

## 自己評価報告書

平成23年 4月22日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20680026

研究課題名（和文）

選択的単一胚移植（eSET）へ向けた体外受精卵の品質モニタリングシステムの開発

研究課題名（英文）

Evaluation of the Embryo Quality for Elective Single Embryo Transfer

研究代表者

村山 嘉延（MURAYAMA YOSHINOBU）

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：80339267

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス、ヒト生殖補助医療

## 1. 研究計画の概要

ヒト生殖補助医療において、母子共にとって最大のリスクである多胎妊娠を防止するために「35歳未満の患者に対する初回の移植では1個に制限する」とのガイドラインが発表された。これにより、体外受精させた複数の受精卵から優良胚を一つだけ選択する（eSET）必要性が新たに生じている。私たちはこれまでに超高感度に局所弾性率を計測するマイクロタクトイルセンサー（MTS）を開発し、マウス卵子透明帯（ZP）の弾性率を世界で初めて計測して、ZP弾性が成熟、受精、発生に伴い細胞活性を反映してダイナミックに変化することを発見した。今後の重要な課題は、妊娠性の高い受精後早期の段階にZP弾性率と受精卵品質との相関を検討すると共に、実用的で安全な品質モニタリングシステムを開発することである。MTSによる評価手法をより安全で簡便に代替する方法として、光学的手法による卵子観察評価法（ZP厚、複屈折率、ラマン分光）も検討している。

## 2. 研究の進捗状況

①ヒト卵子透明帯の透明帯硬化と品質について。乾マタニティクリニック（福島県郡山市）の協力により、院内倫理委員会並びに日本産科婦人科学会の承認のもと、患者へのインフォームドコンセントを適切に行い、ICSI適用症例についてMII期及びPN期のZP弾性率を測定した。受精後にMII期からPN期にかけて約3倍硬化する現象は、これまでに示されたマウス、ウシ、ブタと同様の種を超えて普遍的な現象であると思われるが、Day2でいったん透明帯が軟化する傾向は見られるものの胚盤胞になるにしたがいさらに硬化する傾向が見られた。次に、胚盤

胞移植を施行した症例について胚盤胞のICM及びTEの弾性率を測定し、妊娠した胚と妊娠に至らなかった胚の弾性率をレトロスペクティブに検討した結果、妊娠に至った着床胚の弾性率は、着床に至らなかった胚の弾性率より、高い傾向を示した。さらに、良質卵ほど「表層反応」と「胚盤胞の拡張に伴う透明帯の変化」が活発になり、前核期における硬化と軟化を促進すると仮説し、特に単胎妊娠を希望しMTS検査に同意が得られた1症例について、MTS検査により最も良好と評価された胚をeSETした結果、2900gの健全な女兒が誕生した。

②MTS透明帯弾性率測定が胚発生に及ぼす影響について。マウスを用いた行動学的異常・形態異常に関する5世代継代繁殖試験、産仔の染色体検査では異常を認めない。さらに胚発生への安全性を確かめた結果、MTS接触や超音波暴露による胚発生への負の影響は、胚盤胞到達率・胚盤胞細胞数ともに認められなかった。しかし、初心者のMTS測定作業に伴う外気への暴露や温度等の環境変化が胚発生を悪化させた。よって、MTS測定時の環境改善が、安全性をさらに高めるためにも重要であると考えられる。

③未受精卵成熟過程におけるZP軟化について。マウスを試験動物とし、これまでに明らかにされていない未受精卵ZPの弾性率測定・酵素耐性試験を行い、成熟過程において弾性率・溶解時間共に優位に軟化する現象「透明帯軟化」が示された。加えて、透明帯硬化現象と軟化現象が異なる化学的変化による結果である可能性を示唆した。

④光学的手法による卵子観察評価法について。まず、ヒト卵子ZP厚さと弾性率との関係について、透明帯が厚くなるに伴い弾性

率が高くなる傾向が認められた。ZP が厚い前核期胚の弾性率は、ZP が薄いものに比べ高い傾向が認められた。ZP が厚い症例は、硬度が高く、ハッチング障害の存在を示唆し、今後アシテッドハッチングの適用か否かを判断する上で有効な指標になりうると思われる。次に、OctaxPolarAide を用いて卵子透明帯複屈折率による品質評価の可能性を検討した。正常受精に至った MII 期卵子と受精に至らなかった MII 期卵子の透明帯複屈折率の間に有意な相関は得られなかった。また、受精群において受精前の MII 期卵子と受精後前核期における透明帯複屈折率の差を検討した結果、複屈折率は透明帯弾性率及び酵素耐性とは別の現象を反映した物理量であることが分かった。

### 3. 現在までの達成度

①受精後の胚品質評価及び医療機関における臨床研究について。受精前後の ZP 弾性率変化と胚品質との関係が明らかとなり、受精後早期の段階、及び胚盤胞期における受精卵の品質評価手法を提案した。医療機関の協力によりヒト卵子の臨床試験を行い、同様に受精卵の品質評価が出来た。また、MTS 検査により eSET された症例により健児出産を得ており、当初の目的が十分に達成できた。

②受精前の未受精卵の品質評価について。マウス卵子 ZP が未成熟卵の成熟過程において優位に軟化する現象が明らかとなった。ZP 軟化度による未受精卵の品質評価の可能性を示唆するものであるが、現段階で品質との直接的関係を示すには至っていない。

③光学的観察手法による品質評価について。光学顕微鏡を用いた ZP 厚さ、複屈折試験を試みたが、ヒト卵子の診断として臨床的に用いるまでの達成度は得られていない。

④実用的なヒト生殖補助医療支援システムの開発について。受精卵の品質評価により、同時に選択胚以外の卵子の保存、受精卵そのものの品質を維持する培養法・培養液等の開発の必要性が生じ、本研究課題でも随時研究項目に追加した。新しいガラス化保存手法、無血清培地の開発により受精卵品質の向上を実現しており、研究目的を十分に達成した。

### 4. 今後の研究の推進方策

ZP の物理化学的特性及び構造変化から受精卵の品質を診断する手法が明らかとなり、今後必要とされる研究は①より安全、簡便で誰もが測定可能な手法を開発し、技術の普及に繋げること、②受精卵品質診断に付随して必要となる受精卵培養手法の開発、保存方法の開発、マニピュレーション手法の開発により受精卵品質を低下させない総合的なヒト生殖補助医療支援システムの開発である。加えて、③未受精卵の品質評価の可能性につい

ても検討を重ねたい。以上のことから、①タイムラプス観察や画像解析手法を駆使して ZP 複屈折率による品質評価手法の精度を上げ、MTS 検査に代替する手法として確立を目指す、②培養器内において簡便に受精卵を連続観察する手法の開発を通して、胚品質に影響する培養手法の改善を検討すること、③未受精卵の ZP 軟化現象をもとに受精後の胚品質を診断する手法について研究を推進する予定である。なお、本手法がヒト生殖補助医療だけでなく、再生医療において有用な技術として現段階で様々な応用研究が進み始めていることに言及しておきたい。

### 5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- ① 水野仁二、乾裕昭、赤石一幸、安齋憲、菊池瑛子、渡邊百合、野口香里、村山嘉延、クライオナノホールガラス化コンテナを用いた ART のための密封型の低毒性・完全無血清ガラス化保存システムの開発、日本受精着床学会雑誌、27(1),67-72,(2010)、査読有り
  - ② O. Lindahl, C. Constantinou, A. Eklund, Y. Murayama, P. Hallberg and S. Omata, Tactile Resonance Sensors in Medicine, Journal of Medical Engineering & Technology, 33(4),263-273,(2009)、査読有り
  - ③ Y. Murayama, M. Yoshida, J. Mizuno, H. Nakamura, S. Inoue, Y. Watanabe, K. Akaishi, H. Inui, C. E. Constantinou and S. Omata, Elasticity Measurement of Zona Pellucida Using a Micro Tactile Sensor to Evaluate Embryo Quality, Journal of Mammalian Ova Research, 25(1),8-16,(2008)、査読有り
- (他 8 件、査読有り)

〔学会発表〕(計 38 件)

- ① 村山嘉延、受精卵の品質を診断する技術の開発、医用・生体工学研究会(生体医工学シンポジウム 2010)、平成 22 年 9 月 10 日、北海道大学
  - ② Y. Murayama et al., Evaluation of sufficient maturation and consequent oocyte activation by measuring the change in ZP elasticity, 24th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, 平成 21 年 7 月 6 日, Barcelona, Spain
  - ③ Y. Murayama et al., Mouse Zona Pellucida Mechanically Hardens in the Amount of Cortical Granule exudates dependent manner, 41st Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 平成 21 年 5 月 28 日, Kailua-Kona, Hawaii
- (他 35 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕 特になし