

### 3. 代謝物質測定による胚の品質評価

前述した形態観察による胚の品質評価は、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・定量的な指標として、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品質評価を試みた。

### 4. 電気化学計測法と細胞呼吸測定装置の開発

高精度・非侵襲的という測定条件を満たす計測技術として、電気化学計測技術に注目した。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検出する技術であり、そのメカニズムを検討した。

### 5. 呼吸量測定による胚の品質評価

呼吸能を指標とする胚の品質評価法を確立するために、胚の品質と呼吸能の関係を詳細に検討した。

## C・研究結果

### 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)。例えば、ウシの桑実胚は割球が集まった細胞塊 (embryo mass) の形態 (コンパクトシヨンの程度) やフラグメンテーションなどを基準に4つのカテゴリーに分類される (図1)。また胚盤胞は、胞胚腔の状2態や胚の拡張度、内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) や栄養膜 (trophoblast) の状態を基準に3

段階の品質に分類することができる。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。これら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な精度を有しているとはいえない。

ヒトの正常受精胚では、媒精16~18時間後に雄性前核および雌性前核の2つの前核 (2PN)、そして各前核中に核小体

(nucleolar precursor bodies: NPB) 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い胚の品質を評価している(4, 5)。ヒトの初期分割期胚は、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(6)が最も普及している。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Grade 1と表記し、最も形態的に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Gradeの数値が上がり (Grade 2~Grade 5) 形態不良と判定される。

また胚盤胞の品質評価には、Gardnerらが提案した方法が広く用いられている(7)。この方法では、胚盤胞は胚盤胞腔の広がりや孵化 (ハッチング) の程度によって1~6の6段階に分類され、さらに内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) と栄養膜細胞層 (trophectoderm: Tr) の細胞数により、それぞれA、B、Cの3段階に評価される。

### 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。ウシの形態良好胚では、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マゾームなどの細胞接着装置が良く発達し

ているが、形態不良胚ではデスモゾームや微絨毛が未発達である(8-11)。これは、胚の品質に細胞間接着装置が影響していることを示唆している。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(12)。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の核小体が多く観察されるが、形態不良胚では大部分の核小体はrRNA 転写活性の低いステージ3であることから、低品質胚ではrRNA の発現活性が低いと考えられる(13)。また、高品質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、低品質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が観察される。このような脂肪滴蓄積は胚の耐凍能に大きく影響し、胚の品質低下の一因となっている(14, 15)。

一方、ヒト胚において形態的品質と密接な関係にある超微細形態が明らかになっている。Gardnerらの方法で3BB 以上を良好胚、それ以下のグレードを不良胚として分類し、それぞれの胚の微細構造を観察した。その結果、品質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、品質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た(図2)。これらの研究から、胚の品質にはミトコンドリアやアポトーシスなどが深く関与していることが明らかになった。

### 3. 代謝物質測定による胚の品質評価

前述した形態観察による胚の品質評価は、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・定量的な指標として、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た胚品質評価が試みられてきた(16-20)。

また、細胞の呼吸(酸素消費)を指標に胚の品質を評価する方法も行われている(21-23)。ミトコンドリアは酸化リン酸化反応(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胚の品質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(24-26)や酸素センサー(27-30)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ることから、胚の品質評価においては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品質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・超高精度・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胚品質評価法としての実用化は難しい。

### 4. 電気化学計測法と細胞呼吸測定装置の開発

高精度・非侵襲的という測定条件を満たす計測技術として、筆者らは電気化学計測技術に注目してきた。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検出する技術であり(31, 32)、この技術の有効な装置としてマイクロ電極を探針とする走査型電気化学顕微鏡(scanning electrochemical microscopy: SECM)が注目されている。SECMの空間分解能は探針であるマイクロ電極径に依存するため原子や分子レベルの解析は困難であるが、局所空間での化学反応の評価やイメージング、生体材料を用いたリアルタイム解析や化学反応誘起が可能であることから、局所領域の

電気化学センシングなど種々の系で用いられている(33-36)。例えば、酸素の還元電位を検出できるマイクロ電極を用いることで細胞の酸素消費量(呼吸)を高感度・非侵襲的にリアルタイムで測定することができる。

従来、SECMは微量な酸素消費を検出できることから、金属錆の検出装置として用いられてきた。筆者らは、従来型SECMを生物試料、特に受精卵の呼吸計測に応用するために、呼吸測定に関連した要素技術の開発を行ってきた。その結果、SECMをベースに受精卵や微小組織などの球状試料の酸素消費量を非侵襲的に測定できる「受精卵呼吸測定装置」の開発に成功した(37)。この呼吸測定システムは、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、酸素消費量算出のための専用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3a)。倒立型顕微鏡のステージ上には、マイクロ電極の3次元走査を可能とするXYZステージが設置されており、生物試料の呼吸計測のために気相条件制御が可能な測定用チャンバーや保温プレートが設置できる。

また、計測精度と操作性の向上を目的に、マイクロ電極の改良、専用の多検体測定プレートおよび測定液を開発している。従来型のSECMは、金属等の腐食部位を検出する装置として先端径10~20  $\mu\text{m}$ のマイクロ電極を探針として用いているが、酸素消費量が非常に小さい細胞や受精卵の呼吸測定には電極の感度が不十分であり、より高感度のマイクロ電極が必要であった。マイクロ電極の計測感度は先端径が小さいほど高いため、受精卵や細胞の呼吸測定では先端径2~4  $\mu\text{m}$ にエッチング加工した白金電極をガラスキャピラリー先端部に封止したディスク型マイクロ電極(図3b)を使用している。

「受精卵呼吸測定装置」を用いた呼吸測定には、専用の多検体測定プレートと

測定液を用いる。多検体測定プレートは測定操作の簡易化を目的に開発され、プレートの底面には円錐形のマイクロウェルが施されている(図3c)。

マイクロ電極が検出する微弱な電流は溶液の成分によって影響を受けるため、呼吸量測定にはマイクロ電極の測定感度に影響を与えず、胚に対して非侵襲な専用の測定液を用いる。測定液を満たしたマイクロウェル内に試料(胚)を導入した後、マイクロウェルの底部中心に静置させる(図3d)。酸素が還元可能な-0.6V vs. Ag/AgClに電位を保持した後、マイクロ電極を移動速度20~30  $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、走査距離150~300  $\mu\text{m}$ の条件で透明帯近傍を鉛直方向に走査する

(図3e)。通常、1回の呼吸測定ではマイクロ電極を2~3回走査した後、胚の酸素消費量は球面拡散理論式(38, 39)を基本に開発した解析ソフトを用いて算出する。

これまでに「受精卵呼吸測定装置」を用いて、ウシ、ブタ、マウスの単一胚の呼吸量測定に成功している。ほとんどの動物胚では、8細胞期までは酸素消費量は少なく、桑実胚から胚盤胞にかけて顕著に呼吸量が増加する(図4)。呼吸測定の有効性を検証するために呼吸活性の変化とミトコンドリアの発達との関係を電子顕微鏡により調べた。その結果、呼吸活性の低い8細胞期まではほとんどのミトコンドリアは未成熟であり、呼吸量が急激に増加する桑実胚から胚盤胞にかけてミトコンドリアの顕著な発達(クリステの拡張)が認められた(図5)(40)。このように、呼吸量の増加とミトコンドリアの発達は同じ発生ステージに起こることから、「受精卵呼吸測定装置」はミトコンドリアによる呼吸を高精度で検出していると考えられる。現在、ミトコンドリアの細胞内局在や膜電位活性の解析、アデノシン三リン酸(ATP)産生の定量、呼吸鎖複合体(シトクロームc酸化酵素:Cox)の遺伝子発現解析など、ミトコンドリア呼吸機能に関連する生物学的解析を行い、「受精卵呼吸測定装置」の有用性の科学的検証を進めている。

## 5. 呼吸量測定による胚の品質評価

呼吸能を指標とする胚の品質評価法を確立するために、胚の品質と呼吸能の関係を詳細に調べた結果、これまでに多くの興味深い知見が得られている。ウシでは呼吸活性の高い桑実胚は、呼吸測定後に追加の培養を行うと多くの胚は品質良好な胚盤胞へと発生する(37)。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(41)。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が、基準値以下の呼吸量の胚はほとんど受胎しない(表1)(40, 42)。この結果は、ミトコンドリア呼吸(酸素消費)は、胚の品質評価の有力な指標になるとともに、「受精卵呼吸測定装置は画期的な胚品質診断装置としての可能性を示唆している。

受精卵移植現場や不妊治療におけるヒト胚品質評価への応用を実現するためには、呼吸測定の非侵襲性および安全性の検証が不可欠である。電気化学的呼吸測定技術の安全性を検証するために、「受精卵呼吸測定装置」により呼吸量を測定した胚を移植し、誕生した個体の正常性を生殖発生毒性試験により解析している。これまでの研究では、呼吸測定した胚の移植により得られた産子は、通常の胚移植産子と比べて奇形発生率及び染色体異常の増加、病理組織及び行動の異常は全く確認されていない。このように「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、品質良好胚の効率的選別に有効であると考えている。

今後、多くの動物実験とヒト余剰胚を用いた前臨床研究を実施し、装置および測定技術の有効性と安全性を詳細に検証する。さらに、基礎研究の成果を踏まえ、所定の倫理承認を得た後に、不妊治療での臨床応用を目的に呼吸測定胚の移植に繋げていきたい。

## D・考察

形態観察を基本とする従来の胚品質評価法と、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸活性を指標とする新しい胚品質評価法を解説した。家畜繁殖領域で開発された技術は、不妊治療などの生殖補助医療に応用されるケースが多く、本研究で紹介した「受精卵呼吸測定装置」はヒト胚の品質評価など、医療分野への応用が十分に期待できる。今後、生殖補助医療においては不妊治療技術の高度化や高齢不妊患者の増加に伴い、移植の対象となる胚もより厳密に評価する必要があると思われる。このため、これまでに開発されているいくつかの品質評価法のメリットを有機的に融合した新しい評価システムの開発が必要になってくる(図6)。例えば、呼吸測定による胚品質評価は、形態的評価法との併用が可能であり、これによってより厳密に胚の品質評価が可能であると考えている。今後の詳細な研究により細胞呼吸計測法および測定装置の安全性と有用性が確認され、胚の新しい品質評価システムとして家畜繁殖現場や不妊治療領域において実用化されることを期待している。

## D・結論

「受精卵呼吸測定装置」は細胞呼吸を無侵襲的に測定できることから、胚の品質評価以外にも細胞の代謝機能解析ら微小組織の活性評価への応用が可能である。この装置は、細胞呼吸の計測装置としては最も感度が高く、単一細胞レベルでの呼吸量計測も可能である。したがって、単一卵子の品質評価(45)、単一レベルでの細胞機能診断やミトコンドリア呼吸機能解析への展開も期待できる。細胞呼吸は動物・植物問わずほとんどの細胞に共通する生物現象であることから、電気化学計測技術および装置の応用範囲は極めて広い。以上より、「受精卵呼吸測定装置」が基礎研究から先端医療の現場での実用化を期待している。

## 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

1. ウェルユニット及び電気化学的分析法(青柳重夫, 内海陽介, 末永智一, 珠玖仁, 阿部宏之, 河野浩之, 柏崎寿宣, 星 宏良, 星 翼) 特願 2010-208817
2. 哺乳動物受精卵の呼吸活性測定方法及びその電気化学デバイス(珠玖仁, 末永智一, 高野真一郎, 伊達安基, 齋藤剛史, 横尾正樹, 伊藤隆広, 阿部宏之), 特願 2008-293117 号
3. 移植用胚島の評価方法(後藤昌史, 阿部宏之), 特許番号: 特願 2007-169261, 出願人: 東北大学

4. 検体セル及び電気化学的分析装置及び電気化学分析方法(珠玖仁, 白石卓夫, 末永智一, 阿部宏之, 星宏良, 青柳重夫, 内海陽介, 松平昌昭), 特許番号: 特開 2004-108863. (特許第 4097492 号)
5. 電気化学的多検体分析方法(珠玖仁, 白石卓夫, 末永智一, 阿部宏之, 星宏良, 青柳重夫, 内海陽介, 松平昌昭), 特許番号: 特開 2004-108971. (特許第 3688671 号)
6. 哺乳類胚の無侵襲的品質評価方法及びその装置(珠玖仁, 白石卓夫, 大矢博明, 末永智一, 阿部宏之, 星宏良), 特許番号: 特開 2002-122568. (特許第 3693907 号)
7. 細胞呼吸活性評価法 及びその装置(珠玖仁, 白石卓夫, 大矢博明, 末永智一, 阿部宏之, 星宏良), 特許番号: 特開 2001- 330582.

## 引用文献

- 1) Lindner G.M. & R.W. Wright Jr. (1983) *Theriogenology*, 20:407-416.
- 2) Shea B.F. (1981) *Theriogenology*, 15:13-42.
- 3) Wright J.M. (1981) *Theriogenology*, 15:43-56.
- 4) Tesarik J. & E. Greco (1999) *Hum. Reprod.*, 14:1318-1323.
- 5) Scott L., R. Alvero R, M. Leondires & B. Miller (2000) *Hum. Reprod.*, 15:2394-2403.
- 6) Veeck L.L. (1991) *Atlas of the human oocyte and early conceptus*, vol 2. Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- 7) Gardner D.K. & W.B. Schoolcraft (1999) *Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond. In vitro culture of human blastocysts*, Jansen R. & D. Mortimer (eds), 378-389, Carnforth, Parthenon Press.
- 8) Albiñ A., Rodriduez-Martinez H. & H. Gustafsson (1990) *Acta Anat.*, 138:42-49.
- 9) Abe H., S. Yamashita, T. Itoh, T. Satoh & H. Hoshi (1999) *Mol. Reprod. Dev.*, 53:325-335.
- 10) Abe H., T. Otoi, S. Tachikawa, S. Yamashita, T. Satoh & H. Hoshi (1999) *Anat. Embryo.l.*, 199:519-527.

- 11) Aguilar M.M., C.S. Galina, H. Merchant, F. Montiel, R. Canseco & Y.C. Marquez (2002) *Reprod. Domest. Anim.*, 37:341-346.
- 12) Kopecny V. & H. Niemann (1993) *Theriogenology*, 39:109-119.
- 13) Abe H., S. Matsuzaki & H. Hoshi (2002) *Theriogenology*, 57:1273-1283.
- 14) Nagashima H., N. Kashiwazaki, R.J. Ashman, C.G. Grupen, R.F. Semark & M.B. Nottle (1994) *Biol. Reprod.*, 51:618-622.
- 15) Abe H., S. Yamashita, T. Satoh & H. Hoshi (2002) *Mol. Reprod. Dev.*, 61:57-66.
- 16) Overstrom E.W. (1996) *Theriogenology*, 45:3-16.
- 17) Rieger D., N.M. Loskutoff & K.J. Betteridge (1992) *Reprod. Fertil. Dev.*, 4: 547-557.
- 18) Rieger D. (1992) *Theriogenology*, 37: 75 -93.
- 19) Rieger D. & N.M. Loskutoff (1994) *J. Reprod. Fertil.*, 100:257-262.
- 20) Gopichandran N. & H.J. Leese (2003) *Reproduction*, 126:299-308.21) Thompson J.G., R.J. Partridge, F.D. Houghton, C.I. Cox & H.J. Leese (1996) *J. Reprod. Fertil.*, 106:299-306.
- 22) Thompson J.G., C. McNaughton, B. Gasparrini, L.T. McGowan & H.R. Tervit (2000) *J. Reprod. Fertil.*, 118: 47-55.
- 23) Trimarchi J.R., L. Liu, D.M. Porterfield, P.J.S. Smith & D.L. Keefe (2000) *Biol. Reprod.*, 62:1866-1874.
- 24) Nilsson B., C. Magnusson, S. Widehn & T. Hillensjo (1982) *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 71:75-82.
- 25) Magnusson C., T. Hillensjo, L. Hamberger & L. Nilsson (1986) *Hum. Reprod.*, 1:183-184.
- 26) Houghton F.D., J.G. Thompson, C.J. Kennedy & H.J. Leese (1996) *Mol. Reprod. Dev.*, 44:476-485.
- 27) Land S.C., D.M. Porterfield, R.H. Sanger & P.J.S. Smith (1999) *J. Exp. Biol.*, 202:211-218.28) Smith P.J.S., K. Hammar, D.M. Porterfield, R.H. Sanger & J.R. Trimarchi (1999) *Microsc. Res. Tech.*, 46:398-417.
- 29) Lopes A.S., L.H. Larsen, N. Ramsing, P. Lovendahl, M. Raty, J. Peippo, T. Greve & H. Callesen (2005) *Reproduction*, 130:669-679.30) Lopes A.S., T. Greve & H. Callesen (2007) *Theriogenology*, 67:21-31.
- 31) Engstrom R.C. & C.M. Pharr (1989) *Anal. Chem.*, 61:1099A.
- 32) Bard A.J. & M.V. Mirkin (2001) *Scanning Electrochemical Microscopy*, Marcel Dekker, New York.
- 33) Shiku H., T. Matsue & I. Uchida (1996) *Anal. Chem.*, 68:1276-1278.
- 34) Kasai S., A. Yokota, H. Zhou, M. Nishizawa, K. Niwa, T. Onouchi & T. Matsue (2001) *Anal. Chem.*, 72:5761 -5765.
- 35) Yamashita K., M. Takagi, K. Uchida, H. Kondo & S. Takenaka (2001) *Analyst*, 26:1210-1211.
- 36) Oyamatsu D., N. Kanaya, H. Shiku, M. Nishizawa & T. Matsue (2003) *Sens. Actuat. B*, 91:199-204.
- 37) Abe H., H. Shiku, S. Aoyagi & H. Hoshi (2004) *J. Mamm. Ova Res.*, 21:22-30.
- 38) Shiku H., T. Shiraishi, H. Ohya, T. Matsue, H. Abe, H. Hoshi & M. Kobayashi (2001) *Anal. Chem.*, 73:3751-3758.39) Shiku H., T. Shiraishi, S. Aoyagi, Y. Utsumi, M. Matsudaira, H. Abe, H. Hoshi, S. Kasai, H. Ohya & T. Matsue (2004) *Anal. Chim. Acta*, 522:51-58.
- 40) Abe H., H. Shiku, M. Yokoo, S. Aoyagi, S. Moriyasu, A. Minamihashi, T. Matsue & H. Hoshi (2006) *J. Reprod. Dev.*, 52 (Suppl.): S55-S64.
- 41) Shiku H., Y. Torisawa, A. Takagi, S. Aoyagi, H. Abe, H. Hoshi & T. Matsue (2005) *Sens. Actuat. B*, 108:597-602.
- 42) Abe H. (2007) *J. Mamm. Ova Res.*, 24: 70-78.
- 43) 横尾正樹、伊藤 佐々木隆広、珠玖仁、末永智一、阿部宏之 (2010) *産婦人科の実際*, 59 : 1375-1379.
- 44) 後藤香里、小池恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2010) *受精着床学会雑誌*, 27:53-58.

## 図の説明

### 図1.

ウシ桑実胚の形態的クオリティー評価 (a, c, e, g: ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察、b, d, f, h: 準薄 (semi-thin) 切片 (1  $\mu\text{m}$ 、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4つのクオリティーに分類される。(参考論文13を一部改変)

### 図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) が特徴のアポトーシス像が認められる。

### 図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: HV-405」。①倒立型顕微鏡、②ポテンショスタット、③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 2~5  $\mu\text{m}$  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。

### 図4.

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。退行胚ではほとんど呼吸量は検出されない。異符号間で有意差 ( $P < 0.05$ ) がある。

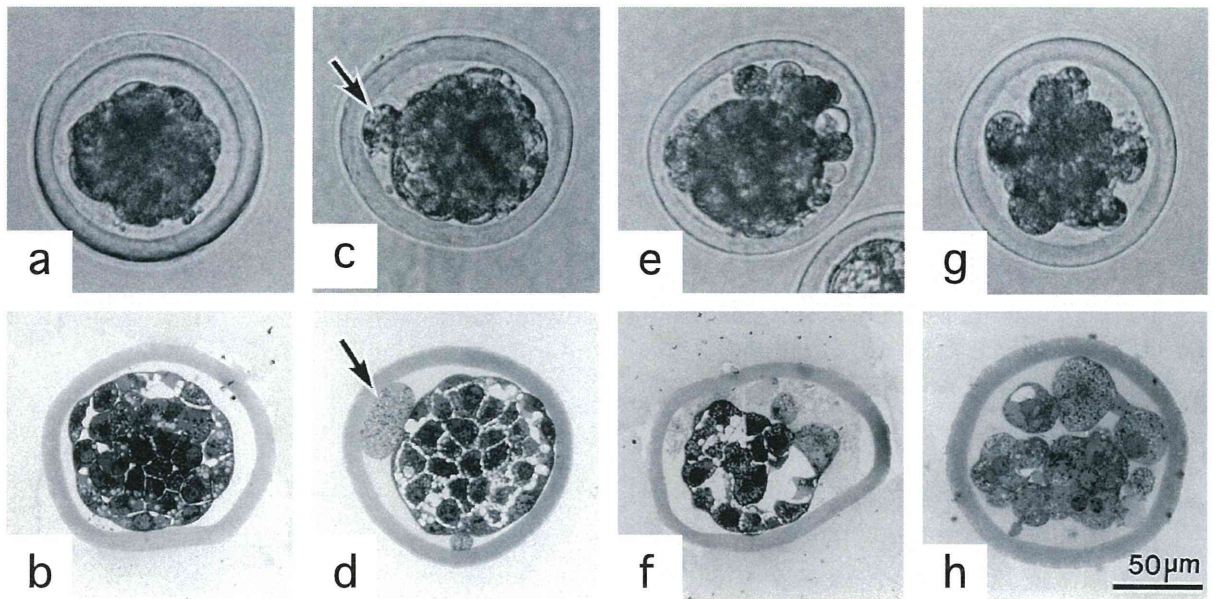
### 図5.

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形態変化。  
A: 8細胞期胚、B: 桑実胚、C: 胚盤胞。M: ミトコンドリア

### 図6.

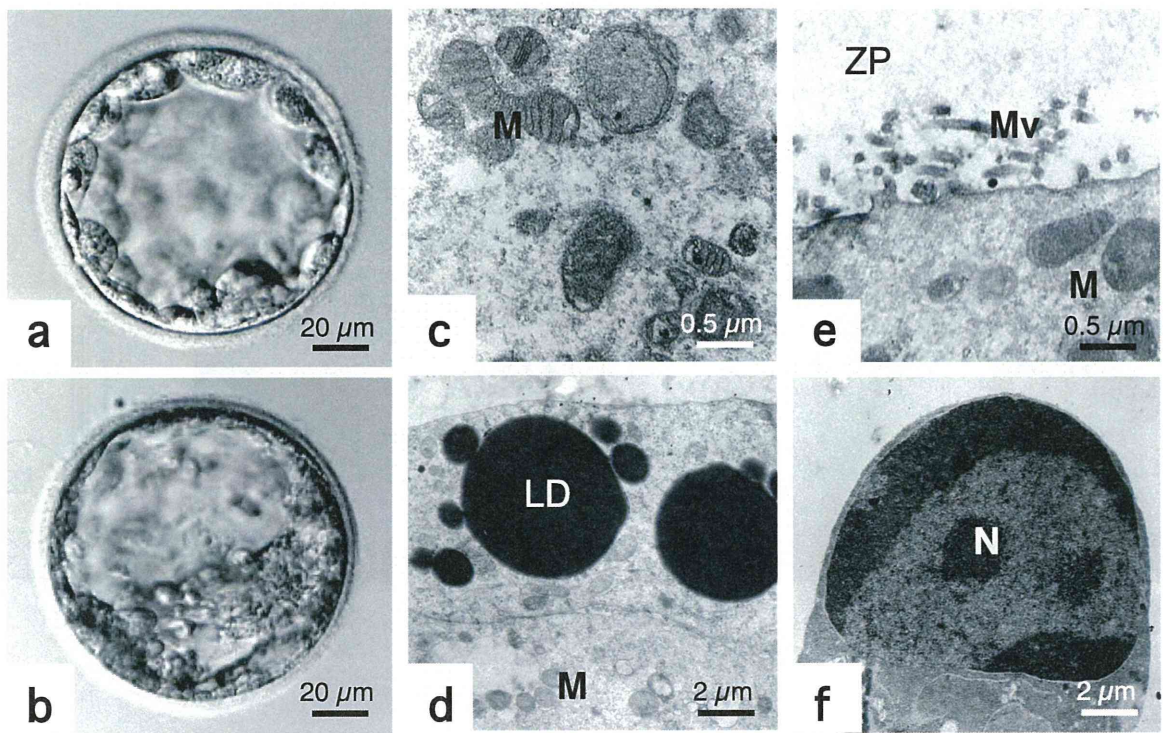
胚の品質評価の現状と将来像を示した模式図。それぞれの評価法の長所を融合した新しい品質評価法の開発が望まれる。

(图1)

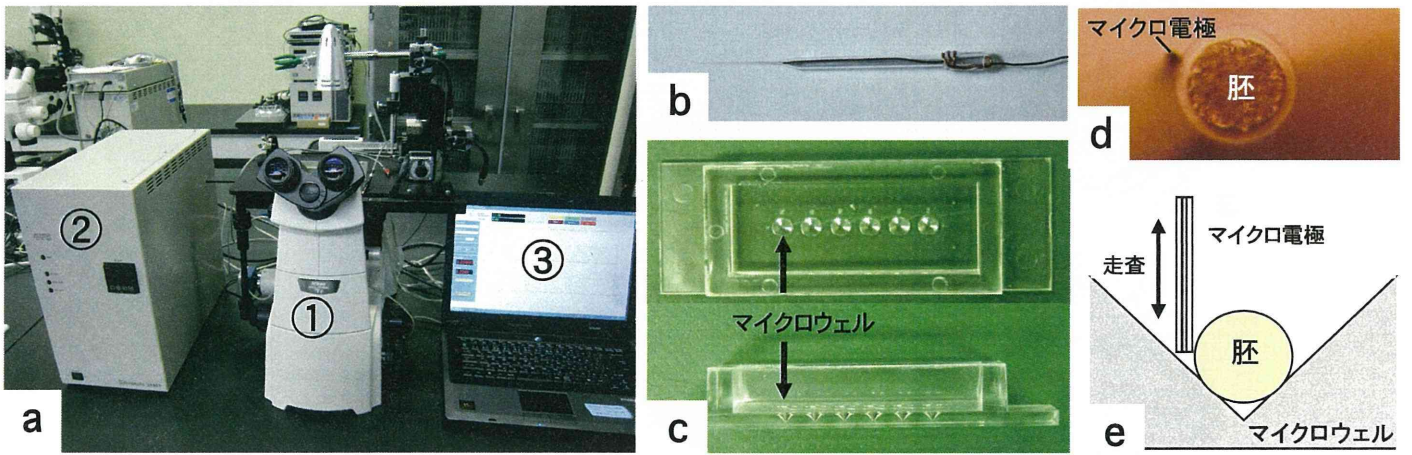




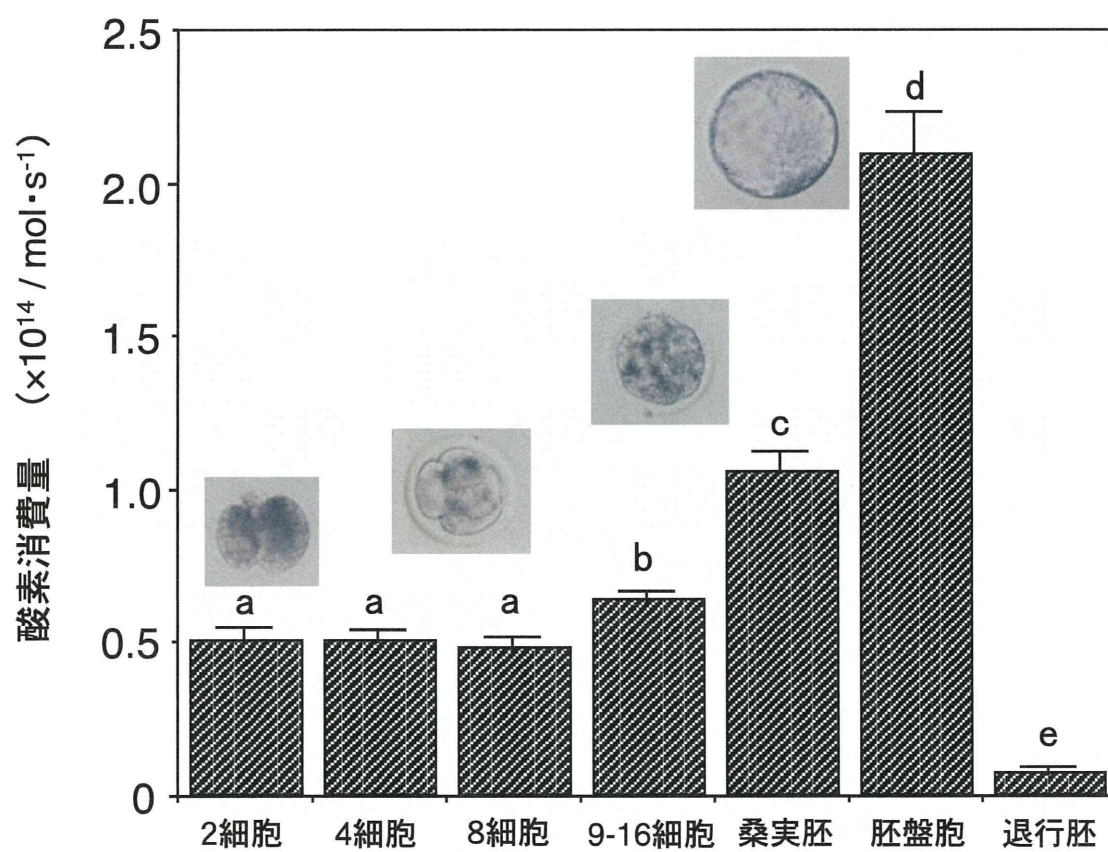
(图2)



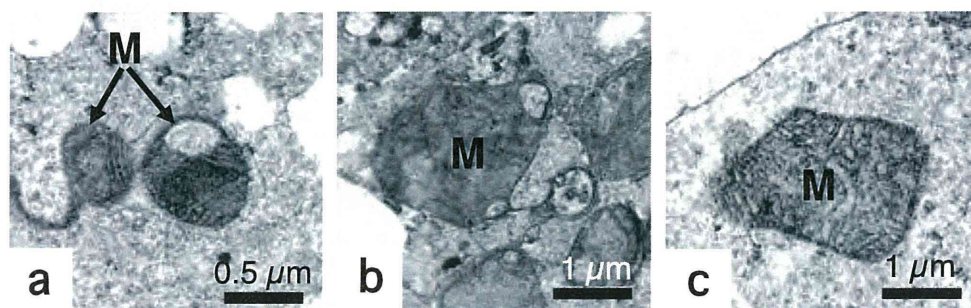
(図3)



(図4)



(图5)



(図6)

## 【胚品質評価の現状と将来像】

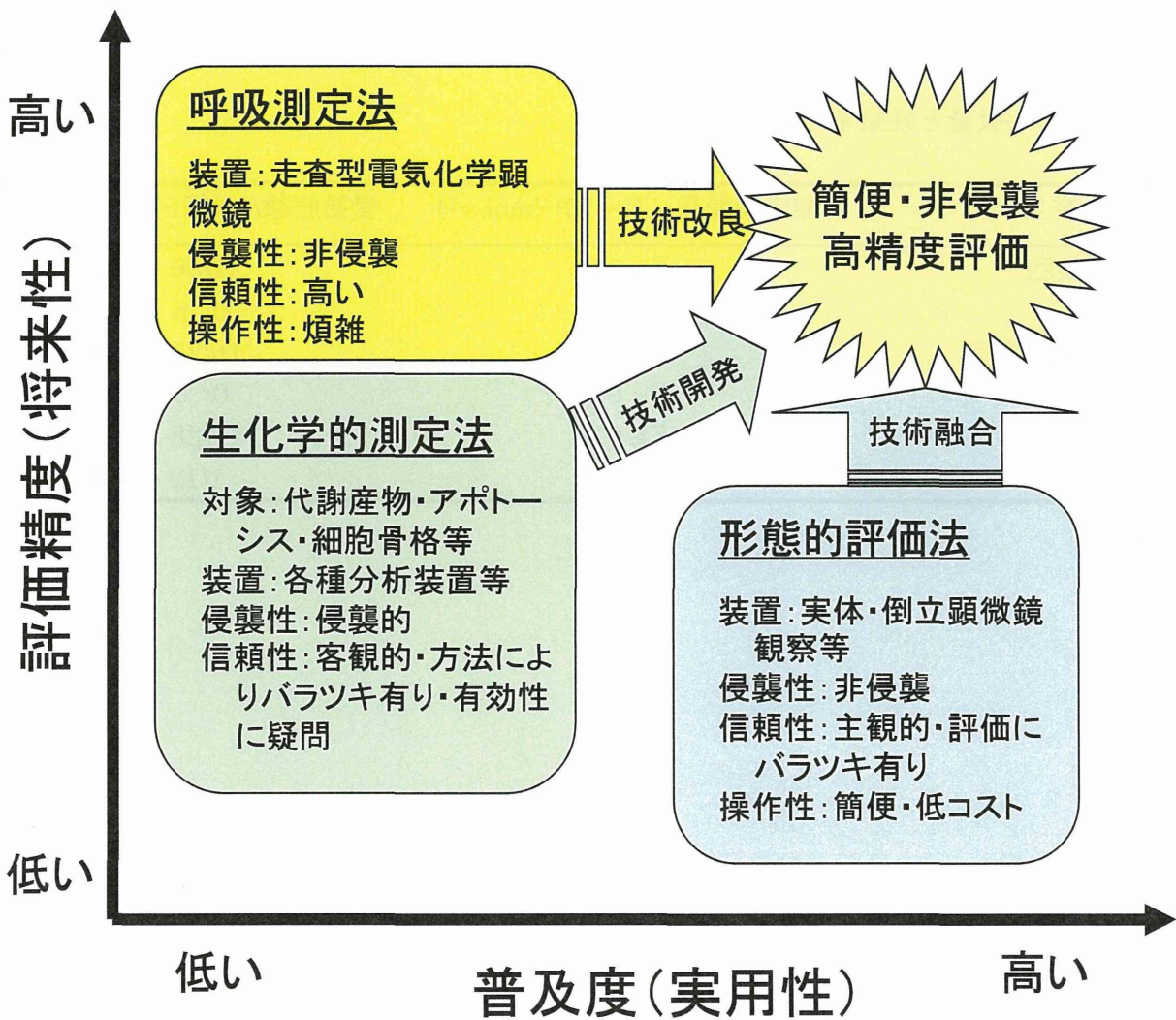


表1 ウシ胚の呼吸量と妊娠率の関係

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

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

**Title: Respiratory activity of single blastocysts measured by scanning electrochemical microscopy: the relationship between pre-freezing and post-thawing**

**Short title: Respiration and blastocoel re-expansion of pre-freezing and post-thawing blastocysts**

Yoko Kumasako<sup>a,b,d</sup>

Kaori Goto<sup>a</sup>

Megumi Koike<sup>a</sup>

Yasuhisa Araki<sup>c</sup>

Hiroyuki Abe<sup>b</sup>

Takafumi Utsunomiya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> St. Luke Clinic, Oita, Japan

<sup>b</sup> Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Yamagata, Japan

<sup>c</sup> The Institute for Advanced Reproductive Medical Technology, Gunma, Japan

<sup>d</sup> Corresponding author: Yoko Kumasako, 1-4-5, Higashi-Omichi, Oita City, Oita 870-0823, Japan.

Tel: 81-97-547-1234 E-mail address: [lukelab@oct-net.ne.jp](mailto:lukelab@oct-net.ne.jp)

## **Abstract**

The aim of this retrospective study was to investigate the relationship between the oxygen consumption rate of blastocysts before freezing and the viability after thawing



in regard to the re-expansion and blastomere loss after thawing. A total of 41 blastocysts from 29 in vitro fertilization (IVF) treatment cycles that were not scheduled for cryopreservation for the next cycle were examined. Good quality blastocysts were defined as less than 20% of blastomere loss, and rapid re-expanded blastocysts were defined as more than 50% blastocoel re-expansion during post-thawing culture for two hours. Evaluation of the two oxygen consumption rates before freezing and after thawing as well as the relationship between the morphological features of good-quality and rapid re-expanded blastocysts during the post-thawing culture. Good-quality blastocysts had a significantly higher oxygen consumption rate measured after thawing than damaged blastocysts; furthermore, rapid re-expanded blastocysts had a significantly higher oxygen consumption rate measured before freezing than slow or non-re-expanded blastocysts. These observations suggest that measurements of the oxygen consumption rate of individual blastocysts before freezing provides important information regarding viability after thawing from the viewpoint of blastocoel re-expansion.

**Key Words:** Oxygen consumption rate, blastocyst, cryopreservation, viability, blastocoel re-expansion

## **Introduction**

Success in assisted reproductive technology (ART) is related to the attainment of excellent quality oocytes and embryos prior to transfer. Embryo quality assessments include a number of invasive and non-invasive procedures. The invasive assessment methods are not useful for clinical application; therefore, practical procedures were used

to apply non-invasive assessment, which merely observes the morphological features. In the great majority of in vitro fertilization (IVF) clinics, cleavage stage embryos are assessed by the method introduced by L. Veeck (Veeck, 1991), which evaluates the degree of fragmentation, and blastocyst stage embryos are assessed by Gardner's scoring method (Gardner et al., 2000), which assesses blastocoel development based on the density of the inner cell mass and the number of cells in the trophectoderm. Thus, embryo quality scoring methods are based on morphological evaluations; better morphology correlates with higher pregnancy rates following transfer. Nevertheless, in some cases, embryos with low morphological quality result in a successful pregnancy and many embryos with good morphology fail to develop in the uterus. Therefore, it is desirable to employ an alternative assessment in addition to morphological assessment.

Recently, new assessment procedures have been reported. These include evaluation of the metabolic substances in the medium (Kaidi et al., 2001), the oxygen consumption in the medium (Lopes et al., 2005; Tejera et al., 2011), and continuous observation with a time-lapse microscope (Mio and Maeda, 2008; Meseguer et al., 2011). With advancements in ART, we have been able to produce comparatively better quality embryos than our previous attempts; in addition, we now limit the number of embryos transferred to reduce the risk of multiple gestations. Therefore, currently we must select a single, excellent-quality embryo for transfer. Oxygen consumption is a useful parameter for the evaluation of embryo quality because it provides important information about metabolic activity. Shiku et al. (Shiku et al., 2001) succeeded in non-invasively determining oxygen consumption of individual embryos by a scanning electrochemical microscopy (SECM) measuring system. This system enabled embryo

evaluation not only by morphological methods, but also by the mitochondrial activity in the cell (Abe et al., 2004; Shiku et al., 2004, 2005; Agung et al., 2005). In a previous study, we reported for the first time that we could form an estimate of embryos suitable for IVF by measuring oxygen consumption via the SECM. This study suggested that measuring embryonic respiration provided additional and valuable information regarding the embryo quality (Utsunomiya et al., 2008).

Currently, IVF centers and clinics are in demand for cryopreservation of supernumerary embryos remaining after transfer. It is important to determine the embryos most suitable for cryopreservation; however, it is difficult to select the better-quality blastocysts because we have no means to evaluate them before freezing. Therefore, the aim of the present study was to characterize morphological features and measure the oxygen consumption and respiratory activity of a blastocyst both before freezing and after thawing. In addition, we examined the relationship between blastocoel re-expansion after thawing and the respiratory activity of each blastocyst.

## **Materials and Methods**

### *Scanning Respiration Activity of a Single Blastocyst*

From August 2010 through November 2011, respiratory activity of 41 blastocysts from 29 patients was measured for oxygen consumption rate on day 5 (n = 19) or day 6 (n = 22) following insemination. In the present study, oxygen consumption was measured by the SECM system (Shiku et al., 2001). The SECM system included a measuring

instrument on an inverted optical microscope stage, a potentiostat (CRAS-1.1; Clino Ltd., Miyagi, Japan), as well as a notebook computer for a controller and analyzer (Figure 1). For the measurement of oxygen consumption, HFF 99 medium (Fuso Pharmaceutical Industries, Osaka, Japan) was transferred onto a plate with cone-shaped microwells. The microdisk electrode was scanned according to the z-direction from the outer edge of the blastocyst, which was located at the bottom of a microwell. The motor driven XYZ-stage was located on the microscope stage for electrode tip scanning. The XYZ stage and potentiostat were controlled by the computer. The oxygen consumption rate of the blastocyst was calculated by software, which was based on the spherical diffusion theory (Shiku et al., 2005). The measurement of the oxygen consumption rate of each blastocyst took approximately 30 seconds. It took less than two minutes to perform three measurements, which were used for the calculation of the average respiratory activity of each blastocyst.

The patients underwent treatment in our IVF-ET (embryo transfer) program was previously described (Utsunomiya et al., 2002, 2006). Following the IVF-ET, surplus embryos that patients preferred not to preserve or those embryos we deemed to be unsuitable for preservation due to their poor morphology were used for our study. Prior to the treatment, written informed consent was obtained from the patients. Ethical approval was given by our clinic's research ethics committee.

#### *Vitrification and thawing blastocysts with closed system*

A total of 41 early stage to expanded blastocysts (grade 3 to 4 by Gardner's blastocyst