

あった。

転座保因者に対する PGD は、合計 572 採卵周期、174 症例に対して施行された。対象疾患としてはロバートソン転座および相互転座保因者であり、それぞれ男性保因者と女性保因者に分けて比較した。採卵周期数および症例数は多い順に相互転座女性保因者(332 周期, 87 症例), 同男性保因者(179 周期, 67 症例), ロバートソン転座女性保因者(48 周期, 16 症例), 同男性保因者(13 周期, 4 症例)であった。採卵周期数は、相互転座では約 65%が女性保因者であるのに対し、ロバートソン転座では約 79%が女性保因者であった。

今後 PGD の適応をどのように判断し、運用すべきか、二段階倫理申請による PGD 実施までの期間の長期化など、わが国における問題点が指摘された。また、遺伝学的情報の取扱と管理についてはなお不十分な体制の施設が多くみられた。PGD では診断のための生検などの操作により、通常の体外受精よりも、胚への侵襲が否定できない。この際の児の予後を長期に亘り調査することは必要不可欠と考えられる。本研究により、わが国における PGD の実施状況を継続的に調査し、データ集積の基盤が構築された。今後、児の長期的な予後調査を開始し、検討していくことが求められる。

A. 研究目的

着床前遺伝子診断 (PGD) はわが国での臨床実施が開始されて以来、実質的にはすでに 7 年が経過し、出生が累積されつつある。PGD は、顕微授精、割球生検、遺伝子診断、長期培養、胚凍結などの先進的生殖医療技術を必要とする。この技術面での知見や成果についての具体的な集積データとして、欧州生殖医学会 (ESHRE) の PGD consortium での集計が行われているが、各施設ベースでの技術的背景などの詳細データは明らかにされておらず、その知見の

共有化はなされていない。

また、遺伝学的診断の精度のみならず、生検胚からの妊娠効率や出生までに生じる流産や出生後の成育についても今後の継続的な情報の集積が必要である。加えて単一細胞に対する複雑な遺伝子診断の精度や対応に関して、個々の疾患や事例によって異なることが多く、遺伝子病の特徴によっても異なる。さらに、わが国では倫理面での議論から対象事例は限定的であり、今後の対象を検討するうえでも実態調査が必要である。そこで実態調査と問題点の抽出を

目的として、協力医療施設に対して、実態調査を実施した。本調査の目的は、わが国における PGD の実施状況をより詳細に調査し、診断技術の標準化を図るとともに、PGD を継続していくために不可欠な出生児の長期予後についてもデータを集積することである。

B. 研究方法

研究協力施設は日本産科婦人科学会に PGD に関する倫理審査依頼を行った医療機関および諸学会発表等の媒体によって実施されていると推定された、計 12 施設である。調査は 2012 年 10 月までに各施設で実施された PGD 症例すべてを対象とした。今後わが国での PGD 実施状況を継続的に把握するため、ESHRE PGD consortium の基本的調査項目に加え、倫理審査や遺伝カウンセリングにおける課題、出生児の長期予後などの項目を加えて、わが国独自のフォーマットファイル (FileMaker Pro を使用) を作成した。

ファイルは①患者情報、適応、費用②倫理審査、カウンセリング③PGD④妊娠、出生前診断⑤分娩⑥児の予後の 6 種類のレイアウトに分けた。

このフォーマットに基づき、協力各施設で事例ごとに記録し、連結不可能匿名化データとして、集計機関

で集計および結果の検討を行った。

胚移植可能胚率は診断可能胚数に対する胚移植可能胚数の割合として算出した。

胎児心拍が一つ以上確認された場合に臨床的妊娠とし、臨床的妊娠率は採卵および胚移植あたりの胎児心拍が確認された症例数として算出した。

また、着床率は 100 移植胚あたりの胎児心拍が確認された数と定義した。

なお本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会の審査承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 遺伝カウンセリングおよび遺伝学的情報の管理体制についての検討 (表 1)

12 施設中 3 施設で臨床遺伝専門医が遺伝カウンセリングを担当していなかった。また専用の遺伝カウンセリング室を使用していない施設は 4 施設あった。検査前後に遺伝カウンセリングを行っている施設は 3 施設であり、9 施設では検査前に行われたのみであった。

遺伝情報の記載は 7 施設で通常の産婦人科カルテに記録されるのみの体制であったことが判明した。検査結果の保管場所は 5 施設で産婦人科カルテであり、職種や担当者の中で閲覧に制限を設けていない施設は 3 施設存在した。検査結果を開示する

際は夫婦同時に行う施設が 9 施設あった。

2. 単一遺伝性疾患に対する PGD (表 2a, 2b)

単一遺伝性疾患に対する PGD は、合計 99 採卵周期、37 症例に対して施行された。

対象疾患としてはデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)、筋緊張性ジストロフィー (DM1)、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 (OTC)、福山型筋ジストロフィー (FCMD)、副腎白質ジストロフィー (ALD) の計 5 疾患であり、DMD および DM1 がそれぞれ 24 症例、9 症例であり、その他の疾患はすべて 1 症例であった。

受精方法は不明の 2 周期を除外すると、すべて ICSI であった。生検時の透明帯開口方法にはすべてレーザーが使用されていた。生検方法は、Day3 の分割期胚の割球吸引法が全周期で実施されていた。

全採卵数は 1050 個であり、そのうち 63.0% (661/1050) が受精した。受精した胚の 83.8% (554/661) が生検され、そのうち 97.7% (541/554) が生検に成功した。生検成功胚のうち、70.8% (383/541) で診断が可能であり、そのうちの 62.7% (240/383) が胚移植可能であった。PGD を施行した 95 周期のうち、123.2% (117/95)

で胚移植となった。採卵周期あたりの平均で考えると、10.6 個の卵子が採取され、そのうち受精した胚は平均 6.7 個で、そのうち 5.6 個に生検可能であった。診断可能胚数は平均で 3.9 個であり、そのうち 2.4 個で胚移植可能であり、1.7 個が実際に胚移植された計算となる。

hCG 陽性は 19 周期で認められ、そのうち胎児心拍陽性は 14 周期であった。採卵および胚移植あたりの臨床的妊娠率はそれぞれ 14.1% (14/99)、12.0% (14/117) であり、着床率は 9.0% (15/167) となった。採卵周期および胚移植周期あたりの分娩数の割合はそれぞれ 10.1% (10/99)、8.5% (10/117) であった。流産数、異所性妊娠はそれぞれ 8 周期、1 周期であった。

3. 転座保因者に対する PGD (表 3a, 3b)

転座保因者に対する PGD は、合計 572 採卵周期、174 症例に対して施行された。

対象疾患としてはロバートソン転座および相互転座保因者であり、それぞれ男性保因者と女性保因者に分けて比較した。採卵周期数および症例数は多い順に相互転座女性保因者 (332 周期、87 症例)、同男性保因者 (179 周期、67 症例)、ロバートソン転座女性保因者 (48 周期、16 症例)、

同男性保因者（13 周期，4 症例）であった。採卵周期数は，相互転座では約 65%が女性保因者であるのに対し，ロバートソン転座では約 79%が女性保因者であった。

受精方法は全体の約 72%が ICSI のみであった。生検時の透明帯開口方法はレーザーと機械的方法がそれぞれ約 48%，約 48%で，同程度に実施されていた。生検方法は，Day3 の分割期胚の割球吸引法が約 86%で大部分を占め，約 13%に割球圧出法が実施され，極体生検は 3 周期のみであり，胚盤胞生検は全く行われていなかった。

全採卵数は 4140 個であり，そのうち 66.3% (2744/4140) が受精した。受精した胚の 66.4% (1822/2744) が生検され，そのうち 99.8% (1819/1822) が生検に成功した。生検成功胚のうち，94.0% (1710/1819) で診断が可能であり，そのうちの 25.5% (436/1710) が胚移植可能であった。PGD を施行した 511 周期のうち，42.3% (216/511) で胚移植となった。採卵周期あたりの平均で考えると，7.2 個の卵子が採取され，そのうち受精した胚は平均 4.8 個で，そのうち 3.2 個に生検可能であった。診断可能胚数は平均で 3.0 個であり，そのうち 0.8 個で胚移植可能であり，0.5 個が実際に胚移植された計算となる。

hCG 陽性は 101 周期で認められ，そのうち胎児心拍陽性は 77 周期であった。採卵および胚移植あたりの臨床的妊娠率はそれぞれ 13.5% (77/572)，35.6% (77/216) であり，着床率は 27.4% (80/292) となった。臨床的妊娠率は，相互転座男性保因者において，高い傾向を認めた。採卵周期および胚移植周期あたりの分娩数の割合はそれぞれ 10.5% (60/572)，27.8% (60/216) であった。流産数，異所性妊娠はそれぞれ 36 周期，2 周期であった。流産の半数以上（約 61%）は相互転座女性保因者において認められた。

4. 出生前および出生後診断（表 4）

出生前診断として，羊水検査は約 45% (26/57) で実施されていたのに対し，約 53% (30/57) では出生前診断は行われていなかった。不明を除外すると，羊水検査が行われた 24 例のうちの 23 例（約 96%）で結果は正常であった。

5. 分娩および出生児（表 5）

確認された分娩数は 70 であり，その約 85%が正期産であったが，全体の約 50%で帝王切開術が実施されていた。性別はやや女児のほうが多い（約 56%）傾向を示した。単胎における出生体重の平均は 2964g であった。

D. 考察

本調査から、日本における PGD の現状を明らかにすることができた。

わが国における PGD の大部分は染色体均衡型転座保因者に対する PGD であり、単一遺伝子疾患などの重篤な遺伝性疾患に対する PGD を実施している施設は 2 施設で、いずれも大学病院であった。今後 PGD の適応をどのように拡大すべきか、二段階倫理申請による PGD 実施までの期間の長期化など、わが国における問題点が指摘された。また、遺伝学的情報の取扱と管理についてはなお不十分な体制の施設が殆どであった。

PGD では診断のための生検などの操作により、通常の体外受精よりも、胚への侵襲が否定できない。この際の子の予後を長期に亘り調査することは必要不可欠と考えられる。本研究により、わが国における PGD の実施状況を継続的に調査し、データ集積の基盤が構築された。今後、子の長期的な予後調査を開始し、検討していくことが求められる。

E. 結論

生殖医療の新たな展開として開始された PGD に関する幅広い調査が必要である。実際に胚操作や遺伝子診断の技術的問題点、安全性、倫理社会面に発生する問題点、出生児の

長期予後の検討などを通じて検証が必要であり、向後に継続的な追跡が求められる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

末岡 浩, 佐藤健二, 水口雄貴, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤 卓, 中林 章, 吉村泰典

「わが国における着床前遺伝子診断の実施に関する実態調査（第一報）」
第 30 回受精着床学会 発表 大阪府
大阪国際会議場, 2012.8.30-31

佐藤健二

「着床前診断の実情と予後調査」
第 30 回受精着床学会 発表（ワークショップ）
大阪府 大阪国際会議場, 2012.8.30-31

佐藤健二, 末岡 浩, 水口雄貴, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤 卓, 中林 章, 吉村泰典

「着床前遺伝子診断の安全性と出生児の予後調査—新たなフォーマットファイルの作成—」

第 30 回受精着床学会 発表 大阪府
大阪国際会議場, 2012.8.30-31

佐藤健二, 末岡 浩, 水口雄貴, 泉 陽子, 高橋香織, 佐藤 卓, 中林 章, 吉村泰典

「着床前遺伝子診断の安全性と出生児の予後調査—新たなフォーマットファイルの作成—」

第57回日本人類遺伝学会 発表 東京都 京王プラザホテル, 2012.10.25-27

佐藤健二, 末岡 浩, 水口雄貴, 泉 陽子, 高橋香織, 佐藤 卓, 中林 章, 吉村泰典

「着床前遺伝子診断の安全性と出生児の予後調査—新たなフォーマットファイルの作成—」

第57回日本生殖医学会 発表 長崎県 長崎ブリックホール, 2012.11.8-9

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 遺伝カウンセリングおよび遺伝学的情報の管理体制についての検討

カウンセリング担当		
	臨床遺伝専門医	9
	認定遺伝カウンセラー	2
	経験豊富な医師	1
カウンセリング場所		
	専用のカウンセリング室	8
	面談室	3
	産婦人科外来	1
カウンセリング時期		
	検査前のみ	9
	検査前後	3
遺伝学的情報の記載		
	遺伝カルテ	5
	産婦人科カルテ	7
遺伝学的検査結果の保管場所		
	遺伝カルテ	5
	産婦人科カルテ	5
	専用保管庫	2
検査結果の開示対象		
	夫婦同時	9
	個人ごと	2
	保因者のみ	1
遺伝情報閲覧可能な職種		
	制限なし	3
	制限あり	9

表 2a 単一遺伝性疾患に対する PGD

	DMD	DM1	OTC	FCMD	ALD	Leigh 脳症	合計
採卵周期数	59	31	6	1	1	1	99
症例数	24	9	1	1	1	1	37
女性年齢 (歳)	38	36	42	38	41	39	38
IVF/ICSI 前のキャンセル周期数	1	1	0	0	0	0	2
受精方法							
IVF	0	0	0	0	0	0	0
ICSI	58	28	6	1	1	1	95
IVF+ICSI	0	0	0	0	0	0	0
不明	0	2	0	0	0	0	2
IVF/ICSI 後のキャンセル周期数	1	0	1	0	0	0	2
PGD 周期数	57	30	5	1	1	1	95
透明帯開口方法							
酸性タイロード液	0	0	0	0	0	0	0
レーザー	57	23	0	1	1	1	83
機械的	0	0	0	0	0	0	0
レーザー+機械的	0	0	5	0	0	0	5
不明	0	0	0	0	0	0	0
生検方法							
極体	0	0	0	0	0	0	0
割球吸引	57	23	5	1	1	1	88
割球圧出	0	0	0	0	0	0	0
胚盤胞	0	0	0	0	0	0	0

表 2b 単一遺伝性疾患に対する PGD

	DMD	DM1	OTC	FCMD	ALD	Leigh 脳症	合計
<u>胚発生</u>							
採卵数 (1 回の平均採卵数)	614(10.4)	360(11.6)	52(8.7)	8(8.0)	13(13.0)	3(3.0)	1050(10.6)
受精卵数	395	224	29	5	7	1	661
生検胚数	331	186	25	4	7	1	554
生検成功胚数	330	174	25	4	7	1	541
診断可能胚数	254	101	22	-	5	1	383
胚移植可能胚数	175	48	12	-	5	0	240
胚移植可能胚率	68.9	47.5	54.5	-	100	0	62.7
移植胚数	125	30	7	-	5	0	167
<u>臨床結果</u>							
胚移植周期数 (% per OR)	90(153.0)	19(61.3)	5(83.3)	0(0.0)	3(300.0)	0(0.0)	117(118.2)
hCG 陽性	14	3	0	0	2	0	19
胎児心拍陽性	12	1	0	0	1	0	14
臨床的妊娠率 (% per OR)	20.3	3.2	0	0	100	0	14.1
臨床的妊娠率 (% per ET)	13.3	5.3	0	0	33.3	0	12.0
心拍陽性胎児数	13	1	0	0	1	0	15
着床率	10.4	3.3	0	0	20	0	9.0
分娩数	9	0	0	0	1	0	10
流産数	5	2	0	0	1	0	8
異所性妊娠	0	1	0	0	0	0	1
双胎	1	0	0	0	0	0	1

表 3a 転座保因者に対する PGD

	ロバート ソン転座 男性保因者	ロバート ソン転座 女性保因者	相互転座 男性保因者	相互転座 女性保因者	合計
採卵周期数	13	48	179	332	572
症例数	4	16	67	87	174
女性年齢 (歳)	43	39	39	39	40
IVF/ICSI 前のキャンセル周期数	0	2	8	14	24
受精方法					
IVF	0	11	61	76	148
ICSI	13	37	105	239	394
IVF+ICSI	0	0	5	3	8
IVF/ICSI 後のキャンセル周期数	1	5	11	20	37
PGD 周期数	12	41	160	298	511
透明帯開口方法					
酸性タイロド液	0	1	5	13	19
レーザー	10	20	61	156	247
機械的	2	20	94	129	245
生検方法					
極体	0	0	0	3	3
割球吸引	10	38	130	262	440
割球圧出	2	3	30	33	68
胚盤胞	0	0	0	0	0

表 3b 転座保因者に対する PGD

	ロバート ソン転座 男性保因者	ロバート ソン転座 女性保因者	相互転座 男性保因者	相互転座 女性保因者	合計
<u>胚発生</u>					
採卵数 (1回の平均採卵数)	63(4.8)	350(7.3)	1322(7.4)	2405(7.2)	4140(7.2)
受精卵数	34	225	922	1563	2744
生検胚数	11	166	636	1009	1822
生検前凍結胚数	13	0	80	228	321
生検成功胚数	11	166	635	1007	1819
診断可能胚数	11	148	626	925	1710
胚移植可能胚数	3	42	177	214	436
胚移植可能胚率	27.3	28.4	28.3	23.1	25.5
移植胚数	2	23	114	153	292
<u>臨床結果</u>					
胚移植周期数 (% per OR)	2(15.4)	16(33.3)	83(46.4)	115(34.6)	216(37.8)
hCG 陽性	0	5	45	51	101
胎児心拍陽性	0	4	40	33	77
心拍陽性胎児数	0	5	41	34	80
臨床的妊娠率 (% per OR)	0	8.3	22.3	9.9	13.5
臨床的妊娠率 (% per ET)	0	25	48.2	28.7	35.6
着床率	0	21.7	36.0	22.2	27.4
分娩数	0	3	28	29	60
流産数	0	2	12	22	36
異所性妊娠	0	0	0	2	2
双胎	0	1	1	1	3

表 4 出生前および出生後診断

	合計	結果		
		正常	異常	不明
出生前診断				
羊水検査	26	23	1	2
絨毛検査	0	0	0	0
臍帯穿刺	1	1	0	0
未施行	30			
不明	13			
出生後診断				
核型	3	3	0	0
DNA	1	1	0	0

表 5 分娩および出生児

	単胎	双胎	合計
分娩数	65	5	70
分娩方法			
経膈	32	0	32
帝王切開	26	5	31
不明	7	0	7
分娩時期			
早産	6	4	10
正期産	57	1	58
過期産	0	0	0
不明	2	0	2
性別			
男児	30	2	32
女児	32	8	40
不明	3	0	3
体重 (g)	2964	2356	2919

予後調査データベースの構築

研究分担者 梅澤 明弘（独）国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部長

研究要旨：生殖補助医療に対する評価は、医療精度のみならず生まれてくる子供達のフォローアップが社会遺伝学や医療福祉の見地からも重要な意味を持つ。そこで本研究においては、ART 由来出生児の長期予後調査にあたり、生殖補助医療によって出生した児に対する長期フォローアップのためのデータベース構築を目的とし、ART 予後調査データベースに対する多角的な調査を行ってきた。本年度は、ウェブデータベースを基盤としたシステムを検討した。ウェブデータベースでは、Access における容量の制限（2Gb）、同時アクセスに弱いことやリカバリー機能がないなどの限界をカバーしている。更に、画面間のリンクが容易であり、データの複雑なソートや詳細条件の検索など様々な機能を付与できる点や画面デザインを自由自在に設計できる点などが利点である。しかし、インターネットを利用することでのセキュリティ対策は重要である。さらに、データベースを管理する物理的な対策も必須である。データベースを構築する上で基本的に重要なことは、「何を解析するか」であり、それによりデータベース登録項目が抽出されてくる。更に、明確な運用ポリシーの設定により、具体的なシステム運用方針が決定される。データベースの管理、システムサポート体制やユーザーサポート体制にかかる人員、設備の効率的な運用が必要不可欠となる。

A. 研究目的

生殖補助医療に対する評価は、生まれてくる子供達のフォローアップが社会遺伝学や医療福祉の見地からも重要な意味を持つ。そこで本研究においては、本邦における生殖補助医療（ART）由来出生児の長期予後調査の基盤となるデータベース構築を目的とし、ウェブデータベースを基盤とした ART によって出生した児に対する長期フォローアップデータベースの構築に必要なパラメータ、データベース構造に対する検討を行った。

B. 研究方法

データベース構築に関する具体的な検討として、日本産科婦人科学会 ART オンライン登録システム上の記入項目を参考に、運用パラメータの抽出を行った。H23 年度に報告したリレーショナル型データベース MS-Access2003（Access）とウェブデータベースとを比較し、コホート研究でのウェブデータベース運用の可能性について検証した。

C. 研究結果

現在、長期予後調査の根幹となる唯一のデータベースは日産婦登録データベースのみであり、主に妊娠成立までを網羅したものである。昨年度までの成果により、「①日本産科婦人科学会 ART オ

ンライン登録システムのパラメータから必要項目を抽出した母親情報データベース」以外に、「②母親識別 ID でリレーションされた子どものマスターフォーム」と「③子ども固有 ID でリレーションされた子どもの詳細情報を記載するためのサブフォーム」の必要性が想定される。これらのフォームのうち①は独立して存在しており、②と③はフォーム内フォーム（サブフォーム）の体裁をなすことに成る。それぞれのリレーションキーを明確に設定することで、ひとりひとりの子どもに対するフォローアップが可能となるであろうと想定してきた。H23 年度では、仮想データベース構築のために、登録項目を具体的に設定し（妊娠転帰、新生児、長期予後等）、それら項目を年代毎に想定したデータベースと入力インターフェイスを設計した。ウェブデータベースにおいても基本的に Access で想定した項目が当てはまり、データベース登録項目の選択を行える（図 1）。更に、極めて明確な運用ポリシーを設定することがデータベースの安定的な運用に必須である。ウェブデータベースの概略を示す（図 2）。ウェブデータベースでは、インターネットに接続し、各ユーザーがデータを登録するものである。そのため、システム管理は重要である。データベースは、運用ポリシーの設定の下、ユーザー権限の設定や公

開・非公開項目の設定、システム運用方針としてデータベースの稼働時間等が指定されうる。データ登録の際のユーザーサポート体制、データベース管理としては、セキュリティレベルの設定、システムサポート体制やシステム管理者をどこにおくかなど、長期フォローアップに適したデータベースシステムを運用する上で必須となる管理項目が存在する。

リレーショナル型データベースの Access は母親データと子どものデータを関連づけ（リレーション）しやすく、先行する母子コホート研究（成育コホート）でも Access が用いられ、小規模で簡単なアプリケーションの構築が可能などのコホート研究への利点がある。しかし、ウェブデータベースと比較し、画面に表示する項目数に制限や容量の制限（2Gb）、同時アクセスに弱い、リカバリー機能がないなどの限界がある。ウェブデータベースは、それら Access の限界をカバーしている。更に、画面間のリンクが容易であり、データの複雑なソートや詳細条件の検索など様々な機能を付与できる点や画面デザインを自由自在に設計できる点などが利点である。

ウェブデータベースは、多くの運用利点があるが、インターネットを介するためセキュリティ管理は十分な対策が必要である。システムの安全性や情報管理をどう行うか、データベース管理をどこに、どのように（ミラーリングなどのデータバックアップ体制等）行うか、データベースの物理的管理も重要な検討項目である。

D. 考察

ART 予後調査データベースに対する多角的な調査を行ってきた。H23 年度で検討した Access データベースによるスタンドアロンコンピュータを用いたシステムと比較してウェブデータベースを検討した。基本的な不妊治療データと治療結果そして子どものデータをリレーショナル形式で保存していくことは変わらない。ウェブデータベースでは、Access における容量の制限（2Gb）、同時アクセスに弱いことやリカバリー機能がないなどの限界をカバーしている。更に、画面間のリンクが容易であり、データの複雑なソートや詳細条件の検索など様々な機能を付与できる点や画面デザインを自由自在に設計できる点などが利点である。しかし、インターネットを利用することでのセキュリティ対策は重要である。さらに、データベースを管理する物理的な対策も当然必要となる。

データベースを構築する上で基本的には重要なことは、「何を解析するか」であり、それによりデータベース登録項目が抽出されてくる。更に、明確な運用ポリシーの設定により、具体的なシス

テム運用方針が決定される。データベースの管理、システムサポート体制やユーザーサポート体制にかかる人員、設備の効率的な運用が必要不可欠となる。

E. 結論

生殖補助医療に対する評価は、生まれてくる子供達のフォローアップが社会遺伝学や医療福祉の見地から、非常に重要な意義を持つ。これらの情報を取り扱う専門データベースの効率的な運用を行うに当たり、入力パラメータ（データベース登録項目）の抽出とブラッシュアップ、実際に運用・管理を行う者とシステムを整備する必要がある。これらの人件費、管理にかかる費用についてはもっとも継続性が要求される費用であり、国家プロジェクトとしての位置づけを検討する必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

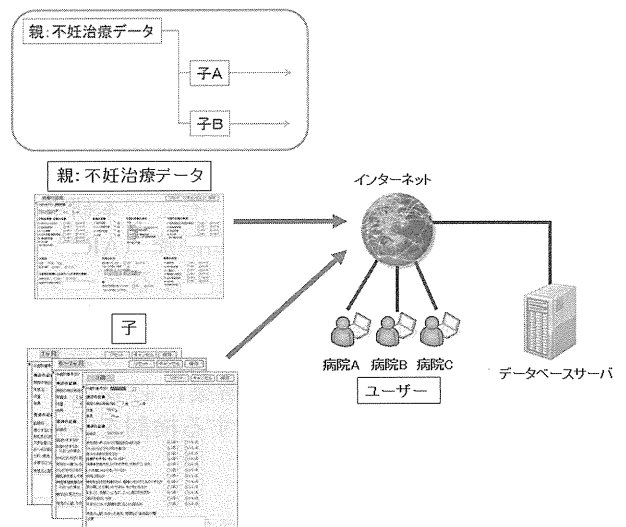


図1 ART 予後調査データベース（ウェブデータベース）

明確な運用ポリシーの下、データベース登録項目が抽出され（親と子）、ユーザーが入力する。親と子は連結（リレーション）されている。

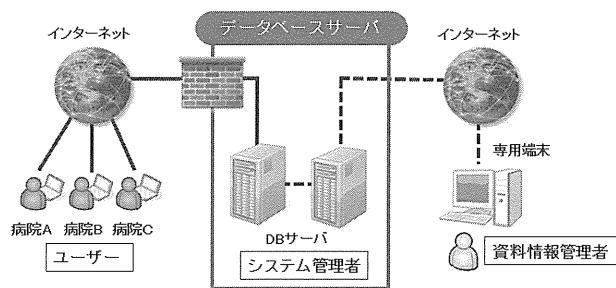


図2 ウェブデータベースの概略

登録項目に対してユーザーが各自端末から入力し、インターネットを経由しデータベース (DB) サーバで保管される。インターネットサーバの基盤としてファイアウォールが完備されセキュリティが担保していること、アプリケーションサーバやDBサーバの組合せなど基盤構築の容易性と拡張性をもつことやミラーリングなどによるデータのバックアップシステムを持つことなどが基本的に要求される。DBサーバでは専門的な管理者のもと物理的にも安全が担保される下での管理が求められる。一般ユーザーと異なるアクセス権限を取りデータを管理・まとめる資料情報管理者も必要となる。

ART の遺伝的安全性の検証：Prader-Willi 症候群発症における生殖補助医療のリスク評価

研究分担者 緒方勤 浜松医科大学 小児科 教授

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）を考慮した解析が必要である。これに関して、われわれは、昨年度、代表的インプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群 (PWS) 患者を対象とする検討により、減数第一分裂時の不分離を介する trisomy rescue タイプの 15 番染色体母性ダイソミー (upd(15)mat) が、高齢出産により有意に増加していることを報告した。

本年度は、ART 出生児 13 例を含む PWS 患者 138 例を対象として、upd(15)mat の発症と ART 施行との関連について解析した。その結果、(1) 高齢出産を発症危険因子とするダイソミー陽性患者が ART 出生児において相対的に高くなっていること、(2) PWS 患者群では、ART 出生児における減数第一分裂時の不分離による upd(15)mat の発症増加は、高齢出産でほぼ説明できること、(3) PWS 患者群と一般集団の比較では、減数第一分裂時 (M1) と数第二分裂時 (M2) の不分離を助長しうる COS のような排卵誘発が upd(15)mat の発症増加に関与しうること、が示唆された。したがって、症例数が少ないことから現時点では、明確な結論は導けないが、ART に関連する upd(15)mat の増加には、高齢出産と ART に関わる COS などの技術的因子の両者が関与すると推測される。

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、および、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 (ART) における遺伝的安全性の評価には、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）などの交絡因子を考慮することが必須である。

これに関し、われわれは、過去 2 年間の研究期間において、特に、高齢出産が重要な交絡因子であることを見出してきた。すなわち、代表的インプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群 138 例の解析から、減数第一分裂時 (M1) の不分離により産生される disomic oocyte を介する第 15 染色体母性ダイソミーが、高齢出産により有

意に増加していることを明らかとした。さらに、第 14 染色体父性ダイソミー (upd(14)pat) および類似表現型を伴う疾患 (upd(14)pat 症候群と命名) において、減数第一分裂時の不分離により産生される nullisomic oocyte を介する第 14 染色体父性ダイソミーが、高齢出産により有意に増加していることを明らかとした。

このような高齢出産は、ART において顕著に認められる。したがって、これらの高齢出産を発症危険因子とするダイソミー陽性患者は、ART 出生児において相対的に高くなっていると予測される。さらに、ART において高頻度で使用される排卵誘発剤 (COS) が、マウスおよびヒトの研究から、減数第一分裂時 (M1) と数第二分裂時 (M2) の不分離を助長するとされていることから、ART では、ダイソミーの発症が、高齢出産で説明される頻度以上に認められる可能性がある。また、他の ART 関連因子もダイソミー発症に寄与する可能性がある。

本年度では、Prader-Willi 症候群患者を対象として、上記の仮説を検証した。

- 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。このうち 117 例は、平成 22 年度の研究成果の通りであり、残る 21 例は、その後の研究期間において集積された患者である。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 13 例が何らかの ART により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、一对の第 15 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る。そして、これらは、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 と分類される。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

- 全解析患者の発症原因：138 例中、欠失が 103 例、TR/GC[M1] が 19 例、TR/GC[M2] が

9 例、MR/PE が 3 例、エピ変異が 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)。

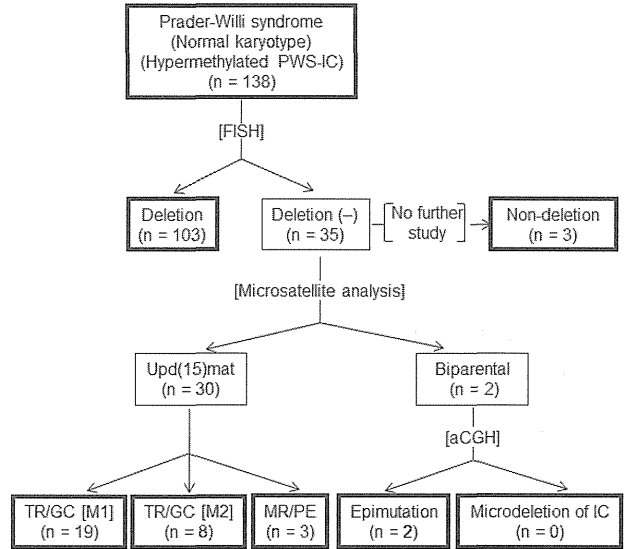


Figure 1. Classification of 138 Japanese patients with Prader-Willi syndrome phenotype.

- ART 出生児 13 例の発症原因：表 1 に示す通りである。全例において排卵誘発 (COS) がなされ、5 例において TR/GC[M1] が、2 例において TR/GC[M2] が見出された。通常、upd(15)mat は PWS の 25% 程度であることから、この upd(15)mat の発症頻度は、ART 出生群において高かった。

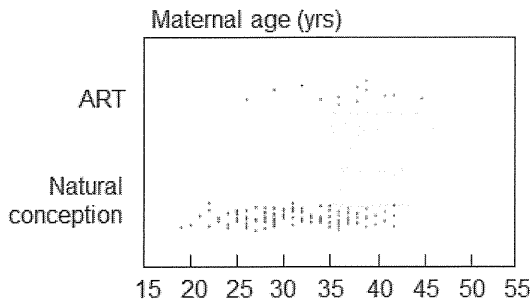
Table 1. PWS patients conceived using IVF/ICSI/COS

	Methods of MAR	Birth year	Sex	Genetic cause	Paternal age (yrs)	Maternal age (yrs)
Pt 1	COS	1980	M	TR/GC[M2]	43	32
Pt 2	COS	1984	M	Deletion	34	34
Pt 3	COS	1993	F	TR/GC[M1]	28	29
Pt 4	ICSI	1998	F	Deletion	42	38
Pt 5	ICSI	1998	F	TR/GC[M2]	44	42
Pt 6	COS	2002	M	Deletion	27	26
Pt 7	IVF	2004	M	TR/GC[M1]	42	41
Pt 8	ICSI	2007	M	Deletion	37	36
Pt 9	ICSI	2007	M	TR/GC[M1]	42	39
Pt 10	ICSI	2007	F	TR/GC[M1]	53	45
Pt 11	ICSI	2008	M	TR/GC[M1]	40	38
Pt 12	COS	2008	M	Epimutation	38	39
Pt 13	COS	2010	F	Deletion	40	38

MAR: medically assisted reproduction, COS: controlled ovarian stimulation, ICSI: intracytoplasmic sperm injection, IVF: in vitro fertilization, TR: trisomy rescue, GC: gamete complementation, M1: meiosis 1, M2: meiosis 2

- PWS 患者集団における ART 出生群と自然妊娠出生群間の出産年齢比較：母親出産年齢は表 1 に、分布は図 2 に示す通りである。出産年齢は、ART 群、中央値 38 歳、範囲 26-45 歳で、自然妊娠群、中央値 31 歳、19-42 歳で、ART 軍において有意に高かった

(P=0.001)。



- PWS 患者集団における ART 出生群と自然妊娠出生群間の TR/GC[M1]の発症頻度比較：TR/GC[M1]の発症頻度は、出産年齢が有意に異なるときにのみ有意に ART 出生群に多く認められたが、出産年齢に有意差が見られない年齢では、両群で同等であった（表 2）。

Table 2. Comparison of relative frequency of TR/GC between IVF/ICSI/COS group and natural conception group

	Maternal age (y)	Median (range)	Comparison of maternal age P value ^a	No of pts with TR/GC[M1] (%)	Comparison of relative frequency of TR/GC[M1] P value ^b
ART		38 (26-45)	-	5 (38.5)	-
Natural Conception group	All	31 (19-42)	0.0015	14 (11.2)	0.018
	≥20	31 (20-45)	0.0016	14 (11.3)	0.019
	≥21	31 (21-45)	0.0017	14 (11.4)	0.020
	≥22	31 (22-45)	0.0019	14 (11.5)	0.020
	≥23	31 (23-45)	0.0024	14 (11.8)	0.022
	≥24	31 (24-45)	0.0031	14 (12.1)	0.024
	≥25	32 (25-45)	0.0040	14 (12.4)	0.027
	≥26	32 (26-45)	0.0084	14 (13.3)	0.035
	≥27	33 (27-45)	0.0026	14 (14.4)	0.034
	≥28	34 (28-45)	0.0039	14 (14.9)	0.038
	≥29	34 (29-45)	0.0098	14 (16.5)	0.055
	≥30	35.5 (30-45)	0.0096	14 (20.0)	0.20
	≥31	36 (31-45)	0.023	14 (22.2)	0.26
	≥32	36 (32-45)	0.046	14 (24.6)	0.32
	≥33	37 (33-45)	0.029	14 (27.5)	0.33
	≥34	37 (34-45)	0.046	14 (29.2)	0.37
	≥35	37 (35-45)	0.037	14 (35.0)	0.43
	≥36	37 (36-45)	0.089	12 (34.3)	0.42
	≥37	38 (37-45)	0.15	11 (42.3)	0.51
	≥38	39 (38-45)	0.93	8 (47.1)	0.61
≥39	40.5 (39-45)	0.66	6 (50.0)	0.56	
≥40	41 (40-45)	0.20	4 (50.0)	0.58	

- PWS 患者集団と一般集団における ART 出生児頻度の比較：本邦一般集団における ART 統計は、1989-2000 年において存在し、年齢別 ART 統計は、2007-2008 年において存在する。PWS 患者のうち、1989-2000 年に ART で出生した児は 7 例で、このうち 4 例が TR/GC[M1]、残る 1 例が TR/GC[M2]であった。ART 出生児頻度は、PWS 患者集団において、1989-2000 年の一般集団により顕著に高く (1.0×10^{-7})、この有意差は、ART 出生全体と

TR/GC[M1]+ TR/GC[M2]の合計において、出産年齢を加味しても有意にとどまった (P=0.00098、P=0.043) (表 3)。

Table 3. Comparison of the frequency of births conceived by IVF/ICSI between PWS patients and general population

	Mat age (y)	Comparison of maternal age P-value ^a	Number of naturally conceived births ^b	All patients conceived by IVF/ICSI		Pts with TR/GC[M1][M2] conceived by IVF/ICSI	
				Number of births conceived by IVF/ICSI (%)	P-value ^a	Number of births conceived by IVF/ICSI (%)	P-value ^a
PWS(1989-2010)	Median 32 Range 19-45	-	106	7 (6.4%)	-	5 (4.5%)	-
General population (1989-2010)	Average 30.2	1.4×10^{-7}	25,249,178	271,068 (1.1%)	1.0×10^{-7}	271,068 (1.1%)	0.0004
General population (2007-2008) ^c	≥25	0.0095	1,839,674	39,700 (2.1%)	0.00094	39,700 (2.1%)	0.047
	≥30	4.9×10^{-6}	1,221,660	35,920 (2.9%)	0.00047	35,920 (2.9%)	0.031
	≥35	0.19	419,914	20,284 (4.6%)	0.00098	20,284 (4.6%)	0.043

D. 考察

以上の結果は、(1) 高齢出産を発症危険因子とするダイソミー陽性患者が ART 出生児において相対的に高くなっていること、(2) PWS 患者群では、ART 出生児における TR/GC[M1]の発症増加は、高齢出産で説明できること、(3) PWS 患者群と一般集団の比較では、TR/GC[M1]+ TR/GC[M2]の発症に COS のような排卵誘発が関与しうること、を示唆するデータである。したがって、症例数が少ないことから現時点では、明確な結論は導けないが、ART に関連する upd(15)mat の増加には、高齢出産と ART に関わる COS などの技術的因子の両者が関与すると推測される。

E. 結論

PWS 患者の解析から、ART に関連する upd(15)mat の増加には、高齢出産と ART に関わる COS などの技術的因子の両者が関与すると推測される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue H, Mukai T, Sakamoto Y, Kimura C, Kangawa N, Itakura M, Ogata T, Ito Y, Fujieda K: Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 76 (1): 78-87, 2012.
2. Sugihara S*, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y,

- Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Y, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): Genetic characteristics on HLA-class II and class I among Japanese type 1A and type 1B diabetic children and their families. *Pediatr Diabetes* 13 (1): 33–44, 2012.
3. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T*: Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 20 (9): 928–932, 2012.
 4. Oto Y*, Obata K, Matsubara K, Koze Y, Tsuchiya T, Sakazume S, Yoshino A, Murakami N, Ogata T, Nagai T: Growth hormone secretion and its effect on height in pediatric patients with different genotypes of Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 158A (6): 1477–1480, 2012.
 5. Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T*: Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the placenta. *Am J Med Genet A* 158A (2): 465–468, 2012.
 6. Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Samuels ME, Ogata T, Deal CL*: 46, XY gonadal dysgenesis: new *SRY* point mutation in two siblings with paternal germ line mosaicism. *Clin Genet* 82 (6): 505–513, 2012.
 7. Abe Y, Aoki Y*, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y: Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: Findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A* 158A (5): 1083–1094, 2012.
 8. Koyama Y*, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M: Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using uUrinary Pregnanetriolone / Tetrahydrocortisone Ratio and 11 β -hydroxyandrosterone by Gas chromatography - mass spectrometry. *Clin Chem* 58 (4): 741–747, 2012.
 9. Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S: Deterioration of myocardial tissue Doppler indices in a case of fetal hydrothorax as a promising indication for clinical intervention before the development of nonimmune hydrops fetalis. *Arch Gynecol Obstet* 286 (4): 1079–1080, 2012.
 10. Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, C Sultan C*: Screening of *MAMLD1* mutations in 70 Children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of two new mutations. *PLoS One* 7 (3): e32505, 2012.
 11. Qin X-Y, Miyado M, Kojima Y, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, Yonemoto J, Fukami M, Ogata T, Sone H*: Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS ONE* 7 (5): e36711, 2012.
 12. Sekii K*, Ishikawa T, Ogata T, Itoh H, Iwashima S: Fetal myocardial tissue Doppler indices before birth physiologically change in proportion to body size adjusted for gestational age in low-risk term pregnancies. *Early Hum Dev* 88 (7): 517–523, 2012.
 13. Fukami M*, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T: Complex genomic rearrangements in the *SOX9* 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A* 158A (7): 1529–1534, 2012.
 14. Ogata T*, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y: Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure. *J Hum Genet* 57 (7): 449–452, 2012.
 15. Qin X-Y, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H*: Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet* 57 (7): 434–441, 2012.
 16. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T*: Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 27 (8): 2541–2548, 2012.
 17. Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T*, Fukami M: *PRKARIA* mutation affecting cAMP-mediated