

201308024A

厚生労働科学研究費補助金

医療 機器開発推進 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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇都宮 裕貴

平成26(2014)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 安全性および有用性に関する研究	1
宇都宮 裕貴	
（資料1）第9回胚細胞呼吸測定装置研究会（第3回厚生労働省班会議）	
（資料2）第4回デバイス開発会議	
（資料3）第10回胚細胞呼吸測定装置研究会（第4回厚生労働省班会議）	
（資料4）企画競争説明会	
（資料5）第5回デバイス開発会議	
（資料6）開発機器納品	
（資料7）第11回胚細胞呼吸測定装置研究会（第5回厚生労働省班会議）	

II. 分担研究報告

1. 凍結融解がヒト胚盤胞の形態と呼吸活性に及ぼす影響に関する研究 ..	105
寺田 幸弘	
（資料）図1-3、資料	
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	121
阿部 宏之	
（資料）図1-3、表1	
3. 呼吸活性測定によるマウス排卵後加齢卵の ミトコンドリア機能の評価に関する研究	133
高橋 俊文	
（資料）図	
4. ヒト体外受精・胚移植余剰胚を用いた胚呼吸に関する研究	139
福井淳史	
5. スフェロイドを用いたチップ型電極の測定結果に関する研究	143
菅沼 亮太	
（資料）図1-6	
6. 新規受精卵呼吸測定装置を用いた臨床研究に関する 倫理委員会承認の報告	153
志賀 尚美	
（資料1）介入研究プロトコール	
（資料2）説明文書	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	179
---------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	180
-----------------------	-----

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
安全性およ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)

I. 総括研究報告

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、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）を移植することが提唱された。しかしながら、法的な拘束力はないため、未だ症例によっては複数個の移植が行われているのが実情である。また、2013年8月に不妊治療助成に年齢および回数制限が追加されることが決定し、今後は着床能の高い優良な受精卵を選別し妊娠率を向上させることが一層重要となった。そこで平成24年度より現行機器の操作性および測定精度の向上を目的に新しいデバイスを開発し、その操作性・安全性および有用性の検討を行ってきた。

まず平成24年度の早期段階でPMDAとの薬事戦略相談（事前相談）を行った。その後、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、そしてチップ開発の統括をクリノ社と共に行い試作品を完成させた。

その後、平成25年度も継続してパナソニック・ヘルスケア社と試作品の改良を行い、最終的に臨床研究に使用するチップを完成し、操作性や耐久性などを検討した。そして、平成26年度に行う臨床研究（ヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定）のプロトコールを作成し、平成26年2月に東北大学倫理委員会の承認を得た。また、共同研究施設とともに臨床研究に使用する余剰卵の蓄積・管理を行った。さらにPMDAと薬事法の必要性に関する打ち合わせを行い、生殖医療における医療機器としての役割を詰めていく予定である。

今後、全ての共同研究施設で倫理委員会の承認を取得した後に、今年度開発したチップによるヒト余剰卵を用いた臨床研究を実施し、その有用性・安全性および操作性を検討する。また、それに先行する前臨床研究として、マウス受精卵を従来の形態学的評価のみの群と開発機器を用いた呼吸量測定併用群に分け、胚移植から胎仔出産まで観察し本チップの有用性と有害事象の有無を検討する。さらに、将来的な前方視的臨床試験に向けた大量生産をふまえて、パナソニック・ヘルスケア社と機器の試作および仕様の決定を目指す。

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）
高橋俊文（山形大学医学部講師）
福井淳史（弘前大学医学部講師）
菅沼亮太（福島県立医科大学講師）
志賀尚美（東北大学医学部助教）

A・研究目的

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、現在は単一受精卵移植が原則となった。さらに、2013年8月に不妊治療助成に年齢および回数制限が追加されることが決定し、今後は着床能の高い優良な受精卵を選別し妊娠率を向上させることが一層重要になった。

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、その有用性・安全性を報告してきた。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、普及の妨げになっている。そこで、現行機器の操作性および測定精度の向上を目的に新しいデバイスを開発し、その操作性・安全性および有用性の検討を下記の手順で遂行している。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（1-7）。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。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。そのため、まず平成24年度にPMDA

との薬事戦略相談を行った。その後、チップ開発に対してパナソニック・ヘルスケア社を中心に試作品を完成させた。そして平成25年度には、試作品の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、改良デバイスの開発を行うことを目的とした。また、それと並行して、平成26年度に行うヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定を目的とした臨床研究のプロトコールを作成し、倫理委員会の承認を得るための準備を行った。さらに、共同研究施設とともに平成26年度の臨床研究に使用する余剰卵の蓄積およびその管理を進めていくことも行った。

- (1) Yamanaka M, Abe H, et al. Prediction for developmental competence of human blastocyst based on its oxygen consumption. *Fertil Steril.* 26:3366-71. 2011
- (2) Yamanaka M, Abe H, et al. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod.* 26:3366-71. 2011
- (3) 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
- (4) Yoshida H., Abe H, et al. Quality evaluation of IVM embryo and imprinting genes of IVM babies. *J Assit Reprod Genet* 30:221-5. 2013
- (5) Kumasako Y, Abe H, et al. Respiration activity of single blastocysts measured by scanning electrochemical microscopy: The relationship between pre-freezing and post-warming. *J Mamm Ova Res* 30:30-5. 2013
- (6) Abe H. Quality evaluation of oocytes and embryos with highly sensitive and non-invasive technique for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy. *Jpn. J. Embryo Transfer* 35: 7-14. 2013
- (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

B・研究方法

新規開発デバイスを用いて正確な呼吸量を測定し、一般診療において容易に取り入れられるように研究を遂行した。また、平成26年度に行うヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定を目的とした臨床研究プロトコール作成および倫理委員会申請を進めた。さらに、平成26年度の臨床研究に使用する余剰卵の蓄積およびその管理を行った。

- ① 定期的な会議を開催し、新規デバイス開発や今後の研究計画などを検討した。また、機器開発に際し企画競争説明会を行い、採択企業を選定した。

1. 平成25年6月8日（仙台）
第9回胚細胞呼吸測定装置研究会
（第3回厚生労働省班会議）（資料1）
2. 平成25年9月2日（TV会議）
第4回デバイス開発会議（資料2）
3. 平成25年9月8日（旭川）
第10回胚細胞呼吸測定装置研究会
（第4回厚生労働省班会議）（資料3）
4. 平成25年9月10日（仙台）
企画競争説明会（資料4）
5. 平成25年12月10日（TV会議）
第5回デバイス開発会議（資料5）
6. 平成26年1月21日（仙台）
開発機器納品（資料6）
7. 平成26年3月2日（仙台）
第11回胚細胞呼吸測定装置研究会
（第5回厚生労働省班会議）（資料7）

- ② 平成26年度に行うヒト余剰卵を用いた臨床研究プロトコール作成および倫理委員会申請

今回、開発した機器を用いたプロトコールを作成し、東北大学倫理委員会の承認を取得する。その後、他の4大学病院においても同様に各施設における倫理委員会承認を取得する。

- ③ 余剰卵の蓄積およびその管理

各研究協力機関において、平成26年度の臨床研究に向けヒト余剰卵の集積及び管理を行う。

- ④ PMDAとの開発相談

今後の開発機器に関して、薬事法に基づく医療機器として開発するか、従来機器と同様に薬事法を介さない測定機器として開発するか相談した。

C・研究結果

- ① 定期的に会議を開催し様々な専門家との打ち合わせを行い、新しい機器開発に関する手法や意義、問題点、有害性などの検討を進めた。

1. 平成25年6月8日（仙台）
第9回胚細胞呼吸測定装置研究会
（第3回厚生労働省班会議）（資料1）

東北5大学病院の生殖医療担当医と山形大学阿部宏之、クリノ社が集まり機器開発業況や培養条件の設定、現状における問題点などに関して班会議を開催した。従来機器を用いた研究に比較し、新規開発デバイスによる問題点が提示され、現行機器からの改良事項や要望などが議論された。また、今後の研究に使用する余剰卵の集積・管理法などに関する検討も併せて行った。

2. 平成25年9月2日（TV会議）
第4回デバイス開発会議（資料2）

機器開発に関連するパナソニック・オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社、パナソニック・ヘルスケア社と共に、今後の開発計画の打ち合わせを行った。

従来の開発機器をさらに改良し、チップ構造の設計/プロセス開発、プレート実装、電気化学測定プロトコール開発、生体における酸素消費量評価などに関して議論した。そして、開発機器によるスフェロイド（乳癌細胞株：MCF-7）を用いた計測を行い、距離依存性の酸素消費量が得られていることを確認した。しかしながら、酸素濃度勾配や電極間の特性ばらつきが十分でなく引き続き検討を行っていくことを確認した。

3. 平成25年9月8日（旭川）
第10回胚細胞呼吸測定装置研究会
（第4回厚生労働省班会議）（資料3）

東北5大学病院の生殖医療担当医と山形大学の阿部宏之、東北大学臨床研究推進センターの藤原義明、クリノ社が集まりパナソニック社が開発している機器に関して、培養条件の設定や現状における問題点などに関して検討した。サイクリック・ボルタンメトリー（CV）波形の異常や測定感度の低下が認められることがあり、その原因の解明などについても議論した。また、現行機器からの改良事項や要望なども併せて議論された。

4. 平成25年9月10日（仙台）
企画競争説明会（資料4）

昨年度の試作機器は湿潤環境において全自動で測定が可能となり、今後の一般診療への普及を見据えた有望な試作品となった。しかしながら、反復使用に

よる測定精度の低下や最適な培養環境の確立など、未だ多くの課題を抱えており、直ちに臨床研究に用いることはできないと考えた。そこで、この試作品を改良し、より高精度で操作性の向上した安価な装置の開発を行うため企画競争を公募した。

当日は、複数の企業が説明会に参加し、開発に関する議論があったが、最終的にはパナソニック・ヘルスケア社が契約対象となり、開発規格提案書および開発実施体制が提示された。

5. 平成25年12月10日（TV会議）
第5回デバイス開発会議（資料5）

チップ開発・改良の進捗状況を評価し、臨床サイドからの要望や課題を提起した。今回の試作で組み立て工程の安定化と4wellタイプの設計を試み、乳癌細胞株（MCF-7）の生体スフェロイドを用いて酸素消費量算出に成功した経緯が報告された。

また今後の検討事項として、チップの設計改善や測定のばらつきを軽減する薄膜MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) プロセス技術改善が挙げられた。

6. 平成26年1月21日（仙台）
開発機器納品（資料6）

パナソニック・ヘルスケア社による全自動受精卵呼吸測定開発機器の納品が行われた。その開発機器には下記の要件を満たすと判断された。

- ① マニュアルのマイクロプローブ廃止
- ② 生体適合材のみ使用
- ③ 5分以内に測定可能
- ④ 一度に受精卵4個まで測定可能
- ⑤ 耐久性に優れている
- ⑥ 安価であること
- ⑦ 受精卵に有害事象が少ない
- ⑧ 測定電流が低い
- ⑨ 測定結果の再現性が高い

今後これらの機器を用いて動物卵・ヒト受精卵の呼吸量測定を試みていく。

7. 平成26年3月2日（仙台）

第11回胚細胞呼吸測定装置研究会 （第5回厚生労働省班会議）（資料7）

本年度に行われた研究に関する報告と議論が行われた。まず始めに、パナソニック・ヘルスケア社による全自動受精卵呼吸測定装置の開発経緯とその有用性が示された。これまでの問題点が改善され、癌細胞株やウシ受精卵を用いた呼吸量測定が可能となり、今後ヒト受精卵における呼吸量測定プロトコルの確立やその評価方法などが検討された。その後、PMDA相談、プロトコル作成や倫理委員会承認、ヒト余剰卵蓄積および管理などに関する経緯が提示・議論された。

② 平成26年度に行うヒト余剰卵を用いた臨床研究プロトコル作成および倫理委員会申請・承認（資料8）

今回、開発した機器を用いたプロトコルを作成し、東北大学倫理委員会に申請し平成26年2月に承認を取得した。今後、他の4大学病院においても同様に倫理委員会の承認を取得していく。当初は平成25年度内に全施設において取得予定であったが、機器開発に時間を要したため研究分担施設による承認は平成26年4月頃になる予定である。

③ 余剰卵の蓄積およびその管理

各研究協力機関において、平成26年度の臨床研究に向けヒト余剰卵の集積及び管理を行っている。現段階では50例を研究予定と考えている。これまでのところ、余剰卵は東北大学病院で96例、秋田大学で60例あり、山形大学、弘前大学、福島県立医大では確認中である。管理方法・使用方法・廃棄方法などについても最終確認を行っている。

④ PMDAとの開発相談

今後の開発機器に関して、平成26年2月にPMDAと電話で相談を行った。薬事法に基づく医療機器として開発する必要性があるか、もしくは従来機器と同様に薬事法を介さない測定機器として開発するか検討していく必要があることを話し合った。さらに、胎児は「ヒト」と想定されているが受精卵は「ヒト」と認識されているか、また「ヒト」と定義されていないとしても「ヒト」に準じて扱う必要があることについても今後考慮していく必要があることを確認した。

D・考察

今回の研究において、湿潤環境において全自動で測定が可能となり、今後の一般診療への普及を見据えた有望な機器が開発された。従来機器と比較し、測定の自動化、測定時の湿潤環境の保持、測定感度の高さ、有害事象の発生頻度などにおいて明らかに有用かつ簡便であることが推察された。プロトコル作成後の倫理委員会承認が若干遅れているが、今後速やかに進めていくことは可能である。早期にヒト余剰卵を用いた臨床研究を開始し、その有用性・安全性・操作性・経済性を検討していきたいと考えている。

E・結論

新規開発した受精卵呼吸量測定装置は、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、ヒト余剰卵を用いてその有用性と安全性を検討し、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

特記事項なし

H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

(資料 1)

第9回 胚細胞呼吸測定装置研究会

(第3回 厚生労働省班会議)

日時：平成25年6月8日（日）9:00～10:00

場所：山形テルサ 3階 研修室A

プログラム

座長 東北大学 宇都宮裕貴

① 開会の辞

山形大学 阿部 宏之

② チップ試作品の開発状況

東北大学 宇都宮裕貴

③ 平成25年度厚生労働省科研費について

東北大学 宇都宮裕貴

④ 各施設における進捗状況

各施設担当者

⑤ 閉会の辞

東北大学 八重樫伸生

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

平成 25 年 6 月 8 日山形市において開催された
第 135 回東北連合産科婦人科学会学術講演会内において
第 9 回胚細胞呼吸機能研究会会議が開催されました。

宇都宮裕貴准教授による研究機器の開発状況や各関連機関との情報交換の状況が発表されました。それに伴い新規の機器開発へ向け培養液の条件設定など、詳細な情報交換が行われていました。また、各大学間の進捗状況等の確認が行われました。



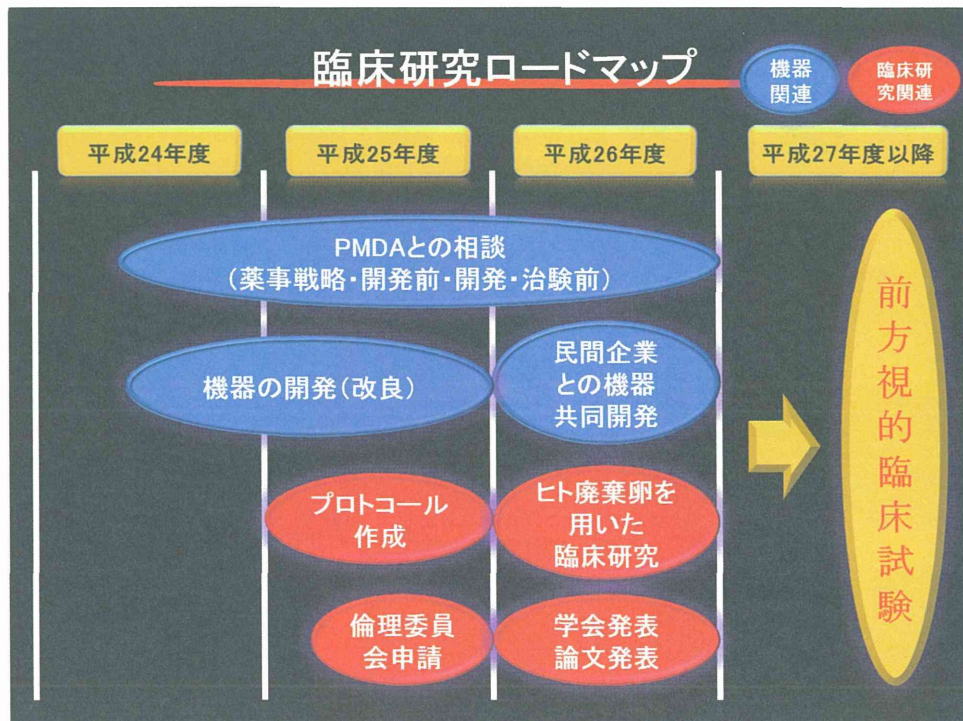
厚生労働省科研費の取得もあり、本会議も 9 回目を迎えることが出来ました。成果も着々と上がっております。最新の知見を吸収しながら世界へ向けて新しい情報発信の場となる可能性を大いに秘めた、大変有意義な討論が行われました。



次回は 9 月、北日本連合(北海道旭川市)で開催予定です。

平成25年度厚生労働省科研費について

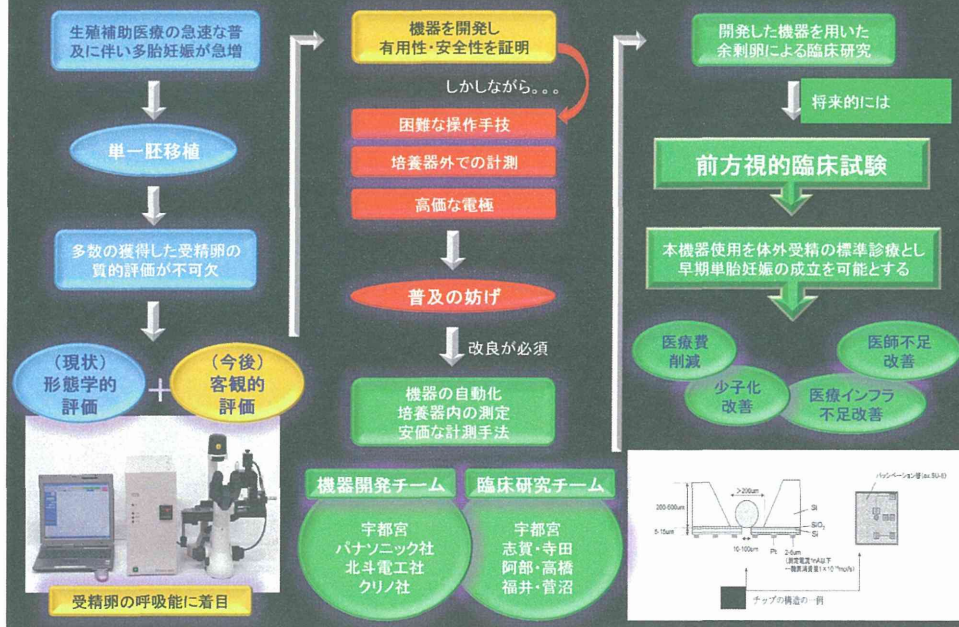
平成25年6月8日
宇都宮 裕貴



平成25年度

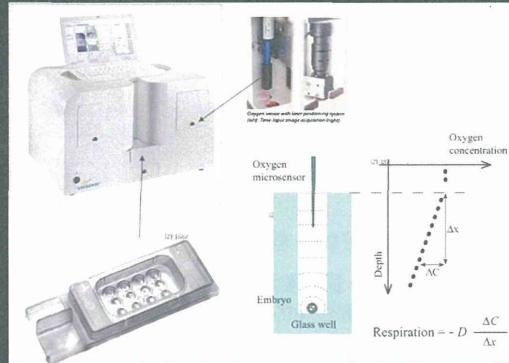
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
PMDA 相談			①							②		
班会議			①			②					③	
企業 開発相談	随時											
機器試作	試作品③			試作品④			試作品⑤ (必要時)					
精度評価		第3作評価			第4作評価			第5作評価				
プロトコール 作成							作成					
倫理委員会 申請										申請		

7. 研究概要 流れ図



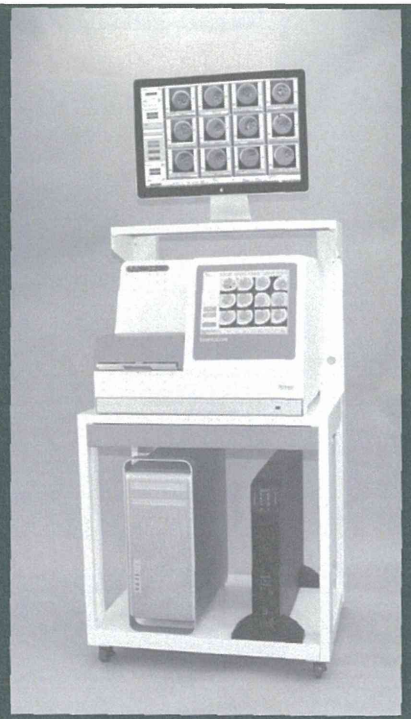
世界での開発状況

Spain & Denmark 合同チーム



(Embryoscope, version C; Unisense Fertilitech)

EmbryoScope™ Time-lapse Embryo Monitoring System



■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	1,189,633	全文	quality
S003	715,872	全文	oxygen
S004	668,781	全文	consumption
S005	903,857	全文	evaluate
S006	481,348	全文	evaluation
S007	183,740	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。

平成24年度

	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
PMDA 相談	第1回							
班会議 (研究会)		第1回						第2回
企業開発相談 契約		第1回				第2回	第3回	
機器試作		第1・2作						
精度評価							第1・2作評価	

平成26年度

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
PMDA相談						①					②	
班会議			①			②				③		
機器試作仕様決定	随時											
余剰卵による臨床研究	多施設(8施設)共同研究											
学会発表				国際学会			国際学会			国内学会		
論文投稿							論文作成・投稿					

PMDA開発相談①(8月22日)

医療機器か？測定機器か？

保険診療ではない、顕微鏡やICSIなどの機器も医療機器ではないことから測定機器として進めることが可能

受精卵はヒトか？

「胎児はヒトである」と定義されているが、受精卵に関しては決まった定義はない

(資料 2)

第4回受精卵活性測定デバイス開発

生体を用いたデバイス評価
(末永研究室 ご協力)

2013年 9月 2日

パナソニック株式会社
オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社
技術本部 エコマテリアル開発センター
バイオデバイスグループ

Panasonic

生体を用いたデバイス評価

実験計画

【日程】 2013/07/16 ~ 2013/07/19 (4日間)

【場所】 東北大学 原子分子材料科学高等研究機構(兼 環境科学研究科、工学部 化学・バイオ工学科) 末永研究室

【目的】 一次試作チップ(ME1301)を使った、生体(スフェロイド)の酸素消費量評価におけるノウハウの蓄積/課題抽出

- ◆測定プレート(Proto.1) 課題抽出
- ◆生体評価に至るまでの電気化学測定プロトコル ノウハウ蓄積
- ◆スフェロイド培養、マニピュレーション ノウハウ蓄積
- ◆溶存酸素の還元電流実測、スフェロイドによる酸素消費量に対する感度の把握
- ◆生体の酸素消費量評価に適したデバイス構造 ノウハウ蓄積、溶存酸素濃度分布シミュレーション協力要請

【評価サンプル】

受精卵位置決めキャビティサイズと作用電極サイズ
設計マトリックス

キャビティ ○形 直径 [um]		作用電極 直径 [um]		
		10	5	3
400		○		
300		○	○	
240		○	○Typ.	○
200		○	○	
100			○	
50			○	

※キャビティパターン端からの作用電極距離(C-W距離)
20 / 50 / 100 / 150 / 200um
上下対称測定

- ◆測定プレート(Proto.1) 実装品 3台
 - ①については、測定プレート2個分 実装する。(計6チップ)
 - ②については、測定プレート1個分 実装する。(計3チップ)
 - 測定プレート実装後、フェロシアン化カリウムメディエータで初期CV評価 @門真

- ◆予備品
6種類のチップについて、各2個づつFFC実装する。

①キャビティ直径 依存性
→ 最適デバイス構造

②作用電極 直径 依存性
→ 測定プロトコル

Panasonic

2013/09/02

受精卵活性測定
デバイス

生体を用いたデバイス評価

実験結果 概要 ※青字・・・東北大学 末永研究室ご協力

取り組み内容	進捗状況(できたこと)	今後の取り組み内容
①チップ構造設計／プロセス開発 ・一次試作 ME1301-P01 ・溶存酸素濃度分布Sim.	◆P01条件Fix。評価サンプル確保 ◆ME1301構造 拡散Sim.実施 還元電流値、2D-Sim.情報入手	◇二次試作ME1301-P02進行
②プレート実装 ・Proto.1 構造決定 ・生体評価用Proto.1試作	◆Proto.1 完成 3プレート組立 →東北大(末永研)でのテストへ	◇Proto.1測定プレート改善 (プレート専用設計化、液シール 構造改善、実装容易性向上 等)
③電気化学測定プロトコル開発 ・東北大(末永研)での評価	◆低濃度メディエータCV、CA測定 ◆溶存酸素還元電流測定 ◆メディエータ選択での課題抽出	◇メディエータ改善(低濃度FMA) → 微小電流測定系 必要 ◇電気化学測定による電極汚染、 劣化抑制
④生体での酸素消費量評価 ・スフェロイドを用いた評価 (1st try)	◆スフェロイド操作確認 ◆スフェロイド有無による 酸素還元電流差を確認	◇第2回実験 計画検討 (第1回実験では、生体からの距離 と酸素還元電流のデータ不十分)

Panasonic

パナソニック(株) AIS社 技術本部 エコマテリアル開発センター バイオデバイスグループ 3

