

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650262

研究課題名（和文）

血清アルブミン結合分子の受精卵培養への影響・分析システムへの展開

研究課題名（英文） Effects of serum albumin binding molecules on embryo culture and analytical system development for the molecules

研究代表者

松浦 宏治 (Koji Matsuura)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・助教

研究者番号：70443223

研究成果の概要（和文）：血清、市販の標品を含む精製ヒト血清アルブミン(HSA)内に特異的または非特異的に結合している分子を評価するために、我々は小分子の検出を試みた。その結果、コレステロールとビリルビンに由来するシグナルが検出された。ビリルビンを除くためにはエタノールを用いた精製方法が必要であった。精製した HSA を培地に添加した際マウス受精卵培養時には、マウス受精卵は胚盤胞に発育した。また、蛍光標識したウシ血清アルブミンを添加した培養液で培養した際には、このアルブミンがマウス胚盤胞内で観察された。このことから、受精卵は発育時に HSA を取り込むと考えられ、HSA に結合分子があってもマウス受精卵は発育した。コレステロールやビリルビンといった結合分子を受精卵培養に影響を与える試薬であるエタノールや塩を添加せずに取り除くことは困難であるために、患者本人の血清から HSA を精製して受精卵培養に積極的に使用することは好適でないと判断した。

研究成果の概要（英文）：To evaluate small molecules non-specifically or specifically bound to the human serum albumin (HSA) including commercially available samples and human serum, we evaluated the small molecules before and after purification of HSA from human serum. The signals derived from bilirubin and cholesterol were detected. We found that a purification method using ethanol was necessary in order to remove bilirubin. 2-cell mouse embryo developed to blastocyst when purified HSA was added to the medium. Furthermore, when the mouse embryo is cultured in culture medium supplemented with fluorescence labeled bovine serum albumin (BSA), fluorescence of the BSA was observed in mouse blastocyst. Based on these results, we considered that fertilized oocyte could uptake the HSA in mouse embryonic development. Even if organic molecules bound to HSA, mouse embryonic development was observed. Because removal of binding molecules such as bilirubin and cholesterol is difficult without addition of salt and ethanol that affect the human embryo culture, we concluded that the HSA purified from human serum was not able to use for the embryo culture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：1301A

キーワード：ヒト血清アルブミン、受精卵培養、ビリルビン、重金属

1. 研究開始当初の背景

体外胚培養にヒト血清アルブミン(Human Serum Albumin: HSA)を添加することにより、培地内の浸透圧を調整する役割を担う。リコンビナント HSA を培地に添加した際に胚培養成績が低下するなどの問題があり、応募者らは患者本人からのヒト血清アルブミンを簡便に臨床現場で精製できるように条件を最適化し精製スキームを完成させた。しかし、場合によっては重金属、薬剤、脂溶性物質の結合した状態で精製・使用される可能性がある。胚培養とこれらの物質の有無との相関についての情報が必要になると想定される。これらの問題を解決すべく、①胚培養に使用するための HSA の評価および標準化と②そのオンサイト評価デバイスへの展開を目指す。

2. 研究の目的

(1) 結合分子に関する情報

吸収スペクトルおよび Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry (DART-MS) 法によって実際に結合している物質を評価した。

(2) 精製方法の改善

ビリルビンは活性酸素発生の原因になったりすると言われている。そのため、ビリルビン非結合型 HSA を精製できるようにする必要があり、その代替精製方法を進めた。低温エタノール法を試してみた。

(3) HSA に結合した重金属イオンの分析方法

重金属イオン評価においては、標的となるイオン種に目途がつけば、それらと光吸収官能基を有する配位子との配位結合によって濃度を計測する。従来は水質調査用のキットが使われていたが、サンプル量が小さく、金属イオン濃度が低いので定量的に評価する必

要がある。銅イオンの場合、Zincon (同仁化学社製) 等を用いて分析した。

(4) マウス受精卵培養

精製した HSA を培地に添加した際、市販の蛍光色素が結合したウシ血清アルブミン (FITC-BSA) 添加時の受精卵培養を行った。

(5) 試験紙デバイスの適用

臨床現場において、化学反応をその場観察するために試験紙を用いることがある。試験紙を構成する繊維は親水性である。疎水性のワックス等でパターン化すれば、親水性のチャネルを試験紙に作製することができる。水溶液を滴下することによって親水性チャネル内のみその液が移動する。試験紙内で化学反応が起こるようにして移動後の液をデジタルカメラで撮影すれば、水溶液が通過した部位の色の变化から反応の進行を評価することができる。試験紙デバイスは台湾精華大学との共同研究先で作製したものを使用した。この試験紙デバイスが機能するか否かを評価するために、精子内の酵素反応を利用した物質の色の变化を検出する手法によって運動精子割合を推定できるか否か検討した。

3. 研究の方法

(1) 結合分子に関する情報

血清、市販の標品を含む精製ヒト血清アルブミン(HSA)内に特異的または非特異的に吸着・結合している分子を評価するために、DART-MS 法または光吸収によって、試料液滴をイオン化させる手法で分子量 1000 までの小分子の検出を試みた。

(2) 精製方法の改善

ヒト血清アルブミンの精製は、コーンの低温エタノール分画法を参考にして行った。4 ~ -5°C で、ヒト血清に最終濃度が 35% になるようにエタノールを加え、数分攪拌した後に、

15000rpm, 1h で遠心分離した。得られた上清を回収し、50mM HEPES(pH7.4)で15~20倍に希釈し、遠心濃縮した。これを3回繰り返し、ヒト血清アルブミンを得た。

(3) HSA に結合した重金属イオンの分析方法

20mg/ml HSA (SIGMA)と 3mM Zn²⁺(Zinc Acetylacetonate)または Cu²⁺(CuSO₄・5H₂O)をモル濃度比が 1:10 なるように混合し、DEAE-650C(TOYOPEARL)に吸着させた。上清を捨てた後、50mM HEPES(pH7.4)を加え洗浄し、15000rpm, 1min で遠心した。これを10回程度繰り返し返した。その後、1M NaClを加えて溶出し、15000rpm, 1min で遠心して、上清を回収した。50mM HEPES(pH7.4)で15~20倍に希釈し、スピカラムを用いて遠心濃縮した。これを2回繰り返し、重金属と結合したHSAを得た。ヒト血清は、millQ水を用いて20倍に希釈、ヒト血清アルブミンは2倍に希釈し、Zinconは80 μMになるように加えて測定した。

(4) マウス受精卵培養

10 mg/ml 程度の精製 HSA または FITC-BSA 5 μl を 50 μl の mW 培地に添加した培地でマウス受精卵を2細胞期から3日間培養した。発育は形態観察で確認し、FITC-BSA の取り込みは蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(5) 試験紙デバイスの適用

試験紙に黄色の試薬 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium 塩 (MTT)水溶液を添加した。乾燥させ、水を揮発させた後、精液を試験紙に滴下した。精子内の還元酵素が MTT と反応して紫色の MTT formazan に還元される。運動精子は試験紙に滴下された後、試験紙上または中をすぐに吸着されることなく移動する。運動精子を多く含む試料では試験紙内の運動精子分布が広くなり、紫色のシグナルが大きく、かつ濃く

なった。この紫色の濃さ・パターン分布と運動精子割合の関連を評価した。

4. 研究成果

(1) 結合分子に関する情報

DART-MS の結果を図1に示す。血清(図1C)では分子量370, 550-600 dalton の位置にコレステロールとビリルビン(あるいはその誘導体)に由来するシグナルが検出された。一方、精製標品(図1A)およびリコンビナントHSA (rHSA) (図1B)ではこれらのピークはあまり検出されなかった。

光吸収スペクトルを測定すると、陰イオン交換カラムで精製した HSA(CP-HSA)と rHSA のスペクトルにおいて違いが見られた(図2)。ポイントは400-500 nm の部分である。400 nm 近傍のピークはヘモグロビン由来であるが、これは両方で観測された。ヘモグロビンが入っていても受精卵培養の成績が低下しないと報告があり、このフラクションが入っていても問題ない。460,480 nm のピークはビリルビン結合型HSA由来である。こちらは、CP-HSA のみ観測された。rHSA では胚発育を大きく阻害することはないために、吸収スペクトルの形を rHSA に近づけることが大事と考えた。

(2) 精製方法の改善

エタノール 25~40%と 5%ごとに振ってみた際には、ビリルビン結合型 HSA の吸収はエタノール濃度 35%で消失した(図3赤色のスペクトル)。また、SDS-PAGE からはグロブリンも沈殿に含まれていたため、不要なグロブリンとビリルビン結合型 HSA を除去可能であった。

グロブリンおよびコレステロールやビリルビンといった結合分子を受精卵培養に影響を与える試薬であるエタノールや塩を添

加せずに取り除くことは困難であるために、患者本人の血清から HSA を精製して受精卵培養に積極的に使用することは好適でない と判断した。

(3) ZINCON の結果

図 4 に得られた吸収スペクトルを示す。亜鉛および銅イオンが zincon と結合している際には、それぞれ吸収極大が 650 および 620 nm に現れた。HSA に結合している場合にはこれらのピークはより長波長側にシフトした。血清から精製した HSA では 650 nm のピークに肩が見られていることから、血清由来 HSA には銅ではなくて亜鉛イオンの割合が多いことが示唆された。

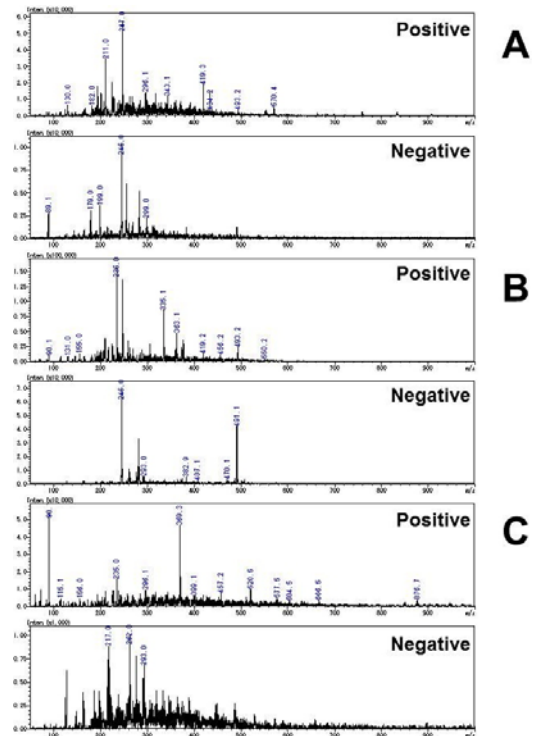
(4) マウス受精卵培養

マウス受精卵培養時には問題なく胚盤胞まで発育し、かつ、蛍光標識した HSA が胚盤胞内で観察された。また、FITC-BSA を添加して培養した際には図 5 に示すように、FITC-BSA が胚盤胞内に取り込まれていた。このことから、受精卵は発育時に HSA を取り込むと考えられる。マウス受精卵の場合は HSA に結合分子があっても問題なく発育する。

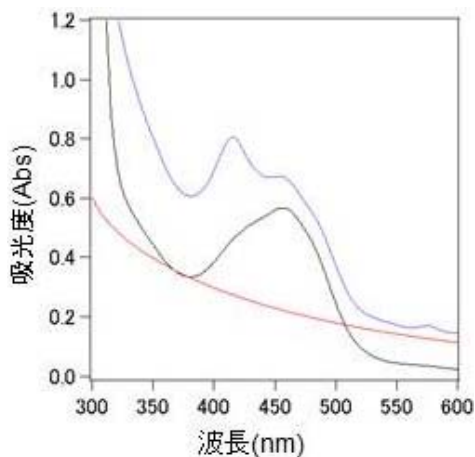
(5) 試験紙デバイスの適用

図 6 の試験紙を用いた際には、精液内運動精子割合が 5%以下の区、10-50%の区、50%以上の区について運動性を示すパラメータを得た。T 検定でそれぞれの区のパラメータ平均値の差を評価したところ、50%以上の区と 5%以下の区との間に有意差があった ($P < 0.01$)。当デバイスを使用して、精子と不活化精子を含むサンプル間の違いを認識できることが示唆された。この実験結果から、試験紙デバイスの化学反応による色の変化を

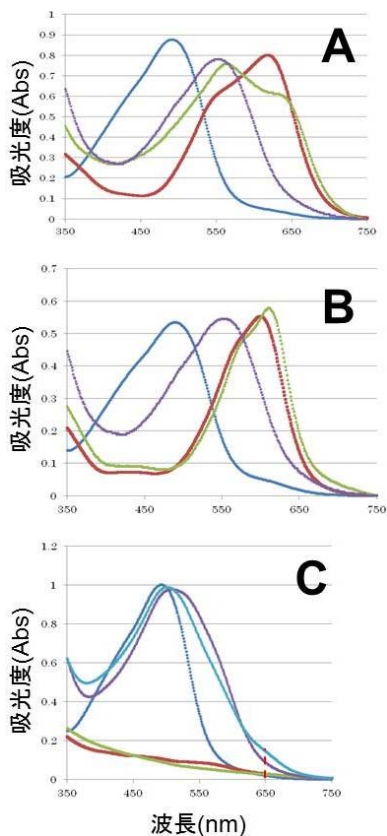
記録することによって、臨床現場で分析可能であると言える。zincon を用いた分析に当技術を応用することもできる。



る。

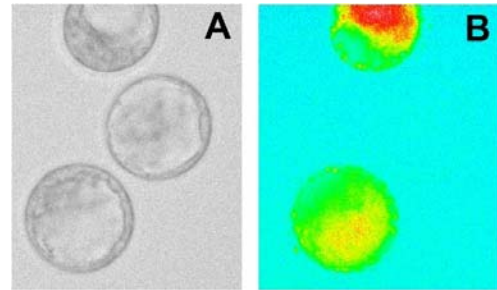


<図3>黒：血清、青：CP-HSA、赤：低温エタノール法で得られたHSAのスペクトル。低温エタノール法では450 nm由来のビリルビン結合型HSAを除くことができる。

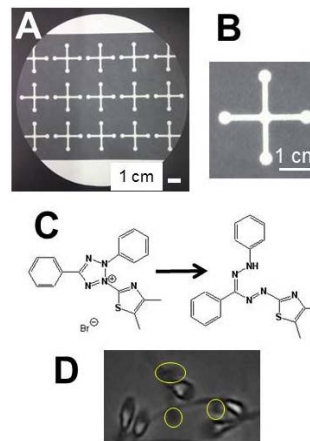


<図4>ZINCON吸収スペクトル。
 (A) 青色：Zincon、えんじ色：Zincon&Zn²⁺+80 μM、黄緑色：Zincon&Zn²⁺+HSA(SIGMA)×6、紫色：HSA(SIGMA)の吸収スペクトル
 (B) 青色：Zincon、えんじ色：Zincon&Cu²⁺+40 μM、黄緑色：Zincon&Cu²⁺+HSA(SIGMA)×3、紫色：HSA(SIGMA)×0.7の吸収スペクトル
 (C) 青色：Zincon×0.7、えんじ色：ヒト血

清、黄緑色：ヒト血清アルブミン、紫色：Zincon+ヒト血清、水色：Zincon+ヒト血清アルブミンの吸収スペクトル
 スペクトルのピーク強度を合わせるために、一部ファクターを掛けた。



<図5>培地内に BSA-FITC 添加時に得られたマウス胚盤胞。(A)明視野像(B)蛍光像。一部のマウス胚盤胞の内部に BSA-FITC が取り込まれていた。



<図6> (A) 本技術で用いた試験紙パターン。(B) 1パターンの拡大図。(C) MTT から MTT formazan への反応式 (D) Formazan が産出されると精子ミトコンドリアに一部蓄積される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Koji Matsuura, Yuka Asano, Akira Yamada, Keiji Naruse, Detection of *Micrococcus Luteus* biofilm formation in microfluidic environments by pH measurement using an ion-sensitive field-effect transistor, *Sensors*, 査読有, 13巻, 2013, 2484-2493, doi:10.3390/s130202484

[学会発表] (計0件)

〔図書〕（計1件）

①Koji Matsuura et al、Intech、Advanced Elastomers: Technology, properties and applications、2012、243-262

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：精子品質検測装置
発明者：松浦宏治ほか
権利者：国立精華大学
種類：特許
番号：P3015TW-40（台湾）
出願年月日：2013年1月28日
国内外の別：外国

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 宏治 (Koji Matsuura)
岡山大学・異分野融合先端研究コア・助教
研究者番号：70443223

(4) 研究協力者

沖津 撰 (Osamu Okitsu)
三宅医院・生殖医療科
研究者番号：なし