

図表 1・2

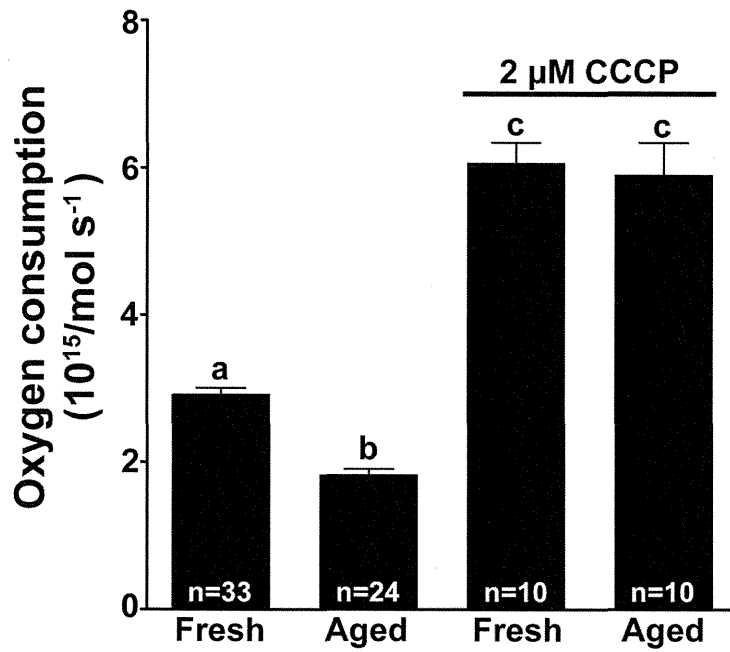


図1. 新鮮卵と加齢卵における酸素消費量

CCCP: Carbonyl cyanide -chlorophenylhydrazone (脱共役剤)

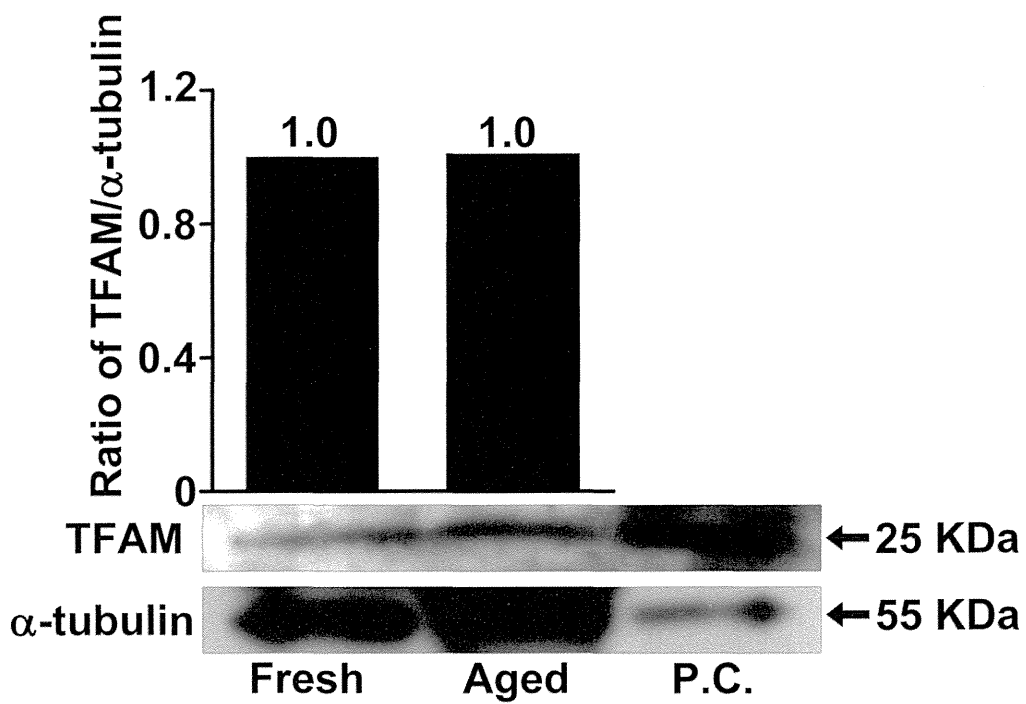


図2. 新鮮卵と加齢卵におけるmitochondria transcriptional factor Aの発現

TFAM: mitochondria transcriptional factor A

P.C.: positive control (卵巣癌細胞株)を使用

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

平成25年度～26年度

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・胚移植を施行した胚のうち、肉眼所見が不良であるために胚移植せず廃棄されることになった胚あるいは異常受精のために胚移植することが出来なかった胚を用い、胚呼吸量が胚の状態を反映するのかを明らかにすることを目的とした。本検討の結果、前核数が増加すると呼吸量は低下する可能性が示唆され、胚が発育するにつれて胚呼吸量は低下する可能性も示唆された。また肉眼的不良胚で呼吸が過剰になっており、これは胚が死滅する直前に胚に無理な酸素消費がある可能性、すなわち通常の呼吸の状態ではない可能性も考えられた。これまでの他家の検討も考え合わせると呼吸が多くても少なくとも胚の状態はよくない可能性があると思われ、胚には至適胚呼吸量というものが存在するのではないかと思われた。

また自動受精卵呼吸測定装置開発後に胚呼吸量を測定するために、廃棄卵を集める試みを行った。すなわち現在胚を凍結保存しているものに対し、今後の胚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。その結果144名527個の廃棄希望卵が集積された。

研究協力者

福原理恵（つがる総合病院産婦人科科長）

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。

そこで今回、当科において体外受精・胚移植を施行した胚のうち、肉眼所見が不良であるために胚移植せず廃棄されることになった胚あるいは異常受精のために胚移植することが出来なかった胚を用い、胚呼吸量が胚の状態を反映するのかどうかを明らかにすることを目的とした。また胚呼吸量測定が胚の状態を反映するのであれば、胚移植に際して、肉眼所見の他にもうひとつ別のパラメーターを加えて胚移植を行うことが可能となり、妊娠率の向上につながると考えられる。また確実に良好な胚を1個のみ移植できるようになるのであれば、多胎妊娠率の減少につながるのと考えられる。

また体外受精・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、自動受精卵呼吸測定装置を用いた胚呼吸量測定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する胚があるかを検討した。

B. 研究方法

①余剰胚を用いた胚呼吸量測定

当科において体外受精・胚移植（新鮮胚移植、凍結胚移植）を予定したもののうち、正常受精が確認（2PN）されたもののうち胚発育不良であり胚移植することが出来なかった胚（n=17）、および異常受精と考えられた1PN胚（n=5）、3PN胚（n=3）を対象とした。胚発育が不良であったものは、胚移植がキャンセルとなった時点で、1PN、3PN胚では適宜、胚呼吸能を検討した。

なお測定にはクリノ社製細胞呼吸活性（胚呼吸）測定装置を使用した。

②自動受精卵呼吸測定装置での胚呼吸測定に向けた廃棄卵確保

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

①余剰胚を用いた胚呼吸量測定

1. 前核数による比較：1PN胚（n=3）の呼吸活性は $4.47 \pm 1.41 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、2PN胚（n=24）の呼吸活性は $3.93 \pm 1.75 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、3PN胚（n=4）の呼吸活性は $3.76 \pm 0.82 \times 10^{15} \text{mol/S}$ であり、有意差は認めなかったものの前核数が多くなると胚呼吸活性が低下する傾向を認めた。
2. 胚の発育ステージによる比較：8細胞期胚（n=20）の呼吸活性は $3.57 \pm 1.59 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、桑実胚（n=9）の呼吸活性は 3.61 ± 1.58

10¹⁵mol/S、胚盤胞 (n=2) の呼吸活性は 4.95 ± 1.01 10¹⁵mol/S であり、①同様有意差は認めなかったが、胚が発育するにつれて胚呼吸量が増加する傾向を認めた。

3. 肉眼的良好胚と不良胚との比較：1PN、3PN 胚のうち測定時肉眼的に良好と見えた胚 (n=11) の呼吸活性は 3.61 ± 1.3 10¹⁵mol/S、肉眼的に不良と見えた胚 (n=20) の呼吸活性は 4.16 ± 1.75 10¹⁵mol/S であり、①②同様有意差を認めないものの、肉眼的に不良胚で呼吸活性が高い傾向を認めた。
4. 同一胚のを複数回測定しての検討：1PN 胚、3PN 胚で胚の発育をみながら複数科い測定し得た胚 (n=4) を対象として胚呼吸活性の変動を測定した。3PN 胚で日を追って観察した場合、一件胚発育は良好に見えるものでも呼吸量が低下していく胚が認められた。また 2PN 胚における検討では胚の状態は変化しなくても日を変えて測定すると胚呼吸量が低下するものや一見胚が発育しているように (桑実胚から初期胚盤胞へ発育) 見えても胚呼吸量は低下していた。

②自動受精卵呼吸測定装置での胚呼吸測定に向けた廃棄卵確保

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%)。

D. 考察

前核数からの検討より、前核数が増加すると呼吸量は低下する可能性が示唆された。また胚の発育ステージからの検討により胚が発育するにつれて胚呼吸量は低下する可能性も示唆された。肉眼的良好胚と不良胚での検討により不良胚で呼吸量が多いかもしれない可能性が示唆された。不良胚で胚呼吸が多くなっているということは不良胚において呼吸が過剰になっている可能性があると思われ、これは胚が死滅する直前に胚に無理な酸素消費がある可能性、すなわち通常の呼吸の状態ではない可能性も考えられた。これまでの他家の検討も考え合わせると呼吸が多くても少なくとも胚の状態はよくない可能性があると思われ、胚には至適胚呼吸量というものがあるのではないかと

と思われた。

また今後の自動受精卵呼吸測定装置による呼吸量測定に向けての胚凍結継続意志確認により、32.5%では胚の廃棄を希望した。これまで当院における凍結胚の凍結は、一度凍結料の支払いがなされれば継続して胚を凍結するシステムが取られていたが、今回のシステム改訂により、胚凍結継続意志の確認を行うことができた。また 527 個もの廃棄希望卵が得られ、これらの胚を日本産科婦人科学会でも認められているように生殖医学発展のための基礎的研究ならびに不妊症の診断治療の進歩に貢献する目的での研究に使用しうる可能性が示唆された。今後はこれら胚廃棄希望者に対して、胚呼吸量測定について改めて説明し、文書にて同意を得た上で、胚呼吸量測定に使用する予定である。

E・結論

ヒトにおいても胚呼吸量の測定は、胚の状態を反映している可能性があると思われるが、自動受精卵呼吸測定装置を用いるなどした更なる検討が必要である。

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. Yaegashi. 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; Hiroaki 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

(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

II. 分担研究報告書

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

平成25年度～26年度

分担研究者 菅沼亮太（福島県立医大学講師）

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

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

研究分担者 菅沼 亮太 福島県立医科大学講師

研究主旨

新しく開発した全自動受精卵呼吸測定装置は、以前にクリノ株式会社が開発した受精卵細胞呼吸活性測定装置（CRAS-1.0）に比較し、容易に操作可能な機器である。そこで、乳癌細胞株である MCF-7 のスフェロイドを使用し、酸素消費に伴う濃度勾配に着目し新規受精卵呼吸測定装置を用いて測定することを試みた。

まず始めにチップ型電極を用いて、フェロセンメディエータ液中で銀塩鹿銀参照電極を用いた酸化還元電流をサイクリック・ボルタンメトリー（CV）測定により検証した。また、MCF-7 細胞からスフェロイドを作成し酸素消費量を測定した。酸素濃度勾配のシュミレーションと酸素消費量を計算式で明らかにした。さらに、キャビティの直径と作用電極の直径を数サイズで検討し最適なサイズを確立した。次に CV 測定し、10 n A 以下の電流で測定可能なことを確認した。そして、200 μ m のスフェロイドを作成し 5 分以内に測定可能なことを検証した。また、溶存酸素濃度と受精卵中心からの距離を用いて関係式を明らかにした。

次に、試作のためにチップ型プローブの作成を行った。キャビティの直径と作用電極の直径を数サイズで検討し最適なサイズを確立した。そして CV 測定し、10 n A 以下の電流で測定可能なことを確認した。さらに 200 μ m のスフェロイドを作成し 5 分以内に測定可能なことを検証した。また、溶存酸素濃度と受精卵中心からの距離を用いて関係式を明らかにした。最後に、MCF-7 から作成したスフェロイド（n=22）の酸素消費量を測定した。直線性のデータが得られており、22 個中 18 個で相関係数 (R^2) が 0.9 以上と良い相関を示した。また、スフェロイド半径と酸素消費量との間には弱い相関がみられた。

以上より、スフェロイド実験においては、溶存酸素濃度と r/R の関係で良い線形関係のデータが得られていることより、電極距離依存的に酸素濃度勾配を検出できていることが示唆された。

研究協力者

鈴木 聡 (福島県立医大助手)

A・研究目的

以前にクリノ株式会社が開発した受精卵細胞呼吸活性測定装置 (CRAS-1.0) はマニュアルのマイクロプローブを用いた機器であり、手技習得に長期間のトレーニングを要する。そのため、一般の不妊診療には取り入れが困難で普及の妨げとなっていた。今回新しく開発した全自動受精卵呼吸測定装置は、全自動で小型であり湿潤環境で容易に操作可能な機器である。今回、乳癌細胞株であるMCF-7のスフェロイドを作成し、そのサイズや測定時間などを決め、その後に酸素消費に伴う濃度勾配に着目し新規受精卵呼吸測定装置を用いて測定することを試みた。次に、特別な手技習得を必要としない自動化されたデバイスを開発した。そして最終的にはこの機器を用いて、スフェロイドの酸素消費量測定が可能か検討した。

B・研究方法

まず始めに、チップ電極の設計・施策を行った。キャビティの直径 (50-400 μm で 6 種類) と作用電極の直径 (3-10 μm で 3 種類) を設定し、最適なサイズを確立した。次に従来機器のポテンショスタットを改造し、測定液中 (ERAM-2) での溶存酸素還元電流を測定した。さらに 200 μm のスフェロイドを作成し、5 分以内に測定可能か検証した。また、溶存酸素濃度と受精卵中心からの距離から関係式を検討にした。また、胚の酸素消費によって胚近傍の溶存酸素濃度が減少し、遠方との間に溶存酸素の濃度勾配が生じる。そこで胚が静置されている点を中心としてチップ上に半球面状の濃度勾配エリアが形成されており、中心より一定距離は

なれた各電極で酸素還元電流を測定し、保つポテンショスタット、解析用PCから構成されている。チップ型電極とは、半導体技術を用いて μm オーダーの正確さでチップ上に微小電極を配置し、チップ中央に受精卵を静置することによって、酸素消費量の指標となる酸素還元電流を検知するように開発されたものである (図1a-d)。チップの中央に受精卵を置くキャビティ (穴) 構造をエッチング技術により形成しており、微小電極はこのキャビティエッジより一定距離離れた地点に配置している。微小電極の作成方法としては、まずシリコンウェハの上にチタンの薄膜を形成し、その上に白金の薄膜を形成後、酸化シリコンで絶縁膜を形成する。エッチング技術により白金を酸化シリコン膜から露出させ、微小電極を形成している。制作当初は直線型配置 (図1a, b) としていたが、下記の実験1の結果を検討した後、リング型へ改良した (図1c, d)。直線型配置のチップ型電極では、酸素還元電流を2方向から測定し、キャビティ径を240 μm 、キャビティエッジより電極までの距離を20 μm 、50 μm 、100 μm 、150 μm 、200 μm 、300 μm としていたが、リング型電極では8方向から測定し、キャビティ径200 μm 、電極距離を20 μm 、70 μm 、120 μm 、200 μm 、300 μm 、400 μm とした。

胚の酸素消費によって胚近傍の溶存酸素濃度が減少し、遠方との間に溶存酸素の濃度勾配が生じる。胚が静置されている点を中心としてチップ上に半球面状の濃度勾配エリアが形成されており (図2)、中心より一定距離離れた各電極で酸素還元電流を測定し、半球面拡散理論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。また、実験においては、先行研究で用いられている呼吸測定液ERAM-2 (機能性ペプチド研究所) を用いた。

本機器を用いて、乳癌細胞株MCF-7から作成したスフェロイド (n=22) の酸素消費量を測定した。これらは培養液RPMI-1640にウシ胎児血清 (FBS) 10%、抗生剤Penicillin-Streptomycin 1%を添加されたものを用いて37°C、5% CO₂下本機器を用い

て、乳癌細胞株 MCF-7 から作成したスフェロイド (n=22) の酸素消費量を測定した。これらは培養液 RPMI-1640 にウシ胎児血清 (FBS) 10%、抗生剤 Penicillin-Streptomycin 1% を添加されたものを用いて 37°C、5% CO₂ 下で culture された。細胞浮遊液 20 μL を用いて、37°C、5%CO₂ 下で culture された。細胞浮遊液 20 μL を用いて、ハンギングドロップ法でスフェロイドを作成した。200 細胞/ドロップ、500 細胞/ドロップでスフェロイド作成を行い、day2 or day3 or day4 でスフェロイド半径と酸素消費量を測定し、両者の相関を調べた。

C・研究結果

図 3 に、検討したチップ構造を示す。この容器は受精卵をセッティングし培養器の中に置くだけで呼吸量が測定可能なため操作性は著しく改善する。最終的には、このチップ測定数が 4 個並んだ形で樹脂プレートに埋め込まれるように作成した。

ターゲットとなる構造 (各部の寸法等) を絞り込むため、キャビティの直径 (50-400 μm で 6 種類) と作用電極の直径 (3-10 μm で 3 種類) を設定し測定を行ったところ、キャビティの直径 200 μm、作用電極の直径 5 μm で最適な測定結果が得られた (図 4)。

次に、北斗電工が開発した従来機器のポテンショスタットを改造し、開発機器に接続をこころみた。ERAM-2 を測定液として溶存酸素還元電流を測定したところほぼ一致した結果が得られ、開発機器による測定が可能であることを確認した (図 5)。

さらに、乳癌細胞株である MCF-7 のスフェロイドを作成し、そのサイズを約 200 μm になるように設定した。そして、測定条件や測定対象などを決め、キャビティからの距離による酸素消費量を検討し、新規受精卵呼吸測定装置を用い

て距離依存的に測定可能なこと、そして 10 nA 以下の電流で測定可能なことを確認した。

図 6a にスフェロイドを用いて測定を行った際の、酸素濃度プロファイル versus r/R のグラフを示す (代表例)。直線性のデータが得られており、22 個中 18 個で相関係数 (R²) が 0.9 以上と良い相関を示した。スフェロイド酸素消費量とスフェロイド半径の関係をプロットしたものを図 6b に示す。スフェロイド半径と酸素消費量との間には弱い相関がみられた。

D・考察

今回のスフェロイド実験において、溶存酸素濃度と r/R の関係で良い線形関係のデータが得られていることより、電極距離依存的に酸素濃度勾配を検出できていることが示唆された。スフェロイドにおいては、半径と酸素消費量がよく相関すると報告されており、同じサイズであればほぼ同等の呼吸量を示すと考えられたが、2 倍以上の呼吸活性値の差がみられた。データのバラツキの原因としては、①設計である直線型電極配置チップのため検出感度が十分ではなく電気的な「外乱ノイズ」によって呼吸計算値に誤差が生じていた可能性や、②スフェロイドの導入/回収による測定液の状態変化に対するデータ解析上の補正が十分ではなく、その解析誤差を含んでいる可能性、の 2 点が主に考えられた。

E・結論

今回の検討より、チップ型電極の設計・施策が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が可能であることが明らかになった。そして、チップ型電極の設計・

施策が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が可能であることが明らかになった。今後は動物卵やヒト余剰卵における計測で、実用化を目指していく。

F・研究発表

1. 論文発表

Peer review誌に投稿中

2. 学会発表

- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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)

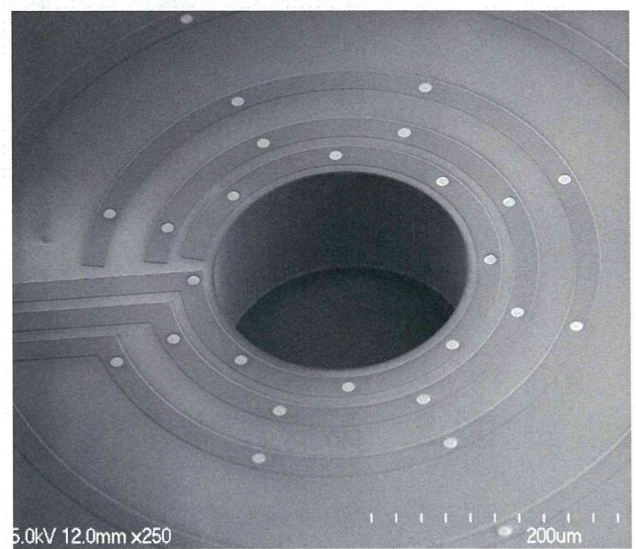
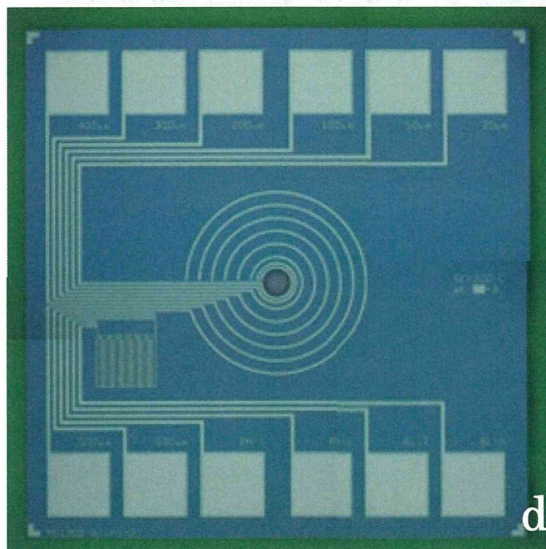
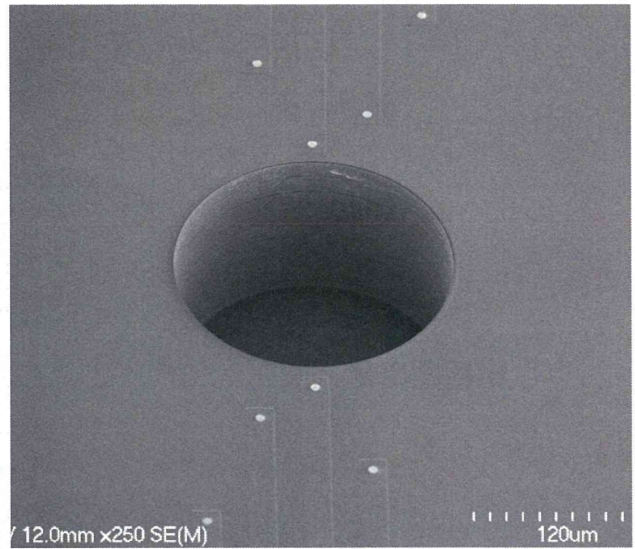
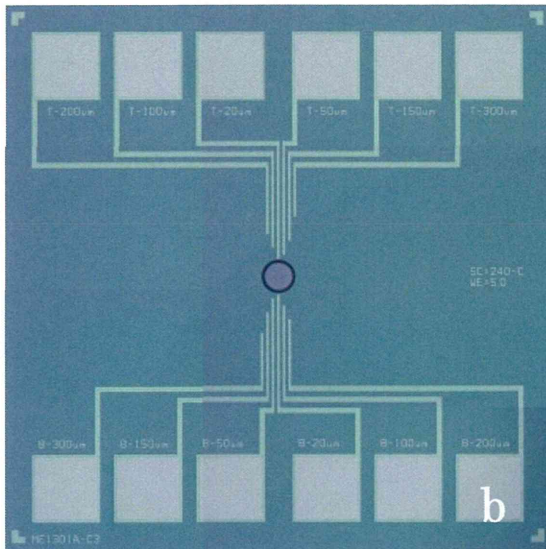


図 1. 本機器の構造

- a) 直線型のチップ型電極
- b) a)の中央を拡大したチップ型電極中央の走査型電子顕微鏡像
- c) リング型のチップ型電極
- d) c)の中央を拡大したチップ型電極中央の走査型電子顕微鏡像

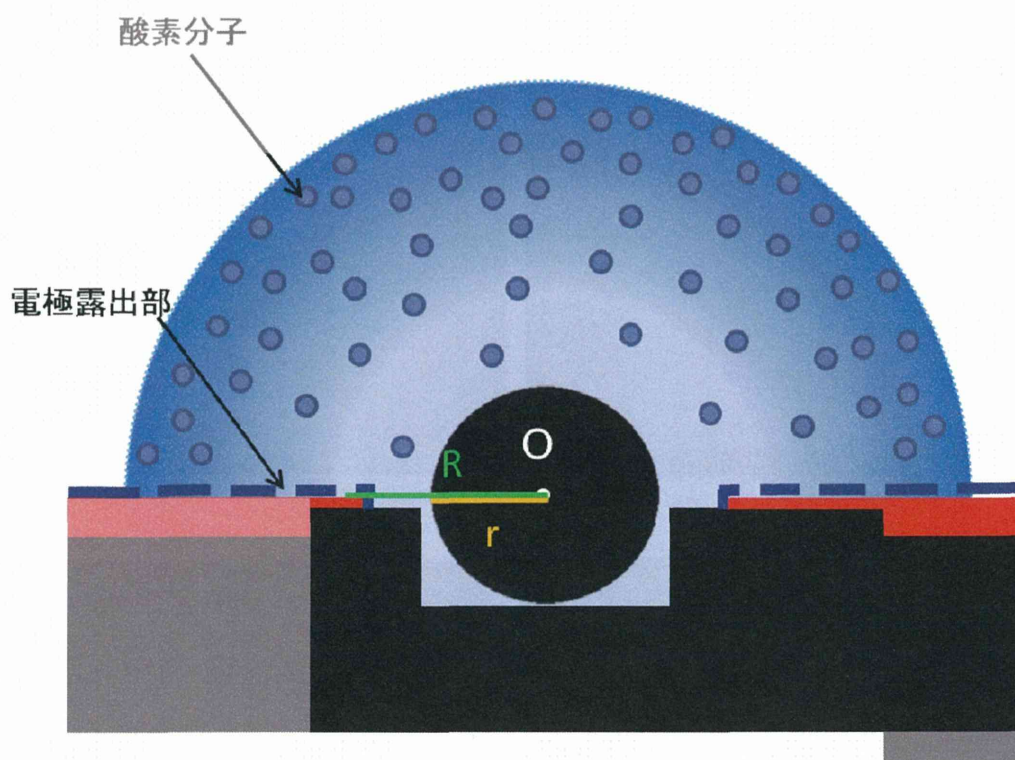
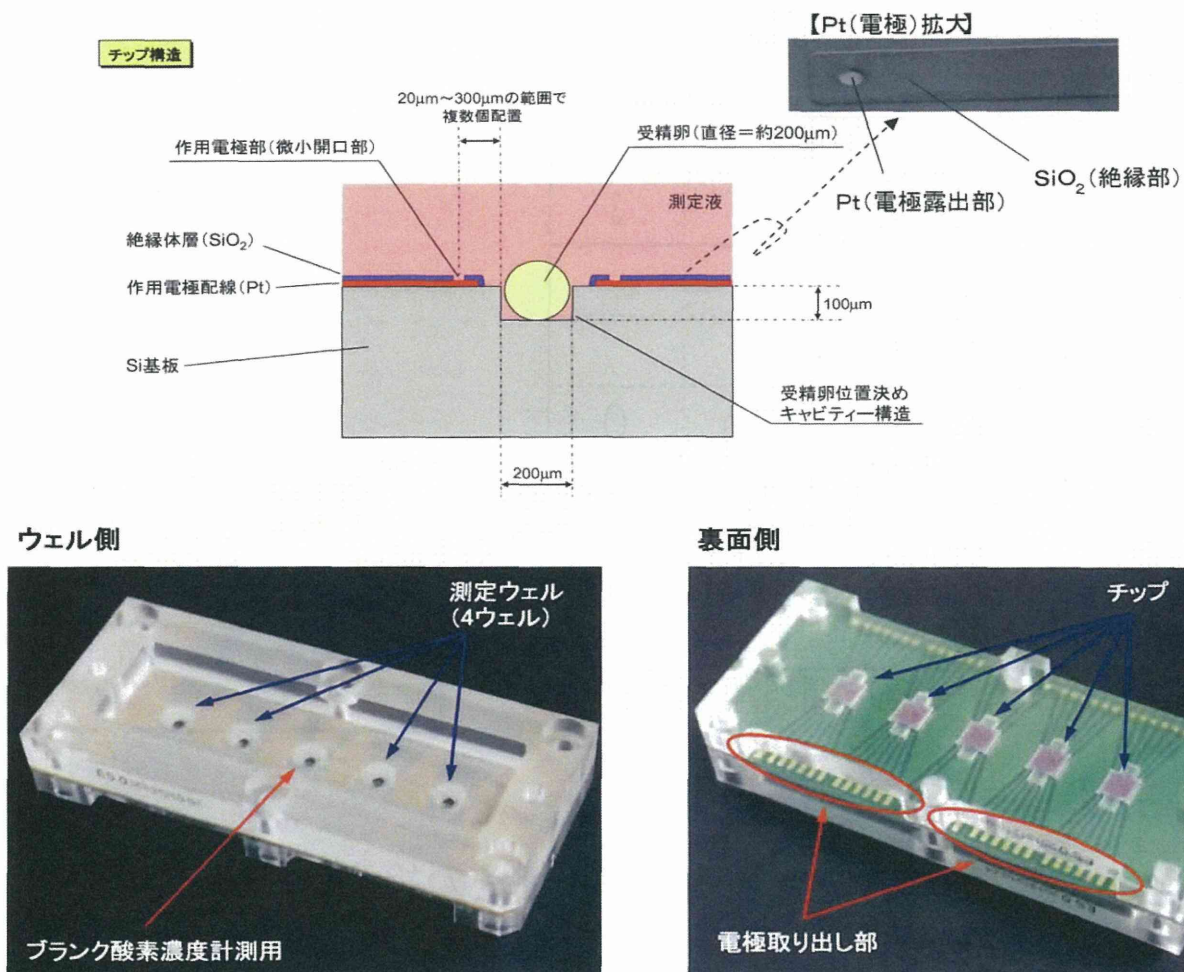


図 2. 溶存酸素濃度勾配プロファイル

測定チップのキャビティに胚を静置した際の溶存酸素濃度勾配の模式図。胚に近いほど、酸素が消費され濃度が低くなっている。 r ; 胚の半径、 R ; 胚中心から微小電極までの距離



(図 3) チップ型電極の写真およびそのイメージ

受精卵位置決めキャビティサイズと作用電極サイズ
設計マトリックス

		作用電極 直径 [um]		
		10	5	3
キャビティ ○形 直径 [um]	400	○		
	300	○	○	
	240	○	○Typ.	○
	200	○	○	
	100		○	
	50		○	

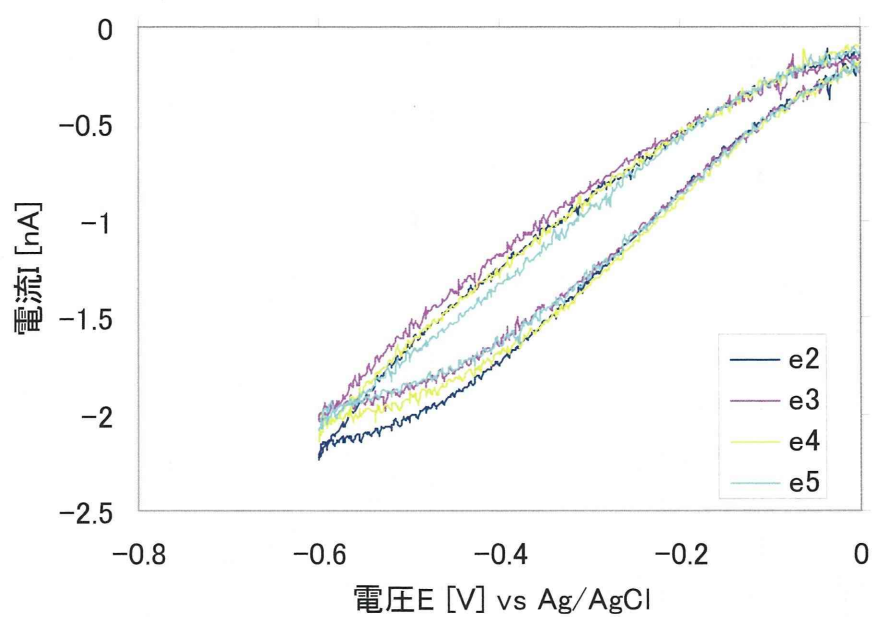
※キャビティパターン端からの作用電極距離(C-W距離)
20 / 50 / 100 / 150 / 200um
上下対称測定

②作用電極 直径依存性
→ 測定プロトコール

①キャビティ直径 依存性
→ 最適デバイス構造

(図4) キャビティ直径と作用電極直径の検討

【測定条件】 チップ：ME1301-P01-02-05-0616
装置：HSV-100F (Hokuto Denko)
測定液：ERAM-2
走査範囲：0 V→-0.5 V→ 0 V



(図5) 測定液中での溶存酸素還元電流測定

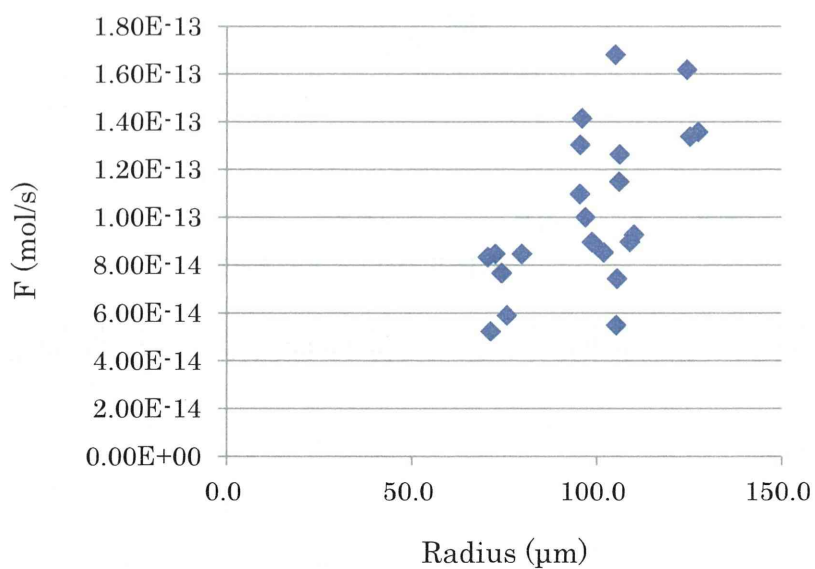
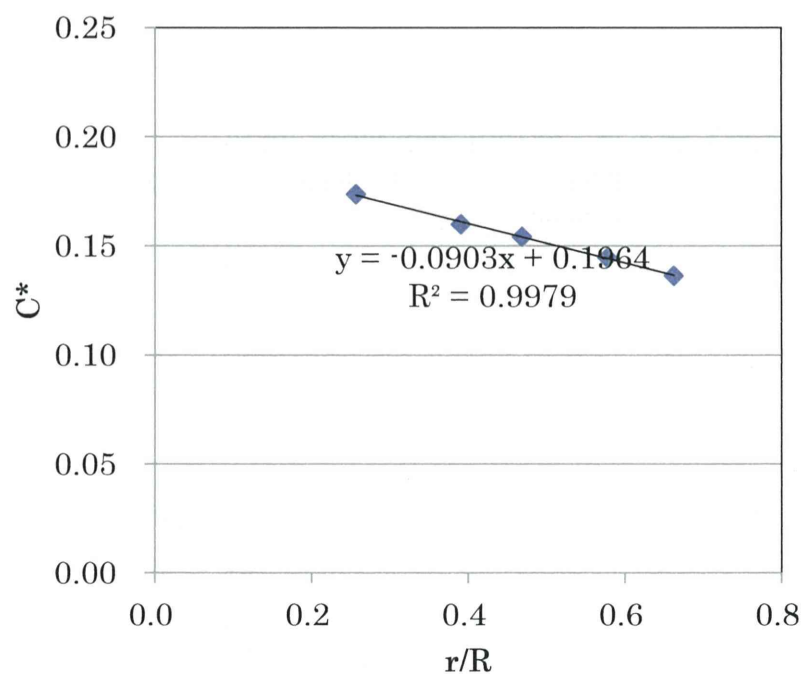


図 6. スフェロイドの呼吸能

- a) (上段) スフェロイド周囲における溶存酸素濃度と r/R のプロット (代表例)
- b) (下段) スフェロイド径と呼吸活性の関係