

(資料 9)

日時： 2013年2月27日 試作品の電気化学的検証

場所： 北斗電工厚木工場

内容：

相互質疑の後、実験による電気化学反応測定(Cyclic Voltammetry)にて電極評価実施。

1. P a n a 送付資料に関する質疑

卵子の貫通孔への配置はどのように？

テーパー（キャビティの構造）の工夫、陰圧など、

下部の閉鎖空間の酸素供給は？

要確認

気泡の混入は？

浸水処理などで培養液は入り込むのでOK

酸素濃度勾配のシミュレーションは？

一応酸素消費勾配をシミュレーションしている

電極はPtを蒸着？

Yes. いらないところをエッチング

電極パッドのところでリードをとる？

Yes.

リードはそれぞれ独立でリードが出てくる？

Yes.

液漏れの問題は？

対応は可能。

マスクの部分の制御ができていない？

今回のみの問題。リソグラフィを使えば可能。

プレート加工、気泡の課題については構想と実績を説明（久本）

実測時のチップの固定は？

リード線で支持して、じゃぶづけ

5 μ スクエアにすれば球面拡散と考えてよい。

受精卵を入れた後に酸素濃度勾配が乱れて落ち着くまで

卵での検討については波根藻（？）で検討していた（北斗）、乳がん細胞で評価も。

今回は電極の出来を評価すること？

Yes. 牛受精卵の場合は100 pAながれている。

今回の電極は被服が正しくされている電極を持参されている。

ポテンシostatの仕様にあわせ込むことが課題？かも。

卵子にくっついている状態で20 pA程度の変化を検出しなければならないため、小さい電極が必要。

現行の埋め込み電極は卵子から数十 μm ほどはなれている。

現行電極法は底近くから160 μm 可動範囲で動かしている。

2. 北斗電工での測定の総括

【結果】

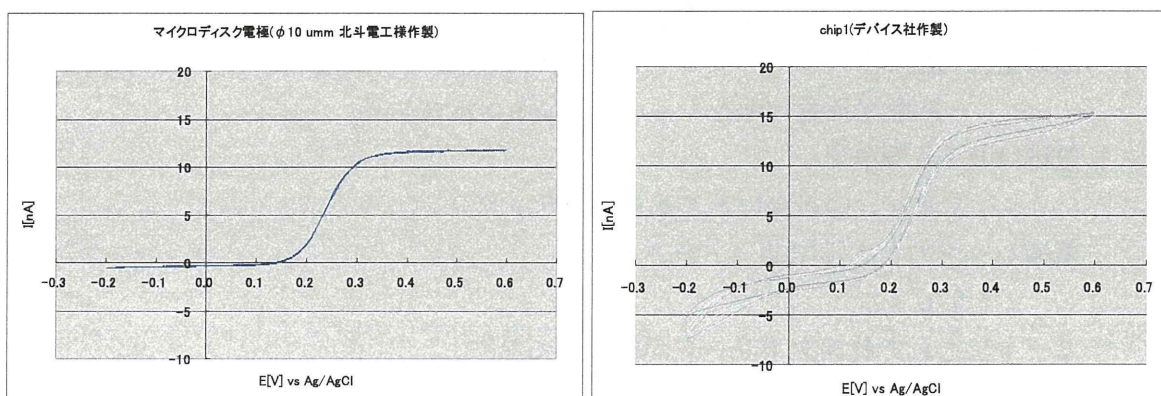


図1：北斗電工製マイクロディスク電極とデバイス社製チップの現状比較

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 ($\phi 4 \times 101$ 、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 程度であった。

【現状での課題点】

○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。

○課題点 2：電極表面汚れ

クリーニング処理（ $\pm 1.1\text{V}$ 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がシャープになり、良化する）現象が見られた。これは、電極表面の汚れが原因だと思われる。

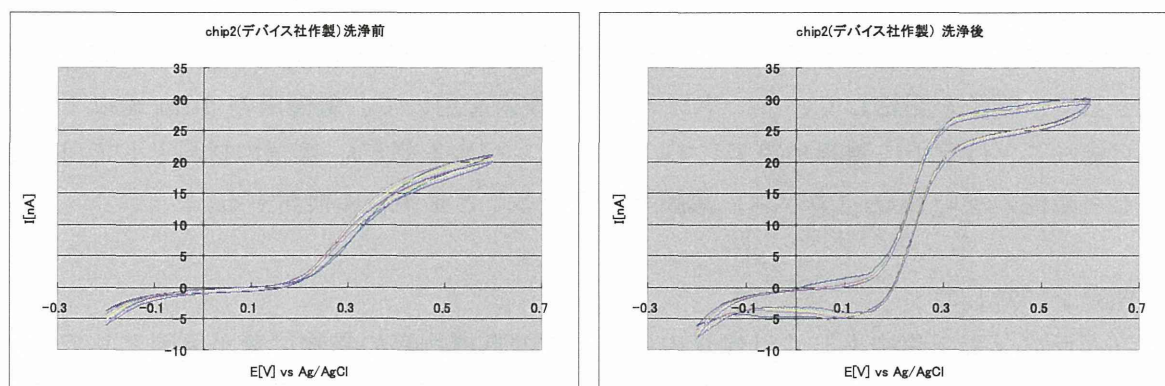


図 2：クリーニング前後での CV 波形変化

○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、 $+0.17\text{V}$ 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。

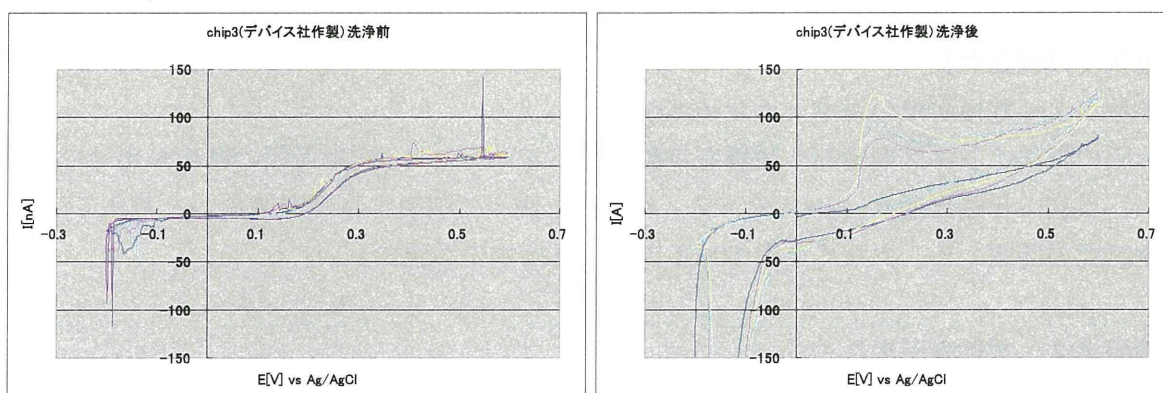


図3：繰り返しの電圧印加による CV 波形の変動

【課題に対するアクションアイテム】

○課題点1に対して：

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 5 μm 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 SiO₂ (ガラス) 薄膜等を用いることを中心に検討する。

○課題点2に対して：

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 O₂ プラズマでの有機残渣除去）。

○課題点3に対して：

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 SiO₂・他の樹脂材料への変更を検討していく。

【今後の検討】

今回の測定において、課題はあるものの、CV 測定に関しては一定の目処がついたと思っている。今後は、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く。

(資料 1 0)

請負契約書

件名 「全自動受精卵呼吸測定装置の試作」業務

請負金額 金 8,937,600円也
(うち、消費税額及び地方消費税額 425,600円)

発注者 国立大学法人東北大学 理事 佃良彦 と 受注者 クリノ株式会社 代表取締役 佐竹典明との間において、上記の業務(以下「業務」という。)について、上記の請負代金額で、次の条項によって請負契約を結ぶものとする。

第1条 受注者は、別紙の仕様書に基づき業務を誠実に履行するものとし、発注者はその対価として代金を支払うものとする。

第2条 業務の実施場所は、東北大学医学部・医学系研究科の指定する場所とする。

第3条 業務の実施期間は、平成25年1月7日から平成25年3月29日までとする。

第4条 業務完了報告書は、東北大学医学部・医学系研究科財務室用度係に提出すべきものとする。

第5条 代金は、業務完了検査終了後、発注者が受注者からの適法な請求書を受理した日の翌月25日までに1回に支払うものとする。

第6条 代金の請求書は、東北大学医学部・医学系研究科財務室用度係に送付すべきものとする。

第7条 受注者又はその使用する者は、業務上知り得た秘密を第三者に漏らし、又は他の目的に利用してはならない。

2 前項の規定は、この契約が終了し、又は解除された後においても同様とする。

第8条 受注者は、第三者に対し業務の全部もしくは一部の実施を委任し、又は請け負わせてはならない。ただし、業務の一部を第三者に請け負わせる必要がある場合は、あらかじめ発注者の書面による承諾を得るものとする。

2 前条の規定は、第三者に業務の一部を請け負わせる場合にも適用する。

第9条 業務実施に関して、受注者は、故意又は過失、その他受注者の責に帰すべき事由により発注者又は第三者に損害を与えた場合には、受注者はその損害を賠償しなければならない。

第10条 受注者は、この契約により生ずる権利または義務を、発注者の書面による承諾を得ずして、第三者に譲渡し、又は承継させてはならない。ただし、あらかじめ発注者の承諾を得た場合はこの限りでない。

第11条 発注者は、受注者が本契約に定める義務を履行しないとき、及び契約の締結又は履行について不正な行為があったときは、本契約を解除することができる。

第12条 受注者の都合により本契約を解除できないものとする。ただし、発注者の責に帰すべき理由のある場合を除くものとする。

第13条 発注者は、この契約期間中、必要があるときは仕様書等を変更することができるものとする。

2 発注者は仕様書等を変更する場合は、受注者と協議の上、契約金額を変更することができるものとする。

第14条 契約保証金は免除する。

第15条 この契約書に基づき得られた成果物について、業務実施の過程で受注者に発生した特許、実用新案又は意匠登録等を受ける権利及び当該権利に基づき取得される特許権、実用新案権、又は意匠権等の産業財産権、著作権(翻訳、翻案権及び二次的著作物を利用する権利を含む。以下同じ)その他の知的財産権は、受注者に帰属するものとする。

第16条 この契約についての必要な細目は、国立大学法人東北大学が定めた役務提供請負契約基準によるものとする。

第17条 この契約について、発注者受注者間に紛争を生じたときは、双方協議の上これを解決するものとする。

第18条 この契約に関する訴えの管轄は、東北大学所在地を管轄区域とする仙台地方裁判所とする。

第19条 この契約に定めのない事項について、これを定める必要がある場合は、発注者受注者間において協議して定めるものとする。

上記契約の成立を証するため、発注者受注者は次に記名し印を押すものとする。
この契約書は2通作成し、双方で各1通を所持するものとする。

平成25年 1月 7日

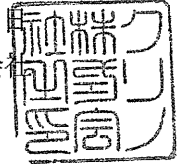
発注者 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
国立大学法人東北大学 理 事 佃 良 彦

受注者 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-40
クリノ株式会社 代表取締役 佐 竹 典 明

仕様書

平成 24 年 11 月 15

クリノ株式会



1. 件名

「受精卵細胞呼吸活性測定装置の測定方法の改良（チップ式プローブの試作・検証）」

2. 目的

受精卵細胞呼吸活性装置は、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受精卵を選択するために使用する機器である。

現行機（弊社製品名 CRAS1.0）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近付けて上下動の走査で測定する手動方法を採用しているが、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にすることを目標に改良を進める。

改良方法としては、測定方法を現行の針式プローブから測定ウェルにプローブ電極を組み込むチップ型プローブ（以下チップ）へ変更し、プローブの物理的な走査がない方式の開発を行う。

改良の最終完了は平成 25 年度末までの 1 年半弱を見込むが、平成 24 年度は、チップの試作開発及び電気化学的検証を行い、検証結果が良好な場合には、平成 25 年度に動物の受精卵の呼吸を測定するとともに、解析ソフトウェアの改良を進め、装置の全自動化完了を目指すものである。

3. 業務内容

チップの試作開発は、MEMS（Micro Electro Mechanical Systems）技術、Si ウェハ微細加工技術を有するパナソニックヘルスケア（株）及びパナソニックグループのデバイス社と、チップの電気化学的検証（溶液の電位発生）は、北斗電工（株）と共同で実施する。

また、全体及び酸素濃度勾配、酸素消費量測定アルゴリズムについては、東北大学工学研究科末永研究室との共同研究契約に基づき技術アドバイスを求める。

4. 実施方法

チップの試作開発及び電気化学的検証を以下の通り実施する。

チップの試作仕様

図 1 に、検討予定のチップ構造の一例を示す。最終的には、このチップが測定数に合わせて数個（6 個程度）並んだ形で樹脂プレートに埋め込まれる形を想定している。

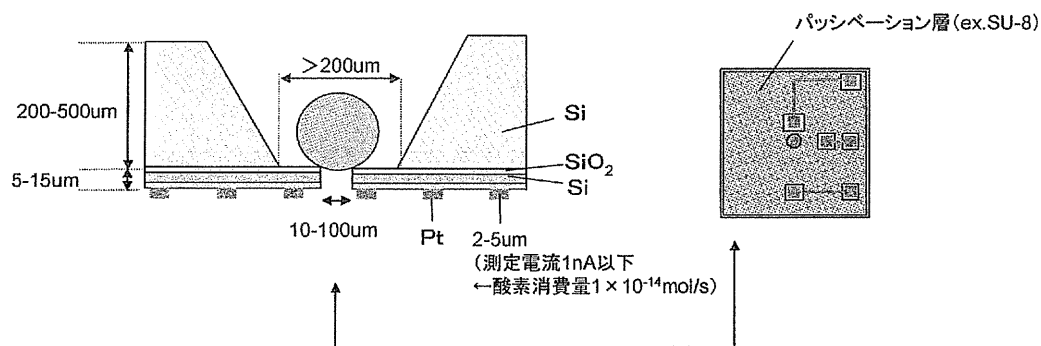


図 1. チップの構造の一例

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、迅速な構造絞り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 (φ 1mm、φ 2mm、φ 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)

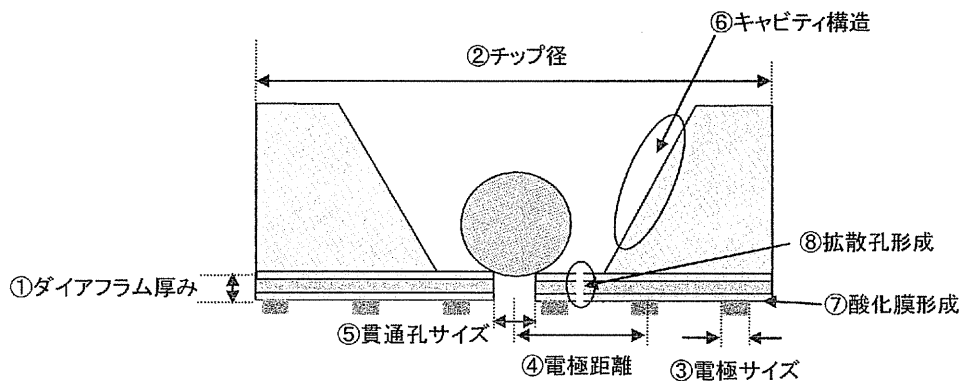


図 2. チップの各部の名称

電気化学的検証

チップに搭載された 2-5 μm 角電極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 μm 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。

チップに搭載された電極よりえられた定常電流値を(1)式に代入して、電極直径を算出し、理論値と比較する。

$$i = 4nFCDr \quad \dots (1)$$

i : 定常電流 [A], n : 移動電子数 = 1, F : ファラデー定数 = 96485 [c·mol⁻¹],
 C : 濃度 = 0.01×10^{-3} [mol·cm⁻³], D : 拡散係数 = 0.65×10^{-5} [cm²·s⁻¹], r : 半径 [cm]

全体スケジュール案

平成 24 年 11 月中旬

チップ構造変化による酸素濃度勾配のシミュレーション

ウェハ手配および試作検討マスク作成

Si ウェハを用いた試作プロセス確認

平成 24 年 11 月下旬

SOI (Silicon on Insulator) を用いたチップ 1st 試作

チップの実装検討 (仮評価のためのリード線取り出し)

平成 24 年 12 月下旬

電気化学的性能評価 1st 評価

平成 25 年 1 月中旬

1st 評価課題点フィードバック及び改善検討

平成 25 年 2 月下旬

チップ 2nd 試作

電気化学的性能評価 2nd 評価

平成 25 年 3 月下旬

チップ試作評価の総合評価・課題改善点抽出

報告書作成・納入

5. 業務完了期限

平成 25 年 3 月 30 日

6. 納入物

評価チップ一式

電気化学計測データ

報告書

7. 納入場所

東北大学病院 産婦人科

II. 分担研究報告書

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

分担研究者 寺田幸弘（秋田大学医学部教授）

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 寺田 幸弘 秋田大学教授

研究主旨

受精卵の凍結技術はガラス化凍結法の開発により、その保存の信頼性に加え簡便性も大きく進化した。一般診療において、余剰胚が生じた場合あるいは卵巢過剰刺激症候群時や移植の際の子宮内膜の菲薄化所見時などの医学的適応により、胚盤胞期胚での凍結を行っている。さらに、複数個の胚盤胞期胚を融解した場合や、不測の事態により移植がキャンセルになった場合には、胚盤胞期胚の再凍結を行っている。しかし、再凍結融解胚を用いた周期での妊娠出産例の報告はあるものの、この方法が胚に生物学的に与える影響に関しての検討はなされていない。我々は、再凍結、再融解が胚盤胞期胚の胚呼吸量に与える影響の検討結果と、再凍結再融解した胚盤胞期胚の移植を実施した症例の臨床結果について検討を行った。

実験方法としては以下の 2 つを行った。[1] 胚呼吸量：胚呼吸量の検討については、凍結保存中の胚のうち、今後、治療に用いる予定がないものを用いた。凍結融解胚を数時間回復培養にかけた後、受精卵呼吸測定装置を用いて測定した。測定後再凍結し、後日 1 回目と同様に再融解し、2 回目の呼吸量を測定し、1 回目の呼吸量との変化を比較した。[2] 移植症例：呼吸量を測定した胚とは別に、当科で凍結融解後、再凍結再融解し移植した 6 例を対象とした。凍結融解胚移植の際使用しなかった胚盤胞期胚を再凍結し、次の移植可能周期に再融解した。融解後、超音波ガイド下に胚移植を実施した。なお、妊娠の診断は、超音波診断により子宮内に胎嚢が確認できた症例とした。

その結果、再凍結融解した胚盤胞期胚の胚呼吸量は、Gardner らの分類において低グレードの胚が高グレードの胚よりも呼吸量値が低くなる傾向が見られた。また低グレードの胚では呼吸量が低くなり、再融解に耐えられない胚も存在した。これとは別に再凍結融解した胚盤胞期胚の移植直前のグレードを調べた結果、再融解後グレードが低下したものは 3 例、維持したものは 2 例、発上昇したものが 1 例だった。このうちグレードが上昇し、発生が進んでいた 1 例のみ胎嚢が確認され、妊娠継続中である。

本検討の結果から、高グレードの胚盤胞期胚では、凍結融解を繰り返すことによる呼吸量活性へ影響を与えないことが示唆された。比較して、低グレードの胚盤胞期胚では、再凍結融解によって呼吸量活性が大きく影響を受けていた。また、再凍結融解胚を移植した結果から、再凍結融解を行ってもグレードが上昇するような高品質胚では妊娠可能であることが示された。以上より、呼吸量活性が卵の質的評価に有用であることが示唆された。

研究協力者

熊谷 仁(秋田大学産婦人科准教授)
熊澤由紀代(秋田大学産婦人科助教)
金森勝裕(秋田大学産婦人科医員)
金森恭子(秋田大学産婦人科医員)
白澤弘光(秋田大学産婦人科医員)
富樫嘉津恵(秋田大学産婦人科医員)
舘山奈江(秋田大学産婦人科培養士)

A・研究目的

受精卵の凍結技術はガラス化凍結法の開発により、その保存の信頼性に加え簡便性も大きく進化した。一般診療において余剰胚が生じた場合、あるいは卵巣過剰刺激症候群の場合、また移植の際の子宮内膜の菲薄化所見時などの医学的適応により、胚盤胞期胚での凍結が行われている。さらに、複数個の胚盤胞期胚を融解した場合や、不測の事態により移植がキャンセルになった場合には、胚盤胞期胚の再凍結が行われている。しかし、再凍結融解胚を用いた周期での妊娠出産例の報告はあるものの、この方法が胚に生物学的に与える影響についての検討はなされていない。獲得された複数の受精卵は、従来は形態学的評価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)。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、その有用性が報告されている(3-8)。さらに、この手法は非常に高感度である上に侵襲もないと考えられている。

今回、細胞呼吸測定機器(製品名CRAS1.0)を用いて、再凍結・再融解が胚盤胞期胚の胚呼吸量に与える影響の検討結果と、再凍結再融解した胚盤胞期胚の移植を実施した症例の臨床結果について検討した。

B・研究方法

研究分担者の阿部らが開発した受精卵呼吸測定装置のプロトタイプ(製品名 CRAS1.0)を用いて下記の2つの検討を行った。

1) 胚呼吸量：胚呼吸量の検討については、凍結保存中の胚のうち、今後、治療に用いる予定がないものを用いた。凍結融解胚を数時間回復培養にかけた後、受精卵呼吸測定装置を用いて測定した。測定後再凍結し、後日1回目と同様に再融解し、2回目の呼吸量を測定し、1回目の呼吸量との変化を比較した。この際、凍結融解は北里バイオファルマのCryotop Safety Kitを用い、プロトコールに従った。

2) 移植症例：呼吸量を測定した胚とは別に、平成24年1月より平成24年12月までに当科で凍結融解後、再凍結再融解し移植した6例を対象とした。凍結融解胚移植の際使用しなかった胚盤胞期胚を再凍結し、次の移植可能周期に再融解した。融解後、超音波ガイド下に胚移植を実施した。なお、妊娠の診断は、超音波診断により子宮内に胎嚢が確認できた症例とした。

C・研究結果

一般に受精卵の形態学的評価はGardnerやVeekらの分類(図)に基づいて行うが、今回使用した再凍結融解した胚盤胞期胚の胚呼吸量は、低グレードの胚では高グレードの胚よりも呼吸量値が低くなる傾向が見られた。また低グレードの胚では呼吸量が低くなり、再融解に耐えられない胚も存在した(表1)。これとは別に再凍結融解した胚盤胞期胚の移植直前のグレードを調べた結果、再融解後グレードが低下したものは3例、維持したものは2例、上昇したものが1例だった。このうちグレードが上昇し、発生が進んでいた1例のみ胎嚢が確認され、妊娠継続中である(表2)。

D・考察

本検討の結果から、高グレードの胚盤胞期胚では、凍結融解を繰り返すことによる呼吸量活性へ影響を与えないことが示唆された。比較して、低グレードの胚盤胞期胚では、再凍結融解によって呼吸量活性が大きく影響を受けていた。また、再凍結融解胚を移植した結果から、再凍結融解を行ってもグレードが上昇するような高品質胚では妊娠可能であることが示された。

E・結論

受精卵呼吸測定装置を用いた受精卵の品質評価法は、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。そして、早期妊娠成立や不要な胚移植による医療費の削減が可能となると期待している。

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

(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

表 1

呼吸量

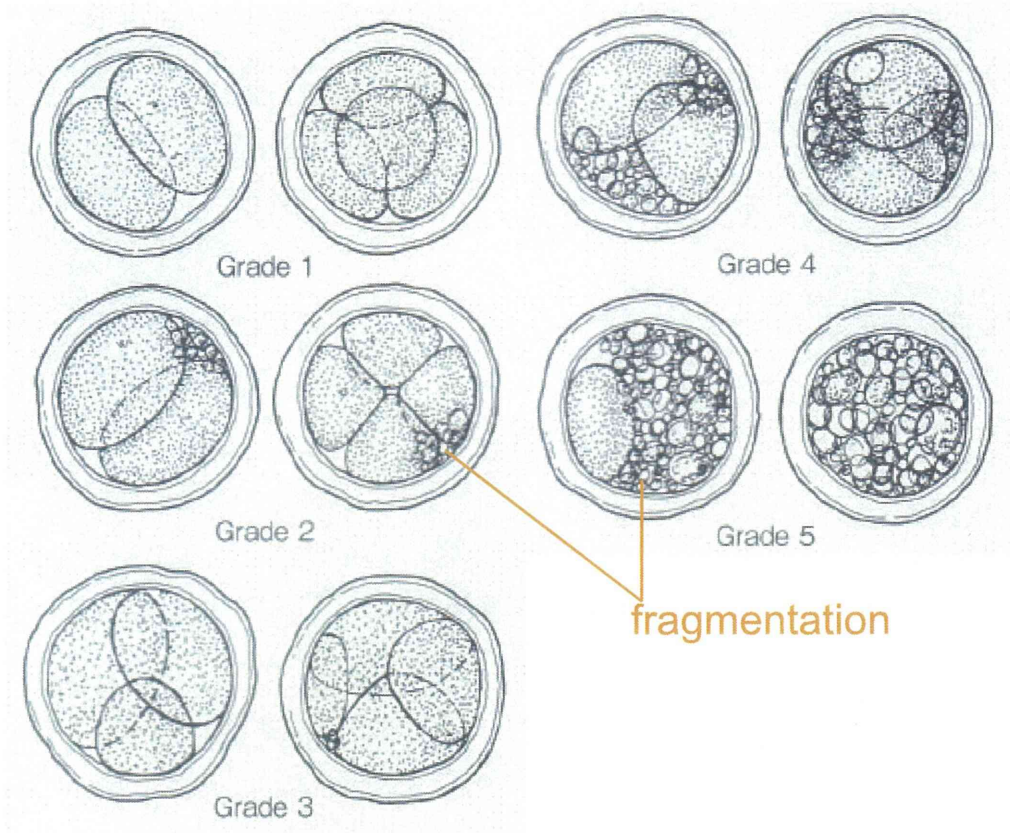
sample No.	1 回目		2 回目	
	解凍時 Grade	測定値($\times 10^{14}\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)	解凍時 Grade	測定値($\times 10^{14}\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)
1	5BA	10.7	5BA	11.38
2	4BB	8.85	4BB	7.86
3	3BC	8.7	4BC	7.16
4	3CC	2.72	degeneration	-
5	3CC	4.85	3CC	1.58
6	3CC	6.82	3CC	9.6

表 2

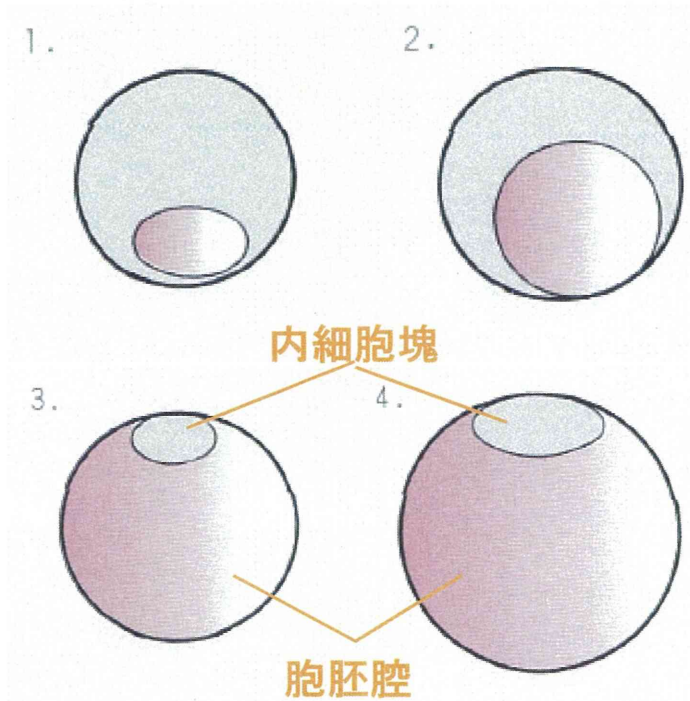
No	凍結胚 grade	融解時 grade	再凍結時 grade	再融解時 grade	転帰
1	4AA	4AA	4AA	4BB	×
2	4BB	4BB	4BB	4BC	×
3	4AA	4AB	4AB	4BB	×
4	2	4BB	4BB	4BB	×
5	3AA	4AA	4AA	4AA	×
6	3BB	3BB	3BB	4AB	○

図

Veek分類



Gardner分類



II. 分担研究報告書

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

分担研究者 阿部宏之（山形大学工学部教授）

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 阿部 宏之 山形大学教授

研究主旨

近年、高性能受精卵培養液や体外受精・顕微授精などの先進生殖技術が開発され、移植可能胚の作製効率は飛躍的に向上している。しかし、生殖技術が高度化する一方で、胚移植における受胎率は伸び悩んでいる。この原因の一つとして、治療に供する卵子や受精卵の品質評価の精度に問題があると考えられている。体外受精・胚移植（IVF-ET）において、移植前に質的に最も良好な胚を選択することは、妊娠率の向上、多胎妊娠の回避、流産率の低下のために極めて重要である。現在、胚の品質（クオリティー）は割球の形態や数等の形態的特徴を基準に（Gardner分類やVeek分類など）評価されている。形態的評価は、簡単・迅速で無侵襲的な方法であることから、現状では最も有効な胚の品質評価法として広く普及している。しかし一方で、評価の基準となる胚の形態的特徴は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る可能性がある。そこで我々は、胚の品質を客観的に評価するための指標としてミトコンドリアの呼吸機能に着目し、細胞の呼吸活性を指標とする新しい胚品質評価システムの開発に取り組んできた。本研究では、ウシとヒトを中心に、これまでに開発されてきた胚の品質評価法を解説するとともに、電気化学計測技術を応用した独自の胚品質評価法を検討した。

研究協力者

黒谷 玲子 (山形大学理工学部助教)
阿部 靖之 (山形大学理工学部助教)
宇都宮隆史 (セントルカクリニック)

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。高性能受精卵培養液や体外受精・顕微授精などの先進生殖技術が開発され、移植可能胚の作製効率は飛躍的に向上している。しかしながら、生殖技術が高度化する一方で、胚移植における受胎率は伸び悩んでいる。この原因の一つとして、治療に供する卵子や受精卵の品質評価の精度に問題があると考えられている。また、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。体外受精・胚移植（IVF-ET）において、移植前に質的に最も良好な胚を選択することは、妊娠率の向上、多胎妊娠の回避、流産率の低下のために極めて重要である。現在、胚の品質（クオリティ）は割球の形態や数等の形態的特徴を基準に評価されている。形態的評価は、簡単・迅速で無侵襲的な方法であることから、現状では最も有効な胚の品質評価法として広く普及している。しかし一方で、評価の基準となる胚の形態的特徴は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る可能性がある。そこで、胚の品質を客観的に評価するための指標としてミトコンドリアの呼吸機能に着目し、細胞の呼吸活性を指標とする新しい胚品質評価システムの開発に取り組んできた。

本装置は細い電極を用いて、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。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繋げていきたい。

今回、ウシを中心に、これまでに開発されてきた胚の品質評価法を検討するとともに、電気化学計測技術を応用した独自の胚品質評価法の確立を試みた。

B・研究方法

1. 形態観察による胚の品質評価

一般に、胚の品質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(1-3)。形態観察によっ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%と高い一方で、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、形態観察による品質評価は十分であるか検討した。

2. 胚の品質に関係する超微細形態

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と言われている。ウシの形態良好胚における、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などの細胞接着装置の発達などを、形態不良胚と比較検討した。