

ARTにおける新技術

## 酸素消費と胚評価

阿部 宏之

- 細胞呼吸：細胞が外部から取り入れた酸素や酸素以外の酸化剤を用いて、養分を分解してエネルギーを発生させる生物現象。
- 電気化学計測：化学物質の性質を電氣的に計測する方法。局所領域における生体反応を高感度・リアルタイムに計測できる。
- 走査型電気化学顕微鏡：マイクロ電極をプローブとして、目的試料の上部や近傍を走査し、プローブ電流を検出する装置。

### はじめに

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きわめて重要である。現在、胚の品質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が、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、細胞呼吸活性を指標とする新しい胚評価システムの開発に取り組んできた。

本稿では、電気化学計測技術を基盤とする酸素消費測定装置と、この装置を応用した新しい胚評価法を解説する。

### 形態観察および代謝物質測定による胚評価

形態的評価は、簡単・迅速で無侵襲的な方法であることから、最も有効な胚の品質評

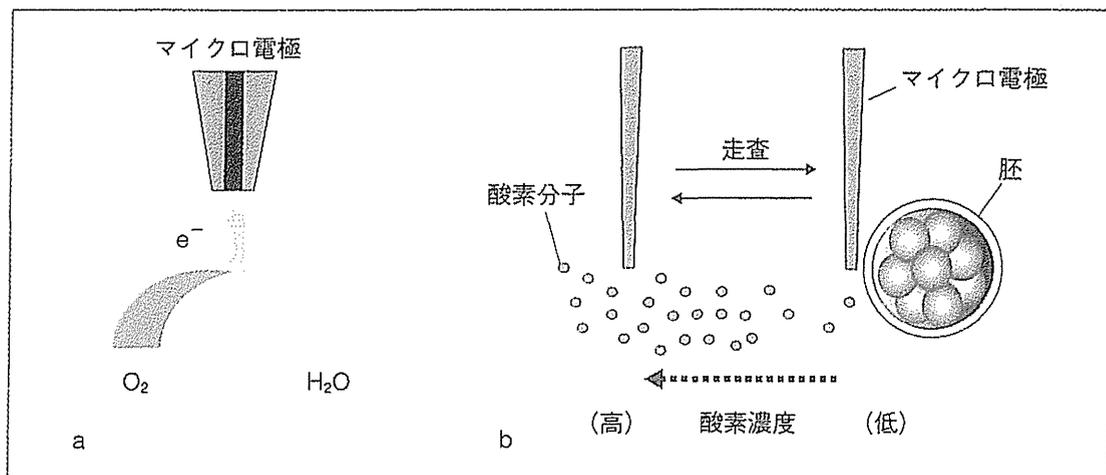


図1 マイクロ電極を用いた受精卵呼吸測定法

a: マイクロ電極は酸素の還元電位を検出する。

b: 走査型電気化学顕微鏡による呼吸測定。呼吸により胚近傍の溶存酸素が減少するため、沖合との間に溶存酸素の濃度勾配が生じる。その酸素濃度差（電流値の差）から胚の酸素消費量を算出する。

価法として広く普及している。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 の分類法<sup>1)</sup>や、Gardner らが提案した胚盤胞の評価法<sup>2)</sup>が広く用いられている。これら形態観察による胚評価は、簡便で非侵襲的な方法であり、その有効性も認められているが、評価の指標となる形態的特徴が定量性に欠けるといふ課題も指摘されている。

このため、客観的・定量的な指標として、胚の代謝産物や酸素消費に着目した胚評価が試みられている<sup>3~7)</sup>。特に、ミトコンドリアは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として注目されている。これまでに、蛍光発色法<sup>8,9)</sup>や酸素センサー<sup>10,11)</sup>を用いた細胞呼吸測定法が考案され、胚評価への応用が試みられているが、多くは測定感度や侵襲性などの面で課題があり、実用化には至っていない。

## 電気化学計測を応用した細胞呼吸測定装置の開発

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<sup>12)</sup>、この技術の有効な装置としてマイクロ電極をプローブ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の空間分解能はプローブ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<sup>13,14)</sup>。SECMは、酸素の還元電位を検出できるマイクロ電極をプローブとして用いることで、細胞の酸素消費量（呼吸）を高感度・非侵襲的に測定することができる（図1）。

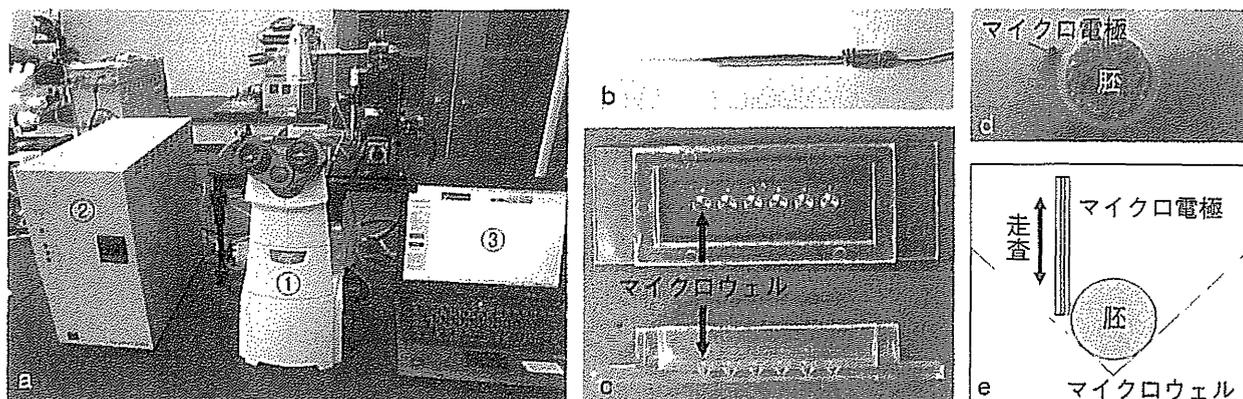


図2 走査型電気化学顕微鏡をベースに開発した「受精卵呼吸測定装置」

- 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 $\mu\text{m}$ 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細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<sup>15)</sup>。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20～30 $\mu\text{m/s}$ 、走査距離150～300 $\mu\text{m}$ 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<sup>16,17)</sup>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

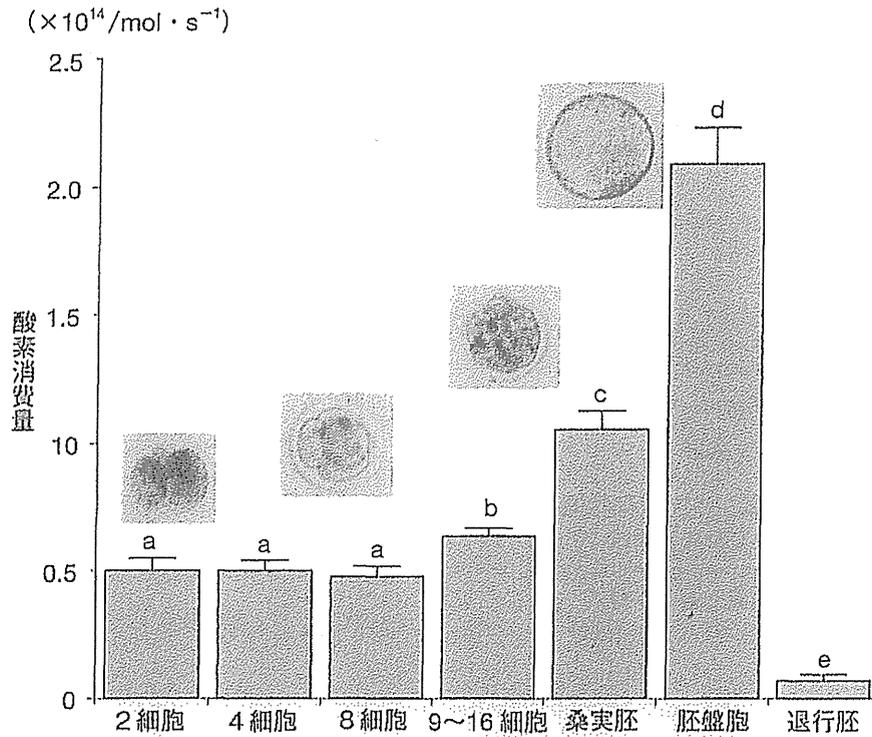


図3 ウシ体外受精胚の発生過程における呼吸量変化  
 桑実胚期から胚盤胞期にかけて呼吸量が増加する。退行胚ではほとんど酸素消費は検出されない。a~eの異符号間で有意差 ( $P < 0.05$ ) がある。

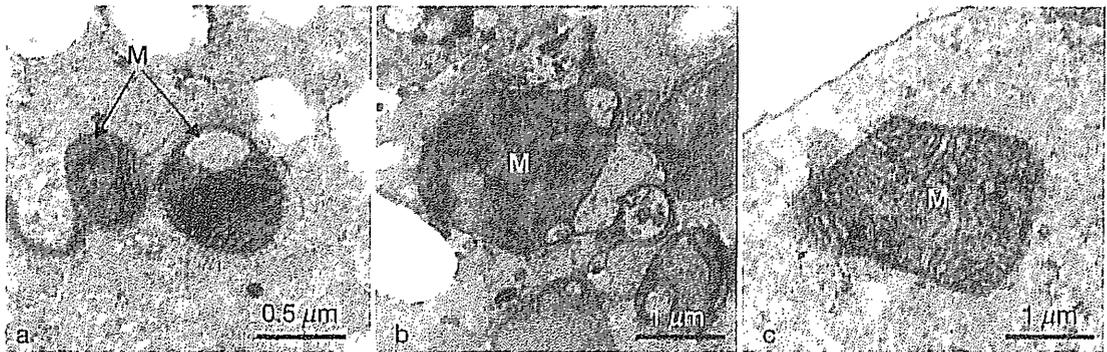


図4 ウシ体外受精胚の発生過程におけるミトコンドリアの微細形態変化  
 a: 8細胞期胚, b: 桑実胚, c: 胚盤胞. M: ミトコンドリア

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)<sup>18)</sup>. 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 ウシ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<sup>18)</sup>。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<sup>19)</sup>。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)<sup>20)</sup>。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	$0.51 \pm 0.05$
桑実胚	5	$0.61 \pm 0.11$
初期胚盤胞	13	$0.72 \pm 0.06$
胚盤胞～孵化胚盤胞	5	$1.05 \pm 0.02$

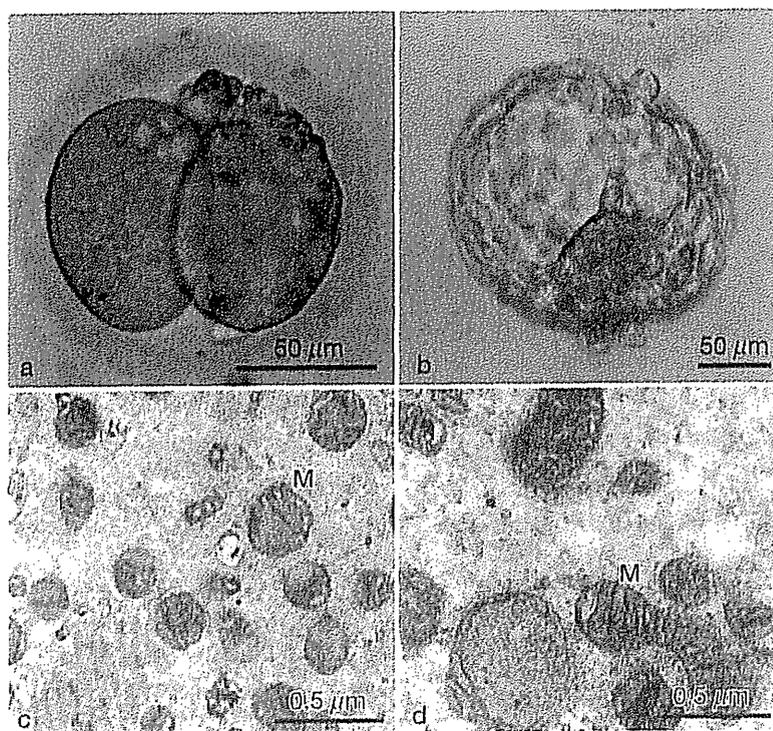


図5 ヒト体外受精胚の電顕像

- 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、 $0.26 \times 10^{14}$

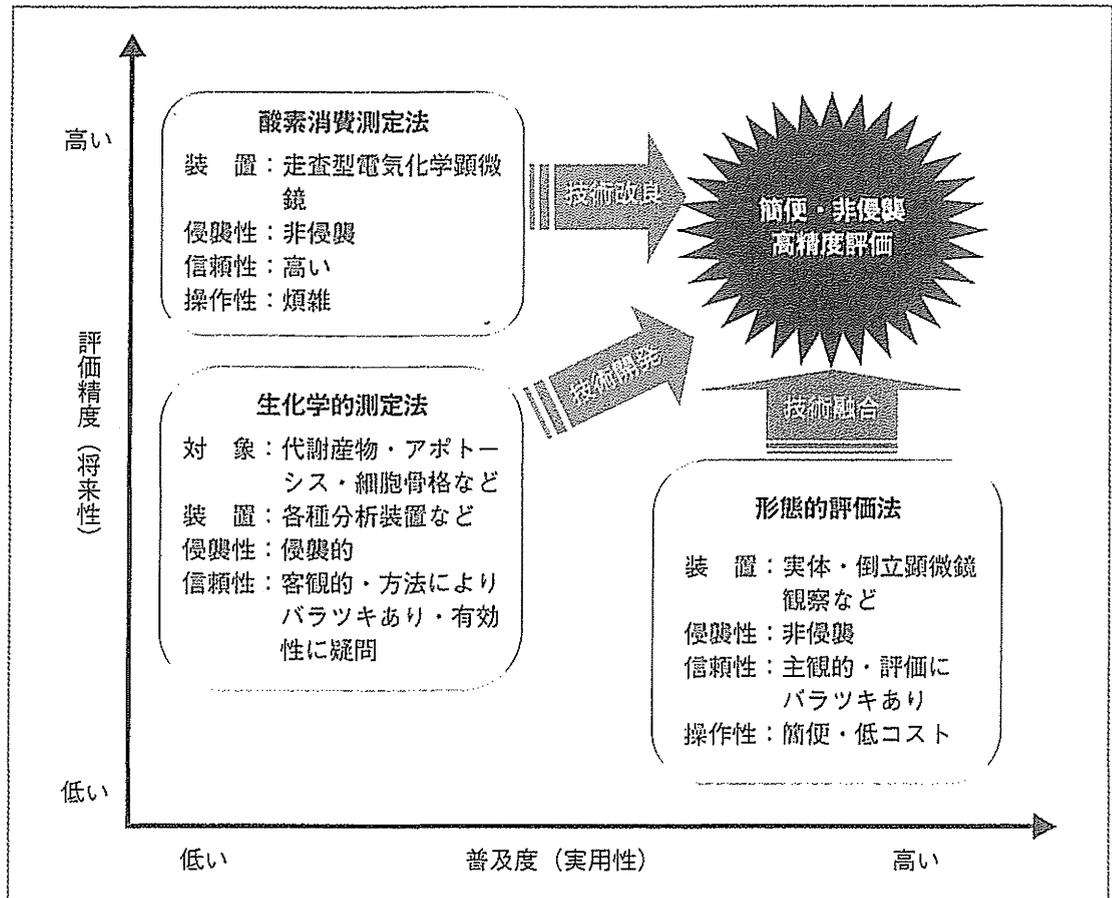


図6 胚評価の現状と将来像を示した模式図

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。

$/\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$  未満または  $0.56 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$  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<sup>21, 22)</sup>。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 恵, 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



受精卵呼吸測定装置を用いた臨床試験に橋渡しするための  
安全性および有用性に関する研究  
(臨床試験登録番号：UMIN000012692)  
改訂版

研究代表者

宇都宮裕貴

東北大学婦人科分野

〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 2-1

TEL : 022-717-7254 FAX : 022-717-7258

E-mail [uskichi@med.tohoku.ac.jp](mailto:uskichi@med.tohoku.ac.jp)

研究事務局

志賀尚美

東北大学婦人科分野

〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 2-1

TEL : 022-717-7254 FAX : 022-717-7258

E-mail [naomit@theia.ocn.ne.jp](mailto:naomit@theia.ocn.ne.jp)

2014年 3月 3日 作成

2014年 12月 11日 修正

## 概要

近年、生殖医療の需要は著しく増加しているが、多胎妊娠による母体合併症や低出生体重児の増加が大きな社会問題となり、現在は単一受精卵移植が原則となった。さらに、2013年8月に不妊治療助成に年齢および回数制限が追加されることが決定し、今後は着床能の高い優良な受精卵を選別し妊娠率を向上させることが一層重要になった。従来、受精卵の形態のみで品質評価を行ってきたが、主観性が強く観察者間での結果に差が生じる可能性が高い。我々はこれまでに受精卵の呼吸機能と卵品質が関連することに着目し、その有用性・安全性を報告してきた。この手法は非常に高感度である上に侵襲もない画期的な装置であると考えている。しかしながら、現行機器を用いた正確な呼吸量測定には手技習得に多大な時間を要するため、標準診療に取り入れるにはハードルが高く、普及の妨げになっている。そこで、現行機器の操作性および測定精度の向上を目的にパナソニック・ヘルスケア社と共同で新しいデバイスを開発した。今後、開発機器によるヒト余剰卵（廃棄卵）50例を用いた臨床研究を行い、その有用性および安全性を検討し、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となるか検討する（下図）。登録は1年間を予定している。相談窓口は以下に示す。

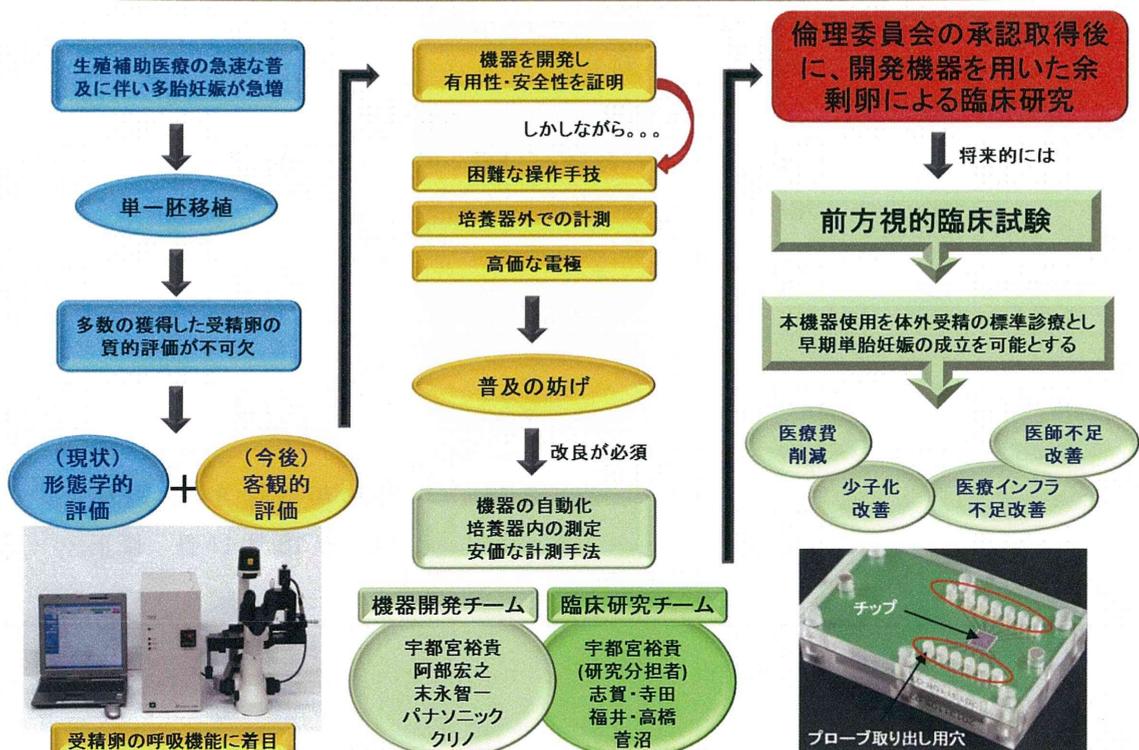
東北大学病院 婦人科

住所：仙台市青葉区星陵町2-1

電話番号：022-717-7254、FAX 番号：022-717-7258

担当医師：宇都宮裕貴

### 受精卵呼吸測定装置を用いた臨床試験に橋渡しするための安全性および有用性に関する研究(流れ図)



## 1. 目的

受精後3日以内のヒト余剰卵（廃棄卵）50例を用いて開発機器による呼吸量測定を行い、その有用性および安全性を検討し、従来の主観的な形態学的評価に呼吸量という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となるか検討する。具体的には、受精後72～168時間の卵呼吸量を測定し、その値と胚盤胞への到達率および孵化率を主要エンドポイントとする。さらに、副次的エンドポイントとして、①従来の形態学的評価と比較し呼吸量測定評価法との相関、②本機器使用による有害事象の発現、具体的には微弱電流や測定ウェルからの有害物質の溶出による受精卵への影響（分割停止、分割速度の低下、および夾雑物の増減）を検討する。

## 2. 背景

近年、晩婚化や出産希望年齢の上昇に伴い生殖医療の需要は著しく増加している。しかしながら、多胎妊娠による母体合併症や低出生体重児の増加が大きな社会問題となり、生殖補助医療における多胎妊娠防止のため、原則として単一受精卵を移植することが提唱された。しかしながら、法的な拘束力はないため、未だ症例によっては複数個の移植が行われているのが実情である。また、2013年8月に不妊治療助成に年齢および回数制限が追加されることが決定し、今後は着床能の高い優良な受精卵を選別し妊娠率を向上させることが一層重要となった。現在、獲得された複数の受精卵は形態のみで評価を行っているが、主観性が強く観察者間での結果に差が生じてしまう(1)。我々はこれまでに受精卵の呼吸機能と卵品質が相関することに着目し、その有用性を報告してきた(2-5)。この手法は非常に高感度である上に侵襲もない画期的な装置と考えている(3, 4)。受精卵呼吸測定装置のプロトタイプは共同研究者らが開発し、クリノ社が既に細胞呼吸測定機器（製品名CRAS1.0）として販売している。これまでに動物卵を用いて、その機器の有用性と安全性を報告している(4)。また、ヒト臨床検体においても、安全性および有効性が国内医療機関から報告されている(5)。しかしながら、現行機器を用いた正確な呼吸量測定には手技習得に多大な時間を要するため、標準診療に取り入れるにはハードルが高く、普及の妨げになっている。そのため、操作性および測定精度の向上を目的にパナソニック・ヘルスケア社と共同で新しいデバイスを開発した。本装置は培養器内に受精卵を設置し、煩雑な操作なしに受精卵の呼吸量を測定でき、現行機器において不可能であった操作の単純化と湿潤環境保持を満たしたものである。今後、ヒト余剰卵（廃棄卵）を用いた臨床研究を行い、その有用性および安全性を検討し、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となるか検討していく。具体的な研究計画を以下に示す。

- ① 東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認取得後に各研究協力機関においても倫理委員会の承認を得る。また、ヒト余剰卵（廃棄卵）の管理および所有者（夫婦双方）からの同意を取得する。

② 開発機器によるヒト余剰卵（廃棄卵）を用いた臨床研究を行い、その有用性および安全性を確認する。具体的には、受精後72～168時間の卵呼吸量を測定し、その値と胚盤胞への到達率および孵化率を主要エンドポイントとする。さらに、副次的エンドポイントとして、I) 従来の形態学的評価と呼吸量測定評価法との相関、II) 本機器使用による有害事象の発現、具体的には微弱電流や測定ウェルからの有害物質の溶出による受精卵への影響（分割停止、分割速度の低下、および夾雑物の増減）を検討する。

尚、今回の臨床研究では、不妊症治療を行い既に生児獲得後や採卵後3年以上が経過し不要となった余剰卵（廃棄卵）を使用するため、受精卵をヒトやヒト以外の動物に戻すことはなく、研究使用後は直ちに全例破棄する。尚、最初の体外受精時に夫婦双方より、生児獲得後や採取から3年経過し不要となった受精卵は自動的の廃棄する同意を取得している。

これまでに数多くの受精卵評価法の研究が世界中で行われてきたが、形態学的評価以外に有用な手法は確立していない（図1）。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。そして、この機器により単一受精卵移植後の早期単胎妊娠が可能となれば、多胎妊娠による母体合併症や早産による未熟児の減少、および不妊診療期間の短縮化が見込まれ、少子化改善、医療費削減、周産期医療に携わる医師不足解消、医療インフラ不足解消など現代社会が抱える多くの問題に大いに貢献することが期待できる。さらに本邦だけでなく、同じ問題に直面する欧米諸国にも普及を試みていきたい。（参考文献は「21. 文献」に記載）

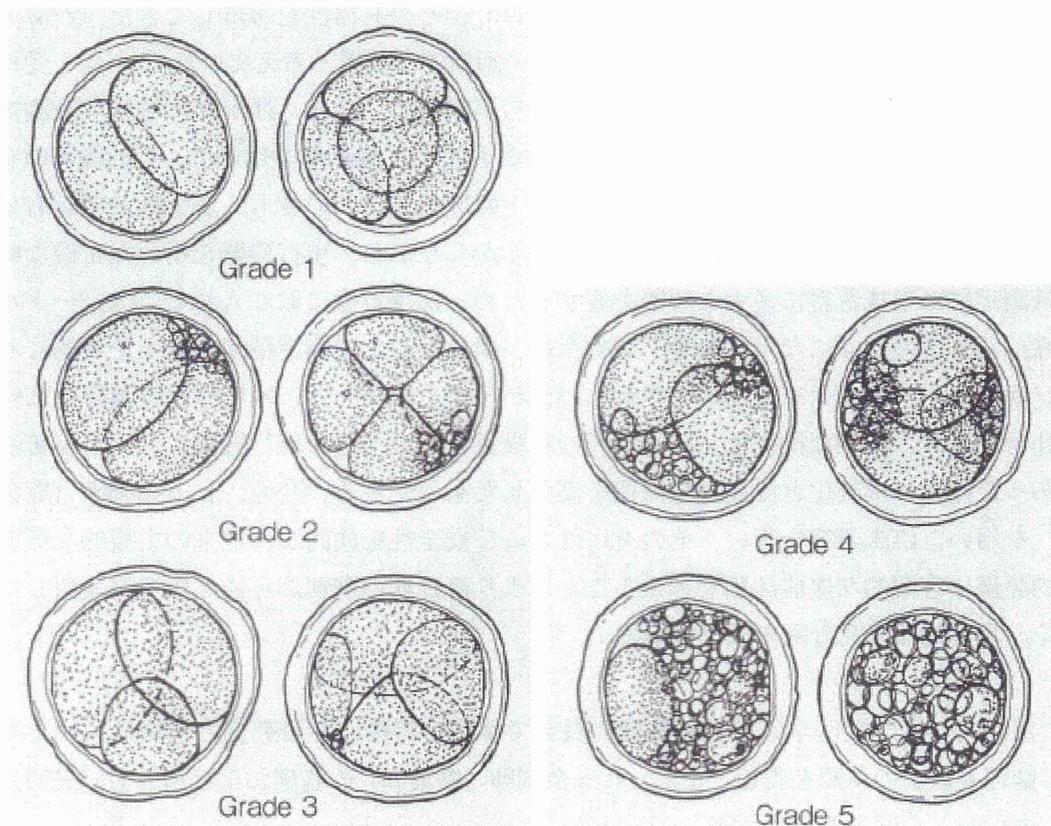


図 1. 受精卵の形態学的な評価 (Veeck 分類)

割球の状態と夾雑物により Grade 1 (良好胚) ~5 (不良胚) に分類される。

### 3. 薬剤や器具の情報

東北大学臨床研究推進センターのサポート下で、2年前よりクリノ社、パナソニック・ヘルスケア社と機器開発を行った。装置の全自動化と培養器中での測定を可能にするため、初案から協議を繰り返し、チップ構造変化による酸素濃度勾配のシミュレーション、ウェハ手配と試作検討マスク作成、および Si ウェハを用いた試作プロセスを検討した。そして、ターゲットとなる構造 (各部の寸法等) を絞り込むため試作品の改良を繰り返し、諸項目の最適化を行った。そして、最終的に培養器内に受精卵を設置し、煩雑な操作なしに受精卵の呼吸量を測定できるチップを開発した (図 2)。これは現行機器において不可能であった操作の単純化と湿潤環境保持を満たしたものである。

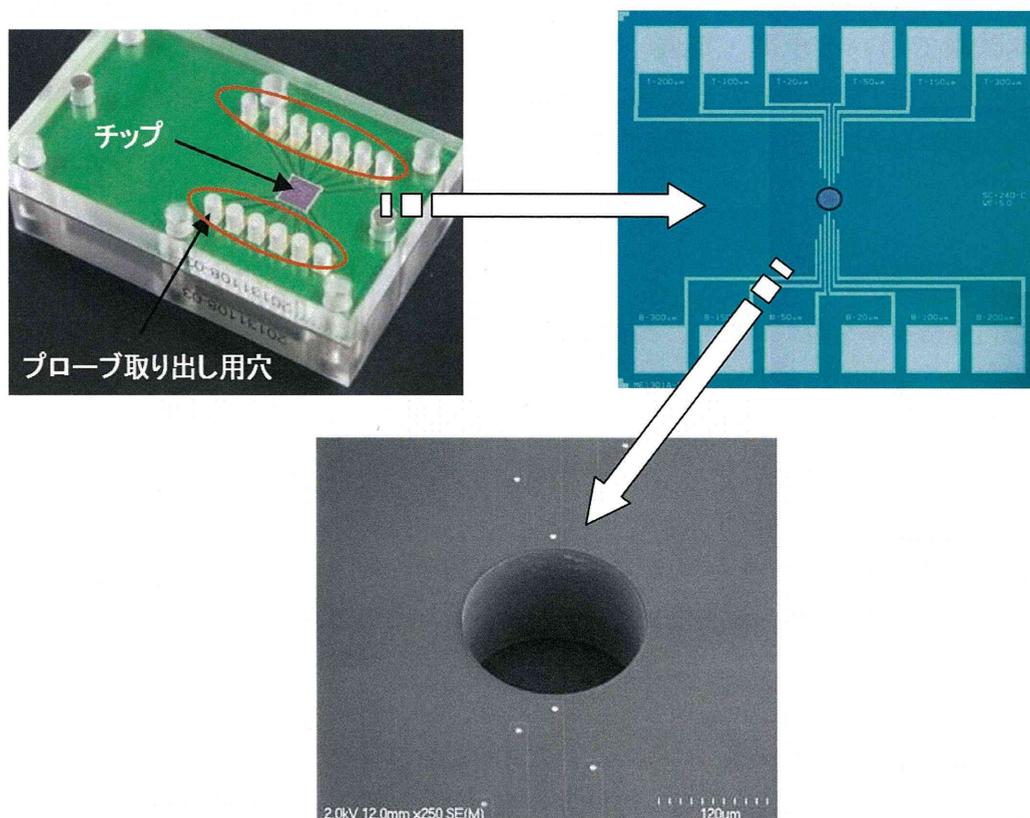


図 2. 開発した呼吸量測定装置 (左上段⇒右上段⇒下段の順に拡大像)

中央の穴に受精後 72~168 時間卵を置き、培養器の中で測定する。

今回の研究では余剰卵 (廃棄卵) を使用するため、受精卵をヒトやヒト以外の動物に戻すことはなく、研究使用後は直ちに破棄する。そのため、本研究により受精卵の所有者に有害事象が発生することはない。ただし、将来的な研究に反映するため、本機器により起こりうる有害事象についても併せて検討する。具体的には、下記のような事象を想定している。

#### a) 微弱電流による受精卵への影響

今回開発した機器では、1電極あたり0.4-0.5nA（全体で5-6nAで、従来機器の1/5程度）の微弱電流を用いて約5分間計測を行う。従来機器では、ヒトおよび動物受精卵で明らかな異常所見（妊娠率、出生数、出生体重、奇形、染色体、生化学的検査など）は認められなかった。本研究では母体やヒト以外の動物に戻さないため項目は限られるが、分割停止率や分割速度の変化、夾雑物の増減を検討する。

#### b) 測定ウェルからの有害物質溶出の可能性

開発機器が培養液と接する部分はすべてシリコンなどの不溶解物で覆われており、電流負荷などにより培養液に溶出することは想定していない。また、それ以外の器具は、日常臨床で使用している機材と同じ成分のものを使用するため、新しい有害事象が発現する可能性は極めて低いと考えている。しかしながら、予想外の事態も想定し、上記の微弱電流と同じ項目になるが、分割停止率や分割速度の変化、夾雑物の増減を検討する。

### 4. 本試験で用いる規準・定義

受精卵の形態学的評価方法としては、日常臨床で用いる初期胚用の Veeck 分類（図1）と胚盤胞用の Gardner 分類を基準とする。

### 5. 患者選択規準

以下の適格規準を全て満たし、かつ以下の除外規準のいずれにも該当しない患者を、本研究の対象（受精卵）とする。

#### 5.1. 適格規準

- ・受精後 3~7日目の受精卵
- ・遺伝性疾患を有していない両親から得られた受精卵
- ・直接対面で夫婦双方から文書による同意の得られた受精卵

#### 5.2. 除外規準

具体的な除外規準を記載する。

除外基準とは以下のような被験者（受精卵）を対象から除外するための条件である。

- ・受精後8日目以降の受精卵
- ・夫婦双方から文書による同意の得られなかった受精卵

## 6. 登録・割り付け

### 6.1. 登録手順

同意説明文書による同意を取得後、適格規準を満たし除外規準のいずれにも該当しないことを確認し、登録票に必要事項を全て記入の上、データセンターに FAX にて送信する。データセンターにて適格性を確認した後に、登録番号を発行する。誤登録や重複登録があった場合には速やかにデータセンターに連絡する。各研究協力施設でも同様の手順で行う。

本研究は、事前に東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得た後に行う。

個人情報登録機関は東北大学産婦人科で、データ管理者は庄子美紀子（看護師）である。個人情報は連結不可能匿名化とし、変換対応票を残さず個人を特定できないようにする。

相談窓口は以下のとおりである。

東北大学病院 産婦人科  
住所：仙台市青葉区星陵町 1-1  
電話番号：022-717-7254  
FAX 番号：022-717-7258  
担当医師：宇都宮裕貴

### 6.2. 割り付け方法

割り付けは行わない。

## 7. 実施計画

### 7.1. 実施方法

登録患者の受精卵は液体窒素容器に凍結保管されているため、融解後に培養器内に移し研究を開始する。受精後 72～168 時間 時点で通常の培養器から開発機器に移し、5 分間静置する。次に、1 電極あたり 0.4-0.5nA（全体で 5-6nA）の電流を流して計測を行う。培養液は通常の受精卵培養と同じものを使用する。その後、通常診療と同様に、培養液中で 7 日目まで測定および観察を行う。各研究協力施設でも同様の手順で検討を行い、結果は速やかにデータセンターに連絡する。

### 7.2. 変更規準

受精卵の状態には急な変化が生じることは考えにくい。呼吸量測定後に受精卵の変化が 48 時間以上停止した際は「分割停止」と判断し、その症例の臨床研究は終了し受精卵は直ちに破棄する。

### 7.3. 併用療法、支持療法

従来から標準的診療として施行されている受精卵培養と同一手法であり、特に併用療法や支持療法はない。

### 7.4. 中止規準、完了規準

受精卵の孵化または分割停止をもって研究終了とする。

### 7.5. 終了後の治療

原則として、使用した受精卵は直ちに破棄する。ヒトやヒト以外の動物に戻すことはない。

## 8 有害事象の評価と報告

### 8.1. 有害事象の定義

今回の試験では、不要となった余剰卵（廃棄卵）を使用する。ヒトやヒト以外の動物に戻すことはなく、研究終了後は直ちに破棄する。よって、所有する患者には有害事象が生じることはない。

### 8.2. 有害事象の評価

有害事象が生じることはない。

### 8.3. 予期される有害事象

特記事項なし

### 8.4. 有害事象の報告と対応

報告を必要とするような想定外の有害事象が生じた際には、速やかに研究担当者が研究代表者へ報告する。

## 9. 検査項目とスケジュール

検査は受精後 72 時間時点で通常の培養器から開発機器に移し、1 電極あたり 0.4-0.5nA（全体で 5-6nA）の電流を用いて約 5 分間計測を行う。一般的には受精後 3~7 日目に測定および顕微鏡にて形態観察を行う。

各研究協力施設でも同様の手順で検討を行う。

### 9.1. 観察・検査項目スケジュール

受精卵登録時からの評価項目を下記に示す。

#### 評価項目

	登録時	受精後					プロトコル 治療終了時/ 中止時
		3日	4日	5日	6日	7日	
母体背景情報	○						
呼吸量測定検査		○	○	○	○	○	
顕微鏡下形態観察		○	○	○	○	○	○

### 9.2. 登録前・開始前の観察・検査項目

登録前に凍結卵が受精後 72 時間以内であることを確認する。また、受精卵の両親に遺伝性疾患がないことを確認する。

### 9.3. 期間中の観察・検査項目

開発機器の有用性・安全性評価のために必要な下記の項目に関して観察、検査を行う。

- ・受精後 72 時間時点で通常の培養器から開発機器に移し、5 分間静置する。次に、1 電極あたり 0.4-0.5nA（全体で 5-6nA）の電流を流して呼吸量計測を行う。
- ・受精後 3~7 日目に呼吸測定および顕微鏡にて形態観察を行う。

### 9.4. 終了後（追跡期間中）の観察・検査項目

プロトコル終了時（または分割中止時）に顕微鏡にて形態観察を行う。

## 10. データ収集

個人情報管理施設は東北大学産婦人科で、データ管理者は庄子美紀子（看護師）が行う。

### 10.1. 記録用紙 (CRF) の種類と提出期限

記録用紙 (Case Report Form; CRF) は研究代表者が定めた所定の様式を用い、観察終了後 60 日以内にデータ管理者に提出する。

### 10.2. 記入方法

記録用紙を記入する際には、研究担当医師が記載し研究代表者が全例確認を行う。

### 10.3. 送付方法

記録用紙は直接データ管理者に手渡す。

## 11. エンドポイント（評価項目）

本試験のエンドポイントは下記のものである。

### 主要エンドポイント

受精卵の呼吸量と胚盤胞への到達率および孵化率との相関

### 副次エンドポイント

従来の形態学的評価法と呼吸量測定評価法の相関

現行手技と比較した本機器による有害事象発現の可能性

### 11.1. 有効性エンドポイント

#### 11.1.1. 主要エンドポイント

受精後3～7日目のヒト余剰卵（廃棄卵）を用いて開発機器による呼吸量測定を行い、その有用性を検討し、従来の主観的な形態学的評価に呼吸量測定という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となるか検討する。具体的には、受精後 72～168 時間の卵呼吸量を測定し、その値と胚盤胞への到達率および孵化率を測定・観察する。

#### 11.1.2. 副次エンドポイント

従来の形態学的評価と開発機器を用いた呼吸量測定値による受精卵質の評価との相関を検討する。

### 11.2. 安全性エンドポイント

形態学的変化のスピードや異常所見を調べ、現行手技と比較した本機器による有害事象の発現を検討する。具体的には、微弱電流による受精卵への影響や測定ウェルからの有害物質溶出の可能性などを考慮し、分割停止率や分割速度の変化、夾雑物の増減を検討する。

## 12. 統計学的事項

半数（25 例）が終了した段階で中間解析を予定している。そして、全症例が終了した段階で最終的な解析に移る。

### 12.1. 解析対象集団

今回の研究では、既に生児獲得後や採卵後 3 年以上経過により不要となった余剰卵（廃棄卵）を用いて行う。今回の目標症例数は 5 大学病院で 50 例（本学では 20 例）を予定している。

## 12.2. 有効性の主要評価項目の解析

受精後 72～168 時間の卵呼吸量を測定し、その値と胚盤胞への到達率および孵化率を観察する。受精卵が胚盤胞に到達した群としなかった群、および孵化した群としなかった群で呼吸量を統計処理し t 検定を用いて比較する。

## 12.3. 有効性の副次的評価項目の解析

従来の形態学的評価により Veeck 分類で 5 群に分け開発機器による呼吸量を集計し、形態学的分類と呼吸量の間に関係があるか検討する。

## 12.4. 安全性評価項目の解析

分割停止率や分割速度の変化、夾雑物の増減を調べ、現行手技（形態学的観察のみ）と比較した本機器による有害事象の発現を比較検討する。現行手技に関するデータはこれまでの症例から算出可能である。

## 12.5. サンプルサイズ、予定登録期間、追跡期間

症例数は 5 大学病院で 50 例（本学では 20 例）を予定している。予定登録期間は平成 26 年 4 月より 1 年間とし、観察後は直ちに廃棄するため追跡調査は行わない。

## 12.6. 中間解析

半数（25 例）が終了した段階で中間解析を予定している。

# 13. 倫理的事項

## 13.1. 患者（夫婦双方）の保護

本研究に関与する全ての者は「世界医師会ヘルシンキ宣言（2008 年改訂）」、「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日全部改正、厚生労働省告示第 415 号）」、日本産科婦人科学会「ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する見解」、および厚生労働省「ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方」に従う。説明・同意文書は研究責任医師が作成する。利用に関して改めて対象者から同意をとり、同意文書をカルテに添付する。

新たに研究協力を依頼する際には、書面（説明書と同意書を添付）を用いて直接対面で夫婦双方から同意取得を行う。また、受精卵に関しては、個人を識別できないように符号や番号の変換対応票を残さない方法による匿名化（連結不可能匿名化）を行う。

## 13.2. 夫婦双方への説明と同意（インフォームド・コンセント）

研究への登録に先立ち、担当医は夫婦双方が本試験に参加する前に、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認の得られた同意説明文書を用いて、直接対面で十分に説明し、

本研究への参加について自由意志による同意を文書により得るものとする。

同意書には説明を行った研究責任医師又は分担医師、夫婦双方が記名捺印又は署名し、各自日付を記入する。研究責任医師又は分担医師は、夫婦双方が本試験に参加する前に、記名捺印又は署名と日付が記入された同意書の写し及び説明文書を夫婦双方に渡し、同意書を保管するものとする。同意書は研究施行期間中保管し、終了後はすべて破棄する。

説明文書改定時は改めて書面を用いて口頭で説明を行う。

### 13.3. プライバシーの保護

収集したデータは個人を識別できない連結不可能匿名化の状態とする。したがって、個人が特定される形で公表されることはなく、対象者が不利益を被ったり人権が侵害されたりすることはない。

### 13.4. 実施計画書の遵守

本研究に参加する研究者は、夫婦双方の安全と人権を損なわない限り、本実施計画書を遵守する。

### 13.5. 東北大学大学院医学系研究科倫理委員会による承認

本研究実施前及び研究実施予定期間中を通じて、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会において、本研究の実施、継続等について倫理的、科学的及び医学的妥当性の観点から承認を得るものとする。研究代表者は、実施計画書、症例報告書の見本、説明同意文書など審査の対象となる文書を東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に提出する。

### 13.6. 新たな情報の報告

本研究に用いる新しい機器の有効性、安全性に関する新たな情報を得た場合、研究代表者は必要に応じて、医療機関の長、当局など速やかに文書にて報告する。

### 13.7. プロトコルの内容変更について

プロトコルの内容を変更する際には、プロトコルの内容変更に従い、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に改訂の申請を行い、承認を得る必要がある。

## 14. 費用負担と補償

### 14.1. 資金源及び財政上の関係

この研究は、厚生労働省科学研究費で行う。そのため今回の研究に要する費用はすべて研究者負担で行う。