

## 研究協力者

五十嵐秀樹(山形大学医学部助教)

### A・研究目的

生殖補助医療の進歩にかかわらず、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( $\text{Ca}^{2+}$  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。クリノ(株)が開発した細胞呼吸測定装置による胚呼吸活性測定は、これまで主に畜産動物の胚において、良好胚を選別する客観的な評価法として有用であることが報告されている。今回、マウス加齢卵でも細胞呼吸測定装置による単一卵子の呼吸活性(酸素消費量)測定により、ミトコンドリア機能が評価可能であるか検討した。

### B・研究方法

当科において体外受精・胚移植(新鮮胚移植、凍結胚移植)を予定したもののうち、正マウス卵の準備した(マウス卵は排卵作用を有する hCG 投与後 12 時間で排卵される)。よって、新鮮卵(コントロール)は hCG 投与後 12-13 時間で卵管より回収し、14-15 時間で測定に供した卵とした。これまでの我々の研究から、hCG 投与後 18 時間で卵管より回収し、20 時間で測定に供した卵は受精率の低下と胚発生の悪化が認められた。よって本研究では、マウス加齢卵は hCG 投与後 18-22 時間で採取し、20-24 時間で測定に供した卵、hCG 投与 42-46 時間で採取し、44-48 時間で測定に供した卵とした。各卵は採卵後直ちに 25IU ヒアルロニダーゼにて顆粒膜細胞を除去し、測定に供した。

呼吸活性(酸素消費量)測定: 卵の呼吸活性は細胞呼吸活性測定装置(クリノ(株)、CARS-1.0)により測定した。卵は HTF メディウムを満たした測定用専用チャンバーに静置して測定に用いた。

### C・研究結果

マウス卵 1 個当たりの酸素消費量は新鮮卵で  $3.3 \pm 0.05 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$ 、hCG 投与後 20~24 時間で測定に供した加齢卵では  $2.0 \pm 0.08 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$ 、44~48 時間で測定に供した加齢卵では  $0.7 \pm 0.07 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$  であった(図)。平均酸素消費量は排卵後の時間に伴い有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

### D・考察

ミトコンドリア機能と呼吸活性(酸素消費量)は相関すると考えられる。つまり、ミトコンドリア機能が良好であれば酸素消費量が多いと考えられる。マウス加齢卵での酸素消費量の減少はミトコンドリア機能の低下を示唆するもので膜電位によってもミトコンドリア機能を評価してきた。

ミトコンドリア膜電位はマウス加齢卵で有意に低下していたが、酸素消費量ほど大きな変化は認めなかった。この事は、酸素消費量の測定はより高感度でミトコンドリア機能を評価し得る可能性を示唆する。細胞呼吸測定装置による呼吸活性（酸素消費量）測定は胚だけで無く、卵（未受精卵）にも応用が可能であり、ミトコンドリア機能評価による卵の老化の解析にも有用であると考えられた。

#### E・結論

細胞呼吸測定装置による呼吸活性（酸素消費量）測定により単一卵子のミトコンドリア機能の評価が可能と考えられた。

#### F・健康危険情報

なし

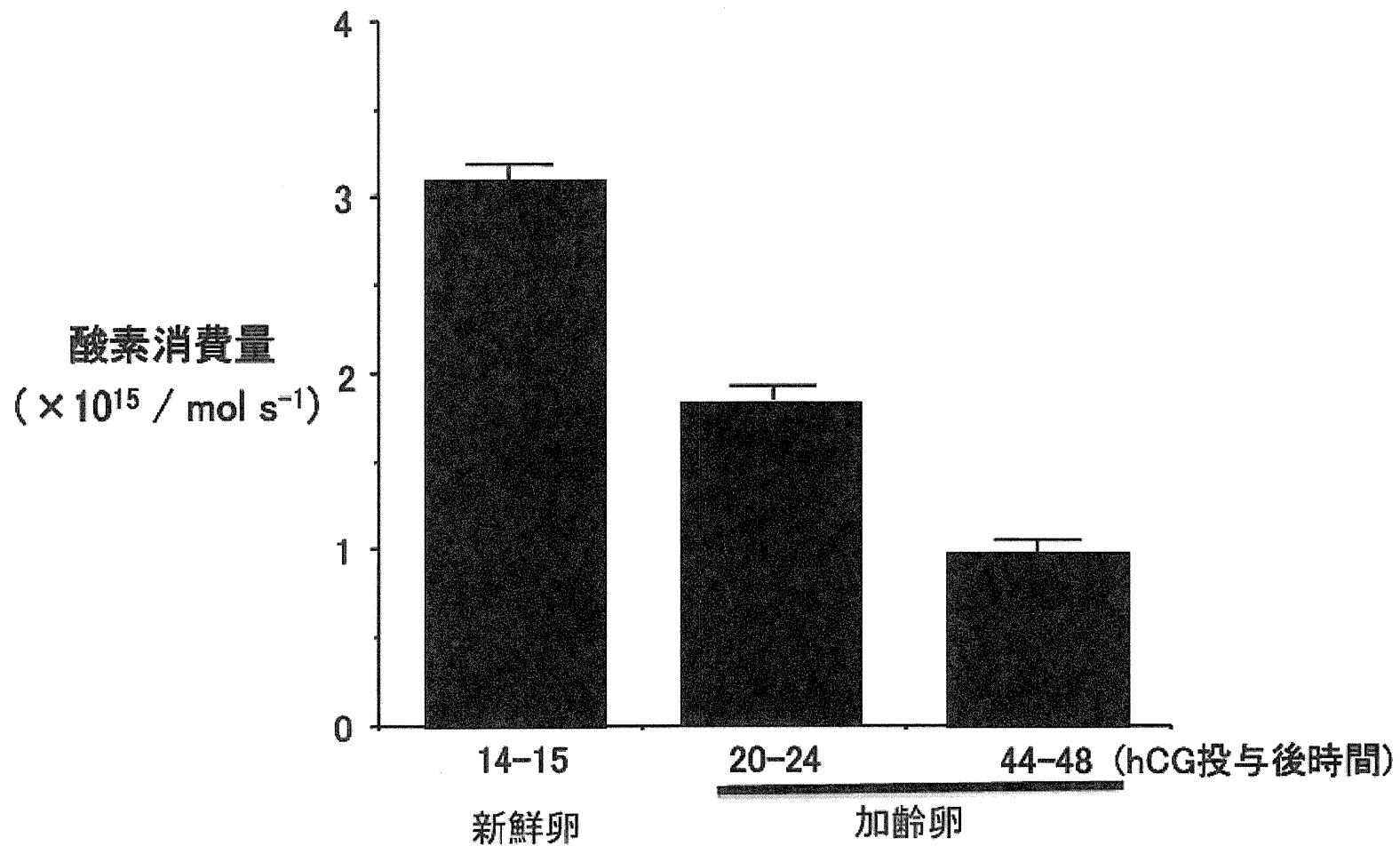
#### G・研究発表

1. Igarashi H, Takahashi T, Matsuo K, Hara S, Amita M, Kurachi H. Systemic complications of premature ovarian failure patients with infertility. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. Kobe, Japan 2013.11.13-14.
2. Takahashi T, Igarashi H, Hara S, Matsuo K, Amita M, Kurachi H. Brachial to ankle pulse wave velocity as an independent prognostic factor for ovulatory response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. Kobe, Japan 2013.11.13-14.
3. 高橋俊文,五十嵐秀樹,原 周一郎,松尾幸城,倉智博久. 多嚢胞性卵巣症候群患者におけるクロミフェン抵抗性に関する予測因子の検討.

第 86 回日本内分泌学会 仙台  
2013.4.25-27

4. 松尾幸城,高橋俊文,竹原 功,池田美智,原 周一郎,五十嵐秀樹,倉智博久. 凍結融解胚移植周期における融解溶液中のトレハロース濃度が融解後の胚の生存率と臨床成績に及ぼす影響. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌  
2013.5.10-12
5. 小島原敬信,高橋俊文,松尾幸城,松村創平,小幡美由紀,松川 淳,倉智博久. 2 年前の膀胱癌由来と思われる腹膜偽粘液腫の 1 例. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌 2013.5.10-12
6. Takahashi T, Seino M, Ohta T, Sudo T, Ishida H, Kurachi H. Evaluation of preventive methods for the symptomatic pulmonary thromboembolism by postoperative anticoagulant therapy in VTE high risk patients with gynecologic malignancy. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌 2013.5.10-12 (IS Poster)
7. 松尾幸城, 高橋俊文, 竹原 功, 原 周一郎, 五十嵐秀樹, 倉智博久. 単一胚盤胞移植後に二卵性双胎妊娠となった一例. 第 31 回日本受精着床学会 別府 2013.8.8-9
8. 松尾幸城, 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 原 周一郎, 長谷川歩美, 倉智博久. 多嚢胞性卵巣症候群患者のクロミフェン抵抗性に関する予測因子として pulse wave velocity 測定は有用である. 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013.11.15-16
9. 竹原 功, 原 周一郎, 松尾幸城, 長谷川歩美, 五十嵐秀樹, 高橋俊文, 倉智博久. 凍結融解周期における単一胚盤胞移植後の二卵性双胎の一例. 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013.11.15-16
10. 五十嵐秀樹, 高橋俊文, 倉智博久. 加齢に伴う卵の質低下と酸化ストレスの関与 (シンポジウム). 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013. 11. 15-16
11. 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 原 周一郎, 網田光善, 松尾幸城, 倉智博久. 脈波伝播速度(pulse wave velocity)は多嚢胞性卵巣症候群患者におけるクロミフェン

- 抵抗性の予測因子である. 第 18 回  
日本生殖内分泌学会 東京  
2013.12.7
12. 長谷川歩美, 高橋俊文, 渡邊憲和,  
山内敬子, 小幡美由紀, 小島原敬信,  
倉智博久. 14 歳で発症した卵巣粘液  
性腺癌の一例. 第 61 回北日本産科  
婦人科学会 旭川 2013.9.7-8
  13. 松村創平, 太田 剛, 清野 学, 須藤  
毅, 高橋俊文, 高橋一広, 倉智博久.  
子宮腺筋症から発生したと思われ  
る類内膜腺癌の一例. 第 61 回北日  
本産科婦人科学会 旭川  
2013.9.7-8
  14. 松尾幸城, 五十嵐秀樹, 清野 学,  
山内敬子, 原 周一郎, 高橋俊文,  
倉智博久. 妊娠初期の卵巣出血にて  
緊急手術を要した 2 例. 第 61 回北  
日本産科婦人科学会 旭川  
2013.9.7-8
  15. 高橋俊文. 卵子の老化と不妊治療.  
第 2 回庄内美人いきいき女性フォー  
ラム. 酒田 2013.9.21
  16. 松尾幸城, 高橋俊文, 網田光善, 五  
十嵐秀樹, 倉智博久. 多嚢胞性卵巣  
症候群患者のクロミフェン抵抗性  
に関する予測因子として脈波伝播  
速度測定は有用である. 第 51 回東  
北生殖医学会 青森 2013.11.2
  17. 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 原 周一郎,  
網田光善, 松尾幸城, 倉智博久. 腹  
腔鏡併用による卵管鏡下卵管形成  
術の治療成績および術後妊娠に関  
する予後因子の検討. 第 51 回東北  
生殖医学会 青森 2013.11.2
- 論文発表
1. Ikeda M, Takahashi T, Kurachi H.  
Spontaneous perforation of pyometra:  
a report of seven cases and literature of  
the review. *Gynecol Obstet Invest*  
2013;75(4):243-249
  2. Matsumura S, Ohta T, Takahashi T,  
Takahashi K, Yamazaki T, Kurachi H.  
Non-sex cord-stromal ovarian tumors  
frequently produce and secrete estrogen in  
postmenopausal women: impact on bone  
metabolism and abnormal endometrial  
histology. *J Clin Endocrinol Metab*  
2013;98(7):2775-2782
  3. Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, Tomita  
Y, Isobe A, Hashimoto K, Kinose Y, Mabuchi  
S, Hisamatsu T, Takahashi T, Kumasawa K,  
Nagata S, Morishige K, Lengyel E, Kurachi H,  
Kimura T. miR-92a inhibits peritoneal  
dissemination of ovarian cancer cells by  
inhibiting integrin  $\alpha 5$  expression. *Am J Pathol*  
2013;182(5):1876-1889
  4. Matsuo K, Takahashi T, Igarashi H, Hara  
S, Amita M, Kurachi H. Effects of  
different trehalose concentrations in a  
warming medium on embryo survival and  
clinical outcomes in vitrified human  
embryos. *Gynecol Obstet Invest*  
2013;76(4):214-220
  5. Hara S, Takahashi T, Amita M, Matsuo K,  
Igarashi H, Kurachi H. Pioglitazone  
counteracts the tumor necrosis factor- $\alpha$   
inhibition of follicle-stimulating  
hormone-induced follicular development  
and estradiol production in an in vitro  
mouse preantral follicle culture system. *J  
Ovarian Res* 2013;6(1):69
  6. Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S,  
Matsuo K, Kurachi H. Molecular  
mechanism of poor embryo development  
in postovulatory aged oocytes: Mini  
review. *J Obstet Gynecol Res*  
2013;39(10):1431-1439
  7. Takehara I, Takahashi T, Hara S, Matsuo  
K, Igarashi H, Kurachi H. Dizygotic twin  
pregnancy after single embryo transfer: A  
case report and review of the literature. *J  
Assist Reprod Genet* 2014 Jan [Epub  
ahead of print]
  8. 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 原 周一郎, 網  
田光善, 松尾幸城, 倉智博久. 腹腔鏡  
併用による卵管鏡下卵管形成術の治療  
成績および術後妊娠に関する予後因子  
の検討. *山形医学* 2014;32(1):1-6
  9. 長谷川歩美, 高橋俊文, 倉智博久. [ホル  
モン療法実践マニュアル] 生殖内分  
泌分野 高プロラクチン血症. *産科と  
婦人科* 2013;80:229-233
  10. 高橋俊文, 倉智博久. 月経前症候群. *産  
科婦人科疾患最新の治療 2013-2015*  
(吉川史隆, 倉智博久, 平松祐司 編) 南  
江堂 2013;184-185
- H・知的財産権の出願・登録状況  
なし



図： マウス卵の加齢に伴う酸素消費量の変化

## II. 分担研究報告書

### 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

分担研究者 福井 淳史(弘前大学医学部講師)

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

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

研究分担者 福井 淳史 弘前大学講師

研究主旨

現在、晩婚化、晩産化がすすみ、不妊症は大きな社会問題となっている。体外受精・胚移植は不妊症の中でも、卵管性不妊、高度の男性不妊、そして高齢の不妊患者などに行われる治療法である。本邦における体外受精・胚移植治療成績は、20代から30代前半における治療あたり生産率は20%程度であるものの、加齢とともに生産率は減少し、40代では5%以下になってしまう。さて、現在胚移植に用いられる胚の選択は肉眼所見のみで行われるため、実際に良好な胚を移植し得ているのか否かについては明らかではない。ところでウシの胚を用いた実験では、胚を分肉眼所見に基づいて分類すると、肉眼的に不良である胚に比べ、肉眼的に良好な胚は酸素消費量大きいことが知られている。また胚盤胞間での比較では、肉眼的に同様な胚盤胞でも呼吸量の多い方が、妊娠率が高いと報告されている。

今回、体外受精・胚移植を施行した胚のうち、肉眼所見が不良であるために胚移植せず廃棄されることになった胚あるいは異常受精のために胚移植することが出来なかった胚を用い、胚呼吸量が胚の状態を反映するのかどうかを明らかにすることを目的とした。また胚呼吸量測定が胚の状態を反映するのであれば、胚移植に際して、肉眼所見の他にもうひとつ別のパラメーターを加えて胚移植を行うことが可能となり、妊娠率の向上につながると考えられる。また確実に良好な胚を1個のみ移植できるようになるのであれば、多胎妊娠率の減少につながるのと考えられる。

本検討の結果、前核数からの検討より、前核数が増加すると呼吸量は低下する可能性が示唆された。また胚の発育ステージからの検討により胚が発育するにつれて胚呼吸量は低下する可能性も示唆された。肉眼的良好胚と不良胚での検討により不良胚の方が呼吸量が多いかもしれない可能性が示唆された。不良胚で胚呼吸が多くなっているということは不良胚において呼吸が過剰になっている可能性があると思われ、これは胚が死滅する直前に胚に無理な酸素消費がある可能性、すなわち通常の呼吸の状態ではない可能性も考えられた。これまでの他家の検討も考え合わせると呼吸が多くても少なくとも胚の状態はよくない可能性があると思われ、胚には至適胚呼吸量というものが存在するのではないかと思われた。

## 研究協力者

福原理恵 (弘前大学産婦人科助教)  
中村理香 (弘前大学胚培養士)  
佐々木幸江 (弘前大学胚培養士)

## A・研究目的

現在、晩婚化、晩産化がすすみ、不妊症は大きな社会問題となっている。体外受精・胚移植は不妊症の中でも、卵管性不妊、高度の男性不妊、そして高齢の不妊患者などに行われる治療法である。本邦における体外受精・胚移植治療成績は、20代から30代前半における治療あたり生産率は20%程度であるものの、加齢とともに生産率は減少し、40代では5%以下になってしまう。さて、現在胚移植に用いられる胚の選択は肉眼所見のみで行われるため、実際に良好な胚を移植し得ているのか否かについては明らかではない。ところでウシ胚を用いた実験では、胚を肉眼所見に基づいて分類すると、肉眼的に不良である胚に比べ肉眼的に良好な胚は酸素消費量が大きいことが知られている。また胚盤胞間での比較では、肉眼的に同様な胚盤胞でも呼吸量の多い方が妊娠率が高いと報告されている。

そこで今回、当科において体外受精・胚移植を施行した胚のうち、肉眼所見が不良であるために胚移植せず廃棄されることになった胚あるいは異常受精のために胚移植することが出来なかった胚を用い、胚呼吸量が胚の状態を反映するのかどうかを明らかにすることを目的とした。また胚呼吸量測定が胚の状態を反映するのであれば、胚移植に際して、肉眼所見の他にもうひとつ別のパラメーターを加えて胚移植を行うことが可能となり、妊娠率の向上につながると考えられる。また、確実に良好な胚を1個のみ移植できるようになるのであれば、多胎妊娠率の減少につながると考えられる。

## B・研究方法

当科において体外受精・胚移植（新鮮胚移植、凍結胚移植）を予定したもののうち、正常受精が確認（2PN）されたもので胚発育不良であり胚移植することが出来なかった胚（n=17）、および異常受精と考えられた1PN胚（n=5）、3PN胚（n=3）を対象とした。胚発育が不良であったものは、①胚移植がキャンセルとなった時点、または②1PN、3PN胚では適宜、それらの胚呼吸能を検討した。

なお、測定にはクリノ社製細胞呼吸活性（胚呼吸）測定装置を使用した。

## C・研究結果

### ① 前核数による比較：

1PN胚(n=3)の呼吸活性は $4.47 \pm 1.41 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、2PN胚(n=24)の呼吸活性は $3.93 \pm 1.75 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、3PN胚(n=4)の呼吸活性は $3.76 \pm 0.82 \times 10^{15} \text{mol/S}$ であり、有意差は認めなかったものの前核数が多くなると胚呼吸活性が低下する傾向を認めた。

### ② 胚の発育ステージによる比較：

8細胞期胚(n=20)の呼吸活性は $3.57 \pm 1.59 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、桑実胚(n=9)の呼吸活性は $3.61 \pm 1.58 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、胚盤胞(n=2)の呼吸活性は $4.95 \pm 1.01 \times 10^{15} \text{mol/S}$ であり、①同様に有意差は認めなかったが、胚が発育するにつれて胚呼吸量が増加する傾向を認めた。

### ③ 肉眼的良好胚と不良胚との比較：

1PN、3PN胚のうち測定時肉眼的に良好と見えた胚(n=11)の呼吸活性は $3.61 \pm 1.3 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、肉眼的に不良と見えた胚(n=20)の呼吸活性は $4.16 \pm 1.75 \times 10^{15} \text{mol/S}$ であり、①②同様有意差を認めないものの、肉眼的に不良胚の方が高い傾向の呼吸活性を認めた。

### ④ 同一胚を複数回測定しての検討：

1PN胚、3PN胚で胚の発育をみながら複数回測定し、得た胚(n=4)を対象として胚呼吸活性の変動を測定した。

3PN胚で日を追って観察した場合、胚発育は一時的に良好に見えるものでも呼吸量が低下していく胚が認められた。また、2PN胚における検討では胚の状態は変化しなくても日を変えて測定すると胚呼吸量が低下するものや一見胚が発育（桑実胚から初期胚盤胞へ発育）しているように見えても、胚呼吸量は低下していた。

#### D・考察

前核数からの検討より、前核数が増加すると呼吸量は低下する可能性が示唆された。また胚の発育ステージからの検討により、胚が発育するにつれて胚呼吸量は低下する可能性も示唆された。肉眼的良好胚と不良胚での検討により、不良胚の方が呼吸量増加の可能性が示唆された。不良胚で胚呼吸が多くなっているということは不良胚において呼吸が過剰になっている可能性があると思われ、これらから胚が死滅する直前に胚に無理な酸素消費がある可能性、すなわち通常の呼吸の状態ではない可能性も考えられた。

これまでの他家の検討も考え合わせると呼吸が多くても少なくとも胚の状態はよくない可能性があると思われ、胚には至適胚呼吸量というものがあるのではないかと思われた。

#### E・結論

ヒトにおいても胚呼吸量の測定は、胚の状態を反映している可能性があると思われるが、更なる検討が必要である。

#### F・健康危険情報

なし

#### G・研究発表

なし

#### H・知的財産権の出願・登録状況

なし



## II. 分担研究報告書

### 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

分担研究者 菅沼 亮太(福島県立医科大学講師)

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

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

研究分担者 菅沼 亮太 福島県立医科大学講師

研究主旨

新しく開発した全自動受精卵呼吸測定装置は、以前にクリノ株式会社が開発した受精卵細胞呼吸活性測定装置（CRAS-1.0）に比較し、湿潤環境で容易に操作可能な機器である。今回、乳癌細胞株であるMCF-7のスフェロイドを作成し、酸素消費に伴う濃度勾配に着目し新規受精卵呼吸測定装置を用いて測定することを試みた。

本研究ではまず始めにチップ型電極を用いて、フェロセンメディエータ液中で銀塩鹿銀参照電極を用いた酸化還元電流をサイクリック・ボルタンメトリー（CV）測定により検証した。また、MCF-7細胞からスフェロイドを作成し酸素消費量を測定した。さらに、酸素濃度勾配のシュミレーションと酸素消費量を計算式で明らかにした。

まず試作のためにチップ型プローブの作成を行った。キャビティの直径と作用電極の直径を数サイズで検討し最適なサイズを確立した。次にCV測定し、10 nA以下の電流で測定可能なことを確認した。さらに200  $\mu$ mのスフェロイドを作成し5分以内に測定可能なことを検証した。また、溶存酸素濃度と受精卵中心からの距離を用いて関係式を明らかにした。

今回の検討より、チップ型電極の設計・施策が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が可能であることが明らかになった。今後はその再現性を確認し、ヒト余剰卵における計測につなげていきたいと考えている。

## 研究協力者

鈴木 聡 (福島県立医大助手)

### A・研究目的

以前にクリノ株式会社が開発した受精卵細胞呼吸活性測定装置 (CRAS-1.0) はマニュアルの

マイクロプローブを用いた機器であり、手技習得に長期間のトレーニングを要する。そのため、一般の不妊診療には取り入れが困難で普及の妨げとなっていた。今回新しく開発した全自動受精卵呼吸測定装置は、全自動で小型であり湿潤環境で容易に操作可能な機器である。今回、乳癌細胞株であるMCF-7のスフェロイドを作成し、そのサイズや測定時間などを決め、その後に酸素消費に伴う濃度勾配に着目し新規受精卵呼吸測定装置を用いて測定することを試みた。

### B・研究方法

本研究で用いたチップ型電極の上面および断面イメージを提示する (図1)。まず始めに、チップ電極の設計・施策を行った。キャビティの直径 (50-400  $\mu\text{m}$  で6種類) と作用電極の直径 (3-10  $\mu\text{m}$  で3種類) を設定し、最適なサイズを確立した。次に従来機器のポテンショスタットを改造し、測定液中 (ERAM-2) での溶存酸素還元電流を測定した。さらに200  $\mu\text{m}$  のスフェロイドを作成し、5分以内に測定可能か検証した。また、溶存酸素濃度と受精卵中心からの距離から関係式を検討にした。

### C・研究結果

図1に、検討したチップ構造を示す。この容器は受精卵をセッティングし培養器の中に置くだけで呼吸量が測定可能なため操作性は著しく改善する。最終的には、このチップ測定数が4個並んだ形で樹脂プレートに埋め込まれるように作成した。

ターゲットとなる構造 (各部の寸法等) を絞り込むため、キャビティの直径 (50-400  $\mu\text{m}$  で6種類) と作用電極の直径 (3-10  $\mu\text{m}$  で3種類) を設定し測定を行ったところ、キャビティの直径200  $\mu\text{m}$ 、作用電極の直径5  $\mu\text{m}$  で最適な測定結果が得られた (図2)。

次に、北斗電工が開発した従来機器のポテンショスタットを改造し、開発機器に接続をこころみた。ERAM-2を測定液として溶存酸素還元電流を測定したところほぼ一致した結果が得られ、開発機器による測定が可能であることを確認した (図3)。

さらに、乳癌細胞株であるMCF-7のスフェロイドを作成し、そのサイズを約200  $\mu\text{m}$  になるように設定した (図4)。そして、測定条件や測定対象などを決め、キャビティからの距離による酸素消費量を検討し、新規受精卵呼吸測定装置を用いて距離依存的に測定可能なこと (図5)、そして10 nA以下の電流で測定可能なこと (図6) を確認した。

### D・考察

今回、新規開発を行ったチップ型電極のサイズ設計や計測方法の検討が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が測定可能であった。引き続き、電流量や開発機器による測定感度差を検討していく。今後はそれらの再現性を確認し、動物卵やヒト余剰卵における計測につなげていきたいと考えている。

## E・結論

今回の検討より、チップ型電極の設計・施策が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が可能であることが明らかになった。今後はその再現性を確認し、動物卵やヒト余剰卵における計測で実用化を目指していく。

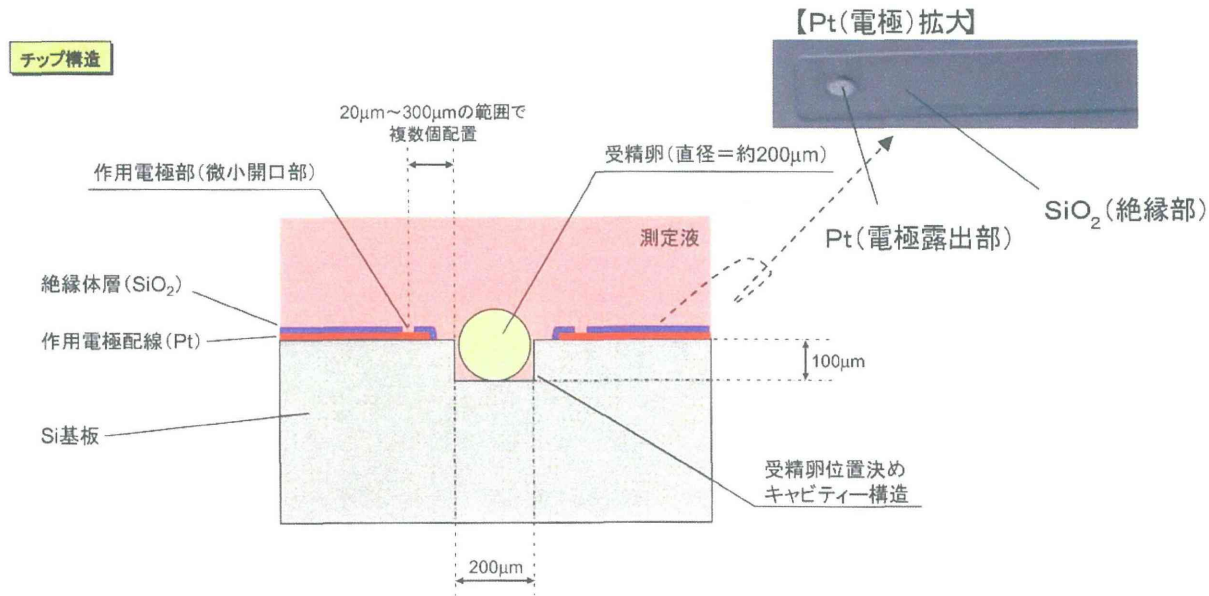
## G・研究発表

特記事項なし

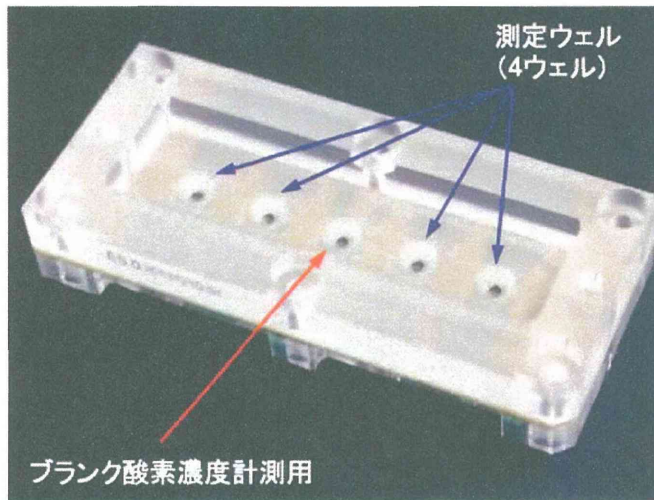
## H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

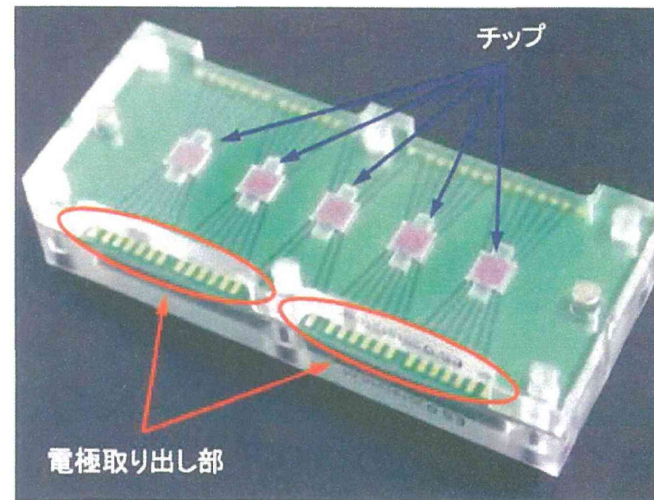
# (図1) チップ型電極の写真およびそのイメージ



ウェル側



裏面側



## (図2) キャビティ直径と作用電極直径の検討

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

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

②作用電極 直径依存性  
→ 測定プロトコル

①キャビティ直径 依存性  
→ 最適デバイス構造

※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

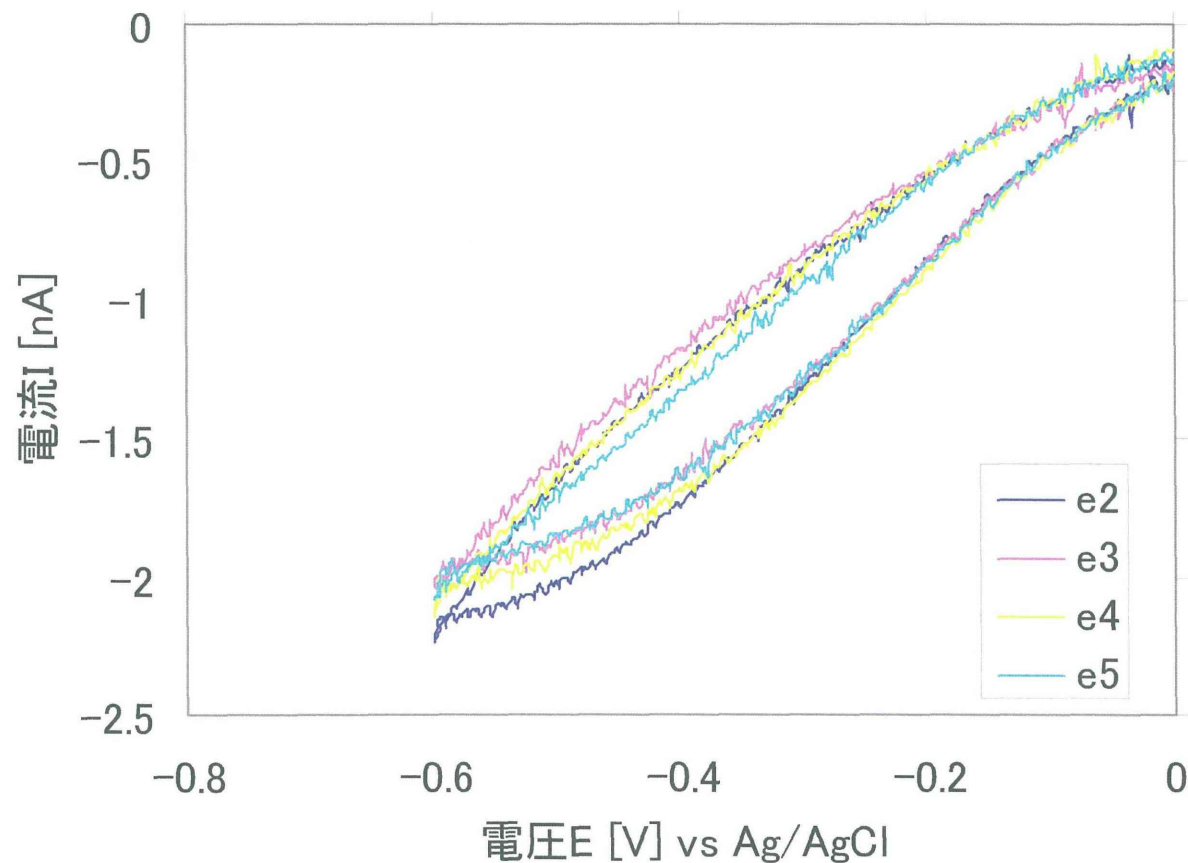
# (図3) 測定液中での溶存酸素還元電流測定

【測定条件】チップ: ME1301-P01-02-05-0616

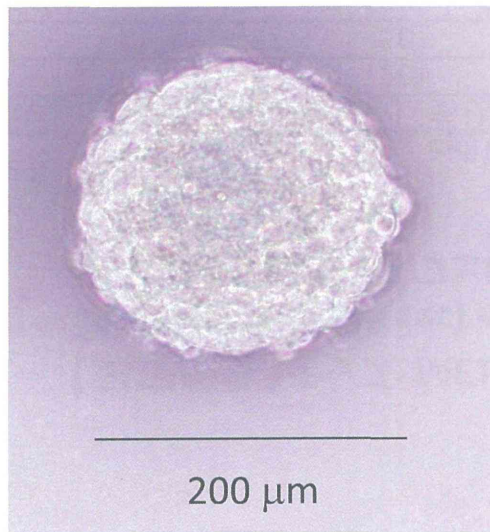
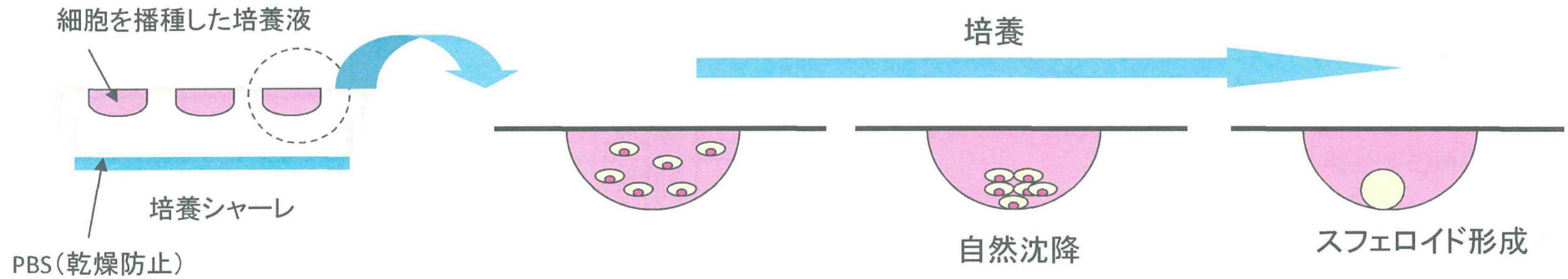
装置: HSV-100F (Hokuto Denko)

測定液: ERAM-2

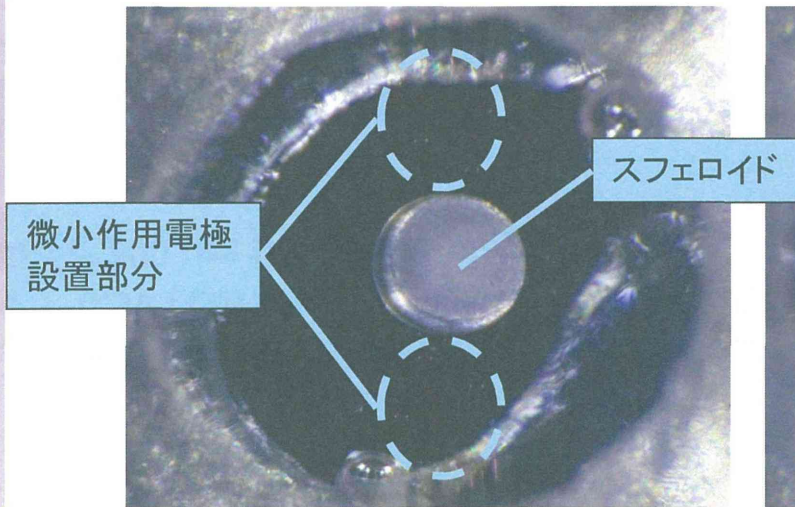
走査範囲: 0 V → -0.5 V → 0 V



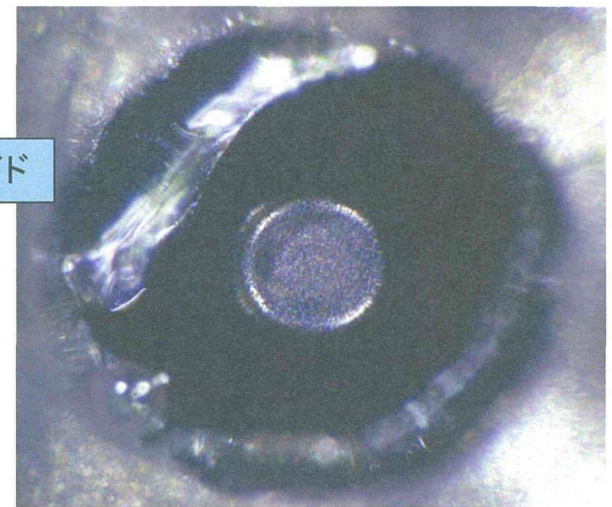
# (図4) MCF-7を用いたスフェロイド作成



培養液中のスフェロイド



キャビティ内に収まった様子



スフェロイド除去後のキャビティ



# (図5) MCF-7スフェロイドを用いた呼吸活性測定

【測定条件】チップ: ME1301-P01-02-05-0812 装置: HSV-100F (Hokuto Denko) 測定液: ERAM-2  
 測定条件: 0 V (20 sec) → -0.5V (120 sec), 各電極1端子ずつなぎ変えて測定  
 測定対象: MCF-7スフェロイド 200 μm (200 cells, 3days)

cell1

キャビティからの距離[um]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.736	-2.976	-0.240
50	-3.428	-4.095	-0.667
100	-2.355	-2.623	-0.268
150	-2.988	-3.012	-0.024

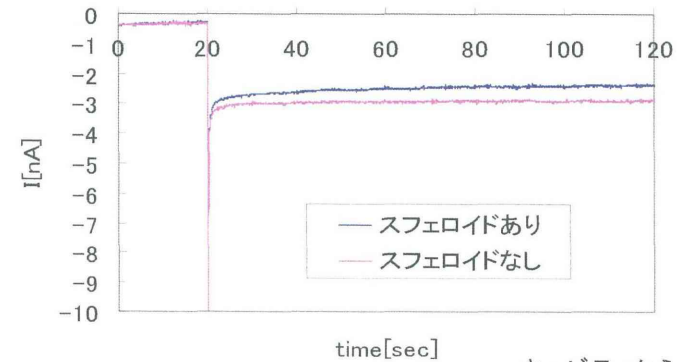
cell2

キャビティからの距離[um]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.432	-2.722	-0.290
50	-3.102	-3.595	-0.492
100	-2.135	-2.482	-0.347
150	-2.662	-2.463	0.200

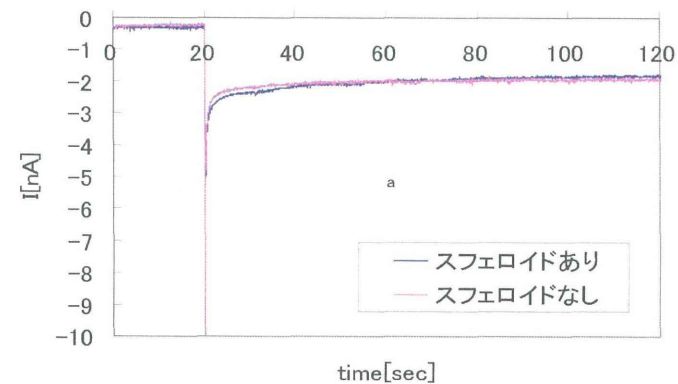
cell3

キャビティからの距離[um]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-1.938	-2.338	-0.400
50	-2.369	-2.876	-0.507
100	-1.773	-2.023	-0.249
150	-1.834	-1.941	-0.108

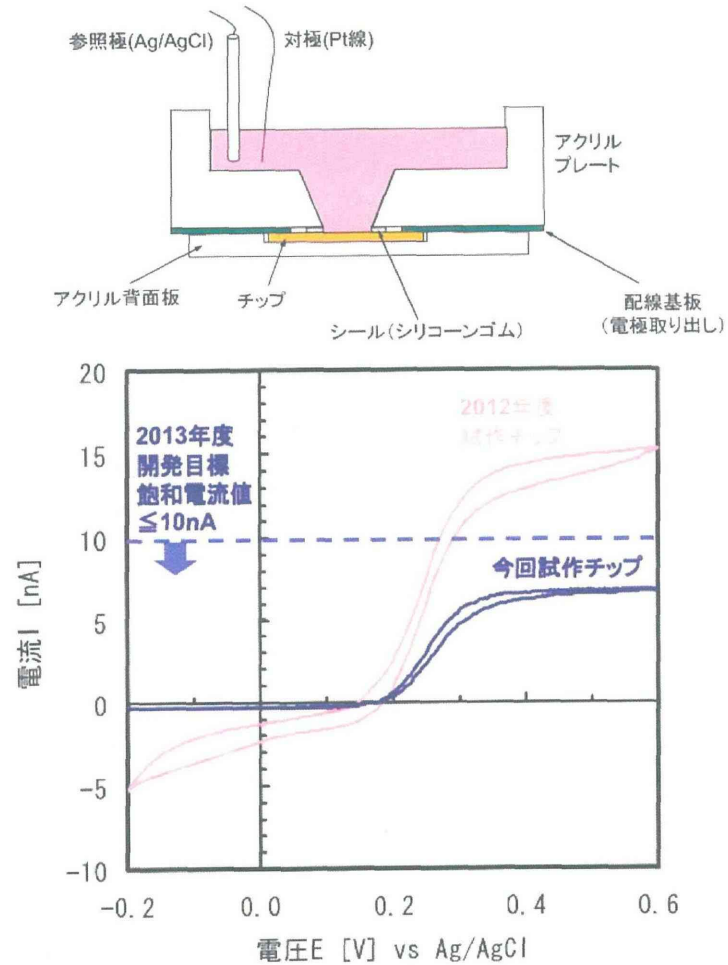
キャビティから20 μm (cell3)



キャビティから150 μm (cell3)



# (図6)新規受精卵呼吸測定装置を用いたCV測定



【測定条件等】 共通測定液=10mmol/Lフェロシアン化カリウムを含む、0.1mol/L 塩化カリウム溶液  
 (2012年度試作チップ、Ptマイクロプロブ電極) 測定系=HV-405@北斗電工、北斗電工製R-6参照極、Pt薄膜対極  
 (2013年度試作チップME1301B-D3) 測定系=HV-4000@パナソニックAIS、弊社所有参照極(対極と共用)

## II. 分担研究報告書

### 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

分担研究者 志賀尚美(東北大学医学部助教)

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

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

研究分担者 志賀 尚美 東北大学助教

研究主旨

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。そして、平成26年度に行う予定のヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定臨床研究のプロトコールを作成し、東北大学医学部倫理委員会承認の取得を行った。

まず、チップの試作品開発をパナソニック・ヘルスケア社と共に行い数回の試作品を繰り返し検討し、平成26年1月に最終品を完成させた。その際のチップ改良に伴う測定手技・評価方法の標準化を行いプロトコールを作成した。次に、患者への説明方法、研究記録の維持方法、使用検体の廃棄方法、取得データの扱いなどについて詳細にまとめた。

平成26年度に行うヒト余剰卵（廃棄卵）を用いた受精卵呼吸量測定の臨床研究について、平成26年2月に東北大学倫理委員会申請を行い、承認を得た。また現在、東北大学で96例の余剰卵が確認されている。

今後、全ての共同研究施設で倫理委員会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。