

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

体外受精胚の培養に関する研究

研究分担者 藤本 晃久 東京大学産科婦人科教室・助教

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。データの誤差をもたらす条件（検者や測定条件）を明確にすることは今後の臨床応用にむけて非常に重要となってくる。本年度は種々の条件下で胚酸素消費量のデータに誤差が生じるかを検討した。

A. 研究目的

女性の社会進出に伴い、女性の妊娠を試みようとする年齢が上昇している現在、不妊治療のニーズが高まっている。特に不妊治療において体外受精は妊娠率の上昇に最も強力な手段である。しかし、一方では多胎妊娠が周産期医療を疲弊させる原因となっている。この流れを受け、体外受精時の胚移植の個数が従来では3個までの胚を子宮に戻すことが許容されていたのに対し、最近では1個のみを子宮に戻すことが主流になっている。体外受精時に多くの症例では複数個の胚を得ることができる。即ち、複数個の胚の中から最も良好な胚を選別することが不可欠となる。しかし、現況では胚の選別方法は肉眼的な観察による非客観的な方法に委ねられている。ある程度の胚の質は肉眼的評価にて判断することは可能であるが、肉眼的評価が一致する複数胚が見られた際、そのうち一つを選別することは判断が難しいことが多々ある。これらの状況を背景とし、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検査になることが期待される。

近年の体外受精は複数の医師、胚培養士等のメディカルスタッフにより営まれている。胚の酸素消費量測定による評価方法は、確かに客観的なデータを得ることができるため、非常に有用なツールに成りうると思われるが、複数のスタッフが胚選別に関与することを鑑み、実際に複数の検者により、同一胚を測定した際の測定誤差は検討されなければならない。また、測定を行う際、データの誤差の原因となる因子は明らかにしなくてはならない。そこで測定時の培養液の量や照明が胚酸素消費量に影響を与えるかについて、ヒト胚を用いて検討した。

B. 研究方法

- ・ 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。

実験 1. 検査師間の測定誤差に関する検討
同一ヒト胚を用いて、2名の検者によりそれぞれ胚の酸素消費量を測定し、その検者間での誤差を検討した。

実験 2. 測定時の条件が、胚の酸素消費量測定に影響を及ぼすかを検討した。検討した項目としては

- a. 顕微鏡ステージに対する照明の有無
- b. 測定時の well に入れてある培養液の量に関して検討を行った。

a. 顕微鏡ステージに対する照明の有無

胚の酸素消費量測定に使用する微小電極は非常に微細であり、電極の先端を認識するために顕微鏡ステージに対して照明（白熱灯）を用いている。照明による明るさの影響、また温度の違いにより胚酸素消費量に差があるかを検討するため、照明の有無によりデータを採取した。

b. 測定時の well に入れる培養液の量

測定用のウェルに培養液を入れて胚の酸素消費量を測定している。注入する溶液量により、データが変化するか、培養液を 3ml 加え検討した。

C. 研究結果 および D. 考察

実験 1. 検者間の測定誤差に関する検討

検者 2 名で同一胚を測定した。(n=4) 検者 A の測定値を 1 とすると検者 B は 0.88 ± 0.18 とまずまずのデータの一致をみた (図 1)。今後、臨床の場において複数の胚を測定し、呼吸量を評価することになるが、測定値の 10% 程度は誤差範囲内であることを銘記すべきである。

実験 2. 測定時の条件が、胚の酸素消費量測定に及ぼす影響

a. 顕微鏡ステージに対する照明の有無

照明の有無でデータに大きな変化を示さなかった (図 2)。

体外受精の現場では胚のクオリティーに与える影響を考慮し、できるだけ照明のない状態で作業を行っている。白熱灯はかなりの光量および温度を発生するが、少なくとも酸素消費量には大きな影響を与えなかった。

b. 測定時の well に入れる培養液の量

体外受精を行っている配偶子操作室は、室温を 27 度程度に保っており、培養液等は蒸発し易い環境にある。さらに上述の白熱灯による昇温の影響もあり、長時間の胚測定は測定時の well に入れる培養液の量にも変化を起しかねない。そこで培養液の量と酸素消費量データに関して検討を行った。通常は 6ml 程度培養液を well に入れるが、そこから 3ml という大量の培養液を取り除き、データを再検したところ、前値とは変化を示さなかった (図 3)。

測定時の条件として、光量・温度および測定時に well に注入する培養液の量を変化させて酸素消費量を測定したが、いずれも顕著な差を認めなかった。ただし胚への影響の可能性もあるため、白熱灯の使用は極力さけ、またできるだけ測定時間は短縮する方針である。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 藤本晃久

高齢者における排卵誘発

産婦人科の実際 58(11): 1809-1815, 2009

(2) Hirata T, Osuga Y, Fujimoto A, Oishi H, Hiroi H, Fujiwara T, Yano T, Taketani Y. Conjoined twins in a triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst transfer: case report and review of the literature.

Fertil Steril. 2009 Mar;91(3):933.e9-12.

(3) Akihisa Fujimoto, Toshihiro Fujiwara, Hajime Oishi, Tetsuya Hirata, Tetsu Yano and Yuji Taketani. Predictive factors of successful pregnancy after assisted reproductive technology in women aged 40 years and older Reprod Med Biol 8:145-149, 2009

(4) 藤本晃久
高齢化と ART
日本産科婦人科学会誌 Vol. 62, No. 3,
pp. 754-760, 2010

(5) 齋藤真由子, 瀬山貴博, 藤本晃久, 廣井久彦, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二
MTX 全身投与と胎嚢穿刺にて治療しえた子宮頸管妊娠の 1 例 日本産科婦人科学会東京地方部会会誌 58 巻 1 号
Page93-96(2009. 03)

G.知的財産権の出願・登録状況：なし

図1 同一胚を2検者で測定した。(n=4) 検者Aのデータとの比 (mean±SD)

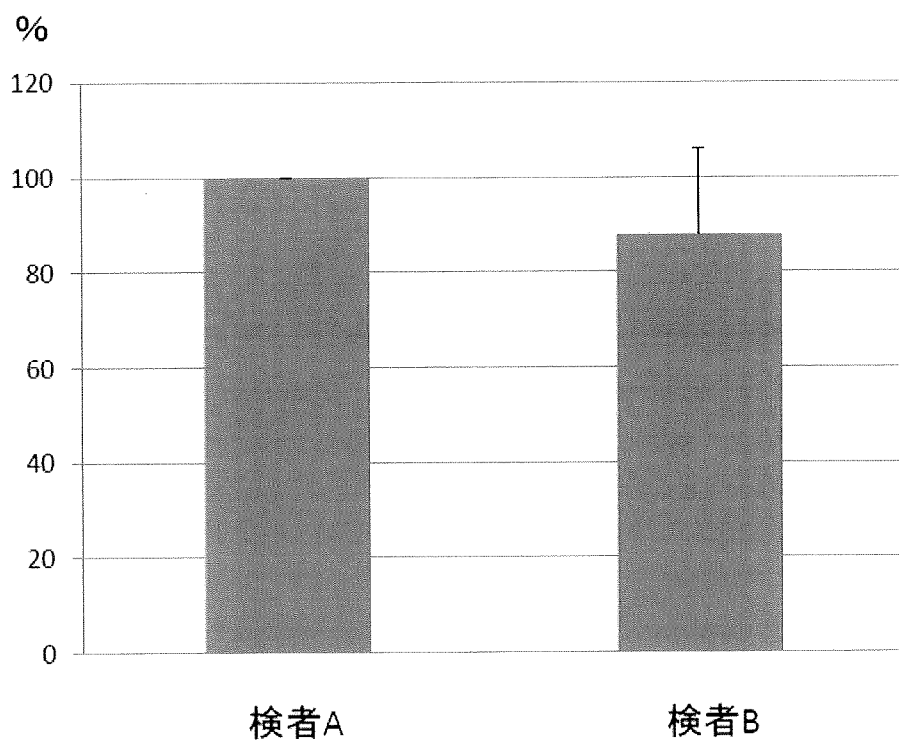


図2 照明あり・なしでの同一胚を測定した際の呼吸量

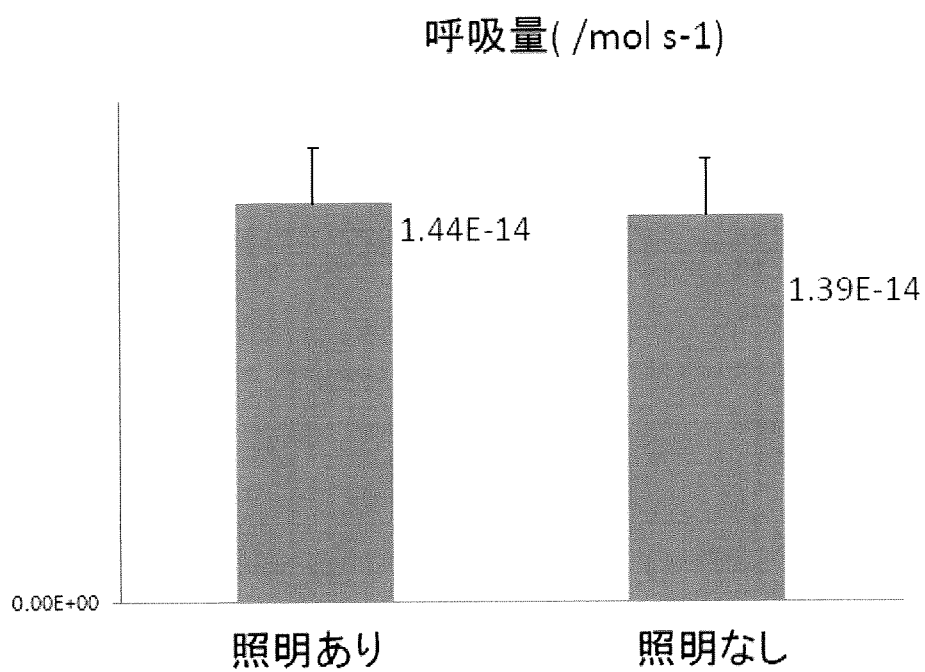
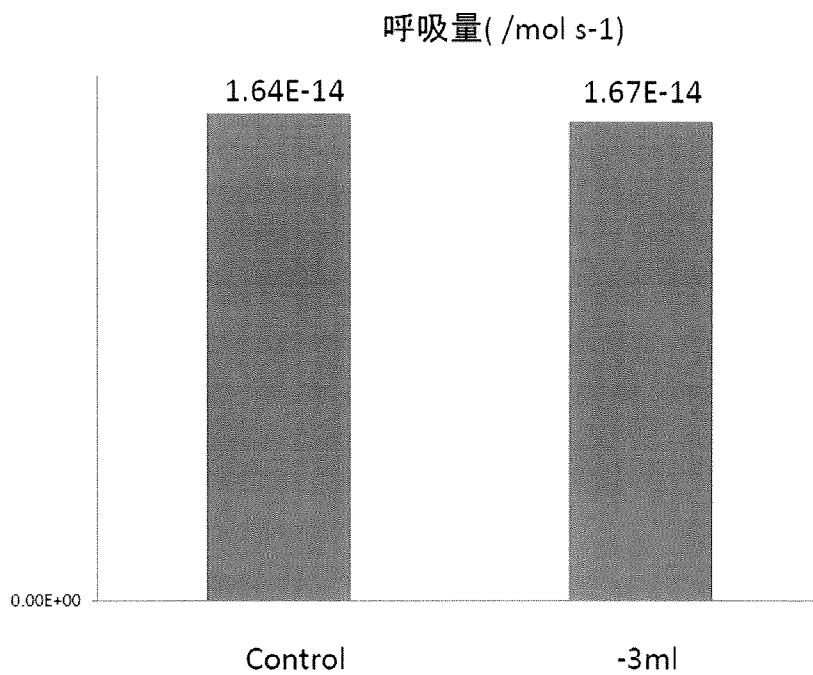


図3 培養液量を変化させた時の酸素消費量の変化



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

卵子の分子生物学的解析

研究分担者 浜谷 敏生 慶應義塾大学医学部 産婦人科・専任講師

研究要旨

を与える。加齢卵における卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察したところ、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能障害、DNA 修復機能の低下など体細胞の加母体加齢および排卵後加齢はともに卵の質的（胚発生率・妊娠率の低下）に影響。加齢変化に共通したメカニズムの他に、DNA メチル化、クロマチン二次構造の変化などに関わる遺伝子の発現変化を認めた。本研究では、遺伝子発現プロファイル変化の分析で明らかとなったミトコドリア機能の低下が実際に加齢卵の細胞呼吸能に影響を与えているか否かを、超高感度マイクロ電極を用いた電気化学的手法により検討した。その結果、加齢卵では細胞呼吸能が低下していたため、細胞呼吸能の電気化学的測定法が「卵の質」の診断に有用である可能性が示唆された。今後の研究では、さらに卵および胚のバイオマーカーとなる遺伝子を同定する。

A. 研究目的

卵細胞は、受精能を持ち、雄性前核のリプログラミングを行い、胚性ゲノムの活性化と着床前期胚の分化全能性の賦与に関与する。クローン胚においては体細胞核をもリプログラミングする。このように、卵細胞は非常に特異な細胞である。そこで、卵・着床前期胚の遺伝子プロファイリング・データにおける発現強度および cDNA ライブラリー・データベースにおける Expression sequence tag (EST) 発現頻度を *in silico* 解析することにより、卵でのみ特異的に発現する遺伝子を抽出する。このような卵特異的遺伝子は、上述した卵の特性に大きく寄与すると考えられる。さらに、母体加齢あるいは排卵後加齢による卵の質的低下をモデルとして、遺伝子発現プロファイリング・データの変化を多元的に解析し、卵の受精後発生能に重要と考えられる卵細胞特異的遺伝子を抽出し、これらの遺伝子の機能を解析する。本研究では、卵の遺伝子発現制御

機構の解明と「卵の質」に寄与する遺伝子 (quality marker) の発見を目指した。

B. 研究方法

(1) 母体の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した、卵で発現する遺伝子のうち、「卵の質」に寄与する遺伝子 (quality marker) の発見を目指した。

マウス着床前期各ステージの胚を 4 セット (1 セット 500 個) 集め、それぞれから mRNA を抽出、*in vitro* transcription 反応により cRNA 増幅および Cy3 標識し、Cy5 標識された universal reference とともに、NIA 22K 60-mer oligo microarray において hybridization に供し、着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングを行った。

(2) 排卵後の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察し、卵で発現する遺伝子のうち、「卵の質」に寄与する遺伝子 (quality marker) の発見を目指した。

以下の各々のグループについて、過排卵処理 F1 マウス (12 週齢) に hCG を注射し、3 セットの未受精卵 (1 セット 1000 個) を集めた。各セットから mRNA を抽出し、*in vitro* transcription 反応により 2-round RNA 増幅した後、OpArray (独オペロン社製 70mer-oligo DNA microarray) において hybridization に供し、着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングを行った。

- (イ) hCG 注射後 14 時間で採取した新鮮卵 (fresh)
- (ロ) hCG 注射後 23 時間で採取した加齢卵 (*in vivo* aged)
- (ハ) hCG 注射後 14 時間で採取し、卵丘細胞と共に *in vitro* で 9 時間培養した加齢卵 (*in vitro* aged with cumulus cells)
- (ニ) hCG 注射後 14 時間で採取し、卵丘細胞を除いて後 *in vitro* で 9 時間培養した加齢卵 (*in vitro* aged without cumulus cells)

(3) マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング・データの *in silico* 解析により、着床前期胚に特異的に発現する新規遺伝子 *Hmgpi* が発見された。この遺伝子の詳細な発現解析と機能解析を行った。

- (i) 定量的リアルタイム逆転写 PCR、ウェスタンブロット、免疫染色
- (ii) 受精卵への siRNA 注入による *Hmgpi* 発現抑制が着床前期および着床周辺期の胚発生に与える影響を検討した。

C. 研究結果・考察

(1) 母体の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した。

卵性 RNA は 2 細胞期までにそのほとんどが分解されると考えられていたが、2 細胞期以降も残存する卵性 RNA が多く存在することが明らかとなった。また、Gene Ontology Organization が遺伝子機能に関するキーワード (GO term) をそれぞれの遺伝子に割り付けているので、卵で発現する遺伝子に頻度の高い GO term を抽出した。その結果、細胞分裂に関わる GO term が多く認められ、サーカディアンリズムや接着分子といった GO term も特徴的であった。

卵の質的低下 (胚発生率・妊娠率の低下) の背景を探究するため、卵の加齢変化を例に、母体加齢がマウス成熟卵の遺伝子発現プロファイリングに与える影響について検討した。卵の加齢には、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能障害、テロメラーゼの発現・活性の低下、DNA 修復機能の低下など体細胞の加齢変化に共通したメカニズムの他に、DNA メチル化、クロマチン二次構造の変化、RNA 修飾などに関わる遺伝子の発現変化を認めた。また、それらの遺伝子の中には生殖細胞特異的に発現すると考えられる遺伝子が多く認められたため、生殖細胞に特異的な加齢機構の存在が示唆された。

(2) 排卵後の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した。

(イ) と (ロ) との対比較

in vivo aging では、Dnmt1, Dnmt3l などの DNA メチル転移酵素やクロマチン・リモデリング関連遺伝子などの発現変化が特徴的であり、卵の加齢によるクロマチン高次構造の変化が示唆された。また、ミトコドリア機

能や細胞微小骨格に関する遺伝子の発現も変化していた (表 1)。さらに、ここで認められたミトコドリア機能の低下が、実際に加齢卵の細胞呼吸能に影響を与えているか否かを、超高感度マイクロ電極を用いた電気化学的手法により検討したところ、有意な呼吸能低下が観察された。排卵直後の新鮮卵 (post-hCG14 h) の酸素消費量は 0.31 ± 0.01 [means \pm SE] $\times 10^{14}$ /mol s^{-1} であったが、排卵後加齢卵では、post-hCG 23 h で $0.19 \pm 0.01 \times 10^{14}$ /mol s^{-1} 、さらに post-hCG 46 h では $0.092 \pm 0.01 \times 10^{14}$ /mol s^{-1} と有意に低下した。

(ハ) と (ニ) との対比較

排卵後の卵細胞の *in vitro* aging における卵丘細胞の影響を検討した。卵丘細胞を保持させた卵細胞の方が卵丘細胞を除去した卵細胞よりもアポトーシス関連遺伝子の発現が大きく、より加齢が進んでいることが示唆された。

(3) マウス着床前期胚特異的遺伝子 *Hmgpi* の発現・機能解析

(i) *Humpy* は high mobility group box ドメインを 2 個持つ転写因子をコードすることが推定され、その mRNA は 2 細胞期～胚盤胞、また胚性幹細胞で、タンパク質レベルでは 4 細胞期～胚盤胞、胚性幹細胞で発現が認められたが、胎生 7 日齢～成獣ではいかなる臓器においても発現は認められなかった。4 細胞期～桑実胚では細胞質のみに発現し、培養液中への分泌も示唆された。一方、胚盤胞および胚性幹細胞では核内にも局在を認めた。

(ii) 受精卵への siRNA 注入により、*Hmgpi* は着床周辺期に至るまで発現が抑制された。その結果、着床前期胚発生が抑制される胚を認め (桑実胚で発生停止)、胚盤胞に至った胚でも、その後の着床および out growth が阻害さ

れた。

D. 結論

加齢卵における卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察したところ、酸化ストレスによるミトコドリアの機能障害、DNA 修復機能の低下など体細胞の加齢変化に共通したメカニズムの他に、DNA メチル化、クロマチン二次構造の変化などに関わる遺伝子の発現変化を認めた。さらに、ここで認められたミトコドリア機能の低下が実際に加齢卵の細胞呼吸能に影響を与えているか否かを、超高感度マイクロ電極を用いた電気化学的手法により検討したところ、加齢卵では細胞呼吸能が低下していた。細胞呼吸能の電気化学的測定法が「卵の質」の診断に有用である可能性が示唆された。さらに遺伝子発現プロファイルの変化から「卵の質」に寄与する quality marker の候補となる遺伝子が抽出がされた。

一方、着床前期胚特異的遺伝子 *Hmgpi* は正常な初期胚発生に必須であり、その HMGPI タンパクの培養液中への分泌を観察することが胚の質的診断に有用である可能性が示唆された

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Toyoda M, Hamatani T, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Chip to analyze cell identity in Reproductive and Regenerative Medicine. Current Medicinal Chemistry 2010, in press.
- (2) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y,

Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Human Molecular Genetics* 2010; 19(3): 480-493

2. 学会発表

(1) 持丸佳之, 久慈直昭, 高野光子, 浜谷敏生, 浅田弘法, 青木大輔, 吉村泰典 交流磁場発生装置を用いたブタ卵巢の超低温保存
第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会
2009 年 4 月 4 日 京都

(2) 山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 持丸佳之, 高野光子, 浅田弘法, 久慈直昭, 青木大輔, 梅澤明弘, 吉村泰典 着床前期胚に特異的に発現する新規遺伝子 Hmgp の発現および機能解析
第 50 回日本哺乳動物卵子学会
2009 年 5 月 8 日 東京

(3) 持丸佳之, 久慈直昭, 山田満稔, 高野光子, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 浅田弘法, 末岡浩, 青木大輔, 吉村泰典 単一卵子の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析とその応用
第 27 回日本受精着床学会 2009 年 8 月 6 日 京都

(4) 山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 持丸佳之, 高野光子, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典 着床前期特異的新規遺伝子 Hmgp による着床周辺期発生の制御機構
第 54 回日本生殖医学会・学術講演会 2009 年 11 月 23 日 金沢

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 排卵後 9 時間加齢させた卵(♀) あるいは 新鮮卵(♂) で高発現を示した遺伝子に特徴的な GO term. Gene Ontology Organization は、個々の遺伝子に、遺伝子の機能を表すキーワード、GO term を割り付けて データベースを構築している。Go term と前述のクラスター分類を用いて、それぞれのグループにおいて発現上昇を示した遺伝子群に頻度の高い GO term を、MAPPFinder を用いて抽出した。

	GO terms	加齢卵 (♀) で有意に高発現していた遺伝子	新鮮卵 (♂) で有意に高発現していた遺伝子	
加齢卵 (♀) で高発現していた遺伝子 (149/11,145 transcripts) に伴い、有意に頻出していた GO terms	Mitochondrion	<i>Alas2, Atp6v1a, Bcl2l11, Cysl, Pccb, Mrpl20, Mrpl21, Mrps24, Mrps14, Mrrf, Spata19, Slc25a3, Trit1, Tomm40</i>		
	Electron transport	<i>Alas2, Cysl, Dgke, Klkb1, Pcyox11, Zdhhc4</i>		
	Hematopoietic or lymphoid organ development	<i>Acvr1b, Alas2, Cxcl13, Hoxa3, Mb, Mitf</i>		
	Chromatin assembly / Chromatin	<i>Cbx5, Hist1h1a, Hist1h3g, Sirt5, Sox4</i>		
	Receptor activity	<i>Acvr1b, Calcr, Gabra3, Lepr, Lphn2, Marco, Mc1r, Ncoa2, Notch4, Olfir414, Olfir453, Olfir801, P2rx4, Ptpn12, Slamf7, Thr2, Unc5d</i>		
	Cell surface receptor linked signal transduction	<i>Acvr1b, Bmper, Calcr, Copeb, Dgke, Dkk3, Gabra3, Lphn2, Mitf, Mc1r15, Notch4, Olfir453, Olfir414, Olfir801, Rqcd1, Thr2</i>		
	Hormone activity	<i>Abpa, Ins2, Lhb, Prl8a2</i>		
	Inflammatory response	<i>Cxcl13, Klkb13, Thr2</i>		
	新鮮卵 (♂) で高発現していた遺伝子 (461/11,145 transcripts) に伴い、有意に頻出していた GO terms	Mitochondrial inner membrane / Electron carrier activity		<i>Abce1, Atp5j, Cox7c, Cysl, Egfr, Mtch2, Ndufa1, Ndufa5, Ndyua11, Pmpcb, Rhot2, Sdhb, Tomm22, Txndc5, Txnrd1, Uqcr, Uqcrfs1</i>
		Antioxidant activity		<i>Apoa4, Kit9, Npn3, Ppp1r15b, Psmb5, Sod1, Srxn1, Txnrd1</i>
Oxidoreductase activity			<i>Ndufa1, Ndufa5, Ndufa11, Txnrd1, Uqcr, Uqcrfs1</i>	
Translation / Ribosome			<i>Cdh16, Dars2, Eef1d, EG666738, Eif2b5, Eif3k, Eif4h, Mrpl4, Mrpl30, Ppp1r15b, Pstk, Pum1, Rnf128, Rpl6, Rpl23a, Rpl39, Rplp1, Rps29, Scve1, Uba52</i>	
S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity			<i>Bat8, Dimt1, Dnmt1, Icm1, Gmmt</i>	
Ion transporter activity / Channel or pore class transporter activity			<i>Aqp6, Atp1b2, Atp10a, Atp11c, Atp5j, Atp6ap2, Chrna2, Chrna9, Cox7c, Gabrd, Gabre, Hiatl1, Kotd2, Nup35, P2rx1, P2rx11, Ryr3, Slc4a10, Slc12a2, Slc30a5, Slc39a12, Uqcr, Uqcrfs1</i>	
Cytokine production / Interleukin receptor activity			<i>Atp6ap2, Irf3, Il1rap, Klrk1, Rnf128, Il1r1, Il1rap, Il12rb2</i>	
Microtubule-based movement			<i>Dnahc10, Kif3a, Kit9, Kif11, Kif13b, Rhot2, Tubb2</i>	
Angiogenesis			<i>Agpt2, Agpt4, Itgav, Pitx2, Ubp1, Tnfrsf13, Vegfa, Vegfc</i>	

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

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

研究分担者 横尾 正樹 秋田県立大学・准教授

研究要旨

我々が開発した電気化学的呼吸量測定技術が，胚の品質評価方法として有効且つ安全であることを検証するため，マウスをモデル動物に用いて実験した。交配後4日目の雌マウスから回収した受精卵（胚盤胞）の呼吸量を受精卵呼吸測定装置（HV-403）で測定した。呼吸量が 0.70×10^{-14} mol/s 以上であった品質良好胚盤胞のみを選別し，受容雌マウスの子宮内へ移植した。その結果，呼吸量によって選別した胚を移植した測定群の分娩率および産子率は，呼吸測定を行わずに移植した対照群と比較して有意に高いことが示された。また，得られた産子の生時体重，染色体および性成熟後の繁殖能力を調べた結果，異常所見は見られなかった。以上の結果から，電気化学的呼吸量測定技術による胚の品質評価は，胚移植の成功率を高め，得られた産子への影響もないことが示唆された。今後は，胚移植試験を継続するとともに，得られたマウスの行動解析（運動能力，記憶力など）を実施し，安全性についてより詳細に検証する予定である。

A. 研究目的

現在，不妊治療に供する胚の品質は形態的に判定されているが，この方法では判定基準が客観性に欠けるため，胚の品質を厳密に評価することは難しい。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胚の品質評価技術が必要不可欠である。これまでに我々は，電気化学的計測技術を応用した単一胚の呼吸量測定法を開発し，胚の呼吸能がその品質と相関することを明らかにした。本研究では，我々が開発した電気化学的呼吸量測定技術が，胚の品質評価方法として有効且つ安全であることを実験動物レベルで検証することが目的である。

B. 研究方法

材料

C57BL/6 マウスを実験に用いた。雌マウス（8週齢）に pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) 5IU 投与し，48 時間後に human chorionic gonadotropin (hCG) 5IU 投与することで過排卵を誘発した。hCG 投与後，直ちに同系統の雄マウスと同居させ，翌朝，膣栓の有無を確認した。膣栓を確認した雌マウスは hCG 投与 96 時間後に頸椎脱臼により屠殺し，摘出した子宮を灌流することで胚を回収した。卵割が停止しているなど明らかに異常が認められた胚を排除し，形態的に正常な胚盤胞のみを実験に使用した。

呼吸量測定

マウス胚盤胞の呼吸量測定には，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:機能性ペプチド研究所) を用いた。呼吸測定液 (ERAM-2:機能性ペプチド研究所) で満たした測定プレートの逆円錐形マイクロウェル内に胚を1つずつ静置した。その後、測定プレートを倒立顕微鏡のステージ上にセットし、 $-0.6V$ vs $Ag/AgCl_2$ の電位を印加した微小白金電極 (先端直径: $2-3\ \mu m$) で、胚近傍を鉛直方向に4回走査 ($31.0\ \mu m/sec$, $160\ \mu m$) した。得られた胚近傍および沖合の酸素還元電流値の差から、球面拡散理論式に基づいて胚の酸素消費量 (呼吸量) を算出した。

胚移植試験

受精卵呼吸測定装置による胚品質評価の有効性を検証する目的で、胚移植試験を実施した。呼吸量 $0.70 \times 10^{-14}\ mol/s$ 以上の胚盤胞を品質良好胚とし、偽妊娠3日目の受容雌マウス (ICR) の子宮内に、1匹当たりの移植胚数が10個前後となるように移植した (測定群)。移植後17日目に分娩および産子数を確認した。なお、呼吸量を測定しなかった胚を測定区と同条件で移植し、対照群とした。

表現型解析

得られた産子の正常性を検証する目的で、産子の生時体重、染色体、繁殖能力を解析した。染色体は、大腿骨から骨髓液を採取しG分染法にて解析した。染色体の数的異常、構造異常について観察した。また、繁殖能力については、性成熟後に継代試験を実施し、性成熟後に繁殖能力の有無を観察した。

C. 研究結果

呼吸量の測定を行わずに形態観察により胚盤胞と判定した胚を移植した対照群では、107個の胚を11匹の受容雌マウスに移植した結果、4匹が分娩し (分娩率: 36.4%)、得られた産子数は合計15匹 (産子率: 14.0%) であった。一方、測定群では呼吸量 $0.70 \times 10^{-14}\ mol/s$ 以上

の胚 (108個) を品質良好胚として10匹の受容雌マウスに移植した結果、8匹が分娩し (分娩率 80.0%)、合計33匹の産子が得られた (産子率: 30.6%)。測定群の分娩率、産子率は対照群と比較して有意に高い成績であった。

また、測定群および対照群の産子は生時体重の平均はそれぞれ $1.55 \pm 0.02\ g$ および $1.51 \pm 0.04\ g$ で、有意差は見られなかった。G分染法による染色体解析においても、解析した全てのマウス (30匹) において、 $2n=40$ の正常な核型を有しており、形態異常も見られなかった。測定群の産子は性成熟後、継代試験を実施したが、少なくとも第3世代までは繁殖能力が維持されていることが示された。

D. 考察

本研究で使用した受精卵呼吸測定装置は、個々の胚の呼吸量を数値化できるため、客観的に胚の評価・選別が可能である。本研究では、交配後4日目の雌マウスから回収した胚盤胞を形態的基準のみで評価した胚 (対照群) と形態評価に加え呼吸活性を評価基準に評価した胚 (測定群) に分けて移植した結果、測定群は対照群と比較して分娩率、産子率が有意に上昇することが確認された。我々は、これまでに、家畜胚 (ブタ、ウシ) を用いた研究において、胚の呼吸量が高いほど、品質も高いことを明らかにしている。本研究の結果は、家畜胚で得られた研究成果を裏付けるものであり、呼吸量による客観的な選別が胚の品質を評価する方法として有効であることを示唆している。さらに本研究では、得られた産子の正常性についても、生時体重、染色体、繁殖能力の点から検証し、産子に異常所見が見られないことを示した。この結果は、受精卵呼吸測定装置による胚の選別が、胚の生存性やその後の個体発生への影響が少ない安全な方法であることが示唆される。

今回の結果はマウス胚を用いたものであるが、この測定技術の注目すべき点は胚の呼吸

量（ミトコンドリア機能）を評価していることである。ミトコンドリアは全ての真核細胞に普遍的に存在している細胞内小器官である。したがって、本研究で得られたマウスの結果をヒトへ直接外挿できる可能性は高いと我々は考えている。

E. 結論

これらの結果から、電気化学的な胚の呼吸量測定技術が、胚移植時における胚の品質評価法として有効かつ安全であることが示唆された。今後、得られた産子の正常性を検証するため、行動解析（運動能力、記憶力）などを実施し、電気化学的呼吸量測定技術の安全性についてより詳細に検証する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 横尾正樹, 伊藤-佐々木隆広, 珠玖 仁, 末永智一, 阿部宏之. 「呼吸活性を指標とした胚の品質評価: マウス胚移植試験の成績と産子の正常性について」. 産婦人科の実際, 金原出版株式会社 (印刷中)

(2) Haruo Murakawa, Nobuya Aono, Takayuki Tanaka, Hiroyuki Kikuchi, Hidemune Yoshida, Hiroaki Yoshida, Masaki Yokoo and Hiroyuki Abe. Evaluation of human cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. Journal of Mammalian Ova Research, 2009; 26: 32-41.

2. 学会発表

(1) 横尾正樹, 伊藤-佐々木隆広, 珠玖 仁, 末永智一, 阿部宏之. 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, 京都, 2009 年 8 月

(2) Takayuki Tanaka, Nobuya Aono, Yuki Iwasa, Tomoko Kamono, Hiroyuki Kikuchi, Asami Suzuki, Haruo Murakawa, Hidemune Yoshida, Masaki Yokoo, Hiroyuki Abe, Hiroaki Yoshida. Embryo development after vitrification-thawing can be predicted by assessment of oxygen consumption. The international ovarian conference 2009, Tokyo (Japan). 2009.

G. 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

3. その他

なし

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
阿部宏之	胚の機能検定法	鈴木秋悦	カラーアトラス 不妊治療のための の卵子学	医歯薬出版	東京	2010	127-131
阿部宏之	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	神原秀記 松永是 植田充美	シングルセル解 析の最前線	シーエム シー出版	東京	2010	103-111
珠玖 仁、 伊野浩介、 末永智一	単 一 細 胞 由 来 mRNA 回収プロ ブの開	神原秀記、松 永 是、植田 充美	シングルセル解 析の最前線	シーエム シー出版	東京	2010	223-228

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
後藤香里、小池恵、熊迫陽 子、宇津宮隆史、荒木康久、 阿部宏之	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	27(1)	53-58	2010
N. Sakagami, T. Yamamoto, K. Akiyama, Y. Nakazawa, N. Kojima, K. Nishida, S. Yokomizo, Takagi Y., <u>H. Abe</u> , C. Suzuki, K. Yoshioka	Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films	<i>J. Reprod. Dev.</i>	56(2)	279-284	2010
H. Yamashiro, M. Toyomizu, M. Kikusato, N. Toyama, S. Sugimura, Y. Hoshino, <u>H. Abe</u> , S. Moisyadi, E. Sato	Lactate and adenosine triphosphate in extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm	<i>J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.</i>	49(2)	160-166	2010
K. Kyono, Y. Nakajo, C. Nishinaka, H. Hattori, T. Kyoya, T. Ishikawa, <u>H. Abe</u> , Y. Araki	A birth from the transfer of a single vitrified-warmed blastocyst using ICSI with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient	<i>Fertil. Steril.</i>	91(3)	e7-e11	2009
H. Shiku, T. Yamakawa, Y. Nashimoto, Y. Takahashi, Y. Torisawa, T. Yasukawa, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, <u>H. Abe</u> , H. Kambara, T. Matsue	A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids	<i>Anal. Biochem.</i>	385	138-142	2009

H. Murakawa, N. Aono, T. Tanaka, H. Kikuchi, H. Yoshida, H. Yoshida, M. Yokoo, <u>H. Abe</u>	Morphological evaluation and measurement of the respiration activity of cumulus-oocyte complexes to assess oocyte quality	<i>J. Mamm. Ova Res.</i>	26	32-41	2009
K. Y. Inoue, K. Ino, H. Shiku, S. Kasai, T. Yasukawa, F. Mizuntani, <u>T. Matsue</u>	Electrochemical Monitoring of Hydrogen Peroxide Released from Leucocytes on Horseradish Peroxidase Redox Polymer Coated Electrode Chip	<i>Biosens. Bioelectron.</i>	25	1723-1728	2010
H. Shiku, S. Goto, S. Jung, K. Nagamine, M. Koide, T. Itayama, T. Yasukawa, <u>T. Matsue</u>	Electrochemical Characterization of Enzymatic Activity of Yeast Cells Entrapped in a Poly(dimethylsiloxane) Microwell on the Basis of Limited Diffusion System	<i>Analyst</i>	134	182-187	2009
H. Shiku, M. Takeda, T. Murata, U. Akiba, F. Hamada, <u>T. Matsue</u>	Development of Electrochemical Reporter Assay Using HeLa Cells Transfected with Vector Plasmids Encoding Various Responsive Elements	<i>Anal. Chim. Acta</i>	640	87-92	2009
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	<i>Anal. Chem.</i>	81	2785-2790	2009
Y. Takahashi, H. Shiku, T. Murata, T. Yasukawa, <u>T. Matsue</u>	Transfected Single Cell Imaging by Scanning Electrochemical Optical Microscopy with Shear Force Feedback Regulation	<i>Anal. Chem.</i>	81	9647-9681	2009
T. Murata, T. Yasukawa, H. Shiku, <u>T. Matsue</u>	Electrochemical Single-Cell Gene-Expression Assay Combining Dielectrophoretic Manipulation with Secreted Alkaline Phosphatase Reporter System	<i>Biosens. Bioelectron.</i>	25	913-919	2009
A. Hasegawa, <u>O. Yoshino</u> , Y. Osuga, A. Kodama, M. Takamura, O. Nishii, Y. Taketani	Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model	<i>Fertil. Steril.</i>	93(8)	2757-2759	2010

A. Kodama, <u>O. Yoshino</u> , Y. Osuga, M. Harada, A. Hasegawa, K. Hamasaki, M. Takamura, K. Koga, Y. Hirota, T. Hirata, Y. Takemura, T. Yano, Y. Taketani	Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells	<i>Hum. Reprod.</i>	25(3)	751-756	2010
M. Takamura, K. Koga, Y. Osuga, Y. Takemura, K. Hamasaki, Y. Hirota, <u>O. Yoshino</u> , Y. Taketani	Post-operative oral contraceptive use reduces the risk of ovarian endometrioma recurrence after laparoscopic excision	<i>Hum. Reprod.</i>	24(12)	3042-3048	2009
J. Shi, <u>O. Yoshino</u> , Y. Osuga, K. Koga, Y. Hirota, T. Hirata, T. Yano, O. Nishii, Y. Taketani	Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin β subunits, and anti-Mullerian hormone in human granulosa cells	<i>Fertil. Steril.</i>	92(5)	1794-1798	2009
J. Shi, <u>O. Yoshino</u> , Y. Osuga, O. Nishii, T. Yano, Y. Taketani	Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells	<i>Fertil. Steril.</i>		1-5	2009
M. Yamada, <u>T. Hamatani</u> , H. Akutsu, N. Chikazawa, N. Kuji, Y. Yoshimura, A. Umezawa	Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein <i>Hmgpi</i> in early embryonic development	<i>Hum. Mol. Genet.</i>	19(3)	480-493	2010
<u>M. Yokoo</u> , N. Kimura, E. Sato	Induction of Oocyte Maturation by Hyaluronan-CD44 Interaction in Pigs	<i>J. Reprod. Dev.</i>	56(1)	15-19	2010

IV 研究成果の刊行物・別刷

胚の機能検定法

阿部宏之

ミトコンドリアは酸素呼吸によって細胞活動に必須のエネルギーを合成する重要な細胞小器官であり、その呼吸機能は胚や卵子の代謝活性解析やクオリティ評価の有力な指標となる。したがって、精度の高い細胞呼吸計測法は、胚の厳密なクオリティ評価や細胞機能解析にきわめて重要な技術となる。

本稿では、高精度・非侵襲的に細胞呼吸を測定することができる電気化学計測技術を応用した“受精卵呼吸測定装置”と、この装置を用いた胚の呼吸機能解析とクオリティ評価法について述べる。

電気化学計測法と 受精卵呼吸測定装置

電気化学計測法は、プローブ電極による酸化還元反応を利用し、局所領域における生物反応を電気化学的に高精度で検出できる有効な技術である。酸素の還元電位を検出するマイクロ電極をプローブとする走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いることで、細胞が消費する酸素量を無侵襲的に測定することができる。

この SECM をベースに胚の呼吸量測定のためのシステムとして、“受精卵呼吸測定装置”が開発されている¹⁾。この測定システムは、倒立型顕微鏡 (図 1 ①)、マイクロ電極の電位を一定に保持するポテンシostat (図 1 ②)、マイクロ電極の移動を制御するコントローラー (図 1 ③)、短時間で酸素消費量を算出する専用の解析ソフトを内蔵したノート型コンピュータ (図 1 ④) により構成されている。倒立型顕

微鏡のステージ上には、保温プレート、マイクロ電極の三次元走査を可能とする XYZ ステージが設置されており、気相条件を制御するための測定用チャンバーの設置も可能である。

胚の呼吸量測定

受精卵呼吸測定装置を用いた呼吸量測定には、超高感度のディスク型マイクロ電極 (図 2a)、専用の多検体測定プレートと測定液を用いる。多検体測定プレートは測定操作の簡易化を目的に開発され、プレートの底面には円錐形のマイクロウェル6穴が施されている (図 2b)。マイクロ電極が検出する微弱な電流値は溶液の成分によって値が変動するため、呼吸測定には胚および細胞用培養液をベースに調製した専用の測定液を用いる。

測定液を満たしたマイクロウェル内に胚を導入した後、ウェルの底部中心に静置する (図 2c)。胚の半径値を解析ソフトに入力した後、マイクロ電極を胚の透明帯直近に手動で移動させる。マイクロ電極は、酸素が還元可能な $-0.6\text{ V vs. Ag/AgCl}$ に電位を保持した後、コンピュータ制御により透明帯近傍を鉛直 (Z 軸) 方向に走査する (図 2d)。通常、1 試料当たりマイクロ電極を 2~3 回走査し、呼吸量を測定する (所要時間は約 30 秒)。マイクロ電極走査後、胚の酸素消費量は球面拡散理論式²⁾を基盤とする呼吸解析ソフトを用いて算出する (図 3)。波形の始点 (マイクロ電極が胚に最も接近している) と終点 (マイクロ電極が胚から最も離れている) の電流値の差 (ΔC) から呼吸量を算出する (ΔC

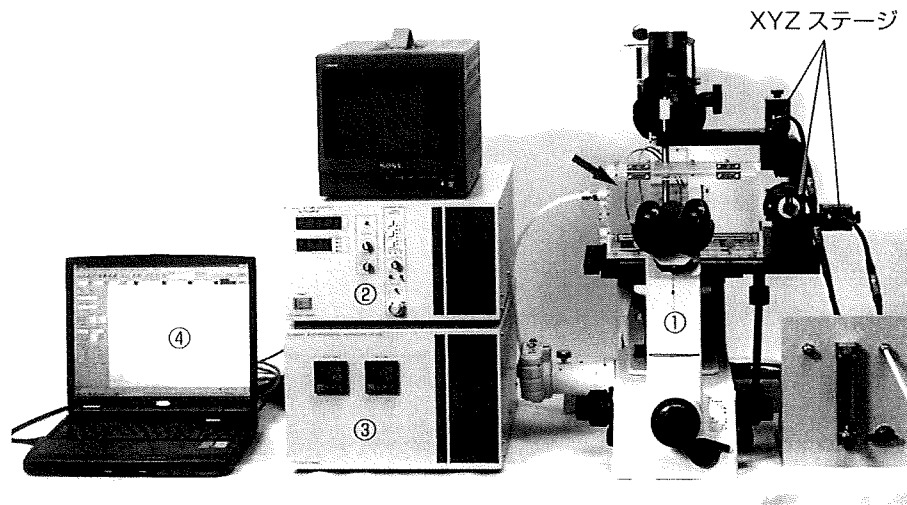


図1 走査型電気化学顕微鏡をベースに開発した受精卵呼吸測定装置

①：倒立型顕微鏡（矢印は測定チャンバーを示す），②：ポテンシostat，③：コントローラー，④ノートパソコン（呼吸機能解析ソフトを内蔵）。

が大きいほど胚の呼吸量は大きい）。

機能解析に有効な方法であることがわかる。

胚のミトコンドリア呼吸機能

受精卵呼吸測定装置を用いて、種々の哺乳動物胚の呼吸量を測定することができる。

図4に、マウス胚の発生過程における呼吸量変化を示す。マウス胚の呼吸量は、受精直後の1細胞期から8細胞期までは $0.5 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 前後と低い。桑実胚から胚盤胞にかけて呼吸量は増加し、発生が進み細胞数も増加した孵化胚盤胞では最も高い呼吸活性が計測される。

ミトコンドリアは呼吸機能の成熟に伴い顕著な微細構造変化を起こすことから、電子顕微鏡による胚の微細構造観察は呼吸測定の有効性を検証するために重要である。マウス胚の微細構造を観察すると、呼吸活性の低い2細胞期胚ではミトコンドリアのほとんどは未成熟であるが、呼吸量が増加する胚盤胞ではミトコンドリアの顕著な発達（クリステの拡張）が起こる（図5）。

このように、ミトコンドリアの発達と呼吸量の増加は一致することから、受精卵呼吸測定装置による呼吸測定は、胚のミトコンドリア呼吸

呼吸機能解析と胚のクオリティ評価

体外受精・胚移植 (*in vitro* fertilization and embryo transfer : IVF-ET) は、最も有効な不妊治療法の一つである。一般にIVF-ETでは、IVFによって得られた複数の胚のなかから移植する胚を選択する。胚移植前に質的に最も良好な胚を選択することは、妊娠率の向上、多胎妊娠の回避、流産率の低下のために有効である。

現在、胚のクオリティ評価は形態観察による方法が一般的である。形態的評価法は、簡単・迅速で無侵襲的な方法であることから、現状では最も有効な胚のクオリティ評価法であると言える。しかし、評価の基準となる形態的特徴は定量性に欠けるため、判定結果が観察者の主観に左右される可能性がある。これまでの研究によって、ミトコンドリア呼吸機能と胚のクオリティは深く関係することが明らかになっており、受精卵呼吸測定装置による呼吸量測定は胚クオリティ評価の有力な指標になると考えられる。

ウシにおいて、胚のクオリティと呼吸活性の