

図1

年齢別特定不妊治療助成制度利用者率・利用者妊娠率・生産率(2008年ART)

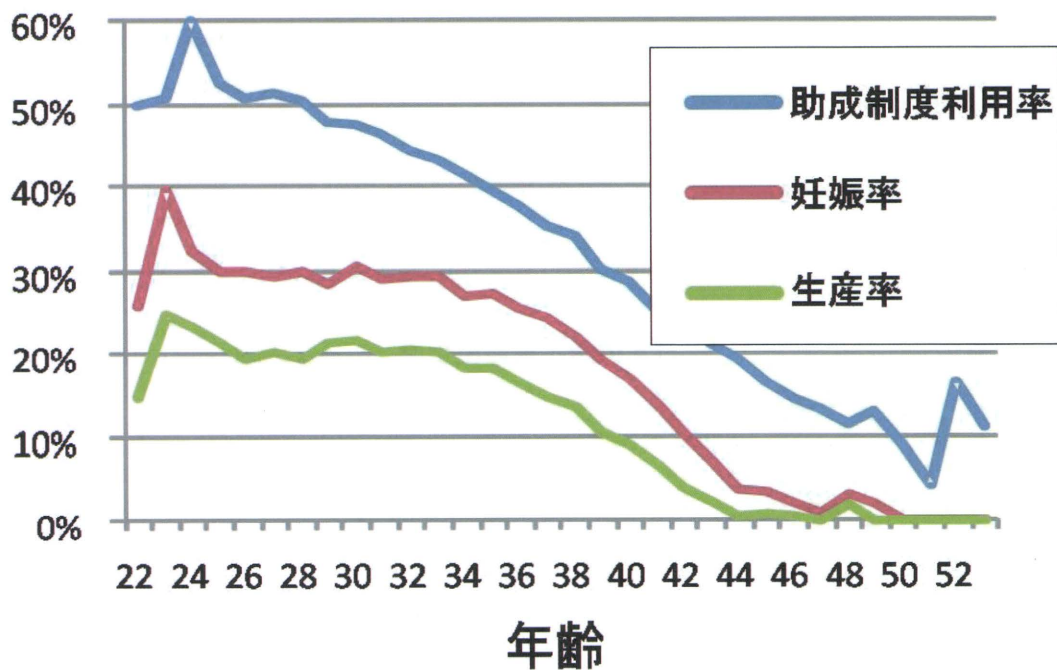
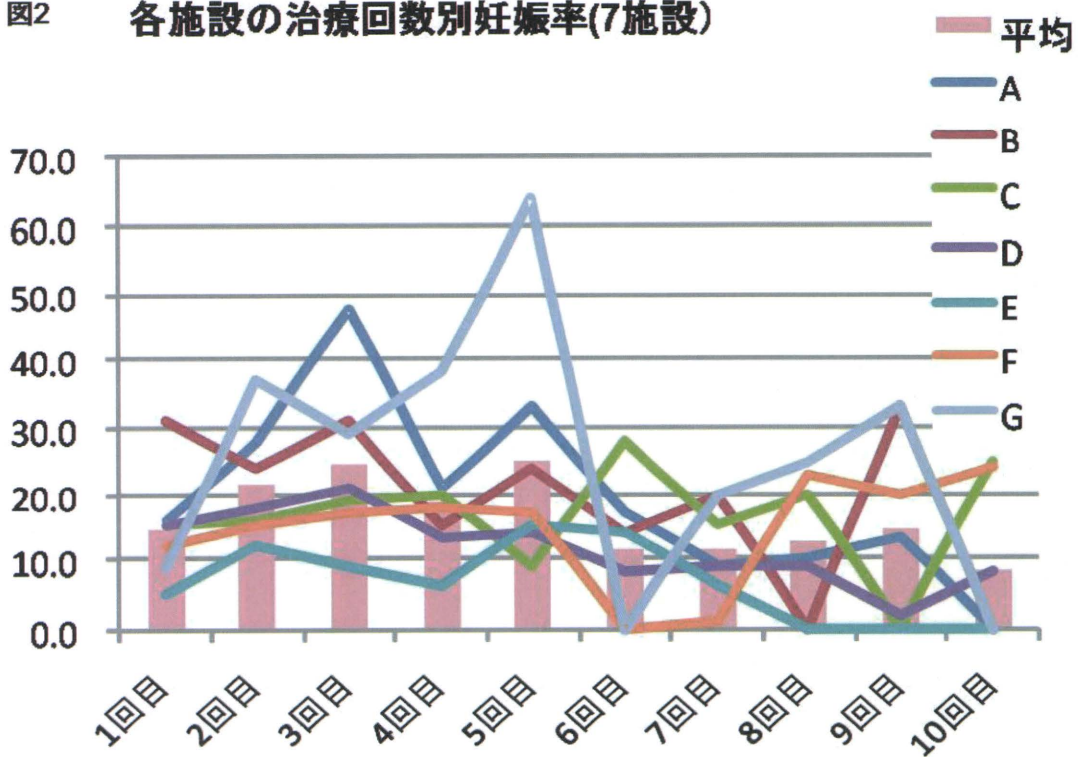


図2 各施設の治療回数別妊娠率(7施設)



## ART の遺伝的安全性の検証：高齢出産は母性ダイソミー発症の交絡因子である Prader-Willi 症候群における分子遺伝学的解析

研究分担者 緒方勤 (独)国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部 部長

### 研究要旨

近年、生殖補助医療 (ART) における遺伝的安全性が重要な課題として挙げられている。そして、種々のインプリンティング疾患の発症頻度が、生殖補助医療出生児において、一般集団よりも高いというデータが集積されつつあるが、これらのデータは、単純にその発症頻度を比較したのみであり、生殖補助医療に関連する交絡因子（両親因子や環境因子）を考慮したデータは、われわれが知る限り存在しない。今年度、われわれは、代表的インプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群 (PWS) 患者 138 例を対象として、生殖補助医療における交絡因子の検討を行った。その結果、減数第一分裂時の不分離を介する trisomy rescue タイプの 15 番染色体母性片親性ダイソミー (upd(15)mat) が、高齢出産により優位に増加していることが判明した。これは、高齢出産が第一減数分裂時の不分離を伴い易いことと一致するデータである。この成果は、母性ダイソミータイプのインプリンティング疾患発症における交絡因子を明確にすると共に、生殖補助医療を受ける母親が通常高齢であることから、今後の生殖補助医療におけるインプリンティング疾患発症の評価において有用と考えられる。現在、138 例中 7 例が ICSI/IVF で出生したことが判明していることから、これら 7 名における PWS 発症において、高齢出産以外の生殖補助医療関連因子が関与するか否かを検討中である。

### A. 研究目的

近年、生殖補助医療 (ART) における遺伝的安全性が重要な課題として挙げられている。特に、インプリンティング疾患は、その臨床診断が比較的容易であること、末梢血を用いた分子遺伝学的解析により原因を特定できることから、生殖補助医療との関連において大きな注目を集めている。そして、種々のインプリンティング疾患の発症頻度が、生殖補助医療出生児において、一般集団よりも高いというデータが集積されつつある。しかし、これらのデータは、単純にその発症頻度を比較したのみであり、生殖補助医療に関連する両親因子（高齢であることや不妊症の影響など）や環境因子（環境化学物質の影響など）を考慮したデータは、われわれが知る限り存在しない。したがって、生殖補助医療における遺伝的リスクを正確に評価するには、これらの交絡因子の検討が必須である。

本年度、われわれは、代表的インプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群 (PWS) を対象とし、交絡因子の検討を行った。PWS は、約 15,000 人に 1 人の頻度で発症し、成長障害、筋緊張低下、精神運動発達遅滞、過食・肥満などを特徴とする。染色体 15q11-13 のインプリンティング領域の異常により発症し、現在、患者の約 70% が父由来インプリンティング領域の欠失 (deletion type) を、約 25% が 15 番染色体母性片親性ダイソミー (upd(15)mat) を、約 5% がこの領域のインプリント調節機構などの異常を有することが知られている。Upd(15)mat とは、一対の染色体を共に母親から受け継ぐ状態を指し、trisomy rescue (TR)、monosomy rescue (MR)、gamete complementation

(GC)、post-zygotic mitotic error (PE) により発症する。さらに、TR/GC は、減数第一分裂の不分離 (TR/GC[M1]) と減数第二分裂の不分離 (TR/GC[M2]) に起因するものに分類され、このうち、TR/GC[M1] は、母親の高年齢が減数第一分裂時における不分離のリスクファクターとなることから、出産年齢に依存すると考えられる。本研究の結果、高齢出産が母性ダイソミー発症の大きなリスク因子であること、したがって、通常高齢のカップルを対象とする生殖補助医療における母性ダイソミータイプの遺伝的リスクの評価には、出産年齢を加味することが重要であることが判明した。

### B. 研究方法

- 対象:PWS 患者 154 例を集積し、その中から、(1) 正常核型、(2) SNRPN-DMR (differentially methylated region;メチル化可変領域)の過剰メチル化陽性、を満足する PWS 患者 138 例において詳細な検討を行った。SNRPN-DMR は、15q11-13 のインプリンティング領域における母由来染色体のインプリンティングセンターとして機能する領域であり、父由来のとき非メチル化状態で母由来のときメチル化状態で存在する。したがって、SNRPN-DMR の過剰メチル化状態は、機能する父由来インプリンティング遺伝子が存在しないことを意味する。なお、この 138 例中 7 例が生殖補助医療 (ICSI/IVF) で出生したことが判明している
- 分子遺伝学的解析:SNRPN 領域の FISH、第 15 染色体上の多数の座位に対するマイクロサテライト解析、SNRPN-DMR と snoRNA 領域に対する MLPA 法により発症原因を同定した。Upd(15)mat

は、第 15 染色体動原体周辺のマイクロサテライト座位がヘテロで存在するとき TR/GC[M1]、第 15 染色体動原体周辺のマイクロサテライト座位がホモで存在し中部・遠位部の座位がヘテロで存在するとき TR/GC[M2]、すべての座位がホモで存在するとき、MR/PE と分類した。なお、TR と GC、および、MR と PE の正確な鑑別は不可能であるが、GC は実際にはほとんど存在しないこと、PE は親因子に無関係であることを付記する。

(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、および検体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た。

### C. 研究結果

- 発症原因: 138 例中、欠失が 99 例、TR/GC[M1] が 19 例、TR/GC[M2] が 9 例、MR/PE が 3 例、エピソードが 2 例において同定された。6 例では FISH のみ行い、欠失は認められなかった (non-deletion) (図 1)。

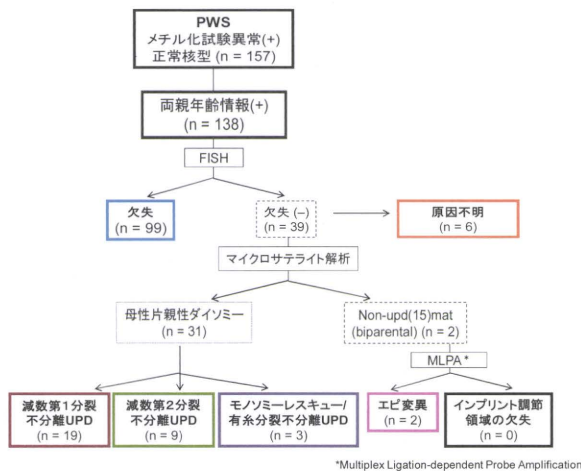


図 1. 日本人 PWS 患者の発症原因。

- PWS 患者の両親年齢: 母親の出産年齢は、TR/GC[M1] 群で、欠失患者群に比し、有意に上昇していた ( $P=1.0 \times 10^{-7}$ ) (図 2、表 1))。父親の年齢も、同様の傾向を認めた ( $P=0.00023$ )。また、母親の年齢が上昇するにつれ、欠失患者の頻度が減少し、TR/GC[M1] 群の頻度が上昇していた。
- 発症原因の相対的頻度: 本邦では、2003 年に、20 歳代と 30 歳代の母親の数が逆転しており、高齢出産傾向がより顕著となった (図 3)。これに基づき、2003 年前後において発症原因の相対的頻度を比較した。欠失と TR/GC[M1] 群の相対的頻度は、2002 年以前 (欠失 79.3%、TR/GC[M1] 15.7%) と 2003 年以降 (欠失 58.8%、TR/GC[M1] 27.5%)

の間で有意に変化していた ( $P=0.00052$ )。2002 年以前出生群に non-deletion 症例 6 例が含まれるが、これらがすべて TR/GC[M1] であると仮定した場合にも、2003 年前後において TR/GC[M1] の頻度は、欠失群に比し有意に増加していた ( $P=0.016$ )。

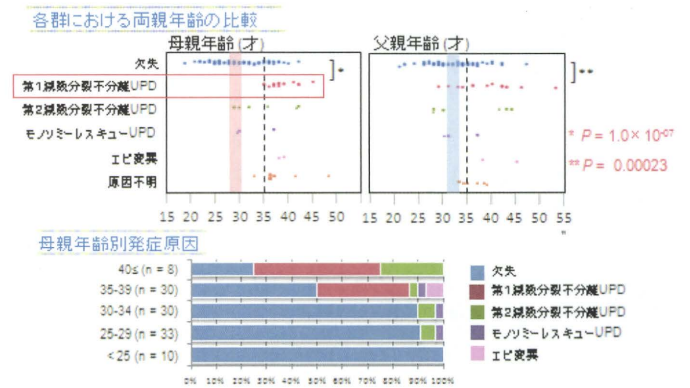


図 2. 発症原因別の両親年齢分布。

表 1 各発症原因の両親年齢

		Deletion	TR/GC [M1]	TR/GC [M2]	MR/P E	Epi-mutation	Non-Deletion	All patients	一般集団
母親年齢	中央値	30	37	31	30	38.5	36	32	27.5-30.9
	全体	範囲 19-42	35-45	29-42	29-37	38-39	30-48	19-48	
	N	84	15	7	3	2	6	117	
	中央値	29	37	32	29	-	36	30*	
2002年以前	範囲	19-42	35-37	29-42	-	-	30-48	19-48	
	N	60	3	5	1	0	6	75	
	中央値	32.5	38.5	35.5	33.5	38.5	-	35*	
2003年以降	範囲	23-39	35-45	30-41	30-37	38-39	-	23-45	
	N	24	15	2	2	2	0	42	
父親年齢	中央値	32.5	40	35.5	31	41.5	36	33	30.6-33.0
	全体	範囲 21-47	29-53	28-44	28-37	38-45	33-39	21-53	
	N	82*	15	6*	3	2	6	114	
	中央値	32.5	43	35.5	28	-	36	33	
2002年以前	範囲	21-47	33-43	28-44	-	-	33-39	21-47	
	N	58*	3	4*	1	0	6	72	
	中央値	32.5	39.5	35.5	34	41.5	-	34.5	
2003年以降	範囲	22-40	29-53	30-41	31-37	38-45	-	22-53	
	N	24	12	2	2	2	0	42	

\*  $P = 0.00017$

### D. 考察

PWS 患者 138 名中、15 番染色体 q11-13 領域の父性由来欠失が 99 名に、15 番染色体母性片親性ダイソミーが 31 名に (TR/GC[M1] 19 名、TR/GC[M2] 9 名、MR/PE 3 名)、エピソードが 2 名で認められた。6 名では、FISH 解析により欠失の存在は否定されたものの、マイクロサテライト解析以降の解析は未施行であるため非欠失群と分類されたが、既存の報告よりこの多くは TR/GC[M1] であることが推測される。これらの結果は、欧米人と日本人で、PWS の発症原因の比率が同等であることを示す。

本研究結果は、第一減数分裂時の不分離を伴いやすい高齢出産が TR/GC[M1] type upd(15)mat 発症のリスクファクターであることを示すものである。事実、出産年

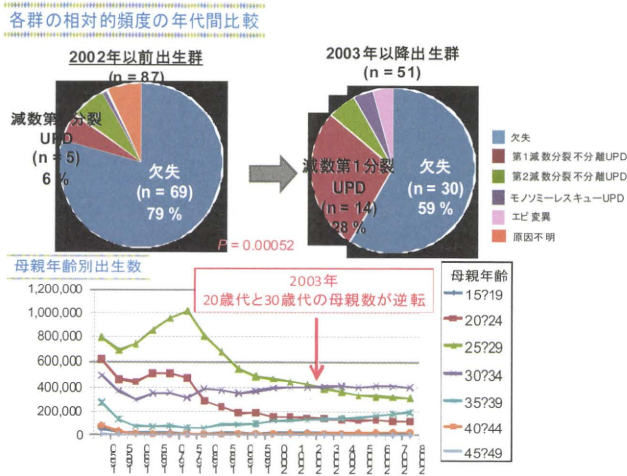


図 3. 2003 年前後の発症原因の相対頻度と母親年齢別出生数。

年齢は、TR/GC[M1]において欠失群に比し有意に高く、2003 年以降に認められた TR/GC[M1]の相対的頻度の有意な増加は、母体の高齢化の影響を強く受けている現象であると考えられる。この発症機序は、ダウン症候群の発症頻度が出産年齢と共に増加することと同じであると推測される。

高齢出産以外に、発症原因の相対的比率の変化を及ぼしうる要因として、父性因子と環境因子を考慮する必要がある。父性因子としては、父親年齢の上昇に伴い、染色体の微小欠失や数的異常が生じる可能性が示唆されており、父親の高年齢が、欠失、あるいは GC や MR を介した upd(15)mat による PWS の発症リスクとなる可能性がある。しかし、父親年齢が上昇した 2003 年以降で、欠失群や MR/PE 群の相対的頻度は増加していなかった。また、GC の過程において、0 染色体性の精子と 2 倍体の卵子が同時に発生するのは非常にまれであると推測され、TR/GC[M1]群で GC によるものの頻度は低いと考えられる。環境因子としては、母体の加齢に伴い、環境化学物質への暴露期間が長くなることで、卵子の減数分裂の異常が起こりやすくなる可能性が示唆されている。しかし、母体の環境物質への暴露量増加のみで TR/GC[M1]の相対的増加を説明することは難しいと考えられる。また、化学物質の暴露を受けた父親の頻度は、コントロール集団に比し、PWS 患者集団で高いという報告が複数存在するが、父親の化学物質への暴露が、特定の PWS 発症原因に強く関与するという報告はない。これらのことから、母親の高齢出産以外の因子が、2003 年前後での発症原因の相対的頻度の変化に与える影響は、あまり大きくないと推察される。

Upd(15)mat は、減数分裂時の不分離のみならず、姉妹染色分体の早期分裂によっても発症しうる。姉妹染色分体の早期分裂は、減数分裂時の不分離と同様に、TR または GC における 2 倍体の卵子形成の原因

であり、女性の高齢化がそのリスクファクターであると考えられている。姉妹染色分体の早期分裂により形成された 2 倍体の卵子は、ヘテロダイソミー/アイソダイソミーが様々なパターンで混在している可能性がある。そして、本研究で用いたマイクロサテライト解析では、upd(15)mat の原因が減数分裂の不分離と姉妹染色分体の早期分離を区別することは不可能である。したがって、TR/GC[M1]に分類された患者には、卵子の減数第一分裂の不分離と姉妹染色体早期分離により発症したものが混在していると考えられる。しかし、いずれの機序も母親の高年齢がその発症に関係しているため、TR/GC[M1]に分類された患者が全て減数第一分裂の不分離、または姉妹染色分体早期分裂のいずれかにより発症したと仮定しても、母親の年齢はこの群の発症に重要な役割を果たしているといえる。

本研究の成果は、生殖補助医療におけるインプリンティング疾患、特に母性ダイソミータイプのインプリンティング疾患、発症を評価する上で重要な示唆を与えるものである。すなわち、生殖補助医療は通常高齢のカップルを対象としているため、本研究で判明したように、年齢という交絡因子を勘案する必要がある。しかし、現在までに、このような交絡因子を勘案して行われた生殖補助医療のリスク評価はなされていない。現在、138 例中 7 例が ICSI/IVF で出生したことが判明していることから、これら 7 名における PWS 発症において、高齢出産以外の生殖補助医療関連因子が関与するか否かを検討中である。

#### E. 結論

本研究成果は、高齢出産が第一減数分裂不分離後の TR を介した 15 番染色体母性片親性ダイソミー発症のリスクファクターであることを示すものである。この成果は、PWS 発症における交絡因子を明確にすると共に、生殖補助医療を受ける母親が通常高齢であることから、今後の生殖補助医療におけるインプリンティング疾患発症の評価において有用と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsubara K, Murakami N, Nagai T, Ogata T\*. Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors. *Hum Reprod* (submitted).
2. 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 Genet* 6 (6): e1000992, 2010. (IF = 9.532)
3. Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T\*. Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like Phenotype. *J Med Genet* 47 (11): 782–785, 2010.
  4. Suzumori N\*, Ogata T, Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Suguhara-Ogasawara M. Prenatal diagnosis of paternal uniparental disomy 14: delineation of further patient. *Am J Med Genet A* 152A (12): 3189–3192, 2010.
  5. Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Matsubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T\*: Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. *J Hum Genet* 56 (1): 91–93, 2011.
  6. Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC\*: Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet C (Seminars in Medical Genetics)* 154C (3): 329–334, 2010.
2. 学会発表
1. 第 33 回小児遺伝学会(仙台)「女性晩婚化に伴うプラダー・ウイリー症候群の発症病因の変化—片親性ダイソミーの増加—」松原圭子、坂爪悟、城戸康宏、緒方勤、永井敏郎
  2. 第 4 回日本エピジェネティクス研究会(鳥取) 2010「日本女性の出産年齢上昇に伴う Prader-Willi 症候群の発症病因の変化」松原圭子、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤
  3. 第 14 回小児分子内分泌研究会(北海道)、2010「高齢出産は trisomy rescue に起因する母性片親性ダイソミーの発症リスクである: Prader-Willi 症候群 154 例の分子遺伝学的解析」松原圭子、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤
  4. 第 44 回小児内分泌学会(大阪) 2010「高齢出産は trisomy rescue に起因する母性片親性ダイソミーの発症リスクである: Prader-Willi 症候群 154 例の分子遺伝学的解析」松原圭子、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤
  5. 第 55 回人類遺伝学会(大宮) 2010「高齢出産は trisomy rescue に起因する母性片親性ダイソミーの発症リスクである: Prader-Willi 症候群 154 例の分子遺伝学的解析」松原圭子、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤
  6. 第 16 回生殖内分泌学会(大阪) 2010「高齢出産は trisomy rescue に起因する母性片親性ダイソミーの発症リスクである: Prader-Willi 症候群 117 例の分子遺伝学的解析」松原圭子、村上信行、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤
  7. 7th International PWS Conference (Taipei) 2010“MATERNAL AGE EFFECTS ON THE CHANGING PROPORTION OF GENETIC CAUSES OF PRADER-WILLI SYNDROME IN JAPAN”. Keiko Matsubara, Yuki Kozu, Satoru Sakazume, Nobuyuki Murakami, Tsutomu Ogata, Toshiro Nagai
  8. 14th International Congress of Endocrinology, (Tokyo) 2010 “MATERNAL AGE EFFECTS ON THE CHANGING PROPORTION OF GENETIC CAUSES OF PRADER-WILLI SYNDROME IN JAPAN”. Keiko Matsubara, Yuki Kozu, Kazuo Obata, Nobuyuki Murakami, Shinji Saito, Tsutomu Ogata, Toshiro Nagai,
  9. Annual meeting of American society of human genetics (Washington D.C.) 2010“Advanced maternal age increases the UPD proportion of PWS.”Nobuyuki Murakami, Keiko Matsubara, Kazuo Obata, Satoru Sakazume, Yasuhiro Kido, Tsutomu Ogata, Toshiro Nagai
  10. International Symposium on epigenome network, development and reprogramming of germ cells (Fukuoka) 2010“Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors.”Keiko Matsubara, Tomoko Sato, Masayo Kagami, Toshiro Nagai and Tsutomu Ogata
- 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

ARTの品質管理・生殖医療の新たな枠組み構築  
～広汎性子宮頸部摘出術後のART症例の周産期予後に関する検討  
および遺伝子発現解析から見た卵子妊孕性解析の基礎的検討～

研究分担者 久慈 直昭 慶應義塾大学医学部産婦人科

研究要旨：広汎性子宮頸部摘出術は、子宮頸部早期浸潤癌を伴う若年女性の妊孕性温存手術として本邦で急速に普及しつつあるが、術後一部の患者は不妊治療を要し、また早産リスクが高くなると推測される。今回我々は RAT 術後の妊娠分娩例 8 症例を経験したので、妊娠に至る治療と妊娠経過・分娩転帰を検討した。8 症例のうち 5 症例に AIH や IVF の不妊治療を必要としたが、不妊治療を行った 5 妊娠中 3 妊娠で妊娠 28 週以前に前前期破水を来し、それぞれ 28 週未満での早産となった。自然妊娠群 3 例では 34 週以前の早産例はなかった。RAT 術後妊娠では予防的頸管縫縮術を行った症例であっても妊娠 28 週未満の早産分娩が起こる危険性が高く、不妊治療を要した症例で高くなる傾向が示唆される。また、卵子の妊孕性を確認するための方法として注目されている遺伝子発現解析について、マウスをモデルとしてその基礎的検討をおこない、増幅後のビオチン標識法の違いによって、解析結果が大きく違いってくることを確認した。

#### A. 研究目的

生殖補助医療（ART）は急速に発展し続けているが、その応用による問題点や、その限界についての研究は始まったばかりである。

そこで、本年度は広汎性子宮頸部摘出術施行後の患者に ART を行った場合の周産期予後について検討するとともに、卵子の妊孕性解析法として注目される遺伝子発現解析法について、基礎的な検討を行い、現在 ART が抱えている問題を別の面から解析した。

#### B. 研究方法

##### 1) 広汎性子宮頸部摘出術後の ART 症例の周産期予後に関する検討

広汎性子宮頸部摘出術の術式は、以下の通りである。術前に、尿管損傷を防ぐため全例に膀胱鏡下逆行性に一時的に尿管カテーテルを留置した。その後我々がこれまで行ってきた広汎子宮全摘術に準じて、第一に腹式に骨盤内リンパ節郭清（総腸骨節、仙骨節、外腸骨節、内腸骨節、基靭帯節、閉鎖節、単径節）、第二に基靭帯処理を施行した。第三に子宮頸部を切除し、この時原則として子宮動脈本幹は温存した。第四に残存子宮頸部と腔の接合および頸管縫縮を行った。周産期合併症の増加を考慮して、

初期に行った症例を除いて全例に頸管縫縮術を行った。また術後 Ashermn 症候群となった経験があるため、子宮内腔癒着防止のために術後 IUD を挿入した。術後は内診、経膈超音波検査、断端細胞診、腫瘍マーカー、CT・MRI 検査などで経過観察し、術後 6 か月程度経過した時点で妊娠許可とした。自然妊娠に至らない症例は当科にて不妊一般検査を施行し、AIH や IVF の不妊治療を試みた。広汎性子宮頸部摘出術後の患者の経過観察において、すべての患者で術後 3 か月は毎月、続く 6 か月は 2 か月毎、2 年目は 3 か月毎、3 年目は 6 か月毎に経過観察とした。それぞれの予約時に合併症を記録し、子宮頸部細胞診を施行した。

##### 2) 卵子遺伝子発現解析法の基礎的検討

卵子遺伝子発現解析法では、微量な卵子由来の遺伝子（mRNA）をおのおのの良否を保ったまま増幅する遺伝子増幅法が必要であり、その有効性・限界や様々な増幅法による解析結果を特徴は多くの報告があるが、同じ増幅法で DNA チップ解析を行うためにラベル化する方法による解析結果の違いについては報告が少ない。

今回我々は、単一卵子遺伝子解析を行う際に、Ribo-SPIA 法（WT-Ovation Pico RNA Amplification System）を用いて遺伝子を増幅し

た後、ULS labeling 法 ( FL-Ovation cDNA Fluorescent Module ) と Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit(5190-0449 : Agilent) のふたつの方法を用いて増幅産物のラベリングを行い、遺伝子発現解析の結果を比較した。

### C. 研究結果

#### 1) 広汎性子宮頸部摘出術後の ART 症例の周産期予後に関する検討

手術症例の詳細を図 1 に示す。全手術症例のうち、広汎性子宮頸部摘出術を施行した症例が 80 例、病変の範囲が術前の予想以上に拡大しており術中に広汎子宮全摘術に変更した例が 10 例であった。広汎性子宮頸部摘出術を施行した中で、術後追加治療が必要となった症例が 10 例あり、経過観察例 70 例のうち未婚症例も含めた挙児希望 41 例を妊娠症例の分母とした。当科での挙児希望例について図 2 に示す。結婚率は 80 症例中 37 例、46.2%、挙児希望率は 80 症例中 41 例、51.2%であった。挙児希望のあった 41 症例中、自然妊娠による妊娠成立は 3 例、症例あたり妊娠率は 7.3%であった。80 症例中 17 例、21.2%で AIH や IVF といった不妊治療を行った。自然妊娠による妊娠成立は 3 症例、症例あたり妊娠率は 7.3%と高くありません。考えられる不妊原因からも、多くの術後症例が AIH や IVF の不妊治療を必要とすることが予想される。総妊娠は 8 症例で、症例あたり妊娠率 19.5%であったが、IVF まで行った症例では、10 症例中 4 症例、40%に妊娠が成立した。

次に当科での妊娠例の周産期予後を図 3 に示す。妊娠例は 8 症例 9 妊娠であるが、前述したように自然妊娠は症例 6 以下の 3 例しかなく、1 例は AIH 妊娠、4 例は IVF による妊娠であった。不妊治療群と自然妊娠群とでみると、上段の不妊治療群で 5 症例中 2 例、6 妊娠中 3 例が前前期破水を起こし、32 週以前の早産となった。これに対して自然妊娠群ではそのような例が見られず、不妊治療群で早産リスクが高くなっている可能性が示唆される。予防的頸管縫縮術については、第一症例の初回妊娠以外、全ての例で施行している。この妊娠では妊娠 22 週より子宮口が自然開大したため、腔閉鎖術を行っているが妊娠 23 週 6 日で前前期破水を起こし、妊娠 24 週 3 日で早産に至っている。これに対して、子宮頸管縫縮術を行った他の症例では、ほぼ妊娠 28 週以降に分娩となっている。一方、出生体重を見てみると、不妊治療群、自然妊娠群とも 10 パーセント未満の IUGR

は一例も認められなかった。このことから、妊娠中の子宮胎盤血流は、不妊治療群も含めて自然妊娠と同様に保たれていることが推測される。分娩、および産褥経過を図 4 に示す。全前置胎盤合併症例以外は全例体下部横切開で分娩可能、輸血を要しなかった。ただし腹腔内癒着症例があり、腸管損傷のリスクや癒着剥離の必要性は高くなる可能性がある。これらの合併症がなければ手術時間は通常と変わらず、また子宮内感染などの産褥合併症も認められなかった。

#### 2) 卵子遺伝子発現解析法の基礎的検討

主成分分析およびクラスター解析を行った結果、同一卵子由来の total RNA サンプルから増幅後に二つのラベリング法でラベル化を行ったものを、同一の DNA microarray (Mouse Whole Genome オリゴマイクロアレイ、Agilent) にて解析した結果、明らかに異なる結果が得られた (n=2)。

### D. 考察

#### 1) 広汎性子宮頸部摘出術後の ART 症例の周産期予後に関する検討

この治療の問題点としては、縮小手術であるために、標準治療と比較して追加治療や、再発リスクが高くなることが挙げられる。一方、妊娠成立・および妊娠維持に必要な頸部を切除していることから、術後の不妊や早産となるリスクの増加が懸念される。不妊の原因としては第一に、子宮頸部切除により精子リザーバー機能の消失、および子宮頸管という感染防御機構の消失による子宮内環境悪化が考えられる。実際、本術式施行後は不妊検査や治療に伴う子宮内操作後の骨盤腹膜炎のリスクが高く、我々も子宮卵管造影後、および人工授精施行後に骨盤腹膜炎を起こした症例を経験しており、注意が必要である。第二に、子宮口狭窄によって精子侵入不全が起こることが考えられる<sup>8)</sup>。第三に、長時間に亘る手術であるため、腹腔内癒着発生による卵管通過障害・pickup 障害が考えられる。図 3 で示した体外受精の成功率はそれほど低くなかったことから、体内での受精障害による不妊が増加している可能性が考えられる。また、術後 Asherman 症候群発症例が報告されており<sup>9)</sup>当科でも経験があることから、術中の子宮血流低下、術後の子宮内環境悪化による子宮内膜の非薄化が不妊の原因となっている可能性もあり、これは体外受精の成功率を低下させる原因となり得る。また、この術式で行われる予防的頸管縫縮術は頸管を狭窄させてしまうため、流産の処置が困難となる可能性や、

分娩後の子宮内容遺残のリスクが増える可能性があり、その施行には議論の余地があると考えられる。広汎性子宮頸部摘出術後の不妊治療後妊娠例の周産期予後の報告は多くないが、Wongらは腹式、および腔式の広汎性子宮頸部摘出術を含む6症例のART後妊娠を報告している<sup>10)</sup>。これをみると、双胎を除く14週以降の妊娠例5例中、4例が30週以前の早産となっており、やはり早産リスクが高いことが示唆される。なお、この報告では予防的縫縮術を行っているかどうかの記載はなかった。なおこの中の症例はIVFによる双胎妊娠例であり、22週で流産となっている。本術式後の妊娠では、多胎妊娠を可及的に回避する工夫が必要と考えられる。

また、広汎性子宮頸部摘出術後妊娠では、頸管粘液の減少により頸管機能不全により感染が増加すると考えられ、妊娠14~16週に予防的抗生剤投与を示唆する報告<sup>11)</sup>や、子宮頸癌臨床進行期I a2期やI b1期の妊婦に対して広汎性子宮頸部摘出術が試みられた報告もある<sup>12,13)</sup>。

広汎性子宮頸部摘出術時には妊孕性温存を熱望する患者に厳しい妊娠予後の説明伝達は不十分となりやすく、特に本手術後の不妊患者にAIH・IVF等の積極的な医学的介入を行う際には、治療に関わる不妊治療担当医からも、周産期管理上危険性が高いことについて再度十分な説明を行うことが望ましく、妊娠管理には周産期担当医との連携も密にしていく必要があると考えられた。

## 2) 卵子遺伝子発現解析法の基礎的検討

遺伝子解析のラベリング法の違いによって、解析結果が事のあることが示された。ラベリングでは、方法によって遺伝子に取り込まれることが明らかになった。

この原因は、キットによる試薬の違いに起因する遺伝子毎のビオチン化塩基取り込み効率の違いや、断片化する際の制限酵素の違いなどに起因すると考えられるが、その詳細な機序は不明である。

しかし、すくなくとも単一卵子由来のmRNAのように極微量の検体を線形増幅してマイクロアレイ解析を行う際には、増幅法によってだけでなく、ビオチン標識法によってもその結果が変化することを知っておく必要があると考えられる。

## E. 結論

RAT術後妊娠では予防的頸管縫縮術を行

った症例であっても妊娠28週未満の早産分娩が起こる危険性が高く、ARTを含む不妊治療を要した症例で高くなる傾向が示唆される。またRAT手術時には妊孕性温存を熱望する患者に妊娠予後の説明が不十分となることがあり、治療に関わる不妊治療担当医からも、周産期管理上危険性が高いことについて十分な説明を行うことが望ましいと考えられた。

また、遺伝子発現解析において、線形増幅法ばかりでなく、ビオチン標識のキットによっても解析結果が異なってくることが明らかになった。

## F. 研究発表

1) 久慈直昭・岸見有紗・西尾浩・持丸佳之・峰岸一宏・宮越敬・藤井多久磨・田中守・青木大輔・吉村泰典・長谷川清志・市川義一。子宮頸部早期浸潤癌に対する腹式radical trachelectomy後の妊娠転帰。第62回日本産科婦人科学会学術講演会、2010年4月23日~25日、東京都、東京国際フォーラム

2) 菅原かな・久慈直昭・岸見有紗・西尾浩・峰岸一宏・宮越敬・藤井多久磨・田中守・市川義一・長谷川清志・青木大輔・吉村泰典。子宮頸部早期浸潤癌に対するradical abdominal trachelectomy後の妊娠転帰。第28回日本受精着床学会総会・学術講演会、平成22年7月28日~29日、神奈川県、パシフィコ横浜

## G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## 参考文献

- 1) Dargent D., Martin X., Sacchetoni A., Mathevet P.: Laparoscopic vaginal trachelectomy: a treatment to preserve the fertility of cervical carcinoma patients. *Cancer*, 88: 1877-1882, 2000.
- 2) Nadeem R. Abu-Rustum, Nikki Neubauer, Yukiko Sonoda, Kay J. Park, Mary Gemignani, Kaled M. Alektiar, William Tew, Mario M. Leitao, Dennis S. Chi, Richard R. Barakat: Surgical and pathologic outcomes of fertility-sparing radical abdominal trachelectomy for FIGO stage IB1 cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 111: 261-264, 2008.
- 3) Lilian T. Gien, Allan Covens.: Fertility-sparing options for early stage



- cervical cancer. *Gynecol Oncol.*, 117: 350-357, 2010.
- 4) Nishio H, Fujii T., Kaori K., Susumu N., Nakamura M., Iwata T., Aoki D.: Abdominal radical tracherectomy as a fertility-sparing procedure in women with early-stage cervical cancer in a series of 61 women. *Gynecol Oncol.*, 115: 51-55, 2009.
  - 5) David C., Jiri S., Jiri S., Daniela F., Pavel F., Michal Z., Iva P., David P., Pavel D., Martin H.: Abdominal radical trachelectomy in fertility-sparing treatment of early-stage cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 19: 1407-1411, 2009.
  - 6) A. Olawaiye, M. Del Carman, R. Tambouret, A. Goodman, A. Fuller, L.R. Duska. Abdominal radical trachelectomy: Success and Pitfalls in a general gynecologic oncology practice. *Gynecol. Oncol.*, 112: 506-510, 2009.
  - 7) Pedro T. Ramirez, Kathleen M. Schmeler, Pamela T. Soliman, Michael Frumovitz. Fertility preservation in patients with early cervical cancer: Radical trachelectomy. *Gynecol. Oncol.*, 110: S25-S28, 2008.
  - 8) Alexander-Sefre F, Chee N, Spender C, Menon U, Shepherd JH. Surgical morbidity associated with radical trachelectomy and radical hysterectomy. *Gynecol. Oncol.*, 101: 450-4, 2006.
  - 9) Ungár L, Pálfalvi L, Hogg R, Siklós P, Boyle DC, Del Priore G, Smith JR. *BJOG*. Mar; 112(3):366-9, 2005.
  - 10) I. Wong, W. Justin, S. Gangooly, L. Sabatini, T. Al-Shawaf, C. Davis, A. Zosmer, A. Tozer.: Assister conception following radical trachelectomy. *Hum Reprod.* 24: 876-879, 2009
  - 11) Shepherd JH, Mould T, Oram DH. Radical trachelectomy in early stage carcinoma of the cervix: outcomes as judged by recurrence and fertility rates. *Br J Obstet Gynacol.*, 108: 882-5, 2001.
  - 12) A .Mandic, P. Novakovic, D. Nincic, M. Zivaljevic, J. Rajovic: Radical abdominal trachelectomy in the 19<sup>th</sup> gestation week in patients early invasive cervical carcinoma: case study and overview of literature. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Aug; 201(2):e6-8. Epub 2009 Jun 13. Review
  - 13) Abu-Rustum NR, Tal MN, DeLair D, Shih K, Sonoda Y. Radical abdominal trachelectomy for stage IB1 cervical cancer at 15-week gestation. *Gynecol. Oncol.*, 2010 Jan; 116(1):151-2. Epub 2009 Oct 29.

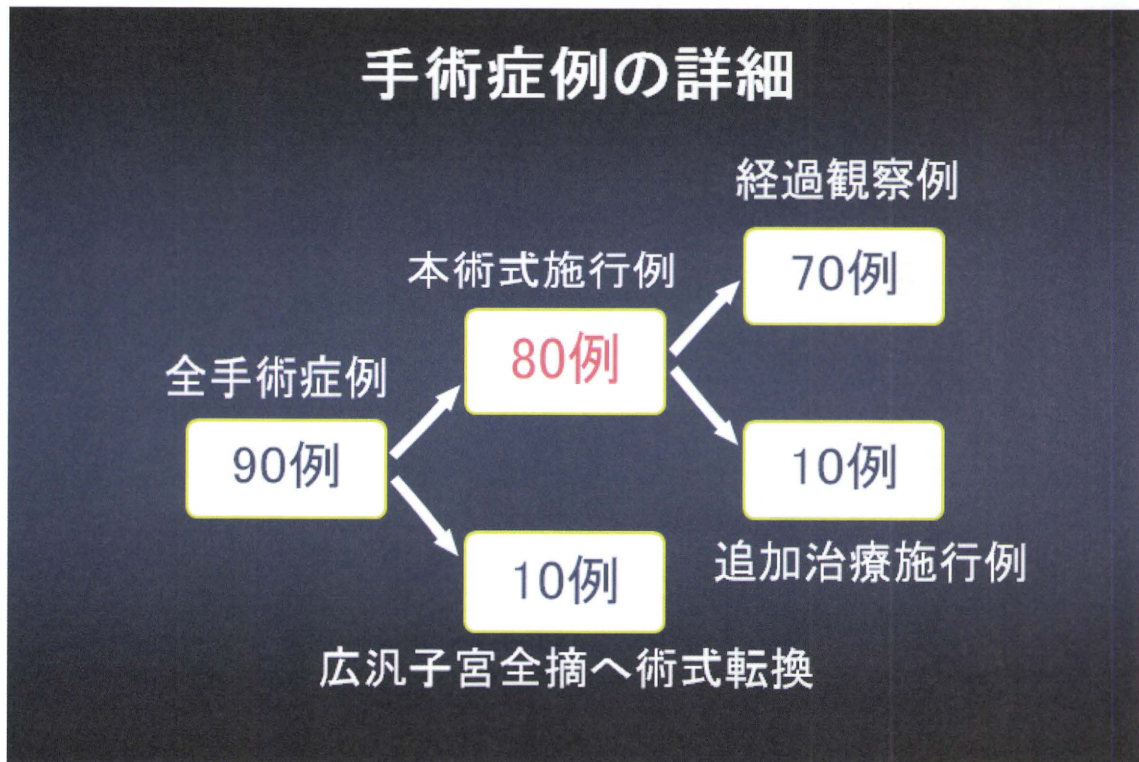


図 1

## 妊娠率

	症例数	率(%)
結婚率	37	46.2
挙児希望率	41	51.2
不妊治療	17	21.2
自然妊娠率	3/41	7.3
総妊娠率	8/41	19.5

図 2

## 当科での妊娠例

症例	年齢	妊娠形式	術中 縫縮術	妊娠中 縫縮術等	分娩 週数	児体重 (g)	APGAR 1/5分後	早産 適応
1	35	AIH	-	膣閉鎖術	24w3d	744*	4/4	PPROM
	40	AIH	+	-	31w1d	1953*	6/7	PPROM
2	34	IVF	+	-	27w6d	969	6/8	PPROM
3	38	IVF	+	-	34w0d	2096	1/5	全前置胎盤
4	35	IVF	+	-	36w6d	2546	8/9	(予定帝切)
5	33	IVF	+	-	37w2d	2690	8/9	
6	35	NI	+	-	35w6d	2658	8/8	
7	33	NI	+	-	37w1d	2598	8/9	
8	27	NI	+	-	37w2d	2450	9/9	

不妊治療群でPPROMが多い傾向があるが、術中の予防的頸管術により分娩をほぼ28週以降に出来る可能性がある  
IUGRは一例もなかった(\*;90%以上のHeavy For Date児)

図 3

## 当科分娩例の経過(8症例中6例)

症例	妊娠形式	腸管縮	分娩週数	早産適応	帝王切開術式	出血量(ml)	その他
1	AIH	-	24w3d	PPROM	体下部・横	1693	(腹腔内癒着)
	AIH	+	31w1d	PPROM	体下部・横	1550	
2	IVF	+	27w6d	PPROM	体下部・横	2054	(術中小腸損傷)
3	IVF	+	34w0d	全前置胎盤	底部・横	4920 (輸血)	
4	IVF	+	36w6d	(予定)	体下部・横	1749	
5	IVF	+	37w2d	(予定)	体下部・横	1800	
6	NI	+	35w6d	(予定)	体下部・横	1680	

前置胎盤合併症例以外は体下部横切開で分娩可能  
輸血を要しなかった

ただし腹腔内癒着のため、腸管損傷リスクや癒着剥離の必要性は高くなる

図 4

## 研究要旨

ヒト精子 DNA 損傷、特に DNA 鎖の断片化観察法の開発を行った。単一精子を固相上に固定し、細胞融解した後に電気泳動を行い、分離された DNA 断片を直接顕微鏡観察し得る方法を開発した。予備的検討の結果、検出される DNA 断片の鎖長が広範囲に分布するため、単一の泳動条件では断片の網羅的解析が困難であることが確認された。そこで断片の鎖長別に 2 種の泳動法および非印加ゲル内拡散法を開発した。

兼子智 東京歯科大学市川総合病院産婦人科講師

### A. 目的

ART に供される卵、精子取扱技術は多岐に渡り、その評価、標準化が不可欠である。本研究はヒト不妊治療を目的とした ART 技術標準化の一端として、ヒト配偶子(精子、卵)、胚の機能異常観察法を確立し、これらを指標として機能的に優れた配偶子、胚の選別法を開発する。本年度はヒト精子 DNA 損傷、特に DNA 鎖の断片化観察法の開発を行った。

### B. 研究方法

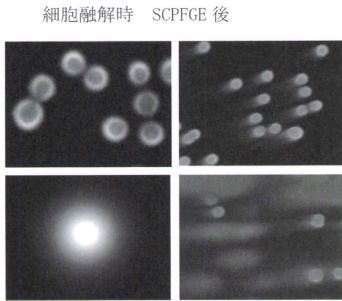
サイトスピン遠心機を用いて精子をスライドグラス上に固定した。これを溶融アガロースで被覆、固化した。さらにトリプシン、DTT、ヘキサ 6 リン酸、ポリリン酸、トライトン X100 を含む溶液に浸漬して細胞を融解した。電気泳動は 1 セットの電極を有する単軸型電気泳動法、交差する 2 セットの電極を有する single cell pulse field gel electrophoresis (SCPFG) を開発した。

SCPFG は X 型に配置した電極を 3 秒間隔で交互に通電し、従来の電気泳動法では伸長不可能な長鎖 DNA を展開するものである。さらに細胞融解過程において短鎖断片は非印加でゲル内拡散をするので、拡散像を泳動前に観察した。

### C. 結果

図 1 に示したように、細胞融解液で処理された精子はゲル内であたかもウニの刺状に周囲に DNA fiber が付きだした状態を示すものと、電圧を印加(電気泳動)しないにも関わらず周囲に DNA 断片が拡散した像を示すものに大別された。電気泳動することなく周囲に拡散した DNA 断片は、アガロースの網目構造を自由に通り抜けて拡散可能なレベルの短鎖 DNA であり、高倍率で検鏡しても粒子としては観察できなかった。これらを SCPFG で電気泳動すると、前者は原点から DNA fiber が伸張する像を示したが、後者では種々の長さの DNA 断片が泳動される像を示した(図 1)。SCPFG により引き出された DNA fiber の先端を高倍率で顕微鏡観察すると、伸張した DNA fiber の先端より先に切断された長鎖 DNA 断片が観察され

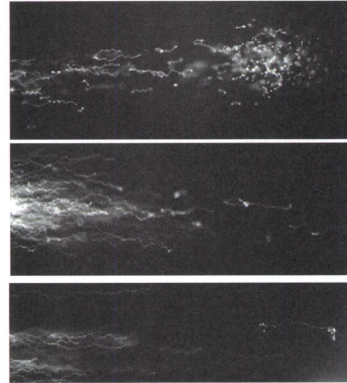
図1 細胞融解時の DNA 自由拡散と  
その SCPFGE 像



るものが存在した (図2)。長鎖 DNA 断片に関しては、電気泳動法による DNA 断片の分離(引抜き)は断片数の観察が可能であり、理論上は1本のDNA断片が観察可能である。SCPFGE装置により泳動を行うと、連続したDNA fiberの伸長とその先に分離された長鎖断片の観察が可能であるが、印加することなく拡散するレベルの短鎖断片は電気泳動速度が速く視野外に移動するため、両者の同時観察は不可能である。また細胞融解時に自由拡散DNA断片が観察されない、ウニの刺状に周囲にDNA fiberが突きだした状態を示した精子においても自由拡散できない短鎖DNAが存在する。そこでDNA fiberを伸長させることなく、自由拡散できない短鎖DNAを選択的に観察することを目的とした単軸型電気泳動法を検討した。印加電圧の低下、泳動時間の短縮により短鎖断片が原点の直前に引き出された泳動像を得ることができた(図3)。

これまで述べた結果は、個々の精子内に存在するDNA断片を網羅的に解析することを目的とした。一般的にDNAは染色体として

図2 SCPFGEにより観察される  
長鎖DNA断片



細胞核内に存在するが、精漿内に細胞外DNAが見出された。精液を超速心分離して調製した精漿20・1をアガロースwellに添加して通常のサブマリン電気泳動を行うとゲル内に泳動像が観察され(図4)、これらはDNaseI処理により消失した。DNA断片の鎖長は100 base pair以下にまで達しており、その分布は広範囲であった。

#### D. 考察

本研究で開発したSCPFGEは単一精子に由来するDNAを伸張することが可能であり、DNA fiberを蛍光顕微鏡観察することができた。ヒト精子染色体は断片化したDNAを含むものが存在した。DNAの鎖長は幅広く分布し、単一泳動条件ではすべてのレベルのDNA断片を網羅的に観察することは不可能であり、複数の泳動条件を設定する必要があった。実験計画の段階では精子核内のDNA断片化を光学顕微鏡で観察することを

図3 短鎖断片の選択的引き出し

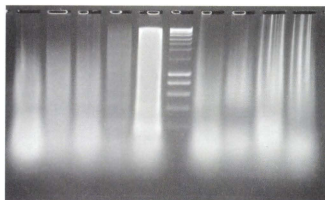
陰性像



陽性像



図4 精漿細胞外 DNA の電気泳動



精漿（細胞外液） 20  $\mu$ l 添加、  
これらは Dnase I 処理で消失

企図したが、精漿中に高度に断片化した DNA  
が存在することが明らかになった。一方、

表1 精液中 DNA 断片の網羅的解析

精子由来 DNA	
連続した DNA fiber	SCPFGE
長鎖 DNA	SCPFGE
短鎖 DNA	単軸電気泳動
自由拡散 DNA	ゲル内拡散
精漿内 DNA	
10,000bps 以下	サブマリン電気泳動法

この知見は DNA 断片に関する臨床検査が精子のみならず精漿を含めた精液内 DNA 断片として総合的に解析するべきであることを示唆している。今後、精漿内の DNA 断片が変性の進行により最終的に融解した精子に由来するか否かを後証明しなくてはならない。表1に精液内 DNA 断片検査法の指針をまとめた。来年度は、これらの DNA 断片が精子機能のどのような指標なのかを検索したい。

#### E. 結論

射精精液内の精子は核 DNA に断片化を示すものが存在した。その断片化の程度は個々の精子で大きく異なり、1本の長鎖断片を認めるものからアガロース網目構造を自由拡散可能な無数の断片を有するものまでであった。さらに精漿内にも細胞外 DNA 断片が存在することを見出した。これらの結果は、精液内 DNA 断片の総合的な解析とともに男性生殖機能における意義を解析する必要があることを示している。



## ARTの品質管理と次世代への影響の検証に関する研究

研究分担者：有馬隆博（環境遺伝医学総合研究センター・教授）

ARTは不妊症に重要な治療法で、年間約2万人の児が出生している。しかしARTは配偶子を操作するため、エピジェネティックの異常（ゲノムインプリンティングの異常）を起こし、先天性疾患や悪性腫瘍、性格や行動異常を引き起こす可能性が示唆されている。米国などの先進諸国では、先天性ゲノムインプリンティング異常症の発症頻度が、ART出生児では一般出生児の6から10倍に増加していると報告している。また、インプリンティングを受ける遺伝子のメチル化異常の報告も多数みられる。本研究の目的は、1) 療育センターや重症心身障害者施設を含む全国多施設の協力下に、ART治療と先天性ゲノムインプリンティング病に関する発症頻度調査（ART症例の頻度、ART治療内容と臨床像等）2) 患者DNAを用いたエピゲノム解析（メチル化解析）を行い、メチル化異常の頻度、程度との関連性について疾患別に交絡要因を考慮し、正確に評価する事である。

全国調査対象施設総数3158施設（産婦人科/小児科/重症心身障害者施設）のうち、1602施設から有効回答があり、報告患者総数は1818人であった（BWS 216人、AS 415人、PWS 992人、SRS 161人、TNDM 34人）。各疾患の年齢別推移では、AS以外の4疾患で、近年増加傾向にあることが示唆された。特にBWS、SRSは最近5～10年間に急増している傾向がみられた。また、不妊治療を受けたかどうかに関しては、受けたかどうか分からない患者が多いことが特徴で、十分な情報が得られていない。しかし、何らかの不妊治療を受けた事が判明している親は0～9.5%で、一般に不妊治療を受けている割合が10%前後なので、多いとはいえない。一方、実際にPWS、BWS、AS、SRSの患者のそれぞれ1.5%、8.6%、1.6%、9.5%が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精（IVF）あるいは顕微授精（ICSI）によるもので、平成17年度のIVF+ICSIの出生児が0.86%である事を考慮すると、4疾患とも発症率は高く、特にSRSでは11.2倍、BWSでは10倍と圧倒的な高リスクである事が判明した。頬粘膜細胞DNAの提供は、現在まで75名しか回収できていない。そのうち異常を認めた症例は、BWSが1人、ASが5人、PWSが8人、SRSが4人で、ART治療を受けた症例は、SRSの2例のみであった（いずれもICSI）。症例数が圧倒的に少ないため、ARTがメチル化異常に関与するかどうか結論を出す事は出来なかった。

晩婚化、少子化により今後もART出生児が増加すると予想され、ARTと先天性ゲノムインプリンティング病との関連性については、次世代社会の最重要な問題として早急に実態を把握し、適切な対応をとる必要性があると考えられる。

## A 研究目的

近年、少子化、晩婚化の社会情勢と医療技術の進歩により、生殖補助医療（ART）が急速に普及した。しかし、同時にこれまで非常に稀であったゲノムインプリンティング異常症の発症頻度が増加していることが世界中で報告され、注目されている。代表的な先天性ゲノムインプリンティング異常症は、Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）、新生児一過性糖尿病（TNDM）で、いずれも発生頻度数万〜数十万人に1人で非常に稀な疾患と考えられている。これには、ゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子は環境変化に対して非常に脆弱であり、その時期にARTにより配偶子を操作する事が様々な異常を招く原因である可能性が高い。ゲノムインプリンティング異常は、先天性疾患だけでなく、周産期異常、乳幼児の身体的、精神的発育・発達、性格、行動異常等にも関連する。さらに、癌や生活習慣病などの成人性疾患の原因となりうるため、次世代社会の最重要な問題として早急に実態を把握し、適切な対応が必要とされる。これまでに、不妊症男性のうち乏精子症患者精子の約半数にインプリンティング異常の存在を確認し、ゲノムインプリンティング異常症発症の原因であると推測した。さらに、独自にこのインプリンティング異常症責任領域を明らかにし、発生リスクの判定方法として東北大学より特許出願した。

本研究では、まず療育センターや重症心身障害者施設を含む全国多施設の協力下に、ART 治療と先天性ゲノムインプリンティング病5疾患に関する疫学調査（ART 症例の

頻度、ART 治療内容と臨床像等）を行う。次に、患者の遺伝子解析（FISH、メチル化解析）を行なう。特にメチル化異常の頻度、程度との関連性について疾患別に交絡要因を考慮し、正確に評価する事を目的としている。

## B. 方法

### （1）ART 治療と先天性ゲノムインプリンティング病5疾患に関する全国調査

#### 1) 調査対象施設・診療科

全国病院の小児科および産婦人科を対象として、大学病院／一般病院の別、病院の病床数で層別化した層化無作為抽出による抽出調査を実施した。全病院のリストは「病院要覧」を、大学病院は「医療機関名簿」を使用した。患者が特に集中すると予想される重症心身障害者施設（以下「特別病院」）については、全数調査を行った。

#### 2) 調査法

調査法は郵送法で行った。依頼状・診断基準・調査票を対象科に送付し、受療患者数（新患および再来）の報告を依頼した。期限までに返送のなかった診療科には再度依頼を行った。第1次調査で「患者なし」と報告された診療科には礼状を送付し、「患者あり」と報告された診療科には依頼状・診断基準とともに第2次調査票（患者個人用）を随時送付した。

#### 3) 倫理面への配慮

本調査は、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている。第1次調査の記入は受療患者数のみであり、第2次調査の集計解析は連結不可能匿名化された状

況下で行い、プライバシー保護に万全の配慮を施している。

(2) 先天性ゲノムインプリンティング病患者のインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

#### 1) DNA 送付

医療機関の主治医により説明、同意を得たのち、口腔粘膜細胞を採取 (FTA カード、アプリケーターチップ)、東北大学に送付、DNA 抽出。

#### 2) DNA メチル化の解析

先天性ゲノムインプリンティング病患者の頬粘膜細胞から抽出した DNA を用い、インプリント遺伝子 8 領域のメチル化解析を行った。これには、ハイスループット系の新規 Bisulphite PCR メチル化定量測定システムを応用した。さらに確認には、それぞれ Bisulphite PCR シークエンス法を用い、正確に評価した。

### C. 研究結果

(1) ART 治療と先天性ゲノムインプリンティング病 5 疾患に関する全国調査

調査対象施設総数 3158 施設のうち、1602 施設から有効回答があり (有効回答率 56.3%)、報告患者総数は 1818 人であった。その内訳は、BWS が 216 人、AS が 415 人、PWS が 992 人、SRS が 161 人、TNDM が 34 人である。1818 例のうち 27.7% にあたる 504 例の第 2 次調査票が回収された。このうち不適格率はなかった。

図 1 には、各疾患の患者数と男女比を示し、図 2 には、各疾患の年齢別推移を示し

た。その結果 AS 以外の 4 疾患で、近年増加傾向にあることが示唆される。特に BWS、SRS は最近 5~10 年間に急増していることが疑われる。性比には、有意な差は見られなかった。また、BWS において 9 割近くの症例が 2000 年以降に発症していた。AS において 4 割近くの症例が 15 年以上前に発症していた。一方、発症 10 年未満の症例も 3 割を超えていた。PWS において 3 割近くの症例が 15 年以上前に発症していた。一方、発症 10 年未満の症例も 4 割を超えていた。SRS においての 8 割以上の症例が 1995 年以降に発症していた。TNDM においては全ての症例が 1995 年以降に発症していた。また、家族歴と近親婚の有無では、PWS において 1.5%、BWS において 1.4%、AS において 0.8%、SRS において 1.4%、TNDM において 25% の症例に家族歴が認められた。しかし、ほとんどが孤発例であった。AS においてのみ 1.6% の症例に近親婚が認められた。

図 3 には、全国地域別の見た症例の分布を示す。関東、中部、近畿の大都市に多く見られるのが特徴である。しかし、総人口比で算出すると有意な差は見られなかった。

図 4 に不妊治療を受けたかどうか、また受けた場合はその治療内容 (表 1) について示した。全体に、不妊治療を受けたかどうか分からない患者が多いことが特徴で、十分な情報が得られていないことが判明した。何らかの不妊治療を受けた事が判明している親は 0~9.5% で、一般に不妊治療を受けている割合が 10% 前後なので、多いとはいえない。しかし、実際少なくとも PWS、BWS、AS、SRS の疾患のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5% が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精 (IVF)

あるいは顕微授精 (ICSI) によるものであった。平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間 10338 人で全出生児の 0.86%となる。いずれの 4 疾患も発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクである事が判明した。

図 5 に各疾患の主な臨床症状の特徴を示すが、現時点では ART 児における特異な症状は見られなかった。症例数が少ない事も原因と考えられた。

(2) 先天性ゲノムインプリンティング病患者のインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

患者登録が行なわれた 1818 人の先天性ゲノムインプリンティング病患者のうち、頬粘膜細胞から抽出した DNA の提供者は、本年 2 月までで 75 名であった。その内訳は、BWS が 6 人、AS が 37 人、PWS が 22 人、SRS が 10 人、TNDM が 0 人であった。我々は、これまでに、これら疾患の原因となるヒトインプリント遺伝子の DNA メチル化領域を同定し、報告した (図 6)。また、ハイスループット系の新規 Bisulphite PCR メチル化定量測定システム (PCR-Luminex 法) を応用した。PCR-Luminex 法はフローサイトメトリーを利用したマイクロビーズアレイ技術である蛍光ルミネックス法を用いた技術である。これまでに、一塩基置換を検出可能なことから SNP 検査等に応用されてきた。この技術を用い、本法ではバイサルファイト (BS:亜硫酸水素塩) 処理で塩基置換した非メチル化をメチル化アレルと区別し、定量化を行う。BS は DNA の非メチル化 CpG 部位は TpG に置換し、非メチル化 CpG 部位は CpG のまま置換しない。労力と

コストの削減が可能となり、96 検体の測定が約 1 時間と短時間で処理可能である。効率良く増幅可能なプライマーの設計は、特許申請している。

また確認には、それぞれ Bisulphite PCR シークエンス法を用い、正確に評価した。異常を認めた症例の結果は、BWS が 1 人、AS が 5 人、PWS が 8 人、SRS が 4 人であった (図 7)。インプリント遺伝子 8 領域のメチル化解析の結果のまとめは、表 3 に示す。そのうち、ART 出生児から抽出された DNA は、SRS の 2 例のみであった。現在、症例登録継続中であり、最終年度で全測定結果がそろってから発生リスクを解析する。

#### D 考察

##### ●ART と先天性インプリント異常症との関連

1 次アンケート調査では、全国 3158 施設の実態調査を行い、1602 施設 (有効回収率 56.2%) より回答を得た。次に 2 次アンケート調査では、対象 5 疾患を治療している 380 施設のうち 171 施設より、臨床像や治療法等 14 項目についての回答を得た (総患者数は 454 名)。不妊治療を受けた患者は 0~9.5%で、一般に不妊治療を受けている割合が 10~15%なので、多いとはいえない。しかし、PWS、BWS、AS、SRS の疾患のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5%が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精 (IVF) あるいは顕微授精 (ICSI) によるものであった。平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間 1 万人以上で、全出生児の 0.86%となる。4 疾患の発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクが予想される。しかし、症例数も少なく、親の年齢も考慮しなければ正確