

1 2. 生まれたお子様のご両親の生活習慣

(お母様の喫煙・飲酒歴について)

- 1) 現在喫煙していますか (はい (1日____本程度)・いいえ)
- 2) 妊娠中喫煙していましたか (はい (1日____本程度)・いいえ)
- 3) お母様に関して過去に喫煙していたが、妊娠前に禁煙された方にお聞きします
喫煙していた期間 (通算 年間)
妊娠の () 年前に禁煙した
- 4) 現在飲酒していますか (はい・いいえ)
- 5) 妊娠中に飲酒していましたか (はい・いいえ)
- 6) 一日平均どれぐらいの量を摂取していますか? 350ml の缶ビールを1本として (____本位)
- 7) お母様に関して過去に飲酒していたが、妊娠後に禁酒された方にお聞きします
飲酒していた期間 (通算 年間)
妊娠の () 年前に禁酒した または 妊娠判定後 () か月で禁酒

(お父様の喫煙・飲酒歴について)

- 8) お父様は現在喫煙していますか (はい (1日 本程度)・いいえ)
- 9) お父様はお母様の妊娠中喫煙していましたか (はい・いいえ)
- 1 0) 他に同居されている方で喫煙している方はいますか (はい・いいえ)
それはどなたですか ()
- 1 1) お父様に関して過去に喫煙していたが、妊娠前または妊娠後に禁煙された方にお聞きします
喫煙していた期間 (通算 年間)
妊娠の () 年前に禁煙した または 妊娠判定後 () か月で禁煙
- 1 2) 現在飲酒していますか (はい・いいえ)
- 1 3) 過去に禁酒した方にお聞きします (現在飲酒している方も含みます)。いつ禁酒されましたか
(自由記載)
- 1 4) 禁酒はいつからですか? (妻の妊娠前 妻の妊娠中 現在)
- 1 5) 一日平均どれぐらいの量を摂取していますか? 350ml の缶ビールを1本として (____本位)

1 3. お子様のご両親の身長・体重等

健康に関してご質問します。わかる範囲でお答えください。

- 1) お母様の現在の身長 (. cm)
- 2) お母様の妊娠前体重 (. kg)
- 3) お母様の最初妊婦検診の週数・体重 (現在お答えになっているお子さんの妊娠時です)
(週) (. kg)
- 4) お母様の最終妊娠検診の週数・体重 (現在お答えになっているお子さんの妊娠時です)
(週) (. kg)

(上記3)、4)は母子手帳をご覧ください)

- 5) お父様の現在の身長 (. cm)
- 6) お父様の現在の体重 (. kg)
- 7) お母様やお父様は診断された事がありますか？

(はい いいえ)

既往病名 (記述回答：

- 8) お母様の現在の健康状態 (健康 少し不安 現在通院中)
- 9) 現在少し不安な疾病や通院中の方の病名 (不安な方： 通院中：)
- 10) お母様はアレルギー・喘息はありますか？ (はい いいえ)
- 11) お母様にアレルギーや喘息がある方は何に関して反応しますか？
(記述回答：)
- 12) お父様はアレルギー・喘息はありますか？ (はい いいえ)
- 13) お父様にアレルギーや喘息がある方は何に関して反応しますか？
(記述回答：

C. 生まれてからの赤ちゃんの発育

1. 身体発育 (母子手帳の検診記録をみて、わかる範囲で記入してください)

出産の状態

妊娠期間 妊娠 週
 分娩の経過 頭位 骨盤位 その他 ()
 分娩所要時間 時間 分
 出血量 少量・中量・多量 (ml)

出産時の児の状態

性別・数 男 ・ 女 ・ 不明 : 単 ・ 多 (胎)
 計測値 体重 g 身長 cm
 胸囲 cm 頭囲 cm
 特別な所見・処置 新生児仮死 → (死亡 ・ 蘇生) ・ 死産

	実際の検診 実施月齢	栄養法	体重	身長	胸囲	頭囲
1ヶ月	か月 日	母乳・混合・ 人工	g	cm	cm	cm
3~4ヶ月	か月 日	母乳・混合・ 人工	g	cm	cm	cm
6~7ヶ月	か月 日	母乳・混合・ 人工	g	cm	cm	cm
9~10ヶ月	か月 日	離乳食は1日 ()回	g	cm	cm	cm
1歳	歳 か月	母乳； 飲んでいる 飲んでいない	g	cm	cm	cm
1歳6ヶ月	歳 か月	母乳； 飲んでいる 飲んでいない 離乳； 完了 未完了	g	cm	cm	cm
2歳	歳 か月		g	cm	cm	cm

2. 保護者による発達の記録 (記入してある方のみ、ご記入ください。これまで特に記入していなかった場合は、何も記入しなくて結構です。)

『1か月ごろ』 _____年 _____月 _____日ごろ

- 裸にすると手足をよく動かしますか。 はい いいえ
- お乳をよく飲みますか。 はい いいえ
- 大きな音にビクッと手足を伸ばしたり、泣き出すことがありますか。 はい いいえ
- おへそはかわいていますか。 はい いいえ
(ジクジクしている時は医師にみてもらいましょう)
- うすい黄色、クリーム色、灰白色の便が続いていますか。 はい いいえ
- 子育てについて困難を感じることはありますか。 はい いいえ
- 育児の心配、かかった病気、感想などを自由に記入しましょう。

『3～4か月頃』 _____年 _____月 _____日ごろ

- 首がすわりましたか。 はい いいえ
すわった時期： _____年 _____月 _____日頃)
- あやすとよく笑いますか。 はい いいえ
- 目つきや目の動きがおかしいのではないかと気になりますか。 はい いいえ
- 見えない方向から声をかけてみると、そちらの方を見ようとしますか。 はい いいえ
- 外気浴をしていますか。 はい いいえ
(天気の良い日に薄着で散歩するなどをしてあげましょう。)
- 薄めた果汁やスープを飲ませていますか。 はい いいえ
(5か月頃から離乳食が始められます。)
- 子育てについて困難を感じることはありますか。 はい いいえ
- 育児の心配、かかった病気、感想などを自由に記入しましょう。

『6～7か月頃』 _____年 _____月 _____日ごろ

- 寝返りをしますか。 はい いいえ
- おすわりをしますか。(7か月頃) はい いいえ
(支えなくてもすわれるようになった時 : _____年 _____月 _____日頃)
- からだのそばにあるおもちゃに手をのばしてつかみますか。 はい いいえ
- 家族といっしょにいるとき、話しかけるような声を出しますか。 はい いいえ
- テレビやラジオの音がしはじめると、すぐそちらを見ますか。 はい いいえ

- 離乳食を喜んで食べていますか。 はい いいえ
 (そろそろ離乳食を2回にすすめ、食品の種類をふやしていきましょう。
 7か月頃から舌でつぶせる固さにします。)
- 神経芽細胞腫の検査は済みましたか。 はい いいえ
 (年 月 日提出)
- ひとみが白く見えたり、黄緑色に光って見えたりすることがあります。
 はい いいえ
- 育児の心配、かかった病気、感想などを自由に記入しましょう。

『9～10か月頃』 年 月 日ごろ

- はいはいをしますか。 はい いいえ
 (できるようになった時： 年 月 日頃)
- つかまり立ちができますか。 はい いいえ
 (できるようになった時： 年 月 日頃)
- 指で小さい物をつまみますか。 はい いいえ
 (たばこや豆などの異物誤飲に注意しましょう。)
- 機嫌よくひとり遊びができますか。 はい いいえ
- 離乳食は順調にすすんでいますか。 はい いいえ
 (離乳食を3回にすすめましょう。9か月頃から歯ぐきでつぶせる固さにします。)
- そっと近づいてささやき声で呼びかけると振り向きますか。 はい いいえ
- 後追いをしますか。 はい いいえ
- 歯の生え方、形、色、歯肉などについて
 気になることがありますか。 はい いいえ
- 子育てについて困難を感じることはありますか。 はい いいえ
 何とも言えない
- 育児の心配、かかった病気、感想などを自由に記入しましょう。

『1歳の頃』 年 月 日ごろ

- つたい歩きをしますか。 はい いいえ
 (できるようになった時： 年 月 日頃)
- バイバイ、コンニチハなどの身振りをしますか。 はい いいえ
- テレビなどの音楽に合わせて、からだを楽しそうに動かしますか。 はい いいえ
- 大人の言う簡単なことば(おいで、ちょうだいなど)がわかりますか。
 はい いいえ
- 相手になって遊んでやると喜ぶますか。 はい いいえ
- 食事を3回、喜んで食べていますか。 はい いいえ

(食欲をなくさぬよう、またむし歯予防のために、砂糖の多い飲食物を控えましょう)

- どんな遊びが好きですか。

(遊びの例:)

- 育児の心配、かかった病気、感想などを自由に記入しましょう。

『1歳6か月頃』 ____年 ____月 ____日ごろ

- ひとりで上手に歩きますか。 はい いいえ

(ひとり歩きができるようになった時: ____年 ____月 ____日頃)

- ママ、ブーブーなどの意味のあることばをいくつか話しますか。 はい いいえ

- 自分でコップを持って水を飲めますか。 はい いいえ

- 哺乳ビンを使っていますか。 はい いいえ

(哺乳ビンを使って飲むのは、むし歯予防などのためにやめるようにしましょう。)

- 食事やおやつ時間はだいたい決まっていますか。 はい いいえ

- 保護者が歯の仕上げみがきをしてあげていますか。 はい いいえ

- 極端にまぶしがったり、目の動きがおかしいのではないかと気になりますか。

はい いいえ

- うしろから名前を呼んだとき、振り向きますか。 はい いいえ

- どんな遊びが好きですか。

(遊びの例:)

- 子育てについて困難を感じることはありますか。 はい いいえ

何とも言えない

- 育児の心配、かかった病気、感想などを自由に記入しましょう。

質問は、以上です。ご協力、誠にありがとうございました。

(記入後、同意書・乳幼児発達スケール・調査票(5枚)を同封の封筒に入れ、お忙しいところ恐縮ですが、平成 ____年 ____月 ____日までに当院へご返送をお願い申し上げます。)

ART出生児の発育・発達に関する研究
－調査参加者の選択バイアスに関する検討－

分担研究者 山縣然太郎 山梨大学大学院医学工学総合研究部 社会医学講座 教授
研究協力者 鈴木 孝太 山梨大学大学院医学工学総合研究部 社会医学講座 准教授

研究要旨

ART出生児の追跡調査を行っている各協力医療機関において、同時期にARTを施行した症例を含む日本産科婦人科学会オンライン登録データを用いて、調査参加者2,777人と不参加者1,798人における、背景、また周産期予後についての違いを検討した。その結果、児の性別や在胎週数、出生体重については、参加者と不参加者で大きな違いがなかった。しかし、卵巣刺激法や使用した受精卵などの治療内容に違いが認められ、また、非参加者で児の先天異常が有意に多かったことから、ART児と不妊治療以外で出生した児の発育・発達の比較において、結果を解釈するうえで、上記のバイアスを考慮する必要性が明らかになった。

A. 研究目的

平成22年度に、ART由来出生児（以下ART児）の長期予後調査として行われた、日産婦登録データベースに登録されたART児集団から抽出されたART児コホートデータと、一般の産科医療施設でARTを用いずに出生した児のデータを用いて、平成23年度、平成24年度は、ART児と、それ以外の児における出生体重・身長、18ヶ月時のBMI、また発達の指標であるKIDSスケール得点についての比較、またARTが低出生体重児、Small for gestational age (SGA) 児、早産児といった周産期予後に与える影響についても検討してきた。その結果、不妊治療を行わなかった児に比べ、凍結胚を用いたIVFで出生した児は約70g ($p < 0.001$) 出生体重が大きく、18ヶ月時にもARTによる発育、発達における負の影響を認めなかった。

しかしながら、このような調査において、調査参加者が一般集団を代表しているかどうかは、これまでに得られた結果を一般化するうえで重要であるが、調査参加児についての選択バ

イアスについては検討されていない。

そこで今年度は、各協力医療機関において同時期にARTを施行した症例を含む日本産科婦人科学会オンライン登録データ（以下日産婦データ）を用いて、調査参加者とそうでない症例における、背景、また周産期予後についての違いを検討した。

B. 研究方法

追跡調査の対象者は、全国の不妊治療を行っている23医療施設および、1つの一般産科医療施設から調査票を郵送し、調査に同意し返信があった4398例である。

今回は、上記の参加者と同時期に各協力医療機関においてARTを実施した症例のうち、ARTで児を出生した症例について、日産婦データを利用し、調査参加者（ARTで児を出産した母とその児）とそうでない症例（不参加者）について、以下の項目に違いがあるかどうかを検討した

- ・治療開始時の年齢

- 不妊治療の適応
- 卵巣刺激法
- 使用した受精卵
- 精液
- 胚移植時の発育段階
- 黄体期管理
- 確認された胎児数
- 出産児数
- 分娩様式
- 性別
- 在胎週数
- 出生体重
- 先天異常の有無

連続変数についてはt検定、カテゴリ変数については χ^2 乗検定を行った。

統計解析には SAS version 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) を用いた。

C. 研究結果

調査に同意し参加したのは 4398 人、日産婦データが存在し、調査に参加していない、あるいは同意しなかったのは延べ 27249 人であった。上記のうち ART で児を出生したのは調査参加群で 2777 人、不参加群で 1798 人であった。

両群における、検討項目ごとの結果を以下に示す (参加群、不参加群の順に記載)

- 治療開始時の年齢：34.7±3.8 歳 vs. 34.7±3.8 歳 (p=0.6)
- 不妊治療の適応 (男性因子)：37.1% vs. 39.6% (p=0.1)
- 卵巣刺激法 (GnRH agonist+hMG or FSH)：42.4% vs. 45.3% (p=0.003、全てのカテゴリについて)
- 使用した受精卵 (新鮮胚・卵)：43.9% vs. 38.8% (p<0.0001、全てのカテゴリについて)
- 精液 (射出精子)：89.7% vs. 91.5% (p=0.3)
- 胚移植時の発育段階 (胞胚)：56.1% vs. 62.5%

(p<0.0001、全てのカテゴリについて)

- 黄体期管理 (エストロゲン+プロゲステロン)：49.0% vs. 50.0% (p=0.5)
- 確認された胎児数：1.16±0.37 vs. 1.11±0.32 (p<0.0001)
- 単胎児の割合：85.9% vs. 90.7% (p<0.0001)
- 出産児数：1.14±0.35 vs. 1.09±0.30 (P<0.0001)
- 分娩様式 (帝王切開)：45.1% vs. 42.6% (p=0.2)
- 性別 (男児、第 1 子)：49.8% vs. 51.9% (p=0.1)
- 在胎週数 (第 1 子)：38.3±2.3 週 vs. 38.4±2.4 週 (p=0.5)
- 出生体重 (第 1 子)：2920.3±539.5g vs. 2949.6±521.1g (p=0.07)
- 先天異常の有無 (第 1 子)：1.07% vs. 2.60% (P=0.0001)

なお、単胎のみで検討した場合も、ほぼ同様の結果が得られた。

D. 考察

これまでに得られた結果の一般化可能性を検討するために、日産婦データを用いて調査参加者と不参加者の年齢や治療方法などに違いがあるかどうかを検討した。

その結果、治療開始時の母親の年齢や、不妊治療の適応、帝王切開の割合、児の性別や出生体重、在胎週数については有意な差を認めなかった。一方で、治療内容については参加群と不参加群でやや違いが認められた。不参加者では、新鮮胚を使用した割合が少なかったが、そのため、同時に胚盤胞移植が多かったことが推測された。

しかしながら、児の性別や在胎週数、出生体重については、参加者と不参加者で大きな違いがなかったことから、これまでに検討してきた ART 児と不妊治療以外で出生した児の比較については、この選択バイアスが結果に与える影響は少ないと考えられた。さらに、交絡因子と

して考えられる母親の年齢に関しても、有意差を認めなかったことから、この点についても結果に与える影響は大きくないと考えられる。

一方で、治療内容についてのバイアスが結果に与える影響については、治療に使用した受精卵の種類などとも関連することが考えられ、これまでに得られた結果を説明する場合に、考慮する必要があると思われた。

しかし、第1子における先天異常の割合が調査参加者で有意に少ないなど、比較的周産期予後のよかった症例が参加している可能性もあり、今後の追跡などにおいても、結果の解釈を慎重に行う必要性が示唆された。

(平成26年度における研究計画案)

これまでに得られたデータのクリーニングを進め、論文作成を進めるとともに、今後は追跡における選択バイアスについても検討を進めていく予定である。

E. 結論

各協力医療機関において同時期にARTを施行した症例を含む日産婦データを用いて、調査参加者とそうでない症例における、背景、また周産期予後についての違いを検討したところ、児の性別や在胎週数、出生体重については、参加者と不参加者で大きな違いがなかった。しかし、卵巣刺激法や使用した受精卵などの治療内容に違いが認められ、また、非参加者で児の先天異常が有意に多かったことから、ART児と不妊治療以外で出生した児の発育・発達の比較において、上記のバイアスを考慮する必要性が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

乳児期における母体妊娠合併症及びART児の粗大運動発達の検討

研究分担者 橋本 圭司 国立成育医療研究センター

発達評価センター長、リハビリテーション科医長

研究要旨

【目的】乳児期における母体妊娠合併症及び生殖補助医療による妊娠で生まれたART児の粗大運動発達の経過を明らかにすることである。【方法】国立成育医療研究センターで妊娠・分娩管理を行った症例で同意を得た症例1,115名のうち、母体妊娠合併症・ART群410名とコントロール群396名を対象とした。粗大運動の評価は、小児基本動作評価スケール（ABMS-C）を用い、母親への質問紙調査によって行った。【結果】ABMS-Cの評価結果は、月齢1カ月、3カ月、6カ月、9カ月、12カ月時の粗大運動発達は、両群間に有意差を認めなかった。【結論】母体妊娠合併症及びART群の乳児では、コントロール群と比較して月齢1～12カ月時の粗大運動発達に有意差を認めなかった。

A. 研究目的

研究の目的は、乳児期における母体妊娠合併症及び生殖補助医療による妊娠で生まれたART児の発達の指標である粗大運動発達の経過を明らかにすることである。

B. 研究方法

2011年1月から2013年4月の期間に、国立成育医療研究センターで妊娠・分娩管理を行った症例のうち、成育母子コホートへの参加の同意を得た症例の中で、経時的にデータを収集できたのは1155名であった。本研究の対象は、母体妊娠合併症・ART群410名と母親の年齢、経産、初産などの条件でマッチングしたコントロール群396名である。純粹に母体要因による児の発達への影響を検討することを目的に、早産児、低出生体重児は対象から除外した。

母体妊娠合併症・ART群の平均在胎日数は 275.1 ± 8.3 日、平均出生体重は 3094.4 ± 349.2 gであり、母親の平均年齢は 38.2 ± 3.7 歳、初産270名、経産

140名であった。コントロール群の平均在胎日数は 274.8 ± 7.9 日、平均出生体重は 3073.6 ± 357.5 gであり、母親の平均年齢は 34.1 ± 3.5 歳、初産230名、経産166名であった。

粗大運動の評価は、乳幼児基本動作スケール（Ability for Basic Movement Scale for Children; ABMS-C）を用い、児の両親への質問紙調査によって行った。ABMS-Cは、日常の診療において、医師及び他のメディカルスタッフが、乳幼児の粗大運動の達成度を簡便に評価する方法で、評価項目は「頸部保持」「座位保持」「平面移動」「立位保持」「歩行」の5項目で、それぞれを0、1、2、3の4段階のグレードで評価する。各項目とも乳幼児がその時点で発揮できる最大限の能力によって評価点をつける。たとえば「平面移動」において、四つバイ・背バイができなくても、殿部を挙げての膝バイが可能であれば、「平面移動」のグレードは3となる。図1にABMS-Cを示した。統計ソフトは、IMB社製のPASW® Statistics 17.0を用いた。

図1. ABMS-C

Ability for Basic Movement Scale for Children (ABMS-C)

グレード	0	1	2	3
1 頸部保持	首が全くすわっていない 	首を45度前後にすることも首がついてくる 	首を90度前後にすることも首がついてくる 	首を90度前後にすることも首がついてくる
2 座位保持	全くお座りできない 	膝をまよればお座りできる 	手をついて10秒お座りできる 	手を離して10秒お座りできる
3 平面移動	全く平面移動できない 	寝返りができる 	20インチ幅の床で移動できる 	狭い床で移動できる
4 立位保持	全く立てない 	膝をまよえて10秒立てる 	両手につかまって10秒立てる 	手を離して10秒立てる
5 歩行	全く歩けない 	膝をまよえて歩ける 	つかまわらずに歩ける 	手を離して歩ける

C. 研究結果

ABMS-Cの下位項目である頸部保持、座位保持、平面移動、立位保持、歩行のそれぞれの項目の評価結果の推移を表1に示した。

ABMS-Cの評価結果では、月齢1カ月、3カ月、6カ月、9カ月、12カ月時の粗大運動発達は、両群間に有意差を認めなかった。(Mann-WhitneyのU検定； $p>0.05$)。

表1. 小児基本動作スケール (ABMS-C)の得点(中央値)の比較

	1カ月	3カ月	6カ月	9カ月	12カ月
頸部保持	母体妊産合併症・ART群	0	1	3	3
	コントロール群	0	1	3	3
	p値	0.4471	0.5797	0.7516	>0.9999
座位保持	母体妊産合併症・ART群	0	0	1	3
	コントロール群	0	0	1	3
	p値	0.8549	0.6362	0.2813	0.9785
平面移動	母体妊産合併症・ART群	0	0	1	2
	コントロール群	0	0	1	2
	p値	0.7727	0.7288	0.4881	0.6933
立位保持	母体妊産合併症・ART群	0	0	0	2
	コントロール群	0	0	0	2
	p値	0.9383	0.746	0.6988	0.0596
歩行	母体妊産合併症・ART群	0	0	0	0
	コントロール群	0	0	0	0
	p値	0.9473	0.936	0.5719	0.887
合計	母体妊産合併症・ART群	0	2	6	10
	コントロール群	0	2	6	11
	p値	0.2636	0.4189	0.7314	0.4546
データ数	母体妊産合併症・ART群	386	253	160	111
コントロール群	396	286	184	125	

D. 考察

日本版DENVER II (デンバー発達判定法)においては、児の90%達成年月齢として、「首がすわる」3.9カ月、「支えなしにすわれる、5秒以上」8.1カ月、「寝返りをする」6.1カ月、「つかまり立ちをする、5秒以上」10.5

カ月、「一人で立つ2秒」14.0カ月、「上手に歩く」17.4カ月などと記載されている。また、新版K式発達検査2001においては、「座位」で頭を直立安定が3~4カ月、「立位」でつかまらせて立ちが7~8カ月、つたい歩きが10~11カ月、一人立ちが11~12カ月が通過の目安となっている。本研究のコントロール群の粗大運動の達成時期がそれぞれ、「頸部保持」の首すわりが3~6カ月、「座位保持」のひとり座りが6~9カ月、「平面移動」の寝返りが6~9カ月、「立位保持」のつかまり立ちが6~9カ月、一人立ちが9~12カ月という結果であったこと、またコントロール群の12カ月の時点での「歩行」がつかまり歩きレベルであることは、既存の発達検査と一致しており、母親によるABMS-C評価の妥当性を示している。

E. 結論

母体妊産合併症及びART群の乳児では、コントロール群と比較して月齢1~12カ月の頸部保持・座位保持・平面移動・立位保持・歩行などの粗大運動発達に有意差を認めなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

a) Miyamura K, Hashimoto K, Honda M. Validity and reliability of Ability for Basic Movement Scale for Children (ABMS-C) in disabled pediatric patients. Brain Dev 2011;33:508-11.

b) 橋本圭司. 発達を支える子どものリハビリテーション. 東京, 三輪書店, 2013

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分裂ヲ介したUPD（15）matの発症増加は、高齢出産で説明できること、（3）PWS患者群でART出生児頻度が高いのは、高齢出産の影響を強く受けているためであること、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3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 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。

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 MS-MLPA 法により発症原因を同定した。UPD (15) mat は、一対の第 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)。

図 1

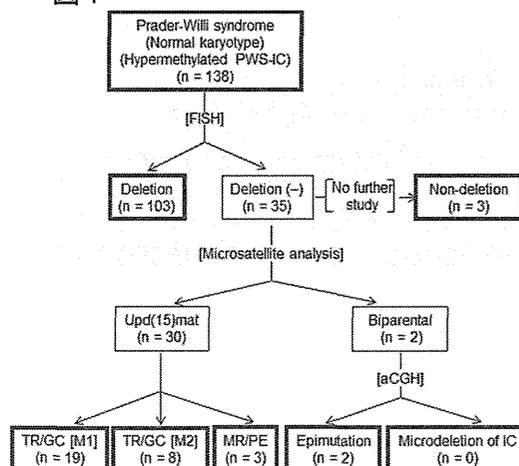


Figure 1. Classification of 138 Japanese patients with Prader-Willi syndrome phenotype.

- 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。

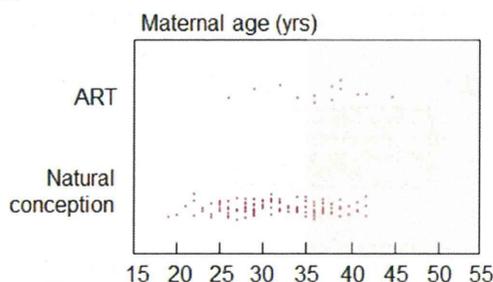
表 1

	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 群において有意に高かった (P=0.001)。

図 2



- ART および自然妊娠 (NC) による出生患者における TR/GC[M1]+TR/GC[M2] の相対頻度比較：表 2 は、ART および NC 群における TR/GC による UPD (15) mat の相対頻度を示したものである。ART 出生患者では減数分裂不分離後の TR/GC による UPD (15) mat の相対的頻度が有意に高かった ($P=0.004$)。

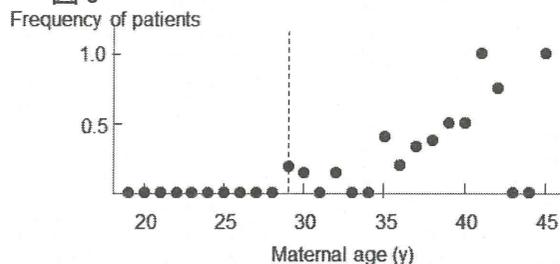
表 2

	Number of patients		Statistical analysis		
	PWS-MAR	PWS-NC	OR (95%CI)	chi-square test P-value ^a	Fisher's exact probability test P-value ^b
TR/GC-[M1+M2]-UPD(15)mat	7	20	6.13 (1.86, 20.1)	0.004	0.004
Others	6	105			

OR: odds ratio, CI: confidence interval

- 高齢出産と ART がダイソミー発症に与える影響の評価：図 3 は、母親年齢別の出生患者における TR/GC[M1]+TR/GC[M2] の相対的頻度を表したものである。TR/GC[M1]+TR/GC[M2] による UPD (15) mat 患者は、29 歳以上の母親からの出生児である。

図 3



したがって、母親年齢を、29 歳以上の母親から出生した患者において、TR/GC[M1]+TR/GC[M2] 発症に影響を与える因子として、ロジスティック解析に導入した (表 3)。

表 3 ロジスティック解析結果

Variable	Odds Ratio (95% confidence interval)	P-value
ART	2.541 (0.60, 10.9)	0.2
Maternal age	1.366 (1.21, 1.58)	3.1×10^{-6}

母親出産年齢が 29 歳以上の時、母親年齢が 1 歳上昇することに TR/GC[M1]+TR/GC[M2] による UPD (15) mat 発症リスクが 1.366 倍に上昇していた ($P=3.1 \times 10^{-6}$)。一方、ART の有無は、TR/GC[M1]+TR/GC[M2] 発症に有意な影響を与える因子ではなかった ($P=0.2$)。

次に、MAR の有無と母親年齢が TR/GC[M1]+TR/GC[M2] 発症に与える影響を個別に評価するために、切片項からなるモデルに説明変量を順に加えていき、それまでに加えた説明変量の効果を除いた上で新たに加えた説明変量の有意性を χ^2 検定により評価した (表 4)。

表 4

Variable	Model 1 (maternal age \rightarrow ART)	Model 2 (ART \rightarrow maternal age)
ART	0.2	0.003
Maternal age	2.0×10^{-9}	7.2×10^{-8}

モデル 1 において、母親年齢による効果を除いた後では、ART の TR/GC[M1]+TR/GC[M2] による UPD (15) mat 発症に与える効果は有意ではなかった ($P=0.2$)。モデル 1, 2 いずれにおいても、患者出生時の母親年齢の説明力は有意であった (モデル 1、 $P=2.0 \times 10^{-9}$ 、モデル 2、 $P=7.2 \times 10^{-8}$)。

- 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 (general population: GP) における ART 統計は、1989-2011 年において存在する。

表 5

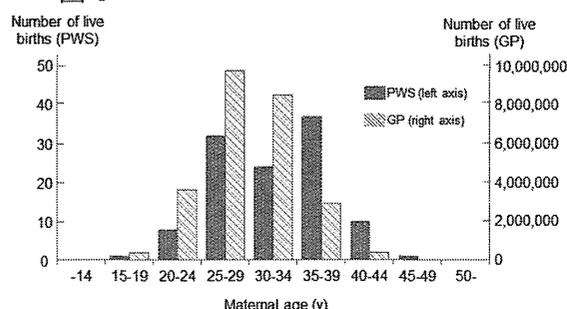
Comparison of the maternal childbearing age (yrs) and the frequency of ART-conceived births between PWS patients and the general population (GP) born in the years 1989–2011.			
	PWS	GP	P-value
Frequency of ART-conceived livebirths	6.20%	1.14%	4.3×10^{-7}
Number of total livebirths	113	26,571,052	
Number of naturally conceived livebirths ^a	106	26,267,558	
Number of ART-conceived livebirths	7	303,494	

^a The number of total births minus the number of births after ART

1989-2011 年に ART により出生した児の頻度は、PWS 患者集団において、一般集団より顕著に高かった (表 5、 $P=4.3 \times 10^{-7}$)。しかし、図 4 に示すように、出産時母親年齢は、

GP 群に比し PWS 群で有意に高年齢であった ($P = 2.2 \times 10^{-16}$)。

図 4



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]+TR/GC[M2]の発症増加は、高齢出産で説明できること、(3) PWS 患者群で ART 出生児頻度が高いのは、高齢出産の影響を強く受けているためであること、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

- Ogata T*, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashim S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y: *TBX1* Mutation Identified by Exome Sequencing in a Japanese Family with 22q11.2 Deletion Syndrome-like Craniofacial Features and Hypocalcemia. *PLoS One* (in press) .
- Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, Ogata T, Hasegawa T*: Identification and Functional Characterization of Two Novel NPR2 Mutations in Japanese Patients with Short

Stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 Jan 28;jc20133525. [Epub ahead of print]

- Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simon C, Moore H, Harness J, Keirstead H, Vicente Sanchez-Mut J, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D*: Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent establishment of imprinting. *Genome Res* (in press) .
- Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kishi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, Ogata T, Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Saitoh H: Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC Public Health* (in press)
- Fukami M, Miyado M, Nagasaki K, Shozu M, Ogata T: Aromatase excess syndrome: a rare autosomal dominant disorder leading to pre- or peri-pubertal onset gynecomastia. *Pediatr Endocr Rev* (in press) .
- Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, Ogata T: IMAGE syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol* (in press)
- Kitsuda K, Yamaguchi R, Nagata E, Nakagawa Y, Ohzeki T, Ogata T, Nakanishi T: Hypertrophic cells in hypophagic intrauterine growth retarded rats without catch-up growth. *Kitasato Med J* (in press) .
- Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Sato T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H: A novel *de novo* point mutation of OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* (in press) .

9. Yagasaki H, Nakane T, Saito T, Koizumi K, Kobayashi K, Ogata T: Disorder of sex development in an infant with molecularly confirmed 46,XY,der (10) t (10;21) (q21.1;q21.3) . *Am J Med Genet A* (in press) .
10. Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jinnno T, Nakabayashi K, Nishimura G, Nagai T, Ogata T, Fukami M: Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestations of Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* (in press) .
11. Nakashima S, Watanabe Y, Okada J, Ono H, Nagata E, Fukami M, Ogata T: Critical role of Yp inversion in *PRKX/PRKY*-mediated Xp;Yp translocation in a patient with 45,X testicular disorder of sex development. *Endocr J* 2013 Oct 3. [Epub ahead of print].
12. Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Nagasaki K, Ogata T, Fukami M: Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol* 2013 Sep 18. doi: 10.1111/cen.12329. [Epub ahead of print].
13. Nagasaki K, Asami T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Long term follow up study for a patient with Floating-Harbor syndrome due to a hotspot *SRCAP* mutation. *Am J Med Genet A* (accepted) .
14. Sasaki A, Sumie M, Eada S, Kosaki R, Kurosawa K, Fukami M, Sago H, Ogata T, Kagami M: Prenatal Genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to upd (14) pat-like phenotype. *Am J Med Genet A* (accepted) .
15. Fujisawa Y, Yamaguchi R, Satake E, Ohtaka K, Nakanishi T, Ozono K, Ogata T: Identification of *AP2SI* Mutation and Effects of Low Calcium Formula in an Infant with Hypercalcemia and Hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (12) : E2022-2027.
16. Fukami M, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunashima R, Ogata T, Shozu M, Noguchi S: Lack of genomic rearrangements involving the aromatase gene *CYP19A1* in breast cancer. *Breast Cancer* 2013 Apr 30. [Epub ahead of print].
17. Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Gurger H, Sompson ER, Emezawa A, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M, Ogata T: Genomic basis of aromatase excess syndrome: recombination- and replication-mediated rearrangements leading to *CYP19A1* overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (12) : E2013-2021, 2013.
18. Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T: Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn* 242 (4) : 320-329, 2013.
19. Fujisawa Y, Yamaguchi R, Nagata E, Satake E, Sano S, Matsushita R, Kitsuta K, Nakashima S, Nakanishi T, Nakagawa Y, Ogata T: The lipid fraction of human milk initiates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Early Hum Dev.* 2013 Jun 8. doi:pii: S0378-3782 (13) 00114-X. 10.1016/j.earlhumdev.2013.05.002. [Epub ahead of print]
20. Hayashi M, Kataoka Y, Sugimura Y, Kato F, Fukami M, Ogata T, Homma K, Hasegawa T, Oiso Y, Sasano H, Tanaka H: A 68-year-old phenotypically male patient with 21-hydroxylase deficiency and concomitant adrenocortical neoplasm producing testosterone and cortisol. *Tohoku J Exp Med* 231 (2) : 75-84, 2013.
21. Igarashi M, Dung VC, Suzuki E, Ida S, Nakacho M, Nakabayashi K, Mizuno K, Hayashi Y, Kohri K, Kojima Y, Ogata T, Fukami M: Cryptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY disorders of sex development. *PLoS One* 8 (7) : e68194, 2013.
22. Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y: Gain-of-function mutations in *RITI* cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK

- pathway syndrome. *Am J Hum Genet* 2013; 93 (1) : 173-180.
23. Ohishi A, Ueno D, Ogata T: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and adrenal hemorrhage in a Filipino neonate with hyperbilirubinemia. *AJP Rep* 3 (1) : 5-8, 2013.
24. Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N: MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 161 (9) : 2234-2243, 2013.
25. Matsumura T, Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Ayabe T, Katsumata N, Fukami M, Inatani M, Akagi Y, Umezawa A, Ogata T, Miyamoto K: Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *FASEB J* 27 (8) : 3198-3208, 2013.
26. Fukami M, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S, Ogata T: Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J* 60 (8) : 1013-1020, 2013.
27. Yamaguchi R, Kato F, Hasegawa T, Katsumata N, Fukami M, Matsui T, Nagasaki K, Ogata T: A novel homozygous mutation of the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene in a Japanese patient with familial glucocorticoid deficiency. *Endocr J* 60 (7) : 855-859, 2013.
28. Ayabe T, Matsubara K, Ogata T, Ayabe A, Murakami N, Nagai T, Fukami M: Birth seasonality in Prader-Willi syndrome resulting from chromosome 15 microdeletion. *Am J Med Genet A* 161 (6) : 1495-1497, 2013.
29. Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T: Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One* 8 (3) : e60405, 2013.
30. Nagasaki K, Tsuchuya S, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type Ib diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Endocr J* 60 (2) : 231-236, 2013.
31. Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S*: Possible contribution of fetal size and gestational age to myocardial tissue Doppler velocities in preterm fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 167 (1) : 121, 2013.
32. Suzuki-Suwanai A, Ishii T, Haruna H, Yamataka A, Narumi S, Fukuzawa R, Ogata T, Hasegawa T: A report of two novel NR5A1 mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression. *Clin Endocrinol* 78 (6) : 957-965, 2013.
33. Matsubara K, Ogata T: Advanced maternal age at childbirth and the development of uniparental disomy. A commentary on the proportion of uniparental disomy is increased in Prader-Willi syndrome due to an advanced maternal childbearing age in Korea. *J Hum Genet* 58 (3) : 118-119, 2013.
2. 学会発表
省略
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

生殖補助医療により出生した児の長期予後と技術の標準化に関する研究（H25-次世代-一般-001）

分担研究課題「ARTのインプリンティング異常例などの遺伝的安全性の検討」

研究分担者 秦 健一郎 独立行政法人国立成育医療研究センター・部長

研究要旨

生殖補助医療技術（ART）に伴う胚操作が、胚発生に与える影響の可能性は、様々な角度から繰り返し検証されている。最近、特殊な先天奇形症候群であるゲノムインプリンティング異常症の集団では、一般集団よりもARTにより出生した児が多く含まれる可能性を示唆する症例報告が散見される。モデル生物では、長期の胚培養などは胚のエピジェネティックな修飾を乱し、ゲノムインプリンティングをはじめ様々な遺伝子発現状態を変化させることが示されているが、ヒトでは因果関係が示されるに至っていない。そこで、ヒトART出生児のDNAメチル化状態を、特定領域（胎児胎盤の発生に重篤な影響を与えるゲノムインプリンティング領域）に限定せず広範に検証し、DNAメチル化状態（エピジェネティックな修飾状態）のばらつきを自然妊娠による出生群とARTによる出生群で比較し、両群間に検出できる明確な違いは認められなかった。

A. 研究目的

体外受精などの生殖補助医療技術が胚発生に与える影響が、様々な観点から検証されている。近年特に、顕微授精や長期の胚培養が、胚の、あるいは出生後も児の遺伝子発現に影響を与えることがモデル生物で示され、注目されている。ヒトでは、生殖補助医療により出生した児で、ゲノムインプリンティング異常が自然妊娠より高頻度に観察される可能性を懸念するケースシリーズ研究結果が報告されている。環境因子（胚培養など）が除去されても胚や児の遺伝子発現に影響を与える分子機構として、エピジェネティックな遺伝子発現制御が有力な候補として示唆されているが、ヒトで網羅的系統的に解析した例は無い。そこで、ヒトART出生児のDNAメチル化状態を、特定領域（胎児胎盤の発生に重篤な影響を与える領域）に限定せず、広範に検証することで、発生異常により淘汰されないDNAメチル化異常を検出する機会が増える事を期待し、網羅的なDNAメチル化解析を行い、統計的な差異の有無を検証する。

B. 研究方法

妊娠36週以降に出生した新生児のうち、母体年齢を一致させたART群と、コントロール群の臍帯血より回収したゲノムDNAを用い、Infinium Human Methylation450Beadchipで、常染色体上の47万か所のCpGサイトのDNAメチル化状態を比較検討する。同時に、これらの症例の網羅的一塩基多型情報を取得し、遺伝的背景（DNAメチル化状態に影響を与える可能性のある多型情報）を加味した解析を行う。

統計的な比較検討手法として、ART群とコントロール群の網羅的DNAメチル化データのクラスター解析を行う。事前情報無しに両群のゲノムワイドなDNAメチル化状態をクラスター解析することで、軽微な変化のために見逃されている「隠されたDNAメチル化変化」の有無を検証する。また、各プローブのシグナル値（DNAメチル化状態）のばらつきを群間比較し、「DNAメチル化の揺らぎ」がART群で大きくなる可能性を検証する。

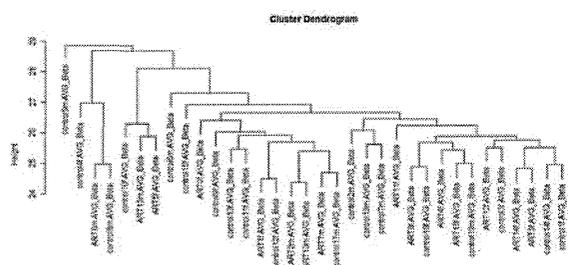
(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来のゲノム解析・遺伝子解析研究であるためヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針をはじめとする関連法令と指針を遵守して計画され、本センターおよび連携研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得て行っている。すべての検体は、書面で患者本人もしくは代諾者からインフォームドコンセントを得た後に採取され、採取時に各医療機関で匿名化が実施された。網羅的遺伝子解析については、説明書・同意書を用いて同意を取得した。

C. 研究結果

我々の先行研究では、ゲノムの多様性と同様に存在するエピジェネティックな多様性や、各DNAメチル化プローブの遺伝子内における位置や周辺配列の特徴により、各DNAメチル化プローブの生理的重みづけは異なる。このような厳密な解析を行うことで、真に確からしい(真にART群に特異的な)DNAメチル化異常を検出・判定できると考えられる。

試験的に解析したART出生16症例臍帯血と自然妊娠児19症例臍帯血の、CpG site 約47万か所を解析し、事前情報なしにクラスター解析を行った。その結果、ART出生群と自然妊娠出生群で明らかなクラスターは形成されなかった。このことは、DNAメチル化状態を観察してもART出生群と自然妊娠出生群を区別できない、すなわち、両群間に検出できる明瞭な違いがない事を強力に示唆する。



ART群と自然妊娠群の臍帯血DNAメチル化状態のクラスター解析

D. 考察

ヒトでは、ゲノム多様性と同様にエピゲノム多様性が存在し、さらにエピゲノム状態は環境因子の影響を受けると考えられるため、ある特定領域に焦点を当てて有意差を検証する際は、

多数検体群間の有意差検定が必要である。また、ARTによる医原性のエピゲノム変化が、合目的に特定の領域に集中するという根拠はなく、ランダムに起こる変化を捉えることができるように、本研究では47万か所のDNAメチル化状態を網羅的にスクリーニングした。ただし、ヒトのゲノムは多様であり、CNVをはじめとしたゲノム構造多型の影響も今後考慮し、エピゲノム解析の結果解釈に反映させる必要があると考えられる。

E. 結論

ヒトART出生児のDNAメチル化状態を、特定領域に限定せず広範に検証したところ、自然妊娠による出生群と比較して検出できる明確な違いは認められなかったことは、ARTの遺伝的安全性を示唆する。

加えて、本年度は、ARTにより出生した分担課題の遂行にも不可欠なSNPジェノタイプング・アレイ解析によるデータ取得ならびコピー数多型(CNV)解析から、標準的な日本人CNVデータベースを確立した。本研究では、イルミナ社BeadChip(HumanOmni 2.5M)を、同社iScanシステムを用いたデータ取得系から、効率的で高い信頼性のあるCNVの探索手法を検討した。これらは、今後の疾患罹患患者群、不妊、不育といった生殖発育異常群の解析にも応用できる。

すでに412検体についてアレイ解析とそのCNVデータセットを取得した。さらに、このデータセットを利用し、病因変異の効率的な探索に応用できた例も経験している。今年度の経験は、アレイ解析データを活用したCNV解析に役立つと考えられ、今後このデータをさらに整備しひろく公開することをめざす。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Epigenomics comes of age with expanding roles in biological understanding and clinical application.

Kubota T, Hata K:

2. Kusumi M, Hata K : Epigenetic Regulations in Placentation. Journal of Mammalian Ova Research 2013;30:11-15

2. 学会発表

(招待講演のみ)

1. 秦健一郎:「大規模配列解析技術の周産期疾患への応用」, バイオインフォマティクス学会 2013 年年会, 第 2 回生命医薬情報学連合大会, 東京, 2013.10.29
2. 秦健一郎: 絨毛発生分化異常のゲノム解析とエピゲノム解析. 第 31 回日本絨毛性疾患研究会, 名古屋, 2013.10.25
3. 秦健一郎: 生殖と発生異常のゲノム解析・エピゲノム解析. 昭和大学医学部産婦人科学講座第 17 回すこやか遺伝セミナー, 東京, 2013.10.8
4. 秦健一郎: エピジェネティクスとヒト疾患. 第 5 回高知県周産期遺伝セミナー, 高知市, 2013.8.25
5. 秦健一郎: Epigenetics in Abnormal Pregnancy. 第 24 回福岡国際母子総合研究シンポジウム, 福岡市, 2013.8.31
6. 秦健一郎: ヒト生殖異常・発生異常のエピジェネティクス. 第 5 回学際科学実験センターシンポジウム, 金沢, 2013.7.5

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし