

1. ART 由来出生児（以下 ART 由来児）の長期予後調査 予後調査データベースの構築

研究分担者 梅澤 明弘 （独）国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部長

生殖補助医療に対する評価は、生まれてくる子供達のフォローアップが社会遺伝学や医療福祉の見地からも重要な意味を持つ。そこで本研究においては、本邦における生殖補助医療（ART）由来出生児の長期予後調査の基盤となるデータベース構築を目的とし、データベース基盤として Access 方式をとり、登録項目を想定しスタンドアロン型のデータベースを構築作製し ART によって出生した児に対する長期フォローアップを目的としたデータベースの構築に必要なパラメータ、データベース構造に対する検討を行った。更に、ウェブデータベース型も想定し、長期フォローアップのためのデータベース構築に向け多角的に検討を行った。データベース構築に関する具体的な検討として、日本産科婦人科学会 ART オンライン登録システム上の記入項目を参考に、運用パラメータの抽出を行った。実際に運用していく上で、データベース構築の現場にて実地調査を行い、小規模データベースを立ち上げた後に、その運用面における問題点の洗い出しを行った。H23 年度には、リレーショナル型データベースの MS-Access2003（Access）を用いた。スタンドアロン型コンピュータを用意し、予後調査（妊娠転帰・新生児・長期予後）のデータベース作成するにあたり管理に必要な人員、およびサーバ等のハードウェアの試験的運用へ向け問題点を抽出し、Access をすでに応用している成育母子コホートの現地調査を行い、コホート研究でのデータベース運用の現況を検証した。H24 年度には、Access とウェブデータベースとを比較し、コホート研究でのウェブデータベース運用の可能性について検証した。現在、長期予後調査の根幹となる唯一のデータベースは日産婦登録データベースのみであり、主に妊娠成立までを網羅したものである。親と子のそれぞれのリレーションキーを明確に設定することで、ひとりひとりの子どもに対するフォローアップが可能となるであろうと想定してきた。具体的に、仮想データベース構築のために、妊娠転帰、新生児、長期予後等の項目を年代毎に想定したデータベースと入力インターフェイスを設計し、さらに、長期フォローアップに適したデータベースシステムの選定と運用設計を行った。ウェブデータベースにおいても基本的に Access で想定した項目が当てはまり、データベース登録項目の選択を行い構築され更に、極めて明確な運用ポリシーを設定することがデータベースの安定的な運用に必須である。ウェブデータベースでは、インターネットに接続し、各ユーザーがデータを登録するものである。そのため、システム管理は重要である。データベースは、運用ポリシーの設定の下、ユーザー権限の設定や公開・非公開項目の設定、システム運用方針としてデータベース稼働時間等が指定されうる。データ登録の際のユーザーサポート体制、データベース管理としては、セキュリティレベルの設定、システムサポート体制やシステム管理者をどこにおくかなど、長期フォローアップに適したデータベースシステムを運用

する上で必須となる管理項目が存在する。リレーショナル型データベースの Access は母親データと子どものデータを関連づけしやすいが、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、同時アクセスに弱い、リカバリー機能がないなどの限界がある。ウェブデータベースは、それら Access の限界をカバーしている。更に、画面間のリンクが容易であり、データの複雑なソートや詳細条件の検索など様々な機能を付与できる点や画面デザインを自由自在に設計できる点などが利点である。既存の母子コホートではフォローアップ時の検診データ等は Excel 管理され、ID 管理がなされている。問題点は、Access データベースと統合できていないことにある。データ管理の人員が不可欠であった。今回提示した擬似データベースを用いて、データベースのトータルマネジメントシステムを構築していくためには、実際の医療現場の意見を取り入れた上でのブラッシュアップが必要不可欠である。ウェブデータベースは、多くの運用利点があるが、インターネットを介するためセキュリティ管理は十分な対策が必要である。システムの安全性や情報管理をどう行うか、データベース管理をどこに、どのように（ミラーリングなどのデータバックアップ体制等）行うか、データベースの物理的管理も重要な検討項目である。ART 予後調査データベースを構築し安定的に長期にわたり運用するためには、Access データベース及びウェブデータベースの双方において共通した課題が存在する。

データベースを構築する上で基本的に重要なことは、「何を解析するか」であり、それによりデータベース登録項目が抽出されてくる。更に、明確な運用ポリシーの設定により、具体的なシステム運用方針が決定される。データベースの管理、システムサポート体制やユーザーサポート体制にかかる人員、設備の効率的な運用が必要不可欠となる。

2. ARTの品質管理と次世代への影響の検証

ARTにおける遺伝的安全性の検証

研究分担者 緒方勤 浜松医科大学 小児科 教授

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。

これに関して、われわれは、本研究期間において、以下の成果を上げることができた。(1) Prader-Willi 症候群 (PWS) 患者 138 例の解析から、減数第一分裂時の不分離を介する trisomy rescue タイプの 15 番染色体母性片親性ダイソミー (upd(15)mat) が、高齢出産により優位に増加していることを見出した。(2) 第 14 染色体父性ダイソミー (upd(14)pat、一対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) の解析から、35 歳以上の高齢出産は、nullisomic oocyte を介する monosomy rescue タイプ (あるいは受精後有糸分裂時の不分離により発症するタイプ) の upd(14)pat に集中して認められた。(3) ART 出生児 13 例を含む PWS 患者 138 例における upd(15)mat の発症と ART 施行との関連解析から、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、PWS 患者群では、ART 出生児における減数第一分裂時の不分離による upd(15)mat の発症増加は、高齢出産でほぼ説明できること、PWS 患者群と一般集団の比較では、減数第一分裂時 (M1) と数第二分裂時 (M2) の不分離を助長しうる COS のような排卵誘発が upd(15)mat の発症増加に関与しうることを示唆された。

以上の成果は、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。さらに、ART 出生児の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、高齢出産のみならず ART に関わる COS などの技術的因子の両者が関与すると推測される。

2. ART の品質管理と次世代への影響の検証

広汎性子宮頸部摘出術後の ART 症例の周産期予後に関する検討および遺伝子発現解析から見た卵子妊孕性解析の基礎的検討

研究分担者 久慈直昭（慶應義塾大学医学部産婦人科）

広汎性子宮頸部摘出術（Radical Abdominal Trachelectomy、以下 RAT）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たし、それぞれ 28 週末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。RAT 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 週末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。

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、単一卵子より抽出した全遺伝子増幅後のビオチン標識法の違いによって、DNA マイクロアレイによる解析結果が大きく違ってくることを確認した。一方同じ試料を用いた次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析結果は、これまで我々が多数の個体由来の複数の卵子をマイクロアレイ解析した結果とほぼ一致し、また試料の標識の必要がないために DNA チップ解析のように標識法による差は見られない。さらに卵子からの RNA 抽出時のキャリア RNA の添加は次世代シーケンサーの解析結果に影響せず、Ribo-SPIA 増幅法で不可避免的に付与されるアダプター配列については、次世代シーケンサー解析で通常行われる DNA の断片化を行うことにより影響がほぼ無視できる範囲となることも明らかとなった。

2. ART の品質管理と次世代への影響の検証

研究分担者 東北大学大学院医学系研究科 教授 有馬 隆博

研究要旨

ART は不妊症に重要な治療法であるが、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。この可能性を評価するのは、不妊症患者が一般集団とは異なるため非常に難しい。ART 操作のリスク要因と不妊症患者背景の両面について解析する必要がある。そこで、本研究では、1) 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を行い、その実態を把握すること（ART 症例の頻度、ART 治療内容と臨床像等）2) インプリント異常症患者 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正確に評価すること 3) 不妊症男性に注目し、その精子のインプリント異常の頻度、程度、影響を受ける遺伝子について評価することを目的とした。その結果、1) 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）より、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。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。2) 22 領域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、DNA メチル化について解析し、異常のパターン分析を行った。ART 出生児の場合の特徴は、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、モザイク型であった。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た。3) 249 例の不妊症精子を用いて、ヒトインプリント領域のメチル化の解析を行った。その結果、全体で 29%に 1 領域以上にメチル化異常を認めた。また、この異常の頻度は、精子濃度、運動率、奇形率と相関を認めた。この事実はインプリント異常症の原因として、精子の影響が大きいことを示している。このインプリント異常は、先天性疾患だけでなく、周産期異常、乳幼児の身体的、精神的発育・発達にも関連するという報告は多数存在する。今後も ART 出生児が増加することが予想され、ART によるインプリント異常のリスク回避は、国民健康管理において重要な課題と考えられる。そのため、

今後も ART 出生時の大規模なフォローアップが重要である。

3. 第三者の関与する不妊治療を含む生殖医療の新たな枠組み構築

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・我が国における代理懐胎の現状調査

研究分担者 久慈直昭（慶應義塾大学医学部産婦人科）

本研究では、1) 我が国における出自を知る権利に対するクライアントの意識、2) (オーストラリア・ビクトリア州を例として) 出自を知る権利を認めた AID の枠組み調査、3) 匿名での提供で生まれた人々への対応としての海外に於けるドナーリンクシステムの現況調査、4) 我が国で事実上禁止されている代理懐胎治療の海外渡航の現況調査を行った。

1) 我が国で AID 治療を受けようと考えている夫婦の約 15% が積極的に告知を考えており、告知をしないと決めている夫婦は約 50% であった。

2) 海外の調査からは、AID で生まれた子どもの出自を知る権利に対する考え方が結婚や育児を契機に変化する可能性があること、知りたい情報は提供者ばかりでなく異母兄弟姉妹に広がること、そして実際に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をつくる必要があると考えられることが示された。出自を知る権利を保障して AID 治療を行っているオーストラリア・ビクトリア州では、提供前に入念なカウンセリングを提供者へ行うこと、提供者と生まれた人々の接触に際してきめ細かな配慮・カウンセリングが必要なことが示された。

3) 米国と英国のドナーリンクシステムの調査からは、このような組織を設立・運営するためには DNA 鑑定やカウンセリングにかかる経費を捻出するための、合理的な経営基盤が必要である事が明らかになり、とくに DNA 鑑定が困難な同胞の同定をするためには、AID 治療機関が持っているドナーコード情報が有用であることが明らかになった。さらに、我が国同様親子関係の法的裏付けのない米国の運営者は、親子関係を確定するための立法の必要性を訴えていた。

4) 米国への代理懐胎目的の渡航者が近年少ない理由は、妊娠した代理母に対する保険が米国居留者以外はきかない、ということから契約そのものが不安定となり、また経済的負担が過重になっているためと考えられた。現在我が国の代理懐胎を望む夫婦はインド・タイへの渡航者が多くなっているといわれるが、これは今まで比較的安心して治療を受けられていた米国での治療の道が閉ざされたためと考えられる。

2. ART の品質管理と次世代への影響の検証

ART 技術の標準化—単一精子核 DNA 断片化の高感度測定

研究分担者 兼子智 東京歯科大学市川総合病院産婦人科講師

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 鎖の断片化観察法の開発を行った。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 μ 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。

(報告書は 22 年度分の兼子智の項を参照してください)

2. ART の品質管理と次世代への影響の検証 ART の遺伝的安全性の検証

研究分担者 秦健一郎

研究要旨

近年、生殖補助医療技術、特に胚培養が、胚あるいは出生仔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、エピジェネティックな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症例報告がなされている。そこで、発生異常により淘汰されないと予想されるゲノム領域の DNA メチル化状態の「ゆらぎ」を、生殖補助医療により出生した児で解析する体制を構築し、試験的検証を行った。エピジェネティックな異常を検出・判定するためには、一般健常集団を含めた DNA メチル化状態の「ばらつき」に関する正確な知見と統計解析が必須であった。

(報告書は 24 年度分の秦健一郎の項を参照してください)

2. ART の品質管理と次世代への影響の検証

各国の生殖補助医療の現状と生殖補助医療を実施する適応および施設の基準に関する研究

研究分担者 柳田 薫 国際医療福祉大学病院 教授

体外受精や顕微授精などの生殖補助医療(ART)は主要な不妊治療として世界で実績を残している。しかし、生殖補助医療を実施する適応、治療への保険適応、実施をするための規制(施設基準)、消耗品の規制などについては各国で独自の対応をしている。我が国の生殖補助医療のクオリティーを高めることを目的として、各国の生殖補助医療の実施状況、消耗品の規定などを調査した。また、合理的に生殖補助医療を実施しクライアントに負担の少ない治療を提供し、かつ不妊治療への助成の有効性を高めるために生殖補助医療を実施する適応と生殖補助医療を実施する施設の基準について検討した。

1 International Federation of Fertility Societies のワールドレポート 2010

報告されているのは3年前より49ヶ国増えて107ヶ国である。IFFSの調査では41ヶ国で何らかの法的監視下で体外受精が実施され、その2/3で施設の認可機関が存在している。本邦では、体外受精の適応と施設基準を日本産科婦人科学会が示しているが、コメディカルの資格基準や使用する消耗品の基準についてはガイドラインが存在しない。生殖補助医療に対する保険でのカバーの状況については、32ヶ国に何らかの生殖補助医療をカバーする保険が存在していた。それらの国は生殖医療の先進国であったが、保険給付は妥当性の高いものから非常に限定的なものまで存在し、相互に大きな格差が認められた。

2. 諸外国の生殖補助医療を実施する場合の規制(適応)およびガイドライン、施設が備えるべき要件、また培養液などの消耗品の規制の状況

各国(英国、米国、オーストラリア、カナダ、ドイツ、中国、ベルギー、フランス、韓国)の生殖補助医療の実施状況を調査した。英国ではART施設数は66、NHS(国民保険サービス)利用時の治療費は原則保険で無料、プライベートクリニックでは自費診療となる。HFE法(Human Fertilization Embryology Act、ヒト受精および胚研究に関する法律”に基づいてHFEA(Human Fertilisation and Embryology Authority、ヒト受精および胚研究許可庁)が全ての管理を行っている。ARTの医学的適応については具体的に示されていない。施設・スタッフの基準に関してはHFE法および実施規定としてのCode of Practice 8th edition(2009)がある。米国でのART施設数は443で保険が広範囲をカバーしているのは5州以下で、ARTの費用の約20%が民間保険会社の保険でカバーされていると推定される。ARTに関する連邦レベルでの「法律」はThe fertility clinic success rate and certification act of 1992である。第三者の精子、卵子、胚を扱う場合のみFDAに登録する規制がある。ASRMが施設基準などのガイドラインを示している。ARTの実際の適応についての具体的ガイドラインはない。

ARTに関連する体外受精用培養液、顕微授精で使うガラス製マイクロピペットなどの製品

の規格について調査した。本邦では、輸入品から国産品まで流通しており、規格の規制はない。培養液類やマイクロピペットなどの消耗品は輸入品が使われている割合が多い。外国製の多くはFDAかCEの認可を受けている。しかし、国内製造。販売されている消耗品の多くは、認可の実績がない。本邦でも何らかの基準を示すべきと思われる。

3. 生殖補助医療手技に関するガイドラインの作成

ARTは婦人への影響、生まれる子供への不測の影響を考えると、その治療が必要なカップルに対してだけ行うことが必要である。実施する医学的な適応はすでにガイドラインとして示されており、修正の余地は少なく、適応が守られているかのチェックシステムが必要である。施設の基準やスタッフの資格について、ART先進国では施設基準や資格基準を明確にしている国が多い。本邦がART先進国であることを考えると、ARTを実施する適応はもちろんのこと、従事するスタッフ、特に不妊専門看護師、胚培養士の資格規定、培養室の施設基準を明確にすべきである。施設構成は外来診療室、採精室、採卵室・胚移植室、培養室の各部屋が必要である。体外受精・胚移植に加えて胚凍結保存法と顕微授精法が実施できなければならない。実施責任医師については、現行のガイドラインに示されているが、その他に専任の不妊専門の看護師、胚培養士が必要である。カウンセラーについては配置することが望ましいと考えられる。

(報告書は24年度分の柳田薫の項を参照してください)

3. 第三者の関与する不妊治療を含む生殖医療の新たな枠組み構築 我が国に於ける卵子提供プログラムの実態調査

研究分担者 見尾 保幸 医療法人社団ミオ・ファティリティ・クリニック 理事長

研究要旨

JISARTにおける非配偶者間体外受精（卵子提供プログラム）の実態調査を行った。現時点では、申請件数 30 件、実施件数 28 件であり、卵子提供者は全て非匿名で、血縁（姉妹）が 23 名、非血縁（義理姉妹、友人）が 5 名であった。10 組の被提供者夫婦で出生児（合計 13 名）が得られており、いずれも健児であった。提供者夫婦（家族）、被提供者夫婦（家族）、および、出生児などの当事者に対するフォローアップ部会も設置されており、予後調査等行われているが、最年長児（3 才）に対しても告知は行われておらず、今後、JISART 側からの積極的な支援が必要と考えられた。しかし、同時に、我が国における非配偶者間生殖医療には、幾多の課題点・問題点が山積していることも明らかとなった。

（報告書は 24 年度分の見尾保幸の項を参照してください）

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)

全出生児の3%を生殖補助医療（ART）由来児が占めるようになった我が国におけるARTの標準化とART由来児の精神的・身体的発達を含む長期予後の調査体制を整備するために必要なART登録システムを検討することが本研究の目的である。目的を達成するために、現在実施されている日本産科婦人科学会によるARTオンライン症例登録システムを基にART治療の把握のみならず、ARTにより生まれてきた児の発育・発達を長期的に調査するためには、今後どのようなシステム構築が求められるか検討した。

諸外国と比較して我が国におけるARTの特徴としては、卵提供を行う事が例外ではない諸外国に比べて極端に高齢者が多く、成功率が低い傾向にあることが判った。しかし、凍結融解胚移植が広く普及し、単一胚移植が浸透して多胎が少ない事も特徴であった。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。ART登録データを対象に精度上の問題点を検討したところ29%（6,948例）で周産期的転帰の詳細が不明であったため、妊娠転帰を含むART治療経過において不足、矛盾のあるレコードを検出し、問題点を判読可能なリストとして出力するデータチェックシステムを追加開発し、ART施設に対して問題点を修正することを促し、転帰不明レコードを1723件（全出産の6%）まで減少させることが可能となった。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。凍結融解胚移植周期においては「胚を凍結した周期」における登録番号を記載させるとともに、融解胚移植周期の管理方法を「採卵周期」と同じ要領で記入するよう明示し、2011年データからテスト運用、2012年データから本運用できるようにシステムを改変したため、今後、新たにリレーション機能に対応したデータ解析システムを準備し、検証にあたる準備が必要である。助成制度との関連では2008年時点で65,443件、全登

録件数の 34.3%にあたる症例で助成制度が申請されており。若年者ほど申請率が高く、高齢者は低いことが明らかとなった。年収による制限や、通算治療回数が多く難治性の高齢症例が補助対象外となり易いことも理由と考えられた。「特定不妊治療助成制度」利用症例は実施自治体毎に ART 成績情報をまとめて制度の効果をより正確に把握することが必要であり、2010 年からデータベースに自治体コードを入力できるように改善し、2012 年から解析可能となった。助成件数では厚生労働省が把握する給付実績と差があり、その原因を検討するとともに、精度を向上させる必要があると考えられた。ART 登録施設を対象に一般排卵誘発多胎を含めた多胎調査を行い 234 施設（施設別回答率 41.1%）から回答をえた。双胎を含む多胎妊娠の総数減少と 3 胎以上の顕著な減少を確認することができた。ART 多胎減少は単一胚移植の普及が主因であった。ART 総治療周期数は年々増加しているため、さらに減少するとは考えにくく、ART 双胎発生に関しては今後も注意である。排卵誘発多胎は総数に大きな変化は無いが 3 胎以上の発生は減少した。移植胚数の制限により明らかな対策が可能な ART に比べて、発育卵胞を単一にすることは困難な一般排卵誘発では、多胎予防に関してある程度の限界がある。治療周期数が多く、ART 登録施設以外でも実施される排卵誘発法では、4 胎以上の発生を含め注意喚起が必要と考えられる。3 胎の半数、4 胎以上のほぼ全例が減数手術を受けていた。減数手術後、5%の症例で流・死産が発生しており、減数手術の短期的な予後は不安定である。長期予後は安定しているもののリスクが高い緊急避難措置と考えられるため、3 胎以上の発生に関して ART 実施施設を含む治療施設に注意喚起を促す必要が指摘される。

A. 研究目的

生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology, ART) の普及はめざましく、我が国における全出生児の 3%を ART 由来児が占めるようになった。日本産科婦人科学会 2010 年の報告によると、全国の ART 実施登録施設は 591 施設（治療報告施設は 552 施設）、2010 年の総治療周期数は 242,017 周期、総出生児数は 28,945 人と年々増加している（図 1, 図 2）。過去 30 年以上の間に実施された ART は実に 190 万件近く、生まれた子供の数

も約 27 万人となっている。ART により出生した児には概ね問題が無いことが経験的に報告される一方、現代の ART は顕微授精、胚盤胞移植など過去 15 年の間に相次いで臨床応用された技術を多く含むため、改めて ART 児の長期予後を検証する必要性が増している。

本研究は ART の標準化と ART 由来児の精神的・身体的発達を含む長期予後の調査体制を整備するために必要な ART 登録システムを検討することを目的としている。ART の標準化と出生児の長期予後に関わる情報収集を行うた

めには、本邦で実施されている全 ART 治療周期の詳細な情報収集と出生児の妊娠・分娩の転機、さらには出生後の継続的情報収集のための環境整備が必須である。日本産科婦人科学会では 1983 年から 1988 年の期間に実施された ART 治療に関する調査報告以来、毎年一回、各施設に報告を求めて「生殖医学の臨床実施に関する調査」を報告し、さらに 2007 年からは全ての ART 実施施設が全ての ART 実施症例個々の情報をオンライン登録している。現在実施されている日本産科婦人科学会による ART オンライン症例登録システムを基に ART 治療の把握のみならず、ART により生まれてきた児の発育・発達を長期的に調査することを目的に、今後どのようなシステム構築が求められるか検討することが必要とされる。そこで日産婦 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 の実情を比較検討するとともに、集積している膨大なデータの精度を検証し、妊娠転帰、予後把握の精度向上の基本として今後の長期予後追跡に必要なシステムの検証と環境整備を行った。加えて、我が国独特の「特定不妊治療助成制度」の現状と有効性も検証し、効果的かつ安全な ART 治療を継続できる環境整備を行うとともに、さらに長期予後に影響を与える多胎妊娠に特化した情報をシステムに取り入れるため、現在の ART 登録施設を対象とした多胎調査を実施し、ART 及びその他の一般不妊症治療により発

生している多胎妊娠の実態と、特に 3 胎以上の妊娠経過、転帰に関して解析した。

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 年から 2010 年までの全国の全 ART 実施施設から集められた症例個別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。データ精度に関しては新たに解析システムを開発し 2009 年データに対して精度チェック、各施設へのデータ差し戻しを実施し、2010 年度データでの精度向上の効果を検証した。多胎妊娠予後調査としては ART 実施登録施設を対象に各施設の治療実態、扱った多胎妊娠の総数把握と特に 3 胎以上の多胎妊娠に対しては個表調査を実施し、得られた情報の解析を実施した。

C. 研究結果と考察

【我が国の ART の特徴】

ART 実施件数、出生数（図 1、図 2）は増加の一途を示すが、登録施設数（図 3）は 2003 年以降大きな変化はない。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たため、やや減少しているが我が国においては ART 施設がある程度普及したことが見て取れる。我が国の ART の現状を諸外国と比較したところ（表 1、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 2010 年時点で 3% となり、社会保障が進み自己負担の少ない北欧諸国やオランダ、ベルギーと同等の普及率を示す。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。

最新の年齢別データ（2010 年）（図 4、図 5）を見ると、治療件数が最も多い年齢は 39 歳、妊娠数が最も多い年齢は 36 歳であり、年齢と共に妊娠率が低下していく中で、比較的高齢の症例が多数 ART を行っていることがわかる。特に生産率が 1% 以下となる 43 歳以上の症例は全実施件数の 14% を占めるが、出産は全出産の 1% 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、卵子提供が実質的には行われておらず、あるいは卵子提供を希望しないため高齢者が成功率の低い ART を続けている実情を裏付けている。治療法を新鮮卵を用いた体外受精、顕微授精および凍結融解胚を

用いた治療の 3 つに分類してみると 2008 年時点では総治療周期数で各々が 1 : 1 : 1 であったが、移植周期数や分娩周期数で見ると凍結融解胚移植の占める割合はそれぞれ 47.8%、57.2% であり、さらに 2010 年までに凍結融解胚移植周期数は増加している。凍結融解胚移植周期の増加は凍結技術の向上が前提であるが、2008 年に日本産科婦人科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。単一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 6）。

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、図 2 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。表 1 を見ると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。米国で妊娠率が高いのは、移植胚数が比較的多く、多胎妊娠率、実数が多いこと、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などの理由も上げられるので、簡単には比較できない。一方、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(図7)。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考えられる。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ため、全胚凍結の影響は限定的と推測される。

【ART データの問題点とその対策】

児の長期予後を検証するためには 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。日産婦 ART データ 2008 年を対象に問題点を検討したところ、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であり、さらに生産と登録されているものの中でも 1674 例で分娩週数、出生児体重など予後が不明であった。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であった。胚移植後の妊娠の有無が登録されていない症例も多数あり、現在の ART 登録が ART 治療中の内容や治療費助成申請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。そこで今回明らかとなった妊娠転帰不明など ART 治療経過において不足、矛盾のあるレコードを検出し、問題点を判読可能な問題点リストとして出力するデータ

チェックシステムを追加開発し(図8)、これを用いて 2009 年 ART 登録データに含まれる転帰不明を含む問題データを抽出し、各 ART 施設に対して問題点を修正することを促した。結果として、転帰不明レコードを 1723 件(全出産の 6%)まで減少させることが可能となった。ART 治療施設に妊娠例の追跡、登録を行うよう再度指導することで解消する部分も多いと考えられる一方、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、今後は周産期データを含む包括的システム構築も必要となる可能性が示唆される。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。具体的には、胚凍結にいたる治療時の情報として、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。そこで今回、ART データベースに新たな項目を加え、凍結融解胚移植周期においては「胚を凍結した周期」における登録番号を記載するとともに、融解胚移植周期の管理方法を「採卵周期」と同じ要領で記入するよう明示し、2011 年データからテスト運用、2012 年

データから本運用することとした。この効果を検証するためにはその妊娠転帰が明らかとなる 2014 年まで待たねばならない。また、新たにリレーション機能に対応したデータ解析システムを準備し、検証にあたる準備が必要である。

【助成制度との関連】

日産婦 ART データベースには「特定不妊治療助成制度」利用の有無と、利用した症例は申請自治体名を登録している。これは「特定不妊治療助成制度」を行っている自治体毎に ART 成績情報をまとめて「特定不妊治療助成制度」の効果をより正確に把握することを目的とした追加機能である。2008 年データでは 65、443 件（全登録件数の 34.3%）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。患者年齢別に見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 2）。年収による対象者の制限や、高齢者では成功率が低いため、年間通算治療回数が多く補助対象外となることが比較的多いことも理由と考えられる。本システム開発当初、助成制度が始まっていなかったため自治体名をコード入力することができずフリー入力に対応していたが、2010 年からデータベースを改善しており、2012 年からより正確に解析可能となった。ART データベースに登録されている助成申請周期数は 2009 年には、78,742 件（厚生労働省が把握している給付実績は 84,395 件）、全 ART 登録例の 39.4%と実数、比率ともに増加傾向にあるが、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。申請したとしても、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。

【多胎調査】

多胎妊娠予後調査として ART 実施登録施設 570 施設（2012 年 9 月現在）を対象に各施設の ART 及び一般排卵誘発治療の実情、扱った多胎妊娠の総数把握と特に 3 胎以上の多胎妊娠に対しては個表調査を実施した。回答が得られた施設は 234 施設（施設別回答率 41.1%）であった。双胎を含む総多胎妊娠数が減少し、周産期において特に問題となる 3 胎以上は 3 年前の調査以降、今回の調査でも減少が確認された（表 3）。3 年毎に実施してきた多胎調査を 3 年毎の総数として図 9 に示す。双胎は今回の調査で始めて総数の減少が明らかとなった。これは、2008 年に日本産科婦人科学会から「原則として移植胚数を単一とし、一部の症例でのみ 2 胚移植を許容する」会告が示されたことが主因と考えられる。しかし ART 総治療周期数は年々増加しているので、さらに減少するとは考えにくく、双胎発生に関しては今後も注意である。3 胎は前回調査に引き続き、ART 3 胎発生が急激に減少し、総数減少が続いている。前述の 2008 年学会会告以前から治療成績の向上と凍結技術の発展によ

り、多くの ART 施設で3胚移植が行われなくなったことが原因であり、例外的施設を除くと3胚移植が行われない現在、ART においては一卵性成分を含む3胎を除くと3胎以上の多胎発生は「ほぼ0」となる状況が今後も続くと考えられる。4胎以上の発生はART、排卵誘発ともに顕著に減少している。一般排卵誘発でも排卵誘発法の工夫やHCG投与中止基準の普及により、4胎以上の多胎は以前に比べて減少している。しかし、移植胚数の制限により明らかな対策が可能なARTに比べて、発育卵胞を単一にすることは困難な一般排卵誘発では、多胎予防に関してある程度の限界がある。治療周期数が多く、ART登録施設以外でも実施される排卵誘発法では、4胎以上の発生を含め注意喚起が必要と考えられる。3胎以上の症例200例は個別調査を基に発生原因、妊娠経過、転帰を解析した(図10)。妊娠初期流産や自然減数、人工妊娠中絶、さらに妊娠確定後の転帰不明を除くと妊娠10週以降に3胎以上で妊娠継続症例が136例あり、その半数が減数手術を行っている。発生原因、多胎数別の減数実施率(図10の中表)を見ると、4胎以上の殆どの症例、ART3胎の40%、排卵誘発3胎の55%が減数を実施していた。自然妊娠(3胎のみ)では減数実施例は無かった。減数手術後、5%の症例で流・死産が発生しており、以前の報告同様、減数手術の短期的な予後は不安定である。減数手術実施、非実施後の生産例における分娩週数および

出生児体重(多胎においては平均)を見ると(表4、表5)、減数後の周産期長期予後は以前の報告同様に比較的良好であった。依然として減数手術のリスクは大きく、あくまでも緊急避難的措置でしかない。症例毎に2胎を含めた多胎発生を予防することが今後一層重要と考えられた。

D. 結論

我が国のARTは増加し全出生の3%がARTとなったが、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。長期予後を検討するために凍結融解胚移植におけるデータ集積方法として凍結前の情報と融解後の情報を連結解析可能とするために融解胚移植周期で「胚を凍結した周期」の登録番号を追加して登録することとし、2012年から運用開始した。精度管理に関してはエラーチェックシステムを追加し、精度を向上させた。特定不妊治療助成制度は39.4%の周期で利用されており、実数、比率ともに増加傾向にあった。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。厚生労働省が把握する給付実績と差があり、精度を向上させる必要性があると考えられた。

ART登録施設を対象に一般排卵誘発多胎を含めた多胎調査を行い、双胎を含む多胎妊娠の総数減少と3胎以上の