

厚生労働科学研究
(子ども家庭総合研究事業)

配偶子・胚提供を含む統合的生殖補助技術の
システム構築に関する研究

平成14年度研究報告書

平成15年 3 月

主任研究者 吉 村 泰 典

目次

I. 総括研究報告書

配偶子・胚提供を含む総合的生殖補助技術のシステム構築に関する研究 235

吉村 泰典

II. 分担研究報告書

1. 先端生殖補助医療技術に関する研究 241

久保 春海

2. カウンセリング制度のあり方に関する研究 255

鈴木 薫

平原 史樹

3. 世界における生殖補助医療の動向調査 261

石原 理

4. 生殖医療機関の具備すべき条件に関する研究 272

齊藤 英和

5. 卵子および胚の提供を受けるための医学的適応基準に関する研究 279

苛原 稔

6. 精子の提供を受けるための医学的適応基準に関する研究 286

柳田 薫

7. 精子提供により子どもを得た日本人夫婦の告知に対する意見 296

久慈 直昭

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

総括研究報告書

配偶子・胚提供を含む統合的生殖補助技術のシステム構築に関する研究

主任研究者 吉村 泰典（慶應義塾大学医学部産婦人科教授）

（研究要旨）本研究は今後の我が国における配偶子・胚提供を含めた統合的生殖補助技術利用の枠組み構築を目的として研究を行った。

第一に配偶子・胚の提供基準・適応選択基準についての指針を作成した。卵子提供を受ける者は、卵巣形成不全症などそれ以外の方法では挙児を得ることができない法律上の夫婦に限るべきであり、妻の年齢は45歳以下とし、卵子の提供を行う女性は35歳以下であることが望ましい。精子提供を受ける者は女性側に非配偶者間体外受精の適応がない限り、まず人工授精を行う。胚提供の適応は、夫婦ともに卵子提供、精子提供をうける適応がある場合だけでなく、卵子提供をうける適応があつて一定期間卵子提供者が現れない場合等もこれに含め、胚提供は余剰胚に限る。またこれらの基準を作製する際、海外諸国で規制の弱い国への受容者夫婦の越境がおこっていることから、これらの可能性を視野に入れたシステム構築が必要である。告知と、子どもの出自を知る権利に関しては、我が国では海外諸国と同じく、親は告知をしない傾向が強いが、その一方で親たちも子どもの出自を知る権利を考慮していることが調査の結果明らかになった。

第二にわが国における生殖補助技術全体の安全・情報管理システムとカウンセリング体制についての現状調査および将来の指針作成を行った。安全管理および情報管理のためには、生殖補助医療実施機関と公的管理機関の独立した2機関が必要であり、実施機関は管理機関より厳格に評価、指導を行われるべきである。また現在我が国では認定看護師を中心とした生殖補助医療のカウンセリングが試行されつつあり、さらに今後男性不妊関連遺伝子の説明をはじめとする、適切な生殖遺伝カウンセリングが保証されるべきである。また配偶子・胚提供を含む生殖補助医療において、説明と同意をとる際の実際の説明事項・手順と、インフォームドコンセントの書式を作製した。

第三に枠組み構築の際に必要な、今後近い将来に検討されなければならない新しい生殖補助技術、とくにクローン技術を基礎とする研究の現状と問題点を調査した。加齢卵子の機能改善を目的としてドナー卵子を用いる細胞質移植法、あるいは卵核

胞期核移植法は人類に遺伝的なリスクをもたらす可能性があり、これらの新しい研究に対して法規制を含む迅速な対応を可能とするシステムが必要である。

分担研究者

久保春海

東邦大学医学部産婦人科学第1講座教授

鈴木 薫

名古屋市立大学医学部医学研究科教授

平原史樹

横浜市立大学医学部産婦人科教授

石原 理

埼玉医科大学産婦人科教授

齊藤英和

国立成育医療センター周産期診療部医長

苛原 稔

徳島大学医学部医発生発達医学講座

女性医学分野教授

柳田 薫

福島県立医科大学医学部産婦人科助教授

久慈直昭

慶應義塾大学医学部産婦人科講師

A. 研究目的

本研究は今後の配偶子・胚提供を含めた統合的生殖補助技術利用の我が国における枠組み構築を目的とした。

B. 研究方法

具体的な方法として、第一に今後臨床応用される可能性のある卵子・胚提供技術を加えた生殖補助技術の配偶子・胚の提供基準・適応選択基準についての指針を生殖医学的見地より作成した。その際、新たな生殖医療を実施するために必要な倫理的及び法整備も含めて各種のアンケート調査を行い、その結果や海外での臨床応用の実態・その規制状況を考慮する。とく

にクライアント夫婦の医学的適応基準や提供される配偶子や胚の条件、および提供者の匿名性や出自を知る権利について詳細な考察を行った。第二に、わが国における生殖補助技術全体の人的資源の運用、とくに患者に必要な十分な情報を提供し、その自己決定権を尊重するためのシステム構築と、患者情報の保管、コーディネート業務の可能性をはじめとする安全管理上の指針を作製した。第三に今後開発されてくる新しい生殖補助技術を社会に対し明らかにし、迅速に対処し適正に運用していくシステムの構築を検討した。

C. 結果・考察

1. 配偶子（精子および卵子）及び胚提供を受けるための医学的適応基準の設定

① 卵子・精子および胚提供を受けるための医学的適応基準

(1) 卵子提供

卵子提供を受ける者は、患者の体内に卵子が存在しないか、存在しても排卵刺激に反応しない法律上の夫婦に

限るべきである。また、提供を受ける者が備えるべき要件として、1. 機能を有する子宮を備える、2. 妻の年齢は45歳以下、3. 健康状態が良好、という3項目を満たす必要がある。卵子の提供を行うものは、妊娠率等を考慮して、35歳以下の身体的にも精神的にも健康な女性であることが望ましい。

(2) 精子提供

精子提供を受けるものの医学的適応は、成熟した精子が得られない場合、あるいは自己の精子が得られても医学的に受精・胚発生能が備わっていない精子を持つ場合である。提供精子による体外受精は卵管性不妊症や免疫性不妊症などがある場合や、非配偶者間人工授精を10回以上実施したが妊娠に至らなかった場合に行うことができる。

(3) 胚提供

胚提供の医学的な適応としては、1. 夫婦ともに卵子提供、精子提供をうける適応がある場合、2. 妻に卵子提供をうける適応があるが、一定期間卵子の提供者が現れない場合、3. 卵子提供または精子提供による非配偶者間の体外受精および顕微授精を受け、繰り返し受精または受精しても妊娠が成立しない場合、4. 配偶者間体外受精および顕微授精で繰り返し受精または受精しても妊娠が成立しない場

合などが考えられる。付帯事項として、胚提供は余剰胚に限る。提供するための体外受精は認めない。

②世界における生殖補助医療の動向

情報伝達と交通手段の発達により、国単位での生殖補助技術の規制は現在事実上不可能となっている。このような状況下、その管理システムの先進国である英国と北欧の事例に注目し、現地における医療従事者と管理システム従事者の双方に直接面接を行った。

これまで調査を行った英国、スウェーデン、フィンランド、デンマークにおいては、異なる社会・文化的背景のもとに、生殖補助技術に対する独自の法的規制を持つ、あるいはフィンランドのように法的規制がないなど、多様な対応がとられている。特に配偶子提供、IVF サロゲートに対する対応には、国による差が大きい。しかし強い規制を持つ国は、結果的に規制の弱い国へ患者の越境輸出を容認し、治療の選択は、各カップルの個人的な裁量に委ねられている。また、生殖医療に関する国家的・社会的な規制は、基本的に個人の権利と幸福を守る視点で行われ、たとえば親子関係が不明確になることを危惧するなど、伝統的家族に対する価値観を守ろうとする社会防衛的

な色彩や視野はない。

③配偶子提供における告知と出自を知る権利に関する両親の意識調査

配偶子・胚提供における告知・出自を知る権利についての当事者の意識を調査するため、非配偶者間人工授精（AID）において実際に子どもを得た受容者夫婦が告知と出自を知る権利についてどのように考えているかについて検討した。

AIDにより生児を得た249例の夫婦を対象として匿名のアンケート調査を夫、妻別々に行った。この内114夫婦がアンケートに協力する意志を示し、最終的に夫76人（66.7%）、妻86人（78.9%）からアンケートを回収できた。告知について、夫婦とも75%以上が一般的意見として「絶対に話さない方がよい」という意見であり、その理由は「子どもを作り、家族を守っている男性が本当の父親だと思う」がもっとも多かった。実際に子どもにこの事実を打ちあけている夫婦はなく、将来も告知する意志をもつ夫婦は極めて少数でるとともに（2%、5%）、仮に告知した後精子提供者を捜すことができるとしてもやはり大多数が告知を行わないと回答した（95%、95%）。しかし夫・妻とも半数近くが「告知を前提としてもAID治療を受けたと思う」と答えた（夫53%、妻53%）。子ど

もの出自を知る権利に対して、「子どもが将来偶然AIDの事実を知って、もし精子提供者を探したいといたら」という質問に対して、約半数の両親が積極的あるいは消極的に、遺伝上の親を捜す子どもの意志を尊重したいと考えていた（49%、52%）。

2. 生殖補助技術全体の安全管理を含めた運営指針策定

① 生殖医療機関における情報管理及びコーディネーションの必要性とその具体的実施案

第三者からの配偶子・胚提供の技術を用いた生殖補助医療システムでもっとも重要なことは、生殖補助医療実施機関と公的管理運営機関との2機関が独立することであり、両機関は独立的立場に立つとともに、医療実施機関は公的管理機関より厳格に評価、指導を行われるべきである。また、配偶子・胚による生殖補助医療をうける症例のコーディネーション等を行う際には、両機関は、緊密に連携を取りながら業務の遂行にあたる必要がある。

また第三者からの配偶子や胚の提供の技術を用いた生殖補助医療は短期間に治療が終了するものではなく、その後の精神的・肉体的健康をフォローアップするために何十年にわたる関与が必要であり、とくに非配偶者間

生殖医療で生まれた子からの開示請求（出自を知る権利）に対する対応や婚姻時、生まれた子またはその両親から、近親婚の懸念に対する対応が重要な業務となる。さらに、長期間にわたる業務のため、膨大な数の症例の生殖医療業務、提供された配偶子・胚による生殖補助医療をうける症例のコーディネーションを行い、かつプライバシーを守るために厳重にデータを管理する必要がある。

②配偶子・胚提供を含む統合的生殖補助技術システムにおけるカウンセリング・インフォームドコンセントの書式設定について

とくに配偶子・胚提供を含む生殖医療では、患者の自己決定権を尊重するためのカウンセリングシステムの構築と、どの医療機関をおとずれても同じ水準の説明と同意が得られるためのインフォームドコンセントの指針が必要である。

生殖医療のカウンセリングに関して、日本看護協会は「不妊看護認定看護師」制度を発足させており、2002年10月より14名がこの制度に則って研修中である。さらに将来は生殖補助医療を希望する妊婦には適切な生殖遺伝カウンセリングの機会も保証されるべきである。

また患者への説明の際、配偶者間の生殖補助医療の実施にあたっては、当然のことながら不妊の原因が何か、今までの治療効果やその後の経過の概略が十分に妻および夫に説明されていることが必須である。一方配偶子・胚の提供による生殖補助医療を実施する際には上記の項目の上に、①適応、②対象者、③提供者に課せられる条件、④提供を受ける際の費用負担、⑤被提供者、提供者の権利と義務、⑥子どもを養育する親の責任、などが含まれる。

3. 新しい生殖補助技術への対応

①加齢に伴う性腺機能低下に対する生殖補助医療の応用

卵子、とくに動物卵子を用いたクローン技術確立は、ヒト生殖補助技術において従来不可能であると考えられていた技術実現の可能性を拓けている。これからヒト卵子で応用可能になってくるこれら先端技術をどのように社会に対し明らかにし、迅速にこれに対処し正しく適用していくかについて考察するため、そのとくに問題となっている卵子の加齢とそれに対する対策の研究状況について調査した。

卵子に問題があるために不妊となっている夫婦では、女性の加齢により卵子はできるがその細胞としての活性が低い場合（加齢卵子）と、女性が

卵子そのものを全く作れない場合（卵巣不全）、の二つが考えられる。このような女性が自分の遺伝子をもった子どもを持つ方法として、クローン技術を応用して、加齢卵子に対しては細胞質移植・卵核胞期核移植、卵巣不全に対しては女性の体細胞から人工卵子を作製する方法が考えられている。問題点としてこの方法は加齢卵子で増加する受精後の胚染色体異常を低減させる効果はないといわれており、また移植されたドナー卵子細胞質の成分であるミトコンドリアはあきらかに子供に伝播されていることが証明されているため、人類全体の遺伝的危険性を危惧する意見があり、法律によってこれら技術を禁止している国も多い。ただしこの技術は、ミトコンドリアの遺伝子に異常をもつミトコンドリア病予防のための医学的適応は考慮されなければならない。

このようにクローン技術を基礎とする生殖技術は人類に遺伝子キメラ個体を作成してしまう危険性を孕んでおり、新しい研究に対して、法規制を含む迅速な対応が必要である。

結論

精子・卵子・胚提供技術を加えた生殖補助技術の配偶子・胚の提供基準・適応選択基準についての指針を作成した。海外での調査から自分たちが欲する生殖医療を求めて国境を越えて治療を行う夫婦の存在が確認された。我が国での精子提供によって挙児を得た夫婦は告知を避ける傾向が強く、その一方で子供の出自を知る権利を考慮していることが示された。配偶子・胚提供を含む生殖医療では実施機関の監督指導、開示請求を含む提供情報の保管・管理、コーディネイト業務を行う管理運営機関が必要であり、その要綱を作製した。専門化した看護師を中心に不妊夫婦へのカウンセリング体制整備は始まっているが、生殖遺伝カウンセリングが今後必要となる可能性がある。クローン技術を基礎とする細胞質移植・卵核胞期核移植、人工卵子による治療技術は生まれてくる子供自身の危険性と共に人類に対する集団遺伝学的危険性も存在するため、法的規制を含む厳重な管理が必要である。

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

（分担）研究報告書

配偶子・胚提供を含む統合的生殖補助技術のシステム構築に関する研究

「先端生殖補助医療技術に関する研究」

加齢に伴う性腺機能低下に対する生殖補助医療の応用に関する基礎的検討

研究者：久保春海（東邦大学医学部産科婦人科学第1講座）

（研究要旨）生殖補助医療(ART)の成否すなわち、受精率や着床率は卵子内に存在する mtDNA コピー数に依存する。また高齢婦人の場合、卵子に変異のない mtDNA が少なくなっていくことが知られおり、これらは加齢とともに変異 mtDNA を有する卵子が増加する可能性と、これらの質の悪い卵子を淘汰する摂理によって支えられていると考えられる。

加齢卵子の低下した機能を改善させるために考えられる手段として、理論的に健全と思われる若年女性のドナー卵子から得られた卵細胞質を加齢卵子に微量注入する方法(Cytoplasmic transplantation ; CT)が一般的である。

CT による出生児は未だ少数であるが異常があることは報告されていない。しかし、細胞質とともに機能的に未知で相同ではない mtDNA を移植することによる heteroplasmy に対する人類の将来に対する危惧が考えられる。

除核ドナー卵子に本人の体細胞から取った核を人工的に1倍体化(haploidized)して核移植(NT)することで、本人の遺伝子を持った新しい人工卵子を作製しようという semi-cloning 技術が研究されている。しかしこの手法による胚は一方の親の配偶子ゲノムともう一方の親の体細胞ゲノムから得られた遺伝子の混合によって形成されるので、通常のクローン個体と同様な問題が発生する可能性が危惧される。

加齢による卵子の質的低下は若齢者のドナー卵子を用いることでこれを補填することが理論的に可能である。したがって、加齢による性腺の機能低下に基づく不妊に対する現時点での最終的選択は Oocyte donation であろう。

加齢による妊孕能低下に対する治療として、米国では、卵子提供が行われている。また、胚の異数体を分析する目的で PGD(Preimplantation Genetic Diagnosis)も行われている。わが国では、上記方法は認められておらず、今後の社会的同意、基礎的研究による安全性の確認が応用への鍵となっている。

研究協力者: 竹下直樹(東邦大学医学
部産科婦人科学第1講座)

I 加齢に伴う性腺機能低下に対する所謂「卵子若返り法」とは。

近年、生殖補助医療(ART)の進歩により、多くの不妊夫婦に対して恩恵を授けられるようになった。しかし、高齢不妊患者の場合には加齢による機能低下卵子(dysfunctional gamete)の問題が発生する。加齢卵(aged oocyte)は発育能の低下と着床率の低下が認められることからARTにおける重要な今後の課題である。これらの問題を解決する手段として卵子若返り法が多く研究者の手により研究が続けられている。このうち加齢卵子の機能を改善させるための最も容易かつ効果的と考えられる方法は理論的に健全と思われる若年女性のドナー卵子の卵細胞質を加齢卵子に注入する方法(Cytoplasmic transplantation ; CT)であろう。実際これらの方法を開発したCohen や Barritt らによれば 100 回以上の流産歴を有する 27 症例の不妊患者にドナーの細胞質を移植した結果、43%の臨床的妊娠率を得たと報告している。しかし、Opsahl らは最近、高 FSH レベルの高齢婦人の加齢卵に対して凍結保存ドナー卵から得た細胞質を注入したが妊娠率は不良であったと報告した。これらの結果を相対的に比較してみるとこの方

法のさまざまな問題点が明らかになる。第1にはこの方法が効果的と考えられる高齢患者の選定基準は何か。そして第2には CT により加齢卵子に誘導される若返り効果因子は何か、ということであろう。

前者の卵子若返り法に対する患者の選定基準の設定は非常に困難な問題である。なぜなら、われわれは未だ vital な状態での老化卵子の判定基準を確立していないことや胚発達、着床障害が起きる生物学的欠失理由を基礎的に解明していない点あげられる。

胚の異数性(aneuploidy)と加齢(ageing)の関連性が議論されているが、この改善方法として CT は効果的ではないという報告もある。減数分裂における染色体不分離(nondisjunction)現象はほとんどが減数分裂時に起きることが知られているが、加齢と異数性の関連性は未だ良く分かっていないのが現状である。第2に CT により加齢卵子に誘導される若返り誘導因子は何かということであるが、確かに成熟卵子の細胞質が核内に影響を与えることは事実であるが、減数分裂時の染色体不分離に対してごく微量の細胞質置換がはたして機能的に障害された卵子の活性化(augmentation)に十分な活性化因子となり得るのであろうか。最近、Munne らは受精後、分割期における特殊な形式の胚異数性(mosaicism)が存在

し、これは母体の加齢と関係がある現象であることを報告した。このような後期の染色体不分離はCTが有効であると考えられている。もしこのCTの目的が細胞質内に含まれるなんらかの若返り効果因子をドナーから移植することが目的であれば、どのような細胞質を移植するかが最もこの方法の成功率を左右する因子となる。凍結卵細胞質の移植が従来行われていたが、この方法ではドナーとレシピエントとの細胞周期性同調を除外して行われている。従ってこれらの卵子の質は不明であるが、凍結保存卵は移植の際にすでに効果因子を変性させてしまっているかもしれないし、細胞質構成成分を変化させているかもしれない。従って、凍結保存卵によるCTがうまくいかないのは核あるいは細胞質もしくは核と細胞質の両者の変質の結果なのかもしれないのである。しかしこれらの相違点を凍結保存された単一細胞で鑑別することは非常に困難であるが、マウスによる研究では凍結による細胞質の障害の方が karyoplast の障害よりも重大であった。しかし、凍結卵子の生存率の違いによって、CTにも差が認められることから、凍結保存卵子がCTに用いられるかどうかは未だ詳細な研究結果を待つ必要がある。いずれにしろ細胞質は同じ固体から採取されても、決して同一と看做すことは出来ないであろうことは明らかであることから、CTのドナー卵子の条件としては

可及的に健全で適切なドナー卵子から採取されることが基本的原則となるである。

① 卵若返り法の必要性和問題点

卵子には平均 100,000 個のミトコンドリアを有し、それぞれのミトコンドリアが1-数コピーのミトコンドリア遺伝子(mtDNA)を有している。mtDNAは環状構造であり、16.6KbのDNAが電子伝達系(ETC)に参与する13のポリペプチドをコードし酸化リン酸化径路を通してATP産生に参与する¹⁾。ミトコンドリアは多くの機能を有しているが、その中でもATPの形でエネルギーを産生する機能は細胞の生存性に重要な役割を果している。そしてまたこの機能を発現させるミトコンドリア遺伝子の転写と複製には、核内遺伝子によってコードされている転写、複製因子の合成、ミトコンドリアへの移送によって成り立っている。したがってmtDNAの点突然変異や欠失が起きればミトコンドリア機能にとって重大な機能障害となり、その細胞は致命的な状態となるであろう。最近、ARTの成否すなわち、受精率あるいは着床率は卵子内に存在するミトコンドリアのmtDNAコピー数に依存するという報告がなされた²⁾。また高齢婦人の場合、卵子の中に正常で変異のないmtDNAが少なくなってくる事が知られている³⁾。これらは加齢とともに変異mtDNAを有する卵子が増加する可能性と、これらの質

の悪い卵子を淘汰する摂理によって支えられていると考えられる。この結果、不十分なミトコンドリア数によって受精後にもエネルギー産生の低下により分割速度が抑えられ、胚発生が最終的に阻止される。また、個々の割球にも ATP 産生抑制によりアポトーシスを誘導し断片化 (fragmentation) を生じさせる。このため加齢にともなう劣化卵子に正常ミトコンドリアを含む細胞質を補填することは議論の余地はあるものの科学的根拠を有している。しかし CT は単にドナー卵のミトコンドリアのみを移植するだけではなく、mRNA やある種の蛋白質成分などの不明因子を含む細胞質をも受容卵に注入することになる。したがって、CT によって特定の加齢不妊患者を救う可能性は否定出来ないが、同時に CT により予期せぬ異常を引き起こすことも予測される。それらは生物学的、社会的、倫理的問題を含んでいるが、未だヒトに対して CT の臨床応用されている症例数が世界的に極限られているために結論は出されていない。

②生殖年齢と妊孕能低下に関する考察

日本人の出生数は、母子医療統計によると、1970 年の 193 万人から 1998 年の 120 万人に減少している⁴⁾。一方、30 歳以上の分娩数における割合は、1970 年では 23.2%、1998 年では 42.9% である。35 歳以上で見ると、4.7% から 10.6% と倍増しており、明らかな出産年齢の上昇

を認める。これは、近年の働く女性の増加、カップルの結婚・育児に対する考え方の変化により、結婚・妊娠・出産の高齢化が生じているためと考えられる。不妊治療においても、患者年齢層は高齢化しており、特に、長期・重症不妊症における割合は顕著である。1993 年の French national IVF registry の報告によれば、女性の妊孕能は、20 歳代前半でピークを迎え、30 歳より低下し始め、平均的に約 44 歳で 0 となるとされている⁵⁾。

高齢と妊孕能低下の原因については、加齢による (30 歳未満、30 歳～34 歳、35 歳～39 歳、40 歳以上) 採卵数、受精卵数、妊娠率、着床率、流産率の検討の報告がされている、それによると、流産率以外は減少していた⁶⁾⁷⁾⁸⁾。また、35 歳前後での、IVF、ICSI による妊娠率は有意に低下し、各々 40% から 20%、35% から 10% であった⁶⁾。そして主たる原因は卵細胞の aging と考えられている。提供卵子による検討では、35 歳以下から得た卵を 40 歳以上に供与した時、donor と recipient 間で出産率は 23%、30% と差を認めなかったと報告されている⁹⁾このことから、卵が加齢により何らかの影響を受けていると考えられる。つまり、妊孕能低下の原因として、卵巣での卵および卵胞発育の質的・閉鎖卵胞の増加による量的低下、染色体異常¹⁰⁾¹¹⁾や子宮の胚維持能力の低下が挙げられる¹²⁾。

加齢による妊孕能低下に対し、治療を計画する際に最も重要であるのは、その診断である。前述の如く、原因として卵および卵胞発育の質的・量的低下、つまり、卵巣機能不全が主である。しかし、現在の生殖補助医療は、卵巣機能不全が明らかとなった時には、ほとんど無効であり。したがって、卵巣予備能力が存在するうちに正確かつ早期に診断し、生殖補助医療を施行することが重要である。ただし卵巣機能不全の予測は、必ずしも容易なことではない。換言すれば、妊孕能の消失の診断も容易ではないため、生殖補助医療による治療を安易にあきらめる必要もない。

卵巣予備能力の評価として、従来からの、年齢、基礎体温クロミフェンや GnRH 投与後の血清 FSH 値などがある¹³⁾。また、上肢間の体インピーダンス値を用いた評価法も最近報告されている¹⁴⁾。

加齢による妊孕能低下に対する治療として、米国では、卵子提供が行われている⁹⁾。また、胚の異数体を分析する目的で PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) も行われている¹⁵⁾。わが国では、上記方法は認められておらず、今後の社会的同意、基礎的研究による安全性の確認が応用への鍵となっている。

卵細胞の質的異常の改善を期待して、核移植、細胞質移植という方法も検討されている^{16) 17) 18)}。これは、卵細胞の良好な発生には、核-細胞質の相互作用が

強く関与していることに基づく方法である。細胞質には、ミトコンドリアをはじめとする、細胞小器官が存在する。これらの、卵発生・成熟における機能は未だ解明されてはいないが、核と協調し、重要な役割を担っているものと考えられる。ミトコンドリアは、唯一の核外 DNA を有しており (mtDNA)、その制御は一部、核 DNA とは独立している¹⁹⁾。mtDNA が加齢とともに、ダメージを受け、その結果 MPF など、卵発生に必要な細胞質成熟を促進する物質が影響を受け、卵の質的低下が起こるものとされている²⁰⁾。このため、高齢者の卵の細胞質を若年者のそれと置換することで卵の質を向上させるという技術である。しかし、置換あるいは移植された第三者の mtDNA の存在、胚発生における動態、遺伝子発現については、今後も引き続き検討の余地があり、わが国では臨床応用に至っていない²¹⁾。

③ 卵子若返り法の問題点

第1の問題点である3親性遺伝子の混在の可能性に関して、初期の CT に関する研究²²⁾ではドナー mtDNA は子孫に伝播されないであろうと予測されたが、最近の研究^{21) 23)}ではあきらかにドナー mtDNA は子供に伝播されていることが証明されている。これにより mtDNA は自然界の受精では例外を除き絶対的に母系遺伝であるが、CT によってこの自然界の法則は崩される可能性がある。

すなわち CT による3親性の遺伝子の混在である;両親の核 DNA と母親由来の mtDNA およびドナー由来 mtDNA の伝播(heteroplasmy)が生じる可能性がある。

第2は未だミトコンドリア-ミトコンドリア間およびミトコンドリア-核間の相互関係の詳細が不明な点である。ドナー細胞質の CT は epigenetically に前核あるいは分割球の核に悪影響を及ぼす可能性が動物実験により証明されている。すなわち、DDK マウスの卵細胞質あるいは卵子 RNA を non-DDK マウスの卵子に注入すると、その卵子は受精後 DDK 系マウスの形質を示すようになり、胚発育は停止して致死的になることが報告されている²⁴⁾。また、卵細胞質因子と受精後発現する細胞質因子は協調的に置換遺伝子機能に影響を与える²⁵⁾。また DBA/2 マウスの karyoplast を C57BL/6 系マウスの接合子期受精卵に移植すると細胞質は系特異的に雄性前核を修飾することが報告されている²⁶⁾。これらの epigenetic な DNA におよぼす影響はヒト卵子の CT では未だ明らかにされていない。

第3は加齢卵子のうち受精、発生に関与する機能低下卵を生きた状態でどのように選別、証明出来るかである。

第4にドナー卵子となり得る健常卵子のスクリーニングの問題であろう。

④各国における卵子若返り法の現状

CT に含まれるミトコンドリアは自己増殖する母親由来の細胞内小器官であり、すべてのエネルギーを必要とする細胞活動に対して、酸化的磷酸化径路により ATP を供給している。胚の発育能力の減少は正常な染色体分裂を行うのに十分な ATP の産生能力が無くなることに関連することが示唆されている。そこで、正常なドナー卵由来の卵細胞質を移植することにより、卵細胞質に欠陥のある卵の正常発生能の回復が期待されている。今の所、CT により生まれた子供に異常があることは報告されていないが、機能的に未知で相同ではない mtDNA を移植することによる heteroplasmy に対する人類の将来に対する危惧が考えられる。そこで法律を以て CT あるいは NT による卵子若返り法を禁止している国はオーストラリア、オーストリア、中国、フランス、オランダ、ノルウェイ、スイス、イギリスであり、香港、アイルランドでは NT は不可であるが、CT は許可されている。ガイドラインによって規制されている国には日本およびイスラエルがある。法律もガイドラインも無い国ではフィンランドでは行われていないようであり、カナダは国レベルでの報告がない。また、イタリアでは基礎研究は行われているが、臨床応用はされていないようである²⁷⁾。米国では FDA が臨床応用に関する危惧を指摘し、動物実験の結果が集積されるまではモラトリアム勧告が出されている。

⑤ミトコンドリア遺伝病へのアプローチ

mtDNA は細胞内で唯一の核外 DNA である。しかし、この核外遺伝子はヒストンを欠き、O₂ radical に曝されるため mtDNA は変異しやすく、点突然変異や欠失、置換などの異常によるミトコンドリア遺伝病の原因として注目されつつある。ミトコンドリア病をはじめて報告したのは Luft R.(1962)²⁸⁾である。彼は患者の筋肉からミトコンドリアを分離し、そのミトコンドリアの性質を詳しく調べた。その結果、ミトコンドリアの電気エネルギーが効率良く ATP に変換されず、熱に変化してしまうので、筋力が低下したり、神経症状が表れたりすることを発見した。ミトコンドリアのエネルギー需要は脳神経と骨格筋で特に高い事が知られているが、このためミトコンドリアの異常はそれらの部位に症状が表れ易いためミトコンドリア脳筋症と呼ばれる。その後、1988 年に最初の mtDNA の変異が発見されて以来、100 以上の点変異、200 以上の欠失、挿入、置換が今までに報告されている。点変異の 60%はミトコンドリア tRNAs の異常、35%は呼吸鎖のポリペプチド subunit の障害、そして 5%はミトコンドリアの rRNA を障害すると言われている²⁹⁾。ミトコンドリアの tRNA の異常は MELAS, MERRF, Leigh 症候群、CPEO, 聾、糖尿病、鉄赤芽球性貧血、ミオクローヌス、骨格筋症、心筋症、尿細管アチドーシスなどを含む

臨床的に酸化的磷酸化異常の多彩な症状を引き起こす。これらのミトコンドリア病に対する臨床的治療法は現在のところミトコンドリアのエネルギー合成反応を補助するためのビタミン類やチトクロム製剤あるいは抗痙攣剤などの対症療法であって、有効な治療手段は見つかっていない。ミトコンドリア病が核 DNA の変異と比べて格段に検査や治療が困難な点は、核内遺伝子では性染色体を除けば変異遺伝子は1個(変異 50%)か2個(変異 100%)のどちらかである、しかしミトコンドリアの場合、臓器により異なるが1個の体細胞内に 100-200 個あり、そのミトコンドリア内にも 1-数個 mtDNA が存在する。このため変異 mtDNA と正常 mtDNA が混在しており、その比率や症状発現は臓器や患者それぞれに異なっていることである。

このような現状を打開する手段として細胞 hybridization 法による cybrid を応用する biological な手段と mtDNA を直接遺伝子銃(gene gun)を用いてミトコンドリアに打ち込む理学的な方法³⁰⁾が研究されている。前者は正常な mtDNA を有する細胞を脱核し cytoplasm を作製し、これを ethidium bromide により患者 mtDNA のみを選択的に除去した細胞(p⁰)に電気癒合法あるいは vectors を用いて癒合させた hybrid 細胞(cybrid)を作製する方法であり、後者は tRNA 分子や mtDNA を直接ミトコンドリア内に選択的に打ち込

むことで得られた遺伝子改変細胞を培養増殖させて、患者組織に注入する遺伝子治療が試みられているが、まだ研究段階であり以下の問題点を解決しなければならない³¹⁾。

- ① 細胞活動に応じて導入 mtDNA の機能発現が可能であること。
- ② 導入 mtDNA が細胞分裂周期において安定して伝播されること。
- ③ 組織における非分裂細胞 (ex, myoblast) に応用が可能かどうか。
- ④ 用いる vector などの発癌因子またはビールス感染などのリスク。

ミトコンドリア遺伝病は臓器特異的に程度の差はあるが、全身の細胞内ミトコンドリアが野生型と変異型の混在する状態になっているのに対して、これらの cybrid や gene gun 法では限局した臓器、組織への移植治療手段としてしか期待される効果は考えられない。このため全身的な遺伝子治療手段を考えることが必要である。これに対する効果的治療手段として考えられているのは、ミトコンドリア遺伝子は例外を除きそのほとんどが母系遺伝であるので、患者あるいは保因者である女性の卵子のミトコンドリアを CT により健常者のミトコンドリアで置換することで改善しようとする試みは、科学的根拠に基づいた期待される研究対象となってきた。最近、マウス卵子のミトコンドリア顕微注入実験により mt 遺伝子転換マウスが作製され、全身 mt 遺伝子治療の可

能性が示唆されている、すなわち、ミトコンドリア ATP 合成酵素の遺伝子を受精卵に注入し、受容雌に移植したところ、その新生仔のすべての器官から注入 DNA 分画が発現していることが認められた³²⁾。また MELAS ミトコンドリアをマウス接合子期胚に顕微注入した結果、胚はこの MELAS-mtDNA を排除することなく発育することが認められた³³⁾。これらの実験から自然受精の際には精子 mtDNA は胚発生初期に排除されるが、顕微注入された外因性 mtDNA は排除されないことが明らかになった³⁴⁾。Inoki et al も5-6週齢 C3H/HeJ マウスを過排卵処理して交配させて得た受精卵に蛍光色素マーカー(PKH26)をラベルしたマウス肝ミトコンドリアをピエゾで顕微注入し蛍光を共焦点顕微鏡で観察したところ、精子由来ミトコンドリアは受精後直ぐに排除されたが、導入ミトコンドリアは1細胞期には核周囲に認められ、2細胞期には細胞質内に分散していることが認められた。また全てのミトコンドリアを Rhodamine123 で染色したところ、導入、内在ミトコンドリアの両者とも 4-,8-細胞期まで共存していることを確認した。また、ミトコンドリア代用粒子を含んだ liposome を顕微注入すると4細胞期までは内因性ミトコンドリアと同位置に局在していることを認めた³⁵⁾。これは liposome と内因性ミトコンドリアを結合させるなんらかの因子が存在することを意味する。したがって、これらの基

礎実験結果から卵への mtDNA, mtDNA 分画あるいは tRNA 顕微注入法はミトコンドリア遺伝子治療の可能性を示唆するものである。

⑥細胞質置換と核置換の比較

重症男性不妊症カップルにとって ICSI は非常に有効な治療成績が得られるようになり、不妊治療における、残された大きな問題は、高齢女性の妊娠率の向上と言える。高齢女性の問題点として、卵の質的、量的低下、胚を支持する子宮内環境の問題が挙げられる¹²⁾。加齢と共に卵の質が低下することは、細胞質の低下と大きく関係している。

そこで、細胞質置換、核置換という技術が開発、研究され、高齢女性の卵の質的向上のレスキューとして、期待されている¹⁶⁾。細胞質置換は、若年者の卵より除核後、高齢者の核(Karyoplast)を卵腔に注入、電気融合用いて再構築する方法¹⁶⁾と、いわゆる、細胞質移植と呼ばれる、高齢婦人の卵に若年者の Cytoplasm を一部注入させる方法がある。後者では、すでに、2001年に30例の分娩例が報告されている¹⁷⁾。

一方、核移植では、マウスによる基礎的研究が、Cornell の Dr.Palermo のグループにより、1999年に報告されてから、ヒトにおいても研究が開始されている。特に、従来、若年者の成熟卵の細胞質を用いていたが、第1減数分裂前の未熟卵を

用いることで、正常な減数分裂が期待されるという観点から現在行われている。高齢者の未成熟卵より、卵核胞(Germinal Vesicle)を除核し、若年者の細胞質に移植する方法である³⁶⁾。細胞質移植、核移植の胚発生について厳密な比較検討を行った報告は無いので、各々の結果を比較する。

両者の適応を考えると、以下の事が考えられる。細胞質置換(細胞質注入)は IVF 反復不成功に有効と考えられる。また、核置換は、いわゆる高齢者の妊娠率向上に貢献すると考えられる。

細胞質置換:未熟卵を体外培養後、M-II 卵とし実験に供した結果。第1極体の有無での融合率の成績は、極体有りで、43.8%,なしでは、64.3%であった。移植する Karyoplast の大きさの違いによる融合率は、大で 66.7%,小で 33.3%であった。再構築卵における、受精率、分割率、杯盤胞発生率は、電気融合まで30分の場合、80.0%, 70.0%, 20.0%であった。また、細胞質置換後の ICSI 後の受精率、分割率および胚盤胞発生率は、[80.0%, 70.0%, 20.0%]、体外培養後の M-II 卵の ICSI 後では、それぞれ[59.0%, 26.1%, 3.4%]であった。

核移植:現在、加齢に対して、染色体異常を防ぐ目的で、高齢者の GV 期卵から、GV を除核し卵細胞質に移植し再構築卵を体外成熟する試みがなされている。現在のところデータは公開されていない

が、若年者の細胞質は正常な減数分裂を誘導する。また高齢者の細胞質は染色体異常を惹起させるという結果が得られているようである。

II semi-cloning 法による人工卵子技術
さまざまな病的状態による卵巣機能低下あるいは卵巣そのものが欠如している女性にとっては遺伝的に繋がった卵子、受精卵を望む事は出来ない。そこで近年のクローン技術を応用して、除核ドナー卵子に本人の体細胞から取った核を人工的に1倍体化(haploidized)してNTすることで、本人の遺伝子を持った新しい卵子を作製しようという試みがなされている。この技術がクローン個体と異なる点はクローン胚はそれ自体で発生し、受容雌生殖道内移植によりクローン個体となるが、この人工卵子は夫の精子によって受精しなければ胚として発生しないということである^{37) 38)}。

人工卵子の技術的問題点

この手法による胚は一方の親の配偶子ゲノムともう一方の親の体細胞ゲノムから得られた遺伝子の混合によって形成されるので、以下に述べるごとく、通常のクローン個体と同様な問題が危惧される。

- ① 体細胞核の染色体分離の信頼性
- ② 遺伝子再配列
- ③ テロメアの長さ
- ④ Genomic imprinting の状態
- ⑤ 中心体と紡錘体機能

人工卵子の倫理的問題点

やみくもなクローン技術応用の危険性

III Oocyte donation

加齢によって女性の妊孕性は低下する。この原因として加齢により卵子の質が低下するの、あるいは子宮内膜の着床能の機能低下なのかあるいはその両者なのか検討する必要がある。加齢による妊娠率への影響を40歳以上(44.3±3.1, range 40 - 52)の不妊患者で同時期にARTを自己卵子使用群と35歳以下のドナー卵子使用群に分けて検討すると着床率(14.7 vs 3.3%)、妊娠率(56 vs 5.3%)あるいは生児獲得率(30 vs 3.3%)のすべてにおいてドナー卵子使用群の方が優れていた。また、egg share programにおける、若年の不妊患者の卵子を分与された高齢不妊患者の妊娠率および生児獲得率はそれぞれ 33 vs 23%, 40 vs 30%であり、有意差を認めなかった³⁹⁾。若年女性のドナー卵子を用いたARTによって得られた受精卵を高年齢婦人の子宮内に移植することによって妊娠を維持することが出来る。これらのことから加齢による妊孕性の低下は卵子の質の低下によるものであり、ドナー卵子を用いることでこれを補填することが可能である。したがって、加齢による性腺の機能低下に対する最終的選択はOocyte donationであろう。

文献

- 1) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijin MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F et al (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-465
- 2) Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barriere P, and Malthiery Y.(2001) Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol.Human Reprod.*,7, 425-429
- 3) St John JC, and Barratt CLR. (1997) Use of anucleate donor oocyte cytoplasm in recipient egg. *Lancet*, 350, 961-962
- 4) 省児童家庭局母子保健課 (2000) 母の年齢別,出生割合. 母子保健の主なる統計—平成 11 年度刊行—母子保健事業団, 東京, p48
- 5) Menken J, Trussell J, Larsen U: Age and infertility. *Science* 233: 1389-1394, 1986
- 6) Oehninger S, Veeck L, Lanzendorf S, et al. (1995) Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. *Fertil Steril* 64: 977-981
- 7) Romeu A, Muasher S, Acosta A, et, al. (1987) Results of in vitro fertilization attempts in women 40 years of age and older: the Norfolk experience. *Fertil Steril* 47: 130-136
- 8) Masaki K, Ito K, Shibui Y, Shiokawa M, Ubagai E, Katagiri Y, Sasabe Y, Abe Y and Kubo H: The Effect of Age on Pregnancy Rates in Assisted Reproductive Technology. *Jpn J Fertil Steril* 47: 33-37 2002
- 9) Navot D, Bergh PA, Williams MA, et, al: Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 337: 1375-1377, 1991
- 10) Munne S, Alikani M, Tomkin G, et, al. (1995) Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64: 382-391
- 11) Benadiva CA, Kligman I, Munne S (1996) Aneuploidy 16 in human embryos increase significantly with maternal age. *Fertil Steril* 66: 248-255
- 12) Meldrum DR (1993) Female reproductive aging ovarian and uterine factors. *Fertil Steril* 59:

- 1-5
- 13) Scott RT Jr, Hofmann GE,:
Prognostic assessment of ovarian reserve, *Fertil Steril* 63: 1-11
 - 14) Jinno M, Hoshiai T, Nakamura Y, et al: A novel method for assessing assisted female fertility: bioelectric impedance. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 471-474, 2000
 - 15) Gianaroli L, Magli MC, Munne S, et al. (1997) Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod* 12: 1762-1767
 - 16) Takeuchi T, Ergun B, Huang TH, Rosenwaks Z and Palermo GD: A reliable technique of nuclear transplantation for immature mammalian oocytes. *Hum Reprod.* 14: 1312-1317, 1999
 - 17) Cohen J, Scott R, Schimmel T, et, al. (1997) Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasmic into recipient eggs. *Lancet* 350: 186-187
 - 18) Cohen J, Scott R, Alikani M, et, al. (1998) Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 4: 269-280
 - 19) Wolstenholme DR. *International Review of Cytology* Vol. 141, Mitochondrial Genomes, 173-216, Academic, San Diego, 1992
 - 20) Karnikova L, Urban F, Moor R and Fulka J. Jr. Mouse oocyte maturation: the effect of modified nucleocytoplasmic ratio. *Reprod. Nutr. Dev* 38: 665-670, 1998
 - 21) Barritt JA, Brenner CA, Malter HE and Cohen J. Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum Reprod.* 16(3): 513-516, 2001
 - 22) Brenner C. (1997) Use of anucleate donor oocyte cytoplasm in recipient egg. *Lancet* 350, 962
 - 23) Brenner CA, Barritt JA, Willadsen S, Cohen J (2000) Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation. *Fertil Steril.*, 74, 573-578
 - 24) Renard JP, Baldacci P, Richoux-Duranthon V, Pournin S, Babinet C, (1994) A maternal factor affecting mouse blastocyst formation. *Development*, 120, 797-802
 - 25) Pickard B, Dean W, Engemann S, Bergmann K, Fuermann M, Jung M, Reis A, Allen N, Reik W, Walter J, (2001) Epigenetic targeting in the mouse zygote marks DNA for later methylation: a mechanism for maternal effects in development.