

# 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と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。今年度は、受精卵呼吸測定装置で品質評価した胚の発生能力に着目し、呼吸活性と胚発育との関係について調査した。その結果、呼吸活性の高い胚盤胞は、胎盤形成に関与する栄養外胚葉細胞の増殖が良好であり、高い着床能力を有している可能性が示唆された。我々は、これまでに呼吸活性を指標に胚を選別することで胚移植後の受胎成績を向上させることを示しており、さらに、電気化学的呼吸量測定技術による胚の選別が、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を明らかにしている。以上の研究成果から、我々が開発した電気化学的な胚の選別技術は、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と結論付けられる。

#### 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、平成21年度の研究では、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を明らかにし、平成22年度の研究では電気化学的呼吸量測定技術による胚の選別が、胚のその後の成長や産子の表現型に悪影響を及

ぼさないことを明らかにした。そこで、今年度は、受精卵呼吸測定装置で品質評価した胚の発生能力に着目し、呼吸活性と胚発育との関係について調査することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 胚の回収

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、膣栓の有無を確認した。膣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M2培地で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、 $-0.6\text{V vs Ag/AgCl}_2$  の電位を印加した微小白金電極 (先端直径:  $2\text{--}3\ \mu\text{m}$ ) 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、球面拡散理論式に基づいて胚の酸素消費量 (呼吸活性) を算出した。

## 胚培養試験

呼吸活性と胚発生能力の相関について検討する目的で、胚培養試験を実施した。呼吸測定後の胚盤胞をM16培地で24時間培養した。培養後の胚盤胞は形態的観察に加えて、Hoechst/PI染色法によって内部細胞塊と栄養外胚葉細胞に分染し、胚の品質を評価した。

## trophoblast outgrowth 試験

呼吸活性と胚の着床能を評価する目的で、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。

## C. 研究結果および考察

胚培養試験では、呼吸活性の高い胚盤胞は培養後の胚発育が良好で、胚盤胞を構成する総細胞数も多い傾向が観察された ( $r=0.557$ ,  $n=31$ ,  $p=0.001$ )。また、呼吸活性と培養後の胚盤胞の内部細胞塊もしくは栄養外胚葉細胞の数との

相関関係について解析したところ、内部細胞塊数との相関は低い ( $r=0.273$ ,  $n=31$ ,  $p=0.138$ ) もの、栄養外胚葉細胞数とは有意な相関性が認められた ( $r=0.551$ ,  $n=31$ ,  $p=0.001$ )。したがって、呼吸活性の高い胚盤胞はその後の胚発育が良好であり、特に、胚の着床に関する栄養外胚葉細胞の増殖が顕著であることが確認された。

次に、trophoblast outgrowth 試験を実施し、胚の呼吸活性と着床能との関係を評価した。観察した全ての胚において、培養24時間~72時間に培養ディッシュへの接着が観察されたが、呼吸活性の低い胚では接着が遅延する傾向が観察された。また、胚の呼吸活性と培養4日後における outgrowth した面積を比較したところ、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。平成21年度に実施した胚移植試験の基準 (呼吸活性  $0.70 \times 10^{-14}\text{mol/s}$ ) で分けて比較したところ、 $0.70 \times 10^{-14}\text{mol/s}$  以上の胚は、 $0.70 \times 10^{-14}\text{mol/s}$  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。

## D. 結論

本研究の結果から、呼吸活性の高い胚盤胞は、その後の胚発育において、細胞増殖、特に胎盤形成に関与する栄養外胚葉細胞の細胞増殖性が高く、高い着床能力を有していることが示唆された。平成21年度の研究において、呼吸活性の高い胚を移植することで、妊娠率、産子率がともに向上することを示したが、今年度の結果はその研究成果を裏付ける結果となった。つまり、受精卵呼吸測定装置による胚の選別は、着床能力の高い胚を選別することであり、その結果として、胚移植後の受胎成績の向上が期待できる。平成22年度の研究において、電気化学的呼吸量測定技術による胚の選別が、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を明らかにしていることから考える

と、我々が開発した電気化学的な胚の選別技術は、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と結論付けられる。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ことから考えて、本研究で得られたマウスにおける研究成果をヒトへ外挿できる可能性は高いと考えられる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Sho Sato, Toshikiyo Takahashi, Hiroshi Nishinomiya, Makiko Katoh, Ryu Itoh, Masaki Yokoo, Mari Yokoo, Momoe Iha, Yuki Mori, Kano Kasuga, Ikuo Kojima and Masayuki Kobayashi. A common nucleotide sequence of structural gene encoding fibroblast growth factor 4 in eight cattle derived from three breeds. *Animal Science Journal* 2012, 83, 260-262.

(2) Masaki Yokoo, Eimei Sato. Physiological function of hyaluronan in mammalian oocyte maturation. *Reproductive Medicine and Biology* 2011, 10: 221-229.

(3) 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). 京都大学学術出版会, 2011, 388-397.

(4) Yasumoto Date, Shinichiro Takano, Hitoshi Shiku, Kosuke Ino, Takahiro Ito-Sakaki, Masaki Yokoo, Hiroyuki Abe, Tomokazu Matsue. Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 30:

100-106.

### 2. 学会発表

(1) Yasuyuki Abe, Kei Takakura, Kouhei Kaito, Taku Ogawa, Masaki Yokoo, Hiroyuki Abe. 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.

(2) 阿部 靖之, 高倉 啓, 海藤 康平, 小川 拓, 横尾 正樹, 阿部 宏之. ウシGV期卵子におけるガラス化保存が細胞骨格へ与える影響. 第52回日本哺乳動物卵子学会, 国際医療福祉大学(栃木), 2011.

## 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	卵子・胚のクオリティー評価	森崇英	卵子学 (Oocytology)	京都大学学術出版会	京都	2011	614-623
珠玖 仁、 末永智一、	電気化学ナノイメー ジング	民谷栄一	ナノ融合による 先進バイオデ バイス	シーエムシー 出版	東京	2011	PP.156-162
菅原かな、 浜谷敏生	第2章 (9) 卵巣の老 化.	石塚文平、 鈴木秋悦	生殖卵巣学— 基礎知識と臨 床の進展	医歯薬出版	東京	2011	236-243
横尾正樹、 佐藤英明.	卵胞発育と成熟の 局所調節因子	森崇英	卵子学 (Oocytology)	京都大学学術出版会	京都	2011	388-397

### 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
Yamanaka M., Hashimoto S., Amo A., Ito-Sasaki T., <b>Abe H.</b> , Morimoto Y.	Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption	<i>Human Reproduction</i>	26	3366-3371	2011
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., <b>Abe H.</b> , Ward J.M., Kimura S.	Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation	<i>Journal of Biological Chemistry</i>	286	19682-19692	2011
Hirobe T., Yoshihara C., Takeuchi S., Wakamatsu K., Ito S., <b>Abe H.</b> , Kawa Y., Soma Y.	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	<i>Zoological Science</i>	28	790-801	2011
阿部宏之、吉田仁秋	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	60	2013-2019	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉田仁秋、田中孝幸、 <u>阿部宏之</u>	体外培養卵子の評価—臨床応用	<i>産科と婦人科</i>	78	974-979	2011
<u>阿部宏之</u>	走査型電気化学顕微鏡を用いた 胚の評価法	<i>産科と婦人科</i>	78	967-972	2011
山中昌哉、橋本周、 天羽杏実、 伊藤-佐々木隆広、 <u>阿部宏之</u> 、森本義晴	ヒト凍結融解胚盤胞の呼吸量測 定	<i>産婦人科の実 際</i>	60	923-927	2011
Nagamine K., Takahashi Y., Ino K., Shiku H., <u>Matsue T.</u>	Influence of tip size on single yeast cell imaging with scanning electrochemical microscopy	<i>Electroanalysis,</i>	23	1168-1174	2011
Takahashi Y., Shevchuk A. Zhang I., Novak P., Y., Neil E., Macpherson J. V., Unwin P. R., Pollard A. Roy D., Clifford C. A., Shiku H., <u>Matsue T.</u> , Klenerman D., and Korchev Y. E.,	Multifunctional nanoprobe for nanoscale chemical imaging and localized chemical delivery at surfaces and interfaces.	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i>	50	9638-9642	2011
Ino K., Saito W., K oide M., Umemura T., S hiku H., <u>Matsue T.</u>	Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection.	<i>Lab Chip</i>	11	385-388	2011
Date Y., Takano S., Shiku H., Ino K., Ito-Sasaki, T. Yokoo M., <u>Abe H.</u> , <u>Matsue T.</u>	Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice.	<i>Biosens. Bioelect ron.</i>	30	100-106	2011
Takeda M., Shiku H., Ino K., <u>Matsue T.</u>	Electrochemical chip inte grating scalable ring-ring electro de array to detect secreted alkaline phosphatase	<i>Analyst</i>	136 (23)	4991-4996	2011
Takahashi Y., Miyamoto T., Shiku H., Ino K., Yasukawa T., Asano R., Kumagai I., <u>Matsue T.</u>	Electrochemical Detection of Receptor-Mediated Endocytosis by Scanning Electrochemical Microscopy.	<i>Phys. Chem. Chem. Phys.</i>	13	16569-16573	2011
Zhu X., Ino K., Lin Z., Shiku H., Chen G., <u>Matsue T.</u>	Amperometric detection of DNA Hybridization using a multi-point, addressable electrochemical device.	<i>Sens. Actuat B</i>	160 (1)	923-928	2011



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shi J, <b>Yoshino O</b> , Osuga Y, Akiyama I, Harada M, Koga K, Fujimoto A, Yano T, Taketani Y.	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.	<i>Fertil Steril</i>	97	979-983	2012
Osuga Y, Hirota Y, <b>Yoshino O</b> , Hirata T, Koga K, Taketani Y.	Proteinase-activated receptors in the endometrium and endometriosis.	<i>Front Biosci</i>	1	755-767	2012
<b>Yoshino O</b> , Nishii O, Osuga Y, Asada H, Okuda S, Orisaka M, Hori M, Fujiwara T, Hayashi T.	Myomectomy decreases abnormal uterine peristalsis and increases pregnancy rate.	<i>J Minim Invasive Gynecol.</i>	19	63-67	2012
Wang B, Koga K, Osuga Y, Cardenas I, Izumi G, Takamura M, Hirata T, <b>Yoshino O</b> , Hirota Y, Harada M, Mor G, Taketani Y.	Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts.	<i>Endocrinology</i>	152	4984-4992	2011
<b>Yoshino O</b> , Izumi G, Shi J, Osuga Y, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Nishii O, Koga K, Taketani Y.	Activin-A is induced by interleukin-1 $\beta$ and tumor necrosis factor- $\alpha$ and enhances the mRNA expression of interleukin-6 and protease-activated receptor-2 and proliferation of stromal cells from endometrioma.	<i>Fertil Steril</i>	96	118-121	2011
Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Saito A, Hasegawa A, Koga K, <b>Yoshino O</b> , Hirota Y, Harada M, Taketani Y.	Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis.	<i>Fertil Steril</i>	96	113-117	2011
Saito A, Osuga Y, <b>Yoshino O</b> , Takamura M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Harada M, Takamura Y, Yano T, Taketani Y.	TGF- $\beta$ 1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6.	<i>Hum Reprod.</i>	26	1892-1898	2011
<b>Yoshino O</b> , Hori M, Osuga Y, Hayashi T, Sadoshima Y, Tsuchiya H, Nishii O, Taketani Y.	Myomectomy reduces endometrial T2 relaxation times	<i>Fertil Steril</i>	95	2781-2783	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wang B, Koga K, Osuga Y, Hirata T, Saito A, <b>Yoshino O</b> , 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.	<i>Am J Reprod Immunol.</i>	66	143-148	2011
Harada M, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Takemura Y, Hirata T, <b>Yoshino O</b> , Koga K, Yano T, Taketani Y.	Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study.	<i>Gynecol Endocrinol.</i>	27	717-720	2011
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	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	60	1523-1528	2011
Isono W, Wada-Hiraike O, Shirane A, <b>Fujimoto A</b> , Osuga Y, Yano T, Taketani Y	Alternative strategies to in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment for aged infertile women	<i>Reproductive Medicine and Biology</i>	11	69-72	2012
Tsutsumi R, <b>Fujimoto A</b> , Osuga Y, Harada M, Takemura Y, Koizumi M, Yano T, Taketani Y.	Successful pregnancy following low-dose hCG administration in addition to hMG in a patient with hypothalamic amenorrhea due to weight loss	<i>Gynecol Endocrinol</i>			In press
<b>藤本晃久</b>	子宮筋腫合併不妊を妊娠に導くには	産科と婦人科	79	295-299	2012
小泉美奈子、廣井久彦、大須賀穰、 <b>藤本晃久</b> 、甲賀かを莉、平池修、百枝幹雄、矢野哲、武谷雄二	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	296-299	2011
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、 <b>藤本晃久</b> 、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二。	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誌	60	106-110	2011
<b>Hamatani T</b>	Human Spermatozoal RNA	<i>Fertil Steril</i>	97(2)	275-281	2012
久慈直昭, (8名省略), <b>浜谷敏生</b> , 吉村泰典.	【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	2011



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
久慈直昭,(6名省略), 浜谷敏生, 吉村泰典.	【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増刊	495-500	2011
清水聖子, 浜谷敏生, (4名省略).	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	2011
Sato S., Takahashi T., Nishinomiya H., Katoh M., Itoh R., <b>Yokoo M.</b> , Yokoo M., Iha M., Mori Y., Kasuga K., Kojima I. and Kobayashi M.	Common nucleotide sequence of structural gene encoding fibroblast growth factor 4 in eight cattle derived from three breeds.	<i>Animal Science Journal</i>	83	260-262	2012
<b>Yokoo M.</b> , Sato E.	Physiological function of hyaluronan in mammalian oocyte maturation.	<i>Reproductive Medicine and Biology</i>	10	221-229	2011

## IV 研究成果の刊行物・別刷

## 卵・胚のクオリティー評価



Key words

体外受精／胚移植／細胞呼吸／ミトコンドリア／電気化学計測

## はじめに

体外受精・胚移植 (IVF-ET, in vitro fertilization-embryo transfer) は、家畜繁殖領域においては受精卵移植による優良牛生産システムの基盤技術であり、生殖補助医療 (ART, assisted reproductive technology) では最も有効な不妊治療法の一つになっている。一般に、IVF-ETにおいては、卵巣から多数の卵子を採取した後、媒精し、得られた複数の胚の中から移植する胚を選択する。IVF-ETでは移植に供する胚の質 (クオリティー) を判定し良好胚を選択することは、着床率および妊娠率の向上だけでなく、治療の成功が最も期待できる胚の一つだけ選択し移植することが可能となり、不妊治療において大きな問題となっている多胎妊娠を防ぐことにも役立つ。このように、精度の高い卵子・胚のクオリティー評価法の確立は、胚移植技術の進歩や不妊治療の成功率向上にきわめて重要である。本節では、これまでに開発されている胚および卵子のクオリティー評価法を解説するとともに、最新の計測技術を応用した新しい胚・卵子クオリティー評価と応用を紹介する。

## 1

## 形態観察による胚のクオリティー評価

一般に、胚のクオリティーは実体顕微鏡または倒立顕微鏡を用いた形態観察により、割球の数や形態的特徴を基準に評価されている (Lindner, Wright, 1983; Shea, 1981; Wright, 1981)。たとえば、ウシの桑実胚は割球が集まった細胞塊 (embryo mass) の形態 (コンパクションの程度) やフラグメンテーションなどを基準に四つのカテゴリーに分類される (図Ⅻ-59-1)。胚盤胞は、胞胚腔の状態や胚の拡張度、内部細胞塊 (ICM, inner cell mass) や栄養膜 (trophoblast) の状態を基準に3段階のクオリティーに分類される。さらに、胚の色調、細胞の数と密度、細胞の輪郭や色調など多くの評価基準が加わることもある。

ヒト胚では、割球や胚の形態的特徴を基準とする評価法が最も普及している。ヒトの正常受精卵では、媒精16-18時間後に雄性前核および雌性前核の二つの前核 (2PN)、そして各前核中に核小体 (NPB, nucleolar precursor bodies) が確認できる。前核の大きさ・接合の有無、核小体の数・大きさ・配列、さらに、細胞質の観察をもとに前核期胚のスコアリングを行う (Scott

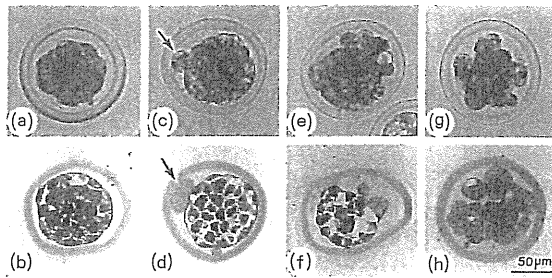


図 59-1. ウシ桑実胚の形態的クオリティー評価 ((a) (c) (e) (g) : ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察, (b) (d) (f) (h) : Semi-thin 切片 (1 μm, トルイジンブルー染色) 像)

細胞塊の形態とフラグメントの数を基準にそれぞれ A ランク ((a) (b) : Excellent), B ランク ((c) (d) : Good), C ランク ((e) (f) : Fair), D ランク ((g) (h) : Poor) の四つのクオリティーに分類される。(Abe et al, 2002a より一部改変)

et al, 2000). 雄性および雌性前核が接し, 核小体が両前核の接合部に整列しており, 不均質な細胞質と明瞭な halo を有する前核期胚を良好胚とする. この方法により, 前核期に移植胚の選別を行った結果, 移植あたりの妊娠率が向上したと報告されている. また, より詳細に核小体の数・大きさ・極性により前核期胚を分類する方法もある (Tesarik, Greco, 1999).

初期分割期胚については, 割球の形態とフラグメンテーションの割合を指標として評価する Veeck の分類 (Veeck, 1991) が最も一般的である. この評価法では, 割球の形態が均等でフラグメンテーションが認められない胚をグレード 1 と表記し, 最も形態良好であると評価している. 割球が不均等になりフラグメンテーションの出現が顕著になるに従いグレードの数値が上がり (グレード 2-グレード 5) 形態不良と判定される.

胚盤胞の評価は, D. K. Gardner らの方法

(Gardner, Schoolcraft, 1999) が最も普及している. 胚腔の広がりや孵化 (ハッチング) の程度によって 1-6 の 6 段階に分類し, さらに内部細胞塊 (ICM, inner cell mass) と栄養外胚葉 (TE, trophoblast) の細胞数により, それぞれ A, B, C の 3 段階に評価している. Gardner らは, 3 AA (full blastocyst, 密で細胞数が多い ICM, 多くの細胞が密に存在する TE) 以上の評価を得た胚盤胞を 1 個移植した場合の妊娠率は 60% 以上であると報告している.

割球数や胚の形態的特徴を基準とする評価法は簡単・迅速で無侵襲的な方法であることから, 現在, 最も普及している胚のクオリティー評価法である. しかし一方で, 評価の基準となる形態的特徴が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, 評価の精度に影響が出る可能性がある. たとえば, ウシにおいて質的に良好とされるグレード A (Excellent) と B (Good) に分類された桑実胚は移植後の受胎率が 40% と高いが, 形態不良とされるグレード C (Fair) と D (Poor) の胚でも受胎率が 20% 前後であることから (Lindner, Wright, 1983), クオリティー評価の精度に課題が残されている.

## 2 胚のクオリティーと超微細形態

正常に受精した胚では, 発生の進行に伴いダイナミックな微細形態変化が起こる. ウシでは, 胚のクオリティーに関連するいくつかの微細形態変化が報告されており, 電子顕微鏡を用いた超微細形態観察は胚のクオリティーを検証する有効な手段となっている (Albihn et al, 1990; Abe et al, 1999a; 1999b; Aguilar et al, 2002). 光学顕微

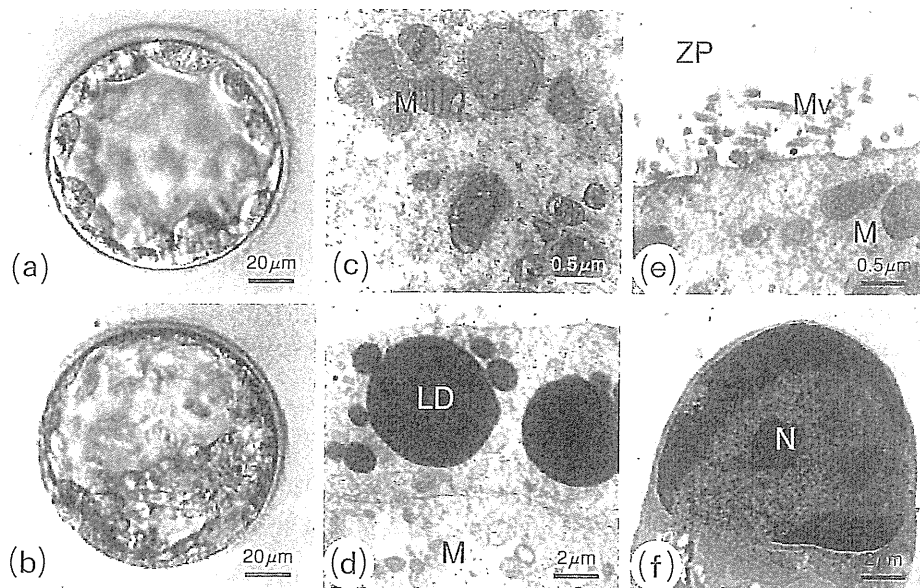


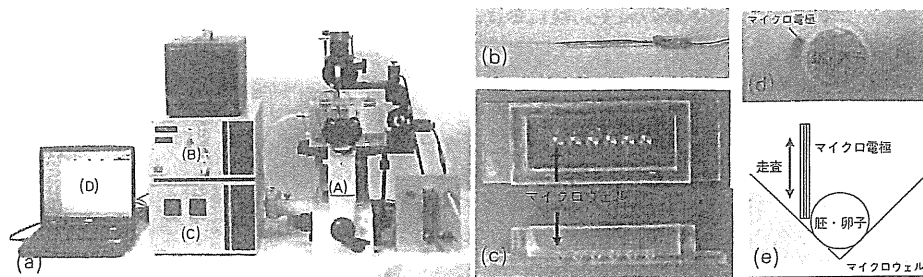
図 59-2. ヒト体外受精胚の光学顕微鏡像 ((a) (d): ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察) および電子顕微鏡像 ((b) (c) (e) (f))

Gardner 分類法によるクオリティー良好胚 ((a)-(c)) と不良胚 ((d)-(f)). (c) (d): クオリティー良好胚では発達した微絨毛 (Mv) とミトコンドリア (M) が観察される. ZP: 透明帯. (e) (f): クオリティー不良胚では高電子密度で大型の脂肪滴 (LD) と凝縮した核 (N) が特徴のアボトーシス像が認められる.

鏡観察により形態的に良好と判定されたウシ胚では、桑実胚および胚盤胞のステージにおいてギャップ結合やデスモゾーム (desmosome) などの細胞接着装置がよく発達しているが、形態不良胚ではデスモゾームは未発達 (pre-desmosome) である (Albihn et al, 1990). 細胞接着装置は割球間のコミュニケーションや胚の形態維持に関与しており、これが未発達であると耐凍能にも影響すると考えられている (Mohr, Trounson, 1981). また、質的に良好な胚盤胞では栄養膜細胞の表面から数多くの微絨毛が伸びているが、不良胚では微絨毛は未発達であることから、胚のクオリティーによって外界からの物質吸収能にも違いがあると考えられる。核小体の微細形態にも違いが認められている。核小

体は、核内にあってリボゾーム RNA (rRNA) 転写を行っており、その転写活性は核小体の微細形態によって把握できる (Kopecny et al, 1989; Kopecny, Niemann, 1993). 正常に発生したウシ胚では、桑実胚期において最も rRNA 転写活性の高いステージ 4 の核小体が観察されるが、不良胚では rRNA 転写活性の低いステージ 3 の核小体が多く観察されている (Abe et al, 2002a). これは、クオリティー不良胚では rRNA の発現活性が低いことを示している。また、クオリティー良好胚では桑実胚期から胚盤胞期にかけてミトコンドリアが顕著に発達するが、クオリティー不良胚ではほとんどのミトコンドリアは未成熟であり、過剰な脂肪滴の蓄積も観察される。このような脂肪滴蓄積は胚の耐凍能に大きく影響





図Ⅻ-59-3.

(a) 走査型電気化学顕微鏡を改良した「受精卵呼吸測定装置」。A：倒立型顕微鏡，B：ポテンシオスタット，C：コントローラー，D：ノートパソコン（呼吸能解析ソフトを内蔵）。(b) 呼吸測定用マイクロ電極：ディスク型白金マイクロ電極で，先端部が直径2～4 μmにエッチング加工された白金電極がガラスキャピラリーに熱封止されている。(c) 多検体測定プレート：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。(d) マイクロウェル底部に静置したウシ胚。(e) マイクロ電極は胚近傍を鉛直方向に走査することで，胚の酸素消費量を測定する。

し，胚のクオリティー低下の一因となっている (Nagashima et al, 1994; Abe et al, 2002b).

最近，ヒト胚のクオリティーと超微細形態との興味深い関係が明らかになっている。Gardnerらの方法で3BB以上を良好胚，それ以下を不良胚に分類しそれぞれの微細構造を観察した結果，クオリティー良好胚ではミトコンドリアや微絨毛は正常に発達しているが，クオリティー不良胚ではミトコンドリアの多くは未発達であり，細胞内には多くの脂肪滴やアポトーシス像が観察される (図Ⅻ-59-2)。これらの知見から，ミトコンドリアはヒト胚のクオリティーに大きく影響していると考えられる。

### 3 呼吸能解析による胚のクオリティー評価

これまでに述べた形態的クオリティー評価法は，評価の基準となる形態的特徴が定量性に欠けるため，評価の精度に影響が出る可能性がある。そこでより客観的・定量的な指標を基準に

クオリティーを評価する方法が試みられている。たとえば，胚によるグルコース，ピルビン酸，アミノ酸等の栄養素の消費に着目し，胚の代謝活性を定量化する方法がある (Overstrom, 1996; Rieger et al, 1992; Rieger, 1992; Rieger, Loskut-off, 1994; Gopichandran, 1994)。また，細胞の呼吸 (酸素消費) を指標に胚のクオリティーを評価する方法も行われている (Thompson et al, 1996; 2000; Trimarchi et al, 2000)。ミトコンドリアは酸化リン酸化反応 (呼吸) により細胞活動に必要なエネルギー (ATP) を産生し，卵子や胚の代謝活動にも深く関与していることから，ミトコンドリア呼吸は卵子・胚のクオリティー評価の有効な指標になると考えられている。

ミトコンドリアの呼吸機能に異常が生じると代謝異常や種々の疾患の原因となることから，これまでにいくつかの細胞呼吸計測技術が開発されてきた。代表的なものとして，蛍光発色法 (Nilsson et al, 1982; Magnusson et al, 1986; Houghton et al, 2000) や酸素センサー (Land et al, 1999;

表Ⅲ-59-1. マウス, ウシおよびヒト胚の発生過程における酸素消費量 (呼吸量:  $F \times 10^4 / \text{mol s}^{-1}$ ) 変化

胚発生ステージ	ウシ <sup>1</sup>	マウス <sup>2</sup>	ヒト <sup>3</sup>
2-8細胞	0.45±0.02 <sup>a</sup>	0.34±0.03 <sup>a</sup>	0.51±0.05 <sup>a</sup>
桑実胚	1.03±0.05 <sup>b</sup>	0.58±0.03 <sup>b</sup>	0.61±0.11 <sup>ab</sup>
初期胚盤胞	1.11±0.07 <sup>b</sup>	0.71±0.01 <sup>bc</sup>	0.72±0.06 <sup>b</sup>
胚盤胞	1.86±0.07 <sup>c</sup>	0.75±0.09 <sup>c</sup>	1.00±0.19 <sup>c</sup>

各動物種において, 異符号間で有意差あり ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>ウシ胚: 体外受精後, 無血清培地 IVD101 (機能性ペプチド研究所) を用いて培養した胚.

<sup>2</sup>マウス胚: 過排卵処理し雄マウスと交尾させた後, 卵管または子宮から回収した胚.

<sup>3</sup>ヒト胚: 体外受精後, 3日までは Sydney IVF Cleavage Medium (Cook 社), それ以降 Sydney IVF Blastocyst medium (Cook 社) で培養した胚.

Smith et al, 1999; Lopes et al, 2005) を用いた細胞呼吸測定法が考案されている. しかし, その多くは測定感度や侵襲性などの面で課題があり, 胚のクオリティー評価において実用化されていない. 初期胚や卵子ではミトコンドリアは十分に機能していないため, その呼吸活性は非常に低いと考えられる. また, 移植に供する胚や卵子のクオリティー評価において実用化するためには非侵襲計測であることが絶対条件である. したがって, 非侵襲・超高感度・迅速計測という条件をクリアした技術でなければ, 今後開発が望まれている精度の高い卵子・胚クオリティー評価法として実用化することは難しい.

これらの条件を満たす計測技術として, 高感度・非侵襲的に細胞の酸素消費量 (呼吸) を測定できる電気化学計測技術が注目されている. 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する技術であり, 細胞活動のような複雑な生命現象を解明する有効な手段となる (Bard et al, 1989). たとえば, 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, scanning

electrochemical microscopy) は, 細胞や胚の酸素消費量は無侵襲的に測定することができる (Shiku et al, 2001). これまでに, SECM をベースとする「受精卵呼吸測定装置」が開発されている (Abe et al, 2004; Aoyagi et al, 2006). この測定システムは, 倒立型顕微鏡, マイクロ電極の電位を一定に保持するポテンシostat, マイクロ電極の移動を制御するコントローラー, 呼吸解析ソフトを内蔵したノート型コンピューターにより構成されている (図Ⅲ-59-3 (a)). 受精卵の呼吸測定には, 白金電極をガラスキャピラリーの先端部に熱封止したディスク型マイクロ電極 (図Ⅲ-59-3 (b)) を使用する. 胚または卵子を測定液で満たしたマイクロウェルの底部中心に静置した後 (図Ⅲ-59-3 (c), (d)), コンピューター制御によりマイクロ電極を透明帯近傍の鉛直方向に走査し, 胚の酸素消費量を算出する (図Ⅲ-59-3 (e)). この測定システムは, マイクロ電極の感度向上, 非侵襲で迅速な計測を可能とする呼吸測定液と多検体測定プレートなど, 呼吸測定に関連する要素技術がシステム化されている.

これまでに「受精卵呼吸測定装置」を用いて,



表Ⅲ-59-2. ウシ胚の呼吸量と妊娠率の関係 (Moriyasu et al, 2007)

移植時の発生ステージ	酸素消費量 ( $F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ )	受胎胚数/移植胚数 (妊娠率%)
胚盤胞	$F \geq 1.0$	21/36 (58.3)
	$F < 1.0$	0/6 (0)
初期胚盤胞	$F \geq 0.8$	16/25 (64.0)
	$F < 0.8$	0/6 (0)
桑実胚	$F \geq 0.5$	17/28 (60.7)
	$F < 0.5$	1/12 (8.3)

ウシ, ブタ, マウス, ヒトの単一胚の呼吸量が測定されている (Abe, 2007). ウシ胚では受精直後から8細胞期までの発生初期では呼吸量は低いが, 桑実胚から胚盤胞にかけて顕著に増加する. 同様に, マウスとヒトにおいても発生の進行に伴う呼吸量の増加が確認されている (表Ⅲ-59-1). 呼吸測定の有効性を検証するためにミトコンドリアの微細形態変化を調べた結果, ミトコンドリアの発達と呼吸量増加の時期が一致することが明らかになっている. このように「受精卵呼吸測定装置」は, 超高感度・非侵襲的にミトコンドリア呼吸活性を解析できる画期的システムとなっている.

呼吸能を指標とする胚クオリティー評価法を確立するための研究を進める中で, 胚の呼吸能とクオリティーに関して興味深い知見が得られている. ウシでは高い呼吸活性を有する桑実胚は, 呼吸測定後に追加培養を行うと高い確率でクオリティー良好な胚盤胞へと発生する (Abe et al, 2004). また, 凍結時に呼吸活性の高い胚盤胞は, 融解した後の生存率が良好であるという結果が得られている (Shiku et al, 2005). さらに, 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%前後の高い確率で妊娠する (表Ⅲ-59-2). 一方, 基準値以下の呼吸量の胚はほとんど受胎しないことから, 呼吸活性を指標に妊娠が期待できるクオリティー良好胚を効率的に選別することが可能になっている (Abe et al, 2006a). 現在, 呼吸測定の非侵襲性・安全性を検証するために, 呼吸測定した胚の移植によって誕生した個体の正常性を解析している. これまでに, 通常の胚移植産子と比べて奇形発生率や染色体異常の増加は確認されていない. 「受精卵呼吸測定装置」による呼吸測定法は, 胚に対して無侵襲・安全な計測方法であり, クオリティー良好胚の効率的選別に有効であると考えている.

#### 4 卵子の呼吸能とクオリティー

卵子は単一の細胞であるため, 胚のように割球数や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. このため, 卵細胞質の形態 (透明度や顆粒の分布状態など) や卵丘細胞の付着状態を基準にクオリティーが評価されてきた (De Loos et al, 1991; Wurth, Kruip, 1992; Aktas et al, 1995; Boni et al, 2002). 一般に, 卵丘細胞が密に

ほぼ均一に付着している卵子は、卵成熟率が高くクオリティー良好胚へと発生する傾向が高い (Blandin, Sirard, 1995; Hazeleger et al, 1995). 卵子と卵丘細胞の相互作用は、卵子自体のクオリティーに重要な影響を及ぼしており、これには減数分裂抑制作用を示す cAMP (cyclic AMP, 環状 AMP) が関与していると考えられている (Boni et al, 2002). 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子ほどクオリティーが良好であるという報告もある (Nakahara et al, 1999). また、アクチンなどの細胞骨格タンパク質の分布様式や卵細胞膜のカルシウム電位活性が卵子や胚のクオリティーに影響していると報告されている (Wang et al, 1999; Boni et al, 2002).

最近、「受精卵呼吸測定装置」を用いて卵子成熟過程における卵子および卵丘細胞の呼吸量変化が解析されている (Abe et al, 2006b). ウシでは成熟した卵子は未成熟卵子と比べて呼吸量と ATP 含量が増加し、それに伴いミトコンドリアの顕著な細胞内での移動が起こる. 一方、卵丘細胞は卵丘細胞層の膨化に伴い呼吸量が激減する. これらの変化は、卵子の成熟度や成熟培養に用いる培養液の組成 (血清の有無など) によって影響を受ける (Abe et al, 2006c). ブタにおいては、成熟卵子では呼吸活性と ATP 含量が高いレベルで維持されるが、極体の放出が確認されない非成熟卵子では顕著な呼吸量の低下が認められる (Yokoo et al, 2008). このように、卵子の成熟と呼吸能が密接に関係していることから、「受精卵呼吸測定装置」を用いた呼吸能解析は卵子のクオリティー評価の有効な手段になると考えられる.

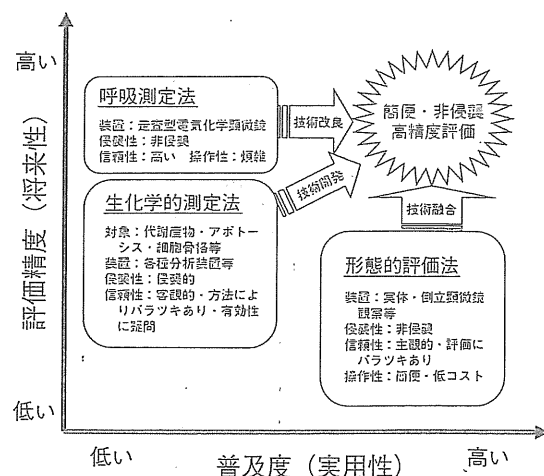


図 59-4. 卵子・胚クオリティー評価の現状と将来像を示した模式図

それぞれの評価法の長所を融合した新しいクオリティー評価法の開発が望まれる.

これまでに述べた評価法以外に、細胞内のミトコンドリア分布や微小管配列、ATP 産生量を指標とする卵子評価法が報告されている (Van Blerkom et al, 2000). また、ユニークな研究として透明帯弾性率を指標に卵子のクオリティーを評価する方法がある (Murayama et al, 2004). これは、触覚技術 (Murayama, Omata, 2004) を応用した超高感度マイクロタクトイルセンサー (MTS, micro tactile sensor) を用いて、透明帯の局所的硬さを評価することによって卵子や胚のクオリティーを評価するという試みである. これまでに、マウスやヒトの卵子および胚の透明帯の硬度を測定した結果、卵子や胚の発生ステージによって透明帯の硬度が変化すること、透明帯の硬度変化が胚のクオリティーとある程度相関することが示唆されている.

## まとめ

本節では、形態観察による胚および卵子のクオリティー評価法と、細胞の呼吸活性を指標とする新しい評価法を中心に解説した。家畜繁殖領域で開発された技術は、不妊治療などARTに応用されるケースが多いことから、本節で紹介した「受精卵呼吸測定装置」はヒトへの応用が十分期待できる。今後、ARTにおいては不妊治療技術の高度化や高齢不妊患者の増加に伴い、移植の対象となる胚もより厳密に評価する必要がある。このため、これまでに開発されているいくつかのクオリティー評価法のメリットを有機的に融合した新しい評価システムの開発が必要になってくる(図Ⅲ-59-4)。たとえば、呼吸測定による卵子・胚クオリティー評価は、形態的評価法との併用が可能であり、これによってより厳密に胚や卵子のクオリティーを評価できると考えている。今後の詳細な研究により細胞呼吸計測法および測定装置の安全性と有用性が確認され、卵子や胚の新しいクオリティー評価システムとして家畜繁殖現場や不妊治療領域において実用化されることを期待している。

(阿部宏之)

## 引用文献

- Abe H, Yamashita S, Itoh T, et al (1999a) Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium, *Mol Reprod Dev*, 53; 325-335.
- Abe H, Otoi T, Tachikawa S, et al (1999b) Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro, *Anat Embryol*, 199; 519-527.
- Abe H, Matsuzaki S, Hoshi H (2002a) Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation, *Theriogenology*, 57; 1273-1283.
- Abe H, Yamashita S, Satoh T, et al (2002b) Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media, *Mol Reprod Dev*, 61; 57-66.
- Abe H, Shiku H, Aoyagi S, et al (2004) In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos, *J Mamm Ova Res*, 21; 22-30.
- Abe H, Shiku H, Yokoo M, et al (2006a) 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.
- Abe H, Saito T, Shiku H, et al (2006b) Analysis of respiratory activity of single bovine oocytes by scanning electrochemical microscopy, *Proceedings of the 4th International Forum on Post-genome Technologies*, pp19-22.
- Abe H, Shiku H, Aoyagi S, et al (2006c) Oxygen consumption of bovine cumulus cells and oocytes cultured in different culture systems for oocyte maturation, *Reprod Fertil Dev*, 18; 267.
- Abe H (2007) 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.
- Aguilar MM, Galina CS, Merchant H, et al (2002) Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos, *Reprod Domest Anim*, 37; 341-346.
- Aktas H, Wheeler MB, First NL, et al (1995) Maintenance of meiotic arrest by increasing camp may have physiological relevance in bovine oocytes, *J Reprod Fertil*, 105; 237-245.
- Albiñ A, Rodríguez-Martínez H, Gustafsson H (1990) Morphology of day 7 bovine demi-embryo during in vitro reorganization, *Acta Anat*, 138; 42-49.
- Aoyagi S, Utsumi Y, Matsudaira M, et al (2006) Quality evaluation of in vitro-produced bovine embryos by respiration measurement and development of semi-automatic instrument, *Bunseki Kagaku*, 55; 847-854.
- Bard AJ, Fan FRF, Kwak J, et al (1989) Scanning electrochemical microscopy - Introduction and principles, *Anal Chem*, 61; 132-138.
- Blandin P, Sirard MA (1995) Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes, *Mol Reprod Dev*, 39; 54-62.
- Boni R, Cuomo A, Tosti E (2002) Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores, *Biol Reprod*, 66; 836-842.
- De Loos F, Kastrop P, van Maurik P, et al (1991) Heterogeneous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus-oocyte complexes, *Mol Reprod Dev*, 28; 255-259.
- Gardner DK, Schoolcraft WB (1999) In vitro culture of human blastocyst, In: *Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond, In vitro culture of human*

- blastocysts*, Jansen R, Mortimer D (eds), pp378-389, Carnforth, Parthenon Press.
- Gopichandran N, Leese HJ (2003) Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid, *Reproduction*, 126; 299-308.
- Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, et al (1995) Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro, *Theriogenology*, 43; 509-522.
- Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, et al (1996) Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo, *Mol Reprod Dev*, 44; 476-485.
- Kopecny V, Flechon JE, Camous S, et al (1989) Nucleogenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: Fine-structural autoradiographic study, *Mol Reprod Dev*, 1; 79-90.
- Kopecny V, Niemann H (1993) Formation of nuclear microarchitecture in the preimplantation bovine embryo at the onset of transcription: Implications for biotechnology, *Theriogenology*, 39; 109-119.
- Land SC, Porterfield DM, Sanger RH, et al (1999) The self-referencing oxygen-selective microelectrode: detection of transmembrane oxygen flux from single cells, *J Exp Biol*, 202; 211-218.
- Lindner GM, Wright RW Jr (1983) Bovine embryo morphology and evaluation, *Theriogenology*, 20; 407-416.
- Lopes AS, Larsen LH, Ramsing N, et al (2005) Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system, *Reproduction*, 130; 669-679.
- Magnusson C, Hillensjo T, Hamberger L, et al (1986) Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro, *Hum Reprod*, 1; 183-184.
- Mohr LR, Trounson AO (1981): Structural changes associated with freezing of bovine embryos, *Biol Reprod*, 25; 1009-1025.
- Moriyasu S, Hirayama H, Sawai K, et al (2007) Relationship between the respiratory activity and the pregnancy rate of bisected bovine, *Reprod Fertil Dev*, 19; 219
- Murayama Y, Omata S (2004) Fabrication of micro tactile sensor for the measurement of micro-scale local elasticity, *Sens Actuat A* 109: 202-207.
- Murayama Y, Constantinou CE, Omata S (2004) Micro-mechanical sensing platform for the characterization of the elastic of the ovum via uniaxial measurement, *J Biomechanics*, 37; 67-72.
- Nagashima H, Kasiwazaki N, Ashman RJ, et al (1994) Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling, *Biol Reprod*, 51; 618-622.
- Nakahara K, Saito H, Saito T, et al (1999) The incidence of apoptotic bodies in membrane granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in vitro fertilization programs, *Fertil Steril*, 68; 312-317.
- Nilsson B, Magnusson C, Widehn S, et al (1982) Correlation between blastocyst oxygen consumption and trophoblast cytochrome oxidase reaction at initiation of implantation of delayed mouse blastocysts, *J Embryol Exp Morphol*, 71; 75-82.
- Overstrom EW (1996) In vitro assessment of embryo viability, *Theriogenology*, 45; 3-16.
- Rieger D (1992) Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos, *Theriogenology*, 37; 75-93.
- Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ (1992) Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and piruvate by cattle embryos produced in vitro, *Reprod Fertil Dev*, 4; 547-557.
- Rieger D, Loskutoff NM (1994) Changes in the metabolism of glucose, puruvate, glutamine and glycine and glycine during maturation of cattle oocyte in vitro, *J Reprod Fertil*, 100; 257-262.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, et al (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related blastocyst development and implantation, *Hum Reprod*, 15; 2394-2403.
- Shea BF (1981) Evaluating the bovine embryo, *Theriogenology*, 15; 13-42.
- Shiku H, Shiraisi T, Ohya H, et al (2001) Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy, *Anal Chem*, 73; 3751-3758.
- Shiku H, Torisawa Y, Takagi A, et al (2005) Metabolic and enzymatic activities of individual cells, spheroids and embryos as a function of the sample size, *Sens Actuat B*, 108; 597-602.
- Smith PJS, Hammar K, Porterfield DM, et al (1999) Self-referencing, non-invasive, ion selective electrode for single cell detection of trans-plasma membrane calcium flux, *Microsc Rec Tech*, 46; 398-417.
- Tesarik J, Greco E (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology, *Hum Reprod*, 14; 1318-1323.
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, et al (1996) Oxygen up take and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos, *J Reprod Fertil*, 106; 299-306.
- Thompson JG, McNaughton C, Gasparini B, et al (2000) Effect of inhibitors and uncplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro, *J Reprod Fertil*, 118; 47-55.
- Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, et al (2000) Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos, *Biol Reprod*, 62; 1866-1874.
- Van Blerkom J, Davis P, Alexander S (2000) Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres; relationship to microtubular organization, ATP content and competence, *Hum Reprod*, 15; 2621-2633.
- Veck LL (1991) *Atlas of the human oocyte and early conceptus*, vol 2. Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- Wang WH, Abeydeera LR, Han YM, et al (1999) Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced in vitro and in vivo, *Biol Reprod* 60; 1020-1028.
- Wright JM (1981) Nonsurgical embryo transfer in cattle:

- embryo-recipient interactions, *Theriogenology*, 15 ; 43-56.
- Wurth YA, Kruip ThAM (1992) Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes, *Proceedings of the 12th International Congress of Animal Reproduction (ICAR)*, 1 ; 387-389.
- Yokoo M, Ito-Sasaki T, Shiku H, et al (2008) Multiple analysis of respiratory activity in the identical oocytes by applying scanning electrochemical microscopy, *Trans of MRS-J*, 33 ; 763-766.