

# 第七回 胚細胞呼吸測定装置研究会報告書

## (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 : メトロポリタン山形 3階

出席者(敬称略)

秋田大学 : 寺田幸弘、熊谷仁

東北大学 : 八重樫伸生、杉山隆、宇都宮裕貴、志賀尚美、西本光男、黒澤大樹、黒澤靖大、  
石橋ますみ、佐藤いずみ

山形大学 高橋俊文、五十嵐秀樹

弘前大学 福原理恵、福井淳史

福島医大 菅沼亮太、鈴木聡

山形大学 阿部宏之

### ① 開会の辞

八重樫 : 今回研究費が獲得できたこともあり、今後一層活発な研究遂行が期待される。

### ② 各施設における進行状況

弘前大学 : 従来型の機器による呼吸量測定と卵の質的評価を継続中。

秋田大学 : 寺田教授が秋田大学治験センター長に就任し、このようなシーズを実用化に結び付けることに関する発言があった。

山形大学 : 現在マウスの卵を用いた従来機器による検討を報告。

福島県立医大 : 現在、新しく発表できるよいデータは得られなかった。

岩手医大 : (今回欠席)

### ③ 本研究会の今後の具体的な方向性

宇都宮 : (PCを用いたプレゼンテーション)

厚生労働省の科研費がようやく9月に採択された経緯および直近に行われたPMDAとの開発前相談、機器共同研究開発会社(クリノ社、パナソニック・ヘルスケア社、北斗電工社)との開発相談につきスライドを用いて発表した(抜粋資料参照)。

また、今後のプロトコル作成(平成25年度を予定)で、具体的には何日目で胚の呼吸機能を図るのか等機器の開発と並行して行っていく。

さらに機器の自動化について、①電極の自動化(ハンドリングの問題があるため、ボタン

一つで安定化しないかクリノと阿部先生のところで検討中)、②チャンバーの開発(容器の方で測れないか)パナソニック社で検討中。これであればインキュベーターの中で測れるという意味で非常に有用この2本立てで進めている

#### ④ 閉会の辞

寺田：新しいデバイス、研究費も取れている。世界的に見ても現在いいポジションにいると思うので、夢を持ってやっていきたい。

次回開催は平成25年度末頃予定。



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 (H24-被災地域-指定-016)

研究代表者 宇都宮 裕貴

1) 研究背景

2) 研究目的

3) 研究計画

4) 研究成果

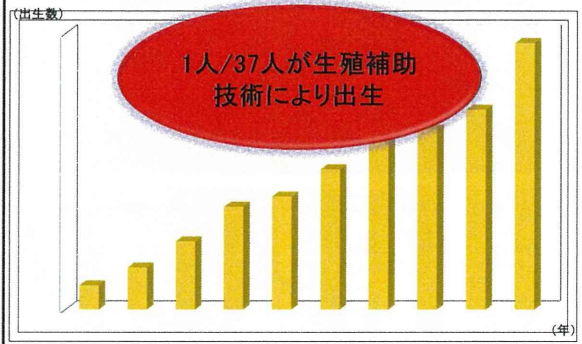
1) 研究背景

2) 研究目的

3) 研究計画

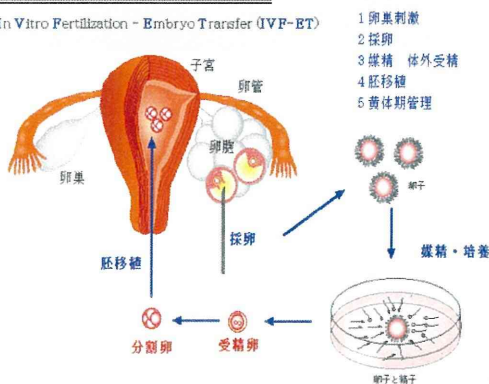
4) 研究成果

生殖補助技術による出生児数の  
年次別推移(日本産婦人科学会)



体外受精-胚移植の流れ

In Vitro Fertilization - Embryo Transfer (IVF-ET)



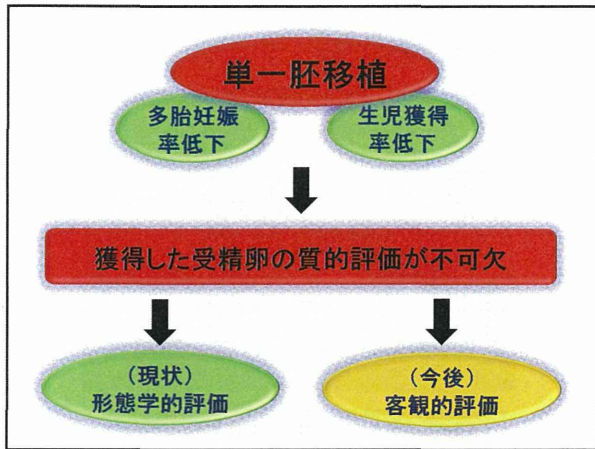
不妊治療の現状 ~課題~

近年、生殖補助技術の普及に伴い多胎妊娠率の上昇が大きな問題となってきた

好都合 単一胚移植 出生児

2008年4月 日本産婦人科学会  
生殖補助医療における多胎妊娠防止に関する見解





**受精卵の形態的クオリティー評価**

**Gardnerの分類 (胚盤胞)**  
 胚腔の大きさ(1-6)、内細胞塊の細胞数(A~C)、外細胞層の細胞数(A~C)の3点で評価している。

**Veekの分類 (分割胚)**  
 割球の状態とフラグメンテーションにより Grade1(良好胚)~5(不良胚)に分類される。

**ウシ受精卵の質的評価とミトコンドリア**

A rank B rank C rank D rank  
 High quality Low quality

クオリティー良好卵  
 ミトコンドリア(M)のサイズの増加やクリステの拡張がみられる。

クオリティー不良卵  
 ミトコンドリアは未熟な形態を呈している。

ミトコンドリアの発達と受精卵の質は相関する  
 ⇒ 良好卵は酸素消費(=呼吸)量が多い

*Abe et al. Theriogenology, 2002*

**受精卵呼吸測定装置**

呼吸解析ソフト  
 ポテンシオスタット  
 Z軸ステージ (マイクロ電極コントローラー)  
 倒立顕微鏡

**機器の原理**

高感度  
非侵襲的

電極  
 還元電流  
 電極  
 O<sub>2</sub> 濃度 (high/low)  
 上下にスキャン  
 受精卵  
 Resistor (kΩ)  
 Time (s)

**ウシ体外受精卵の呼吸量と発生能**

呼吸量 (F × 10 <sup>14</sup> /mol s <sup>-1</sup> )	測定した胚数	胚盤胞に発生した胚数 (%)	ハッチングした胚盤胞数 (%)
F ≥ 1.0	56	50(89.3)	35(62.5)
0.8 ≤ F ≤ 1.0	44	34(77.3)	20(50.0)
F < 0.8	107	49(45.8)	28(26.2)

呼吸量が多い受精卵の方が発生能が高い

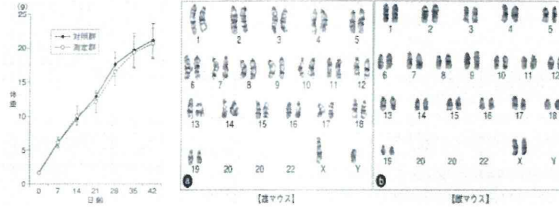
*Abe et al. J. Mamm. Ova Res., 2004*



### マウス胚移植試験の成績

実験区	受容雌 (雌)	移植胚数 (個)	移植胚の平均呼吸量 [ $\times 10^{-14}$ mol/s]	分娩した受容雌 (匹)	分娩率 (%)	産子数 (匹)	産子率 (%)
測定群 (0.70以上)	16	170	0.85 $\pm$ 0.01	12	12/16* (75.0)	67	67/170* (39.4)
対照群	18	175	-	7	7/18 (38.9)	41	41/175 (23.4)

\*P<0.05



### ヒト胚の呼吸量測定とミトコンドリアの発達

胚発生ステージ	測定胚数	酸素消費量 ( $\times 10^{14}$ /mol $\cdot$ s $^{-1}$ )
2~8細胞	18	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
桑実胚	5	0.61 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>
初期胚盤胞	13	0.72 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
胚盤胞	4	1.00 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>



a 2細胞期胚。未成熟な形態のミトコンドリア (M)  
b 胚盤胞期胚。拡張したクリステ構造を持つ発達したミトコンドリア (矢印)

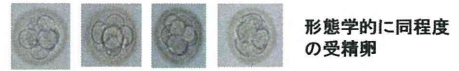
### ヒト受精卵における形態的評価と呼吸量

Morphology of embryos	4-cell Grade 1	4-cell Grade 1	6-cell Grade 2	6-cell Grade 2	8-cell Grade 2	8-cell Grade 2
Classification by Veeck method	4-cell Grade 1	4-cell Grade 1	6-cell Grade 2	6-cell Grade 2	8-cell Grade 2	8-cell Grade 2
Oxygen consumption ( $F \times 10^{14}$ /mol $\cdot$ s $^{-1}$ )	0.25	0.44	0.57	0.23	0.71	0.35

形態的評価と受精卵呼吸量は必ずしも一致しない

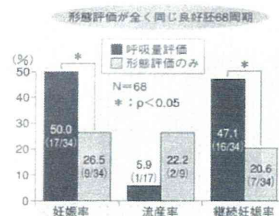
Utsunomiya et al. J Mamm Ova Res, 2008

### ヒト受精卵における臨床研究①



評価方法	患者数	妊娠率 (%)
形態学的評価 + 呼吸量測定	14	9 (64.3)
形態学的評価のみ	18	7 (38.9)

### ヒト受精卵における臨床研究②



- 呼吸量評価を行った群での出産例における平均出生体重は2906g、形態評価のみの群の2720gと有意差はなかった。
- 呼吸量評価群においても健康な出生を確認した。

### 現在までの研究進捗状況

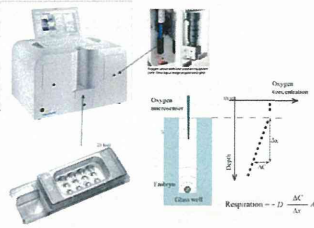
ウシ・ヒトの受精卵の呼吸量はミトコンドリアの発達に相関し、卵の質評価の指標となる (共同研究者: 阿部宏之ら)

マウス・ウシ・ブタにおける受精卵呼吸測定装置の有用性および安全性を確認 (共同研究者: 阿部宏之ら)

倫理委員会承認を得たのちに、ヒト受精卵を用いた有用性および安全性を確認 (セント・ルカ、IVFなんばクリニック)

## 世界での開発状況

・Spain & Denmark 合同チーム



・北米・アジアなどでは報告なし

1) 研究背景

2) 研究目的

3) 研究計画

4) 研究成果

## 胚細胞呼吸測定装置研究会

平成22年10月13日  
第1回(仙台市)  
「立ち上げ」

平成23年2月4日  
第2回(仙台市)  
「機器設置報告」

平成23年6月5日  
第3回(弘前市)  
「手技習得」

平成23年9月25日  
第4回(秋田市)  
「データ報告」

平成24年6月16日  
第5回(秋田市)  
「データ報告」

平成24年7月14日  
第6回(仙台市)  
「今後の方針」

## 現状における問題点

機器の自動化  
一般診療への普及

高価な電極

## 機器の自動化

① chamberの開発

② 電極移動の自動化

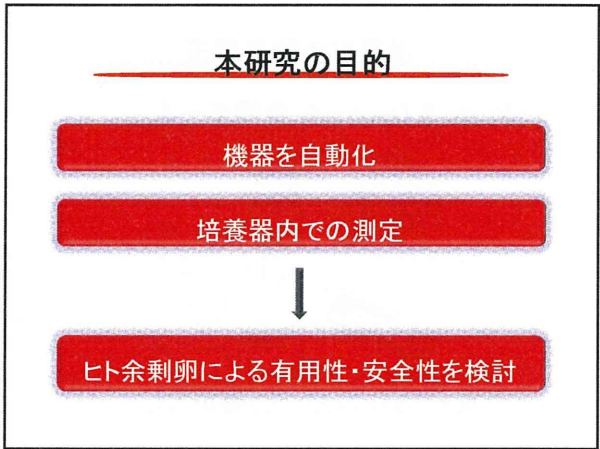
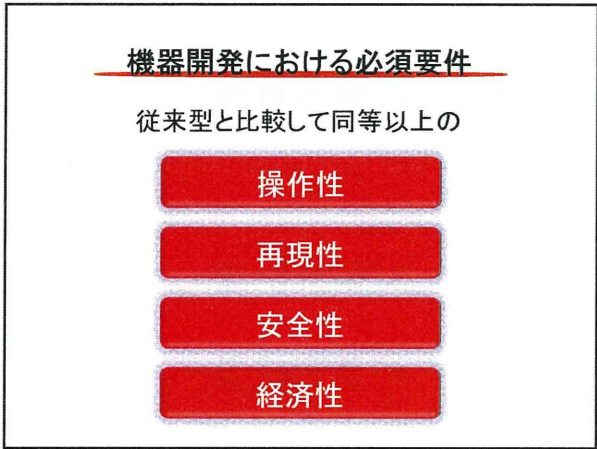
① chamberの開発 ② 電極移動の自動化

長所

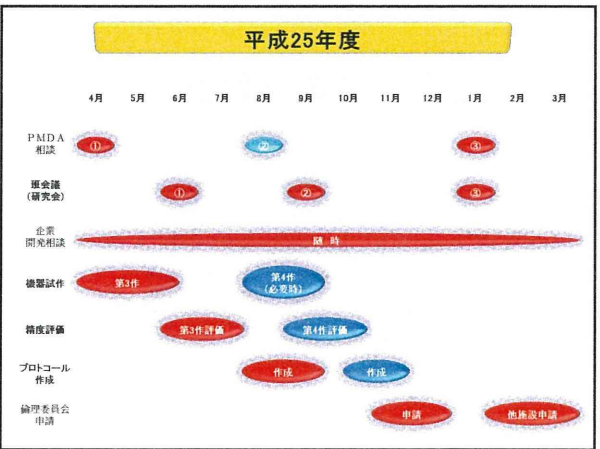
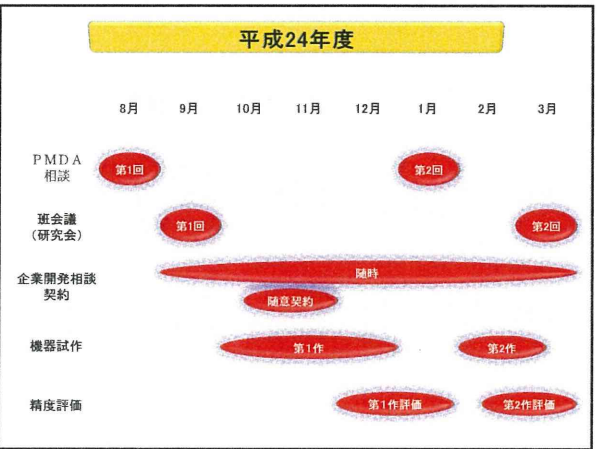
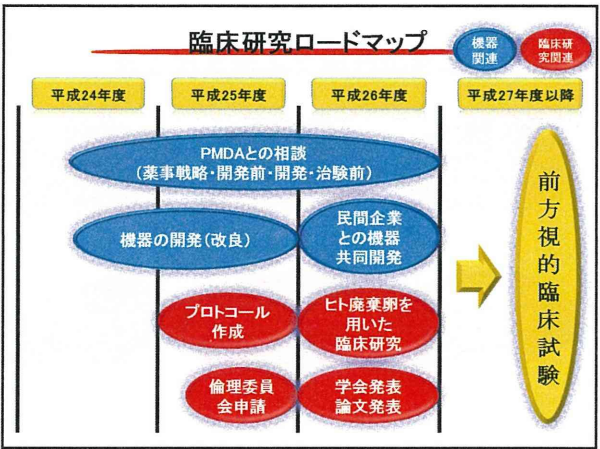
- ・培養器中で測定可能
- ・手技が非常に容易
- ・開発が容易
- ・解析方法が既に確立
- ・手技が容易

短所

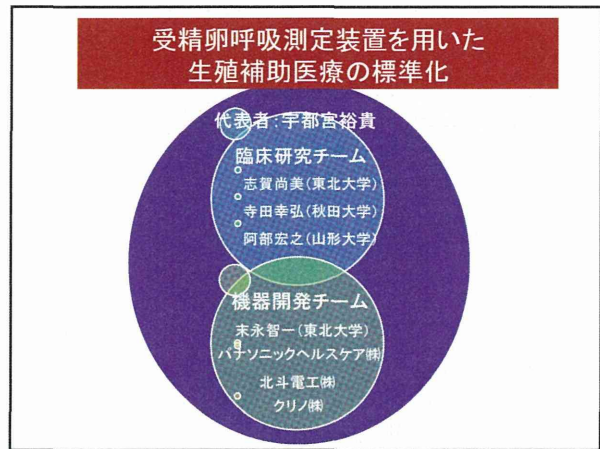
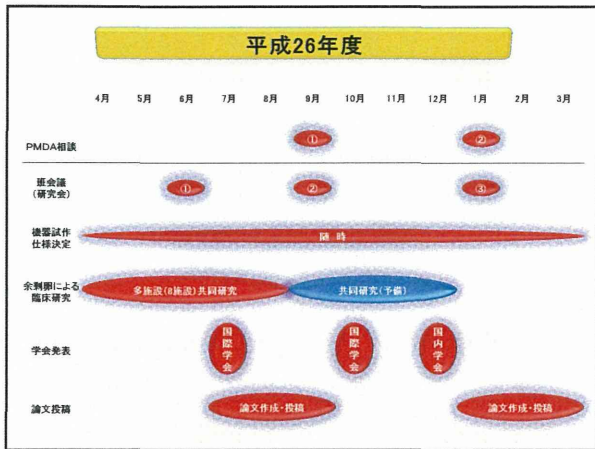
- ・開発に高度な技術力
- ・新たな評価方法の確立
- ・従来型と同様に培養器外で測定



- 1) 研究背景
- 2) 研究目的
- 3) 研究計画
- 4) 研究成果

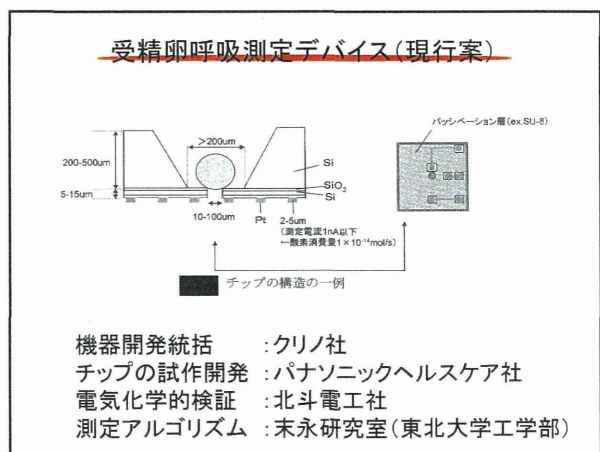
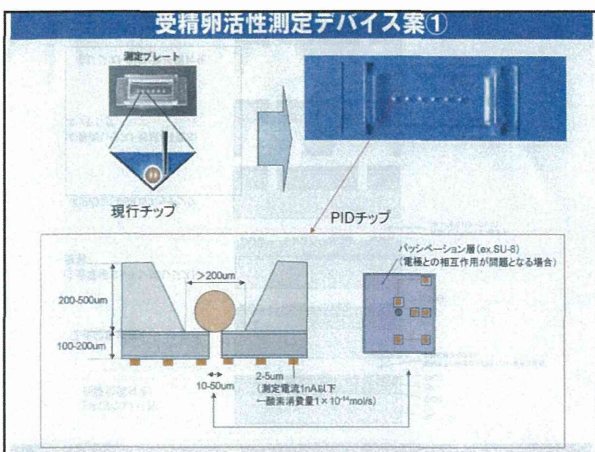






- 1) 研究背景
- 2) 研究目的
- 3) 研究計画
- 4) 研究成果

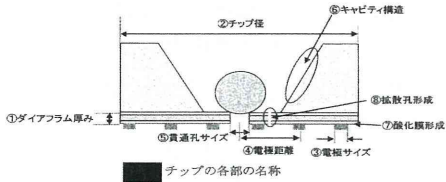
- 採択からこれまでの進捗状況
- 平成24年8月22日 PMDA相談(薬事戦略相談)
  - 平成24年9月 5日 研究費採択
  - 平成24年9月 6日 開発相談(東京)
  - 平成24年9月 8日 研究会(班会議)開催(山形)
  - 適宜、機器作成・改良に関する打ち合わせ
  - 平成24年11月中 随意契約



チップ評価項目

ターゲットとなる構造（各部の寸法等）を絞り込むため、以下の構造に関して最適化を行う予定。各部の名称に関して図2に示す。それぞれの寸法を持つチップパターンを評価用プロセスマスクに組み込んでおり、一括でそれぞれのチップを作成することができるため、迅速な構造校込みが可能であると目論んでいる。

- ①ダイアフラム厚み (5~15um)
- ②チップ径 (φ1mm, φ2mm, φ5mm)
- ③電極サイズ (2um角, 5um角)
- ④電極距離 (受精卵位置からの距離) (5~300um)
- ⑤貫通孔サイズ (10, 20, 50, 100um)
- ⑥キャビティ構造 (垂直、テーパ、受精卵からの距離)
- ⑦酸化膜形成 (有り、無し)
- ⑧拡散孔形成 (有り、無し、拡散孔配置および大きさ)



受精卵呼吸機能測定装置により  
単一受精卵移植後の早期単胎妊娠の成立

不妊診療期間  
の短縮化

未熟児の減少

母体合併症の  
減少

医療費削減

医師不足解消

少子化改善

医療施設不足解消

(資料 5)



## 打合せ項目

2013年1月24日 13:00～14:30

1. チップ試作  
進捗報告  
評価方針、スケジュール  
ディスカッション
2. EmbryoScope (Unisence社製) タイムラプス法への見解
3. Alberto Tejera (バレンシア大)の知財調査状況報告
4. 打合せ議事録

# 受精卵活性測定デバイス 打合せ

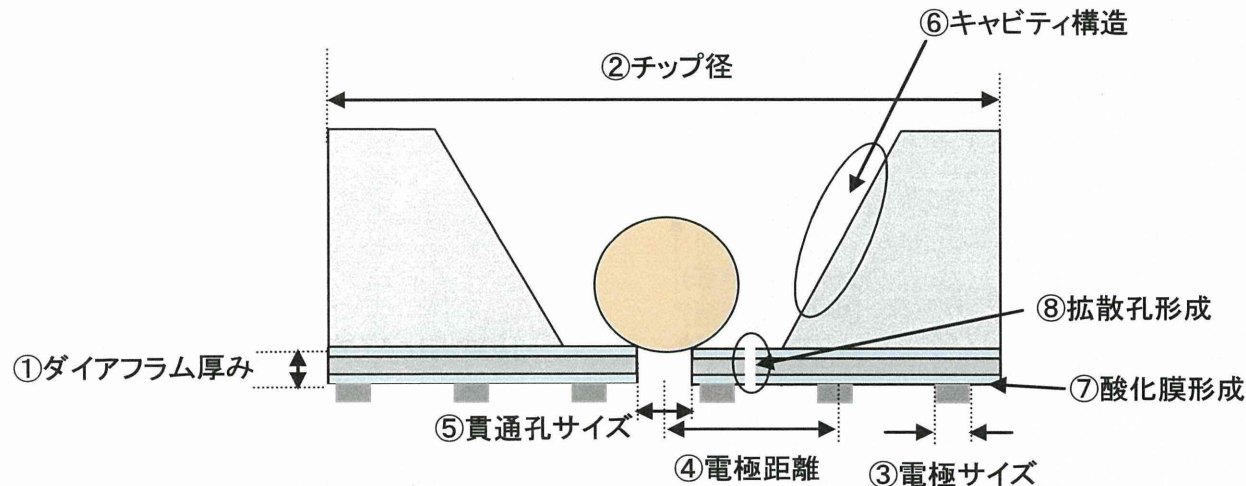
## 1. チップ試作

進捗報告

評価方針、スケジュール

ディスカッション

# 受精卵活性測定デバイス（一次試作計画）



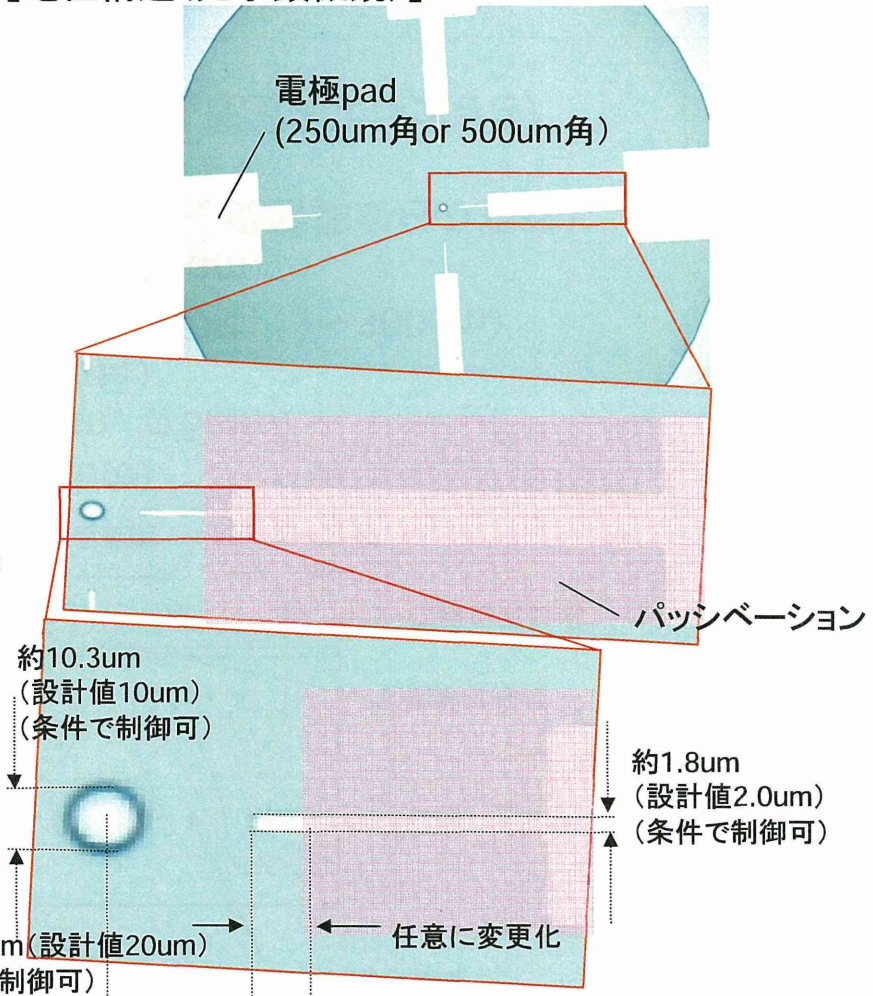
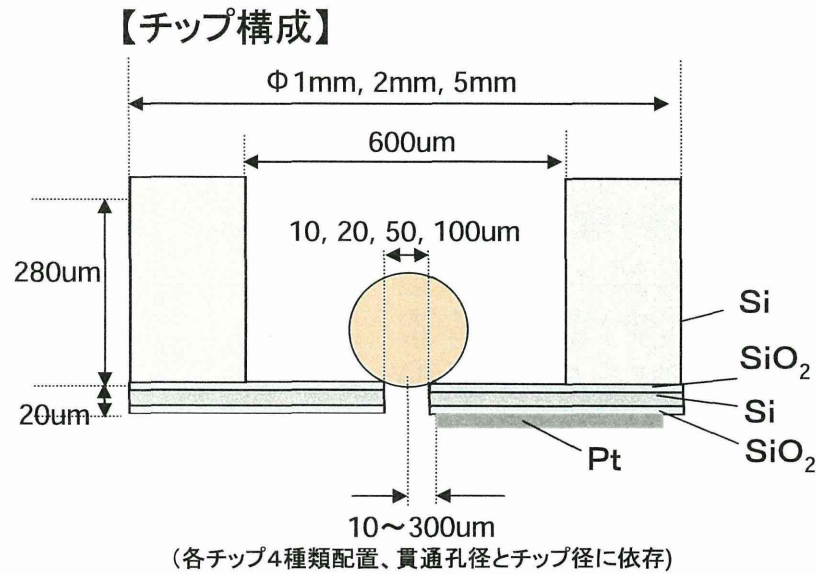
- ①ダイアフラム厚み (5~15um)
- ②チップ径 ( $\phi$  1mm、 $\phi$  2mm、 $\phi$  5mm)
- ③電極サイズ (2um角, 5um角)
- ④電極距離 (受精卵位置からの距離) (5~300um)
- ⑤貫通孔サイズ (10, 20, 50, 100um)
- ⑥キャビティ構造 (垂直、テーパ、受精卵からの距離)
- ⑦酸化膜形成 (有り、無し)
- ⑧拡散孔形成 (有り、無し、拡散孔配置および大きさ)

酸素濃度勾配感度シミュレーションの結果を踏まえて、仮パラメーターを決定



# 受精卵活性測定デバイス（一次試作現状）

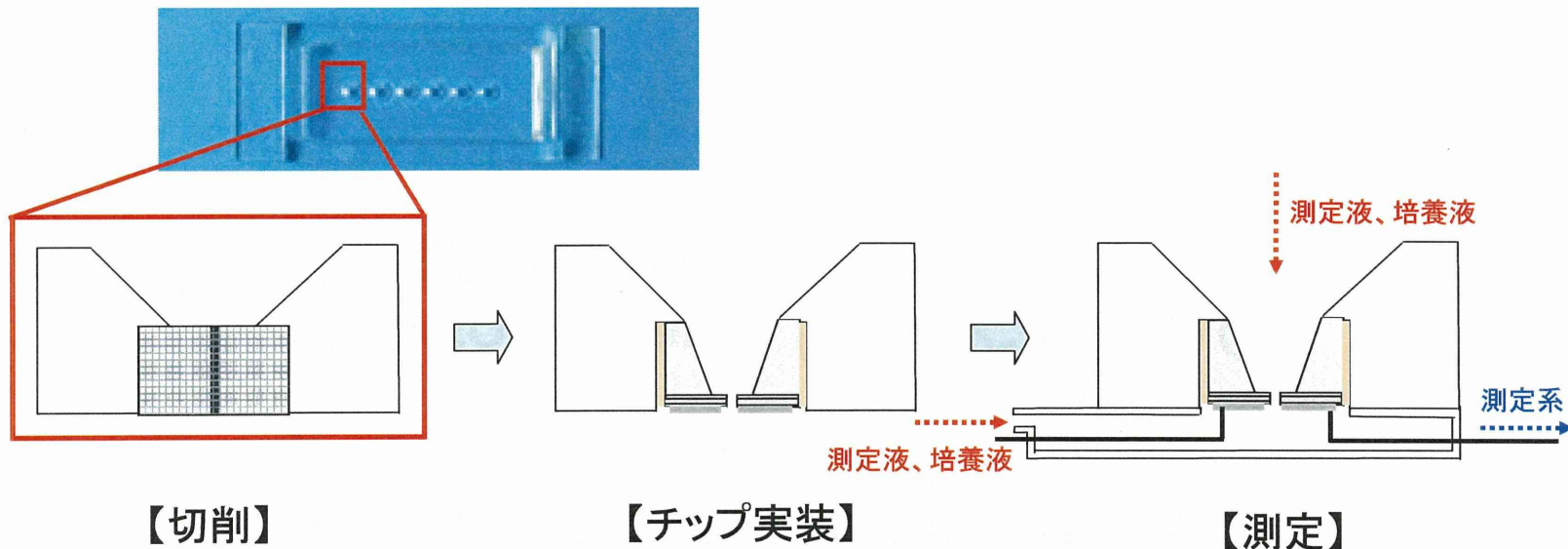
【電極構造（光学顕微鏡）】



ほぼ狙い通りの形状を有したチップが完成  
北斗電気様での試作評価に向け、実装検討中、他の形状に関しては並行して作製

# 受精卵活性測定デバイス（試作測定評価）

従来の樹脂プレートに切削加工して、試作チップを実装、評価



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、電気化学的性能を確認予定。

項目/日程	1月	2月	3月
チップ試作	1次試作	2次試作	他構造試作/検討
CV評価		弊社内部検討	北斗電工様測定
樹脂プレート試作		試作/実装検討	

# 受精卵活性測定デバイス 打合せ

2. EmbryoScope (Unisence社製)  
タイムラプス法への見解
3. Alberto Tejera (バレンシア大)の  
知財調査状況報告



## ■タイムラプス法への見解



UNSENSE社 Embryoscope に搭載されている12チャンバープレートを6プレート同時に無加湿環境で培養(計72チャンネル)  
卵の時系列画像記録機能＝タイムラプス法

2012年、株式会社ナカメディカルが輸入販売開始した。

2012年11月の日本生殖医学会にて機器の実物確認。関連発表及び宇都宮先生の評価として、臨床価値がないとの認識が広がっているとのこと。画像による患者、学生へのアピール、教育効果はあるとの認識。

パナソニックヘルスケアとしても、呼吸測定機能のような新たな卵の評価指標提示にはならないと評価した。

# Alberto Tejera (バレンシア大)の知財調査状況報告

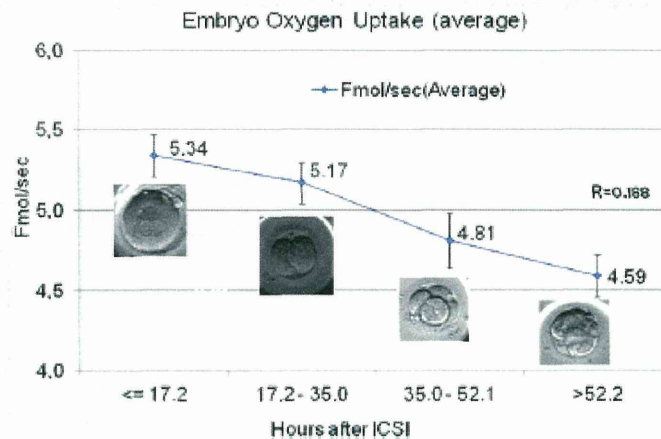
ORIGINAL ARTICLES: ASSISTED REPRODUCTION

## Time-dependent O<sub>2</sub> consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos

Alberto Tejera, Ph.D., Javier Herrero, Ph.D., Tamara Vilorio, Ph.D., Josep Lluís Romero, M.D., Pilar Gamiz, Ph.D., and Marcos Meseguer, Ph.D.

Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

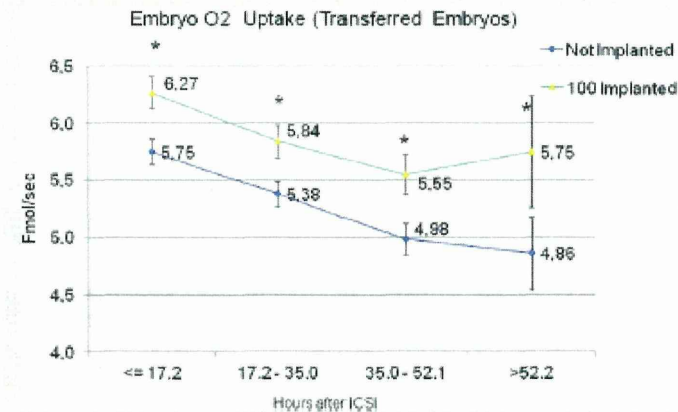
FIGURE 1



Time-dependent embryo O<sub>2</sub> consumption. Averages in each of four time ranges.

Tejera. O<sub>2</sub> consumption changes depending on embryo stage. *Fertil Steril* 2012.

FIGURE 2



Time-dependent embryo O<sub>2</sub> consumption. Averages from transferred embryos in each of the four time ranges depending on implantation success. \*Significant difference ( $P < .05$ ) between implanted embryos and nonimplanted embryos.

Tejera. O<sub>2</sub> consumption changes depending on embryo stage. *Fertil Steril* 2012.



## ■Alberto Tejera (バレンシア大)の知財調査状況報告

This study used automated OC rate measurements with microsensors to characterize individual human embryos from fertilization to immediately before transfer. The instrument (Embryoscope, version C; Unisense Fertilitech) is an incubator system with control of temperature and gas composition. This instrument has an optional microsensor, (OX50, tip diameter 40–60 mm; Unisense Fertilitech). It is a miniaturized Clark-type oxygen sensor with insignificant OC. Calibration was performed by first submerging the microsensor in 0.1 mol/L alkaline sodium ascorbate (0% O<sub>2</sub>) and then in the medium inside the beaker (20% O<sub>2</sub>). This kind of sensor facilitates automatic measurements of the OC for each individual embryo based on a steady-state respirometer principle.

UNSENSE社 Embryoscope Version C (酸素代謝測定機能搭載)による測定がなされている。

同装置は2009年 EU, 2011年 FDA(510K)取得

宇都宮先生より、Version D で本機能削除とのこと。

### Questions and Answers - EmbryoScope™

*The EmbryoScope™ is a time-lapse system developed to improve IVF treatments. Recent clinical results revealed novel embryo selection criteria that will be evaluated in prospective trials. The instrument is based on more than 7 years of research and uses several proprietary technologies; it was approved for clinical use in EU in June 2009, and has recently been cleared by FDA (510k) for use by US clinics.*



## ■Alberto Tejera (バレンシア大)の知財調査状況報告

### ■特許調査

#### (ガラス電極様の電気化学による酸素濃度測定に関する技術調査)

PCT出願公開なしを確認後、USPで拡大調査

式No.	登録件数	検索項目	条件式
S001	47,001	全文	embryo
S002	1,188,633	全文	quality
S003	715,872	全文	oxygen
S004	566,731	全文	consumption
S005	303,857	全文	evaluate
S006	491,349	全文	evaluation
S007	169,748	全文	oval
S008	60,458	全文	egg
S009 	2,445	論理式	(S001+S007+S008)*S002*S003*S004*(S005+S006)

2013年1月時点で出願情報なし、但し、

クラーク電極方式によるメタン濃度測定特許あり(既調査済み)

ルミノホア層による酸素濃度依存発色測定による特許あり(既調査済み)

関連キーワードによるUSP網羅調査 2,445件中にも該当開示情報なし

試作チップに関連するUNISENSE社知財の存在確認できず。