

201216016A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

受精卵呼吸測定装置を用いた  
臨床試験に橋渡しするための安全性  
および有用性に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇都宮 裕貴

平成25(2013)年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

受精卵呼吸測定装置を用いた臨床試験に橋渡しするための 安全性及び有用性に関する研究 .....	1
宇都宮 裕貴	
(資料1) 研究課題のシェーマ	
(資料2) 第1回PMDA開発相談	
(資料3) 第1回受精卵活性測定デバイス開発会議	
(資料4) 第7回胚細胞呼吸測定装置研究会 (第1回厚生労働省班会議)	
(資料5) 第2回受精卵活性測定デバイス開発会議	
(資料6) 第3回受精卵活性測定デバイス開発会議	
(資料7) 第8回胚細胞呼吸測定装置研究会 (第2回厚生労働省班会議)	
(資料8) 受精卵細胞呼吸活性測定装置 (CRAS-1.0)	
(資料9) チップの電気化学的検証評価	
(資料10) 請負契約書と機器開発仕様書	

## II. 分担研究報告

1. 凍結融解が胚盤胞期胚の呼吸活性に与える影響と再凍結融解胚を 用いたIVF-ETの臨床結果に関する研究 .....	65
寺田 幸弘	
2. 細胞呼吸計測技術を応用した胚品質評価システムの開発 に関する研究 .....	71
阿部 宏之	
(資料1) 図1-6	
(資料2) 表1, 2	
(資料3) 英文論文	
3. 新規受精卵呼吸測定装置の開発 に関する研究 .....	107
志賀 尚美	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	111
---------------------------	-----



# I. 総括研究報告書

受精卵呼吸測定装置を用いた臨床試験に橋渡しするための  
安全性及び有用性に関する研究

主任研究者 宇都宮裕貴(東北大学医学部准教授)

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
総括研究報告書

受精卵呼吸測定装置を用いた臨床試験に橋渡しするための  
安全性および有用性に関する研究

研究代表者 宇都宮 裕貴 東北大学准教授

研究要旨

近年、生殖医療の需要は著しく増加しているが、多胎妊娠による母体合併症や低出生体重児の増加が大きな社会問題となり、現在は原則として単一受精卵（胚）移植が行われている。そのため着床能の高い優良な受精卵を選別することが非常に重要と考えられるようになった。従来、受精卵の形態学的評価のみで品質評価を行ってきたが、主観性が強く観察者間での結果に差が生じる可能性が高い。そのため、客観的で再現性のある高精度の評価方法が切望されている。我々はこれまでに受精卵の呼吸機能と卵品質が関連することに着目し、その有用性を報告してきた。この手法は非常に高感度である上に侵襲もない画期的な装置であると考えている。そのため、従来の主観的な形態学的評価に受精卵呼吸測定装置を用いた客観的な機能評価を加えることにより、優良卵の選別が可能になると考えている。しかしながら、①現行機器では操作性が煩雑である、②培養機から取り出して呼吸量を測定するため実際に培養されている湿潤環境で測定が行われていない、という問題点を抱えている。今回、3ヶ年計画の1年目として、まず始めに本装置の新規開発による操作性向上を図るとともに、現行機器以上の精度を有するかどうか検証するため下記の手順で研究を行った。

- ① 定期的な会議を開催し、新規デバイスの企画発案・試作を進めた。
- ② チップの試作品開発をパナソニック・ヘルスケア社、電気化学的検証を北斗電工社、そして機器開発の統括をクリノ社と共に行った。

今回、培養器内に受精卵を設置し、煩雑な操作なしに受精卵の呼吸量を測定できるキットの試作品を開発した。これは現行機器において不可能であった操作の単純化と湿潤環境保持を満たした機器である。10mmol/L フェロシアン化カリウムを含む0.1 mol/L塩化カリウム溶液中で、サイクリックボルタンメトリー（CV）を比較し、電気化学的性能を検討し概ね良好な結果が得られた。ただし、以下の課題も認められた。

- 課題点1：電極面積の規定（小サイズ化）
- 課題点2：電極表面汚れ
- 課題点3：CV波形の変動

今後、PMDAとの薬事戦略相談を行いながら測定機器として操作性および測定精度の一層の向上を図っていく。そして、開発した機器によるプロトコールを作成し、測定手技・評価方法の標準化を試みていく。

## 分担研究者

寺田幸弘 (秋田大学医学部教授)  
阿部宏之 (山形大学理工学部教授)  
志賀尚美 (東北大学医学部助教)

従来の主観的な形態学的評価に客観的な機能評価を加えることにより優良卵の選別が可能になり、将来的には体外受精において本機器の使用が標準診療となるよう繫げていきたい(資料1)。

本年度は現行機器の操作性および測定精度の一層の向上を目的に、新しいデバイスの開発を中心に研究テーマを遂行した。

## A・研究目的

近年、晩婚化や出産希望年齢の上昇に伴い生殖医療の需要は著しく増加している。しかしながら、多胎妊娠による母体合併症や低出生体重児の増加が大きな社会問題となり、生殖補助医療における多胎妊娠防止のため、原則として単一受精卵(胚)のみを移植することが提唱された。そのため、今後は着床能の高い優良受精卵を選別することが非常に重要と考えられるようになった。

獲得された複数の受精卵は、従来は形態学的所見のみで評価を行ってきたが、主観性が強く観察者間での結果に差が生じる可能性が高い(1, 2)。我々はこれまでに受精卵の呼吸機能と卵品質が相関することに着目し、研究分担者の阿部らとその有用性を報告してきた(3-8)。この手法は非常に高感度である上に侵襲もない画期的な装置と考えられている(7, 8)。受精卵呼吸測定装置のプロトタイプは研究分担者の阿部らが開発し、クリノ社が既に細胞呼吸測定機器(製品名CRAS1.0)として販売している。これまでにマウスや牛を用いて、その機器の有用性と安全性を報告している(5-7)。また、ヒト臨床検体においても、安全性および有効性が国内医療機関から報告されている(8)。しかしながら、現行機器を用いた正確な呼吸量測定には手技習得に多大な時間を要するため、標準診療に取り入れるにはハードルが高く、普及の妨げになることが予想される。

受精卵呼吸測定装置は、酸素消費の際に放出される陰イオンを測定し、生じた電位差から受精卵の呼吸量を算出するという世界的に見ても独創的で先駆けとなる機器である。

(参考文献)

- (1) Mio Y and Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol.* 199;660:e1-5. 2008
- (2) Okutsu O. Human embryo grading. *J Mamm Ova Res.* 25:90-7. 2008
- (3) Yamanaka M, Abe H, et al. Prediction for developmental competence of human blastocyst based on its oxygen consumption. *Fertil Steril.* 26:3366-71. 2011
- (4) Yamanaka M, Abe H, et al. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod.* 26:3366-71. 2011
- (5) Date Y, Abe H, et al. Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice. *Biosens Bioelectron.* 15;30:100-6. 2011
- (6) Moriyasu S, et al. Relationship between the respiratory activity and the pregnancy rate of bisected bovine. *Reprod Fertil Dev.* 19:219. 2007
- (7) Abe H. A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J Mamm Ova Res.* 24:70-8. 2007
- (8) Utsunomiya T, Abe H, et al. Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Mamm Ova Res.* 25:2-7. 2008

## B・研究方法

現行機器を用いて正確な呼吸量測定は可能であるが、その手技習得に約1ヶ月程度の多大な時間を要する。そのため、生殖医療における標準診療に取り入れるにはハードルが高く、普及の妨げになることが予想される。また、現行機器では、測定を培養器外で行うため、実際の培養機内環境における呼吸量を測定できているのか不明である。以上の問題点を踏まえて、一般診療に容易に取り入れられるよう新規デバイスの開発を下記のように遂行した。

### ① 定期的な会議を開催し、新規デバイスの開発を進めた。

1. 平成24年8月22日 (仙台)  
第1回PMDA開発相談 (資料2)
2. 平成24年9月6日 (東京)  
第1回デバイス開発会議 (資料3)
3. 平成24年9月8日 (山形)  
第7回胚細胞呼吸測定装置研究会  
(第1回厚生労働省班会議) (資料4)
4. 平成25年1月24日 (東京)  
第2回デバイス開発会議 (資料5)
5. 平成25年2月22日(テレビ会議)  
第3回デバイス開発会議 (資料6)
6. 平成25年3月3日 (仙台)  
第8回胚細胞呼吸測定装置研究会  
(第2回厚生労働省班会議) (資料7)

### ② 全自動受精卵呼吸測定装置の試作およびその機能評価を行った。

クリノ株式会社が開発した受精卵細胞呼吸活性測定装置CRAS-1.0 (資料8) は、不妊治療において受精卵の呼吸活性

を非侵襲的かつ定量的に測定し、母体に戻す最も良好と考えられる受精卵を選択するために使用する機器である。

本機器は、呼吸活性を測定する方法として針式のマイクロプローブを受精卵の近傍に移動し上下動の走査で測定する手動方法を採用している。非常に高感度で侵襲もないが、正確な呼吸量測定には手技の習得に時間を要する。そのため、従来機器の有用性が証明できたとしても標準診療に取り入れるためにはハードルが高く、普及の妨げになることが予想される。よって、本業務では初心者でも再現性の高い正確な結果が得られ、測定者による差異解消や測定のスPEEDアップを図るために、測定時に受精卵を測定ウェルにセットした後、全自動で測定出来るような新しい機器を開発する。すなわち、現行の針式プローブの走査による測定ではなく、測定ウェルに電極を埋め込んだチップ型プローブによる測定方法を採用する。具体的には下記の項目を行った。

- 1) チップ型プローブの設計・試作 (資料5)
- 2) チップ型プローブの電気化学的検証 (資料9)

チップに搭載された2-5  $\mu\text{m}$ 角電極の電気化学的性能を確認するため、10 mmol/Lフェロシアン化カリウムを含む0.1 mol/L塩化カリウム溶液中で、チップに搭載された電極と従来の受精卵呼吸量測定に用いている微小電極(直径10  $\mu\text{m}$ の白金線が封止されたガラスキャピラリー)のサイクリックボルタンメトリー(CV)を比較する。そして、得られた結果から問題点を抽出し、より最適化された機器の開発に結び付けていく。

なお、現段階では機器開発のみで倫理的問題はないが、将来的なヒト余剰胚(廃棄卵)を用いた研究は、東北大学倫理審査委員会の承認に加え、本研究事業の評価委員会での了承が得られた後に実施する。

## C・研究結果

① まず始めに、様々な専門家との打ち合わせを行い、新しい機器開発のデザインや手法、対費用効果、および有害性などの検討を進めた。

### 1. 平成24年8月22日 (仙台) 第1回PMDA開発相談 (資料2)

本相談では、従来機器の特性やその問題点を洗い出し、新しい機器開発における指針を相談した。重要な指摘としては、開発機器を「医療機器」または「測定機器」のいずれで承認を得るかという点であった。一般には生殖補助医療は保険診療ではなく、またこれまで使用している顕微鏡や顕微授精の機器などは全て医療機器としての承認を受けていない。そのため、本機器も「医療機器」ではなく「測定機器」として問題がないことが確認された。また、ヒトの受精卵に関して明らかな定義がなされていない点にも議論が及んだ。妊娠し母体の子宮内に存在する「胎児」は「ヒト」と同様に取り扱うことが規定されているが、「受精卵」に関してはまだ明確な定義付けはされていない。このことも、将来的な臨床研究を行っていくうえで大切な留意事項で考えられた。

### 2. 平成24年9月6日 (東京) 第1回デバイス開発会議 (資料3)

平成24年9月5日に本課題が採択されたため、直ちに機器開発に関連する企業がパナソニック・ヘルスケア社に集まり、今後の開発計画の打ち合わせを行った。以前より、本研究に関しクリノ社、パナソニック・ヘルスケア社と共同研究を行っており、今回の本課題採択に至る経緯および今後の研究計画を議論した。

次にパナソニック・ヘルスケア社のデバイス開発部門より、新規デバイスのデザインおよび製作工程に関して提案があった。

### 3. 平成24年9月8日 (山形) 第7回胚細胞呼吸測定装置研究会 (第1回厚生労働省班会議) (資料4)

東北6大学の生殖医療担当医とクリノ社が集まり、定例の胚細胞呼吸測定装置研究会に加えて、研究費取得に伴う初回の班会議を開催した。従来までの研究に加えて、新たなデバイス開発という大きなテーマが提示され、現行機器からの改良事項や要望などが議論された。

### 4. 平成25年1月24日 (東京) 第2回デバイス開発会議 (資料5)

定期的な打ち合わせ(メール・電話など)の後にデバイスの試作品(第1作)が完成したため、パナソニック・ヘルスケア社にて試作品開発の経緯、実物の検閲および問題点の指摘、さらに今後の試作品評価方法と改良について検討した。さらに、現在デンマークおよびスペインのグループが開発を試みている呼吸機能測定装置もとりあげ、我々の開発デバイスとの相違点や特許取得状況につき情報の共有を行った。

### 5. 平成25年2月22日(テレビ会議) 第3回デバイス開発会議 (資料6)

前回の試作品をもとに北斗電工社と共同でデバイスの電気化学的な評価を行った。幾つかの問題点が指摘され、その解決策を議論した。全体的には諸要件をみたく良好な出来であった。

### 6. 平成25年3月3日 (仙台) 第8回胚細胞呼吸測定装置研究会 (第2回厚生労働省班会議) (資料7)

再び、東北6大学の生殖医療担当医とクリノ社、研究分担者の阿部が集まり、これまでのデバイス開発経緯の紹介と、今後の研究計画について打ち合わせを行った。来年度以降、機器開発に伴う臨床研究の各施設における倫理申請や余剰卵のストックに関しても確認した。

② 次にこれまでの全自動受精卵呼吸測定装置の試作およびその機能評価を述べる。

これまでにパナソニック・ヘルスケア社のデバイス開発部門と検討を重ね、デバイスのデザインと8つの項目を検討した（詳細は研究分担者：志賀尚美の項で述べる）。操作性の簡便化はもとより、湿潤環境における計測による有用性の向上、受精卵に対する安全性、大量生産による経済性などを満たすことを条件に開発業務の委託契約を行った（資料10）。

そして完成した試作品に関して電気化学的な評価を行った（資料7）。

測定条件としては、

- ・測定系：HV-405
- ・10mmol/L フェロシアン化カリウムを含む0.1 mol/L 塩化カリウム溶液
- ・参照極：銀塩化銀電極 R-6（φ4 × 101、北斗電工製）
- ・カウンター電極：Pt 膜付き板（パナソニック作製）
- ・掃引：0→0.6→0→-0.2→0V
- ・掃引速度：20mV/s
- ・Cycle 数：5回

ガラス微小電極では、定常電流値11.6nAでは、デバイス社製チップでは、15nA程度で行った。

得られた結果は概ね想定範囲内で良好であったが、以下の課題が挙げられた。

○課題点1：電極面積の規定（小サイズ化）

今回の試作チップは電極部の被覆を手動でやっているため、電極面積の精度が出せなかったが、当初の目論見通り、リソグラフィの技術を使って被覆すれば問題ないと考えている。測定感度の問題から、少なくとも10nA以下を目指すのが望ましい。

次回試作チップに関しては、電極の不要部の被覆をリソグラフィの技術を用いて実施する予定として、設計を開始し

ている。リソグラフィ技術を用いて、電極部の5μm角以下の開口が可能なことはすでに確認が完了している（6nA レベルを想定）。被覆の材料としては、変質する可能性のないSiO<sub>2</sub>（ガラス）薄膜等を用いることを中心に検討する。

○課題点2：電極表面汚れ

クリーニング処理（±1.1Vで1秒ずつ、100回）を実施することで、CVの波形が良化する（電流値の立ち上がりシャープになり、良化する）現象が見られた。これは、電極表面の汚れが原因と考えられた。これはリソグラフィの工程中もしくは保管中における有機物等の異物付着が原因として想定される。当面はこれまでのデバイス同様、クリーニング処理を実施することで対応が可能だと考えているが、付着原因の解明および対策の検討を進める（例えば、工程中の洗浄強化やO<sub>2</sub>プラズマでの有機残渣除去を検討する）。

○課題点3：CV波形の変動

測定の繰り返し（電圧の印加）により、CVの波形が変化するものが存在する。また、+0.17V付近での酸化電流や-0.2V付近での還元電流（酸素の還元電流の可能性が高い）を生じるものが存在する。ただし、全てのチップで発生するわけではなく、個体差が見られる。徐々に、電流値が増加していくことから、不要電極部の被覆に用いているUV硬化樹脂（アクリル樹脂）の変質が疑われる。個体差が見られることから、材料そのものに起因する問題ではなく、UV硬化樹脂の硬化状態（未硬化部があると反応する）に問題がある可能性を想定している。まずは、接着剤の硬化度により、①CV波形の変化が見られるか、②不要な酸化電流・還元電流が見られるか、の2点の確認を実施する。その上で、UV硬化条件の厳密化もしくはUV硬化樹脂のSiO<sub>2</sub>・他の樹脂材料への変更を検討していく。



## D・考察

今回の測定において、本試作品のCV測定に関しては一定の成果が得られた。いくつかの課題が残ったが、いずれも解決可能なものと考えられる。今後、受精卵活性の測定感度を最大化するための電極配置・電極距離の検討を進めていき、測定機器としての実用化に向けて一層の精度向上を目指していく。

## E・結論

新しく開発している呼吸量測定装置の試作品は、我々が目的としている容易な操作性と湿潤環境を維持した測定が可能な機器である。今後一層の改良を加えその有用性と安全性を証明し、日常臨床に応用していくことが可能になると期待している。

## F・健康危険情報

特記事項無し

## G・研究発表

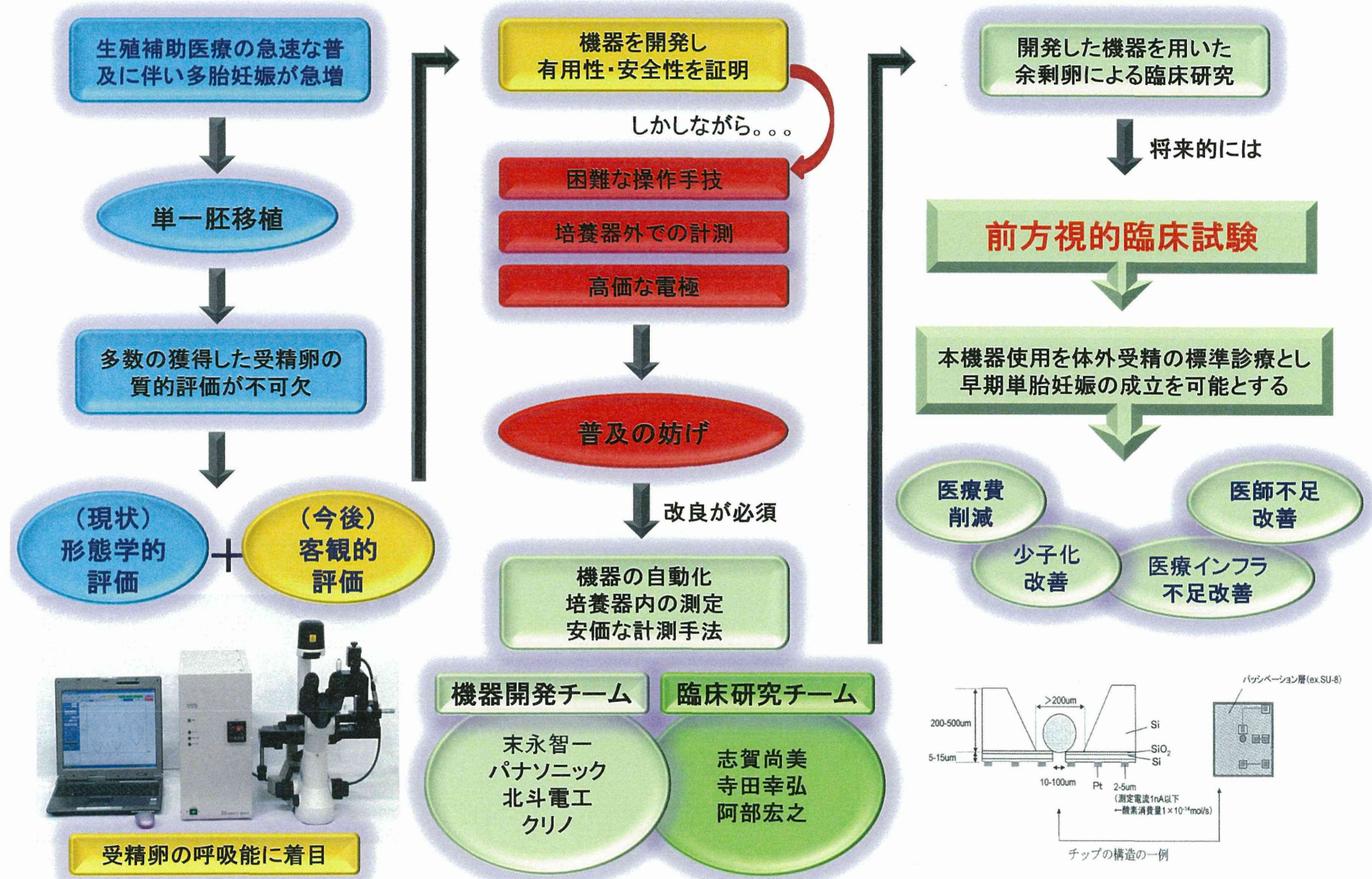
「III. 研究成果の刊行に関する一覧表」に別掲

## H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

(資料 1)

# 受精卵呼吸測定装置を用いた臨床試験に 橋渡しするための安全性および有用性に関する研究



(資料 2)



# 第1回 PMDA 開発相談 報告書

日時：平成24年8月22日（水）16:00～17:00

場所：東北大学臨床試験推進センター

まず宇都宮よりこれまでの研究の経緯を説明した（抜粋資料参照）。次に、製造販売承認取得までに我々は以下の相談事項に示すようなハードルがあると考えているが、開発計画策定・実行するにあたって特に注意すべきポイントやPMDAから求められる可能性の高い要求事項等を助言・指導を受けた。

## ① 機器改良・開発について

現機器は非常に好感度で侵襲もないため臨床試験にも直ちに使用できると考えられるが、正確な呼吸量測定には手技の習得に時間を要する。そのため、有用性が証明できたとしても標準診療に取り入れるためにはハードルが高く、普及の妨げになることが予想される。よってまず始めに、受精卵呼吸測定装置プロトタイプの改良を行う。具体的には、倒立顕微鏡とそのステージ部分を改良し、専用の容器に受精卵を入れボタン一つで測定電極がスキャンされ、初心者でも再現性の高い操作ができるよう機器の自動化を行う。自動化には、①測定電極の自動スキャン、②ステージ上での測定容器の固定、を行う必要がある。一般的にはどの程度の費用と改良期間を要するか、またこのような一部改良に際しどのような問題が生じたのか過去の事例などを参考に教えていただきたい。

⇒「受精卵はヒトか？」という質問が出た。厚生労働省では胎児までをヒトとして、まだ規定はされていない。この点は要するに「医療機器」なのか「医療機器ではなく測定機器」なのか、すなわち測定機器という位置づけならステップは軽くなる。

生殖医療に関しては、培養液や顕微鏡も医療機器ではないので、医療機器ではないという扱いでよいのではないかと？現在日本において生殖補助医療は保険診療ではなく私費診療であるため、医療機器という扱いは必須ではない。

受精卵がヒトであるかどうか、PMDAから厚生労働省に確認を取ってみる。

## ② 医療機器製造のQMS、第1種製造販売業資格をもつ企業との契約

現在、この機器は北斗電工、機能性ペプチド研究所が作成し、クリノ（株）社が販売

を担当している。しかしながら今後広く一般診療に取り入れていくにあたり、第1種製造販売業資格をもつ企業との契約が必須と考えている。これまでパナソニック・ヘルスケア社と直接話し合いを行い、研究協力を依頼している（正式な契約は成立していない）。

大手企業に共同機器開発を依頼するに際し、研究者側に必要な契約書の内容（資金なども含めて）で、留意する点を教えていただきたい。

⇒ 本研究は、将来的には前方視的な臨床試験を行い一般診療に取り込むのであれば、第1種製造販売業資格をもつ企業との提携は必須と考える。パナソニック・ヘルスケア社とであれば、これまでの知財や特許など機器開発・改良に十分に対応できると考える。

### ③ ヒト受精卵を用いた臨床試験の倫理的な承認

本機器は受精卵に触れることもなく侵襲はないと考えられているが、昨今生殖医療に対する世間の倫理的視点には厳しいものがあり、厚生労働省からも研究費の支給に際して厳しく審査されているのが実情である。他の領域も含めて、今後医療機器開発における倫理的に取り上げられる問題について教えていただきたい。

⇒ 専門ではないため詳細は不明だが、生殖医療における機器開発には十分な倫理的対応が要求される。最初の点とも重なるが、「医療機器」なのか「医療機器ではなく測定機器」なのかを含め、倫理委員会など正しい手順を踏んで対応していくのが妥当である。

(資料 3)

# 臨床研究ロードマップ

臨床研究  
関連

機器  
関連

平成24年度

平成25年度

平成26年度

平成27年度以降

PMDAとの開発相談

プロトコール  
作成

臨床研究

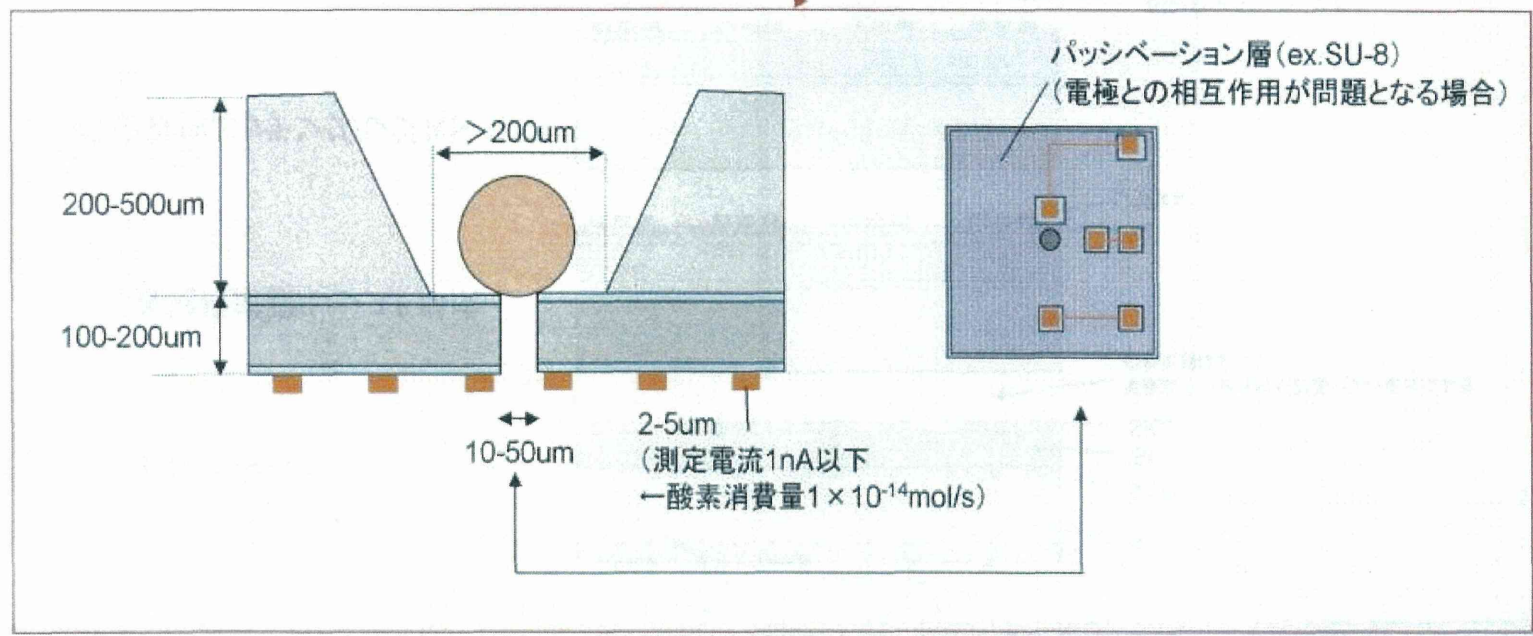
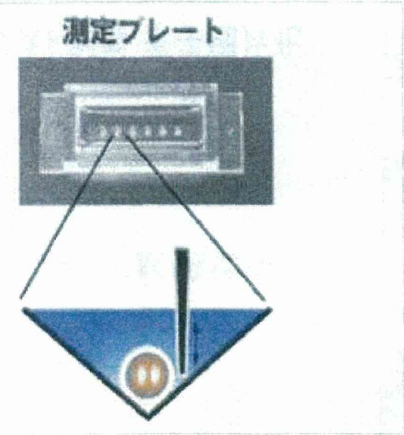
使用機器の改良

民間企業  
との機器  
共同開発

前方視的  
臨床試験

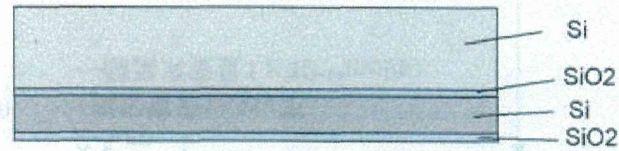


# 受精卵活性測定デバイス案①



# 受精卵活性測定デバイス案①(プロセス例)

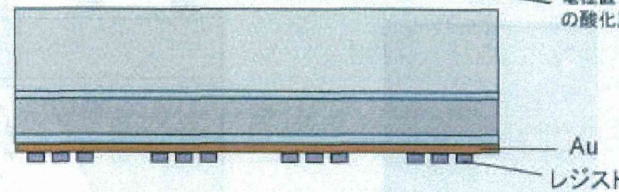
①SOIウェハ(片面酸化膜付き)



Si  
SiO2  
Si  
SiO2

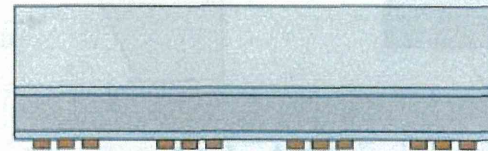
電極直下の絶縁性が問題でない場合は裏面の酸化膜は必要なし

②金電極成膜/レジスト形成



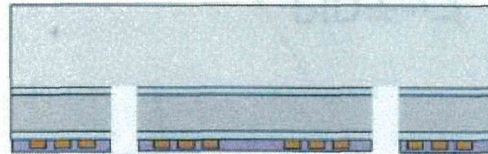
Au  
レジスト

③金電極エッチング/レジスト剥離

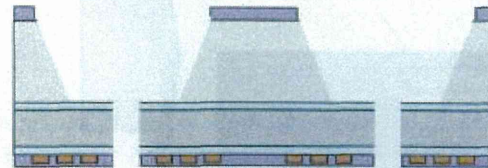


金のパッシベーション必要?  
(SU-8のパターニング)

④SiO2/Si/SiO2エッチング

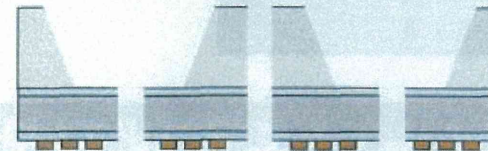


⑤裏面レジスト形成/裏面Siエッチング



本図では、Siのウェットエッチを採用。ドライエッチ(垂直)でも可?

⑥レジスト剥離/素子固片化



(資料 4)

# 第七回 胚細胞呼吸測定装置研究会

## (第1回 厚生労働省班会議)

日時：平成24年9月9日（日）7:00～7:40

場所：ホテルメトロポリタン山形

### プログラム

座長 東北大学 宇都宮裕貴

① 開会の辞

東北大学 八重樫伸生

② 各施設における進捗状況

各施設担当者

③ 本研究会の今後の具体的な方向性

東北大学 宇都宮裕貴

④ 閉会の辞

秋田大学 寺田幸弘

共催：東北トランスレーショナルリサーチ拠点形成ネットワーク協議会