

氏名	くろさわ ひろき 黒澤 大樹
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成29年3月8日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項
最終学歴	平成17年3月 高知大学医学部医学科 卒業
学位論文題目	チップ型センサーを用いた新規受精卵呼吸測定装置による胚評価に関する研究
論文審査委員	主査 教授 八重樫 伸生 教授 荒井 陽一 教授 木村 芳孝

論文内容要旨

Ia-研究背景

近年の晩婚化や少子化にともない、ART (assisted reproductive technology; 生殖補助技術) の需要は増加の一途を辿っている。胚発育能の正確な評価および良好胚の選別は、ART 治療の成否を左右する重要な要素である。過去には複数胚移植によって成績の向上が図られたが、それに伴い多胎妊娠の増加、母体合併症や流産の増加が問題となった。このことから、現在では国内外の学会より推奨された単一胚移植が主流となっている。しかしながら、移植胚数の制限は反復不成功による患者への精神的、経済的な負担等、新たな問題が生じている。こうした問題を解決するためには、妊娠に寄与する良好胚の選別が必要であり、胚評価法の重要性が高まっている。これまでの胚評価は形態学的に行われるのが主流であり、安価かつ簡便な方法であるが、主観的で判定者によるばらつきなどが懸念されている。また、形態学的良好胚でもしばしば着床に至らないなど限界がある。このため、今後の成績向上には簡便で非侵襲的、かつ客観的で定量的な新規の評価法の普及が望まれている。近年、胚の質の評価として代謝が注目されており、胚の酸素消費量測定はエネルギー代謝に重要なミトコンドリアの機能と関連する。これまでに SECM (scanning electrochemical microscopy; 走査型電気化学顕微鏡) の原理を応用した受精卵呼吸測定装置が開発され、酸素消費量と胚の質が高い相関関係にあることが報告され、市販化に至っている。SECM 装置は高精度で非侵襲的な画期的装置であるが、操作時に倒立顕微鏡下でマニュアル操作が必要であり、測定に熟練を要することから普及に至っていない。

Ib-研究目的

「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-指定-016) として、先行機器である SECM 装置の測定精度を維持しつつ、より簡便なシステムの開発を目指した。さらに、新規に開発した受精卵呼吸測定装置の測定精度の検証及び、臨床応用前段階の研究として胚酸素消費量測定によるヒト胚発育能の評価を行う事を目的とした。

Ic-研究方法

これまで走査型であった測定電極に代わり、半導体技術を用いてチップ上に微小電極を同心円状に配置したチップ型センサーを製作し、自動測定を可能とした新規の受精卵呼吸測定装置 CERMs (Chip-sensing Embryo Respiration Monitoring system) を開発した。これは民間企業

の協力を公募して行われた共同開発である。測定チップのヒト胚へのサイズ適合性、および酸素消費量算出に必須である正確な溶存酸素濃度の測定を検証するため、形態・大きさをヒト胚に模した球形の細胞塊（スフェロイド）を用いて検討した。次に既存の高感度受精卵呼吸量測定装置である SECM 装置との測定値の相関を確認するため、ウシ胚盤胞を用いて、SECM 装置と CERMs による同時測定を行った。最後に、当施設倫理委員会の承認（2013-1-519）のもと、ヒト余剰胚を用いた酸素消費量と胚発育能の比較検討を行った。受精後 2 日目の凍結胚（ $n = 30$ ）を用いて、融解後 6、24、48、72、96 時間での酸素消費量を測定し、ヒト胚発育と酸素消費量の関係を後方視的に検討した。

Id-研究結果

スフェロイドを用いた実験では、細胞の酸素消費により形成された距離依存性の溶存酸素濃度勾配を CERMs により高感度に検出可能であることを確認した（決定係数 $R^2 = 0.98 - 1.0$, 中央値 0.99）。次に、先行機器との測定値の相関を確認するため、ウシ胚盤胞を用いて、SECM 装置と CERMs による同時測定を行った。両機器の測定値には高い相関性がみられ（決定係数 $R^2 = 0.82$, $P = 0.0008$ ）、先行機器と同等の精度を確認した。最後に、ヒト余剰胚を用いた酸素消費量と胚発育能の比較検討を行った。受精後 2 日目の凍結胚（ $n = 30$ ）を融解し、融解後 6、24、48、72、96 時間で形態学的評価と酸素消費量測定を行い、胚盤胞到達群（ $n = 9$ ）と発育停止群（ $n = 21$ ）に分けて後方視的に検討した。胚提供カップルの背景、媒精方法、不妊原因には差を認めなかった。融解後 24 時間までは両群ともに酸素消費量増加はみられなかったが、48 時間以降（受精後 4 日目）で胚盤胞到達群では発育停止群と比べ酸素消費量の有意な増加（ $P < 0.05$ ）を認め、各測定ポイントにおいて既に発育停止した胚を比較対象から除外した場合にも同様の結果であった。また、ロジスティック回帰分析より、融解後 48 時間以降において、酸素消費量が 1 femtomol/second [fmol/s] 増加するごとに胚盤胞へ到達する可能性が有意に上昇した（オッズ比（OR）= 2.0; 95% 信頼区間, 1.0 - 4.6; $P = 0.04$ ）。この結果、胚の酸素消費量から胚発育を予測できる可能性が示唆された。一方、融解後 24 時間では胚の酸素消費量が回復していない可能性も考えられた。また、胚盤胞到達胚において形態学的評価を数値化する BQS (Blastocyst Quality Score) を用いて酸素消費量と比較したところ、BQS と酸素消費量には正の相関（決定係数 $R^2 = 0.65$, $P = 0.008$ ）がみられたが、一部の胚は形態良好にもかかわらず低い酸素消費量を示した。

Ie-考察

胚の酸素消費量はヒト胚発育との相関性を認め、胚盤胞到達予測や胚の質を反映する可能性が示唆された。一方、一部の胚では形態学的評価と酸素消費量の間乖離がみられた。これは酸素消費量が形態には表れないパラメーター（代謝面）を反映し、単独または形態評価を補完して胚評価の精度を改善する可能性を示唆している。今回の研究では胚移植を含む検討をしていないため、酸素消費量と着床率や妊娠率の関係、酸素消費量測定による出生児への影響が未評価である。これらの確認には、今後の胚移植を含む実験が必要と考えられる。本機器は、インキュベーターへの搭載やタイムラプスシステムとの統合など、将来の拡張性も期待される。今後の開発継続とデータの蓄積により、早期の臨床応用が期待される。

If-結論

これまで普及の妨げとなっていた SECM 装置の操作性を改善し、測定の自動化を可能とした新たな受精卵呼吸測定装置 CERMs を開発した。胚の酸素消費量が CERMs によって高感度に測定可能であることを証明した。酸素消費量と胚発育能には有意な関連がみられ、本機器が実臨床において胚評価の手段となる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

博士論文題目 チップ型センサーを用いた新規受精卵呼吸測定装置による胚評価に関する研究

受付番号 16B-4 氏名 黒澤 大樹 /

近年の晩婚化や少子化に伴い、ART (assisted reproductive technology; 生殖補助技術) の需要は増加の一途を辿っている。胚発育能の正確な評価および良好胚の選別は ART 治療の成否を左右する重要な要素であるが、これまでの胚評価は形態学的に行われるのが主流であり、主観的で十分な精度とはいえない。このため、客観的で定量的な新規の評価法の普及が望まれている。近年、胚発育能の指標として代謝が注目されており、特に胚の酸素消費量はエネルギー代謝に重要なミトコンドリア機能を反映する。これまでに SECM (scanning electrochemical microscopy; 走査型電気化学顕微鏡) の原理を応用した受精卵呼吸測定装置が開発され、酸素消費量と胚の質が高い相関関係にあることが報告されている。SECM 装置は高精度で非侵襲的な画期的装置だが、測定時に倒立顕微鏡下でマニュアル操作が必要であり、熟練を要することから普及に至っていない。

本研究では、先行機器である SECM 装置の精度を維持しつつ、より簡便に操作可能な新規の受精卵呼吸測定装置を民間企業と共同開発した。これまで走査型であった測定電極に代わり、半導体技術を用いてチップ上に微小電極を同心円状に配置したチップ型センサーを採用することによって、測定の自動化に成功した。まず、形態・大きさをヒト胚に模した球形の細胞塊 (スフェロイド) をサンプルとして、酸素消費量算出に必須である距離依存性の溶存酸素濃度勾配を高感度に検出可能であることを示した。次に、ウシ胚盤胞を用いて本機器と先行機器による同時測定を行い、両機器が同等の精度であることを確認した。最後に、受精後 2 日目凍結ヒト余剰胚を用いて酸素消費量と胚発育能の比較検討を行い、融解後 48 時間 (受精後 4 日目) 以降で胚盤胞到達群では発育停止群と比べて酸素消費量の有意な増加 ($P < 0.05$) を認めた。

本研究では、臨床応用を念頭に置いて操作性の向上に重点を置いた機器開発を行い、ヒト胚を用いて酸素消費量と発育能の有意な関連を示した。本機器はインキュベーターへの搭載やタイムラプスシステムとの統合など将来的な拡張性も有しており、今後のデータ蓄積により臨床応用が期待される。本研究は学位論文にふさわしいと考えられる。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。

学力確認結果の要旨

審査委員出席のもとに、学力確認のための試問を行った結果、本人は医学に関する十分な学力と研究指導能力を有することを確認した。

なお、英学術論文に対する理解力から見て、外国語に対する学力も十分であることを認めた。