

部を削除し、IE エンハンサーを付加した改変型 C0 プロモーターを作製した。

C. 研究結果

安全性評価

遺伝子導入 2 週間後に視覚誘発電位の回復がわずかに観察され、導入から 2 ヶ月後に最大となった。回復した視覚誘発電位は、2 年間減弱することなく維持された。また、遺伝子導入後の各リンパ球サブセットの変動を調べたところ、遺伝子導入 7 日後、一過性に CD4/CD25 および CD4/CD8 陽性細胞の増加が観察されたが、2 週間後に正常レベルに回復した。この一過性の上昇は、Venus 遺伝子を含む AAV ベクター投与群でも観察された。

神経細胞特異的 AAV ベクターの構築

シナプシンプロモーターを用いた遺伝子導入では、広範囲に導入することができた。同濃度の CAG プロモーターを持つ AAV ベクターを用いて遺伝子導入を行った場合、約 28% (710 ± 118 cells/mm²) の神経節細胞に発現が見られることをすでに報告しているが (Tomita H, *Exp. Eye Res.* 2010)、AAV-SyChr2V の導入効率は約 20% (505 ± 118 cells/mm²) であり、CAG プロモーターに比較すると導入効率は低いものであった。また、AAV-SyChr2V で遺伝子導入を行った場合、発現量が不均一である傾向が観察された。今回、CAG プロモーターでの遺伝子導入と比較するために、同一の条件下で、導入効率を算出したため、遺伝子導入細胞数が少なかった可能性が考えられる。このように、導入効率の差は CAG プロモーターと Synapsin プロモーターの発現量の差によって生じる可能性もあり、今後長期的な発現を観察する必要がある。

クローニングした C0 プロモーターのルシフェラーゼアッセイでは、発現は低いものの機能することが確認できた。IE エンハンサーの付加により、その発現量は顕著に増大した。

D. 考察

ラットを用いた安全性評価で、Chr2 遺伝子発現の長期的な安全性が確認された。遺伝子導入後の CD4/CD25 および CD4/CD8 陽性細胞の増加は、コントロールベクター (AAV-Venus) 投与群でも観察され、Venus タンパク質あるいは AAV ベクターそのものによって引き起こされたと考えられた。

今回作製した、シナプシンプロモーターを持つ AAV ベクター (AAV-Sy) は、神経細胞特異的であり、さらに安全性を高める上で有用であると考えられる。また、AAV-IECO ベクターは、現時点で神経細胞特異的であるか確認できていないが、シナプシンプロモーターより高い発現を誘導できることから、本研究に最適なベクターである可能性がある。

E. 結論

緑藻類由来遺伝子 Chr2 をラット網膜内で恒常的に発現させることによって、何ら重篤な副作用は観察されず、高度な視機能を作ることができる「視機能再建法」の 1 つになりえる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H. Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. *Development Growth and Differentiation*, 53(3), 357-365, 2011.
2. Sugano E, Isago H, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. *Gene Therapy*, 18(3), 266-74, 2010.
3. Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen A, Lawrence JM, Tomita H, Coffey PJ, Vugler A. Dissecting a Role for Melanopsin in Behavioural Light Aversion Reveals a Response Independent. *PLoS ONE*, 5(11), E15009, 2010.

2. 学会発表

国際学会

(口頭)

1. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Visual Responses of Royal College of Surgeons Rats Transferred Modified Volvox Channelrhodopsin-2 Gene. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2010.
2. Tomita H. Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing

Tohoku University-Hanyang University Joint Symposium on "Biomedical Engineering in Future Medicine. Souel, Korea, 2010

(ポスター)

3. Sugano E, Tomita H, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Systematic and Local Responses of Channelrhodopsin-2 Gene Therapy. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2010.

4. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Retinal and systemic immune responses after the transfer of channelrhodopsin-2 into RCS rats. XIVth International Symposium on Retinal Degeneration. Quebec, Mont-Tremblant

5. Sugano E, Tomita H, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Optimization of volvox-derived channelrhodopsin-1 to express expression in mammalian cells. XIVth International Symposium on Retinal Degeneration. Quebec, Mont-Tremblant

国内学会

(招待)

6. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信. 遺伝子導入による視覚再建, 日本視覚学会, 東京, 2011.

7. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信. 緑藻類由来遺伝子を用いた視覚再生技術, 日本人工臓器学会, 仙台, 2010

8. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信. 緑藻類由来遺伝子を用いた視覚再生技術, 集積光デバイスと応用技術 (IPDA)第4回研究会 (IEEE 分科会), 仙台, 2010

(口頭発表)

9. 砂金ひとみ, 菅野江里子, 廣井照, 王卓, 玉井信, 富田浩史, ボルボックス由来チャンネルロドプシン 2 を導入した遺伝盲ラットの光反応性, 日本動物学会, 東京, 2010.

10. 王卓, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 廣井照, 玉井信, 富田浩史, NIH 3T3 線維芽細胞からの神経細胞の誘導, 日本動物学会, 東京, 2010.

3. 医療講演会

1. 富田浩史:「視機能再建のための遺伝子治療、チャンネルロドプシンによって得られる視覚特性」日本網膜色素変性症協会 (J R P S) 群馬県支部総会・医療講演会 2010

2. 富田浩史:「緑藻由来遺伝子を利用した視覚再生研究」日本網膜色素変性症協会 (J R P S) 栃木県支部総会・医療講演会 2010

4. その他

1. 雑誌 Medical Bio、2010年9月号、オーム社、pp.55-57、緑藻の光受容体遺伝子の導入による網膜色素変性ラットの視力回復

2. 朝日新聞 (全国) 2010年11月23日 「脳を動かす光のスイッチ」記事内で紹介「視力回復に成功」

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

1. PCT/JP2010/063786、「発現効率が改善された光受容チャンネルロドプシン」、発明者:富田浩史、菅野江里子、出願日:H22年7月10日

研究要旨：マイクロ電極をセンサープローブとする電気化学計測技術は、局所的な生体反応を高感度・非侵襲的に計測できる技術である。本研究では、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸測定技術を開発するとともに、この技術の中心装置である走査型電気化学顕微鏡をベースに、不妊治療に応用可能な「臨床対応型細胞診断装置」の開発を目的とする。本研究事業では、これら計測技術及び装置の開発に関する研究を通じて、先端工学技術を医療に応用するために重要である工学と生物・医学との異分野融合研究の意義を教育するための実学的医工学教育システムの構築を目的とした。

A. 研究目的

電気化学計測技術はマイクロ電極をセンサープローブとし、生体反応を非侵襲的に高感度で計測できる有効な技術の一つである。昨年までの研究によって、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸計測技術を確立するとともに、走査型電気化学顕微鏡を基盤とする「細胞呼吸測定装置」の開発に成功している。この装置は、単一の細胞や受精卵の酸素消費量（呼吸）を非侵襲的にモニタすることができることから、呼吸活性を指標に細胞や受精卵の機能・品質を高度に診断できる装置として医療分野での応用が期待されている。本研究では、細胞呼吸測定装置をベースに医療応用可能な「受精卵呼吸測定装置」を開発するとともに、この装置を用いた「ヒト胚品質診断システム」の開発を目指す。また、工学技術を医療へ応用するための実学的医工学教育システムとして、装置開発に携わる若手工学研究者に対して、工学と生物学の異分野融合研究の意義と方法について教育する。

B. 研究方法

受精卵や卵子の品質（クオリティー）は着床率に大きく影響することから、不妊治療の成功率向上のためには精度の高い胚品質診断法の開発が不可欠である。昨年度までの研究によって、マウス胚及びヒト胚（余剰胚）の呼吸量を測定した結果、胚の呼吸活性はミトコンドリアの微細形態や品質と密接に関連していることが明らかになった。さらに、受精卵と異なり形態的指標による品質評価が困難である卵子の品質評価法の構築を試みるためにウシ卵子の呼吸能解析を行った。本年度は、ヒト卵子の呼吸能を指標とする品質評価システムの構築を目的に、卵子のクオリティー（卵子成熟能）と呼吸能の関係を明らかにするために、ヒト卵子-卵丘細胞複合体（COC）の呼吸解析と微細構造の解析を行った。

(a) 材料

不妊治療の終了により余剰となり、学術研究への使用に対して患者の同意が得られた卵子及び卵丘細胞-卵子複合体（Cumulus-oocyte complex : COC）を呼吸量測定に供した。

(b) 呼吸量測定

COCの呼吸量は、走査型電気化学顕微鏡（SECM）をベースに開発した「受精卵呼吸測定装置」を用いて測定した。個々のCOCを測定専用プレートのマイクロウェル底部中心に静置した後、酸素の還元電位を検出する微小電極を透明帯近傍に移動した。本測定に用いたマイクロ電極は、計測感度を上げるために先端径2~5 μm にエッチングした白金電極をガラスキャピラリーに封止したディスク型電極を使用した。マイクロ電極は、酸素が還元可能な -0.6V vs. Ag/AgCl に保持し、試料に対して鉛直方向に移動速度31 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、走査距離160 μm の条件で試料近傍を走査し酸素還元電流を測定した。胚の酸素消費量は、球面拡散理論式に基づいた専用の解析ソフトを用いて算出した。

(c) 微細構造解析

各グレードのCOCにおいてミトコンドリアを中心とする細胞小器官の微細構造を電子顕微鏡により観察した。呼吸測定したCOCの一部をグルタルアルデヒドおよびオスミック酸で固定した後、定法に従いエポキシ樹脂に包埋し超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で微細構造観察を行った。

(d) 卵子の成熟培養

各グレードのCOCを成熟培養し、卵子の成熟能にグレード間の違いがあるのか検討した。COCをTCM199培地に10%患者血清（Patient's serum）、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン（Human chorionic gonadotropin: HCG）100 IU/ml、卵胞刺激ホルモン（Follicle stimulating hormone: FSH）75 IU/mlを加えた培養液を用いて37°C、5% CO₂ in airの条件で26時間、成熟培養を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では不妊治療が終了した患者の同意（インフォームド・コンセント）が得られた卵子及び卵子-卵丘細胞複合体を用いた。卵子は短期間の培養に限定し、実験終了後は速やかに所定の方法で廃棄する。体外受精及び顕微授精により生じた余剰胚は着床以前の胚盤胞（受精後4-5日）までに限定することで日本産婦人科学会及び日本不妊学会で定めている生殖医療技術ガイドラインには抵触しない。

C. 研究結果

(a) 卵丘細胞-卵子複合体の呼吸量

不妊治療において採取されたCOCを卵丘細胞層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(図1)。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「受精卵呼吸測定装置」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(表1)。一方、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と卵丘細胞の減少に伴い酸素消費量が低下し、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示された。

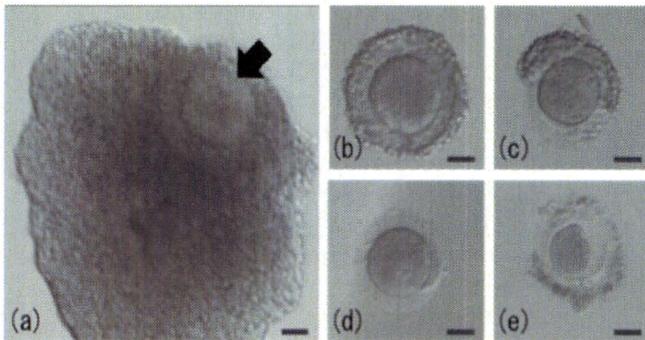


図1. ヒト卵丘細胞-卵子複合体(COC)の光学顕微鏡像。(a) グレード1: 卵子(矢印)の周囲には卵丘細胞層が多層に密に付着している。(b) グレード2: 卵丘細胞が1~3層付着している。(c) グレード3: 卵丘細胞層は1~3層で部分的に剥離している。(d) グレード4: 卵丘細胞が全く付着していない。(e) グレード5: 卵丘細胞層の付着が認められるが卵子が変形している。スケールバーは、50 μm を示す。

(b) 卵丘細胞-卵子複合体の超微細形態

グレード1のCOCでは、卵丘細胞において拡張したクリステをもつミトコンドリアが多数存在し、卵丘細胞と卵子の間には典型的なギャップ結合が数多く観察された(図2 a, b)。卵子には、円形で小型のミトコンドリアが多数存在し、それらの多くはクラスターを形成し細胞質にほぼ均一に分布していた(図2 c)。一方、グレード2およびグレード3のCOCでは、卵丘細胞内のミトコンドリアはグレード1のCOCと比べて小型で数も少なく、また、多くのミトコンドリアはクリステが未発達であった(図2 d, e)。グレード1で観察された卵丘細胞と卵子とのギャップ結合は、グレード2およびグレード3のCOCではほとんど認められなかった。卵子のミトコンドリアについては、数や形態、分布様式などグレード間での顕著な違いは認められなかった。

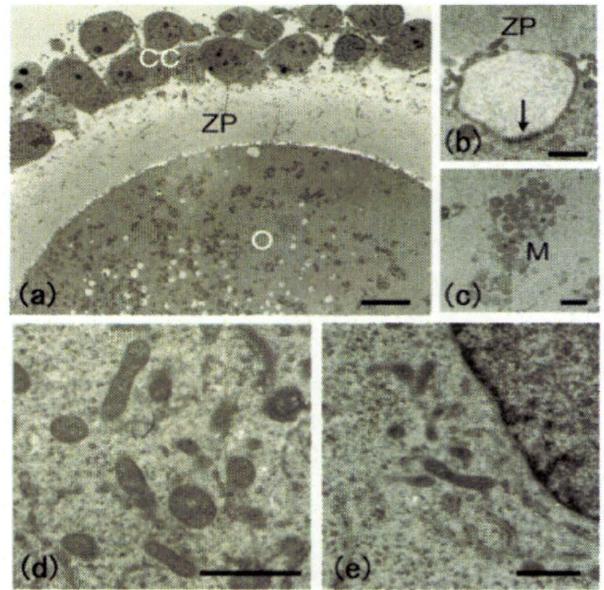


図2. ヒト卵丘細胞-卵子複合体(COC)の電子顕微鏡像。a-d: グレード1。卵細胞表面には卵丘細胞から伸びた突起との間にギャップ結合(矢印)が観察される(b)。卵子(O)には円形で小型のミトコンドリア(M)がクラスター状になって、ほぼ均一に局在している(a, c)。卵丘細胞にはクリステが発達したミトコンドリアが多数観察される(d)。e: グレード3。卵丘細胞のミトコンドリアは小型で数も少ない。ZP: 透明帯。スケールバーは、a: 10 μm 、b-e: 1 μm を示す。

(c) 卵丘細胞-卵子複合体の形態と卵子成熟率の関係

ヒトのCOCは、卵丘細胞の付着状態を基準に分類したグレードによって、呼吸量やミトコンドリアの微細形態が顕著に異なることが明らかとなった。ミトコンドリアやギャップ結合は卵子の成長や成熟に重要な役割を果たしていると考えられることから、本研究では各グレードのCOCを成熟培養し、卵子の成熟能にグレード間の違いがあるのか検討した。その結果、卵子成熟率はグレード1で70.0%、グレード2で63.3%、グレード3で20.0%、グレード4で33.3%、グレード5で0%でありグレード間に卵子成熟率の違いが認められた(図3)。

表1. 形態的特徴(グレード1~5)により分類したヒト卵丘細胞-卵子複合体(COC)の酸素消費量($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)

カテゴリー	成熟培養前 (n)	成熟培養後 (n)
グレード1	7.79 \pm 1.00 (50)	6.11 \pm 0.74 (50)
グレード2	1.46 \pm 0.15 (25)	1.63 \pm 0.33 (25)
グレード3	1.26 \pm 0.35 (8)	1.60 \pm 0.55 (8)
グレード4	0.86 \pm 0.30 (2)	0.79 \pm 0.11 (2)
グレード5	0.77 (1)	0.35 (1)

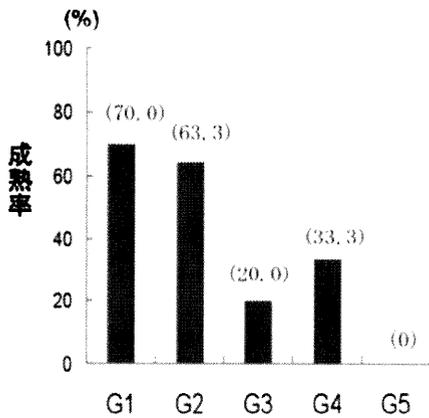


図3. ヒト卵丘細胞-卵子複合体 (COC) を成熟培養した後の卵子成熟率。G1: グレード1、G2: グレード2、G3: グレード3、G4: グレード4、G5: グレード5。

(d) 実学的医工学研究教育

昨年度に引き続き、電気化学計測技術など工学技術の有用性を検証するために、卵子培養や電子顕微鏡観察などの生物学的解析の重要性を中心に、若手工学研究への研究指導を実施した。従来の工学研究ではあまり馴染みのない受精卵培養実験や顕微鏡標本作製などを実施することで、生物学・医学の観点から工学技術を医療に応用するための重要なポイントについて実践的指導を行った。

D. 考察

卵子は単一細胞であるため、胚のように割球数やその形態を基準にクオリティーを評価することは困難である。しかしながら、卵子のクオリティーを卵丘細胞の状態から評価しようとする試みが行われてきた。例えば、採卵時に回収された顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率が低い卵胞から得られた卵ほどクオリティーが良好であるという報告がある。また筆者らは、IVM-IVF (in vitro maturation and in vitro fertilization) 施行時に、COCにおいて卵子面積 (oocyte-area)、卵子円形率 (oocyte-circularity)、卵丘細胞の多層形成 (cumulus-layer)、卵丘細胞-卵子面積比 (C-ratio) などを画像解析ソフト (NIH Image) により解析し、これら計測値を指標にCOCの段階で卵子成熟能の予測が可能かどうか検討してきた。これまでに、成熟培養26時間前後においてC-ratioが大きい、即ち卵丘細胞が多く付着しているCOCは高い卵子成熟率を示すことが明らかになっている。このように、卵丘/顆粒膜細胞のクオリティー評価は卵子のクオリティー評価にも有効であることが示唆されている。今年度の研究では、「受精卵呼吸測定装置」を用いて初めて単一ヒトCOCの呼吸量測定に成功するとともに、COCの呼吸量活性と卵子成熟能の関係を示唆する結果が得られた。卵丘細胞の数及びその付着状態とCOCの呼吸活性及び卵子成熟率の関係を調べた結果、卵子成熟率と呼吸量は付着している卵丘細胞の数にほぼ比例すること、卵子成熟率と呼吸

吸活性が両方とも最も高いグレード1では卵子と卵丘細胞間のギャップ結合の発達が非常に顕著であり、他のグレードのCOCと比べて卵丘細胞内のミトコンドリアも良く発達していることが明らかになった。これらの結果から、卵丘細胞の呼吸活性は卵子のクオリティーと密接に関連しており、COCの呼吸測定はこれまで困難であったCOC内の卵子のクオリティーを非侵襲的に評価できる画期的な方法となる可能性が示唆された。

また、本研究を通じて、工学技術の医療応用を促進するためには若手工学研究の意識改革を促す必要があったことから、これまで以上に工学と生命科学の境界領域研究の重要性を教育するためのシステム構築が重要であると考えられる。

E. 結論

今年度の研究により以下の結論に達した。

- (1) SECMを用いた電気化学計測技術は、ヒトCOCのミトコンドリアの呼吸機能解析に有効である。
- (2) これまで困難であったCOC内の卵子の品質を、呼吸活性を指標に評価できる可能性が示された。

本研究事業において、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸計測技術は非侵襲・高感度測定法であることが確認されたことから、「受精卵呼吸測定装置」は不妊治療において胚や卵子の品質評価での臨床応用が十分に期待できる。また、工学研究サイドからの実学的医工学教育には、工学と生命科学の境界領域研究の重要性を教育するためのシステム構築が重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

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. Reprogram.*, 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 m

- ice. *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 pullulan films. *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) プ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、東北大学未来医工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-Environment

- tal-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) Utsunomita 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胚の呼吸量測定の試み、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。

医工学若手研究者の研究教育システムの構築に関する研究

分担研究者	佐藤正明	東北大学大学院医工学研究科	研究科長/生体力学研究分野教授
	永富良一	東北大学大学院医工学研究科	健康維持増進医工学分野 教授
	出江紳一	東北大学大学院医工学研究科	リハビリテーション医工学分野 教授
	高橋 明	東北大学大学院医工学研究科	血管再建医工学分野 教授
	阿部高明	東北大学大学院医工学研究科	分子病態医工学分野 教授
	福島浩平	東北大学大学院医工学研究科	消化管再建医工学分野 教授
	玉井 信	東北大学大学院医学系研究科	客員教授

研究要旨

21 世紀 COE プロジェクト「バイオテクノロジー基盤未来医工学」(2002-2006)、科学技術振興調整費科学技術拠点育成「先進医工学研究機構 (TUBERO)」(2003-2007) により、境界領域医工学研究の優れた人材養成と、そのシーズを臨床にもたらすことを目指してきた。この活動は日本の医工学研究で最も世界に遅れている部分を埋めようとする試みであった。本事業では今年度終了する TUBERO の事業を継続・発展させ、研究成果の臨床研究のみでなく、医工学研究を志す若手大学院生、企業の研究者に「シーズの開発」とともに、「臨床までもたらす努力」の意識、すなわち我々が経験した「臨床研究までの障害を如何に克服するか」を教育した。

A. 研究目的

研究シーズを臨床研究まで高めるための障害を克服するためにすべきことは①研究者・医療従事者・患者の三位一体の研究組織の確立、②研究シーズの知財獲得と医療における研究の最終目標の明確化、③常に臨床現場または市場における自分の研究の意義の確認の 3 点である。それを実現するために東北大学全体の中からシーズごとの研究支援研究室、開発しようとする医療機器に最も関連の深い支援診療科を選定し連携を深める。事業全体として毎日の研究活動の方向性、産業界・患者組織との交流の場を提供する努力を怠らない。このような努力を継続すれば、ここで育った研究者は各大学や企業における臨床研究・治験を最終目標とした医療機器開発研究推進の原動力になり、日本から世界に通用する医療機器が生まれてくるものと確信する。

TUBERO の経験に基づき知財獲得及び医療従事

者との共同研究を推進すると共に、今後の医工学研究を担っていく企業を含めた若手研究者に広く門戸を開放し、問題解決のノウハウを伝授する事を目的とする。それによりシーズを臨床現場や市場に提供し得る医工学研究者の育成が可能となり、ひいては現場のニーズに直結した研究シーズの創出が期待できる。こういった試みこそがこれまでの我が国の医工学領域に最も欠けていたものであり、本事業の最大の特色でもある。

B. 研究方法

医工学若手研究者、企業の研究者を対象に、生命科学、医学、医療の現場で役立つ医療機器開発に必要な知識、患者の全人的な理解、大学病院における現場に基づいたアイデアの創出、機器の改良など医工学分野の「インターン」教育を行う。(倫理面への配慮)

既に TUBERO において動物による研究、倫理委

員会への申請、その後の臨床研究において多くの事例で上記の諸事項は経験を積んでいる。また平成19年9月に発足した橋渡し研究拠点「未来工学治療センター」の設置目的が研究の Protokol 作成に始まり、上記の各項目を国際的な基準に従って整備することであり、今まで以上に詳細かつ十分な配慮が制度化され、支援を受けられることになる。

C. 研究結果

理工学系学部出身者に対して、4日間の病院実習を行った。第1日目は、感染管理、**standard precaution**、患者接遇、医療倫理などについて講義が行われた。第2日目は、放射線部、検査部、薬剤部、救急部、リハビリテーション室の見学が行われ、そこで働く職員から生の声を聴く機会が設けられた。第3日目は、大学病院内にあるスキルズラボコミュニケーショントレーニング室において、縫合・鏡視下手術、超音波検査、血圧測定、心電図記録などの医療手技の研修がシミュレーション機器を用いて行われた。第4日目には、トランスレーショナルリサーチセンターにおいて、同センターの体制、役割、機能などについての講義と見学が実施された。実習の最後に質疑応答の時間を設けた。さらに履修した学生に対してアンケートを実施し、本実習への参加度、理解度、実習の良かった点、改善すべき点などの回答を得た。約40名の学生が参加し、好評を得た。このように理工学系を背景とする社会人や研究者に医学・医療の現場を体験してもらうプログラムのモデルを確立することができた。本プログラムはスキルズラボを備えた大学病院等高度先進医療機関で実施されることを想定しており、広く普及を図る予定である。

D. 考察

理工学系の背景をもつ社会人、研究者に対する医工連携教育を病院で行うためのプログラムがほぼ確立した。見学・実習内容を厳選し、できる

だけ現場の空気と生の声に触れられるように工夫されている。大学病院との連絡、意思疎通は良好であり、今後の継続実施についても環境が整った。今後はさらに広く参加者を募集し、プログラムを継続するとともに、参加者から教育者を輩出する再生産の仕組みを整えることが肝要であると思われる。

E. 結論

理工学系社会人、研究者には、病院での医療・医学研修に対するニーズは高い。高度医療機器が駆使される現場において、教育設備を用い、臨床経験の豊富な医療従事者が直接教育するという適切なプログラムを提供することにより、医工連携が大きく進展すると示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Momma, H., Niu, K., Kobayashi, Y., Guan, L., Sato, M., Guo, H., Chujo, M., Otomo, A., Yufei, C., Tadaura, H., Saito, T., Mori, T., Miyata, T. & Nagatomi, R. Skin advanced glycation end product accumulation and muscle strength among adult men. *Eur J Appl Physiol* 2010.
- 2) Niu, K., Ahola, R., Guo, H., Korpelainen, R., Uchimaru, J., Vainionpaa, A., Sato, K., Sakai, A., Salo, S., Kishimoto, K., Itoi, E., Komatsu, S., Jamsa, T. & Nagatomi, R. Effect of office-based brief high-impact exercise on bone mineral density in healthy premenopausal women: the Sendai Bone Health Concept Study. *J Bone Miner Metab* 28, 568-577, 2010.
- 3) Guo, H., Niu, K., Monma, H., Kobayashi, Y., Guan, L., Sato, M., Minamishima, D. & Nagatomi, R. Association of Japanese

dietary pattern with serum adiponectin concentration in Japanese adult men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010.

- 4) 小野峰子、鈴鴨よしみ、山村麻里子、陳進志、高津郁美、外園知恵、横山孝子、山縣祥隆、吉村尚子、浅野紀美江、阿曾沼早苗、安藤伸郎、出江紳一：据置型拡大読書器の使用頻度と視機能関連 QOL との関連. 眼科臨床紀要 4(1) 9-15,2011
- 5) Takuo Hirose, Masahiro Hashimoto, Kazuhito Totsune, Hirohito Metoki, Azusa Hara, Michihiro Satoh, Masahiro Kikuya, Takayoshi Ohkubo, Kei Asayama, Takeo Kondo, Kei Kamide, Tomohiro Katsuya, Toshio Ogihara, Shin-Ichi Izumi, Hiromi Rakugi, Kazuhiro Takahashi and Yutaka Imai: Association of (pro)renin receptor gene polymorphisms with lacunar infarction and left ventricular hypertrophy in Japanese women: the Ohasama study. *Hypertension Research*, 1-6,2011
- 6) 出江紳一：末梢神経におけるリハビリテーション. *Peripheral Nerve* 21(2):203-9, 2010
- 7) Wang Y, Kondo T, Suzukamo Y, Oouchida Y, Izumi S : Vagal nerve regulation is essential for the increase in gastric motility in response to mild exercise. *Tohoku J Exp Med* ; 222(2): 155-163. 2010
- 8) 出江紳一：日本初の医工学研究科. 工学教育 (J.of JSEE) 58(5): 37-38,2010

2. 学会発表

- 1) 内野すみ江、大内田裕、出江紳一：運動前野における半球間情報連絡 両手タッピングを用いた運動前野摘出後の症例の検

討. 第2回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、2011年2月12日、名古屋

- 2) 鈴木栄三郎、大内田裕、出江紳一：左右運動前野における反応抑制の制御方式の違い. 第2回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、2011年2月12日、名古屋
- 3) 阿部利彦、出江紳一、高木敏行、金高弘恭、鈴木栄三郎、八島和美：筋電位をトリガーとする磁気刺激リハビリテーション装置の開発. 第2回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、2011年2月12日、名古屋
- 4) 角井俊幸、大内田裕、西嶋一智、出江紳一：Hand Mental Rotation Task(HMRT)を用いた上肢の運動イメージ能力の測定 脳卒中片麻痺患者の応用可能性. 第2回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、2011年2月12日、名古屋
- 5) Suzukamo Y, Tanabe M, Izumi S: Response shift which occurred to healthcare provider influenced satisfaction of the service users. 2010 International Society for Quality of Life Research meeting (London, Oct 27-31,2010)
- 6) 鈴鴨よしみ、山村麻里子、小野峰子、高津育美、吉村尚子、横山貴子、陳進志、山縣祥隆、外園千恵、阿曾沼早苗、浅野紀美江、安藤伸郎、出江紳一：拡大ロービジョンリハビリテーションの短期的・長期的アウトカム. 第11回日本ロービジョン学会学術総会、2010.10.22-24、岡山
- 7) Anzaki F, Suzukamo Y, Kondo T, Tateno M, Oouchida Y, Takeda Y, Izumi S: Left Superior Temporal Gyrus May Play a Role in Auditory-Verbal Short-term Memory Disturbance. *International*

Neuropsychological Society Mid-Year Meeting. June 30-July 3, Poland, 2010

- 8) 大内田 裕、鈴木栄三郎、西嶋一智、出江紳一：振動刺激が強制把握の力制御に与える影響、第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2010 年 5 月 20～22 日、鹿児島
- 9) 大内田 裕、鈴木栄三郎、西嶋一智、出江紳一：強制把握における反応抑制障害の検討、第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2010 年 5 月 20～22 日、鹿児島
- 10) 鈴嶋よしみ、出江紳一、ELVR 研究チーム：拡大ロービジョンリハビリテーションの効果、第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2010 年 5 月 20～22 日、鹿児島
- 11) 西嶋一智、近藤健男、鈴嶋よしみ、出江紳一：ITB 療法の導入前後における SF-36 による QOL 評価、第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2010 年 5 月 20～22 日、鹿児島
- 12) 森 隆行、古澤義人、西嶋一智、大内田 裕、杉山 謙、瀬田 拓、鈴嶋よしみ、近藤健男、出江紳一：小脳腫瘍術後に無言症を呈した一例、第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2010 年 5 月 20～22 日、鹿児島
- 13) 古澤義人、杉山 謙、出江紳一：リンパ浮腫における圧迫下運動療法の即時効果、第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2010 年 5 月 20～22 日、鹿児島

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

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
Tokodai K, <u>Goto M</u> , Inagaki A, Nakanishi W, Ogawa N, Satoh K, Kawagishi N, Sekiguchi S, Bo Nilsson, Okada N, Okada H, <u>Satomi S</u>	Attenuation of Cross-Talk Between the Complement and Coagulation Cascades by C5a Blockade Improves Early Outcomes After Intraportal Islet Transplantation	Transplantation	90	1358-1365	2010
<u>Goto M</u> , Imura T, Inagaki N, Ogawa N, Yamaya H, Fujimori K, Kurokawa Y, <u>Satomi S</u>	The Impact of Ischemic Stress on the Quality of Isolated Pancreatic Islets	Transplantation	42	2040-2042	2010
Saito Y, <u>Goto M</u> , Maya K, Ogawa N, Fujimori K, Kurokawa Y, <u>Satomi S</u>	Brain Death in Combination With Warm Ischemic Stress During Isolation Procedures Induces the Expression of Crucial Inflammatory Mediators in the Isolated Islets	Cell Transplantation	19	775-782	2010

Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor AR, McLean CA, Cao D, Rigopoulos A, Cartwright GA, O'Keefe G, Gong S, Adlard PA, Barnham KJ, Rowe CC, Masters CL, <u>Kudo Y</u> , Cappai R, Yanai K, Villemagne VL	18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease.	Brain	134	1089-1100	2011
Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Fukuda H, Arai H, <u>Kudo Y</u> , Yanai K, Itoyama Y.	In vivo visualization of α -synuclein deposition by [11C]-BF-227 PET in multiple system atrophy.	Brain	133	1772-1778	2010
Clarissa Velayo, Takuya Ito, Hiroshi Chisaka, Nobuo Yaegashi, Kanunihiro Okamura, <u>Yoshitaka Kimura.</u>	Effects of antenatal steroid therapy on neurodevelopment in Kan IUGR mouse model	Fetal Diagn Ther.	010:28(2)	79-86	2010
Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, <u>Tamai M, Tomita H.</u>	Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions	Development Growth and Differentiation	53(3)	357-365	2011
Sugano E, Isago H, Wang Z, Murayama N, <u>Tamai M, Tomita H.</u>	Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy.	Gene Therapy		1-9	2010

Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen A, Lawrence JM, Tomita H , Coffey PJ, Vugler A.	Dissecting a Role for Melanopsin in Behavioural Light Aversion Reveals a Response Independent	PLoS ONE	5(11)	e15009 1-15	2010
Kimura N., Tsunoda T., Iuchi Y., Abe H. , 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	Molecular Human Reproduction	16	441-451	2010
Sakagami N., Yamamoto T., Akiyama K., Nakazawa Y., Kojima N., Nishida K., Yokomizo S., Takagi Y., Abe H. , Suzuki C., Yoshioka K.	Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films	Journal of Reproduction and Development	56 (2)	279-284	2010
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
T. Ohashi, N. Kameda, S. Nakamura and M. Sato	Biomechanical contribution of cytoskeletal structures to traction forces in smooth muscle cells	Journal of Biomechanical Science and Engineering	5(3)	262-271	2010
N. Sakamoto, K. Segawa, M. Kanazaki, T. Ohashi and M. Sato	Role of p120 catenin in the morphological changes of endothelial cells exposed to shear stress	Biochemical and Biophysical Research Communications	398(3)	426-432	2010
S. Sugita, T. Murase, N. Sakamoto, T. Ohashi and M. Sato	Size sorting of kinesin-driven microtubules with topographical grooves on a chip	Lab on a Chip	10	755-761	2010
Momma, H., Ni u, K., Kobayashi, Y., Guan, L., Sato, M., Guo, H., Chujo, M., Ohtomo, A., Yufei, C., Tadaura, H., Saito, T., Mori, T., Miyata, T. & Nagatomi, R.	Skin advanced glycation end product accumulation and muscle strength among adult men	Eur J Appl Physiol	(DOI 10.1007/s00421-010-1779-x)		2010

Niu, K., Ahola, R., Guo, H., Korpelainen, R., Uchimaru, J., Vainionpaa, A., Sato, K., Sakai, A., Salo, S., Kishimoto, K., Itoi, E., Komatsu, S., Jamsa, T. & <u>Nagatomi, R.</u>	Effect of office-based brief high-impact exercise on bone mineral density in healthy premenopausal women: the Sendai Bone Health Concept Study.	J Bone Miner Metab	28 (DOI 10.1007/s00774-010-0163-6)	568-577	2010
Guo, H., Niu, K., Monma, H., Kobayashi, Y., Guan, L., Sato, M., Minamishima, D. & <u>Nagatomi, R.</u>	Association of Japanese dietary pattern with serum adiponectin concentration in Japanese adult men.	Nutr Metab Cardiovasc Dis	XX	1-8	2010
出江紳一	日本初の医工学研究科	工学教育	58(5)	37-39	2010
出江紳一	摂食・嚥下リハビリテーション	Anti-Aging Medicine	7(2)	213-8	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1①)、マイクロ電極の電位を一定に保持するポテンシオスタット(図1②)、マイクロ電極の移動を制御するコントローラ(図1③)、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1④)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

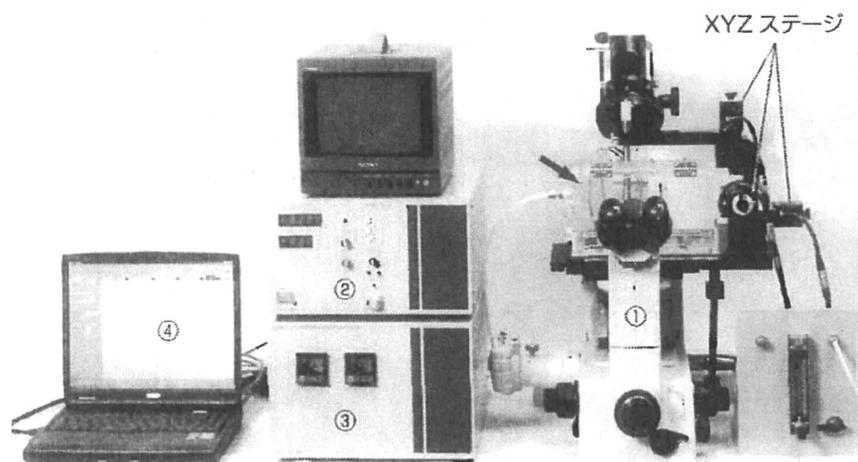


図1 走査型電気化学顕微鏡をベースに開発した受精卵呼吸測定装置

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 $0.5 \times 10^{11} \text{ mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 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。形態の評価法は、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

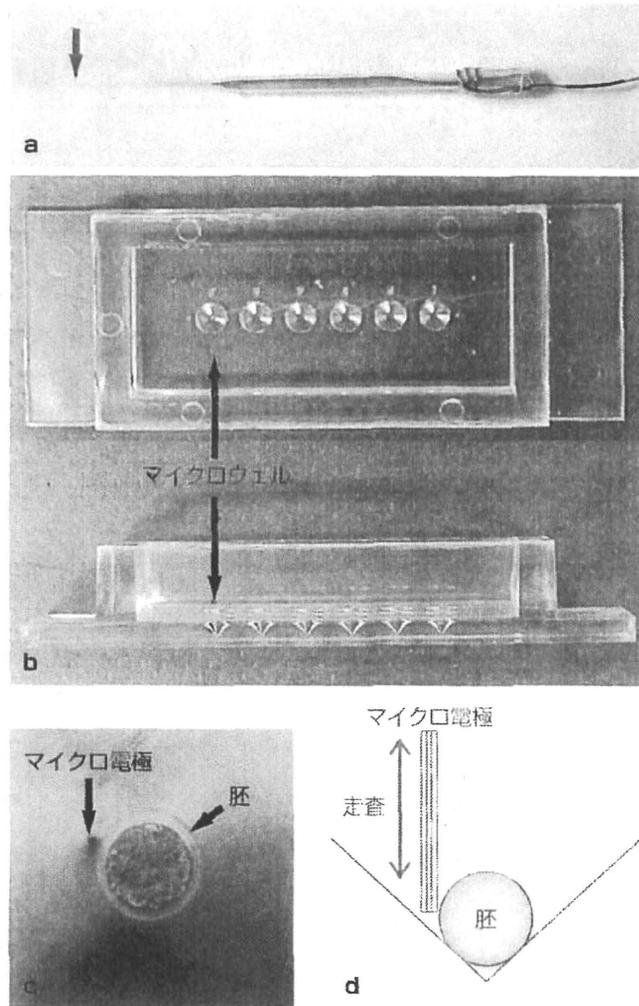


図2 胚の呼吸測定のための関連技術
 a: ディスク型白金マイクロ電極。
 b: 多検体測定プレート、底面には円錐形のマイクロウェルが6穴施されている。
 c: マイクロウェル底部に静置したウシ胚。
 d: マイクロ電極は胚近傍を鉛直方向に走査し、胚の酸素消費量を測定する。

関係を示す興味深い研究成果が得られている。呼吸測定後の胚を借腹牛に移植し胚の呼吸活性と受胎率の関係を調べた結果、移植前の呼吸量が基準値以上(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、60%以上の高い妊娠率が得られている。一方、呼吸量が基準値以下の胚は、ほとんど受胎しない。この研究結果から、受精卵呼吸測定装置はクオリティ良好胚の選別に有効なシステムであると考えられている³⁾。

ヒト胚の呼吸機能解析

受精卵呼吸測定装置は、ほとんどの細胞に共通するミトコンドリア呼吸を測定していることから汎用性は高く、ヒト胚の呼吸機能解析やクオリティ評価への応用が期待されている。

ヒトへの応用を目的とした基礎的研究として、ヒト胚(余剰胚)の形態と呼吸測定例を示す(図6)。体外受精3日(day 3)および5日(day 5)の胚の酸素消費量は、それぞれ $0.45 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ および $1.15 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ で