

れたこと、Admixed Embryo (いわゆる Hybrid 胚)の作成が認められたこと、提供配偶子による出生子が 16 歳になると出自情報を請求できること、などがある。

Part 2 は新規部分で、ART における両親規定に関する部分である。たとえば、母親の定義は、胚移植などにより子どもを妊娠している、あるいは妊娠した女性である。一方、父親の定義は婚姻した、あるいは父親になることを同意した男性である。ただし、父親ははじめから存在せず、別の女性がもう1人の親となることも可能となった。なお、この Part 2 のみは、2009 年 4 月から既に前倒して施行されている。Part3 は、その他の項目から構成される。たとえば、サロゲートに関する項目などである。

HFEA の責任者らの発言を整理すると、英国における、これら HFE 法改正ポイントの背景には、いくつかの重要な要因があると考えられる。

まず、旧 HFE 法施行から 20 年近くが経過し、社会の ART への態度や受入が変わったことはもちろんであるが、法律や社会そのものの規範が、この間に大きく変化したことが重要と考えられる。たとえば、EU 憲法に適合させるべく改訂された新しい Human Rights Act へ対応させることであり、今回改訂の主要部分の一つである、「父親の必要性」の削除がこれに相当する。また、提供配偶子により出生した子の出自を知る権利もここに

含まれる。

一方、医学・科学の進歩発展により、過去において知られていなかった、あるいは必要度や重要度がさほど高くなかった分野の研究が新たに注目されたことがある。その例は、胚研究における Hybrid 胚作成の解禁である。

## 2) COP の改正

COP は旧 HFE 法のもとで第 7 版まで改訂されてきた。特に第 7 版への改訂は比較的大規模な改訂であった。COP を発行する目的について、8 版の冒頭にはこう記載されている。「HFE 法は、ヒトに対しての精子、卵子及び胚の使用と保管に適用されるとともに、生存するヒト胚及び admixed 胚の使用を含むすべての研究に適用される。この法律に従うライセンスを与えられたセンターを HFEA が援助する一つの方法が COP の出版することである。」と述べ、COP は実際、HFE 法に基づく、HFEA によるライセンスを受けたセンターの管理原則と、指導の手引き、用語集からなっている。各クリニックにとって、いわば ART 治療と施設管理における「憲法」のような存在が、COP であるといえる。

COPの内容を目次に沿って記載すると表1のようになる。なお、COPに用いられている英語は、第7版までの、理解困難な法律的な厳密さを最優先した記述法から、第8版では大きく変更され、Plain Language Commission から Clear English

Standard を受賞した文書となり、きわめて理解しやすい好ましい文書になった。

使用ガイド
ライセンスを受けたセンターの管理原則
指導の手引き
スタッフ
1 責任者
2 スタッフ
カウンセリング
3 カウンセリング
情報提供と同意取得
4 同意取得前に提供されるべき情報
5 治療、保管、提供、情報開示への同意
6 法的親子関係
多胎分娩
7 多胎分娩
子どもの福利
8 子どもの福利
胚生検
9 着床前遺伝スクリーニング(PGS)
10 着床前診断と性別選択
提供とサロゲート
11 ドナー募集、評価、スクリーニング
12 エッグシェアリングの合意
13 ドナーへの支払い
14 サロゲート
配偶子と胚の使用
15 配偶子と胚の入手、処理、運搬
16 輸入と輸出
17 配偶子と胚の保管
18 患者とドナーID の Witnessing と確認
19 追跡可能性

20 ドナーの関与する妊娠
21 顕微授精(ICSI)
胚研究と取扱いの訓練
22 胚研究と取扱いの訓練
設備と管理
23 品質管理システム
24 外部との契約
25 建物と施設
26 設備備品と材料
27 有害な偶発事故
28 苦情
公正な治療
29 公正で公平な治療
記録保管と他の義務
30 秘密保持とプライバシー
31 記録保管と文書管理
32 センターの義務と報告内容
用語集
索引

表 1 COP 第8版の目次(翻訳)

また、第8版 COP の各項目には、HFE 法の各条項に基づく各クリニックの義務的な要求点が列挙され、その後に HFEA ガイダンスとして、実際の運用における要求が、あらためてわかりやすく解説されるというスタイルで記載されている。

一般に英国における、法律に対するコンプライアンスは良く、HFEA の Mr Doran は、「HFEA は倫理委員会のように振る舞うことはないし、権力を厳密に適用することはない」と述べたが、これには

例外もあることは、前年の報告書で述べたとおりである。

### 3) ART の安全管理

英国における ART 安全管理の実情を Sheffield 大学で調査した。Jessop Wing は、Sheffield 周辺の基幹病院であり、年間約 700 周期の IVF/ICSI を施行している一方で、7200 分娩を取扱っている産婦人科としては、英国で 4 番目に大規模な施設である。また、NHS(National Health Service)の患者に対する治療を施行している ART クリニックとしては、同国でもっとも治療成績の良いクリニックである(なお、私費診療のプライベートのみに特化したクリニックでは、クリニックが患者をある程度選別できるため、良い成績を出しやすい)。

英国では、2002 年に Leeds 大学 (Reproductive Medicine Units at the Leeds Teaching Hospitals NHS Trust)において、胚の取り違えが起こったことが明るみに出て詳細な調査が行われ、その経緯や問題点が Prof Brian Toft による報告書(いわゆる Toft レポート)として、2004.6 に保健省から出版された。事例の詳細は省略するが、白人のカップルから黒人の双子児が出生した事例である。

これを受けて、英国国内の各クリニックは、HFEA から Wittnessing(わが国でいう、いわゆるダブルチェックに近いが、より徹底している)の徹底を求められた。

ダブルチェックには批判があり、二人が

互いに他方が徹底的にチェックすると思えば他方に依存することになり、どちらも結局業務に対して十分注意深く行なわない可能性が指摘されている。また、一つの仕事に二人が責任を持つというのは、どちらも本当は責任を持たないのと同じことだという指摘もある。

その結果、第三者による Wittnessing だけでは必ずしも十分ではなく、バーコードや RFID(Radiofrequency Identification) タグの導入などが、推奨された。

Assisted Conception Unit in the Jessop Wing においては、3 年前に個人識別を電子化し、職員のみならず患者についても、写真入り ID で識別することとなった。同時に ART ラボにおいては RFID (図 1) を導入し、すべてのステップにおいて使用している。原理的にはスイカや ETC などとほぼ同様と考えて良い。その結果、精子、卵子、胚などの処理や取扱い過程が、逐一記録されることになる(図 2)。すなわち、誰がいつ何をどこへ移動させたかが経時的に RFID タグに記録され、一つ一つのディッシュやチューブについて、事後にどのような経過をたどったかを再現することが可能となっている。また、これらについて不適切な移動を行なうと、直ちに警告が表示されるとともに、警告音が発せられる(図 3)。

このシステムが運用されるためには、操作の各ステップに RFID タグの検知器があらかじめ設置されていることが必要で、

作業を行うベンチは言うまでもなく、採卵室から培養室への受け渡しの窓、培養器などに検知器が装着されている(図4)。これらの設備を完備するには、もちろん相当の初期投資が要するが、むしろICタグのランニングコストが危惧される。しかし、実際には、チップ一つの価格は約20p(約30円)にすぎないとのことで、膨大なコストがかかるというわけではない。

ARTの安全管理には、設備と並んで、勤務者の充実とその教育・訓練が重要であることは言うまでもない。Toftレポートは、過重労働、人員不足、トレーニング不足などを、Leedsの問題の背景として示したが、このIVFユニットでは、7人の医師と7人のエンブリョジスト、7人の専属看護師、2人のカウンセラー、10人の事務スタッフにより構成されるチームにより、診療が行われている。なお産科部門にはConsultantだけで23人の周産期専門医師が勤務しているという。訪問時、1人の新入エンブリョジストのトレーニングが行われていたが、1ヶ月をかけて、専属指導者による指導が行われるという。

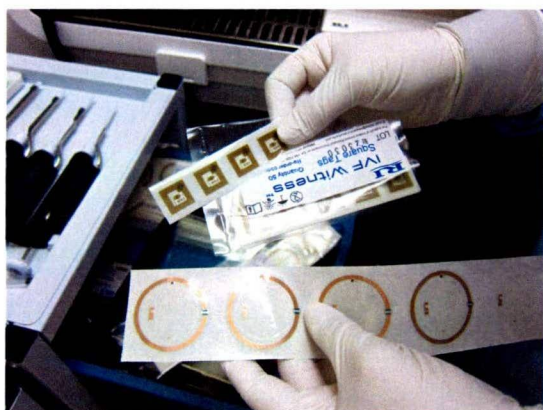


図1 RFIDタグ(2種類用いられている)

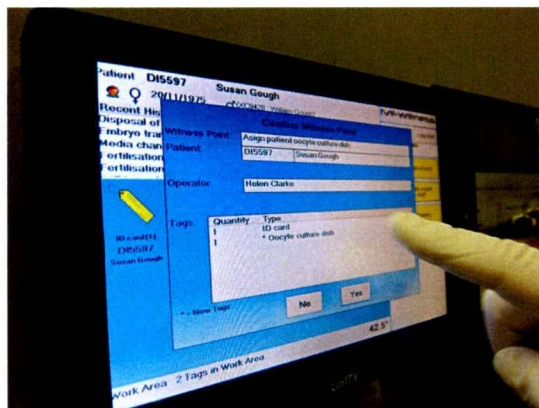


図2 すべてのステップが表示される

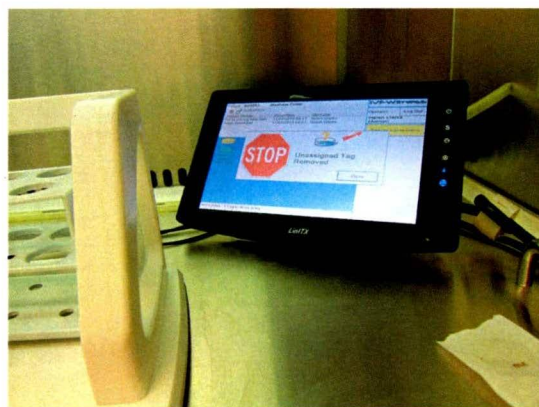


図3 不適切な移動により警告が出る

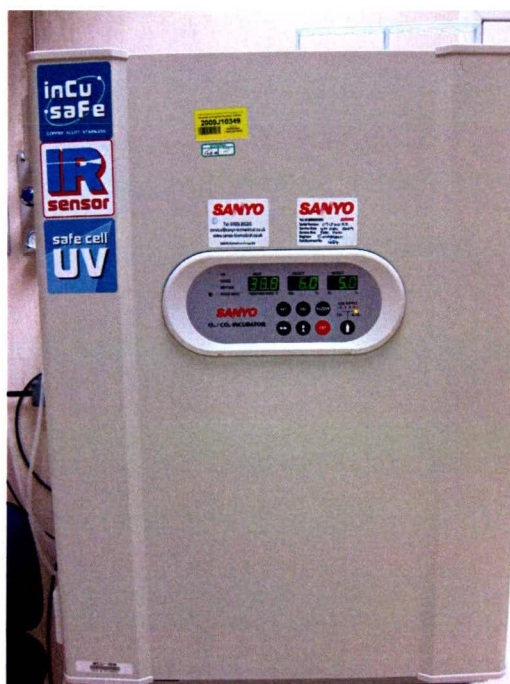


図4 すべての場所に検知器が設置済み  
4) ART により出生した児のフォローアップ

英国では、2008年4月に配偶子提供者が出生した児に対して非匿名となった。これに伴い、精子提供者と卵子提供者数が激減し、精子については海外からの輸入が行われるようになり、卵子については海外渡航による治療が急増したことを、すでに報告した。

提供精子について、Sheffield では、体外受精を受けるカップルの男性に対して、カウンセリングの過程で精子提供について打診し、了承の得られた一部の男性から非匿名の精子提供を受けることで、提供精子不足は一部改善しているという。この方法は提供卵子の確保のために行われるEgg sharing(採卵された卵子の一部を自ら用いずに第三者に提供することで、ART費用の一部を減免する方法)に類似しており、いわばSperm sharingと呼ぶことが可能であろう。

一方、提供卵子についての状況は相変わらず困難で、多くのカップルはスペインやウクライナへ渡航治療をしている。ただし、LondonのプライベートクリニックであるBridge Centreでは、2009年10月からFreeze and Shareというプログラムが開始された。このプログラムは、35歳以下の自分の未受精卵凍結保存を希望する女性に対し、その一部を第三者に提供することで、凍結保存費用を無料にする

というものである。若年女性に由来する良好卵子の提供を受けるためのインセンティブとして、将来の妊孕性確保の可能性を提示したものである。同センターのDr Menabweyは、開始したばかりなので具体的な数字を出せる段階ではないとしながらも、希望者が順調に集まっていると話した。

国外におけるART治療では、治療により出生した児のフォローアップがほとんど不可能となる。したがって、国内治療の可能性を確保する取り組みが必要であることが認識され、このような精子と卵子提供に関する新たな取り組みがはじめられたと考えることができる。

新HFE法の施行により、英国では治療を受けるカップルの同意を得ることで2010年から、出生した児の長期経過観察をすることが可能になった。実際にどの程度の割合と期間、フォローアップが実現するかどうかは、まだ不明である。しかし、いくつかのプロジェクトが既に始動している。

日本において児の長期フォローアップを行うためには、法的な裏付けに基ずく疫学研究のための個人情報原則開示を設定しない限り、これまでの英国と同様の状況である。したがって、本人からの同意取得が不可能な新生児について、出生から長期間にわたる全数を対象とした研究は困難であろう。母親からの同意取得の及ぶ範囲を明確に規定する必要

がある。

#### D 結論

法体系そのものの異なる英国と日本を比較することは困難であるが、それでも親子関係、個人情報保護など法的な介入がある程度不可欠な領域と密接に関連する ART については、必要最小限の管理と運営がしかるべき立法により担保されるべきであろう。特に児の権利と福祉の重要性、および第三者配偶子の関与する ART が今後日本でも行われる可能性を考慮すると、新 HFE 法が、母親と父親を新たに定義せざるを得なかったように、わが国の文化と社会状況に適合した ART 時代の定義を策定する必要がある。

#### E 健康危険情報

なし

#### F 研究発表

##### 英文論文発表

1. de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson D: World collaborative report on assisted reproductive technology, 2002. Hum Reprod 24(9):2310-20, 2009
2. Chambers GM, Sullivan EA, Ishihara O, Chapman MG, Adamson GD: The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected

developed countries. Fertil Steril 91:2281-94, 2009.

3. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S: The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised Glossary on ART Terminology 2009. Hum Reprod 24:2683-87, 2009.
4. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S: International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised Glossary on ART Terminology 2009. Fertil Steril 92:1520-4, 2009
5. Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O: Increased ovarian follicle atresia in obese Zucker rats is associated with enhanced expression of the forkhead transcription factor FOXO1. Med Mol Morphol 42:216-221, 2009.

##### 総説(和文)

1. 石原理、精子凍結と死後生殖 ホルモンと臨床 57:73-81,2009
2. 石原理、生殖補助医療—産婦人科

の視点から 泌尿器外科 22:649-654, 2009

3. 石原理、不妊治療とGnRHアンタゴニスト 産婦人科治療 98:641-647, 2009

4. 岡垣竜吾、石原理、卵巣予備能産婦人科の実際 58:1681-1687, 2009.

5. 石原理、岡垣竜吾、梶原健、出口顯、配偶子提供の現状 臨床婦人科産科 63:1415-1421, 2009

#### 学会発表

1. Osamu Ishihara: Japan: A Country Perspective in Areas of Improvement in Infertility Treatment. (Invited lecture) 5<sup>th</sup> Asia Pacific Fertility Expert Meeting, Ho Chi Minh City, 2009.5.23-24

2. Osamu Ishihara: Impact of GnRH antagonist on endogenous LH during Controlled Ovarian Stimulation. (Invited lecture) 7<sup>th</sup> Conference of Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Taipei, 2009.8.21-23

3. Osamu Ishihara, Hidekazu Saito: Successful transition to Single Embryo Transfer in Japan. (Invited lecture) 7<sup>th</sup> Conference of Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Taipei, 2009.8.21-23

4. Osamu Ishihara, Suresh Nair: Workshop: Registries and Quality Management- Where do we stand?

(Workshop) 5<sup>th</sup> Asia Pacific Fertility Expert Meeting, Ho Chi Minh City, 2009.5.23-24

5. Jacques de Mouzon, David Adamson, Osamu Ishihara, Paul Lancaster, Ragaa Mansour, Karl G Nygren, Elizabeth Sullivan, Fernando Zegers-Hoschild: World report on ART Year 2005. (Symposium) ESHRE 25<sup>th</sup> Annual Meeting, Amsterdam, 2009.6.28-7.1

6. David Adamson, Fernando Zegers-Hoschild, Karl G Nygren, Jacques de Mouzon, Osamu Ishihara: ICMART report on global trends in ART from 2000-2004: How does the USA compare? 65<sup>th</sup> American Society for Reproductive Medicine, Atlanta, 2009.10.17-21

7. Fernando Zegers-Hoschild, David Adamson, Karl G Nygren, Jacques de Mouzon, Osamu Ishihara: Worldwide differences in access to assisted reproductive technologies (ART) influence providers' and consumers' decisions on the number of embryos transferred, affecting the proportion of multiple births. 65<sup>th</sup> American Society for Reproductive Medicine, Atlanta, 2009.10.17-21

G 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

生殖補助医療の医療技術の標準化安全性の確保と生殖補助医療により生まれた児の長期予後の検証に関する研究

長期予後調査に対する説明と同意  
特定不妊治療助成制度の効率について

分担研究者 齊藤 英和 国立成育医療センター周産期診療部不妊診療科 医長

研究協力者 齊藤 隆和、松井大輔、宮田あかね 国立成育医療センター周産期診療部不妊診療科

研究要旨

今年度は、現在行っている日本産科婦人科学会の体外受精・胚移植等の臨床実施成績に関する報告のなかで特定不妊治療助成制度が生殖医療にどのような効果を与えているか検討した。

2007年に生殖補助医療を行った161,992治療周期のうち44,393周期(27.4%)が特定不妊治療助成制度を利用しており、残りの周期は、この制度を利用していないか、または利用の有無が不明であった。制度を利用した治療周期を「利用治療周期」、制度利用を利用しない、または利用が不明な治療周期を「非利用治療周期」として、全体を2群に分けて検討した。

全治療周期を年齢群に分けると、実数としては35-39歳群が16639周期において特定不妊治療助成制度を利用しており、最も多かった。続いて30-34歳群が14894周期であった。しかし、各年齢群別の制度利用率は最も若い29歳群で高く(41.1%)、30-34歳群(35.8%)、35-39歳群年齢(27.9%)、40-44歳群(18.7%)、45歳群(10.9%)と、年齢が進むにつれて低下した。これは年齢が若い層では、比較的所得が低い方が多く、特定不妊治療助成制度を利用する夫婦が多いと推察される。

治療周期あたりの妊娠率は新鮮胚治療群、凍結胚治療群に分け検討したが、どちらも特定不妊治療助成制度利用治療群で高かった。さらに治療周期あたりの生産分娩率も特定不妊治療助成制度利用治療群で高かった。また治療成績が特定不妊治療助成制度利用治療群で高いのは、特定不妊治療助成制度利用治療群には比較的妊娠しやすい若い症例が多いことが影響している可能性もあり、妊娠率が下降しない34歳までの症例で治療周期あたりの生産分娩率を検討したが、この検討でも特定不妊治療助成制度利用治療群で高かった。このことから、特定不妊治



療助成制度利用治療群で生産分娩率が高いのは、比較的妊娠しやすい治療開始の初回、2回目の治療周期に特定不妊治療助成制度が利用されることが多いためであると考えられる。このことより、この特定不妊治療助成制度が、効率よく利用されていると結論できた。

## A. 研究目的

前年度まで研究において、多くの不妊患者は不妊治療で出生した児の長期予後調査の必要性を感じていた。さらに、不妊治療を行う医療側においても、多くの医療施設で児の長期予後調査の必要性があると答えていた。

今年度は、現在行っている日本産科婦人科学会の体外受精・胚移植等の臨床実施成績に関する報告のなかで特定不妊治療助成制度が生殖医療にどのような効果を与えているか検討した。

## B. 研究方法

日本産科婦人科学会が毎年行っている生殖医学登録は2007年の治療より、インターネットを用いた症例ごとの登録となった。この登録項目には、特定不妊治療助成制度の利用の有無があり、この登録データを用いて2007年に生殖補助医療による治療をした症例の検討を行ない、特定不妊治療費助成制度のこの治療に対する影響についても検討した。

## C. 研究結果

2007年に生殖補助医療を行った161,992治療周期のうち44,393周期(27.4%)が特定不妊治療助成制度を利用しており、残りの周期は、この制度を利用

していないか、または利用の有無が不明であった。制度を利用した治療周期を「利用治療周期」、制度利用を利用しない、または利用が不明な治療周期を「非利用治療周期」として、全体を2群に分けて検討した。

全「利用治療周期」を年齢群に分けると、実数としては35-39歳群が16639周期において助成制度を利用して最も多かった(37.5%)。続いて30-34歳群が14894周期(33.6%)、40-44歳群が7876周期(17.7%)、-29歳群が4043周期(9.1%)、45-歳群が937周期(2.1%)であった。しかし、各年齢群別の制度利用率は図1のように最も若い-29歳群で高く(41.1%)、30-34歳群(35.8%)、35-39歳群年齢(27.9%)、40-44歳群(18.7%)、45-歳群(10.9%)と、年齢が進むにつれて低下した。

治療周期あたりの妊娠率は新鮮胚治療群、凍結胚治療群に分け検討した。新鮮胚治療では利用群が19.7%、非利用群が10.6%、凍結胚治療では利用群が38.8%、非利用群が28.2%と、どちらの治療法においても治療周期あたりの妊娠率は助成制度利用治療群で高かった(図2)( $p < 0.001$ )。

さらに治療周期あたりの生産分娩率を検討した。新鮮胚治療では利用群が

12.2%、非利用群が 6.3%、凍結胚治療では利用群が 23.1%、非利用群が 17.0%と、どちらの治療法においても治療周期あたりの生産分娩率は助成制度利用治療群で高かった (図 3) ( $p < 0.001$ )。

治療周期あたりの生産分娩率が助成制度利用治療群で高いのは、助成制度利用治療群には比較的妊娠しやすい若い症例が多いことが影響している可能性もあり、妊娠率が下降しない 34 歳までの症例群と全年齢群で治療周期あたりの生産分娩率を検討した。この検討でもすべての年齢群においては、制度利用群の生産分娩率が 15.1%、制度非利用群が 9.3%と有意に制度利用群が高い生産分娩率を示していたが、34 歳までの若い群の検討においても、制度利用群が 20.1%、制度非利用群が 15.6%と、制度利用群で制度非利用群に比較し有意に高値を示した (図 4)

( $p < 0.001$ )。このことは、この助成制度が、効率よく利用されていると結論することができる。

新鮮胚治療群・凍結胚治療群において助成制度利用別の 37 週以降の正期産生産分娩率は新鮮胚治療群において、利用群が 76.7%、非利用群が 76.6%、凍結胚治療群において、利用群が 78.4%、非利用群が 77.4%とすべての群で 7 割を超えており、各群間に有意な差は認めなかった (表 1)。

37 週以降に分娩した児の体重においては、新鮮胚治療群において、利用群が  $2941 \pm 423$  (M $\pm$ SD)、非利用群が  $2943 \pm 410$ 、凍結胚治療群において、利用群が  $3046 \pm 426$ 、非利用群が  $3053 \pm$

411 と新鮮胚治療群・凍結胚治療群において、利用群と非利用群の間に有意な差を認めなかった (表 2)。しかし、新鮮胚治療群、凍結胚治療群の間には、約 100 g の体重差を認めた。

生産分娩児の先天異常率は、新鮮胚治療群において、利用群が 1.4%、非利用群が 1.4%、凍結胚治療群において、利用群が 1.4%、非利用群が 1.4%と助成制度利用の有無別群間に差は認めなかった (表 3)。

新生児期死亡率は、新鮮胚治療群において、利用群が 0.7%、非利用群が 0.5%、凍結胚治療群において、利用群が 0.2%、非利用群が 0.2%と助成制度利用の有無別群間に差は認めなかったが、凍結胚治療群は新鮮胚治療群よりも低かった (表 4)。

#### D. 考察

以上より、特定不妊治療助成制度は、年齢が若い層では、実数は少ないものの、若い年齢の夫婦においては高い率で利用されていた。これは年齢の若い夫婦においては、比較的所得が低い夫婦が多く、助成制度を利用する夫婦が多いと推察される。

妊娠率・生産分娩率を検討すると、新鮮胚治療でも凍結胚治療でも特定不妊治療助成制度利用群に非利用群に比較し高い妊娠率・生産分娩率を示した。しかし、この高い妊娠率・生産分娩率は、特定不妊治療助成制度利用群は若い症例が多い可能性もある。そのため、

妊娠率・生産分娩率が比較的に低下しない、34歳以下の症例で、特定不妊治療助成制度利用群・非利用群の生産分娩率を検討したが、若い症例群でも、特定不妊治療助成制度利用群に非利用群に比較し高い生産分娩率を示した。

この結果は、助成制度利用治療群で生産分娩率が高いのは、比較的妊娠しやすい治療開始の初回、2回目の治療周期に特定不妊治療助成制度が利用されることが多いためであると推測される。

各治療の生産分娩に占める正期産の割合は、特定不妊治療助成制度利用群、非利用群の間に差を認めなかった。また正期産児の平均体重も、特定不妊治療助成制度利用群、非利用群の間に差を認めなかった。さらに、先天異常児の率や新生児死亡率においても、特定不妊治療助成制度利用群、非利用群の間に差を認めなかった。このことより、特定不妊治療助成制度利用にて妊

娠された症例の予後は、特定不妊治療助成制度利用を利用しないで妊娠された症例との間に差はなことが判明した。

今後さらに、この制度が効率よく利用されることが望まれるが、それには、年あたりの利用回数と利用年限の検討が重要となってくると考えられた。

#### E. 結論

特定不妊治療助成制度は、効率よく安全に利用されていることが判明した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 各年齢群の特定不妊治療助成利用率

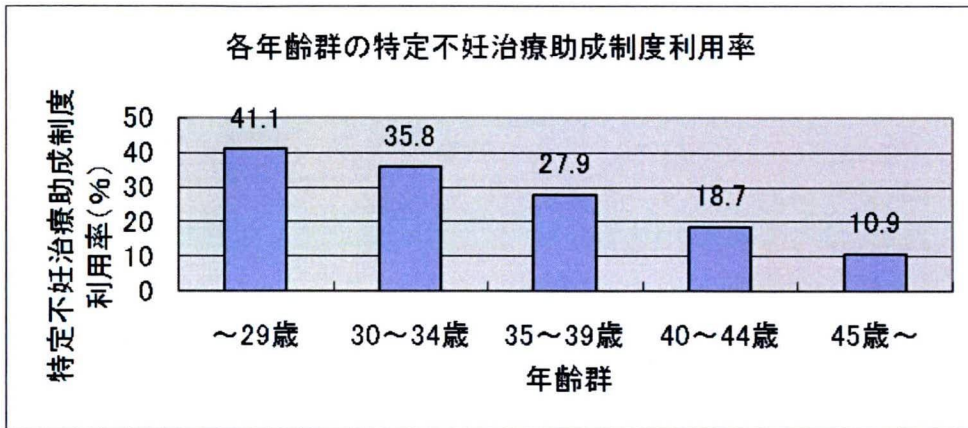


図2. 各治療法の妊娠率

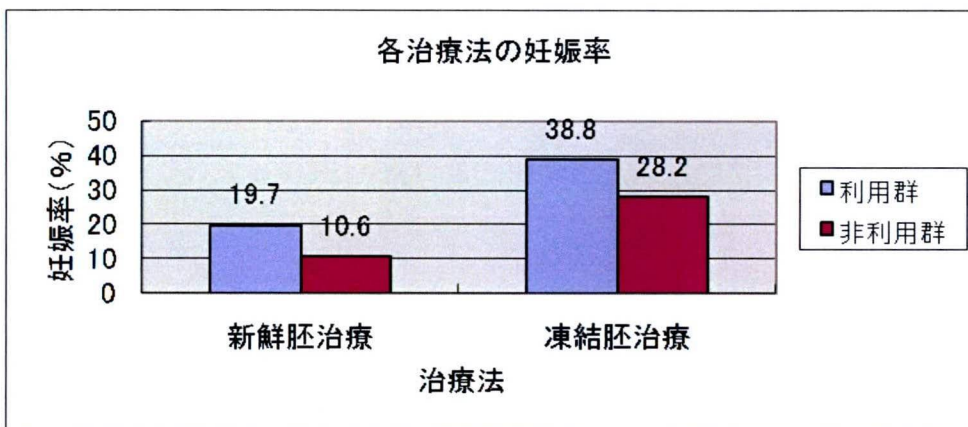


図3. 各治療法の生産分娩率

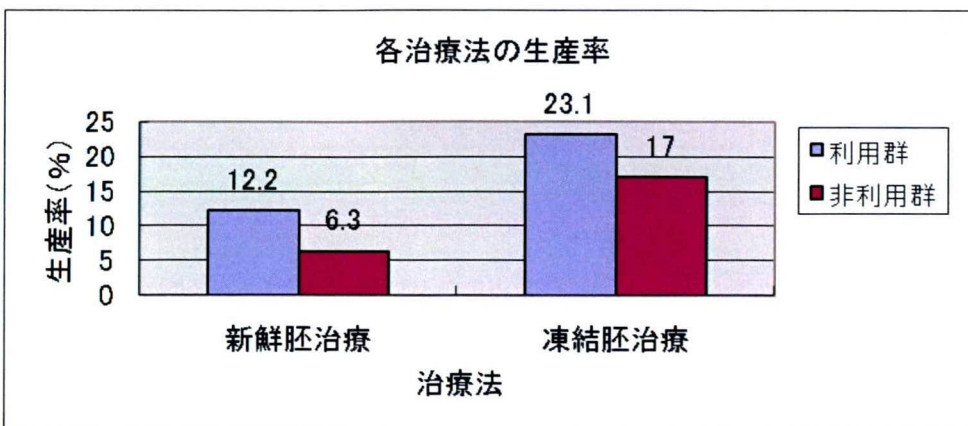


図4 すべての年齢群と若年群（34歳以下）の生産分娩率

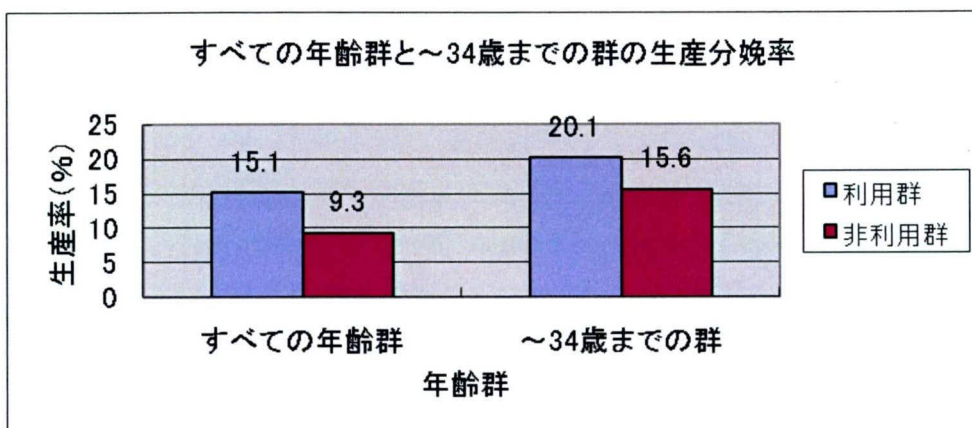


表1. 各治療群別生産分娩中37週以降の分娩率

	新鮮胚治療	凍結胚治療
利用群	76.7%	78.4%
非利用群	76.6%	77.4%

表2. 各治療群別37週以降生産分娩児の平均体重 (M+/-SD)

	新鮮胚治療	凍結胚治療
利用群	2941+/-423	3046+/-426
非利用群	2943+/-410	3053+/-411

表3. 各治療群別先天異常児率

	新鮮胚治療	凍結胚治療
利用群	1.4%	1.4%
非利用群	1.4%	1.4%

表4. 各治療群別新生児死亡率

	新鮮胚治療	凍結胚治療
利用群	0.7%	0.2%
非利用群	0.5%	0.2%

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

生殖補助医療由来児の発育・発達に関する研究：  
Prader-Willi 症候群発症における高齢出産と生殖補助医療の影響

分担研究者 緒方 勤 国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部 部長

研究要旨

Prader-Willi 症候群 (PWS) 患者の遺伝的発症原因の解明を介して以下のことを明らかとした。(1) 本邦における晩婚化を背景とした出産年齢の高齢化は、trisomy type の第 15 染色体母親性ダイソミー患者の割合の増加に強く関与しているものと考えられる。(2) 生殖補助医療により生まれた患者が優位に多いことは、高齢出産とは別の生殖補助医療に関わる因子が PWS の発症に関連することを示唆する。

A. 研究目的

近年、生殖補助医療により出生した児において、低出生体重や先天奇形の発症率が高いこと、および、インプリンティング異常疾患の発症率が有意に高いことが報告され、大きな問題となっている。

本年度においては、代表的インプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群 (PWS) の解析を集中的に行った。PWS は、15000-20000 人に 1 人の頻度で発症する先天性疾患で、第 15 染色体長腕近位部のインプリンティング領域の異常に起因する。従来から患者の 70%程度で父性由来 15 番染色体 q11-13 領域の欠失が、25-30% で 15 番染色体母性片親性ダイソミー (UPD: uniparental disomy) が、5%未満で 15 番染色体上のインプリント調節領域の異常が認められるとされている。そして、UPD 発症機序のひとつに、15 番染色体を 2 つ持つ卵子が正常な精子と受精した後、trisomy rescue を介して父親由来の 15 番染色体が取り除かれ、母親由来の 15 番染色体のみが残った結果 UPD となるものが知ら

れている。異数性を有する卵子の形成は減数分裂時の不分離に起因しており、この過程には母親の高年齢の関与が大きいと考えられている。近年、本邦においても女性の晩婚化と出産年齢の上昇が進んでおり、PWS 患者における UPD 頻度が増加していることが推察される。しかし、その推移を解析した研究はない。さらに、生殖補助医療の影響や発症原因と臨床像との関連を解析した報告もほとんど見られない。

われわれは、PWS 患者 156 名の発症原因解明を介して、母体高齢化と生殖補助医療がリスク因子となることを見いだしたので報告する。

B. 研究方法

獨協医科大学越谷病院小児科でフォロー中の PWS 患者 156 名に対して、メチル化試験、染色体検査、FISH、マイクロサテライト解析、MLPA を行い、各々の発症原因を解析した。その結果をもとに、30 歳以上の母親から生まれた児の数が、20-29 歳の母親より生まれた児の数を上回った 2003 年前後における各々の発症病因の割

合を比較した。また、生殖補助医療との関連について解析した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、検体の収集を含めた研究計画については、国立成育医療センター、および各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

#### C. 研究結果

2002年以前に出生した患者では欠失が83%、trisomy rescue を介した UPD(trisomy rescue type UPD)が14%に認められたのに対し、2003年以降に出生した患者では欠失が60%、trisomy rescue type UPD が28%に認められ、2003年以降出生群において UPD 比率の増加を認めた ( $p=0.014$ )。母親の年齢が上昇するほど、または児の出生年次が最近であるほど、trisomy rescue type UPD の割合が増加していた。2002年以前と2003年以降出生群の母親年齢を比較すると、2003年以降で上昇(2002年以前中央値30歳(19-48)vs. 2003年以降中央値35(23-45),  $p=0.00041$ )していたが、trisomy rescue type UPD 群でのみ母親の出産年齢の上昇を認めた ( $p=0.031$ )。さらに、少なくとも11名の患者が生殖補助医療で出生し、この頻度が一般集団の生殖補助医療による出生児の割合よりも有意に高いこと(したがって、本排卵誘発を含む生殖補助医療がリスク因子となりうること)が判明した。

#### D. 考察

以上の成績は以下のことを示唆する。第一に、本邦における晩婚化を背景とした出産年齢の高齢化は、trisomy type UPD 患者の割合の増加に強く関与しているものと考えられる。しかし、母親年齢の上昇が trisomy rescue type UPD 発症を招く詳細な機序や、出産年齢の上昇以外に UPD 患者の比率を上昇させる要因については、さらなる検討が必要である。第二に、生殖補助医療により生まれた患者が優位に多いことは、高齢出産とは別の生殖補助医療に関わる因子が PWS の発症に関連することを示唆する。その候補として、体外培養や排卵誘発剤の使用が危惧される。

#### E. 結論

PWSにおける遺伝子診断による発症機序の解明を行い、母体高齢化や生殖補助医療の影響を同定した。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T. The IG-DMR and the *MEG3*-DMR at Human Chromosome 14q32.2: Hierarchical Interaction and Distinct Functional Properties as Imprinting Control Centers. *PLoS Genetics* (in press).
2. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J,



- Ogata T, Saitoh S. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *Journal of Pediatrics* 155 (6): 900–903, 2009.
3. Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, Ogata T, Hata K, Sotomaru Y, Kono T. Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics* 93 (5): 461–472, 2009.
4. 緒方勤, 伊達木澄人, 山澤一樹. 胎内発育に影響する因子: IUGR の遺伝的要因. 藤枝憲二, 編集. SGA 性低身長症のマネジメント. メディカルレビュー社. 57–68, 2009.
5. 緒方勤. 胎児診断された第 14 染色体父性ダイソミーの症例: インプリンティング疾患における胎盤解析の重要性. 第 1 回胎児骨系統疾患フォーラム記録集. 15–18, 2009.
6. 山澤一樹, 緒方勤. シルバーラッセル症候群における分子遺伝学のおよび臨床学的所見とその相関. ホルモンと臨床 (印刷中)
7. 緒方勤. 先天性疾患のエピジェネティクス: 第 14 染色体ダイソミー表現型発症機序をモデルとして. *細胞工学* 28 (6): 572–577, 2009.
8. 緒方勤. エピジェネティクスと遺伝疾患. *小児科診療* 72 (1): 39–44, 2009.
2. 学会発表
1. Ogata T. Silver-Russell syndrome as a human imprinting disorder. Prenary Lecutre. In: The 14th Annual Scientific Meeting of Korean Society for Pediatric Endocrinology. October 24, Seoul, 2009.
2. Ogata T. (Epi)genetic mechanisms leading to the development of upd(14)pat/mat phenotypes. In: The Seminar for Department of Physiology, Development & Neuroscience, University of Cambridge, March 6, Cambridge, 2009.
3. 緒方勤. 胎児成長発達とゲノムインプリンティング. 第 18 回東海新生児研究会. 2009 年 (平成 21 年) 11 月 7 日, 名古屋
4. Nakabayashi K, Yoshida W, Yamazawa K, Kusumi M, Ogata T, Hata K. MeDIP-chip detection and quantitative DNA methylation analysis of differentially methylated regions in imprinted loci. The 47th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2009.
5. Kagami M, Fukami M, O'Sullivan M, Green A, Takada S, Kato F, Ferguson-Smith A, Ogata T. Essential role of the *MEG3*-DMR in the regulation of the maternally inherited human chromosome 14q32.2 imprinting region. The 24th Naito Conference, Sapporo, 2009.
6. 鏡雅代, 高田修司, 深見真紀, 山澤一樹, 松原圭子, 加藤芙弥子, Anne C Ferguson-Smith, 緒方勤. Hierarchical interaction and distinct functional properties of the IG-DMR and the *MEG3*-DMR at the human chromosome 14q32.2 imprinted region. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9-12 日、2009.
7. 山澤一樹, 鏡雅代, 松原圭子, 肥塚直美, 堀川玲子, 緒方勤. シルバーラッセル症候群の表現型とモザイクターナー症候群の核型を有する雌性単為生殖キメラ症例. 第 43 回日本小児内分泌学会, 2009.
8. 鏡雅代, 加藤芙弥子, 松原圭子, 渡部功, 有阪治, 緒方勤. 14 番染色体インプリンティ

- ング遺伝子群の調節において、IG-DMR と MEG3-DMR は異なった役割をはたす. 第 43 回日本小児内分泌学会, 2009.
9. 松原圭子, 山澤一樹, 中林一彦, 内木康博, 堀川玲子, 緒方勤. 片方のみが Silver-Russell 症候群と H19-DMR の低メチル化を呈した一卵性双胎女兒. 第 43 回日本小児内分泌学会, 2009.
  10. 勝島由利子, 山澤一樹, 勝島史夫, 緒方勤. 成長ホルモン分泌不全を合併し, H19-DMR の低メチル化を来した Silver-Russell 症候群の 1 女兒例. 第 43 回日本小児内分泌学会, 2009.
  11. 鏡雅代, 高田修司, 加藤芙弥子, Ann C Ferguson-Smith, 緒方勤. 14 番染色体インプリンティング遺伝子群の調節において, IG-DMR と MEG3-DMR は異なった役割を果たす. 第 54 回日本人類遺伝学会, 2009.
  12. 中林一彦, 吉田亘, 山澤一樹, 永江玄太, 油谷浩幸, 緒方勤, 秦健一郎. DNA メチル化プリファイリングによるゲノムインプリンティング領域の網羅的解析. 第 54 回日本人類遺伝学会, 2009.
  13. 松原圭子, 山澤一樹, 中林一彦, 緒方勤. 片方のみが Silver-Russell 症候群と H19-DMR の低メチル化を呈した一卵性双胎女兒. 第 54 回日本人類遺伝学会, 2009.
  14. 山澤一樹, 鏡雅代, 松原圭子, 中林一彦, 秦健一郎, 肥塚直美, 堀川玲子, 緒方勤. Silver-Russell 症候群を呈する雌性単為生殖キメラおよび Beckwith-Wiedemann 症候群を呈する雄性単為生殖キメラ. 第 32 回日本小児遺伝学会学術集会, 2009.
  15. 鏡雅代, 高田修司, 加藤芙弥子, Anne C Ferguson-Smith, 緒方勤, 緒方勤. 14 番染色体インプリンティング遺伝子群の調節において, IG-DMR と MEG3-DMR は異なった役割をはたす. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
 Estrogen receptor alpha gene, genomic DNA, and diagnosis marker. 米国特許出願 Patent No: US 7,601,828 B2、2009 年 10 月 13 日

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

生殖補助医療の医療技術の標準化、安全性の確保と生殖補助医療により生まれた児の長期  
予後の検証に関する研究

ART の安全性に関する研究

分担研究者：秦健一郎 国立成育医療センター周産期病態研究部 部長

（研究要旨）

ART（生殖補助医療）後の出生児に、ゲノムインプリンティング異常症（DNA メチル化異常による先天性奇形症候群）の発症率が上昇する可能性を示唆する報告がなされ、ART 関連技術による生殖細胞や初期胚への影響の可能性が懸念されている。しかしこれまでの報告では、ごく限られた領域の DNA メチル化状態しか調べられていないため、仮に DNA メチル化異常が存在したとしても、その発症時期や機序、転帰との因果関係を評価することが困難であった。

そこで我々は、ART 後妊娠症例の DNA メチル化異常の有無を確定的に解析することを目的とし、臨床的分子診断に資する解析系を確立した。具体的には、異なる染色体上に散在し、様々な生理的機構によって DNA メチル化されることが示されている領域（既知のインプリンティング遺伝子関連メチル化領域全て、反復配列、X 染色体、胎盤特異的非メチル化遺伝子領域を含む合計 27 箇所）を網羅した解析対象領域を設定し、解析条件を詳細に検討した。既知の DNA メチル化異常疾患を用いて、我々の解析系が臨床的実用性のあることが示された。また、いくつかの異常妊娠症例（流産、子宮内胎児発育遅延）では実際に、DNA メチル化異常を示唆する結果が得られてきている。現在解析終了した ART 後妊娠の子宮内胎児発育遅延 12 症例に関しては、DNA メチル化異常が見出されていないが、安全性の評価には、今後さらに多数症例の解析が必要であると考えられる。

A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの完了により、ゲノム配列が全て明らかとなり、遺伝学的な異常を同定する技術（ジェネティックな異常の解析技術）が飛躍的に進歩した。一方で、遺伝子配列の異常（ジェネティックな異常）だけでは説明できない疾患の存在も

明らかになった。DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックなゲノム制御機構と疾患や発生異常との関連は、近年特に様々な因果関係が明らかにされてきており、従来の解析手法（ジェネティックな解析手法）を超えたポストゲノムシーケンス時代の重要な医学研究領域として注目が高まっている。

エピジェネティックな生命現象の一つであるゲノムインプリンティングの破綻は、実際にヒトの先天性疾患の原因であることが明らかになっている。また、モデル生物の詳細な解析から、エピジェネティックな異常やゲノムインプリンティングの破綻は、胎盤の発生分化異常を引き起こすことが示された。さらに最近、生殖補助医療後の出生児でインプリンティング異常症の発症率が上昇する可能性を懸念する報告がなされた。しかし、ヒトの流産やその他の発生異常におけるエピジェネティックな破綻の有無は、系統的網羅的に解析されておらず、そもそもヒト正常発生を参考とした正常値も定義されるに至っていない。

本研究は、ARTの安全性を評価する一つの指標としてエピジェネティックな異常の有無に着目し、特にDNAメチル化状態を網羅的かつ定量的に解析する手法を独自に確立し、実際にヒトART後妊娠の検体を用いたDNAメチル化解析を行う。

## B. 研究方法

### 1. 解析標的領域の決定

前述のように、ART後の出生児では、ゲノムインプリンティング異常の発生リスクが高まる可能性が懸念されている。ゲノムインプリンティングとは、常に片親由来の遺伝子が発現する現象であるが、このようなインプリンティング遺伝子には、父由来と母由来の対立遺伝子間でDNAメチル化の状態が異なる領域（DMR: Differentially Methylated Region）が存在する。そこで、現在までにヒトで報告されている全ての

DMRを、文献的に検索した。また、ヒトでは報告されていないが、マウスDMRとの配列相同性からヒトでもDMRであると予想される領域を推定した。これらの領域が実際にDMRである事を、正常血液（リンパ球）および正常胎盤由来のゲノムDNAを用いて検証した。これらのDMRに加え、胎盤特異的なDNAメチル化を受ける領域、X染色体上のDNAメチル化領域も選定し、合計32ヶ所を解析対象領域とした。

### 2. COBRA条件検討

上記選定された領域を、COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法により解析するための、詳細な条件検討を行った。領域内から、PCR法による増幅の際に偏りが無く効率的な反応が起こり、かつ増幅産物長が約500bp以下になるよう設定した。また、増幅産物を特定の制限酵素で切断する必要があるため、領域内に適切な制限酵素認識配列を有する配列が存在する事も必須である。解析するゲノムDNAは、bisulfite変換により非メチル化シトシンがウラシルに変換されるため、本来4種類のDNAで構成されるゲノム配列が、ほぼ3種類で構成される配列に変換される。このため、PCRの為のプライマー設計の自由度が格段に狭められると共に、非特異的な増幅反応が起き易いが、事前の予測が困難であり、領域ごとに数回の試行を行い最適な条件を決定した。一方で、解析をハイスループット化する為に、PCRの反応条件は可能な限り統一した。

### 3. 電気泳動

一般的にCOBRA法では、アガロースゲルや

ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、得られる泳動像から半定量的な解析を行うが、我々の事前検討では、従来の解析法はダイナミックレンジが低く、定量性が劣る事が判明した。そこで我々は、測定値の定量性を厳密に担保するために、キャピラリー電気泳動法を採用した。

#### 4. 検体収集

生殖補助医療を受けて妊娠に至った症例(排卵誘発あるいは体外受精を行った症例)のうち、子宮内胎児発育遅延をきたした症例を解析対象とした。本研究内では、正常分娩症例(生殖補助医療を受けずに妊娠し、正常分娩に至った症例)の解析結果から正常値を定義した。

#### 5. 倫理面への配慮

倫理面においてはヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する指針を遵守する。また本研究内容は、報告者の所属する機関の倫理委員会の承認を受けている(国立成育医療センター倫理委員会承認番号 234)。

### C. 結果

既に報告したように、初年度は、実験手技の原理上避け難い実験誤差の緻密な条件検討を行った。また、正常末梢血由来のゲノム DNA を用いた解析を行ない、検体間および検者間差を生じやすい因子(ゲノム DNA の精製法、テンプレート量、制限酵素処理過程の DNA 量、泳動量などの各実験操作)を見極め、その自己点検修正法を確立した。

これらの知見を加味し、観測値の偏りを極力排除するための実践的な解析プロトコルを作成した。さらに、正常ヒト胎盤ゲノム DNA および正常成人末梢血リンパ球ゲノム DNA を用い、最終的に 24 箇所(27 領域)の DMR、X 染色体 1 領域、反復配列 2 種類、合計 27 領域に対する DNA メチル化解析系を確立した。本法を用い、すでに確定診断されていたインプリンティング疾患の末梢血を解析した。これらの疾患は、前述のように、ART 後の出生児で発症が増加する可能性が懸念されている疾患である。我々の解析結果は、従来の定性的な解析法と矛盾の無い、正確な診断を行うことができた。加えて、網羅的な解析を行うことで初めて疾患関連領域以外の DNA メチル化異常が明らかとなり、雌性発生モザイク症例、雄核発生モザイク症例といった、きわめて稀な疾患がこれらのインプリンティング異常症例に含まれていたことを明らかにした。これらの結果を踏まえ、ART 後に妊娠し、かつ子宮内胎児発育遅延を呈した 12 症例を解析した(内訳; AIH 2 例、ICSI 4 例、IVF-ET 4 例、排卵誘発のみ 2 例)。これらの症例は、正常末梢血や正常胎盤と比較して、明らかな DNA メチル化異常は見出されなかった。(次頁図参照)