

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31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

研究成果の概要（和文）：

ヒト生殖補助医療における、選択的単一胚移植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を行い、以下の研究成果を得た。まず、ヒト卵子においても受精後に MII 期から PN 期にかけて約3倍硬化する現象が確認された。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。次に、胚盤胞移植を施行した胚盤胞の ICM 及び TE の弾性率を測定したところ、単一胚盤胞移植による着床胚の弾性率は、着床に至らなかった胚の弾性率より、高い傾向を示した。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症例1周期8卵子について、MTS測定結果に基づく eSET を行ったところ、健全な女児が誕生した。同時に、MTS 透明帯弾性率測定が胚発生に及ぼす影響が無いことを確認している。また、マウス未受精卵成熟過程において透明帯が軟化する現象が確認されたことから、未受精卵の品質評価が出来る可能性が示唆された。さらに、より卵子に優しい非侵襲な計測法の開発のために、光学的顕微鏡観察による透明帯厚さと弾性率の関係について調べたところ、透明帯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た。加えて、低毒性、完全無血清の安全性の高いガラス化保存システムの開発を行い、従来法と同等の成績を達成した。

研究成果の概要（英文）：

To enable improved success rate of IVF, we developed the technology to optimize embryo selection, having the highest implantation potential while ensuring no damage to embryos using zona elasticity as selection criteria. First, “zona hardening” was demonstrated mechanically following fertilization at the PN stage, Young’s modulus decreased gradually as the embryo developed. Evaluation of the quality of expanded blastocysts (EPB) shows that the quality of EPBs could also be evaluated from elasticity parameters. Furthermore observations indicated that ZPs of embryos generated in vivo were significantly harder than those of embryos generated in vitro at each stage. We examined the correlations between subsequent ZP elasticity changes after IVF treatment and quality of embryos and the results showed that the pregnancy rate after MTS-eSET was almost the same with that after double-embryo transfer. It was also examined that both theoretically and experimentally the MTS test does not cause any damage to embryos. Furthermore, we developed a cryo-nano-hole vitrification container with a low concentration of CPA solution with no serum and mouse and human blastocysts can be cryopreserved successfully.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

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. 研究開始当初の背景

ヒト生殖補助医療において、母子共にとって体外受精の最大のリスクである多胎妊娠を防止するために子宮に移植する胚の数を減らすべきとの世界的認識を受け、本邦においても平成19年になり「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必要性が新たに生じている。しかし、従来優良胚の選択は顕微鏡下での形態観察(ガードナー分類等)が唯一の方法であることが問題となっており、主観的評価によるばらつきを無くすために、客観性・定量性のある評価法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

一方で、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(軟化→硬化→軟化)に変化することを発見した。先ず、マウス及びヒト胚盤胞(受精後後期)の弾性率が胚品質の指標となることを見出し、受精卵の品質を評価できる可能性が示された。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、本測定手法の有用性を生理学的に解明し、実用的(次項参照)な品質モニタリングシステムを開発することである。他に唯一報告されている胚品質評価手法として、溶存酸素濃度を電気化学的に測定し胚呼吸活性を推定する方法が近年開発され、同様に今後の開発が

期待されている。

3. 研究の方法

受精後早期(1～3日)の受精卵及び拡張する胚盤胞(受精後5～6日)の品質評価を行うために、①弾性率測定装置・品質モニタリングシステムの開発、②マウス受精卵を用いた基礎生理学的研究、③不妊治療クリニック協力による臨床試験を行った。①ではZP弾性率を測定するマイクロタクトイルセンサ(MTS)の医用安全性を高め、培養環境にてZP弾性率測定するシステムを開発し、同時に画像解析手法を確立した。②ではマウス受精卵をモデルとして用い、生殖生理学的研究手法により品質評価の科学的根拠を確立した。また、③ではプライベート不妊治療クリニックの研究協力を受け、開発した手法の有用性を実証した。

4. 研究成果

(1) ヒト卵子透明帯の透明帯硬化と品質
ヒト卵子の扱いについては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の後、ICSI適用の7症例29個についてMII期及びPN期(一部は分割期～胚盤胞期)のZPヤング率を測定した。継続培養した胚の一部は移植を行った。測定の結果、MII期、PN期、Day2、Day3、EB期において、それぞれ 4.69 ± 3.08 kPa (n=24)、 13.03 ± 6.68 kPa (n=48)、 9.97 ± 4.68 kPa (n=40)、 11.48 ± 5.11 kPa (n=43)、 12.59 ± 6.41 kPa (n=80)となった。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（一過性の硬化）は見られるものの胚盤法になるにしたがいさらに硬化する傾向が見られた。ヒト卵子は他の動物と比べて弾性率変化の様子が異なる結果を得た。

次に、胚盤胞移植を施行した 29 症例 33 周期 43 個について胚盤胞の 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。ICM のヤング率は $20.6 \pm 3.7\text{kPa}(n=7)$ 、TE のヤング率は $13.9 \pm 4.6\text{kPa}(n=7)$ の値を示した。弾性率測定後、胚盤胞移植した 33 周期のうち、12 周期 36.4%において臨床的妊娠を確認した。胚盤胞移植後、妊娠した症例の弾性率をレトロスペクティブに解析した結果、単一胚盤胞移植による妊娠、または移植個数と GS 数が一致した着床胚のヤング率は、着床に至らなかった胚のヤング率より、高い傾向を示した。

次に、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症例 1 周期 8 卵子について、MTS 測定結果に基づく eSET を行った。MTS 検査の後、もっとも良好胚と評価された受精卵 (MII 期、PN 期、Day5 においてそれぞれ 10.5kPa 、 29.1kPa 、 19.9kPa) を eSET した結果、2900g の健全な女児が誕生した。

(2) MTS 透明帯弾性率測定が胚発生に及ぼす影響について

MTS の安全性について、これまでにマウスをモデルとし、行動学的異常・形態異常を含めた 5 世代継代繁殖試験や、産仔の染色体検査などの、最も肝心な産仔安全性試験を行ってきたが、異常は認めていない。しかし、MTS 技術をヒト ART に応用するにあたり、さらに胚発生への安全性を確かめる必要がある。そこで、MTS 透明帯弾性率測定が胚発生に及ぼす影響について、マウス卵、および体外受精胚を用い検討した。胚発生における MTS の安全性試験を行うため、MTS 測定が胚発生に影響を与えると思われる以下の項目に関して検討を行った。

MTS 測定時に、チャンバー内に投入した複数の卵を、MTS を接触させる測定群と、

MTS を接触させない擬似測定群の 2 つに分け調査した。他の条件は同一とした。MTS 測定は MII (Metaphase II) 期 (第二減数分裂中期)、PN 期 (前核期)、2cell 期 (2 細胞期)、CM 期 (桑実胚期) の各ステージで MTS 測定を行い、通常の媒精・培養したものをコントロールとした。(詳細な結果は膨大量となるため省略し、以下に結言を記す)。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、コントロールと比較して、測定群・擬似測定群ともに胚盤胞細胞数が少なかったことは、MTS 測定作業に伴う外気への暴露や温度などの環境変化が原因である可能性がある。その影響は 2cell 期卵において顕著であった。よって、MTS 測定を行うにあたり、測定時の卵を取り巻く環境を適した状態に改善することが、MTS の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。加えて、MTS 測定用チャンバー内に保持した胚において、2cell 以降に 20 分間を 2 回までの外気中放置を行った場合は、胚発生にさほどの影響は及ぼさないが、PN 期から 30 分間の外気放置を 3 回行うと顕著に胚発生へ影響を及ぼすことが示された。MTS 測定に伴う外気への暴露や温度などの環境変化は、胚発生に影響を与えることは明らかである。よって、MTS の安全性をさらに高めるためにも、現状の MTS 測定用チャンバーおよび測定方法を改善する必要があると考えられ、チャンバー内の培養液が外気に触れる面積を最小とするような構造にする等の改良が求められる。

(3) 未受精卵成熟過程における ZP 軟化

未受精卵の ZP 弾性率変化については、これまでに明らかになっていない。細胞質活動が ZP 構造を変化させていることから卵子成熟過程においても ZP 弾性率が変化していると考えられるが、同変化が測定できれば体外受精に試供する未受精卵の品質評価ができる可能性を示す。そこで、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 の弾性率変化・酵素耐性試験 (ケモトリプシンを用いた溶解試験) を行い、未受精卵の成熟過程における透明帯の特性変化を初めて明らかにした。未成熟 GV 卵と成熟 M I I 卵において、それぞれの試験結果は $25.42 \pm 8.68(\text{kPa})$ と $326 \pm 24(\text{分})$ 、及び 8.39

±3.81(kPa)と4.2±1.7(分)であり、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、弾性率及び溶解時間の変化が透明帯硬化ではそれぞれ2倍と106倍であるのに対し、透明帯軟化では3倍と78倍であり、透明帯硬化現象と軟化現象が異なる化学的变化による結果である可能性を示唆した。

(4) ヒト卵子 ZP 厚さと弾性率との関係について

ヒト卵子 ZP は、症例や個々の卵子で厚さに差を認める。また酵素を用いた ZP 溶解試験において、個々の卵子で溶解時間に差があると言われている。そこで、MTS を用いて弾性率を測定し、前核期胚における透明帯の厚さとヤング率の相関を検討した。

体外受精及び顕微授精 19 症例 20 周期 44 個の前核期胚について MTS を用いた測定をおこない弾性率を算出した。透明帯の厚さは、倒立顕微鏡の接眼レンズにマイクロメーターを用いて計測し算出した。前核期胚は透明帯の厚さにより 3 群に分類し、それぞれのヤング率を算出し比較検討した。なお本試験は、院内倫理委員会及び日本産科婦人科学会の承認を取得、十分なインフォームドコンセントの得られた後に行った。体外受精及び顕微授精で得られた前核期胚における透明帯の厚さ別弾性率は、(A 群) 15 μ m 未満 7.49±4.53kPa (n=12)、(B 群) 15 μ m 以上 17.5 μ m 未満 9.36±3.91kPa (n=20)、そして (C 群) 17.5 μ m 以上 15.86±7.72kPa (n=12) と透明帯が厚くなるに伴いヤング率が高くなる傾向が認められた。ZP が厚い前核期胚のヤング率は、ZP が薄いものに比べ、弾性率が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、今後アシステッドハッチングの適用可否かを判断する上で有効な指標になりうると思われた。

(5) ZP 複屈折率の測定

OctaxPolarAide を用いて卵子透明帯複屈折率による受精卵品質評価の可能性を検討した。乾マタニティクリニックにおいて採卵周期または凍結融解周期合わせて 136 周期の卵子の透明帯複屈折率測定を行った。まず、透明帯厚さと複屈折率の相関を求めた結果、透明帯の厚さが 15 マイクロメートル未満

(平均 14.0±0.89) の場合の複屈折率は平均 9.0±14.7 であり両者の相関係数が 0.07 であった。透明帯の厚さが 15 マイクロメートル以上 17 マイクロメートル未満 (平均 16.0±0.6) の場合、複屈折率は平均 16.0±17.9 であり、両者の相関係数が 0.01 であった。透明帯の厚さが 17 マイクロメートル以上 (平均 20.1±4.06) の場合、複屈折率は平均 18.8±20.4 であり、両者の相関係数が 0.05 であった。いずれの透明帯厚さにおいても両者に有意な相関が無く、複屈折率を評価するにあたり透明帯厚さを考慮に入れる必要性はネガティブな結果を得た。次に、正常受精になった 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をレトロスペクティブに検討した結果、正常受精群において複屈折率は 14.9±19.3 であり、非受精群において 11.9±16.1 であり、t 検定の結果両者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、複屈折率が増加した例が 26 例、減少した例が 21 例となり、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。

(6) MTS プローブの信頼性・安定性向上

PIEZOpus を用いて有限要素法を用いた振動解析により、圧電セラミック振動子全長 30mm に対し駆動電極寸法を長くするほど振動振幅が大きくなるが、駆動電極寸法を 8.75mm とした場合に検出電極に最大応答電圧が得られることが分かった。一方で、ガラス製接触子の長さを変化させることにより、得られる振動振幅が大幅に変化することが示され、同様に測定感度に直接影響する位相感度が変化することが示された。

同様の寸法にて圧電セラミック素子をアクリルパイプ内にシリコーンゴムを用いて完全包埋し、加えてリード線はマイクロコネクタを用いて直結しない方式を採用することにより、センサ特性の長期的ドリフト変化 1%以内を達成した。

(7) 低毒性、完全無血清の安全性の高いガラス化保存システムの開発

クライオナノホールガラス化コンテナはガラス化時の体積を約 10nl に極小化し冷却速度を速め、低濃度の凍結保護剤(CPA)でガ

ラス化保存が可能なコンテナで、射出整形法により作製した。先端から 0.5mm 間隔で円柱状 ($\phi \times H=250 \times 150 \mu m$ 、体積約 10nl) の貫通穴を 3 個持ち、胚はこの中で守られながらガラス化保存される。ガラス化液 (VS) は Hepes 修正完全無血清 I-medium(受精着床学会誌,25,23-26,2008)に 15%EG と 10%PLL のみを添加使用した。ガラス化マウス胚盤胞の生存性は回復培養後の形態により判定し、発育胚は品質評価のため構成総細胞数(TCN)をカウント、または移植し産仔への発育を確認、産仔生産率を比較した。マウス胚盤胞を用いた試験区(VS 中の総 CPA25%:EG 15%+PLL 10%)の生存率、発育率、平均総細胞数、産仔生産率、産仔正常率は、対照区 1 (VS 中の総 CPA 32%:EG 7.5%+DMSO 7.5%+Sucrose 0.5M(17%))、そして対照区 2 ((VS 中の総 CPA 47%:EG 15%+DMSO 15%+Sucrose 0.5M(17%))、北里 Vitri KIT)と同等の成績が得られた。ヒト胚盤胞 (Day5-6) を用いた予備試験においても 100% (n=10) の生存率と発育率が得られ、ガラス化保存によるダメージは認められなかった。クライオナノホールガラス化コンテナと PLL を組み合わせることにより DMSO と Sucrose free、完全無血清下で 15%EG と 10%PLL のみを添加した VS でマウス拡張期一脱出開始胚盤胞のガラス化保存が可能となった。低毒性で完全無血清の安全性の高いガラス化保存システム開発の扉を開き、ART の安全性と成功率向上に寄与する可能性が示唆された。

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(クライオナノホール)、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。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. 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 18 件)

① H. Inui, J. Mizuno, S. H. Hyon, K. Matsumura, E. Kikuchi, K. Noguchi, Y. Tanji, K. Akaishi, K. Anzai and Y. Murayama, Development of a Low Toxicity and Completely Serum-Free Vitrification System Combining a Cryo-Nano-Hole Vitrification Container with Antifreeze Polyamino-acid (Carboxylated Poly-L-Lysine) for ART, Human Reproduction, Journal of Reproduction Engineering, Vol.14, No.2, pp.19-28, 2011、査読有り

② Y. Murayama, K. Yoshida, H. Takahashi, J. Mizuno, K. Akaishi and H. Inui, Softening of the Mouse Zona Pellucida during Oocyte Maturation, IEEE Engineering in Medicine and Biology, 投稿中、査読有り

③ 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

④ 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

⑤ 水野仁二、乾裕昭、中村寛子、赤石一幸、安齋憲、菊池瑛子、渡邊百合、野口香里、村山嘉延、ART のための低毒性・完全無血清ガラス化保存システムの開発：クライオナノホールガラス化コンテナを用いたガラス化保存、日本受精着床学会雑誌、26(1),32-40,(2009)、査読有り

⑥ 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 5 件、査読有り)

[学会発表] (計 4 2 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 村山嘉延、水野仁二ほか、透明帯の弾性率変化を指標とした受精卵の品質診断法、第 18 回日本癌病態治療研究会、平成 21 年 6 月 18 日、コラッセ福島

③ 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

④ 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 3 6 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 嘉延 (MURAYAMA YOSHINOBU)

日本大学工学部・電気電子工学科・准教授

研究者番号：8 0 3 3 9 2 6 7