles BJ, Van Spijker HG. Rubinstein-Taybi syndrome in The Netherlands. *Am J Med Genet Suppl*. 1990b; 6: 17-29.
- 7) Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol*. 2002 ;17:269-71.
- 8) Thorburn MJ, Wright ES, Miller CG, Smith-Read EH. Exomphalos-macroglossia-gigantism syndrome in Jamaican infants *Am J*

Dis Child. 1970 ;119:316-21.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Otomo T, Muramatsu T, Yorifuji T, Okuyama T, Nakabayashi H, Fukao T, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okamoto N, Inui K, Ozono K, Sakai N. Mucopolipidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet*. 54 , 145-51 2009
- 2). Hilton E, Johnston J, Whalen S, Okamoto N, Hatsukawa Y, Nishio J, Kohara H, Hirano Y, Mizuno S, Torii C, Kosaki K, Manouvrier S, Boute O, Perveen R, Law C, Moore A, Fitzpatrick D, Lemke J, Fellmann F, Debray FG, Dastot-Le-Moal F, Gerard M, Martin J, Bitoun P, Goossens M, Verloes A, Schinzel A, Bartholdi D, Bardakjian T, Hay B, Jenny K, Johnston K, Lyons M, Belmont JW, Biesecker LG, Giurgea I, Black G. BCOR analysis in patients with OFCD and Lenz microphthalmia syndromes, mental retardation with ocular anomalies, and cardiac laterality defects. *Eur J Hum Genet* 1325-35 2009
- 3). Hosokawa S, Takahashi N, Kitajima H, Nakayama , Kosaki K, Okamoto N. A case of Brachmann-de Lange syndrome with congenital diaphragmatic hernia and NIPBL gene mutation. *Congenit Anom (Kyoto)*. in press ,2010
- 4). Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillissen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat (in press)*,2010
- 5). 岡本伸彦: 遺伝学的検査アップデート_小児科 50 834-841,2009
- 6). 岡本伸彦: EEC症候群 小児内科 41 295-297 ,2009
- 7). 岡本伸彦: 胎児ヒダントイン症候群 /胎児バルプロ酸症候群 小児内科 41 312-314,2009

2. 学会発表

- 1). Char 症候群双生児例 日本小児遺伝学会
2009年 奈良市
大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科
岡本伸彦
- 2). 小頭症・橋小脳低形成を呈する CASK 異常症の
臨床像 日本小児神経学会 2009年
米子市
大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科
岡本伸彦
東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺
伝 林 深 井本逸勢 稲澤譲治
森之宮病院 小児神経科 平井聡里 青天目信
荒井洋
旭川医科大学 教育センター 蒔田芳男
- 3). CADPS2ハプロ不全と広汎性発達障害 日本人
類遺伝学会 2009年 東京都
岡本伸彦 松田圭子 秋丸憲子
大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科
山本俊至 下島圭子
東京女子医科大学国際統合医科学
- 4). アレイCGHで診断された1p34.3微細欠失例 日
本人類遺伝学会 2009年 東京都
大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科
岡本伸彦
東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺
伝 林 深 井本逸勢 稲澤譲治
旭川医科大学教育センター 蒔田芳男
千葉大学大学院医学研究院公衆衛生 羽田 明
- 5). 遺伝子診療学会 2009年 札幌市
RAF1遺伝子変異を同定した Noonan 症候群3例の
臨床像と遺伝カウンセリング
大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療
科 岡本伸彦 松田圭子 秋丸憲子
東北大学医学系研究科遺伝病学分野 青木洋子、
小林朋子、松原洋一

G. 知的財産権の出願・登録

なし

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及び遺伝子診断の意義についての検討

研究分担者 水野誠司 愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部長

研究要旨

CHARGE 症候群は虹彩欠損(Coloboma of iris)、先天性心疾患(Heart disease)、後鼻孔閉鎖(Atresia choanae) 成長障害及び精神遅滞(Retarded growth and mental development)、性器低形成(Genital hypoplasia)、耳介奇形と難聴(Ear anomalies and deafness)を特徴とする、1981年にその頭文字を取って命名された先天奇形症候群である。従来その診断は複数の臨床的所見の評価による診断基準を元に行われている。2004年にその原因遺伝子としてCHD7が同定された以後は遺伝子診断を受ける患者も増加し、その診断方法についての患者家族を取り巻く状況も変化している。今回患者団体の協力を得て、従来の診断基準項目の陽性率の検討、及び遺伝子検査を受けた患者家族の結果の受け止め方について検討した。

A. 研究目的

CHARGE 症候群は複数の感覚器、多臓器にわたる奇形を特徴とする先天異常症候群である。

従来から複数の合併奇形の評価によるさまざまな診断基準案が提唱されており、現在ではもっとも一般的に広く認められた診断基準として Blake の基準が存在する(表)。2004年に原因遺伝子 CHD7 の同定後、従来 Blake の基準によって臨床診断された CHARGE 症候群患者においても CHD7 変異陽性例と変異陰性例の両者において臨床症状の差が見られることが明らかになった。遺伝学的に均一である変異陽性例をより正確に臨床診断するために再度診断基準の見直しが求められている。今回患者会協力を得て行ったアンケートにおいて、Blake の基準の各々についての陽性率について検討し、今後の新たな診断基準策定の基礎資料とする。また同時に行った遺伝子検査についてのアンケートについても集計し、遺伝子診断が患者家族にとって有用であるかを検討する。

(表) Blake の診断基準

Blakeらは、下記において4つの大基準、もしくは3つの大基準と1つ以上の小基準を満たすものをチャージ症候群(Possible CHARGE Syndrome)とすると提唱した(1998年)

大基準

眼科領域のコロボーマ
後鼻孔閉鎖
典型的な耳の奇形(内耳、中耳、外耳含む)
脳神経異常

小基準

性器の低形成
発達遅滞
心血管奇形

成長障害

口唇口蓋裂
気管食道瘻
特徴的顔貌

B. 研究方法

CHARGE 症候群の全国的な患者家族のサポートグループである「CHARGE の会」の会員宛にアンケートを送付し、アンケート中の下記の項目について検討する

1. 患者会のアンケート全集計結果から Blake の診断基準の各項目に相当する症状を有する人数を集計。
2. 患者会に属する患者のうち変異陽性例の個々の患者が Blake の基準を満たしているかどうかを検討する。
3. 患者家族アンケートにおいて遺伝子診断の意義についての設問(下記)について集計検討する。

質問項目

1. 遺伝子診断を受けていますか
遺伝子診断を受けた患者につき
- 2-a 遺伝子変異はありましたか
- 2-b 遺伝子診断を受ける前に、十分な説明を受けたり疑問点を聞いたりする機会がありましたか
(複数可)
 - ・一般診療とは別の場で「遺伝カウンセリング」を受けた
 - ・内容や疑問点に対して十分な説明を受けた
 - ・十分ではないがある程度の説明を受けた。
 - ・説明はわずかで疑問点が残った。
 - ・説明を受けなかった

- 2-c1 受けて良かったと思われることは何ですか。
 2-c2 遺伝子診断を受けて戸惑ったことはありますか。それは何ですか。

(倫理面への配慮)

遺伝学的検査は2003年8月の遺伝医療関連10学会編「遺伝学的検査に関するガイドライン」、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守して実施した。

C. 研究結果

1. Blakeの基準の各項目の陽性率 アンケート回答数 57名

大基準

眼科領域のコロボーマ	50名	(88%)
後鼻孔閉鎖、狭窄	27名	(47%)
特徴的な耳の奇形(内耳、中耳、外耳含む)		
難聴	55名	(96%)
平衡障害	37名	(65%)
外耳奇形	47名	(82%)

脳神経異常

顔面神経麻痺	43名	(75%)
嗅覚異常	12名	(21%)

小基準

外性器(男)の低形成	25名	(86%)
発達遅滞	未集計	
心血管奇形	42例	(74%)
成長障害	未集計	
口蓋裂	19例	(33%)
気管食道瘻 食道閉鎖	9例	(16%)

2. 変異陽性例患者における Blakeの基準合致の検討

回答総数 57件中遺伝子診断を受けた患者数 26例、変異陽性数 16例であった。

大症状 4	9例
大症状 3+小症状 3以上	6例
大症状 2+小症状 3	1例

3. 患者家族アンケートにおける遺伝子診断の意義

質問 1 遺伝子診断を受けた 26例

質問 2a 遺伝子変異あり 16例

質問 2b. 遺伝子診断を受ける前に、十分な説明を受けたり疑問点を聞いたりする機会があったか

- ・一般診療と別の場で遺伝カウンセリングを受けた5件
- ・内容や疑問点に対して十分な説明を受けた

21件

- ・十分ではないがある程度の説明を受けた 6件
- ・説明はわずかで疑問点が残った 0件
- ・説明を受けなかった 0件

質問 2-c1 遺伝子診断を受けて良かったこと一回答
 ・関わってくれる人に症状や先の見通しを説明しやすくなった。

- ・病名が確定していると、いろいろな情報に振り回されなくなるのが良い。
- ・遺伝子変異によるCHARGE連合だと確定したので原因がわかって、とりあえず納得した。
- ・今まで複数の障害があるということで各科を単体で受診し、トータル的に診てくれる病院もなく、また適切な療育も受けられなかったが、確定診断がついたことで医療機関や療育園に対して、適切なサービスを受けていないことを説明できた。
- ・今後どのような問題が出てくるのか情報があれば予測を立てる事が出来る事。
- ・CHARGEと確定できたことで他の病気についても何をすべきか考えてもらえるようになった。
- ・今後何らかの発見があった時に本人に有益なことがあると思う
- ・病名が確定できたことにより、療育や医療面でより積極的になれたこと。
- ・将来的なビジョンが持てるようになったこと。
- ・兄弟児には遺伝的影響はないとわかったこと。
- ・CHARGEという病名がわかるまでに9年もかかったので遺伝子診断の結果を聞いて今までの症状に納得できた。
- ・CHARGEと診断されはっきりして安心した。
- ・原因が分かってすっきりした。

質問 2-c2 遺伝子診断を受けて戸惑ったこと一回答
 ・親としてはCHARGEだと思っていたので気持ち的には何も変わらなかった。

- ・兄弟には、遺伝しないときちんと説明頂いたが心のどこかにひっかるのか未だに一人っ子で兄弟ができない。
- ・CHARGEと認めたくなかったのが決定されたこと。
- ・CHARGE症候群として、トータル的に診てもらえる医療機関が欲しい。各病院各診療科で検査が重複することがある。

D. 考察

CHARGE症候群の診断基準は当初Pagonらが提唱した7つの頭文字を持つ特徴所見に始まり、今回示したBlakeの基準、そしてその後もさらにいくつかの修正案が提示されている。2004年にCHARGE症候群の原因遺伝子としてCHD7が同定された後に変異陽性例の臨床情報が明らかになると、従来の診断基準は必ずしも変異陽性例に対しての特異度が高くないことが示された。

Blake の基準は、内耳奇形による難聴と脳神経異常としての聴神経異常による難聴をできないことや、合併率が少なくない平衡感覚異常についての言及が無いなど改善の余地があると考えられる。変異陽性例において1例は Blake の基準を満たしていない。

今回の我々の検討では、変異陰性例の症例別の検討が行われなかったために感度や特異度の検討はできなかった。しかし従来の診断基準には含まれないが、比較的多くの患者に認められる所見、年齢により合併症の存在が明らかになる所見、新たな診断技術で診断可能となる所見など、時代とともに診断基準を改訂する必要があると考えられた。

家族アンケートによる調査の限界として、あくまでも医師から説明を受けている範囲でしか認識していないこと、耳介奇形などは専門知識が無いと正常と異常の区別が困難なことなどがある。

遺伝子診断を受けた意義についての回答では、遺伝子診断を受ける前の説明や同意の手続きについては、概ね事前に良好な場を設けられていたと推測される。

確定診断を受けて将来へ向けてのビジョンが持てる、より適切な医療を受けられる、同胞への遺伝的な影響がないことが分かったなど多くが肯定的な受け止め方であると考えられた。

一方で、遺伝子診断を受けた後も兄弟への影響を心配している人もあり、診断後の医療側の説明や対応が不十分な例もあると考えられ、今後の課題である。

E. 結論

変異例一例において CHARGE 症候群の従来の診断基準を満たしておらず、診断基準については常に再評価し検討を加えてより特異度の高いものにする必要があると考えられる。

遺伝子検査は、比較的良好な手続きにより行われており、患者家族の多くが有意義であると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

59th Annual Meeting of American Society of Human Genetics. Honolulu, USA. Oct 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

研究分担者 工藤純

慶應義塾大学医学部 遺伝子医学研究室 教授

研究要旨

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る。現在、原因遺伝子としてCHD7が同定されているが、変異が同定される症例は全体の70%程度とされている。全例に変異が同定されない理由として、① 患者がCHARGE症候群以外の疾患を有している、② CHD7遺伝子以外の原因遺伝子が存在する、③ 現在使われている遺伝子診断法(PCR-シーケンシング法)では検出し得ないタイプの遺伝子異常が存在するなどの可能性が考えられる。③については、特に数十塩基から数百キロ塩基程度の欠失ないし重複や、イントロン等翻訳領域以外の部分の変異が原因と考えられている。

本研究ではイントロンに変異があることが知られ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遺伝子のゲノム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。アレイCGH技術および次世代シーケンサー技術を利用して、遺伝子内の各塩基を網羅的に同定する方法を開発し、遺伝子診断の感度を向上させることができた。今後の研究推進において、CHD7変異陽性患者コホートの確保は不可欠であり、今回、遺伝子診断の精度の向上に成功したことは、今後の本研究の遂行のために、大きな意義を有していると考えられた。

研究協力者

清水 厚志(慶應義塾大学医学部分子生物学教室)

小崎 健次郎(慶應義塾大学医学部小児科学教室)

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る。現在、原因遺伝子としてCHD7が同定されているが、変異が同定される症例は全体の70%程度とされている。われわれの先行研究でも日本人症例90例の変異解析をおこなったが、60例に変異が認められたが、30例には変異を認めなかった。全例に変異が同定されない理由として、① 患者がCHARGE症候群以外の疾患を有している、② CHD7遺伝子以外の原因遺伝子が存在する、③ 現在使われている遺伝子診断法(PCR-シーケンシング法)では検出し得ないタイプの遺伝子異常が存在するなどの可能性が考えられる。③については、特に数十塩基から数百キ

ロ塩基程度の欠失ないし重複や、イントロン等翻訳領域以外の部分の変異が原因と考えられている。

本研究では、次世代シーケンサーを用いて、現在、検出が困難な種類のCHD7遺伝子変異の検出法の開発を進めた。次世代シーケンサーの技術により、これまでのサンガー法による配列解析技術とは比較にならないほどの膨大なデータを得ることが出来るようになったものの、全ゲノムを丸ごと解読する手法では、目的遺伝子領域の遺伝子変異の検出率を高めるためにゲノム全体を何十倍もカバーするだけのシーケンスデータを獲得する必要が生じ、時間、コストが増大するという問題があった。本研究では最近開発されたゲノム上の特定領域をエンリッチする技術を用いてコストの削減と検出率の向上の達成を目指した。

B. 研究方法

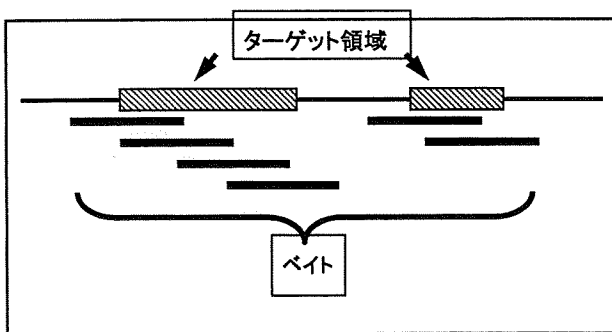
Sanger法により点変異があることが分かっている検体について、次世代シーケンサーを用いて、再解析した。CHD7遺伝子領域をエンリッチするベイト(ゲノム上のターゲット領域に相補的な配列を持つ120bpのシングルオリゴシーケンス)を設計し、SureSelectターゲットエンリッチメントシステムを用いた次世代シーケンサーの有用性を確認した。

個人情報の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 SureSelect eArrayによるベイトの設計

ベイトの設計には、アジレント社が提供しているウェブサイト(eArray: <https://earray.chem.agilent.com/earray/>)を利用して行った。CHD7遺伝子領域にたいして2×tilingになるようにベイトを設計した。また今回使用する次世代シーケンサーは、イルミナ社のGenome Analyzerであることからそれに対応した条件を選択した。設計したベイトはアジレント社においてビオチン化されたcRNAベイトにされ次のステップで必要な他の試薬とともにcRNAベイトライブラリが納品された。(図1)



② SureSelectターゲットエンリッチメントシステムを用いた特定領域の濃縮

CHD7遺伝子上に点変異を有することが判明しているゲノムDNA(NA18972: Coriell Institute)を用いた。ゲノムDNAをアコースティックソルビライザー(Covaris)によって断片化し、SureSelectプロ

を回収しそれを次世代シーケンシングに用いた。

③ Genome Analyzerによるシーケンシング

SureSelectターゲットエンリッチメントシステムによって得られたサンプルを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箇所に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。(付表)

D. 考察

次世代シーケンサー技術を利用して、イントロン等翻訳領域以外の部分も含めて変異を網羅的に同定する方法を開発し、遺伝子診断の感度を向上させることができた。

今後の研究推進において、CHD7変異陽性患者コホート確保は不可欠であり、そのために今回、遺伝子診断の精度の向上に成功したことは、今後の本研究の遂行のために、大きな意義を有していると考えられた。本研究班活動の中で行った患者家族会のアンケート中で、遺伝子検査の有用性に関する質問を行ったところ、下記のような理由で遺伝子検査は有用との回答が得られている。
病名が確定できたことにより、療育や医療面でより積極的になれた/関わってくれる人に症状や先の見通しを説明しやすくなった/病名が確定していると、いろいろな情報に振り回されなくなるのが良い/他の病気ではないことがわかった。今まで複数の障害があるということで各科を単体で受診し、トータル的に診てくれる病院もなく、また適切な療育も受けられなかったが、確定診断がついたことで医療機関や療育園に対して、適切なサービスを受けていないことを説明できた/CHD7因子に変異があった事がわかり両親も同じ診断を受けて変異がなかった事など判った/兄弟児には遺伝的影響はないとわかったこと/現在まで、いろいろな病気が起きるのが疑問だったが、原因が分かってスッキリした。
今回、従来法より精度の高い遺伝診断法の開発に成功したことは、患者・家族にも還元可能な有用な結果であると考え。先進医療への申請をはかり、研究成果の社会還元を図ってゆきたい。

E. 結論

マイクロアレイ技術を利用して、次世代シーケンサーを用いて網羅的に点変異を同定する方法を開発し、遺伝子診断の感度を向上させた。

F. 研究発表

- 1. 論文発表
- 2. 学会発表
特になし

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

（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。

（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。

（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。

（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。

（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。



（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。

（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。

（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。

（注）本報告書の記載内容は、調査時点での状況に基づき記載しております。調査時点から調査終了までの間に発生した変更については、本報告書の記載とは異なる場合があります。

付 表

Coordinates	Codons	Transcript ID	Protein ID	Substitution	Region	dbSNP ID	SNP Type
8,61655690,1,G/A	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron2	rs7836586	-
8,61693412,1,C/A	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron2	rs6471901	-
8,61707725,1,G/A	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron4	rs4540437	-
8,61713133,1,A/T	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron5	rs77952475	-
8,61713231,1,C/A	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron5	rs3890803	-
8,61714245,1,A/G	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron6	rs10448027	-
8,61732521,1,A/G	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron8	rs6471902	-
8,61734295,1,A/G	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron9	rs4509369	-
8,61748893,1,C/A	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron16	rs7005873	-
8,61750860,1,A/G	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron19	rs7844902	-
8,61764076,1,A/G	-	ENST00000307121	ENSP00000307304	NA	Intron28	rs4342642	-
8,61769195,1,A/G	ACA-AC _g	ENST00000307121	ENSP00000307304	T2452T	EXON CDS	rs2272727.G	Synonymous

CHARGE 症候群の眼合併症と視覚障害に関する研究

研究分担者 仁科 幸子 国立成育医療センター眼科医員

研究要旨：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。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。

A. 研究目的

CHARGE 症候群の眼科的合併症と視覚障害に関する実態調査を行い、眼合併症の眼科的管理、及び療育・教育の現状と問題点について検討する。

さらに CHD7 遺伝子変異陽性例を対象として、眼異常の合併率と詳細な臨床像を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) 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、眼合併症の有無、視力・視野障害、羞明、色覚障害の有無、眼鏡・光学的補助具の使用状況、眼科通院状況など、眼合併症と視覚障害の実態を書面にて調査・検討した。また、障害者手帳取得、視覚訓練、視覚特別支援学校との関わりなど福祉や療育・教育に関する側面についても調査した。
- 2) CHD7 遺伝子変異陽性例に対する二次調査の一環として、班員の在籍施設（大阪府立母子保健総合医療センター、愛知県心身障害者コロニー中央病院、神奈川県立こども医療センター）における変異陽性例の眼合併症の調査を実施した。眼異常の合併率のほか、視力、屈折、コロボーマの範囲、黄斑部欠損、併発症の有無など詳細に検索し、臨床像を検討した。

（倫理面への配慮）

慶應大学倫理委員会の承認を得て、研究代表者によって二次調査が実施され、取りまとめられた。

C. 研究結果および考察

1) 眼合併症・視覚障害の実態調査

患者・家族会を対象としたアンケート調査によって CHARGE 症候群患者計 57 名の回答を得た。患者年齢によって 0～3 歳（A 群）15 名、4～6 歳（B 群）14 名、7～12 歳（C 群）18 名、13～18 歳（D 群）4 名、19 歳～（E 群）6 名に区分し、検討した。

眼科疾患のある例は A 群 80%、B 群 100%、C 群 83%、D 群 100%、E 群 100% であったが、うち両眼に器質的眼合併症をもつ視覚障害児（者）は A 群 53%、B 群 71%、C 群 50%、D 群 75%、E 群 67% であった。全群とも光覚～0.2 の重篤な視力障害の占める比率が高いが、視力障害が軽度であっても視野障害（44～83%）、羞明（44～75%）を訴える比率は高かった。一方、色の識別に障害をもつ例は少なかった。

全群を通じて眼科疾患のある例は眼科に定期的に通院し管理されている例が大部分を占めた。B 群（4～6 歳）では屈折矯正眼鏡の使用例が 57% に上り、保有視機能の発達を促す弱視治療が積

極的に行われていることが示唆されたが、A群(0~3歳)では7%と少なく、視覚障害の把握も十分ではなかった。重複障害児であっても、感受性の高い乳幼児期に積極的に視機能の評価、弱視治療を行い、ロービジョンケアを開始することが重要な課題である。

また全群を通じて、乳幼児期や学童期に視覚訓練や視覚特別支援学校において専門的指導を受けた例の比率が7~25%と予想以上に低かった。重複障害児に対する医療、療育・教育の連携体制を作ることが急務である。B群以降の補助具(ルーペ、単眼鏡、拡大読書器、遮光眼鏡)使用例の比率も0~33%と低かった。適切な補助具を早期に選定するケアを充実していくとともに、もっと有効に活用し得る補助具を開発していく必要がある。

2) CHD7 遺伝子変異陽性例の二次調査

現在までに、大阪府立母子保健総合医療センター、愛知県心身障害者コロニー中央病院、神奈川県立こども医療センターにおける眼合併症の二次調査が進み、計19例38眼の検索結果が得られている。年齢は1~21歳である。

眼異常の合併率は18例(94.7%)と高率であり、うち両眼性が16例(84.2%)、片眼性が2例(10.5%)であった。

視力測定可能な例は17例で、その分布は0.02未満3例、0.02以上0.1未満6例、0.1以上0.3未満2例と0.3未満の視力障害を11例65%にきたしており、0.3以上の視力を得たものは6例35%であった。

CHARGE症候群の代表的な眼所見とされている眼底の網脈絡膜コロボーマは32眼(84.2%)に合併しており、視神経乳頭コロボーマの合併も33眼(86.8%)と高率であった。一方、前眼部の虹彩コロボーマの合併は2眼(5.3%)のみであった。黄斑欠損・部分欠損は21眼(55.3%)に上った。視神経及び黄斑欠損が、多くの例に重篤な視覚障害をきたす原因と考えられた。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ることが示唆された。

他の眼合併症として小眼球(疑い例含む)8眼(21.1%)、小角膜(疑い例含む)7眼(18.4%)、第一次硝子体過形成遺残1眼(2.6%)を認めた。後眼部・眼底に比較して前眼部の合併所見は少ないが、CHD7遺伝子変異陽性例において、全眼球に及ぶ先天異常をきたし得ることが示唆された。虹彩-網脈絡膜コロボーマは胎齢6週頃の胎生裂閉鎖不全が主因とされているが、広汎

なコロボーマに加えて視神経乳頭や黄斑の欠損例が多く、小眼球の合併例もあることから、初期に高度の発生異常が生じていると推定される。併発症は白内障1眼のみで、緑内障や網膜剥離など重篤な併発症は認めなかった。低年齢の患者が多数を占めるためとも考えられるが、CHD7遺伝子変異陽性例の一つの特徴かもしれない。

D. 考察・今後の展望

1) 眼合併症・視覚障害の実態調査

患者・家族会へのアンケート調査にて総計57例の回答が得られ、眼合併症と視覚障害に関しても、これまでに類のない詳細な実態調査を行うことができた。その結果、前述のように、重複障害児(者)に対する視覚訓練やロービジョンケアの遅れが浮き彫りとなり、視覚障害に対する医療や福祉・教育における問題点も明らかとなった。今後、重複障害児(者)に対する効果的なロービジョンケアの方法を開発し、医療・療育・教育の連携体制を作ることが、重篤な眼合併症をもつCHARGE症候群、さらには他の全身症候群の小児・成人の社会参加を進めるうえで急務の課題である。

本研究班は、全身各種合併症の専門医によって構成され、患者・家族会との連携も取れている。今回の実態把握に基づき、重複障害児に対して、協調して効率よく医療・社会的課題を解決していく体制をつくりたい。

2) CHD7 遺伝子変異陽性例の二次調査

CHD7遺伝子変異陽性例の眼合併症の二次調査では現在までに19例38眼の検索が進んでおり、遺伝子診断に基づく正確な臨床像が明らかとなりつつある。

これまでにCHARGE症候群における眼異常の合併率は約80%との報告があるが

(Russell-Eggitt IM, Blake KD, et al. Br J Ophthalmol 1990)、眼合併症に関する多数例の詳細な報告はきわめて少ない(Chestler RJ, Ophthalmology 1988)。また2004年に原因遺伝子として明らかにされたCHD7遺伝子の変異例の眼合併症の報告は1例のみである(Holak HM, Ophthalmic Genet 2008)。本研究では、CHD7遺伝子診断に基づく眼合併症の詳細な検索を進めており、国内外において学術的に有意義な成果となると考えられる。

CHD7遺伝子診断に基づく眼合併症の研究を進めることによって、その病態を解明し、よりよい治療法を開発することが今後の課題である。

E. 結論

CHARGE症候群の眼合併症と視覚障害に関する実態調査によって、乳幼児期からの重篤な視覚障害に対する医学的、福祉・教育的なケアの重要性が明らかとなった。

CHD7遺伝子変異陽性例に対する検索の結果、遺伝子診断に基づいた眼合併症の臨床像が世界に先駆けて解明されつつある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki Y, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Congenital rotated macula with good vision and binocular function. *Jpn J Ophthalmol*, 53: 452-454, 2009
2. Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Wu J, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull*, 32: 999-1003, 2009
3. 仁科幸子、横井匡、横井多恵、小林百合、野田英一郎、東範行. 乳幼児眼疾患の発見・受診経路と初診時期. *眼科臨床紀要* 3: 172-177, 2010
4. 伊藤里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東範行. 液晶視力表システムチャートSC-2000によるロービジョン児のコントラスト視力測定と遮光レンズの効果. *眼科臨床紀要* 3: 70-73, 2010
5. 仁科幸子. 視神経無形成. *眼科* 52: 205-209, 2010
6. 仁科幸子. 眼科における先天異常—網膜硝子体疾患. *眼科* 51: 755-764, 2009
7. 仁科幸子. 乳幼児健診とその周辺—眼科の問題. 重症眼疾患を早期に発見するために. *小児科診療* 62: 2748-2754, 2009
8. 仁科幸子. ケーススタディ乳児の眼鏡. *あたらしい眼科* 26: 753-740, 2009
9. 仁科幸子. 乳児の眼鏡. *日本視能訓練士協会誌* 38: 71-76, 2009

2. 学会発表

1. Nishina S, Suzuki Y, Yokoi T, Kobayashi Y, Noda E, Azuma N. Clinical Features and Pathogenesis of Congenital Retinal Fold. Annual Meeting of American Academy of

Ophthalmology, San Francisco, USA, 2009.10

2. 仁科幸子、横井匡、横井多恵、小林百合、野田英一郎、東範行. 乳幼児眼疾患の発見・受診経路と初診時期. 第65回日本弱視斜視学会総会・第34回日本小児眼科学会総会合同学会, 大阪, 2009.6
3. 伊藤里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東範行. 液晶視力表によるロービジョン児のコントラスト視力測定と遮光レンズの効果. 第65回日本弱視斜視学会総会・第34回日本小児眼科学会総会合同学会, 大阪, 2009.6
4. 仁科幸子. 小児IOLの適応. 第48回日本白内障学会総会・第24回日本眼内レンズ屈折手術学会総会, 東京, 2009.6
5. 仁科幸子. 先天性眼疾患の診断と治療. *眼科診療アップデートセミナー*, 東京, 2009.7
6. 仁科幸子. 乳幼児の眼疾患とそのケア. 九州ロービジョンフォーラム, 大分, 2009.8
7. 仁科幸子. 乳幼児眼疾患の早期発見と治療. 第568回日本小児科学会東京都地方会講演会, 東京, 2009.9
8. 仁科幸子. 小児の眼科診療の進め方. 北海道眼科医会北海道ブロック講習会, 札幌, 2009.9
9. 仁科幸子. 小児眼科のABCそしてDへ. 第63回日本臨床眼科学会, 福岡, 2009.10
10. 仁科幸子. 小児眼内レンズの安全性を求めて. 第63回日本臨床眼科学会, 福岡, 2009.10
11. 伊藤里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東範行. 液晶視力表によるロービジョン児のコントラスト視力測定. 第63回日本臨床眼科学会, 福岡, 2009.10
12. 仁科幸子. 小児の視覚障害、その原因疾患. 福島県ロービジョンネットワーク第3回フォーラム, 郡山, 2009.11
13. 仁科幸子. 小児白内障手術の術後管理. 第33回日本眼科手術学会, 東京, 2010.1

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし