

図2 走査型電気化学顕微鏡をベースに開発した「受精卵呼吸測定装置」

- a 装置は、①倒立型顕微鏡、②ポテンシオスタット、③ノートパソコン（呼吸能解析ソフトを内蔵）により構成されている。
- 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 μm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。

筆者らは、金属錯の検出装置として用いられてきた SECM を受精卵の呼吸計測に応用するための要素技術開発を行ってきた。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¹⁵⁾ 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オスタット、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により構成されている（図2a）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

単一胚の酸素消費測定

「受精卵呼吸測定装置」を用いた酸素消費（呼吸）測定には、超高感度マイクロ電極（図2b）多検体測定プレート（図2c）および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、マイクロウェルの底部中心に静置させる（図2d）酸素が還元可能な $-0.6\text{ V vs. Ag/AgCl}$ に電位を保持したのち、マイクロ電極を移動速度 $20\sim 30\ \mu\text{m/s}$ 、走査距離 $150\sim 300\ \mu\text{m}$ の条件で透明帯近傍を鉛直方向に走査する（図2e）通常、1回の呼吸測定では、マイクロ電極を3回走査したのちに球面拡散理論式^{16,17)}を基本とする解析ソフトを用いて胚の酸素消費量を算出する

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3）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結

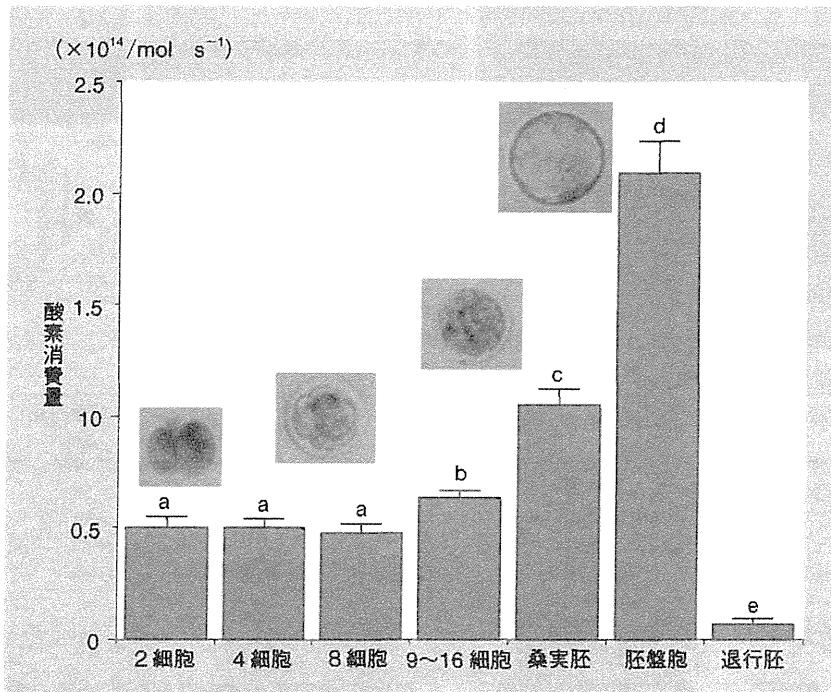


図3 ウシ体外受精胚の発生過程における呼吸量変化

桑実胚期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酸素消費は検出されない。a～eの異符号間で有意差 ($P < 0.05$) がある。

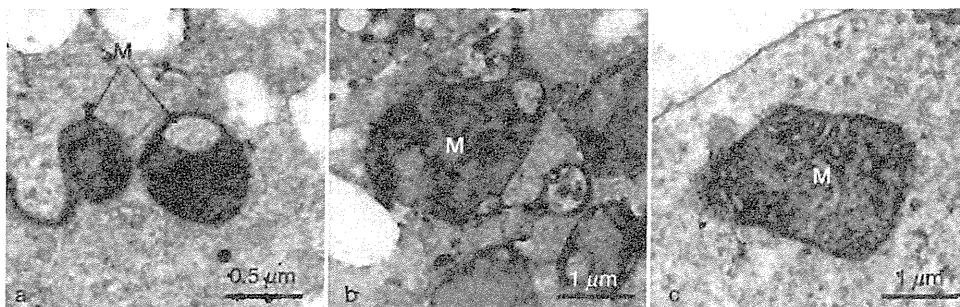


図4 ウシ体外受精胚の発生過程におけるミトコンドリアの微細形態変化

a 8細胞期胚, b 桑実胚, c 胚盤胞. M ミトコンドリア

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）が認められる（図4）¹³⁾。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で起こることから「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ことがわかる。現在、胚評価における「受精卵呼吸測定装置」の有用性を検証するために、ミトコンドリアの細胞内局在、ミトコンドリア膜電

表1 ウン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 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) | 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) |

位活性, エネルギー (ATP) 産生および呼吸鎖複合体 (シトクローム c 酸化酵素 Cox) 遺伝子発現の解析など ミトコンドリア呼吸機能に関連する生物学的解析を総合的に展開している

酸素消費測定による胚評価

酸素消費を指標とする胚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¹⁸⁾ また, 凍結時に呼吸活性の高い胚盤胞は, 融解したあとの生存率が良好であるという結果が得られている¹⁹⁾ 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 $1.0 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 初期胚盤胞で $0.8 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 桑実胚で $0.5 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) 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)²⁰⁾ この結果は, ミトコンドリア呼吸 (酸素消費) が胚評価の有力な指標になるとともに, 「受精卵呼吸測定装置」が画期的な胚品質診断装置である可能性を示している

「受精卵呼吸測定装置」を生殖医療分野で応用するためには, 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」を用いて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って得られた産子に, 通常の胚移植産子と比べて奇形発生率および染色体異常の増加, 病理組織およ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

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 ± 0.05 |
| 桑実胚 | 5 | 0.61 ± 0.11 |
| 初期胚盤胞 | 13 | 0.72 ± 0.06 |
| 胚盤胞～孵化胚盤胞 | 5 | 1.05 ± 0.02 |

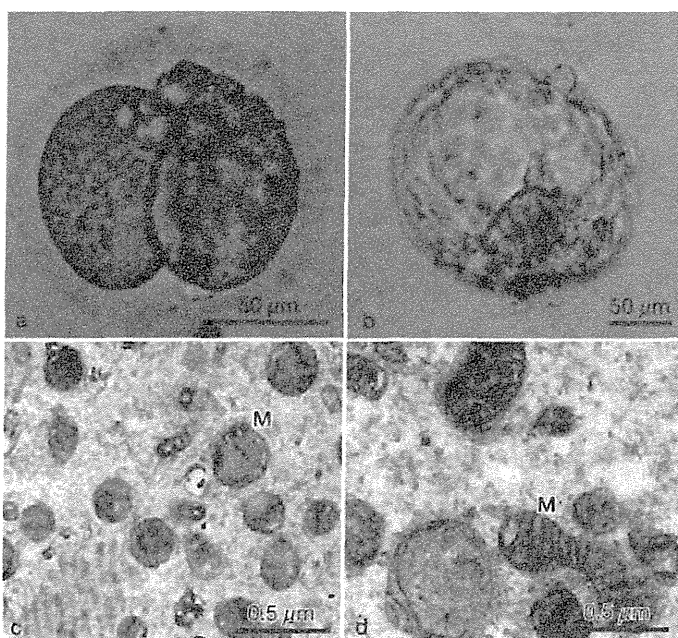


図5 ヒト体外受精胚の電顕像

- a 2細胞期胚. 未成熟な形態のミトコンドリア (M)
 b 胚盤胞期胚. 拡張したクリステ構造をもつ発達したミトコンドリア (M)

ヒト胚評価への応用

「受精卵呼吸測定装置」は、短時間で非侵襲的に胚の呼吸量を測定できることから臨床応用可能な計測機器として有望である。不妊治療への臨床応用を実現するためには、呼吸測定によるヒト胚品質評価の有効性と装置の安全性の検証が不可欠である。

これまでに、試験的臨床研究としてヒト余剰胚の酸素消費量測定を試みている表2に、ヒト胚の発生過程における呼吸量変化を示す。ヒト胚ではウシ胚と同様に、発生に伴いミトコンドリアの発達とともに呼吸量が顕著に増加する(図5)。また、受精後3日目に比較的高い呼吸活性 ($0.26 \sim 0.56 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) を有する胚は、 0.26×10^{14}

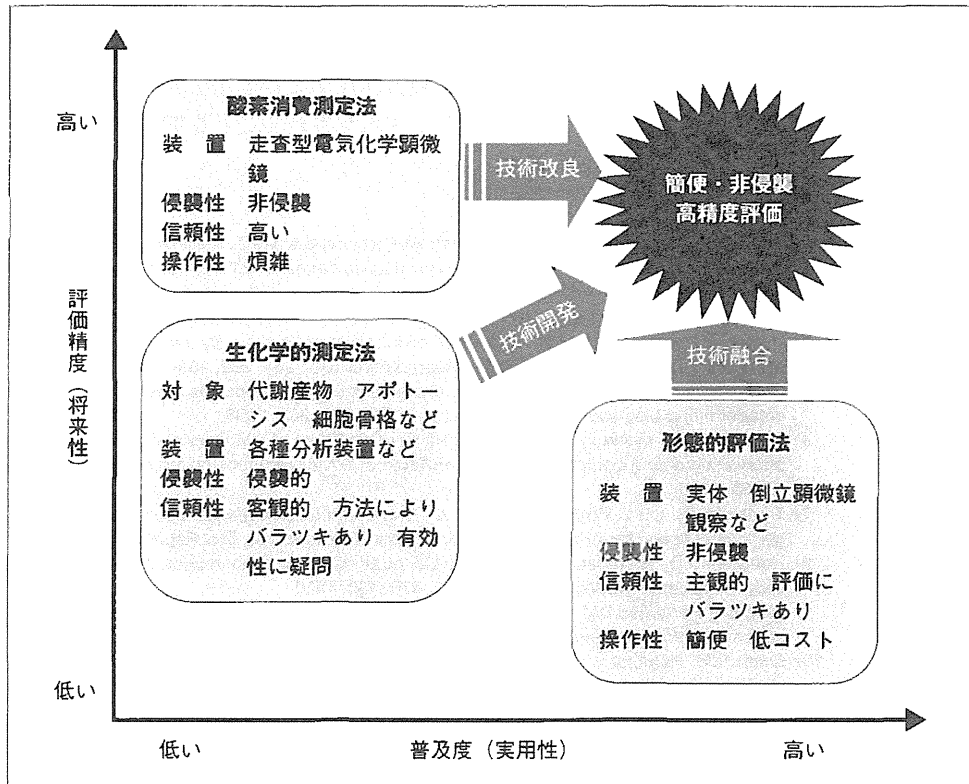


図6 胚評価の現状と将来像を示した模式図

それぞれの評価法の長所を融合した新しい胚評価法の開発が望まれる。

$/\text{mol s}^{-1}$ 未滿または $0.56 \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ を上回る呼吸活性を示す胚と比べて有意に高い確率で胚盤胞へ発生することが示されている^{21, 22)} また、形態的に同じクオリティと評価された胚の酸素消費量を測定し、呼吸活性が最も高い胚を移植した場合、形態観察のみで評価した胚を移植した症例と比べて妊娠率が高い傾向がある(未発表データ) これらの結果は、ヒト胚においても呼吸活性を指標とする品質評価が可能であることを示唆している

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のち、不妊治療での臨床応用を目的に呼吸測定胚の移植を計画している

おわりに

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。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胚評価システムの開

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って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,新しいヒト胚評価システムとして実用化されることを期待している

● 文献

- 1) Veeck LL Atlas of the human oocyte and early conceptus, vol 2. Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1991
- 2) Gardner DK, Schoolcraft WB Towards reproductive certainty : infertility and genetics beyond. In vitro culture of human blastocysts, Jansen R, Mortimer D(eds). pp378-389, Carnforth, Parthenon Press, 1999
- 3) Overstrom EW : In vitro assessment of embryo viability. Theriogenology 45 : 3-16, 1996
- 4) Rieger D, Loskutoff NM : Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. J Reprod Fertil 100 : 257-262, 1994
- 5) Gopichandran N, Leese HJ : Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophoblast and blastocoel fluid. Reproduction 126 : 299-308, 2003
- 6) Thompson JG, McNaughton C, Gasparrini B, et al : Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. J Reprod Fertil 118 : 47-55, 2000
- 7) Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, et al Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. Biol Reprod 62 : 1866-1874, 2000
- 8) Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, et al Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. Mol Reprod Dev 44 : 476-485, 1996
- 9) Land SC, Porterfield DM, Sanger RH : The self-referencing oxygen-selective microelectrode Detection of transmembrane oxygen flux from single cells. J Exp Biol 202 : 211-218, 1999
- 10) Smith PJS, Hammar K, Porterfield DM, et al : Self-referencing, non-invasive, ion selective electrode for single cell detection of trans-plasma membrane calcium flux. Microsc Res Tech 46 : 398-417, 1999
- 11) Lopes AS, Larsen LH, Ramsing N, et al : Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensors system. Reproduction 130 : 669-679, 2005
- 12) Bard AJ, Mirkin MV Scanning Electrochemical Microscopy, Marcel Dekker, New York, 2001
- 13) Shiku H, Matsue T, Uchida I Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. Anal Chem 68 : 1276-1278, 1996
- 14) Oyamatsu D, Kanaya N, Shiku H, et al Electrochemical/photochemical formation of enzyme patterns on glass substrates using a scanning electrochemical/confocal microscope. Sens Actuat B 91 : 199-204, 2003
- 15) Abe H, Shiku H, Aoyagi S, et al In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. J Mamm Ova Res 21 : 22-30, 2004
- 16) Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, et al Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. Anal Chem 73 : 3751-3758, 2001
- 17) Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, et al Respiration activity of single bovine embryos entrapped in cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. Anal Chim Acta 522 : 51-58, 2004
- 18) Abe H, Shiku H, Yokoo M, et al : Evaluating the quality of individual embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. J Reprod Dev 52(Suppl) : S55-S64, 2006
- 19) Shiku H, Torisawa Y, Takagi A, et al Metabolic and enzymatic activities of individual cells, spheroids and embryos as a function of the sample size. Sens Actuat B 108 : 597-602, 2005
- 20) Abe H : A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. J Mamm Ova Res 24 : 70-78, 2007
- 21) Utsunomiya T, Goto K, Nasu M, et al Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. J Mamm Ova Res 25 : 2-7, 2008
- 22) 後藤香里, 小池 憲, 熊迫陽子, 他 : 電気化学的吸計測技術におけるヒト胚クオリティー評価と安全性. 日受精着床会誌 27 : 53-58, 2010

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

阿部宏之

山形大学大学院理工学研究科・バイオ化学工学専攻

はじめに

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、胚の品質 (クオリティー) は割球の形態や数などの形態的特徴を基準に評価されている。形態観察による品質評価は、簡単・迅速で非侵襲的な方法であることから、現状では最も有効な胚の品質評価法である。しかし一方で、評価の基準となる胚の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。そこで筆者は、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。本稿では、ウシとヒトを中心に、これまでに開発されてきた胚の品質評価法を解説するとともに、電気化学計測技術を応用した独自の胚品質評価法を紹介する。

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⁾。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 (コンパクションの程度) 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²⁾。しかし一方で、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、これら形態観察による品質評価の精度には課題が残されている。

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 bod-

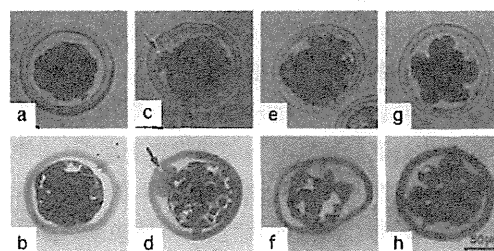


図1. ウシ桑実胚の形態的クオリティー評価 (a, c, e, g ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察、b, d, f, h 準薄 (semi-thin) 切片 (1 μ m、トルイジンブルー染色) 像)。細胞塊の形態とフラグメントの数を基準にそれぞれグレードA (a, b: Excellent)、グレードB (c, d: Good)、グレードC (e, f: Fair)、グレードD (g, h: Poor) の4つのクオリティーに分類される。(参考文献13を一部改変)

ies: 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^{4,9)}。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モ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、核内にあってリボソーム 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。Gardner⁷⁾ 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^{21,22)}。ミトコンドリアは

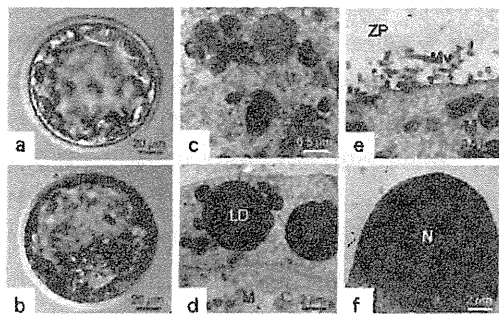


図 2. ヒト体外受精胚の光学顕微鏡像 (a, b ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察) および電子顕微鏡像 (c-f)。Gardner 分類法によるクオリティー良好胚 (a, c, e) と不良胚 (b, d, f)。c, b クオリティー良好胚では発達した微絨毛 (Mv) とミトコンドリア (M) が観察される。ZP 透明帯。d, f クオリティー不良胚では高電子密度で大型の脂肪滴 (LD) と凝縮した核 (N) が特徴のアポトーシス像が認められる。

酸化的リン酸化反応（呼吸）により細胞活動に必要なエネルギー（アデノシン三リン酸 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、現在開発が望まれている精度の高い胚品質評価法として実用化することは難しい。

4. 電気化学計測法を応用した 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 μm 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 μm 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。

5. 単一胚の呼吸量測定

「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

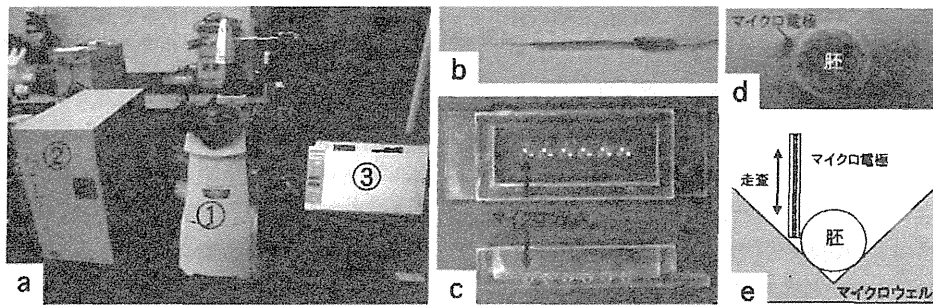


図3. (a) 走査型電気化学顕微鏡を改良した「受精卵呼吸測定装置 HV-405」。①倒立型顕微鏡、②ポテンシオスタット、③ノートパソコン（呼吸能解析ソフトを内蔵）。(b) 呼吸測定用マイクロ電極 ディスク型白金マイクロ電極で、先端部が直径2~5 μm にエッチング加工された白金電極がガラスキャピラリーに熱封止されている。(c) 多検体測定プレート プレート底面には円錐形のマイクロウェルが6穴施されている。(d) マイクロウェル底部に静置したウシ胚。(e) マイクロ電極は胚近傍を鉛直方向に走査することで、胚の酸素消費量を測定する。

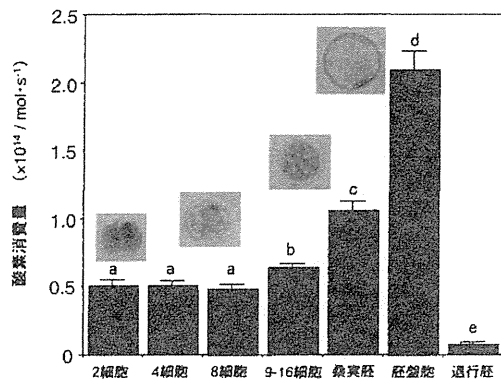


図4. ウシ体外受精胚の発生過程における呼吸量変化。桑実胚から胚盤胞期にかけて呼吸量が増加する。退化胚ではほとんど呼吸量は検出されない。異符号間で有意差 ($P < 0.05$) がある。

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 $-0.6\text{ V vs. Ag/AgCl}$ に電位を保持した後、マイクロ電極を移動速度 $20\sim 30\ \mu\text{m}/\text{sec}$ 、走査距離 $150\sim 300\ \mu\text{m}$ 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、

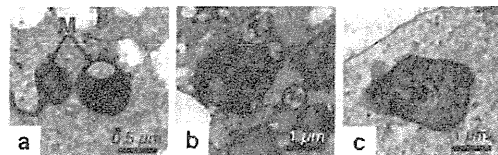


図5. ウシ体外受精胚の発生過程におけるミトコンドリアの微細形態変化。a 8細胞期胚、b 桑実胚、c 胚盤胞。M ミトコンドリア。

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5⁴⁰⁾)。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、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のミトコンドリア呼吸機能に関連する

呼吸量が顕著に増加する。また、受精後3日目に比較的高い呼吸活性 ($0.26\sim 0.56 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$) を有する胚は、 $0.26 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 未満または $0.56 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ を上回る呼吸活性を示す胚と比べて有意に高い確率で胚盤胞へ発生することが示されている⁴⁾。これらの結果は、ヒト胚においても呼吸活性を指標とする品質評価が可能であることを示唆している。今後は、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予定である。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、不妊治療での臨床応用を目的とした呼吸測定胚の移植を目指してしている。

おわりに

本稿では、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、本稿で紹介した「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。

「受精卵呼吸測定装置」は細胞呼吸を非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や微小組織の活性評価への応用

【胚品質評価の現状と将来像】

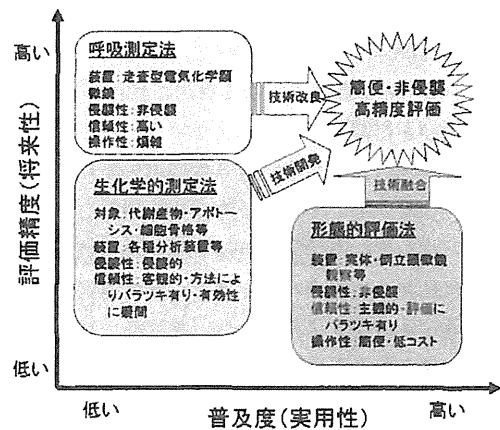


図6. 胚の品質評価の現状と将来像を示した模式図。それぞれの評価法の長所を融合した新しい品質評価法の開発が望まれる。

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⁴⁾、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、電気化学的呼吸計測技術および装置の応用範囲は極めて広い。

近い将来、「受精卵呼吸測定装置」が基礎研究から先端医療に至る幅広い分野において実用化されることを期待している。

本研究は、文部科学省科学研究費補助金 (No. 17380164、21380171、18038003、18048001)、科学技術振興調整費「戦略的研究拠点育成」、厚生労働科学研究費補助金(医療機器開発推進研究事業)、生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)、社団法人畜産技術協会、中谷医工計測技術振興財団、鈴木謙三記念医科学応用研究財団、社団法人家畜改良事業団の支援を受けて行われた。

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, 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., H. Rodriduez-Martinez & 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. Embryol*, 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) Kopečný, 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. Techn.*, 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, 伊藤一佐々木隆広, 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

