

Ⅱ. 分担研究報告書

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

平成24年度～26年度

分担研究者 志賀 尚美 (東北大学病院助教)

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

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

研究分担者 志賀 尚美 東北大学病院助教

これまでに、乳癌細胞株である MCF-7 を用いて新規チップ型受精卵呼吸量測定装置に関する検討を行い、呼吸量が細胞株の増殖と相関することを確認した。そこで今回は、ヒト受精卵に大きさ・性状が近いウシ受精卵を用いて、新規チップ型受精卵呼吸量測定装置で呼吸量を計測し、従来の呼吸量測定装置（CRAS-1.0）と比較検討した。

研究方法は、9 例のウシ受精卵を対象として、従来の呼吸量測定装置（CRAS-1.0）と新規チップ型受精卵呼吸量測定装置を用いて呼吸量を測定し両者の呼吸量を比較検討するとともに、受精卵の形態学評価と呼吸量の関係について検討した。尚、平成 26 年度に行う予定のヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定臨床研究のプロトコールを作成し、東北大学医学部倫理委員会承認を取得した。また、患者様への説明書に関しても改めて作成した。

今回検討したウシ受精卵 9 例は全て胚盤胞で、形態学的に形態良好な胚盤胞が 6 例、形態不良な胚盤胞が 3 例であった。新規チップ型受精卵呼吸量測定装置で全てのウシ受精卵の呼吸量を計測することが可能であった。従来の呼吸量測定装置と新規チップ型受精卵呼吸量測定装置いずれにおいても、形態良好な胚盤胞は形態不良な胚盤胞と比較して呼吸量が高い傾向である一方、形態不良な胚盤胞は比較的呼吸量が低い傾向を示した。またそれぞれの中でも成長が早い受精卵は呼吸量が高く、成長が遅い、もしくは発育が停止した受精卵は呼吸量が低かった。従来の呼吸量測定装置と新規チップ型受精卵呼吸量測定装置の呼吸量は同じような動態を示し、呼吸量値は正の相関を示した。また、新規チップ型受精卵呼吸量測定装置は従来の呼吸量測定装置と比較して操作性が簡便で、操作習得は容易であった。

以上より、新規チップ型受精卵呼吸量測定装置は従来の呼吸量測定装置と同様、受精卵の呼吸量計測が可能であり、その呼吸量値は従来の呼吸量測定装置と相関することを確認できた。また、呼吸量は受精卵の viability を反映している可能性が示唆された。今後これらの結果をもとに、ヒト余剰卵を用いた応用を試みていく。

研究協力者

黒澤大樹 (東北大学病院 助手)
渡邊善 (東北大学病院 助手)
石橋ますみ (東北大学大学院 院生)
高橋藍子 (東北大学病院 研究助手)

A・研究目的

これまで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) (以下、従来機器とする) はマニュアルのマイクロプローブを用いた装置である。しかし、ヒト受精卵においては、マニュアルの操作習得に多大な時間を要することから、一般不妊診療への普及の妨げになっていると考えられてきた。

そこで我々はCRAS-1.0の操作性の向上と、測定精度の向上を目的に、新規にチップ型受精卵呼吸測定装置 (以下、本機器とする) を開発した。今回、本機器を用いてウシ受精卵の呼吸量測定を行い、その精度や操作性を従来機器と比較検討した。

B・研究方法

採取したウシ卵巣は20℃に保温した生理食塩水中で研究室まで輸送し、70%アルコールで表面を消毒した後、生理食塩水で洗浄した。卵巣内の直径2~8 mm程度の胞状卵胞から卵丘細胞-卵子複合体 (cumulus-oocyte complex: COC) を吸引により採取し、38.5℃に保温した卵子回収液中に回収した。

次に、卵子の成熟培養を以下の方法で行った。卵子成熟・共培養用無血清培地 (IVMD101; 機能性ペプチド研究所、山形) を用いて350 μ lのドロップ (洗浄用、培養用) を60mmX15mmの培養用ディッシュ (コーニング、USA) に作製し、流動パラフィンを重ねた後、38.5℃、5% CO₂ in air に設定したインキュベーター (SCI-165D; アステック、福岡市) 内で3時間以上ガス平衡化した。COCを洗浄用ドロップ中で3回洗浄後、培養用ドロップに

20~30個のCOCを導入して、同条件のインキュベーター内で22~24時間培養した。

一方、精子懸濁液の調製は以下の方法で行った。液体室素内で凍結保存したウシ精液入りのストローを37.0℃の温水で融解し、遠心チューブ中で媒精液に懸濁した。次に、懸垂型遠心分離機で遠心分離を行い、精子を沈殿させた。遠心後、上清を取り除き、精子懸濁液食塩水で100倍に希釈した後、血球計算盤 (サンリード硝子、さいたま市) を用いて精子数を算出した。

次に、体外受精の方法について述べる。体外受精用培地にはIVF100 (機能性ペプチド研究所) を使用した。培養用ディッシュに50 μ lの媒精用及び洗浄用ドロップを作製し、流動パラフィンを重ねた後、38.5℃、5% CO₂ in airのインキュベーター内でガス平衡化した。体外受精を行う直前に、50 μ lの精子懸濁液 (1X10⁷精子/ml) を媒精用ドロップに加え、最終濃度5X10⁶精子/mlに調整した。前述した成熟培養後のCOCを同条件で平衡化した洗浄用ドロップで3回洗浄した後、媒精用ドロップにCOCを導入して、同条件で設定したインキュベーター内で6時間体外受精を行った。

媒精から6時間後、透明帯周囲の卵丘細胞を残し、余分な細胞と精子をピペッティングにより取り除いた。その後、COCを38.5℃、5% CO₂ in airで平衡化した洗浄用のIVMD101ドロップで洗浄し、受精卵の前培養を行った。前培養にはリプロC-1プレート (機能性ペプチド研究所) とIVMD101を用い、前培養用ドロップ (250 μ l) に20~25個のCOCを導入して同じ条件に設定したインキュベーター内で24時間前培養を行った。

前培養後、2細胞期受精卵への発生により受精を確認した。受精の確認後、卵丘細胞をガラスキャピラリーによるピペッティングで除去し、受精卵を裸化した。裸化受精卵を38.5℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂の条件で平衡化した洗浄用の裸化受精卵培養用培地 (IVD101; 機能性ペプチド研究所) のドロップ中で洗浄し、発生培養用のIVD101ドロップへ20~30受精卵を導入した。

受精卵培養は同条件に設定したインキュベーター内で行い、培養3~4日目に同条件でガス平衡化したIVD101で培地の半量を交換

した。培養中の受精卵は倒立顕微鏡 (IX71 ; OLYMPUS) を用いて観察し、発生段階を記録した。媒精後 144 時間後に胚盤胞へ到達した受精卵を回収して研究検体とした。今回は上記の方法により 9 例の受精卵を作成し、研究検体として用いた。

9 例の受精卵についてまず従来機器を用いて呼吸量を計測した。測定方法は阿部らの報告に従い、1 例ずつ計 9 回に分けて検討した。その後本機器を用いて同じ受精卵の呼吸量を測定した。測定時に各受精卵の形態学的評価も行った。

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ール作成および倫理委員会に、観察研究として申請を行った。具体的には、受精後 72 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。

C・研究結果

従来機器と本機器を用いてウシ受精卵 9 例の呼吸量測定を行い比較検討した。今回使用したウシ受精卵は、9 例中 6 例で形態学的に良好な胚盤胞に到達した (以下、形態良好胚盤胞とする)。形態良好胚盤胞の光学顕微鏡像を示す (図 1)。ウシ受精卵 No. 3 は初期胚盤胞、ウシ受精卵 No. 6 は拡張胚盤胞の所見であった。従来機器、本機器にて計測した呼吸量はいずれも後述する形態不良胚盤胞の計測値と比較して高値であった

(表 1)。本機器の呼吸量は計測時間中経時的範囲で計測され、その中で変動する。そのため結果は計測値の最小値、最大値、中央値を示した。本機器による呼吸量の中央値は 15.1~28.7 のウシ受精卵 No. 3 は 16.0 と比較的低値を示し、ウシ受精卵 No. 6 は 28.7 と比較的高値を示した。一方、残りの 3 例は形態学的に不良であった (以下、形態不良胚盤胞とする)。形態不良胚盤胞の光学顕微鏡像を示す (図 2)。ウシ受精卵 No. 1 は発育が停止していた。従来機器、本機器による呼吸量は形態良好胚盤胞の呼吸量と比較して低値であった (表 2)。本機器による呼吸量の中央値はすべて 10 以下と低値を示した。ウシ受精卵 No. 1 はその中でも最低値 8.1 を示した。

次に従来機器と本機器の中央値をプロットしたグラフを示す (図 3)。形態良好胚盤胞を青点で示し、形態不良胚盤胞を赤点で示した。従来機器と本機器の測定値 (中央値) は相関しており、相関係数 (R^2) は 0.8191 であった。

D. 考察

ヒトに大きさ、性状の近いウシ受精卵を用いることで、ヒトへの応用を想定した検討が可能となった。まず、従来機器と同様に本機器でもウシ受精卵の呼吸量を計測することが可能であった。計測に起因すると考えられる形態学的な変化などの有害事象は認められなかった。呼吸量は従来機器、本機器いずれにおいても、形態良好胚盤胞で比較的高値を示し、形態不良胚盤胞で比較的低値を示した。また、形態良好胚盤胞の中でも成長が進んでいる受精卵（拡張胚盤胞）はより高い呼吸量を示し、成長が遅延している受精卵（初期胚盤胞）は比較的低い呼吸量を示した。形態不良胚盤胞においては発育が停止している受精卵の呼吸量が最低値を示した。このように、呼吸量は受精卵の形態学的評価、viabilityを反映している可能性が強く示唆された。また、従来機器と本機器の呼吸量に正の相関と認めたことから、本機器は従来機器と同様に受精卵の呼吸活動を正確に反映していることが示唆された。従来機器の呼吸量測定は受精卵の呼吸運動に直結するミトコンドリア機能を反映していることが報告されている(参考文献1, 2)。このことは本機器による呼吸量測定も受精卵の呼吸活動に直結するミトコンドリア機能を反映している可能性、ひいては受精卵のviabilityを反映している可能性が示唆され、今後検討していく必要があると思われる。今後はさらに例数を増やして、受精卵の形態学的評価と呼吸量の関係について詳細に検討していく。

E. 結論

今回ウシ受精卵を用いて従来機器と本機器による呼吸量測定を行った。本機器は従来機器と同様に呼吸量を測定でき、測定による有害事象も認めず安全性が確認できた。さらに従来機器と比較し操作性が非常に簡便であった。

今後はこれらの結果をもとに、ヒト余剰卵における研究に結び付け本機器の実用化を目指していく。平成26年度に施行予定のヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定の臨床研究について、平成26年2月に東北大学倫理委員会申請を行い、承認を得た(参考資料1, 2)。

(参考文献)

(1) Abe H, Shiku H, Aoyagi S, Hoshi H. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J Mamm Ova Res*, 21(2004)22-30.

(2) M. Yamanaka, S. Hashimoto, A. Amo, T. Ito-Sasaki, H. Abe, Y. Morimoto, Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption, *Hum Reprod*, 26 (2011) 3366-3371.

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; 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

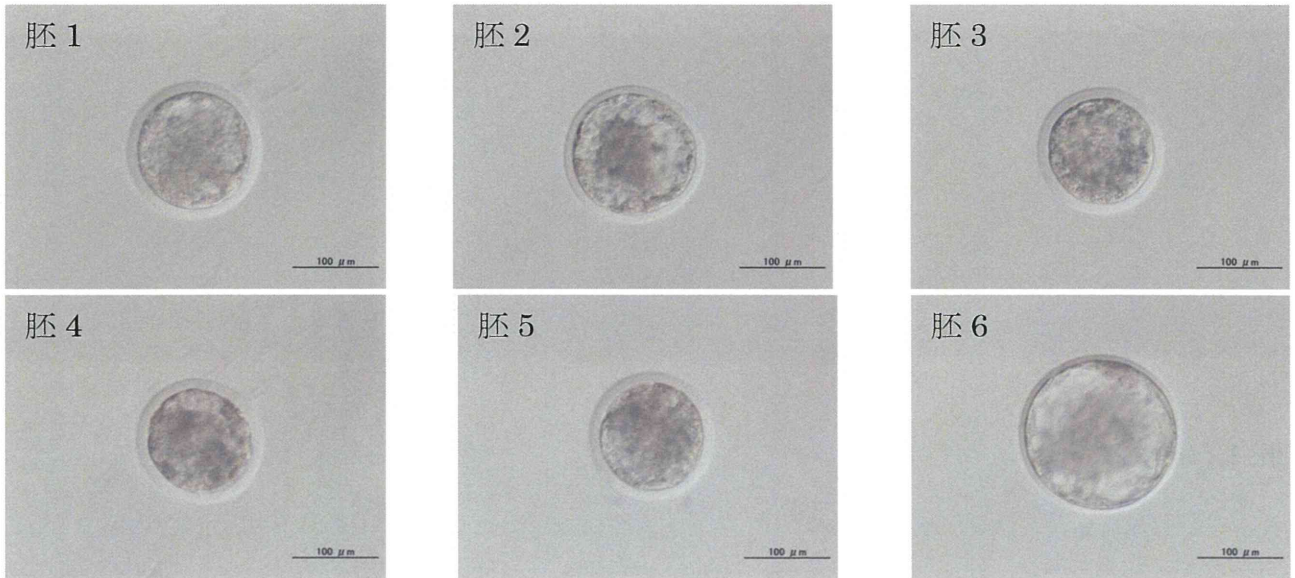
特記事項なし

3. その他

特記事項なし

(図表)

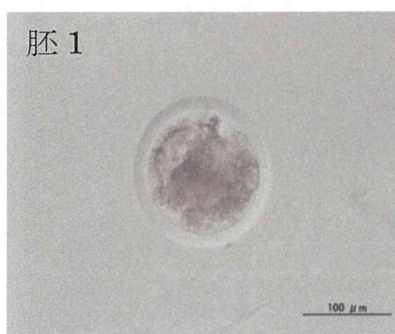
図 1 : 形態良好胚盤胞



胚 3 : 初期胚盤胞

胚 6 : 拡張胚盤胞

図 2 : 形態不良胚盤胞



胚 1 : 発生停止

図 3 : 形態不良胚盤胞

従来機器と本機器の比較

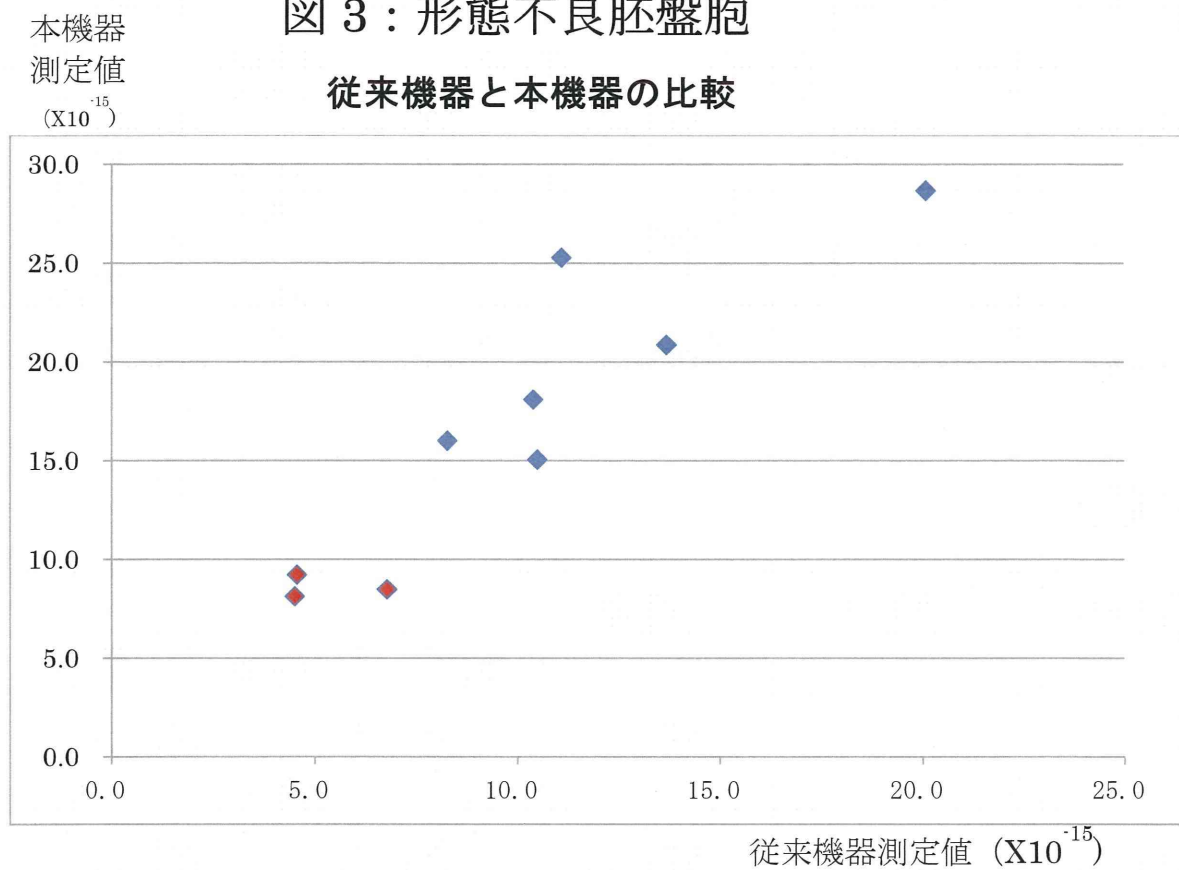


表1

ウシ受精卵(No.)	従来機器	本機器		
		最小	中央	最大
1	11.1	24.3	25.3	26.7
2	13.7	19.3	20.9	21.5
3	8.3	15.5	16.0	17.0
4	10.5	13.4	15.1	16.1
5	10.4	17.6	18.1	20.4
6	20.1	27.1	28.7	29.7

表2

ウシ受精卵(No.)	従来機器	本機器		
		最小	中央	最大
1	4.5	7.3	8.1	8.7
2	4.6	8.0	9.2	10.1
3	6.8	7.8	8.5	9.0

表1 形態良好胚盤胞

表2 形態不良胚盤胞

(参考資料)



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

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

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。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。

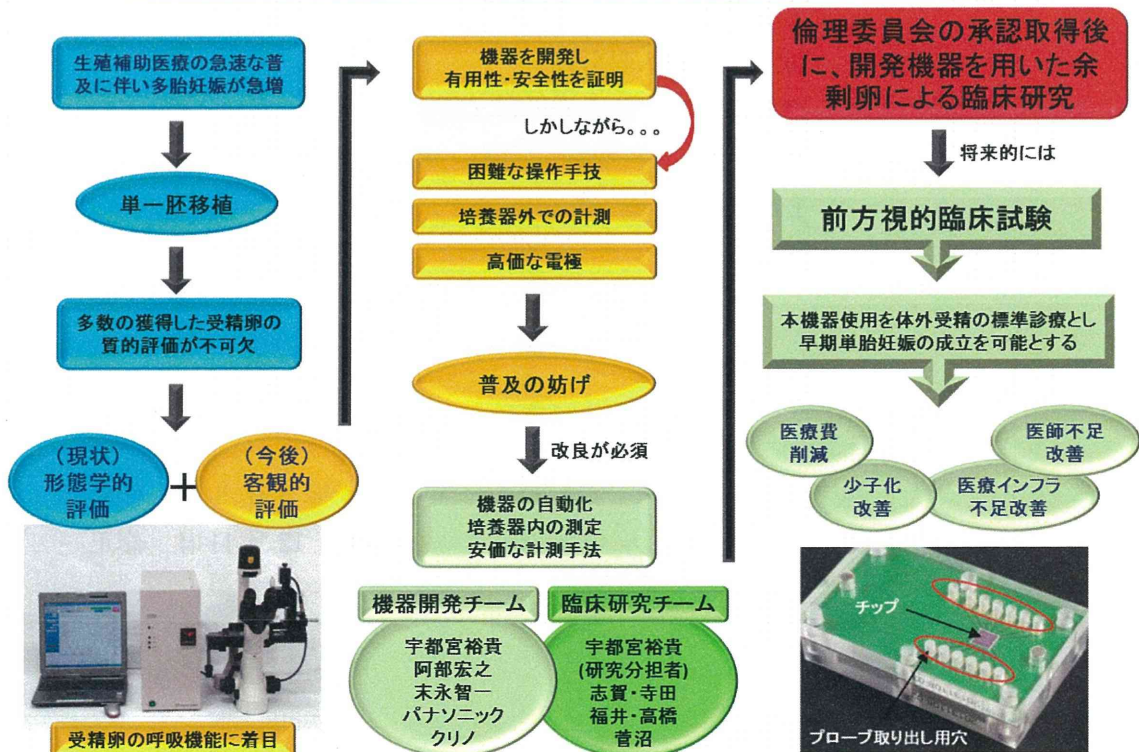
東北大学病院 婦人科

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）

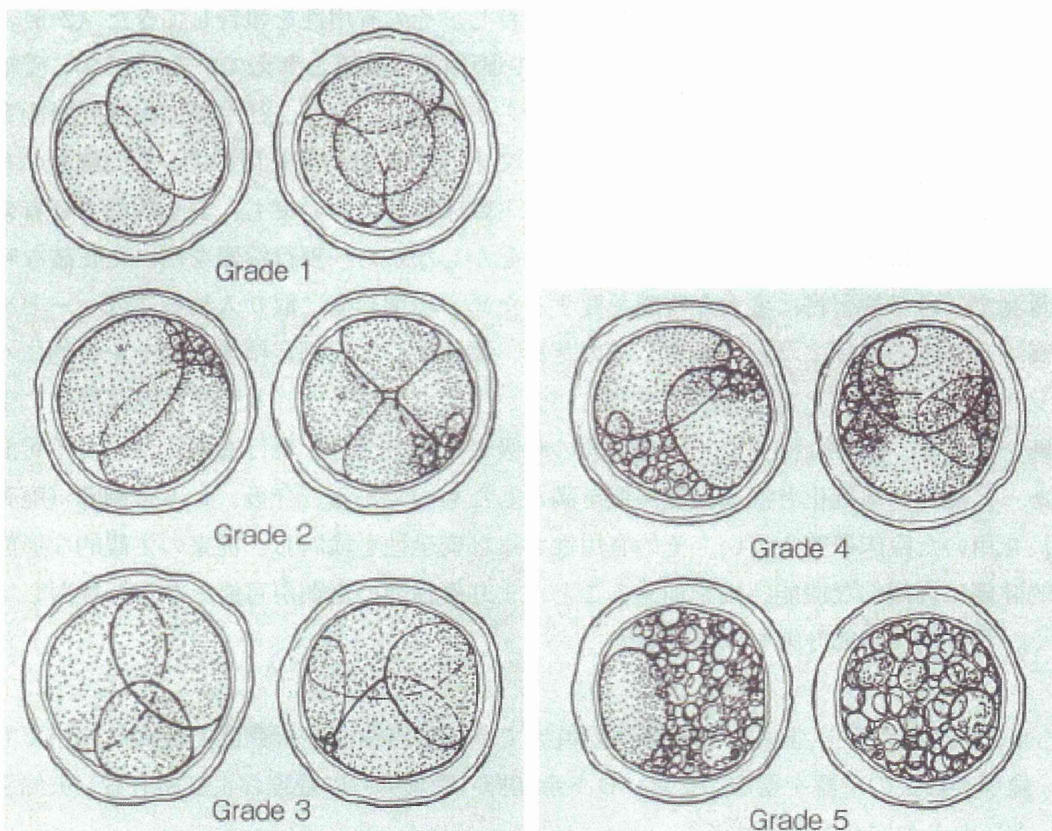


図 1. 受精卵の形態学的な評価 (Veeck 分類)

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。

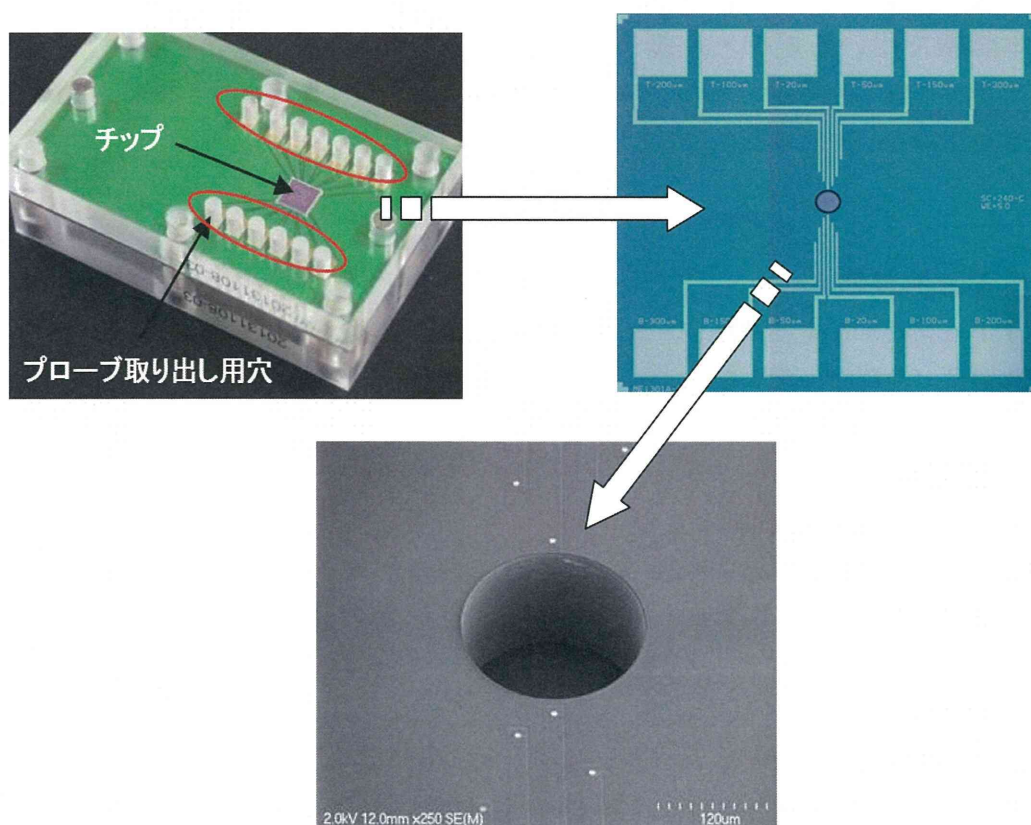


図 2. 開発した呼吸量測定装置 (左上段⇒右上段⇒下段の順に拡大像)

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。