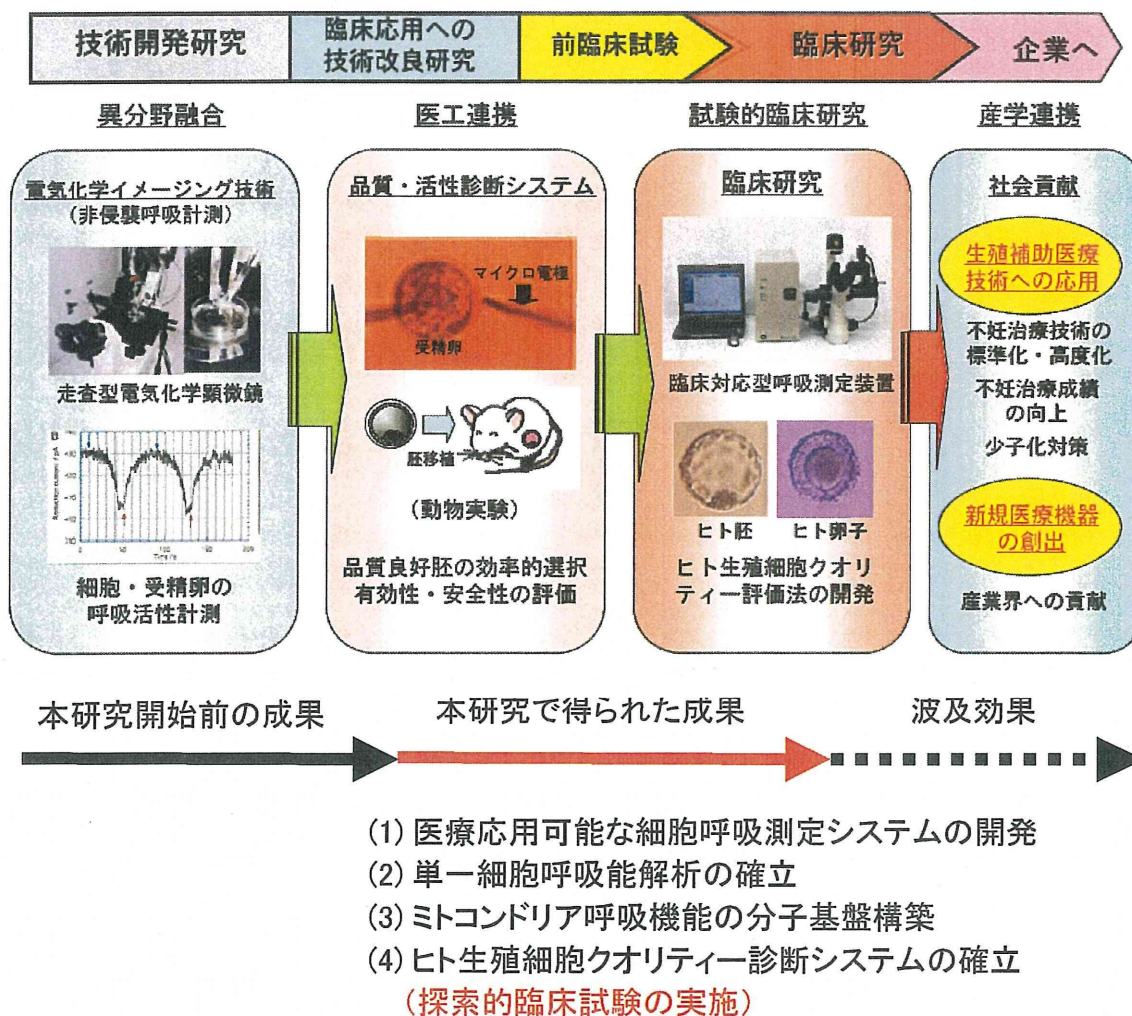


【図 14: 研究全体の流れ: 概要図】



## II 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	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
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用い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
珠玖 仁、伊野浩介、末永智一	単一細胞由来 mRNA 回収プロトコルの開	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	223-228
末永智一、高橋康史、伊野浩介、珠玖 仁	走査型電気化学顕微鏡による酵素イメージング,	小宮山真	酵素利用技術体系-基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで-	株式会社エヌ・ティー・エス	東京	2010	112-116 (第2編、第2節)

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
吉田仁秋、田中孝幸、阿部宏之	体外培養卵子の評価—臨床応用	産科と婦人科	78	974-979	2011
阿部宏之	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	78	967-972	2011
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	ヒト凍結融解胚盤胞の呼吸量測定	産婦人科の実際	60	923-927	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., <b>Matsue T.</b> , Klenerman D., and Korchev Y. E.,	Multifunctional nanoprobes 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., Koide M., Umamura T., Shiku H., <b>Matsue T.</b>	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. <b>Yokoo M.</b> , <b>Abe H.</b> , <b>Matsue T.</b>	Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice.	<i>Biosens. Bioelectron.</i>	30	100-106	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
Takeda M., Shiku H., Ino K., <b>Matsue T.</b>	Electrochemical chip integrating scalable ring-ring electrode 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., <b>Matsue T.</b>	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., <b>Matsue T.</b>	Amperometric detection of DNA Hybridization using a multi-point, addressable electrochemical device.	<i>Sens. Actuat B</i>	160 (1)	923-928	2011
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	2011
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	2011
<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	2011
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saito A, Osuga Y, <b>Yoshino O</b> , Takamura M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Harada M, Takemura 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	2012
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>	28	460-462	2012
<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
久慈直昭,(6名省略), <b>浜谷敏生</b> , 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



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
清水聖子, <u>浜谷敏生</u> , (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., <u>Yokoo M.</u> , 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
<u>Yokoo M.</u> , Sato E.	Physiological function of hyaluronan in mammalian oocyte maturation.	<i>Reproductive Medicine and Biology</i>	10	221-229	2011
Sugimura S., Yokoo M., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., Nagai T., <u>Abe H.</u> , Sato E.	Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos	<i>Cellular Reprogramming</i>	12 (4)	463-474	2010
Kimura N., Tsunoda T., Iuchi Y., <u>Abe H.</u> , Totsukawa K., Fujiii J.	Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developing stages of the embryos from SOD1-deficient mice	<i>Molecular Human Reproduction</i>	16	441-451	2010
後藤香里、小池恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、 <u>阿部宏之</u>	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	53-58	2010
Sakagami N., Yamamoto T., Akiyama K., Nakazawa Y., Kojima N., Nishida K., Yokomizo S., Takagi Y., <u>Abe H.</u> , Suzuki C., Yoshioka K.	Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films	<i>Journal of Reproduction and Development</i>	56 (2)	279-284	2010
Yamashiro H., Toyomizu M., Kikusato M., Toyama N., Sugimura S., Hoshino Y., <u>Abe H.</u> , Moisyadi S., Sato E.	Lactate and adenosine triphosphate in extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm	<i>J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.</i>	49	160-166	2010
横尾正樹、伊藤・佐々木隆広、珠玖仁、末永智一、 <u>阿部宏之</u>	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	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
後藤香里、小池 恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、 <b>阿部宏之</b>	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	<b>産婦人科の実際</b>	59(8)	1277-1281	2010
Nagamine K., Takahashi Y., Ino K., Shiku H., <b>Matsue T.</b>	Influence of tip size on single yeast cell imaging with scanning electrochemical microscopy	<i>Electroanalysis</i> ,	23	1168-1174	2011
Takahashi Y., Shevchuk A. I., Novak P., Murakami Y., Shiku H., Korchev Y. E., <b>Matsue T.</b>	Simultaneous non-contact topography and electrochemical imaging by SECM/SICM featuring ion current feedback regulation	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	132(29)	10118-10126	2010
Shiku H., Okazaki D., Suzuki J., Takahashi Y., Murata T., Akita H., Harashima H., Ino K., <b>Matsue T.</b>	Quantitative characterization of reporter gene expression at single cell level with real-time RT-PCR, chemluminescence, fluorescence, and electrochemical imaging	<i>FEBS Lett.</i>	584	4000-4008	2010
Shiku H., Suzuki J., Murata T., Ino K., <b>Matsue T.</b>	Chronoamperometric characterization of secreted alkaline phosphatase from single cell entrapped in a poly(dimethylsiloxane) microwell	<i>Electrochimica Acta</i>	55	8623-8627	2010
Lin Z., Ino K., Shiku H., <b>Matsue T.</b>	Electrochemical topography of a cell monolayer with an addressable microelectrode array	<i>Chem. Commun.</i>	46	559-561	2010
Lin Z., Ino K., Shiku H., <b>Matsue T.</b> , Chen G.	Addressable Electrochemiluminescence detection system based on redox-cycling of Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup>	<i>Chem. Commun.</i>	46	243-245	2010
<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
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	143-1438	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



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hirata T., Osuga Y., Takamura M., Kodama A., Hirota Y., Koga K., <u>Yoshino O.</u> , Harada M., Takemura Y., Yano T., Taketani Y.	Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells	<i>Endocrinology</i>	151(11)	5468-5476	2010
Shi J., <u>Yoshino O.</u> , Osuga Y., Koga K., Hirota Y., Nose E., Nishii O., Yano T., Taketani Y.	Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and StAR in Human Granulosa Cells	<i>Am J Reprod Immunol.</i>	65	421-427	2011
<u>Yoshino O.</u> , Hayashi T., Osuga Y., Orisaka M., Asada H., Okuda S., Hori M., Furuya M., Onuki H., Sadoshima Y., Hiroi H., Fujiwara T., Kotsuji F., Yoshimura Y., Nishii O., Taketani Y.	Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids	<i>Hum. Reprod.</i>	25(10)	2475-2479	2010
Osuga Y., Koga K., Hirota Y., Hirata T., <u>Yoshino O.</u> , Taketani Y.	Lymphocytes in endometriosis	<i>Am. J. Reprod. Immunol.</i>	65(1)	1-10	2011
Hasegawa A., <u>Yoshino O.</u> , Osuga Y., Kodama A., Takamura M., Nishii O., Taketani Y.	Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model	<i>Fertil Steril.</i>	93(8)	2757-2759	2010
吉野修、大須賀 穰	卵胞発育と血管新生	ホルモンフロンティア、メディカルレヴィー社編	17(3)	227-235	2010
藤本晃久	高齢化とART	日本産科婦人科学会誌	62(3)	754-760	2010
Taguchi A, Koga K, Osuga Y, <u>Fujimoto A.</u> , Miyasaka A, Yano T, Kurokawa M, Taketani Y.	Successful management of a ruptured endometrial cyst in acute leukemia	<i>Fertil Steril.</i>	95(1)	292.e1-3	2011
Wada-Hiraike O., Osuga Y., Hiroi H., <u>Fujimoto A.</u> , Maruyama M., Yano T., Taketani Y.	Sessile polyps and pedunculated polyps respond differently to oral contraceptives	<i>Gynecol. Endocrinol.</i>	27(5)	351-355	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Harada M., Hiroi H., Fujiwara T., <u>Fujimoto A.</u> , Kikuchi A., Osuga Y., Momoeda M., Kugu K., Yano T., Taketani Y.	Case of chronic ectopic pregnancy diagnosed in which the complete shape of the fetus was visible by ultrasonography	<i>J. Obstet Gynaecol. Res.</i>	36(2)	462-465	2010
北麻里子、田口歩、堤亮、平池修、廣井久彦、 <u>藤本晃久</u> 、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二	子宮動脈塞栓術後の子宮鏡手術で切除した胎盤ポリープの1例	日本産科婦人科学会東京地方部会誌	59(2)	284-287	2010
磯野渉、堤亮、砂川空広、廣井久彦、 <u>藤本晃久</u> 、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二	帝王切開術後3ヵ月に大量性器出血をきたした子宮仮性動脈瘤破裂の1例	日本産科婦人科学会東京地方部会誌	59(1)	137-140	2010
山本直子、廣井久彦、大須賀穰、平田哲也、 <u>藤本晃久</u> 、矢野哲、武谷雄二	腹腔鏡用超音波プローブが有用であった卵管間質部妊娠	日産婦内視鏡学会	26(2)	274-377	2010
Yamada M., <u>Hamatani T.</u> , Akutsu H., Chikazawa N., Kuji N., Yoshimura Y., Umezawa A.	Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development	<i>Hum. Mol. Genet.</i>	19(3)	480-493	2010
Toyoda M., <u>Hamatani T.</u> , Okada H., Matsumoto K., Saito H., Umezawa A.	Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling	<i>Curr. Med. Chem</i>	17(28)	3245-3252	2010
Tarín J.J, <u>Hamatani T.</u> , Cano A.	Acute stress may induce ovulation in women.	<i>Reprod Biol Endocrinol</i>	8:53		2010
<u>Hamatani T.</u>	Spermatozoal RNA profiling towards a clinical evaluation of sperm quality	<i>Reprod. BioMed. Online</i>	22(2)	103-105	2011
<u>Yokoo M.</u> , Kimura N., Sato E.	Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs	<i>J. Reproduction and Development</i>	56(1)	15-19	2010
Sugimura S., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., <u>Yokoo M.</u> , Sato E.	Early metaphase II oocytes treated with dibutyryl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos	<i>Animal Science J.</i>	81	48-57	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashiro H., Toyomizu M., Toyama N., Aono N., Sakurai M., Hiradate Y., <u>Yokoo M.</u> , Stefan M., Sato E.	Extracellular ATP and dibutyryl cAMP enhance the freezability rat epididymal sperm	<i>Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	49(2)	167-172	2010
横尾正樹、清水隆、 佐藤英明	細胞の流れ	日本哺乳動物卵子学会編, 生命の誕生に向けて (第二版) - 生殖補助医療 (ART) 胚培養の理論と実際		13-19	2011
Kyono K., Nakajo Y., Nishinaka C., Hattori H., Kyoya T., Ishikawa T., <u>Abe H.</u> , Araki Y.	A birth from the transfer of a single vitrified-warmed blastocyst using ICSI with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient	<i>Fertil. Steril.</i>	91(3)	e7-e11	2009
Shiku H., Yamakawa T., Nashimoto Y., Takahashi Y., Torisawa Y., Yasukawa T., Ito-Sasaki T., Yokoo M., <u>Abe H.</u> , Kambara H., Matsue T.	A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids	<i>Anal. Biochem.</i>	385	138-142	2009
Murakawa H., Aono N., Tanaka T., Kikuchi H., Yoshida H., Yoshida H., Yokoo M., <u>Abe H.</u>	Morphological evaluation and measurement of the respiration activity of cumulus-oocyte complexes to assess oocyte quality	<i>J. Mamm. Ova Res.</i>	26	32-41	2009
Inoue K. Y., Ino K., Shiku H., Kasai S., Yasukawa T., Mizuntani F., <u>Matsue T.</u>	Electrochemical Monitoring of Hydrogen Peroxide Released from Leucocytes on Horseradish Peroxidase Redox Polymer Coated Electrode Chip	<i>Biosens. Bioelectron.</i>	25	1723-1728	2010
Shiku H., Goto S., Jung S., Nagamine K., Koide M., Itayama T., Yasukawa T., <u>Matsue T.</u>	Electrochemical Characterization of Enzymatic Activity of Yeast Cells Entrapped in a Poly(dimethylsiloxane) Microwell on the Basis of Limited Diffusion System	<i>Analyst</i>	134	182-187	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shiku H., Takeda M., Murata T., Akiba U., Hamada F., <u>Matsue T.</u>	Development of Electrochemical Reporter Assay Using HeLa Cells Transfected with Vector Plasmids Encoding Various Responsive Elements	<i>Anal. Chim. Acta</i>	640	87-92	2009
Takahashi Y. i, Miyamoto Shiku T., H., Asano R., Yasukawa T., Kumagai I., <u>Matsue T.</u>	Electrochemical Detection of Epidermal Growth Factor Receptors on a Single Living Cell Surface by Scanning Electrochemical Microscopy	<i>Anal. Chem.</i>	81	2785-2790	2009
Takahashi Y., Shiku H., Murata T., Yasukawa T., <u>Matsue T.</u>	Transfected Single Cell Imaging by Scanning Electrochemical Optical Microscopy with Shear Force Feedback Regulation	<i>Anal. Chem.</i>	81	9647-9681	2009
Murata T., Yasukawa T., Shiku H., <u>Matsue T.</u>	Electrochemical Single-Cell Gene-Expression Assay Combining Dielectrophoretic Manipulation with Secreted Alkaline Phosphatase Reporter System	<i>Biosens. Bioelectron.</i>	25	913-919	2009
Kodama A., <u>Yoshino O.</u> , Osuga Y., Harada M., Hasegawa A., Hamasaki K., Takamura M., Koga K., Hirota Y., Hirata T., Takemura Y., Yano T., Taketani Y.	Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells	<i>Hum. Reprod.</i>	25(3)	751-756	2010
Takamura M., Koga K., Osuga Y., Takemura Y., Hamasaki K., Hirota Y., <u>Yoshino O.</u> , Taketani Y.	Post-operative oral contraceptive use reduces the risk of ovarian endometrioma recurrence after laparoscopic excision	<i>Hum. Reprod.</i>	24(12)	3042-3048	2009
Shi J., <u>Yoshino O.</u> , Osuga Y., K., Hirota Y., Koga Hirata T., Yano T., Nishii O., Taketani Y.	Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin $\beta$ subunits, and anti-Mullerian hormone in human granulose cells	<i>Fertil. Steril.</i>	92(5)	1794-1798	2009
Shi J., <u>Yoshino O.</u> , Osuga Y., Nishii O., Yano T., Taketani Y.	Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulose cells	<i>Fertil. Steril.</i>	93	1273-1279	2009

### Ⅲ 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を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Ⅲ-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

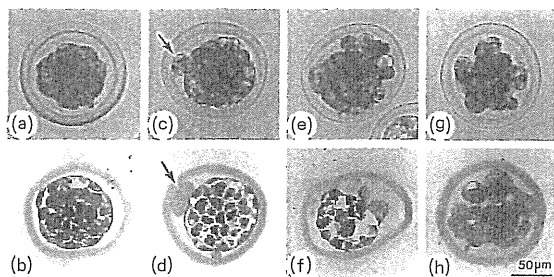


図 59-1. ウシ桑実胚の形態的クオリティー評価((a) (c) (e) (g) : ノーマルスキー微分干渉顕微鏡観察, (b) (d) (f) (h) : Semi-thin 切片 (1 μm, トルイジンブルー染色) 像)

細胞塊の形態とブ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 (Albiñan et al, 1990; Abe et al, 1999a; 1999b; Aguilar et al, 2002)。光学顕微



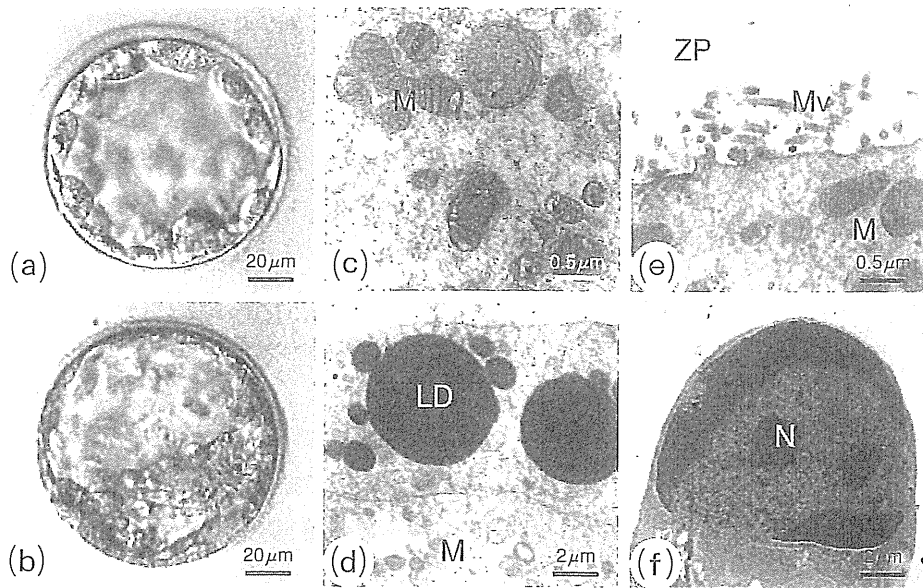
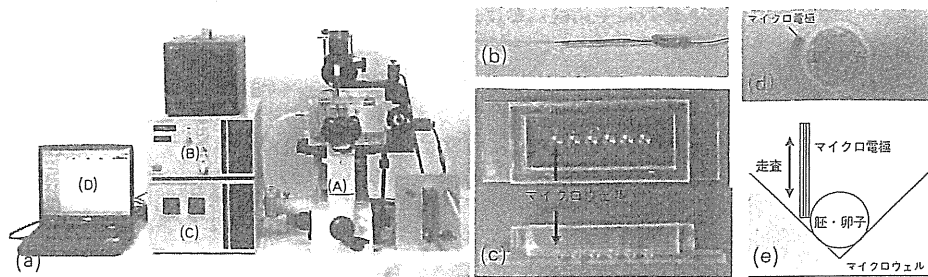


図 59-2. ヒト体外受精胚の光学顕微鏡像 ((a) (d): ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察) および電子顕微鏡像 ((b) (c) (e) (f))

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：ポテンショスタット，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 $2\sim 4\mu\text{m}$ 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的リン酸化反応 (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:  $F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ ) 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が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ョスタット, 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。

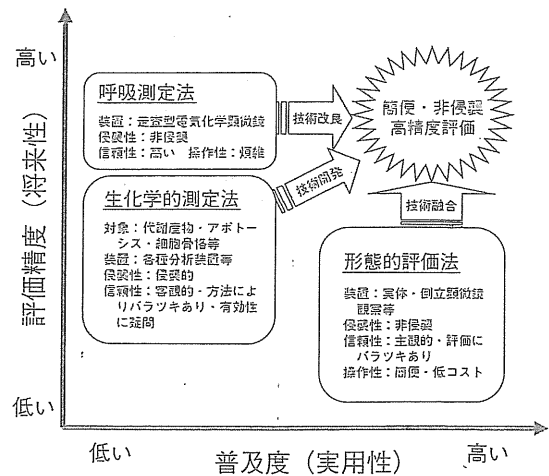


図 59-4. 卵子・胚クオリティー評価の現状と将来像を示した模式図

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。