

201111003A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業
(ナノメディシン研究)

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
(H21-ナノ一般-001)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 宏之

平成24(2012)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診断装置の開発 ----- 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 ----- 19
末永 智一
2. ヒト胚・卵子の評価 ----- 23
吉野 修
3. 体外受精胚の培養 ----- 28
藤本 晃久
4. 卵子の分子生物学的解析 ----- 32
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 ----- 37
横尾 正樹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 47

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23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

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。第2年度までに、(1)「臨床対応型細胞呼吸測定装置」に不可欠な基盤技術を開発するとともに、(2)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と安全性を検証することができた。また、探索的臨床研究の第一歩として(3)ヒトの余剰胚と余剰卵子の呼吸活性測定に成功した。

本研究事業の最終年度はこれらの研究成果を踏まえ、ヒトの胚および卵子のクオリティー診断システムの確立と、医療現場での利用を目指した「臨床対応型細胞呼吸測定システム」の完成を目的とした。具体的には、(1)医療応用可能な超高感度マイクロ電極、非侵襲呼吸測定液および呼吸解析ソフトを開発した。(2)走査型電気化学顕微鏡をベースに要素技術をシステム化した「細胞呼吸測定システム」を製作し、医療現場での実用化の可能性を検証した。(3)「細胞呼吸測定システム」の有効性と安全性を検証するための探索的臨床研究として、ヒト余剰胚を用いた呼吸能解析および培養試験、動物胚を用いた胚移植試験、ミトコンドリア呼吸機能の分子生物学的解析を行った。その結果、(1)では高感度マイクロ電極と非侵襲測定液の開発に成功し、単一の胚および卵子の呼吸量を非侵襲的に測定できた。(2)では、従来のシステムと比べてクリーン度と操作性を向上させた「細胞呼吸システム」を製作することができた。不妊治療機関において「細胞呼吸測定システム」の操作性を検討した結果、医療現場での実用化の目処が立った。(3)では、呼吸測定した胚や胚移植によって誕生した産子の正常性が確認され医療応用へ向けての有効性と安全性が示されるとともに、ミトコンドリア呼吸機能に関する分子基盤が明らかになった。

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

近年、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の成功率は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。

本研究事業の最終年度は、ヒトの胚および卵子のクオリティー診断に用いることができる「臨床対応型細胞呼吸測定システム」の完成を目的とした。さらに、「細胞呼吸測定システム」

の有効性と安全性を検証するためにヒト余剰胚を用いた探索的臨床研究を実施した。

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

前年度までに、単一胚の呼吸計測に必要な針型の電極サイズを特定し、この条件を満たすマイクロ電極を作製するための電解エッチング研磨法とマイクロフォーシールド法を開発した。今年度は、マイクロ電極の高機能化と電極固定型デバイスの開発を行った。具体的には、マイクロ電極を高機能化するために、参照極一体型リング・ディスク電極探針と2チャンネル炭素ナノプローブ（DBCNP）を作製し、それぞれ性能評価を行った。

(b) 非侵襲測定液の開発

前年度までの研究により、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、電極性能に影響しない受精卵培養液の探索を行ってきた。今年度は、各種培養液におけるマイクロ電極の性能評価と、医療応用可能な培養液組成を検討するために非動物由来成分添加の効果調べた。また、胚に対する侵襲性の有無を調べることで、製作した測定液の安全性を検証した。

(c) 多検体測定プレートの開発

前年度までに、サイズの異なる各種動物胚の呼吸量測定に対応した多検体測定用プレートを開発し、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。今年度は、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を製作し、ヒト乳癌細胞スフェロイドとマウス胚の呼吸量測定による性能評価を試みた。

(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機能を有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「細胞呼吸測定システム」を製作した。このシステムを不妊治療施設に設置し、医療現場における実用性を検証した。

(2) 細胞呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

細胞呼吸測定システムの有効性・安全性を生物学的解析により検証するために、以下の研究を行った。ウシ胚は、体外受精により得られた2細胞時胚、4細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚、胚盤胞をそれぞれ回収し実験に用いた。マウス胚は、体外受精および生体回収胚(体内受精胚)を実験に用いた。これらの試料を用いて、ミトコンドリアの呼吸機能に関連した以下の解析を行った。

(a) 酸素消費量測定

(1)-(e)で製作した「細胞呼吸測定システム」を用いて、ウシおよびマウス胚の呼吸量を測定

した。呼吸測定装置専用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、マイクロ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(挿引)し試料の酸素消費量(呼吸量)を測定した。

(b) 活性型ミトコンドリアの局在観察

MitoTracker Orange CM-H2 TMRosを用いてウシ胚およびマウス胚を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて活性型ミトコンドリアの細胞内分布を調べた。また、ミトコンドリアの膜電位に依存して緑色(不活性型)から赤色(活性型)へ変化するJC-1を用いてミトコンドリアを染色し、相対膜電位(緑色/赤色)を算出した。

(c) ATP量測定

細胞内のアデノシン三リン酸(ATP)は、ルシフェリン/ルシフェラーゼ混合キット(BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay kit, Promega社)を用いて測定した。ルミノメーターにより発光強度を測定し、1胚または1卵子当たりのATP含有量を算出した。

(d) シトクロームcオキシダーゼ(Cox)遺伝子の発現解析

呼吸量測定による胚クオリティー評価の有効性を遺伝子レベルで解析するために、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体IVを構成するシトクロームcオキシダーゼ(Cox)の遺伝子発現をRT-PCRにより解析した。呼吸鎖複合体IVは、ミトコンドリアゲノムと核ゲノムによってコードされる13のサブユニットで構成されている。本研究では、マウスおよびウシにおいてミ

トコンドリアゲノム由来であり呼吸鎖複合体IVの電子伝達を担っている Cox1、Cox2、Cox3 と、核ゲノム由来であり呼吸鎖複合体IVの機能調節に関与する Cox4、Cox5a、Cox5b および Cox6b の遺伝子の発現をそれぞれ調べた。また、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)の発見を目的に、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* 解析により調べた。

(e) ミトコンドリアの微細構造観察

ウシ胚およびマウス胚をグルタルアルデヒドおよびオスミック酸で固定し、定法に従い超薄切片を作製した。透過型電子顕微鏡を用いて胚発生に伴うミトコンドリア微細構造変化を観察した。

(f) 胚移植試験(安全性評価試験)

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を行った。また、過排卵処理し雄マウスと交尾させた雌マウスから胚盤胞を回収し、呼吸測定後に仮腹雌マウスの子宮に移植した。ウシおよびマウス共に、胚の呼吸活性と妊娠率の関係を調べ、産子の正常性を解析することで呼吸測定の安全性を検証した。さらに、培養系において呼吸測定の安全性を評価するために、マウス胚の trophoblast outgrowth 試験を実施した。子宮灌流で胚盤胞を回収し、呼吸測定後、胚盤胞から透明帯を酸性タイロド溶液で除去した。平衡化した outgrowth 用培養液で洗浄後、ゼラチンコート 96-well ディッシュ上で4日間培養した。マウス胚の接着、伸展、outgrowth の変

化を顕微鏡下で観察し、outgrowth 面積は市販の画像解析ソフト(Adobe Photoshop CS5)を使用して計測した。

(3) ヒト生殖細胞クオリティー診断法の開発(探索的臨床研究)

「細胞呼吸測定システム」の臨床応用を目指した探索的臨床研究の基礎として、ヒト余剰胚の呼吸量測定および培養試験を行った。ヒト胚の呼吸能解析研究には、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。また、各発生ステージにおけるミトコンドリアの微細構造を解析し呼吸測定の有効性を検証した。さらに、呼吸測定したヒト胚を培養し、呼吸活性と胚発生能の関係を調べた。

今年度は、ヒト生殖細胞クオリティー診断法開発のための臨床的な検討として、ヒト卵胞発育のメカニズム解析による卵巣機能評価を行った。具体的には、卵巣から分泌される因子を測定することが卵巣の機能評価に繋がる可能性があることから、卵巣に存在するサイトカインのうち、特に anti mullerian hormone (AMH) の血中濃度解析を行った。また、卵巣に発現する BMP (bone morphogenetic protein) サイトカインに着目し、その発現および卵胞発育における作用についての検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト余剰胚および卵子を研究試料として用いる場合、研究実施に際しては当該研究機関における倫理委員会の承認を受ける必要がある。

既に山形大学、東京大学および研究協力機関においては、学術研究への使用に関して患者の承諾が得られた余剰胚に限って、本研究事業の主要実験である呼吸活性測定への使用が承認されている。また、日本産婦人科学会が定める「ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する見解と、これに対する考え方：日産婦誌 54 巻 2 号付録 pp.2-3」において、(1) 精子・卵子は、提供者の承諾を得たうえ、また、提供者のプライバシーを守って研究に使用することができる、(2) 受精卵は 2 週間以内に限って、これを研究に用いることができる、という条項に従うことで、本研究では倫理的な問題は一切生じていない。

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

Pt 線を電解エッチングにより細線化後低融点ガラスに封入し、Pt ディスク電極を作製した。さらに、ガラス表面に Pt スパッタリングにより Pt リング電極を積層し、ガラスシール部の厚さを調製して様々な[リング電極半径]/[ディスク電極半径]比(= b/a)で探針を作製した。参照極一体型リング-ディスク電極探針の性能を評価した結果、 b/a 比が 2.96 以下の場合にレドックスサイクルが観測され、両電極間での干渉が示唆された。Pt リング電極を参照極として Pt ディスク電極の酸素還元電流のボルタモグラムの観測した結果、電位 -0.7 V vs. Pt リング電極にて酸素還元電流が観測可能であることがわかった。マウス ES 細胞から作成した胚様体 (Embryoid body) の呼吸測定を実施した。その結果、参照極一体型 Pt リング-ディスク電極探針により、マウス胚様体の呼吸を

正確に測定できることが示された (分担研究報告：東北大学・末永智一)。

2 チャンネル炭素ナノプローブ (DBCNP) を作製し、その測定精度を評価した。その結果、DBCNP の 2 チャンネルのうち、炭素を析出しないチャンネルには電解液を充填し、Ag/AgCl を挿入してイオン電流を観測したところ、イオン電流をフィードバック信号として探針-基板間距離を制御することにより、ヒト扁平上皮細胞 (A431)、ラット副腎髄質クロム親和性細胞種 (PC12) の生細胞イメージングに成功した (分担研究報告：東北大学・末永智一)。

(b) 非侵襲測定液の開発

昨年度までに開発した高感度マイクロ電極を用いて、各種培養液中での酸化還元電流値を測定した。その結果、マウス受精卵培養液 (HTF) において非常に安定した還元電流計測ができた。HTF 培地を基本とする受精卵呼吸測定液 (ERAM: Embryo Respiration Assay Medium) をベースに、ウシ血清アルブミンの代わりに合成ポリマー (ポリビニルアルコール: PVA) を添加した測定液を作製し、電極性能への影響や胚への侵襲性の有無を調べた。製作した測定液を用いて呼吸測定した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、合成ポリマーを添加した HTF 測定液は非侵襲的呼吸測定に有効であり、医療対応可能な呼吸測定液であることが示された。

(c) 多検体測定プレートの開発

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。この電極固定型デバイスを用いて、ヒト乳癌細胞スフェロイドの呼吸を測定した。同じスフェロイドサンプルを「受精卵呼吸測定装置：HV405」に移して再度呼吸計測を行った結果、2つの測定法の相関は 0.79 (決定係数 R²) であった (分担研究報告：東北大学・末永智一)。

(d) 呼吸解析ソフトの開発

マイクロ電極の移動を半自動化した呼吸解析ソフトを用いてマイクロ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マイクロ電極の移動が確認された。これにより、マイクロ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マイクロ電極の破損防止効果が向上した。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た結果、データ解析の操作性が大幅に向上。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結果、より精度の高い呼吸解析が可能となった。

(e) 細胞呼吸測定システムの開発

走査型電気化学顕微鏡 (北斗電工(株)製) をベースに(a)~(d)の要素技術をシステム化した「細胞呼吸測定システム」を製作した。マイクロ電極およ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、マイクロ電極を1ミクロン単位で走査(移動)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。さらに今年度は、多検体測定プレートを測定に使用し、新たに製作した呼吸解析ソフトをシステムに加えた。その結果、昨年度までに製作した呼吸測定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・解析までの一連の操作を1~2分で完了することが可能となった。

(2) 呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

研究項目(1)で新たに製作した「細胞呼吸測定システム」を用いてウシ胚およ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。

(a) 酸素消費量測定

マウス胚の発生過程における酸素消費量の解析を行った結果、酸素消費量は胚の発生に伴い増加し、特に桑実胚から胚盤胞のステージにかけて顕著に増加することが明らかになった。この呼吸活性の変化は、ウシ胚やヒト胚(余剰胚)の測定で得られた結果と類似していた。

(b) 活性型ミトコンドリアの局在観察

マウス胚において活性型ミトコンドリアは、2細胞期から4細胞期の胚では細胞内にほぼ均一に存在していたが、8細胞期胚では割球の外縁部にミトコンドリアのクラスターが観察された。桑実胚および胚盤胞では核の周辺に活性型ミトコンドリアの大きなクラスターが形成されていた。ウシ胚ではマウス胚と同様に、4細胞期までの発生初期では活性型ミトコンド

リアは細胞内に均一に存在していたが、発生が進むにしたがって核周辺へのミトコンドリアの集中が観察された。次に、2細胞期胚と胚盤胞におけるミトコンドリア膜電位活性を比較した結果、マウス胚及びウシ胚ともに酸素消費量が大きい胚盤胞の方がミトコンドリアの膜電位活性が高いことがわかった。

(c) ATP 量測定

マウス胚の発生過程における ATP 含量の変化を解析した。その結果、2細胞期から8細胞期までは1胚当たりの ATP 含量は顕著に増加し、桑実胚および胚盤胞のステージでは8細胞期胚に比べて有意に減少した。8細胞期胚において ATP 含量が急激な増加を示したことから、個々の胚の ATP 含量を詳細に解析した結果、8細胞期胚では他の発生ステージと比べて、個々の胚の間に ATP 含量の大きな差が認められた。

(d) シトクローム c オキシダーゼ (Cox) 遺伝子の発現解析

マウス胚およびウシ胚において、ミトコンドリアゲノム由来であり呼吸鎖複合体 IV の中心活性部位を構成するサブユニットである Cox1、Cox2 および Cox3 と、核ゲノム由来であり生体機能調節に関与するとされる Cox4、Cox5a、Cox5b および Cox6b の遺伝子の発現をそれぞれ RT-PCR により解析した。その結果、マウス胚では Cox1、Cox2 および Cox3 は、1細胞期から胚盤胞期までの全ての発生ステージで発現していた。Cox5a、Cox5b および Cox6b は、2細胞期以降徐々に発現量が増加したが、Cox4 は全ての発生ステージにおいて発現は認められなかった。この結果から、マウス胚ではミトコンドリアゲノムと核ゲノムにコードさ

れる Cox 遺伝子は、胚発生過程において異なる発現パターンを示すことが明らかになった。一方、ウシ胚では、Cox1、Cox3、Cox4 および Cox6b は2細胞期から胚盤胞期までの全ての発生ステージで発現していた。また、Cox5a と Cox6b は2細胞期と8細胞期を除き他のステージにおいて発現が見られたが、Cox2 は桑実胚と胚盤胞においてのみ発現していた。ウシ胚では、桑実胚期以降に今回調べた全ての Cox 遺伝子が発現したことから、呼吸活性が顕著に増加する時期に合わせて Cox 遺伝子の発現が活発になることが示唆された。

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が認められた。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ことから、生殖細胞に特異的な加齢機構の存在が示唆された(分担研究報告:慶應義塾大学・浜谷敏生)。

(e) ミトコンドリアの微細構造観察

ウシ胚においては、前年度までに胚発生過程におけるミトコンドリアの微細構造の解析が行われている。今年度は、マウス胚におけるミトコンドリアの微細構造を観察した。その結果、ウシ胚と同様に、呼吸活性が高くなる桑実胚から胚盤胞においてミトコンドリアのサイズ増加やクリステ拡張などミトコンドリア機能発

達を示す変化が観察された。

(f) 胚移植試験

前年度は、人工授精した牛から採取した胚を1日間回復培養した胚の移植試験を行った。移植前に胚盤胞で $1.0 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、初期胚盤胞で $0.8 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、桑実胚で $0.5 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ という呼吸量基準値を設定し、これら基準値以上の呼吸量を示す胚を移植した。その結果、それぞれの発生ステージにおいて58.3%、64.0%、60.7%の高い妊娠率が得られた。一方、基準値に満たない呼吸量の胚を移植した場合、全ての発生ステージにおいて妊娠率は極めて低かった(0~9%)。今年度は、呼吸量に加えて形態評価を併用した場合の妊娠率を解析した。その結果、形態的评价が最も良好なAランクで、且つ呼吸量が基準値以上の胚を移植した場合、妊娠率が約80%に達することが明らかになった。この結果は、品質良好胚の選別には形態評価と呼吸量測定との併用が有効であることを示唆している。また昨年度は、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。今年度は、マウス胚 trophoblast outgrowth 試験系を用いて、呼吸測定の安全性を検証した。その結果、呼吸活性の高い胚は outgrowth の面積が大きいことが確認された。前年度に実施した胚移植試験の基準(呼吸活性 $0.70 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$)で分けて比較したところ、 $0.70 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 以上の胚は、 $0.70 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 以下の胚と比較して、有意に outgrowth 面積が拡大することが確認された($P < 0.05$)。以上のことから、呼吸活性の高い胚は、高い着床能力を有しているこ

とが推察された(分担研究報告:秋田県立大学・横尾正樹)。

(3) ヒト生殖細胞クオリティー診断法の開発 (探索的臨床研究)

「細胞呼吸測定システム」の臨床応用と呼吸測定によるヒト生殖細胞クオリティー診断の開発を目的とした探索的臨床研究として、ヒト余剰胚および卵子を用いた呼吸測定データの収集を行った。前年度に引き続き異なる発生ステージの胚の呼吸量を測定した結果、桑実胚から胚盤胞にかけて顕著な呼吸量の増加とミトコンドリアの形態的成熟が同時に起こることが明らかになった。これは、ウシ胚およびマウス胚と同様の結果であった。また、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おこなうことで、胚の発生能と呼吸能との関連を調べた。その結果、呼吸量($\times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)が基準値の範囲内($0.26 \leq F \leq 0.56$)の胚は、胚盤胞への発生率が高かったのに対して、 $0.26 > F$ および $F > 0.56$ の呼吸量の胚は有意に発生能が低下することが示された。さらに前年度に引き続き、ヒト卵子の呼吸能を解析するためにヒト卵子-卵丘細胞複合体(COC)の呼吸量測定を行った。その結果、卵丘細胞が最も多く付着しているCOCが最も酸素消費量が大きく、卵子の成熟率も高いことが明らかになった。本研究により、COCの呼吸活性を解析することで卵子のクオリティーを評価できる可能性が示された。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において酸素消費量を比較検討した。その結果、凍結保存胚では酸素消費量が低下すること、凍結保存後の回復培養過程出に

呼吸能の変化を解析することができた。これらの研究から、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

不妊症患者血清において、卵胞発育に重要な役割を果たしている TGF- β スーパーファミリーメンバーに属するサイトカイン Bone Morphogenetic Protein (BMP) ファミリーと anti mullerian hormone (AMH)の発現を解析した。その結果、(1) BMP-2, -6, -7, -15, アクチビン-A および Growth differentiation factor 9 (GDF-9) 刺激は FSH 受容体 mRNA を誘導すること、(2) BMP-2, -6, -7, -15 の順で AMH mRNA 発現が誘導されるが、アクチビン-A および GDF-9 は AMH mRNA 誘導作用を示さないことが判明した。さらに、卵巣に発現する BMP サイトカインの発現および卵胞発育における作用を検討した結果、(3) BMP サイトカインにより誘導される GDF-3はBMPの作用を抑制することがわかり、BMP サイトカインのネガティブフィードバックシステムの存在が明らかになった。以上の結果から、実地臨床において卵巣機能評価法として BMP サイトカインの下流に位置する AMH の血中濃度を測定することが有効であることが示唆された(分担研究報告：東京大学・吉野修、東京大学・藤本晃久)。

以上の結果から、呼吸活性を指標にヒト胚および卵子のクオリティー評価に「細胞呼吸測定システム」が有効であることがヒト由来の試料を用いた研究により示唆された。

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。これにより、医療現場での実用化の可能性が高くなった。

D. 考察

本年度は3年計画の最終年度として、第2年度までの研究成果を踏まえ、以下の研究を実施した。本研究事業は、装置開発から医療現場での実用化を図るために、工学と生物・医学の異分野が連携した研究プロジェクトとして、(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。最終年度に予定していた全ての研究項目において、当初の計画通りの研究が実施され、本研究事業の最終目標を達成するための十分な研究成果が得られた。研究期間を通じて、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。

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の要素技術を確立することができた。細胞呼吸測定の基盤となる走査型電気化学顕微鏡をベースに、これら要素技術をシステム化した「臨床対応型細胞呼吸測定装置」を開発することができた。
- (2) ウシおよびマウスを用いた動物実験により、胚や卵子など生殖細胞のクオリティー評価に細胞呼吸測定技術が有効であることが示された。また、医療応用へ向けての安全性が確認された。
- (3) ヒト胚および卵子の呼吸量測定に成功し、呼吸活性を指標とするヒト生殖細胞クオリティー診断法の有効性と安全性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表論文

1. 論文発表

- (1) Yamanaka M., Hashimoto S., Amo A., Ito-Sasaki T., **Abe H.**, Morimoto Y. (2011) Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum. Reprod.*, 26 (12): 3366-3371.
- (2) 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.*, 286 (22):19682-19692.
- (3) Date Y., Takano S., Shiku H., Ino K., Ito-Sasaki T., **Yokoo M.**, **Abe H.**, Matsue T. (2011) Monitoring oxygen consumption of single mouse embryo on an integrated electrochemical microdevice. *Biosens. Bioelect.*, 33(1):106-112.
- (4) 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.*, 28:790-801.
- (5) Nagamine K., Takahashi Y., Ino K., Shiku H., **Matsue T.** (2011) Influence of tip size on single yeast cell imaging with scanning electrochemical microscopy. *Electroanalysis*, 23:1168-1174.
- (6) Takahashi Y., Shevchuk A.I., Novak P., Zhang Y., Neil E., Macpherson J.V., Unwin P.R., Pollard A., Roy D., Clifford C.A., Shiku H., **Matsue T.**, Klenerman D., Korchev Y.E. (2011) Fabrication of the double-barrel carbon SECM-SICM nanoprobe for simultaneous nanoscale electrochemical and topographical imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50:9638-9642.
- (7) Ino K., Saito W., Koide M., Umemura T., Shiku H., **Matsue T.** (2011) Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection. *Lab. Chip.*, 11:385-388.

- (8) Takeda M., Shiku H., Ino K., **Matsue T.** (2011) Electrochemical chip integrating scalable ring-ring electrode array to detect secreted alkaline phosphatase. *Analyst*, 136 (23):4991 – 4996.
- (9) Takahashi Y., Miyamoto T., Shiku H., Ino K., Yasukawa T., Asano R., Kumagai I., **Matsue T.** (2011) Electrochemical detection of receptor-mediated endocytosis by scanning electrochemical microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13:16569-16573.
- (10) Zhu X., Ino K., Lin Z., Shiku H., Chen G., **Matsue T.** (2011) Amperometric detection of DNA Hybridization using a multi-point, addressable electrochemical device. *Sens. Actuat B*, 160 (1):923-928.
- (11) Shi J., Yoshino O., Osuga Y., Akiyama I., Harada M., Koga K., **Fujimoto A.**, Yano T., Taketani Y. (2012) Growth differentiation factor 3 is induced by bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) and BMP-7 and increases luteinizing hormone receptor messenger RNA expression in human granulosa cells. *Fertil. Steril.*, in press.
- (12) Osuga Y., Hirota Y., **Yoshino O.**, Hirata T., Koga K., Taketani Y. (2012) Proteinase-activated receptors in the endometrium and endometriosis. *Front Biosci. (Elite Ed.)*, 4:755-767.
- (13) **Yoshino O.**, Nishii O., Osuga Y., Asada H., Okuda S., Orisaka M., Hori M., Fujiwara T., Hayashi T. (2012) Myomectomy decreases abnormal uterine peristalsis and increases pregnancy rate. *J. Minim. Invasive. Gynecol.*, 19(1):63-67.
- (14) Wang B., Koga K., Osuga Y., Cardenas I., Izumi G., Takamura M., Hirata T., **Yoshino O.**, Hirota Y., Harada M., Mor G., Taketani Y. (2011) Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts. *Endocrinology*, 152(12):4984-4992.
- (15) **Yoshino O.**, Izumi G., Shi J., Osuga Y., Hirota Y., Hirata T., Harada M., Nishii O., Koga K., Taketani Y. (2011) Activin-A is induced by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α and enhances the mRNA expression of interleukin-6 and protease-activated receptor-2 and proliferation of stromal cells from endometrioma. *Fertil. Steril.*, 96(1):118-121.
- (16) Hirata T., Osuga Y., Takamura M., Saito A., Hasegawa A., Koga K., **Yoshino O.**, Hirota Y., Harada M., Taketani Y. (2011) Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis. *Fertil. Steril.*, 96(1):113-117.
- (17) Saito A., Osuga Y., **Yoshino O.**, Takamura M., Hirata T., Hirota Y., Koga K., Harada M., Takamura Y., Yano T., Taketani Y. (2011) TGF- β 1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6. *Hum. Reprod.*

- 26(7):1892-1898.
- (18) Yoshino O., Hori M., Osuga Y., Hayashi T., Sadoshima Y., Tsuchiya H., Nishii O., Taketani Y. (2011) Myomectomy reduces endometrial T2 relaxation times. *Fertil. Steril.*, 95(8):2781-2783.
- (19) Wang B., Koga K., Osuga Y., Hirata T., Saito A., Yoshino O., Hirota Y., Harada M., Takemura Y., Fujii T., Taketani Y. (2011) High mobility group box 1 (HMGB1) levels in the placenta and in serum in preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 66(2):143-148.
- (20) Harada M., Osuga Y., Izumi G., Takamura M., Takemura Y., Hirata T., Yoshino O., Koga K., Yano T., Taketani Y. (2011) Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study. *Gynecol. Endocrinol.* 27(9):717-720.
- (21) Isono W., Wada-Hiraike O., Shirane A., Fujimoto A., Osuga Y., Yano T., Taketani Y. (2012) Alternative strategies to in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment for aged infertile women. *Reprod. Med. Biol.*, 11(1):69-72.
- (22) Tsutsumi R., Fujimoto A., Osuga Y., Harada M., Takemura Y., Koizumi M., Yano T., Taketani Y. (2011) Successful pregnancy following low-dose hCG administration in addition to hMG in a patient with hypothalamic amenorrhea due to weight loss. *Gynecol. Endocrinol.* 2011 Nov 21 (Epub ahead of print)
- (23) Hamatani T. (2012) Human spermatozoal RNAs. *Fertil. Steril.*, 97(2):275-281.
- (24) Sato S., Takahashi T., Nishinomiya H., Katoh M., Itoh R., Yokoo M., Yokoo M., Iha M., Mori Y., Kasuga K., Kojima I., Kobayashi M. (2012) A common nucleotide sequence of structural gene encoding fibroblast growth factor 4 in eight cattle derived from three breeds. *Anim. Sci. J.*, 83:260-262.
- (25) Yokoo M., Sato E. (2011) Physiological function of hyaluronan in mammalian oocyte maturation. *Reprod. Med. Biol.*, 10:221-229.
- (26) 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*、Vol. 60, No. 12, 2013-2019.
- (27) 吉田仁秋、田中孝幸、阿部宏之 (2011) 体外培養卵子の評価—臨床応用、*産科と婦人科*、No. 78, No. 8, 974-979.
- (28) 阿部宏之 (2011) 走査型電気化学顕微鏡を用いた胚の評価法、*産科と婦人科*、No. 78, No. 8, 967-972.
- (29) 山中昌哉、橋本周、天羽杏実、伊藤-佐々木隆広、阿部宏之、森本義晴 (2011) ヒト凍結融解胚盤胞の呼吸量測定、*産婦人科の実際*、Vol. 60, No. 6, 923-927.
- (30) 阿部宏之 (2011) 卵子・胚のクオリティ—評価、*卵子学* (森崇英 編)、京都大学学術出版会、614-623.
- (31) 横尾正樹、佐藤英明 (2011) 卵胞発育と卵胞成熟、卵胞発育と成熟の局所調節因子、

- 卵子学(森崇英 編)、京都大学学術出版会、388-397.
- (32) 珠玖仁、末永智一 (2011) 電気化学ナノイメージング、ナノ融合による先進バイオデバイス、シーエムシー出版、156-162.
- (33) 藤本晃久 (2012) 子宮筋腫合併不妊を妊娠に導くには、産科と婦人科、Vol. 79, No.3 295-299.
- (34) 小泉美奈子、廣井久彦、大須賀穰、藤本晃久、甲賀かを莉、平池修、百枝幹雄、矢野哲、武谷雄二 (2011) 原因不明ならびに卵管因子不妊症例に対する腹腔鏡検査・治療の意義、日本産科婦人科内視鏡学会雑誌、27巻1号、296-299.
- (35) 松本玲於奈、嘉本寛江、市川麻佑子、樋口紗恵子、後藤美希、平池修、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 (2011) 高度肥満を合併した汎発性腹膜炎の1例、日本産科婦人科学会東京地方部会会誌、60巻1号、106-110.
- (36) 菅原かな、浜谷敏生 (2011) 生殖卵巣学—基礎知識と臨床の進展(編集:石塚文平、鈴木秋悦). 第2章(9) 卵巣の老化. 医歯薬出版、東京.
- (37) 久慈直昭、井上治、福永朝子、菅原かな、小川誠司、奥村典子、山田満稔、浜谷敏生、吉村泰典 (2011) 【不妊診療のすべて】ART(生殖補助医療) 精子・卵子・卵巣の凍結保存とその安全性. 産婦人科治療 102巻増刊:495-500.
- (38) 清水聖子、浜谷敏生、後藤智子、田代有喜子、太田博明、松井英雄 (2011) カップルのセクシャリティを評価する質問票 Golombok-Rust Inventory of Sexual Satisfaction(GRISS) 日本語版の作成とその言語的妥当性の検討. 日本受精着床学会雑誌 28(2):453-456.
- (39) 久慈直昭、井上治、福永朝子、菅原かな、小川誠司、奥村典子、内田明花、山田満稔、佐藤卓、浜谷敏生、吉村泰典 (2011) 【社会医学的ハイリスク妊娠とその対策】不妊治療後の妊娠とその予後. 産婦人科治療 103(4):375-382.
- (40) 吉野修、西井修、折坂誠、浅田弘法、藤原敏博、小辻文和、吉村泰典、大須賀穰、武谷雄二 (2011) 子宮筋腫により誘導される子宮内膜の異常蠕動様運動は妊娠率を低下させる、産婦人科の実際 (0558-4728) 60巻10号.

2. 学会発表

- (1) 珠玖仁、新井俊陽、周縁殊、西條拓、堀口佳子、伊野浩介、末永智一 (2012) マウスES細胞分化過程における呼吸活性と網羅的遺伝子解析の照合、電気化学会第79回大会(アクトシティ浜松、2012年3月29日)
- (2) 藤本晃久 (2012) シンポジウム「ロボット支援下手術—導入と展望—」当科におけるロボット支援下子宮全摘術の導入経験、第2回日本婦人科ロボット手術研究会(東京都、東京医科大学、2012年3月24日)
- (3) 海藤康平、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2011) ウシ初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能解析: シトクロムcオキシダーゼ遺伝子発現解析の試み、第27回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会(岐阜県高山市、ひだホテルプラザ、2011年1月26-27日)
- (4) 渡邊剛広、島麗香、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2011) マウス初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能の階層的解析、第27回

- 東日本家畜受精卵移植技術研究会大会（岐阜県高山市、ひだホテルプラザ、2011年1月26-27日）
- (5) 萩本範幸、高倉啓、黒谷玲子、阿部靖之、**阿部宏之**（2011）異なる温度条件下で保存したウシ卵巣における組織学的変化、第27回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会（岐阜県高山市、ひだホテルプラザ、2011年1月26-27日）
- (6) **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（2012）子宮内膜症の成因に関する基礎的研究 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32回日本エンドメトリオーシス学会（東京都都市センターホテル、2012年1月22-23日）
- (7) Abe Y., Takakura K., Kaito K., Ogawa T., **Yokoo M.**, **Abe H.** (2012) Effect of vitrification at GV stage on the mitochondrial and cytoskeletal integrity in bovine oocytes. The 38th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. Arizona (USA). 2012.
- (8) 珠玖仁（2011）マウス胚様体の遺伝子発現と代謝活性の階層的評価. 第21回日本MRS学術シンポジウム（横浜市、2011年12月19日）
- (9) 熊迫陽子、小池恵、後藤香里、宇津宮隆史、荒木康久、**阿部宏之**（2011）凍結施行前と融解後における胚盤胞の形態および呼吸量の比較検討、第56回日本生殖医学会学術講演会・総会（横浜市、パシフィコ横浜会議センター、2011年12月8-9日）
- (10) **吉野修**、大須賀穰、佐渡島陽子、土屋裕子、西井修、武谷雄二（2011）子宮筋腫核出術は子宮内膜のT2値を低下させる、第56回日本生殖医学会学術講演会・総会（横浜市、パシフィコ横浜会議センター、2011年12月8-9日）
- (11) **浜谷敏生**（2011）シンポジウム：卵巣機能異常に起因する不妊治療の最前線：マウス卵の加齢メカニズム、第56回日本生殖医学会学術講演会・総会（横浜市、パシフィコ横浜会議センター、2011年12月8-9日）
- (12) 原田美由紀、櫻橋彩子、**藤本晃久**、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二（2011）早期発症型卵巣過剰刺激症候群に対するcabergoline（カバサル）の使用経験、第56回日本生殖医学会学術講演会・総会（横浜市、パシフィコ横浜会議センター、2011年12月8-9日）
- (13) Shiku H., Saito G., Zhou Y., Horiguchi Y., Takano R., Ino K., **Matsue T.** (2011) mRNA analysis of multicellular spheroid with a scanning probe microscopy system, Proceeding of The 7th International Forum On Post-Genome Technologies and China-Japan-Korea Joint Symposium on Natural Products" (7thIFPT-CJK), pp. 343-344. Chongqing, China, October 28-29, 2011.
- (14) **Abe H.** (2011) Oocyte and embryo selection based on oxygen consumption. Individualized controlled ovarian stimulation and objective gamete and embryo selection. Sero Symposia International, (Yokohama, Japan, December 7, 2011)
- (15) Yamanaka M., Hashimoto S., Amo A., Ito-Sasaki T., **Abe H.**, Morimoto Y. (2011)

Prediction for developmental competence of human blastocyst based on its oxygen consumption. The 66th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (Orland, USA, October 15-19, 2011)

- (16) Yamada M., Hamatani T., Akutsu H., Kuji N., Aoki D., Yoshimura Y. (2011) Identification of a novel gene encoding a high mobility group box protein and its specific expression and essential role during preimplantation development. The 67th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), (Orland, USA, October 15-19, 2011)
- (17) Hamatani T. (2011) Metabolomic analysis of culture media by CE-TOF/MS suggests a medium-chain fatty acid as an alternative energy source of mouse preimplantation embryos. The 2nd international symposium of CHA fertility Center on reproductive science, Seoul, Korea, 2011, 10.
- (18) 藤本麻葉、原田美由紀、平池修、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 (2011) 卵巣成熟嚢胞性奇形腫の再発に関する検討、第122回関東連合産科婦人科学会 (横浜市・パシフィコ横浜、2011年10月30日)
- (19) 鮫島大輝、中江華子、平池修、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 (2011) 当科における過去10年間の子宮筋腫核出後の妊娠・再発についての検討、第122回関東連合産科婦人科学会 (横浜市・パシフィコ横浜、2011年10月30日)
- (20) 斎藤泉、平池修、保谷茉里、甲賀かをり、藤本晃久、大須賀穰、久具宏司、矢野哲、武谷雄二 (2011) 子宮動脈近傍の広間膜後葉に着床していたと考えられた腹膜妊娠の一例、第122回関東連合産科婦人科学会 (横浜市・パシフィコ横浜、2011年10月30日)
- (21) Shiku H., Ino K., Matsue T. (2011) Electrical cell lysis technique to collect mRNA from single-cells, the 220th ECS Meeting & Electrochemical Energy Summit in Boston, Massachusetts, October 9-14, 2011.
- (22) 黒谷玲子、佐々木昭美、小川拓、阿部宏之 (2011) マウス肺発生におけるシトクロムc酸化酵素 (Cox) の発現、第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (金沢市、金沢大学宝町キャンパス、2011年9月24-25日)
- (23) 小笹清香、熊木伸枝、佐々木昭美、小川拓、阿部宏之、柴田陽光、黒谷玲子 (2011) 喫煙マウス肺におけるサーファクタントとシトクロムc酸化酵素 (Cox) の発現、第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (金沢市、金沢大学宝町キャンパス、2011年9月24-25日)
- (24) 高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2011) 電気化学計測技術を応用した単一培養細胞の呼吸能解析、日本機械学会東北支部第47期秋期講演会 (米沢市、山形大学工学部、2011年9月22日)
- (25) 海藤康平、高倉啓、阿部靖之、阿部宏之 (2011) 走査型電気化学顕微鏡を用いた単一ウシ胚のリアルタイム呼吸能解析、日本機械学会東北支部第47期秋期講演会 (米沢市、山形大学工学部、2011年9月22日)
- (26) 栢本亮太、長畑仁美、大江将司、阿部靖之、

- 黒谷玲子、阿部宏之 (2011) リアルタイム培養細胞観察システムを用いたマウス胚発生タイムラプス解析、日本機械学会東北支部第47期秋期講演会 (米沢市、山形大学工学部、2011年9月22日)
- (27) 阿部宏之、長畑仁美、栢本亮太、大江将司、黒谷玲子 (2011) リアルタイム培養細胞観察システムを用いたマウス胚発生タイムラプス解析、日本動物学会第82回大会 (旭川市、旭川大雪クリスタルホール、2011年9月21-23日)
- (28) 坂上信忠、山本禎、西田浩司、秋山清、藤谷明倫、阿部宏之、星宏良、鈴木千恵、吉岡耕治 (2011) ブタ体外受精胚の耐凍性に対する発生ステージ、日齢および後期胚培養培地の影響、第104回日本繁殖生物学会大会 (盛岡市、いわて県民情報交流センター、2011年9月16-17日)
- (29) 阿部宏之、小川拓、渡邊剛広、黒谷玲子 (2011) マウス初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能の多項目解析、第104回日本繁殖生物学会大会 (盛岡市、いわて県民情報交流センター、2011年9月16-17日)
- (30) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2011) 凍結施行前と融解後における胚盤胞の呼吸量変化の比較検討、第29回日本受精着床学会総会学術講演会 (東京都、京王プラザホテル、2011年9月9-10日)
- (31) Shiku H., Suzuki J., Ino K., Matsue T. (2011) Electrochemical gene expression analysis on single-cell array devices. ISE Conference Management of the 62nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Niigata, Toki-Messe, September 15, 2011.
- (32) 吉野修、浅田弘法、折坂誠、大須賀穰、土屋裕子、佐渡島陽子、古谷正敬、小辻文和、吉村泰典、西井 修、武谷雄二 (2011) 筋層内子宮筋腫 (intramural myoma:IM) 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63回日本産婦人科学会総会 (大阪市、リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場、2011年8月29-31日)
- (33) 原田美由紀、大須賀穰、泉玄太郎、高村将司、竹村由里、平田哲也、吉野修、甲賀かをり、矢野 哲、武谷雄二 (2011) 直腸・膀胱子宮内膜症治療におけるジエノゲストの有用性の検討、第63回日本産婦人科学会総会 (大阪市、リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場、2011年8月29-31日)
- (34) 福永朝子、浜谷敏生、山田満稔、阿部宏之、阿久津英憲、井上治、小川誠司、菅原かな、奥村典子、久慈直昭、青木大輔、吉村泰典 (2011) マウス卵子の排卵後加齢における遺伝子発現と酸素消費量との関連、第63回日本産婦人科学会総会 (大阪市、リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場、2011年8月29-31日)
- (35) 泉玄太郎、甲賀かをり、大須賀穰、永井美和子、浦田陽子、高村将司、斎藤亜子、竹村由里、原田美由紀、吉野修、矢野 哲、武谷雄二 (2011) 周期的伸展刺激が子宮内膜間質細胞に与える影響、第63回日本産婦人科学会総会 (大阪市、リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場、2011年8月29-31日)
- (36) 高村将司、大須賀穰、泉玄太郎、斎藤亜子、長谷川亜希子、竹村由里、原田美由紀、平田哲也、吉野修、甲賀かをり、

- 武谷雄二 (2011) 子宮内膜症進展における IL-17, GRO(Growth Related Oncogene) α を介した vicious cycle の形成、第63回日本産婦人科学会総会 (大阪市、リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場、2011年8月29-31日)
- (37) 中江華子、廣井久彦、藤本晃久、大須賀穰、百枝幹雄、藤井知行、矢野哲、上妻志郎、武谷雄二 (2011) 当院における筋腫分娩症例の臨床検討、第63回日本産婦人科学会総会 (大阪市、リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場、2011年8月29-31日)
- (38) 藤本麻葉、原田美由紀、平池修、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 (2011) 卵巣成熟嚢胞性奇形腫の再発に関する検討、第63回日本産婦人科学会総会 (大阪市、リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場、2011年8月29-31日)
- (39) 中江華子、藤本晃久、長坂貴顕、原田美由紀、甲賀かをり、平池修、矢野哲、武谷雄二 (2011) SILSポートをを用いた単孔式腹腔鏡下手術は術後疼痛を軽減できる、第51回日本産科婦人科内視鏡学会 (大阪市、リーガロイヤルホテル、2011年8月4-6日)
- (40) 平池修、藤本晃久、斎藤泉、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 (2011) 腹腔鏡下子宮摘出をした非産褥期子宮内反の一例、第51回日本産科婦人科内視鏡学会 (大阪市、リーガロイヤルホテル、2011年8月4-6日)
- (41) 渡邊剛広、黒谷玲子、阿部宏之 (2011) マウス胚におけるミトコンドリア呼吸機能の多項目解析の試み、平成23年度東北支部大会 (弘前市、弘前大学農学生命科学部、2011年7月30日)
- (42) 黒谷玲子、木村芝生子、阿部宏之 (2011) SCGB3A2はTGF β シグナルの制御によってブレオマイシン誘導性肺線維症を抑制する、日本動物学会平成23年度東北支部大会 (弘前市、弘前大学農学生命科学部、2011年7月30日)
- (43) 阿部宏之、高倉啓、黒谷玲子 (2011) 電気化学計測法を応用した単一培養細胞の呼吸能解析の試み、日本動物学会平成23年度東北支部大会 (弘前市、弘前大学農学生命科学部、2011年7月30日)
- (44) Fujimoto A., Osuga Y., Ichinose M., Oishi H., Harada M., Koizumi M., Takemura Y., Yano T., Taketani Y. (2011) Endometrial thickness is associated with outcome of ART after hormonal therapy for atypical endometrial hyperplasia or endometrial carcinoma. The 27th ESHRE Annual Meeting 2011.7.1-4 Stockholm, Sweden.
- (45) Inoue O., Kuji N., Fukunaga T., Ogawa S., Sugawara K., Yamada M., Hamatani T., Hanabusa H., Yoshimura Y., Kato S. (2011) Processing of semen from an HIV-1-positive male and its use in the IVF-ICSI procedure clinical efficacy. The 27th Annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Stockholm, Sweden, 2011, 7.1-4.
- (46) 板岡奈央、原田美由紀、平池修、藤本晃久、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二 (2011) 腹腔鏡下子宮全摘術後に腔断端離開を起こした一例、第122回関東連合産科婦人科学会 (東京都、2011年6月12日)