

201111003B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 阿部 宏之

平成24（2012）年 4月

目 次

I. 総合研究報告書

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	-----	1
阿部 宏之		

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	39
--------------------	-------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	49
------------------	-------	----

I 総合研究報告

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 クオリティー診断装置の開発

研究代表者 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・非侵襲的にモニタリングできる技術である。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した。研究期間内に達成する目標として、(1) 医療応用可能な「細胞呼吸測定システム」を開発すること、(2) 「細胞呼吸測定システム」の有効性と安全性を検証し、呼吸活性を指標とする生殖細胞クオリティー診断法を確立すること、(3) ヒト余剰胚および卵子を用いた探索的臨床研究を行う、の3項目を設定した。(1)では単一の胚および卵子の呼吸量を非侵襲的に測定できる「高感度細胞呼吸測定システム」の開発に成功した。(2)では、呼吸活性を指標とする生殖細胞クオリティー診断の有効性を科学的に検証するとともに、ミトコンドリア呼吸機能解析のための分子基盤を構築することができた。(3)では、「細胞呼吸測定装置」を中心とする新しい「ヒト生殖細胞クオリティー診断システム」の構築に向けて極めて有効な前臨床データが得られた。本研究事業では、当初計画していた全ての研究項目において期待される成果が得られた。本研究事業は、工学と生命科学との異分野融合により生み出された研究成果を医工連携によりさらに発展させたものであり、我が国における異分野融合・医工連携の雛形になるものと期待する。

研究分担者

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

1978年に体外受精-胚移植によって初めて妊娠・分娩に成功して以来、体外受精技術は不妊治療の最も有効な治療法となっている。これまでに世界中で約430万人が体外受精により誕生しており、この社会的貢献によりヒト体外受精技術の開発者であるロバート・G・エドワーズ博士に2010年ノーベル医学・生理学賞が授与されている。現在、国内では体外受精など

を用いた不妊治療によって年間 2 万人以上が誕生しているが、治療成功率の低迷（約 15～18%）が大きな課題となっている。この原因の一つとして、不妊治療に供する胚の選択法に問題があると考えられている。不妊治療において質的に良好な胚を効率的に選択できれば、胚移植による妊娠率の向上や単一胚移植による多胎妊娠の減少等の効果が期待できる。

現在、胚の品質は割球の数や形態を基準に評価されているが、このような形態的特徴は定量性に欠けるため判定基準が観察者の主観に左右される可能性が指摘されている。これまでに研究代表者らは、品質良好胚ではミトコンドリアは正常に発達しているが、品質不良胚や発生停止胚においてはミトコンドリアの多くは未成熟あるいは退行している現象を発見し、胚の品質とミトコンドリアの呼吸機能が密接に関係していることを示してきた。ミトコンドリアは酸化的リン酸化（呼吸）により細胞活動に必須のエネルギーであるアデノシン三リン酸（ATP）を産生し、胚の発生等に深く関与していることから、精度の高い細胞呼吸測定技術は受精卵の品質評価や細胞の呼吸機能診断に極めて有効な技術となる。そこで本研究では、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自の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した。また、「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）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

体細胞と比べてミトコンドリア未発達で呼吸活性が低い単一の受精卵や卵子の呼吸計測には、高感度のマイクロ電極の開発が不可欠である。本研究項目では、酸素還元条件下（ $-0.6V$ 荷電下）において還元電流 -1.0 nA 以下の感度を有するマイクロ電極の作製を目的とした。まず初めに、マイクロ電極のサイズが酸素消費量計測に及ぼす影響について検討した。次に、Pt電極を安定的に微細加工できる研磨法と、この微細 Pt 電極を確実にガラスキャピラリーに装填できる方法を検討した。また、医療現場での実用化を念頭にマイクロ電極の滅菌法を検討した。さらに、次世代型マイクロ電極として、現行のディスク型マイクロ電極の高機能化を試みた。

（b）非侵襲測定液の開発

走査型電気化学顕微鏡を用いた電気化学イメージング法は高精度の計測技術であることから、呼吸測定に用いる培養液の組成や添加物によって計測感度が影響を受ける可能性がある。また、試料はある一定時間、測定液中で培養する必要があるため、測定液は受精卵の呼吸機能や発生能に影響を与えない非侵襲的なものでなければならない。そこで本項目では、計測感度に影響せず、且つ呼吸機能などに影響しない安全性の高い呼吸測定液の開発を試みた。この目的を達成するために、項目(a)で作製したマイクロ電極を用いて、培地の成分が異なる細胞培養液や受精卵培養液を用いた呼吸測定を行い、培養液組成と計測精度との関連、測定操作による侵襲性の有無を調べた。また、タンパク質や合成高分子を添加した影響についても検討した。

(c) 多検体測定プレートの開発

走査型電気化学顕微鏡を用いた従来の測定では、ホールディングピペットを用いた試料（受精卵）保持の方法が用いられてきた。しかしながら、この方法は計測操作が煩雑で走査型電気化学顕微鏡による呼吸測定技術の実用化の大きな障害となっていた。本項目では、短時間で複数試料の呼吸計測を可能にするための多検体プレートを製作し、受精卵の呼吸測定による性能評価を行った。具体的には、測定プレートの素材と試料の固定方法を検討した。また、従来法との計測精度の比較検証を行い、新しい計測アルゴリズムの構築を試みた。さらに、従来の針型電極に代わりに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、性能の評価を行った。

(d) 呼吸解析ソフトウェアの開発

項目(c)で製作した多検体測定プレートに適用できる呼吸解析ソフトの製作を試みた。ウシ胚の呼吸量測定データを収集し、球面拡散理論式に基づく呼吸解析アルゴリズムの構築を行った。また、呼吸量解析のデータ処理速度の向上、医療現場での使用を目的に呼吸計測操作の半自動化、ディスプレイ画面の視認性の向上、バックグラウンド補正、患者データ管理ソフトとのデータ移植機能などの高機能化を図った。

(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、項目(a)～(d)で開発した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。不妊治療施設に設置し、医療現場において操作性などを中心に実用性を検証した。

(2) 細胞呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

細胞呼吸活性を指標とする胚や卵子のクオリティー診断法を開発するには、「細胞呼吸測定システム」の有効性と安全性を生物学的解析によって詳細に検証する必要がある。本項目では、ウシとマウスの胚および卵子を主な実験材料に用い、生殖細胞クオリティー評価における「細胞呼吸測定システム」の有用性を調べるとともに、臨床応用に向けた測定システムの安全性を検証した。具体的には、細胞生物学・分子生物学的解析技術を駆使したミトコンドリア呼吸機能を総合的に解析することで、「細胞呼吸測定システム」の性能評価と、生殖細胞クオリティー評価に対する有用性を検証した。また、胚や卵子の培養試験および移植試験により「細胞呼吸測定システム」の安全性を調べた。

(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、ウシおよびマウスから採取した胚と卵子の呼吸量を測定した。呼吸測定専用開発した多検体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、微小電極を試料近傍に移動した後、マイクロ電極をZ軸方向に走査（挿引）し、呼吸によって試料近傍と沖合との間に生じる酸素還元電流値を測定した。試料近傍と沖合間での電流値の差を基に、(1)-(d)で製作した呼吸解析ソフトを用いて酸素消費量を算出した。

(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* 解析を行った。

(e) ミトコンドリアの微細構造観察

胚および卵子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ミトコンドリアを中心とする細胞小器官、細胞膜等の微細構造を観察した。

(f) 体外受精および胚の培養試験

本研究で用いたウシの体外受精胚は、以下の方法で作製した。食肉処理場において採材したウシ卵巣から卵丘細胞-卵子複合体（COC）を採取した。20~30 個の COC を IVMD101 培地（機能性ペプチド研究所：IFP）350 μ l で 22 時間成熟培養を行った後、IVF100（IFP）培地 100 μ l 中で媒精した。受精卵は、IVD101 培地（IFP）350 μ l を用いて、5 % O_2 / 5 % CO_2 / 90 % N_2 、38.5 $^{\circ}C$ の低酸素条件下で培養し、培養 4~5 日目に培地の半量を交換した。2 細胞期胚、4 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞を回収し各種実験に用いた。

一方、マウスは、B6C3F1 と ICR の 2 系統（8~14 週齢）を使用した。雌マウスに PMSG を投与し、その 48 時間後に hCG を投与することで過剰排卵を誘起した。生体由来胚（体内受精胚）は、hCG 投与した雌マウスを雄マウスと同居させた後、hCG 投与 16 時間後に卵管より胚を採取した。一方、体外受精胚は、hCG 投与 14 時間後に排卵された卵子・卵丘細胞複合体（COC）を回収し、HTF 培地内で体外受精を行った。生体由来胚および体外受精胚は、modified Whitten's medium（mWM）培地中で 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 in air の条件下で発生培養を行った。

(g) 胚の移植試験

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イド溶液で除去した。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。

(g) 安全性評価試験

偽妊娠 3 日目の受容雌マウス (ICR 系統) をネンブタールで麻酔し、第一腰椎付近の皮膚を切開した。脂肪・卵巣・卵管・子宮組織を引き出し、子宮内へ胚を 10 個前後移植した。移植後、引き出した全ての組織を腹腔内へ戻し、皮膚をオートクリップで縫合し、保温して覚醒させた。形態的に正常で、呼吸量 $0.70 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上の胚盤胞を移植したものを「測定群」、呼吸量を測定せずに形態的評価のみで選別した胚盤胞を測定群と同条件で移植したものを「対照群」とした。胚移植後 17 日目に分娩を確認し、得られた産子の正常性を検証する目的で表現型解析を実施した。繁殖能力試験に加えて、マウスの行動解析としてオープンフィールド

テスト (一般活動性・情動性・馴化の試験法)、オープンスペース水泳テスト (運動能力・動機づけの試験法) および水迷路学習課題 (空間認知・学習能力・記憶力の試験法) を実施した。対照群 6 個体、測定群 6 個体とし、いずれも 12 週齢時に実験を開始した。全ての個体に対し、オープンフィールドテスト、オープンスペース水泳テスト、水迷路学習課題をこの順序で実施した。各テストの間は、1 日以上インターバルを挿入した。試験終了後、各個体は安楽死させ、心臓より採血し、富士ドライケムを用いて、定法により血液生化学的指標について分析した。また、主要臓器 (脳、肺、胃、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、心臓、大腿二頭筋、卵巣、精巣) は、直ちに 10% 緩衝ホルマリン固定液に浸漬して 48 時間室温にて固定後、定法に従って脱水後、パラフィンブロックを作製した。各ブロックより厚さ $4 \mu\text{m}$ の薄切標本を作製、Hematoxylin-Eosin 染色 (HE 染色) を施して顕微鏡下で観察し、臓器ごとに好中球など炎症細胞の浸潤状態を中心に、各個体間の組織所見を比較した。

(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データ収集を目的にヒト余剰胚の呼吸量測定および培養試験を行った。ヒト胚の呼吸能生解析研究では、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。

ヒト生殖細胞クオリティー診断法開発のための前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 週間以内に限り、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

マイクロ電極のサイズが酸素消費量計測に及ぼす影響について検討した結果、単一受精卵の呼吸量計測に適した電極サイズは、白金 (Pt) の先端径が 2~5 μm であることが明らかになった。次に、Pt 電極を安定的に微細加工できる電解エッチング研磨法と、この微細 Pt 電極を確実にガラスキャピラリーに装填できるマイクロフォーシールド熱封止法を開発することで 0.3~1.0 nA の感度を有するディスク型マイクロ電極の作製システムを確立することができた (図 1)。また、医療現場での実用化を念頭にマイクロ電極の滅菌法を検討した結果、最近普及し始めているプラズマ滅菌が電極性能や受精卵の生物機能影響しない方法であることが示された。さらに、次世代型マイクロ電極として、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、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参照極一体型リング-ディスク電極探針の基盤技術を構築することができた (図 2)。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を観測した結果、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することができた。

また、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

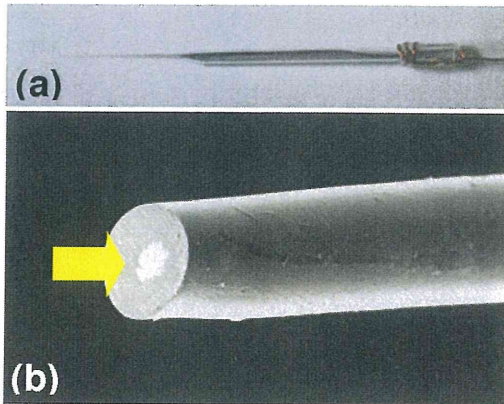


図1. ガラスキャピラリーにPt電極を封止したディスク型マイクロ電極 (a) と先端部の走査型電子顕微鏡像 (b)。Pt電極 (矢印) の先端径は $2.8 \mu\text{m}$ (実測値) であり、単一の胚および卵子の呼吸量計測が可能となった。

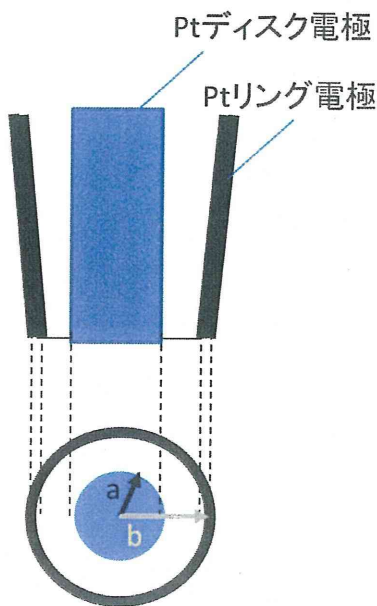


図2. 参照極一体型リング-ディスク電極探針。

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。

(b) 非侵襲測定液の開発

ウシ受精卵培養液 (IVD101: 機能性ペプチド研究所製) とマウス受精卵培養液 (HTF) を用いた場合、受精卵の呼吸機能や発生能などに影響が出ないことが確認されたため、この2種類に培養液を用いて呼吸測定試験を行った。その結果、HTF 培地において非常に安定した還元電流を計測することができたが、一方のTCM199をベースに開発されたIVD101では、測定開始直後に還元電流値の顕著な低下が起こった。このように、IVD101と比べて電解質などが少ないHTF培地が電気化学計測に適していることが判明したことから、HTF培地を基本とする呼吸測定液を試作した。さらに、医療で利用できない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

測定プレートの素材としてポリスチレンとアクリルの2種類の素材について、透明度、成形加工性、耐久性などを検討した。その結果、透明度と成形加工性は両者ともに呼吸測定には問題はなかったが、エタノール耐性などの問題からポリスチレンの方が測定プレートの素材として適していることが判明した。次に、試料(受精卵)を保持するためのマイクロウェルの形状を検討した結果、円錐形のマイクロウェ

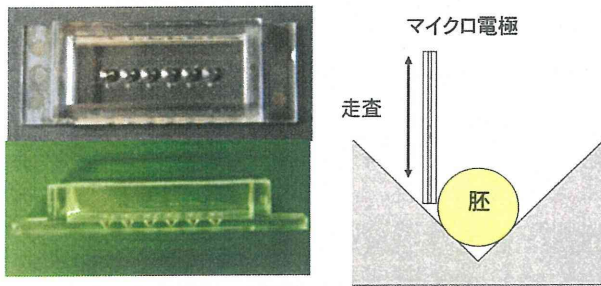


図3. 円錐形マイクロウェルを施したポリエチレン製多検体プレート。マイクロウェル内に静置した胚の近傍をZ軸方向にマイクロ電極を走査し、呼吸によって生じる酸素還元電流の濃度勾配をPA(ピコアンペア)レベルの高感度で測定できる。

ルがウシ受精卵の保持と観察に最も適していた。以上の結果から、ポリスチレン製で底面に6個のマイクロウェルを施した多検体プレート(図3)を製作した。ウシ受精卵の呼吸測定により操作性と機能性を評価した結果、マイクロウェル内への受精卵の導入・設置から測定までの一連操作は問題なく行うことができ、最大6個の受精卵の呼吸測定を連続して行うことが可能となった。受精卵1個の呼吸測定に要する時間は概ね2分以内(従来は8~10分程度)で完了することができた。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。

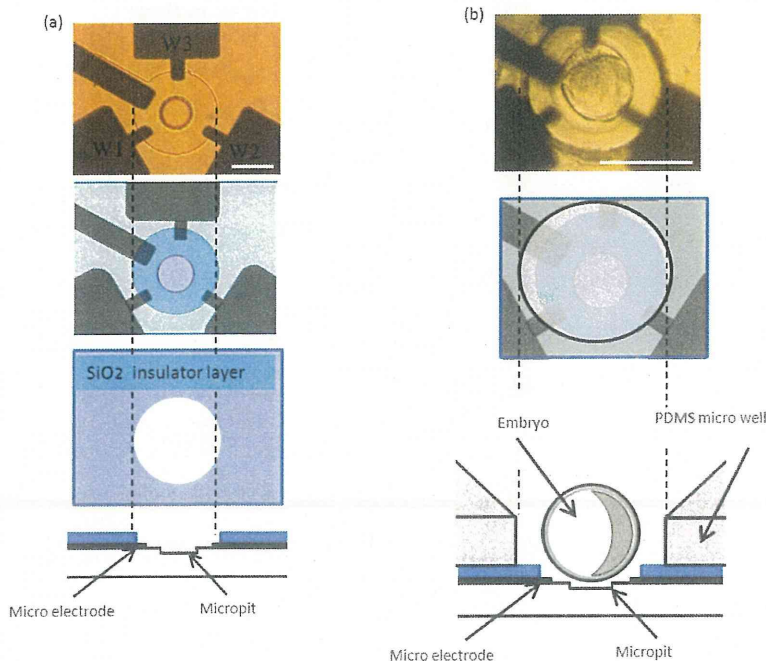


図4. 石英基板上に作製した電極固定型デバイス (Biosens. Bioelectron., 2011)。

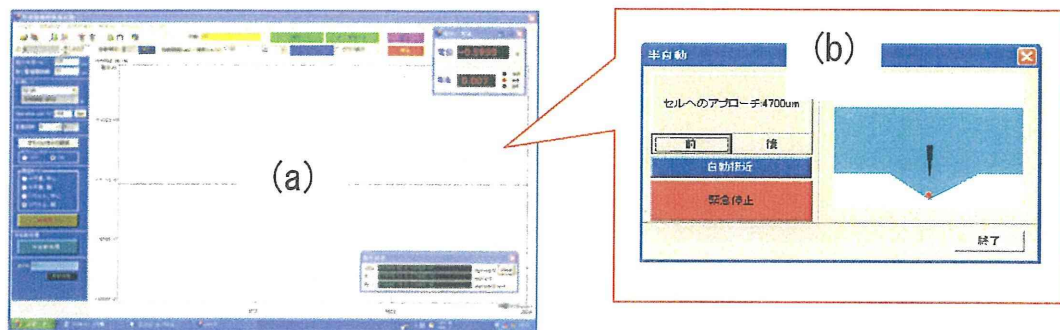


図5. 新規に開発した呼吸解析ソフトの画面。(a) 電流値等の視認性が大幅に向上している。(b) マイクロ電極の移動を一部自動化した機能を備えている。

(d) 呼吸解析ソフトの開発

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を向上させるために、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した。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、マイクロ電極を1ミクロン単位で走査するための自動駆動装置を倒立型顕微鏡のステージ上に設置した。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、従来型呼吸測定装置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。

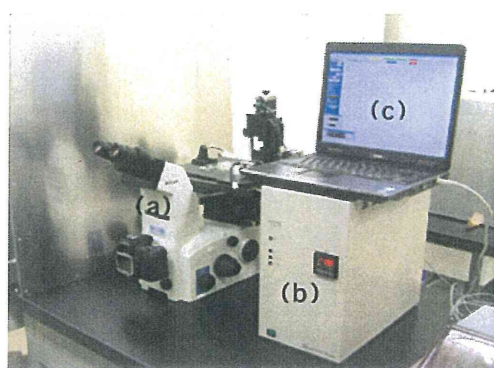


図6. 各要素技術をシステム化した「細胞呼吸測定システム」。(a) 倒立顕微鏡、(b) ポテンシostat、(c) 呼吸解析ソフトを内蔵したノートパソコンにより構成される。

(2) 細胞呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

研究項目(1)で製作した「細胞呼吸測定システム」の性能評価を行った。具体的には、(a)

胚の酸素消費量測定、(b)活性型ミトコンドリア局在、(c)ATP 含量測定、(d)シトクローム c オキシダーゼ(Cox)遺伝子の発現解析、(e)ミトコンドリア微細構造観察などの細胞生物学的・分子生物学的解析により測定システムによる呼吸測定の有効性を検証した。また、ウシ胚およびマウス胚の呼吸量を測定し呼吸活性と発生能および妊娠率との関係を調べ、呼吸活性を指標とする生殖細胞クオリティー評価の有効性を検証した。

(a) 酸素消費量測定

胚の発生過程における呼吸能変化を調べるために、体外受精により作出したウシ胚の呼吸量を測定した。2細胞期から8細胞期にかけての発生初期では $0.45\sim 0.46 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ であったが、桑実胚 ($1.03 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$) から有意に呼吸量が上昇し、孵化胚盤胞 ($3.01 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$) において最大になった(表1)。次に、ウシ胚と比べてサイズが小さいマウス胚の酸素消費量を測定した。その結果、ウ

シ胚と比べて酸素消費量は発生過程を通して低かったが、ウシ胚と同様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。

(b) 活性型ミトコンドリアの局在

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。

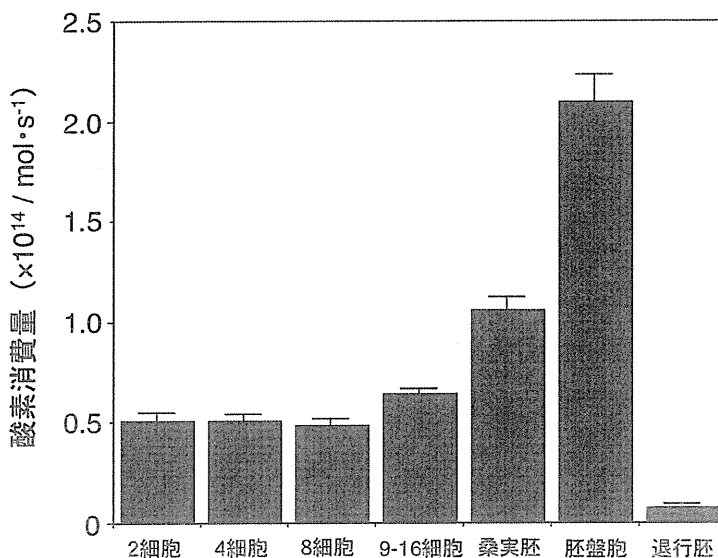


図7. ウシ体外受精胚の発生過程における呼吸量変化。桑実胚から胚盤胞期にかけて呼吸量が増加する。退化胚ではほとんど呼吸

(c) ATP 量測定

マウス胚の発生過程における ATP 含量変化を解析した。1 胚当たりの ATP 含量は、2 細胞期から発生に伴い増加し、8 細胞期で最大になった後、桑実胚と胚盤胞において減少した。しかしながら、発生過程全体では呼吸活性の上昇に伴い胚の ATP 含有量は増加する傾向が認められた。

(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。

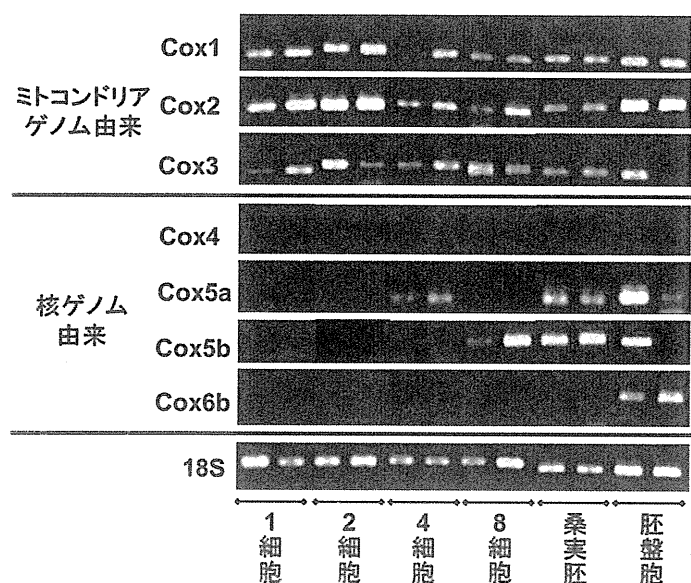


図7. マウス胚発生過程における Cox 遺伝子の発現。ミトコンドリアゲノム由来のサブユニットをコードする遺伝子は全ての発生ステージ発現している。Cox4 を除き、核ゲノム由来のサブユニットをコードする遺伝子は 2 細胞期以降に発現量が増加する。

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。

(e) ミトコンドリアの微細構造変化

ミトコンドリアは呼吸機能の発達に伴い顕著な微細構造変化を示す。本研究では、ウシ胚とマウス胚の発生過程におけるミトコンドリアの超微細形態変化を解析した。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

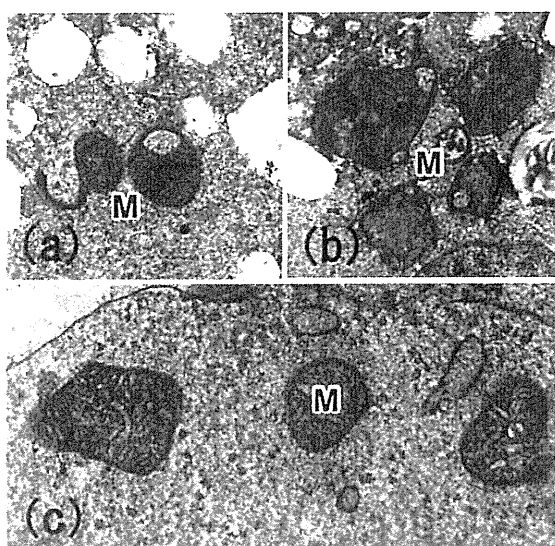


図8. ウシ体外受精胚の発生過程におけるミトコンドリアの微細構造変化。(a) : 8細胞期胚、(b) : 桑実胚、(c) : 胚盤胞。M : ミトコンドリア。

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) 胚の培養および移植試験

呼吸活性を指標とする受精卵品質評価システムの有効性を検証するために、「細胞呼吸測定システム」により呼吸量を測定したウシ胚の胚発生能および妊娠率を調べた。受精6日目の桑実胚の呼吸量を測定した後、IVD101培地を用いて5%CO₂/5%O₂/90%N₂、38.5℃の条件で3日間個別に追加培養を行い、胚盤胞数および孵化胚盤胞数を調べた。その結果、呼吸量が $1.0 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上の胚において胚盤胞発生率(89.3%)および孵化胚盤胞率(62.5%)が最も高く、呼吸量が低下するに従い胚盤胞発生率と孵化胚盤胞率が低下した(表1)。

次に、呼吸測定後のウシ胚を移植し呼吸活性と妊娠率の関係を調べた。人工授精した牛から採取した胚をLamp法により性別別した後、1日間回復培養し移植に供した。その結果、各発生ステージにおいて、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、58.3~64.0%の高い妊娠率が得られた(表2)。さらに、形態的品質が良好な胚(Excellent胚)の中で呼吸量が高い胚を選択すれば、より高い妊娠率が期待できる。一方、基準値に満たない胚のほとんどは受胎しなかった。以上の結果から、「細胞呼吸測定システム」は胚の品質評価や胚移植後の妊娠率改善に有効であることが示された。

表 1. ウシ体外受精胚の呼吸活性と発生能との関係

酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)	測定胚数	胚盤胞数 (%)	孵化胚盤胞数 (%)
$F \geq 1.0$	56	50 (89.3)	35 (62.5)
$0.8 \leq F < 1.0$	44	34 (77.3)	20 (50.0)
$F < 0.8$	107	49 (45.8)	28 (26.2)

表 2. ウシ胚の呼吸量と妊娠率の関係

移植時の 発生ステージ	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)	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)

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。さらに、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。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。

(g) 安全性評価試験

「細胞呼吸測定システム」による胚品質評価の安全性を検証する目的で、胚移植試験で得られた産子の表現型解析を実施した。測定群では、

ミトコンドリア機能の高い胚を選択して移植しているため、その産子は運動能力が優れているなどの影響も予想されたが、行動解析（一般活動性・情動性・馴化、運動能力・体力、空間認知・学習能力・記憶力の試験）のいずれの試験結果においても対照群と測定群のマウスで有意差は認められなかった。また、血液生化学検査および主要臓器の組織学的検査においても異常所見は認められなかった。さらに、測定群の産子の一部は、性成熟後に繁殖試験を実施し、少なくとも 5 世代目までは正常な繁殖能力を有していることが確認された。以上の結果から、受精卵呼吸測定装置で品質評価した胚から得られた産子は、通常の胚移植で得られた産子と比較しても差異は認められず、正常な個体であることが示唆された。

ウシ胚の移植試験によって誕生した産子について、形態的観察による異常の有無を調べた。その結果、胎児の妊娠期間や産子の出生時体重は、通常移植によって誕生した産子と比べて大

きな違いは無く、これまでに誕生した産子では奇形などの異常は認められていない。

(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。

異なる発生ステージのヒト胚の呼吸量を測定した結果、2~8細胞期の胚では $0.51 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、この酸素消費量はウシ胚とほぼ同じであった。また、桑実胚から胚盤胞にかけて顕著な呼吸量の増加が認められ、これに合わせてミトコンドリアも形態的に成熟することが明らかになった(図9)。さらに、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行った結果、呼吸量

($\times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) が基準値内 ($0.26 \leq F \leq 0.56$) の胚は、胚盤胞への発生率が高かった。

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)を卵丘細胞の付着状態を基準に5つのカテゴリーに分類し(図11)、呼吸量測定と成熟培養試験を行った。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(表4、図12)。この研究により、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。

表3. ヒト胚(余剰胚)の発生過程における酸素消費量(呼吸量)変化

発生ステージ	測定胚数	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)
2~8細胞	18	0.51 ± 0.05
桑実胚	5	0.61 ± 0.11
初期胚盤胞	13	0.72 ± 0.06
胚盤胞~孵化胚盤胞	5	1.05 ± 0.02

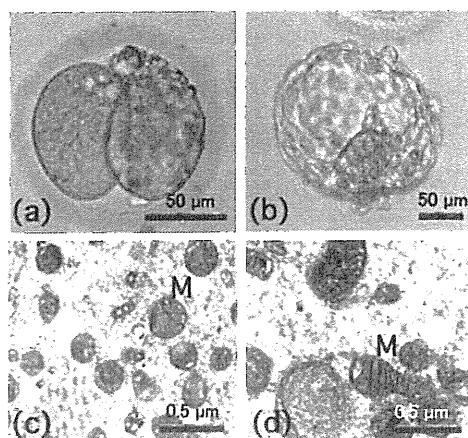


図9. ヒト胚(余剰胚)の形態(a, b)とミトコンドリアの微細形態(c, d)。a, c: 2細胞期胚、b, d: 孵化胚盤胞。M: ミトコンドリア。ミトコンドリアの発達と呼吸量の増加は一致する。

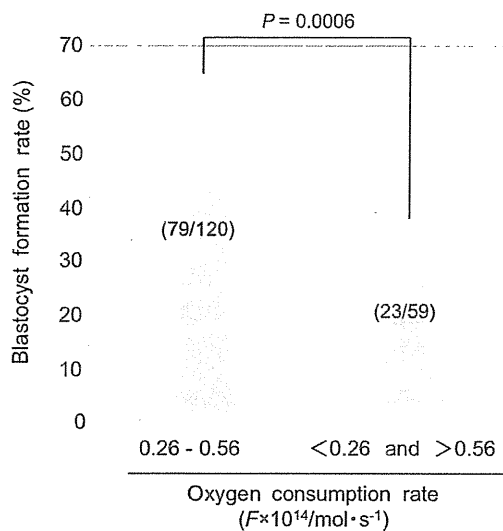


図 10. ヒト胚（余剰胚）の呼吸能と胚発生能の関係。

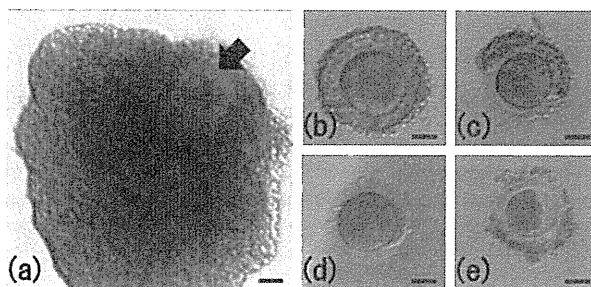


図 11. ヒト卵丘細胞-卵子複合体 (COC) の光学顕微鏡像。(a) グレード 1 : 卵子 (矢印) の周囲には卵丘細胞層が多層に密に付着している。(b) グレード 2 : 卵丘細胞が 1~3 層付着している。(c) グレード 3 : 卵丘細胞層は 1-3 層で部分的に剥離している。(d) グレード 4 : 卵丘細胞が全く付着していない。(e) グレード 5 の : 卵丘細胞層の付着が認められるが卵子が変形している。スケールバーは、50 μm を示す。

表 4. 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

カテゴリー	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)
グレード 1	7.79 ± 1.00 (50)
グレード 2	1.46 ± 0.15 (25)
グレード 3	1.26 ± 0.35 (8)
グレード 4	0.86 ± 0.30 (2)
グレード 5	0.77 (1)

括弧内の数字は、測定した試料の数を示す。

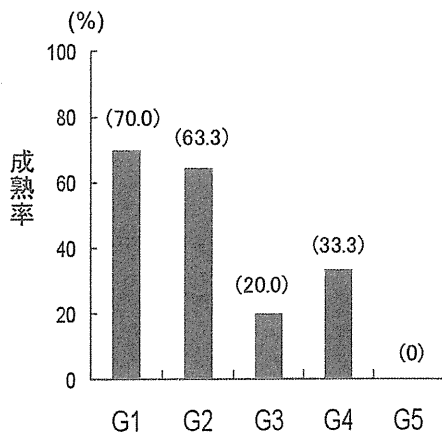


図 12. ヒト卵丘細胞-卵子複合体 (COC) を成熟培養した後の卵子成熟率。G1：グレード1、G2：グレード2、G3：グレード3、G4：グレード4、G5：グレード5。

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。

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、臨床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、医療現場における実用化の可能性が高くなった。

D. 考察

近年、生殖医療技術は目覚ましい進歩を遂げ、不妊患者に光明をもたらしてきた。しかしながら、体外受精や顕微授精などの先端的な治療技術を用いても治療の成功率は 15~18%程度と低迷している。この原因としては、女性の社会進出に伴う晩婚化や社会の変化が挙げられている。一方で、不妊治療技術における問題点も指摘されている。例えば、治療に供する卵子や胚の品質 (クオリティー) 評価の精度に課題があり、胚移植効率の原因になっていると考えられている。現在、不妊治療に供される卵子や胚の品質は形態的特徴を指標に判定されている。しかし、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評価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、世界的にも客観的で精度の高い胚品質診断法の開発が切望されている。

研究代表者らは、動物胚の詳細な微細構造解析により、胚の品質とミトコンドリアの呼吸機能が密接に関係していることを発見してきた。ミトコンドリアは酸化的リン酸化（呼吸）により細胞活動に必須のエネルギーであるアデノシン三リン酸（ATP）を産生し、胚の発生等に深く関与している。したがって、精度の高い細胞呼吸測定技術は胚の品質診断に極めて有効な技術となる。これらの研究成果を基盤に本研究では、超高感度電気化学イメージング技術を応用した「細胞呼吸測定システム」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した。平成 21 年度から 3 年間にわたる研究期間内に達成する目標は、(1) 医療現場での応用が可能な「臨床対応型細胞呼吸測定装置」を開発すること、(2) 「細胞呼吸測定システム」の有効性と安全性を検証し、呼吸活性を指標とする新しい生殖細胞クオリティー診断法を開発すること、(3) 「細胞呼吸測定システム」の臨床応用を目的としたヒト余剰胚および卵子を用いた探索的臨床研究を行う、ことであった。

(1) については、ミトコンドリアが未発達で呼吸活性が低い単一の胚および卵子の酸素消費量を計測する技術の開発が不可欠であった。そこで本研究項目では、単一細胞の呼吸量測定が可能な「超高感度マイクロ電極」と非侵襲計測を可能とする呼吸測定液を開発した。また、呼吸測定の操作と精度を向上させるための

「多検体測定プレート」と「呼吸解析ソフト」を開発し、医療応用可能な呼吸測定技術を確立することができた。そして、電気化学イメージング技術の基盤装置である走査型電気化学顕微鏡（scanning electrochemical microscopy: SECM）をベースにこれら要素技術をシステム化し、本項目の最終目標である「臨床対応型呼吸測定装置」を製作することができた。この測定システムは、現在、最も高感度・非侵襲的に細胞呼吸を測定することできるシステムである。さらに本研究では、現行のディスク型マイクロ電極を高機能化した「参照極一体型 Pt リングーディスク電極探針」と「2チャンネル炭素ナノプローブ」の作製に成功するとともに、次世代型の呼吸測定デバイスと期待される「電極固定型デバイス」を開発することができた。以上のように、項目（1）は当初の目標を十分に達成するとともに、新たな技術開発にも成功した。

(2) では（1）で製作した「細胞呼吸測定システム」の性能評価と安全性の検証を行った。この研究項目では、マウスなどの実験動物やウシなどの家畜の胚および卵子におけるミトコンドリア呼吸機能の解析を重点的に行った。特に、「細胞呼吸測定システム」により得られた呼吸測定データの信頼性を検証するために、細胞呼吸に関連する生物現象を遺伝子レベルからタンパク質、そして細胞小器官（ミトコンドリア）から細胞レベルまで階層的に解析を行った点がこれまでにはないアプローチである。その結果、「細胞呼吸測定システム」の高精度な測定性能を検証できるとともに、呼吸測定の安全性（非侵襲性）を科学的に裏付けることができた。さらに、本研究で行ったミトコンドリア呼吸機能の詳細な解析により、これまで明らか