

2009/2025A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業
(ナノメディシン研究)

超高感度電気化学イメージング技術を応用し
たヒト生殖細胞クオリティ診断装置の開発
に関する研究
(H21-ナノ-一般-001)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 宏之

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

超高感度電気化学イメージング技術を応用したヒト生殖細胞 クオリティー診断装置の開発に関する研究	-----	1
阿部 宏之		

II. 分担研究報告

1. 超高感度マイクロ電極の開発に関する研究	-----	11
末永 智一		
2. ヒト胚・卵子の評価に関する研究	-----	15
吉野 修		
3. 体外受精胚の培養に関する研究	-----	18
藤本 晃久		
4. 卵子の分子生物学的解析に関する研究	-----	23
浜谷 敏生		
5. 電気化学的呼吸量測定技術の有効性・安全性に 関する研究	-----	28
横尾 正樹		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	35
-----------------	-------	----

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

(ナノメディシン研究)

平成21年度 総括研究報告書

超高感度電気化学イメージング技術を応用したヒト生殖細胞 クオリティー診断装置の開発に関する研究

主任研究者 阿部 宏之 山形大学大学院理工学研究科・教授

研究要旨

本研究事業では、超高感度電気化学イメージング技術を応用した「臨床対応型生殖細胞呼吸測定装置」を開発し、呼吸活性を指標とする新しいヒト生殖細胞クオリティー診断法の確立を目的とする。電気化学イメージング法は、生物活動によって生じる電気化学的現象をマイクロ電極により高感度でモニタリングできる有効な技術である。これまでに、マイクロ電極をプローブとする走査型電気化学顕微鏡を応用した細胞呼吸測定技術を確立している。本研究は、電気化学イメージング技術によりミトコンドリア呼吸機能を非侵襲的にモニタリングし、呼吸活性を指標にヒトの胚や卵子の活性・クオリティーを評価する点が独創的であり最大の特色である。

本年度は、(1) 走査型電気化学顕微鏡をベースとする「臨床対応型細胞呼吸測定装置」の要素技術開発、(2) 呼吸測定技術の有効性と安全性の生物学的検証、(3) 医療応用のための探索的臨床研究を行った。その結果、(1) では単一胚や卵子の呼吸活性を検出するための高感度マイクロ電極と非侵襲呼吸測定液の基盤技術を確立することができた。(2) では、ウシ胚及びマウス胚を用いた動物実験により、呼吸測定による胚クオリティー評価の有効性と、電気化学的呼吸計測技術の安全性が示唆された。(3) では、ヒト余剰胚の呼吸活性測定に成功した。

本研究で開発を目指す「ヒト生殖細胞クオリティー診断システム」は、卵子や胚のクオリティーの正確な評価を可能とし、生殖補助医療技術の標準化に大きく貢献する。また、クオリティー良好胚の効率的選択と培養が可能になることで単一胚の移植が普及し、複数胚移植によって起こる多胎妊娠を防ぐことも可能となり、母体への身体的負担や医療費負担の軽減などの波及効果が期待できる。本研究事業は、不妊治療技術の向上に大きく寄与するとともに、少子化対策など厚生労働行政への貢献も大きい。

分担研究者氏名・所属施設名及び職名

末永智一（東北大学・大学院環境科学研究科・教授）

吉野 修（東京大学・医学部産婦人科・特任研究員）

藤本晃久（東京大学・医学部産婦人科・助教）

浜谷敏生（慶應義塾大学・医学部産婦人科・専任講師）

横尾正樹（秋田県立大学・生物資源科学部・准教授）

A. 研究目的

生殖医療技術は目覚ましい進歩を遂げているが、体外受精や顕微授精などの先端的治療技術を用いても治療成功率は 20%程度にとどまっている。この原因として治療に供する卵子や胚の品質（クオリティー）評価の精度に問題があると考えられている。現在、不妊治療に供する卵子や胚の品質は形態的に判定されているが、この方法は判定基準が客観性に欠けるため卵子や胚の品質を厳密に判定することは困難である。卵子や胚の品質は胚移植後の妊娠率に大きく影響することから、治療成績の向上には客観的で精度の高いクオリティー評価法の開発が不可欠である。本研究事業では、超高感度電気化学イメージング技術を応用した「臨床対応型生殖細胞品質診断装置」を開発し、世界的にも例の無い呼吸活性を指標とする独創的発想に基づくヒト生殖細胞クオリティー診断法の開発を目的とする。

本年度は、走査型電気化学顕微鏡を応用した「臨床対応型細胞呼吸測定装置」を開発し、呼吸活性を指標とする生殖細胞クオリティー評

価法を確立するために、(1) 超高感度マイクロ電極、非侵襲呼吸測定液、多検体測定プレートなどの要素技術の開発、(2) 呼吸測定技術の有効性と安全性の生物学的検証、(3) 医療応用のための探索的臨床研究を行った。

B. 研究方法

(1) 生殖細胞呼吸測定システムの開発

(a) 超高感度マイクロ電極の開発：酸素消費量を計測するための針状マイクロ電極を操作する電極走査法とマイクロ電極を計測チップに固定化した電極固定法を比較検討することで、単一胚の呼吸計測に必要な電極サイズの特定制を試みた。針型電極のサイズ（直径）を変化させ、受精卵サンプルの近傍の酸素濃度勾配を測定し、電極側及びサンプル側の酸素消費量を見積もった。受精卵の呼吸測定には、走査型電気化学顕微鏡を改良した「受精卵呼吸測定装置(HV-403)」を用いた。特定されたサイズの白金電極を作製するために、電解エッチングによる研磨とマイクロフォージを用いた熱封止法を検討した。

(b) 非侵襲測定液の開発：(a) で作製したマイクロ電極を用いて、異なる組成の培養液中での電極性能を評価した。種々の受精卵培養液を用いて、酸素還元条件下での電流値を測定し、培地組成の電極感度や細胞呼吸活性への影響の有無を調べた。

(c) 多検体測定プレートの開発：医療現場での臨床応用に対応した多検体測定プレートを開発するために、プレートの素材、試料保持のためのマイクロウェルの形状等を検討した。

(d) 呼吸解析ソフトの開発：球面拡散理論に基づいて作成した呼吸解析ソフトの改良を行った。特に、ディスプレイ画面の視認性の向上、計測データの解析精度を向上させるためのバックグランド補正機能の開発を行った。

(e) 細胞呼吸測定システムの開発：走査型電気化学顕微鏡をベースに、(a)～(d)の要素技術をシステム化した「細胞呼吸測定装置」の製作を行った。

(2) 呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

細胞呼吸測定装置を用いて、ウシ胚の発生過程における呼吸能変化を解析し、呼吸測定装置の有効性を科学的に検証した。屠体雌牛卵巣より回収した未成熟卵子をIVMD101無血清培地で体外成熟させた後、体外受精により胚を得た。胚は、IVD101無血清培地を用いて、5% O₂/5% CO₂/90% N₂、38.5℃の低酸素条件下で培養した。2細胞、4細胞、8細胞期、桑実胚、胚盤胞の発生ステージの胚をそれぞれ回収し実験に供した。胚の呼吸量は、(1-e)で製作した「細胞呼吸測定装置」を用いて測定した。呼吸測定装置専用に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、マイクロ電極をZ軸方向に(31.0 μm/sec、160 μm)3回走査し試料の酸素消費量(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、透過型電子顕微鏡により微細構造を観察した。

(3) ヒト生殖細胞への応用

不妊治療における臨床応用のための基礎データ収集を目的にヒト余剰胚の呼吸量測定を試みた。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。

C. 研究結果

(1) 生殖細胞呼吸測定システムの開発

(a) 超高感度マイクロ電極の開発：電極走査方式における検知電極に許容される電流値の評価を検討した。許容される検知電極のサイズを酸素還元電流値の上限で規定する方法を考案し数式化した結果、単一受精卵の呼吸計測に有効である実用上の検知電極のサイズ(直径)は2~5 mmに相当することが分かった。この結果を基に、先端径2~5 mmのマイクロ電極を作製するための方法を検討した結果、電解エッチング法と熱封止法が有効であることが示された。この方法により試作したマイクロ電極を用いて、酸素還元条件下(-0.6V荷電下)での電流値を測定した結果、検出された酸素還元電流値は-0.8~-1.0 nAであった。

(b) 非侵襲測定液の開発：種々の受精卵培養液を用いてマウス胚の呼吸量を測定し、マイクロ電極の測定感度に対する培養液組成の影響を調べた。その結果、培養液によってマイクロ電極の測定感度が異なる

ことが明らかになった。特に、ヒト受精卵の培養に用いられているHTF培地を基本とする培地組成が高感度呼吸測定に有効であることが明らかになった。

(c) 多検体測定プレートの開発：試料をマイクロウェル内に静置するだけで呼吸量を測定することができる多検体測定プレートを製作した。素材は、ポリエチレン製のプレートが視認性と耐久性に優れ、マイクロウェルの形状は円錐形が最も試料の固定とマイクロ電極の視認性が良好であった。これらの検討結果を踏まえ、底面に6個の円錐形マイクロウェルを施した多検体プレートを製作した。

(d) 呼吸解析ソフトの開発：従来の球面拡散理論式をベースに開発された呼吸解析ソフトに新たにマイクロウェルでの呼吸解析用モードを追加するとともに、測定や解析時に頻繁に用いるクリックボタンの大型化により、視認性と操作性の向上を実現した。

(e) 細胞呼吸測定システムの開発：走査型電気化学顕微鏡（北斗電工(株)製）をベースに(a)～(d)の要素技術をシステム化した「細胞呼吸測定装置」を製作した。従来の走査型電気化学顕微鏡システムと比べて、大幅な操作性の改善が認められた。試料の設置から測定・解析まで3分以内で完了することができた。

(2) 呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

研究項目(1)で製作した走査型電気化学顕微鏡システムを用いて、ウシ胚の発生過程における呼吸能変化を解析し、呼吸測定

装置の有効性を科学的に検証した。その結果、ウシ胚の呼吸量は、8細胞までの発生初期では低い値 ($0.45-0.46 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) 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。桑実胚から胚盤胞期にかけて有意な呼吸量の増加が測定され ($1.03-1.86 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)、孵化胚盤胞において最も高い呼吸活性値が計測された ($3.01 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)。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。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致することが示された。また、マウスを用いた胚移植試験を実施した結果、呼吸活性の高い胚は妊娠する確率が高く、誕生した産子も正常であることが示された。以上の結果から、走査型電気化学顕微鏡をベースに開発した細胞呼吸測定装置はミトコンドリア呼吸活性を高感度・非侵襲的に計測できる装置であることが示された。

(3) ヒト生殖細胞への応用

不妊治療における臨床応用のための基礎データ収集を目的に、ヒト余剰胚の呼吸量測定を試みた。異なる発生ステージの胚の呼吸量を測定した結果、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 ($0.61-1.06 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)。この

結果から、電気化学計測技術はヒト胚の呼吸量測定に有効であることが示された。また、臨床現場での装置の使用を目的に測定操作の向上を試みた。マイクロ電極装着部にマニピレーター用のジョイント部品を追加することで、マイクロ電極の視認性が向上し、電極破損の頻度が減少することが示された。

D. 考察

本年度は、3年計画の初年度として、(1) 細胞呼吸測定技術及び装置の開発(工学系)、(2) 測定装置の有効性・安全性の検証(生物系)、(3) 探索的臨床研究(医学系)のセクションに分かれて研究を行った。各研究項目においては、計画通りの研究が行われ、今後の研究を進める上で十分な研究成果が得られた。また、各セクション間の密な連携によるデータの検証も十分に行われた。これは、本研究事業の研究チーム構成が十分機能した結果であると考えている。これまで本研究グループは、細胞呼吸に関する電気化学的計測や生物学的研究を総合的に展開しており、基礎研究や技術的研究成果の蓄積も多く、国際的な視野からみても当該分野において最も高い研究水準にある。さらに、生物系と工学系を融合した研究により生み出された成果を医療に応用する点が大きな特徴であり、当該分野では他に研究例はなく本研究事業の最大の特色であり独創的な点である。このように本研究事業は、我が国における異分野融合・医工連携の理想

的な雛形になると確信する(添付図)。

E. 結論

(1) マイクロ電極や非侵襲測定液など、「臨床対応型細胞呼吸測定装置」を開発するための基盤技術を確立することができた。

(2) 動物実験により、電気化学イメージング技術を応用した細胞呼吸測定技術はミトコンドリア呼吸機能解析に有効であり、非侵襲的な測定技術であることが示された。

(3) ヒト余剰胚の呼吸量測定に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表論文

1. 論文発表

(1) Sugimura S., Yokoo M., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., Nagai T., Abe H., Sato E. (2010) Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. Cellular Reprogramming, in press.

(2) Kimura N., Tsunoda T., Iuchi Y., Abe H., Totsukawa K., Fujiii J. (2010) Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developing stages of the embryos from SOD1-deficient mice. Molecular Human Reproduction, in press.

(3) 後藤香里、小池恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2010) 電気化学

的呼吸計測技術におけるヒト胚クオリティ
ー評価と安全性、受精着床学会雑誌、Vol.
27, No. 1, 53-58.

- (4) Sakagami N., Yamamoto T., Akiyama K., Nakazawa Y., Kojima N., Nishida K., Yokomizo S., Takagi Y., Abe H., Suzuki C., Yoshioka K. (2010) Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulanfims. *J. Reprod. Dev.*, 56 (2), 279-284.
- (5) Yamashiro H., Toyomizu M., Kikusato M., Toyama N., Sugimura S., Hoshino Y., Abe H., Moisyadi S., Sato E. (2010) Lactate and adenosine triphosphate in extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 49:160-166.
- (6) Kyono K., Nakajo Y., Nishinaka C., Hattori H. Kyoya T., Ishikawa T., Abe H., Araki Y. (2009) A birth from the transfer of a single vitrified-warmed blastocyst using ICSI with calcium ionophoreoocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil. Steril.*, 91: e7-e11.
- (7) Shiku H., Yamakawa T., Nashimoto Y., Takahashi Y., Torisawa Y., Yasukawa T., Ito-Sasaki T., Yokoo M., Abe H., Kambara H., Matsue T. (2009) A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids. *Anal. Biochem.*, 385: 138-142.
- (8) Murakawa H., Aono N., Tanaka T., Kikuchi H., Yoshida H., Yoshida H., Yokoo M., Abe H. (2009) Morphological evaluation and measurement of the

respiration activity of cumulus-oocyte complexes to assess oocyte quality. *J. Mamm. Ova Res.*, 26: 32-41.

- (9) 阿部宏之 (2010) 胚の機能検定法、カラーアトラス不妊治療のための卵子学、鈴木秋悦編、医歯薬出版、p. 127-131.
- (10) 阿部宏之 (2010) 電気化学計測技術を応用したシングルセル呼吸機能解析と応用、シングルセル解析の最前線、監修：神原秀記、松永是、植田充美、シーエムシー出版、103-111.

2. 学会発表

- (1) 阿部宏之 (2009) 生殖細胞呼吸活性測定のための新規デバイス開発、宇宙環境における生殖・継世代研究の展開WG談話会（宇宙生殖WG2009年会）（東京都、東京大学教養学部、2009年12月26日）
- (2) 阿部宏之、熊迫陽子、後藤香里、小池恵、城戸京子、宇津宮隆史 (2009) 電気化学計測技術を応用したヒト胚クオリティー評価、第19回日本MRS学術シンポジウム（横浜市、横浜市開港記念会館、2009年12月7-9日）
- (3) 高野真一郎、伊達安基、伊藤-佐々木隆広、横尾正樹、伊野浩介、珠玖仁、阿部宏之、末永智一 (2009) マウス胚呼吸活性評価のための電気化学マイクロデバイスの開発、第19回日本MRS学術シンポジウム（横浜市、横浜市開港記念会館、2009年12月7-9日）
- (4) 後藤香里、熊迫陽子、小池恵、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2009) 選択的単一胚移植 (eSET) において移植胚選別困難例に対する呼吸量測定

- の有用性、第 54 回日本生殖医学会総会・学術講演会（金沢市、石川県立音楽堂・ANA クラウンプラザホテル金沢、2009 年 11 月 22-23 日）
- (5) Utsunomita T., Kumasako Y., Goto K., Koike M., Araki Y., Abe H. (2009) Clinical efficacy of a novel evaluation method with measurement of embryo respiration activity using a scanning electrochemical microscopy. The 65th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (Atlanta, USA, October 17-21, 2009)
- (6) Tanaka T., Aono N., Yokoo M., Abe H., Yoshida H. (2009) Effect of vitrification on metabolism of human embryo. The 65th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (Atlanta, USA, October 17-21, 2009)
- (7) 阿部宏之、横尾正樹、熊迫陽子、後藤香里、小池恵、宇津宮隆史 (2009) 電気化学計測技術を応用したヒト胚クオリティー評価、第 47 回日本生殖医学会東北支部総会学術講演会（山形市、山形大学医学部・山形医学交流会館、2009 年 10 月 10 日）
- (8) 阿部宏之、齋藤剛史、横尾正樹、珠玖仁、末永智一 (2009) 超高感度細胞呼吸計測技術を応用した単一卵子呼吸能解析、第 80 回日本動物学会（静岡市、静岡コンベンションアーツセンターグランシップ、2009 年 9 月 17-20 日）
- (9) 阿部宏之 (2009) 電気化学計測技術を応用した受精卵品質評価システムの開発と医療応用、産学連携交流会（山形市、山形国際ホテル、2009 年 9 月 17 日）
- (10) 田中俊幸、青野展也、岩佐由紀、加茂野倫子、菊地裕幸、鈴木麻美、村川晴生、吉田英宗、横尾正樹、阿部宏之、吉田仁秋 (2009) 呼吸量測定による凍結・融解胚の Quality 評価、第 12 回日本 IVF 学会（仙台市、仙台江陽グランドホテル、2009 年 9 月 12-13 日）
- (11) 阿部宏之 (2009) 電気化学計測技術を応用した受精卵品質評価システムの開発と医療応用、山形大学工学部 100 周年記念フォーラム（米沢市、伝国の杜、2009 年 9 月 4 日）
- (12) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2009) 走査型電気化学顕微鏡を用いた胚品質評価の選択的単一胚移植 (eSET) への臨床的有用性、第 27 回日本受精着床学会総会・学術講演会（京都市、国立京都国際会館、2009 年 8 月 6-7 日）
- (13) 阿部宏之 (2009) 呼吸活性から見た胚の選別、第 27 回日本受精着床学会総会・学術講演会（京都市、国立京都国際会館、2009 年 8 月 6-7 日）
- (14) 田中俊幸、青野展也、岩佐由紀、加茂野倫子、菊地裕幸、鈴木麻美、村川晴生、吉田英宗、横尾正樹、阿部宏之、吉田仁秋 (2009) 多前核胚の呼吸能解析、第 27 回日本受精着床学会総会・学術講演会（京都市、国立京都国際会館、2009 年 8 月 6-7 日）
- (15) 横尾正樹、伊藤・佐々木隆広、珠玖仁、末永智一、阿部宏之 (2009) 呼吸活性を指標とした胚の品質評価：マウス胚着床試験の成績と産子の正常性について、第 27 回日本受精着床学会総会・学術講演会（京都市、国立京都国際会館、2009 年 8 月 6-7 日）

- (16) 阿部宏之 (2009) ヒト胚を用いた走査型電気化学顕微鏡 (SECM) による呼吸測定 of 臨床的有用性、第 6 回 A-PART 日本支部・第 3 回 Minimal Stimulation 研究会合同学術講演会 (東京都、都市センターホテル、2009 年 5 月 30-31 日)
- (17) 阿部宏之 (2009) 超高感度細胞呼吸測定装置の開発と医療応用、第 7 回 ミキシングコンファレンス in 米沢 (米沢市、伝国の杜、2009 年 5 月 29 日)
- (18) Kasai S., Numata T., Shiku H., Abe H., Matsue T., Niizeki Y. (2009) Real-time monitoring of oxygen consumption during differentiation of human monocyte cell lines (THP-1) by scanning electrochemical microscopy. 215th The Electrochemical Society Meeting (San Francisco, USA, May 24-29, 2009)
- (19) 阿部宏之、珠玖仁、青柳重夫、宇津宮隆史、末永智一、星宏良 (2009) 電気化学計測技術を応用した超高感度細胞呼吸計測装置の開発と医療応用、日本組織培養学会第 82 回大会 (栃木県下都賀郡、獨協医科大学、2009 年 5 月 18-19 日)
- (21) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、荒木康久、横尾正樹、阿部宏之 (2009) 走査型電気化学顕微鏡を用いた胚品質評価の選択的単一胚移植 (eSET) への臨床的有用性、第 50 回日本哺乳動物卵子学会 (東京都、都市センターホテル、2009 年 5 月 8-9 日)
- (21) 横尾正樹、木村直子、珠玖仁、末永智一、阿部宏之 (2009) 母体の加齢が卵子のミトコンドリア機能に及ぼす影響、第 50 回日本哺乳動物卵子学会 (東京都、都市センターホテル、2009 年 5 月 8-9 日)
- (22) 角田智志、木村直子、阿部宏之、戸津川清、藤井順逸 (2009) SOD1 欠損マウス胚では内因性酸化ストレスがミトコンドリア機能障害を伴わない 2 細胞期発生停止を引き起こす、第 50 回日本哺乳動物卵子学会 (東京都、都市センターホテル、2009 年 5 月 8-9 日)
- (23) Abe H., Yamashita S., Hoshi H. (2009) Respiratory activity and ultrastructural features of bovine embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. 15th World Congress on In Vitro Fertilization, Geneva, Switzerland, April 19-22, 2009.
- (24) Utsunomiya T., Kumasako Y., Goto K., Koike M., Yokoo M., Abe H. (2009) Clinical efficacy of a novel evaluation method with measurement of embryo respiration activity using a scanning electrochemical microscopy. 15th World Congress on In Vitro Fertilization, Geneva, Switzerland, April 19-22, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

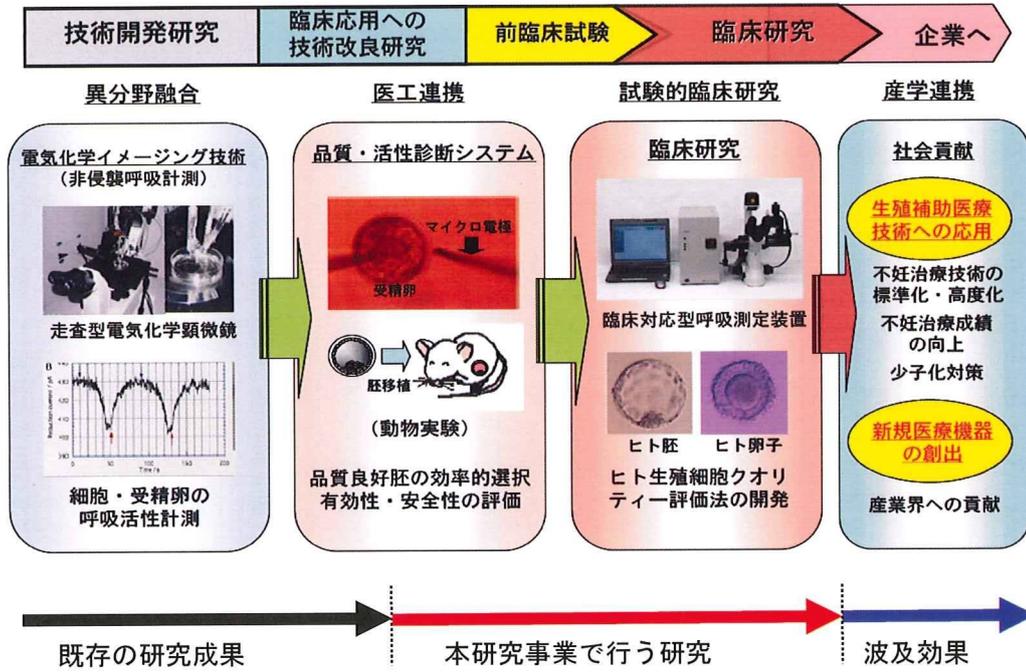
なし

2. 実用新案登録

なし

(添付図)

【研究事業の概要】



我が国における医工連携・異分野融合研究の雛形 !!

Ⅱ 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

超高感度マイクロ電極の開発に関する研究

研究分担者 末永 智一 東北大学大学院環境科学研究科

研究要旨

本研究では、超微細技術を応用し、単一細胞呼吸計測可能な超高感度マイクロ電極を開発する。電極走査方式における、検知電極に許容される電流値の評価を検討した。その結果許容される検知電極のサイズを酸素還元電流値の上限で規定する方法を考案し、数式化した。また、従来法である電極走査型測定システム（受精卵呼吸測定装置）と電極固定型デバイスとを用いて、同一受精卵について呼吸量測定を実施し比較検討した結果、検出電極における酸素消費量が見かけのサンプル呼吸量に影響を与える可能性があることを見出した。さらにこの結果から、一受精卵・卵子の呼吸計測に有効である、実用上の検知電極のサイズ（直径）は2-5 μm に相当することが分かった。

A. 研究目的

発生生物学・生殖工学の重要性は、基礎科学から組換え動物作出、家畜繁殖、医療の現場など多方面に及んでいる。哺乳動物の体外受精・体外培養技術は、バイオテクノロジーのなかでも大きな柱となる領域であり、ヒト不妊治療や家畜の生産、クローン動物やトランスジェニック動物の作出など波及効果も大きい。我々は、哺乳動物（ウシ、マウスなど）初期胚の酸素消費（呼吸）を、マイクロ電極を用いて計測する手法を開発してきた。

本研究では、酸素消費量を計測するための針状マイクロ電極を走査する電極走査法とマイクロ電極を計測チップに固定化した電極固定法の比較検討を行った。また、検出電極のサイズおよび酸素消費量が計測に及ぼす影響についても検討した。

B. 研究方法

針型電極のサイズを変化させ、受精卵サンプル近傍の酸素濃度勾配を測定した。電極側

およびサンプル側の酸素消費量を見積った。電極サイズを制御する方法としては、電解エッチング法、スパッタリング法、収束化イオンビーム（FIB）などを検討した。呼吸量の測定には受精卵呼吸測定装置を用いた（図1）。受精卵およびがん細胞スフェロイドをサンプルとして逆円錐型ウェルの底に静置した。針型電極をサンプル側面に配置し、そこから上方向に160 μm 走査し酸素濃度勾配を記録した。電極電位は-0.6 V vs Ag/AgCl に設定した。

また、石英ガラス基板上に酸素消費量計測するための微小電極アレイ、SiO₂絶縁膜、受精卵サンプル導入用ウェル、受精卵サンプル保持用チャンバー、測定溶液リザーバーを集積化した電気化学チップを作製した。B6C3F1 系統マウスから回収した2細胞期胚を培養して得た胚盤胞について、受精卵呼吸測定用チップを用い、電極の電位を-0.5 V vs. Ag/AgCl に設定し、一定電位を印加したまま、時間に対する酸素還元電流の変化をモニタリングした。

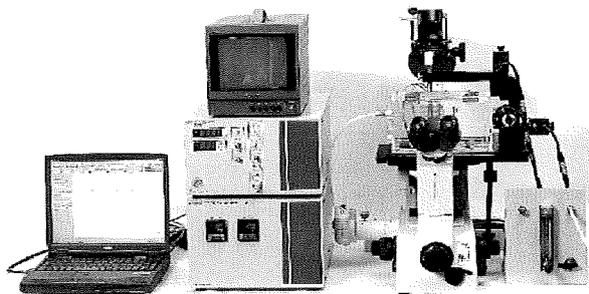


図1 受精卵測定装置 HV403 遺伝子発現

C. 研究結果

従来の受精卵呼吸測定装置(HV-403、ペプチド機能性研究所(株))を用いた電極走査法と電極を固定した受精卵呼吸測定チップとの相関性について、検討を行った。電極走査法においては、針型電極プローブとして、白金マイクロ電極を用いた。また、XYZ ステージ(K701-20RMS、(株)駿河精器)上の電極ホルダーに、電極を固定した。6個の逆円錐型マイクロウェルを有する受精卵呼吸測定用Well((株)北斗電工)に、測定溶液(ERAM2、(株)機能性ペプチド研究所)でウェルを満たし、ウェルの中心にサンプルを配し、測定を行った。測定専用プレートを 37°Cに維持するため、Warm plate (MATS-502NLR、(株)東海ヒット))をXYZ ステージ上に設置した。

サンプルとして、グルタルアルデヒドにより固定化処理を行った胚(Dead 胚=ネガティブコントロール)および体外受精(IVF)によって回収したマウス胚を培養した2細胞期(2-cell)、桑実胚期(Morula)、胚盤胞期(Blastocyst)の異なる発生ステージの胚を用いた。まず、受精卵呼吸測定装置を用いて呼吸量($F^{\text{chip, sample}}$ [mol/s])を測定した。

また、同サンプルを用いて受精卵呼吸測定チップにより呼吸量(F^{well} [mol/s])を測定した。装置の設置場所の都合により、37°Cで保温された細胞培養輸送器(MEA451、Fujihira industry co., Ltd)を用いてサンプルの輸送を

行った。受精卵呼吸測定装置で測定後、10~15 min 程度輸送を行い、輸送後すぐに 37°C、5% CO₂、95% air の条件下の炭酸ガスインキュベーター(Model-9200、Wakenyaku Co., Ltd)中に移動した。なお、測定は室温(24°C±1)で行った。

F^{well} [mol/s]と $F^{\text{chip, sample}}$ [mol/s]との関係を調査した。プロットは比較的直線的であり、 F^{well} [mol/s]と $F^{\text{chip, sample}}$ [mol/s]の間にはある程度の相関性($R=0.32$)が有ることが示された。また、Dead 胚については、 F^{well} [mol/s]、 $F^{\text{chip, sample}}$ [mol/s]共に 0 に近い値を示した。これらのことから、受精卵呼吸測定チップは、受精卵呼吸測定装置と同様に胚の呼吸量を測定できることが示された。しかしながら、 F^{well} [mol/s]の値と $F^{\text{chip, sample}}$ [mol/s]の値とを比較すると、 $F^{\text{chip, sample}}$ [mol/s]の方が大きくなる傾向が見られた。

また、電極サイズが酸素消費量計測に及ぼす影響についても検討した。受精卵呼吸測定チップの電極で観測される酸素還元電流値が大きすぎると、電極の酸素消費が原因でサンプルの酸素消費量を正確に測定できていないことが示されたので、受精卵呼吸測定電極で観測される酸素還元電流値が 1nA 以上を排除したところ、相関係数が大幅に向上した ($R=0.78$)。このことから、電極のサイズとしては、2.5 μm が望ましいことが明らかとなった。

D. 考察

単一受精卵ごとの呼吸活性は、受精卵近傍の酸素濃度プロファイルから拡散方程式に基づき求める。つまり、微小電極を走査する場合に限らず、サンプル-電極間距離が既知であれば、電極固定型デバイスチップを用いても、濃度プロファイルから呼吸量を求めることは可能である。アンペロメトリック酸素センサでは、検出部の電極にて酸素消費が起

り、近傍の酸素濃度勾配は不均一となっている。検出電流値が十分小さければ、サンプル側の濃度プロファイルの乱れは無視することができる。しかしながら、検出電流値が大きくなると、サンプル近傍の濃度プロファイルの乱れが大きくなり、真のサンプル呼吸量、即ちセンサ側の酸素消費がゼロの場合のサンプル呼吸量を求めることができなくなる。検出電極とサンプルの拡散層とのクロスオーバー、およびサンプル由来の酸素消費量への影響を詳細かつ正確に議論するには、拡散方程式のデジタルシミュレーションが有効であると考えられるが、実際に数値あるいは指標を提示する方法論はこれまでほとんど議論されてこなかった。したがって、センサの検出電流値を指標にしたデバイス設計、デバイスデザインの検証、デバイスの作製を試みた例はこれまで報告されていない。

我々が提案する検知電極サイズに係る制限は沖合いにおける酸素還元電流が1 nA以下とする。電極およびサンプルの酸素消費の観点から $A = F^{\text{electrode}} / F^{\text{sample}} < 0.26$ の不等式に変換することが可能であり、許容される検知電極サイズがサンプルの酸素消費量に依存することが分かる。単一受精卵・卵子の呼吸計測に有効である、実用上の検知電極のサイズ(直径)は2.5 μm に相当することが分かった。また、この制限は電極走査方式—電極固定方式の双方に適用可能である。実際に、電極で観測される酸素還元電流値が1nA以下の受精卵呼吸測定チップのみを使用すると、電極走査方式と電極固定方式の相関係数が大幅に向上した ($R=0.78$)。

E. 結論

電極走査方式における、検知電極に許容される電流値の評価を検討した。その結果許容される検知電極のサイズを酸素還元電流値の上限で規定する方法を考案し、数式化した。この条件式は電極走査方式のみならず、電極

固定方式の受精卵呼吸測定方法にも適用可能であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H. Shiku, S. Goto, S. Jung, K. Nagamine, M. Koide, T. Itayama, T. Yasukawa, T. Matsue. Electrochemical Characterization of Enzymatic Activity of Yeast Cells Entrapped in a Poly(dimethylsiloxane) Microwell on the Basis of Limited Diffusion System. *Analyst*, 134, 182-187 (2009).
- (2) H. Shiku, T. Yamakawa, Y. Nashimoto, Y. Takahashi, Y. Torisawa, T. Yasukawa, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, H. Kambara, T. Matsue, A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids. *Anal. Biochem.*, 385, 138-142 (2009).
- (3) Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai, T. Matsue, Electrochemical Detection of Epidermal Growth Factor Receptors on a Single Living Cell Surface by Scanning Electrochemical Microscopy. *Anal. Chem.*, 81 (7), 2785–2790 (2009).
- (4) Y. Takahashi, H. Shiku, T. Murata, T. Yasukawa, T. Matsue, Transfected Single Cell Imaging by Scanning Electrochemical Optical Microscopy with Shear Force Feedback Regulation, *Anal. Chem.* 81, 9647-9681 (2009).
- (5) T. Murata, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, Electrochemical Single-Cell Gene-Expression Assay Combining Dielectrophoretic Manipulation with Secreted Alkaline Phosphatase Reporter

System. *Biosens. Bioelectron.* 25, 913–919 (2009).

(6) H. Shiku, M. Takeda, T. Murata, U. Akiba, F. Hamada, T. Matsue, Development of Electrochemical Reporter Assay Using HeLa Cells Transfected with Vector Plasmids Encoding Various Responsive Elements. *Anal. Chim. Acta*, 640, 87-92 (2009).

(7) K. Y. Inoue, K. Ino, H. Shiku, S. Kasai, T. Yasukawa, F. Mizuntani, T. Matsue, Electrochemical Monitoring of Hydrogen Peroxide Released from Leucocytes on Horseradish Peroxidase Redox Polymer Coated Electrode Chip. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1723-1728 (2010).

2. 学会発表

(1) H. Shiku, T. Yamakawa, D. Okazaki, G. Saito, Y. Date, K. Ino, T. Matsue, Development of multi-functional probes for gene expression analysis at single cell level. *The Sixth International Forum on Post-genome Technologies (IFPT'6)* in Beijing on Sep. 17-18, 2009.

(2) H. Shiku, D. Okazaki, K. Ino, T. Matsue, Quantitative characterization of gene expression at single cell level combining reporter system with RT real-time PCR. *APBioChEC'09*, Kobe, Japan. November 24-28, 2009

(3) H. Shiku, S. Takano, Y. Date, K. Ino, H. Abe, T. Matsue, Monitoring respiration activity of mouse embryo on an integrated electrochemical microdevice. *APBioChEC'09*, Kobe, Japan. November 24-28, 2009

(4) T. Matsue, Detection of Gene

Expression in a Single Living Cell by Scanning Electrochemical Microscopy, 60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Beijing, August16-21, 2009

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

ヒト胚・卵子の評価に関する研究

分担研究者 吉野 修 東京大学産科婦人科教室・特任研究員

研究要旨

酸素消費量による胚の評価法は今後の生殖医療に革新的な情報をもたらすことが期待できる。本年度は、さらにデバイスを使用しやすくするため、装置の改善を行った。

A. 研究目的

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。胚の酸素消費量測定は、低侵襲かつ高感度に胚の機能評価を行うことができるため、今後のヒトにおける不妊治療において重要なツールになることが予想される。

しかし、同測定装置は胚の近傍に微小電極を近づけると非常に微細なものであり、かつ繊細な操作が求められる。今後、一般臨床医の現場で容易に操作できるように操作性の向上を目的に機器に改良を試み、機能性に関して検討を行った。

尚、同検討は山王病院 リプロダクションセンター藤原敏博先生と共同で行った。

B. 研究方法

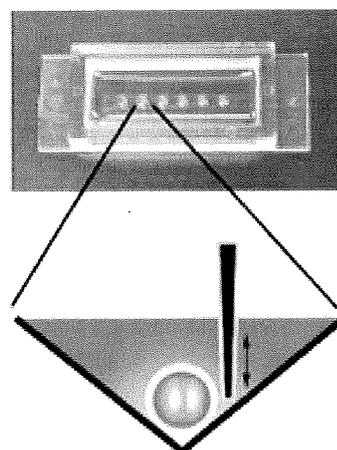
実験1. 微小電極の操作法の改良

・ ヒト胚を用いた検討に関して
ヒト胚を用いる研究に対し東京大学倫理委員会より承認を得ている。患者の同意のもと、検

体を採取して検討を行った。

・これまで、胚の酸素消費量測定は胚を ‘すり鉢状’ の容器に置き、微小電極を上方から少しずつ降ろしてくるという方法をとっている

測定プレート



(図1)。

図1 これまでの微小電極の挿入方向

同法は手技に慣れた技師であれば、胚の近傍まで微小電極を降ろすことができるが、手技に慣れていない者が行くと、電極の先端をすり鉢状容器の壁に当て過ぎてしまい、容易に微小電極を破壊してしまう。その原因として、顕微鏡下に電極を下に降ろす際、電極の先端が視認しづらいことが挙げられる。

そこで、電極を従来の垂直方向より斜めの方向になると考えた。ジョイント部品を追加し、微小電極をすり鉢状の壁に添わせるようにして下方に降ろすこととした。(図2)

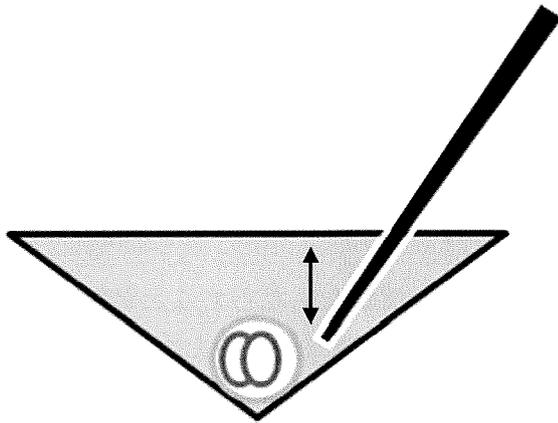


図2 今回検討した微小電極の挿入方向

実験2. 酸素消費量測定位置の検討

微小電極を置く場所を胚にほぼ接する位置

(0)、横軸方向にそれぞれ 50 μm , 100 μm , 200 μm に離し、酸素消費量を測定した。

C. 研究結果 および D. 考察

微小電極をすり鉢状の壁に添わせながら、下方へ動かす操作を行う方法に変えたことで、電極の損傷・破損は全くなくなった。その理由として、

1. 最初から微小電極の先端を顕微鏡で視認することができるようになり、電極と胚の位置関係が理解しやすくなったこと、および
2. 電極が壁に当たった際、これまでであれば直接に電極に力が伝わりやすかったため、その場で電極が損傷してしまうことが多かったが、今回の設定では電極が壁に当たった際に、電極が折れることなく滑るという感覚で壁との接触を認識できるようになったことが挙げられる。電極の損傷が減少したことで、同装置が一般に広く受け入れやすくなることが期待できる。

実験2. 酸素消費量測定位置の検討

から入れることにより、電極の先端が視認し易

今回、微小電極を斜めから胚に近づけることから、従来よりも電極の先端と胚の位置関係において横方向の関係が視認し易くなった。そこで特に電極を置く位置を横方向(X軸方向)に移動し、酸素消費量を測定した。

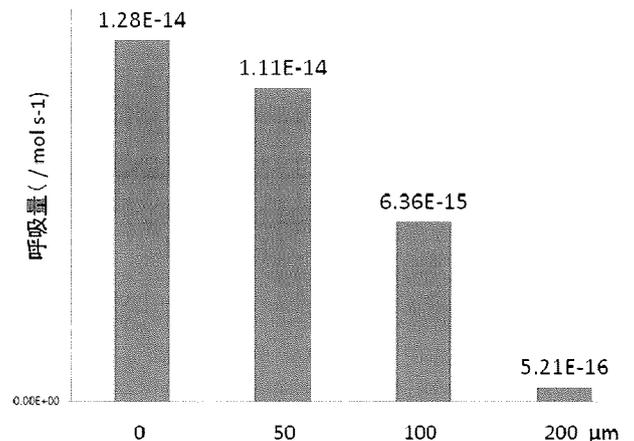


図3 呼吸量と距離

胚から遠ざかるにつれ呼吸量データは減少したことから、胚の呼吸量測定のためには、微小電極はできるだけ胚に近づける必要があることを確認した。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 学会発表

- (1) 第61回日本産科婦人科学会総会(京都) 子宮内膜症における接着因子 CD44 の役割
- (2) 第91回米国内分泌会議 (ワシントン) BMP-6 stimulates gene expression of follicle stimulating hormone receptor, inhibin/activin b subunits and anti-mullerian hormone in human granulosa cells

2. 論文発表

- (1) Hasegawa A, Yoshino O, Osuga Y, Kodama A, Takamura M, Nishii O, Taketani Y. Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model. *Fertil Steril.* (in press)
- (2) Kodama A, Yoshino O, Osuga Y, Harada M, Hasegawa A, Hamasaki K, Takamura M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Takemura Y, Yano T, Taketani Y. Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells. *Hum Reprod.* 2010 Mar;25(3):751-6.
- (3) Takamura M, Koga K, Osuga Y, Takemura Y, Hamasaki K, Hirota Y, Yoshino O, Taketani Y. Post-operative oral contraceptive use reduces the risk of ovarian endometrioma recurrence after laparoscopic excision. *Hum Reprod.* 2009 Dec;24(12):3042-8.
- (4) Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y. Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1794-8.
- (5) 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.* 2010 Mar 1;93(4):1273-9.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし