

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20122

研究課題名(和文) マウス受精卵における受精卵呼吸量測定装置を用いた呼吸量測定の安全性の検討

研究課題名(英文) Safety evaluation of the oxygen consumption rate measurement using newly developed Chip-sensing Embryo Respiration Measuring system: CERMs in mouse model

研究代表者

志賀 尚美 (SHIGA, Naomi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20595558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当施設で開発した受精卵呼吸量測定装置(CERMs)の安全性を検証するため、呼吸量測定胚の胚移植を行い、妊孕性を持つ産仔を獲得することができた。次に胚呼吸量と胚の生存性を規定する分子生物学的パラメーターとの相関を検証した。ヒト胚盤胞の大きさに準じた集合キメラ胚を用いた検討では、ATP量、細胞数ともに呼吸量との相関を認めしたが、ミトコンドリア遺伝子コピー数との相関は認めなかった。最後に呼吸量測定胚の移植により着床率と流産率の関係を調べたが、マウスモデルにおける相関は認められなかった。

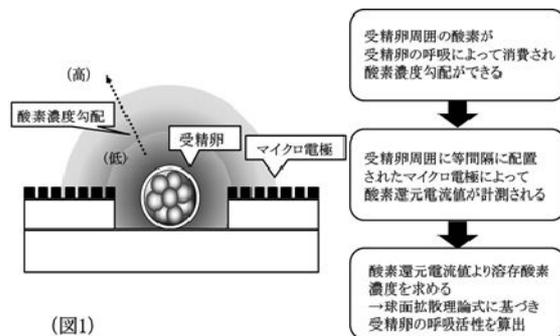
研究成果の概要(英文)：In order to verify safety of the oxygen consumption rate measurement using CERMs, we conducted the oxygen consumption rate measurement of mouse embryos followed by embryo transfer. Fetuses with confirmed their fertility was recovered. Thus, measurement procedure by CERMs did not compromise full-term development of mouse embryos and their future fertility. Next, the correlation between oxygen consumption rate and the molecular biological parameters defining embryo viability was examined. In mouse model for CERMs, aggregated chimeric mouse blastocysts, mimicking human embryo, were utilized. The oxygen consumption rate measured by CERMs was statistically correlated with both the number of cells and the ATP contents, but not with MtDNA copy number. Finally, we transferred the embryos measured using CERMs and examined the relationship between the oxygen consumption rate of the embryo and both the implantation rate and miscarriage rate. However, no statistical correlation was found.

研究分野：産婦人科学

キーワード：不妊治療 体外受精 受精卵質評価 受精卵呼吸量測定装置

1. 研究開始当初の背景

近年の晩婚化とそれに伴う挙児希望年齢の上昇により生殖補助医療の需要は急増している。一方、生殖補助医療における多胎妊娠によって母体合併症、未熟児の増加が問題となっている。そのため、2008年4月に日本産婦人科学会より、原則単一胚(受精卵)を移植することが提唱された。また、2013年8月には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た。このような背景から、今後は着床能の高い良質な受精卵を選定し妊娠率を向上させることが一層強く求められる。しかし、現在の標準的な受精卵評価法は形態学的評価のみで主観性が強く、観察者間で結果に差が生じる可能性が高い。そこで客観的な受精卵の評価法として、受精卵の呼吸量評価が試みられ、呼吸量と受精卵の質に相関があることが数多く報告されてきた。受精卵呼吸測定装置の原理を以下に示す。培養液中に静置された受精卵が呼吸をすることによって周囲の培養液中の溶存酸素が減少し、受精卵近傍と遠方の溶存酸素に濃度勾配が生じる。その濃度勾配を酸素還元電流を検出するマイクロ電極を用いて計測し、球面拡散理論式に基づいて受精卵呼吸量を算出する(図1)。



しかしながら、既存機器として細胞呼吸測定装置(製品名CRAS1.0)が市場に販売されているが、測定手技の獲得に多大な時間がかかる欠点があり標準診療にはなっていない。そのため当施設では操作性の簡便化・自動化、測定精度の向上を目的としてチップ型センサーを用いた新たな受精卵呼吸量測定装置(以下、本機器 Chip-sensing Embryo Respiration Measuring system: CERMs)を開発した。先行研究としてヒト余剰卵を用いて受精卵呼吸量装置の安全性と有用性を検討するため、平成24年度に厚生労働科学研究費補助金の交付を受け、装置の開発と有用性の検討を行った(「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」(H24-被災地域-指定-016))。検討の結果、ヒト受精卵の客観的質評価法として新規受精卵呼吸量装置が有用であることが確認され、平成26年度で機器開発研究(厚生労働科学研究費補助金)は終

了予定である。

生殖補助医療分野において、今まで体外受精、顕微授精、受精卵の凍結融解などの技術が急速に開発され世界中で大きな成果を上げている。しかし、技術の安全性についてヒトで証明することに限界があり、慎重に取り扱うことを前提に普及してきた背景がある。当施設の受精卵呼吸量測定装置についても、厚生労働省から「今までの生殖補助医療技術と同様の扱いで薬事承認は不要だが、慎重に取り扱うこと」との言明があった。よって今後は、なし得る安全性を確認しながら慎重にヒト受精卵への臨床応用を進めていく予定である。

2. 研究の目的

本研究では受精卵呼吸量測定装置の安全性をマウスモデルにて検討し、ヒトにおける安全性を予測することを目的とする。またマウスモデルを用いて、胚呼吸量と胚のViabilityを規定する分子生物学的パラメーターとの相関を検証するためにATP定量、細胞数やミトコンドリア遺伝子コピー数の検討を行う。細胞呼吸との関連性が示唆されるパラメーターとの相関が明らかとなれば、非侵襲的に分子生物学的パラメーターを評価可能になる。これは、今後の培養環境の開発や配偶子操作による治療効果の評価に大きく貢献すると考えられる。最後に、臨床応用における胚呼吸量測定の有用性を検証すべく、胚呼吸量と着床や流産との関連を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本機器の使用に際しての生後の健全性に関する検討
最初に、本機器の安全性を検証するため、胚移植により得られた産子の正常性を検討した。マウスを体外受精させ受精卵を獲得し、胚盤胞期に本機器で胚呼吸量を計測した。続いて、偽妊娠レシピエントマウス(ICR雌マウス)に胚を移植した。

(2) マウス受精卵呼吸量と分子生物学的パラメーターとの相関に関する検討

受精卵胚呼吸量と細胞数に関する検討
これまでに胚盤胞における細胞数が妊娠率と相関する報告されている。実際、臨床で行われているヒト胚盤胞の形態学的評価は体細胞に寄与する内細胞塊と胎盤に寄与する栄養外胚葉の細胞量を簡易的に評価している。そこで、胚の質や生存性の指標として、細胞数と胚呼吸量との相関を検討した。胚盤胞期胚の呼吸量を測定したのちに4%PFA固定を行い、内細胞塊(ICM)をNANOG抗体、全細胞核をDAPIにて染色し細胞数カウントを行なった。

受精卵胚呼吸量とATP量に関する検討
次に、胚呼吸量と相関する指標の候補とし

て ATP 量の測定を行なった。
本機器において受精卵胚呼吸量と ATP 量の相
関関係を確認すべく、3.5dpc における胚盤胞
到達胚の呼吸量を測定し、その後 ATP 測定試
薬によるルシフェラーゼ発光法で測定した。

(3) マウス集合キメラ胚作成

ヒト胚盤胞に準じた大きさのマウス胚盤胞
を得るため。マウス 2 細胞期胚を 2 個集合す
ることによる集合キメラ胚を作成した(図 2)。

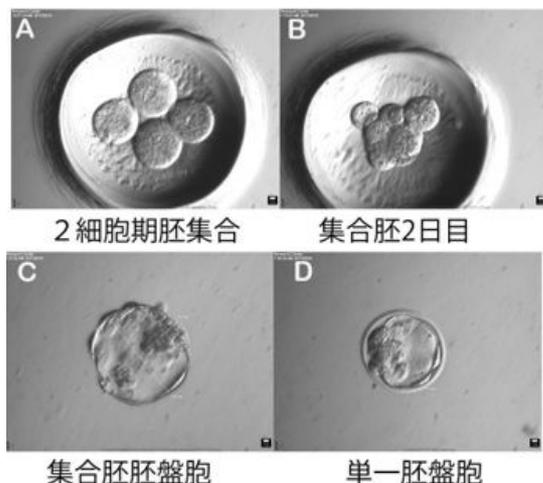


図 2 マウス集合キメラ胚作成及び、キメラ胚
胚盤胞と単一胚由来胚盤胞

A、マウス 2 細胞期胚 2 個 (1dpc) の透明帯
を除去し、Aggregation needle にて作成した
チャンバーへ静置。B、2 胚の集合を確認
(2dpc)。C、マウス集合胚胚盤胞 (3.5dpc)。
D、マウス単一胚胚盤胞 (3.5dpc)

(4) マウスキメラ集合胚における受精卵呼 吸量と分子生物学的パラメーターとの相関 に関する検討

マウスキメラ集合胚についても (2) と同様
に、胚呼吸量と細胞数に関する検討 胚呼
吸量と ATP 量に関する検討
を行った。

(5) 胚呼吸量とミトコンドリア遺伝子コピ ー数の検討

集合キメラ胚の胚盤胞期で胚呼吸量を測定
後、REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen) を用
いて全ゲノム増幅 (WGA) にて核、ミトコンド
リア遺伝子の増幅を行って、Mouse
Mitochondrial DNA copy number kit (Detroit
R&D) を用いミトコンドリア遺伝子コピー数
解析を行った。

(6) 集合胚における胚呼吸量と着床数、流 産数の検討

各移植周期において約 30 個の集合胚胚盤胞
を作成。3.5dpc 集合胚胚盤胞を胚呼吸量測定
と大きさの計測を行ったのち、それぞれ胚呼

吸量と従来方としての形態評価 (大きさ) で
群わけを行った。移植では個々の胚を評価す
ることは不可能であるため、群わけを行った。
胚呼吸量で移植を行う実験では呼吸量の
高い群 (呼吸量が高い方から 10 個) と低い群
(低い方から 10 個) をそれぞれ 2.5dpc 偽
妊娠 ICR 雌マウスの左右の子宮へ移植を行
った。形態評価に基づいた移植実験では良好
(大きい方から 10 個) と不良 (小さい方
から 10 個) を呼吸量も測定したのちにそれ
ぞれ 2.5dpc 偽妊娠 ICR 雌マウスの左右の子宮
へ移植を行った。レシピエント雌マウスは
12.5dpc で開腹し、子宮内の着床数と胎児数
を検討した。

4. 研究成果

(1) 本機器の使用に際しての生後の健全性 に関する検討

2016 年度にレシピエント 2 匹から合計 3 匹の
出産を確認できたが、いずれも確認時死亡に
て正確な産仔の評価ができていなかった。
2017 年度は 1 匹に移植する胚の数を増やす
ことによって、レシピエント 1 匹から 6 匹の生
仔を獲得し (図 3) 8 匹の第 2 代を獲得した。
これらの生仔において外表奇形や行動異常
は見られなかったことから、現時点では受精
卵呼吸量測定装置使用による胚の発育や産
仔の生殖能力への悪影響はないと考えてい
る。



図 3 レシピエントマウスと産仔

(2) マウス受精卵呼吸量と分子生物学的パ ラメーターとの相関に関する検討

受精卵胚呼吸量と細胞数に関する検討

NANOG 抗体 (ICM) と DAPI (全細胞) による
免疫組織化学染色の結果を図 4 に示す。
NANOG 抗体によって染色される ICM 細胞を明
瞭に描出可能であった。呼吸量による群分け
は、測定胚 30 個の呼吸量 (胚呼吸量平均
 $5.59\text{fmol/s} \pm 1.66$) より A 群を $+1/2\text{SD}$ (呼吸
量 $>6.42\text{fmol/s}$, $n=9$) より大きいもの、B 群を
 $+1/2\text{SD}$ 以上 $-1/2\text{SD}$ 以下のもの (呼吸量
 $6.41\text{--}4.77\text{fmol/s}$, $n=15$)、C 群を $-1/2\text{SD}$ 未満
(呼吸量 $<4.76\text{fmol/s}$, $n=5$) とした。呼吸量
の高い胚において全細胞数が多い傾向は認
めるものの、内細胞塊数、全細胞数ともに有
意差を認めなかった (図 5)。また、内細胞塊
数、全細胞数ともに、呼吸量との相関も認め
なかった (Kruskal-Wallis 検定)。

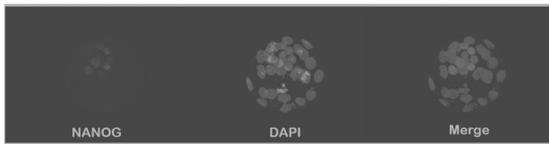


図4 NANOG抗体とDAPI染色による免疫組織化学(赤: NANOG陽性内細胞塊(ICM)、青: DAPI陽性全細胞核)

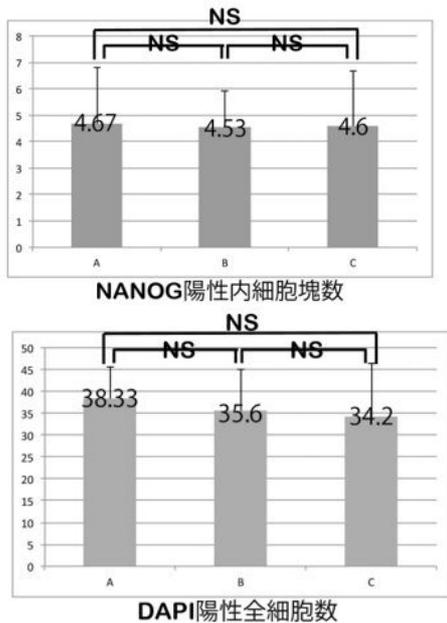


図5 胚呼吸量と細胞数

受精卵胚呼吸量とATP量に関する検討
合計56個のマウス胚盤胞に対して呼吸量測定後に個々のATP測定を行った。呼吸量平均は $4.81 \pm 2.17 \text{ fmol/s}$ でATP量の平均値は $3.01 \pm 0.87 \text{ nM/胚}$ であった。胚呼吸量とATP量には明らかな相関を認めない結果であった(図6)

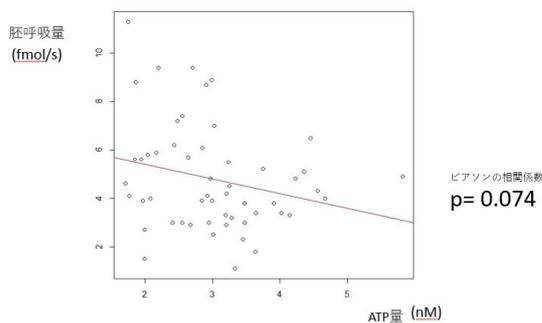


図6 胚呼吸量とATP量

(3) マウス集合キメラ胚作成
(1)(2)の結果よりヒト胚盤胞に比して細胞数もサイズも小さいマウス胚はCERMsのチップによる測定には適していないと考えた。そこで、マウス2細胞期胚を2個集合す

ることによる集合キメラ胚を作成し、通常より大きな胚盤胞を作成して再度検討を行った(図2)。IVF5周期行い、112個の2細胞期胚から39個の集合キメラ胚の胚盤胞を獲得した。うち、15個の集合キメラ胚と、同一の周期で単一胚による胚盤胞($n=18$)も作成して対照群とした。

大きさを、(長径+短径)/2とし、大きさを計測した。結果を表1に示す。集合キメラ胚胚盤胞の表面積平均は $7.00 \pm 1.88 \mu\text{m}^2$ 、呼吸量平均は $7.77 \pm 3.12 \text{ fmol/s}$ でATP量の平均値は $5.83 \pm 1.45 \text{ nM/胚}$ であり、いずれも統計学的有意差を認めた。

胚盤胞	N	表面積 ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	胚呼吸量 (fmol/s)	ATP量 (nM/胚)
単一胚胚盤胞 (対照)	18	$5.38 \pm 1.56^*$	$3.97 \pm 1.60^*$	$3.01 \pm 0.84^*$
キメラ胚胚盤胞	15	$7.00 \pm 1.88^*$	$7.77 \pm 3.12^*$	$5.83 \pm 1.45^*$

表1 単一胚胚盤胞とキメラ胚胚盤胞における、表面積、胚呼吸量、ATP量

*全て統計学的有意差あり(t検定 <0.05)

(4) マウスキメラ集合胚における受精卵呼吸量と分子生物学的パラメーターとの相関に関する検討

胚呼吸量と細胞数に関する検討

24個の集合キメラ胚について胚呼吸量と全細胞数および内細胞塊細胞数との関係をみた。

胚呼吸量とDAPI陽性全細胞数には相関係数 $R=0.549$ と相関がみられた(図7)。

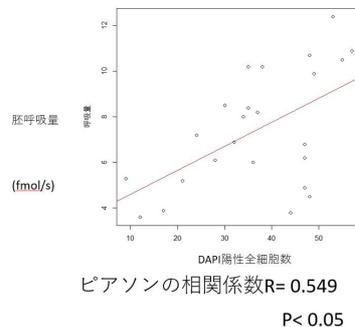


図7 胚呼吸量とDAPI陽性全細胞数

胚呼吸量とNANOG陽性内細胞塊数には有意な相関はみられなかったが、胚呼吸量の多い胚は、内細胞塊数が多い傾向にあった(図8)。

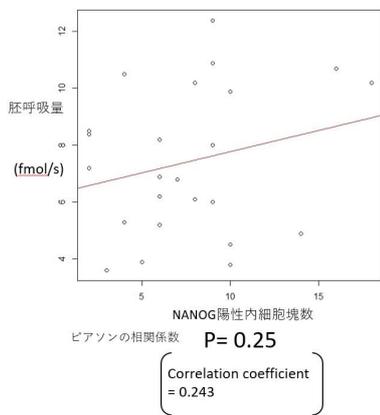


図8 胚呼吸量と NANOG 陽性内細胞塊数

胚呼吸量と ATP 量に関する検討

15 個の集合キメラ胚について胚呼吸量と ATP 量との関係を見た。呼吸量平均は 7.77 ± 3.02 fmol/s で ATP 量の平均値は 5.82 ± 1.40 nM/胚で、胚呼吸量と ATP 量に相関係数 $R=0.533$ の有意な相関を見た (図 9)。

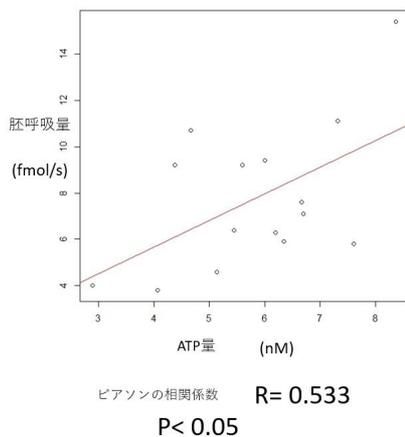


図9 胚呼吸量と ATP 量

(5) 胚呼吸量とミトコンドリア遺伝子コピー数の検討

ミトコンドリア DNA 量と胚呼吸量には有意な相関はみられなかった。近年ヒト胚においてもミトコンドリアコピー数の増加は発育不良胚の予想因子となることが報告されており、これまでコピー数が多いほうが良好胚であると考えられていた見解が一転している。マウスにおいても呼吸量とコピー数の相関はみとめられず、前述のヒト胚の報告を指示する結果であった。

以上より、本機器による受精卵質評価の安全性を検証するための胚移植から産子の獲得は一定の成果を得た。また、キメラ集合胚を用いることによって胚の呼吸量と ATP、細胞数の相関が得られたことより、本機器による

胚呼吸量測定は胚の Viability を反映すると考えられた。しかしながら、胚のサイズ、胚の呼吸量がヒト胚と類似している必要があると考えられた。

(6) 集合胚における胚呼吸量と着床数、流産数の検討

最後に、胚呼吸量と妊娠予後との相関を検証するため、胚呼吸量測定後の胚を偽妊娠 ICR マウスへ胚移植し、12.5dpc で開腹。胎児を形成している数と着床痕のみ (流産) の数を検証した (図 10)。

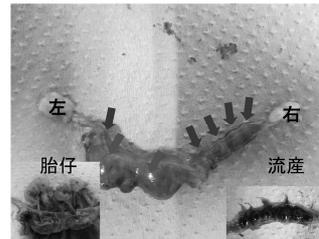


図10 12.5dpc で開腹した胚移植後の子宮

本研究では、それぞれ 8 回と 5 回の胚移植を呼吸量と形態評価に基づいて合計 13 回行った。そのうち両側の子宮の一つでも着床が認められる 4 回ずつを解析対象とした。胚呼吸量に基づいて胚移植を行った場合、呼吸量が高い群 (移植胚 40 個) と低い群 (移植胚 40 個) の平均の胚呼吸量はそれぞれ 13.52 ± 1.2 fmol/s と 7.18 ± 0.6 fmol/s であった。呼吸量が高い群と低い群の着床率、流産率でそれぞれ 62.5% (25/40) と 65% (26/40) であり、68% (17/25)、34.6% (9/26) と着床は同等で、流産がやや呼吸量が高い群に多かったが統計学的には有意差は無かった。一方、形態評価 (大きさ) による分類では、大きい群と小さい群の胚呼吸量はそれぞれ 11.99 ± 4.2 fmol/s と 9.09 ± 1.3 fmol/s であり、両群間に差はなかった。形態評価において、大きい群と小さい群の着床率、流産率でそれぞれ 67.5% (27/40) と 65% (26/40) であり、44.4% (12/27)、50.0% (13/26) と両群に差は認めなかった。

今回の検討では胚呼吸量と着床率、流産率といった *In vivo* での胚の Viability との相関は認めなかった。しかしながら、同様に形態における評価も妊娠転帰を予測できず、マウスにおいては胚盤胞に至った胚は一定の *In vivo* 発育能を有すると考えられる。実際、マウスにおいては胚盤胞の評価は一般的ではなく、特に確立した形態学的評価に基づいたグレーディングなども存在しない。

本研究成果をまとめると、マウスモデルをもちいて受精卵胚呼吸装置 (CERMs) 使用児の安全性を検証し、呼吸量と胚の Viability を反映する分子生物学的パラメーターとの相関を検証した。CERMs による測定胚は妊孕性を持つ正常な産仔に帰着できることが確認され、測定作業や測定培養液への暴露によ

る懸念についての安全性に対する一定の回答を得ることができた。CERMs では、ヒト胚サイズの胚、ヒト胚に近い呼吸量を持つ胚であれば測定が可能であり、今回のマウスモデルにおいては集合胚を作成することによって種々の検討を行うことが可能であった。安全性が担保され、細胞数、ATP 量などの胚の Viability と関連する分子生物学的パラメーターと関連していたことから、今後はヒト胚における臨床研究として移植前の胚呼吸量測定によって、その有用性を検証する必要があると思われる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

久野貴司

A trial to predict blastocyst development of human embryos by Chip-sensing Embryo Respiratory Monitoring System.

The 33rd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology ESHRE2017

2017年7月3-5日、ジュネーブ(スイス)

〔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〕

ホームページ等

http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/patient/rep_research.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志賀 尚美 (SHIGA, Naomi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 20595558

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

立花 眞仁 (TACHIBANA, Masahito)

黒澤 大樹 (KUROSAWA, Hiroki)

久野 貴司 (KUNO, Takashi)

藤峯 絢子 (FUJIMINE, Ayako)