

200822025A

厚生労働科学研究費補助金

子ども家庭総合研究事業

女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の  
確立に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉野 修

平成21年(2009)年 3月

## 目次

I. 総括研究報告書	3
吉野 修	
II. 分担研究報告書	
1. 卵巣予備能の客観的評価に関する基礎的研究	7
吉野 修	
2. 胚・卵子の客観的評価に関する研究	13
阿倍 宏之	
3. 子宮内腔洗浄液を用いた子宮内膜の客観的評価に関する検討	19
浜谷 敏生	
4. 子宮内膜の客観的評価法の開発を目的とした胚着床に関する基礎的研究	22
大須賀 穰	
5. 画像による子宮内膜の客観的評価法の開発	26
堀 正明	
III. 主な研究成果の刊行に関する一覧表	30

# I. 総括研究報告書



課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

#### 研究総括

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

(要約) 不妊治療のニーズが高まる中、生殖機能の客観的な評価法が確立しているとは言い難く、このことが不妊治療の方針が定まらない原因と思われる。客観的なスクリーニング法を確立することが効率のよい治療法の提示および妊娠率向上に寄与すると思われる。特に機能評価が確立していない 1). 卵巣機能評価、2). 得られた卵子および胚の評価、3). 子宮内膜の着床能の評価にわけ、各々の分野で精力的に基礎研究を行ってきた研究者と共同研究を開始した。本研究ではできるだけ非侵襲的で簡便な検査法を用いる。3年間でそれぞれの不妊因子の新たなスクリーニング検査を確立するとともに、初年度、2年目に基礎研究を行うことで3年目にそれぞれの不妊因子の治療法の開発も試みる予定である。今年度は、基礎的な知見を増やすことができ、また今後臨床データを蓄積する環境を整えることができた。

#### A. 研究目的

女性の加齢に伴い卵巣機能は低下し、子宮筋腫など子宮疾患の合併率が上昇することが知られている。女性の社会進出が進んでいる現代では女性の晩婚化が進んでおり、それに伴い卵巣および子宮機能異常に起因した不妊症患者が増えている。不妊治療を進める上で、正確な卵巣機能評価は治療方針の決定に大切である。また、近年体外受精のニーズは拡大しているが、得られた胚の評価方法も主観による形態的な評価にとどまっている。良好胚の正確な選別は妊娠率の向上のみならず、母子に対するリスクから産科領域で問題となっている多胎の予防にも寄与することから、新たな胚の評価方法が望まれる。また胚の子宮内膜への着床は未だ不明な点が多い。従来の不妊検査では異常が見つからない所謂、原因不明症例は不妊患者の4割を占めると言われている。この中に子宮内膜の機能異常症例が少なからず含まれていると思われるが、これまで子宮内膜機能に対する有効な検査法は全く確立していない。また、子宮

筋腫合併症例などに対し、子宮病変の治療もしくは不妊治療のどちらを先行させるべきなのか明確な方針がない。

本研究では 1).卵巣機能評価方法 2).卵子・胚の評価 3).子宮内膜の評価にわけ、共同研究を通して新たな不妊症検査の確立をめざす。

精度の高い不妊スクリーニング検査の確立は、将来その概念に立脚した治療法の開発も多いに期待することができる。

#### B. 研究方法(詳細は各分担研究に記載)

1) 卵巣機能評価 (吉野担当): 卵胞に発現する BMP ファミリーサイトカインの分泌異常は卵巣機能不全を引き起こすことから、同サイトカインの測定が卵巣機能の直接評価に繋がると考えられる。1年目は、ヒト卵巣に発現するサイトカイン、BMP-6 および BMP-7 に関する基礎的研究を行った。

2) 胚および卵子の評価 (阿部担当): 胚の着床能を非侵襲的な方法で多角的に評価し、良

好胚の選別に関する客観的な指標作成を目標とする。今年度は、阿部准教授の開発した胚の呼吸能測定装置を使用し、検討を行った。ヒト胚に関してはセント・ルカ産婦人科 宇津宮隆史博士の研究協力を頂いた。

### 3) 子宮内膜評価：

#### 1. 子宮内腔洗浄液の検討 (浜谷担当分)

胚と子宮内膜は液性因子を介して着床を試みることが知られている。この事実に注目し、不妊症患者より子宮内腔洗浄液を採取し着床に関与する蛋白発現を検討した。今年度は子宮内腔洗浄液中に存在する液性因子 matrix metalloproteinase (MMP)、に注目し、それらの分泌量(活性)と妊娠(着床)率との相関を検討を行った。

#### 2. 着床機転に関与する因子の基礎的研究 (大須賀担当分)

胎児成分と母体成分の相互作用に関する知見を検討した。

#### 3. 画像による子宮内膜の客観的評価法の開発 (堀担当分)

他科領域で使用されている新たな MRI 検査法を用い、不妊症例を対象に検討を行った。

### C. 研究結果 (表1)詳細は分担報告書参照

#### 1). 卵巣機能評価 (吉野)

卵胞に発現するサイトカイン BMP-6, BMP-7 に関して主に in vitro 実験を行った。同サイトカインが卵胞発育に重要な役割を果たす FSH 受容体およびインヒビン・アクチビンを卵胞に誘導することを認め、また、同サイトカインが卵巣予備能力の指標として注目されている anti-Mullerian hormone (AMH) を誘導することを見出した。

#### 2). 胚・卵子の選別法 (阿部)

マウスおよびヒト胚の質と呼吸活性との関係を明らかにするために、マウスおよびヒト胚の呼吸量を、走査型電気化学顕微鏡をベースに開発した「胚・卵子呼吸測定装置」を用いて調べた。

ヒトを用いた実験は研究協力者であるセント・ルカ産婦人科 宇津宮 隆史博士が行った。マウス胚は発生進行に伴い呼吸量が増加し、特に桑実胚以降はミトコンドリアの発達と一致して呼吸活性が顕著に増加することが明らかになった。一方、ヒト胚はマウス胚同様、桑実胚から胚盤胞期にかけて呼吸活性が増加することが判った。以上の結果から、「胚・卵子呼吸測定装置」を用いることでマウスおよびヒト胚のミトコンドリア呼吸機能を高精度でモニタできたことから、当初の研究目標は達成できたと判断する。

### 3). 子宮内膜の評価法

#### 1. 子宮内腔洗浄液の検討 (浜谷担当分)

今年度は MMP について検討し、MMP の調整には抗生剤とプレドニゾロンによる内服療法が奏功を示し、妊娠率の改善に導くことが明らかとなった。

#### 2. 着床機転に関与する因子の基礎的研究 (大須賀担当分)

胎児成分と母体成分の相互作用に関する知見を検討した。胚成分より産生されるサイトカイン interleukin-1 (IL-1)が子宮内膜細胞における IL-8 を誘導し、IL-8 が胎児成分である絨毛細胞の子宮側への遊走および子宮内膜における生存に関与していることを見出した。

#### 3. 画像による子宮内膜の客観的評価法の開発 (堀担当分)

おもに子宮筋腫を有する不妊症例を対象として、あらたなMRI撮影法の開発を試みた。

子宮全体の三次元ボリューム撮像、子宮の連続的時間差撮像、いわゆるシネ MRI 撮像、子宮内膜の T2 値測定を試み、今年度はMRIの条件を設定することができ、今後、データを蓄積する環境を整えることができた。



#### D. 考察(詳細は各分担者分を参照)

客観的なスクリーニング法を確立することが効率のよい治療法の提示および妊娠率向上に寄与すると思われる。特に機能評価が確立していない 1). 卵巣機能評価、2). 卵子および胚の評価、3). 子宮内膜の着床能の評価にわけ、各々の分野で精力的に基礎研究を行ってきた研究者と共同研究を開始した。本年度は、すべての領域において基礎的データを得ることができた。

- 1) 卵巣機能評価において、これまで脳下垂体ホルモン値である FSH(follicular stimulating hormone)値が妊孕能の観点から見た卵巣予備能の評価に用いられてきた。しかし、同ホルモン測定は偏差が大きく、明確な基準になり得ていない。近年、血中 AMH 値が卵巣予備能評価に有用であるとの報告が見られるが、同ホルモンの調節因子はこれまでよくわかっていなかった。今年度、我々は BMP-6, BMP-7 が AMH を誘導することを見出した。
- 2) 胚および卵子の評価法では、ヒト胚においても呼吸能測定により胚の質を評価することができる可能性を示すことができた。
- 3) 子宮内腔の洗浄液をもちいた検討では、液性因子 MMP 測定とその是正が不妊治療に有用であることを示すことができた。また、基礎的研究として、胎児成分が液性因子である IL-1 を分泌することで母体細胞に働きかけて IL-8 の分泌を誘導し、IL-8 の作用により胎児成分の子宮内膜への遊走および生存能を獲得していることを見出した。  
画像による不妊症のスクリーニングに関して、特に各種検査法の条件設定を確立

すると共に、今後データを蓄積することができる環境を整えることができた。

#### E. 結論

3箇年計画の初年度を終えるにあたり、今年度は主に不妊症検査に関する基礎的知見を加えることができた。また同時に来年度以降のデータを蓄積することができる研究環境も整えることができた。

F. 健康危険情報           なし

#### G. 研究発表(各分担報告書に記載)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得(出願)

(1) 哺乳動物受精卵の呼吸活性測定方法及びその電気化学デバイス(珠玖仁、末永智一、高野真一郎、伊達安基、齋藤剛史、横尾正樹、伊藤隆広、阿部宏之)特願 2008-293117、2008 年 11 月。

## II. 分担研究報告書

課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

分担課題: 卵巣機能の評価

分担研究者: 吉野 修 (東京大学産科婦人科教室 特任研究員)

(要約) 卵胞発育のメカニズムを解明することが、正確な卵巣機能評価法の開発に有用である。

今年度は、卵巣に発現するBMP (bone morphogenetic protein) サイトカインに着目し、その発現および卵胞発育における作用についての検討を行った。

#### A. 研究目的

女性の社会進出が進んでいる現代では女性の晩婚化が進んでおり、それに伴い卵巣機能低下に起因した不妊症患者が増えている。不妊治療を進める上で、正確な卵巣機能評価はその後の治療方針の決定に大切である。なかでも卵胞発育は、卵の数と質を決める主要な因子である。このため、ヒトにおける卵胞発育のメカニズムを解明することが、より高度かつ有効な生殖医療に求められ、また不妊症のスクリーニングへの応用が可能になると思われる。

卵胞発育は脳下垂体より分泌される卵胞刺激ホルモン FSH により調節を受けていることから、卵巣顆粒膜細胞における FSH 受容体の発現誘導のメカニズムを知ることは大変意義がある。近年、TGF- $\beta$ スーパーファミリーメンバーに属するサイトカイン Bone Morphogenetic Protein (BMP) ファミリーが卵胞発育に重要な役割を担っていることが知られており、BMP-15 や類似蛋白である Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9)の遺伝子異常はヒトを含めた種々の動物において早発卵巣不全 (POF) の原因となることが報告されている (Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Elickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 2004; 25 (1):72-101)。

BMP リガンドの卵巣での発現は、前述の BMP-15 や GDF-9 以外に BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 が現在

までに報告されているが、主にラットおよびヒツジを用いた検討が多く、ヒト検体を用いたものは殆どない。我々は、ヒト検体を用いて BMP-6 および BMP-7 の発現およびその機能に関する検討を行った。

#### B. 研究方法

患者の同意のもと、検体を採取し以下の実験を行った。

実験1) BMP-6 および BMP-7 の卵巣における局在: 子宮癌手術患者の卵巣切片を用いて、BMP-6 および BMP-7 蛋白の免疫染色を行った。(抗体 R&D 社製)

実験2) BMP-6 および BMP-7 の顆粒膜細胞における機能解析実験 (in vitro 実験)

体外受精の採卵時に得られたヒト顆粒膜細胞培養系にリコンビナント BMP-6 および BMP-7 (R&D 社製 0-300 ng/ml)を添加し、卵胞発育に関与する物質の mRNA 発現変化を定量的および半定量 PCR にて検討した。

実験3) 良好胚の選別に関する検討

顆粒膜細胞における BMP 受容体の発現量測定により、良好な卵子や胚を選別できないかとの仮説をたて、体外受精症例を用いて検討を行った。卵



子周囲に存在する卵丘顆粒膜細胞の RNA を卵子毎に抽出し、BMP サイトカインの受容体である activin receptor-like kinase (ALK)-5, ALK-6, BMP receptor-II mRNA 発現量の測定を real time PCR にて行った。また卵子は精子との受精後3日間培養し、胚の形態による grade 評価を行い、mRNA 発現量との関係を調べた (図5)。

### C. 研究結果 および D. 考察

#### 実験1. BMP-6 および BMP-7 の発現に関する検討

ヒト正常卵巣を用い、BMP-6 および BMP-7 の発現の検討を行った。BMP-6 は卵胞を構成する成分のうち、主に顆粒膜細胞に発現を認め、一方 BMP-7 は英膜細胞にその発現を認めた。これらの発現は卵胞の増大に伴って増強することを認めた (図1)。特に、BMP-6 の顆粒膜細胞における発現は、良好に発育している卵胞 (healthy follicle) では強発現しているのに対し、発育を停止した所謂、閉鎖卵胞 (unhealthy follicle) ではその発現は著明に低下していた (図4)。

#### 実験2. BMP-6 および BMP-7 の機能に関する検討

BMP-6 および BMP-7 が顆粒膜細胞における FSH 受容体 mRNA を誘導することを認めた (図2)。一方、卵胞の黄体化を制御する LH 受容体発現を減少させることを認めた。卵胞が増大するにつれ BMP-6 および BMP-7 発現が増加することから (実験1)、BMP-6, 7 の卵胞における作用として卵胞における FSH 受容体を誘導し、一方で黄体化を抑制することが考えられる。

さて、ヒト月経周期において、卵胞期中期より inhibin B の作用により血中 FSH 濃度の低下することが知られている。その意義として FSH 受容体発現が少ない卵胞は、血中 FSH 濃度の低下に対応できずに閉鎖卵胞となる一方で、FSH 受容体を多く発現する卵胞は生存することができ、このことが単一排卵にむけての follicle selection のメカニ

ズムであると考えられている (Minegishi T: The Ovary, p79-92, Elsevier, Academic Press, 2004 Regulation of Gonadotropin Receptor in the Ovary) (図4)。卵胞において BMP-6, BMP-7 が存在すると、FSH 受容体がさらに発現することで、血中 FSH 濃度低下に対応することができ、主席卵胞へさらに成長することができるが、BMP-6, BMP-7 が発現しないと、FSH 受容体の発現が弱く、血中 FSH 濃度低下に対応することができずに閉鎖卵胞へ陥ることが考えられる。事実、上述した通り、healthy follicle では BMP-6 の発現を顆粒膜細胞に認めたが、unhealthy follicle では BMP-6 の発現を認めなかった (図4)。現在、不妊治療において FSH 製剤が汎用されているが同薬剤に反応の悪い、所謂 poor responder が問題となっている。BMP サイトカインは顆粒膜細胞における FSH 受容体を誘導することから、卵胞の FSH 製剤に対する感受性をあげる可能性がある。

また、BMP-6 および BMP-7 は AMH (anti-Mullerian hormone) mRNA を増加させることを認めた (図3)。AMH は顆粒膜細胞から産生され、初期卵胞の活性化、すなわち卵胞の recruitment を抑制することが知られている。また血中 AMH 値は卵巣の予備能力を反映することから、近年注目を集めている物質であるが (Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol 2005; 29: 81-6)、AMH の発現調節因子に関して殆ど報告がない。BMP-6 および BMP-7 は顆粒膜細胞における AMH の誘導を介して、周囲に存在する初期卵胞の活性化を抑制させることが考えられる。その意義として、増大している卵胞は周囲に存在する初期卵胞の活性化を AMH を介して調節することで、卵胞の急激な枯渇化を防いでいる可能性が推測された。

#### 実験3. 良好胚の選別に関する検討

BMP サイトカインの受容体は主に顆粒膜細胞に存在することが知られている。また、in vitro の検討

で長期間の BMP 刺激により、顆粒膜細胞における BMP 受容体の発現が低下することを認めている (自験例)。そこで顆粒膜細胞における BMP 受容体の発現量測定により 良好な卵子や胚を選別できないかとの仮説をたて、ヒト体外受精症例を用いて検討を行った。卵丘顆粒膜細胞の mRNA を卵子毎に抽出し、BMP サイトカイン受容体である activin receptor-like kinase (ALK)-5, ALK-6, BMP receptor-II mRNA 発現量の測定を real time PCR にて行った。卵丘顆粒膜細胞を除いた後の卵子は受精後 3 日間培養し、胚の形態による grade 評価を行った (図 5)。胚の grade と卵丘顆粒膜細胞における BMP 受容体発現量との関係を調べた。良好胚では不良胚と比して有意に BMP サイトカインの受容体である ALK-5, ALK-6, BMPR-II の発現が有意に低いことを認めた (図 6)。すなわち、良好胚群の顆粒膜細胞は十分な量の BMP に曝露されていたことが推測された。

#### E. 結論

BMP サイトカインファミリーが、卵胞発育に重要な役割を担っていることが知られてきているが、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。今年度の検討により、BMP サイトカインの卵胞における機能に関する一端を示すことができた。次年度以降は BMP サイトカインの血中濃度を測定することにより、卵巣機能の評価が可能であるかなどについて、検討を行う予定である。

F. 健康危険情報           なし

#### G. 研究発表

学会発表:

吉野 修 卵胞発育および卵子成熟に関する各種生理活性物質の意義 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 横浜

#### 論文発表

- 1) 吉野 修 卵胞発育および卵子成熟に関する各種生理活性物質の意義 日本産科婦人科学会誌 60 巻 10 号 pp 1770-1777 2008 年
  - 2) Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y. Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells. Fertil Steril. in press (2009)
- H. 知的財産権の出願・登録状況   なし

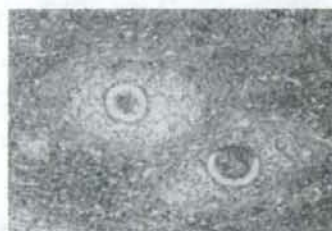


図1 正常卵巣における BMP-6、BMP-7 の発現 (免疫染色法)

**BMP-6, BMP-7 ヒト卵胞における発現部位**



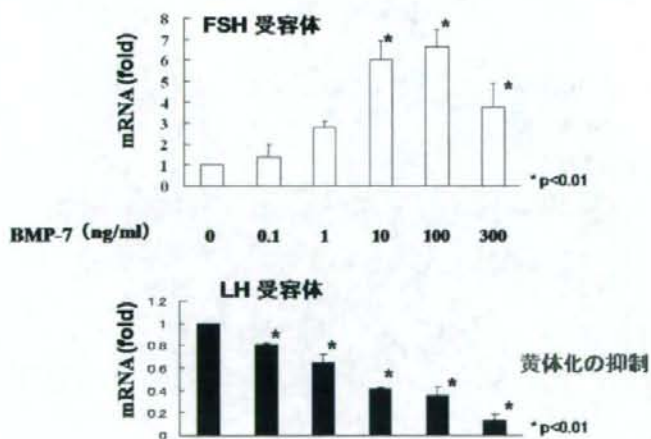
**BMP-6: 主に顆粒膜細胞**



**BMP-7: 主に莢膜細胞**

ヒト正常卵巣において Bone Morphogenetic Protein 6 (BMP-6) はおよび BMP-7 蛋白はそれぞれ顆粒膜細胞、莢膜細胞に発現していた

図2 ヒト顆粒膜細胞における BMP-6、BMP-7 の FSH 受容体および LH 受容体誘導作用 (real-time PCR にて解析)

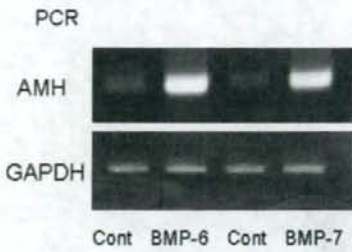


\* BMP-6も同様の作用を有した。

ヒト顆粒膜細胞に BMP-6 および BMP-7 を添加したところ、FSH 受容体の発現を上昇させ、一方で LH 受容体の発現を低下させることを認めた。

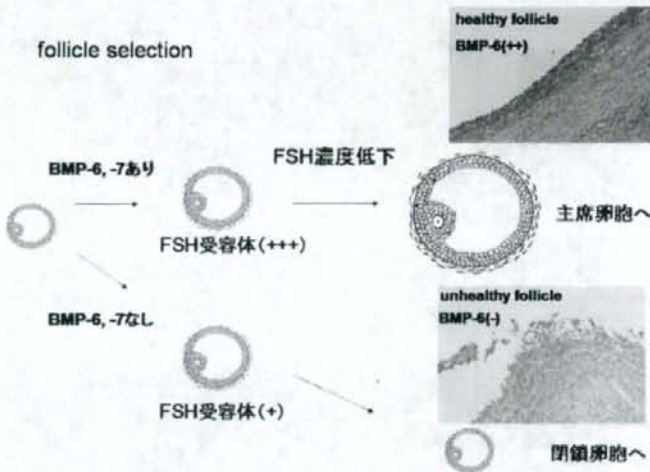


図3 ヒト顆粒膜細胞における BMP-6、BMP-7 の AMH mRNA 誘導作用



ヒト顆粒膜細胞に BMP-6 および BMP-7 を添加したところ、卵巢予備能を示す指標として知られている AMH (anti-Mullerian hormone) mRNA を増加させることを認めた。

図4 follicle selection への BMP-6、BMP-7 の作用 (仮説)



良好に発育している卵胞 (healthy follicle) において BMP-6 蛋白発現を顆粒膜細胞に認めたが、閉鎖卵胞 (unhealthy follicle) ではその発現が著明に減弱していた。

図5 ヒト卵丘細胞における BMP 受容体発現と胚の質の関係

臨床応用にむけて

③良好胚の選別 ICSI (顕微授精)症例による検討



卵丘顆粒膜細胞のRNAを  
卵子ごとに抽出

卵子は顕微授精後3日間培養

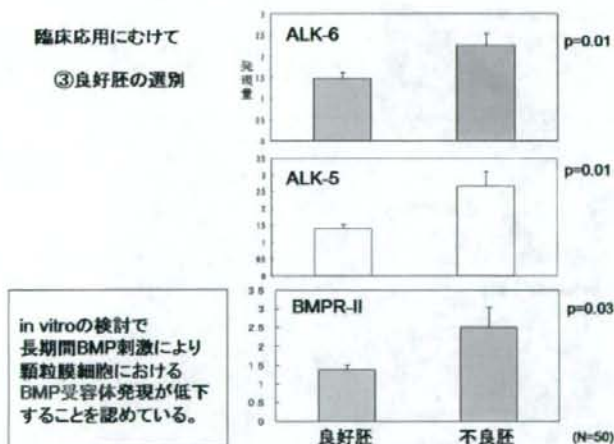


胚の形態による  
grade 評価  
(3日目)

BMPs およびGDF-9の受容体である  
ALK-5, ALK-6, BMPR-II発現量の測定

卵子周囲に存在する卵丘顆粒膜細胞の RNA を卵子毎に抽出し、BMP サイトカイン受容体である activin receptor-like kinase (ALK)-5, ALK-6, BMP receptor-II mRNA 発現量の測定を real time PCR にて行った。また卵子は受精後3日間培養し、胚の形態による grade 評価を行い、受容体発現量との関係を調べた。

図6 ヒト卵丘細胞における BMP 受容体発現と胚の質の関係



良好胚では不良胚と比して有意に BMP サイトカインの受容体である ALK-5, ALK-6, BMPR-II の発現が有意に低いことを認めた。in vitro の検討で長期間の BMP 刺激により、顆粒膜細胞における BMP 受容体の発現が低下することを認めている。

課題番号: H20-子ども-若手-O11

課題名: 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

分担課題: 胚および卵子の評価に関する研究

分担研究者: 阿部 宏之 山形大学准教授

研究要旨: 胚や卵子の品質は着床能に大きく影響することから、精度の高い品質評価は不妊治療における治療成績の向上に不可欠である。本研究では、非侵襲的電気化学計測技術を応用した受精卵呼吸測定装置により胚および卵子の呼吸能を解析し、妊娠が期待できる高品質胚の効率的選択法開発のための基盤構築を目的とする。電気化学計測技術と生物学的解析技術を駆使し、細胞呼吸活性を指標とする胚品質評価法の有効性と安全性を検証する。

#### A. 研究目的

胚や卵子の品質(クオリティー)は着床能に大きく影響することから、不妊治療の成功率向上のためには精度の高い胚品質診断法の開発が不可欠である。現在、胚の品質は形態観察による選択が一般に行われているが、形態的評価法は判定基準が客観性に欠けることから精度の面での問題が指摘されている。最近の研究より、ミトコンドリアの呼吸機能と胚の品質が相関していることが明らかにされ、胚の呼吸活性を指標とする新しい胚品質評価法が注目されている。これまでに、ウシなどの家畜においてその有効性が示されているが、マウス胚やヒト胚においては研究されていない。そこで本研究では、電気化学計測技術を応用して開発した走査型電気化学顕微鏡(受精卵呼吸測定装置)を用いてマウス胚の胚発生過程における呼吸能変化を解析した。また、不妊治療への応用を目指してヒト余剰胚の呼吸量測定を試みた。本研究の目的は、マウス胚およびヒト胚の呼吸能を解析し、呼吸活性を指標とする胚・卵子品質評価システム開発のための基盤構築を目的とする。

#### B. 研究方法

過排卵処理を行ったB6C3F1系統雌マウス(3-6週

齢)を同系統の雄マウスと交配させ、2細胞、4細胞、8細胞、桑実胚および胚盤胞の各発生ステージの胚を回収した。胚の呼吸量は、走査型電気化学顕微鏡(SECM)を改良した「受精卵呼吸測定装置」を用いて測定した。呼吸測定装置専用開発した測定プレートに施した逆円錐形マイクロウェルの底部中心に試料を静置させた後、微小電極を試料近傍に移動した後、微小電極をZ軸方向に(31.0  $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、160  $\mu\text{m}$ )3回走査し試料の酸素消費量(呼吸量)を測定した。測定には、「受精卵呼吸測定液: ERAM-2」(機能性ペプチド研製)を用いた。

ヒト胚の呼吸能生解析研究では、全て患者の同意が得られた余剰胚を使用した。凍結保存余剰胚は、融解後、HTF培地に10%ヒト合成血清(SSS)を添加した培地で培養し、1細胞(2PN胚)、2-8細胞、および桑実胚-胚盤胞の異なる3段階の発生ステージに分類し呼吸量を測定した。

呼吸測定した胚の一部は、ミトコンドリアの微細構造変化を調べるために、定法に従いグルタルアルデヒドとオスミック酸で固定後、超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡により微細構造を観察した。

(倫理面への配慮)

通常、不妊治療目的で回収又は作製されたヒト卵や受精胚は倫理的な問題もあり研究に用い



ることは不可能である。したがって、本研究ではマウスや家畜など動物由来の卵子及び胚を主な研究材料として用いる。また、臨床試験に先立ちヒト生殖細胞に関するデータの収集が必要になるが、これは不妊治療が終了した患者の同意（インフォームド・コンセント）が得られた胚（余剰胚）を用いることで解決する。余剰胚は短期間の培養に限定し、実験終了後は速やかに所定の方法で廃棄する。呼吸測定等に用いる余剰胚の発生ステージは着床以前の胚盤胞（受精後4-5日）までに限定することで日本産婦人科学会及び日本不妊学会で定めている生殖医療技術ガイドラインには抵触しない。

### C. 研究結果（表1）

マウス胚の呼吸量は、8細胞までの発生初期では非常に低い値（ $0.21-0.32 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ）であったが、桑実胚期以降は発生の進行に伴い顕著な増加を示した（表1）。特に、桑実胚から胚盤胞期にかけて顕著な呼吸量の増加が測定された（ $0.42-0.59 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ）。電子顕微鏡観察により、8細胞期まではミトコンドリアの多くは小型でクリステが発達していない未成熟な特徴を示していたが、桑実胚からクリステの拡張が始まり、胚盤胞ではクリステの発達した成熟したミトコンドリアが観察された（図1）。桑実胚から胚盤胞にかけての呼吸量の増加とミトコンドリアの発達は一貫することが示された。

各発生ステージにおけるヒト胚の酸素消費量を表2に示す。2-8細胞期胚では  $0.51 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$  であり、この呼吸活性値はウシ胚とほぼ同じであった。桑実胚から胚盤胞にかけて呼吸量の増加が認められた（ $0.61-1.06 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ）。電子顕微鏡観察の結果、1細胞期胚および2-8細胞期胚においてミトコンドリアは小型で球状の未成熟形態であったが、桑実胚から胚盤胞にかけて拡張したクリステをもつ発達したミトコンドリアが多

く観察された。マウス胚同様、呼吸量の増加とミトコンドリアの発達が密接に関連していることが示唆された。

### D. 考察

本研究では、マウス胚およびヒト胚（余剰胚）の呼吸量測定に初めて成功した。これまでにウシ胚の呼吸量測定には成功しているが、マウス胚やヒト胚はウシ胚と比べて小型であり呼吸活性も低い可能性があることから、ウシ胚の呼吸測定用に開発された「受精卵呼吸測定装置」による呼吸測定には若干の困難が予想された。しかしながら、マウスおよびヒトの初期胚において安定した呼吸量の測定ができたことから、「受精卵呼吸測定装置」は感度面・操作性において極めて汎用性の高い測定システムであることが示された。

今回の研究により、マウス胚およびヒト胚において呼吸量の増加とミトコンドリアの発達が一致することが示された。これはウシ胚と同様の結果であることから、マウス胚およびヒト胚においても「受精卵呼吸測定装置」はミトコンドリア呼吸を高精度で検出できることを示唆している。ミトコンドリア呼吸機能と胚の品質が密接に関係していることから、「受精卵呼吸測定装置」を用いたマウス胚、ヒト胚の品質評価が十分可能であると考えられる。

今年度の研究成果を踏まえ、「受精卵呼吸測定装置」を用いたマウス胚およびヒト胚の品質評価法を開発するためには、(1) 生物学的解析による呼吸計測の有効性検証、(2) 胚の培養試験等による有効性・安全性の検証、(3) 異なる培養条件下で発生した胚の呼吸能解析と培養液の性能評価試験、などの課題解決が必要であると考えられる。

### E. 結論

今年度の研究により以下の結論に達した。

- (1) 電気化学計測技術を基盤とする「受精卵呼吸



測定装置」は、単一のマウス胚およびヒト胚の呼吸測定が可能であった。

(2) 「受精卵呼吸測定装置」は、高精度でミトコンドリア呼吸活性をモニタできることが示された。

(3) 呼吸活性を指標とするマウス胚およびヒト胚の品質評価システム開発のための基盤構築ができた。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Abe H., Hoshi H. Morphometric and ultrastructural changes in ciliated cells of the oviductal epithelium in prolific Chinese Meishan and Large White pigs during the estrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals* Vol. 43 66-73, 2008

(2) 那須 恵、熊迫陽子、後藤香里、宇津宮隆史、荒木康久、横尾正樹、阿部宏之 電気化学的呼吸能計測によるヒト胚のクオリティ評価 産婦人科の実際 Vol. 57, No. 2 289-294, 2008

(3) Utsunomiya T., Goto K., Nasu M., Kumasako Y., Araki Y., Yokoo M., Itoh-Sasaki T., Abe H. Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy *Journal of Mammalian Ova Research* Vol. 25, 2-7, 2008

(4) Abe H., Yokoo M., Itoh-Sasaki T., Nasu M., Goto K., Kumasako Y., Araki Y., Shiku H., Matsue T., Utsunomiya T. Measurement of the respiratory activity of single human embryos by scanning electrochemical microscopy *Transactions of the Materials Research Society of* Vol. 33, No. 3, 759-762, 2008

(5) Yokoo M., Itoh-Sasaki T., Shiku H., Matsue T., Abe H. Multiple analysis of respiratory activity in the identical oocytes by applying scanning electrochemical microscopy *Transactions of the Materials Research Society of* Vol. 33, No. 3, 763-766, 2008

(6) Hirobe T., Ishizuka K., Ogawa S., Abe H. Mitochondria are well developed in pink-eyed dilution melanoblasts in the neonatal mouse epidermis *Zoological Science* Vol. 25, 1057-1065, 2008

### 2. 学会発表

(1) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、宇津宮隆史、

荒木康久、横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、阿部宏之 (2008) 走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用いたヒト胚の呼吸能測定の臨床的有用性、日本生殖医学会九州支部会(福岡市、エルガーラホール、2008年4月27日)

(2) 伊達安基、高野真一郎、伊藤-佐々木隆広、横尾正樹、珠玖仁、阿部宏之、末永智一 (2008) 電気化学マイクロデバイスを用いたマウス初期胚の呼吸評価、第69回分析化学検討会(名古屋市、名古屋国際会議場、2008年5月15-16日)

(3) 阿部宏之 (2008) 電気化学センシング技術を基盤とする家畜受精卵呼吸計測システムの開発と応用、山形大学農工連携プロジェクト第1回情報交換会(米沢市、山形大学工学部、2008年5月16日)

(4) 阿部宏之 (2008) 新しい培養評価法 -受精卵呼吸解析による培養液の性能評価について-、第49回日本哺乳動物卵子学会(名古屋市、名古屋国際会議場、2008年5月17-18日)

(5) 青野展也、杉村智史、菊地裕幸、田中孝幸、横尾正樹、阿部宏之、吉田仁秋、佐藤英明 (2008) 体外成熟卵子のミトコンドリア機能解析、第49回日本哺乳動物卵子学会(名古屋市、名古屋国際会議場、2008年5月17-18日)

(6) 村川晴生、青野展也、鈴木麻美、田中孝幸、菊地裕幸、加茂野倫子、岩佐由紀、吉田英宗、吉田仁秋、伊藤-佐々木隆広、横尾正樹、阿部宏之 (2008) ヒトIVM-IVFにおける走査型電気化学顕微鏡の未成熟卵子評価への応用、第49回日本哺乳動物卵子学会(名古屋市、名古屋国際会議場、2008年5月17-18日)

(7) 横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、阿部宏之 (2008) マウス卵成熟および胚発生過程におけるCytochrome c oxidase遺伝子の発現変化、第49回日本哺乳動物卵子学会(名古屋市、名古屋国際会議場、2008年5月17-18日)

(8) 服部裕充、中条友紀子、熊谷志麻、中西千佳子、京谷利彦、滝沢妙花、太田奈里子、安田師仁、土信田雅一、菅藤哲、阿部宏之、荒木康久、京野廣一 (2008) 頭部円形精子(globozoospermia)を用いたICSIによる凍結融解胚盤胞移植を行って妊娠に至った1例、第49回日本哺乳動物卵子学会(名古屋市、名古屋国際会議場、2008年5月17-18日)

(9) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、宇津宮隆史、荒木康久、横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、阿部宏之 (2008) 走査型電気化学顕微鏡を用いたヒト胚の呼吸量測定の臨床的有用性、第49回日本哺乳動物卵子学会(名古屋市、名古屋国際会議場、2008年5月17-18日)

(10) 横尾正樹、木村直子、伊藤-佐々木隆広、珠玖仁、末永智一、阿部宏之 (2008) 老化(エイジング) 卵子のミトコンドリア機能解析～高年齢化する生殖医療の発展をめざして～、第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台市、仙台国際センター、2008年5月19日)

(11) 杉村智史、横尾正樹、山中賢一、阿部宏



- 之、佐藤英明 (2008) 電気化学的単一細胞呼吸能解析システムを利用した体細胞核移植胚のミトコンドリア機能解析、第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台市、仙台国際センター、2008年5月19日)
- (12) 高野真一郎、伊達安基、横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、珠玖仁、阿部宏之、末永智一 (2008) 電気化学的測定法に基づくマウス初期胚呼吸量測定チップの開発と評価、第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台市、仙台国際センター、2008年5月19日)
- (13) Abe H. (2008) Evaluating the embryo quality with a non-invasive and highly sensitive measurement of respiration activity by scanning electrochemical microscopy. The Korean Society of Embryo Transfer 2008, Korea, May 23, 2008)
- (14) Yamashiro H., Toyomizu M., Kikusato M., Han Y.-J., Yokoo M., Abe H., Hoshino Y., Sato E. (2008) Exogenous lactate and adenosine triphosphate in extender solution regulates the oxidative activity and enhanced the freezability of rat epididymis sperm. Conference and Exhibition 2008, The Society for Reproduction and Fertility (Edinburgh, UK, June 29-July 1, 2008)
- (15) 阿部宏之、横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、珠玖仁、末永智一、那須恵、後藤香里、熊迫陽子、宇津宮隆史 (2008) 電気化学的細胞呼吸計測技術を応用したヒト胚品質評価の試み：文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究 領域会議・第6回ライフサイエンスシンポジウム (大阪市、大阪大学・銀杏会館、2008年6月26-27日)
- (16) 珠玖仁、高橋康史、山川剛史、岡崎大輔、阿部宏之、横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、神原秀記、末永智一 (2008) 単一細胞由来mRNA回収マイクロプローブの開発：文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究 領域会議・第6回ライフサイエンスシンポジウム (大阪市、大阪大学・銀杏会館、2008年6月26-27日)
- (17) Murakawa H., Aono N., Kikuchi H., Tanaka T., Yokoo M., Abe H., Yoshida H., Yoshida H. (2008) Oxygen consumption fluctuation of human cumulus-oocyte complexes probed by scanning electrochemical microscopy during a in vitro maturation. The 24th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Barcelona, Spain, 6 to 9 July 2008.
- (18) 阿部宏之 (2008) 異分野融合研究による生殖細胞呼吸能解析システムの開発と応用、第7回山形大学生命・環境科学交流セミナー (山形市、山形大学理学部、2008年7月10日)
- (19) 伊達安基、横尾正樹、佐々木隆広、珠玖仁、阿部宏之、末永智一 (2008) マウス初期胚の呼吸評価を目的とした電気化学マイクロデバイスの開発、平成20年度東北支部分析化学若手交流会 (仙台市、秋保リゾート ホテルクレセント・東北大学青葉記念会館、2008年7月18-19日)
- (20) Sugimura S., Yokoo M., Yamanaka K., Abe H., Sato E. (2008) Evaluation of mitochondrial function in porcine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. The 1st Chungbuk National University-Tohoku University Joint Seminar on Animal Reproduction, Chunbuk National University Korea, July 22-23, 2008.
- (21) 伊藤-佐々木隆広、横尾正樹、阿部宏之 (2008) マウス胚発生過程におけるCytochrome c oxidase遺伝子の発現解析、日本動物学会平成20年度東北支部大会 (盛岡市、プラザおでって・盛岡市観光文化交流センター、2008年7月26日)
- (22) 横尾正樹、杉村智史、佐藤英明、阿部宏之 (2008) プタ体外受精胚の呼吸活性と胚発生成能、日本動物学会平成20年度東北支部大会 (盛岡市、プラザおでって・盛岡市観光文化交流センター、2008年7月26日)
- (23) 高野真一郎、伊達安基、伊藤-佐々木隆広、横尾正樹、珠玖仁、阿部宏之、末永智一 (2008) マウス初期胚の電気化学的呼吸活性評価チップの開発、第20回生体機能関連化学若手の会サマースクール (宮城県白石市、小原温泉 かつらや、2008年8月6-7日)
- (24) Goto M., Abe H., Ito-Sasaki T., Goto M., Inagaki A., Fujimoto K., Kurokawa Y., Matsue T., Satomi S. (2008) A novel predictive method for assessing the quality of isolated pancreatic islets using a scanning electrochemical microscopy. The XXII International Congress of The Transplantation Society (Sydney, Australia, August 10-14, 2008)
- (25) 村川晴生、青野展也、鈴木麻美、田中孝幸、菊地裕幸、加茂前倫子、岩佐由紀、吉田英宗、吉田仁秋、横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、阿部宏之 (2008) 走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いたヒト未成熟卵子の呼吸能解析、第26回日本受精着床学会総会・学術講演会 (福岡市、福岡国際会議場、2008年8月28-29日)
- (26) 田中孝幸、青野展也、岩佐由紀、加茂前倫子、菊地裕幸、鈴木麻美、村川晴生、吉田英宗、吉田仁秋、伊藤-佐々木隆広、横尾正樹、阿部宏之 (2008) 凍結保存によるヒト分割胚の呼吸能への影響、第26回日本受精着床学会総会・学術講演会 (福岡市、福岡国際会議場、2008年8月28-29日)
- (27) 後藤香里、熊迫陽子、小池恵、宇津宮隆史、荒木康久、横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、阿部宏之 (2008) 走査型電気化学顕微鏡を用いたヒト胚の呼吸量測定に臨床的有用性、第26回日本受精着床学会総会・学術講演会 (福岡市、福岡国際会議場、2008年8月28-29日)
- (28) 杉村智史、横尾正樹、山中賢一、阿部宏



- 之、佐藤英明 (2008) プタSCNT胚盤胞期胚の酸素消費低下を引き起こす要因の解析、第15回日本胚移植研究会大会 (仙台市、泉文化創造センター・イズミティ21、2008年9月4日)
- (30) Abe H. (2008) Evaluating the quality of single human embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of respiration activity by scanning electrochemical microscopy, The 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell-Analysis (Zurich, Switzerland, 2008.9.11-12)
- (31) Sugimura S., Yokoo M., Yamanaka K., Abe H., Sato E. (2008) Mitochondrial function in porcine somatic cell nuclear transferred embryos. The 13th Animal Science Congress of the Asian - Australasian Association of Animal Production Societies, Hanoi - Vietnam September 22-26, 2008.
- (32) 高野真一郎、伊達安基、伊藤-佐々木隆広、横尾正樹、珠玖仁、阿部宏之、末永智一 (2008) マウス初期胚の電気化学的呼吸活性評価デバイスの開発、平成20年度化学系学協会東北大会 (八戸市、八戸工業大学、2008年10月11-13日)
- (33) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、宇津宮隆史、荒木康久、横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、阿部宏之 (2008) 走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いたヒト胚の呼吸量測定の臨床的有用性、第53回日本生殖医学会総会・学術講演会 (神戸市、神戸国際会議場、2008年10月23-24日)
- (34) Kido K., Kumasako Y., Goto K., Kiok M., Utsunomiya T., Abe H. (2008) Clinical efficacy for IVF patients using a new evaluation with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (San Francisco, USA, November 8-12, 2008)
- (35) Abe H., Yokoo M., Kumasako Y., Goto K., Koike M., Utsunomiya T. (2008) Non-invasive and highly sensitive measurement of the respiratory activity of individual human embryos by scanning electrochemical microscopy. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (San Francisco, USA, November 8-12, 2008)
- (36) Hattori H., Nishinaka C., Nakajo Y., Abe H., Araki Y., Kyono K. (2008) Birth following a single vitrified-warmed blastocyst transfer after ICSI using round headed sperm and assisted oocyte activation in a globozoospermic patient. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (San Francisco, USA, November 8-12, 2008)
- (37) 阿部宏之 (2008) 非侵襲的細胞呼吸代謝活性診断システムの開発と臨床応用、東北大学未来医学治療開発センターシンポジウム (仙台市、東北大学医学部・長陵会館、2008年11月17日)
- (38) 阿部宏之、佐田竜一、辻井宏忠、山下祥子、星 宏良 (2009) リポタンパク質添加培地で培養したウシ胚における脂肪滴蓄積：微細構造観察による解析、第24回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (さいたま市、大宮ソニックシティ、2009年1月28-29日)
- (39) Abe H. (2009) Clinical efficacy of quality evaluation of human embryos using a scanning electrochemical microscopy system. International Life Surveyor Symposium (Central Research Laboratory of Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan, January 20-30, 2009)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得 (出願)

- (1) 哺乳動物受精卵の呼吸活性測定方法及びその電気化学デバイス (珠玖仁、末永智一、高野真一郎、伊達安基、齋藤剛史、横尾正樹、伊藤隆広、阿部宏之) 特願 2008-293117、2008年11月。

表 1. マウス胚発生過程における酸素消費量（呼吸量）の変化

発生ステージ	測定胚数	酸素消費量 ( $\times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ )
2細胞	15	$0.21 \pm 0.02$
4細胞	13	$0.29 \pm 0.03$
8細胞	18	$0.32 \pm 0.02$
桑実胚	26	$0.42 \pm 0.04$
胚盤胞	21	$0.59 \pm 0.06$

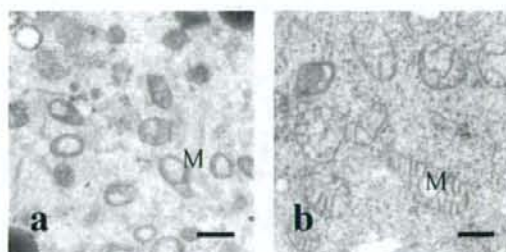


図1. マウス胚のミトコンドリアの微細構造。(a) 2細胞期胚、(b) 胚盤胞。  
M: ミトコンドリア。スケールバーは0.5  $\mu\text{m}$ を示す。

表 2. ヒト胚（余剰胚）の呼吸量変化

胚発生ステージ	測定胚数	酸素消費量 ( $\times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ )
2-8細胞	18	$0.51 \pm 0.05$
桑実胚	5	$0.61 \pm 0.11$
初期胚盤胞	13	$0.72 \pm 0.06$
胚盤胞	4	$1.06 \pm 0.11$



課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

分担課題: 子宮内膜の評価

分担研究者: 浜谷 敏生 (慶應義塾大学医学部 産婦人科 専任講師)

(要約) 体外受精(顕微授精)・胚移植において反復着床不全例に対する治療法開発は急務である。まず我々は、子宮内腔着床環境の評価法開発を目指した。子宮内腔洗浄液中に存在する matrix metalloproteinase (MMP)、CD9、HB-EGF などの内膜由来の液性因子に注目し、それらの分泌量(活性)と妊娠(着床)率との相関を検討することにより、着床因子のバイオマーカーとしての有用性を探索する。今年度は MMP について検討し、MMP のコントロールには抗生剤とプレドニゾンによる内服療法が奏功を示し、妊娠率の改善に導くことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

着床に影響を与える内膜由来因子の検索を目的として、これまでに多数の研究者が着床期特異的に子宮内膜に発現する分子の発見を報告している。しかし、子宮内腔に存在する液性因子を検討した報告は非常に少ない。そこで、着床に向けた子宮内腔環境を評価するために、我々は子宮内腔洗浄液中に含まれる子宮内膜由来の液性因子に注目した。Inagaki らは、16 例の反復着床不全例に対し、子宮内腔洗浄液中の MMPs 活性が高いことを報告している(Inagaki N et al, Hum Reprod 2003;18(3):608-615)。そこで今年度は、まず MMPs (MMP2 および MMP9) 活性と妊娠率について、症例数を増やして検討を加えた。次に、CD9、HB-EGF について、それらの分泌量と妊娠率について検討を進める。

#### B. 研究方法

平成16年1月から平成20年6月までの5年間で、体外受精あるいは顕微授精とそれに続く胚移植を行い、形態良好胚(採卵後培養3日目に6細胞以上に分割しておりVeeck分類でG1~G2、あるいは5日目にGardner分類3BB以上)を2回以上移植しても妊娠に至らなかった症例で、子宮内腔環境を

評価するため子宮内腔洗浄液を採取した症例は642例であった。そのうち、他院から子宮内腔環境検査目的で来院され、その後の妊娠予後が不明である症例、子宮内腔環境検査後に胚移植を未施行あるいは1回しか施行していない症例を除外した549例を対象とした。子宮内腔洗浄液の分析とともに、その後の胚移植(2回以上)における妊娠率を検討した。

子宮内腔洗浄液の採取に際しては、非刺激周期の黄体中期に、腔内消毒後子宮頸部より10Fr吸引チューブを挿入し、子宮内腔を生理食塩水5mlで洗浄(flushing)後、吸引して回収する。回収液は、1500rpm、10分間の遠心により細胞を沈降させた後、上清を-80℃で保存した。

子宮内腔洗浄液の分析としては、最初に MMP について zymography による半定量を行った(Inagaki N et al, Hum Reprod 2003;18(3):608-615)。子宮内腔洗浄液は、ゼラチン(1mg/ml)加・ポリアクリルアミド・ゲルを用いて電気泳動後、ゲルを0.7% CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O / 50mM ZnCl<sub>2</sub>加・トリスバッファー中で37℃、48時間インキュベートした後、Coomassie Brilliant Blue 染色した。青色の背景の中で、MMP 蛋白のバンドが酵素活性に応じて白く抜けて観察された(図1)。ポジティブ・コントロール (pro-MMP2, active-MMP2,