

- 35) Yamashita, K., M. Takagi, K. Uchida, H. Kondo & S. Takenaka (2001), *Analyst*, 26: 1210-1211
- 36) Oyamatsu, D., N. Kanaya, H. Shiku, M. Nishizawa & T. Matsue (2003), *Sens. Actuat. B*, 91: 199-204
- 37) Abe, H., H. Shiku, S. Aoyagi & H. Hoshi (2004), *J. Mamm. Ova Res.*, 21: 22-30
- 38) Shiku, H., T. Shiraiishi, H. Ohya, T. Matsue, H. Abe, H. Hoshi & M. Kobayashi (2001), *Anal. Chem.*, 73: 3751-3758
- 39) Shiku, H., T. Shiraiishi, S. Aoyagi, Y. Utsumi, M. Matsudaira, H. Abe, H. Hoshi, S. Kasai, H. Ohya & T. Matsue (2004), *Anal. Chim. Acta*, 522: 51-58
- 40) Abe, H., H. Shiku, M. Yokoo, S. Aoyagi, S. Moriyasu, A. Minamihashi, T. Matsue & H. Hoshi (2006), *J. Reprod. Dev.*, 52 (Suppl.): S55-S64
- 41) Shiku, H., Y. Torisawa, A. Takagi, S. Aoyagi, H. Abe, H. Hoshi & T. Matsue (2005), *Sens. Actuat. B*, 108: 597-602
- 42) Abe, H. (2007), *J. Mamm. Ova Res.*, 24: 70-78
- 43) 横尾正樹, 伊藤一佐々木隆広, 珠玖仁, 末永智一, 阿部宏之 (2010), *産婦人科の実際*, 59: 1375-1379
- 44) 後藤香里, 小池恵, 熊迫陽子, 宇津宮隆史, 荒木康久, 阿部宏之 (2010), *受精着床学会雑誌*, 27: 53-58

— 総説 —

特集：卵子のエネルギー代謝 —ミトコンドリア機能について—

電気化学的計測技術を用いた卵子の呼吸活性解析 Analysis of Respiratory Activity in the Oocytes Using by Electrochemical Measurement System

横尾 正樹^{1*}・阿部 宏之²

Masaki Yokoo^{1*} and Hiroyuki Abe²

¹秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科 〒010-0444 南秋田郡

²山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学分野 〒992-8510 米沢市

¹Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Ogata 010-0444, Japan

²Department of Biochemical Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Yonezawa 992-8510, Japan

要旨：卵子の品質はその後の初期胚発生や妊娠の成立、維持に影響を与えることから、その評価方法は重要である。卵子の細胞レベル、分子レベルでの品質評価法は、卵子の能力を正確に判定することはできても、卵子に対して侵襲的なものである場合が多く、卵子の生存性は失われ、臨床現場の評価方法としては意味を持たない。一方、我々が開発した電気化学的呼吸測定技術は、非侵襲的に細胞のミトコンドリア機能（呼吸活性）を評価できるため、哺乳動物の受精卵や卵子の新しい品質評価法として期待されている。本稿では、電気化学的呼吸測定技術の概要を説明するとともに、ブタ卵子を用いた呼吸活性解析の一例を紹介する。

キーワード：卵子、品質、ミトコンドリア、呼吸、電気化学的計測

Abstract: Oocyte quality impacts early embryonic survival and the establishment and maintenance of pregnancy. The cellular and molecular basis assessments of oocyte quality may be regarded as potential predictors of oocyte developmental competence. However, these methods are invasive and therefore have no value as prediction tools in Assisted Reproductive Technology. On the other hand, we developed a novel cell respiration measuring system, scanning electrochemical microscopy (SECM). This measuring system is able to determine the respiratory activity of individual embryos non-invasively and quantitatively. Therefore, the SECM may be useful to assess the quality of embryos and oocytes in mammals. In the present review, we describe the SECM procedures briefly and our analysis of respiratory activity in the porcine oocytes using by the SECM.

Key words: Oocyte, Quality, Mitochondria, Respiration, Electrochemical analysis

はじめに

卵子の品質は、受精率やその後の初期胚発生の成績、さらには妊娠の成立にも大きな影響を与えるため、精度の高い卵子の品質評価法が求められている。しかしながら、卵子は

単一細胞であるため、受精卵の場合のように割球数や各割球の形状を基準にして評価することは困難である。現在、一般的に行われている卵子の品質評価法としては、形態的観察によるものと細胞レベル・分子レベルで解析するものに分けられる。成熟卵子の形態的評価として一般的な方法は、極体放出や細胞質の状態、色で判断することである。このような評価方法は簡便で、卵子に対するダメージが少ないものの、主観的であり、観察者によって評価に差が生じる可能性も高い。さらに、初期胚の発生障害や着床不全を招く要因の多くは、一般的な光学顕微鏡を使用して卵子を観察するだけでは、見分けることは難しいとの指摘もある¹⁾。一方、

(受付 2012年6月12日／受理 2012年6月26日)

別刷請求先：〒010-0444 秋田県南秋田郡大湯村字南2-2

秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: myokoo@akita-pu.ac.jp

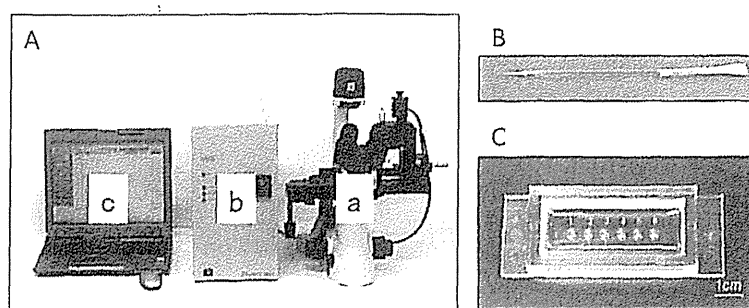


図1 受精卵呼吸測定装置

A: 受精卵呼吸測定装置の外観 (a: 倒立型顕微鏡, b: ポテンショスタット/コントローラを内蔵した装置本体, c: 解析用PC), B: マイクロ電極, C: 測定プレート.

細胞レベル・分子レベルで解析する方法としては、表層顆粒分布の解析や、成熟促進因子 (MPF) 活性, MAPK活性, グルタチオン含量, 卵子の代謝能を指標としたものがある。これらの解析方法は、形態的な評価方法と比較すると客観性があり、卵子の品質を正確に評価することは可能である。しかしながら、これらの方法のほとんどは、卵子を染色したり、卵子そのものを破壊する必要があるなど、解析のために卵子の生存性が失われるため、臨床現場における評価方法としては意味を持たない。品質を評価した卵子を、受精や発生過程に利用するためには、卵子に対して非侵襲的な評価方法が必要となる。

卵成熟過程におけるミトコンドリア機能

近年、卵子の品質評価で注目されているのは、卵子内のミトコンドリア機能を指標にするものである。ミトコンドリアは細胞内小器官のひとつであり、その重要な生理的役割のひとつは、酸化リン酸化、すなわち電子伝達系による酸素消費に伴うエネルギー (ATP) 産生である。これが機能不全に陥ると、卵子内の代謝が低下し、様々な生理反応が滞ることになる。

ミトコンドリアの細胞内局在や、その機能の指標となるミトコンドリア膜電位活性については、MitoTrackerやRhodamine 123, JC-1などのミトコンドリアを特異的に標識する蛍光試薬によって解析することができる。卵成熟過程では卵細胞質内のミトコンドリアは、未成熟卵子では細胞内に散在しているが、卵成熟に伴いクラスターを形成し、卵細胞質中央へ移動する様子が観察される。このようなミトコンドリア分布に異常を示す卵子は胚発生能が低いことが報告されている²⁻⁵⁾。また、卵子内のミトコンドリアDNA (mtDNA) は卵成熟過程で増加することが観察されており、卵子内のmtDNAコピー数の低下は、受精障害や胚発生率の低下を招くことも報告されている⁶⁻⁹⁾。これらの観察と一致して、卵子内のATPレベルも卵成熟が進行するにつれて増加することが観察され、より高いATPレベルの卵子は、その後の胚発生

や着床能力と相関することも報告されている^{9, 10)}。これらの研究から、ミトコンドリア分布やATPレベルなど卵子のミトコンドリア機能は、卵子の発生能力を推測する指標として利用可能であることがわかる。しかしながら、これらのミトコンドリア機能の解析法も、前述の細胞レベル・分子レベルの解析方法と同様に、卵子に対しては侵襲的な方法であり、卵子の品質評価方法として臨床応用するためには、卵子のミトコンドリア機能を非侵襲的に解析する手法が必要となる。

電気化学的細胞呼吸計測技術

ミトコンドリアのATP産生にともなう細胞呼吸は生命活動に必須の現象であり、細胞活動をモニターする重要な指標となる。我々は、酸素の還元電流を電気化学的に検出できる走査型電気化学顕微鏡 (Scanning Electro Chemical Microscopy: SECM) を改良し、受精卵のミトコンドリア機能 (呼吸活性) を計測する「受精卵呼吸測定装置」を開発した^{11, 12)}。電気化学的計測技術は、局所的な生物反応を高感度かつ非侵襲的に検出する有効な手段であり、この技術を応用することで単一の受精卵の呼吸活性を計測することを可能にした。これまでに、この装置を使用して、哺乳動物 (マウス, ブタ, ウシ, ヒト) の受精卵の呼吸活性を測定することに成功しており、ミトコンドリアの微細構造解析や受精卵の移植試験の結果から、呼吸活性と胚の品質とが相関することを明らかにしている¹²⁻¹⁴⁾。現在、家畜生産や生殖補助医療における受精卵の品質評価法として、実用化が期待されている技術である。

受精卵呼吸測定装置の外観を図1に示す。装置は、(1)受精卵を観察する倒立顕微鏡 (図1-A-a)、(2)マイクロ電極の電位を一定に保つポテンショスタットおよびマイクロ電極の移動を自動で制御するコントローラを内蔵した本体 (図1-A-b)、(3)解析ソフトを搭載したコンピュータ (図1-A-c) から構成されている。溶存酸素の検出に使用するマイクロ電極には化学的に安定な白金ディスク電極 (図1-B) を採用

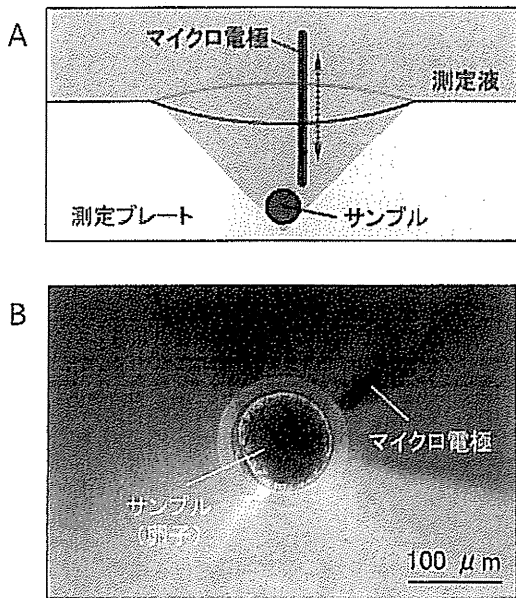


図2 呼吸測定解析の概要

A：測定プレートのウェルにサンプルを静置し、サンプル近傍をマイクロ電極で数回走査する。得られたサンプル近傍の溶存酸素濃度プロファイルを基に、サンプルの呼吸活性が自動的に算出される。B：実際の呼吸活性測定の様子。

している。白金の直径は2-3 μmと極めて細く、それをガラスキャピラリー内に熱封止した形状となっている。このマイクロ電極に-0.6V vs Ag/AgCl₂の電位を印加することで、溶液中の溶存酸素を選択的に検出することが可能となる。

測定には受精卵呼吸測定装置専用の測定プレートを使用する(図1-C)。プレートの底には、逆円錐形のウェルが6個(1個はブランク測定用)あり、5サンプルを連続して測定することができるようになっている。測定の際には、予め保温しておいた測定液を満ちし、測定プレート内のウェルにサンプルを静置し、マイクロ電極の先端をサンプル近傍へセットする。その後はコントローラがマイクロ電極を鉛直方向に自動的に走査し、サンプル近傍の溶存酸素を計測する(図2)。サンプルが呼吸している場合には、測定液中の溶存酸素を盛んに消費するため、サンプル近傍と沖合の溶存酸素濃度に大きな差が生じ、サンプルが呼吸していない場合には、サンプル近傍と沖合の溶存酸素濃度に差は生じない。このようにして計測したサンプル周囲の溶存酸素濃度プロファイルから、解析ソフトが球面拡散理論¹¹⁾に基づいて各サンプルの呼吸活性を自動的に算出する仕組みになっている。

この装置の特徴としては、(1)受精卵の酸素消費量を数値化できる(客観的)、(2)単一受精卵で測定ができる(高感度)、(3)受精卵に電極を触れることなく測定できる(非侵襲)、(4)測定が1分以内(迅速)といった点が挙げられる。受精卵呼吸測定装置では、前述のように球面拡散理論¹¹⁾に基づいてサンプルの呼吸活性を算出していることから、測定に使用

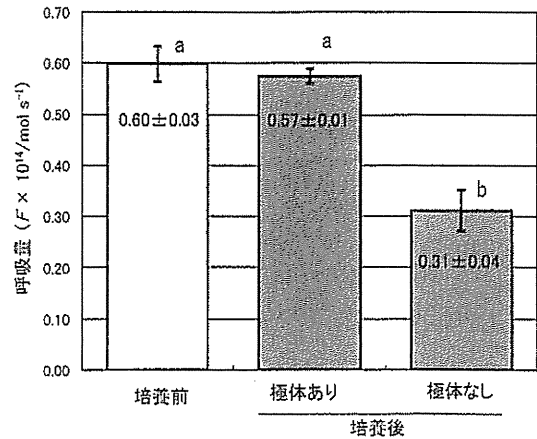


図3 ブタ卵成熟に伴う呼吸活性の変化

成熟培養前の未成熟卵、成熟培養後に極体が観察された成熟卵および成熟培養後に極体が観察できなかった未成熟卵の呼吸活性を受精卵呼吸測定装置で計測した。値は平均値±標準誤差を表している。a-b; 異符号間に有意差 ($P < 0.05$)。

するサンプルは球形であることが条件になる。その点、卵子は受精卵と同様に球形であることから、この装置に適用可能であり、基本的な測定操作も受精卵の呼吸活性測定と同様である。これらの特徴から、受精卵呼吸測定装置が卵子の品質評価にも応用できる可能性が高いと考えられる。

卵成熟過程におけるブタ卵子の呼吸活性解析

これまでに、我々は受精卵呼吸測定装置を利用して、哺乳動物卵子の呼吸活性解析を実施してきた。ここでは、ブタ卵子を用いて、呼吸活性、ミトコンドリア局在およびATP含量について解析した研究成果を紹介する¹⁵⁾。

卵成熟過程における呼吸活性の変化を解析する目的で、食肉処理場由来卵巣から採取したブタ卵子の呼吸活性を受精卵呼吸測定装置で計測したところ、形態的に良好な卵丘細胞-卵子複合体から採取した未成熟ブタ卵子の呼吸活性は、 $0.60 \pm 0.03 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$ であった。一方、TCM-199を基礎培地に用いた体外成熟培養を44時間実施した後、極体を放出した成熟卵の呼吸活性を計測した結果、 $0.57 \pm 0.01 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$ であったのに対し、極体放出が観察されなかった未成熟卵は $0.31 \pm 0.04 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$ と成熟卵と比較して有意に低いことが確認できた(図3)。

また、他のミトコンドリア機能と比較するために、卵成熟前後の卵子をMitoTracker Orange (Molecular Probs)で染色し、共焦点レーザー顕微鏡(FV-300, Olympus)で活性型ミトコンドリアの卵子内局在を調査した。その結果、図4に示すように、ミトコンドリア分布パターンの違いで3つのタイプ(Type I: ミトコンドリアが卵細胞表層に局在している、Type II: 多くのミトコンドリアはクラスターを形成し、その一部は卵細胞質内部へ移動している、Type III: ミトコン

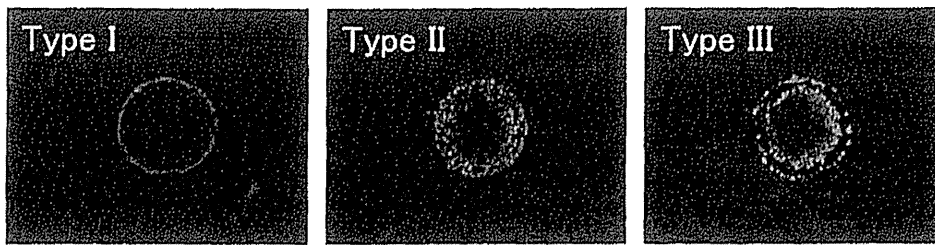


図4 プタ卵子内の活性型ミトコンドリア分布のパターン
 成熟培養前後プタ卵子をMitoTracker Orangeで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
 Type I: 卵子表面に均一に局在, Type II: クラスター化が観察され、一部は細胞質内部へ移動,
 Type III: クラスターが大きくなり、細胞質内部へ移動している。

表1 卵成熟に伴う卵子内活性型ミトコンドリア分布の変化

	供試 卵子数	ミトコンドリア分布のType (%)		
		I	II	III
培養前	33	28 (84.8)	5 (15.2)	0 (0)
培養後	極体あり	3 (5.4)	9 (16.1)	44 (78.5)
	極体なし	1 (7.7)	10 (76.9)	2 (15.4)

ドリアのクラスターは大型化し、多くは細胞質内へ移動している)に大別され、培養前の未成熟卵の多くはType Iであったのに対して、成熟卵の多くはType IIIを示し、卵成熟過程でミトコンドリア分布を大きく変化させていることが確認された(表1)。さらに、卵子内ATP含量をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に基づく測定キット(BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay kit, Promega)を用いて測定した結果、培養前の未成熟卵子では 1.16 ± 0.11 pmol/oocyteであったのに対して、成熟培養後、極体の放出が観察された成熟卵では 2.06 ± 0.06 pmol/oocyteと卵成熟の進行に伴って有意に上昇することが確認された(図5)。一方、成熟培養後、極体の放出が観察できなかった未成熟卵のATP含量は 1.51 ± 0.21 pmol/oocyteと成熟卵と比較して有意に低く、ミトコンドリアの分布パターンも成熟卵とは異なり、その多くがType IIを示していた。

以上のことから、正常な成熟過程においては卵子の呼吸活性は高く維持されていることが確認され、さらに、卵子の呼吸活性は、卵子内のミトコンドリア分布の様子やATP含量の変化と関連が深いことが示された。前述のように、卵細胞質内のミトコンドリア分布やATP含量は、卵子の品質評価の指標として考えられている。ミトコンドリア分布やATP含量の結果と呼吸活性に関連性がみられたことから、電気化学的計測技術を用いた呼吸活性解析は、卵子の品質評価法として利用できる可能性がある。

おわりに

現在、不妊症の治療法として広く普及している体外受精(IVF)や顕微授精(ICSI)では、使用する卵子の品質がその

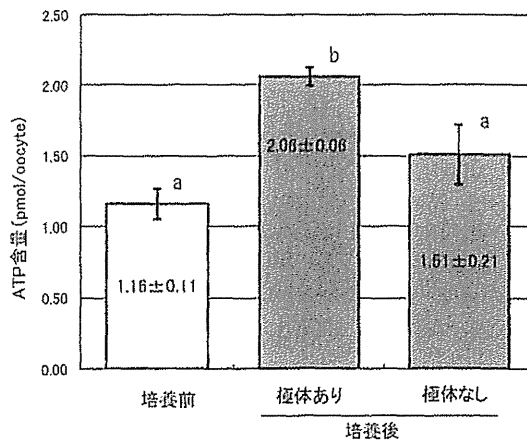


図5 ~ プタ卵成熟過程における卵子内ATP含量の変化
 成熟培養前の未成熟卵、成熟培養後に極体が観察された成熟卵および成熟培養後に極体が観察できなかった未成熟卵の卵子内ATP含量を測定した。値は平均値±標準誤差を表している。a-b; 異符号間に有意差 ($P < 0.05$)。

後の治療成績を大きく左右する要因のひとつであることは間違いない。特に、最近では卵子の老化による不妊も話題となっており、卵子一つひとつの品質を評価できる技術が求められている。その意味では、単一の卵子を非侵襲的に解析できる呼吸測定技術は、生殖補助医療現場における卵子の品質評価方法としては理想的であると言える。しかしながら、今回紹介した解析結果はプタ卵子を使用したものであり、将来的にヒト生殖補助医療において臨床応用するため

には、今後、ヒト卵子を使用した基礎的な研究データの蓄積が必要である。呼吸活性解析が卵子の品質評価法として実用可能かどうか、この研究分野の今後の発展に期待したい。

文 献

- 1) Rawe, V.Y. and Combelles, C.M.H. (2009): Human Oocyte Abnormalities: Basic Analyses and Clinical Applications. In: Biennial Review of Infertility (Carrell, D.T., Racowsky, C., Schlegel, P.N., Van Voorhis, B.J., eds.), pp. 193–214, Humana Press, New York.
- 2) Bavister, B.D. and Squirrell, J.M. (2000): Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum. Reprod.*, 15, 189–198.
- 3) Sun, Q.Y., Wu, G.M., Lai, L., Park, K.W., Cabot, R., Cheong, H.T., Day, B.N., Prather, R.S. and Schatten, H. (2001): Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, 122, 155–163.
- 4) Brevini, T.A., Vassena, R., Francisci, C. and Gandolfi, F. (2005): Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biol. Reprod.*, 72, 1218–1223.
- 5) Au, H.K., Yeh, T.S., Kao, S.H., Tzeng, C.R. and Hsieh, R.H. (2005): Abnormal mitochondrial structure in human unfertilized oocytes and arrested embryos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1042: 177–185.
- 6) Hsieh, R.H., Tsai, N.M., Au, H.K., Chang, S.J., Wei, Y.H. and Tzeng, C.R. (2002): Multiple rearrangements of mitochondrial DNA in unfertilized human oocytes. *Fertil. Steril.*, 77, 1012–1017.
- 7) Gibson, T.C., Kubisch, H.M. and Brenner, C.A. (2005): Mitochondrial DNA deletions in rhesus macaque oocytes and embryos. *Mol. Hum. Reprod.*, 11, 785–789.
- 8) Reynier, P., May-Panloup, P., Chretien, M.F., Morgan, C.J., Jean, M., Savagner, F., Barriere, P. and Malthiery, Y. (2001): Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 7, 425–429.
- 9) Slotte, H., Gustafson, O., Nylund, L. and Pousette, A. (1990): ATP and ADP in human pre-embryos. *Hum. Reprod.*, 5, 319–322.
- 10) Van Blerkom, J., Davis, P.W. and Lee, J. (1995): ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 10, 415–424.
- 11) Shiku, H., Shiraishi, T., Ohya, H., Matsue, T., Abe, H., Hoshi, H. and Kobayashi, M. (2001): Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. *Anal. Chem.*, 73, 3751–3758.
- 12) Abe, H., Shiku, H., Aoyagi, S. and Hoshi, H. (2004): *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J. Mamm. Ova Res.*, 21, 22–30.
- 13) Abe, H. (2007): A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J. Mamm. Ova Res.*, 24, 70–78.
- 14) Abe, H., Shiku, H., Yokoo, M., Aoyagi, S., Moriyasu, S., Minamihashi, A., Matsue, T. and Hoshi, H. (2006): 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 (supple), s55–s64.
- 15) Yokoo, M., Ito-Sasaki, T., Shiku, H., Matsue, T. and Abe, H. (2008): Multiple analysis of respiratory activity in the identical oocytes by applying scanning electrochemical microscopy. *Trans. of MRS-J.*, 33, 763–766.

