

201408016B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 宇都宮 裕貴

平成27 (2015) 年 3月

目 次

I. 総合研究報告

- 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 ----- 1
宇都宮 裕貴
 (図) 1～5
 (資料) 1～16

II. 分担研究報告

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 ----- 235
 寺田 幸弘
 (表) 1～2、(図) 1～3、(資料) 8枚
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 ----- 251
 阿部 宏之
3. 未受精卵の胚呼吸測定とミトコンドリアDNA転写因子の発現評価
による加齢卵の品質評価 ----- 261
 高橋 俊文
 (図) 1～2
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 ----- 267
 福井 淳史
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 ----- 271
 菅沼 亮太
 (資料、図) 1～6
6. ウシ受精卵を用いたチップ型電極の測定結果に関する研究と
臨床研究に関する倫理委員会承認について ----- 281
 志賀 尚美
 (資料 1) 介入研究プロトコール(改訂版)
 (資料 2) 説明文書(改訂版)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 313

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 319

I. 総合研究報告書

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

平成24～26年度

主任研究者 宇都宮裕貴

(東北大学病院准教授)

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業） （総合）研究報告書

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

研究代表者 宇都宮 裕貴 東北大学准教授

研究要旨

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（胚）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。そこで平成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。

まず、平成24年度の早期段階でPMDAとの薬事戦略相談（事前面談）を行った。そして、平成25年より細胞株およびウシ株を用いて予備検討を行い、平成26年度に臨床研究（ヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定）を施行した。

はじめに今回提供される夫婦より、余剰となり破棄予定の受精卵に関して研究使用の同意を得た。次に、新機器を用いた受精卵の呼吸量測定および従来からの形態学的評価を行った。具体的には、受精後3日目に呼吸量測定および形態評価を行い、その後6日目（または7日目）まで継続培養し、連日の測定評価（呼吸量および形態学的評価）をし、比較検討した。尚、本研究に先立って平成26年3月に東北大学倫理委員会の承認を得た。さらに本研究に対し、平成26年3月にPMDAを介して厚生労働省より薬事法の対象外であることが通達された。

今回検討した余剰卵51例のうち、胚盤胞に成長した症例は17例であった。受精後3日目の呼吸量は症例により0-5.4と大きく異なっていたが、胚盤胞に至った良好胚では3.5-4.8の値を示し、異常低値では胚盤胞非到達症例が多かった。また、4-6日目での呼吸量は胚盤胞到達例で上昇傾向であったが、一部には呼吸量減少も認められた。

従来判断に本機器の評価を加えることにより、形態学的評価では十分ではなかった良好胚の選別が可能であると推察された。すなわち、呼吸量測定による一層詳細な受精卵評価が可能となり、単一胚移植による児獲得率の向上に貢献すると期待される。

分担研究者

寺田幸弘 (秋田大学医学部教授)
阿部宏之 (山形大学理工学部教授)
高橋俊文 (山形大学医学部講師)
福井淳史 (弘前大学医学部講師)
菅沼亮太 (福島県立医科大学講師)
志賀尚美 (東北大学医学部助教)

A・研究目的

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。

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・安全性を報告してきた。しかしながら、現行機器を用いた正確な酸素消費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下記の手順で遂行している。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、研究分担者の阿部らはその有用性を報告してきた(1-7)。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られている。しかしながら、現行機器を用いた正確な酸素消費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、普及の妨げになることが予想される。そのため、まず平成24年度に

PMDAとの薬事戦略相談を行った。その後、チップ開発に対してパナソニック・ヘルスケア社を中心に試作品を完成させた。そして平成25年度には、試作品の現行機器の操作性および測定精度の一層の向上を目的に、改良デバイスの開発を行うことを目的とした。また、それと並行して、平成26年度に行うヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定を目的とした臨床研究のプロトコールを作成し、倫理委員会の承認を得た。

そしてそれらを踏まえ、平成26年度には余剰で廃棄予定のヒト受精卵を用いて検討した。受精後3日目に酸素消費量測定および形態評価を行い、その後6日目(または7日目)まで継続培養し、連日の測定評価(酸素消費量および形態評価)をし、比較検討した。

- (1) Yamanaka M, Abe H, et al. Prediction for developmental competence of human blastocyst based on its oxygen consumption. *Fertil Steril*. 26:3366-71. 2011
- (2) Yamanaka M, Abe H, et al. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod*. 26:3366-71. 2011
- (3) Date Y, Abe H, et al. Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice. *Biosens Bioelectron*. 15;30:100-6. 2011
- (4) Yoshida H., Abe H, et al. Quality evaluation of IVM embryo and imprinting genes of IVM babies. *J Assit Reprod Genet* 30:221-5. 2013
- (5) Kumasako Y, Abe H, et al. Respiration activity of single blastocysts measured by scanning electrochemical microscopy: The relationship between pre-freezing and post-warming. *J Mamm Ova Res* 30:30-5. 2013
- (6) Abe H. Quality evaluation of oocytes and embryos with highly sensitive and non-invasive technique for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy. *Jpn. J. Embryo Transfer* 35: 7-14. 2013

- (7) Abe H. A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J Mamm Ova Res.* 24:70-8. 2007

B・研究方法

新規開発デバイスを用いて正確な酸素消費量を測定し、一般診療において容易に取り入れられるように研究を遂行した。あらかじめ市販されている9社のHEPES緩衝剤添加培養液を用いて、動作性確認を行った(図1)。各培養液を測定プレートに導入し、-0.75v vs. Ptの電位を10秒間、3回印加した際の電流挙動を比較した。その中で、電流値の大きいもの、過渡応答が小さいもの(より早く電流値が定常状態に達するもの)、繰り返し測定で電流値の変動が小さいものを選定ポイントし、ガーマットバッファ(COOK社)に決定した。

凍結胚はすべて受精後3日目で凍結保存しており、融解後2時間、6時間、24時間、48時間、72時間、96時間の6点で形態学的評価と本機器による酸素消費量測定を行った。まず各時間における呼吸量を順位付けして、均等に3群間に割り付ける。3群間を呼吸量が最も低い群(低群)、(中央群)、最も高い群(高群)にわけ、低群を1(reference)にしたとき、高群が48時間(D5)もしくは72時間(D6)に胚盤胞へ到達するオッズ比を検討した。胚の融解にはthawing media (KITAZATO)、胚培養には(SAGE: Quinn's Advantage Medium with HEPES)を用いた。なお、今回の研究に関して、東北大学医学部倫理委員会での承認を得ている。そして、定期的な会議を開催し、各施設の研究や情報交換、今後の研究計画などを討論した。また、平成26年度に行うヒト余剰卵を用いた臨床研究プロトコル作成および倫理委員会申請を行い、平成26年3月に承認を取得した(倫理審査)。

さらに、PMDAとの開発相談を行ってきた。開発機器に関して、薬事法に基づく医療機器として開発することを前提としたが、従来機器と同様に薬事法を介さない測定機器として開発することが、平成26年3月31日に認められた。

以上の内容は、定期的な下記の会議を開催し、一般診療において容易に取り入れられるように研究を遂行した。

1. 平成24年8月22日 (仙台)
第1回PMDA開発相談(資料1)
2. 平成24年9月6日 (東京)
第1回デバイス開発会議(資料2)
3. 平成24年9月9日 (山形)
第7回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第1回厚生労働省班会議)(資料3)
4. 平成25年1月24日 (東京)
第2回デバイス開発会議(資料4)
5. 平成25年2月22日(テレビ会議)
第3回デバイス開発会議(資料5)
6. 平成25年3月3日 (仙台)
第8回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第2回厚生労働省班会議)(資料6)
7. 平成25年6月8日 (仙台)
第9回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第3回厚生労働省班会議)(資料7)
8. 平成25年9月2日 (TV会議)
第4回デバイス開発会議(資料8)
9. 平成25年9月8日 (旭川)
第10回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第4回厚生労働省班会議)(資料9)
10. 平成25年9月10日 (仙台)
企画競争説明会(資料10)
11. 平成25年12月10日(TV会議)
第5回デバイス開発会議(資料11)

C・研究結果

12. 平成26年1月21日 (仙台)
開発機器納品 (資料12)
13. 平成26年3月2日 (仙台)
第11回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第5回厚生労働省班会議) (資料13)
14. 平成26年6月14日 (福島)
第12回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第6回厚生労働省班会議) (資料14)
15. 平成26年9月1～5日 (仙台)
第1回機器開発研究
16. 平成26年9月28日 (金沢)
第13回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第7回厚生労働省班会議) (資料15)
17. 平成26年10月27～31日 (仙台)
第2回機器開発研究
18. 平成26年12月22～26日 (仙台)
第3回機器開発研究
19. 平成27年1月5～9日 (仙台)
第4回機器開発研究
20. 平成27年2月16～20日 (仙台)
第5回機器開発研究
21. 平成27年3月1日 (仙台)
第14回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第8回厚生労働省班会議) (資料16)
22. 平成27年3月9～13日 (仙台)
第6回機器開発研究

定期的に会議を開催し様々な専門家との打ち合わせを行い、新しい機器開発に関する手法や意義、問題点、有害性などの検討を進めた。まず第一に、培養液の選定を行った。代表的な9種類のうち酸素還元電位印加時の電流絶対値が大きいもの(測定分解能が高いもの)、電流減少の変化率が小さいもの(解析誤差がでにくいもの)、そして繰り返し測定で、電流が安定化しやすいものからゲームットバッファ(CK)を使用した。

図2に全例の酸素消費量経過を示す。2時間値の酸素消費量は4.35(3.45-4.75)、6時間は3.25(2.9-4.1)、24時間は3.95(3.0-4.9)、48時間は4.0(2.7-5.4)、72時間は4.4(2.3-6.4)、96時間は12.75(7.25-17.65)であった。融解後6-72時間の呼吸量はほぼ横ばいとなり、96時間で上昇した。ただしこれらの呼吸量は胚盤胞へ達した群(胚盤胞到達群)と胚盤胞へ達しなかった群(胚盤胞非到達群)、すべてが含まれた結果である。形態評価の内訳はD6で胚盤胞へ達した群(D6胚盤胞到達群)は17例(33.3%)、そのうちD5で胚盤胞へ達した群(D5胚盤胞到達群)は10例(19.6%)、胚盤胞非到達群が34例(66.6%)であった。D6胚盤胞到達群とD6胚盤胞非到達群の呼吸量を比較した(図2)。胚盤胞到達群は48時間から徐々に2次関数的に上昇した。胚盤胞非到達群は72時間までほぼ横ばいとなり96時間で急上昇した。この急上昇の原因は、72時間で初めて胚盤胞に到達して呼吸量が上昇した胚が含まれている影響と考える。胚盤胞到達群と胚盤胞非到達群を比較すると、2時間値で胚盤胞到達群のほうが非到達群に比較して低い傾向があり、24時間まではほぼ重なり、48時間以降明らかに差が出現する。

次にD6胚盤胞到達群とD6胚盤胞非到達群の呼吸量を比較した(図3)。胚盤胞到達群は24時間まではほぼ横ばいで、48時間以降2次関数的に上昇する。胚盤胞非到達群は96時間までほぼ横ばいである。胚盤胞到達群と胚盤胞非到達群を比較すると、D5同様2時間では胚盤胞到達群のほうが低い傾向

はあるが、24時間まではほぼ同じように推移する。48時間以降明らかな呼吸量の差を認める。

対象とする胚の D5 以前の呼吸量から、D5 もしくは D6 の時点で胚盤胞に到達することを予測できるか検討した。解析方法は説明変数を胚の各時間の呼吸量とし、目的変数を D5 もしくは D6 の形態学的評価としてロジスティック回帰分析を用いた (SAS9.4)。D5 で胚盤胞へ到達することについての検討は、2 時間

(D3) での推定値は 0.929 (95%信頼区間 0.271-3.738)、6 時間 (D3) の推定値は 0.909 (95%信頼区間 0.264-2.619)、24 時間 (D4) の推定値は 1.356 (95%信頼区間 0.873-2.161) であった。24 時間

(D4) の推定値は有意ではなかったものの高い傾向を認め、今後症例数を増やすことによって、D4 での呼吸量が高いと D5 で胚盤胞になるといえる可能性が高い。同様に D6 で胚盤胞へ到達することについて検討した (図 4)。2 時間 (D3) での推定値は 1.056 (95%信頼区間 0.405-2.922)、6 時間 (D3) の推定値は 1.091 (95%信頼区間 0.473-2.879)、24 時間 (D4) の推定値は 1.039 (95%信頼区間 0.711-1.510)、48 時間 (D5) の推定値は 2.548 (95%信頼区間 1.528-4.865、P 値<0.0001) であった。以上より、48 時間 (D5) の推定値は有意水準に達していたため、D5 の呼吸量が 1 増加するごとに D6 で胚盤胞へ到達するオッズ比は 2.548 倍である。つまり、D5 での呼吸量が高いと有意に D6 で胚盤胞になる。また、24 時間 (D4) の検定も有意水準に達しなかったものの高い傾向を認め、今後症例数を増やすことで D4 での呼吸量が高いと D6 で胚盤胞になるといえる可能性が高い。D5、D6 での検討から、今後症例数が増え、24 時間 (D4) の呼吸量から D5、D6 での胚盤胞到達を予測できれば、新鮮胚移植時の予後良好胚の選定に有用な可能性がある。

次に、各時間の呼吸量について胚盤胞に到達する最適な呼吸量の範囲が存在するのかが検討した。各時間の呼吸量を昇順に並べ、均等に上から順に3群にわけ (均等3分割法)、各群の呼吸量を説明変

数とし、目的変数を D5 もしくは D6 の形態学的評価としてロジスティック回帰分析を行った (SAS9.4)。各時間の呼吸量が低い群を「低群」、呼吸量が中間の群を「中央群」、呼吸量が高い群を「高群」とした。結果は D5 での胚盤胞到達に関しては各群で最適な呼吸量を示す、有意水準に達する結果は得られなかった。D6 での胚盤胞到達に関しては、48 時間 (D4) において、低群を 1 としたときの高群のオッズ比が 29.356 (95%信頼区間 3.99-404.26、P 値<.0001) であった。よって、48 時間 (D5) の呼吸量が 3.1 (Arb.) 以下を 1 としたとき、4.9 (Arb.) 以上の呼吸量を呈する胚は 29.356 倍、胚盤胞へ到達するということができる (図 5)。

また、PMDA との開発相談を、保険診療をふまえて薬事法のもと相談を行った。その後、平成 26 年 3 月 31 日に PMDA より連絡があり、他の生殖補助医療と同様に、私費診療で行われることが伝えられた。

(計22回の研究集会記録)

1. 平成24年8月22日 (仙台)
第1回PMDA開発相談 (資料2)

本相談では、従来機器の特性やその問題点を洗い出し、新しい機器開発における指針を相談した。重要な指摘としては、開発機器を「医療機器」または「測定機器」のいずれで承認を得るかという点であった。一般には生殖補助医療は保険診療ではなく、またこれまで使用している顕微鏡や顕微授精の機器などは全て医療機器としての承認を受けていない。そのため、本機器も「医療機器」ではなく「測定機器」として問題がないことが確認された。また、ヒトの受精卵に関して明らかな定義がなされていない点にも議論が及んだ。妊娠し母体の子宮内に存在する「胎児」は「ヒト」と同様に取り扱うことが規定されているが、「受精卵」に関してはまだ明確な定義付けはされていない。このことも、将来的な臨床研究を行っていくうえで大切な留意事項で考えられた。

2. 平成24年9月 6日 (東京)
第1回デバイス開発会議 (資料3)

平成24年9月5日に本課題が採択されたため、直ちに機器開発に関連する企業がパナソニック・ヘルスケア社に集まり、今後の開発計画の打ち合わせを行った。以前より、本研究に関しクリノ社、パナソニック・ヘルスケア社と共同研究を行っており、今回の本課題採択に至る経緯および今後の研究計画を議論した。次にパナソニック・ヘルスケア社のデバイス開発部門より、新規デバイスのデザインおよび製作工程に関して提案があった。

3. 平成24年9月8日 (山形)
第7回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第1回厚生労働省班会議) (資料4)

東北6大学の生殖医療担当医とクリノ社が集まり、定例の胚細胞呼吸測定装置研究会に加えて、研究費取得に伴う初回の班会議を開催した。従来までの研究に加えて、新たなデバイス開発という大きなテーマが提示され、現行機器からの改良事項や要望などが議論された。

4. 平成25年1月24日 (東京)
第2回デバイス開発会議 (資料5)

定期的な打ち合わせ(メール・電話など)の後にデバイスの試作品(第1作)が完成したため、パナソニック・ヘルスケア社にて試作品開発の経緯、実物の検閲および問題点の指摘、さらに今後の試作品評価方法と改良について検討した。さらに、現在デンマークおよびスペインのグループが開発を試みている呼吸機能測定装置もとりあげ、我々の開発デバイスとの相違点や特許取得状況につき情報の共有を行った。

5. 平成25年2月22日(テレビ会議)
第3回デバイス開発会議 (資料6)

前回の試作品をもとに北斗電工社と共同でデバイスの電気化学的な評価を行った。幾つかの問題点が指摘され、その解決策を議論した。全体的には諸要件をみたく良好な出来であった。

6. 平成25年3月3日 (仙台)
第8回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第2回厚生労働省班会議) (資料7)

再び、東北6大学の生殖医療担当医とクリノ社、研究分担者の阿部が集まり、これまでのデバイス開発経緯の紹介と、今後の研究計画について打ち合わせを行った。来年度以降、機器開発に伴う臨床研究の各施設における倫理申請や余剰卵のストックに関する確認も行った。

7. 平成25年6月8日 (仙台)
第9回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第3回厚生労働省班会議) (資料8)

東北5大学病院の生殖医療担当医と山形大学阿部宏之、クリノ社が集まり機器開発業況や培養条件の設定、現状における問題点などに関して班会議を開催した。従来機器を用いた研究に比較し、新規開発デバイスによる問題点が提示され、現行機器からの改良事項や要望などが議論された。また、今後の研究に使用する余剰卵の集積・管理法などに関する検討も併せて行った。

8. 平成25年9月2日 (TV会議)
第4回デバイス開発会議 (資料9)

機器開発に関連するパナソニック・オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社、パナソニック・ヘルスケア社と共に、今後の開発計画の打ち合わせを行った。

従来の開発機器をさらに改良し、チップ構造の設計/プロセス開発、プレート実装、電気化学測定プロトコール開発、生体における酸素消費量評価に関して議論した。そして、開発機器によるスフェロイド(乳癌細胞株:MCF-7)を用いた計測を行い、距離依存性の酸素消費量が得られていることを確認した。しかしながら、酸素濃度勾配や電極間の特性ばらつきが十分でなく引き続き検討を行っていくことを確認した。

9. 平成25年9月8日 (旭川)
第10回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第4回厚生労働省班会議) (資料10)

東北5大学病院の生殖医療担当医と山形大学の阿部宏之、東北大学臨床研究推進センターの藤原義明、クリノ社が集まりパナソニック社が開発している機器に関して、培養条件の設定や現状における問題点などに関して検討した。サイクリック・ボルタンメトリー(CV)波形の異常や測定感度の低下が認められることがあり、その原因の解明などについても議論した。また、現行機器からの改良事項や要望なども併せて議論された。

10. 平成25年9月10日 (仙台)
企画競争説明会 (資料11)

昨年度の試作機器は湿潤環境において全自動で測定が可能となり、今後の一般診療への普及を見据えた有望な試作品となった。しかしながら、反復使用による測定精度の低下や最適な培養環境の確立など、未だ多くの課題を抱えており、直ちに臨床研究に用いることはできない。そこで、この試作品を改良し、より高精度で操作性の向上した安価な装置の開発を行うため企画競争を公募した。

当日は、複数の企業が説明会に参加し、開発に関する議論があったが、最終的にはパナソニック・ヘルスケア社が契約対象となり、開発規格提案書および実施体制が提示された。

11. 平成25年12月10日 (TV会議)
第5回デバイス開発会議 (資料12)

チップ開発・改良の進捗状況を評価し、臨床サイドからの要望や課題を提起した。今回の試作で組み立て工程の安定化と4wellタイプの設計を試み、乳癌細胞株(MCF-7)の生体スフェロイドで酸素消費量算出に成功した経緯が報告された。

また、今後の検討事項として、チップの設計改善や測定の際のばらつきを軽減する薄膜MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)プロセス技術改善が挙げられた。

12. 平成26年1月21日 (仙台)
開発機器納品 (資料13)

パナソニック・ヘルスケア社による全自動受精卵呼吸測定装置の機器改良業務納品が行われた。開発された機器には下記の要件を満たすと判断された。

- ① マニュアルのマイクロプローブ廃止
- ② 生体適合材のみ使用
- ③ 5分以内に測定可能
- ④ 一度に受精卵4個まで測定可能
- ⑤ 耐久性に優れている
- ⑥ 安価であること
- ⑦ 受精卵に有害事象が少ない

- ⑧ 測定電流が低い
- ⑨ 測定結果の再現性が高い

今後これらの機器を用いて動物卵・ヒト受精卵の呼吸量測定を試みていく。

- 13. 平成26年3月2日（仙台）
第11回胚細胞呼吸測定装置研究会
（第5回厚生労働省班会議）（資料14）

本年度に行われた研究に関する報告と議論が行われた。まず始めにパナソニック・ヘルスケア社による全自動受精卵呼吸測定装置の開発経緯とその有用性が示された。これまでの問題点が改善され、癌細胞株やウシ受精卵を用いた呼吸量測定が可能となり、今後ヒト受精卵における呼吸量測定プロトコールの確立やその評価方法などが検討された。その後、PMDA相談、プロトコール作成や倫理委員会承認、ヒト余剰卵蓄積および管理などに関する経緯が提示・議論された。

- 14. 平成26年6月14日（福島）
第12回胚細胞呼吸測定装置研究会
（第6回厚生労働省班会議）（資料15）

本年度までに確執した新規呼吸測定装置を披露し、各種現場から実臨床における利用価値を評価した。そして、今後使用していく新しい測定デバイスを持参し、各種意見を議論した。また、東北大学病院における破棄卵を用いた臨床研究を計画し、実臨床への足がかりとしていくことが確認された。

- 15. 平成26年9月1～5日（仙台）
第1回機器開発研究

東北大学病院において第一回目の実習研究に入った。初回に設定されたプロトコールは、測定感度はよいが測定時間が長いと改めて測定方法の改良が望まれた。

- 16. 平成26年9月28日（金沢）
第13回胚細胞呼吸測定装置研究会
（第7回厚生労働省班会議）（資料16）

前回測定箇所の問題点を取り上げ、施設間で改善点を検討した。また、機器作成側からの現段階での改良機器を検討しており、次回研究で検討予定であることを確認した。

- 17. 平成26年10月27～31日（仙台）
第2回機器開発研究

測定感度・測定時間が改ざんされ、前回のような計測時間の延長は改善された。しかしながら、信号処理情報が少なく測定方法の改良が改めて望まれた。

- 18. 平成26年12月22～26日（仙台）
第3回機器開発研究

改めて測定機器を改善し、最終形の臨床測定器を完了した。測定は2～3 胚同時測定を可能にし、臨床現場における有用性の確立を目標に改善された。本会で実験完了とし、次回からの本実験に関する準備などを議論した。

- 19. 平成27年1月5～9日（仙台）
第4回機器開発研究

前回作成した機器を用いて、呼吸量測定と受精卵の発育を検討した。また、従来機器との比較検討も併せて行った。今回の計測から一定の結果が得られたため、次回以降は症例数を増やして計測を行っていくことも確認した。

- 20. 平成27年2月16～20日（仙台）
第5回機器開発研究

症例数を増やして継続した実験を継続した。使用した受精卵は、余剰卵で廃棄予定であったが、3割以上が胚盤胞に成長し、有意義な結果が得られる公算が高まった。

21. 平成27年3月1日 (仙台)
第14回胚細胞呼吸測定装置研究会
(第8回厚生労働省班会議) (資料3)

東北5大学病院の生殖医療担当医と山形大学阿部宏之、パナソニック社が集まり、これまでの研究計画およびその結果、さらに今後の実臨床への応用について議論し合った。特に予定機器の試作を操作し、長所及び短所を意見してもらい、実臨床に向けた具体的な問題を議論した。

22. 平成27年3月2～6日 (仙台)
第6回機器開発研究

本年度最終の基礎研究を行った。1度に15例の症例を用いて検討した。最終的には、これまでに行った6回分を検討し、新しい医療機器開発の確立に意見をまとめていった。

D・考察

ヒト胚を用いた実験では、D5以降で胚盤胞到達群では酸素消費量の上昇、非到達群では低下の傾向がみられた。現在、本邦では妊娠率の高さから胚盤胞移植が主流となりつつあるが、継続培養による潜在的リスクの可能性も指摘され、可能な限り早期の胚選別法が求められている。今回の実験では、胚盤胞到達群は非到達群に比較してD3-4変化率が小さい傾向があった。今後D3-4酸素消費量の値や変化率に着目してさらに研究を進めていく必要がある。また、胚盤胞到達群において、形態学的評価が良い胚ほど呼吸活性が高いというような関係はみられなかった。従来形態学的良好胚盤胞でも妊娠率はたかだか5割程度であり、形態学的観察のみでは評価しきれない面があると考えられ、呼吸活性測定は形態学的評価を補完する手段となりうる。最終的に着床や出産に至る胚かどうかを選別することが重要であるが、今回の実験では実際に胚移植には至っていない。今後、形態、酸素消費ともに

に良好な群、形態学的なクオリティは良好だが酸素消費量が低い群、形態学的クオリティは不良だが酸素消費量が高い群など群分けをして妊娠率、流産率、生児獲得率等を比較する必要がある。

E・結論

新規開発した受精卵呼吸量測定装置は、我々が目的としている容易な操作性と湿潤環境を維持した測定が可能な機器である。今後、ヒト余剰卵を用いてその有用性と安全性を検討し、日常臨床に応用していくことが可能になると期待している。

48時間の低群を1としたときの高群のオッズ比は有意であった。24時間以前のオッズ比は有意でなかった。また、48時間において呼吸量3.1以下を1としたとき呼吸量4.9以上の受精卵は29倍では72時間で胚盤胞になりやすい。

F・研究発表

1. 論文発表

Peer review誌に投稿中

2. 学会発表

(1)H. Kurosawa, H. Utsunomiya, N. Shiga, A. Takahashi, M. Ishibashi, Z. Watanabe, H. Abe, Y. Terada, T. Takahashi, A. Fukui, R. Suganuma, N. Yae gashi. Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; Yamagata University, Yonezawa, Japan; Akita University Graduate School of Medicine, Akita, Japan; Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan; Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan; Fukushima Medical University, Fukushima, Japan. NOVEL AUTOMATED DEVICE WITH THE CHIP ELECTRODE FOR MONITORING RESPIRATORY ACTIVITY OF EMBRYOS. ASRM annual meeting.

(2) 黒澤大樹¹、宇都宮裕貴¹、志賀尚美¹、寺田幸弘⁵、高橋俊文⁴、福井淳史³、菅沼亮太²、八重樫伸生¹：¹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

(3) 黒澤大樹¹、宇都宮裕貴¹、高橋藍子¹、渡邊善¹、志賀尚美¹、熊谷仁²、寺田幸弘²、五十嵐秀樹³、高橋俊文³、阿部宏之⁴、福井淳史⁵、菅沼亮太⁶、八重樫伸生¹：¹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

(4) 志賀尚美¹、宇都宮裕貴¹、高橋藍子¹、石橋ますみ¹、黒澤大樹¹、渡邊善¹、菅沼亮太²、福井淳史³、高橋俊文⁴、阿部宏之⁵、寺田幸弘⁶、八重樫伸生¹：¹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

G・知的所有権の取得状況

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

(図表)

図 1 : 培養液選定

販売会社	名称
Irvine Scientific	Modified HTF Medium-HEPES
COOK	ガーマットバッファー
VitroLife	G-MOPS
NAKA medical	ヘペスメディウム
Life Groval	HTF/wHEPES
Medicult	Sperm preparation medium
SAGE	Quinn' s Advantage Medium with HEPES
Fertli PRO	Ferti Cult Sperm Washing & Flushing medium
扶桑薬品	HFF99

図 2 : 呼吸量経過

融解後時間	統計 処理数	中央値 (四分位点)
2hr (D3)	20	4.35 (3.45-4.75)
6hr (D3)	10	3.25 (2.9-4.1)
24hr (D4)	48	3.95 (3.0-4.9)
48hr (D5)	49	4.0 (2.7-5.4)
72hr (D6)	43	4.4 (2.3-6.4)
96hr (D7)	16	12.75 (7.25-17.65)

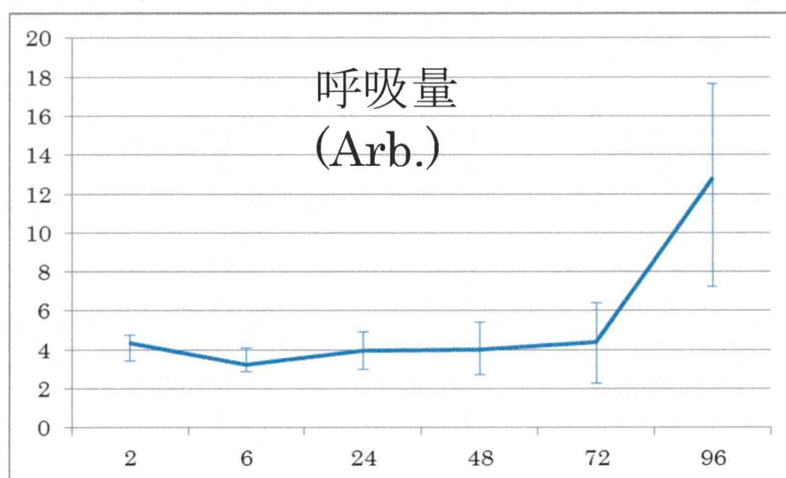


図 3: 胚盤胞到達の有無による呼吸量の違い (D6)

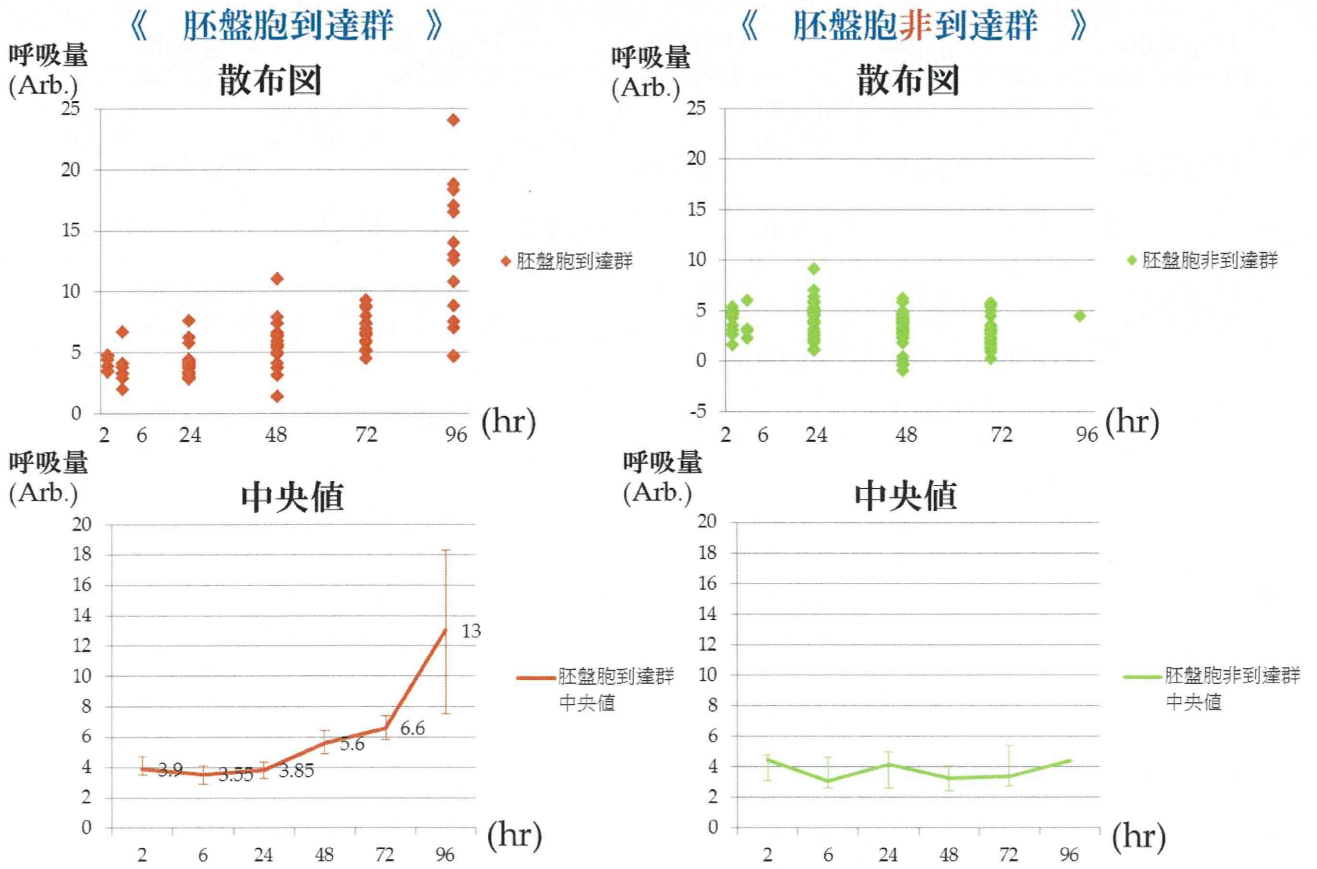
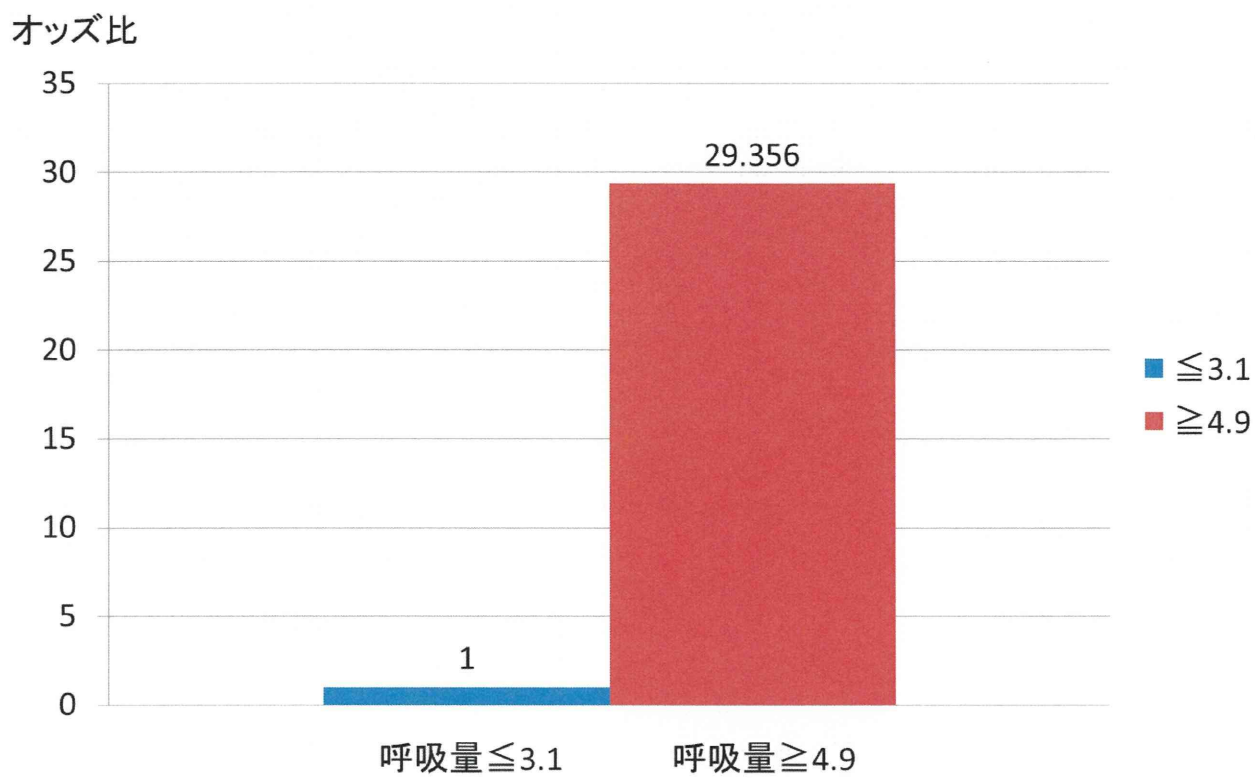


図 4 : ロジスティック回帰分析、説明変数

融解後時間 (時間)	推定値	95%信頼区間	P 値
2	1.056	0.405 – 2.922	0.952
6	1.091	0.473 – 2.879	0.8476
24	1.039	0.711 – 1.510	0.8417
48	2.548	1.528 – 4.865	<.0001

図5：ロジスティック回帰分析



(資料 1)