

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17380164

研究課題名（和文）電気化学的イメージングによる家畜生殖細胞の機能評価と応用

研究課題名（英文）The development of methods for evaluating embryo quality based on the electrochemical measuring technique

研究代表者

阿部 宏之（ABE HIROYUKI）

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：10375199

研究成果の概要：

本研究では、電気化学的イメージング技術を基盤とする細胞呼吸計測システムを開発し、これを応用した受精卵品質評価法の開発を目的とした。走査型電気化学顕微鏡をベースに、非侵襲的・高感度で家畜胚や卵子の呼吸量を測定できる「細胞呼吸計測システム」の開発に成功した。この計測システムを用い、呼吸活性を指標に品質の高い家畜受精卵を選別できる新しい評価法を確立した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,300,000	0	6,300,000
2006年度	4,200,000	0	4,200,000
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	15,000,000	1,350,000	16,350,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：電気化学計測、細胞機能評価、細胞呼吸、ミトコンドリア、体外受精

1. 研究開始当初の背景

卵子や受精卵の品質（クオリティー）は、胚の発生率や妊娠率に大きく影響することから、受精卵移植の成功率を向上させるためには厳密な品質評価法の開発が不可欠である。従来、受精卵の品質は形態的特徴を指標に評価されてきたが、この方法は主観的であり受精卵の厳密な品質評価は困難であった。これまでに研究代表者らは、電子顕微鏡を用いた詳細な微細形態観察により、胚の品質とミトコンドリア呼吸機能が密接に関係していることを発見していた。そこで注目したの

が、細胞の呼吸活性を非侵襲的に測定できる電気化学的計測（イメージング）技術である。

電気化学的イメージング法は、生物活動によって生じる電気化学的現象をマイクロ電極によりモニタリングする技術である。これまでの研究により、酸素の還元電位を検出するマイクロ電極をプローブとした走査型電気化学顕微鏡を用いることで、植物細胞や動物培養細胞の呼吸活性のイメージングに成功している。これらの研究から、呼吸活性を指標に細胞の機能や受精卵の品質を評価するという独創的システムを提案している。

2. 研究の目的

本研究では、電気化学的イメージング技術を応用し、卵子や胚など生殖細胞の機能解析や品質の評価を目的とした細胞呼吸活性測定システムの開発を目的とした。具体的には、ウシなどの家畜を研究材料に、卵子及び胚の呼吸活性を非侵襲的に計測できる要素技術を開発し、生殖細胞の呼吸活性を容易に測定できる装置を開発し、細胞呼吸活性を指標とする生殖細胞品質評価システムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロ電極をセンサプローブに用いる走査型電気化学顕微鏡(SECM)を基盤に、家畜受精卵の酸素消費量(呼吸量)を非侵襲的に計測できる「細胞呼吸計測装置」の開発を行った。呼吸計測の要素技術として、マイクロ電極作製技術と細胞呼吸計測専用の測定液の開発を行った。また、卵子や受精卵など球状試料の呼吸計測に特化した多検体測定プレートと酸素消費量を算出するための球面拡散理論式に基づく呼吸解析アルゴリズムの構築を行った。これら要素技術をシステム化し、卵子や受精卵の呼吸計測に特化したシステムの開発を行った。

(2)(1)で製作した呼吸測定システムを用いてウシ胚の呼吸量を測定し、呼吸計測システムの性能を評価した。侵襲性の有無を調べるために、受精卵培養試験とミトコンドリアの微細構造観察を行った。

(3)「細胞呼吸計測システム」を応用した家畜生殖細胞品質評価システムを構築するために、呼吸測定したウシ胚の培養試験と移植試験を実施し、呼吸活性と胚発生能及び妊娠率の関係を調べた。

4. 研究成果

(1)細胞呼吸計測システムの開発：

- ・ 単一胚の呼吸計測を目的にマイクロ電極の感度向上を試みた結果、酸素の還元条件下-0.6V、計測レンジ 1 nA、電流値-0.2 ~ -1.0 nA の計測感度を有する白金電極研磨技術を確立した。安定した呼吸計測を可能とするディスク型マイクロ電極の作成に成功した(図1)。



図1.単一胚の呼吸計測を可能とする超高感度ディスク型マイクロ電極。

- ・ 非侵襲呼吸計測を実現するための測定を検討した。胚培養用の TCM199 培地と HTF 培地を用いて、マイクロ電極によるウシ胚の呼吸測定を行った結果、培養液の種類によりマイクロ電極の計測感度が異なることが示された。特に、組成が比較的単純な HTF 培地が高感度計測に適することが明らかになった。
- ・ 卵子や受精卵の呼吸計測に特化した多検体測定プレート(図2)を考案した。これは、ポリスチレン製プレートの底面に逆円錐形のマイクロウェルが施されており、各ウェルに1個の胚や卵子を導入することで、最大6個の試料の呼吸量を連続して測定することができる。これにより、測定時間の大幅な短縮と測定操作の簡便化が可能となった。

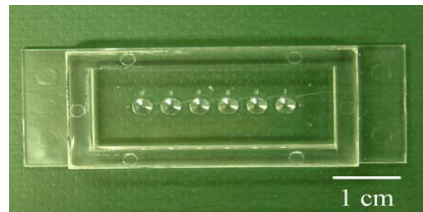


図2.連続して最大6個の試料の呼吸量を測定できる多検体測定プレート。

- ・ 球状試料の酸素消費量を算出するために球面拡散理論式に基づく呼吸解析アルゴリズムを構築した。さらに、多検体測定プレートにも適用できる呼吸解析ソフトの開発に成功した(図3)。

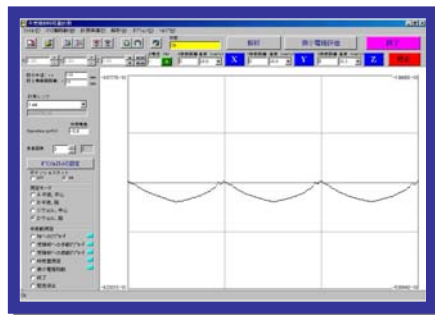


図3.短時間(1分以内)で細胞の呼吸活性値を算出できる呼吸解析ソフト。

- ・ 胚や卵子の酸素消費量(呼吸)を安定して計測できるマイクロ電極、専用計測液、多検体測定プレート、呼吸解析ソフトなどの要素技術と走査型電気化学顕微鏡を統合した「細胞呼吸計測システム」を開発した(図4)。

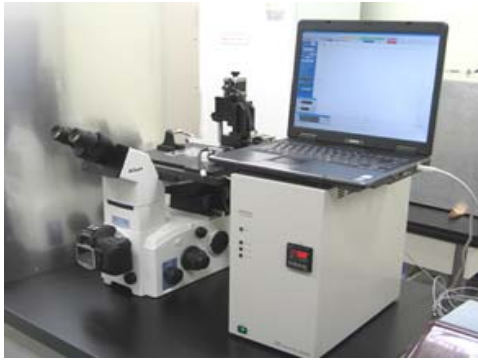


図4. 走査型電気化学顕微鏡と高感度マイクロ電極等の要素技術を集積して開発した「細胞呼吸計測システム」。

(2)細胞呼吸計測システムの性能評価：「細胞呼吸計測システム」を用いて、受精直後から胚盤胞に至る発生過程における呼吸量を測定した。その結果、桑実胚期から胚盤胞期にかけて顕著な呼吸量の増加が測定された(図5)。電子顕微鏡を用いて胚の微細構造を解析した結果、呼吸活性の低い8細胞期まではほとんどのミトコンドリアは未成熟であるが、呼吸活性が上昇する桑実胚期から胚盤胞期にかけてミトコンドリアの顕著な発達(クリステの拡張)が認められた(図6)。呼吸量の増加とミトコンドリアの発達が一致したことから、呼吸能解析における呼吸計測システムの有効性が示された。

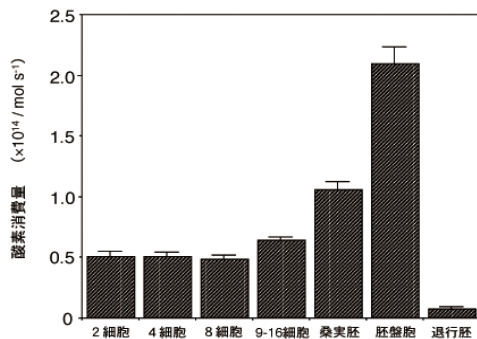


図5. 「細胞呼吸計測システム」で測定したウシ胚の発生過程における呼吸量変化。桑実胚から胚盤胞期にかけて呼吸量が増加する。退行胚ではほとんど呼吸量は検出されない。

呼吸測定操作によるウシ胚への侵襲性の有無を調べるために、呼吸測定した胚の追加培養試験を行った。その結果、呼吸計測した胚のほとんどは正常に発生したことから、「細胞呼吸計測システム」による呼吸計測は非侵襲的であることが示された。

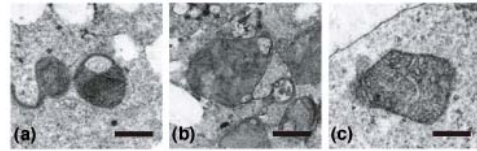


図6. ウシ体外受精胚の発生過程におけるミトコンドリアの微細構造変化。(a)：8細胞期胚、(b)：桑実胚、(c)：胚盤胞。

(3) 受精卵品質評価システムの構築：「細胞呼吸計測システム」を用いて呼吸測定したウシ胚(桑実胚)を追加培養し、移植可能である胚盤胞への発生率を解析した。その結果、呼吸活性の高い胚は良好な胚盤胞へ発生する確率が高いことが判った。さらに、呼吸量測定後のウシ胚を借腹牛に移植し、胚の呼吸能と受胎率の関係を調べた結果、基準値以上の呼吸量(胚盤胞： $1.0 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、初期胚盤胞： $0.8 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、桑実胚： $0.5 \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$)の胚を移植した場合、60%以上の高い妊娠率が得られた(表1)。一方、基準値以下の胚の移植ではほとんど受胎例は認められなかった。このように、呼吸量測定は胚の品質評価法として有効であり、「細胞呼吸計測システム」を用いることで効率良く高品質胚の選択が可能であることが示された。

表1. ウシ胚の酸素消費量(呼吸量： $\times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)と妊娠率の関係

移植時発生 ステージ	呼吸量	受胎胚数/移植胚数 (妊娠率%)
胚盤胞	$F \geq 1.0$	21/36 (58.3)
	$F < 1.0$	0/6 (0)
初期胚盤胞	$F \geq 0.8$	16/25 (64.0)
	$F < 0.8$	0/6 (0)
桑実胚	$F \geq 0.5$	17/28 (60.7)
	$F < 0.5$	1/12 (8.3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計29件)

Abe H., Hoshi H. Morphometric and ultrastructural changes in ciliated cells of the oviductal epithelium in prolific Chinese Meishan and Large White pigs during the estrous cycle. *Reprod Domest Anim*, 43: 66-73, 2008. (査読有)

Yokoo M., Kimura N., Abe H., Sato E. Influence of hyaluronan accumulation during cumulus expansion on in vitro porcine oocyte maturation. *Zygote*, 16: 309-314, 2008. (査読有)

Nashimoto Y., Takahashi Y., Yamakawa T., Torisawa Y., Yasukawa T., Ito-Sasaki T., Yokoo M., Abe H., Shiku H., Kambara H., Matsue T. Analysis of mRNA from single adherent cells and spheroids collected using fast electrical lysis. Anal. Chem., 79: 6823-6830, 2007. (査読有)

Hirobe T., Abe H., Wakamatsu K., Ito S., Kawa Y., Soma Y., Mizoguchi M. Excess tyrosine rescues the reduced activity of proliferation and differentiation of cultured recessive yellow melanocytes derived from neonatal mouse epidermis. Eur J Cell Biol, 86: 315-330, 2007. (査読有)

Abe H., Hoshi H. Regional and cyclic variations in the ultrastructural features of secretory cells in the oviductal epithelium of the Chinese Meishan pig. Reprod Domest Anim, 42: 292-298, 2007. (査読有)

Wu C.-C., Saito T., Yasukawa T., Shiku H., Abe H., Hoshi H., Matsue T. A microfluidic chip integrated with amperometric detector array for *in situ* estimating oxygen consumption characteristics of single bovine embryo. Sens Actuat B, 125: 680-687, 2007. (査読有)

Saito T., Wu C.-C., Shiku H., Yasukawa T., Yokoo M., Sasaki T., Abe H., Hoshi H., Matsue T. Oxygen consumption of cell suspension in a poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchannel estimated by scanning electrochemical microscopy. Analyst, 131: 1006-1011, 2006. (査読有)

〔学会発表〕(計158件)

国際

Abe H "Evaluating the quality of single human embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of respiration activity by scanning electrochemical microscopy", The 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell-Analysis, 2008/9.11, Zurich, Switzerland (invited)

Abe H "Estimation of respiratory activity of single human embryos by scanning electrochemical microscopy". The 5th International Forum on Post-genome Technologies, 2007/10.11, Suzhou, China (invited)

Abe H "Non-invasive quality assessment of IVP embryos", Post Conference Satellite Symposium, The 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2007/1.10, Kyoto, Japan (invited)

国内

阿部宏之「呼吸代謝能解析による卵子・胚の品質評価と応用」, 第25回日本受精着床学会、2007年8月、仙台国際センター(招待講演)

阿部宏之「電気化学計測法による卵子呼吸能解析とクオリティー評価への応用」, 第52回日本生殖医学会、2007年10月、秋田県民会館(招待講演)

阿部宏之「新しい培養評価法 受精卵呼吸能解析による培養液の性能評価について」, 第49回日本哺乳動物卵子学会、2008年5月、名古屋国際会議場(招待講演)

〔図書〕(計5件)

阿部宏之(2007)「マイクロ電極を用いた受精卵呼吸測定」, 動物実験代替のためのバイオマテリアル開発、シーエムシー出版、pp. 269-276

阿部宏之(2007)「胚の呼吸能の測定、図説よくわかる臨床不妊症学入門・生殖補助医療編」, 中外医学社、pp. 50-59

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 哺乳動物受精卵の呼吸活性測定方法及びその電気化学デバイス

発明者: 珠玖仁、末永智一、高野真一郎、伊達安基、齋藤剛史、横尾正樹、伊藤隆広、阿部宏之

権利者: クリノ(株)、東北大学、山形大学

番号: 特願2008-293117

出願年月日: 2008年11月15日

国内外の別: 国内

〔その他〕

新聞記事

2007年11月22日 朝日新聞「不妊治療で元気な受精卵選別」

2009年1月15日 山形新聞「元気な受精卵は呼吸が活発・不妊治療の成績向上に期待」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 宏之 (ABE HIROYUKI)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 10375199

(2) 研究分担者

珠玖 仁 (HITOSHI SHIKU)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授

研究者番号: 10361164

横尾 正樹 (YOKOO MASAKI)

東北大学・未来医工学治療開発センター・

助教

研究者番号: 10396541