

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

**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25年度 総括・分担研究報告書

目 次

I . 総括研究報告

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		
(資料1) 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2) 第4回デバイス開発会議		
(資料3) 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4) 企画競争説明会		
(資料5) 第5回デバイス開発会議		
(資料6) 開発機器納品		
(資料7) 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)		

II . 分担研究報告

1 . 凍結融解がヒト胚盤胞の形態と呼吸活性に及ぼす影響に関する研究--105		
寺田 幸弘		
(資料) 図1 - 3、資料		
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	-----	121
阿部 宏之		
(資料) 図1 - 3、表1		
3 . 呼吸活性測定によるマウス排卵後加齢卵の ミトコンドリア機能の評価に関する研究	-----	133
高橋 俊文		
(資料) 図		
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	-----	139
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	---	143
菅沼 亮太		
(資料) 図1 - 6		
6 . 新規受精卵呼吸測定装置を用いた臨床研究に関する 倫理委員会承認の報告	-----	153
志賀 尚美		
(資料1) 介入研究プロトコール		
(資料2) 説明文書		

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	179
----------------------	-------	-----

IV . 研究成果の刊行物・別刷	-----	180
------------------	-------	-----

・ 総括研究報告書

**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**

主任研究者 宇都宮裕貴(東北大学医学部准教授)

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業） 総括研究報告書

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。その後、チップの試作品開発をパナソニック・ヘルスケア社、電気化学的検証を北斗電工社、そしてチップ開発の統括をクリノ社と共に行い試作品を完成させた。

その後、平成25年度も継続してパナソニック・ヘルスケア社と試作品の改良を行い、最終的に臨床研究に使用するチップを完成し、操作性や耐久性などを検討した。そして、平成26年度に行う臨床研究（ヒト余剰卵を用いた受精卵呼吸量測定）のプロトコールを作成し、平成26年2月に東北大学倫理委員会の承認を得た。また、共同研究施設とともに臨床研究に使用する余剰卵の蓄積・管理を行った。さらにPMDAと薬事法の必要性に関する打ち合わせを行い、生殖医療における医療機器としての役割を詰めていく予定である。

今後、全ての共同研究施設で倫理委員会の承認を取得した後に、今年度開発したチップによるヒト余剰卵を用いた臨床研究を実施し、その有用性・安全性および操作性を検討する。また、それに先行する前臨床研究として、マウス受精卵を従来の形態学的評価のみの群と開発機器を用いた呼吸量測定併用群に分け、胚移植から胎仔出産まで観察し本チップの有用性と有害事象の有無を検討する。さらに、将来的な前方視的臨床試験に向けた大量生産をふまえて、パナソニック・ヘルスケア社と機器の試作および仕様の決定を目指す。

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ルを作成し、倫理委員会の承認を得るための準備を行った。さらに、共同研究施設とともに平成26年度の臨床研究に使用する余剰卵の蓄積およびその管理を進めていくことも行った。

- (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呼吸量を測定し、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。また、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プロトコール作成および倫理委員会申請を進めた。さらに、平成26年度の臨床研究に使用する余剰卵の蓄積およびその管理を行った。

定期的な会議を開催し、新規デバイス開発や今後の研究計画などを検討した。また、機器開発に際し企画競争説明会を行い、採択企業を選定した。

1. 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1）
2. 平成25年9月2日（TV会議）
第4回デバイス開発会議（資料2）
3. 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3）
4. 平成25年9月10日（仙台）
企画競争説明会（資料4）
5. 平成25年12月10日（TV会議）
第5回デバイス開発会議（資料5）
6. 平成26年1月21日（仙台）
開発機器納品（資料6）
7. 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7）

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申請

今回、開発した機器を用いたプロトコールを作成し、東北大学倫理委員会の承認を取得する。その後、他の4大学病院においても同様に各施設における倫理委員会承認を取得する。

余剰卵の蓄積およびその管理

各研究協力機関において、平成26年度の臨床研究に向けヒト余剰卵の集積及び管理を行う。

PMDAとの開発相談

今後の開発機器に関して、薬事法に基づく医療機器として開発するか、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か相談した。

C・研究結果

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。

1. 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1）

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。

2. 平成25年9月2日(TV会議)
第4回デバイス開発会議(資料2)

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などに関して議論した。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。

3. 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3)

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・ボルトアンメトリー(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。

4. 平成25年9月10日(仙台)
企画競争説明会(資料4)

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と考えた。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開発実施体制が提示された。

5. 平成25年12月10日(TV会議)
第5回デバイス開発会議(資料5)

チップ開発・改良の進捗状況进行评估し、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を用いて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。

6. 平成26年1月21日(仙台)
開発機器納品(資料6)

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開発機器の納品が行われた。その開発機器には下記の要件を満たすと判断された。

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

7. 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7)

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。

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・承認(資料8)

今回、開発した機器を用いたプロトコルを作成し、東北大学倫理委員会に申請し平成26年2月に承認を取得した。今後、他の4大学病院においても同様に倫理委員会の承認を取得していく。当初は平成25年度内に全施設において取得予定であったが、機器開発に時間を要したため研究分担施設による承認は平成26年4月頃になる予定である。

余剰卵の蓄積およびその管理

各研究協力機関において、平成26年度の臨床研究に向けヒト余剰卵の集積及び管理を行っている。現段階では50例を研究予定と考えている。これまでのところ、余剰卵は東北大学病院で96例、秋田大学で60例あり、山形大学、弘前大学、福島県立医大では確認中である。管理方法・使用方法・廃棄方法などについても最終確認を行っている。

PMDAとの開発相談

今後の開発機器に関して、平成26年2月にPMDAと電話で相談を行った。薬事法に基づく医療機器として開発する必要性があるか、もしくは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か検討していく必要があることを話し合った。さらに、胎児は「ヒト」と想定されているが受精卵は「ヒト」と認識されているか、また「ヒト」と定義されていなくても「ヒト」に準じて扱う必要があることについても今後考慮していく必要があることを確認した。

D・考察

今回の研究において、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機器が開発された。従来機器と比較し、測定の自動化、測定時の湿潤環境の保持、測定感度の高さ、有害事象の発生頻度などにおいて明らかに有用かつ簡便であることが推察された。プロトコル作成後の倫理委員会承認が若干遅れているが、今後速やかに進めていくことは可能である。早期にヒト余剰卵を用いた臨床研究を開始し、その有用性・安全性・操作性・経済性を検討していきたいと考えている。

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。

F・健康危険情報

特記事項無し

G・研究発表

特記事項なし

H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

(資料 1)

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)

日時：平成25年6月8日（日）9:00～10:00

場所：山形テルサ3階研修室A

プログラム

開会の辞

座長 東北大学 宇都宮裕貴

山形大学 阿部 宏之

チップ試作品の開発状況

東北大学 宇都宮裕貴

平成25年度厚生労働省科研費について

東北大学 宇都宮裕貴

各施設における進捗状況

各施設担当者

閉会の辞

東北大学 八重樫伸生

共催：東北トランスレーショナルリサーチ拠点形成ネットワーク協議会

(資料2)

第4回受精卵活性測定デバイス開発

生体を用いたデバイス評価
(末永研究室 ご協力)

2013年 9月 2日

パナソニック株式会社
オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社
技術本部 エコマテリアル開発センター
バイオデバイスグループ

生体を用いたデバイス評価

実験計画

【日程】 2013/07/16 ~ 2013/07/19 (4日間)

【場所】 東北大学 原子分子材料科学高等研究機構(兼 環境科学研究科、工学部 化学・バイオ工学科) 末永研究室

【目的】 一次試作チップ(ME1301)を使った、生体(スフェロイド)の酸素消費量評価におけるノウハウの蓄積/課題抽出

- ◆測定プレート(Proto.1) 課題抽出
- ◆生体評価に至るまでの電気化学測定プロトコル ノウハウ蓄積
- ◆スフェロイド培養、マニピュレーション ノウハウ蓄積
- ◆溶存酸素の還元電流実測、スフェロイドによる酸素消費量に対する感度の把握
- ◆生体の酸素消費量評価に適したデバイス構造 ノウハウ蓄積、溶存酸素濃度分布シミュレーション協力要請

【評価サンプル】

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

キャビティ ○形 直径 [um]		作用電極 直径 [um]		
		10	5	3
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

◆測定プレート(Proto.1) 実装品 3台

- ①については、測定プレート 2個分 実装する。(計 6チップ)
 - ②については、測定プレート 1個分 実装する。(計 3チップ)
- 測定プレート実装後、
フェロシアン化カリウムメディエータで初期CV評価 @門真

◆予備品

6種類のチップについて、各2個づつFFC実装する。

①キャビティ直径依存性
→ 最適デバイス構造

②作用電極直径依存性
→ 測定プロトコル

生体を用いたデバイス評価

実験結果 概要

※青字・・・東北大学 末永研究室ご協力

取り組み内容	進捗状況(できたこと)	今後の取り組み内容
①チップ構造設計／プロセス開発 ・ 一次試作 ME1301 - P01 ・ 溶存酸素濃度分布Sim.	◆P01条件Fix。評価サンプル確保 ◆ME1301構造 拡散Sim.実施 還元電流値、2D-Sim.情報入手	◇二次試作ME1301 - P02進行
②プレート実装 ・ Proto.1 構造決定 ・ 生体評価用Proto.1試作	◆Proto.1 完成 3プレート組立 →東北大(末永研)でのテストへ	◇Proto.1測定プレート改善 (プレート専用設計化、液シール構造改善、実装容易性向上 等)
③電気化学測定プロトコル開発 ・ 東北大(末永研)での評価	◆低濃度メディエータCV、CA測定 ◆溶存酸素還元電流測定 ◆メディエータ選択での課題抽出	◇メディエータ改善(低濃度FMA) → 微小電流測定系 必要 ◇電気化学測定による電極汚染、劣化抑制
④生体での酸素消費量評価 ・ スフェロイドを用いた評価 (1st try)	◆スフェロイド操作確認 ◆スフェロイド有無による酸素還元電流差を確認	◇第2回実験 計画検討 (第1回実験では、生体からの距離と酸素還元電流のデータ不十分)

今回ご報告内容

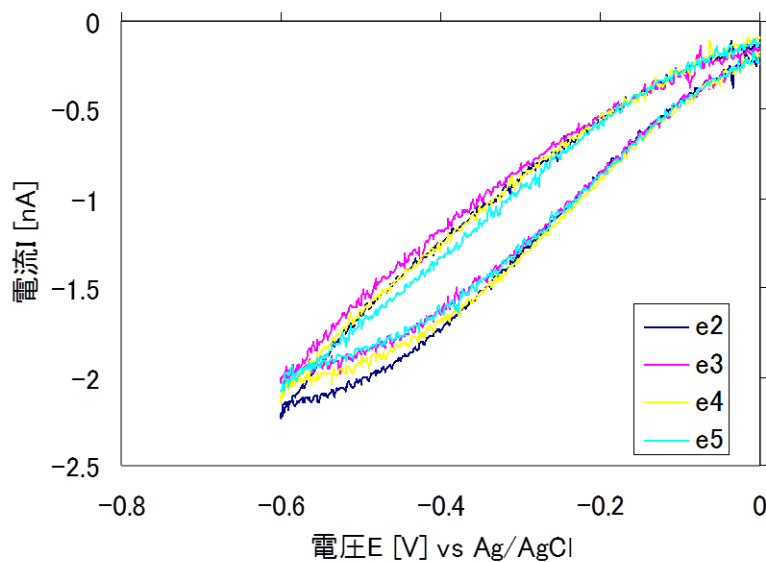
生体を用いたデバイス評価

測定液による
酸素還元電流測定

測定液中(ERAM - 2)での溶存酸素還元電流測定

【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

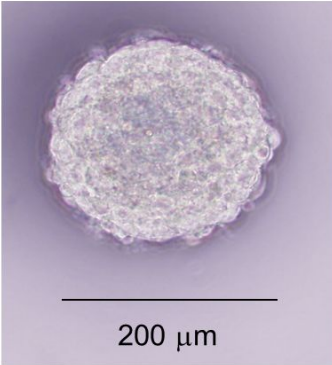
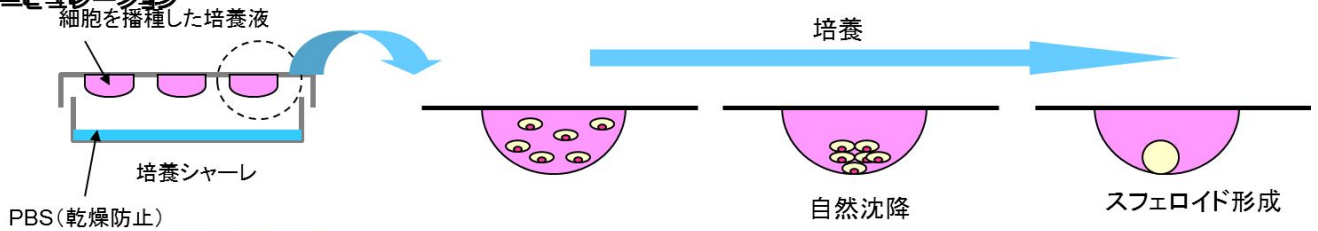


- ◆酸素還元電流 -2nA程度であり、電極サイズから想定される値が得られた。
- ◆還元側で定常電流は得られていない点については、今後原因調査を行う予定。
(末永先生コメント: 生体酸素消費の概算をすることは可能と思われる)

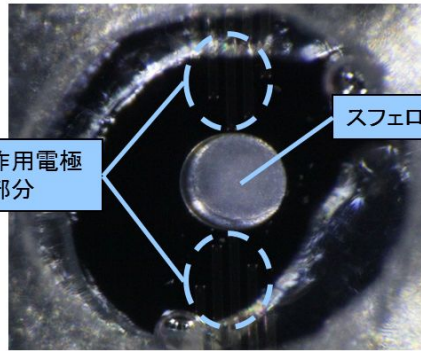
生体を用いたデバイス評価

MCF-7スフェロイド作製

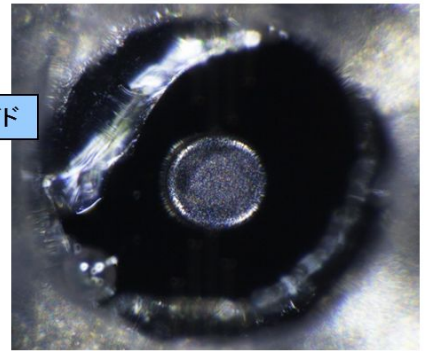
ハンギングドロップ法でMCF-7のスフェロイドを作製



培養液中のスフェロイド



キャビティ内に収まった様子



- ◆もくろみの直径で、スフェロイド作製が可能。
- ◆200μm径のキャビティへ、スフェロイドの操作ができることを確認。

生体を用いたデバイス評価

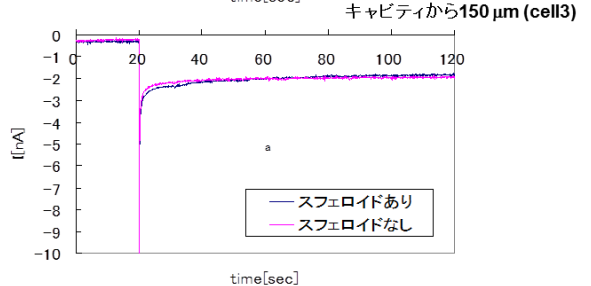
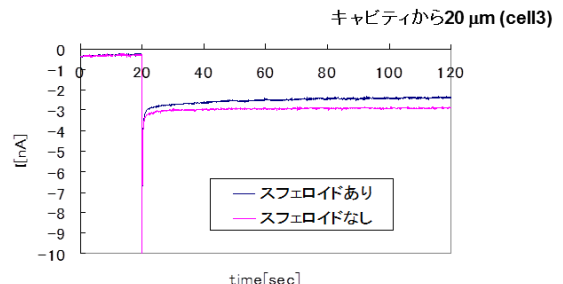
MCF-7スフェロイド呼吸活性測定 (I_r測定)

【測定条件】チップ: ME1301-P01-02-05-0812 装置: HSV-100F (Hokuto Denko) 測定液: ERAM-2
測定条件: 0 V (20 sec) → -0.5V (120 sec), 各電極1端子ずつなぎ変えて測定
測定対象: MCF-7スフェロイド 200 μm (200 cells, 3days)

cell1			
キャビティからの距離[μm]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.736	-2.976	-0.240
50	-3.428	-4.095	-0.667
100	-2.355	-2.623	-0.268
150	-2.988	-3.012	-0.024

cell2			
キャビティからの距離[μm]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.432	-2.722	-0.290
50	-3.102	-3.595	-0.492
100	-2.135	-2.482	-0.347
150	-2.662	-2.463	0.200

cell3			
キャビティからの距離[μm]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-1.938	-2.338	-0.400
50	-2.369	-2.876	-0.507
100	-1.773	-2.023	-0.249
150	-1.834	-1.941	-0.108



- ◆スフェロイドから遠い電極(150μm)と近い電極で、酸素消費量に差がみられた。
→ スフェロイドの呼吸活性を検出できていると考えられる
- ◆生体からの電極距離に対する依存性は、十分な評価ができていない(想定と合わない)。
→ 酸素濃度勾配の測定は未達。電極間の特性バラツキ低減を実施予定。

(資料 3)

第 10 回 胚細胞呼吸測定装置研究会 (平成 25 年度第 2 回厚生労働省班会議)

日時：平成 25 年 9 月 8 日 (日) 7:30 ~ 8:10

場所：旭川グランドホテル 6 階 リンデンの間

〒070-0036 旭川市 6 条通 9 丁目

TEL : 0166 - 24 - 2111

プログラム

座長 東北大学 宇都宮裕貴

開会の辞

秋田大学 寺田 幸弘

チップ試作品の開発状況

東北大学 宇都宮裕貴

各施設における進捗状況

各施設担当者

閉会の辞

東北大学 八重樫伸生

共催：東北トランスレーショナルリサーチ拠点形成ネットワーク協議会

共催：東北トランスレーショナルリサーチ拠点形成ネットワーク協議会

2013年9月8日 北日本産科婦人科学会学術講演会(旭川グランドホテル)において、第10回胚細胞呼吸測定装置研究会(平成25年度第2回厚生労働省班会議)が開催されました。当科の宇都宮裕貴准教授より試作品の説明、並びに進行状況の説明があり、それに対し活発な討論がなされていました。今回が10回目と言う節目の会議であり、具体的な機器の仕上がり具合も順調に進んでいます。来年度は機器を使用した臨床研究を始める予定であるため、今後さらなる基礎的研究を進めながら将来的な臨床応用に向けたデータを発信していけるよう各大学協力し、成果を上げていきたいと思ひます。



(資料4)

募集要領(企画競争)

1. 業務名

「全自動受精卵呼吸測定装置の開発」業務

2. 業務の目的・趣旨

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、日本産科婦人科学会は生殖補助医療における多胎妊娠防止に関する見解をまとめ、原則として単一受精卵(胚)のみを移植することが提唱された。そして今後、着床能の高い優良な受精卵を選別することが非常に重要になると考えられている。従来、受精卵の形態学的評価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。そのため、客観的で再現性のある高精度の評価方法が切望されている。従来の主観的な形態学的評価に受精卵呼吸測定装置を用いた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ると考え、昨年度クリノ社が全自動受精卵呼吸測定装置の試作を行った。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。そこで今回、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。

3. 業務の内容

クリノ株式会社が開発した受精卵呼吸活性測定装置 CRAS-1.0(以下「従来機器」という。)は、不妊治療において受精卵の呼吸活性を非侵襲的かつ定量的に測定し母体に戻す受精卵を選択するために使用する機器である。従来機器は、呼吸活性を測定する方法として針式のマイクロプローブを受精卵の近傍に近付けて上下動の走査で測定する手動方法を採用している。非常に高感度で侵襲もないが、正確な呼吸量測定には手技の習得に時間を要する。そのため、従来機器の有用性が証明できたとしても標準診療に取り入れるため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、昨年度に初心者でも再現性の高い正確な結果が得られ、測定者による差異解消や測定のスピードアップを図るために、測定時に受精卵を測定ウェルにセットした後、全自動で測定出来るようにすることを目標に試作品の開発を行った。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。そこで今回、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。

具体的には、下記の要件を満たすことが必要となる。

受精卵検査に伴い用いられる微弱電流が、昨年度試作機器と同等かそれ以下であること。

受精卵の呼吸測定感度が、昨年度試作機器と同様かそれ以上であること。

昨年度試作機器と比較して価格が低廉であり、且つ耐久性に勝ること。

昨年度試作機器と比較して、受精卵測定時の初期設定が簡便かつセットが容易であり、操作性に優れ、初心者でも高い再現性を得ることが可能で、全自動化を実現することにより検査時間の短縮を図るものであること。

(1) 業務報告等

業務終了後、全自動受精卵呼吸活性測定装置の開発品、電気化学計測データ及び開発報告書を提出し、本学担当者の確認を受けるものとする。

報告書の内容については本学担当者から照会があった場合は説明を行うこと。

業務の全部、又は一部が仕様書に基づいて行われず若しくは仕様書等に定める製造が行なわれていないと委託者が判断した場合は、受託者に対し再調査、又は修正等必要な措置を要求することがある。なお、その場合に要する経費は、本契約に含まれるものとする。

(2) 成果の帰属及び取扱いに関する体制

この契約書に基づき得られた成果物にかかる権利は、原則、東北大学と開発企業に帰属するものとし、

その取扱いについて十分に留意するものとする。

(3) 特許権等の使用

業務の実施に際し、第三者の所有する工業所有権及び技術情報等を使用するときは、あらかじめ本学担当者の承認を得るものとし、その使用に関して一切の責任を負うものとする。

(4) 業務を遂行する上で疑義が生じた場合は本学担当者と協議して定めるものとする。

4. 本件に参加する者に必要な資格及び要件等

(1) 国立大学法人東北大学契約事務取扱細則第6条の規定に該当しない者であること。

(2) 国立大学法人東北大学から取引停止の措置を受けている期間中の者でないこと。

(3) 暴力団員による不当な行為の防止等に関する法律（平成三年法律第七十七号）に規定する暴力団員、暴力団又は暴力団員が経営に実質的に関与している組織等の者、不正の利益を図る目的又は第三者に損害を加える目的をもって暴力団又は暴力団員を利用するなどした者、暴力団の維持、運営に協力している者、及び暴力団又は暴力団員と社会的に非難されるべき関係を有している者でないこと。

5. 提案書の提出方法等

(1) 提案書の提出場所

仙台市青葉区片平二丁目1-1 東北大学財務部調達室調達第一係

TEL 022-217-4869

FAX 022-217-4912

(2) 提案書の提出方法

提出方法は、5部を郵送又は持参すること

・郵送：簡易書留、宅配便等で送付すること

・持参：受付時間は平日9:00から17:00

・その他：提案書は日本語で作成し、提案書に関する照会先を明記すること。

(3) 提出書類

本募集要領及び審査基準に記載されている項目を基に想定される事柄を整理した具体的な企画提案書

本業務を行う上での実施体制に関する資料

本業務を行う上での詳細な見積書（概算見積書）及び工程表

(4) 提案書の提出期限等

提出期限：平成25年9月6日 17:00 必着

提出先：上記(1)に示す場所

(5) その他

提案書等の作成費用については選定結果に拘らず提案者の負担とする。

また、提出された提案書等については返却しない。

6. 説明会の開催について

説明会への参加を必須とする

日時：平成25年8月29日（木） 16:00～

場所：東北大学医学部3号館3階 産婦人科医局

〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1

: 022-717-7254

7. 業務の規模及び採択数

業務の規模：9,000,000円（税込限度額）

採 択 数：1件

8. 選定方法等

選定方法：別紙審査基準のとおり

結果通知：提案者全員に選定結果を通知する。

9. 契約締結

契約書（案）は別添のとおりである。仕様書については採択者と提案書を基に作成・調整するものとする。

る。

なお、契約金額については提案書の内容を勘案して決定するので採択者が提示する金額と必ず一致するものではない。また、金額及びその他契約条件等が合致しない時には契約締結を行わない場合がある。

10. スケジュール

提案書の締切: 平成 25 年 9 月 9 日

審 査: 平成 25 年 9 月中旬頃

採択者の決定: 平成 25 年 9 月中旬頃

契 約 締 結: 平成 25 年 9 月下旬頃

業 務 期 間: 平成 25 年 10 月 1 日 ~ 平成 25 年 12 月 27 日 (予定)

11. その他

業務実施に当たっては、契約書、仕様書を遵守すること。

審査基準（企画競争）

・選定方法

提案書に基づき、東北大学医学系研究科に設置された「全自動受精卵呼吸測定装置の開発」審査委員会において審査を行い、評価が最も高かった者を契約予定者として採択する。

なお審査期間中、必要に応じて提案の詳細に関する追加資料の提出または面接を求めることがある。

・選定基準

【必須条件】 …… 企画提案書は次の各号に適していることを必須の条件とする。

提案内容が募集要領に記載してある目的、趣旨に合致してあること。

業務が具体的かつ適切な方法により計画されていること。

業務を遂行するのに必要な能力、知識、ノウハウを有していることが明確に分かること。

概算見積書の内容が合理的かつ明確であり、妥当な積算がなされていること。

【審査項目】 ……以下の各項目を4段階で評価する。

1. 安全性

受精卵検査に伴い用いられる微弱電流が、昨年度試作機器と同等かそれ以下であること。

2. 有効性

受精卵の呼吸測定感度が、昨年度試作機器と同等かそれ以上であること。

3. 経済性

昨年度試作機器と比較して価格が低廉であり、且つ耐久性に勝ること。

3. 操作時間

昨年度試作機器と比較して、受精卵測定時の初期設定が簡便かつセットが容易であり、操作性に優れ、初心者でも高い再現性を得ることが可能で、全自動化を実現することにより検査時間の短縮を図るものであること。

5. 概算見積額の内容、妥当性

ただし、提案を確認できないもの、具体性に欠け意味を成さないと判断されたものについては不可とし、**一項目でも不可があったものは不採用とする。**

【評価基準表】100点満点

審査項目	点数	評価基準			
		優	良	可	不可
1		30	15	6	不合格
2		40	20	8	不合格
3		20	10	4	不合格
4		10	5	2	不合格

「全自動受精卵呼吸測定装置の試作」業務
調達日程（企画競争）

業務期間 平成 25 年 10 月（契約日）～平成 25 年 12 月 27 日

調達日程

- 1．公告日 平成 25 年 8 月 26 日
- 2．説明会(原則開催) 平成 25 年 8 月 29 日 16：00～
- 3．提案書締め切り 平成 25 年 9 月 9 日
- 4．審査期間 平成 25 年 9 月 10 日～平成 25 年 9 月 12 日
- 5．審査結果報告 平成 25 年 9 月 13 日
- 6．仕様書作成 平成 25 年 9 月 17 日～平成 25 年 9 月 27 日
- 7．契約請求書提出 平成 25 年 9 月 30 日

平成 25 年 8 月 12 日

企画競争手続請求書

調達室長 殿

医学部・医学系研究科
事務長 齋藤 嘉信

業務名 「全自動受精卵呼吸測定装置の開発」業務

上記業務に係る企画競争手続を請求しますので、よろしくお取り計らい願います。

記

1. 企画競争方式を採用する理由

東北大学医学系研究科では現在、厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）平成 25 年度採択課題の 1 つとして、「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」に関する研究開発（代表者：宇都宮裕貴、以下「本プロジェクト」とする）を実施しており、その課題の 1 つとして新しい受精卵呼吸測定装置の開発に取り組んでいる。

本プロジェクトは受精卵呼吸測定装置としての妥当性検証が目的であり、本業務で実施する機器開発・改良自体は本学が担当する研究開発の範疇には入らない。そのため、機器開発・改良の目的に最も合う提案を採択するため、企画競争を実施する。

2. 添付書類

- 募集公告（案）
- 募集要領（案）
- 調達日程（案）

(資料5)

受精卵活性測定デバイス 開発進捗

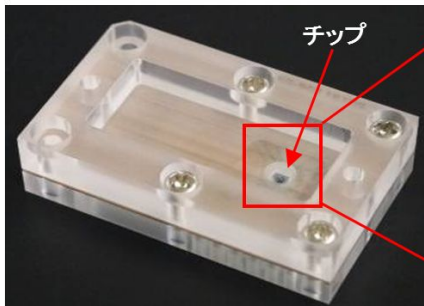
2013年 12月 10日

パナソニック株式会社
オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社
技術本部 エコマテリアル開発センター
バイオデバイスグループ

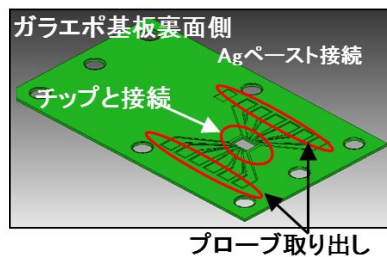
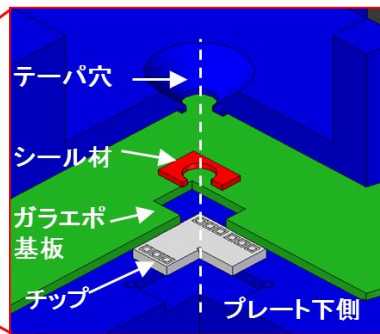
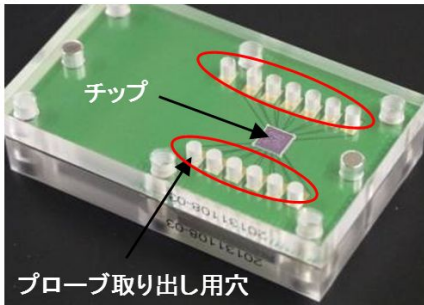
測定プレート設計開発進捗

測定プレート構造 (Proto.2)

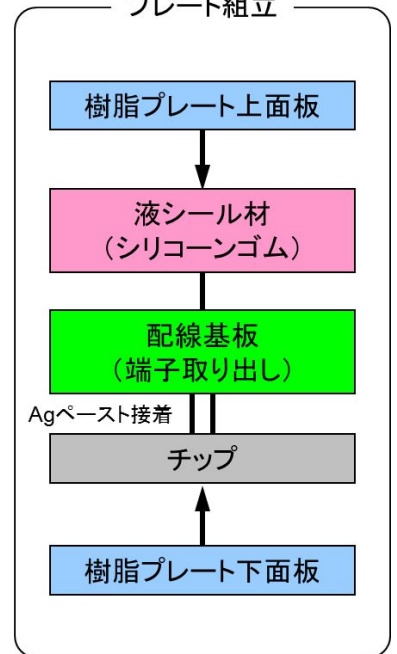
ウェル側



裏面側



プレート組立

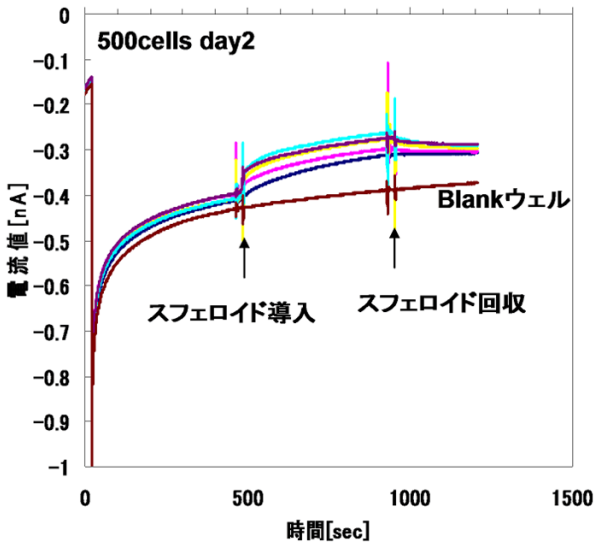


Proto.1と比べ、組立容易性を向上させたProto.2へ切り替え。
ES0は、Proto.2の4ウェル構造のプレートを設計/試作中。

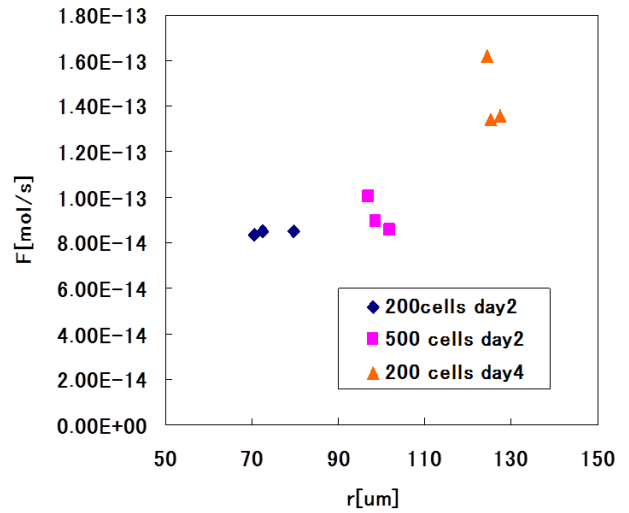
生体(スフェロイド)でのデバイス機能評価状況

スフェロイド(細胞塊)
酸素消費量測定

評価チップ : ME1301-P02-03 C11 Proto.1
測定方法 : 6電極同時ステップ印加(-0.5V印加)
測定液 : ERAM-2



(1) スフェロイド導入/回収と酸素還元電流変化



(2) 酸素消費量とスフェロイド径の相関

- ◆ 酸素還元電流の外乱要因を低減し、スフェロイド近傍での溶存酸素濃度勾配の検出に成功。
- ◆ スフェロイド近傍での溶存酸素濃度勾配から酸素消費量を算出、スフェロイド径と相関があることを確認。(マイクロプローブ方式と同様の傾向を示す)

生体(スフェロイド)での呼吸活性検討

測定結果(代表例)

【測定条件】チップ:P02-03 Prot.1 C11-e12345
装置:HA1010mM8 (Hokuto Denko)
測定液:ERAM-2
走査範囲:0V→-0.5V

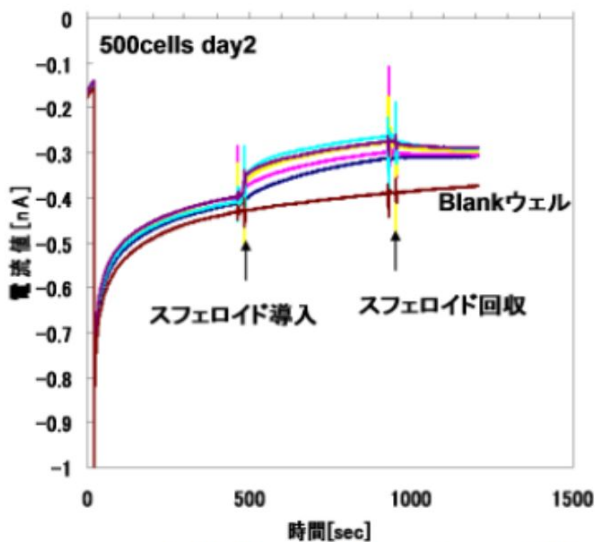


Fig. 3 測定結果(WE6はblankウェルに接続)

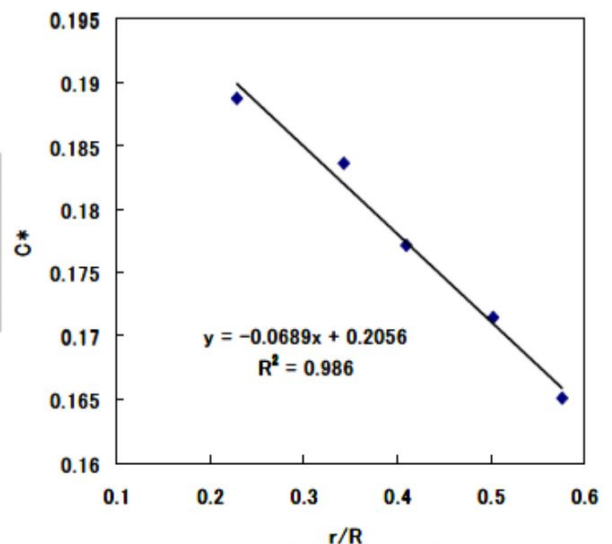


Fig. 4 溶存酸素濃度プロット

- ◆ 電極距離依存的に酸素濃度勾配を検出できた(第2回測定と同様の結果)

まとめ／今後の計画

まとめ

- (1) 専用設計のProto.2測定プレート(1ウェルタイプ)を完成。組立工程の安定化を確認。
4ウェルタイプのES0測定プレート設計中。2013年12月中に完成予定。
- (2) 東北大学 工学部 末永研究室のご協力により、生体(スフェロイド)での酸素消費量算出に成功。
Ptマイクロプローブ方式で報告されている「スフェロイド径と酸素消費量の関係」と同様の傾向を確認。

今後の検討予定

- (1) チップ設計／薄膜MEMSプロセス技術開発
 - ・生体近傍での溶存酸素濃度分布の二次元分布を考慮した、チップ設計の改善
 - ・測定バラツキ、電極特性バラツキを低減するチップ設計、および薄膜MEMSプロセス技術改善
- (2) プレート設計／組立工法開発
 - ・動物受精卵での実験に対応可能な、「ES0測定プレート」の設計および試作
- (3) 電気化学測定プロトコル開発
 - ・複数の生体(スフェロイド)での酸素消費量比較
 - ・測定バラツキを低減する測定条件の開発

(資料 6)

平成 2 5 年度

「全自動受精卵呼吸測定装置の試作機器改良業務」 業務完了報告書

平成 2 6 年 1 月 2 1 日

パナソニック ヘルスケア株式会社

目次

1 はじめに.....	3
1.1 背景と課題.....	3
1.2 東北大学からの仕様書の抜粋.....	5
1.3 東北大学からの業務要件.....	8
1.4 実施スケジュール.....	8
2 設計試作.....	9
2.1 チップ型電極、プローブの試作.....	9
2.2 変換アダプターの試作.....	13
3 性能評価.....	15
3.1 チップ型電極の評価検証結果.....	15
3.1.1 フェロセンメディエータ液中の酸化還元電流評価 ...	16
3.1.2 乳がん細胞スフェロイドを用いた酸素消費量測定検証	16
3.1.3 酸素濃度勾配のシミュレーションと酸素消費計算式	19
3.1.4 測定時間に関する検証	19
2	
4 試作検討結果.....	21
5 試作品納品物.....	22
6 打合せ記録.....	23
6.1 2 0 1 3 年 1 2 月 1 0 日 報告資料	23
6.2 2 0 1 3 年 1 2 月 2 4 日 報告資料	26

1 はじめに

1.1 背景と課題

生殖補助医療による出生児が50人に1人の時代を迎え、我が国では約21万人が生殖補助医療を受ける時代となっている。また、先進諸国である米国、欧州においても、生殖補助医療の状況は我が国と同様の環境が整備され、それぞれの国において数十万人以上が生殖補助医療を受ける状況にある。

【国内】

不妊で悩むカップル約230万カップル
生殖補助医療を受けた患者約21万人
約213,800回治療
特定不妊治療助成金支給回数約8万4,395件

【米国】

生殖補助医療を受けた患者国内の0.7倍

【欧州5カ国】

生殖補助医療を受けた患者国内の1.9倍

出典：不妊治療情報センター情報、2009年時厚生労働省発表、日産婦学会複数論文より引用

【国内】

人工受精約1万円/回
体外受精約30万円/回
顕微授精約40万円/回

【米国】

体外受精約12,500ドル/回

【欧州：イギリス例】

体外受精約6,534ドル/回

出典：不妊治療情報センター情報、徐クリニックWeb

体外受精及び顕微授精のみとなります。

治療1回につき15万円を上限額として、

初年度は1年度()当たり3回、2年度目以降は1年度当たり2回を限度に、通算5年度(期間が連続している必要なし)まで、かつ合計10回まで申請することができます。

生殖補助医療に要する一回当たりの費用は、人工受精で約1万円、体外受精で約30万円、顕微授精で約40万円と高額であり、先進諸国でもほぼ同様の費用が掛かる。

生殖補助医療により着床、妊娠に至る率は約3割前後と言われ、個人が負担する医療費は大きな負担となる。

また、児を儲けるけるために複数回の生殖補助医療を受けることに対するメンタル面での個人の受ける負担は非常に大きい。

このため、東北大学では、着床、妊娠に至る率に影響を及ぼしている、胚移植時の最も良好に発育している卵の選択指標として、通常行われている形態学的指標(顕微観察による割卵状態等の観察による)に加え、卵の呼吸の結果である酸素消費の状態を評価する、胚細胞呼吸測定装置をクリノ株式会社と共に開発し世に送り出している。本胚細胞呼吸測定装置は臨床現場で使用され、有意に妊娠率の向上成果を得ている。

課題：しかしながら、現在の胚細胞呼吸測定装置による測定は、測定用の電極を卵の近傍へ配置する手段が用手法によるため、臨床現場におけるルーチン使用に対する時間的、人件費的コストアップとなる導入に対する障壁が存在する。本受託業務で開発・試作される測定デバイスは用手法による操作を排することを実現し胚細胞呼吸測定装置（以下、受精卵呼吸測定装置とも表現）を簡便に臨床現場で利用することを可能とするために必要なデバイスの提供を目指すものである。

1.2 東北大学からの仕様書の抜粋

1.3 東北大学からの業務要件

本業務で、前記東北大学より指定された仕様を満たすチップ型電極（以下チップ）及びチップを内蔵するチップ型プローブ（以下プローブ）について、

[東北大学 仕様書による要件]

- 1) チップの設計試作
- 2) プローブの検証評価
- 3) プローブの電気化学的検証

の各項目について、東北大学より提示された要件を満たすチップ型プローブ及び、昨年度試作機器と本業務で試作するチップ型プローブとを接合する変換アダプターを成果物とする。

[東北大学 仕様書による成果物]

- 1) チップ型プローブの試作品
- 2) チップ型プローブと昨年度試作器と接合する変換アダプター

1月（上旬）

チップ型電極試作

チップ型電極評価

プレート試作

プレート評価（チップ型電極

組み込み型）

ポテンショスタット改造

総合評価・報告書作成

2 設計試作

東北大学より提示された仕様書に従い、以下の試作仕様のチップ型プローブ及び変換アダプターの仕様を設定した。

2.1 チップ型電極の試作、プローブの試作

図1-1 に、評価用チップ型電極（チップ）を組み込んだチップ型プローブの構造を示す。最終的には、この評価用チップが測定数に合わせて数個（5 個）並んだ形でアクリル樹脂プレートに埋め込まれる形のチップ型プローブを試作した。

図1-1. 試作したチップ型プローブの構造

図1-2. TEG(Test Element Group)切り出し

4mmチップシール（シリコーンゴム）

アクリル背面板

参照極(Ag/AgCl) 対極(Pt線)

アクリルプレート

配線基板

(電極取り出し)

チップ型電極および測定液保持プレートの断面イメージ

チップ型電極の 上面イメージ

試作したプローブ形電極には、図1-2 及び1-3 に示したチップ型電極(4mmx4mm 角)が培養液の液漏れを防ぐシールにより固定されており、本チップ型電極の中心に受精卵を静置、卵から一定距離毎に配置された電極露出部(図1-3)で呼吸活性の指標である酸素還元電流を測定することができる。図1-4 に電極露出部及び絶縁部の寸法を示す。また、図1-5 に電極のSEM(電子顕微鏡像)を示す。同図の左端円弧が受精卵を静置するための陥没穴で、その中心から直径方向に電極露出部が並んでいる。

図1-3. 試作したチップ型電極の構成図と寸法

図1-4. 電極部寸法(ディメンジョン)

チップ構造チップ構造

受精卵(直径=約200 μ m)

作用電極部(微小開口部)

絶縁体層(SiO₂)

作用電極配線(Pt)

受精卵位置決め

キャビティ構造

Si基板

測定液

200 μ m

100 μ m

20mm~300mmの範囲で

複数個配置

【Pt(電極)拡大】

SiO₂

(絶縁部)

Pt(電極露出部)

【電極構造】

電極部分:Pt/Ti

絶縁部分:SiO₂

SiO₂のエッチングにより電極部分を露出

電極直径5 μ mのものを設計

図1-5. 試作した電極部のSEM(電子顕微鏡像)

チップ型プローブは、上記チップ型電極、培養液を溜めるアクリルプレート、チップ型電極とアクリルプレート間の液シール(培養液の漏防止)から構成される。試作した最終形態であるチップ型プローブの写真を以下に示し、表1-1 に構成をまとめた。

図1-6. 試作したチップ型プローブ

表1-1 チップ型プローブの構成

最終形態 構成部品 概要

チップ型電極

MEMS 技術と半導体製造技術の微細加工技術を使用したSi, SiO₂,Pt(白金)で構成される酸素還元電流を測定する電極と絶縁体を構成する

アクリルプレート

培養液を溜め、受精卵をチップ型電極に静置するための誘導するウェルを構成する

チップ型プローブ液シール

その他部品

チップ型電極をアクリルプレートのウェルに固定し、駅漏れを防止するためのシール。シリコンを材料として採用する

2.2 変換アダプターの試作

2.1 で試作したチップ型プローブを使って、受精卵の呼吸活性を培養液中の溶存酸素を酸素還元電流測定により推定するために、ピコアンペア[pA]オーダーの微小電流を測定するための、ポテンシostatといわれる装置が必要となる。本業務では、クリノ株式会社製CRAS システムと呼ばれるポテンシostatを含む測定装置で測定可能となるよう、同装置と本業務で試作したチップ型プローブを接続する変換アダプターも試作した。

試作した変換アダプターとクリノ株式会社製のCRAS システムとの関係を図2-1 に示す。

図2-1. 試作した変換アダプター (赤字表示部)

本変換アダプターと試作したチップ型プローブの接続部を図2-2 に示す。

図2-2. 変換アダプターとチップ型プローブ (図中 AIS プレート) 接続部

3 性能評価

東北大学より指定された要件 (1.2 東北大学からの仕様書の抜粋 にて再掲) について、評価検証結果を以降に示す。

3.1 チップ型電極の評価検証結果

本業務で試作したチップ型電極の断面イメージ及びチップ型電極の上面イメージ (実物) を図3-1 に再掲する。

図3-1. 試作したチップ型プローブ(再掲)

3.1.1 フェロセンメディエータ液中の酸化還元電流評価

本チップ型プローブについて、10mmol/L のフェロセンメディエータ液中で銀塩化銀参照電極を用いて酸化還元電流をCV 測定により検証を行った。以下に結果を示す。

図3-2. 10mmol/L フェロセンメディエータ液中のCV 測定

本結果より、10[mmol/L] フェロセンメディエータ液中で、対銀塩化銀参照電極に対する酸化還元電流は10[nA]以下で、東北大学からの要件である30[nA]以下を満たしていることを検証できている。

3.1.2 乳がん細胞スフェロイドを用いた酸素消費量測定の検証

本チップ型プローブについて、乳がん細胞のスフェロイドを用いて、細胞の酸素消費量の測定検証を行った結果を以下に示す。

3.1.2.1スフェロイドの作成

乳がん細胞を直径が人受精胚と同等の直径200[um]になるようスフェロイドを図3-3 に示す手順で作成した。

【測定条件等】共通測定液 = 10mmol/Lフェロシアン化カリウムを含む、0.1mol/L 塩化カリウム溶液

(2012年度試作チップ、Ptマイクロプローブ電極) 測定系 = HV 405@北斗電工、北斗電工製 R-6参照極、Pt薄膜対極

(2013年度試作チップME1301B D3) 測定系 = HV-4000@パナソニックAIS、弊社所有参照極(対極と共用)

図3-3. スフェロイドの作成手順

作成されたスフェロイドを図3-4 に示す。

図3-4. 作成されたスフェロイド

3.1.2.2酸素消費量の測定検証

図3-5. スフェロイドによる酸素還元電流測定 1

図3-6. 陥没穴外周淵からの電極距離

図3-5 左図はスフェロイドをチップ型プローブに投入する前後で、ポテンショスタットにより測定される電流値 = 酸素還元電流値が変化すること、スフェロイドからの距離が離れるほど (WE1 が最もスフェロイドに近く、WE2,3 と距離は離れる) 酸素還元電流が少なくなり、スフェロイドにより酸素濃度勾配が生じていることを測定できている。図3-5 右図はスフェロイドの直径と酸素消費量 (後述) と相関があることを示している。次に、図3-7 右図で、電極がスフェロイドに近いほど (WE1=20[um]...WE6=300[um]) 溶存酸素濃度 (図中C*) が低い(受精卵の呼吸により溶存酸素濃度が低くなっている)相関が示せている。

図3-7. スフェロイドによる酸素還元電流測定

右方向：卵子から貴距離が近い

3.1.3 酸素濃度勾配のシミュレーションと酸素消費計算式

理論シミュレーションから酸素濃度勾配と酸素消費計算式を算出し、前項のスフェロイドを用いた酸素消費量算出に用い、理論値相当の酸素消費量が算出できていることを確認した。図3-8 に算出した溶存酸素濃度C(R)と受精卵中心からの距離R の関係式を示す。

図3-8. 酸素濃度勾配、酸素消費計算検討

3.1.4 測定時間に関する検証

前項のスフェロイドを用いた検証で、測定時間 (東北大学の要件では5 分以内) の検討と検証を行った。

図3-9. 5 分間の酸素還元電流の推移

【バルクの溶存酸素濃度】 $C_0 = 0.209 \text{ mmol/L}$

【各電極近傍の溶存酸素濃度】 $C^* = C_0 (1 - I / I_{BG})$

【電極とスフェロイドの中心の距離】 $R = (L_2 + r_2) \cdot 0.5$

【スフェロイドからの距離に対する酸素濃度】

$C(R) = (r/R) \cdot (C^* - C_0) + C_0$

酸素濃度プロファイルがスフェロイドを中心とした半球面拡散であるとする

【スフェロイドの呼吸活性】

$$F = 2 \quad rD(C^* - C_0)$$

(酸素の拡散係数 $D = 2.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$)

図3-9 で、スフェロイド投入直後から酸素還元電流の変化が読み取れており、定常状態（10分以上）を待たず、酸素還元電流の変化時定数を含む波形プロファイルから5分以内の測定が可能であることが示唆された。

4 試作検討結果

1) チップ型電極の設計・試作

「各評価」

- ・マニュアルのマイクロプローブの手技を廃止すること達成マイクロプローブ廃止
- ・電極には生体適合材料を使用すること達成
- ・チップ電極は受精卵に悪影響を与えないこと達成
- ・操作性に優れ、5分以内に測定可能にすること達成5分以内測定可能
- ・測定数に合わせて数個（6個程度）並んだ形のものを試作すること達成5個並んだものを試作

「総合評価」

- ・マニュアル操作をなくし、一度に5分以内で測定できる設計になっていること達成
- ・受精卵に対し有害な事象が生じないこと達成
- ・耐久性に優れ、高価でないこと達成

2) チップ型プローブの検証評価

「各評価」

・従来機器のポテンシオスタットを改造し、チップ型電極による測定を可能にする達こと成変換アダプターを試作

・測定アルゴリズムの評価をすること達成報告書本文に記載

・従来機器のソフトを改造し、チップ型電極による酸素消費計算を可能にする達こと達成従来機器のEXCEL出力にて計算可能

・酸素濃度勾配のシミュレーションをし、酸素消費計算式を開発すること達成報告書本文に記載

「総合評価」

・チップ型電極による測定が可能なポテンシオスタットであること達成変換アダプターを使用して実現

・酸素消費量の計算を可能にし、計算式を確立すること達成計算式確立

3) チップ型プローブの電気化学的検証

「各評価」

・測定電流を銀塩化銀参照電極に対し、10mmol/Lフェロセン液中で30nA以下達成10nA以下実現

・測定回数を重ねても、再現性のある結果が得られること達成報告書本文に記載

「総合評価」

・測定電流が30nA以下で測定可能であること達成10nA以下実現

・再現性のある結果が得られること達成報告書本文に記載

業務成果

シリコン、シリコン、アクリル、白金のみで構成、いずれも生体適合材量産効果を見込める半導体プロセスにより実現

5 試作品納品物

1. 本報告書ファイルに試作チップ（クリアファイル中）
2. クリノ社製CRASシステム用変換アダプター

6 打合せ記録

6.1 2013年12月10日 報告資料

パナソニック（株） A I I I I S 社技術本部エコマテリアル開発センターバイオデバイスグループ2

2013/12/24

受精卵活性測定デバイス開発

開示先限定：東北大学、PHC

まとめ / 今後の計画

- (1) 専用設計のProto.2測定プレート（1ウェルタイプ）を完成。組立工程の安定化を確認。4ウェルタイプのES0測定プレート設計 / 第1試作完了。Proto.2同等性能であることを確認。
- (2) 東北大学工学部末永研究室のご協力により、生体（スフェロイド）での酸素消費量算出に成功。
- (3) スフェロイド径を変えてスフェロイド酸素消費量を評価したが、スフェロイド径に依存した傾向は見られるものの、チップ間 / 測定間のバラツキが現状では大きい。

今後の検討予定

- (1) チップ設計 / 薄膜MEMSプロセス技術開発
 - ・ 生体近傍での溶存酸素濃度分布の二次元分布を考慮した、チップ設計の改善
 - ・ 測定バラツキ、電極特性バラツキを低減するチップ設計、および薄膜MEMSプロセス技術改善
- (2) プレート設計 / 組立工法開発
 - ・ 動物受精卵での実験に対応可能な、「ES0測定プレート」の設計および試作
- (3) 電気化学測定プロトコル開発
 - ・ 複数の生体（スフェロイド）での酸素消費量比較
 - ・ 測定バラツキを低減する測定条件の開発

以上__

(資料7)

第11回 胚細胞呼吸測定装置研究会 (第5回 厚生労働省医療技術実用化総合研究事業 班会議)

日時：平成26年3月2日(日)9:00~10:00

場所：江陽グランドホテル4階 千歳の間

プログラム

進行 東北大学 宇都宮 裕貴

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1・開会の辞 | 東北大学 八重樫 伸生 |
| 2・試作機器の開発状況 | パナソニック(ヘルスケア/AIS社) |
| 3・本研究会今後の方向性 | 東北大学 宇都宮 裕貴 |
| 1) 倫理申請、余剰卵蓄積について | |
| 2) 研究報告書記載について | |
| 3) 来年度の研究計画 | |
| 4・各施設における進捗報告 | 各施設担当者 |
| 5・閉会の辞 | 秋田大学 寺田 幸弘 |

第11回 胚細胞呼吸測定装置研究会(第5回 厚生労働省医療技術実用化総合研究事業 班会議)が平成26年3月2日(日) 江陽グランドホテルで開催されました。パナソニック・ヘルスケア社様、クリノ社様と検討を重ねて胚呼吸測定装置の試作品がついに完成し、牛を用いた研究結果等に対して有意義なディスカッションが行われました。倫理申請等の調整を経て平成26年度からはいよいよ本格的な研究開始となります。研究の結果について十分議論を重ね、今後の生殖医療における新たな指針を東北の地から世界へ発信していくことができればと思います。



I I . 分担研究報告書

- 1 . 凍結融解がヒト胚盤胞の形態と呼吸活性に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 寺田幸弘（秋田大学医学部教授）

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

凍結融解がヒト胚盤胞の形態と呼吸活性に及ぼす影響
に関する研究

研究分担者 寺田 幸弘 秋田大学教授

研究主旨

凍結融解胚移植は、生殖補助医療における妊娠率の向上に大きく寄与している。近年では、複数の胚を融解した場合や、移植のキャンセルのような不測の事態が生じたケースにおいて、一度融解した胚を再度凍結して利用することの臨床的有用性も報告され始めている。しかし、胚を複数回凍結融解するという操作が胚自体に与える影響については動物胚を含めても十分な検討がなされておらず、特に、ヒト胚では情報が限られている。本研究では、患者の同意を得た廃棄対象の余剰凍結胚を用い、複数回凍結融解したヒト胚における形態的变化を観察した。さらに機能的な変化については、試料に対して非侵襲的な測定手法である細胞呼吸活性測定装置（CRAS-1.0、クリノ社）の特性を生かし、複数回凍結融解した同一のヒト胚における呼吸量の変化を追跡しようとした。

ヒト胚盤胞の凍結と融解は、北里バイオファルマ社の Cryotop Safety Kit を用いて行った。融解した胚盤胞は、数時間の回復培養後に生存率を調べ、Gardner 分類によるグレードを記録した。さらに、倒立顕微鏡に装着されたデジタルカメラで画像を取得し、画像解析ソフト（ImageJ）を用いて胚盤胞の大きさ（径）を計測した。解析後、変性せずに生存した胚は再度凍結した。凍結融解は 5 回まで繰り返し行った。また、細胞呼吸測定機器（CRAS-1.0、クリノ社）を用いて、凍結融解が胚盤胞の呼吸量に与える影響について検討した。

本研究の結果、ヒト胚盤胞は 5 回の凍結融解後も生存することが可能であることが明らかとなった。本研究で用いた cryotop 法による超急速ガラス化凍結保存は、ヒト胚にとって極めてダメージの少ない手法であると考えられる。また、凍結融解前後の胚盤胞の大きさ（径）の変化は、発生能を示す簡便で客観的な指標となる可能性が示唆された。呼吸量測定と併用することで、ヒト胚の評価法の精度向上につながることを期待される。本研究では、9 年間以上凍結保存されたヒト余剰胚も研究に使用可能であることが明らかとなった。これらは、受精卵呼吸測定装置の新型デバイスの開発に必要な、ヒト凍結余剰胚に関する有用な基礎的データとなるものと思われる。

研究協力者

熊谷 仁(秋田大学産婦人科准教授)
熊澤由紀代(秋田大学産婦人科助教)
金森恭子(秋田大学産婦人科医員)
佐藤巨(秋田大学産婦人科医員)
白澤弘光(秋田大学産婦人科医員)
富樫嘉津恵(秋田大学産婦人科医員)
舘山奈江(秋田大学産婦人科培養士)
椋嶋克哉(秋田大学産婦人科培養士)

A・研究目的

生殖補助医療（ART：Assisted Reproductive Technology）は、卵管閉塞や乏精子症などの難治性不妊症患者に対して、配偶子（卵子・精子）を体外に取り出し、受精（体外受精、顕微授精）させ、体内に戻す（胚移植する）治療法である。日本産科婦人科学会のART登録データによると、2011年に我が国では27万件の生殖補助医療が施行され、それにより3万1千人の児が誕生している。本邦の2011年の全出生数は105万人であることから（厚生労働省人口動態統計）出生児の3%、約30人に一人が生殖補助医療に由来していることになる。

生殖補助医療のうち、2011年には体外受精が7万1千件、顕微授精が10万2千件、凍結胚を用いた治療が9万6千件行われている。体外受精や顕微授精による出生児数はそれぞれ5千人と、近年横ばい傾向にある。それに対し、凍結胚による出生児は急速に増加して2万2千人と、2007年に比べ倍増している（図1）。この原因として、2008年の日本産科婦人科学会会告において、多胎防止の観点から単一胚移植が原則となり、治療周期あたりの移植胚数を1個に制限する傾向が強まったことが挙げられる。通常、排卵誘発によって複数の卵子が採取

されることから、単一胚移植後に生じる余剰胚を凍結保存する必要性が高くなっている。

凍結融解胚移植は、受胎側（母体）の許容に合わせて移植時期を調整することが可能である。このため、生殖補助医療における妊娠率の向上にも大きく寄与している（新鮮胚移植妊娠率：21.3% vs 凍結融解胚移植妊娠率：34.2%、日本産科婦人科学会2011年ART登録データ）。また、複数の胚を融解した場合や、移植のキャンセルのような不測の事態が生じたケースにおいて、一度融解した胚を再度凍結して利用することの臨床的有用性も報告されている(1-3)。しかし、胚を複数回凍結融解するという操作が胚自体に与える影響については動物胚を含めても十分な検討がなされておらず、特に、ヒト胚では情報が限られている。

本研究では、患者の同意を得た廃棄対象の余剰凍結胚を用い、複数回凍結融解したヒト胚における形態的变化を観察した。さらに機能的な変化について、試料に対して非侵襲的な測定手法である細胞呼吸活性測定装置（CRAS-1.0、クリノ社）の特性を生かし(4-6)、複数回凍結融解した同一のヒト胚における呼吸量の変化を追跡しようとした。

B・研究方法

患者の同意を得た廃棄対象の余剰凍結胚（胚盤胞）を用いた。胚盤胞の凍結と融解は、北里バイオフィーマ社のCryotop Safety Kitを用いて行った。融解した胚盤胞は、数時間の回復培養後に生存率を調べ、Gardner分類によるグレードを記録した。さらに、倒立顕微鏡に装着されたデジタルカメラで画像を取得し、画像解析ソフト（ImageJ）を用いて胚盤胞の大きさ（径）を計測した。解析後、変性せずに生存した胚は再度凍結した。凍結融解は5回まで繰り返し行った。

また、細胞呼吸測定機器（CRAS-1.0、ク

リノ社)を用いて、凍結融解が胚盤胞の呼吸量に与える影響について検討した。

C・研究結果

計6個の胚盤胞を供試した。6個の胚盤胞の凍結前のグレードは、No.1:4CC、No.2:3CC、No.3:3AA、No.4:3AA、No.5:4AA、No.6:3BCであった。凍結融解後の生存率は、1回目100%(6/6)、2回目83.3%(5/6)、3回目83.3%(5/6)、4回目66.7%(4/6)、5回目66.7%(4/6)であった。凍結融解を繰り返すことにより生存率は低下したものの、5回の凍結融解後も生存が可能であった。グレードの高い胚盤胞(No.4:3AA、No.5:4AA)ばかりでなく、グレードの低い胚盤胞(No.1:4CC、No.2:3CC)も5回の凍結融解が可能であった。途中で変性した胚盤胞(No.3:3AA、No.6:3BC)は、採卵時の年齢が30代後半と高く(No.3:38歳、No.6:39歳)、発育速度が遅い(No.3、No.6共に6日目胚盤胞)傾向がうかがわれた。

凍結保存期間は5日間から9年4ヶ月間まで幅があったが(No.1:9日間、No.2:5年6ヶ月間、No.3:9年4ヶ月間、No.4:9年1ヶ月間、No.5:8年3ヶ月間、No.6:5日間)、凍結保存期間の影響は特に認められなかった。

凍結融解を繰り返すと、それぞれの回復培養時間が積算されることになる。回復培養後の胚盤胞の径を計測したところ、凍結融解を繰り返しても常に拡張していたNo.4の胚盤胞(1回目:155 μ m、2回目:167 μ m、3回目:174 μ m、4回目:188 μ m、5回目:271 μ m)がhatchingした(図2)。その他の、拡張と縮小がみられたり、常に縮小するような胚盤胞は、hatchingすることはなかった(図2)。

呼吸量に関しては、サーモプレートの破損等の原因により安定した結果が得られなかった(添付資料)。クリノ社のアドバイスを得ながら、今後も引き続き

検討を行っていく。

D・考察

ヒト胚盤胞は5回の凍結融解後も生存することが可能であった。このため、一度凍結融解した胚を再度凍結融解した胚(再凍結再融解胚)からも、生児の獲得が報告されているものと思われる。また、凍結融解前後の胚盤胞の大きさ(径)の変化は、発生能を示す簡便で客観的な指標となる可能性が示唆された。呼吸量と併用することで、ヒト胚の評価法の精度向上につながる事が期待される。

E・結論

ヒト余剰胚を用いて、凍結保存と呼吸量測定に関する検討を行った。ヒト胚盤胞は5回の凍結融解後も生存が可能であり、cryotop法による超急速ガラス化凍結保存はヒト胚にとって極めてダメージの少ない手法であると考えられる。また本研究では、9年間以上凍結保存されたヒト余剰胚も研究に使用可能であることが明らかとなった。これらは、受精卵呼吸測定装置の新型デバイスの開発に必要な、ヒト凍結余剰胚に関する有用な基礎的データとなるものと思われる。

G・研究発表

「III.研究成果の刊行に関する一覧表」に別掲

H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

(参考文献)

- 1) Koch J, Costello MF, Chapman MG, Kilani S. Twice-frozen embryos are no detriment to pregnancy success: a retrospective comparative study. *Fertility and Sterility*, 96, 58-62, 2011.
- 2) Murakami M, Egarashi A, Murakami K, Araki Y, Kuramoto T. Perinatal outcome of twice-frozen-thawed embryo transfers: a clinical follow-up study. *Fertility and Sterility*, 95, 2648-2650, 2011.
- 3) Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, Araki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertility and Sterility*, 91, 383-386, 2009.
- 4) Abe H. A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *Journal of Mammalian Ova Research*, 24, 70-78, 2007.
- 5) Moriyasu S, Hirayama H, Sawai K, Kageyama S, Aoyagi S, Shiku H, Matsue T, Abe H, Kacchi M, Hoshi H, Minamihashi A. Relationship between the respiratory activity and the pregnancy rate of bisected bovine. *Reproduction Fertility and Development*, 19, 219, 2007.
- 6) Utsunomiya T, Goto K, Nasu M, Kumasako Y, Araki Y, Yokoo M, Itoh-Sasaki T, Abe H. Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25, 2-7, 2008.

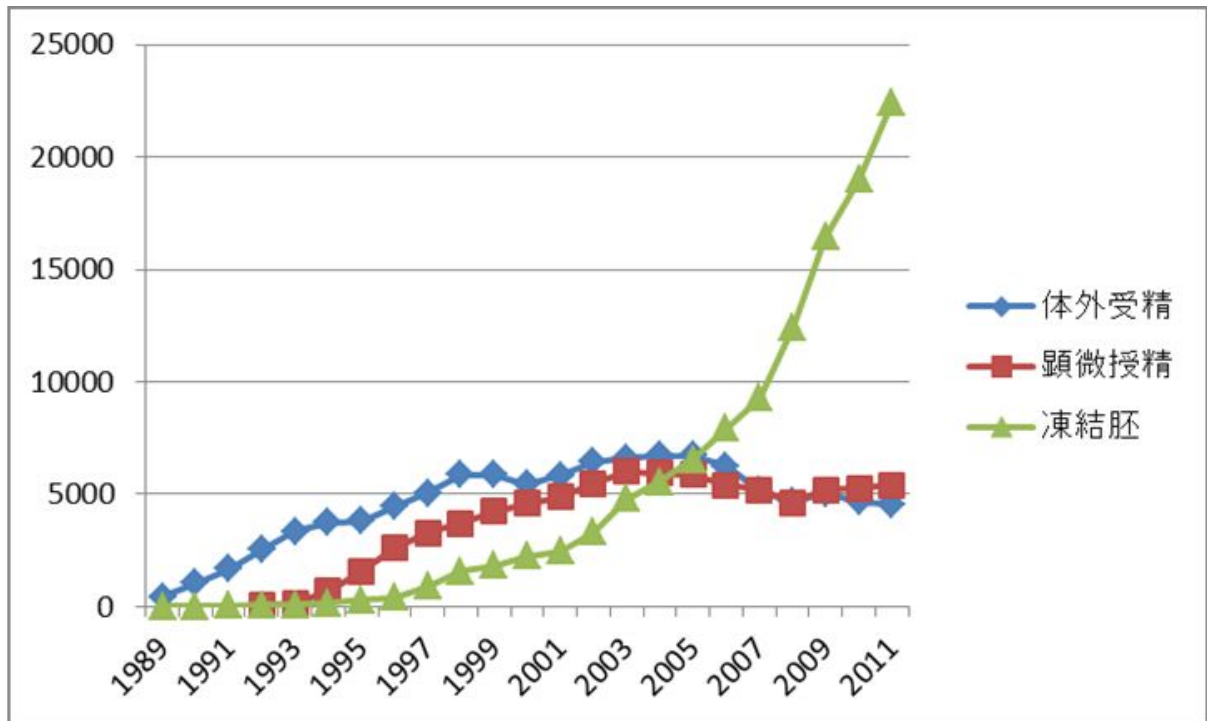


図1. 生殖補助医療による出生児数の内訳と推移

日本産科婦人科学会ART登録データより

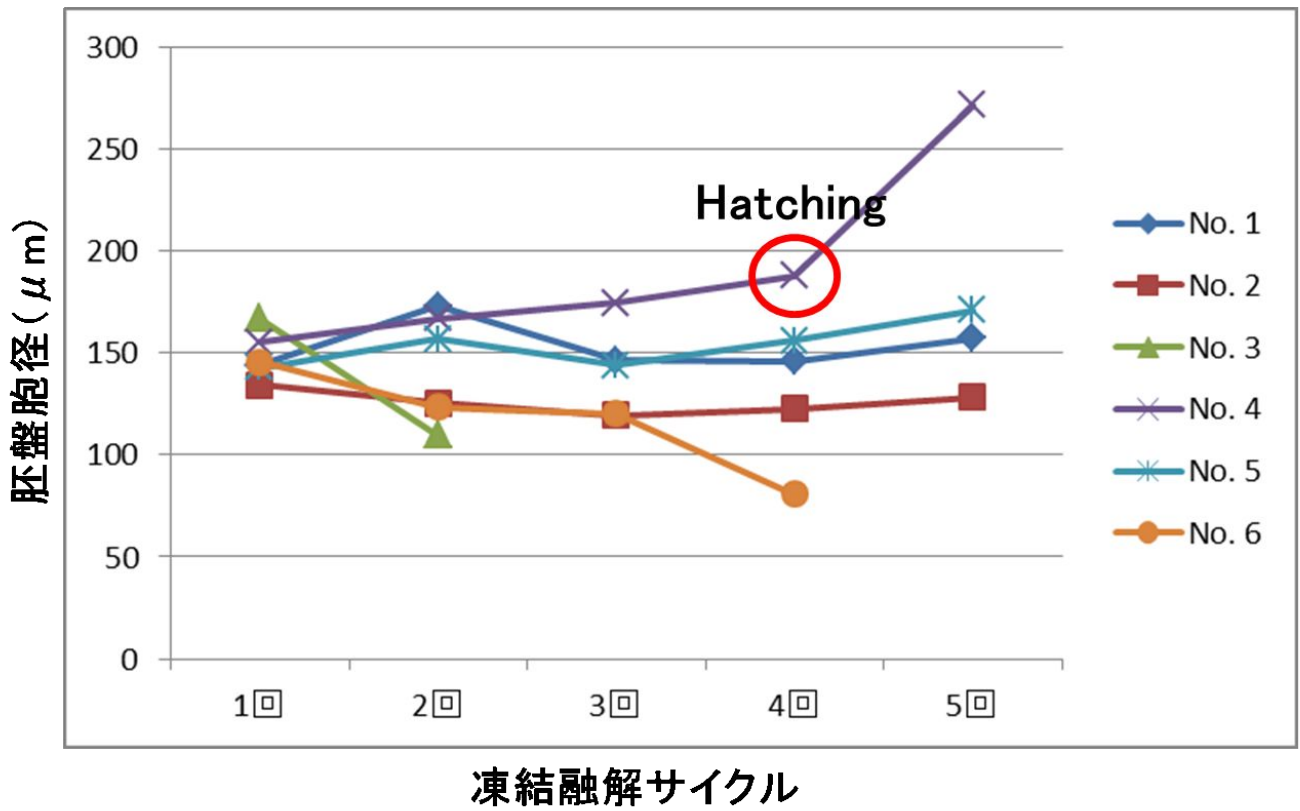


図2. 複数回凍結融解したヒト胚盤胞における径の変化

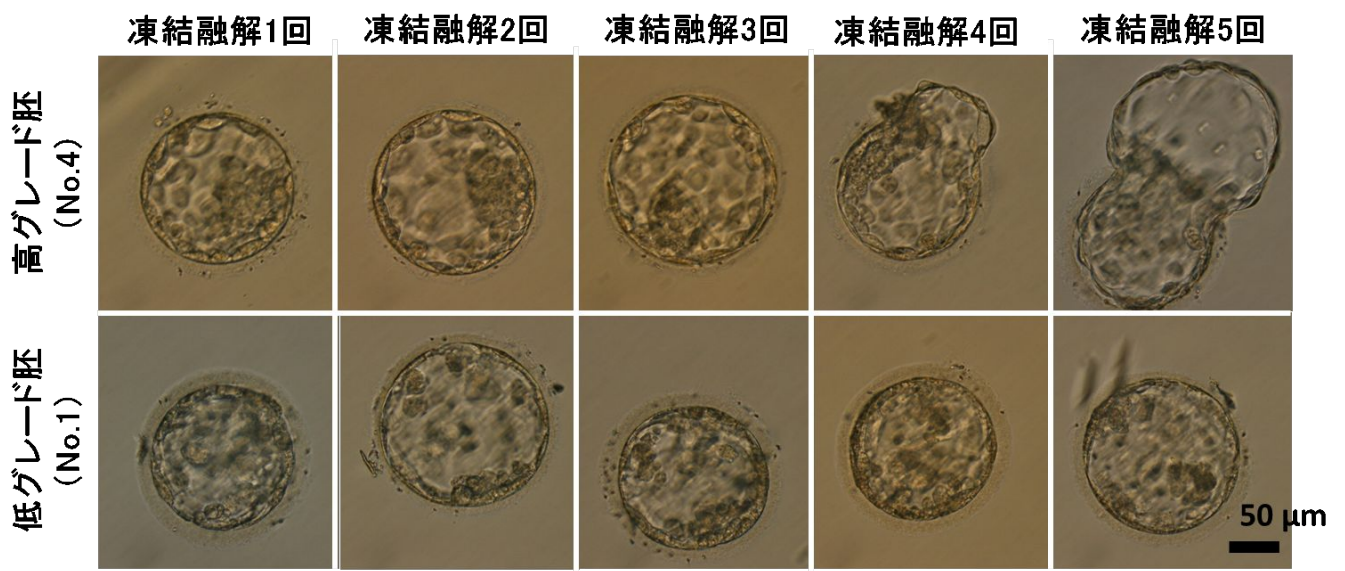
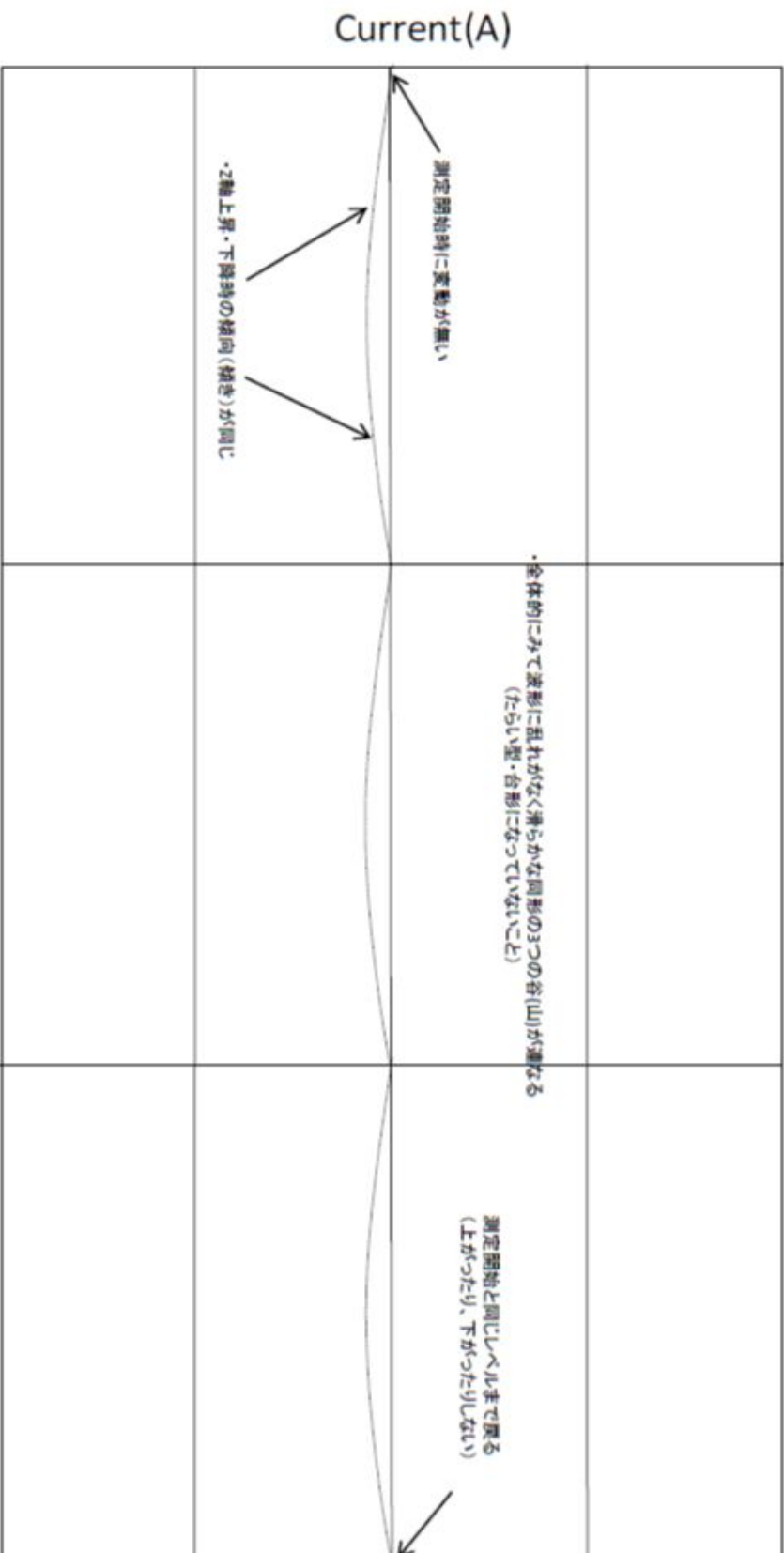


図3. 複数回凍結融解したヒト胚盤胞における形態の変化

・呼吸活性が高い胚を測定した場合の理想的な波形

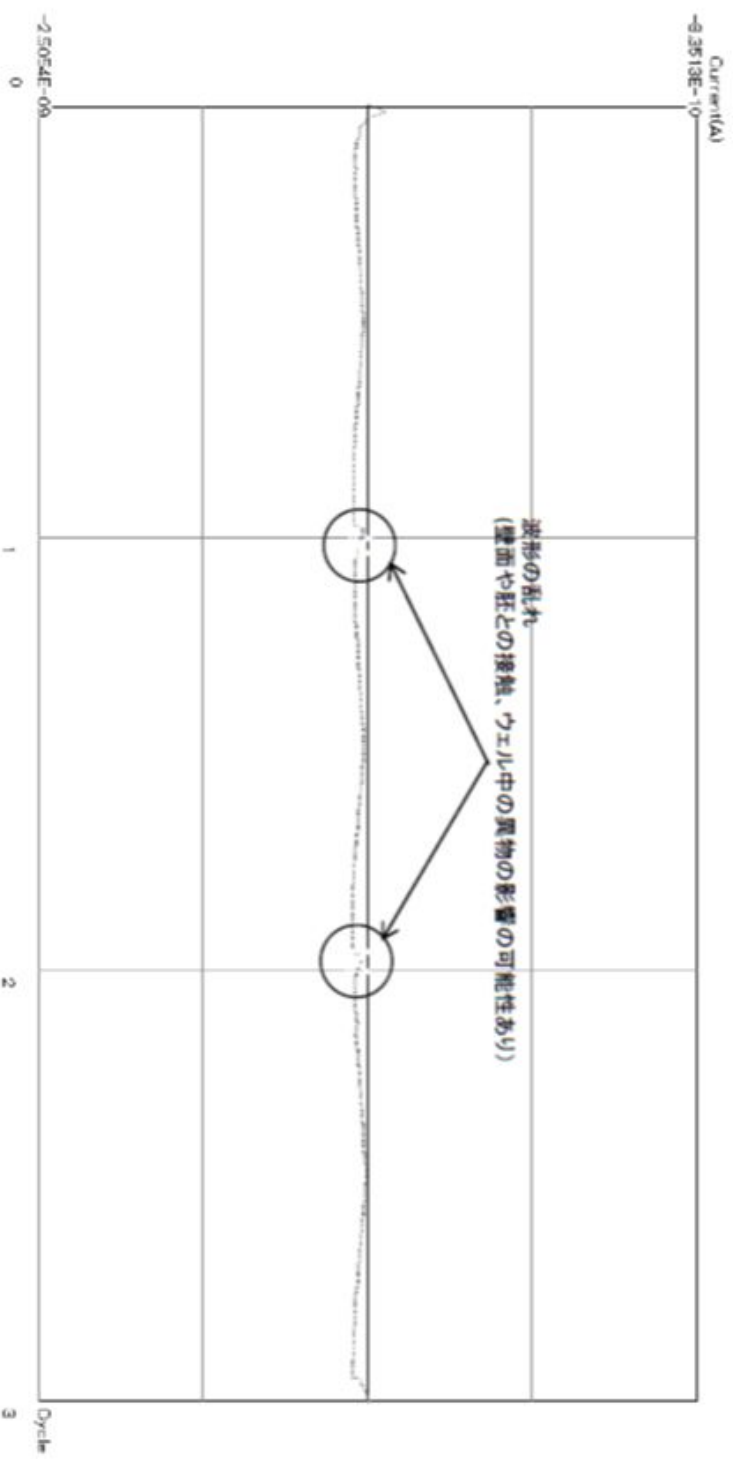
(プランク測定時・活性が低い胚などの測定時は、測定液の状態によっては上向きの山になる場合もあり)



※あくまで理想形です。上記を満たさなくとも許容できるものもありますので、不明な場合はデータを御送りいただければ確認させていただきます。

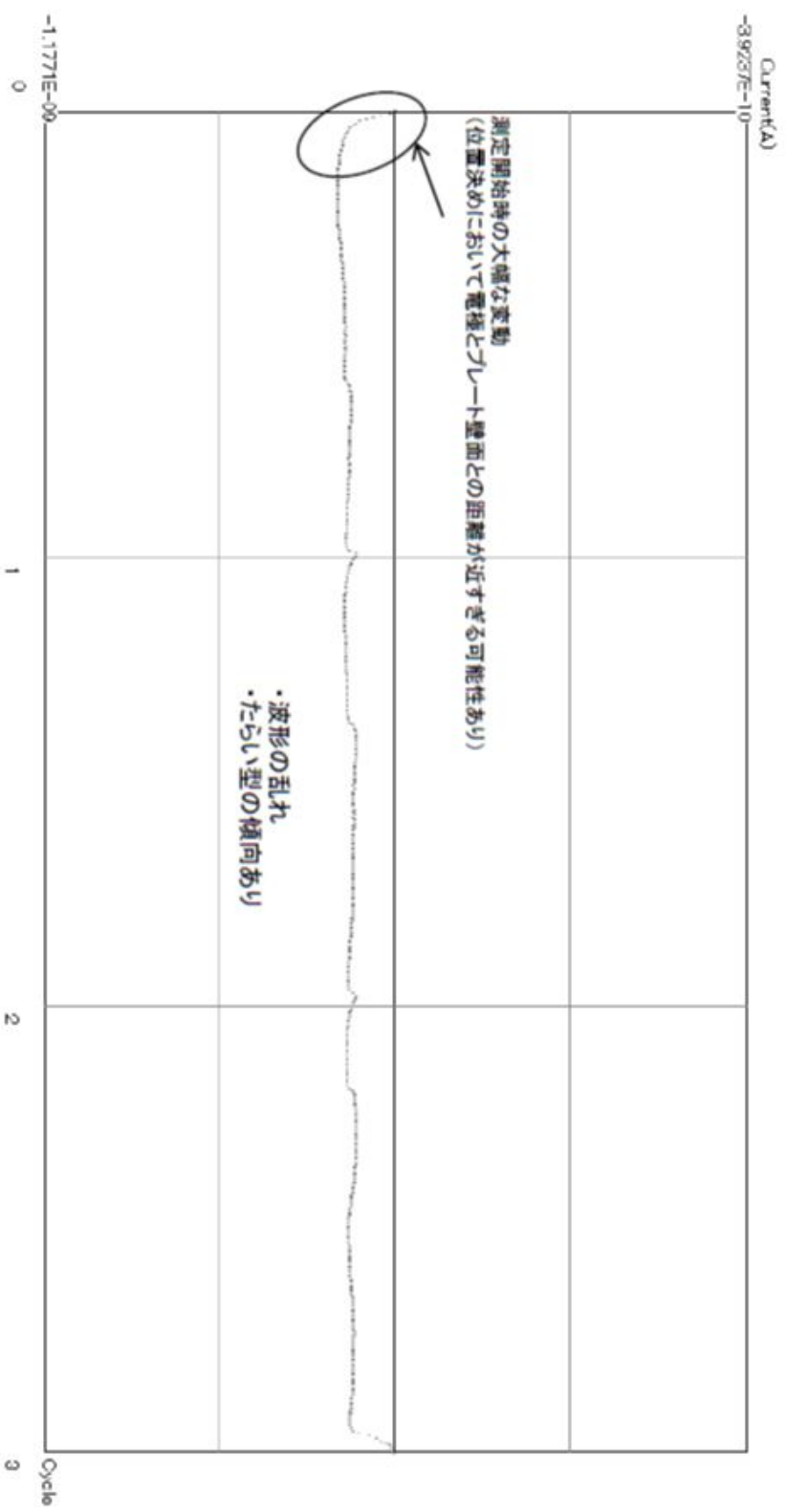
・測定不良例 1

samples_2times_1



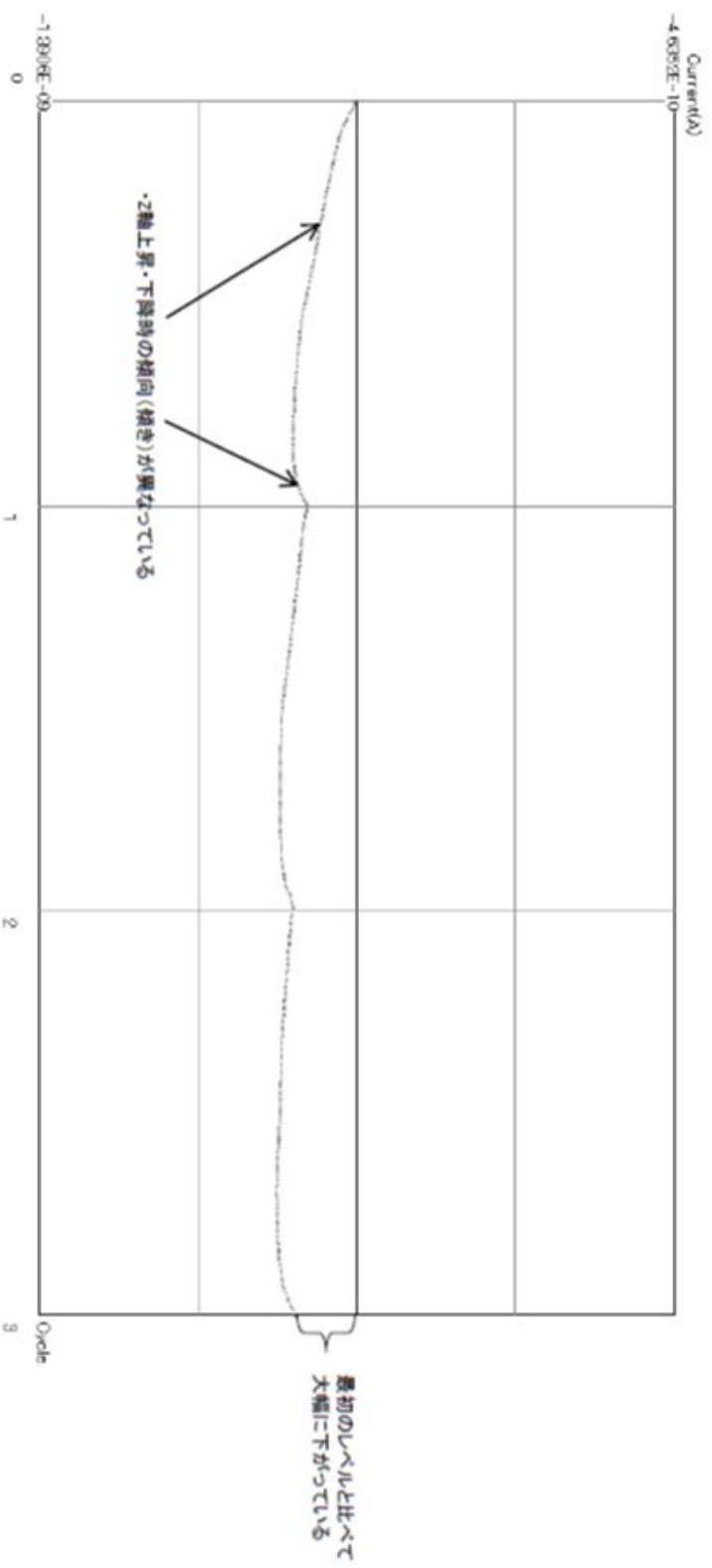
・測定不良例 2

samples_2times_3



・測定不良例 3

sample11_2times_1



平成25年9月24日

作業報告書	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	様
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	

作業報告	
<p>●症状 以前4fml/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>●対応</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) →ポテンショ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>推定原因</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・測定液がアルブミン無添加であること。 <p>対応策</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。 <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>●残件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・交換用サーモプレートの送付 ・過去測定データの確認 	
以上	

作業報告書

確認印



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・融解を行った发育良好胚と、2日目以降細胞分裂の見られない发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发育停止胚は、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

確認印



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

Δ Cb:	-1.98E-09				
FileName	Fel(mea)	F(correct)	Δ Cel(mea)	Δ C(correct)	Rs R
blank 1	-3.31E-16 ± 1.7111E-15	1.59 ± 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	-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	-2.52E-09 ± 5.1776E-10	-5.35E-10 ± 5.1776E-10	10 70
2.1	1.67E-14 ± 9.3527E-16	18.65 ± 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	1.67E-08 ± 1.3144E-09	1.87E-08 ± 1.3144E-09	10 70
3.1	-2.29E-15 ± 9.0086E-16	-0.28 ± 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	-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	-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	-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

Δ Cb:	-1.53E-09				
FileName	Fel(mea)	F(correct)	Δ Cel(mea)	Δ C(correct)	Rs R
blank 2	-1.11E-15 ± 9.1596E-16	0.38 ± 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	-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	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	1.62E-08 ± 6.8964E-10	1.78E-08 ± 6.8964E-10	10 70
3.1	-1.39E-15 ± 9.8630E-16	0.11 ± 0.99	-1.42E-09 ± 1.0183E-09	1.09E-10 ± 1.0183E-09	10 70
3.2	1.38E-17 ± 1.1157E-15	1.5 ± 1.12	1.40E-11 ± 1.1519E-09	1.55E-09 ± 1.1519E-09	10 70
4.1	-1.30E-15 ± 7.8369E-16	0.18 ± 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	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	-1.28E-09 ± 1.1309E-09	2.56E-10 ± 1.1309E-09	10 70
5.1	1.97E-14 ± 6.3356E-16	21.21 ± 0.63	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	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	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

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（医療技術実用化総合研究事業）
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する。今年度は、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸測定装置の安全性の検証を行った。その結果、マウス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が示めされた。

研究協力者

黒谷 玲子 (山形大学理工学部助教)
阿部 靖之 (山形大学理工学部助教)

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。

今年度は、「受精卵呼吸測定装置」の胚品質評価における有用性の検証と臨床応用に向けた安全性の検証を目的に、マウスを実験材料として胚のミトコンドリア呼吸機能解析、胚移植試験および産子の表現型解析を実施した。

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

細胞呼吸活性を指標とする胚や卵子のクオリティー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、マウスの胚および卵子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」の有効性と安全性の検証を目的と

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した。また、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 及び ICR 系マウスを実験に用いた。雌マウス (8 週齢) に pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) 5IU 投与し、48 時間後に human chorionic gonadotropin (hCG) 5IU 投与することで過排卵を誘発した。hCG 投与後、直ちに同系統の雄マウスと同居させ、翌朝、膣栓の有無を確認した。膣栓を確認した雌マウスは hCG 投与 96 時間後に屠殺し、摘出した子宮を灌流することで胚を回収した。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。

(3) 呼吸活性測定

マウス胚盤胞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: 機能性ペプチド研究所) 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、 $-0.6V$ vs $Ag/AgCl_2$ の電位を印加した微小白金電極 (先端直径: $2-3\ \mu m$) で、胚近傍を鉛直方向に 3 回走査 ($31.0\ \mu m/sec$, $160\ \mu m$) 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観察

MitoTracker Orange CM-H2 TMRos を用いてウシ胚およびマウス胚を染色し、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。

(5)シトクローム c オキシダーゼ(Cox) 遺伝子の発現解析

呼吸測定による胚クオリティー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 IV を構成する Cox の遺伝子発現を RT-PCR により解析した。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、マウスにおいてミトコンドリアゲノム由来であり呼吸鎖複合体 IV の電子伝達を担っている Cox1、Cox2、Cox3 と、核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 および Cox6b の遺伝子の発現をそれぞれ調べた。

(6) 胚の移植試験

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 0.70×10^{-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。

(7) 安全性評価試験

偽妊娠3日目の受容雌マウス(ICR系統)をネンプタールで麻酔し、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 0.70×10^{-14} mol \cdot 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。対照群 6 個体、測定群 6 個体とし、いずれも 12 週齢時に実験を開始した。全ての個体に対し、オープンフィールドテスト、オープンスペース水泳テスト、水迷路学習課題をこの順序で実施した。各テストの間は、1 日以上インターバルを挿入した。試験終了後、各個体は安楽死させ、心臓より採血し、富士ドライケムを用いて、定法により血液生化学的指標について分析した。また、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)は、直ちに 10%緩衝ホルマリン固定液に浸漬して 48 時間室温にて固定後、定法に従って脱水後、パラフィンブロックを作製した。各ブロックより厚さ 4 μ m の薄切標本作製、Hematoxylin-Eosin 染色(HE 染色)を施して顕微鏡下で観察し、臓器ごとに好中球など炎症細胞の浸潤状態を中心に、各個体間の組織所見を比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験は山形大学工学部倫理委員会の承認を得た後に開始する。個体レベルでの実験プロトコルの作成にあたっては、法律第 105 号「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、苦痛軽減に努める。

C・研究結果

(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ともに 0.24×10^{-14} mol s⁻¹ であり、卵成熟による酸素消費量の変化はなかった。また、受精直後の 1 細胞期胚の酸素消費量は、 0.22×10^{-14} mol s⁻¹ であり、MII 期卵子と比べると有意な差はなく、受精による酸素

消費量の変化は認められなかった。次に、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、発生の進行に伴い酸素消費量が増加した。特に、桑実胚 ($0.34 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$)、胚盤胞 ($0.52 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$) および脱出胚盤胞 ($0.7 \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$) にかけて顕著な呼吸量の増加が認められた (図 1)。

(b) 活性型ミトコンドリアの局在

マウス胚において活性型ミトコンドリアは、2細胞期から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 (図 2)。

(c) ATP 量測定

マウス胚の発生過程における ATP 含量の変化を解析した。その結果、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。8細胞期胚においてATP含量が急激な増加を示したことから、個々の胚のATP含量を詳細に解析した結果、8細胞期胚では他の発生ステージと比べて、個々の胚の間にATP含量の大きな差が認められた。

(d) シトクローム c オキシダーゼ (Cox) 遺伝子の発現解析

マウス胚において、ミトコンドリアゲノム由来であり呼吸鎖複合体 IV の中心活性部位を構成するサブユニットである Cox1、Cox2 および Cox3 と、核ゲノム由来であり生体機能調節に関与するとされる Cox4、Cox5a、Cox5b および Cox6b の遺伝子の発現をそれぞれ RT-PCR により解析した。その結果、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。この結果から、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 (図 3 - (a), (b))。

(f) 胚移植試験

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 (表 1)。

(g) 安全性評価試験

受精卵呼吸測定装置による胚品質評価の安全性を検証する目的で、胚移植試験で得られた産子の表現型解析を実施した。産子の生時体重の平均は、対照群で $1.55 \pm 0.02 \text{ g}$ 、測定群で $1.51 \pm 0.04 \text{ g}$ 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。そこで本研究では、呼吸測定による胚品質評価の有効性と安全性の検証を行った。

今年度は、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。特に、「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ために、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がこれまでにはないアプローチである。その結果、「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、本研究で行ったミトコンドリア呼吸機能の詳細な解析により、これまで明らかにされていなかった初期発生における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。

また、胚や移植試験を行い、呼吸活性を指標とする胚品質評価の有効性を検証した。その結果、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が確認された。

E・結論

マウス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が示唆された。

F・健康危険情報

なし

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) Hirobe T., Ito S., Wakamatsu K., Kawa Y., Abe H. (2013) Mouse brown (*b/Tyrp1^b*) allele inhibits eumelanin but not pheomelanin synthesis. *Zool. Sci.*, in press.
- (4) Miyano Y., Tahara S., Sakata I., Sakai T., Abe H., Kimura S., Kurotani R. (2013) Regulation of LH/FSH expression by secretoglobin 3A2 in the mouse pituitary gland. *Cell Tiss. Res.*, in press.
- (5) 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.*, in press.
- (6) 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.

(7) 阿部宏之：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、2014

(8) 阿部宏之：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」、印刷中

2. 学会発表

- (1) 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)
- (2) 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)
- (3) 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)
- (4) 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)
- (5) 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(COX)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)

- (6) 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)
- (7) 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)
- (8) 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)
- (9) 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)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)
- (10) 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)

(11) 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)

(12) 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)

(13) 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)

(14) 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) 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)

(15) 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)

(16) 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)

(17) 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)

(18) 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)

(19) 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)

(20) 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)

(21) 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)

(22) 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)

(23) 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、名古屋大学豊田講堂・野依学術交流館、9 月 27-29 日)

(24) 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)

(25) 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ーム 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)

(26) 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ーム 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)

H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

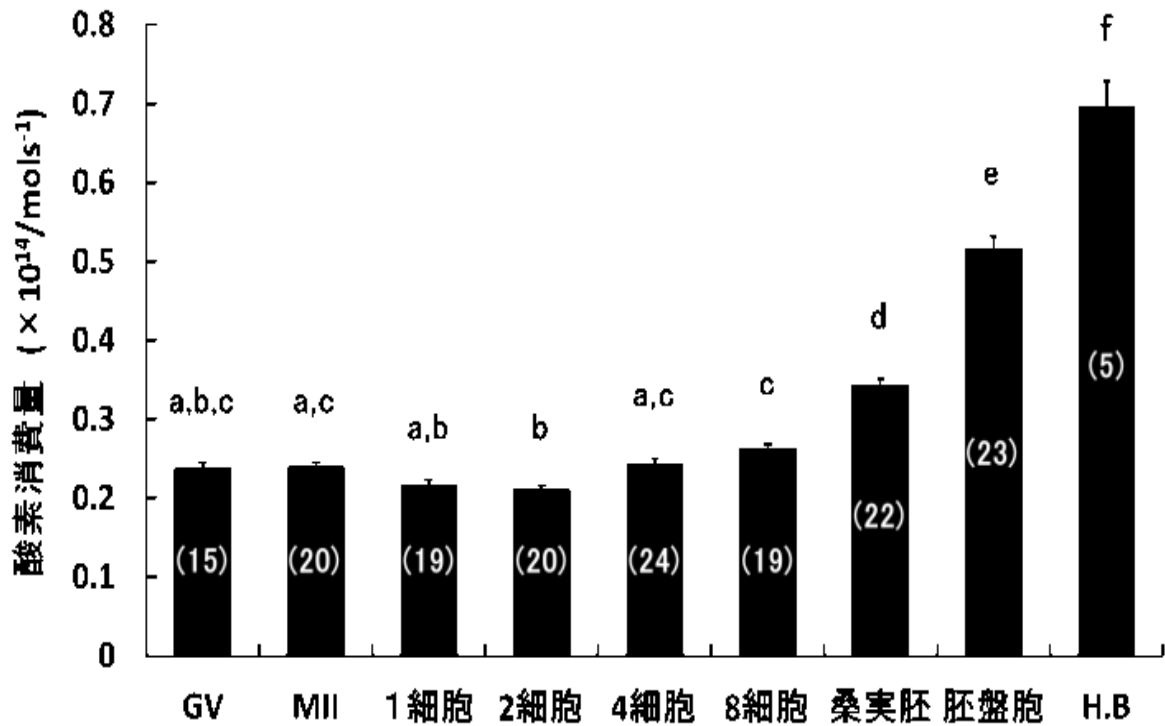


図 1. 卵子および発生初期胚における酸素消費量変化。H.B: 脱出胚盤胞。括弧内の数字は測定した卵子数または胚数を示す。異符号間で有意差有り ($P < 0.05$)。

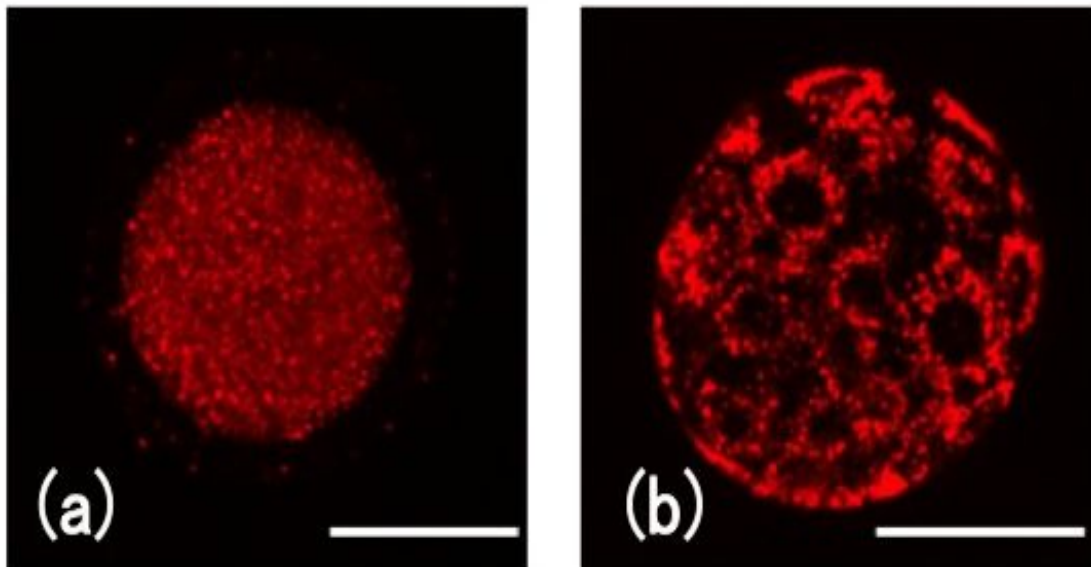


図 2. GV期卵子と胚盤胞の活性型ミトコンドリアの局在。a: GV期卵子、b: 胚盤胞。Bar: 50 μm 。

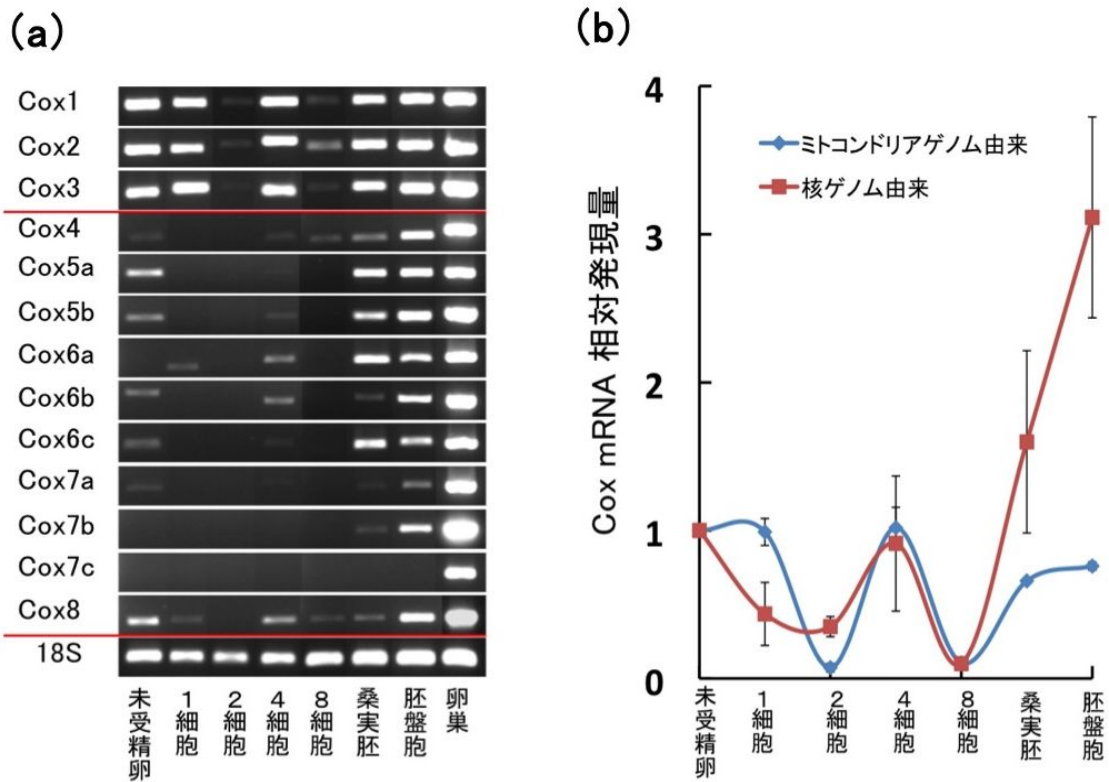


図3. マウスの未受精卵および胚におけるミトコンドリアゲノムおよび核ゲノム由来COXサブユニットのmRNAの検出 (a)。S18を基準としたmRNAの相対遺伝子発現量を示す (b)。

表1. マウス胚移植試験の成績

実験区	受容雌 (匹)	移植胚数 (個)	移植胚の平均呼吸量 ($\times 10^{-14}$ mol/s)	分娩した受容雌 (匹)	分娩率 (%)	産子数 (匹)	産子率 (%)
測定群 (0.70以上)	16	170	0.85 \pm 0.01	12	12/16* (75.0)	67	67/170* (39.4)
対照群	18	175	-	7	7/18 (38.9)	41	41/175 (23.4)

*: 対照区と比較して有意に高い (P<0.05)

II.分担研究報告書

3 . 呼吸活性測定によるマウス排卵後加齢卵の ミトコンドリア機能の評価に関する研究

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（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

呼吸活性測定によるマウス排卵後加齢卵のミトコンドリア機能
の評価に関する研究

研究分担者 高橋 俊文 山形大学講師

研究主旨

生殖補助医療の進歩にもかかわらず、その治療成績は改善していない。その最大の要因は不妊治療を受ける女性患者の高齢化であると推測されている。日本国内での生殖補助医療の治療周期に占める35歳以上の患者の割合は、実に76%に及ぶ（2011年 日本産科婦人科学会報告）。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、米国で行われている若年者ドナー卵を用いた生殖補助医療の治療成績は母体年齢に依らないことから（2003年 CDCレポート）、この患者高齢化（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とは何を意味するのか？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。筆者らはこれまで、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（排卵後8時間以上、受精に至らず卵管内に留まった卵。以下、マウス加齢卵と略す）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小胞体機能、特にカルシウムポンプ（ Ca^{2+} ATPase）機能が低下すること、ミトコンドリア機能が低下すること（ATP産生能が低下、ミトコンドリア膜電位の低下など）が明らかとなった。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から検討を行った。本稿ではその結果を紹介する。

研究協力者

五十嵐秀樹 (山形大学医学部助教)

A・研究目的

生殖補助医療の進歩にかかわらず、その治療成績は改善していない。その最大の要因は不妊治療を受ける女性患者の高齢化であると推測されている。日本国内での生殖補助医療の治療周期に占める35歳以上の患者の割合は、実に76%に及ぶ(2011年 日本産科婦人科学会報告)。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、米国で行われている若年者ドナー卵を用いた生殖補助医療の治療成績は母体年齢に依らないことから(2003年 CDCレポート)この患者高齢化(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とは何を意味するのか? 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。筆者らはこれまで、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(排卵後8時間以上、受精に至らず卵管内に留まった卵。以下、マウス加齢卵と略す)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小胞体機能、特にカルシウムポンプ(Ca^{2+} ATPase)機能が低下すること、ミトコンドリア機能が低下すること(ATP産生能が低下、ミトコンドリア膜電位の低下など)が明らかとなった。クリノ(株)が開発した細胞呼吸測定装置による胚呼吸活性測定は、これまで主に畜産動物の胚において、良好胚を選別する客観的な評価法として有用であることが報告されている。今回、マウス加齢卵でも細胞呼吸測定装置による単一卵子の呼吸活性(酸素消費量)測定により、ミトコンドリア機能が評価可能であるか検討した。

B・研究方法

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、正マウス卵の準備した(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、14-15 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、hCG 投与 42-46 時間で採取し、44-48 時間で測定に供した卵とした。各卵は採卵後直ちに 25IU ヒアルロ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。

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 $3.3 \pm 0.05 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$ 、hCG 投与後 20~24 時間で測定に供した加齢卵では $2.0 \pm 0.08 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$ 、44~48 時間で測定に供した加齢卵では $0.7 \pm 0.07 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$ であった(図)。平均酸素消費量は排卵後の時間に伴い有意に低下した ($p < 0.05$)。

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膜電位によってもミトコンドリア機能を評価してきた。

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老化の解析にも有用であると考えられた。

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た。

F・健康危険情報

なし

G・研究発表

1. Igarashi H, Takahashi T, Matsuo K, Hara S, Amita M, Kurachi H. Systemic complications of premature ovarian failure patients with infertility. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. Kobe, Japan 2013.11.13-14.
2. Takahashi T, Igarashi H, Hara S, Matsuo K, Amita M, Kurachi H. Brachial to ankle pulse wave velocity as an independent prognostic factor for ovulatory response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. Kobe, Japan 2013.11.13-14.
3. 高橋俊文,五十嵐秀樹,原 周一郎,松尾幸城,倉智博久. 多嚢胞性卵巣症候群患者におけるクロミフェン抵抗性に関する予測因子の検討.

第 86 回日本内分泌学会 仙台
2013.4.25-27

4. 松尾幸城,高橋俊文,竹原 功,池田美智,原 周一郎,五十嵐秀樹,倉智博久. 凍結融解胚移植周期における融解溶液中のトレハロース濃度が融解後の胚の生存率と臨床成績に及ぼす影響. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌 2013.5.10-12
5. 小島原敬信,高橋俊文,松尾幸城,松村創平,小幡美由紀,松川 淳,倉智博久. 2 年前の膀胱癌由来と思われる腹膜偽粘液腫の 1 例. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌 2013.5.10-12
6. Takahashi T, Seino M, Ohta T, Sudo T, Ishida H, Kurachi H. Evaluation of preventive methods for the symptomatic pulmonary thromboembolism by postoperative anticoagulant therapy in VTE high risk patients with gynecologic malignancy. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌 2013.5.10-12 (IS Poster)
7. 松尾幸城,高橋俊文,竹原 功,原 周一郎,五十嵐秀樹,倉智博久. 単一胚盤胞移植後に二卵性双胎妊娠となった一例. 第 31 回日本受精着床学会 別府 2013.8.8-9
8. 松尾幸城,高橋俊文,五十嵐秀樹,原 周一郎,長谷川歩美,倉智博久. 多嚢胞性卵巣症候群患者のクロミフェン抵抗性に関する予測因子として pulse wave velocity 測定は有用である. 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013.11.15-16
9. 竹原 功,原 周一郎,松尾幸城,長谷川歩美,五十嵐秀樹,高橋俊文,倉智博久. 凍結融解周期における単一胚盤胞移植後の二卵性双胎の一例. 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013.11.15-16
10. 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(シンポジウム). 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013.11.15-16
11. 高橋俊文,五十嵐秀樹,原 周一郎,網田光善,松尾幸城,倉智博久. 脈波伝播速度(pulse wave velocity)は多嚢胞性卵巣症候群患者におけるクロミフェン

抵抗性の予測因子である．第 18 回
日本生殖内分泌学会 東京
2013.12.7

12. 長谷川歩美, 高橋俊文, 渡邊憲和, 山内敬子, 小幡美由紀, 小島原敬信, 倉智博久. 14 歳で発症した卵巣粘液性腺癌の一例. 第 61 回北日本産科婦人科学会 旭川 2013.9.7-8
13. 松村創平, 太田 剛, 清野 学, 須藤 毅, 高橋俊文, 高橋一広, 倉智博久. 子宮腺筋症から発生したと思われる類内膜腺癌の一例. 第 61 回北日本産科婦人科学会 旭川 2013.9.7-8
14. 松尾幸城, 五十嵐秀樹, 清野 学, 山内敬子, 原 周一郎, 高橋俊文, 倉智博久. 妊娠初期の卵巣出血にて緊急手術を要した 2 例. 第 61 回北日本産科婦人科学会 旭川 2013.9.7-8
15. 高橋俊文. 卵子の老化と不妊治療. 第 2 回庄内美人いきいき女性フォーラム. 酒田 2013.9.21
16. 松尾幸城, 高橋俊文, 網田光善, 五十嵐秀樹, 倉智博久. 多嚢胞性卵巣症候群患者のクロミフェン抵抗性に関する予測因子として脈波伝播速度測定は有用である. 第 51 回東北生殖医学会 青森 2013.11.2
17. 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 原 周一郎, 網田光善, 松尾幸城, 倉智博久. 腹腔鏡併用による卵管鏡下卵管形成術の治療成績および術後妊娠に関する予後因子の検討. 第 51 回東北生殖医学会 青森 2013.11.2

論文発表

1. Ikeda M, Takahashi T, Kurachi H. Spontaneous perforation of pyometra: a report of seven cases and literature of the review. *Gynecol Obstet Invest* 2013;75(4):243-249
2. Matsumura S, Ohta T, Takahashi T, Takahashi K, Yamazaki T, Kurachi H. Non-sex cord-stromal ovarian tumors frequently produce and secrete estrogen in postmenopausal women: impact on bone metabolism and abnormal endometrial histology. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(7):2775-2782

3. Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, Tomita Y, Isobe A, Hashimoto K, Kinose Y, Mabuchi S, Hisamatsu T, Takahashi T, Kumasawa K, Nagata S, Morishige K, Lengyel E, Kurachi H, Kimura T. miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin $\alpha 5$ expression. *Am J Pathol* 2013;182(5):1876-1889
4. Matsuo K, Takahashi T, Igarashi H, Hara S, Amita M, Kurachi H. Effects of different trehalose concentrations in a warming medium on embryo survival and clinical outcomes in vitrified human embryos. *Gynecol Obstet Invest* 2013;76(4):214-220
5. Hara S, Takahashi T, Amita M, Matsuo K, Igarashi H, Kurachi H. Pioglitazone counteracts the tumor necrosis factor- α inhibition of follicle-stimulating hormone-induced follicular development and estradiol production in an in vitro mouse preantral follicle culture system. *J Ovarian Res* 2013;6(1):69
6. Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review. *J Obstet Gynecol Res* 2013;39(10):1431-1439
7. Takehara I, Takahashi T, Hara S, Matsuo K, Igarashi H, Kurachi H. Dizygotic twin pregnancy after single embryo transfer: A case report and review of the literature. *J Assist Reprod Genet* 2014 Jan [Epub ahead of print]
8. 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 原 周一郎, 網田光善, 松尾幸城, 倉智博久. 腹腔鏡併用による卵管鏡下卵管形成術の治療成績および術後妊娠に関する予後因子の検討. *山形医学* 2014;32(1):1-6
9. 長谷川歩美, 高橋俊文, 倉智博久. [ホルモン療法実践マニュアル] 生殖内分泌分野 高プロラクチン血症. *産科と婦人科* 2013;80:229-233
10. 高橋俊文, 倉智博久. 月経前症候群. *産科婦人科疾患最新の治療* 2013-2015 (吉川史隆, 倉智博久, 平松祐司 編) 南江堂 2013;184-185

H・知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告書

3. (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

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（医療技術実用化総合研究事業）
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。

今回、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するのであれば、多胎妊娠率の減少につながるのと考えられる。

本検討の結果、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の方が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存在するのではないかと思われた。

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。

B・研究方法

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。

C・研究結果

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。

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 $3.61 \pm 1.58 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、胚盤胞（n=2）の呼吸活性は $4.95 \pm 1.01 \times 10^{15} \text{mol/S}$ であり、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。

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 $3.61 \pm 1.3 \times 10^{15} \text{mol/S}$ 、肉眼的に不良と見えた胚（n=20）の呼吸活性は $4.16 \pm 1.75 \times 10^{15} \text{mol/S}$ であり、同様有意差を認めないものの、肉眼的に不良胚の方が呼吸活性が高い傾向を認めた。

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回測定し得た胚（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。

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の方が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る、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る、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。

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、更なる検討が必要である。

F・健康危険情報

なし

G・研究発表

なし

H・知的財産権の出願・登録状況

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

分担研究者 菅沼 亮太（福島県立医科大学講師）

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
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、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、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。

本研究では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。さらに、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。

まず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。次にCV測定し、10 nA以下の電流で測定可能なことを確認した。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。

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。今後はその再現性を確認し、ヒト余剰卵における計測につなげていきたいと考えている。

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。

B・研究方法

本研究で用いたチップ型電極の上面および断面イメージを提示する (図1)。

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オスタットを改造し、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。

C・研究結果

図1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2)。

次に、北斗電工が開発した従来機器のポテンシオスタットを改造し、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3)。

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 (図4)。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 (図5)、そして10 nA以下の電流で測定可能なこと (図6) を確認した。

D・考察

今回、新規開発を行ったチップ型電極のサイズ設計や計測方法の検討が終了し、スフェロイドを用いて電気化学的検証評価が測定可能であった。引き続き、電流量や開発機器による測定感度差を検討していく。今後はそれらの再現性を確認し、動物卵やヒト余剰卵における計測につなげていきたいと考えている。

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。今後はその再現性を確認し、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。

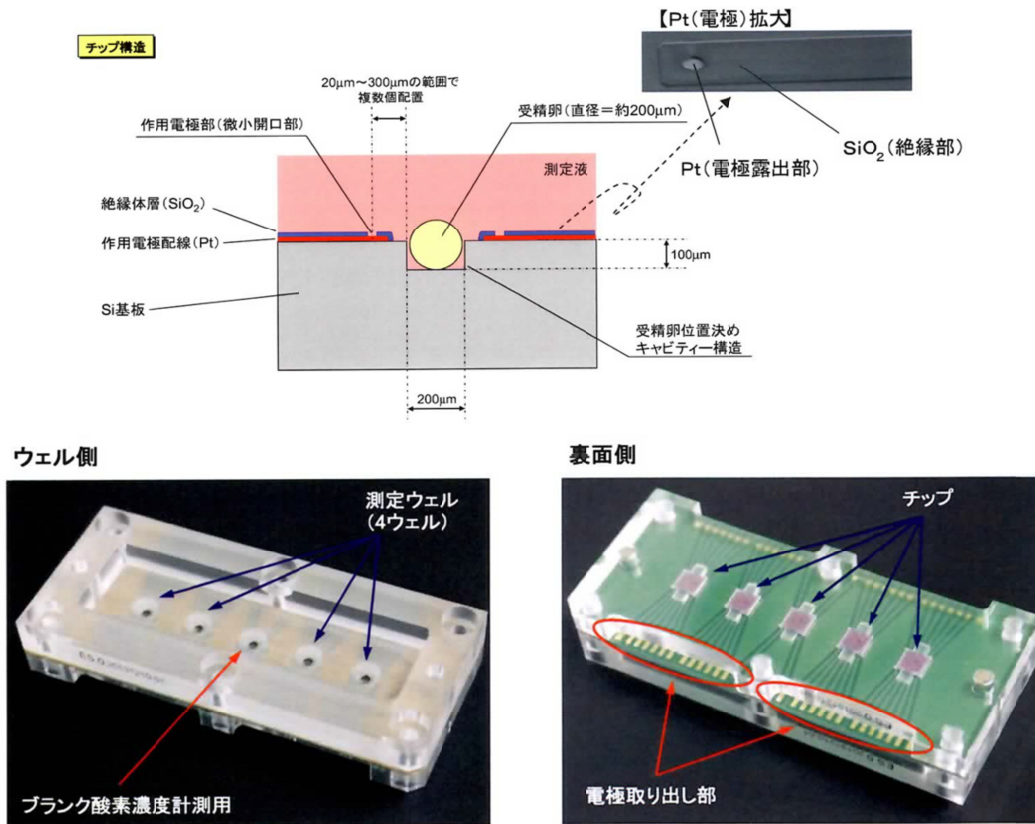
G・研究発表

特記事項なし

H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

(図1) チップ型電極の写真およびそのイメージ



(図2) キャビティ直径と作用電極直径の検討

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
→ 測定プロトコル

①キャビティ直径依存性
→ 最適デバイス構造

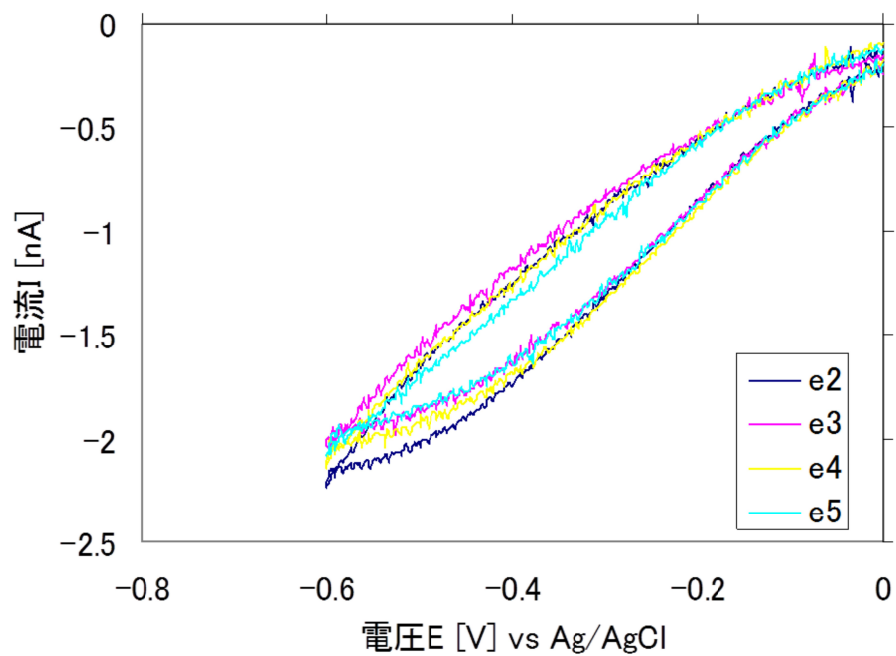
(図3) 測定液中での溶存酸素還元電流測定

【測定条件】チップ: ME1301-P01-02-05-0616

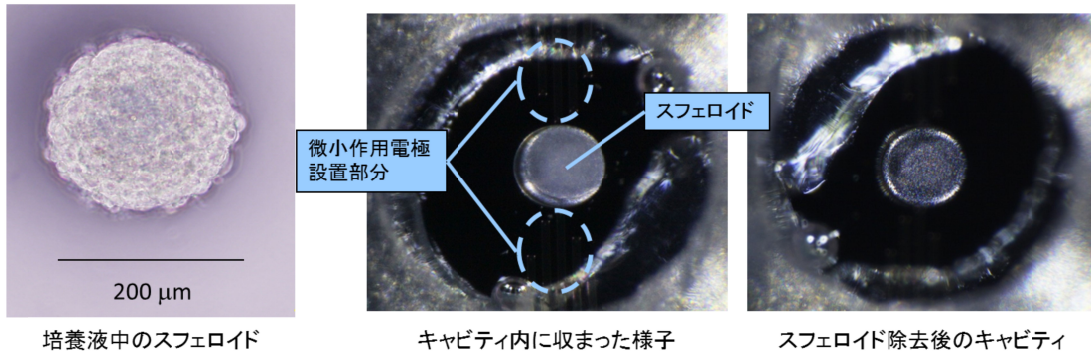
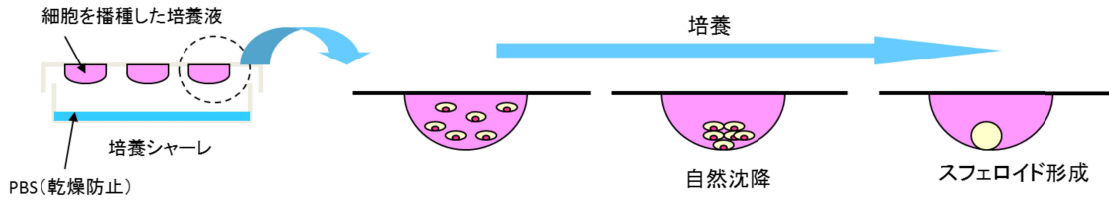
装置: HSV-100F (Hokuto Denko)

測定液: ERAM-2

走査範囲: 0 V → -0.5 V → 0 V



(図4) MCF-7を用いたスフェロイド作成



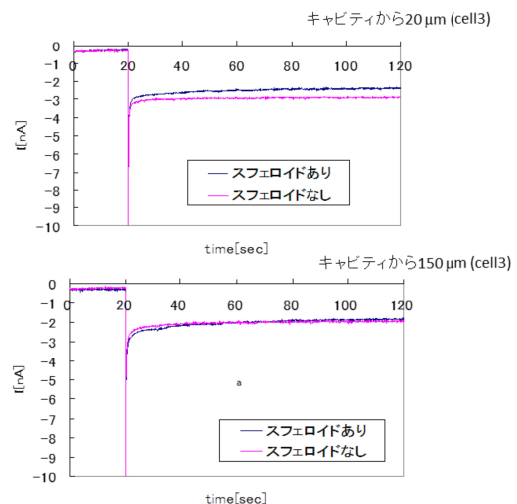
(図5) MCF-7スフェロイドを用いた呼吸活性測定

【測定条件】チップ: ME1301-P01-02-05-0812 装置: HSV-100F (Hokuto Denko) 測定液: ERAM-2
 測定条件: 0V (20 sec) → -0.5V (120 sec), 各電極1端子ずつなぎ変えて測定
 測定対象: MCF-7スフェロイド 200 μm (200 cells, 3days)

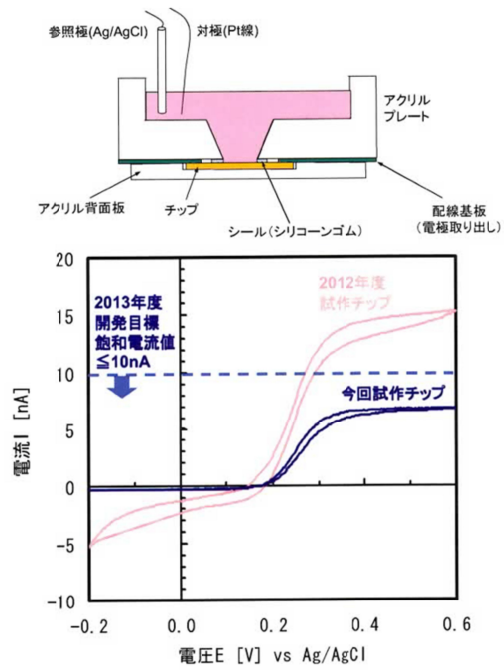
cell1			
キャビティからの距離[um]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.736	-2.976	-0.240
50	-3.428	-4.095	-0.667
100	-2.355	-2.623	-0.268
150	-2.988	-3.012	-0.024

cell2			
キャビティからの距離[um]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-2.432	-2.722	-0.290
50	-3.102	-3.595	-0.492
100	-2.135	-2.482	-0.347
150	-2.662	-2.463	0.200

cell3			
キャビティからの距離[um]	あり[nA]	なし[nA]	差[nA]
20	-1.938	-2.338	-0.400
50	-2.369	-2.876	-0.507
100	-1.773	-2.023	-0.249
150	-1.834	-1.941	-0.108



(図6) 新規受精卵呼吸測定装置を用いたCV測定



【測定条件等】 共通測定液=10mmol/Lフェロシアン化カリウムを含む、0.1mol/L 塩化カリウム溶液
 (2012年度試作チップ、Ptマイクロプローブ電極) 測定系=HV-405@北斗電工、北斗電工製R-6参照極、Pt薄膜対極
 (2013年度試作チップME1301B-D3) 測定系=HV-4000@パナソニックAIS、弊社所有参照極(対極と共用)

II. 分担研究報告書

6. 受精卵呼吸測定装置を用いた臨床研究に関する 倫理委員会承認の報告

分担研究者 志賀尚美（東北大学医学部助教）

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

新規受精卵呼吸測定装置を用いた臨床研究に関する
倫理委員会承認の報告

研究分担者 志賀 尚美 東北大学助教

研究主旨

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。そして、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の取得を行った。

まず、チップの試作品開発をパナソニック・ヘルスケア社と共に行い数回の試作品を繰り返し検討し、平成26年1月に最終品を完成させた。その際のチップ改良に伴う測定手技・評価方法の標準化を行いプロトコールを作成した。次に、患者への説明方法、研究記録の維持方法、使用検体の廃棄方法、取得データの扱いなどについて詳細にまとめた。

平成26年度に行うヒト余剰卵（廃棄卵）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。また現在、東北大学で96例の余剰卵が確認されている。

今後、全ての共同研究施設で倫理委員会承認を取得した後に、今年度開発したチップによるヒト余剰卵を用いた臨床研究を実施し、その有用性・安全性および操作性を検討する。

研究協力者

渡邊 善(東北大学医学部助手)
黒澤大樹(東北大学医学部医員)
石橋ますみ(東北大学医学部医員)
西本光男(東北大学医学部大学院)
高橋藍子(東北大学産婦人科培養士)

A・研究目的

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るための準備を行った。具体的には、受精後3日以内のヒト余剰卵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(資料1)。

B・研究方法

平成26年度に行うヒト余剰卵を用いたの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、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、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。また、今回の研究では余剰卵を使用するため、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」と述べている。

また、今回の研究では個人情報に連結不可能匿名化し、変換対応票を残さず個人を特定できないようにする。そして、今回の登録は1年間を予定している。

さらに、患者様への説明文書も作成し、手渡すことにした(資料2)。そちらには基本的な用語を用いて一般人にも理解ができるよう配慮した。

C・研究結果

平成26年2月24日の東北大学医学部倫理委員会で承認が得られた。研究用に使用された受精卵は、本研究以外の目的で使用されることはない。また、これらのサンプルはヒトやヒト以外の動物に戻すことはなく、本研究が終了次第すぐに破棄される。この臨床研究に参加した場合、患者様とその検体が同定できないように連結不可能匿名化する。そのことから、患者を特定できる個人情報を取り扱うことはないため、患者のプライバシーは完全に守られる。また、この研究の途中で協力を中止したい場合でも、本人の検体を特定できないため中断することは不可能である。尚、研究データに関しては研究終了後も保存する。研究結果は学術雑誌や学会で発表される予定である。その際に患者の名前や個人を特定できるような情報が使われることはない。そのため、希望があっても患者にご自分の研究結果をお知らせすることはできない。

尚、主な内容は下記のようなものである。

他施設共同研究(東北大学主幹)

観察研究

ヒト余剰卵(廃棄卵)使用

ヒト余剰卵使用後は直ちに廃棄

患者に対する侵襲性なし

UMIN-CTR

患者に対する補償なし

目標症例数 50例

厚生労働科学研究費使用予定

有用性および安全性を検討

受精後3日目に呼吸量測定

患者情報は連結不可能匿名化

D・考察

現在、東北大学倫理委員会の承認を取得し、96例の余剰卵を確認している。今後、全ての共同研究施設で倫理委員会承認を取得した後に、今年度開発したチップによるヒト余剰卵を用いた臨床研究を実施し、その有用性・安全性および操作性を検討する。

E・結論

今回、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。今後、エンドポイントに着目して研究を進めていく。

G・研究発表

特記事項なし

H・知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し



**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)

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

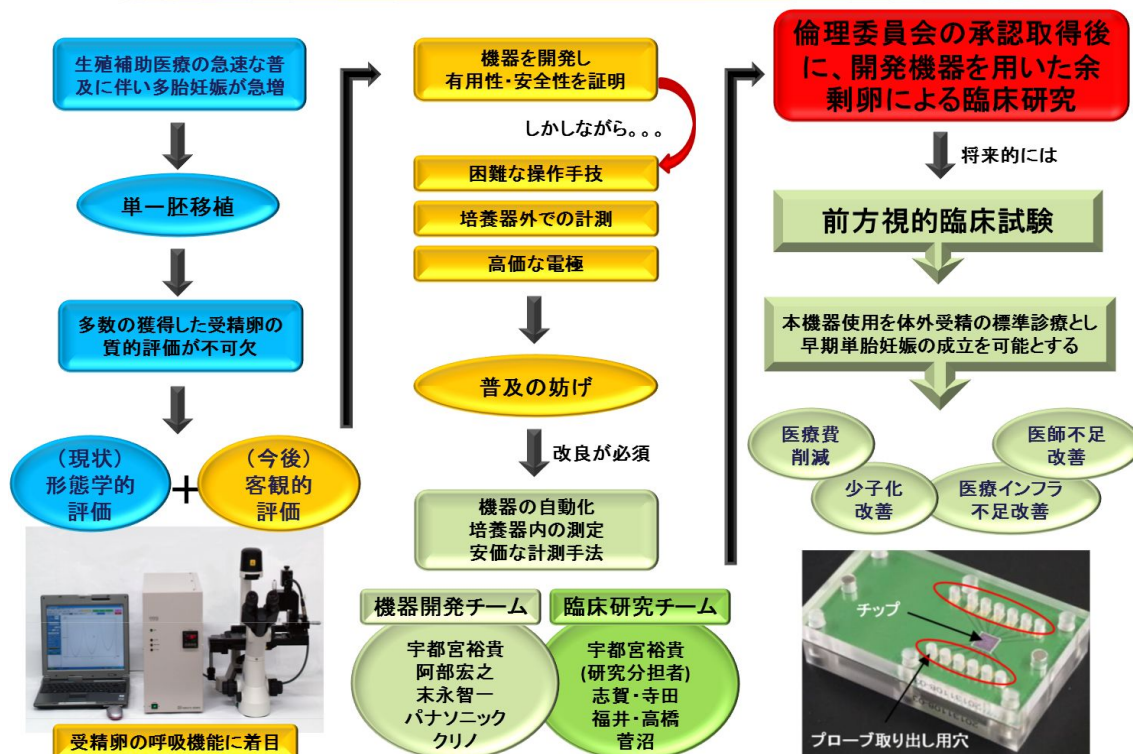
2014年3月3日 作成

0 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す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、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、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。

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。

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)

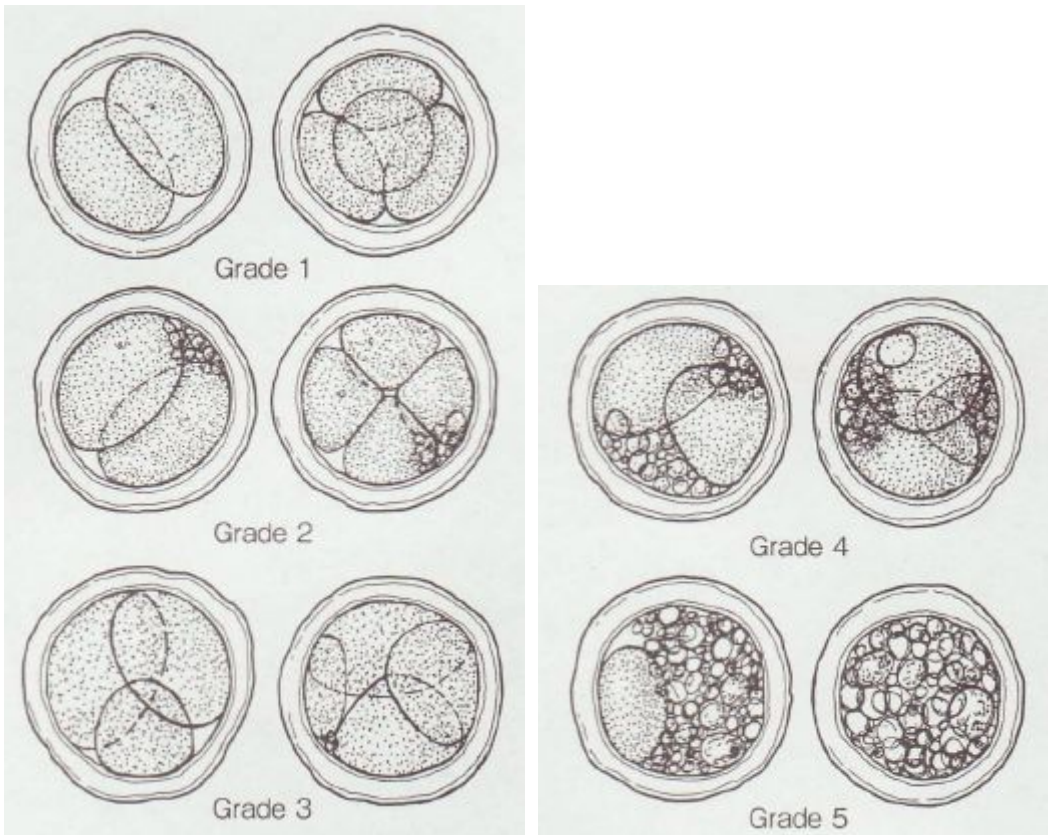


図 1. 受精卵の形態学的な評価 (Veeck 分類)

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ュミレーション、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。

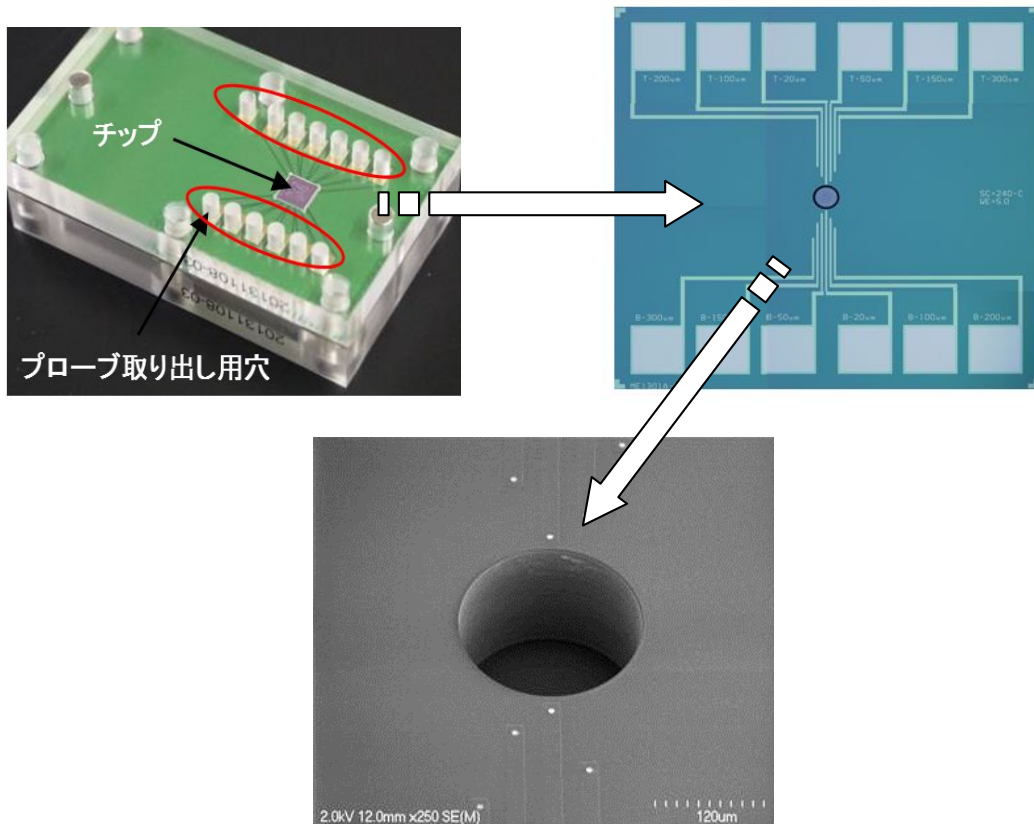


図 2. 開発した呼吸量測定装置（左上段 右上段 下段の順に拡大像）

中央の穴に受精後 72 時間の卵を置き、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に、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 日目以内の受精卵
- ・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 4 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 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・5・7 日目に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。

9.1. 観察・検査項目スケジュール

受精卵登録時からの評価項目を下記に示す。

従来の受精卵の形態変化観察を行うスケジュールと全く同一である。

評価項目	登録時	受精後			プロトコル治療終了時/中止時
		3日	5日	7日	
母体背景情報					
呼吸量測定検査					
顕微鏡下形態観察					

9.2. 登録前・開始前の観察・検査項目

登録前に凍結卵が受精後 72 時間以内であることを確認する。また、受精卵の両親に遺伝性疾患がないことを確認する。

9.3. 期間中の観察・検査項目

開発機器の有用性・安全性評価のために必要な下記の項目に関して観察、検査を行う。

- ・受精後 72 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) の電流を流して呼吸量計測を行う。

・受精後 3・5・7 日目に顕微鏡にて形態観察を行う。

9.4. 終了後(追跡期間中)の観察・検査項目

プロトコール終了時(または分割中止時)に顕微鏡にて形態観察を行う。

10. データ収集

個人情報管理施設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)が行う。

10.1. 記録用紙(CRF)の種類と提出期限

記録用紙(Case Report Form; CRF)は研究代表者が定めた所定の様式を用い、観察終了後 60 日以内にデータ管理者に提出する。

10.2. 記入方法

記録用紙を記入する際には、研究担当医師が記載し研究代表者が全例確認を行う。

10.3. 送付方法

記録用紙は直接データ管理者に手渡す。

11. エンドポイント(評価項目)

本試験のエンドポイントは下記のものである。

主要エンドポイント

受精卵の呼吸量と胚盤胞への到達率および孵化率との相関

副次エンドポイント

従来の形態学的評価法と呼吸量測定評価法の相関

現行手技と比較した本機器による有害事象発現の可能性

11.1. 有効性エンドポイント

11.1.1. 主要エンドポイント

受精後 3 日目以内のヒト余剰卵(廃棄卵)を用いて開発機器による呼吸量測定を行い、その有用性を検討し、従来の主観的な形態学的評価に呼吸量測定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 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観察する。

11.1.2. 副次エンドポイント

従来の形態学的評価と開発機器を用いた呼吸量測定値による受精卵質的評価との相関を検討する。

11.2. 安全性エンドポイント

形態学的変化のスピードや異常所見を調べ、現行手技と比較した本機器による有害事象の発現を検討する。具体的には、微弱電流による受精卵への影響や測定ウェルからの有害物質溶出の可能性などを考慮し、分割停止率や分割速度の変化、夾雑物の増減を検討する。

12. 統計学的事項

半数(25 例)が終了した段階で中間解析を予定している。そして、全症例が終了した段階で最終的な解析に移る。

12.1. 解析対象集団

今回の研究では、既に生児獲得後や採卵後 3 年以上経過により不要となった余剰卵(廃棄卵)を用いて行

う。今回の目標症例数は5大学病院で50例（本学では20例）を予定している。

12.2. 有効性の主要評価項目の解析

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観察する。受精卵が胚盤胞に到達した群としなかった群、および孵化した群としなかった群で呼吸量を統計処理しt検定を用いて比較する。

12.3. 有効性の副次的評価項目の解析

従来の形態学的評価によりVeck分類で5群に分け開発機器による呼吸量を集計し、形態学的分類と呼吸量の間に関連があるか検討する。

12.4. 安全性評価項目の解析

分割停止率や分割速度の変化、夾雑物の増減を調べ、現行手技（形態学的観察のみ）と比較した本機器による有害事象の発現を比較検討する。現行手技に関するデータはこれまでの症例から算出可能である。

12.5. サンプルサイズ、予定登録期間、追跡期間

症例数は5大学病院で50例（本学では20例）を予定している。予定登録期間は平成26年4月より1年間とし、観察後は直ちに廃棄するため追跡調査は行わない。

12.6. 中間解析

半数（25例）が終了した段階で中間解析を予定している。

13. 倫理的事項

13.1. 患者（夫婦双方）の保護

本研究に参与する全ての者は「世界医師会ヘルシンキ宣言（2008年改訂）」、「臨床研究に関する倫理指針（（平成20年7月31日全部改正、厚生労働省告示第415号）」、日本産科婦人科学会「ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する見解」、および厚生労働省「ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方」に従う。説明・同意文書は研究責任医師が作成する。利用に関して改めて対象者から同意をとり、同意文書をカルテに添付する。

新たに研究協力を依頼する際には、書面（説明書と同意書を添付）を用いて直接対面で夫婦双方から同意取得を行う。また、受精卵に関しては、個人を識別できないように符号や番号の変換対応票を残さない方法による匿名化（連結不可能匿名化）を行う。

13.2. 夫婦双方への説明と同意（インフォームド・コンセント）

研究への登録に先立ち、担当医は夫婦双方が本試験に参加する前に、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認の得られた同意説明文書を用いて、直接対面で十分に説明し、本研究への参加について自由意志による同意を文書により得るものとする。

同意書には説明を行った研究責任医師又は分担医師、夫婦双方が記名捺印又は署名し、各自日付を記入する。研究責任医師又は分担医師は、夫婦双方が本試験に参加する前に、記名捺印又は署名と日付が記入された同意書の写し及び説明文書を夫婦双方に渡し、同意書を保管するものとする。同意書は研究施行期間中保管し、終了後はすべて破棄する。

説明文書改定時は改めて書面を用いて口頭で説明を行う。

13.3. プライバシーの保護

収集したデータは個人を識別できない連結不可能匿名化の状態とする。したがって、個人が特定される形で公表されることはなく、対象者が不利益を被ったり人権が侵害されたりすることはない。

13.4. 実施計画書の遵守

本研究に参加する研究者は、夫婦双方の安全と人権を損なわない限り、本実施計画書を遵守する。

13.5. 東北大学大学院医学系研究科倫理委員会による承認

本研究実施前及び研究実施予定期間中を通じて、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会において、本研究の実施、継続等について倫理的、科学的及び医学的妥当性の観点から承認を得るものとする。研究代表者は、実施計画書、症例報告書の見本、説明同意文書など審査の対象となる文書を東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に提出する。

13.6. 新たな情報の報告

本研究に用いる新しい機器の有効性、安全性に関する新たな情報を得た場合、研究代表者は必要に応じて、医療機関の長、当局など速やかに文書にて報告する。

13.7. プロトコルの内容変更について

プロトコルの内容を変更する際には、プロトコルの内容変更に従い、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に改訂の申請を行い、承認を得る必要がある。

14. 費用負担と補償

14.1. 資金源及び財政上の関係

この研究は、厚生労働省科学研究費で行う。そのため今回の研究に要する費用はすべて研究者負担で行う。

14.2. 試験にかかる費用負担

この研究は、厚生労働省科学研究費で行う。
企業から無償提供を受ける事項はない。

14.3. 健康被害の補償及び保険への加入

14.3.1. 健康被害の補償

今回の臨床研究では、既に生児獲得後や採卵より3年以上経過により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破棄する。そのため、患者に健康被害を及ぼすことはない。

14.3.2. 補償・賠償保険への加入

賠償・賠償保険などの加入はない。

15. モニタリングと監査

15.1. モニタリング

常に研究代表者と分担者が研究を担当し、連結不可能匿名化で個人を識別できない形で記録を記載する。

15.2. プロトコル違反・逸脱

モニタリングにより下記のプロトコル違反・逸脱が発見された場合は本症例を除外する。

違反 Violation

試験のエンドポイントの評価に影響を及ぼす、担当医に原因がある、故意または系統的、危険または逸脱の程度が著しい、臨床的に不適切であるなどのプロトコルの規定からの逸脱。

逸脱 Deviation

違反や許容範囲に含まれないプロトコルの規定からの逸脱。

許容範囲 Acceptable deviation

試験毎に設けた許容範囲内のプロトコルの規定からの逸脱。

15.3. 監査

施設訪問監査は実施しない。

16. プロトコルの内容変更

実施計画書の内容を変更する場合には、変更在先立ち、「プロトコルの内容変更申請書」を東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に提出し、承認を得る必要がある。

変更内容が試験実施計画の重要な変更と考えられるか否かによって、以下の改正が改訂に相当するかは東北大学大学院医学系研究科倫理委員会が決定し承認する。

改正 Amendment

試験の被験者のリスクを増大させる、試験の主要評価項目に関係するなどの試験計画の重要な変更と考えられる変更。東北大学大学院医学系研究科倫理委員会及び参加施設の IRB の審査承認を要する。

改訂 Revision

試験の被験者のリスクを増大させる可能性がない、試験の主要評価項目に関係しないなどの試験計画の軽微な変更。東北大学大学院医学系研究科倫理委員会及び参加施設の IRB の審査承認を要する。

- 重大性に関わらず、全ての改定内容とその理由を主任研究者の所属する研究機関の倫理審査委員会に報告する。
- 改定内容が重大と判断される場合、主任研究者の所属する研究機関の倫理審査委員会での再審査および承認を要する。
- 重大と判断されるプロトコルの改正とは、以下のいずれかの項目が変更されることをいう。
 - 1) 試験デザイン
 - 2) 研究対象（適格基準）
 - 3) エンドポイント
 - 4) 目標症例数
 - 5) 予期される有害事象
- プロトコルに改定があった場合には、試験責任医師は、それに応じて被験者への説明文書を改定する。
- 改定内容が症例登録票や症例報告書の様式に影響する場合は、主任研究者はデータマネジメント責任者に症例登録票または症例報告書の様式の改定を依頼する。

17. 試験の終了と早期中止

25 例終了した段階で中間解析に移り、50 例終了した段階で試験を終了とし、最終データ解析に移る。また、想定していないが何らかの重篤な有害事象が生じた場合は、研究を早期中止する。

18. 記録の保存

収集したデータについては研究代表者が本試験終了も保管するものとする。原資料（診療記録等）ならびに試験実施医療機関で保管される書類（実施計画書、同意説明文書等）については、実施医療機関が許可する最長期間保持するものとする。

19. 研究結果の帰属と発表

新たに得られた知見などは東北大学医学部産婦人科ホームページ (<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/index.html>) に掲載し国民に広報する。そして、積極的に国内外の学術集会や一流雑誌を通じて報告していきたいと考えている。

また、臨床試験登録（臨床試験登録番号：UMIN000012692）を行っている。

20. 研究組織

研究代表者：宇都宮裕貴

研究担当者：志賀尚美

データ管理者：庄子美紀子

事務局：東北大学病院 産婦人科

住所：〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1

電話番号：022-717-7254

FAX 番号：022-717-7258

「研究協力施設」

弘前大学産婦人科

研究担当者：福井淳史

住所：〒036-8563 青森県弘前市本町 53

電話番号：0172-33-5111

秋田大学産婦人科

研究担当者：寺田幸弘

住所：〒010-8543 秋田県秋田市 広面字蓮沼 4 4- 2

電話番号：018-834-1111

山形大学産婦人科

研究担当者：高橋俊文

住所：〒990-9585 山形県山形市飯田西 2 丁目 2- 2

電話番号：023-633-1122

福島県立医科大学産婦人科

研究担当者：菅沼亮太

住所：〒960-1247 福島県福島市光が丘 1

電話番号：024-547-1563

21. 文献

- (1) Okutsu O. Human embryo grading. *J Mamm Ova Res.* 2008. 25:90-7.
- (2) Yamanaka M, Abe H, et al. Prediction for developmental competence of human blastocyst based on its oxygen consumption. *Fertil Steril.* 2011. 26:3366-71.
- (3) Yamanaka M, Abe H, et al. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod.* 2011. 26:3366-71.
- (4) Abe H. A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J Mamm Ova Res.* 2007. 24:70-8.
- (5) Utsunomiya T, Abe H, et al. Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Mamm Ova Res.* 2008. 25:2-7.

22. 付録

説明文書・同意書、添付文書は申請書に添付した。

臨床研究へのご協力に関する 説 明 文 書

本臨床研究の課題名

「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 本臨床研究の概要・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ます。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ました。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ります。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りました。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ますが、観察者間での結果に差が生じてしまうことが多くあります(図1)。

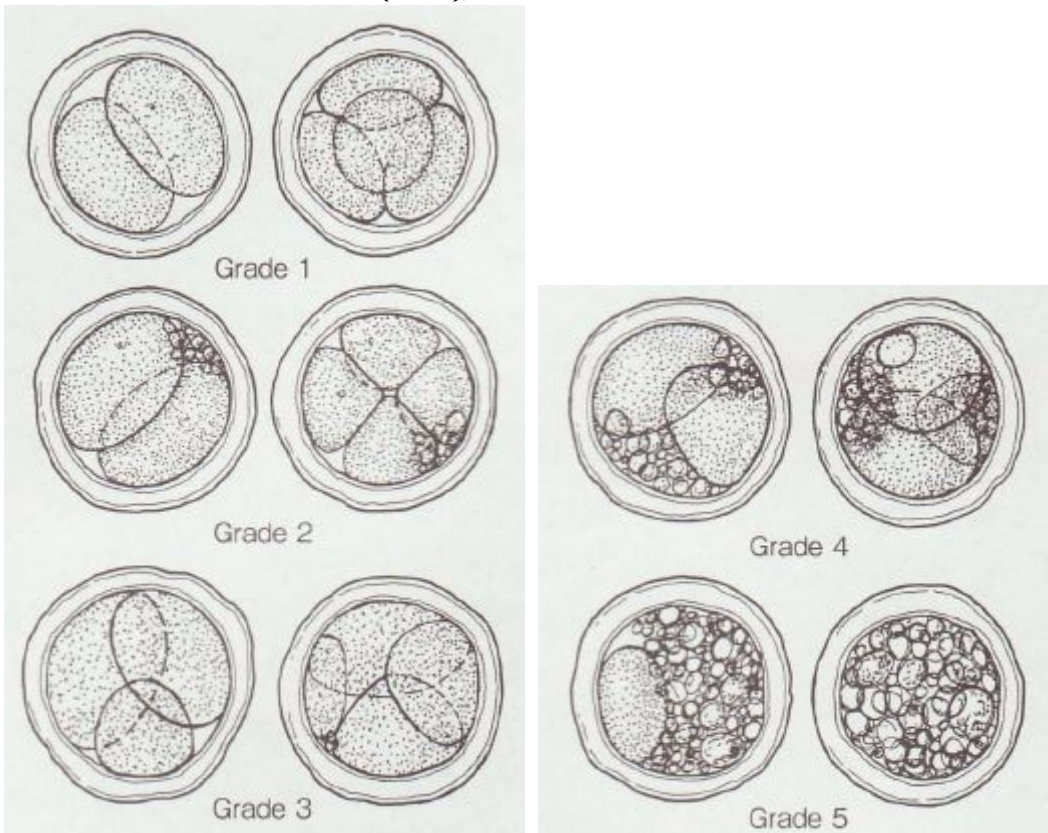


図1. 受精卵の形態学的な評価 (Veeck 分類)

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ました。この手法は非常に高感度である上に、受精卵に直接接触することもないため侵襲もない画期的な装置と考えています。この装置の原型は共同研究者らが開発し、既に測定機器(今後、従来機器と呼びます)として販売しています。これまでに動物の卵を用いて、その機器の有用性と安全性を確認しています。また、ヒト臨床検体においても、従来機器を用いた安全性および有効性が国内医療機関から報告されています。しかしながら、従来機器を用いた正確な呼吸量測定には長時間の訓練が必要ため、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ます。そのため我々は、2年前より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測定機器を開発してきました。

2 本課題の目的及び医学・医療における意義

新しい装置は卵を育てる培養器に受精卵を置き、煩雑な操作なしに受精卵の呼吸量を測定でき、従来機器において不可能であった操作の単純化を可能にしたものです。また、従来機器と同様に直接受精卵に触れることはなく、非常に弱い電流を流すのみで測定可能なため有害事象の発生は極めて低いと予想されます。今後、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検討し、従

来の形態の評価に呼吸機能の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きます。本研究により新しい装置の有用性・安全性が確認されれば、将来的には臨床試験を行い、体外受精を行う際に本機器の使用を標準診療としていきたいと考えております。そして、この機器により早期の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に大いに貢献することが期待できます。

3 対象者の本課題への参加同意の自由と、途中での参加撤回の自由

この説明書を読み、本研究に参加してもよいと思われる場合には、最終ページの同意文書に日付を記入し、署名もしくは記名捺印をお願いします。

一旦同意した場合でも、あなたが不利益をこうむることはなく、いつでも自由にそれを撤回することが出来ます。ただし、同意を撤回した時点で既に研究が開始している場合は、症例が特定不可能なため、中断および破棄ができない場合があります。

4 本課題の実施期間

登録は平成26年4月1日から1年間を予定しています。

5 本課題の実施体制（共同研究者等）

この臨床研究は東北大学産婦人科が中心となり、弘前大学産婦人科、秋田大学産婦人科、山形大学産婦人科、福島県立医科大学産婦人科と共同で行われます。

6 本課題の対象者（対象の受精卵）

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）を所有している方が対象です。

7 本課題の実施方法

・測定方法

まず、受精卵を育てる培養器というものの中に開発した装置を設置します。

次に受精卵を中央のチップと呼ばれる部分のくぼんだ場所に置きます（図2）。約5分間培養器内で静置し、微弱な電流を流すことにより受精卵の呼吸量を測定します。これは従来機器において不可能であった操作の単純化と培養器内環境下での測定を可能としたものです。

手順ですが、受精後3日目の卵を用いて呼吸量を測定し、通常の培養に戻します。さらに培養を継続しますと良好受精卵では分割を繰り返す、桑実胚（5日目頃） 胚盤胞（6日目頃） 孵化（7-8日目頃）、という形態の変化を起こします。一方、不良卵は途中で分割が停止してしまいます。

・評価方法

受精3日目に呼吸量測定と従来から行われている形態学評価をします。次に受精卵が孵化するまでの形態変化を確認し、呼吸量と比較検討します。また、従来からの顕微鏡による形態評価と本機器による呼吸量評価を比較検討します。さらに、呼吸量測定装置を用いた際の分割スピードの変化や夾雑物の増減を検討し、これまでの手法と比較した所見を調べます。

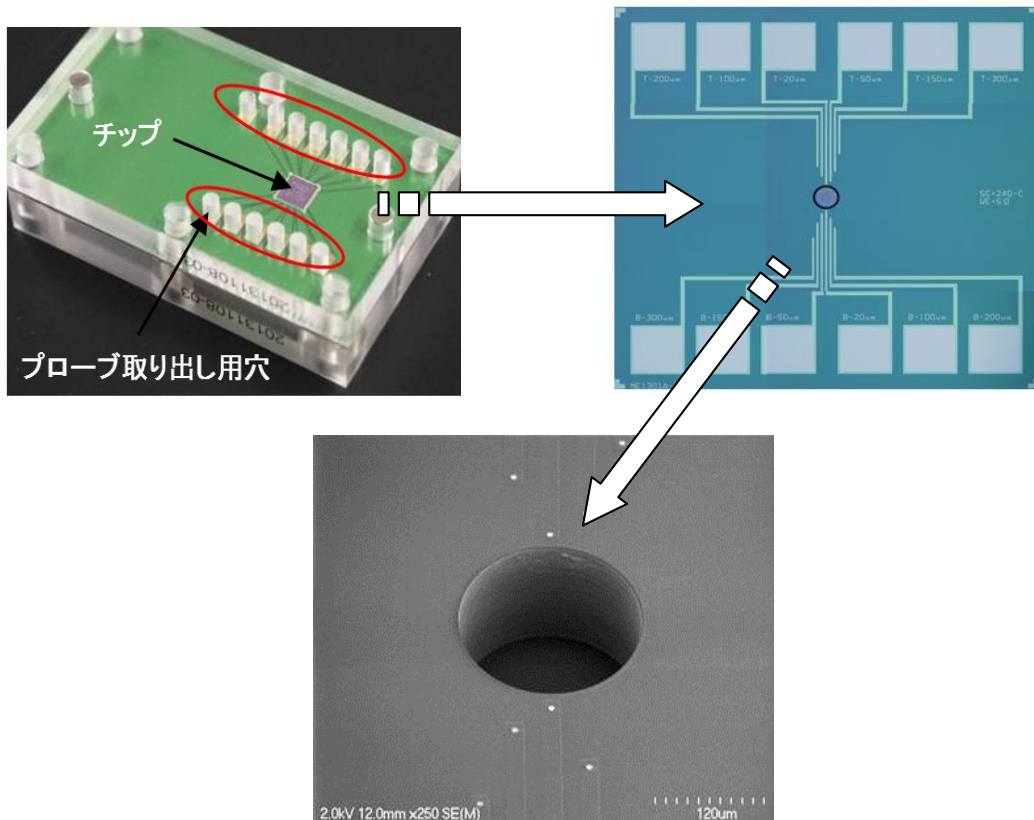


図 2. 開発した呼吸量測定装置（左上段 右上段 下段 の順に拡大像）

中央の穴に受精後 3 日目の卵を置き、培養器の中で測定します。

・本機器使用による有害事象発現の可能性

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します。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ありません。ただし、将来的な研究に反映するため、本機器使用により起こりうる有害事象についても併せて検討します。具体的には、下記のような事象が想定されます。

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）の非常に弱い電流を用いて約 5 分間計測を行います。従来機器では、ヒトおよび動物受精卵に明らかな異常所見（妊娠率、出生数、出生体重、奇形、染色体、生化学的検査など）は認められませんでした。本研究ではヒトやヒト以外の動物に戻すことはありませんので検討項目は限られますが、分割停止率や分割速度の変化、夾雑物の増減を検討します。

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できません。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しますので、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おります。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様に、分割停止率や分割速度の変化、夾雑物の増減を検討します。

8 本課題の資金源，起こり得る利害の衝突及び研究者等の関連組織との関わり

この研究は厚生労働省の科学研究費で行い、患者様の負担は一切ありません。科学研究費の研究代表者が所属する東北大学が中心となり、分担研究者の所属する 4 つの研究協力施設と共同で研究を行います。

9 本課題の実施に伴う危険性及び問題が生じた場合の対処

今回の試験では、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)を使用します。所有する患者様には危険や問題が生じることはありません。

10 資料の保存と廃棄

これらの研究用に使用された受精卵は、本研究以外の目的で使用されることはありません。また、これらのサンプルはヒトやヒト以外の動物に戻すことはなく、本研究が終了次第すぐに破棄されます。尚、研究データに関しては研究終了後も保存します。

11 個人情報の保護

この臨床研究に参加した場合、患者様とその検体が同定できないように連結不可能匿名化されます。あなたを特定できる個人情報を取り扱うことはありませんので、あなたのプライバシーは完全に守られます。

研究結果は学術雑誌や学会で発表される予定です。その際にあなたのお名前や個人を特定できるような情報が使われることはありません。そのため、ご希望があれども、あなたにご自分の研究結果をお知らせすることはできません。

12 本課題に関する問い合わせ先

この研究について疑問や不安があるときや、何かご相談やご意見があればいつでもご連絡ください。相談窓口は以下の通りです。

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

13 経過中及び終了後の対象者からのクレームにつきまして

この研究の途中で協力を中止したいと思っても、ご本人の検体を特定できませんので中断することは不可能です。また、調査中に不快な思いをされた場合などは、必ず担当医師にお伝えください。担当医師に言いにくい事は他のスタッフにお伝えいただいても結構です。いずれの場合でも、あなたの今後の治療で不利益を受けることはありません。

説明年月日 平成 年 月 日

説明者所属 _____

説明者氏名 _____

III .研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kumasako Y., Goto K., Koike M., Araki Y., Abe H., Utsunomiya T.	Respiration activity of single blastocysts measured by scanning electrochemical microscopy: The relationship between	Journal of Mammalian Ova Research	30	30-35	2013
Yoshida H., Abe H., Arima T.	Quality evaluation of IVM embryo and imprinting genes of	Journal of Assisted Reproductive	30	221-225	2013
阿部宏之	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	7-14	2013
Hirobe T., Ito S., Wakamatsu K., Kawa Y. Abe H.	Mouse brown (<i>b/Tyrp1^b</i>) allele inhibits eumelanin but not pheomelanin	Zoological Science			In press
Miyano Y., Tahara S., Sakata I., Sakai T., Abe H., Kimura S., Kurotani R.	Regulation of LH/FSH expression by secretoglobin 3A2 in the mouse pituitary gland	Cell Tissue Research			In press

Hoshino S., Kurotani R., Miyano Y., Sakahara S., Koike K., Maruyama M., Ishikawa F., 阿部宏之	Macrophage colony-stimulating factor induces prolactin expression in rat pituitary glands	Zoological Science			In press
阿部宏之	ARTにおける新技術・ 酸素消費と胚評価	臨床婦人科産 科	68	20-27	2014
阿部宏之	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	医学のあゆみ			印刷中

IV . 研究成果の刊行物・別刷

代表的な4本の文献の別刷を添付いたしました。

- 1) Kumasako Y., Abe H. et al. Respiration activity of single blastocysts measured by scanning electrochemical microscopy: The relationship between pre-freezing and post-warming.
Journal of Mammalian Ova Research. 30:30-35 2013
- 2) Yoshida H., Abe H., Arima T. Quality evaluation of IVM embryo and imprinting genes of IVM babies. *Journal of Assisted Reproductive Genetics* 30:221-225 2013
- 3) 阿部宏之. ARTにおける新技術・酸素消費と胚評価 臨床婦人科産科 68:20-27 2014
- 4) 阿部宏之. 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 35:7-14 2013