

生前診断を行うかについては“必ず実施する”が1施設、他は“クライアントの希望によって実施する”であった。また、誤診断の報告はなかった。これまでにすでに出生児を得ている施設は3施設であった。児の予後調査については出生時までの情報で、とくに異常児の回答はなかった。

## 2. 技術面での検討

現行で用いられる FISH 法および PCR 法の診断精度はなお確立したとはいえない。この精度管理をするうえで新たな診断技術が必要であり、この高い精度の技術によって現行の手法も精度が評価できる。染色体、遺伝子情報を共に全ゲノム増幅に基づく PGD の技術導入に着手した。

## II. わが国における PGD に関する得 実態調査-II (フォーマットファ イルを用いた調査結果)

### 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たのは、9 施設で、3 施設においては専門医が対応していない体制で実施されていた。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、特別のカルテとして取り扱ってはいなかった。遺伝学的検査結果の保管場所は 5 施設で、産婦人科カルテ上で行われ、閲覧に職種や担当者の制限を設けていない施設が 3 施設存在した。習慣流産の対象においてクライアント夫婦の染色体検査結果を双方共有する情報として開示すると答えた施設が 9 施設あり、どちらかに均衡型染色体異常が存在したが特定しない形で開示するとの配慮を示した施設は、3 施設のみであった。

### 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 法による顕微授精であった。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 のみによって実施していると返答した。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．性別はやや女兒のほうが多い（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

本調査によって日本における PGD の現状における実施状況を明らかにした．

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示された．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，継続的にわが国におけるPGDの実施状況を調査する礎を構築できたと考えられ，今後，子の長期的な予後調査を開始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，出生子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子の予後調査—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子の予後調査—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子の予後調査—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					
酸性タイロード液	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。生殖補助医療（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、予後調査（妊娠転帰・新生児・長期予後）のデータベースを作成するにあたり管理に必要な人員、およびサーバ等のハードウェアの試験的運用へ向け問題点を抽出してきた。特に、長期にデータベースシステムを運営する継続性について国立成育医療研究センターにおいて、すでに事業化に成功している既存データベースを調査し、リレーショナル型データベースのMS-Access2003（Access）を用いたスタンドアロン型コンピュータを用い、データベース作成するにあたり管理に必要な人員、およびサーバ等のハードウェアの試験的運用へ向け問題点を抽出し、予後調査データベースの「パイロット版」を作成し実際運営上で問題となる点を明らかにした。一方、Access型管理とは異なるウェブデータベースを基盤としたシステムも検討した。ウェブデータベースでは、Accessにおける容量の制限、同時アクセスに弱いことやリカバリ機能が無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な重要なことは、「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、データベース基盤としてAccess方式をとり、登録項目を想定しスタンドアロン型のデータベースを構築作製しARTによって出生した児に対する長期フォローアップを目的とした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。更に、ウェブデータベース型も想定し、長期フォローアップのためのデータベース構築に向け多角的に検討を行った。

### 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。実際に運用していく上で、データベース構築の現場にて実地調査を行い、小規模データベースを立ち上げた後に、その運用面における問題点の洗い出しを行った。H23年度には、リレーショナル型データベースのMS-Access2003（Access）を用いた。スタンドアロン型コンピュータを用意し、予後調査（妊娠転帰・新生児・長期予後）のデータベース作成するにあたり管理に必要な人員、およびサーバ等のハードウェアの試験的運用へ向け問題点を抽出を行った。Accessをすでに応用している成育母子コホートの現地調査を行い、コホート研究でのデータベース運用の現況を検証した。H24年度には、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

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。具体的に、仮想データベース構築のために、妊娠転帰、新生児、長期予後等の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、さらに、長期フォローアップに適したデータベースシステムの選定と運用設計を行い（図 1：Access データベース）、その有用性と問題点を抽出した。母親データと子のデータフェイスを示す（図 2：登録項目とインターフェイス）。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。

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い構築される（図 3：ART 予後調査ウェブデータベース）。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 4：ウェブデータベースの概略）。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）しやすいが、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。既存の母子コホートではフォローアップ時の検診データ等は Excel 管理され、ID 管理がなされている。問題点は、Access データベースと統合できていないことにある。データ管理の人員が不可欠であった。今回提示した擬似データベースを用いて、データベースのトータルマネジメントシステムを構築していくためには、実際の医療現場の意見を取り入れた上でのブラッシュアップが必要不可欠である。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。ART 予後調査データベースを構築し安定的に長期にわたり運用するためには、Access データベース及びウェブデータベースの双方において共通した課題が存在する（図 5：ART 予後調査データベースの安定的な運用のために）。

### 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。スタンドアロンコンピュータ Access を用いた擬似データベースを作製した。子どもの長期フォローアップに関するパラメータの整合性や実際のデータ入力に至るまでにそこに投入される人員、設備の効率的な運用が必要不可欠となる。データ管理の人員が不可欠であり、今回提示した擬似データベースを用いて、データベースのトータルマネジメントシステム構築を想定した結果、実際の医療現場の意見を取り入れた上でのブラッシュアップが必要不可欠である。

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も検討した。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（図5：ART 予後調査データベースの安定的な運用のために）。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

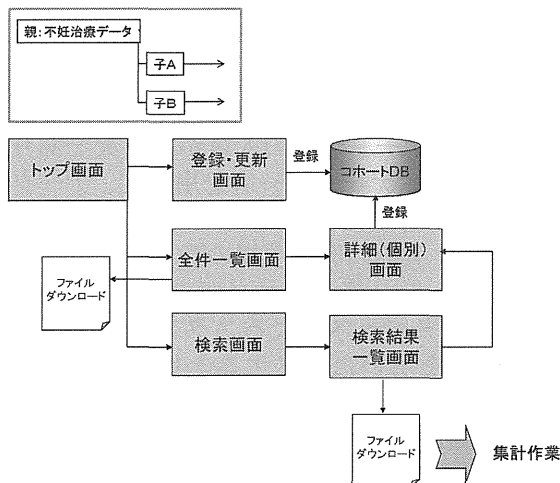


図1 コホート研究対応 Access データベース概略  
母親と子のデータがリレーションでき、一覧画面からデータ削除やダウンロードが可能である。詳細（個別）画面から編集・更新を実行できる。

## 入力画面(妊娠～出産)

## 詳細画面(個別データ)

図2 コホート研究対応 Access データベースの登録項目とインターフェイス

データベース構築には、第一に何を解析するかが重要でありそれにより登録項目が抽出される。母親と子のデータがリレーションされ、ワンクリックで各種データへ移動できる。

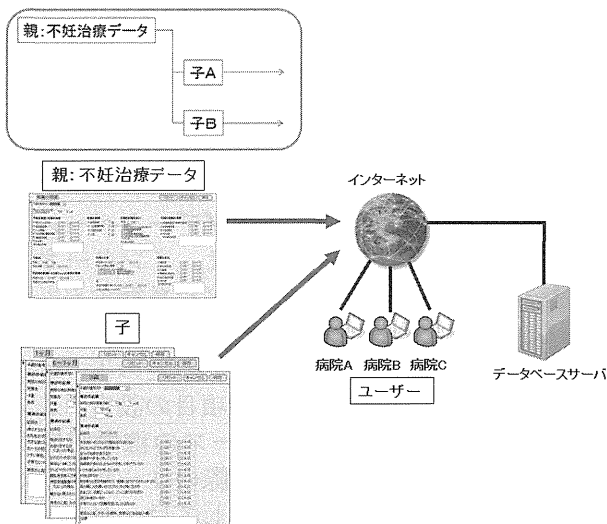


図3 ART 予後調査ウェブデータベース  
明確な運用ポリシーの下、データベース登録項目が抽出され（親と子）、ユーザーが入力する。親と子は連結（リレーション）されている。

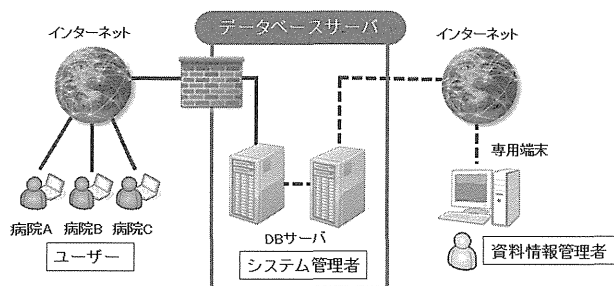


図4 ウェブデータベースの概略

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。

### 登録に関わる人員・ハードウェア

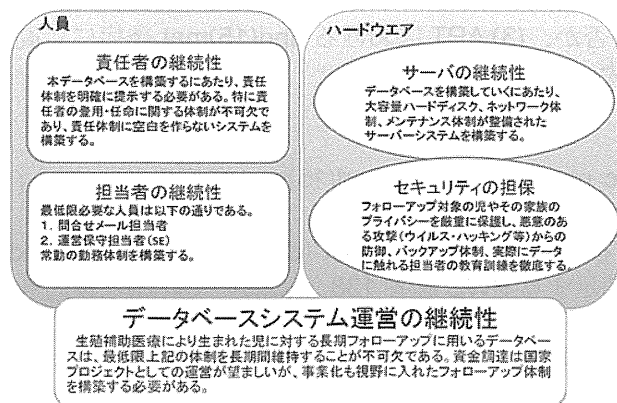


図5 ART 予後調査データベースの安定的な運用のために

予後調査 (妊娠転帰・新生児・長期予後) のデータベースを構築し継続的な運用にあたり必要な要素を提示する。長期フォローアップに適したデータベース運用にはシステム (ハードウェア) の問題とともにその運営のためのヒューマンパワーも重要点である。



生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）  
研究分担総合報告書  
ARTにおける遺伝的安全性の検証

研究分担者 緒方勤 浜松医科大学 小児科 教授

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。特に、高齢出産はダウン症候群などのトリソミー同様、ダイソミータイプのインプリンティング疾患発症の危険因子とされている。

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 사용되는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。

以上を踏まえて、本研究では、(1) Prader-Willi 症候群（PWS）において、高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される disomic oocyte を介する upd(15)mat 発症のリスク因子であるか否か、(2) 第 14 染色体父性ダイソミー（upd(14)pat、一对の染色体を共に父親から受け継ぐ状態）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、高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される nullisomic oocyte を介する upd(14)pat 発症のリスク因子であるか否か、(3) ART における upd(15)mat 発症に、高齢出産以外の因子が関与するか否か、について解析した。

B. 研究方法

1. 高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される disomic oocyte を介する upd(15)mat 発症のリスク因子であるか否か
  - 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。
2. 高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される nullisomic oocyte を介する upd(14)pat 発症のリスク因子であるか否か
  - 対象：Upd(14)pat 症候群患者 26 例である。全例、正常核型を有する。これは世界中の upd(14)pat 症候群患者の約 80% を占める。
  - 分子遺伝学的解析：胎盤におけるインプリンティングセンターとして機能する IG-DMR (differentially

methylated region ; メチル化可変領域) および個体におけるインプリンティングセンターとして機能する MEG3-DMR のメチル化解析、第 14 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、IG-DMR と MEG3-DMR にたいする FISH 解析、インプリンティング領域のアレイ CGH 解析を行った。Upd(14)pat の発症原因は、少なくとも 1 個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、全てのマイクロサテライト座位がホモで存在するとき MR/PE と分類した。なお、父性ダイソミーでは、母性ダイソミーと異なり、nullisomic oocyte が M1 と M2 の卵子形成時の不分離を鑑別することはできないこと、TR と GC 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と考えられること、MR と PE の鑑別も困難であるが部分的ホモダイソミーは PE に特異的であることを付記する。

3. ART における upd(15)mat 発症に、高齢出産以外の因子が関与するか否か

- 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 : 高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される disomic oocyte を介する upd(15)mat 発症のリスク因子であるか否か、と同じ方法を用いた。

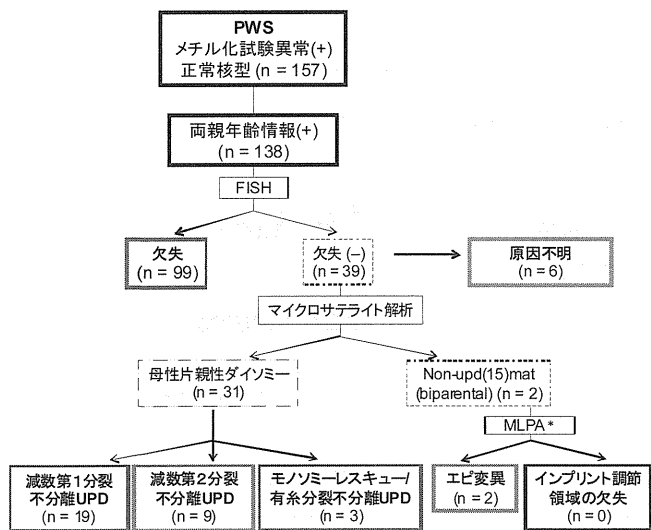
(倫理面への配慮)

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

1. 高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される disomic oocyte を介する upd(15)mat 発症のリスク因子であるか否か

- 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)。



\* Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

図 1. 日本人 PWS 患者の発症原因。

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

- 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。

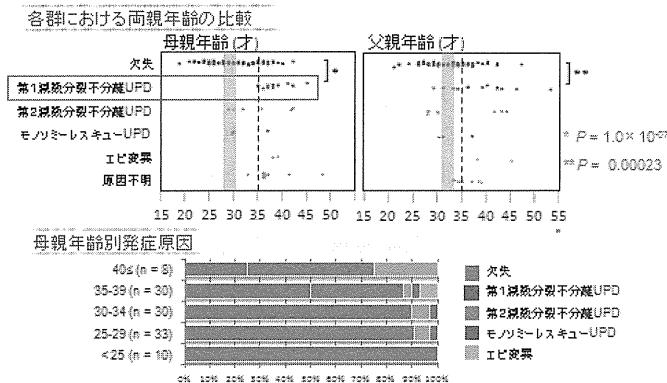


図 2. 発症原因別の両親年齢分布

- 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 ( $P=0.016$ )。

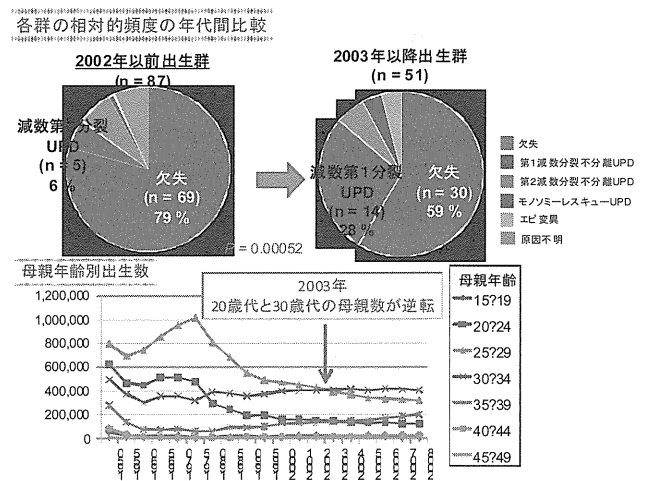
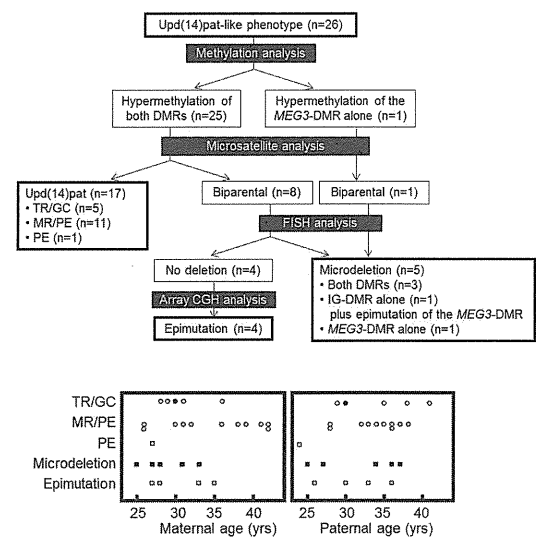


図 3. 2003 年前後の発症原因の相対頻度と母親年齢別出生数。

2. 高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される nullisomic oocyte を介する upd(14)pat 発症のリスク因子であるか否か
- 発症原因：26 例中、IG-DMR と MEG3-DMR を含む微小欠失が 3 例、IG-DMR のみの欠失が 1 例、MEG3-DMR のみの欠失が 1 例、TR/GC type-upd(14) pat が 5 例、MR/PE type-upd(14)pat が 11 例、PE 特異的部分的ホモダイソミーが 1 例、エピ変異が 4 例において同定された(図 4)。

図 4. 第 14 染色体父性ダイソミー症候群患者 26 例における発症原因の分類 (上) と出生時両親年齢の分布 (下)



- Upd(14)pat 症候群患者の出生時両親年齢：35歳以上の高齢出産は、MR/PE type-upd(14)pat に集中して認められた (図 4)。さらに、高齢出産の頻度は、MR/PE type-upd(14)pat で 6/11、それ以外の原因で 2/15 と、MR/PE type-upd(14)pat において有意に高かった (P=0.034)。同様に、出産年齢中央値は、MR/PE type-upd(14)pat で 36.0、それ以外の原因で 29.5 と、MR/PE type-upd(14)pat において有意に高かった (P=0.045)。
3. ART における upd(15)mat 発症に、高齢出産以外の因子が関与するか否か
- 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 5)。

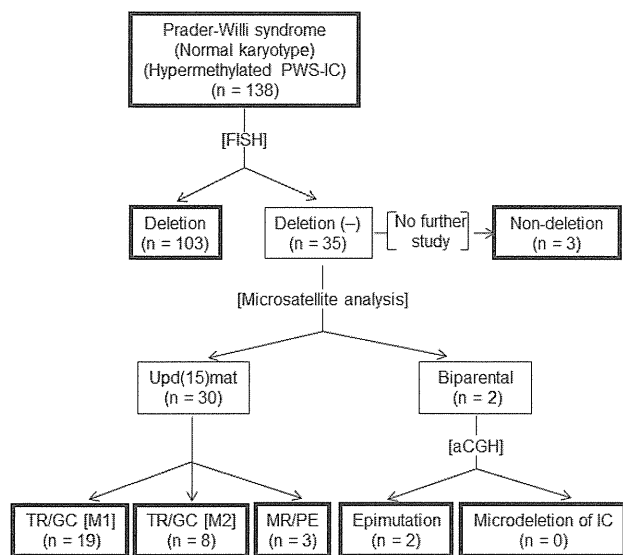


図 5. PWS 患者 138 例における発症原因の分類

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

- ART 出生児 13 例の発症原因は Table 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