

201117009A

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 23 年度研究報告書

平成 24 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. 生殖補助医療の正期産出生時体重へ与える影響	14
	齊藤 英和	
	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	20
	苛原 稔	
	3. ART 出生児のコホート抽出・発育・発達調査体制の構築	31
	田中 温	
	宇津宮 隆史	
	吉村 泰典	
	久慈 直昭	
	4. ART 出生児の発育・発達に関する研究	51
	山縣 然太郎	
	5. 乳幼児発達スケール(KIDS)の信頼性と妥当性に関する研究	54
	橋本 圭司	
	6. 産婦人科医と小児科医との連携	56
	竹下 俊行	
	7. 着床前遺伝子診断の安全性と出生児の予後調査	93
	末岡 浩	
	8. 予後調査データベースの構築	96
	梅澤 明弘	
	9. ART の遺伝的安全性の検証:高齡出産は母性ダイソミーのみならず 父性ダイソミー発症の交絡因子である:第 14 染色体父性ダイソミーにおける 分子遺伝学的解析	98
	緒方 勤	
	10. ART の品質管理と次世代への影響の検証に関する研究	105
	有馬 隆博	
	11. ART の品質管理・非配偶者間人工授精における告知と 出自を知る権利に関する研究	112
	久慈 直昭	

平成 23 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）

第一に ART 児の長期予後調査については、2007 年、2008 年のデータをもとに ART 由来児の出生体重を解析すると、新鮮胚移植由来児の平均出生体重は 3009.77g と日本全体の平均 3059.59g に比較して有意に少なく、一方凍結胚移植由来児では 3100.66g と有意に多い。卵巣刺激法別では自然周期と比較してクロミフェン周期、GnRH アゴニストおよびアンタゴニスト周期由来児では低出生体重児になるリスクは高いが、胚盤胞由来児ではリスクは減少した。次に 2008 年度の ART 治療に由来する児の調査では、ART 児 1879 例、非 ART 児（ART 以外の治療で妊娠に至った不妊症症例の子ども）629 例、一般産科例 671 例の出生体重の平均値は一般産科例・非 ART 児・新鮮胚由来児に比較して凍結胚由来児で有意に高かったが、同一症例の 1.6 歳時の BMI の平均値は各群間に差を認めなかった。さらに KIDS スケールによってみた 1.6 歳時の精神運動発達には、この 4 群間で差を認めなかった。長期予後調査に対する新生児医・小児科医の意識調査では、小児科医の多くが ART 由来児かどうかに関する情報の必要性を感じておらず、ART 由来児の識別法として考えられる母子手帳への記載は倫理的な問題があると感じていた。

第二にインプリンティング疾患を中心とする ART の次世代への影響については、まず高齢出産が父性ダイソミータイプのインプリンティング疾患発症のリスク因子であることが Upd(14)pat 症候群についての解析から示された。また昨年度の全国調査登録症例のインプリント領域異常についてのパターン分析の結果、ART により発症したインプリンティング異常症では受精以降のメチル化の維持に原因が多いと推測される結果が得られた。

第三に配偶子提供における告知と出自を知る権利については、非配偶者間人工授精治療を求めて受診した 112 例のカップルからの聞き取り調査の結果、告知を考慮している夫婦の割合は 10 年前より明らかに増加していることがあきらかである。さらに告知する親が多くなればさらに大きな問題となるこどもの出自を知る権利については、この権利を認めている海外の研究より、出自を知る権利に対する考え方が結婚を契機に変わる可能性があることや、子どもが知りたいと思う情報の範囲は提供者のみならず異母兄弟姉妹にも広がっていること、また実際に子どもに提供者・同胞の情報を伝える上で様々な問題点や留意点があることが明らかとなっている。

1. ART 由来出生児の長期予後調査

1) 生殖補助医療の正期産出生時体重へ与える影響

(齋藤英和)

生殖補助医療が出生体重にどのように影響しているのかを、新鮮胚移植周期、融解胚移植周期を分けてその詳細について検討した。2007年、2008年の日本産科婦人科学会生殖補助医療登録より、単胎妊娠し、正期産(妊娠37週以上、妊娠41週以下)で分娩に至った症例を抽出した。これらより、母体の治療年齢、卵巣刺激方法、治療方法(体外受精、顕微授精、体外受精+顕微授精)、採卵個数、胚移植の発育段階(分割期、胞胚)、移植周期の黄体期補充ホルモン療法、分娩週数、出生体重、性別がわかるものを対象とし、多重ロジスティック回帰分析を行い、低出生体重児となるリスク比を算出した。

1) 日本全体の正期産児の平均出生体重は3059.59g(1842598人)であり、新鮮胚移植周期では3009.77g(11374人)と有意に減少し、一方凍結融解胚移植周期では3100.66g(14403人)と有意に増加した。

2) 生殖補助医療全体での検討とし、調節因子を治療年齢、新鮮胚移植、凍結融解胚移植、培養期間、分娩週数、性別として解析を行った。凍結融解胚移植により低出生体重児となるリスクは0.71倍(95%CI 0.63-0.80)であり、胚盤胞までの長期培養は同様に0.83倍(95%CI 0.74-0.94)となり、いずれも有意に減少している。

3) 新鮮胚移植周期においては治療方法(体外受精、もしくは顕微授精)や採卵個数、黄体補充による影響は認められず、調節因子からは除外した。治療年齢、卵巣刺激方法、培養期間、分娩週数、性別を調節因子として解析を行った。卵巣刺激法は自然周期と比較しているが、クロミフェン使用周期では低出生体重児となるリスクは2.09倍(95%CI 1.34-3.33)と有意に上昇した。GnRH アゴニストおよびアンタゴニスト使用周期でも1.72倍(95%CI 1.17-2.62)、1.60倍(95%CI 1.05-2.50)と有意に上昇した。また長期培養により胚盤胞まで培養した場合、0.85倍(95%CI 0.71-1.00)と有意に減少している。

4) 凍結融解胚移植周期においては、治療年齢、培養期間、黄体補充療法、分娩週数、性別を調節因子として解析を行った。ここでは長期培養は低出生体重児となるリスクは0.87倍(95%CI 0.72-1.05)と低下する傾向にあったが有意差は無かった。一方黄体期にエストロゲンとプロゲステロンを併用した周期では、何も使用しなかった自然排卵周期の融解胚移植に比較し、0.77倍(95%CI 0.60-0.99)と有意に低下した。

長期培養や凍結融解技術は何らかの理由で出生体重を増加し、一方新鮮胚移植においては卵巣刺激が子宮内環境を悪化させ、低出生体重児となるリスクを増加することが明らかとなった。今後さらにこれら技術の安全性について十分な検証を行う必要がある。

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 稔)

日産婦 ART データベース登録件数は 2009 年現在、213,793 件となり、26,680 人の ART 児が誕生している。全出生に対する ART 児の割合は 2.50%と、他の先進諸国より多く、ART 実施率が高い北欧諸国 (3-4%) に急速に近づきつつある。これには ART に対する治療助成制度が整備され、給付条件が拡大していることや、低刺激や選択的単一胚移植の普及により、より多くの夫婦にとって ART が受け入れやすい環境が整いつつあることが影響している。特に選択的単一胚移植の導入後である 2009 年データを見ると ART 品胎はほぼ無くなり、双胎も全妊娠の 5%程度に減少しているため、より安全な生殖医療としての ART の重要性が増しているともいえる。

多胎妊娠を防ぐ目的で単一胚移植と凍結融解胚移植の必要性が増しているため、年々凍結胚移植の実施数、割合ともに増している。2008 年に初めて凍結融解周期での妊娠が新鮮胚移植での妊娠を上回り、さらに 2009 年は ART 児の 61.7%が凍結融解胚移植に由来する状況であり、凍結、融解の ART 技術が児の長期予後に与える影響を検証する必要性が増している。しかし現在の ART データベースでは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) や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) が欠落している。そのような状況を抜本的に解消するために、本年度は凍結融解胚移植周期において、移植胚が採卵、受精、凍結された周期の登録番号を入力するよう変更し、これを 2012 年データから運用することとした。実際にデータの解析が可能となるのは 2014 年まで待たねばならないが、その成果が期待される。また、単純な個票登録では無くなるため、データ解析にはリレーション機能を持った解析システムが今後必要となる。

昨年の検討により改善の必要があった妊娠転帰不明例に関し、データベース解析・エラーチェックシステムを開発、運用することにより 2009 年治療データで継続妊娠の 4.6%にまで減少させることが可能であった (前年は 20%)。生産に至ったものの分娩の詳細な転帰不明症例は依然として妊娠例の 6.2%を占めている。ART 実施施設にデータ入力の精度を高めるよう指導、およびデータチェックシステムの改善を計画する必要があるが、周産期および新生児期の治療を担当する施設との協力体制を整備する必要性も急務であり、今後の課題と考えられた。

「特定不妊治療助成制度」利用の有無に加えて実施 106 自治体 (都道府県および中核市以上の市) 毎の情報を得るため、2010 年から患者が住所をおく自治体名も入力するようデータベースを改善した。ART データベースに登録されている助成申請周期数は 2009 年で 78,742 件 (厚生労働省が把握している給付実績は 84,395 件) と毎年 1 万件程度増加しており、助成制度を利用した症例は全 ART 登録例の 39.4% (前年度は 34.3%) で実数、比率ともに増加傾向にある。尚、ART データベースからみた数字と実際の給付実績の数字には、実数にして 5,635 件 (6.7%) の差を認める。これは「年」と「年度」の差だけではなく、

ART 登録と実際の申請の時間差、その他の要因が考えられ、可能な限り少なくしていく方策を検討する必要があると思われた。

3) ART 出生児のコホート抽出・発育・発達調査体制の構築

(田中 温、宇津宮隆史、吉村泰典、久慈直昭)

生殖補助技術(以下 ART)によって生まれた子どもについて、排卵誘発あるいは体外受精・体外培養による ART 児への影響が全世界で懸念されており、ART 児に特定の先天異常が集積するという信頼あるデータも北欧を中心に複数出されている。本年度、本研究では前年度に発送したボランティアベースにもとづく ART 出生児の親へのアンケート調査を各機関から回収、集計して、試験的な解析を行った(別項参照)。

データ収集は、同意の有無によらず親より依頼書を発送した各医療機関宛に同意書(および同意のある場合は調査票及び KIDS スケール)を返送してもらい、各医療機関から同意のとれたクライアントからの調査票・KIDS スケールに加えて、当該期間に施設で生まれたすべての ART 出生児の日本産科婦人科学会登録データベースのデータを匿名化して添付、一旦 JISART の本研究とりまとめ機関であるセントルカ産婦人科を經由して、解析機関(慶應義塾大学および山梨大学)へ送付する形式で行った。

平成 23 年 3 月 11 日の東日本大震災の影響もあったが、平成 24 年 1 月末までに集計できている分についてみると、ART 由来児・ART 以外の不妊症例由来児・自然妊娠由来児各々 4766, 1792, 2125 例から、施設側の理由で発送しなかったもの、宛先不明で届かなかったもの、同意が得られなかったものを除き、ART 由来児 2483 例、不妊症例 656 例、自然妊娠例 652 例より同意を得ている。郵便が届いた例のうちで同意がとれた者の割合は、ART 由来 65%、不妊症例 50%、自然妊娠例 42%であり、長期にわたる調査であるにも関わらず ART 由来児の親からの返信率が最も高く、この研究への関心の高さが伺えた。

4) ART 出生児の発育・発達に関する研究

(山縣 然太郎)

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、ART 児と、それ以外の児における出生体重、1 歳 6 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比較し、ART による発育、発達の違いが存在するかどうか、そして、今後の検討において考慮すべき点を抽出し、検討することを目的とした。

全国の不妊治療を行っている 17 医療施設および、1 つの一般産科医療施設から収集した、3178 例 (ART 児 1879 例、非 ART 児 629 例、一般産科例 671 例) のデータを用いて、ART によって、出生体重、1.6 歳時の BMI (カウプ指数) などの発育状況、さらには KIDS スケールにより判定される発達状況に影響を与えているかどうかを検討した。

収集された 3178 例のうち、158 例については、新鮮胚、凍結胚、いずれを使用したか不明であったため、出生体重については 3020 例 (95.0%) について解析を行った。また、1.6 歳時の身体データが存在したのは 2583 例 (81.3%)、KIDS スケールスコアが存在したのは 2867 例 (89.9%) であった。

出生体重の平均値は、一般産科例 : 2947g、非 ART 児 (IVF 以外の不妊治療) : 2929g、新鮮胚による ART 児 : 2972g、凍結胚による ART 児 : 3011g ($p < 0.001$) で、凍結胚移植症例群で有意に高い結果であった。1.6 歳時の BMI の平均値は、一般産科例 : 16.1、非 ART 児 (IVF 以外の不妊治療) : 16.0、新鮮胚による ART 児 : 16.0、凍結胚による ART 児 : 16.3 で各群間に差を認めなかった。1.6 歳時の KIDS スケール総得点 (142 点満点) の平均値は、一般産科例 : 87.2、非 ART 児 (IVF 以外の不妊治療) : 86.6、新鮮胚による ART 児 : 86.0、凍結胚による ART 児 : 86.0 で各群間に差を認めなかった

結果として、不妊治療としての操作が増えるほど、出生体重が増える傾向を認めた。このことは、過去の研究結果と一致している。しかし、1 歳 6 ヶ月になると、体格については大きな差を認めず、これも、ART 児で体格の差を認めなかった過去の研究と一致している。また発達についても、KIDS スケール総得点では有意な差を認めず、IVF により児の発達に影響を及ぼさないとした過去の報告と一致している。

5) 乳幼児発達スケール(KIDS)の信頼性と妥当性に関する研究

(橋本圭司)

研究の目的は、ご家族がつけた乳幼児発達スケール (KIDS ; KINDER INFANT DEVELOPMENT SCALE) の信頼性と妥当性について検証することである。対象は、2011 年 1 1 月に、国立成育医療研究センターリハビリテーション科へ作業療法の依頼のあった入院患者 11 名 (男児 6 名、女児 5 名。年齢は中央値 2 歳 ; 0.92~3.92 歳、両大血管右室起始症 2 名、脳性まひ 1 名、脳外傷 1 名、染色体異常 1 名、ピエールロバン症候群 1 名、広汎性発達障害 1 名、精神発達遅滞 1 名、三角頭蓋 1 名、骨形成不全 1 名、ネフローゼ 1 名) である。対象者について、KIDS を患児の親 1 名と作業療法士 1 名の計 2 名の検者が評価し、作業療法士が遠城寺乳幼児発達検査 (ESID) と Functional Independence Measure for Children (WeeFIM) も併せて評価した。KIDS の 9 項目 (運動、捜査、理解、表出、概念、対子ども社会性、対成人社会性、しつけ、食事) について、家族が評価した family-rated KIDS と、作業療法士が評価した staff-rated KIDS は、ともに高い内的整合性を示し (Cronbach'

s $\alpha=0.981, 0.982$)、検者間信頼性分析でも、 $ICC=0.944-0.997$ と高い信頼性を示した。また、family-rated KIDS は遠城寺式発達検査による発達年齢や Functional Independence Measure for Children (WeeFIM)の運動スコア・認知スコアと高い相関(Spearman の順位相関係数 ; $r=0.659-0.841, p<0.05$)を示した。小児発達の評価バッテリーには、遠城寺式乳幼児分析的発達検査法、乳幼児精神発達診断法 (津守式)、新版 K 式発達検査、日本版デンバー式発達スクリーニング検査などがある。しかしながら、どれも専門家による評価を要し、大規模な調査には適さない。このため、いつでもどこでも、親が簡単につけることのできる評価スケールの使用が望まれる。本研究の結果より、入院中の患児のご家族がつけた K I D S は高い信頼性と妥当性があることが証明され、KIDS は、大規模な調査における乳幼児の発達評価フォローに適していると考えられた。次年度は、健常児における KIDS の妥当性を検証する予定である。

6) 産婦人科医と小児科医との連携

(竹下俊行)

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、さらに新生児・乳児検診データと連結させる必要が生ずる。

そこで今年度は、新生児科医、小児科医にアンケート調査を実施した。全国の小児科研修指導施設 (指導責任医) 505 施設、並びに日本小児科医会会員から無作為に抽出した 500 名にアンケート用紙を配布した。

回答者は医育機関以外の総合病院勤務者が半数を占め、小児科開業医 : 研修指導施設勤務者は 3 : 7 であり、回収率は 39% であった。

妊娠までの過程 (ART 児かどうか) についての情報が必要と回答したものは 41.6% で、否定派の 57.9% より少なく、多くの小児科医は妊娠までの成立過程に関する情報の必要性をあまり感じていないことが判明した。特に、診療所の医師はその必要性を感じていない傾向が見られた。ART 児かどうかの情報が必要なときは、精神発達に問題があるきや、身体発達に問題があるときと答えたものが多かった。選択枝に記載しなかったが、母親の育児不安が強いとき、養育に問題のある時と記載した例が少なからず認められた。昨今問題化している児童虐待に ART が関連していると考える小児科医も存在することを物語っている。ART 児の予後調査を行う場合、実現可能な方法として「1 歳半、3 歳児健診などで ART 児をピックアップする」との回答が 50% 弱あったが、自由意見には、ART を行った医師が責任を持って追跡調査をすべきとの意見が少なくなかった。

現在 ART 児であるかどうかの識別ができる資料として、母子手帳への記載義務を選択したものが 35% に認められたが、これを選択しなかったものは、79% が記載させることに倫理

的な問題があるからと感じていた。また、「ART児には特別な連絡票を持たせる」や「各段階の健診の間診で必須項目とする」ことにも倫理的な問題を感じる医師が多かった。

1歳半、3歳児健診などで、ART児をピックアップすることは「可能である33%」、「不可能である42.2%」「わからない23.8%」と、意見が分かれた。不可能、わからないと回答したものは、いずれもそのような行為自体に倫理的な問題を感じている。また、たとえピックアップ作業を行っても、ART児であることを隠したり、正直に答えないのではないかと懸念をしめした回答者も少なからず認められた。

総じて小児科医はART児であるかどうかに関心は低くないが、それを確認することに関しては否定的な意見が強く、健診などでピックアップすることの実現性は低いと考えられた。また、ART児の長期予後調査を責任を持って行うべきはARTを実施した医師が行うべきであるという考えが自由意見に多かったことを考慮すると、小児科医の協力を仰ぐには、まず長期予後調査の必要性の啓蒙、新たな調査法の探索、行政の介入などを考慮してゆく必要があると思われた。

7) 着床前遺伝子診断の安全性と出生児の予後調査

(末岡浩)

着床前遺伝子診断 (preimplantation genetic diagnosis: PGD) は、我が国での臨床実施が開始されて以来、実質的にはすでに5年が経過し、出生も累積されつつある。PGDは生殖医療の技術を用い、顕微授精、割球生検、遺伝子診断、長期培養、胚凍結などの先進的技術を必要とする。この技術面での知見や成果について具体的な集積データはこれまでにみられていない。

欧州生殖医学会(ESHRE)のPGD consortiumでの集計についても各施設ベースでの技術的背景などの詳細データは明らかにされておらず、その知見の共有化はなされていない。また、遺伝学的診断の精度のみならず、生検胚からの妊娠効率や出生までに生じる流産や出生後の成育についても今後の継続的な情報の集積が必要である。加えて単一細胞からの複雑な遺伝子診断の精度や対応に関しても、個々の疾患や事例によって異なることが多く、また、遺伝子病の特徴によって移植可能胚に対する議論がある。また、我が国では倫理面での議論から対象事例は限定的であり、今後の対象を検討するうえでも実態調査が必要である。

本研究の目的は、PGDを実施している主な施設を対象に、わが国におけるPGDの実施状況をより詳細に調査し、診断技術の標準化を図るとともに、今後PGDを発展的に実施していくために不可欠な出生児の長期予後についても調査することである。昨年度の実施施設に対するアンケート調査から、今後PGDの適応の解釈についての不整合や、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浮き彫りとなった。

また、遺伝学的情報の取り扱いと管理についてはなお不十分な体制の施設が殆どであった。

このアンケートの結果を踏まえ、今後わが国での実施状況を継続的に把握するための基盤となるわが国独自のデータ集積フォーマットを作製した。ESHRE PGD consortium の調査項目に加え、用いる技術、倫理審査やカウンセリングにおける実態調査、そして出生児の長期予後の調査項目を追加した。データは症例ごとに記入し、各施設で匿名化したうえで一括集計を行う方針である。現在までに作成したフォーマットファイルは慶應義塾大学および協力施設での試用入力により、適宜修正し、慶應義塾大学倫理委員会の認可を得たうえで実際に運用を開始する予定である。

PGD では有効性の評価とともに、診断のための生検などの操作が及ぼす胚への侵襲も懸念される。出生児の予後を長期に亘り調査することは必要不可欠と考えられる。本研究により、PGD 技術の改良の指標としても、出生児の予後調査を開始する基盤を形成することが求められる。

8) 予後調査データベースの構築

(梅澤 明弘)

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 (Access) を用いた。スタンドアロー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する。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。

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。今年度は具体的に、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、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ァイスを示す。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）などが上げられる。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。

2. ART の品質管理と次世代への影響の検証

1) 高齢出産は母性ダイソミーのみならず父性ダイソミー発症の交絡因子である：第 14 染色体父性ダイソミーにおける分子遺伝学的解析

（緒方勤）

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。

特に、高齢出産は重要な交絡因子である。これは、ART を受けるカップルが通常高齢であること、そして、減数第一分裂時における不分離を生じやすいことから、ダウン症候群などの trisomy 同様、卵の異数性を介するダイソミーの発症リスクになりうることに基づく。

これについて、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 138 例の解析から、減数第一分裂時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。すなわち、Prader-Willi 症候群は、父由来インプリンティング領域の欠失 (deletion type)、15 番染色体母性片親性ダイソミー (upd(15)mat、一对の染色体を共に母親から受け継ぐ状態)、インプリント調節領域のエピ変異や極微小欠失により発症し、さらに、upd(15)mat は、trisomy rescue (TR)、monosomy rescue (MR)、gamete complementation (GC)、

post-zygotic mitotic error (PE) により発症する。そして、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、減数第一分裂の不分離に由来する TR/GC[M1] が高齢出産により有意に増加することを世界に先駆けて明らかとした。

本年度は、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) において同様の解析を行った。Upd(14)pat 症候群は、特徴的顔貌、疾患特異的な胸郭形成不全、腹壁異常、用水過多、巨大胎盤を伴う疾患で、われわれは、upd(14)pat 症候群が、Prader-Willi 症候群同様、第 14 染色体長腕遠位部のインプリンティング領域の欠失 (deletion type)、upd(14)pat、インプリント調節領域のエピ変異や極微小欠失により発症することを世界で初めて明らかとしている。そして、upd(14)pat は、upd(15)mat 同様、TR、MR、GC、PE により発症し、このうち高齢出産は、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 MR と GC に影響すると考えられる。

Upd(14)pat 症候群患者 26 例の解析の結果、発症原因では、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。そして、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。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 において有意に高く ($P=0.034$)、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 ($P=0.045$)。

以上の成績は、高齢出産が、母性ダイソミータイプのみならず父性ダイソミータイプのインプリンティング疾患発症のリスク因子であることを示すものである。そして、生殖補助医療は通常高齢のカップルが対象となっているため、今後、生殖補助医療のリスク評価は、このような交絡因子を勘案してなされなければならない。

2) ART の品質管理と次世代への影響の検証に関する研究

(有馬隆博)

生殖医療の発展に伴い、我が国では年間 10 万人以上の夫婦が、体外授精などの生殖補助医療 (ART) を受けて、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な異常 (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あり、不安視されている。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。昨年度の全国調査で、先天性ゲノムインプリンティング異常症：Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）、新生児一過性糖尿病（TNDM）のうち、SRS と BWS は ART との関連が強いことを報告した。しかし、どのような不妊治療が影響を及ぼすのか、そのリスク要因について、全くわかっていない。今回の解析では、全てのヒトメチル化インプリント領域を同定し、ART により発症したインプリンティング異常症の患者について、全領域のメチル化インプリントの分子機構について解析し、異常のパターン分析を行った。その結果、ART 出生児では、（1）複数のインプリント領域の異常を示す（2）精子型と卵子型 DMR の両方に異常を示す（3）高メチル化と低メチル化のメチル化異常を示す（4）メチル化異常の程度は、モザイク型であるという特徴を示した。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果から、ART により発症したインプリンティング異常症（SRS と BWS）の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因が多いと推測される。つまり、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）で、異常が起こり、疾患発症を導いた可能性が推察された。しかし、ART により発症したインプリント異常症と自然に発症した場合と比較し、その臨床症状に決定的な差はみられなかった。ART と先天性ゲノムインプリンティング異常症との関連性については、早急に実態を把握し、適切な対応をとる必要性があり、次世代社会の最重要な課題であると改めて認識した。

3. 非配偶者間人工授精における告知と出自を知る権利に関する研究

(久慈直昭)

非配偶者間人工授精治療（以下 AID）に於いて、生まれた子どもに提供精子で出生した事実を伝えるべきか、子どもが自己の出自を知る権利を尊重すべきか、という問題が世界中で議論されている。そこで 1) 我が国で告知を考えている夫婦の割合はどの程度で、増加する傾向にあるのか、2) 出自を知る権利を認めている国でどのような経験がえられているのか、を調査した。

1) 我が国において AID を希望する夫婦における告知を考えている夫婦の割合

平成 22 年 8 月～平成 23 年 12 月までに慶應病院を初診で訪れた、まだ子どもを持ったことのない夫婦の告知に関する考え方をまとめた。ここでは、生物学的・遺伝的に男性・女性の夫婦のみを対象とし、告知がほぼ必然になってしまう性同一性障害者が夫である夫婦は対象から外している。

112 例の初診患者の中で告知を積極的に考えている夫婦は 17 例で全体の 15%、告知す

るかどうか悩んでいる夫婦も 32 例、28%に見られた。これに対して、はっきり告知しないつもり、と答えた夫婦も 58 例、52%で、ほぼ半数であった。また、告知という問題があることを考えてもいなかった、という夫婦はわずか 3 例、3%であった。告知を考えている夫婦の割合は 2000 年頃より明らかに増加しており、またほとんどの夫婦がこの治療を受ける前に告知の問題を夫婦で考え、この困難な問題に悩んでいる夫婦も多いと考えられる。

告知する、と答えた夫婦から得られたコメントとして「紹介元の医師から告知を勧められた」「紹介元で（告知を勧める）カウンセリングを受けた」など、不妊治療機関の中でも告知を積極的に勧める機関が出てきていることが伺える。他に「スマイルの会・勉強会に出て考えさせられた」もあり、この種の患者の自助団体、あるいは情報提供機関も大きな役割を果たしていると考えられた。

告知しない、と答えた群の夫婦からは、「紹介元の医師からは告知しない方がいいと言われた」「他院で AID をしてきたが何もいわれなかった」といった、不妊治療機関や AID 治療を行っている医療機関でも、告知を勧めるかどうかには様々な意見があることが明らかとなった以外に、「夫、妻が養子であり、告知されたとき悲しい気持ちになった」という、「知らされない権利」について考えさせられる意見も見られた。

2) 海外における AID の当事者たちの出自を知る権利に関する考え方についての調査

一方、海外における研究から、子どもの自己の出自を知る権利を認めた状況において、子どもに提供者・同胞の情報を伝える上での留意点もいくつか考慮すべきであると考えられる。

まず AID によって生まれた人の「出自を知りたい」というニーズは、親が積極的に告知をした場合であっても、親が告知をしなかったにも関わらず偶然子どもが知ってしまった場合であっても、存在する。

さらに、幼いころは自分の誕生の過程を肯定的に受け止めていたにもかかわらず、自分に子どもが誕生したのを境に、AID で生まれた人の考え方が変わる場合もある。AID によって親になることを希望する夫婦（特にヘテロカップル）や提供者になろうとする人には、実際に AID にかかわる前に、このような生まれた子どものニーズやその変化、将来直面するであろう課題等、きちんとした事前教育を受けさせこれを理解させる必要がある。

また子どもが知りたいと思う情報の範囲は提供者のことばかりでなく、異母兄弟姉妹にも広がる。これは血縁者を知りたいという他に、近親婚の回避という点からも重要である。

しかし、その一方で提供者を特定する情報を得て、提供者と生まれた子ども、またその家族、あるいは同じ提供者から生まれた子ども同士が互いに交流関係を築く場合、交流するためのルール（rules of engagement）を各々つくる必要がでてくる。このようなルールを作るためには、これまでの海外における出会いの事例の詳細な検討と、我が国の社会風土を土台とした慎重な配慮が必要であり、なによりその根本となる AID や卵子提供による親子関係に関する、法的整備がこれに先立って必須である。

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)

分担研究報告書

生殖補助医療の医療技術の標準化安全性の確保と生殖補助医療により産まれた
児の長期予後の検証に関する研究

—生殖補助医療の正期産出生時体重へ与える影響—

分担研究者 齊藤英和 国立成育医療研究センター不妊診療科 医長

研究協力者 中島章1)、中島恵1)、荒木隆一郎2)

1)国立成育医療研究センター・母性医療診療部・不妊診療科

2)埼玉医科大学 地域医学・医療センター

研究要旨

生殖補助医療で単胎妊娠し正期産で出生した児の出生体重を比較検討し、胎児発育に与える因子について解析した。各治療および日本全体の平均出生体重を算出し、多変量解析を行った。新鮮胚移植は融解胚移植より低出生体重となるリスクが1.4倍となり、新鮮胚移植周期では、自然周期で採卵するより、排卵誘発を行った場合に低出生体重のリスクは約2倍となり、胚盤胞までの培養期間延長は出生体重を約90g増加した。また融解胚移植では、自然排卵周期と比較し、エストロゲン、プロゲステロンで黄体補充した周期で出生体重は増加した。また若年妊娠および女児の出産でも低出生体重児となるリスクは上昇した。

A.研究目的

前年度は凍結融解胚移植および、胚盤胞までの長期培養が出生児の出生体重をより大きくする可能性がある事を報告した。さらに本年度は、生殖補助医療が出生体重にどのように影

響しているのかを、新鮮胚移植周期、融解胚移植周期を分けてその詳細について検討した。

B.研究方法

2007年、2008年の日本産科婦人科学会生殖補助医療登録より、単胎妊娠し、正期産(妊娠37週以上、妊娠41週以下)で分娩に至った症例を抽出した。これらより、母体の治療年齢、卵巣刺激方法、治療方法(体外受精、顕微授精、体外受精+顕微授精)、採卵個数、胚移植の発育段階(分割期、胞胚)、移植周期の黄体期補充ホルモン療法、分娩週数、出生体重、性別がわかるものを対象とした。

1) 厚生労働省より得られた同時期の日本全体の平均出生児体重を、妊娠週数を調整した上で新鮮胚移植周期、融解胚移植の平均体重と共分散分析で比較した。

2) 生殖補助医療による出生時を新鮮胚、凍結融解胚、培養期間、分娩週数、性別を調節因子として多重ロジスティック回帰分析を行い、低出生体重児となるリスク比を算出した。

3) 新鮮胚移植周期において、母体の治療年齢、卵巣刺激方法(自然周期、クロミフェン周期、クロミフェン+ゴナドトロピン周期、ゴナドトロピン単独周期、GnRHアゴニスト周期、GnRHアンタゴニスト周期)、採卵数、治療方法(体外受精、顕微授精、体外受精+顕微授精)、培養期間(分割期、胞胚期)、分娩週数、性別を調節因子とし、多重ロジスティック回帰分析を

行い、低出生体重児となるリスク比を算出した。

4) 融解胚移植周期において母体の治療年齢、培養期間(分割期、胞胚期)、黄体補充ホルモン療法(自然周期、プロゲステロン補充、絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)、プロゲステロン+hCG、エストロゲン+プロゲステロン、その他)、分娩週数、性別を調節因子とし、多重ロジスティック回帰分析を行い、低出生体重児となるリスク比を算出した。

C.結果

1) 日本全体の正期産児の平均出生体重は3059.59g(1842598人)であり、新鮮胚移植周期では3009.77g(11374人)と有意に減少し($p<0.0001$)、一方凍結融解胚移植周期では3100.66g(14403人)と有意に増加した($p<0.0001$) (表1)。

2) 生殖補助医療全体での検討とし、調節因子を治療年齢、新鮮胚移植、凍結融解胚移植、培養期間、分娩週数、性別として解析を行った(表2)。凍結融解胚移植により低出生体重児となるリスクは0.71倍(95%CI 0.63-0.80)であり、胚盤胞までの長期培養は同様に0.83倍(95%CI

0.74-0.94)となり、いずれも有意に減少している。(表2)

3) 新鮮胚移植周期においては治療方法(体外受精、もしくは顕微授精)や採卵個数、黄体補充による影響は認められず、調節因子からは除外した。治療年齢、卵巣刺激方法、培養期間、分娩週数、性別を調節因子とし解析を行った。卵巣刺激法は自然周期と比較しているが、クロミフェン使用周期では低出生体重児となるリスクは**2.09倍(95%CI 1.34-3.33)**と有意に上昇した。GnRHアゴニストおよびアンタゴニスト使用周期でも**1.72倍(95%CI 1.17-2.62)**、**1.60倍(95%CI 1.05-2.50)**と有意に上昇した。また長期培養により胚盤胞まで培養した場合、**0.85倍(95%CI 0.71-1.00)**と有意に減少している。(表2)

4) 凍結融解胚移植周期においては、治療年齢、培養期間、黄体補充療法、分娩週数、性別を調節因子として解析を行った。ここでは長期培養は低出生体重児となるリスクは**0.87倍(95%CI 0.72-1.05)**と低下する傾向にあったが有意差は無かった。一方黄体期にエストロゲンとプロゲステロンを併用した周期では、何も使用しなかった自然排卵周期の融解胚移植に比較し、**0.77**

倍(95%CI 0.60-0.99)と有意に低下した。(表2)

D. 考察

今回生殖補助医療が出生児の体重に与える影響についてその詳細な治療項目別に検討を行ってみた。出生児全体の評価により、凍結融解胚移植を行うことで、出生体重は日本全体の平均を有意に上回る結果となった。また、長期培養により同様に出生児体重は増加する事が前年度同様に明らかとなった。

新鮮胚移植周期に関しては卵巣刺激方法により出生児体重は変化する傾向にある。自然周期での採卵と比較し、卵巣刺激を行った周期で出生体重は減少する傾向にあり、特にクロミフェンを用いた採卵周期では低出生体重児のリスクが約**2倍**となる事が示された。同様にGnRHアゴニスト、GnRHアンタゴニストを用いた場合もそのリスクは上昇するが、これらにより子宮内膜および、子宮内環境は着床および、その後の胎盤、胎児発育にネガティブな影響を与えている可能性が示唆される。Gaudoinらは、人工授精でも卵巣刺激周期は自然排卵周期よりも低出生体重児のリスクが増加することを報告しており[1]、生殖補助医療においても卵巣刺激法が子宮内膜の

着床環境を変化させることはHaouzi
らも報告しているが、今回の報告では
さらに刺激方法別に詳細な解析を行
い、児の出生体重まで比較した[2]。

融解胚移植では自然周期に比較し、
ホルモン療法（エストロゲン、プロゲ
ステロン補充）を積極的に行うこと
により、出生体重を増加することが明
らかとなったが、これらにより子宮内
環境がより着床、胎盤胎児発育に有
利に働く可能性を示唆している。

これらの結果から、子宮内環境が胎
盤胎児発育に大きな影響を与えて
いる可能性が考えられるが、新鮮胚
移植で長期培養を行った場合に出生
体重が増加する要因として、長期培
養そのものが胚の発育に直接的な影
響を与えている可能性がある。融解
胚移植周期においても、有意差は無
かったが長期培養で出生体重は増
加する傾向にあった。同様に凍結、
融解操作そのものがその後の胎盤
胎児発育に直接影響を与える可能
性も否定できない。使用する培養
液や凍結融解液そのものによる過
剰発育の可能性以外にも、これら
生殖補助医療技術に用いる培養液
や胚・配偶子操作そのものがエピ
ジェネティックな変化を与えること
で体重増加を促している可能性が
ある。新生児の異常を明らかに増
加する程度では無いとしても、そ
の変化を幾分修飾している可能性
も報告されてお

り[3,4,5,6]、これらの安全性に
関しては今後も十分な検証の必要
がある。

E. 結論

本国の生殖補助医療による出生
児のデータ解析を行い、生殖補助
医療が出生体重に与える影響につ
いて検証した。長期培養や凍結融
解技術は何らかの理由で出生体重
を増加し、一方新鮮胚移植にお
いては卵巣刺激が子宮内環境を悪
化させ、低出生体重児となるリス
クを増加することが明らかとな
った。今後これら技術の安全性に
ついて十分な検証を行う必要性が
ある。

参考文献

- [1] Gaudoin M, Dobbie R, Finlayson A, Chalmers J, Cameron IT, Fleming R. Ovulation induction/intrauterine insemination in infertile couples is associated with low-birth-weight infants. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Mar;188(3):611-6.
- [2] Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects. *Biol Reprod.* 2010 Apr;82(4):679-86. Epub 2009 Dec 30.

H24年7月 ヨーロッパ生殖医学会
(ESHRE)学術集会／提出

[3] Wang Z, Xu L, He F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. Fertil Steril 2010;93:2729-33.

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

[4] Al-Khtib M, Perret A, Khoueiry R, et al. Vitrification at the germinal vesicle stage does not affect the methylation profile of H19 and KCNQ1OT1 imprinting centers in human oocytes subsequently matured in vitro. Fertil Steril 2011;95:1955-60.

[5] Nelissen EC, van Montfoort AP, Dumoulin JC, Evers JL. Epigenetics and the placenta. Hum Reprod Update 2011;17:397-417.

[6] Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. Lancet. 2003 Jun 7;361(9373):1975-7.

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

H24年4月 日本産科婦人科学会学術集会／発表予定

表1

	Fresh cycles		Frozen thawed cycles		All Japanese Infants	
	n	average BW	n	average BW	n	average BW
total	11374	3009.8±376.8	14403	3100.66±387.2	1842598	3059.59±369.64
age	34.53±3.75		34.63±3.87		-	-
<35	5532(48.6)	3013.6±378.3	6870(47.7)	3105.1±389.8	-	-
35=<	5842(51.4)	3006.2±375.3	7533(52.3)	3096.6±384.9	-	-
insemination						
IVF	5571(49.0)	3010.5±377.3	-	-	-	-
ICSI	4869(42.8)	3011.6±379.6	-	-	-	-
split	934(8.2)	2995.7±358.9	-	-	-	-
stimulation protocol						
natural	610(5.4)	3043.5±353.3	-	-	-	-
CC	981(8.6)	2986.4±382.3	-	-	-	-
CC+hMG/FSH	1237(10.9)	2998.7±386.1	-	-	-	-
hMG/FSH	322(2.8)	3001.9±372.6	-	-	-	-
GnRHagonist	6336(55.7)	3010.7±378.3	-	-	-	-
GnRHantagonist	1888(16.6)	3016.7±370.0	-	-	-	-
duration of embryo culture						
cleavage stage	7994(70.3)	3002.1±377.2	2946(20.5)	3069.6±384.7	-	-
blastocyst stage	3380(29.7)	3028.0±375.3	11457(79.5)	3108.6±387.5	-	-
luteal phase support						
non	-	-	875(6.1)	3064.3±393.1	-	-
hCG	-	-	4657(32.3)	3102.1±385.5	-	-
P+hCG	-	-	377(2.6)	3068.9±371.9	-	-
P	-	-	1210(8.4)	3061.1±391.2	-	-
E+P	-	-	6115(42.5)	3118.0±387.1	-	-
others	-	-	1169(8.1)	3083.0±385.9	-	-
male	5836(51.3)	3050.9±377.7	7566(52.5)	3151.9±385.0	-	-
female	5538(48.7)	2986.4±370.9	6837(47.5)	3044.0±381.8	-	-
Gestational week						
37	1578(13.9)	2752.6±347.8	2089(14.5)	2836.2±335.5	194065 (10.5)	2783.85±336.37
38	2586(22.7)	2895.9±341.0	2973(20.6)	2974.7±347.8	392715 (21.3)	2833.27±333.37
39	3013(26.5)	3028.8±340.1	3330(23.1)	3104.2±357.5	554280 (30.1)	3066.25±338.51
40	2965(26.1)	3138.9±354.3	3816(26.5)	3226.2±362.5	514284 (27.9)	3178.03±348.03
41	1232(10.8)	3220.9±359.7	2187(15.3)	3299.0±368.8	187254 (10.2)	3265.26±359.28

表2

	Total of ART		Fresh cycles		Frozen thawed cycles	
	cOR(95%CI)	aOR(95%CI)	cOR(95%CI)	aOR(95%CI)	cOR(95%CI)	OR(95%CI)
age	1.00(0.98-1.01)	0.97(0.95-0.98)	1.01(0.99-1.02)	0.98(0.96-1.00)	0.99(0.97-1.01)	0.86(0.84-0.88)
stimulation protocol						
natural	-	-	1.0	1.0	-	-
CC	-	-	1.19(0.94-1.49)	2.09(1.34-3.33)	-	-
CC+hMG/FSH	-	-	1.11(0.89-1.37)	1.88(1.22-2.98)	-	-
hMG/FSH	-	-	1.07(0.70-1.58)	1.65(0.93-2.92)	-	-
GnRHagonist	-	-	1.02(0.89-1.18)	1.72(1.17-2.62)	-	-
GnRHantagonist	-	-	0.93(0.77-1.13)	1.60(1.05-2.50)	-	-
fresh embryo transfer	1.0	1.0	-	-	-	-
frozen thawed embryo transfer	0.64(0.58-0.71)	0.71(0.63-0.80)	-	-	-	-
duration of embryo culture						
cleavage stage	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
blastocyst stage	0.70(0.63-0.77)	0.83(0.74-0.94)	0.56(0.72-0.99)	0.85(0.71-1.00)	0.81(0.68-0.97)	0.87(0.72-1.05)
luteal phase support						
non	-	-	-	-	1.0	1.0
hCG	-	-	-	-	0.97(0.82-1.13)	0.84(0.64-1.09)
P+hCG	-	-	-	-	1.06(0.76-1.43)	0.97(0.68-1.35)
P	-	-	-	-	1.42(1.11-1.78)	1.08(0.78-1.49)
E+P	-	-	-	-	0.81(0.70-0.95)	0.77(0.60-0.99)
others	-	-	-	-	1.11(0.76-1.57)	0.91(0.60-1.35)
infant's sex						
male	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
female	1.64(1.49-1.82)	1.82(1.64-2.04)	1.64(1.43-1.89)	1.86(1.61-2.16)	1.651.42-1.92)	1.78(1.52-2.08)