

(資料 3)

# 第14回 胚細胞呼吸測定装置研究会

(厚生労働省医療機器開発推進研究事業 班会議)

日時：平成27年3月1日(日) 9:00～11:00

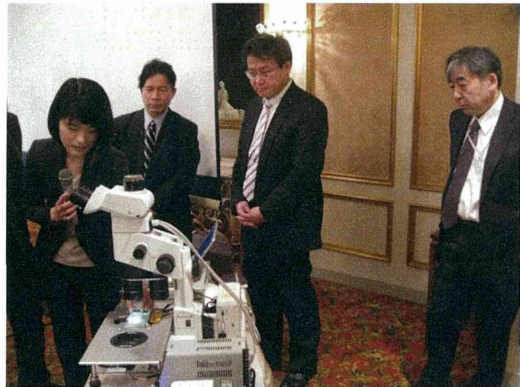
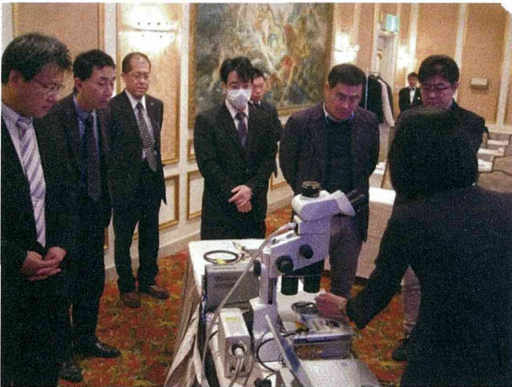
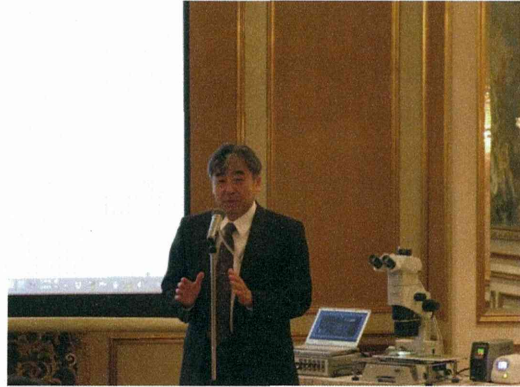
場所：江陽グランドホテル3階 羽衣の間

## 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・研究結果報告          | 東北大学               | 志賀 尚美  |        |
| 4・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       |                    |        |        |
| 5・各施設における進捗報告     | 各施設担当者             |        |        |
| 6・閉会の辞            | 山形大学               | 阿部 宏之  |        |

14回胚細胞呼吸測定装置研究会(厚生労働省医療機器開発推進研究事業 班会議)が平成27年3月1日(日)江陽グランドホテルで開催されました。パナソニックヘルスケア社より機器開発の進捗状況と機器の展示・説明があり、東北大学より51個のヒト余剰卵を用いた計4回の実験果報告と検討課題、本研究会の今後の方向性について報告がなされました。データの解析方法の工夫、胚のサイズや形状と測定値についての関連、測定値と形態学的クオリティ・生産率の相関性についての基礎的な検討の必要性など、活発なディスカッションが行われました。

3月で今回の厚労科研のしめくりとなり、研究も大詰めですが、実用化に向けさらなる機器の改良と、データの蓄積が必要と考えられます。不妊で悩むカップルの福音となるよう、また2018年仙台で開催される日本産婦人科学会学術集会での機器発表を目指して、来年度以降も東北一丸となって研究を進めていきたいと思いをします。



## II. 分担研究報告書

### 1. 凍結融解が胚盤胞の呼吸活性に与える影響と 再凍結融解胚を用いたIVF-ETの臨床結果に関する研究

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（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

凍結融解が胚盤胞の呼吸活性に与える影響と  
再凍結融解胚を用いた IVF-ET の臨床結果に関する研究

研究分担者 寺田 幸弘 秋田大学教授

研究主旨

現在の生殖補助医療においては、凍結融解胚移植の果たす役割が大きくなってきている。凍結融解胚移植では、貴重な胚を有効に活用する手段として、一度融解した胚を再凍結した再凍結融解胚移植を行うケースが存在する。当科では、平成 26 年中に 3 例の再凍結融解胚移植を行った。3 例中 2 例の胚盤胞は、再凍結融解後も形態的な回復が可能であった。一方、胚盤胞への発育速度が遅い（受精後 6 日目）胚である 1 例は、再凍結融解後における形態的な回復がみられなかった。再凍結融解胚を移植した 3 例中 1 例に胎嚢が確認され、現在妊娠継続中である。妊娠した症例は採卵時の年齢が 40 歳であり、40 代の女性の胚であっても再凍結融解後の妊娠が可能であることが明らかとなった。また、平成 24 年度の報告時点において妊娠継続中であった症例について追跡調査を行った。妊娠 37 週で帝王切開により 3,200g の男児を出産した。母児ともに健康であり、出生児に異常はみられなかった。

ヒト余剰胚を用いた呼吸測定については、引き続きヒト余剰胚の蓄積、管理を進めた。さらに、新規受精卵呼吸測定装置を用いた臨床研究を倫理委員会に申請し、研究実施体制を整えた。今後本体制に基づき研究を推進することで、新規受精卵呼吸測定装置の有用性および安全性に関するデータが得られることが期待される。

## 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)  
佐藤亘(秋田大学産婦人科助教)  
金森恭子(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)  
佐藤恵美子(秋田大学産婦人科胚培養士)  
梶嶋克哉(秋田大学産婦人科胚培養士)

## A・研究目的

現在の生殖補助医療では、凍結融解胚移植の果たす役割が大きくなってきている。日本産科婦人科学会のART登録データによると、2007年以降の新鮮胚移植による出生児数は約一万人と横ばい傾向にあるのに対し、凍結融解胚移植による出生児数は2007年の9,257人から2012年の27,715人へと3倍近く増加している。凍結融解胚移植では、複数の胚を融解した場合や不測の事態により移植がキャンセルとなった場合に、胚を再凍結するケースが存在する。さらに、日本産科婦人科学会の主導による着床前受精卵遺伝子スクリーニング(PGS)の臨床研究の結果、将来的にPGSの実施が認められると、凍結胚をPGS後に再凍結する必要性が生じる事態も予測される。

生殖補助医療により出生した児については予後の調査が求められる。現在、日本産科婦人科学会のART登録データを用いて大規模な調査が行われているが、胚の再凍結の有無等の詳細な項目については追跡が不可能である。本研究では、再凍結融解胚移植を行うとともに、本法により出生した児の予後を調査した。また、新型受精卵呼吸測定装置の非侵襲的な測定手法は、同一胚における再凍結の影響を検討する手段としても有用であり、余剰胚を用いた本装置の臨床研究を学内倫理委員会に申請した。

## B・研究方法

### 1) 再凍結融解胚の臨床結果

平成26年1月より平成26年12月までに当科で再凍結融解胚を移植した3例を対象とした。凍結融解胚移植の際使用しなかった胚盤胞を再凍結し、次の移植可能周期に再融解した。融解後、超音波ガイド下に胚移植を実施した。なお、妊娠の診断は、超音波診断により子宮内に胎嚢が確認できた症例とした。出生児の調査は、日本産科婦人科学会のART登録データにおける当科の登録データを用いた。

### 2) 胚呼吸測定

東北大学倫理委員会で承認が得られた臨床研究(ヒト余剰胚を用いた受精卵呼吸量測定)のプロトコールをもとに倫理審査書類を作成し、秋田大学倫理委員会に申請を行った。

## C・研究結果

平成26年には3例の再凍結融解胚移植を行った。3例中2例の胚盤胞は、再凍結融解後も形態的な回復が可能であった。一方、胚盤胞への発育速度が遅い(受精後6日目)胚である1例は、再凍結融解後の形態的な回復がみられなかった。再凍結融解胚を移植した3例中1例に胎嚢が確認され、現在妊娠継続中である(表1)。妊娠した症例は採卵時の年齢が40歳であり、40代の女性の胚であっても再凍結融解後の妊娠が可能であることが明らかとなった。また、平成24年度の報告時点において妊娠継続中であった症例について追跡調査を行った。妊娠37週で帝王切開により3200gの男児を出産した。母児ともに健康であり、出生児に異常はみられなかった。

ヒト余剰胚を用いた呼吸測定については、引き続きヒト余剰胚の蓄積、管理を進めた。さらに、新規受精卵呼吸測定装置を用いた臨床研究を倫理委員会に申請し、研究実施体制を整えた。

## D・考察

30代後半以降の生殖学的に高齢な女性では卵の質的低下により妊娠率の低下が認められるが、本研究では40歳の女性の胚においても再凍結融解後の妊娠が可能であった。このことは、クライオトップ法に代表される現在のガラス化凍結法が胚にとって極めてダメージの少ない手法であることを示唆している。一方、胚盤胞への発育速度が遅い(受精後6日目)胚は、再凍結融解の影響が大きい可能性が示唆された。本結果は、研究分担者らが平成25年度において報告した結果と一致する。胚盤胞の評価に用いられるGardner分類では、胞胚腔の大きさと内部細胞塊および栄養外胚葉の細胞数によって評価されるため、発育速度は加味されない。したがって、Gardner分類に加えて新型受精卵呼吸測定装置による呼吸活性を組み入れた評価手法を確立することで、ヒト胚盤胞の評価法の精度の向上につながり、妊娠率の上昇および流産率の低下につながることが期待される。

## E・結論

本年度整備した体制に基づき研究を推進することで、新規受精卵測定装置の有用性および安全性に関するデータが得られ、生殖補助医療の質的向上に資することが期待される。

## G・研究発表

1. 論文発表  
Peer review誌に投稿中
2. 学会発表  
特記事項なし

## H・知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特記事項なし
2. 実用新案登録  
特記事項なし
3. その他  
特記事項なし

表 1

No	凍結胚 grade	融解時 grade	再凍結時 grade	再融解時 grade	転帰
1	3AB	3AB	3AB	3AB	×
2	4BB	4BB	4BB	戻らず	×
3	4AA	4AA	4AA	4AB	○



## 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（医療機器開発推進研究事業）  
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 山形大学理工学部教授

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が、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不可欠である。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有効性と安全性の検証を行った。その結果、ウシ胚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（山形大学大学院理工学研究科 准教授）

### 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、ウシ胚を実験材料として、胚のミトコンドリア呼吸機能の多項目解析を実施した。

### 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評価法を開発するには、「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、ウシ胚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」の有用性と安全性の検証を目的とした。具体的には、ウシ初期胚において遺伝子発現から細

胞呼吸までの各階層におけるミトコンドリア呼吸機能の解析を行った。遺伝子レベルでは、電子伝達系の終末酵素複合体である呼吸鎖複合体 VI (シトクロム c オキシダーゼ: COX) 遺伝子の発現を解析した。細胞小器官レベルでは、ミトコンドリアの膜電位と細胞内局在を解析し、細胞レベルでは胚の酸素消費量と ATP 含量を解析することで「受精卵呼吸測定装置」の有用性を検証した。

#### (2) 材料

ウシ卵巣から卵丘細胞- 卵子複合体 (COC) を採取し、IVMD101 培地 (機能性ペプチド研究所: IFP) で 22 時間成熟培養を行った後、IVF100 (IFP) 培地中で媒精した。受精卵は、IVD101 培地 (IFP) を用いて、5% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> / 90% N<sub>2</sub>、38.5°C の低酸素条件下で培養し、1 細胞期から胚盤胞期までの各発生ステージの胚を実験に用いた。

#### (3) 呼吸活性測定

ウシ胚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、-0.6V vs Ag/AgCl<sub>2</sub> の電位を印加した微小白金電極 (先端直径: 2-3 μm) で、胚近傍を鉛直方向に 3 回走査 (31.0 μm/sec, 160 μm) 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) ミトコンドリアの膜電位の解析

ミトコンドリアでは、内膜に存在する電子伝達系の呼吸鎖複合体によって外膜と内膜の間にプロトン勾配がつけられ、それによって生じる膜電位を利用して ATP 合成酵素が ATP を産生している。従って、ミトコンドリア機能の評価には膜電位の解析が有効な方法となる。本研究では、ウシ胚のミトコンドリア膜電位の解析に JC-10 を用い

た。JC-10 は、ミトコンドリアが分極している際に、単量体の形でミトコンドリアマトリックス内に入り込む脂溶性のカチオン染料である。JC-10 はミトコンドリア内に選択的に取り込まれ、膜電位の上昇に伴い緑から赤へ色調が可逆的に変化する。各発生ステージの胚を JC-10 で染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。胚赤道面から上端部までの Merge 画像にて緑と赤それぞれの蛍光強度を計測し、赤色/緑色の比から相対膜電位を算出した。

#### (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 を構成するシトクローム c オキシダーゼ (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、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、COX6a、COX6b、COX6c、COX7a、COX7b、COX7c、COX8 の 10 サブユニットの遺伝子の発現をそれぞれ調べた。

#### (6) 胚の ATP 含量の解析

単一胚に含まれる ATP 量を測定し、ミトコンドリアの呼吸機能と ATP 産生能との関係を調べた。BacTiter-Glo microbial Cell Viability Assay kit 及び GloMax 20/20n Luminometer を用いたホタルルシフェラーゼ反応による方法で、各発生ステージの胚の ATP 含量を測定した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は、山形大学動物実験審査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ー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

ウシ胚の発生過程における酸素消費量の変化を調べた結果、8 細胞期までは呼吸量は低かったが、桑実胚期から呼吸量が増加し始め、胚盤胞では急激な呼吸量の増加が認められた。

### (b) ミトコンドリア膜電位の解析

JC-10 により各発生ステージのウシ胚を染色した結果、2 細胞期胚では高い膜電位活性のシグナルである赤色蛍光シグナルはほとんど観察されなかった。8 細胞期胚では、赤色蛍光が強い割球と、主に低膜電位の緑色を呈する割球が観察された。桑実胚では、細胞内に緑色及び赤色の強い蛍光シグナルが観察され、その多くは胚全体に分布していた。多くの胚盤胞及び脱出胚盤胞において、ミトコンドリアの局在を示す蛍光シグナルは発生が進むにつれて強度を増し、胚を構成する細胞のほとんどに蛍光シグナルが認められた。桑実胚及び胚盤胞では、JC-10 によって染色されるミトコンドリアは、核周辺部に集中して存在していた。

JC-10 染色による赤色と緑色の蛍光強度を数値化し、赤色/緑色の蛍光強度の比からミトコンドリアの相対膜電位を算出した。その結果、8 細胞期まではミトコンドリア相対膜電位は変化しなかったが、桑実胚期以降に顕著な相対膜電位の上昇が観察された。JC-10 染色における相対膜電位は桑実胚、胚盤胞及び脱出胚盤胞において相対膜電位は高かった。これらの結果から、酸素消費量が大きい胚においてミトコンドリアの膜電位は高い活性を有することがわかった。

### (c) シトクローム c オキシダーゼ (Cox) 遺伝子の発現解析

ウシ胚において、ミトコンドリアゲノム由来であり COX の酵素活性部位を構成する COX1、COX2 及び COX3 の mRNA は、1 細胞から胚盤胞の全ての発生ステージにおいて検出された。一方、核ゲノム由来の COX サブユニットの mRNA は、ミトコンドリアゲノム由来の COX サブユニット mRNA と比べて発生過程で顕著な発現量の変化を示した。1 細胞期及び 2 細胞期では 10 種類全てのサブユニットの mRNA が検出されたが、4 細胞期から 8 細胞期

にかけて多くのサブユニットの mRNA 量は減少した。桑実胚から胚盤胞のステージでは、核ゲノム由来の全てのサブユニットにおいて mRNA の発現量は顕著に増加した。以上の結果から、核ゲノム由来の Cox mRNA は、サブユニットによって若干異なる発現パターンを示しているが、桑実胚から発現量が増えることが明らかになった。また、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わかった。

#### (d) 胚の ATP 含量の解析

ウシ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、胚の ATP 含量は呼吸量の変化と完全な一致は認められなかったが、呼吸活性が最も高い脱出胚盤胞において、他のステージと比較して有意に高い ATP 含量が検出された。

#### 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的リン酸化（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。これまでに、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てきた。

今年度は、ウシ胚におけるミトコンドリア呼吸機能の多項目解析を行った。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「受精卵呼吸測定装置」の有効性検証のアプローチである。

本研究では、「受精卵呼吸測定装置」の高精度な測定性能を検証し、呼吸測定の有用性を科学的に裏付けることができた。さらに、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。

#### E・結論

本年度整備した体制に基づき研究を推進することで、新規受精卵測定装置の有効性および安全性に関するデータが得られ、生殖補助医療の質的向上に資することが期待される。

#### G・研究発表

##### 1. 論文発表

Peer review誌に投稿中

##### 2. 学会発表

特記事項なし

#### H・知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特記事項なし

##### 2. 実用新案登録

特記事項なし

##### 3. その他

特記事項なし

## II. 分担研究報告書

### 3. 卵の質を規定するミトコンドリア機能の評価 ：排卵後加齢卵モデルを用いた解析

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（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

卵の質を規定するミトコンドリア機能の評価  
：排卵後加齢卵モデルを用いた解析

研究分担者 高橋 俊文 山形大学医学部講師

研究主旨

生殖補助医療（ART）の進歩にかかわらず、35 歳以上の高齢不妊女性の治療成績は依然低率である。日本国内での ART 治療周期に占める 35 歳以上の患者の割合は、約 80% と高率である（2011 年 ART 登録、日本産科婦人科学会）。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、若年者のドナー卵を用いた ART の治療成績は母体年齢に依らないことから、この患者年齢の高齢化（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の要因として、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。我々はこれまで、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、酸化ストレスによるミトコンドリア機能の低下と ATP 産生低下により小胞体機能が低下することを報告した。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とミトコンドリア DNA 転写機構に関与する Mitochondrial transcriptional factor A の発現の変化からも検討を行った。

## 研究協力者

研究協力者

五十嵐 秀樹 (山形大学医学助手)

### A・研究目的

加齢による卵の質の低下の重要な要因である、ミトコンドリア機能低下について、排卵後の加齢卵を用いて検討した。これまでマウス加齢卵を用いたミトコンドリア機能異常について、小胞体機能との関連を主に研究してきたが、今回は、ミトコンドリア機能の評価を酸素消費量およびミトコンドリア DNA の転写に関与する転写因子である、Mitochondrial transcriptional factor A (TFAM) の発現を指標に検討を行った。

### B・研究方法

マウス卵の準備: 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 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。新鮮卵および加齢卵における TFAM の発現は各々 50 個の卵を用い western blot (WB) 法にて検出した。

### 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平均  $3.3 \pm 0.05 \times 10^{15}/\text{mols}^{-1}$ 、hCG 投与後、20 から 24 時間で測定に供した加齢卵では平均  $2.0 \pm 0.08 \times 10^{15}/\text{mols}^{-1}$ 、であった。平均酸素消費量は新鮮卵と比べ加齢卵で有意に低下した ( $p < 0.05$ ) (図 1)。TFAM の発現は WB 法を用いて解析した結果、新鮮卵と加齢卵において発現量に差がなかった (図 2)。

### 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ある。これまで筆者らはミトコンドリア膜電位によってもミトコンドリア機能の評価してきた。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の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加齢による変化の解析にも有用であると考えられた。ミトコンドリア DNA のコピー数や mutation は胚発育と相関するとの報告もあり、ミトコンドリア DNA 転写因子に関与する TFAM の発現を新鮮卵と加齢卵で返答したが、蛋白レベルでの差は認めなかった。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の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加齢による変化の解析にも有用であると



考えられた。ミトコンドリア DNA のコピー数や mutation は胚発育と相関するとの報告もあり、ミトコンドリア DNA 転写因子に關与する TFAM の発現を新鮮卵と加齢卵で返答したが、蛋白レベルでの差は認めなかった。

#### 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、卵の加齢、卵の質の低下と關連する可能性が示唆された。

#### F・健康危険情報

特記事項なし

#### G・研究発表

##### 1. 論文発表

特記事項なし

##### 2. 学会発表

(1) 高橋俊文. 卵の老化と不妊治療. 福島県産婦人科医会県中地区勉強会、福島 2014. 9. 18

(2) 五十嵐秀樹. カルシウムオシレーションの役割と有効な卵子活性化法. 第6回生殖補助医療胚培養士セミナー、東京 2014. 10. 5

(3) 黒澤大樹<sup>1</sup>、宇都宮裕貴<sup>1</sup>、志賀尚美<sup>1</sup>、寺田幸弘<sup>5</sup>、高橋俊文<sup>4</sup>、福井淳史<sup>3</sup>、菅沼亮太<sup>2</sup>、八重樫伸生<sup>1</sup>: 1 東北大学医学部産科学婦人科学教室 2 福島県立医科大学産科婦人科学講座 3 弘前大学医学部産科婦人科学教室 4 山形大学産科婦人科学講座 5 山形大学山形大学大学院理工学研究科 6 秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 機能展開医学系 産婦人科学講座:

(3) 黒澤大樹<sup>1</sup>、宇都宮裕貴<sup>1</sup>、志賀尚美<sup>1</sup>、寺田幸弘<sup>5</sup>、高橋俊文<sup>4</sup>、福井淳史<sup>3</sup>、菅沼亮太<sup>2</sup>、八重樫伸生<sup>1</sup>: 1 東北大学医学部産科学婦人科学教室 2 福島県立医科大学産科婦人科学講座 3 弘前大学医学部産科婦人科学教室 4 山形大学産科婦人科学講座 5 山形大学山形大学大学院理工学研究科 6 秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 機能展開医学系 産婦人科学講座: 測定の自動化を可能としたチップ型受精卵呼吸測定装置の有用性について 第62回北日本産科婦人科学会、金沢 2014. 9. 27-28

(4) 黒澤大樹<sup>1</sup>、宇都宮裕貴<sup>1</sup>、高橋藍子<sup>1</sup>、渡邊善<sup>1</sup>、志賀尚美<sup>1</sup>、熊谷仁<sup>2</sup>、寺田幸弘<sup>2</sup>、五十嵐秀樹<sup>3</sup>、高橋俊文<sup>3</sup>、阿部宏之<sup>4</sup>、福井淳史<sup>5</sup>、菅沼亮太<sup>6</sup>、八重樫伸生<sup>1</sup>: 1 東北大学医学部産婦人科学、2 秋田大学院医学部産婦人科、3 山形大学医学部産婦人科、4 山形大学大学院理工学研究科、5 弘前大学医学部産婦人科、6 福島県立医科大学産婦人科: チップ型受精卵呼吸測定装置によるヒト余剰卵の呼吸活性の検討 第52回東北生殖医学会、秋田 2014. 11. 15

(5) 志賀尚美<sup>1</sup>、宇都宮裕貴<sup>1</sup>、高橋藍子<sup>1</sup>、石橋ますみ<sup>1</sup>、黒澤大樹<sup>1</sup>、渡邊善<sup>1</sup>、菅沼亮太<sup>2</sup>、福井淳史<sup>3</sup>、高橋俊文<sup>4</sup>、阿部宏之<sup>5</sup>、寺田幸弘<sup>6</sup>、八重樫伸生<sup>1</sup>: 1 東北大学医学部産科学婦人科学教室 2 福島県立医科大学産科婦人科学講座 3 弘前大学医学部産科婦人科学教室 4 山形大学産科婦人科学講座 5 山形大学山形大学大学院理工学研究科 6 秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 機能展開医学系 産婦人科学講座: 新規チップ型受精卵呼吸測定装置を用いた受精卵の客観的評価法の検討 第59回生殖医学会、東京 2014. 12. 4-5

#### H・知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特記事項なし

##### 2. 実用新案登録

特記事項なし

##### 3. その他

特記事項なし

## 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（医療機器開発推進研究事業）  
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。

体外受精・胚移植を施行し、その後の胚を凍結したものの中には、出産するなどにより治療の目的を達成し、現在通院を行っていないものが存在する。そこで今回、体外受精・胚移植を施行し、その後に胚を凍結しているもののうち、今後体外受精・胚移植治療に使用する可能性のない胚を胚呼吸量測定の研究に用いるために、胚の今後の凍結保存継続の意志確認を行った。胚凍結者には、郵送にて胚凍結継続確認の文書を送付し、胚凍結継続希望者には来院して頂き、文書にて胚凍結継続の確認を行った。

郵送を行った442名のうち、返答が得られたのは242名で有り、うち144名は胚の廃棄を希望し、98名は胚凍結の継続を希望した。残りの200名からは返答が得られていない。今後、胚の廃棄を希望した144名に対し再度、説明と同意を得ることにより、破棄胚を胚呼吸量測定に今日することが可能であると思われた。

## 研究協力者

船水文乃（弘前大学産科婦人科助教）  
淵之上康平（弘前大学産科婦人科助手）  
中村理果（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。

体外受精・胚移植を施行し、その後の胚を凍結したものの中には、出産するなどにより治療の目的を達成し、現在通院を行っていないものが存在する。日本産科婦人科学会のヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する見解（平成25年6月22日）によれば、ヒト受精卵は、提供者への文書を用いた十分な説明を行った後に、文書による承諾をえることにより、はじめて研究に使用することが出来るとされて

いる。そこで、今回、体外受精・胚移植を施行し、その後に胚を凍結しているもののうち、今後、体外受精・胚移植治療に使用する可能性のない胚を将来、胚呼吸量測定の研究に用いることを目的に、胚を現在凍結保存しているものに対し、胚の今後の凍結保存継続の意志確認を行い、どの程度研究に使用しうる胚があるかを検討した。

### B・研究方法

弘前大学医学部附属病院産科婦人科外来において平成8年～平成25年までの間に体外受精・胚移植を施行し、その後に胚を凍結保存した442名を対象とし、胚の凍結継続の意志確認を行った。

意志確認は、次の方法で行った。

患者に凍結胚の保存更新に関する文書を郵送し、文書には以下のことを明記した。

- ① 胚の凍結継続を希望する場合は弘前大学医学部附属病院産科婦人科外来を受診したうえで所定の書類を提出していただくこと
- ② 胚の凍結継続を希望しない場合は胚廃棄の同意書を返信していただくこと
- ③ 廃棄となった胚は研究に用いることがあること

### C・研究結果

胚凍結継続意志確認の文書を送付した442名のうち242名（54.8%）から返答が得られた。うち98名（22.1%）は胚凍結の継続を希望し、来院の上凍結継続の書類を取り交わした。144名（32.5%）は胚の廃棄を希望した。廃棄を希望した胚（527個）の内訳は次の通りである。未受精卵34個（6.5%）、2前核期胚141個（26.7%）、分割期胚202個（38.3%）、桑実胚87個（16.5%）、胚盤胞63個（12.0%）。