

201011007A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 宏之

平成23(2011)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 ----- 13
末永 智一
2. ヒト胚・卵子の評価に関する研究 ----- 17
吉野 修
3. 体外受精胚の培養に関する研究 ----- 20
藤本 晃久
4. 卵子の分子生物学的解析に関する研究 ----- 25
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 ----- 31
横尾 正樹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 41

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

平成22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

電気化学計測（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。本研究事業では、電気化学イメージング技術を応用した「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。これまでの研究により、マイクロ電極をプローブとした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。

本研究事業の第2年度は、(1)「臨床対応型細胞呼吸測定装置」開発のための基盤技術である超高感度マイクロ電極と非侵襲呼吸測定液の開発、(2) 胚移植試験などの動物実験による呼吸測定技術の有効性と安全性の生物学的検証、(3) 医療応用のためにヒト胚や卵子の呼吸能解析を中心とした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の安定生産システムと非侵襲呼吸測定液を開発することができた。(2) では、ウシ胚及びマウス胚を用いた動物実験により、呼吸活性を指標とする胚クオリティー評価の有効性が示されるとともに、電気化学的計測技術の非侵襲性が示された。(3) では、ヒト余剰胚と単一卵子の呼吸活性測定に成功した。

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徴である。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移植の普及が可能となり、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・東北大学原子分子材料
学高等研究機構・教授）

吉野 修（東京大学・医学部産婦人科・助教）

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15～18%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基盤とする「臨床対応型細胞呼吸測定装置」を開発するために、(1) 単一生殖細胞の呼吸計測可能な超高感度マイクロ電極と、医療応用可能な非侵襲呼吸測定液の開発、(2) 呼吸測定技術の有

効性と安全性を検証するための生物学的解析研究、(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

前年度は、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した結果、単一胚の呼吸計測に必要な針型の電極サイズが特定できた。今年度は、電極のサイズ（直径）を変化させ、単一の受精卵及び卵子サンプルの近傍の酸素濃度勾配を測定し、呼吸測定に対する電極サイズの影響を調べた。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安定的に作製するための電解エッチング研磨とマイクロフォージによる熱封止法を検討した。

(b) 非侵襲測定液の開発

前年度の研究により、培養液の組成（電解質等）が電極性能に影響することを明らかにした。今年度は、この研究成果を踏まえ電極性能に影響しない受精卵培養液の探索を行った。具体的には、種々の受精卵培養液を用いたマイクロ電極の性能評価試験を行い、医療応用可能な培養液組成を検討するとともに、胚や卵子に対する侵襲性の有無を調べた。

(c) 多検体測定プレートの開発

前年度までに作製した多検体測定用プレートの性能を評価するために各種動物の呼

呼吸測定を行い、計測操作の簡易化と測定データの信頼性に関して評価した。また、呼吸測定操作の簡便化を図るために、従来の針型電極に代わり測定プレートに計測用電極を装着した電極固定型デバイスの製作を試みた。

(d) 呼吸解析ソフトウェアの開発

前年度は、球面拡散理論式に基づく呼吸解析ソフトを製作した。今年度は、臨床現場での使用を目的に呼吸計測の半自動化とデータ解析精度の向上を可能とする解析ソフトの製作を試みた。併せて、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ウンド補正機能の検証を行った。

(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」を製作した。

(2) 細胞呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

(1)～(e)で製作した「細胞呼吸測定装置」を用いて、ウシ及びマウス胚の呼吸量を測定し、呼吸測定装置の有効性を生物学的解析により検証した。ウシ胚は、体外受精により得られた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、培養実験に供した。また、人工授精した牛から採取した胚を1日間回復培養した後、呼吸量を測定し移植に供した。マウス胚は、体外受精及び生体回収胚(体内受精胚)を実験に用いた。

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 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、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、ミトコンドリアの細胞内局在と微細構造を調べるために、共焦点レーザー顕微鏡及び透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

(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。さらに、ヒト卵子の呼吸能解析を目的に、卵子-卵丘細胞複合体の呼吸量測定を試みた。

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 μm に相当することが分かった。この結果を基に、先端径2～5 μm のマイクロ電極を作製するための方法を検討した。その結果、以下の電解エッチング法を用いることで、従来法と比べて安定した超高感度マイクロ電

極作製が可能となった。

① Pt 細線を約15 mm に切り出し、約10cmの銅リード線にスポット溶接機で溶接したPt線の先端を、マイクロフォージを用いて飽和NaNO₃水溶液内で電解エッチングを行った。

② 低融点ガラス管をキャピラリーチューブにより細尖化し、Pt 線をキャピラリー内に注意深く挿入した後、マイクロフォージを用いて熱封止し、ダイヤモンドグラインダーでPt 線の断面を露出させた。

③ 微小電極の性能評価を行った結果、サイクリックボルタモグラム(CV)は、シャープでヒスシテリシのないシグモイダルな形状となり、0.7 V vs. Ag/AgCl 付近で定常電流が観測され、理想的な微小電極で得られる歪みのないシグモイダルな形状のCVが得られた。作製したマイクロ電極の先端を走査型電子顕微鏡で観察した結果、白金電極の先端は直径2.8 μmであった。

(b) 非侵襲測定液の開発

研究項目(1)で作製したマイクロ電極を用いて、ウシ受精卵培養液(IVD101:機能性ペプチド研究所製)及びマウス受精卵培養液(HTF)中での酸素還元電流値の変化を測定した。その結果、HTF培地において非常に安定した還元電流計測ができたが、TCM199をベースに開発されたIVD101では測定開始直後、還元電流値の低下が起り、測定が困難になった。このようにHTF培地が呼吸測定に適することが明らかになったことから、HTF培地を基本とする受

精卵呼吸測定液(ERAM: Embryo Respiration Assay Medium)を製作した。

試作した呼吸測定液を用いてウシ及びマウス受精卵の呼吸量を測定し、受精卵に対する侵襲性の有無を調べた。呼吸測定後の受精卵を追加培養し発生率の変化を調べた結果、対照区(呼吸測定を行わなかった受精卵)と比べて発生率の低下などは起こらなかった。また、受精卵の微細構造を電子顕微鏡により観察した結果、細胞膜や細胞小器官などに損傷は認められなかった。これらの結果から、HTF培地をベースに製作した測定液は呼吸測定に有効であり、今後はこの測定液を基本に医療対応可能な呼吸測定液の開発を進める予定である。

(c) 多検体測定プレートの開発

ポリスチレン製でプレート底面に6個のマイクロウェルを施した多検体プレートを製作した。ウシ及びマウス受精卵の呼吸量測定を行い、操作性と機能性を評価した結果、マイクロウェル内への受精卵の導入・設置から測定までの一連操作は問題なく行うことができ、最大6個の受精卵の呼吸測定を連続して行うことが可能となった。受精卵1個の呼吸測定に要する時間は概ね1~2分以内で完了することができた。

多検体測定プレートをベースに電極固定型デバイスを製作した。微細加工技術により、石英ガラス基板上に微小電極アレイ、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(分担研究報告:東北大学・

末永智一)。これにより、単一マウス受精卵呼吸計測の効率化に成功した。このデバイスの酸素濃度検出能について検討を行った結果、単一マウス受精卵呼吸計測が可能であることが示された。

(d) 呼吸解析ソフトの開発

呼吸計測及び解析操作の簡易化を目的に、微小電極の移動を半自動化したソフトを開発した。この呼吸解析ソフトを用いて微小電極の駆動試験を行った結果、設定したプログラムに従った微小電極走査が確認された。これにより、微小電極の試料近傍への移動の簡便化や、移動操作中における微小電極の破損防止効果が期待できる。また、解析データの視認性の向上のために、一部インターフェイスを改良し、さらに、測定データ解析のためのバックグラウンド補正計算機能を追加したソフトを製作した。

(e) 細胞呼吸測定システムの開発

走査型電気化学顕微鏡（北斗電気㈱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。具体的には、マクロ電極及び多検体測定プレートを設置するためのステージを製作した。また、微小電極を1ミクロン単位で走査するためのマイクロ電極自動駆動装置は、これまで電気化学計測装置での使用実績が多い駿河精機製を選定し、倒立型顕微鏡のステージ上に設置した。これにより、従来の走査型電気化学顕微鏡システムと比べて大幅に操作性が改善し、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）で製作した細胞呼吸測定システムを用いてウシ及びマウス胚の呼吸量を測定し、呼吸活性と胚発生能と妊娠率との関係を調べた。受精6日目の桑実胚の呼吸量を測定した後、IVD101培地を用いて3日間個別に追加培養を行い胚盤胞数及び孵化胚盤胞数を調べた。その結果、呼吸量が $1.0 \times 10^{14} \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上の胚では胚盤胞発生率（89.3%）及び孵化胚盤胞率（62.5%）が最も高く、呼吸量が低下するに従い胚盤胞発生率及び孵化胚盤胞率が低下することが明らかになった。

また、人工授精した牛から採取した胚を1日間回復培養し移植に供した。その結果、移植前の呼吸量が胚盤胞で $1.0 \times 10^{14} \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、初期胚盤胞で $0.8 \times 10^{14} \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、桑実胚で $0.5 \times 10^{14} \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ の胚を移植した場合、それぞれ58.3%、64.0%、60.7%の高い妊娠率が得られた。一方、基準値に満たない胚を移植した場合、ほとんどの胚は受胎しなかった。さらに、マウスにおける呼吸測定した胚の移植試験を実施した結果、ウシと同様に呼吸活性の高い胚は妊娠する確率が高いこと、誕生した産子も正常であることが示された（分担研究報告：秋田県立大学・横尾正樹）。

以上の結果から、「細胞呼吸測定装置」は胚の呼吸量を非侵襲的に測定できること、呼吸活性を指標に高い発生能と着床能を有する高品質胚の選別に有効であることが示された。

今年度は、生殖細胞のクオリティを遺

伝子レベルで解析・検証するためのシステムを開発するために、母体加齢および排卵後加齢による卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察した。その結果、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能障害、テロメラーゼや 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が認められた。また、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ン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。さらに、加齢卵においてテロメラーゼの発現低下が観察されたことから、加齢卵におけるテロメラーゼ活性やテロメア長を解析したところ、いずれも低下あるいは短縮していた。(分担研究報告：慶應義塾大学・浜谷敏生)。

(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、昨年度に引き続きヒト余剰胚の呼吸量測定を行った。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。また、桑実胚から胚盤胞にかけて顕著な呼吸量の増加が認められ、これに合わせてミトコンドリアも形態的に成熟することが判

明した。さらに、体外受精3日目 (Day 3) の胚の呼吸量を測定し、個々の胚の追加培養を行った結果、呼吸量 ($\times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) が基準値内 ($0.26 \leq F \leq 0.56$) の胚は、胚盤胞への発生率が高い傾向が認められた。

今年度はヒト卵子の呼吸能解析を目的に、ヒト卵子-卵丘細胞複合体 (COC) の呼吸量測定を行った。不妊治療において採取された COC を卵丘細胞の付着状態と卵子の形態的特徴を基準に次の5つのグレードに分類した。卵丘細胞が4層以上に密に付着している COC をグレード1、卵丘細胞が1~3層付着している COC をグレード2、卵丘細胞に覆われる領域が1/2以下の COC をグレード3のカテゴリーに分類した。一方、卵丘細胞が全く付着していない完全裸化卵子をグレード4、卵丘細胞が少数付着し卵子が変形しているものをグレード5のカテゴリーとした。各グレードの COC の酸素消費量を「細胞呼吸測定装置」を用いて測定した結果、卵丘細胞が最も多く付着しているグレード1の平均酸素消費量 ($\times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) は 7.79 と最大を示した。一方、付着している卵丘細胞が減少しているグレード2およびグレード3の酸素消費量は、それぞれ 1.46 および 1.26 と低く、卵丘細胞がほとんど付着していないグレード4とグレード5ではさらに少ない酸素消費量が計測された。このように、COC の呼吸活性は卵子の付着している卵丘細胞の数に大きく影響することが明らかになった。

以上の結果から、呼吸活性を指標にヒ

ト胚の品質評価が可能であること、また卵子の呼吸能解析に「細胞呼吸測定装置」が有効であることが示唆された。

また昨年度に引き続き、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結果、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(分担研究報告: 東京大学・吉野修)。さらに、凍結保存による胚の品質低下への影響を調べるために、凍結前後の胚酸素消費量を比較検討したところ、凍結保存した胚では酸素消費量が低下することが示された。呼吸量測定は、胚の凍結保存の影響を客観的に評価できる有効な方法であることが示唆された(分担研究報告: 東京大学・藤本見久)。

D. 考察

本年度は3年計画の第2年度として、以下の研究を実施した。初年度に引き続き、(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。全ての研究項目において、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、初年度同様に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、本研究事業の研究チーム構成が十分機能した。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。さらに本研究では、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他に類似の研究例はなく、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) 単一生殖細胞の呼吸量測定を可能とする超高感度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) ウシ及びマウスを用いた動物実験により、電気化学イメージング技術を基盤とする細胞呼吸測定技術は、超高感度・非侵襲的な測定技術であり、医療応用が十分可能であることが示された。
- (3) ヒト胚及び卵子(卵丘細胞複合体)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) Kurotani R., Okumura S., Matsubara T., Yokoyama U., Buckley J.R., Tomita T., Kezuka K., Nagano T., Esposito D., Taylor T.E., Gillette W.K., Ishikawa Y., Abe H.,

- Ward J.M., Kimura S. (2011) Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation. *J. Biol. Chem.*, in press.
- (2) Hirobe T., Yoshihara C., Takeuchi S., Wakamatsu K., Ito S., Abe H., Kawa Y. Soma Y. (2011) A novel deletion mutation of mouse ruby-eye 2 named ru2d/Hps5ru2-d inhibits melanocyte differentiation and its impaired differentiation is rescued by L-tyrosine". *Zool. Sci.*, 28, in press.
- (3) 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. *Cell. Rerogram.*, 12 (4):463-474.
- (4) Kimura N., Tsunoda T., Iuchi Y., Abe H., Totsukawa K., Fujii J. (2010) Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developing stages of the embryos from SOD1-deficient mice. *Mol. Human Reprod.*, 16:441-451.
- (5) 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*、27 (1)、53-58.
- (6) 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 pullulanfilms. *J. Reprod. Dev.*, 56 (2):279-284.
- (7) 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.
- (8) 阿部宏之、吉田仁秋 (2011) 電気化学計測技術を応用したヒト卵丘細胞-卵子複合体の呼吸能解析、*産婦人科の実際*、印刷中。
- (9) 阿部宏之 (2011) 卵子・胚のクオリティー評価、産科と婦人科、京都大学学術出版会、印刷中。
- (10) 阿部宏之 (2011) 走査型電気化学顕微鏡を用いた胚の評価法、卵子学、診断と治療社、印刷中。
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、珠玖 仁、末永智一、阿部宏之 (2010) 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*、59 (9) : 1375-1379.
- (14) 後藤香里、小池 恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、阿部宏之 (2010) 選択的単一胚移植 (eSET) における移植胚選別困難例に対す

る呼吸量測定の有用性、産婦人科の実際、
59 (8) : 1277-1281.

2.学会発表

- (1) 坂上信忠、西田浩司、山本禎、秋山清、阿部宏之、星宏良、鈴木千恵、吉岡耕治 (2011) ブタ体内発育胚の輸送条件の検討、第26回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (盛岡市、盛岡市民文化ホール・小ホール、2011年1月25-26日)
- (2) 角田夢人、小川 拓、阿部靖之、黒谷玲子、阿部宏之 (2011) 長期保存されたウシ卵巣におけるアポトーシス細胞の組織学的検出、第26回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (盛岡市、盛岡市民文化ホール・小ホール、2011年1月25-26日)
- (3) 海藤康平、高倉啓、阿部靖之、阿部宏之 (2011) 単一卵子培養システムにより生産したウシ胚の呼吸能解析、第26回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (盛岡市、盛岡市民文化ホール・小ホール、2011年1月25-26日)
- (4) Abe H., Shiku H., Matsue T. (2010) Analysis of respiratory activity of single oocytes and embryos with a noninvasive and highly sensitive measurement using scanning electrochemical microscopy. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2010)
- (5) 広部知久、吉原千尋、竹内栄、阿部宏之、若松一雅、伊藤祥輔、河陽子、相馬良直 (2010) ルビーアイ2の新規突然変異遺伝子 (*ru2^d/Hps5^d*) はマウスのメラノサイトの分化を抑制し毛色を薄くするが、L-チロシンはその分化抑制を回復させる、第23回日本色素細胞学会学術大会 (東京都、東京慈恵会医科大学、2010年11月27-28日)
- (6) 西園啓史、阿部宏之 (2010) マウス精子凍結保存における凍結傷害とその改善研究、第12回山形大学生命・環境科学交流セミナー「哺乳動物：生殖から発生の解明をめざして」(鶴岡市、山形大学農学部、2010年11月26日)
- (7) 小池恵、佐藤晶子、城戸京子、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2010) 選択的単一胚移植 (e-SET) におけるday3胚の呼吸量測定の試み、第55回日本生殖医学会総会・学術講演会 (徳島市、あわぎんホール (徳島郷土文化会館)、2010年11月11~13日)
- (8) 坂上信忠、阿部宏之、高木優二、秋山清 (2010) 水溶性プルランフィルムを用いて超急速ガラス化保存したウシ体外生産胚のストロー内一段階希釈法の検討、第65回関東畜産学会大会 (神奈川県海老名市、海老名市民文化会館、2010年11月5日)
- (9) Koike M., Kumasako Y., Goto K., Ito H., Utsunomiya T., Abe H. (2010) Measurement of oxygen consumption rate of embryos to select the best embryo for e-SET. The 66th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (Denver, USA, October 23-27, 2010)
- (10) 阿部宏之 (2010) 装置の開発の経緯と基礎データ、第1回細胞呼吸測定研究会 産婦人科部会 (仙台市、東北大学未来医学治療開発センター、2010年10月12日)
- (11) 阿部宏之、横尾正樹、伊藤 (佐々木) 隆広、山下祥子、珠玖仁、星宏良、末永智一 (2010)

- 電気化学計測技術を応用した受精卵ミトコンドリア呼吸機能解析、日本動物学会第81回大会（東京都、東京大学教養学部、2010年9月23-25日）
- (12) 阿部宏之（2010）高感度呼吸計測による胚・卵の品質評価、第13回日本IVF学会（大阪市、大阪国際会議場・グランキューブ大阪、2010年9月18-19日）
- (13) Kumasako Y., Goto K., Koike M., Araki Y., Utsunomiya T., Abe H. (2010) Measuring the oxygen consumption of individual human embryos by a scanning electrochemical microscopy. 5th International Symposium on Chemical-Environmental-Biomedical Technology for Young Researchers (isCEBT), Tohoku University, Sendai, September 5-8, 2010)
- (14) Nagahata H., Ooe M., Kayamoto R., Abe Y., Abe H. (2010) Time-lapses analysis of mouse embryo development with real-time cultured cell monitoring system. 5th International Symposium on Chemical-Environmental-Biomedical Technology for Young Researchers (isCEBT), Tohoku University, Sendai, September 5-8, 2010)
- (15) 西園啓文、佐藤佑一朗、上村尚美、太田茂男、阿部宏之（2010）新規細胞抑制タンパク質を用いたミトコンドリア機能保護というまったく新しいアプローチによる精子保存技術の開発、第103回日本繁殖生物学会大会（十和田市、北里大学獣医学部キャンパス、2010年9月2-4日）
- (16) 阿部宏之、山下祥子、星宏良（2010）超高精度細胞呼吸計測技術を応用したウシ受精卵ミトコンドリア機能に影響する血清因子の解析、第103回日本繁殖生物学会大会（十和田市、北里大学獣医学部キャンパス、2010年9月2-4日）
- (17) Utsunomiya T., Yasuhisa A., Abe H. (2010) Benefit of measuring oxygen consumption for increasing pregnancy rate. The 2nd Japan-Korea ART Conference 2010 (The Westin Resort & Conference Center, Awaji Island, Japan, August 12-13, 2010)
- (18) 阿部宏之、山下祥子、星宏良（2010）ウシ胚ミトコンドリア機能に影響する血清因子の解析、日本動物学会平成22年度東北支部大会（福島市、福島県立医科大学光が丘会館、2010年8月7日）
- (19) 山中昌哉、橋本周、天羽杏実、右島理可、阿部宏之、檜垣将二郎、伊藤隆広、森本義晴（2010）ヒト凍結融解胚盤胞の呼吸測定による退行予測の検討、第28回日本受精着床学会総会・学術講演会（横浜市、パシフィコ横浜、2010年7月28-29日）
- (20) 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（2010）選択的単一胚移植(eSET)において移植胚選択に迷う症例での胚呼吸量測定の有有用性、第28回日本受精着床学会総会・学術講演会（横浜市、パシフィコ横浜、2010年7月28-29日）
- (21) 阿部宏之（2010）超高感度細胞呼吸測定による胚のクオリティー評価、ART (Assisted Reproductive Technology) Forum'10（横浜市、パシフィコ横浜、2010年7月28日）

(22) Utsunomiya T., Kumasako Y., Ito H., Goto K., Koike M., Abe H. (2010) Measurement of oxygen consumption rate of embryos to select the best embryo for e-set. The 26th Annual Meeting of ESHRE (June 27-30, 2010, Rome, Italy)

(23) 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 (2010) 異なる成熟培地により得られた体外成熟卵母細胞のミトコンドリア機能への影響、第51回日本哺乳動物卵子学会 (新潟市、朱鷺メッセ、2010年5月29-30日)

(24) 小池恵、佐藤晶子、城戸京子、後藤香里、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2010) 選択的単一胚移植(e-SET)におけるday3胚の呼吸量測定を試み、第51回日本哺乳動物卵子学会 (新潟市、朱鷺メッセ、2010年5月29-30日)

(25) 後藤香里、熊迫陽子、小池恵、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、阿部宏之 (2010) 移植胚選別困難例における胚呼吸量測定の有用性、第67回日本生殖医学会九州支部会 (福岡市、エルガーラホール、2010年5月9日)

(26) Kumasako Y., Goto K., Koike M., Utsunomiya T., Araki Y., Abe H. (2010) Clinical efficacy of a novel evaluation method with measurement of the embryo oxygen consumption rate using a scanning electrochemical microscopy. 3rd Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2010) (Bangkok, Thailand, April 9-11, 2010)

(27) 阿部宏之 (2010) 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、平成21年度厚生労働科学研究費成果等普及啓発事業 医療機器開発推進研究・ナノメディシン研究成果発表会 (東京都、財団法人がん研究振興財団 国際研究交流会館、2010年2月24日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得 (出願)

(1) ウェルユニット及び電気化学的分析法 (青柳重夫、内海陽介、末永智一、珠玖仁、阿部宏之、河野浩之、柏崎寿宣、星 宏良、星 翼) 2010年9月17日、特願2010-208817号。

(添付図)

【研究全体の流れ:概要図】



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。昨年度は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。本年度は、この方法論に立脚した電極固定型デバイスを開発した。これにより、単一マウス受精卵呼吸計測の効率化に成功した。

A. 研究目的

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。

受精卵呼吸測定装置は、走査型電気化学顕微鏡 (scanning electrochemical microscopy, SECM) を基にしているために、プローブである微小電極の操作を行う必要がある。測定時の微小操作こそステッピングモーターにより自動化されているものの、サンプル胚の近傍までの電極の移動および測定開始位置の決定は手動で行われており、技術の習得に熟練を要する。つまり、微小電極を走査する測定原理では、操作性、スループットに限界があった。

昨年度は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。本年度は、昨年度の知見をもとにマイクロ電極を計測チップに固定化した電気化学集積型デバイスを開発した。

B. 研究方法

微細加工技術により、石英ガラス基板上に微小電極アレイ、 SiO_2 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、

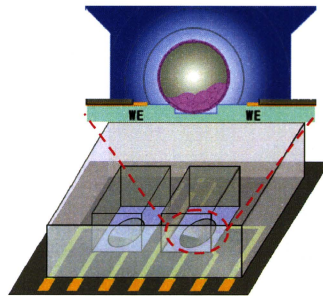


図1 受精卵呼吸測定用チップ。

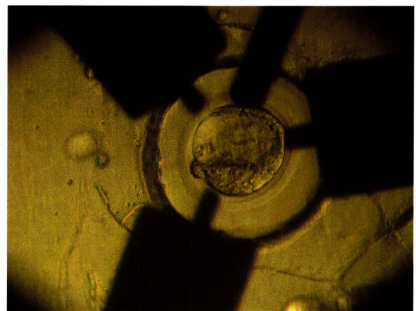


図2 酸素還元電流観測用の検知電極アレイ (WE1~WE3)。中央にマウス胚盤胞期胚が静置されている。

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(図1)。受精卵呼吸測定用チップとして、電極を3本(W1~W3)とし、胚位置規定補助のためのウェルを湿式エッチングにより基板上に作製し、逆円錐型のPDMSウェルを基板と接着したものを使用して測定を行った(図2)。測定手順として、まず、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。測定開始(0s)から60s程度、胚を入れずにバルク電流を測定し、その平均値をバルク電流値*i**とした。その後、ガラスキャピラリーを用いて胚をPDMSウェル内に移動し、操作終了後、電流値が安定するまで600s間電流値を測定し、測定終了までの最後の60sの電流値の平均をサンプル電流値*i*とした。同様の操作を、胚を用いずに行い、ネガティブコントロールを測定した。

C. 研究結果

受精卵呼吸測定チップの酸素濃度検出能について検討を行った。1M 亜硫酸ナトリウム(Na₂SO₃)水溶液を適量滴下し、PBS(-)溶液中の酸素濃度を決定した。酸素濃度と電流値とは直線性を示した(相関係数 R = 0.982)。ネガティブコントロールでは、電流値の減少は認められなかった。それに対して、サンプルの胚を用いた電極(W1~W3)においては、マウス胚の導入操作によるノイズの後に定常値を示したが、その値はバルク電流値から減少していた。また、3つの異なる位置にある電極(W1~W3)で同様の電流値変化が見られることから、同時に多方向からマウス胚の酸素消費量測定を行うことが出来た(図3)。マウス胚は、発生段階が進むにつれ極性を持つことが知られている。そのため、胚の向きにより、同一の胚でも呼吸量が増加することが考えられる。今回の結果から、受精卵呼吸測定チップを用いることで胚の極性に起因する同一胚内での呼吸量の差異を測定できることが予想される。

単一胚呼吸活性の検出

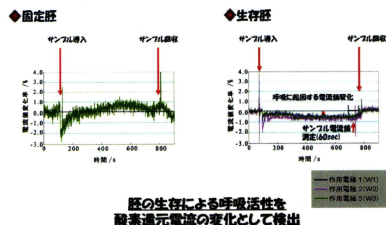


図3 受精卵呼吸測定用チップにより観測されたマウス胚の電流応答。固定胚(左)と生存胚(右)。

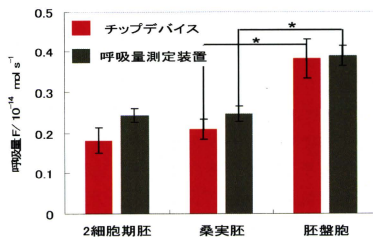


図4 マウス胚の発生ステージごとの呼吸量。従来法(呼吸量測定装置)とチップデバイスにより観測された値を示した。

受精卵呼吸測定用チップおよび、従来法である呼吸量測定装置(HV405、北斗電工)により、マウス胚の発生ステージごとの呼吸量を測定した(図4)。呼吸量は胚発生ステージの進行に伴い増加し、従来法とチップデバイスの結果は傾向としてよく一致した。

D. 考察

本デバイスを用いた呼吸活性評価の再現性について評価を行った。同一サンプルに対して2回測定を行い、1回目の測定値と2回目の測定値をプロットし相関を評価した。プロットに対して線形近似により近似直線を作成したところ、傾きが1.004、相関係数が0.942とな

った。この値を、1回目の測定値と2回目の測定値が完全に一致するという仮定の下作成した直線の傾き 1.00 と有意差検定を行ったところ、有意な差は認められなかった。このことから、本デバイスを用いた呼吸活性評価の測定値には再現性があることが示され、本デバイスを用いた呼吸活性評価の可能性が示された。

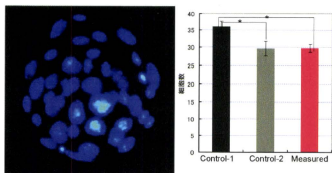


図5 マウス胚の発生ステージごとの呼吸量。従来法(呼吸量測定装置)とチップデバイスにより観測された値を示した。

本デバイスを用いた呼吸活性評価がサンプルへ与えるストレスについて評価を行った。マウスより回収した2細胞期胚について呼吸活性評価を行った後、温度 37°C、気相条件 5% CO₂、95% Air のインキュベーター内で培養を行い胚盤胞まで発生させた。胚盤胞まで発生させた胚を4% パラホルムアルデヒドで固定化処理を行った後、Hoechst33342を用いて核染色を行い、胚内部の細胞数を計測した(図5左)。呼吸活性評価を行ったグループ(Measured)と比較するために、回収後呼吸活性評価を行わず培養のみを行ったグループ(Control-1)、呼吸活性評価を行った胚と同一の時間インキュベーター外で静置したグループ(Control-2)に対しても同様の操作を行い、細胞数を比較しストレスの評価を行った(図5右)。Control-1とControl-2、Control-1とMeasuredの間にそれぞれ有意な差(P<0.05)が認められた。一方、Control-2とMeasuredの間には有意な差が認められなかった。このことから、胚に与えられるストレスは電気化学計測に起因するものではなく、インキュベーター外で操作したことによる温度ストレスであると考えられる。温度ストレスを低減するためには、一つ一つの作業を手早く行う、測定時間を短くするといったことが考えられる。

E. 結論

3本の作用電極による同時計測を行うチップデバイスを作製し、電気化学的酸素検出能の評価を行った。続いて、単一胚の呼吸活性に起因する酸素還元電流の変化の計測を行い、胚の生死判別、発生ステージ間の呼吸活性の差異を検出することに成功した。また、呼吸活性評価が胚に与える影響について評価し、温度ストレスが存在することとその改善点についていくつか提案を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

- K. Nagamine, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue*. Influence of tip size on single yeast cell imaging with scanning electrochemical microscopy. *Electroanalysis*, Accepted (2011). DOI: 10.1002/elan.201000595
- Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y. E. Korchev, T. Matsue*. Simultaneous non-contact topography and electrochemical imaging by SECM/SICM featuring ion current feedback regulation. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(29), 10118-10126 (2010).
- H. Shiku, D. Okazaki, J. Suzuki, Y. Takahashi, T. Murata, H. Akita, H. Harashima, K. Ino, T. Matsue*. Quantitative characterization of reporter gene expression at single cell level with real-time RT-PCR, chemluminescence, fluorescence, and electrochemical imaging. *FEBS Lett.* 584, 4000-4008 (2010).
- H. Shiku, J. Suzuki, T. Murata, K. Ino, T. Matsue*. Chronoamperometric characterization of secreted alkaline phosphatase from single cell entrapped in a poly(dimethylsiloxane) microwell. *Electrochimica Acta* 55, 8623-8627 (2010).
- Z. Lin, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue*. Electrochemical topography of a cell monolayer with an addressable microelectrode array. *Chem. Commun.* 46, 559-561 (2010).
- Z. Lin, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue*, G. Chen. Addressable Electrochemiluminescence detection system based on redox-cycling of Ru(bpy)₃²⁺. *Chem. Commun.* 46, 243-245 (2010).
- 2. 学会発表
 - H. Shiku, K. Ino, and T. Matsue*, Single-Cell Analysis by Multi-Functional Scanning Probes, *MRSJ 2010*, Yokohama, December 22, 2010.
 - H. Shiku, Y. Takahashi, K. Ino, T. Matsue*.

Electrochemical imaging techniques with scanning probe and addressable microelectrode array, *Pacificchem 2010*, Hawaii, USA. December 15, **2010**.

- H. Shiku, K. Ino, T. Matsue*. Evaluation of mRNA and protein expressions at single-cell level, *Pacificchem 2010*, Hawaii, USA. December 19, **2010**.

- 珠玖 仁,高橋康史,伊野浩介,末永智一「多機能ナノ電気化学顕微鏡によるソフト界面へのアプローチ」第59回高分子討論会、北海道大学. 2010. 09. 16.