

論文内容要旨 (和文)

平成 22年度入学 博士後期課程

専攻名 バイオ工学

氏 名 熊迫 陽子



論文題目 電気化学計測技術を応用した受精卵評価法の開発と
不妊治療における実用化研究

我が国では、年々晩婚化が進み、それに伴い不妊症の患者も増加している。不妊治療では、体外受精-胚移植 (IVF-ET) が最も有効な治療法の一つとして普及しているが、この治療による成功率は約 20%程度と低迷している。この原因として、治療に用いる受精卵 (胚) の評価・選別の精度に問題があると考えられている。現在、治療に用いる胚は割球 (細胞) の形態や数などの形態的特徴を基準に選別されている。形態観察による評価は、簡単・迅速で無侵襲的な方法であることから、世界的にも普及している品質評価法である。しかし一方で、評価の基準となる胚の形態的特徴は定量性に欠けるため、判定結果が観察者の主観に左右される可能性がある。胚の品質は妊娠の成立に深く関与していることから、精度の高い胚品質評価技術の開発は、不妊治療成績の向上に不可欠である。最近、客観的指標としてミトコンドリアの呼吸機能に着目した受精卵品質評価法の開発が試みられている。そこで本研究では、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸活性を指標とするヒト胚評価法の開発を試みるとともに、不妊治療における新しい胚評価法の臨床的有用性を検証した。

電気化学計測技術は、プローブ電極による酸化還元反応を利用し、局所領域における生物反応を電気化学的に検出することができる。例えば、酸素の還元電位を検出するマイクロ電極をプローブに用いる走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、細胞の酸素消費量 (呼吸) を高感度・非侵襲的にリアルタイムで測定することができる。本研究では、(1) SECM を用いたヒト胚におけるミトコンドリア呼吸機能の解析、(2) 細胞呼吸活性を指標とするヒト胚品質評価法の開発、(3) 不妊治療における胚評価法の臨床的有用性の検討を行った。

まず、SECM によるヒト胚のミトコンドリア機能解析の有効性を検証するために、体外受精卵の発生過程における呼吸量変化を調べた。受精後の各発生ステージにおける胚の呼吸量を SECM により測定した結果、胚盤胞まで正常に発生した胚では受精 4 日目 (Day 4) の桑実胚のステージにおいて呼吸量が一旦低下した後、Day 5 以降の胚盤胞期において顕著に増加することがわかった。一方、胚盤胞に発生しなかった胚では、桑実胚期から胚盤胞期にかけて呼吸量の増加は認められなかった。胚盤胞に発生した胚においてミトコンドリアの微細構造を調べた結果、桑実胚から胚盤胞にかけて顕著なクリステの発達が観察された。さらに、胚の呼吸量と活性型ミトコンドリアの局在及び ATP 含量の関係を調べた結果、呼吸活性が高い胚では活性型ミトコンドリアが核周辺部に多く存在し、ATP 含量も高い傾向があった。これらの結果から、SECM はヒト胚のミトコンドリア呼吸機能を高精度で解析できる有効な技術であることが示された。

次に、SECM による呼吸測定の有効性と安全性を検証するために、受精 3 日目 (Day 3) に SECM を用いて呼吸量を測定した胚の培養試験を行った。その結果、呼吸量が $0.26 \sim 0.56 \times 10^{-14} \text{mol/s}$ の呼吸量を示す胚は胚盤胞への発生率が高く、呼吸量を指標とする客観的な品質評価が可能であることが示された。さらに、受精 5~6 日目の胚盤胞の呼吸量を測定し、凍結・融解した後の胚の回復状態を観

察した結果、凍結前に呼吸量が高い胚は、融解後、胞胚腔の再拡張が起こり回復培養による発生が良好であることがわかった。これらの結果から、SECMによる呼吸量測定は、初期胚においては割球数などの形態的指標とは異なる基準で発生能など胚の品質を評価できること、胚盤胞期においては耐凍能が高い品質良好胚を効率的に選択できる有効な方法であることが示された。

最後に、所定の倫理承認を得た後、SECMを用いた胚評価の臨床的有用性を検証した。不妊治療では通常、受精3日目（Day 3）あるいは5日目（Day 5）の胚を移植する。Day 5胚は比較的容易に形態観察による評価ができるが、Day 3胚は形態観察による品質評価は困難な場合が多い。そこで、形態評価が全く同様であるDay 3胚が複数個得られた症例において、SECMにより呼吸量を測定した胚を移植した場合の治療成績を調べた。その結果、形態が良好で呼吸活性が最も高かった胚を治療（移植）に用いた場合、従来の形態観察のみで選択した胚を移植した症例に比べて妊娠率の向上と流産率の低下が認められた。さらに、出生後の児の体重および性別の比を追跡調査した結果、呼吸量非測定胚の移植で出生した児と比べて大きな差は認められなかった。これらの結果から、SECMを用いたヒト胚評価は、不妊治療において実用化可能な有効性と安全性の高い方法であることが示唆された。

本研究では、電気化学計測技術を基盤とするSECMを用いることで、ヒト胚におけるミトコンドリア呼吸機能の非侵襲的解析に初めて成功した。また、呼吸活性を指標とするヒト胚評価法の基盤技術の開発にも成功した。さらに、不妊治療における探索的臨床研究を行なった結果、生殖医療におけるSECMを用いた胚評価の有用性と安全性を示すことができた。これらの研究結果は、新しいヒト胚品質診断技術の開発の起爆剤となり、生殖医療技術の向上に大きく貢献すると考えられる。

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成26年 2月 18日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 阿部 宏之.....

副査 佐藤 慎吾.....

副査 田中 賢.....

副査 尾形 健明.....

副査

副査



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

専攻名 バイオ工学専攻.....

氏名 熊迫 陽子.....

2. 論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記する。)

電気化学計測技術を応用した受精卵評価法の開発と不妊治療における実用化研究.....

3. 審査年月日

論文審査 平成26年 1月 31日 ~ 平成26年 2月 13日

論文公聴会 平成26年 2月 13日

場所 工学部 9号館 300-2号室.....

最終試験 平成26年 2月 13日

4. 学位論文の審査及び最終試験の結果 (「合格」・「不合格」で記入する。)

(1) 学位論文審査 合格.....

(2) 最終試験 合格.....

5. 学位論文の審査結果の要旨 (1,200字程度)

別紙のとおり

6. 最終試験の結果の要旨

別紙のとおり

| | | | |
|--|---------|----|-------|
| 専攻名 | バイオ工学専攻 | 氏名 | 熊迫 陽子 |
| 学位論文の審査結果の要旨 | | | |
| <p>我が国では不妊治療は広く普及しているが、その治療成績は伸び悩んでいる。この原因の一つとして、治療に用いる受精卵（胚）の評価・選別の精度に問題があると考えられている。本研究では、電気化学計測技術を応用したヒト胚評価法の開発を試みるとともに、不妊治療における新しい胚評価法の臨床的有用性の検証を目的としている。</p> <p>第1章では、序論として「不妊治療の現状と課題」を中心に呼吸代謝解析による胚品質評価の意義を述べた後、第2章では電気化学計測技術を応用したヒト胚ミトコンドリア機能解析に関する研究成果を報告した。電気化学計測技術は、プローブ電極による酸化還元反応を利用し、局所領域における生物反応を電気化学的に検出する技術である。本章では走査型電気化学顕微鏡（SECM）を用い、体外受精卵の発生過程における呼吸量変化を調べた結果、ヒト胚では胚盤胞まで正常に発生した胚では、桑実胚から胚盤胞にかけて顕著な呼吸量の増加とミトコンドリアの形態的な発達が起こり、それに伴いアデノシン三リン酸（ATP）の増加と活性型ミトコンドリアの増加が起こることを明らかにした。</p> <p>第3章では、細胞呼吸活性を指標とするヒト胚品質評価法を開発するために、SECMにより呼吸量を測定した胚の培養試験と凍結融解試験を行った。その結果、呼吸量を指標に胚発生能と耐凍能の高い品質良好胚の選択が可能であることを示すことができた。また、SECMによる呼吸量測定は、初期胚において割球数などの形態的指標とは異なる基準で発生能など胚の品質を評価できることを明らかにした。</p> <p>第4章では、SECMを用いた胚評価の臨床的有用性を検証した。形態評価が全く同様である胚が複数個得られた症例において、SECMにより呼吸量を測定した胚を移植した場合の治療成績を調べた。その結果、形態が良好で呼吸活性が最も高かった胚を移植した場合、従来の形態観察のみで選択した胚を移植した症例に比べて妊娠率の向上と流産率の低下が認められた。これらの結果から、SECMを用いたヒト胚評価は不妊治療において実用化可能な有効性と安全性の高い方法であることが示唆された。</p> <p>以上、本研究の成果は、(1) SECMを用いたヒト胚呼吸能解析の成功、(2) 呼吸活性を指標とするヒト胚評価法の開発、(3) 呼吸測定によるヒト胚評価法の臨床的有用性の証明、の3点が挙げられる。本研究は新しいヒト胚品質診断法開発の基盤となり、生殖医療技術の向上に大きく貢献すると考えられる。</p> <p>本研究で得られた成果は、原著論文1編、査読付の国際会議2件において公表され、国内外から高い評価を受けている。本研究は博士学位論文として十分価値が認められるため、論文審査の結果を合格とする。</p> | | | |
| 最終試験の結果の要旨 | | | |
| <p>本研究の最終試験として、学位論文の内容を約50分で発表し、その後約30分の質疑応答を行った。口頭発表では研究の背景と目的を明確に説明した後、研究項目毎に成果を発表した。発表後に主査及び副査から実験データの追記等の指示があったが、論文の内容に関しては十分に学位論文として合格との評価を受けた。公聴会には、主査及び副査の他に多数の一般聴講者が参加し、多くの質問やコメントが出された。質疑には全ての確に回答し、学位論文の内容及び関連分野に関する理解度は十分であると判断された。以上、博士（工学）として必要とされる専門知識及び研究能力を十分に備えているものと判断し、最終試験を合格と判定した。</p> | | | |