

201018018A

厚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

生殖補助医療により生まれた児の長期予後の検証と  
生殖補助医療技術の標準化に関する研究

平成 22 年度研究報告書

平成 23 年 3 月

主任研究者 吉村 泰典

# 目 次

I	総括研究報告書	
	生殖補助医療により生まれた児の長期予後の検証と 生殖補助医療技術の標準化に関する研究	2
	吉村 泰典	
II	分担研究報告書	
	1. 妊娠・出生後の予後調査のための ART データベース構築とその精度向上	13
	苛原 稔	
	2. 予後調査データベースの構築	24
	梅澤 明弘	
	3. 生殖補助医療施設と分娩施設との連携	26
	竹下 俊行	
	4. ① 新鮮胚移植周期と凍結融解胚移植周期の出生児に与える影響の検討 ② 特定不妊治療助成制度の在り方についての検討	93
	齊藤 英和	
	5. ART の遺伝的安全性の検証:高齡出産は母性ダイソミー発症の交絡因子である Prader-Willi 症候群における分子遺伝学的解析	101
	緒方 勤	
	6. ART の品質管理・生殖医療の新たな枠組み構築	105
	久慈 直昭	
	7. ART 技術の標準化—単一精子核 DNA 断片化の高感度測定	113
	兼子 智	
	8. ART の品質管理と次世代への影響の検証に関する研究	116
	有馬 隆博	
	9. ART 出生児のコホート抽出・発育・発達調査体制の構築	126
	田中 温 宇津宮 隆史 吉村 泰典 久慈 直昭	
	10. 着床前遺伝子診断の安全性と出生児の予後調査	144
	末岡 浩	



平成 22 年度 厚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）

生殖補助医療により生まれた児の長期予後の検証と  
生殖補助医療技術の標準化に関する研究（H22—次世代—一般—004）

総括研究報告書

主任研究者 吉村泰典（慶應義塾大学教授）

（研究要旨）

本研究では第一に、生殖補助医療（以下 ART）由来児の精神的・身体的発達を含む長期予後調査、第二に ART の品質管理と次世代への影響の検証、第三に生殖医療の新たな枠組み構築という、三つの課題を実現することを目的としている。

本年度、ART 由来児の精神的・身体的発達を含む長期予後調査に関しては、第一に、ART 由来の正期産児の出生体重を我が国全出生児の平均体重と比較し、凍結融解胚移植では出生体重が有意に大きく、一方新鮮胚移植では有意に小さかったことが明らかになった。また、ART 治療は、初期 5 回目までの妊娠率が高いが、6 回目以降の治療による妊娠率は低値であった。第二に、日産婦 ART データベースの解析から、我が国の登録例のうち 13.7% を占める 43 歳以上の群の出産は 1.2% に過ぎず、効率的ではない対象が多数含まれていることが明らかとなった。一方単胚移植率が高く、ART 多胎率が 10% 未満となり、多胎予防対策が効果を上げている。また、日産婦 ART 登録症例のうち、継続妊娠の 29% で周産期的転帰の詳細が不明であった。第三に、現在わが国で不妊治療をうけている夫婦は長期予後調査に対して、①ART により生まれた児の長期予後調査は必要であり、しかるべき方法で実施して欲しい、②ART からの妊娠を識別する方法として、医療機関同士が密に連絡を取るべきであり、母子健康手帳は利用して欲しくない、③調査の中心となるべき組織は日本生殖医学会である、と考えていることがあきらかになった。第四に、ボランティアベースで ART 児の周産期予後・長期予後調査を継続的に可能とする体制を構築するため、今年度は先行調査として、実際に現在 1-2 歳の子供を持つ ART 妊娠例 3346 症例、ART 以外の不妊症妊娠症例 1066 症例、および自然妊娠例 1810 症例に対し、不妊形質や児の予後に影響を与えうると考えられる交絡因子に関する質問票、母子手帳に記載された身体発育・精神運動発達に関する質問事項、KIDS 乳幼児発達スケールの 3 種からなるアンケート調査を送付し、来年度解析を予定している。さらに今後より効率的な調査の枠組みを構築するため、ART や不妊治療による妊娠時に予後調査を妊婦へ呼びかける説明書・同意書の文面を考案し、現在慶應義塾大学医学部の倫理委員会に申請準備中である。

ART の品質管理と次世代への影響の検証に関しては、第一に高齢出産が母性ダイソミー発症の交絡因子であることを Prader-Willi 症候群（PWS）における分子遺伝学的解析から

明らかにした。第二に先天性ゲノムインプリンティング病に関する発症頻度調査を行い、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)、Silver-Russell 症候群 (SRS) は最近 5～10 年間に急増しており、BWS、Angelman 症候群 (AS)、PWS、SRS の 4 疾患とも ART からの発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクである可能性がある。

生殖医療の新たな枠組み構築について、本年度は広汎性子宮頸部摘出術後の ART による妊娠の周産期予後について解析を行い、本手術後の妊娠では予防的頸管縫縮術を行った症例であっても妊娠 28 週未満の早産分娩が起こる危険性が高く、不妊治療を要した症例で高くなる傾向が示唆された。

## 1. ART 由来出生児（以下 ART 児）の長期予後調査

### 1) 新鮮胚移植周期と凍結融解胚移植周期の出生児に与える影響の検討および特定不妊治療助成制度の在り方についての検討（齊藤）

生殖医療技術が出生児の平均体重にどのように影響するかを 2007、2008 年度の ART 登録より正期産(妊娠 37 週から 41 週)の出生児体重を抽出し、日本の全正期産出生児と比較する事で検討した。凍結融解胚移植による正期産児 14,555 人の平均体重 3100.6g は新鮮胚移植による正期産児 12,627 人の平均体重 3009.5g と比較し有意に大きかった ( $p < 0.00001$ )。日本全体の正期産児 1842598 人、平均体重 3059.6g との比較でも凍結融解胚移植で有意に大きく ( $p < 0.00001$ )、一方新鮮胚移植では有意に小さい結果であった ( $p < 0.00001$ )。これらは分娩週数毎の比較でも全ての週で同様の結果であり、正期産で 2500g 未満の出生児の割合も凍結融解胚移植で 5.00%、日本全体で 5.55%、新鮮胚移植で 7.62%と有意に凍結融解胚移植周期で少なかった。また移植胚の発育段階による比較では新鮮胚凍結胚ともに初期胚よりも胚盤胞で有意に大きく(新鮮胚  $p < 0.00196$ 、凍結胚  $p < 0.00001$ )、同じ発育段階でも凍結融解胚での出生児が有意に大きかった(初期胚  $p < 0.00001$ 、凍結胚  $p < 0.00001$ )。このことから培養・凍結融解技術に関わる因子は、児の出生体重に何らかの影響を与える可能性があると考えられた。

また、特定不妊治療助成制度を利用した症例の妊娠率・生産率を生殖補助医療の治療を受けた全症例の妊娠率・生産率と比較検討した。また、不妊治療施設 7 施設の治療回数別の妊娠率を検討することにより、特定不妊治療助成のあり方について検討した。特定不妊治療助成制度利用率は 28 歳までは 50%を超えており、35 歳では 39%、40 歳では 29%、45 歳では 17%であった。さらに高齢では約 10%の利用率であり、年齢を増すごとに低下した。また、妊娠率・生産率においては日本の総治療症例と特定不妊治療助成を受けた症例の間には、有意な差はないことが判明した。このことより特定不妊治療助成制度の利用制限を考える因子として年齢は一つの因子と考えられた。7 治療施設の治療回数別妊娠率の平均は、初回が 14.7%とやや低いものの、2 回から 5 回目の治療は約 20%前後であった。また、5 回目以降では 10%をやや上回る値であった。治療回数別妊娠率は、各施設の治療方針により多少異なるものの、7 施設の平均では、初期 5 回目での妊娠率は高くその後の治療による妊娠率は低値となっており、初期の治療効率が大きく、助成の効率を考える上で年間の助成回数は重要な因子となりうることが判明した。

### 2) 妊娠・出生後の予後調査のための ART データベース構築とその精度向上（苛原）

日産婦 ART データベース登録件数は 1985 年以降、年々増加し 2008 年データによると

190,613 件が登録され、21704 人の ART 児が誕生しており、世界有数の規模に達している。全出生に対する ART 児の割合は約 2%まで増加しており、欧州諸国と同等の普及率を示している。ART 実施施設数はここ 10 年ほど大きな変化がなく、一定のレベルまで普及したことが推測される。一方で保険の適応や公的補助の対象となることで実施数今後も変動すると推測され、ART 治療助成制度がさらに整備されると北欧諸国と同等の 3〜4%まで増加する可能性がある。我が国では高齢 ART 実施件数が多く、43 歳以上が 13.7%を占めるが、出産は 1.2%にしか過ぎず、必ずしも効率的ではない対象が多数含まれていることが特徴である。凍結融解胚移植が増加し、移植周期の 47.8%、分娩周期の 57.2%を凍結融解胚移植が占めることも我が国の特徴であり、凍結技術の普及により、単胚移植率が高く、ART 多胎率が 10%未満となり、多胎予防対策が効果を上げている。一方、我が国における ART では高齢者が多く、また、低刺激採卵周期が多く、結果として平均採卵数が少ないため、実施登録数は多いが胚移植キャンセル率が極めて高い等効率的な治療が行われなくなりつつあることが危惧される。

日産婦 ART データの精度には改善の余地がある。継続妊娠の 20%が妊娠転帰不明であり、生産に至ったものの分娩の転帰不明な症例を含め全継続妊娠の 29%で周産期的転帰の詳細が不明である。胚移植後の妊娠判定以後の登録がされていない施設もあるため、これらの問題点を改善する目的で監査、指導が今後必要と考えられた。しかし、ART 治療施設と妊娠・分娩施設が異なる場合や、都道府県を超えて患者が移動する場合などに備えた環境整備も今後検討が必要となると考えられた。また、増加している凍結融解周期では、従来の情報に加えて、胚凍結にいたる治療時の情報（年齢、排卵誘発法、凍結時期と凍結方法）、また、融解胚移植時の情報（移植周期の治療方法、融解後の培養期間など）の登録が必要と考えられた。「特定不妊治療助成制度は全登録の 34.3%で利用されており、年収による制限、回数制限などから若年ほど申請率が高く、高齢者は低いことが明らかとなった。

### 3) 生殖補助医療施設と分娩施設との連携（竹下）

生殖補助医療（以下 ART）により生まれた児の予後を検証するには、ART データベースと周産期データベースの連結作業が不可欠である。長期予後となると、乳児検診データと連結させる必要が生ずるが、現在わが国のデータベースではこれらを連結することは困難である。ART 長期予後調査で最も問題となるのが、ART 施設と妊婦健診・分娩施設が異なるということである。さらに、出生後はその管理は主に小児科医の手に委ねられ、これらが連結統合されるようなシステムを構築しなければならない。

ART により生まれた児に関する統計は、日本産科婦人科学会・登録調査小委員会報告によって出生数等、きわめて基礎的な情報が把握されているに過ぎなかったが、平成 19 年度より症例ごとの個別登録を推進しており、この作業をすすめることにより妊娠分娩転帰

の一段階進んだ実態が明らかになりつつある。また、従来から日本産科婦人科学会の周産期委員会は、全国の定点施設による周産期登録事業を展開している。しかし、この周産期登録施設での登録数は、2008年度では70,082件で、わが国の全分娩数1,092,000の6.4%に過ぎない。残りの多くの診療所や助産施設等における多彩な分娩状況を網羅するための方策は再検討の必要があり、さらにART児に関する個別登録データとの照合は今後の課題である。

昨年われわれは、実際にARTを受けているクライアントを対象として、長期予後調査の必要性・方法などに関するアンケートを実施した。この調査は不妊治療施設10施設を抽出して行ったパイロット的なものであった。今年度はその配布対象を全国に広げ、総計358施設、5405部の送付を行い、現在わが国で不妊治療をうけているクライアントの長期予後調査に対する考え方を探索した。

ARTクライアントの多くが望んでいることを今回の調査結果から抽出すると、以下のようになる。①ARTにより生まれた児の長期予後調査は必要であり、しかるべき方法で実施して欲しい。②ARTからの妊娠を識別する方法として、医療機関同士が密に連絡を取るべきである。母子健康手帳は利用して欲しくない。③調査の中心となるべき組織は日本生殖医学会である。

妊婦健診・分娩施設と乳児検診施設の情報は母子健康手帳により得ることができる。これにART施設の情報が加わればART長期予後調査の基本情報は得られるかも知れない。したがって現行のシステムを利用するならば、母子健康手帳の活用は考慮されてよい方法である。しかし、ARTを受ける多くのクライアントは、ART児の長期予後調査の重要性を認めているものの、ARTによる出生を明らかにしたくないという潜在的な感情をもつ女性も少なくなく、母子手帳にARTからの妊娠であることを記載することに対する抵抗はかなり強いことが明かとなった。今後、関係学会、行政と協調した対策が必要であると考えられた。

#### 4) ART出生児のコホート抽出・発育・発達調査体制の構築(田中・宇都宮・吉村・久慈)

本研究では、前述の日産婦登録データベースを基礎とし、個人情報保護に細心の注意を払い、ボランティアベースでART児の周産期予後・長期予後調査を継続的に可能とする体制を構築することを目的としている。

そこで、今年度はまず先行調査として、現在1-2歳の子供を持つART妊娠例、ART以外の不妊症妊娠症例、および自然妊娠例に対し、不妊形質や児の予後に影響を与えうると考えられる交絡因子に関する質問票、母子手帳に記載された身体発育・精神運動発達に関する質問事項、KIDS乳幼児発達スケールの3種からなるアンケート調査を送付した。実際に調査への参加を呼びかけた症例は、JISART加盟施設にて2008年1月から12月の間に妊娠した1)ART妊娠例3346症例、2)ART以外の不妊症妊娠症例1066症例、および3)一般

産科医療機関で2008年10月から2009年10月までに分娩した自然妊娠例1810症例である。これらの症例はすでに発送を終えており、各医療機関に返送され次第、その施設で行った全てのART症例の匿名化した日産婦登録データを付して、アンケート調査票との対応がわかるようにして集計機関（慶應義塾大学医学部産婦人科）に厚保名、集計と解析を行い、さらに今回調査協力への同意が得られた群については、次年度以降一年に一回の連絡を行うとともに、3-4歳、及び6-7歳で今回と同様の発育・発達調査を行う予定である。

一方、1)の先行調査では、先天異常や染色体異常など分娩時の児の状態がよくない場合、両親に調査への参加を促すことが非常に困難となる。しかしその反面、このような症例のなかにも調査への参加を希望する症例が含まれていることも考えられる。このように、予後不良例への医療機関からの呼びかけ困難による標本抽出時のバイアスをさけ、またこのような症例への調査参加の呼びかけそのものを円滑に行うことから、予後調査への同意取得は妊娠時に行うことが望ましい。そこで、ARTや不妊治療による妊娠時に妊婦へ呼びかける説明書・同意書の文面を考案し、現在慶應義塾大学医学部の倫理委員会に申請準備中である。倫理委員会承認後、JISART施設での妊娠例を中心に、速やかに妊娠時同意取得、分娩後に調査票を送付する形でアンケート調査体制を構築する予定である。

#### 5) 予後調査データベースの構築（梅澤）

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、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。

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。用いたデータベースプラットフォームはリレーショナル型データベースのMS-Access2003を用いた。スタンドアローン型コンピュータを用意した上で架空のデータを用意し、その運用方法について、パラメータの有効性、操作性を検討した。

今回のデータベース作製において、必要なフォームは3つである。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、②母親識別IDでリレーションされた子どものマスタフォーム、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である。これらのフォームのうち①は独立して存在しており、②、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。



今回はスタンドアロンコンピュータを用いた擬似データベースを作製したが、この運用方法についての議論が必要不可欠な課題となる。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。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。

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、入力パラメータの抽出とブラッシュアップ、実際に運用を行う者の教育訓練を徹底する必要がある。これらの人件費にかかる費用についてはもともと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。ハードウェアに関しては日進月歩で技術革新がめざましい。最近話題になっているクラウドコンピューティングシステムも導入に値するシステムの一つになりつつある。これらのハードウェアの進歩を柔軟に取り入れ長期フォローアップのコスト面でのフィードバックを常に行い、効率的な運用体制の構築が重要である。

## 2. ART の品質管理と次世代への影響の検証

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

近年、生殖補助医療（ART）における遺伝的安全性が重要な課題として挙げられている。そして、種々のインプリンティング疾患の発症頻度が、生殖補助医療出生児において、一般集団よりも高いというデータが集積されつつあるが、これらのデータは、単純にその発症頻度を比較したのみであり、生殖補助医療に関連する交絡因子（両親因子や環境因子）を考慮したデータは、われわれが知る限り存在しない。

今年度、われわれは、代表的インプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群（PWS）患者 154 例を対象として、生殖補助医療における交絡因子の検討を行った。PWS は、染色体 15q11-13 のインプリンティング領域の異常により発症し、現在、患者の約 70%が父由来インプリンティング領域の欠失（Deletion）を、約 25%が 15 番染色体母性片親性ダイソミー（upd(15)mat）を、約 5%がこの領域のインプリント調節機構などの異常を有することが知られている。そして、upd(15)mat は、trisomy rescue (TR)、monosomy rescue (MR)、gamete complementation (GC)、post-zygotic mitotic error (PE) に分類され、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]）に起因するものに細分される。

154 例中 138 例の患者が正常核型と SNRPN-DMR の過剰メチル化を有していた。これら 138 例の患者に対し、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 法を行った。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。

その結果、PWS 患者の母親出産年齢は、TR/GC[M1] 群で、Deletion 群に比し、有意に上昇していることが判明した ( $P = 1.0 \times 10^{-7}$ )。また、母親の年齢が上昇するにつれ、Deletion 群の頻度が減少し、TR/GC[M1] 群の頻度が上昇していた。さらに、本邦において、高齢出産傾向がより顕著となった 2003 年前後において発症原因の相対的頻度を比較したところ、TR/GC[M1] 群の相対的頻度は、2003 年以降において有意に増加していた ( $P = 0.00052$ )。

この結果は、高齢出産が第一減数分裂時の不分離を伴い易いことと一致するデータである。そして、母性ダイソミータイプのインプリンティング疾患発症における交絡因子を明確にすると共に、生殖補助医療を受ける母親が通常高齢であることから、今後の生殖補助医療におけるインプリンティング疾患発症の評価において有用であると考えられる。現在、138 例中 7 例が ICSI/IVF で出生したことが判明していることから、これら 7 名における PWS 発症において、高齢出産以外の生殖補助医療関連因子が関与するか否かを検討中である。

## 2) ART の品質管理と次世代への影響の検証に関する研究 (有馬)

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

全国調査対象施設総数 3158 施設 (産婦人科/小児科/重症心身障害者施設) のうち、1602 施設から有効回答があり、報告患者総数は 1818 人であった (BWS 216 人、AS 415 人、PWS 992 人、SRS 161 人、TNDM 34 人)。各疾患の年齢別推移では、AS 以外の 4 疾患で、近年増加傾向にあることが示唆された。特に BWS、SRS は最近 5~10 年間に急増している傾向がみられた。また、不妊治療を受けたかどうかに関しては、受けたかどうか分からない患者が多い

ことが特徴で、十分な情報が得られていない。しかし、何らかの不妊治療を受けた事が判明している親は0~9.5%で、一般に不妊治療を受けている割合が10%前後なので、多いとはいえない。一方、実際に PWS、BWS、AS、SRS の患者のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5% が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精 (IVF) あるいは顕微授精 (ICSI) によるもので、平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児が 0.86%である事を考慮すると、4 疾患とも発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクである事が判明した。頬粘膜細胞 DNA の提供は、現在まで 75 名しか回収できていない。そのうち異常を認めた症例は、BWS が 1 人、AS が 5 人、PWS が 8 人、SRS が 4 人で、ART 治療を受けた症例は、SRS の 2 例のみであった (いずれも ICSI)。症例数が圧倒的に少ないため、ART がメチル化異常に関与するかどうか結論を出す事は出来なかった。

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

### 3) ART 技術の標準化—単一精子核 DNA 断片化の高感度測定 (兼子)

本研究はヒト不妊治療を目的とした ART 技術標準化の一端として、ヒト配偶子 (精子、卵)、胚の機能異常観察法を確立し、これらを指標として機能的に優れた配偶子、胚の選別法を開発する。本年度はヒト精子 DNA 損傷、特に DNA 鎖の断片化観察法を開発を行った。個々の精子における DNA 断片化を高精度に観察することを目的とし、固相上に固定した精子を融解した後に電気泳動を行い、分離された DNA 断片を直接顕微鏡観察する方法を開発することを目的とした。スライドガラス上に固定した精子を溶融アガロースで被覆、固化した。さらにトリプシン、DTT、ヘキサ 6 リン酸、ポリリン酸、トライトン X100 を含む溶液に浸漬して細胞を融解した。予備的検討の結果、検出される DNA 断片の鎖長が広範囲に分布するため、単一の泳動条件では断片の網羅的解析が困難であることが確認された。そこで断片の鎖長別に 2 種の泳動法および非印加ゲル内拡散法を開発した。すなわち、1 セットの電極を有する単軸型電気泳動法、交差する 2 セットの電極を有する single cell pulse field gel electrophoresis (SCPFGE) を開発した。SCPFGE は X 型に配置した電極を 3 秒間隔で交互に通電し、従来の電気泳動法では伸長不可能な長鎖 DNA を展開するものである。

融解処理された精子はゲル内であたかもウニの刺状に周囲に DNA fiber が付きだした状態を示すものと、電圧を印加 (電気泳動) しないにも関わらず周囲に DNA 断片が拡散した像を示すものに大別された。電気泳動することなく周囲に拡散した DNA 断片は、アガロースの網目構造を自由に通り抜けて拡散可能なレベルの短鎖 DNA であり、高倍率で検鏡しても粒子としては観察できなかった。これらを SCPFGE で電気泳動すると、前者は原点から DNA fiber が伸張する像を示したが、後者では種々の長さの DNA 断片が泳動される像を示した。

SCPFGE により引き出された DNA fiber の先端を高倍率で顕微鏡観察すると、伸張した DNA fiber の先端より先に切断された長鎖 DNA 断片が観察されるものが存在した。長鎖 DNA 断片に関しては、電気泳動法による DNA 断片の分離（引抜き）は断片数の観察が可能であり、理論上は 1 本の DNA 断片が観察可能である。

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

これまでは、個々の精子内に存在する DNA 断片の網羅的解析について述べた。一般的に DNA は染色体として細胞核内に存在することを前提に研究がなされてきたが、本研究において精漿内に細胞外 DNA が見出された。精液を超遠心分離して調製した精漿 20  $\mu$ l をアガロース well に添加して通常のサブマリン電気泳動を行うとゲル内に泳動像が観察され、これらは DNaseI 処理により消失した。DNA 断片の鎖長は 100 base pair 以下にまで達しており、その分布は広範囲であった。この知見は DNA 断片に関する臨床検査が精子のみならず精漿を含めた精液内 DNA 断片として総合的に解析するべきであることを示唆している。今後、精漿内の DNA 断片が変性の進行により最終的に融解した精子に由来するか否かを後証明しなくてはならない。

#### 4) 着床前遺伝子診断の安全性と出生児の予後調査（末岡）

生殖医療の新たな展開として重篤な遺伝病を対象に開始された着床前診断に関して、これまでに実施された施設による実態調査がなされていなかったため、日本産科婦人科学会のガイドラインに基づく実施施設に限らず、広く我が国で行われている着床前診断の実施状況について調査を開始した。相談事例の中で対象とされてこなかった事例についても明らかにすることを目標とした。日本産科婦人科学会に着床前診断に関する倫理審査依頼を行った医療機関および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医療施設に対してアンケートによる実態調査を行った。現状では 13 施設が対象であり、日本産科婦人科学会へ倫理審査の実績のある施設 11 施設 (A 群) および倫理審査は未申請であるが、実績があると考えられる 2 施設 (B 群) にアンケートを送付した。実際の診断内容は、均衡型染色体異常の保因者による習慣流産を対象に fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による診断は回答があった全施設に共通しており、遺伝子疾患に対する遺伝子診断は 2 施設にとどまっ

た。妊娠が成立した後に出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。遺伝情報の管理体制、妊娠事例のフォローアップについてはなお不十分である可能性が指摘された。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。新たな診断技術が必要であり、染色体、遺伝子情報を共に全ゲノム増幅に基づく着床前診断の技術導入に着手した。

### 3. 生殖医療の新たな枠組み構築（久慈）

広汎性子宮頸部摘出術は、子宮頸部早期浸潤癌を伴う若年女性の妊孕性温存手術として本邦で急速に普及しつつあるが、術後一部の患者は不妊治療を要し、また早産リスクが高くなると推測される。今回我々はRAT術後の妊娠分娩例8症例を経験したので、妊娠に至る治療と妊娠経過・分娩転帰を検討した。8症例のうち5症例にAIHやIVFの不妊治療を必要としたが、不妊治療を行った5妊娠中3妊娠で妊娠28週以前に前前期破水を来し、それぞれ28週未満での早産となった。自然妊娠群3例では34週以前の早産例はなかった。広汎性子宮頸部摘出術後妊娠では予防的頸管縫縮術を行った症例であっても妊娠28週未満の早産分娩が起こる危険性が高く、不妊治療を要した症例で高くなる傾向が示唆される。

また、卵子の妊孕性を確認するための方法として注目されている遺伝子発現解析について、マウスをモデルとしてその基礎的検討をおこない、増幅後のビオチン標識法の違いによって、解析結果が大きく違ってくることを確認した。



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  
「生殖補助医療により生まれた児の長期予後の検証と生殖補助医療技術の標準化に関する研究」

妊娠・出生後の予後調査のためのARTデータベース構築とその精度向上

分担研究者 苛原 稔 徳島大学産科婦人科 教授

研究協力者 桑原 章 徳島大学産科婦人科 講師

(研究要旨)

日産婦 ART データベース登録件数は 2008 年には 190,613 件が登録され、21704 人の ART 児が誕生した。全出生に対する ART 児の割合は約 2%であり、諸外国と同等であるが、ART に対する治療助成制度がさらに整備されると北欧諸国と同等の 3~4%まで増加する可能性がある。高齢 ART 実施件数が多く、43 歳以上が 13.7%を占めるが、出産は 1.2%にしか過ぎない。凍結融解胚移植が増加し、移植周期の 47.8%、分娩周期の 57.2%を凍結融解胚移植が占める。単胚移植率が高く、ART 多胎率が 10%未満となり、日本では多胎予防対策が効果を上げている。一方、我が国における ART は高齢者が多く、低刺激採卵周期が多いため平均採卵数が少ないため、実施登録数は多いが胚移植キャンセル率が極めて高い。

日産婦 ART データを予後調査に用いる場合、妊娠転帰が不明な例や、生産分娩週数が不明な例などを含め妊娠の 29%で周産期転帰の詳細が不明であることが問題であり、この問題点を改善する目的で監査などが今後必要と考えられた。ART 治療施設と分娩施設が異なる場合や、患者が遠隔地へ移動する場合に備えた環境整備も今後必要と考えられた。また、凍結融解周期では、従来の情報に加えて、胚凍結にいたる治療時の情報(年齢、排卵誘発法、凍結時期と凍結方法)、融解胚移植時の情報(移植周期の治療方法、融解後の培養期間など)の登録が必要と考えられた。「特定不妊治療助成制度」は全登録の 34.3%で利用されており、年収による制限、年間の回数制限などから若年ほど申請率が高く、高齢者は低いことが明らかとなった。

A. 研究目的

近年の我が国における生殖補助医療(ART)の普及はめざましく、日本産科婦人科学会の報告によると、2008年のART実施施設609件、実施周期数190,613件と年々増加している。過去30年間に実施されたARTは

実に144万件近く、生まれた子供の数も22万人程になる。ARTにより出生した児の長期予後は概ね問題が無いことが経験的に報告されている。しかし顕微授精、胚盤胞移植など過去10年から15年の間に相次いで臨床応用された技術の多くは未だ長期

的に検証されたことはなく、また ART による妊娠、出産の大半は ART が普及した最近 10 年間のことであるため、ART 長期予後は未だに課題である。

今回の研究は、我が国における全ての ART 実施施設を対象としてオンラインで記録を集めている日本産科婦人科学会 ART データベース（日産婦 ART データベース）を解析し、長期的予後追跡に必要なデータ集積環境整備を検討することを目的とする。また、ART 治療の実情を諸外国と比較し、さらに我が国独特の「特定不妊治療助成制度」の現状と有効性を検証して、効果的かつ安全な ART 治療を受けられる環境整備に貢献することを目的とする。

本年度は日産婦 ART データベースに集積された全国症例データを用いて、諸外国と比較しつつ我が国における ART の実情を概観する。さらに集められた症例データの精度を詳細に解析し、今後の長期予後追跡に必要な点を考察する。また、特定不妊治療助成制度の利用状況を解析し、今後の特定不妊治療助成制度の有効性検証に向けた検討を行うこととした。

## B. 研究方法

我が国における ART データとして日本産科婦人科学会が公表している年次報告に加えて、日産婦学会登

録・調査小委員会の協力のもと 2007 年、2008 年は全国の全 ART 実施施設から集められた症例個別のデータベースを対象に詳細な検討を行った。我が国の人口動態に関しては厚生労働省より公表されているデータを用いた。さらに諸外国のデータは米国、オーストラリア+ニュージーランド、英国および EU 諸国の報告を参照した。

## C. 研究結果と考察

### 【我が国の ART の特徴】

我が国における ART 実施数、出生児数などの年次推移を、年別の出生件数が明らかとなった 1989 年以降でまとめた（表 1、図 1）。増加していた登録施設数は 2003 年以降、横ばいであり、我が国においては ART 施設がある程度普及したこと推測される。（登録・調査小委員会による再登録を実施した 2005 年から 2006 年にかけて ART を実施していない施設が登録抹消され一時増少している）一方、実施登録件数は 1989 年から現在に至るまで増加し 2008 年には 19 万件を越えた。分娩数、出生児数も増加し、2008 年には 21704 人の ART 児が誕生した。この現状を諸外国と比較した（表 2、統計年度をあわせるために 2006 年データでの比較）。日本は世界最多の ART 実施国であり、出生数でも米国について多数の ART 児が生まれている。全出生に対する

ART 児の割合は我が国では約 2% と他の先進国と同等である。社会保障が進み自己負担の少ない北欧諸国やオランダ、ベルギーでは 3-4% を占めており、今後我が国でも ART に対する治療助成制度がさらに整備されると増加する余地があることが推測される。

最新の年齢別データ (2008 年) (図 2、図 3) を見ると妊娠数が最も多い 35 歳が実施件数でも最多である。一方で高齢であっても実施件数が多いことが明らかである。特に生産率が 1% あるいはそれ以下となる 43 歳以上の症例は全実施件数の 13.7% (26,188 件) を占めるが、出産は 251 件 (全出産の 1.2%) にしか過ぎない。卵提供を行う事が例外ではない諸外国に比べて高齢者が成功率の低い ART を続けざるを得ない実情を裏付けている。治療法の内訳を見ると、新鮮卵を用いた治療 (体外受精、顕微授精) および凍結融解胚を用いた治療が各々 1 : 1 : 1 を占めているが、凍結融解胚移植の占める割合、実数の増加が著しく、移植周期の 47.8%、分娩周期の 57.2% を凍結融解胚移植が占めている (図 4)。凍結融解胚移植周期の増加は凍結技術の向上がもたらしたものであるが、2008 年に日産婦学会が移植胚数を原則 1 個とするガイドラインを示したことも大きい影響を与えている。単胚移植の占める割合が高い国は北欧

諸国とオーストラリア、日本が上げられ、これらの国では多胎率が低い傾向にあるが、特にスウェーデン、オーストラリア、日本では ART 多胎率が 10% 未満となっており、多胎予防対策が効果を上げていることが見て取れる (図 5)。

一方、治療効率の観点から見ると我が国における ART は非効率的であることが懸念される。図 1 を見ると 2002 年以降、実施件数が一段と増加しているのに比べて、妊娠数、出産数がこれに平行して増加していないことが明らかである。また、表 2 を見てもわかるように日本は実施数が最多であるにも関わらず、出生児数は米国の約半数しかない。米国では移植胚数が多く、多胎妊娠の率、実数が多いことも理由として上げられるが、米国では成功率の低い高齢者に対しては卵子提供が行われることが多いのもその理由の一つである。一方、前述のように多胎率が我が国より低い豪州と比べても、その効率の低さは際だっており、特に我が国では実施登録数あたりの胚移植キャンセル率が極めて高いことが上げられる。これは高齢者が多いことや低刺激採卵周期が多いため平均採卵数が少ない事が理由として推測される。日本では全胚凍結周期が多いことがもう一つの理由として推測されるが、豪州に比較して日本における凍結融解胚移植あたり出産率が際だって高

くは無いことから、全胚凍結の影響は限定的と推測される。

#### 【ART データの問題点】

児の長期予後を検証するためにも ART 治療・妊娠経過・妊娠転帰がより正確に登録されていることが重要である。しかし、日産婦 ART データ 2008 年分を見る限り、現状では未だ問題点があることが指摘される。まず、妊娠が継続して分娩に至ったと考えられる症例 24, 115 例のうち、5, 274 例で妊娠転帰が不明となっている。これは継続妊娠の実に 20%で妊娠の転帰が不明であることを示す(図 7)。さらに、生産に至ったと登録されているものの中でも 1674 例で分娩週数、出生児体重などの短期的予後が不明のままであり、実に全継続妊娠 24, 115 例の 29% (6, 948 例) で周産期的転帰の詳細が不明となっている(図 8)。さらに施設によっては極端に胚移植後の妊娠の有無など詳細の登録がなされていない事も明らかとなった(図 9)。これは現在の登録が治療費助成制度を念頭に行われており、採卵-胚移植が行われていれば登録、申請が可能なこととも関連していると考えられた。

これらの問題点は今後も ART 治療施設において妊娠例の追跡、登録を厳密に行うよう監査、指導することで解消する部分も多いと考えられる。また、問題のある施設に注意を行う

だけでなく、データ追跡の点で問題のある施設を明示して報告する等の方法により、学会、行政が協調して改善を促すことも今後必要と考えられた。一方で ART 治療施設と妊娠・分娩施設が異なる、都道府県を超えて患者が移動するなどのため、ART 施設単独での努力では追跡不能に至る症例もあるため、今後はこのような症例に対する包括的システム構築も必要となる可能性が示唆される。

児の長期予後を検証する場合、近年増加している凍結融解周期に関しては、従来集めている情報だけでは不足がある。胚凍結にいたる治療時の情報としては母体の年齢、排卵誘発方法の詳細、凍結時期(前核期、分割胚期、胚盤胞期)と凍結方法(緩慢法、カラス化法)の情報を今後は追加して集積する必要がある。また、融解胚移植時の情報としても移植周期での治療方法と自然排卵の有無、融解後の追加培養期間などの情報が必要と考えられる。

#### 【助成制度との関連】

現在の日産婦 ART データベースでは「特定不妊治療助成制度」を利用した場合には患者が住所をおく自治体(多くの場合は都道府県のみ)に登録することが必須となっている。これは「特定不妊治療助成制度」を行っている 106 自治体(都道府県および中核市以上の市)に登録し、自

治体毎に情報をまとめて「特定不妊治療助成制度」の効果を把握する目的で設定されている。2008年データでは65,443件のART登録が「特定不妊治療助成制度」利用有りとして登録されている。これは全登録件数の34.3%にあたる。患者の年齢により登録症例数を検討すると、若年者ほど申請率が高く、高齢者は低いことが明らかである(表3)。これは年収による制限や、年間2回の回数制限がある中で通算治療回数が多く難治性の高齢症例が補助対象から外れ易いこともその理由と考えられる。実際に助成を受けたかどうかを検証する事はできないので、今後は行政データも利用してその実情を検証する必要があると考えられた。

#### E. 結論

我が国のARTは実施件数、出生児数ともに増加し、全出生の2%がARTとなった。諸外国と比較し登録件数で最多、出生児数も米国の次に多い。高齢者が多く、凍結融解胚移植が多く、単一胚移植が浸透して多胎が少ない事が特徴である。一方、高齢者が多く、低刺激周期が多いため、治療開始あたりの出産率が低い。全治療周期の34%が特定不妊治療費助成制度の対象であり、若年者では半数が補助を受ける一方、高齢では様々

な理由から15%程度に補助が行われている現状が明らかとなった。一方、長期予後を検討するためには現在のARTデータに加えて凍結融解胚移植においてさらに詳細なデータを集積する必要性が高いと考えられた。また、施設における症例の追跡、登録を今後もより徹底する必要がある一方、患者の移動や分娩施設がART施設と異なる実情を考慮した症例追跡方法の検討が必要であると考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

G. なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### (参考文献)

1. <http://www.jsog.or.jp/activity/report.htm>
2. <http://www.cdc.gov/art/ARTReports.htm>
3. <http://www.hfea.gov.uk/>
4. <http://www.aihw.gov.au/>
5. de Mouzon, J., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. Human Reproduction. 25: 1851-1862.



表1 ARTの年次推移

西暦	登録施設数	登録周期数	分娩数	出生児数	全国の出生数	ART児の割合
1989	125	4,407	350	449	1,246,802	0.04%
1990	156	7,565	784	1,048	1,221,585	0.09%
1991	189	11,546	1,349	1,700	1,223,245	0.14%
1992	237	18,920	2,070	2,626	1,208,989	0.22%
1993	270	23,753	2,934	3,554	1,188,282	0.30%
1994	303	31,970	3,577	4,576	1,238,328	0.37%
1995	348	38,150	4,604	5,687	1,187,064	0.48%
1996	388	43,676	5,689	7,410	1,206,555	0.61%
1997	394	54,076	7,305	9,224	1,191,665	0.77%
1998	442	61,718	9,020	11,119	1,203,147	0.92%
1999	471	69,009	9,613	11,929	1,177,669	1.01%
2000	511	69,699	10,005	12,274	1,190,547	1.03%
2001	552	76,079	10,942	13,158	1,170,662	1.12%
2002	578	85,664	12,654	15,228	1,153,855	1.32%
2003	590	101,905	14,697	17,400	1,123,610	1.55%
2004	627	116,604	15,426	18,168	1,110,721	1.64%
2005	641	125,470	16,275	19,112	1,062,530	1.80%
2006	575	140,489	17,171	19,587	1,092,674	1.79%
2007	606	161,164	17,620	19,595	1,089,818	1.80%
2008	609	190,613	20,422	21,704	1,091,156	1.99%

図1 年次推移

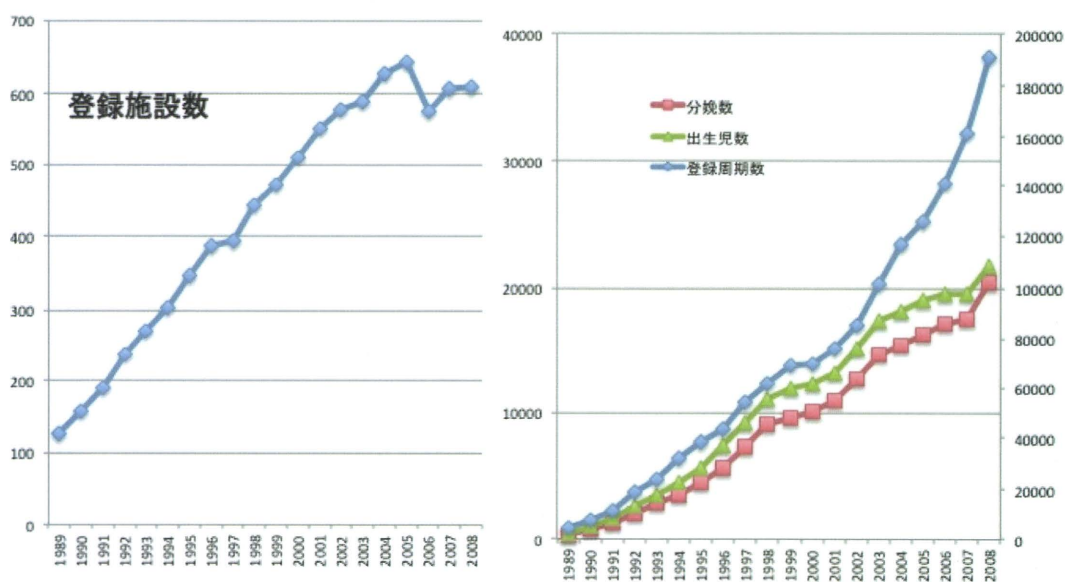


表2 ART 国別比較

国	施設数	登録周期数	施設あたり周期数	ART出生児数	全出生に対する割合
日本	572	139371	244	19587	1.8
米国	426	138198	324	54656	-
豪州*	32	50275	1571	10522	-
デンマーク	22	12618	574	2674	4.1
フィンランド	18	9116	506	1908	3.3
ノルウェー	11	7134	649	1660	2.8
スウェーデン	14	14931	1067	3417	3.3
オランダ	13	17770	1367	4448	2.4
ベルギー	18	22730	1263	4019	3.3
スイス	24	7109	296	1241	1.7
フランス	102	65749	645	13480	1.6
ドイツ	122	54695	448	10427	1.5
英国	70	43953	628	12698	1.7
イタリア	202	40748	202	5322	1

\*: 豪州にはニュージーランドを含む

(2006年データによる比較)

図2 2008年 年齢別治療総数

