

## I I . 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)  
佐藤巨(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)  
椋嶋克哉(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变化を観察した。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、北里バイオフィーマ社の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のグレードは、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の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 $\mu$ m、2回目:167 $\mu$ m、3回目:174 $\mu$ m、4回目:188 $\mu$ m、5回目:271 $\mu$ m)がhatchingした(図2)。その他の、拡張と縮小がみられたり、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)からも、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事が期待される。

## 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。

## G・研究発表

「III.研究成果の刊行に関する一覧表」に別掲

## 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.

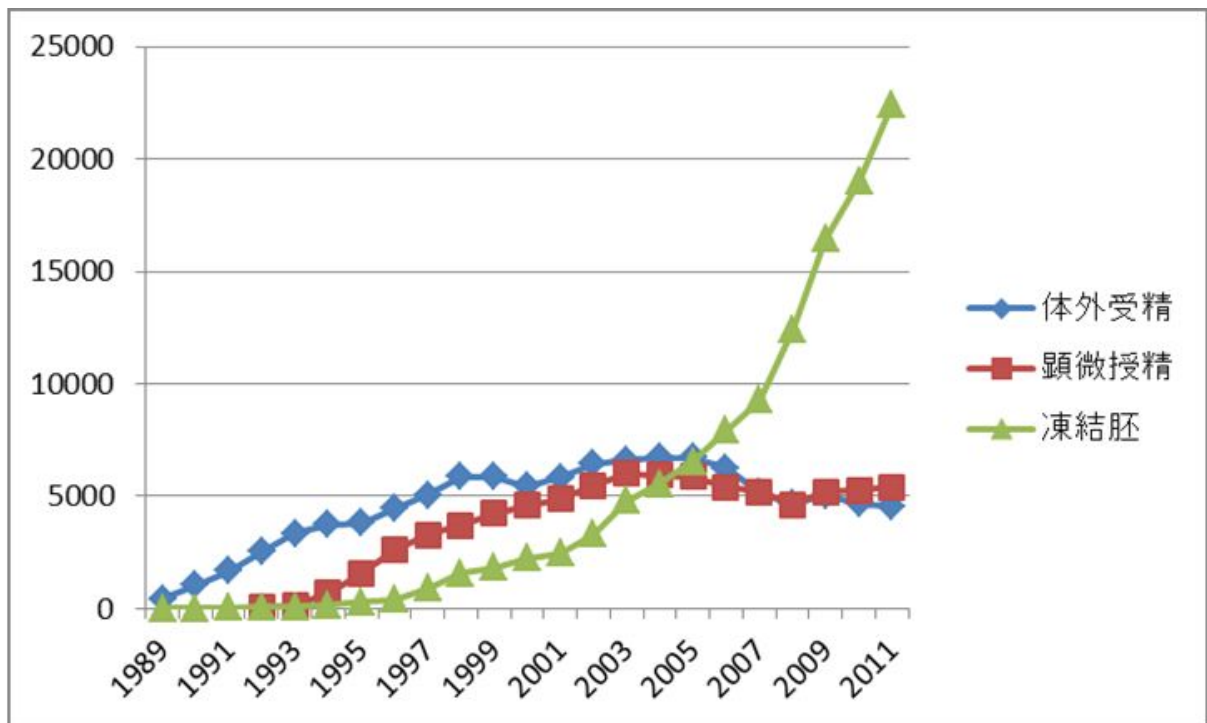


図1. 生殖補助医療による出生児数の内訳と推移

日本産科婦人科学会ART登録データより

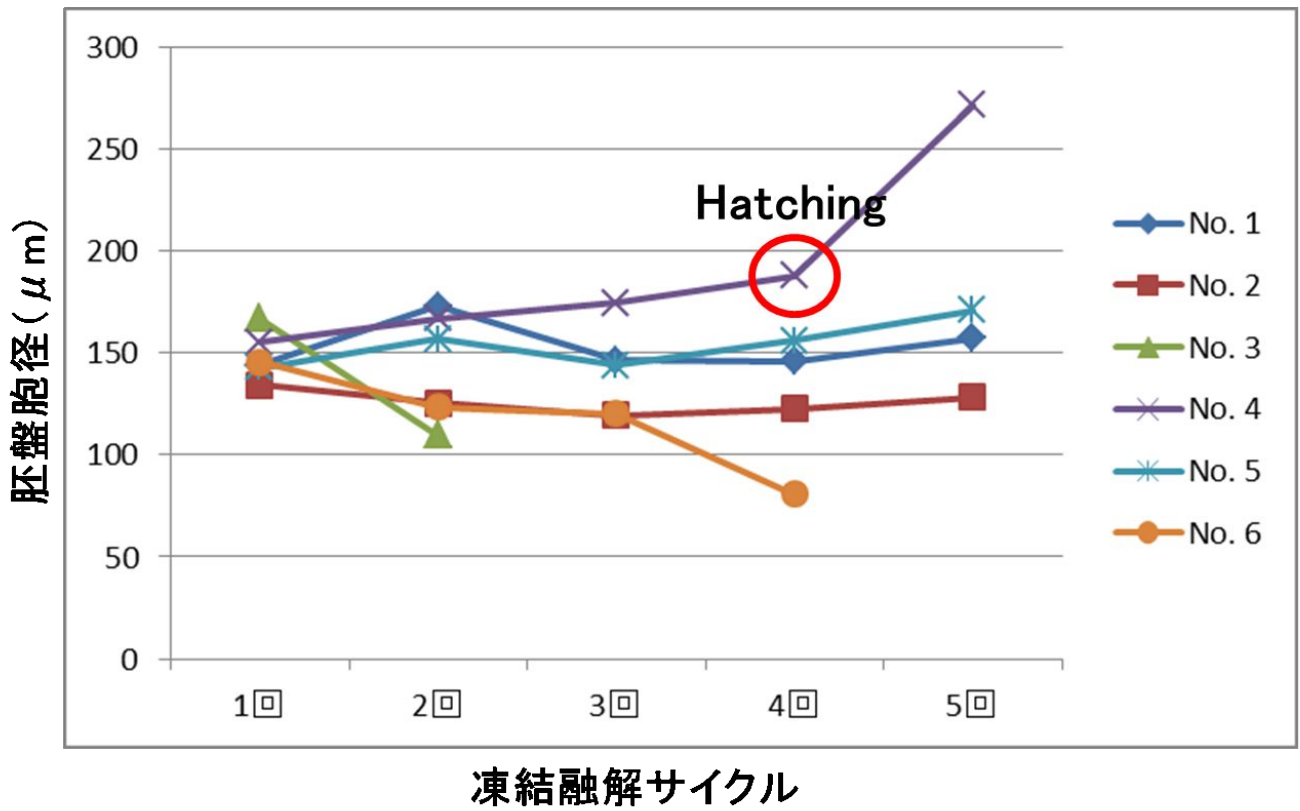


図2. 複数回凍結融解したヒト胚盤胞における径の変化

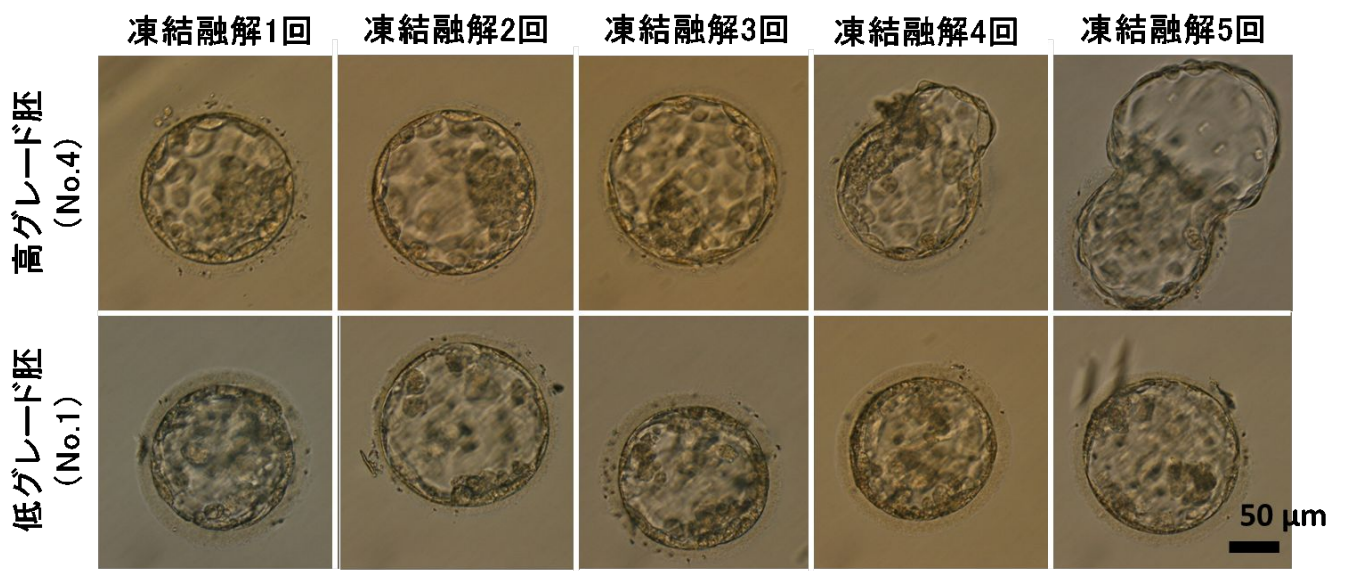
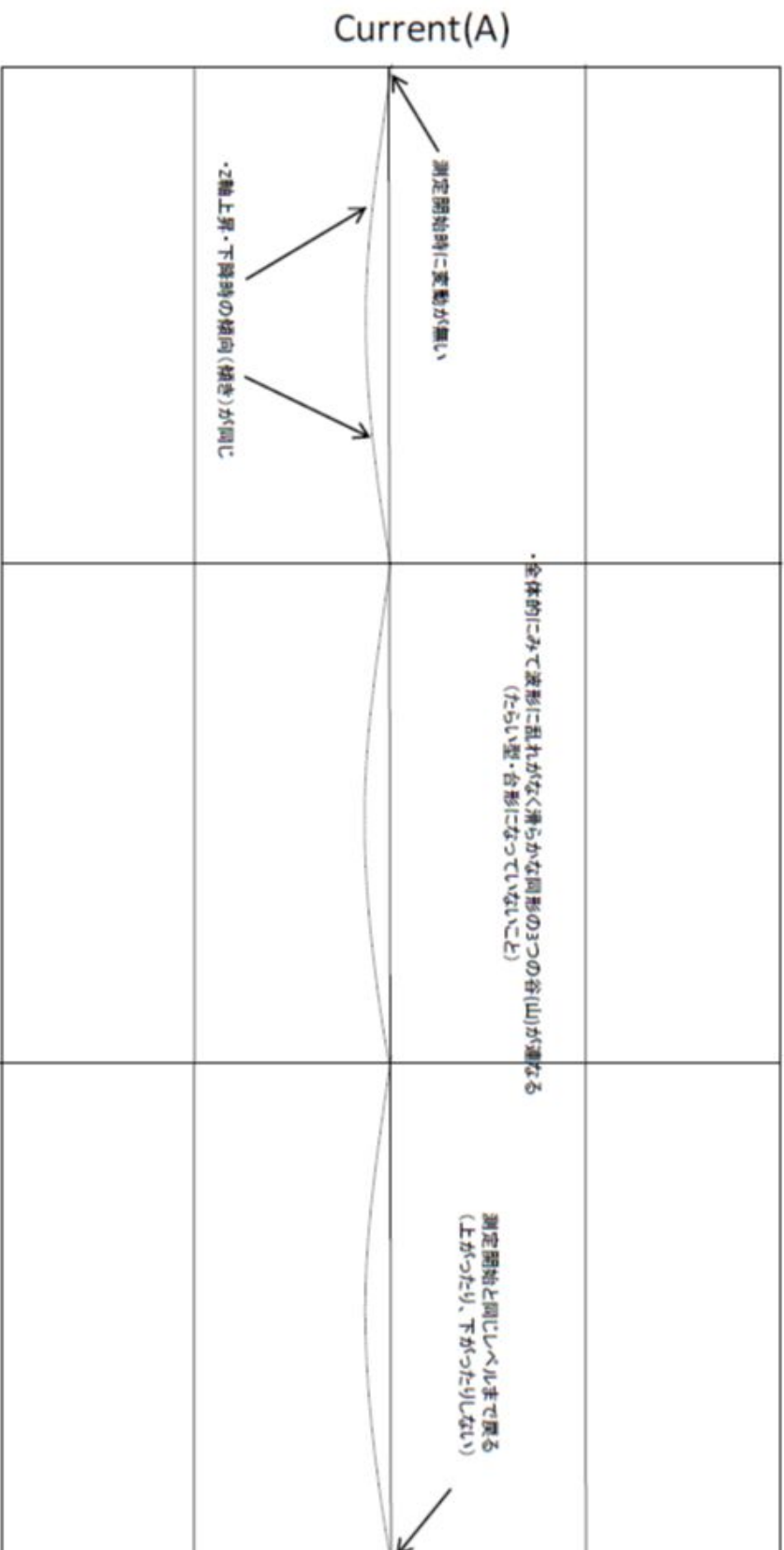


図3. 複数回凍結融解したヒト胚盤胞における形態の変化



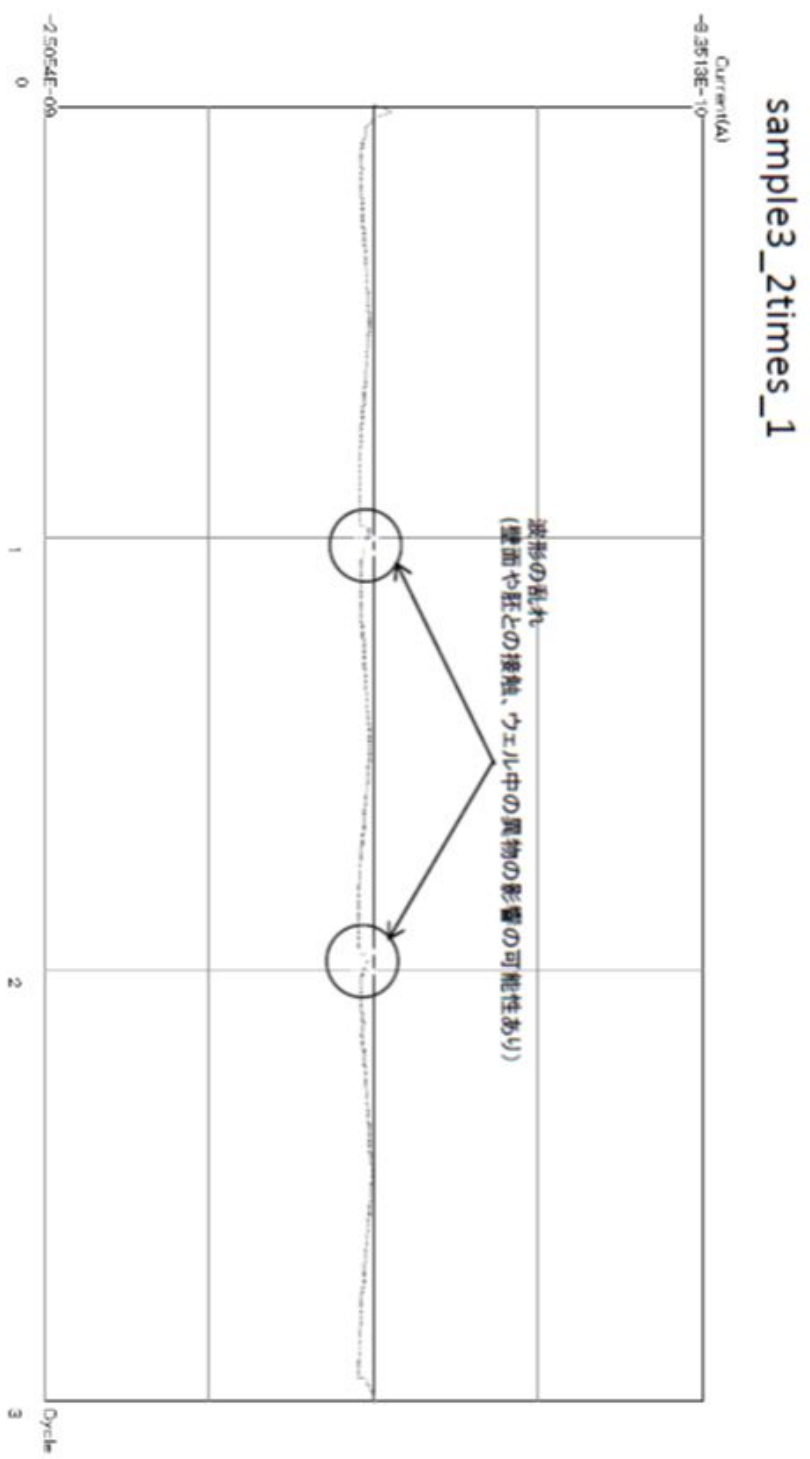
## ・呼吸活性が高い胚を測定した場合の理想的な波形

(プランク測定時・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)



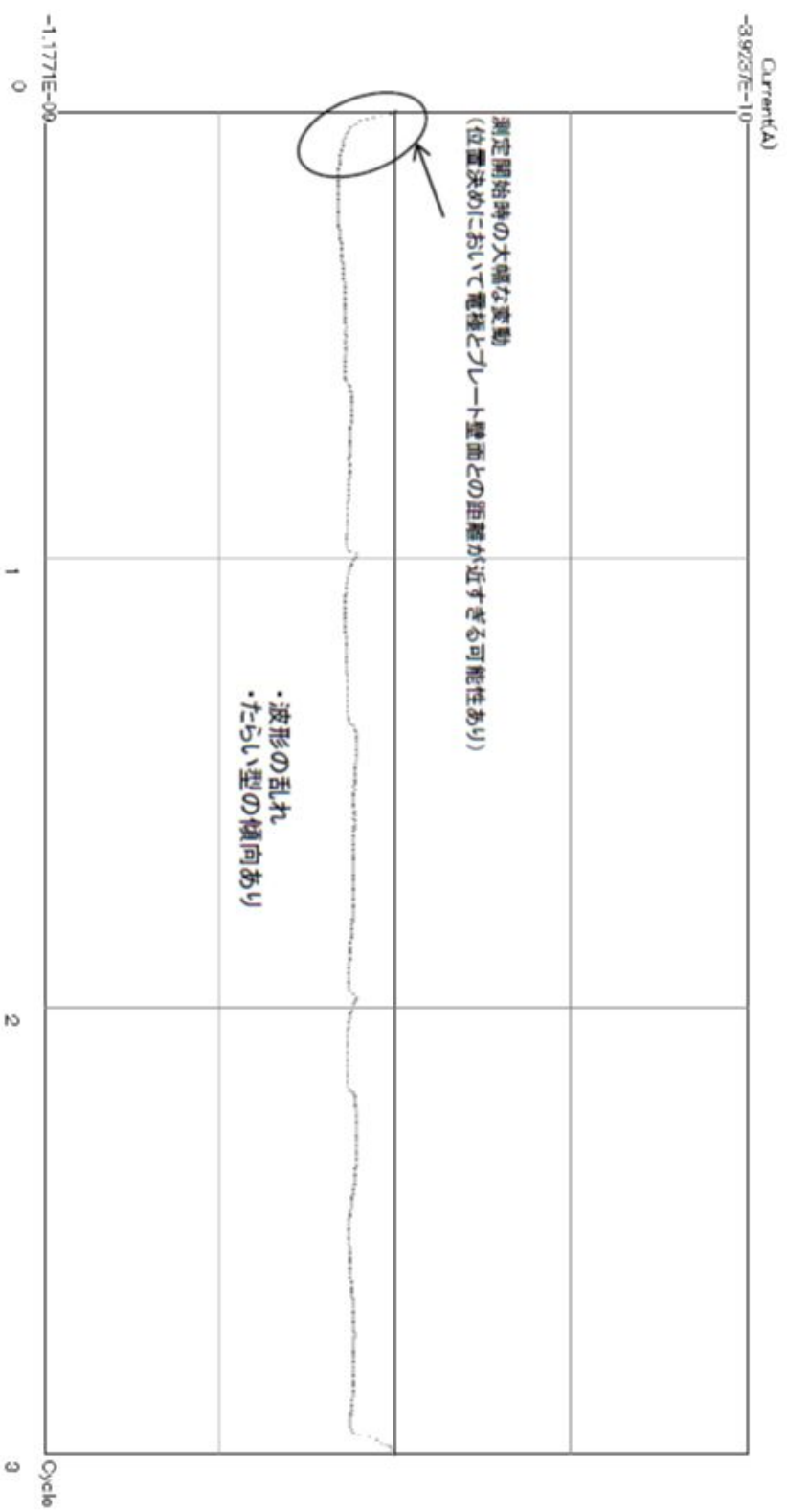
※あくまで理想形です。上記を満たさなくとも許容できるものもありますので、不明な場合はデータを御送りいただければ確認させていただきます。

・測定不良例 1



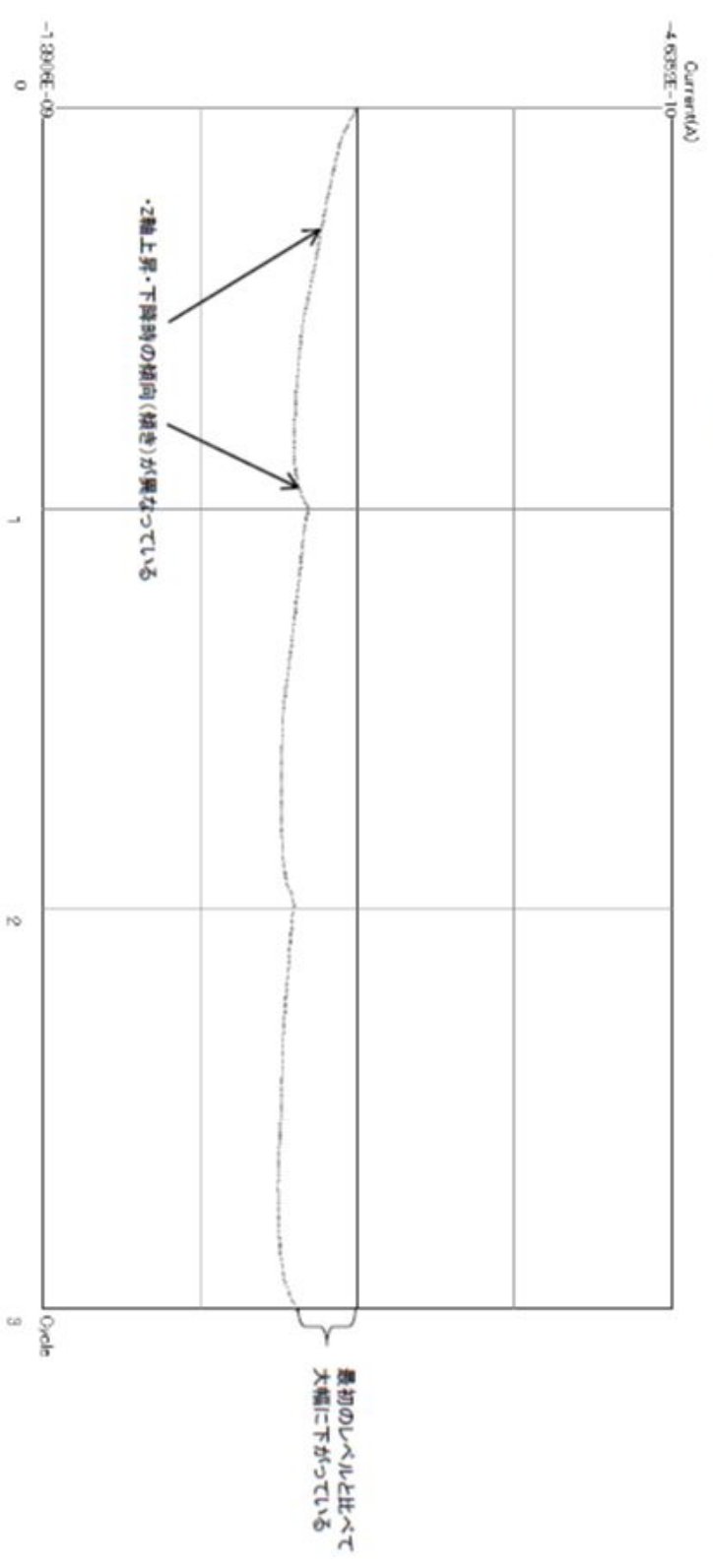
・測定不良例 2

samples\_2times\_3



・測定不良例 3

sample11\_2times\_1



平成25年9月24日

<b>作業報告書</b>	確認印	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ベータ103 Tel/Fax: 022-721-5633 E-mail: pr@clino.rog

お客様名	秋田大学産婦人科	<b>様</b>
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	

**作業報告**

## ●症状

以前4fmol/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0mol/sec以下になり、測定出来ない。また、電位が安定しない。

## ●対応

- 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)
  - 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。
- 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。
- 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、依然として想定より低い。

## 推定原因

- ・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。

## 対応策

- ・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。

- 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。

## 5.測定手技の確認

測定者である梶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。

## ●残件

- ・交換用サーモプレートの送付
- ・過去測定データの確認

以上

## 作業報告書

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	

## 作業報告

- 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多い(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
    - ・ 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。
 →そのために、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 <sup>-15</sup> mol/s)	18.375	0.26	0.625

Δ Cb:	-1.98E-09						
FileName	Fel(mea)	F(correct)	Δ Cel(mea)	Δ C(correct)	Rs	R	
blank 1	-3.31E-16 ± 1.7111E-15	1.59 ± 1.71	-3.42E-10 ± 1.7667E-09	1.64E-09 ± 1.7667E-09	10	70	
blank 2	-1.40E-15 ± 7.1744E-16	0.52 ± 0.72	-1.45E-09 ± 7.4073E-10	5.35E-10 ± 7.4073E-10	10	70	
blank 3	-2.44E-15 ± 5.0148E-16	-0.52 ± 0.50	-2.52E-09 ± 5.1776E-10	-5.35E-10 ± 5.1776E-10	10	70	
2.1	1.67E-14 ± 9.3527E-16	18.65 ± 0.94	1.73E-08 ± 9.6564E-10	1.93E-08 ± 9.6564E-10	10	70	
2.2	1.62E-14 ± 1.2731E-15	18.1 ± 1.27	1.67E-08 ± 1.3144E-09	1.87E-08 ± 1.3144E-09	10	70	
3.1	-2.29E-15 ± 9.0086E-16	-0.28 ± 0.90	-2.27E-09 ± 9.3012E-10	-2.89E-10 ± 9.3012E-10	10	70	
3.2	-1.12E-15 ± 7.9557E-16	0.8 ± 0.80	-1.16E-09 ± 8.2140E-10	8.24E-10 ± 8.2140E-10	10	70	
4.1	-1.32E-15 ± 9.1057E-16	0.6 ± 0.91	-1.36E-09 ± 9.4014E-10	6.16E-10 ± 9.4014E-10	10	70	
4.2	-1.27E-15 ± 8.3638E-16	0.65 ± 0.84	-1.31E-09 ± 8.6354E-10	6.70E-10 ± 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 <sup>-15</sup> mol/s)	17.095	0.805	0.86	20.357

Δ Cb:	-1.53E-09						
FileName	Fel(mea)	F(correct)	Δ Cel(mea)	Δ C(correct)	Rs	R	
blank 2	-1.11E-15 ± 9.1596E-16	0.38 ± 0.92	-1.14E-09 ± 9.4570E-10	3.90E-10 ± 9.4570E-10	10	70	
blank 3	-1.21E-15 ± 9.2111E-16	0.27 ± 0.92	-1.25E-09 ± 9.5102E-10	2.83E-10 ± 9.5102E-10	10	70	
2.1	1.55E-14 ± 3.5610E-16	16.99 ± 0.36	1.60E-08 ± 3.6766E-10	1.75E-08 ± 3.6766E-10	10	70	
2.2	1.57E-14 ± 6.6795E-16	17.2 ± 0.67	1.62E-08 ± 6.8964E-10	1.78E-08 ± 6.8964E-10	10	70	
3.1	-1.39E-15 ± 9.8630E-16	0.11 ± 0.99	-1.42E-09 ± 1.0183E-09	1.09E-10 ± 1.0183E-09	10	70	
3.2	1.38E-17 ± 1.1157E-15	1.5 ± 1.12	1.40E-11 ± 1.1519E-09	1.55E-09 ± 1.1519E-09	10	70	
4.1	-1.30E-15 ± 7.8369E-16	0.18 ± 0.78	-1.34E-09 ± 8.0912E-10	1.88E-10 ± 8.0912E-10	10	70	
4.2	6.63E-16 ± 1.2305E-15	2.15 ± 1.23	6.84E-10 ± 1.2704E-09	2.22E-09 ± 1.2704E-09	10	70	
4.3	-1.24E-15 ± 1.0953E-15	0.25 ± 1.10	-1.28E-09 ± 1.1309E-09	2.56E-10 ± 1.1309E-09	10	70	
5.1	1.97E-14 ± 6.3356E-16	21.21 ± 0.63	2.04E-08 ± 6.5413E-10	2.19E-08 ± 6.5413E-10	10	70	
5.2	2.15E-14 ± 3.7016E-16	22.96 ± 0.37	2.22E-08 ± 3.8218E-10	2.37E-08 ± 3.8218E-10	10	70	
5.3	1.54E-14 ± 7.9396E-16	16.9 ± 0.79	1.59E-08 ± 8.1974E-10	1.74E-08 ± 8.1974E-10	10	70	