

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

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

実験①胚の酸素消費量測定法についての装置改善：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。また、実験②として、ウシ胚の培養系確立を目指した。

<実験①胚の酸素消費量測定法についての装置改善>

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いふ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。

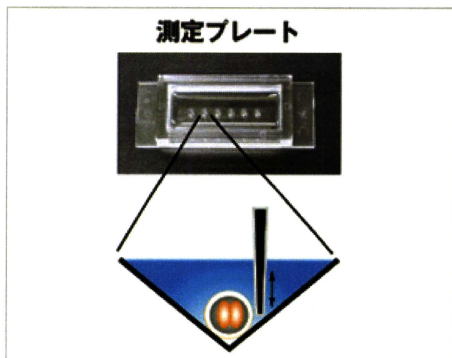
尚、同検討は山王病院 リプロダクションセンター藤原敏博先生と共同で行った。

B. 研究方法、結果等

測定方法の改善

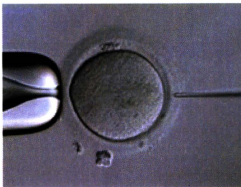
これまで、胚の酸素消費量測定は、‘すり鉢状’の容器に置き、微小電極を上方から少しずつ降ろして行くという方法をとっていた（図1）。昨年度の本研究において、微小電極を斜め上

図1 これまでの測定プレート



から鉢状の壁に添わせながら、降ろしていく方法を開発した。同方法に変えたことで、電極の

損傷・破損は全くなくなった。しかし、現行でも、胚を固定する目的ですり鉢状の測定プレート(図1)に胚を一つずつ移動する必要がある。できるだけ胚への余分な操作を減らすことが、胚酸素消費量測定の普及に繋がる。そこで、通常の培養容器を用いて胚の固定をおこなう方策として、顕微授精時に胚を固定する際にもちいるホールディングピペットを用いて胚を固定し、酸素消費量測定のための電極を胚の近傍に移動する方法を考案した(図2)。同方法を用いることで、胚の酸素消費量測定が簡便になることが期待される。



(図2)

<実験②ウシ胚の培養系確立について>

胚酸素消費量は不妊治療において、胚の選別に関して大変有用なツールに成り得る。しかし、現在、東京大学ではヒト胚を直接実験に使用する場合は廃棄卵を用いるとの制約がある。そこで、基礎的実験を行うことを目的にウシ胚の培養を確立することを試みた。未熟卵を培養し、成熟卵子(M2卵)まで育てた後に、媒精し胚を得る方法とした。

今年度は、ウシ未熟卵子を培養(in vitro maturation)し、受精可能であることを確認することができた。今後は同胚を用いて酸素消費量に関する基礎的実験を行うことができるので、基礎的実験を円滑に行うことができるようになり、ヒト胚への臨床応用がスムーズに移行することが期待される。

健康危険情報 なし

E. 研究発表

<学会発表>

第62回日本産科婦人科学会総会(東京)

吉野 修、大須賀穰、矢野 哲、西井 修、武谷 雄二

ヒト卵巣における bone morphogenetic protein 2 (BMP2)の役割に関する検討

第62回日本産科婦人科学会総会(東京)

児玉亜子、大須賀穰、吉野 修、泉玄太郎、高村将司、長谷川亜希子、竹村由里、平田哲也、甲賀かをり、矢野 哲、武谷雄二

TGF β は子宮内膜症細胞において PAR2の発現ならびに機能を増強する(高得点演題)

第62回日本産科婦人科学会総会(東京)

高村将司、甲賀かをり、泉玄太郎、児玉亜子、田島敏樹、長谷川亜希子、竹村由里、原田美由紀、吉野 修、大須賀穰、武谷雄二

腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術後の再発率低下に低用量ピル(OC)は有益である

第55回日本生殖医学会総会(徳島)

吉野 修、大須賀 穰、折坂 誠、浅田 弘法、古谷 正敬、大貫 裕子、廣井 久彦、藤原 敏博、小辻 文和、吉村 泰典、西井 修、武谷 雄二

子宮筋腫により誘導される子宮内膜の異常蠕動は妊娠率を低下させる。

第32回 エンドメトリオーシス学会(東京)

吉野 修、泉玄太郎、施佳、大須賀穰、浦田陽子、高村将司、甲賀かをり、西井 修、武谷雄二
子宮内膜症におけるアクチビンAの発現調節と機能に関する検討

第9 2 回米国内分泌会議 (サンディエゴ)

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) increases gene expression of FSH receptor and aromatase and decreases gene expression of LH receptor and StAR in human granulosa cells.

〈論文発表〉

1: Yoshino O, Hori M, Osuga Y, Hayashi T, Sadoshima Y, Tsuchiya H, Nishii O, Taketani Y. Myomectomy reduces endometrial T2 relaxation times. *Fertil Steril*. 2011 Feb 10.

2: Wang B, Koga K, Osuga Y, Hirata T, Saito A, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, Fujii T, Taketani Y. High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Levels in the Placenta and in Serum in Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Jan 18.

3: Harada M, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Takemura Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani Y. Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study. *Gynecol Endocrinol*. 2010 Dec 15.

4: Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Kodama A, Hirota Y, Koga K, Yoshino O, Harada M, Takemura Y, Yano T, Taketani Y. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells. *Endocrinology*. 2010 Nov;151(11):5468-76.

5: Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Nose E, Nishii O, Yano T,

Taketani Y. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) increases gene expression of FSH receptor and aromatase and decreases gene expression of LH receptor and StAR in human granulosa cells. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Apr;65(4):421-7.

6: Yoshino O, Hayashi T, Osuga Y, Orisaka M, Asada H, Okuda S, Hori M, Furuya M, Onuki H, Sadoshima Y, Hiroi H, Fujiwara T, Kotsuji F, Yoshimura Y, Nishii O, Taketani Y. Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids. *Hum Reprod*. 2010 Oct;25(10):2475-9.

7: Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Jan;65(1):1-10.

8: 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*. 2010 May 15;93(8):2757-9.

9: 吉野 修、大須賀 穣

卵胞発育と血管新生

ホルモンフロンティア、メディカルレビュー社編、2010 VOL. 17, No. 3:227-235.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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

分担研究者 藤本 晃久 東京大学産科婦人科教室・助教

研究要旨

近年の体外受精技術の進歩に伴い、胚凍結移植法が妊娠率向上に寄与する寄与することが知られている。今回、ヒト胚を用いた凍結前後の酸素消費量を測定することで、胚のクオリティを客観的に評価し得るか検討を行った。

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、現状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、胚の凍結、融解を行うことで、卵子の採取時期と移植時期をずらすことが可能とな

った。そして、子宮内膜が自然周期に近い状態で胚を移植することで、妊娠率の向上に寄与することが知られている。しかし複数個の凍結胚がある場合、融解すべき胚を特定することは肉眼的の見だけでは難しい場合も想定される。また、凍結、融解手技が胚に与える影響に関しては、一般的に肉眼的の見に委ねられており、その評価法が確立していない。今回、凍結、融解前後で胚の酸素消費量を評価し、同手技が胚に与える影響、および複数胚から良好な融解胚を選び出すことができるかを評価した。

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、検体採取して検討を行った。また、同研究では、廃棄卵のみを使用した。

凍結前に胚の形態を顕微鏡下に観察し、続いて呼吸能測定器を用いて酸素消費量を測定した。その後、胚を急速凍結法を用いて凍結し、数か月間液体窒素下に保存した。その後、胚を融解し、3・4時間ほど回復培養をしてから再度、胚の形態学的分類および酸素消費量を測定した。

酸素消費量測定は胚の2か所を測定し、平均値をだした。

C. 研究結果 および D. 考察

結果) 5ケの胚を用いて検討を行った。全ての胚が凍結融解後に胚の形態学的所見が低下していた。(表1) また、凍結前後の酸素消費量を比較検討したところ、凍結後に酸素消費量が低下していた。今回の検討で、明らかになったこととして、1) 胚の凍結融解は胚にとって、悪影響を与えること 2) 胚の質が悪くなった場合、その変化を酸素消費量で評価することができることが挙げられる。近年の不妊治療では多胎妊娠を予防するために、移植胚数の制限が行われている。複数の胚が得られた場合、凍結する胚の数が増えることが考えられる。即ち、今後の不妊治療では複数の凍結胚の中から、良好胚を選び出すことが必要となる。今回の検討で、胚の酸素消費量測定は、胚の機能評価が可能であることを確認することができ、今後、同測定法が胚の選択に使用できる可能性を示した。今回、当初から質の悪い胚を使用したのが、良好胚を用いた検討も必要であると思われる。また、凍結胚融解は酸素消費量のみならず、胚の形態学的分類においても胚の質を低下させた。凍結胚融解法が不妊治療に占める割合が増加することが予想されることから、同技術の改善は必要であることが再認識された。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

2010年度 学会発表

1) 男性型脱毛症の治療薬の中止により精子無力症が著明に改善した症例 小泉美奈子、廣井久彦、藤本晃久、大須賀穰、百枝幹雄、矢野哲、武谷雄二。2010年11月 第55回生殖医学会 徳島

2) 腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術の卵巣予備能へ与える影響についての検討 原田美由紀、大須賀穰、藤本晃久、大井なぎさ、矢野哲、武谷雄二。2010年11月 第55回生殖医学会 徳島

3) 当科における Conventional IVF および ICSI における異数前核胚の出現頻度と妊娠例 大井なぎさ、藤本晃久、小泉美奈子、原田美由紀、竹村由里、堤亮、渡邊善、渡辺裕子、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二。2010年11月 第55回生殖医学会 徳島

4) 38歳以上不妊症症例に対する一般不妊治療法の有効性と適応基準の検討 磯野涉(東京大学)、平池修、大須賀穰、藤本晃久、百枝幹雄、久具宏司、矢野哲、武谷雄二。2010年11月 第55回生殖医学会 徳島

5) 子宮体癌・子宮内膜異型増殖症に対する子宮温存治療後の ART 成績に関する検討 市瀬茉里(東京大学 医学部産婦人科)、藤本晃久、大井なぎさ、渡辺裕子、渡邊善、竹村由里、原田美由紀、小泉美奈子、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二。2010年11月 第55回生殖医学会 徳島

6) 婦人科におけるトレーニングシステムへの LapVR の導入に向けた検討 渡邊善、大須賀穰、百枝幹雄、廣井久彦、田口歩、藤本晃久、矢野哲、武谷雄二。2010年10月 第23回内視鏡外科学会

7) 当科における過去5年間の腹腔鏡下手術に伴う合併症の検討 宮下真理子、原田美由紀、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二。第120回関東連合地方部会 11月 つくば

8) 当科における単孔式腹腔鏡下手術の現況 長坂貴顕(東京大学 医学部産婦人科)、中江華子、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二。第120回関東連合地方部会 11月 つくば

- 9) 診断に苦慮した卵巣外子宮内膜症性嚢胞の2症例 高橋千波, 小泉美奈子, 藤本晃久, 中澤明里, 中尾美木, 大須賀穰, 百枝幹雄, 矢野哲, 武谷雄二 第120回関東連合地方部会 11月 つくば
- 10) 子宮動脈塞栓術後の子宮鏡手術で切除した胎盤ポリープの1例 北麻里子, 田口歩, 堤亮, 平池修, 廣井久彦, 藤本晃久, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二 2010年2月 353回 日本産科婦人科学会東京地方部会
- 11) 子宮内膜ポリープに対する黄体・卵胞ホルモン混合製剤の効果についての検討 平池修, 大須賀穰, 竹村由里, 小泉美奈子, 甲賀かをり, 廣井久彦, 藤本晃久, 丸山正統, 百枝幹雄, 久具宏司, 矢野哲, 武谷雄二 62回日本産科婦人科学会 2010年4月東京
- 12) レボノルゲストレル(LNG)単独投与による緊急避妊の作用機序の検討 矢野直美(池下レディースクリニック吉祥寺), 大須賀穰, 矢野哲, 藤本晃久, 北村邦夫, 武谷雄二 62回日本産科婦人科学会 2010年4月東京
- 13) Endometriosis and risk of placenta previa in pregnancies after assisted reproductive technology Y Takemura, A Fujimoto, Y Osuga, R Tsutsumi, N Ooi, T Yano, Y Taketani ESHRE Annual Meeting 2010.7 Roma

論文・著書

- 1) 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
- 2) 藤本晃久, 矢野哲 OGS now 1 開腹・閉腹と付属器手術 基本手技の完全マスター 卵管結紮術 134-141 2010.2

3) Successful management of a ruptured endometrial cyst in acute leukemia. Taguchi A, Koga K, Osuga Y, Fujimoto A, Miyasaka A, Yano T, Kurokawa M, Taketani Y. Fertil Steril. 2011 Jan;95(1):292.e1-3

4) Sessile polyps and pedunculated polyps respond differently to oral contraceptives. Wada-Hiraike O, Osuga Y, Hiroi H, Fujimoto A, Maruyama M, Yano T, Taketani Y. Gynecol Endocrinol. 2010 Jun 9. [Epub ahead of print]

5) Case of chronic ectopic pregnancy diagnosed in which the complete shape of the fetus was visible by ultrasonography. Harada M, Hiroi H, Fujiwara T, Fujimoto A, Kikuchi A, Osuga Y, Momoeda M, Kugu K, Yano T, Taketani Y. J Obstet Gynaecol Res. 2010 Apr;36(2):462-5.

6) 子宮動脈塞栓術後の子宮鏡手術で切除した胎盤ポリープの1例 北麻里子(東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科), 田口歩, 堤亮, 平池修, 廣井久彦, 藤本晃久, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二 日本産科婦人科学会東京地方部会会誌 59巻2号 Page284-287, 2010

7) 帝王切開術後3ヵ月に大量性器出血をきたした子宮仮性動脈瘤破裂の1例 磯野渉, 堤亮, 砂川空広, 廣井久彦, 藤本晃久, 大須賀穰, 矢野哲, 武谷雄二 日本産科婦人科学会東京地方部会会誌 59巻1号 Page137-140, 2010

8) 腹腔鏡用超音波プローブが有用であった
卵管間質部妊娠 山本直子, 廣井久彦, 大須
賀讓, 平田哲也, 藤本晃久, 矢野哲, 武谷雄
二 日産婦内視鏡学会 第26巻第2号

Page374-377, 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況：なし

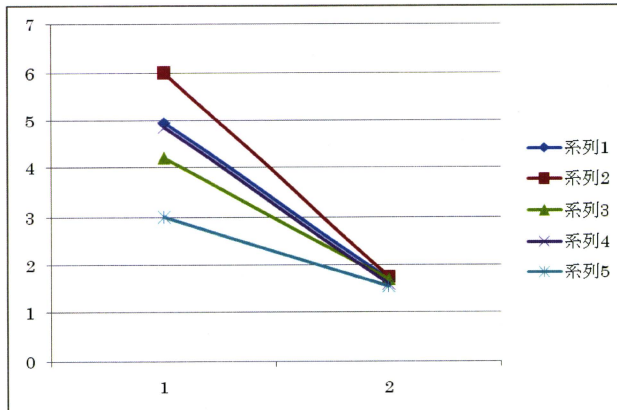
図 1

胚の凍結前後における形態学的所見。数字は細胞数、ローマ字は数字が少ないほど良好な胚であることを示す。

| 凍結前 | 凍結後 |
|---------|-----------|
| ① 5II | 3cell+変性 |
| ② 5III | 3cell+変性 |
| ③ 5V | 5V+変性 |
| ④ 6V | 変性気味 |
| ⑤ mor V | mor V +変性 |

図 2 凍結胚融解前後で同一胚を測定した際の酸素呼吸量

X 軸 1. 凍結前 2. 凍結融解後 Y 軸：酸素消費量 (単位 $10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$)



分担研究報告書

卵子の分子生物学的解析

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

研究要旨

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、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。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。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。今後は、テロメア短縮のメカニズムについても、さらに検討を加える予定である。

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・データの変化を多角的に解析し、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。

- (i) hCG 注射後 14 時間で採取した新鮮卵 (fresh)
- (ii) hCG 注射後 23 時間で採取した加齢卵 (*in vivo* aged)
- (iii) 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)
- (iv) 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。

卵の加齢におけるテロメア・バイオロジー

まず、高齢マウス卵におけるテロメラーゼ (*Tert*) の RNA 発現の低下を、qPCR により確認した。高齢マウスと若齢マウス卵、それぞれのマウス

から別の日に集めた3つのlotよりmRNAを抽出、cDNAを合成し、qPCRを行った。qPCRの結果、高齢マウス卵における *Tert* のRNA発現は 6.0 ± 1.4 (対GAPDH)で、若齢マウス卵におけるRNA発現 11.5 ± 1.6 (対 *Gapdh*)に比し、0.53倍と有意に減少していた。これは、マイクロアレイの結果(0.63倍)とほぼ同様であった。

次に、*Tert* 蛋白に対するポリクローナル抗体を用いて、若齢マウス卵と高齢マウス卵におけるタンパク発現を検討した。*Tert* 蛋白は、若齢・高齢いずれの卵でも細胞質全般に認められたが、特に若齢マウス卵では中心部に比べて細胞膜近傍にやや強い局在を認めた。一方、高齢マウス卵では、発現自体が著名に低下しており、また斑状に欠損するなどの不規則な発現パターンも認められた。

さらに、Telomerase PCR ELISA kit (ロシユ・ダイアグノスティックス)を用いて、*in vitro*でテロメア伸長反応を行わせることにより、テロメラーゼ酵素活性を測定した。その結果、*Tert* の発現のみならず、テロメラーゼ逆転写酵素活性も加齢とともに43%にまで有意に低下していることが明らかとなった(高齢マウス卵/若齢マウス卵: $0.30 \pm 0.11/0.70 \pm 0.01$)。

テロメア長についてはqPCRを用いて検討した。高齢マウス卵のテロメア長(0.84 ± 0.10)は、若齢マウス卵のテロメア長(1.74 ± 0.20)に比べて0.48倍と有意に減少していた。

以上の結果から、卵形成過程では卵母細胞はほとんど分裂をしないにもかかわらず、実際、加齢によりテロメア長が短くなることが明らかとなった。

テロメラーゼ欠損マウスから排卵された卵細胞のテロメア長も、wild typeのそれよりも短いことが報告されているため(Liu et al., Nat Cell Biol. 2007)、加齢によるテロメラーゼの発現および活性の低下がテロメア長の短縮に寄与していると考えられる。高齢マウスでは、排卵に至るまでのintervalが長くなり、加齢によって卵におけるテロメラーゼ活性が落ち、酸化ストレスの蓄積も加わり、テロメア長が維持できずに短縮してしまうと考えられた。さらに最近で

は、着床前期胚発生におけるテロメア長の短縮がフラグメンテーションの増加と相関すると報告されており (Keefe et al., Am J Obstet Gynecol. 2005)、加齢によるテロメラーゼの発現および活性の低下が着床前期胚発生を障害する可能性が示唆されるものの、今後のさらなる検討が必要である。

(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

排卵後の卵細胞の *in vitro* 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)。

電気化学的手法による加齢卵の酸素消費量測定

さらに、ここで認められたミトコリア機能の低下が、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) *Hmgpi* 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ンドリアの機能障害、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、超高度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された。また、加齢卵では、テロメラーゼの発現・活性の低下とテロメア長の短縮が認められたため、今後はテロメア短縮の分子メカニズムとその生物学的意義について検討する。

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

論文発表

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. *Hum Mol Genet.* 19(3):480-93, 2010.

Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. *Curr Med Chem.* 17(28):3245-52, 2010..

Tarín JJ, Hamatani T, Cano A. Acute stress may induce ovulation in women. *Reprod Biol Endocrinol.* 26:8:53, 2010.

Hamatani T. Spermatozoal RNA profiling towards a clinical evaluation of sperm quality. *Reprod BioMed Online* 22(2): 103-105, 2011

学会発表

持丸佳之, 久慈直昭, 山田満穂, 奥村典子, 高野光子, 浜谷敏生, 阿久津英恵, 浅田弘法, 末

岡浩, 青木大輔, 吉村泰典. マウス単一卵子の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析とその応用. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2010 年 4 月 23 日

山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 奥村典子, 持丸佳之, 浅田弘法, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典. 着床前期特異的新規遺伝子 Hmgs による着床周辺期発生の制御機構. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2010 年 4 月 23 日

山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 小川誠司, 奥村典子, 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. 着床前期胚特異的新規遺伝子 Hmgpi による着床周辺期発生の制御機構. 第 51 回日本哺乳動物卵子学会, 新潟, 2010 年 5 月 30 日

Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Identification of a novel gene encoding a high mobility group box protein and its specific expression and essential role during preimplantation development. The First SKLRB Symposia on Frontiers in Periimplantation Biology, the Beijing Friendship Hotel, Beijing, May 8-12, 2010, 5.

Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Identification of a novel gene encoding a high mobility group box protein and its specific expression and essential role during preimplantation development. The H.

26th Annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Rome, Italy, 2010, 6.

近澤奈々, 津村秀樹, 山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 久慈直昭, 梅澤明弘, 吉村泰典. 着床前期および未分化維持に関わる新規 zinc finger 遺伝子の解析. 第 28 回受精着床学会・学術講演会, 横浜, 2010 年 7 月 28 日

福永朝子, 浜谷敏生, 山田満稔, 阿久津英憲, 井上治, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 近澤奈々, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典. マウス卵子上における排卵後加齢による遺伝子発現変化の解析. 第 55 回日本生殖医学学会・学術講演会, 徳島, 2010 年 11 月 11 日

近澤奈々, 浜谷敏生, 山田満稔, 阿久津英憲, 奥村典子, 久慈直昭, 吉村泰典. 着床前期胚に特異的な発現が予想された新規 zinc finger 遺伝子の発現・機能解析. 第 55 回日本生殖医学学会・学術講演会, 徳島, 2010 年 11 月 11 日

山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 井上治, 福永朝子, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 近澤奈々, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典. マウス卵子上における加齢によるテロメア長短縮とテロメラーゼ活性の変化. 第 55 回日本生殖医学学会・学術講演会, 徳島, 2010 年 11 月 11 日

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(o) あるいは 新鮮卵(i) 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 (o) で有意に高発現していた遺伝子 | 新鮮卵 (i) で有意に高発現していた遺伝子 |
|---|--|--|
| 加齢卵 (o) 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 Electron transport Hematopoietic or lymphoid organ development Chromatin assembly / Chromatin Receptor activity Cell surface receptor linked signal transduction Hormone activity Inflammatory response | <i>Alas2, Atp6v1a, Ecl2l1, Cye1, Pccb, Mrp120, Mrp121, Mrps24, Mrps14, Mrrf, Spata19, Slc25a3, Tric1, Tomm40, Alas2, Cye1, Dgke, Kikb1, Pcyox11, Zdhbc4, Acvr1b, Alas2, Cxcl13, Hoxa3, Mb, Mitf, Cbx5, Hist1h1a, Hist1h3g, Sirt6, Sox4, Acvr1b, Calcr, Gabra3, Lepr, Lphn2, Marco, Mc1r, Ncoa2, Notch4, Olf414, Olf453, Olf801, P2rx4, Fppn12, Slamf7, Tlr2, Unc5d, Acvr1b, Bmpcr, Calcr, Copeb, Dgke, Dkk3, Gabra3, Lphn2, Mitf, Mc1r15, Notch4, Olf453, Olf414, Olf801, Rqcd1, Tlr2, Abpa, Ins2, Lhb, Prl8a2, Cxcl13, Kikb13, Tlr2</i> |
| 新鮮卵 (i) 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 Antioxidant activity Oxidoreductase activity Translation / Ribosome S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity Ion transporter activity / Channel or pore class transporter activity Cytokine production / Interleukin receptor activity Microtubule-based movement Angiogenesis | <i>Absc1, Atp5b, Cox7c, Cye2, Egrf, Mtc2, Ndufa1, Ndufa5, Nduoa11, Pmpcb, Rhot2, Sthb, Tomm22, Txndc5, Txnrd1, Uqcr, Uqcrf1, APOA4, KIF9, NPN3, FPP1R15b, PSMb5, Sod1, Srxn1, Tcnrd1, Ndufa1, Ndufa5, Ndufa11, Txnrd1, Uqcr, Uqcrf1, Cdh16, Dars2, Eo1d, EG666738, Eip2b5, Eif3k, Eif4b, Mrp14, Mrp130, Ppp1r15b, Pstk, Pum1, Rnf128, Rpl6, Rpl23a, Rpl39, Rplp1, Rps29, Sycp1, Uba52, Bat8, Dmt1, Dnmt1, Icm1, Gnm1</i> |
| | | <i>Aqp6, Atp1b2, Atp10a, Atp1c, Atp5j, Atp6ap2, Chrna2, Chrna9, Cox7c, Gabrd, Gabre, Hiatt1, Kctd2, Nup35, P2rx1, P2rx11, Ryr3, Slc4a10, Slc12a2, Slc30a5, Slc38a15, Uqcr, Uqcrf1, Atp6ap2, Irf3, Il1rap, Kir1, Rnf128, Il1r1, Il1rap, Il12rb2, Dnahe10, Kif8a, Kif9, Kif11, Kif13b, Rho42, Tubb2, Aqpl2, Aqpl4, Iqav, Ptxc2, Ubp1, Tufb13, Vegfa, Vegf</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の、胚の品質評価方法としての有効性および安全性を検証するため、マウスをモデル動物に用いて実験した。平成 21 年度では、受精卵呼吸測定装置による胚の選別が、客観的な胚の品質評価方法として有効であることが明らかとなったことから、今年度は受精卵呼吸測定装置で品質評価した胚に由来する産子の正常性について分析した。得られた産子に対して行動解析、血液生化学検査および主要臓器の組織学的検査を実施した結果、いずれの試験においても異常所見は認められなかった。以上のことから、少なくとも実験動物レベルでは、電気化学的な胚の品質評価が、胚のその後の成長や産子の表現型に悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、生殖補助医療の普及とともに多胎妊娠が増加しており、それを防止する最も有効な手段として「単一胚移植」に注目が集まっている。そのため、臨床現場においては移植に供する個々の胚の品質を正確に評価、選別することの重要性がこれまで以上に高まっている。現在、ヒト胚の品質評価法としては、割球の数や形態を基準とした方法（Veck 分類, Gardner 分類など）が広く普及しているが、これらの方法は主観性が強く、観察者によって検査結果に差が生じる可能性が高い。そのため、客観的で高精度な胚の評価方法が望まれている。

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た。平成 21 年度では我々が開発した胚の品質評価技術について実験動物レベルで検証し、受精卵呼吸測定装置による胚の選別が、客観的な胚の品質評

価方法として有効であるとともに、胚の生存性やその後の個体発生への影響が少ないことを明らかにした。今年度の研究目的は、受精卵呼吸測定装置で品質評価した胚に由来する産子の表現型を詳細に分析し、電気化学的計測の産子への影響を調査することである。

B. 研究方法

胚（胚盤胞）の回収

C57BL/6 系統のマウスを実験に用いた。雌マウス（8 週齢）に pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) 5 単位投与し、48 時間後に human chorionic gonadotropin (hCG) 5 単位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、腔栓の有無を確認した。腔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安楽死させ、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

偽妊娠3日目の受容雌マウス (ICR 系統)をネプタールで麻酔し、第一腰椎付近の皮膚を切開した。脂肪-卵巣-卵管-子宮組織を引き出し、子宮内へ胚を10個前後移植した。移植後、引き出した全ての組織を腹腔内へ戻し、皮膚をオートクリップで縫合し、保温して覚醒させた。形態的に正常で、呼吸量 $0.70 \times 10^{-14} mol/s$ 以上の胚盤胞を移植したものを「測定群」、呼吸量を測定せずに形態的評価のみで選別した胚盤胞を測定群と同条件で移植したものを「対照群」とした。

表現型解析

胚移植後17日目に分娩を確認し、得られた産子の正常性を検証する目的で表現型解析を実施した。平成21年度に実施した繁殖能力試験に加えて、マウスの行動解析としてオープンフィールドテスト (一般活動性・情動性・馴化の試験法)、オープンスペース水泳テスト (運動能力・動機づけの試験法)および水迷路学習課題 (空間認知・学習能力・記憶力の試験法)を実施した。対照群6個体、測定群

6個体とし、いずれも12週齢時に実験を開始した。全ての個体に対し、オープンフィールドテスト、オープンスペース水泳テスト、水迷路学習課題をこの順序で実施した。各テストの間は、1日以上インターバルを挿入した。試験終了後、各個体は安楽死させ、心臓より採血し、富士ドライケムを用いて、定法により血液生化学的指標について分析した。また、主要臓器 (脳、肺、胃、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、心臓、大腿二頭筋、卵巣、精巣)は、直ちに10%緩衝ホルマリン固定液に浸漬して48時間室温にて固定後、定法に従って脱水後、パラフィンブロックを作製した。各ブロックより厚さ $4 \mu m$ の薄切標本を作製、Hematoxylin-Eosin染色 (HE染色)を施して顕微鏡下で観察し、臓器ごとに好中球など炎症細胞の浸潤状態を中心に、各個体間の組織所見を比較した。

C. 研究結果および考察

受精卵呼吸測定装置による胚品質評価の安全性を検証する目的で、胚移植試験で得られた産子の表現型解析を実施した。測定群では、ミトコンドリア機能の高い胚を選択して移植しているなどの影響も予想されたが、行動解析 (一般活動性・情動性・馴化、運動能力・体力、空間認知・学習能力・記憶力の試験)のいずれの試験結果においても対照群と測定群のマウスで有意差は認められなかった。また、血液生化学検査および主要臓器の組織学的検査においても異常所見は認められなかった。さらに、測定群の産子の一部は、性成熟後に繁殖試験を実施し、少なくとも5世代目までは正常な繁殖能力を有していることが確認された。以上の結果から、受精卵呼吸測定装置で品質評価した胚から得られた産子は、通常の胚移植で得られた産子と比較しても差異は認められず、正常な個体であることが示唆された。今回の結果はマウス胚を用いたものであり、ヒト胚における有効性、安全性について

は今後の課題である。しかしながら、この測定技術の注目すべき点は胚の酸素消費量（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。

D. 結論

電気化学的に品質を評価した胚に由来する産子の表現型を解析した。その結果、得られた産子に異常所見は認められず、少なくともマウスにおいては、電気化学的な胚の品質評価が、胚のその後の成長や産子の表現型に悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。平成21年度および今年度の研究成果から、電気化学的な胚の呼吸量計測は、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) 横尾 正樹, 佐藤 英明. VIII 卵胞発育と卵胞成熟 卵胞発育と成熟の局所調節因子. 森崇英 編, 卵子学 (Oocytology). 京都大学出版 (印刷中) .

(2) 横尾 正樹, 清水 隆, 佐藤 英明. II 生殖系列細胞の基礎 1. 細胞の流れ. 日本哺乳動物卵子学会編, 生命の誕生に向けて (第二版) - 生殖補助医療 (ART) 胚培養の理論と実際. 東京: 近代出版; 2011, 13-19.

(3) 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, 2010; 59: 1375-1379.

(4) 佐藤 英明, 星野 由美, 横尾 正樹. 卵子の成熟 - 卵子成熟のメカニズム (基礎), 鈴木秋悦 編, カラーアトラス 不妊診療のた

めの卵子学. 医歯薬出版; 2010; 22-27.

(5) Masaki Yokoo, Naoko Kimura, Eimei Sato. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. Journal of Reproduction and Development 2010; 56: 15-19.

(6) Satoshi Sugimura, Masaki Yokoo, Ken-ichi Yamanaka, Manabu Kawahara, Takuya Wakai, Takashi Nagai, Hiroyuki Abe and Eimei Sato. Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. Cellular Reprogramming 2010, 12, 463-474.

(7) Satoshi Sugimura, Ken-ichi Yamanaka, Manabu Kawahara, Takuya Wakai, Masaki Yokoo and Eimei Sato. Early metaphase II oocytes treated with dibutyryl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. Animal Science Journal 2010, 81: 48-57.

(8) Hideaki Yamashiro, Toyomizu Masaaki, Toyama Natsuki, Aono Nobuya, Sakurai Masahiro, Hiradate Yuuki, Masaki Yokoo, Moisyadi Stefan, and Sato Eimei. Extracellular ATP and dibutyryl cAMP enhance the freezability rat epididymal sperm. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 2010, 49: 167-172.

2. 学会発表

(1) 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. 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, 朱鷺メッセ (新潟), 2010.

F. 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用い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 回収プロトコルの開発 | 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 |
| 末永智一、高橋康史、伊野浩介、珠玖 仁 | 走査型電気化学顕微鏡による酵素イメージング | 小宮山真 | 酵素利用技術体系-基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで- | 株式会社エヌ・ティエス | 東京 | 2010年4月 | 112-116(5ページ) (第2編、第2節) |

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 |
|--|---|-------------------------------------|----------------|---------|------|
| Sugimura S., Yokoo M., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., Nagai T., <u>Abe H.</u> , Sato E. | Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos | <i>Cellular Reprogramming</i> | 12 (4) | 463-474 | 2010 |
| Kimura N., Tsunoda T., Iuchi Y., <u>Abe H.</u> , Totsukawa K., Fujii J. | Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developing stages of the embryos from SOD1-deficient mice | <i>Molecular Human Reproduction</i> | 16 | 441-451 | 2010 |
| 後藤香里、小池恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、 <u>阿部宏之</u> | 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 | 2010 |