

Figure 4

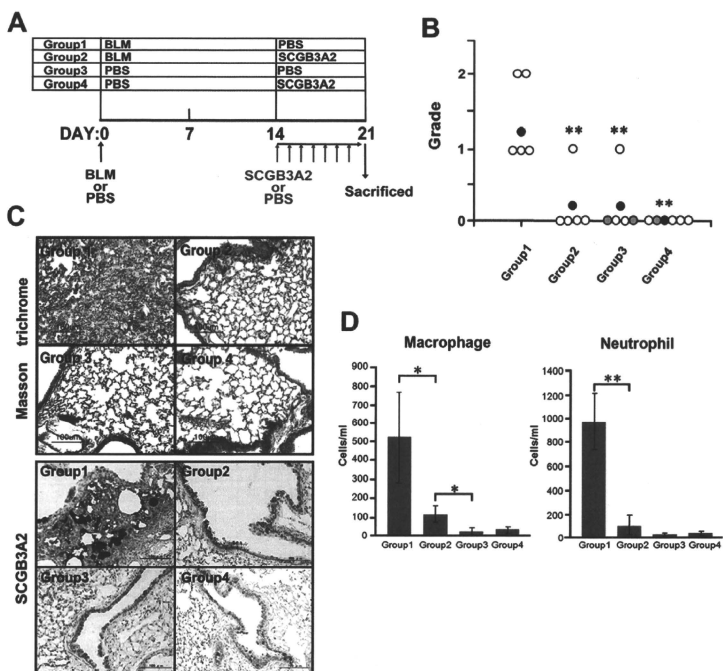


Figure 5

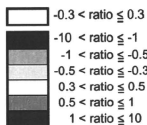
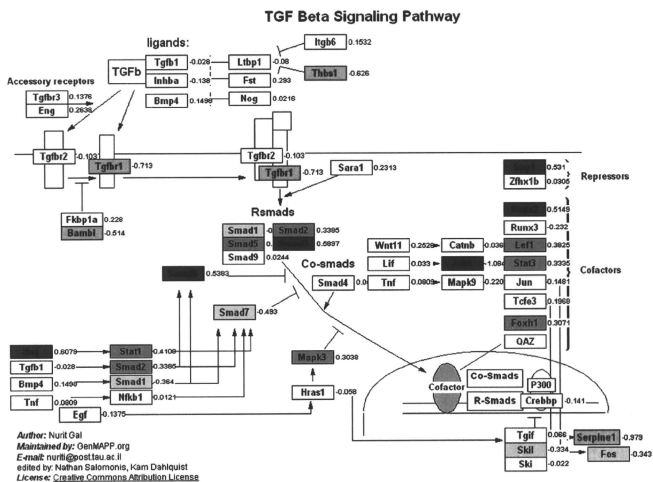


Figure 6

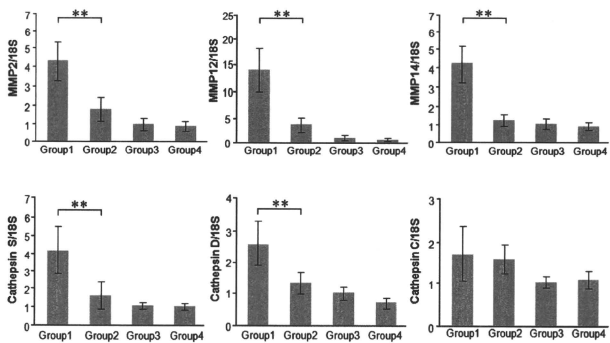
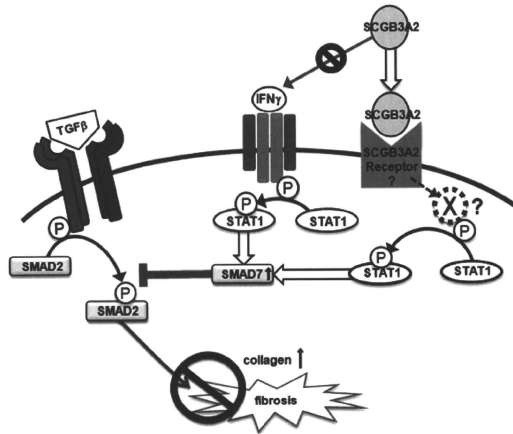


Figure 7



SUPPLEMENTAL MATERIALS

Table S1. Primers used for qRT-PCR and/or RT-PCR

Gene Name	Foreword (5'→3')	Reverse (3'→5')
Mmp2	TGCAGGAGACAAGTTCTGGA	GACGGCATCCAGGTTATCAG
Mmp12	ATGAGGCAGAAACGTGGACT	TTTGGATTATTGGAATGCTGC
Mmp14	AGGCAGCAACTTCAGCCC	ATAGAACTTTTGCATGGCGG
Cathepsin S	GGAGCAACTGCAGAGAGACC	CCAGATGAGACGCCGTA
Cathepsin D	CAACAGAAGCTGGTGGACAA	GACAGCTCCCCGTGGTAGTA
Cathepsin C	GGATACTGCCTACGACGAGC	TGTGTGGCCTCTGACTTCAT
Col1a1	CCTGGCAAAGACGGACTCAAC	GCTGAAGTCATAACCGCCACTG
Col1a2	CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGAG	GCAATGCTGTCTTGCAGTGGTA
Col3a1	TGCTCGGAACTGCAGAGACCTA	GCTGAAGTCATAACCGCCACTG
Ifny	GCG TCA TTG AAT CAC ACC TG	TGA GCT CAT TGA ATG CTT
Ifn α	AATGACCTGCAAGGCTGTCT	TCAGTCTCCAGCACATTG
Ifn β	ATAAGCAGCTCCAGCTCCAA	CCCAGTGTGGAGAAATTGT
Stat1	CGGAGTCGGAGGCCCTAAT	ACAGCAGGTGCTTCTTAATGAG
18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	ATTGGAGCTGGAATTACCGC

Table S2. Alteration of major extracellular matrix genes in BLM-injured lung with/without SCGB3A2

Gene Symbol	Gene name	Hybridization A	Hybridization B
		Median fold increase	
Col18a1	Collage, type XVIII, alpha 1	0.75498	0.28594
Col3a1	Collage, type III, alpha 1	1.2689	-0.4487
Col4a1	Collage, type IV, alpha 1	1.56063	-0.2687
Col4a2	Collage, type IV, alpha 2	1.09224	-0.0727
Col4a5	Collage, type IV, alpha 5	1.05255	-0.0823
Col5a1	Collage, type V, alpha 1	0.82543	0.21414
Col6a2	Collage, type VI, alpha 2	1.57289	0.09081
Col1a1	Collage, type I, alpha 1	1.73388	-0.2629
Col1a2	Collage, type I, alpha 2	0.7796	-0.2681
Fn1	Fibronectin 1	1.53551	-0.9425
Mmp12	Matrix metalloproteinase 12	1.42338	2.7658
Mmp10	Matrix metalloproteinase 10	0.926	
Mmp11	Matrix metalloproteinase 11	1.53519	0.1375
Mmp14	Matrix metalloproteinase 14	0.90547	-0.9113
Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	1.41658	-1.1459

Ctsd	Cathepsin D	0.88292	-0.6413
Ctsk	Cathepsin K	1.15229	-0.4869
Ctsl	Cathepsin L	0.64947	0.15979
Ctss	Cathepsin S	1.83493	-1.2637

Hybridization A: Comparison of Group3 (PBS-PBS) vs Group1 (BLM-PBS), showing the effect of BLM.

Hybridization B: Comparison of Group1 (BLM-PBS) vs Group2 (BLM-SCGB3A2), showing the effect of SCGB3A2.

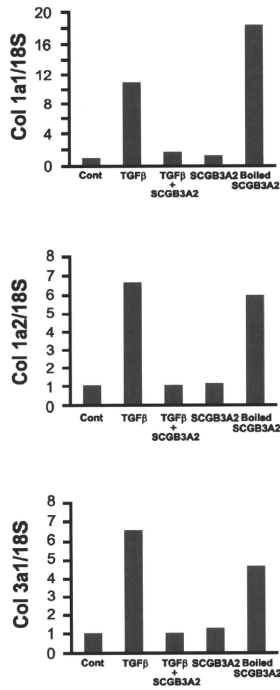


Figure S1. Effect of boiled SCGB3A2 on collagen gene expression. The expression levels of collagen mRNAs were determined by qRT-PCR in the presence of TGFβ and/or SCGB3A2 or boiled SCGB3A2 (at 100°C for 10min). The experiments were repeated twice and the same results were obtained.

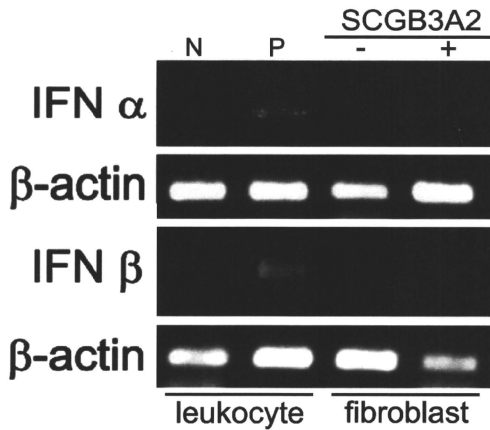


Figure S2. RT-PCR for IFN α and β expression in mouse lung primary fibroblasts in the presence or absence of SCGB3A2. Leukocytes stimulated by PMA (10 ng/ml) and ionomycin (1 μ M) for 3 h was used as a positive control for IFN α . Leukocyte stimulated by Poly (I:C) (10 μ g/ml) for 24 h was used as a positive control for IFN β . Experiments were repeated three times using differently prepared samples. Representative results are shown.

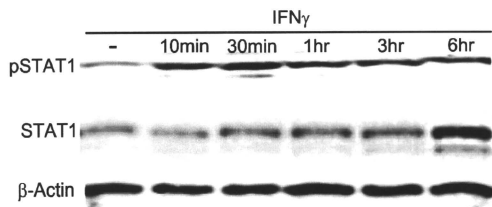


Figure S3. Time-course of STAT1 phosphorylation by IFN γ . Adult mouse lung primary fibroblasts were treated with IFN γ , and STAT1 phosphorylation and the amount of STAT1 were examined by western blotting from 10 min through 6 h after addition of IFN γ .

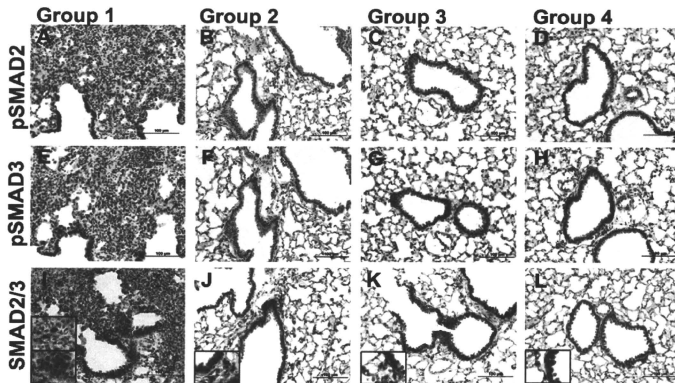


Figure S4. Phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 and expression of total SMAD2/3 in BLM induced lung fibrosis. Immunohistochemistry for phosphorylated (p) SMAD2 (A-D), pSMAD3 (E-H), and total SMAD2/3 (I-L). Each Group corresponds to those shown in Figure 4. Inserts in I-L show magnified images of cells highly expressing SMAD2/3. pSMAD2 , pSMAD3 and total SMAD2/3 were overexpressed in the foci of fibrosis, but no significant changes were observed among Group 2-4.

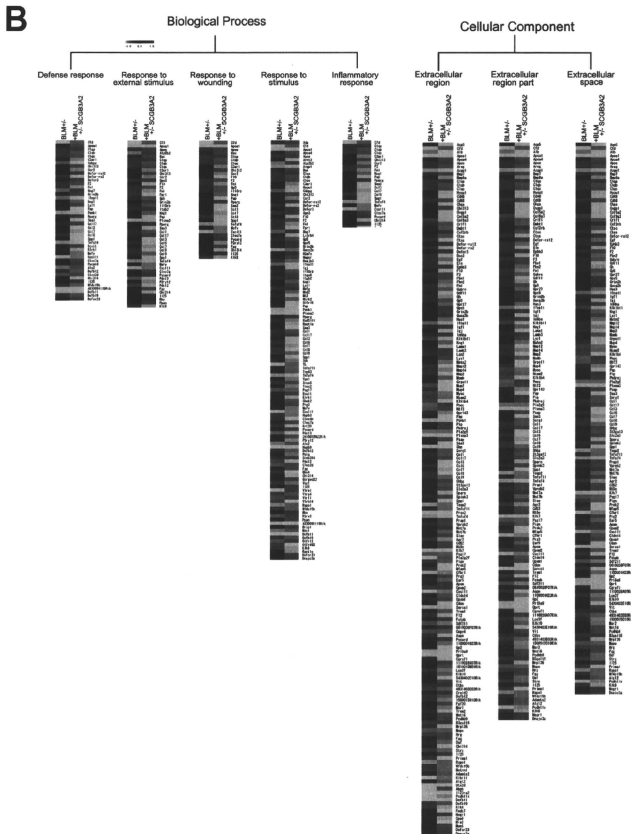


Figure S5. Heat maps of genes categorized in GO terms listed in Table 1 and 2. (A) Heat maps based on over-expressed genes in BLM-injured lungs (left column, red), compared with those treated with SCGB3A2 (right column). (B) Heat maps based on suppressed genes by SCGB3A2 in BLM-injured lungs (right column, green), compared with those treated with BLM only (left column). GO terms are listed on the top.

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

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

横尾 正樹^{*1} 伊藤-佐々木隆広^{*2} 珠 玖 仁^{*3} 末 永 智 一^{*3} 阿部 宏 之^{*4}

われわれは電気化学的計測技術を応用した「受精卵呼吸測定装置」を開発し、呼吸活性を指標とした新しい胚の品質評価法を確立した。本研究では、マウスをモデル動物として、この胚品質評価法の有効性と安全性を検証した。胚移植試験の結果、形態評価に加え呼吸活性の高い胚を移植することで、移植成績が有意に上昇した。また、得られた産子の発育、血液生化学値、染色体、主要臓器の組織、行動、繁殖能力の各検査において異常所見は認められなかった。以上の結果から、この技術はヒト胚の新しい品質評価法としても臨床応用が十分に期待できる。

はじめに

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（Veeck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。

われわれはこれまでに、マイクロ電極をプローブとして用いて、電気化学的に細胞の酸素消費量を計測する技術を開発している¹⁾。さらに、この技術を基盤とする画期的な「受精卵呼吸測定装置」を開発した²⁾ (図1)。現在までに、哺乳動物胚（マウス、ブタ、ウシ、ヒト）の呼吸活性の測定に成功しており、胚の呼吸活性と品質とが相関することを明らかにしている^{3,4)}。この装置の特徴としては、①胚の酸素消費量を数値化できる（客観的）、②単一胚で測定ができる（高感度）、③胚に電極を触れることなく測定できる（非侵襲）、④測定が1分以内（迅速）といった点が挙げられる。これらの特徴から、将来的に生殖補助医療におけるヒト胚の品質評価方法として臨床応用が十分に期待される。そこで、本研究ではこの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を検証する目的で、マウスを実験モデルとして胚移植試験および産子の表現型解析を実施した。

^{*1}Masaki YOKOO

秋田県立大学生物資源科学部

^{*2}Takahiro ITO-SASAKI

株式会社クリノ

^{*3}Hitoshi SHIKU, Tomokazu MATSUE

東北大学大学院環境科学研究科

^{*4}Hiroyuki ABE

山形大学大学院理工学研究科

〒010-0444 秋田県南秋田郡大湯村字南2-2 (秋田県立大学)

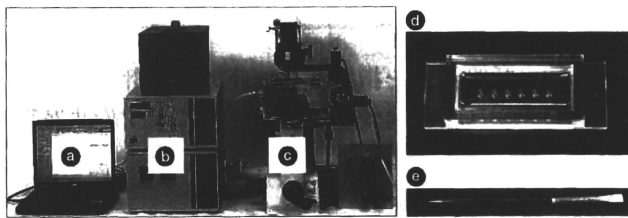


図1 受精卵呼吸測定装置 (HV-403)

解析用 PC (a), ポテンシオスタット/コントローラ (b), 倒立顕微鏡 (c) で構成されている。倒立顕微鏡のステージ上に測定プレート(d)と微小白金電極(e)をセットして計測を行う。

表1 マウス胚移植試験の成績

実験区	受容雌 (匹)	移植 胚数 (個)	移植胚の 平均呼吸量 ($\times 10^{-14}$ mol/s)	分娩した 受容雌 (匹)	分娩率 (%)	産子数 (匹)	産子率 (%)
測定群 (0.70 以上)	16	170	0.85 ± 0.01	12	12/16* (75.0)	67	67/170* (39.4)
対照群	18	175	—	7	7/18 (38.9)	41	41/175 (23.4)

*: 対照区と比較して有意に高い ($p < 0.05$)

I. 実験

1. 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) 5 IU 投与し、48時間後に human chorionic gonadotropin (hCG) 5 IU 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、陰栓の有無を確認した。陰栓を確認した雌マウスは hCG 投与 96 時間後に屠殺し、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。

2. 呼吸活性測定

マウス胚盤胞の呼吸活性測定には、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: 図1, 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一つずつ静置した。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、 -0.6 V vs Ag/AgCl₂ の電位を印加した微小白金電極 (先端直径: $2 \sim 3 \mu\text{m}$) で、胚近傍を鉛直方向に4回走査 ($31.0 \mu\text{m}/\text{sec}$, $160 \mu\text{m}$) 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²⁾に基づいて胚の酸素消費量 (呼吸活性) を算出した。

3. 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(表1)。呼吸活性 0.70×10^{-14} mol/s 以上の胚盤胞を選別し、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。呼吸測定を行

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、18匹の受容雌マウスに合計175個の胚を移植した結果、7匹が分娩(38.9%)し、合計41匹の産子を得た(産子率:23.4%)。一方、測定群では16匹の受容雌マウスに合計170個の胚を移植した結果、12匹が分娩し(分娩率:75.0%)、合計67匹の産子が得られ(産子率:39.4%)、対照群と比較して移植成績が有意に上昇した。

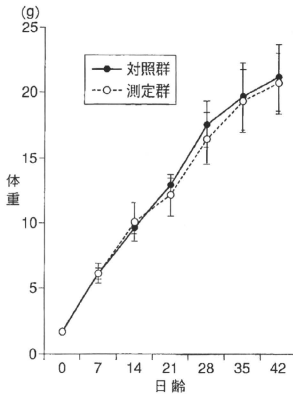


図2 体重成長曲線
生後0~42日の体重変化を示す。
(エラーバーは平均値±標準誤差)

4. 表現型解析

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。産子の生時体重の平均は、対照群で 1.55 ± 0.02 g、測定群で 1.51 ± 0.04 gで有意差はなく、その後の体重増加にも有意差は認められなかった(図2)。また、Gバンド法による染色体検査(図3)や主要臓器(脳、肺、胃、腎臓、肝臓、脾臓、脾臓、心臓、大腿二頭筋、卵巣、精巣)の組織学的検査、血液生化学検査においても異常所見は認められなかった。また、行動解析(一般活動性・情動性・馴



図4 測定群由来のマウス
性成熟後、5世代までの繁殖試験を実施したが、いずれの世代でも繁殖能力に異常はみられなかった。

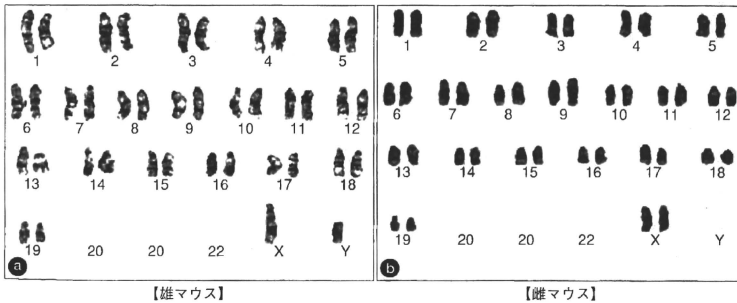


図3 染色体解析(Gバンド解析)
解析したマウス(30匹:雄12匹,雌18匹)すべてが $2n=40$ の正常な核型を有していた。

化の試験としてオープンフィールドテスト、運動能力・体力の試験としてオープンスペース水泳テスト、空間認知・学習能力・記憶力の試験として水迷路学習テストおよびブロープテスト)を実施したが、いずれのテスト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。さらに、測定群の産子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(図4)。

II. 考 察

近年の不妊治療件数の増加とともに多胎妊娠数も増加している。わが国では、生殖補助医療に伴って発生する多胎妊娠を減少させることが急務であるとし、2007年3月には日本生殖医学会が「多胎妊娠防止のための移植胚数ガイドライン」を、2008年4月には日本産科婦人科学会が「生殖補助医療における多胎妊娠防止に関する見解」を発表している。いずれの内容も、母体および胎児・新生児の健全なる福祉を保持する観点から、35歳以下の患者に対する胚移植においては、移植する胚の数を「原則1個」とすることが示されている。また、Velevaら³⁾は、36～39歳の患者に対しても単一胚移植を実施し、妊娠率、正常分娩率が複数胚(2個)移植の場合と比較して統計的有意差がないことを報告している。これらのことから、生殖補助医療における単一胚移植は、今後、幅広い年齢層の患者に対してますます重要になってくる可能性が考えられる。

単一胚移植における胚の評価に求められることは、できるだけ低侵襲に、再現性の高い方法で、移植に供する個々の胚の品質を正確に評価・選別することである。このことは妊娠率の向上だけでなく、流産・死産率の低下にもつながる。現在、生殖補助医療の臨床現場の多くは、Veck⁶⁾やGardner⁷⁾が提唱したヒト胚の品質評価法を採用している。これらの評価方法は、胚の割球数や形態を基準としており、現状

では、最も簡便で有効な方法である。しかしながら、最近、経時的な胚の観察研究などから、胚の品質を評価する上で形態を基準にするだけでは決して十分ではないことが指摘されている⁸⁾⁹⁾。また、形態的基準による判断だけでは、観察者の主観が影響する可能性が高く、検査結果の客観性に疑問が残る。

一方で、本研究で使用した受精卵呼吸測定装置は、個々の胚の酸素消費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、妊娠4日目のマウスから得られた胚盤胞を①形態的基準のみで評価した胚(対照群)と②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妊娠率、産子率が有意に上昇することが確認された。同様の結果は、ウシを用いた胚移植試験においても得られている³⁾¹⁰⁾。さらに本研究では、得られた産子の正常性についても様々な角度から検証し、呼吸活性を測定した胚を移植しても、その産子に異常はみられないことを確認した。従って、これらの結果から、胚の評価に呼吸活性の指標を加えることは、従来の形態的基準のみで評価する方法よりも有効な方法であり、胚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。ミトコンドリアはすべ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。従って、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われわれは考えている。

おわりに

本研究では、マウスをモデル動物として、受精卵呼吸測定装置の有効性と安全性を検証した。その結果、呼吸活性を指標として胚の品質

を評価することで、移植成績の向上が認められた。さらに、得られた産子に異常所見はみられなかった。これらの結果から、電気化学的な胚の呼吸測定技術が、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、ヒト胚における検証を十分に重ねるとともに、胚の呼吸活性と受胎（妊娠）との関係を詳しく調べることで、さらに安全性や精度を高めることができると考えている。近い将来、呼吸測定技術および装置が生殖補助医療における臨床応用へつながっていくことを期待している。

文 献

- 1) Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, et al : Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem*, **73** : 3751-3758, 2001.
- 2) Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, et al : Respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. *Anal Chim Acta*, **522** : 51-58, 2004.
- 3) Abe H, Shiku H, Yokoo M, et al : Evaluating the quality of individual embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Reprod Dev*, **52** (suppl): s55-s64, 2006.
- 4) Abe H : A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J Mamm Ova Res*, **24** : 70-78, 2007.
- 5) Veleva Z, Vilksa S, Hydén-Granskog C, et al : Elective single embryo transfer in women aged 36-39 years. *Hum Reprod*, **21** : 2098-2102, 2006.
- 6) Veeck LL : Atlas of the human oocytes and early conceptus. Williams & Wilkins. **2**. 151-153, Baltimore, 1991.
- 7) Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al : Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome : towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*, **73** : 1155-1158, 2000.
- 8) Mio Y, Maeda K : Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol*, **660** : e1-5, 2008.
- 9) Okitsu O : Human embryo grading. *J Mamm Ova Res*, **25** : 90-97, 2008.
- 10) Moriyasu S, Hirayama H, Sawai K, et al : Relationship between the respiratory activity and the pregnancy rate of bisected bovine. *Reprod Fertil Dev*, **19** : 219, 2007.

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

後藤香里 小池 恵 熊迫陽子 宇津宮隆史 阿部宏之

金原出版株式会社
