

まとめ／今後の計画

まとめ

- (1) 専用設計のProto.2測定プレート(1ウェルタイプ)を完成。組立工程の安定化を確認。
4ウェルタイプのESO測定プレート設計／第1試作完了。Proto.2同等性能であることを確認。
- (2) 東北大学 工学部 末永研究室のご協力により、生体(スフェロイド)での酸素消費量算出に成功。
- (3) スフェロイド径を変えてスフェロイド酸素消費量を評価したが、スフェロイド径に依存した傾向は見られるものの、チップ間／測定間のバラツキが現状では大きい。

今後の検討予定

- (1) チップ設計／薄膜MEMSプロセス技術開発
 - ・生体近傍での溶存酸素濃度分布の二次元分布を考慮した、チップ設計の改善
 - ・測定バラツキ、電極特性バラツキを低減するチップ設計、および薄膜MEMSプロセス技術改善
- (2) プレート設計／組立工法開発
 - ・動物受精卵での実験に対応可能な、「ESO測定プレート」の設計および試作
- (3) 電気化学測定プロトコル開発
 - ・複数の生体(スフェロイド)での酸素消費量比較
 - ・測定バラツキを低減する測定条件の開発

以上

(資料 7)

第 11 回 胚細胞呼吸測定装置研究会

(第 5 回 厚生労働省医療技術実用化総合研究事業 班会議)

日時：平成 26 年 3 月 2 日 (日) 9:00～10:00

場所：江陽グランドホテル 4 階 千歳の間

プログラム

進行 東北大学 宇都宮 裕貴

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1・開会の辞 | 東北大学 八重樫 伸生 |
| 2・試作機器の開発状況 | パナソニック(ヘルスケア、AIS社) |
| 3・本研究会今後の方向性 | 東北大学 宇都宮 裕貴 |
| 1) 倫理申請、余剰卵蓄積について | |
| 2) 研究報告書記載について | |
| 3) 来年度の研究計画 | |
| 4・各施設における進捗報告 | 各施設担当者 |
| 5・閉会の辞 | 秋田大学 寺田 幸弘 |

第 11 回 胚細胞呼吸測定装置研究会

(第 5 回 厚生労働省医療技術実用化総合研究事業 班会議)

場所： 江陽グランドホテル 4 階 千歳の間

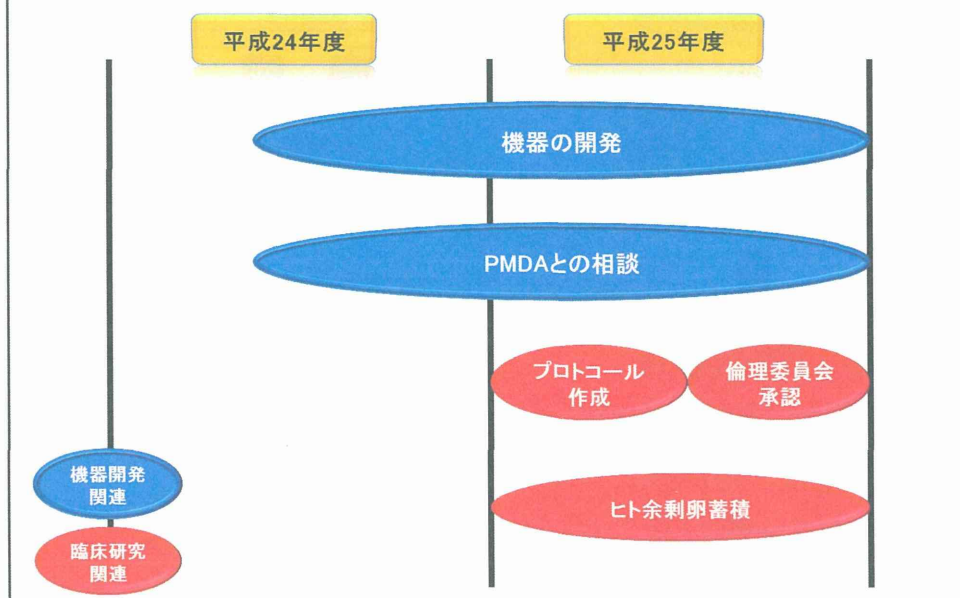
パナソニックヘルスケア社様、クリノ社様と検討を重ねて胚呼吸測定装置の試作品がついに完成し、牛を用いた研究結果等に対して有意義なディスカッションが行われました。倫理申請等の調整を経て平成 26 年度からはいよいよ本格的な研究開始となります。研究の結果について十分議論を重ね、今後の生殖医療における新たな指針を東北の地から世界へ発信していくことができればと思います。次の研究会は 6 月(東北連合 福島)予定



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

平成26年3月2日
宇都宮 裕貴

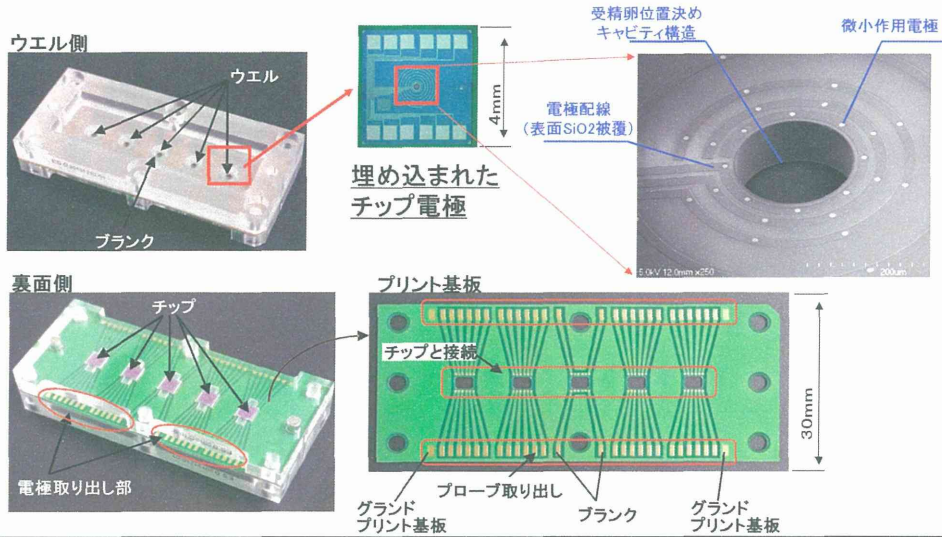
研究ロードマップ



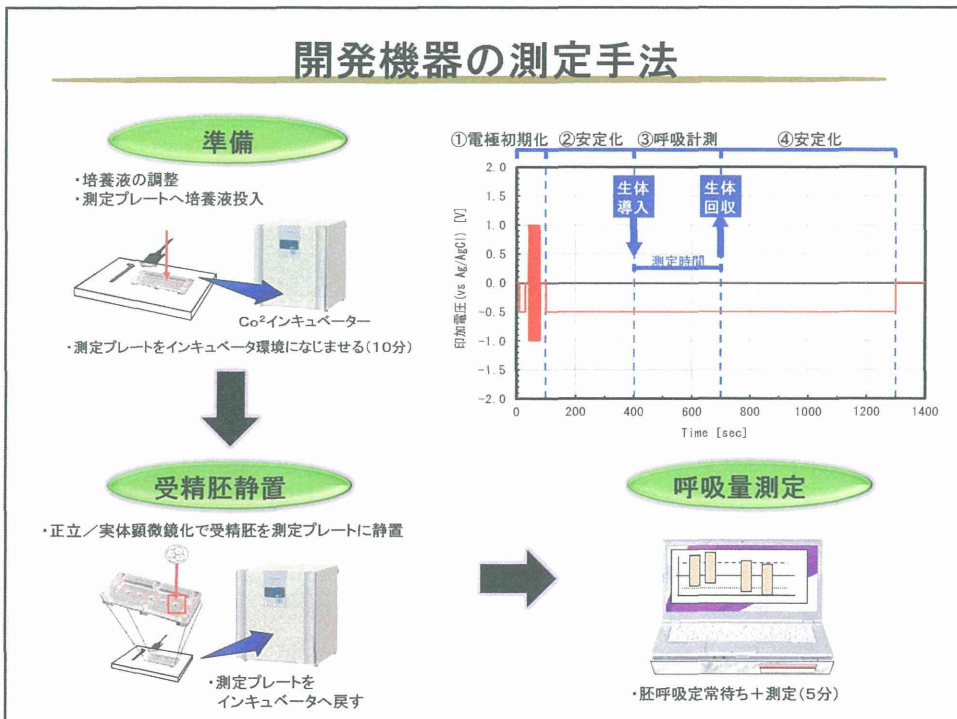
開発したチップ型機器

■チップ型機器

従来のガラス棒状電極に対し、操作性と測定精度を向上した半導体機器



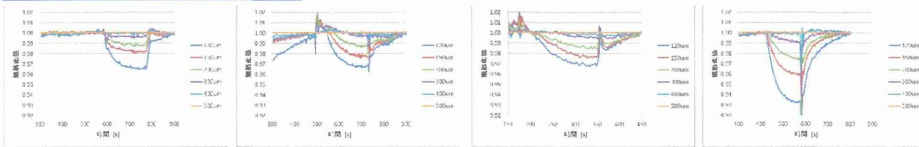
開発機器の測定手法



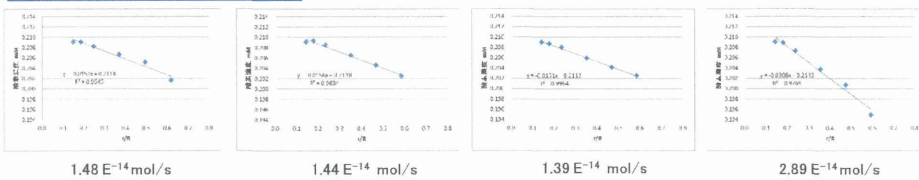
ウシ受精卵による性能評価

同一電極チップを用いたウシ受精卵(4個)の測定

Blank補正(500um電極で規格化)



呼吸活性算出(酸素濃度と距離係数)



プロトコール作成

ヒト余剰卵(廃棄卵)を用いて、開発機器の有用性および安全性を確認

主要エンド
ポイント

呼吸量を測定し、その値と胚盤胞
への到達率および孵化率

副次エンド
ポイント

従来の形態学的評価と
新規呼吸量測定評価法との相関

本機器使用による有害事象発現

評価項目	登録時	受精後			プロトコール 治療終了時 /中止時
		3日	5日	7日	
母体背景情報	○				
呼吸量測定検査		○			
顕微鏡下形態観察		○	○	○	○

倫理申請

東北大学で倫理承認取得
(平成26年2月)



研究分担施設で承認申請
(平成26年3月)

(受付番号: 2013-1-348)

様式第3号 備 考 委 員 会
審 査 結 果 通 知 書

平成26年2月21日

実施責任者: 宇藤 宏 氏 職 名 東北大学大学院医学系研究科長
大 内 重 明 印

研究課題名: 受精卵保存施設設置を用いた臨床試験に備えるための安全性および有用性に関する研究

研究期間: 西暦2014年4月~西暦2015年3月

申請のあった上記研究計画について、審査の結果下表のとおり判定しました。

判定

1. 承認する。
2. 条件付きで承認する。
3. 承認しない。
4. 承認しない。
5. 該当しない。

条件又は変更動向の内容及び理由

1. 承認不可判定理由にすることが望ましいと考えます。ご検討ください。承認不可判定理由にすると、実施計画書、プロトコルだけでなく、説明文書および同意書において、同意書採択などの内容を修正する必要がありますので、確認してください。
2. 本報告が、この研究計画の作成を行う医療機関承認申請に関する論議資料には該当しない旨の文書を添付してください。
3. 研究終了後のデータの取扱いについて、終了後も保存するのであれば、実施計画書及びプロトコルにも添付して説明文書の1号欄に、保存する旨の内容を添付してください。
4. 説明文書の1号欄において、二次利用の必要性が不適切なもので、削除してください。

文書を訂正し、webシステムに修正履歴をアップロードしてください。

【備考】承認する、条件付きで承認する、承認しない等のコメントの採否については、臨床研究一課より倫理申請手続書として届出してください。承認まで承認する、承認しないの届出書は行いません。
東北大学大学院医学系研究科倫理委員会審査員 委員長 橋本 博 印

PMDAとの相談

生殖医療における
従来機器の取り扱い

受精卵の扱い



医療機器としての
薬事審査の必要性

余剰卵蓄積

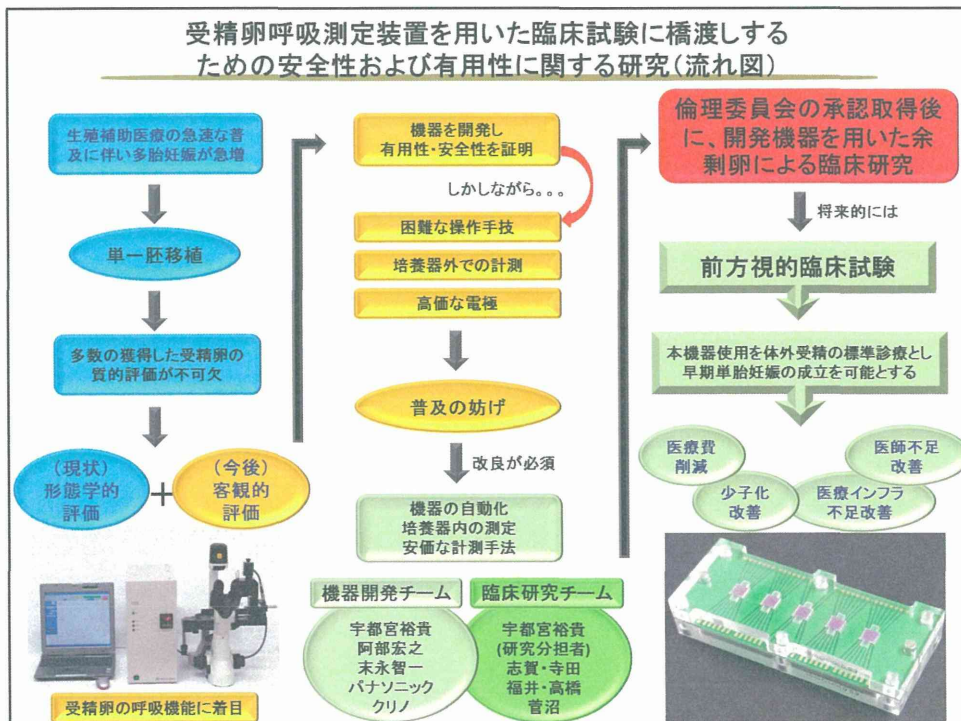
東北大学・秋田大学
弘前大学・山形大学
の合計で156例



今後、同意取得予定
(平成26年4-7月)

平成26年度年次計画工程表

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
①倫理申請 ②同意取得	関連施設											
③マウス受精卵による研究	前臨床研究											
④ヒト余剰卵による臨床研究					多施設共同臨床研究							
⑤学会発表							発表					発表
⑤論文投稿										論文作成・投稿		
⑥班会議			①			②				③		
⑦PMDA相談						①					②	
⑧機器試作仕様決定	随時											



II. 分担研究報告書

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

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

研究分担者 寺田 幸弘 秋田大学教授

研究主旨

凍結融解胚移植は、生殖補助医療における妊娠率の向上に大きく寄与している。近年では、複数の胚を融解した場合や、移植のキャンセルのような不測の事態が生じたケースにおいて、一度融解した胚を再度凍結して利用することの臨床的有用性も報告され始めている。しかし、胚を複数回凍結融解するという操作が胚自体に与える影響については動物胚を含めても十分な検討がなされておらず、特にヒト胚では情報が限られている。本研究では、患者の同意を得た廃棄対象の余剰凍結胚を用い、複数回凍結融解したヒト胚における形態的变化を観察した。さらに機能的な変化については、試料に対して非侵襲的な測定手法である細胞呼吸活性測定装置（CRAS-1.0、クリノ社）の特性を生かし、複数回凍結融解した同一のヒト胚における呼吸量の変化を追跡しようとした。

ヒト胚盤胞の凍結と融解は、北里バイオファルマ社の Cryotop Safety Kit を用いて行った。融解した胚盤胞は、数時間の回復培養後に生存率を調べ、Gardner 分類によるグレードを記録した。さらに、倒立顕微鏡に装着されたデジタルカメラで画像を取得し、画像解析ソフト（ImageJ）を用いて胚盤胞の大きさ（径）を計測した。解析後、変性せずに生存した胚は再度凍結した。凍結融解は 5 回まで繰り返し行った。また、細胞呼吸測定機器（CRAS-1.0、クリノ社）を用いて、凍結融解が胚盤胞の呼吸量に与える影響について検討した。

本研究の結果、ヒト胚盤胞は 5 回の凍結融解後も生存することが可能であることが明らかとなった。本研究で用いた cryotop 法による超急速ガラス化凍結保存は、ヒト胚にとって極めてダメージの少ない手法であると考えられる。また、凍結融解前後の胚盤胞の大きさ（径）の変化は、発生能を示す簡便で客観的な指標となる可能性が示唆された。呼吸量測定と併用することで、ヒト胚の評価法の精度向上につながることを期待される。本研究では、9 年間以上凍結保存されたヒト余剰胚も研究に使用可能であることが明らかとなった。これらは、受精卵呼吸測定装置の新型デバイスの開発に必要な、ヒト凍結余剰胚に関する有用な基礎的データとなるものと思われる。

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)
金森恭子(秋田大学産婦人科医員)
佐藤亘(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)
椛嶋克哉(秋田大学産婦人科培養士)

A・研究目的

生殖補助医療（ART：Assisted Reproductive Technology）は、卵管閉塞や乏精子症などの難治性不妊症患者に対して、配偶子（卵子・精子）を体外に取り出し、受精（体外受精、顕微授精）させ、体内に戻す（胚移植する）治療法である。日本産科婦人科学会のART登録データによると、2011年に我が国では27万件の生殖補助医療が施行され、それにより3万1千人の児が誕生している。本邦の2011年の全出生数は105万人であることから（厚生労働省人口動態統計）、出生児の3%、約30人に一人が生殖補助医療に由来していることになる。

生殖補助医療のうち、2011年には体外受精が7万1千件、顕微授精が10万2千件、凍結胚を用いた治療が9万6千件行われている。体外受精や顕微授精による出生児数はそれぞれ5千人と、近年横ばい傾向にある。それに対し、凍結胚による出生児は急速に増加して2万2千人と、2007年に比べ倍増している（図1）。この原因として、2008年の日本産科婦人科学会会告において、多胎防止の観点から単一胚移植が原則となり、治療周期あたりの移植胚数を1個に制限する傾向が強まったことが挙げられる。通常、排卵誘発によって複数の卵子が採取されることから、単一胚移植後に生じる余剰胚を凍結保存する必要性が高くなっている。

凍結融解胚移植は、受胎側（母体）の許容に合わせて移植時期を調整することが可能である。このため、生殖補助医療における妊娠率の向上にも大きく寄与している（新鮮胚移植妊娠率：21.3% vs 凍結融解胚移植妊娠率：34.2%、日本産科婦人科学会2011年ART登録データ）。また、複数の胚を融解した場合や、移植のキャンセルのような不測の事態が生じたケースにおいて、一度融解した胚を再度凍結して利用することの臨床的有用性も報告されている（1-3）。しかし、胚を複数回凍結融解するという操作が胚自体に与える影響については動物胚を含めても十分な検討がなされておらず、特に、ヒト胚では情報が限られている。

本研究では、患者の同意を得た廃棄対象の余剰凍結胚を用い、複数回凍結融解したヒト胚における形態的変化を観察した。さらに機能的な変化について、試料に対して非侵襲的な測定手法である細胞呼吸活性測定装置（CRAS-1.0、クリノ社）の特性を生かし（4-6）、複数回凍結融解した同一のヒト胚における呼吸量の変化を追跡しようとした。

B・研究方法

患者の同意を得た廃棄対象の余剰凍結胚（胚盤胞）を用いた。胚盤胞の凍結と融解は、北里バイオファルマ社のCryotop Safety Kitを用いて行った。融解した胚盤胞は、数時間の回復培養後に生存率を調べ、Gardner分類によるグレードを記録した。さらに、倒立顕微鏡に装着されたデジタルカメラで画像を取得し、画像解析ソフト

（ImageJ）を用いて胚盤胞の大きさ（径）を計測した。解析後、変性せずに生存した胚は再度凍結した。凍結融解は5回まで繰り返し行った。また、細胞呼吸測定機器（CRAS-1.0、クリノ社）を用いて、凍結融解が胚盤胞の呼吸量に与える影響について検討した。

C・研究結果

計6個の胚盤胞を供試した。6個の胚盤胞の凍結前グレードは、No. 1 : 4CC、No. 2 : 3CC、No. 3 : 3AA、No. 4 : 3AA、No. 5 : 4AA、No. 6 : 3BCであった。凍結融解後の生存率は、1回目100% (6/6)、2回目83.3% (5/6)、3回目83.3% (5/6)、4回目66.7% (4/6)、5回目66.7% (4/6)であった。凍結融解を繰り返すことにより生存率は低下したものの、5回の凍結融解後も生存が可能であった。グレードの高い胚盤胞 (No. 4 : 3AA、No. 5 : 4AA) ばかりでなく、グレードの低い胚盤胞 (No. 1 : 4CC、No. 2 : 3CC) も5回の凍結融解が可能であった。途中で変性した胚盤胞 (No. 3 : 3AA、No. 6 : 3BC) は、採卵時の年齢が30代後半と高く (No. 3 : 38歳、No. 6 : 39歳)、発育速度が遅い (No. 3、No. 6共に6日目胚盤胞) 傾向がうかがわれた。

凍結保存期間は5日間から9年4ヶ月間まで幅があったが (No. 1 : 9日間、No. 2 : 5年6ヶ月間、No. 3 : 9年4ヶ月間、No. 4 : 9年1ヶ月間、No. 5 : 8年3ヶ月間、No. 6 : 5日間)、凍結保存期間の影響は特に認められなかった。

凍結融解を繰り返すと、それぞれの回復培養時間が積算されることになる。回復培養後の胚盤胞径を計測したところ、凍結融解を繰り返しても常に拡張していたNo. 4の胚盤胞 (1回目 : 155 μ m、2回目 : 167 μ m、3回目 : 174 μ m、4回目 : 188 μ m、5回目 : 271 μ m) がhatchingした (図2)。その他の拡張と縮小が共にみられたり、常に縮小するような胚盤胞はhatchingすることはなかった (図2)。呼吸量に関しては、サーモプレートの破損等の原因により安定した結果が得られなかった (添付資料)。クリノ社のアドバイスを得ながら、今後も引き続き検討を行っていく。

D・考察

ヒト胚盤胞は5回の凍結融解後も生存することが可能であった。このため、一度凍結融解した胚を再度凍結融解した胚 (再凍結再融解胚) から、生児の獲得が報告されているものと思われる。また、凍結融解前後の胚盤胞の大きさ (径) の変化は、発生能を示す簡便で客観的な指標となる可能性が示唆された。呼吸量と併用することで、ヒト胚の評価法の精度向上につながるものが期待される。

E・結論

ヒト余剰胚を用いて、凍結保存と呼吸量測定に関する検討を行った。ヒト胚盤胞は5回の凍結融解後も生存が可能であり、cryotop法による超急速ガラス化凍結保存はヒト胚にとって極めてダメージの少ない手法であると考えられる。また、本研究では9年間以上凍結保存されたヒト余剰胚も研究に使用可能であることが明らかとなった。これらは、受精卵呼吸測定装置の新型デバイスの開発に必要で、ヒト凍結余剰胚に関する有用な基礎的データとなるものと思われる。

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

(参考文献)

- 1) Koch J, Costello MF, Chapman MG, Kilani S. Twice-frozen embryos are no detriment to pregnancy success: a retrospective comparative study. *Fertility and Sterility*, 96, 58-62, 2011.
- 2) Murakami M, Egarashi A, Murakami K, Araki Y, Kuramoto T. Perinatal outcome of twice-frozen-thawed embryo transfers: a clinical follow-up study. *Fertility and Sterility*, 95, 2648-2650, 2011.
- 3) Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, Araki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertility and Sterility*, 91, 383-386, 2009.
- 4) Abe H. A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *Journal of Mammalian Ova Research*, 24, 70-78, 2007.
- 5) Moriyasu S, Hirayama H, Sawai K, Kageyama S, Aoyagi S, Shiku H, Matsue T, Abe H, Kacchi M, Hoshi H, Minamihashi A. Relationship between the respiratory activity and the pregnancy rate of bisected bovine. *Reproduction Fertility and Development*, 19, 219, 2007.
- 6) Utsunomiya T, Goto K, Nasu M, Kumasako Y, Araki Y, Yokoo M, Itoh-Sasaki T, Abe H. Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25, 2-7, 2008.

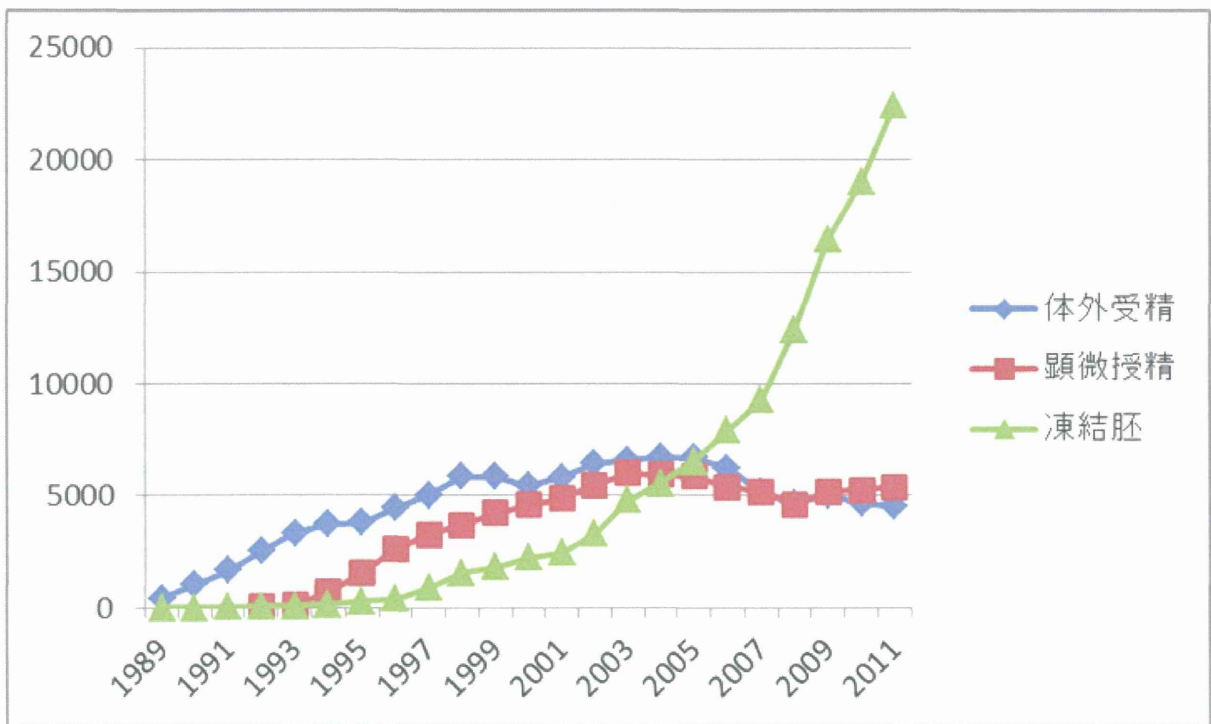


図1. 生殖補助医療による出生児数の内訳と推移

日本産科婦人科学会ART登録データより

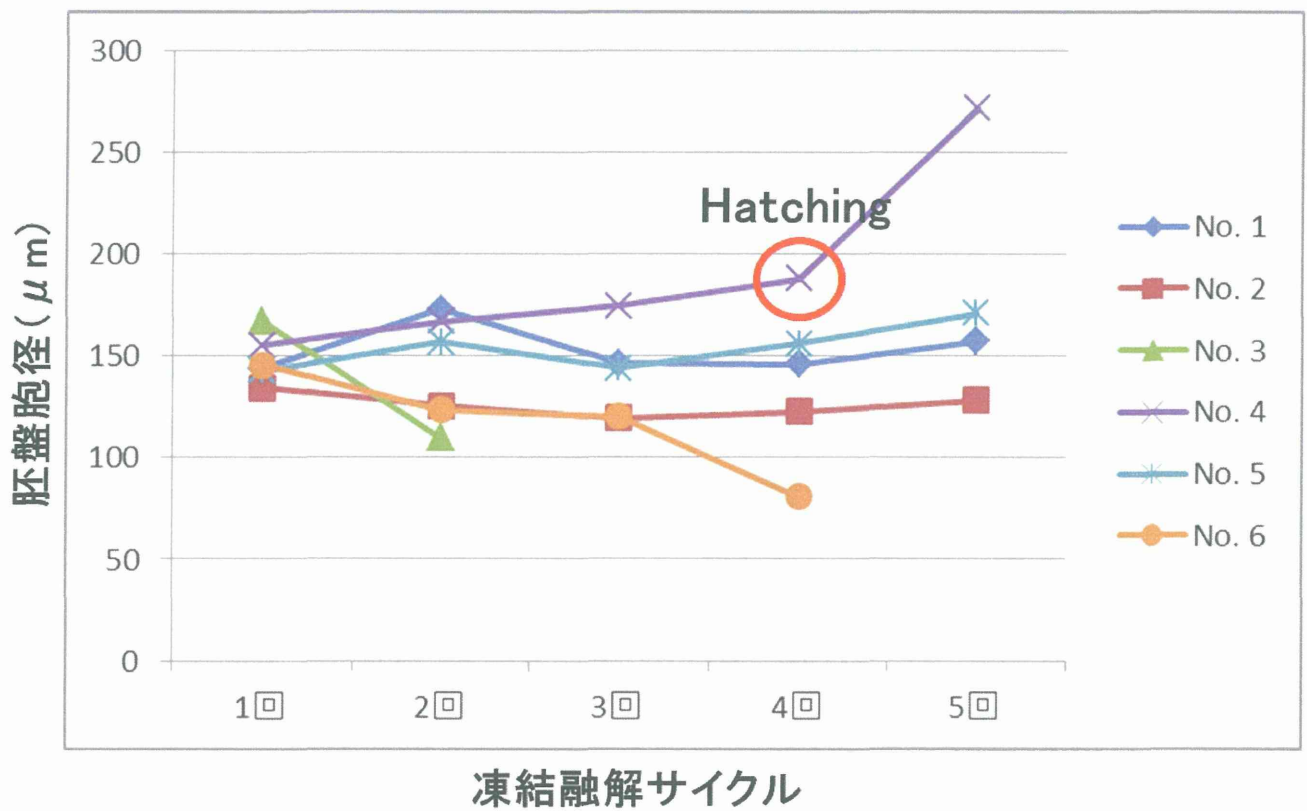


図2. 複数回凍結融解したヒト胚盤胞における径の変化

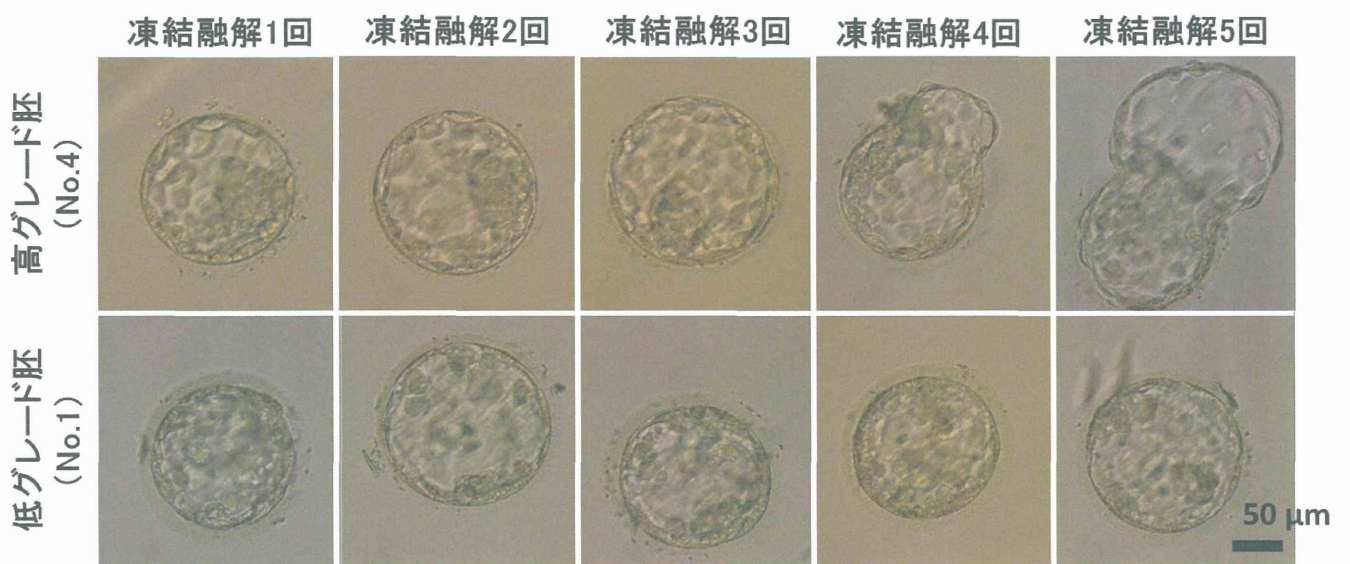
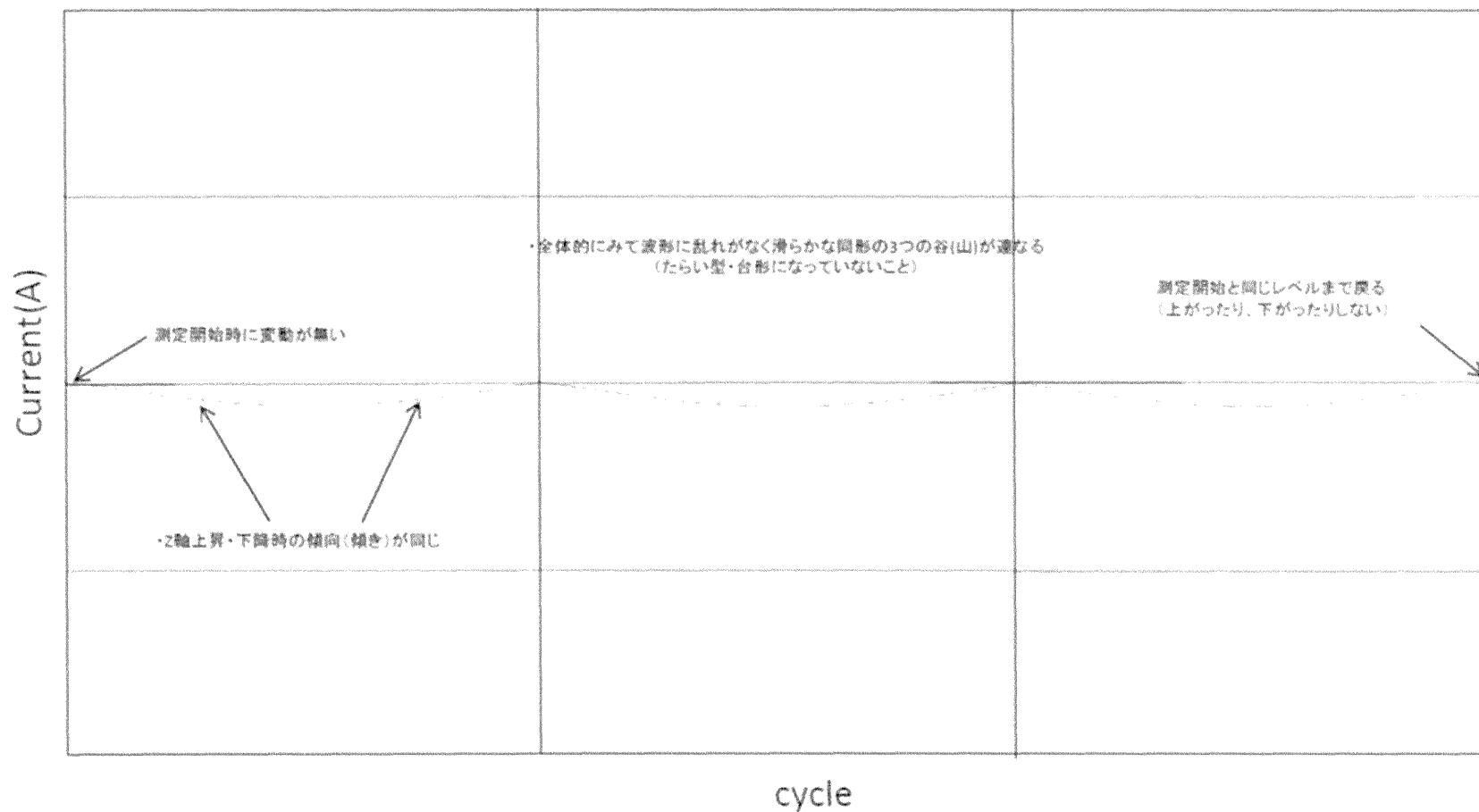


図3. 複数回凍結融解したヒト胚盤胞における形態の変化

・呼吸活性が高い胚を測定した場合の理想的な波形

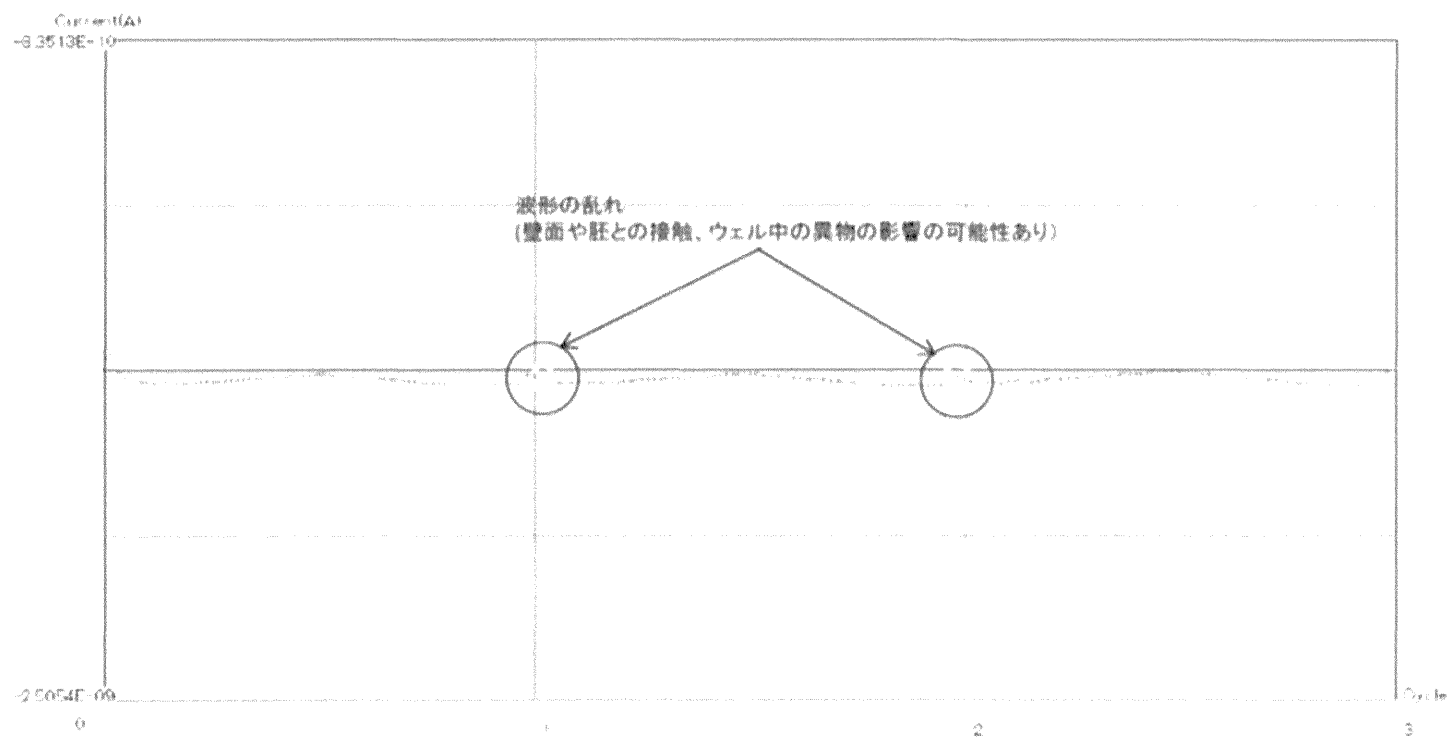
(ブランク測定時・活性が低い胚などの測定時は、測定液の状態によっては上向きの山になる場合もあり)



※あくまで理想形です。上記を満たさなくとも許容できるものもありますので、不明な場合はデータを御送りいただければ確認させていただきます。

・測定不良例 1

sample3_2times_1



・測定不良例 2

sample5_2times_3

