

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	

<b>作業報告</b>	
<p>●<b>症状</b>          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。</p> <p>●<b>対応</b></p> <p>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)</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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、依然としてとして想定より低い。</p> <p><b>推定原因</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・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。</li> <li>・測定液がアルブミン無添加であること。</li> </ul> <p><b>対応策</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・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。</li> <li>・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。</li> </ul> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>●<b>残件</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・交換用サーモプレートの送付</li> <li>・過去測定データの確認</li> </ul>	
以上	

## 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

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・融解を行った発育良好胚と、2日目以降細胞分裂の見られない発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発育停止胚は、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( $10^{-15}$ mol/s)	18.375	0.26	0.625

$\Delta C_b$ :		-1.98E-09							
FileName	Fe(meas)	F(correct)		$\Delta C_e(\text{meas})$		$\Delta C(\text{correct})$		Rs	R
blank 1	-3.31E-16 ± 1.7111E-15	1.59 ± 1.71	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	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	0.50	-2.52E-09 ± 5.1776E-10	-5.35E-10 ± 5.1776E-10	10	70		
2.1	1.07E-14 ± 9.3527E-16	18.65 ± 0.94	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	1.27	1.67E-08 ± 1.3144E-09	1.87E-08 ± 1.3144E-09	10	70		
3.1	-2.20E-15 ± 9.0086E-16	-0.28 ± 0.90	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	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	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	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( $10^{-15}$ mol/s)	17.095	0.805	0.86	20.357

$\Delta C_b$ :		-1.53E-09							
FileName	Fe(meas)	F(correct)		$\Delta C_e(\text{meas})$		$\Delta C(\text{correct})$		Rs	R
blank 2	-1.11E-15 ± 9.1596E-16	0.38 ± 0.92	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	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	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	0.67	1.62E-08 ± 6.8964E-10	1.78E-08 ± 6.8964E-10	10	70		
3.1	-1.38E-15 ± 9.8630E-16	0.11 ± 0.99	0.99	-1.42E-09 ± 1.0183E-09	1.09E-10 ± 1.0183E-09	10	70		
3.2	1.36E-17 ± 1.1157E-15	1.5 ± 1.12	1.12	1.40E-11 ± 1.1519E-09	1.55E-09 ± 1.1519E-09	10	70		
4.1	-1.30E-15 ± 7.8368E-16	0.18 ± 0.78	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	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	1.10	-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	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	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	0.79	1.59E-08 ± 8.1974E-10	1.74E-08 ± 8.1974E-10	10	70		

## 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

平成24年度～26年度 分担研究報告書

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。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した。平成 24 年から平成 26 年度の 3 年間に、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸測定装置の有用性と安全性の検証を行った。その結果、マウスおよびウシ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を示すことができた。

## 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。

## 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

細胞の呼吸活性を指標とする胚品質診断法を開発するには、「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、マウスおよびウシの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」の有用性と安全性を検証した。具体的には、細胞生物学・分子生物学的解析技術を駆使したミトコンドリア呼吸機能を総合的に解析することで、「受精卵呼吸測定装置」の性能評価と、胚品質評価に対する有用性を検証するとともに、胚や卵子の培養試験および移植試験により「細胞呼吸測定システム」の安全性を調べた。

### (2) 材料

C57BL/6およびICR系マウスを実験に用いた。雌マウスに過排卵を誘発し、同系統の雄マウスと同居させ、翌日に胚を回収した。卵割が停止しているなど明らかに異常が認められた胚を排除し、形態的に正常な胚盤胞のみを実験に使用した。ウシ胚は、以下の方法で作製した。ウシ卵巣から卵丘細胞-卵子複合体

(COC)を採取し、IVMD101培地で成熟培養を行った後、体外受精を行った。受精卵は、IVD101培地を用いて培養し、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) 胚の酸素消費量測定

マウス胚および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)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、胚近傍を鉛直方向に3回走査した。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) 活性型ミトコンドリアの局在と膜電位の解析

MitoTracker Orange CM-H2 TMRosを用いてマウス胚を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて活性型ミトコンドリアの細胞内分布を調べた。また、ミトコンドリアの膜電位に依存して緑色(不活性型)から赤色(活性型)へ変化するJC-1を用いてミトコンドリアを染色し、相対膜電位(緑色/赤色)を算出した。ウシ胚のミトコンドリア膜電位の解析にはJC-10を用いた。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、赤色/緑色の比から相対膜電位を算出した。

### (5) 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。

### (6) シトクロームcオキシダーゼ(COX)遺伝子の発現解析

呼吸測定による胚品質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I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。

#### (7) 胚の移植と安全評価試験

受精卵呼吸測定装置による胚品質評価の有効性を検証する目的で、胚移植試験を実施した。呼吸活性  $0.70 \times 10^{-14}$  mol/s 以上の胚盤胞を選別し、偽妊娠 3 日目の受容雌マウス (ICR) の子宮内に、1 匹当たりの移植胚数が 10 個前後となるように移植した (測定群)。移植後 17 日目に分娩および産子数を確認した。偽妊娠 3 日目の受容雌マウス (ICR 系統) をネンブタールで麻酔し、第一腰椎付近の皮膚を切開した。脂肪-卵巣-卵管-子宮組織を引き出し、子宮内へ胚を 10 個前後移植した。移植後、引き出した全ての組織を腹腔内へ戻し、皮膚をオートクリップで縫合し、保温して覚醒させた。形態的に正常で、呼吸量  $0.70 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$  以上の胚盤胞を移植したものを「測定群」、呼吸量を測定せずに形態的評価のみで選別した胚盤胞を測定群と同条件で移植したものを「対照群」とした。胚移植後 17 日目に分娩を確認し、得られた産子の正常性を検証する目的で表現型解析を実施した。繁殖能力試験に加えて、マウスの行動解析としてオープンフィールドテスト (一般活動性・情動性・馴化の試験法)、オープンスペース水泳テスト (運動能力・動機づけの試験法) および水迷路学習課題 (空間認知・学習能力・記憶力の試験法) を実施した。

### C・研究結果

#### (1) 細胞呼吸測定システムの有効性・安全性の検証

##### (a) 胚の酸素消費量測定

マウスの卵子および初期胚の発生過程における酸素消費量の変化を調べた結果、GV 期卵子および MII 期卵子における酸素消費量は卵成熟による変化は

なかった。受精卵の発生過程における酸素消費量を調べた結果、2 細胞期以降、発生の際に伴い酸素消費量が増加し、桑実胚、胚盤胞および脱出胚盤胞へと発生するにしたがい顕著な呼吸量は増加した。一方、ウシ胚では、8 細胞期までは呼吸量は低くかったが、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) 活性型ミトコンドリアの局在と膜電位の解析

マウス胚において活性型ミトコンドリアは、2~4 細胞期の胚では細胞内にほぼ均一に存在していたが、8 細胞期胚では割球の外縁部にミトコンドリアのクラスターが観察された。桑実胚および胚盤胞では核の周辺に活性型ミトコンドリアの大きなクラスターが形成されていた。次に、2 細胞期胚と胚盤胞におけるミトコンドリア膜電位活性を比較した結果、酸素消費量が大きい胚盤胞の方がミトコンドリアの膜電位活性が高いことがわかった。ウシ胚を JC-10 で染色した結果、8 細胞期胚において赤色蛍光が強い割球が観察され、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た。胚盤胞およ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。ミトコンドリアの相対膜電位は、桑実胚期以降に顕著に上昇した。

##### (c) ATP 量測定

マウス胚では、2 細胞期から 8 細胞期までは 1 胚当たりの ATP 含量は顕著に増加し、桑実胚および胚盤胞のステージでは 8 細胞期胚に比べて有意に減少した。一方、ウシ胚では胚の 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) シトクローム c オキシダーゼ (Cox) 遺伝子の発現解析

マウス胚ではミトコンドリアゲノム由来の COX1、COX2 および COX3 は、1 細胞期から胚盤胞期までの全ての発生ステージで発現していた。一方、核ゲノム由来の COX5a、COX5b および COX6b は、2 細胞期以降徐々に



発現量が増加したが、COX4 は全ての発生ステージにおいて発現は認められなかった。マウス胚では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明らかになった。一方、ウシ胚では COX1、COX2 および 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。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 細胞期および 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。ウシ胚では、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、桑実胚から発現量が増えることが明らかになった。

#### (e) 胚移植試験と安全性評価試験

呼吸測定を行わずに形態観察により胚盤胞と判定した胚を移植した対照群では 18 匹の受容雌マウスに合計 175 個の胚を移植した結果、7 匹が分娩 (38.9%) し、合計 41 匹の産子を得た (産子率: 23.4%)。一方、測定群では 16 匹の受容雌マウスに合計 170 個の胚を移植した結果、12 匹が分娩し (分娩率: 75.0%)、合計 67 匹の産子が得られ (産子率: 39.4%)、対照群と比較して移植成績が有意に上昇した。

胚移植試験で得られた産子の表現型解析を実施した結果、産子の生時体重は、対照群と測定群で有意差は無く、その後の体重増加にも有意差は認められなかった。また、G バンド法による染色体検査や主要臓器 (脳、肺、胃、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、心臓、大腿二頭筋、卵巣、精巣) の組織学的検査、血液生化学検査においても異常所見は認められなかった。また、行動解析 (一般活動性・情動性・馴化の試験としてオープンフィールドテスト、運動能力・体力の試験としてオープンスペース水泳テスト、空間認知・学習能力・記憶力の試験と

して水迷路学習テストおよびプローブテスト) を実施したが、いずれのテストにおいても対照群と測定群のマウスで有意差は認められなかった。さらに、測定群の産子は性成熟後に繁殖試験を実施し、少なくとも 5 世代目までは正常な繁殖能力を有していることが確認された。

#### 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。本研究では、呼吸測定による胚品質評価の有効性と安全性を以下の解析により検証することができた。

マウスの胚および卵子におけるミトコンドリア呼吸機能の解析を重点的に行った結果、「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ことができた。本研究は、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でこれまではないアプローチである。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できるとともに、呼吸測定の安全性 (非侵襲性) 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。

胚や移植試験によって、呼吸活性を指標とする胚品質評価の有効性を示すことができた。また、胚の発生能や受胎 (妊娠) に呼吸が深く関与しており、呼吸活性値を基準に発生良好な卵子や胚、妊娠が期待できる高品質な胚を効率的に選別できることが示された。さらに、呼吸測定を行った胚を移植し得られた産子の詳細な解析を行った結果、医療応用へ向けて「受精卵呼吸測定装置」の安全性と呼吸量測定による胚品質診断法の有効性を確認することができた。

## E・結論

本研究事業において、マウスおよびウシ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を科学的に検証することができた。

## G・研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kumasako Y., Goto K., Koike M., Araki Y., Abe H., Utsunomiya T. (2013) Respiration activity of single blastocysts measured by scanning electrochemical microscopy: The relationship between pre-freezing and post-warming. *J. Mamm Ova Res.*, 30 (1):30-35.
- (2) Yoshida H., Abe H., Arima T. (2013) Quality evaluation of IVM embryo and imprinting genes of IVM babies. *J. Assit. Reprod. Genet.*, 30 (2): 221-225.
- (3) 阿部宏之 (2013) 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、*日本胚移植学雑誌*、35 (1): 7-14.
- (4) Hirobe T., Ito S., Wakamatsu K., Kawa Y. Abe H. (2014) Mouse brown (b/Tyrplb) allele inhibits eumelanin but not pheomelanin synthesis. *Zool. Sci.*, 31:53-63.
- (5) Miyano Y., Tahara S., Sakata I., Sakai T., Abe H., Kimura S., Kurotani R. (2014) Regulation of LH/FSH expression by secretoglobin 3A2 in the mouse pituitary gland. *Cell Tiss. Res.*, 356: 253-260.
- (6) Hoshino S., Kurotani R., Miyano Y., Sakahara S., Koike K., Maruyama M., Ishikawa F., Sakata I., Abe H., Sakai T. (2014) Macrophage colony-stimulating factor induces prolactin expression in rat pituitary glands. *Zool. Sci.*, 31:390-397.
- (7) Sato M., Kanno T., Ishihara S., Suto H., Takahashi T., Kurotani R., Abe H., Nishida I. (2014) Imaging of rat brain using short graded-index multimode fiber. *Proc. of the International Society for Optics and Photonics*, Vol. 8928, 89281D-1~D-7.
- (8) Sakagami N., Nishida K., Akiyama K., Abe H., Hoshi H., Suzuki

C., Yoshioka K. (2014) Relationship between oxygen consumption rate, viability and subsequent development of in vivo-derived porcine embryos. *Theriogenology*, in press.

- (9) Mori C., Yabuuchi A., Ezoe K., Murata N., Takayama T., Okimura T., Uchiyama K., Takakura K., Abe H., Wada K., Okuno T., Kobayashi T., Kato K. (2015) Hydroxypropyl cellulose as an option for supplementation of cryoprotectant solutions for embryo vitrification in human assisted reproductive technologies. *Reproductive BioMedicine Online*, accepted.
- (10) 阿部宏之 (2014) ARTにおける新技術・酸素消費と胚評価、臨床婦人科産科「生殖医療の進歩と課題- 安全性の検証から革新的知見まで」、68巻1号: 20-27.
- (11) 阿部宏之 (2014) 酸素消費測定による胚の品質評価 - 超高感度細胞呼吸測定装置の開発と不妊治療における臨床応用-、医学のあゆみ「生殖医療の最前線」、249 (1):19-24.
- (12) 阿部宏之、黒谷玲子 (2015) 多項目解析技術を駆使したウシ初期胚ミトコンドリア呼吸機能解析、産婦人科の実際、印刷中.

### 2. 学会発表

- (1) 海藤康平、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2012) ウシ初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能解析: シトクロムcオキシダーゼ遺伝子発現の解析、第53回日本哺乳動物卵子学会 (大阪市、千里ライフサイエンスセンター、2012年5月26-27日)
- (2) 渡邊剛広、島麗香、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2012) マウス初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能とシトクロムcオキシダーゼ遺伝子発現の解析、第53回日本哺乳動物卵子学会 (大阪市、千里ライフサイエンスセンター、2012年5月26-27日)
- (3) 坂上信忠、三角浩司、秋山清、西田浩司、山本禎、山本千尋、阿部宏之、星宏良、鈴木千恵、吉岡耕治 (2012) MVAC法を用いてガラス化保存したブタ体内発育胚の呼吸量と生存性、第53回日本哺乳動物卵子学会 (大阪市、千里ライフ

- サイエンスセンター、2012年5月26-27日)
- (4) 阿部宏之 (2012) 卵子も呼吸している!! ~電気化学と生命科学の異分野融合研究は生殖医療を変えるのか?~、生物工学若手の集い 夏のセミナー2012 (岩沼市、モンタナリゾート岩沼、2012年6月30日-7月1日)
  - (5) 海藤康平、島 麗香、古舘 晃、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2012) ウシ初期発生におけるミトコンドリア呼吸機能解析: シトクロム c オキシダーゼ遺伝子の発現解析、第50回日本生殖医学会東北ブロック総会・学術講演会 (仙台市、フォレスト仙台、2012年7月14日)
  - (6) 渡邊剛広、島 麗香、高倉 啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2012) マウス初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能とシトクロム c オキシダーゼ遺伝子発現の解析、第50回日本生殖医学会東北ブロック総会・学術講演会 (仙台市、フォレスト仙台、2012年7月14日)
  - (7) 木村隼己、栢本亮太、高倉 啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2012) 異なる遺伝的背景をもつマウス胚の発生解析: リアルタイム培養細胞観察装置を用いたタイムラプス観察、第50回日本生殖医学会東北ブロック総会・学術講演会 (仙台市、フォレスト仙台、2012年7月14日)
  - (8) 渡邊剛広、島麗香、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2012) マウス初期胚におけるシトクロム c オキシダーゼ遺伝子の発現解析、第105回日本繁殖生物学会 (つくば市、筑波大学大学会館、2012年9月6-8日)
  - (9) 木村隼己、栢本亮太、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2012) 異なる遺伝的背景をもつマウス胚のタイムラプス発生解析、日本動物学会第83回大会 (大阪市、大阪大学豊中キャンパス、2012年9月13-15日)
  - (10) 阿部宏之、海藤康平、古舘 晃、高倉啓、黒谷玲子 (2012) ウシ初期胚におけるシトクロム c オキシダーゼ遺伝子の発現解析、日本動物学会第83回大会 (大阪市、大阪大学豊中キャンパス、2012年9月13-15日)
  - (11) 古舘晃、海藤康平、伊藤卓也、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2012) ウシ初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能解析: シトクロム c オキシダーゼ (Cox) 遺伝子発現の解析、日本動物学会平成24年度東北支部大会 (山形市、山形大学理学部、2012年7月21日)
  - (12) 阿部宏之 (2012) 呼吸量測定による胚・卵子品質評価の現状と課題 ~電気化学と生命科学の異分野融合研究は生殖医療を変えるのか?~、第19回日本胚移植研究会大会 (富山市、富山大学黒田講堂、2012年9月27-28日)
  - (13) 阿部宏之 (2012) 先端工学技術を応用した生殖細胞品質評価システムの開発、平成24年精子研究会 (仙台市、東北大学農学部、2012年11月10日)
  - (14) Sakahara S., Watanabe T., Takakura K., Kurotani R., Abe H. (2012) Multiple analyses of mitochondrial respiration activity in single mouse embryos. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, The 6<sup>th</sup> International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & The 8<sup>th</sup> International Forum on Post-Genome Technologies (Kyoto Research Park Building No.1 Science Hall, Kyoto, Japan, November 27-28, 2012)
  - (15) Takakura K., Watanabe T., Sakahara S., Kurotani R., Abe H. (2012) Analyses of respiration activity in single culture cells. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, The 6<sup>th</sup> International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & The 8<sup>th</sup> International Forum on Post-Genome Technologies (Kyoto Research Park Building No.1 Science Hall, Kyoto, Japan, November 27-28, 2012)

- (16) 古舘晃、田村涼、海藤康平、高倉啓、坂原聖士、荒井康子、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 長期保存ウシ卵巣から採取した卵子の品質評価、第28回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (栃木県宇都宮市、ホテル東日本宇都宮、2013年2月7-8日)
- (17) 伊藤卓也、古舘晃、田村涼、高倉啓、坂原聖士、荒井康子、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) ウシ卵子の品質評価を目的とした呼吸鎖複合体遺伝子の発現解析、第28回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (栃木県宇都宮市、ホテル東日本宇都宮、2013年2月7-8日)
- (18) 田村涼、古舘晃、海藤康平、高倉啓、坂原聖士、荒井康子、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) リアルタイム培養細胞観察システムを用いたウシ体外受精胚の発生解析、第28回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (栃木県宇都宮市、ホテル東日本宇都宮、2013年2月7-8日)
- (19) 高倉啓、栢本亮太、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2013) 光干渉断層撮影法を応用したマウス卵巣内卵胞の非侵襲的観察、第54回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013年5月25-26日)
- (20) 渡邊剛広、島麗香、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) マウス胚におけるシトクロムcオキシダーゼ遺伝子発現とミトコンドリア呼吸機能の解析、第54回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013年5月25-26日)
- (21) 木村隼己、野中亜希子、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 異なるマウス系統における胚発生とミトコンドリア呼吸機能の解析、第54回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013年5月25-26日)
- (22) 伊藤卓也、古舘晃、田村涼、海藤康平、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) ウシ胚におけるシトクロムcオキシダーゼ (COX) mRNA の解析、第54回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013年5月25-26日)
- (23) 古舘晃、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) ウシ卵巣の保存時間が卵子のミトコンドリア呼吸機能に及ぼす影響、日本動物学会平成25年度東北支部大会 (秋田県秋田市、秋田大学手形キャンパス大学会館クレール、2013年7月20日)
- (24) 高橋布美奈、木村隼己、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) 異なる系統のマウス胚における発生能とミトコンドリア呼吸機能の解析、日本動物学会平成25年度東北支部大会 (秋田県秋田市、秋田大学手形キャンパス大学会館クレール、2013年7月20日)
- (25) 今井裕美、田村涼、古舘晃、高倉啓、坂原聖士、荒井康子、黒谷玲子、阿部宏之 (2013) リアルタイム培養細胞観察システムを用いたウシ体外受精胚の発生解析、日本動物学会平成25年度東北支部大会 (秋田県秋田市、秋田大学手形キャンパス大学会館クレール、2013年7月20日)
- (26) 阿部宏之、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、渡部裕輝 (2013) 光干渉断層画像化法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージング、日本動物学会平成25年度東北支部大会 (秋田県秋田市、秋田大学手形キャンパス大学会館クレール、2013年7月20日)
- (27) 阿部宏之 (2013) 先端工学技術を応用した生殖細胞品質診断システムの開発と臨床応用、第31回日本受精着床学会学術講演会 (大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013年8月8-9日) ワークショップ (招待)
- (28) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、大津英子、長木美幸、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2013) 電気化学計測技術を応用したヒト胚品質評価法の開発と不妊治療における臨床的有用性に関する研究、第31回日本受精着床学会学術講演会 (大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013年8月8-9日) シンポジウム (招待)
- (29) 阿部宏之、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、渡部裕輝 (2013) 光干渉断層画像化法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージングシステムの開発、

- 第 31 回日本受精着床学会学術講演会（大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日）
- (30) 黒谷玲子、伊藤卓也、高倉 啓、坂原聖士、阿部宏之（2013）ウシ初期胚におけるシトクロム c オキシダーゼ (COX) mRNA の発現解析、第 31 回日本受精着床学会学術講演会（大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日）
- (31) 森智絵美、高倉啓、藪内晶子、村田奈々、阿部宏之、勝股克成、福田淳一郎、青野文仁、小林保、加藤恵一（2013）胚盤胞凍結保存液におけるヒドロキシプロピルセルロースの有用性、第 31 回日本受精着床学会学術講演会（大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日）
- (32) 木村隼己、坂原聖士、高倉 啓、黒谷玲子、阿部宏之（2013）異なる遺伝的背景をもつマウス胚の発生能とミトコンドリア機能の解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会（東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日）
- (33) 渡邊剛広、島 麗香、坂原聖士、高倉 啓、黒谷玲子、阿部宏之（2013）マウス初期発生における呼吸鎖複合体 IV 遺伝子発現とミトコンドリア呼吸機能の解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会（東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日）
- (34) 高倉 啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之（2013）光干渉断層画像化法を用いたマウス卵巣内卵胞の非侵襲的定量解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会（東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日）
- (35) 坂原聖士、渡邊剛広、坂上信忠、黒谷玲子、阿部宏之（2013）単一ブタ胚におけるシトクロム c オキシダーゼ mRNA の検出、第 106 回日本繁殖生物学会大会（東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日）
- (36) 古舘 晃、高倉 啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之（2013）長期保存ウシ卵巣から採取した卵子の品質評価とミトコンドリア呼吸機能解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会（東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日）
- (37) 木村隼己、高橋布美奈、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之（2013）異なる系統のマウスにおける胚発生能とミトコンドリア機能の解析、日本動物学会第 84 回大会（岡山県岡山市、岡山大学津島キャンパス、2013 年 9 月 26-28 日）
- (38) 渡邊剛広、島 麗香、坂原聖士、高倉 啓、黒谷玲子、阿部宏之（2013）マウス胚初期発生におけるシトクロム c オキシダーゼ (COX) 遺伝子発現の解析、日本動物学会第 84 回大会（岡山県岡山市、岡山大学津島キャンパス、2013 年 9 月 26-28 日）
- (39) 阿部宏之、高倉 啓、黒谷玲子、渡部裕輝（2013）光干渉断層画像化法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージングシステム、日本動物学会第 84 回大会（岡山県岡山市、岡山大学津島キャンパス、2013 年 9 月 26-28 日）
- (40) 阿部宏之、珠玖 仁、黒谷玲子（2013）電気化学計測技術を応用した単一細胞ミトコンドリア呼吸機能解析システムの開発と医療応用、日本化学会第 7 回バイオ関連化学シンポジウム（愛知県名古屋市長、名古屋大学豊田講堂・野依学術交流館、9 月 27-29 日）
- (41) 高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之（2013）光干渉断層撮影法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージング、第 51 回東北生殖医学会（青森市、青森市文化観光交流施設、2013 年 11 月 2 日）
- (42) 坂原聖士、渡邊剛広、坂上信忠、黒谷玲子、阿部宏之（2013）単一ブタ体内受精胚におけるシトクロム c オキシダーゼ mRNA の検出、第 51 回東北生殖医学会（青森市、青森市文化観光交流施設、2013 年 11 月 2 日）
- (43) 阿部宏之、島 麗香、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子（2013）ウシ胚におけるシトクロム c オキシダーゼ (呼吸鎖複合体 IV) mRNA の発現解析、第 51 回東北生殖医学会（青森市、青森市文化観光交流施設、2013 年 11 月 2 日）

- (44) 坂原聖士、坂上信忠、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) 単一ブタ胚におけるシトクロムcオキシダーゼ (Cox) mRNA検出システムの開発、第55回日本卵子学会 (神戸市、神戸国際会議場、2014年5月17-18日)
- (45) 高倉 啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) ドップラー光干涉断層画像化技術を応用した3次元卵胞イメージングシステムの開発、第55回日本卵子学会 (神戸市、神戸国際会議場、2014年5月17-18日)
- (46) 木村隼己、高橋布美奈、高倉 啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) 受精条件が胚の発生及びミトコンドリア呼吸機能に及ぼす影響の解析、第55回日本卵子学会 (神戸市、神戸国際会議場、2014年5月17-18日)
- (47) 高倉 啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) ドップラー光干涉断層撮影法を応用したマウス卵胞の高感度3次元イメージング解析、日本動物学会平成26年度東北支部大会 (盛岡市、岩手大学復興祈念銀河ホール、2014年7月12-13日)
- (48) 小林義蔵、高倉 啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) ウシ胚発生過程における呼吸鎖複合体IV (Cox) 遺伝子発現の解析、日本動物学会平成26年度東北支部大会 (盛岡市、岩手大学復興祈念銀河ホール、2014年7月12-13日)
- (49) 坂田昂弥、高倉 啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) 蛍光プローブJC-10を用いたウシ初期胚におけるミトコンドリア膜電位活性の解析、日本動物学会平成26年度東北支部大会 (盛岡市、岩手大学復興祈念銀河ホール、2014年7月12-13日)
- (50) 高倉 啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) ドップラー光干涉断層画像化法を応用した高感度卵胞3次元イメージング、第32回日本受精着床学会学術講演会 (東京都、ハイアットリージェンシー東京、2014年7月31日-8月1日)
- (51) 坂原聖士、渡邊剛広、坂上信忠、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) シトクロムcオキシダーゼ (Cox) mRNA発現解析による単一ブタ胚品質評価、第32回日本受精着床学会学術講演会 (東京都、ハイアットリージェンシー東京、2014年7月31日-8月1日)
- (52) 阿部宏之、島 麗香、今井祐未、高倉 啓、坂原聖士、黒谷玲子 (2014) 多項目解析技術を駆使したウシ初期胚ミトコンドリア呼吸機能解析、第32回日本受精着床学会学術講演会 (東京都、ハイアットリージェンシー東京、2014年7月31日-8月1日)
- (53) 黒谷玲子、渡邊剛広、高倉 啓、坂原聖士、阿部宏之 (2014) マウス卵子及び初期胚におけるシトクロムcオキシダーゼ (Cox) mRNAの発現解析、第32回日本受精着床学会学術講演会 (東京都、ハイアットリージェンシー東京、2014年7月31日-8月1日)
- (54) 木村隼己、高倉 啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) 異なる受精条件で作製したマウス胚の発生能とミトコンドリア機能の解析、日本動物学会第85回大会 (仙台市、東北大学川内北キャンパス、2014年9月11-13日)
- (55) 高倉 啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) ドップラー光干涉断層画像化技術を応用したマウス卵胞の三次元非侵襲イメージング、日本動物学会第85回大会 (仙台市、東北大学川内北キャンパス、2014年9月11-13日)
- (56) 広部知久、伊藤祥輔、若松一雅、河 陽子、阿部宏之 (2014) マウスブラウン遺伝子はメラノサイトにおける黄色メラニン生成に影響しない、日本動物学会第85回大会 (仙台市、東北大学川内北キャンパス、2014年9月11-13日)
- (57) 阿部宏之、島 麗香、高倉 啓、坂原聖士、黒谷玲子 (2014) 多項目解析技術を駆使したウシ初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能の解析、日本動物学会第85回大会 (仙台市、東北大学川内北キャンパス、2014年9月11-13日)
- (58) 坂原聖士、坂上信忠、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) 単一ブタ胚におけるシトクロムcオキシダーゼ遺伝子発現解析、日本動物学会第85回大会 (仙台市、東北大学川内北キャンパス、2014年9月11-13日)

11-13日)

- (59) 黒谷玲子、松本良江、宮野佑樹、阿部宏之 (2014) 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) におけるセクレトグロビン (SCGB) 3A2の役割の解明、日本動物学会第85回大会 (仙台市、東北大学川内北キャンパス、2014年9月11-13日)
- (60) Kurosawa H., Utsunomiya H., Shiga N., Takahashi A., Ishibashi M., Watanabe Z., Abe H., Terada Y., Takahashi T., Fukui A., Suganuma R., Yaegashi N. (2014) Novel automated device with the chip electrode for monitoring respiratory activity of embryos. 2014 Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (Honolulu, Hawaii, USA, October 18-22, 2014)
- (61) 志賀尚美、宇都宮裕貴、石橋ますみ、黒澤大樹、渡邊善、菅沼亮太、福原理恵、福井淳史、五十嵐秀樹、高橋俊文、阿部宏之、熊谷仁、寺田幸弘、八重樫伸生 (2014) 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62回北日本産婦人科学会 (金沢市、ホテル金沢、2014年9月28日)
- (62) 坂上信忠、西田浩司、秋山清、阿部宏之、青柳重夫、内海陽介、星宏良、鈴木千恵、吉岡耕治 (2014) 走査型電気化学顕微鏡を用いた呼吸量測定による非侵襲的で客観的な豚受精卵の品質評価の試み、平成26年度神奈川県ものづくり技術交流会 (神奈川県海老名市、神奈川県産業技術センター、2014年10月22-24日)
- (63) 渡部裕輝、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) OCTを用いたマウス卵巣内卵胞のリアルタイム計測、日本光学会年次学術講演会 (東京、筑波大学東京キャンパス文京校舎、2014年11月5-7日)
- (64) 志賀尚美、宇都宮裕貴、石橋ますみ、黒澤大樹、渡邊善、菅沼亮太、福原理恵、福井淳史、五十嵐秀樹、高橋俊文、阿部宏之、熊谷仁、寺田幸弘、八重樫伸生 (2014) 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回日本生殖医学会学術講演会 (東京、京王プラザホテル、2014年12月4-5日)
- (65) Abe H. (2014) Evaluation the quality of single embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of respiration activity by scanning electrochemical microscopy. The 16<sup>th</sup> Chongqing ART Conference (Chongqing, China, November 20-22, 2014)

#### H・知的財産権の取得状況

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

## II. 分担研究報告書

### 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

平成25年度～26年度

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

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

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 転写機構に關与する Mitochondrial transcriptional factor A の発現の変化からも検討を行った。

研究協力者

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 ヒアルノ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を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。

## 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、卵の質の低下と関連する可能性が示唆された。

## F・研究発表

### 1. 論文発表

Peer review誌に投稿中

### 2. 学会発表

(1) 五十嵐秀樹. 加齢に伴う卵の質低下と「卵の若返り」を目的としたミトコンドリア移植の試み. 第13回日本抗加齢医学会、横浜  
2013. 6. 28-30

(2) 五十嵐秀樹、高橋俊文、倉智博久. 加齢に伴う卵の質低下と酸化ストレスの関与. 第58回日本生殖医学会、神戸  
2013. 11. 15-16

(3) 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

(4) 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

(5) 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

(6) 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

(7) 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

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