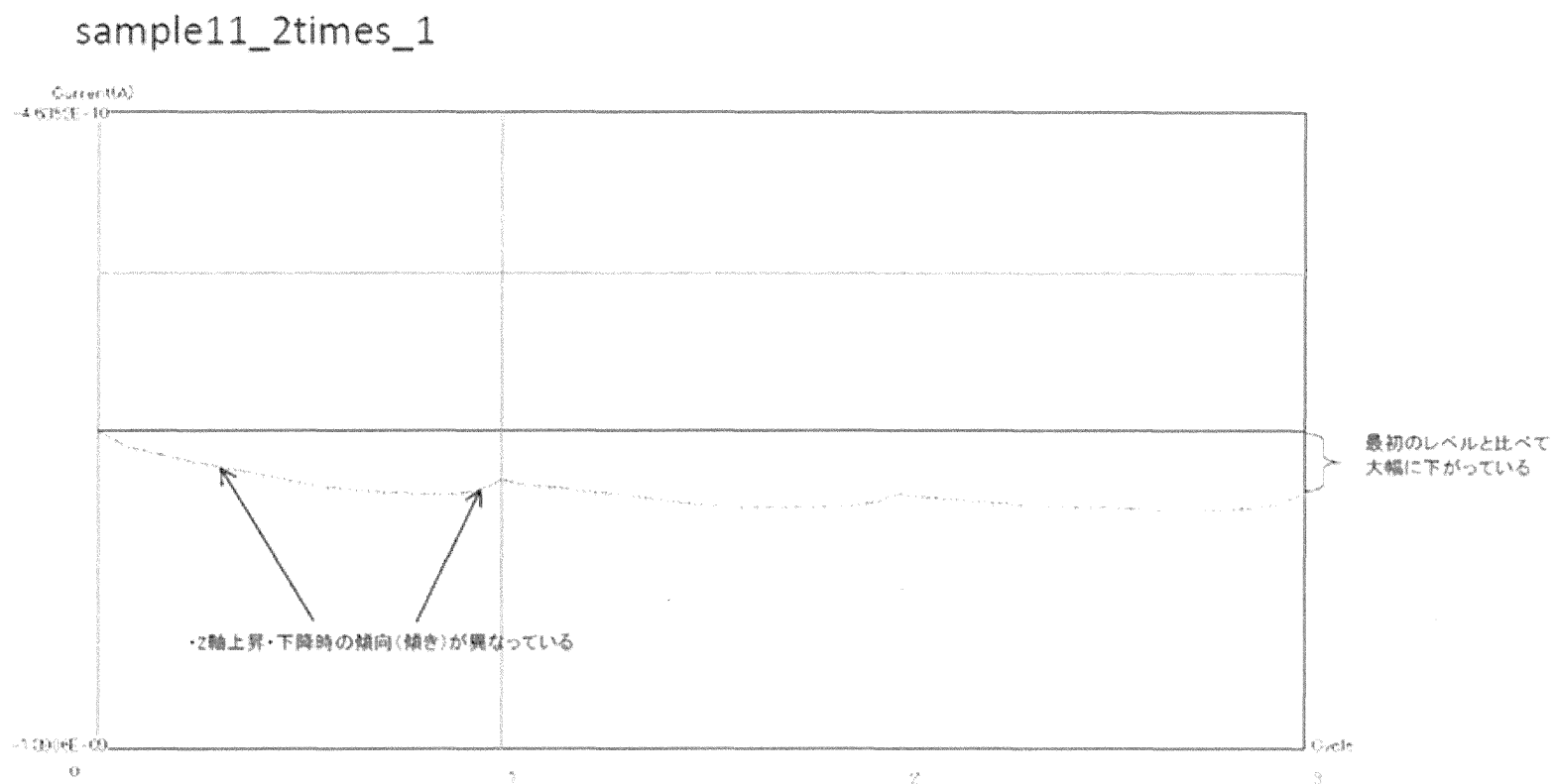
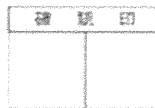


・測定不良例 3



平成25年9月24日

作業報告書



クリノ株式会社
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-40
東北大学連携ビジネスインキューバー7103
Tel/Fax: 022-721-9633
E-mail: pr@clno.co.jp

お客様名	秋田大学産婦人科	様
作業内容	呼吸活性測定装置CRAS1.0故障状況調査	
作業日	2013 年 9 月 19 日	
時間	15 : 15 ~ 18 : 30	
作業者 (訪問者)	佐竹、伊藤、植垣	

<p>作業報告</p> <p>●症状 以前4fml/sec程度の呼吸量が測定されていたにもかかわらず最近では0ml/sec以下になり、測定出来ない。また、電位が安定しない。</p> <p>●対応</p> <p>1.サーモプレートが破損、ノイズ元となっていることを確認 → 一時的にサーモプレートOFFで測定検証実施、ノイズは軽減した。 → 新品を送付、交換していただく。(9月第4週前半までに送付)</p> <p>2.サーモプレートOFFでのスキャンを行うものの、波形のドリフトが発生(方向へ変遷) →ポテンシオスタット本体を新品へ交換、波形のドリフトは改善した。</p> <p>1、2の対応により、電位不安定の問題については改善した。 2に関しては、本体故障ではなく新品交換時に配線類のつけ直しを行ったことによる改善とも考えられ、本体故障かどうかはあらためて確認する必要有り。</p> <p>3.上記対応後に、胚盤胞の測定を実施した。 →呼吸量はプラスの値になるものの、依然としてとして想定より低い。</p> <p>推定原因</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サーモプレートOFFでの測定のため、実際に活性が低いこと。 ・測定液がアルブミン無添加であること。 <p>対応策</p> <ul style="list-style-type: none"> ・新品サーモプレート交換後、再度呼吸量測定を実施し、確認いただく。 ・アルブミン添加の測定液で測定を行い確認いただくことを提案。 →上記2点について確認いただいても問題が継続する場合は、再度訪問し原因究明にあたる。 <p>4.従来データの信頼性は、データを数点ピックアップして弊社へ送付いただき確認する。</p> <p>5.測定手技の確認 測定者である椎嶋様の測定手技の確認。 電極の取り扱い、サンプルと電極の距離の取り方等、他の施設と同等のレベルであり、これまでの測定が正常であることを確認した。</p> <p>●残件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・交換用サーモプレートの送付 ・過去測定データの確認 <p style="text-align: right;">以上</p>	
---	--

<h1>作業報告書</h1>	確 認 印	クリノ株式会社 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-40 東北大学連携ビジネスインキュベータ103 Tel/Fax:022-721-5633 E-mail:pr@clino.rog
		

お客様名	秋田大学	様
作業内容	CRAS-1.0測定不調についての現地確認	
作業日	2014 年 2 月 5 日	
時間	15 : 00 ~ 19 : 30	
作業者 (訪問者)	伊藤, 植垣	

<p>作業報告</p> <ul style="list-style-type: none"> ●症状 呼吸量測定値が低い (1~2fmol/s程度の測定値しかでない) ●原因 測定液中にアルブミン未添加であったため胚に粘着性有、プローブへの胚の付着のおそれから、胚とプローブとの距離を適切にとることが出来ていない (距離が離れている) ことが判明。 ●対応策 アルブミン添加しての測定で、胚とプローブの距離を適切にとる (十分近づける) ことが出来るようになり、測定値は向上した。 (3~4fmol/s程度) ・ 今後は測定液へアルブミン添加の上、測定を実施していただく。 ●作業中に生じた問題 対応策の確認として、発達良好で凍結・融解を行った发育良好胚と、2日目以降細胞分裂の見られない发育停止胚の呼吸量測定を実施、両者の比較を3回行った。 →1回目の測定では両者間に差異有、しかし2回目、3回目の測定では差異無し。 差異無しの原因は弊社検討課題として持ち帰り、その際測定に用いた測定液を提供していただいた。 ●弊社での検討内容 弊社にてCRAS同等機器を用いて、生きたサンプルと完全に呼吸停止したサンプルの呼吸量測定を実施、結果を比較した。 サンプルはMCF-7スフェロイド(φ140μm)を用い、同時に作成した2個のサンプルのうち1個を、4%パラフォルムアルデヒド-PBSで30分以上固定し呼吸停止させた。 測定液はERAM-2、秋田大様より提供いただいたmodified HTF(アルブミン有)の2種を用いた。 ●結果 細胞数が多く活発に分裂をするサンプルは呼吸量が大きい (20fmol/s程度)。一方で、呼吸停止させたサンプルの呼吸量は約1fmol/s程度で、明らかに差がある。また呼吸停止サンプルでは、秋田大様での測定で見られたような大きな呼吸 (3fmol/s程度) は見られなかった。この傾向は、ERAM-2, modified HTFどちらの測定液でも同様であった。 (詳細結果別途送付いたします。) ●上記を踏まえて推定原因 <ul style="list-style-type: none"> ・ 秋田大様にて測定を実施した发育停止胚は、実際に呼吸をしていた可能性が高い。 ・ また、良好胚と思われた胚についても呼吸活性が低かった可能性がある。 →そのため、両者間の差異がほとんど生じなかったと考えられる。
--

作業報告書



クリノ株式会社
980 8579
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-40
東北大学連携ビジネスインキュベータ103
Tel/Fax:022-721-5633
E-mail:pr@clino.rog

作業報告

山形大 阿部先生からも、「発育停止胚が呼吸し続けている可能性は十分あり、良好胚との差異が出ないことは不思議ではない」と、同様の助言をいただきました。

●今後の対策

- ・秋田大様にて継続して測定、同様の比較を行っていただく。
これまで良好胚と発育停止胚で呼吸量の差が出なかった（どちらも低かった）のは、胚とプローブの距離が遠かったことが原因と考えられますので、この点に注意して測定を行っていただければ、実際に呼吸量に差異がある場合は、測定結果にも差異が現れるものと思われます。
- ・単純な凍結融解のみで呼吸停止胚を作製いただき、比較を行っていただく。
培養室内に固定液を持ち込むことは困難とのことでしたので、可能であれば凍結融解のみで呼吸停止させた胚を作製いただき、標準サンプルとして用いていただくことをお勧めいたします。

以上

ERAM-2 での測定

Sample Name	2	3(呼吸停止)	4(呼吸停止)
呼吸量(10^{-15} mol/s)	18.375	0.26	0.625

ΔC_b :		-1.98E-09					
FileName	Fe(meas)	F(correct)	$\Delta C_e(\text{meas})$	$\Delta C(\text{correct})$	R_s	R	
blank 1	$-3.31E-16 \pm 1.7111E-15$	1.59 ± 1.71	$-3.42E-10 \pm 1.7667E-09$	$1.64E-09 \pm 1.7667E-09$	10	70	
blank 2	$-1.40E-15 \pm 7.1744E-16$	0.52 ± 0.72	$-1.45E-09 \pm 7.4073E-10$	$5.35E-10 \pm 7.4073E-10$	10	70	
blank 3	$-2.44E-15 \pm 5.0148E-16$	-0.52 ± 0.50	$-2.52E-09 \pm 5.1776E-10$	$-5.35E-10 \pm 5.1776E-10$	10	70	
2.1	$1.67E-14 \pm 9.3527E-16$	18.65 ± 0.94	$1.73E-08 \pm 9.6564E-10$	$1.93E-08 \pm 9.6564E-10$	10	70	
2.2	$1.62E-14 \pm 1.2731E-15$	18.1 ± 1.27	$1.67E-08 \pm 1.3144E-09$	$1.87E-08 \pm 1.3144E-09$	10	70	
3.1	$-2.29E-15 \pm 9.0086E-16$	-0.28 ± 0.90	$-2.27E-09 \pm 9.3912E-10$	$-2.89E-10 \pm 9.3912E-10$	10	70	
3.2	$-1.12E-15 \pm 7.9557E-16$	0.8 ± 0.80	$-1.16E-09 \pm 8.2140E-10$	$8.24E-10 \pm 8.2140E-10$	10	70	
4.1	$-1.32E-15 \pm 9.1057E-16$	0.6 ± 0.91	$-1.36E-09 \pm 9.4014E-10$	$6.16E-10 \pm 9.4014E-10$	10	70	
4.2	$-1.27E-15 \pm 8.3638E-16$	0.65 ± 0.84	$-1.31E-09 \pm 8.6354E-10$	$6.70E-10 \pm 8.6354E-10$	10	70	

modified HTF での測定

Sample Name	2	3(呼吸停止)	4(呼吸停止)	5(2を再測定)
呼吸量(10^{-15} mol/s)	17.095	0.805	0.86	20.357

ΔC_b :		-1.53E-09					
FileName	Fe(meas)	F(correct)	$\Delta C_e(\text{meas})$	$\Delta C(\text{correct})$	R_s	R	
blank 2	$-1.11E-15 \pm 9.1596E-16$	0.38 ± 0.92	$-1.14E-09 \pm 9.4570E-10$	$3.90E-10 \pm 9.4570E-10$	10	70	
blank 3	$-1.21E-15 \pm 9.2111E-16$	0.27 ± 0.92	$-1.25E-09 \pm 9.5102E-10$	$2.83E-10 \pm 9.5102E-10$	10	70	
2.1	$1.55E-14 \pm 3.5610E-16$	16.99 ± 0.36	$1.60E-08 \pm 3.6766E-10$	$1.75E-08 \pm 3.6766E-10$	10	70	
2.2	$1.57E-14 \pm 6.6795E-16$	17.2 ± 0.67	$1.62E-08 \pm 6.8964E-10$	$1.78E-08 \pm 6.8964E-10$	10	70	
3.1	$-1.38E-15 \pm 9.8630E-16$	0.11 ± 0.99	$-1.42E-09 \pm 1.0183E-09$	$1.09E-10 \pm 1.0183E-09$	10	70	
3.2	$1.36E-17 \pm 1.1157E-15$	1.5 ± 1.12	$1.40E-11 \pm 1.1519E-09$	$1.55E-09 \pm 1.1519E-09$	10	70	
4.1	$-1.30E-15 \pm 7.8388E-16$	0.18 ± 0.78	$-1.34E-09 \pm 8.0912E-10$	$1.88E-10 \pm 8.0912E-10$	10	70	
4.2	$6.63E-16 \pm 1.2305E-15$	2.15 ± 1.23	$6.84E-10 \pm 1.2704E-09$	$2.22E-09 \pm 1.2704E-09$	10	70	
4.3	$-1.24E-15 \pm 1.0953E-15$	0.25 ± 1.10	$-1.28E-09 \pm 1.1309E-09$	$2.56E-10 \pm 1.1309E-09$	10	70	
5.1	$1.97E-14 \pm 6.3356E-16$	21.21 ± 0.63	$2.04E-08 \pm 6.5413E-10$	$2.19E-08 \pm 6.5413E-10$	10	70	
5.2	$2.15E-14 \pm 3.7018E-16$	22.96 ± 0.37	$2.22E-08 \pm 3.8218E-10$	$2.37E-08 \pm 3.8218E-10$	10	70	
5.3	$1.54E-14 \pm 7.9396E-16$	16.9 ± 0.79	$1.59E-08 \pm 8.1974E-10$	$1.74E-08 \pm 8.1974E-10$	10	70	

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(山形大学理工学部教授)

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、胚の質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が、これら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。本研究では、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、細胞呼吸活性を指標とする胚評価システムの開発を目的とする。今年度は、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸測定装置の安全性の検証を行った。その結果、マウスを用いた動物実験により、呼吸活性を指標とする胚品質評価技術の有効性と安全性が示めされた。

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)

A・研究目的

研究分担者らは、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。これまでに、走査型電気化学顕微鏡をベースとする「受精卵呼吸測定装置」の開発に成功し、細胞呼吸活性を指標とする新しい胚品質評価法を提唱している。「受精卵呼吸測定装置」はマイクロ電極を用いて酸素の還元電流を測定し、呼吸によって受精卵近傍に生じた酸素の濃度勾配を電気化学的に検出し、受精卵の呼吸量を非侵襲的に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。

今年度は、「受精卵呼吸測定装置」の胚品質評価における有用性の検証と臨床応用に向けた安全性の検証を目的に、マウスを実験材料として胚のミトコンドリア呼吸機能解析、胚移植試験および産子の表現型解析を実施した。

B・研究方法

(1) 細胞呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

細胞呼吸活性を指標とする胚や卵子のクオリティー診断法を開発するには、「受精卵呼吸測定装置」の有効性と安全性を生物学的解析によって詳細に検証する必要がある。本研究では、マウスの胚および卵子を主な実験材料に用い、胚品質評価における「受精卵呼吸測定装置」の有効性と安全性の検証を目的と

した。具体的には、細胞生物学・分子生物学的解析技術を駆使したミトコンドリア呼吸機能を総合的に解析することで、「受精卵呼吸測定装置」の性能評価と胚品質評価に対する有用性を検証した。また、胚や卵子の培養試験および移植試験により「細胞呼吸測定システム」の安全性を調べた。

(2) 材料

C57BL/6 及び ICR 系マウスを実験に用いた。雌マウス (8 週齢) に pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) 5IU 投与し、48 時間後に human chorionic gonadotropin (hCG) 5IU 投与することで過排卵を誘発した。hCG 投与後、直ちに同系統の雄マウスと同居させ、翌朝、膣栓の有無を確認した。膣栓を確認した雌マウスは hCG 投与 96 時間後に屠殺し、摘出した子宮を灌流することで胚を回収した。卵割が停止しているなど明らかに異常が認められた胚を排除し、形態的に正常な胚盤胞のみを実験に使用した。

(3) 呼吸活性測定

マウス胚盤胞の呼吸活性測定には、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) を用いた。呼吸測定液 (ERAM-2: 機能性ペプチド研究所) で満たした測定プレートの逆円錐形マイクロウェル内に胚を 1 つずつ静置した。その後、測定プレートを倒立顕微鏡のステージ上にセットし、 $-0.6\text{V vs Ag/AgCl}_2$ の電位を印加した微小白金電極 (先端直径: $2\text{--}3\ \mu\text{m}$) で、胚近傍を鉛直方向に 3 回走査 ($31.0\ \mu\text{m}/\text{sec}$, $160\ \mu\text{m}$) した。得られた胚近傍および沖合の酸素還元電流値の差から、球面拡散理論式に基づいて胚の酸素消費量 (呼吸活性) を算出した。

(4) 活性型ミトコンドリアの局在観察

MitoTracker Orange CM-H2 TMRos を用いてウシ胚およびマウス胚を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて活性型ミトコンドリアの細胞内分布を調べた。また、ミトコンドリアの膜電位に依存して緑色 (不活性

型) から赤色 (活性型) へ変化する JC-1 を用いてミトコンドリアを染色し、相対膜電位 (緑色/赤色) を算出した。

(5) シトクローム c オキシダーゼ (Cox) 遺伝子の発現解析

呼吸測定による胚クオリティー評価の有効性を遺伝子レベルで解析するために、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 IV を構成する Cox の遺伝子発現を RT-PCR により解析した。呼吸鎖複合体 IV は、ミトコンドリアゲノムと核ゲノムによってコードされる 13 のサブユニットで構成されている。本研究では、マウスにおいてミトコンドリアゲノム由来であり呼吸鎖複合体 IV の電子伝達を担っている Cox1、Cox2、Cox3 と、核ゲノム由来であり呼吸鎖複合体 IV の機能調節に関与する Cox4、Cox5a、Cox5b および Cox6b の遺伝子の発現をそれぞれ調べた。

(6) 胚の移植試験

受精卵呼吸測定装置による胚品質評価の有効性を検証する目的で、胚移植試験を実施した。呼吸活性 0.70×10^{-14} mol/s 以上の胚盤胞を選別し、偽妊娠 3 日目の受容雌マウス (ICR) の子宮内に、1 匹当たりの移植胚数が 10 個前後となるように移植した (測定群)。移植後 17 日目に分娩および産子数を確認した。

(7) 安全性評価試験

偽妊娠 3 日目の受容雌マウス (ICR 系統) をネンブタールで麻酔し、第一腰椎付近の皮膚を切開した。脂肪-卵巣-卵管-子宮組織を引き出し、子宮内へ胚を 10 個前後移植した。移植後、引き出した全ての組織を腹腔内へ戻し、皮膚をオートクリップで縫合し、保温して覚醒させた。形態的に正常で、呼吸 0.70×10^{-14} mol \cdot s⁻¹ 以上の胚盤胞を移植したものを「測定群」、呼吸量を測定せずに形態的評価のみで選別した胚盤胞を測定群と同条件で移植したものを「対照群」とした。胚移植後 17 日目に分娩を確認し、得られた産子の正常性を検証する目的で表現

型解析を実施した。繁殖能力試験に加えて、マウスの行動解析としてオープンフィールドテスト (一般活動性・情動性・馴化の試験法)、オープンスペース水泳テスト (運動能力・動機づけの試験法) および水迷路学習課題 (空間認知・学習能力・記憶力の試験法) を実施した。対照群 6 個体、測定群 6 個体とし、いずれも 12 週齢時に実験を開始した。全ての個体に対し、オープンフィールドテスト、オープンスペース水泳テスト、水迷路学習課題をこの順序で実施した。各テストの間は、1 日以上インターバルを挿入した。試験終了後、各個体は安楽死させ、心臓より採血し、富士ドライケムを用いて、定法により血液生化学的指標について分析した。また、主要臓器 (脳、肺、胃、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、心臓、大腿二頭筋、卵巣、精巣) は、直ちに 10% 緩衝ホルマリン固定液に浸漬して 48 時間室温にて固定後、定法に従って脱水後、パラフィンブロックを作製した。各ブロックより厚さ 4 μ m の薄切標本を作製、Hematoxylin-Eosin 染色 (HE 染色) を施して顕微鏡下で観察し、臓器ごとに好中球など炎症細胞の浸潤状態を中心に、各個体間の組織所見を比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験は山形大学工学部倫理委員会の承認を得た後に開始する。個体レベルでの実験プロトコルの作成にあたっては、法律第 105 号「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、苦痛軽減に努める。

C・研究結果

(a) 胚の酸素消費量測定

マウスの卵子および初期胚の発生過程における酸素消費量の変化を調べた結果、GV 期卵子および MII 期卵子における酸素消費量はともに 0.24×10^{-14} mol s⁻¹ であり、卵成熟による酸素消費量の変化はなかった。また、受精直後の 1 細胞期胚の酸素消費量は、 0.22×10^{-14} mol s⁻¹ であり、MII 期卵子と比べると有意な差はなく、受精による酸素

消費量の変化は認められなかった。次に、受精卵の発生過程における酸素消費量を調べた結果、2細胞期以降、発生の進行に伴い酸素消費量が増加した。特に、桑実胚 ($0.34 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$)、胚盤胞 ($0.52 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$) および脱出胚盤胞 ($0.7 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$) にかけて顕著な呼吸量の増加が認められた (図1)。

(b) 活性型ミトコンドリアの局在

マウス胚において活性型ミトコンドリアは、2細胞期から4細胞期の胚では細胞内にほぼ均一に存在していたが、8細胞期胚では割球の外縁部にミトコンドリアのクラスターが観察された。桑実胚および胚盤胞では核の周辺に活性型ミトコンドリアの大きなクラスターが形成されていた。次に、2細胞期胚と胚盤胞におけるミトコンドリア膜電位活性を比較した結果、酸素消費量が大きい胚盤胞の方がミトコンドリアの膜電位活性が高いことがわかった (図2)。

(c) ATP 量測定

マウス胚の発生過程における ATP 含量の変化を解析した。その結果、2細胞期から8細胞期までは1胚当たりのATP含量は顕著に増加し、桑実胚および胚盤胞のステージでは8細胞期胚に比べて有意に減少した。8細胞期胚においてATP含量が急激な増加を示したことから、個々の胚のATP含量を詳細に解析した結果、8細胞期胚では他の発生ステージと比べて、個々の胚の間にATP含量の大きな差が認められた。

(d) シトクローム c オキシダーゼ (Cox) 遺伝子の発現解析

マウス胚において、ミトコンドリアゲノム由来であり呼吸鎖複合体 IV の中心活性部位を構成するサブユニットである Cox1、Cox2 および Cox3 と、核ゲノム由来であり生体機能調節に関与するとされる Cox4、Cox5a、Cox5b および Cox6b の遺伝子の発現をそれぞれ RT-PCR により解析した。その結果、ミトコンドリア

ゲノム由来の Cox1、Cox2 および Cox3 は、1細胞期から胚盤胞期までの全ての発生ステージで発現していた。一方、核ゲノム由来の Cox5a、Cox5b および Cox6b は、2細胞期以降徐々に発現量が増加したが、Cox4 は全ての発生ステージにおいて発現は認められなかった。この結果から、マウス胚ではミトコンドリアゲノムと核ゲノムにコードされる Cox 遺伝子は、胚発生過程において異なる発現パターンを示すことが明らかになった (図3-(a), (b))。

(f) 胚移植試験

呼吸測定を行わずに形態観察により胚盤胞と判定した胚を移植した対照群では18匹の受容雌マウスに合計175個の胚を移植した結果、7匹が分娩 (38.9%) し、合計41匹の産子を得た (産子率: 23.4%)。一方、測定群では16匹の受容雌マウスに合計170個の胚を移植した結果、12匹が分娩し (分娩率: 75.0%)、合計67匹の産子が得られ (産子率: 39.4%)、対照群と比較して移植成績が有意に上昇した (表1)。

(g) 安全性評価試験

受精卵呼吸測定装置による胚品質評価の安全性を検証する目的で、胚移植試験で得られた産子の表現型解析を実施した。産子の生時体重の平均は、対照群で $1.55 \pm 0.02 \text{ g}$ 、測定群で $1.51 \pm 0.04 \text{ g}$ で有意差は無く、その後の体重増加にも有意差は認められなかった。また、Gバンド法による染色体検査や主要臓器 (脳、肺、胃、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、心臓、大腿二頭筋、卵巣、精巣) の組織学的検査、血液生化学検査においても異常所見は認められなかった。また、行動解析 (一般活動性・情動性・馴化の試験としてオープンフィールドテスト、運動能力・体力の試験としてオープンスペース水泳テスト、空間認知・学習能力・記憶力の試験として水迷路学習テストおよびプローブテスト) を実施したが、いずれのテストにおいても対照群と測定群のマウスで有意差は認められなかった。さらに、測定群の産子は性成熟後に繁殖試験を実施し、少なくとも5世代目までは正常な繁殖能力を有していることが確認された。

D・考察

研究分担者らは、動物胚の詳細な微細構造解析により、胚の品質とミトコンドリアの呼吸機能が密接に関係していることを発見してきた。ミトコンドリアは酸化リン酸化（呼吸）により細胞活動に必須のエネルギーであるアデノシン三リン酸（ATP）を産生し、胚の発生等に深く関与している。したがって、精度の高い細胞呼吸測定技術は胚の品質診断に極めて有効な技術となる。そこで本研究では、呼吸測定による胚品質評価の有効性と安全性の検証を行った。

今年度は、マウスの胚および卵子におけるミトコンドリア呼吸機能の解析を重点的に行った。特に、「受精卵呼吸測定装置」により得られた呼吸測定データの信頼性を検証するために、細胞呼吸に関連する生物現象を遺伝子レベルからタンパク質、そして細胞小器官（ミトコンドリア）から細胞レベルまで階層的に解析を行った点がこれまでにはないアプローチである。その結果、「受精卵呼吸測定装置」の高精度な測定性能を検証できるとともに、呼吸測定の安全性（非侵襲性）を科学的に裏付けることができた。さらに、本研究で行ったミトコンドリア呼吸機能の詳細な解析により、これまで明らかにされていなかった初期発生におけるミトコンドリア呼吸機能制御機構やその分子基盤の一端を解明することができた。

また、胚や移植試験を行い、呼吸活性を指標とする胚品質評価の有効性を検証した。その結果、胚の発生能や受胎（妊娠）に呼吸が深く関与しており、呼吸活性値を基準に発生良好な卵子や胚、妊娠が期待できる高品質な胚を効率的に選別できることが示された。さらに、呼吸測定を行った胚を移植し得られた産子の詳細な解析を行った結果、医療応用へ向けて「受精卵呼吸測定装置」の安全性と呼吸量測定による胚品質診断法の有効性が確認された。

E・結論

マウスを用いた動物実験により、呼吸活性を指標とする胚品質評価技術の有効性と安全性が示唆された。

F・健康危険情報

なし

G・研究発表

1. 論文発表

- (1) Kumasako Y., Goto K., Koike M., Araki Y., Abe H., Utsunomiya T. (2013) Respiration activity of single blastocysts measured by scanning electrochemical microscopy: The relationship between pre-freezing and post-warming. *J. Mamm Ova Res.*, 30 (1):30-35.
- (2) Yoshida H., Abe H., Arima T. (2013) Quality evaluation of IVM embryo and imprinting genes of IVM babies. *J. Assit. Reprod. Genet.*, 30 (2): 221-225.
- (3) Hirobe T., Ito S., Wakamatsu K., Kawa Y., Abe H. (2013) Mouse brown (*b/Tyrb^{1b}*) allele inhibits eumelanin but not pheomelanin synthesis. *Zool. Sci.*, in press.
- (4) Miyano Y., Tahara S., Sakata I., Sakai T., Abe H., Kimura S., Kurotani R. (2013) Regulation of LH/FSH expression by secretoglobin 3A2 in the mouse pituitary gland. *Cell Tiss. Res.*, in press.
- (5) Hoshino S., Kurotani R., Miyano Y., Sakahara S., Koike K., Maruyama M., Ishikawa F., Sakata I., Abe H., Sakai T. (2014) Macrophage colony-stimulating factor induces prolactin expression in rat pituitary glands. *Zool. Sci.*, in press.
- (6) 阿部宏之 (2013) 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、日本胚移植学雑誌、35 (1): 7-14.

- (7) 阿部宏之：ARTにおける新技術・酸素消費と胚評価、臨床婦人科産科「生殖医療の進歩と課題-安全性の検証から革新的知見まで」、68巻1号：20-27、2014
- (8) 阿部宏之：酸素消費測定による胚の品質評価 - 超高感度細胞呼吸測定装置の開発と不妊治療における臨床応用-、医学のあゆみ「生殖医療の最前線」、印刷中

2. 学会発表

- (1) 古舘晃、田村涼、海藤康平、高倉啓、坂原聖士、荒井康子、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 長期保存ウシ卵巣から採取した卵子の品質評価、第28回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (栃木県宇都宮市、ホテル東日本宇都宮、2013年2月7-8日)
- (2) 伊藤卓也、古舘晃、田村涼、高倉啓、坂原聖士、荒井康子、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) ウシ卵子の品質評価を目的とした呼吸鎖複合体遺伝子の発現解析、第28回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (栃木県宇都宮市、ホテル東日本宇都宮、2013年2月7-8日)
- (3) 田村涼、古舘晃、海藤康平、高倉啓、坂原聖士、荒井康子、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) リアルタイム培養細胞観察システムを用いたウシ体外受精胚の発生解析、第28回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (栃木県宇都宮市、ホテル東日本宇都宮、2013年2月7-8日)
- (4) 高倉啓、栢本亮太、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2013) 光干渉断層撮影法を応用したマウス卵巣内卵胞の非侵襲的観察、第54回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013年5月25-26日)
- (5) 渡邊剛広、島麗香、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) マウス胚におけるシトクロムcオキシダーゼ (COX) 遺伝子発現とミトコンドリア呼吸機能の解析、第54回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013年5月25-26日)
- (6) 木村隼己、野中亜希子、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 異なるマウス系統における胚発生とミトコンドリア呼吸機能の解析、第54回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013年5月25-26日)
- (7) 伊藤卓也、古舘晃、田村涼、海藤康平、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) ウシ胚におけるシトクロムcオキシダーゼ (COX) mRNAの解析、第54回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013年5月25-26日)
- (8) 古舘晃、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) ウシ卵巣の保存時間が卵子のミトコンドリア呼吸機能に及ぼす影響、日本動物学会平成25年度東北支部大会 (秋田県秋田市、秋田大学手形キャンパス大学会館クレール、2013年7月20日)
- (9) 高橋布美奈、木村隼己、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 異なる系統のマウス胚における発生能とミトコンドリア呼吸機能の解析、日本動物学会平成25年度東北支部大会 (秋田県秋田市、秋田大学手形キャンパス大学会館クレール、2013年7月20日)
- (10) 阿部宏之、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、渡部裕輝 (2013) 光干渉断層画像化法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージング、日本動物学会平成25年度東北支部大会 (秋田県秋田市、秋田大学手形キャンパス大学会館クレール、2013年7月20日)

- (11) 阿部宏之 (2013) 先端工学技術を応用した生殖細胞品質診断システムの開発と臨床応用、第 31 回日本受精着床学会学術講演会 (大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日) ワークショップ (招待)
- (12) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、大津英子、長木美幸、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2013) 電気化学計測技術を応用したヒト胚品質評価法の開発と不妊治療における臨床的有用性に関する研究、第 31 回日本受精着床学会学術講演会 (大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日) シンポジウム (招待)
- (13) 阿部宏之、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、渡部裕輝 (2013) 光干渉断層画像化法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージングシステムの開発、第 31 回日本受精着床学会学術講演会 (大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日)
- (14) 黒谷玲子、伊藤卓也、高倉 啓、坂原聖士、阿部宏之 (2013) ウシ初期胚におけるシトクロム c オキシダーゼ (COX) mRNA の発現解析、第 31 回日本受精着床学会学術講演会 (大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日) 森智絵美、高倉啓、藪内晶子、村田奈々、阿部宏之、勝股克成、福田淳一郎、青野文仁、小林保、加藤恵一 (2013) 胚盤胞凍結保存液におけるヒドロキシプロピルセルロースの有用性、第 31 回日本受精着床学会学術講演会 (大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日)
- (15) 木村隼己、坂原聖士、高倉 啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 異なる遺伝的背景をもつマウス胚の発生能とミトコンドリア機能の解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会 (東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日)
- (16) 渡邊剛広、島 麗香、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) マウス初期発生における呼吸鎖複合体 IV 遺伝子発現とミトコンドリア呼吸機能の解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会 (東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日)
- (17) 高倉 啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2013) 光干渉断層画像化法を用いたマウス卵巣内卵胞の非侵襲的定量解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会 (東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日)
- (18) 坂原聖士、渡邊剛広、坂上信忠、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 単一ブタ胚におけるシトクロム c オキシダーゼ mRNA の検出、第 106 回日本繁殖生物学会大会 (東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日)
- (19) 古舘 晃、高倉 啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 長期保存ウシ卵巣から採取した卵子の品質評価とミトコンドリア呼吸機能解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会 (東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日)
- (20) 木村隼己、高橋布美奈、坂原聖士、高倉 啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 異なる系統のマウスにおける胚発生能とミトコンドリア機能の解析、日本動物学会第 84 回大会 (岡山県岡山市、岡山大学津島キャンパス、2013 年 9 月 26-28 日)
- (21) 渡邊剛広、島 麗香、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) マウス胚初期発生におけるシトクロム c オキシダーゼ (COX) 遺伝子発現の解析、日本動物学会第 84 回大会 (岡山県岡山市、岡山大学津島キャンパス、2013 年 9 月 26-28 日)

- (22) 阿部宏之、高倉 啓、黒谷玲子、渡部裕輝 (2013) 光干渉断層画像化法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージングシステム、日本動物学会第 84 回大会 (岡山県岡山市、岡山大学津島キャンパス、2013 年 9 月 26-28 日)
- (23) 阿部宏之、珠玖 仁、黒谷玲子 (2013) 電気化学計測技術を応用した 単一細胞ミトコンドリア呼吸機能解析システムの開発と医療応用、日本化学会第 7 回バイオ関連化学シンポジウム (愛知県名古屋市、名古屋大学豊田講堂・野依学術交流館、9 月 27-29 日)
- (24) 高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2013) 光干渉断層撮影法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージング、第 51 回東北生殖医学会 (青森市、青森市文化観光交流施設、2013 年 11 月 2 日)
- (25) 坂原聖士、渡邊剛広、坂上信忠、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 単一ブタ体内受精胚におけるシトクローム c オキシダーゼ mRNA の検出、第 51 回東北生殖医学会 (青森市、青森市文化観光交流施設、2013 年 11 月 2 日)
- (26) 阿部宏之、島 麗香、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子 (2013) ウシ胚におけるシトクローム c オキシダーゼ (呼吸鎖複合体 IV) mRNA の発現解析、第 51 回東北生殖医学会 (青森市、青森市文化観光交流施設、2013 年 11 月 2 日)

H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

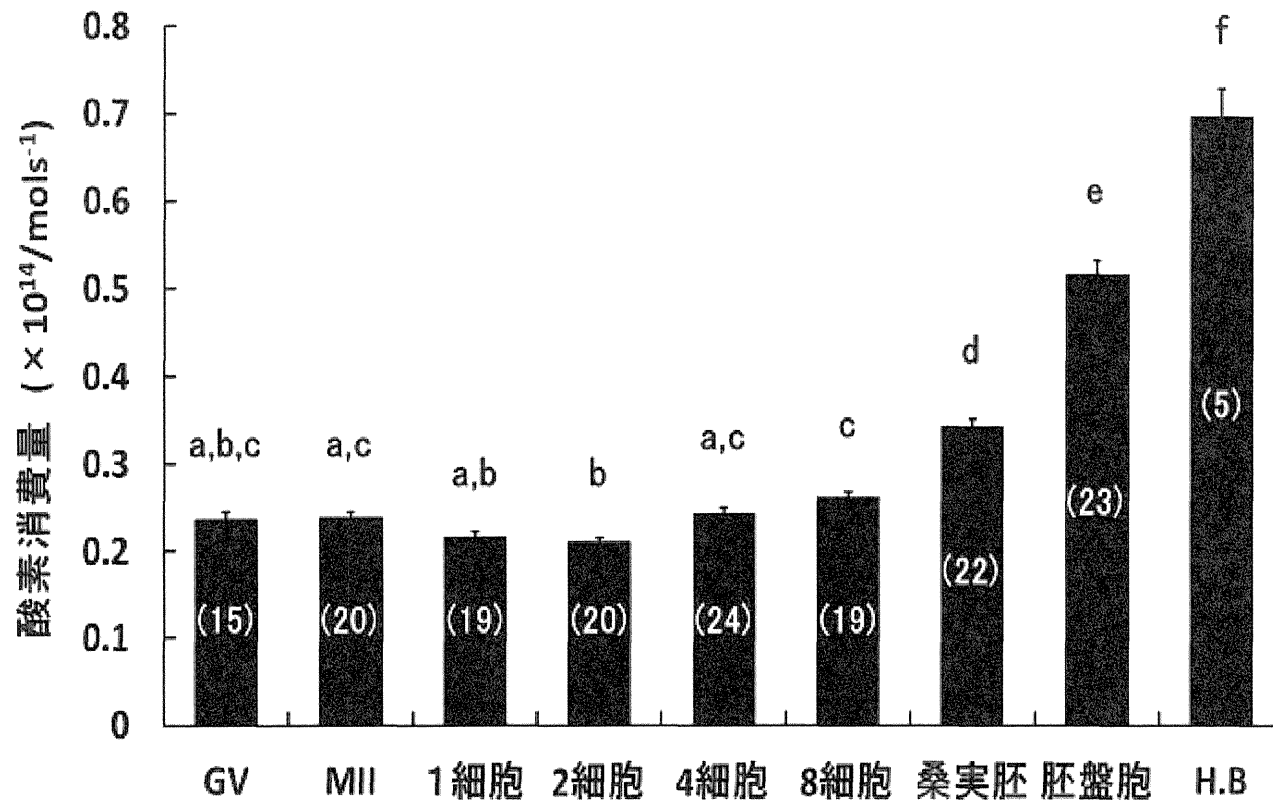


図1. 卵子および発生初期胚における酸素消費量変化。H.B: 脱出胚盤胞。括弧内の数字は測定した卵子数または胚数を示す。異符号間で有意差有り(P<0.05)。

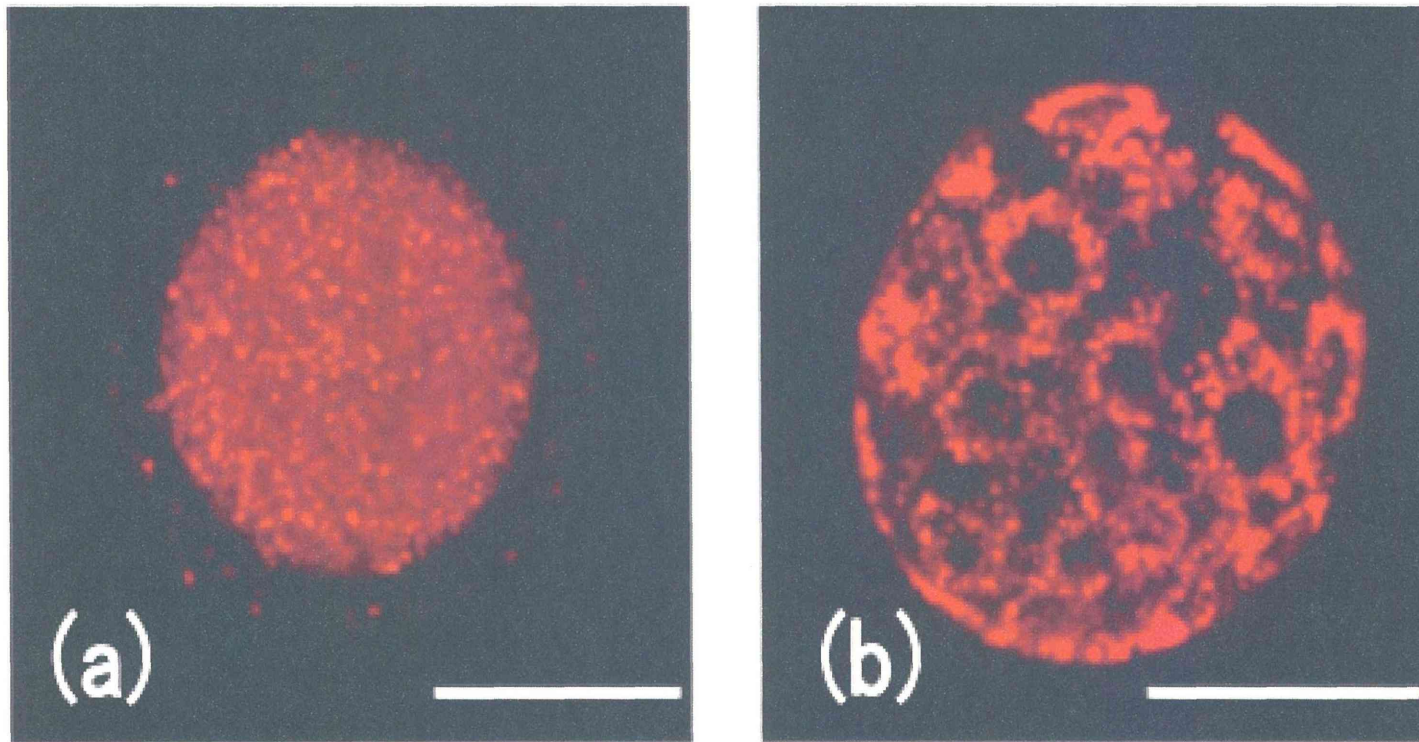


図2. GV期卵子と胚盤胞の活性型ミトコンドリアの局在。a:GV期卵子、b:胚盤胞。
Bar: 50 μm 。

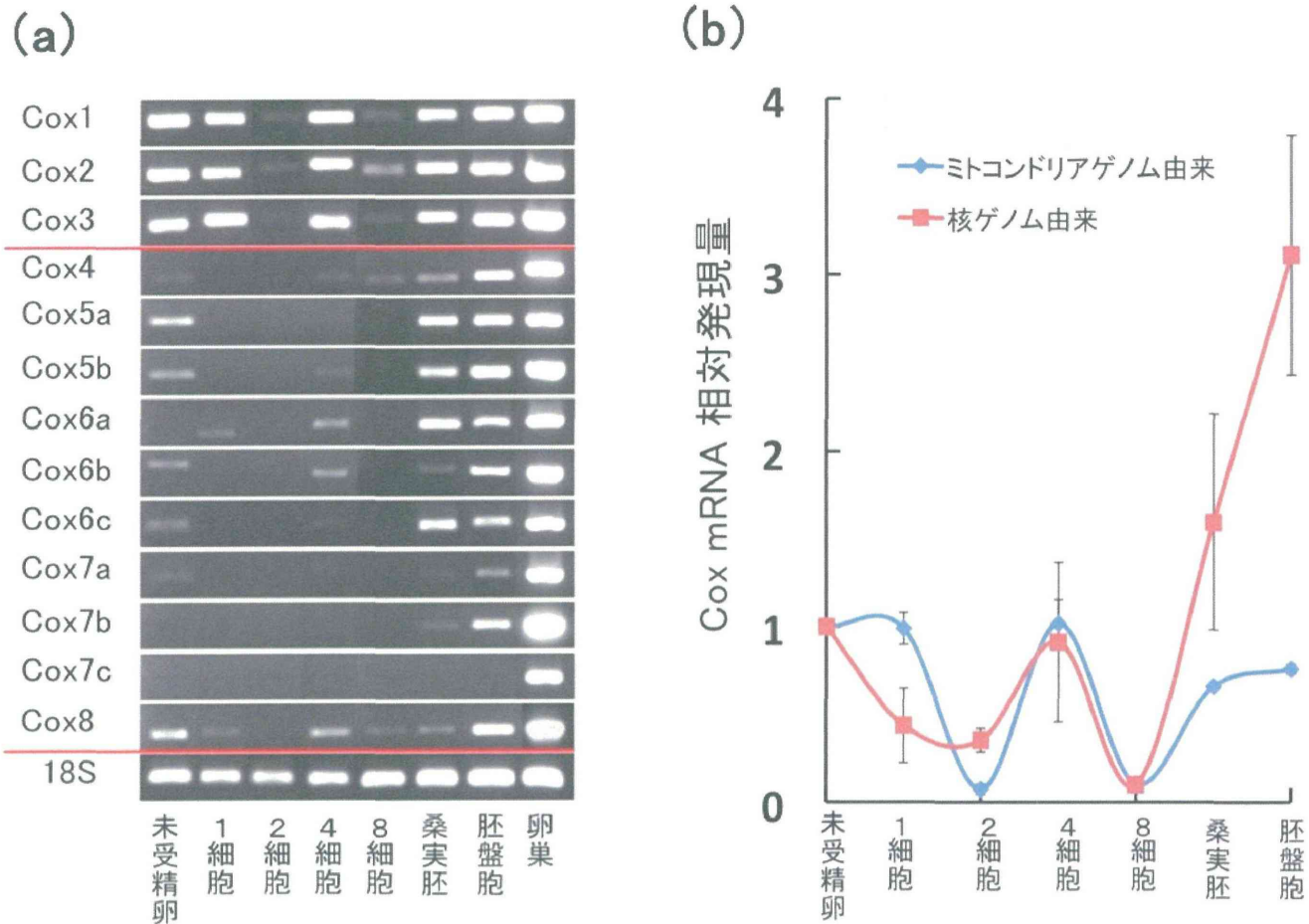


図3. マウスの未受精卵および胚におけるミトコンドリアゲノムおよび核ゲノム由来COXサブユニットのmRNAの検出(a)。S18を基準としたmRNAの相対遺伝子発現量を示す(b)。

表 1. マウス胚移植試験の成績

実験区	受容雌 (匹)	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)

* : 対照区と比較して有意に高い (P<0.05)

II. 分担研究報告書

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

分担研究者 高橋俊文(山形大学医学部講師)

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

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

研究分担者 高橋 俊文 山形大学講師

研究主旨

生殖補助医療の進歩にもかかわらず、その治療成績は改善していない。その最大の要因は不妊治療を受ける女性患者の高齢化であると推測されている。日本国内での生殖補助医療の治療周期に占める35歳以上の患者の割合は、実に76%に及ぶ（2011年 日本産科婦人科学会報告）。35歳以上では妊娠率が低下し、流産率は増加するため、生産率は極めて低下することが治療成績低下の要因である。一方、米国で行われている若年者ドナー卵を用いた生殖補助医療の治療成績は母体年齢に依らないことから（2003年 CDCレポート）、この患者高齢化（加齢）による治療成績の低下は卵の質の低下に起因すると考えられる。加齢卵による卵の質の低下とは何を意味するのか？ ミトコンドリア機能低下と染色体異常の増加が特に重要と考えられている。筆者らはこれまで、卵の質の低下した加齢モデル卵としてマウス排卵後加齢卵（排卵後8時間以上、受精に至らず卵管内に留まった卵。以下、マウス加齢卵と略す）を用い、加齢に伴う小胞体機能とミトコンドリア機能の変化について検討を行ってきた。これまでにマウス加齢卵では小胞体機能、特にカルシウムポンプ（Ca²⁺ ATPase）機能が低下すること、ミトコンドリア機能が低下すること（ATP産生能が低下、ミトコンドリア膜電位の低下など）が明らかとなった。これらの結果を踏まえ、著者らはマウス加齢卵のミトコンドリア機能の変化を、細胞呼吸測定装置による卵の呼吸活性測定から検討を行った。本稿ではその結果を紹介する。