

# 博士學位論文

## 要約

最適な培養環境の構築に向けた  
着床前胚評価技術の開発

2024年2月8日

八尾竜馬

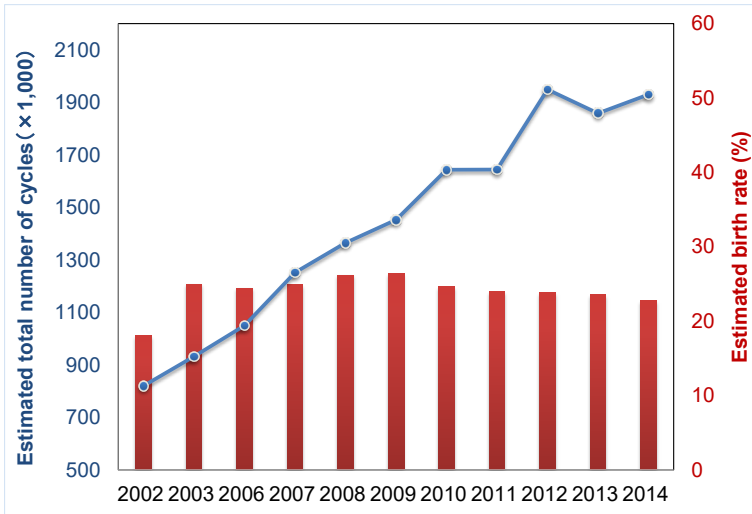
## 目次

第1章	序論	1
第2章	マウス着床前胚の ATP ライブセルイメージング技術の構築と検証	8
第3章	ウシ着床前胚の核・染色体ライブセルイメージング技術の構築と検証	9
第1節	ウシ着床前胚の核・染色体ライブセルイメージング技術の構築	9
第2節	ウシ着床前胚の核・染色体ライブセルイメージング技術の検証	34
第3節	小括	51
第4章	総括	53
	参考文献	55
	謝辞	64

## 1 第1章 序論

2 体外受精 (in vitro fertilization, IVF)、胚培養 (in vitro culture, IVC) 及び胚移植 (embryo  
3 transfer, ET) 等の生殖補助医療技術 (assisted reproductive technologies, ART) が現代社会に  
4 及ぼす影響は計り知れない。1978年にヒトのARTが成功して以来、これまで世界中で  
5 1,000万人のART児の誕生に貢献し、年間約400万件の治療が行われている (European  
6 society of human reproduction and embryology. ART factsheet, 2023)。この技術は家畜にも  
7 応用され、2017年にはIVF胚による牛の生産が体内由来胚を上回り、2021年には世界  
8 で約120万個ものIVF胚が移植されている (Rabel *et al.*, 2023)。また、ARTは発生生物  
9 学の研究のみならず、遺伝子組換え動物やクローン動物の生産を含む発生工学の分野  
10 でも利用され、科学の発展に不可欠な技術となっている。

11 しかしながら、ARTの成功率は必ずしも満足のものではなく、最近の国際生殖  
12 補助医療監視委員会 (International Committee for Monitoring Assisted Reproductive  
13 Technologies, ICMART) の報告によると、世界のARTの治療周期数は年々上昇している  
14 のに対し、その成功率は頭打ちか、むしろ減少傾向にある (Adamson *et al.*, 2018; Banker  
15 *et al.*, 2021; Chambers *et al.*, 2021; de Mouzon *et al.*, 2020; de Mouzon *et al.*, 2009; Dyer *et al.*,  
16 2016; Ishihara *et al.*, 2015; Mansour *et al.*, 2014; Nygren *et al.*, 2011) (図 1)。



17

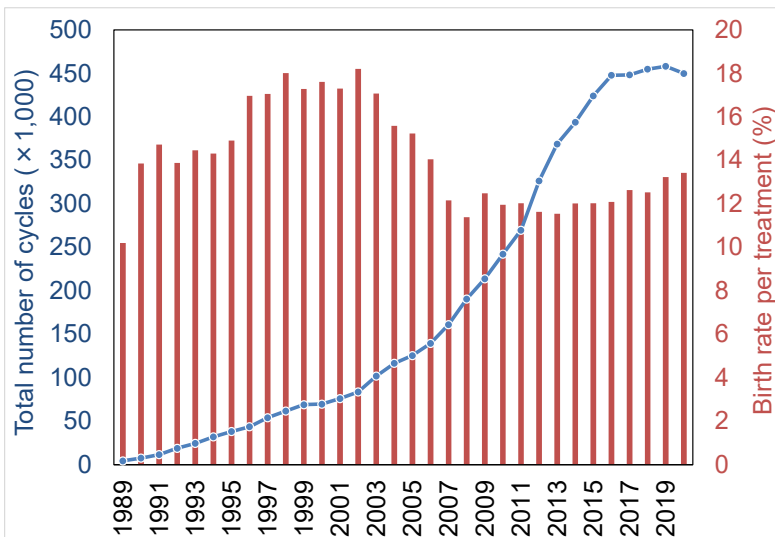
図1 世界の ART の推定治療周期数と出生率の推移

ICMART の年次報告を集計した。Estimated birth rate (%) は total babies estimated from all clinics を estimated or reported overall total number of cycles で除することで求めた。

18

19 また、本邦の ART 成功率は、世界と比較しても低く、2000 年頃をピークに減少して

20 いる (図 2)。



21

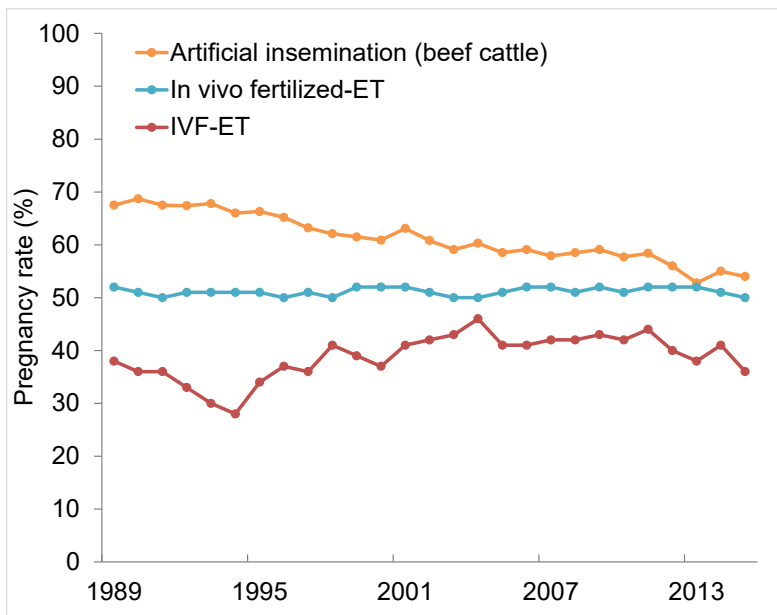
図2 本邦の ART の治療周期数と出生率の推移

日本産科婦人科学会倫理委員会 登録・調査小委員会報告の年次報告を集計した。

22

23 さらに畜産においても、IVF-ET の成功率は、人工授精や体内受精胚移植の成績より

24 も低いことが問題となっている (図 3)。



25

図3 牛の繁殖技術別受胎率の推移

人工授精（肉用牛）の成績は、家畜改良事業団の受胎調査成績の初回受胎率より抜粋した (<http://liaj.or.jp/giken/hanshoku/jyutai.html>)。体内受精卵移植及びIVF-ETの成績は農水省の牛受精卵移植実施状況（平成27年）の新鮮1卵より抜粋した ([https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1\\_katiku/index.html](https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_katiku/index.html))。

26

27 またARTで誕生した児は、自然懐胎児と比較して、周産期や小児期においては早産

28 や出生体重変化及び周産期死亡のリスクが高く、成人期から壮年期にかけては高血圧

29 や脂質代謝異常、糖尿病等のリスクが上昇することが報告されている (Berntsen *et al.*,

30 2019; Ceelen *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2017; Hann *et al.*, 2018)。このような転帰の違いを生

31 じさせるメカニズムは明らかになっていないが、胚のエピジェネティクスが大規模に

32 編成される時期に生体内とは異なる環境に暴露することで、エピゲノム変化が生じそ

33 の後の生涯に影響を与える、いわゆる Developmental Origins of Health and Disease

34 (DOHaD) 仮説に基づくものだと考えられている (Fleming *et al.*, 2018; Lane *et al.*, 2014)。

35 低妊娠率・出生率及び出生後の体重変化や疾患リスク上昇は、高齢化や不完全な培

36 養環境による胚の変質が原因のひとつだと考えられており (Ng *et al.*, 2018)、培養温度

37 やガス濃度及び pH (Baak *et al.*, 2019; Ng *et al.*, 2018)、培養装置 (Swain, 2020)、培養容器  
38 (Chi *et al.*, 2020)、培養液 (Kawagoe *et al.*, 2020; Yao and Asayama, 2016; 2017; Zhang *et al.*,  
39 2023) などの検討が世界中で精力的に進められている。著者も、体内で胚発生を支える  
40 卵管液の多成分解析データに基づく新たなヒト胚培養液を開発するなど (Utsunomiya *et*  
41 *al.*, 2022; Yao *et al.*, 2018a)、培養環境の改善を目的として様々な取り組みを進めてい  
42 る。

43 培養環境改善のためには、胚の変質を正確に把握する評価法が不可欠だが、現在主  
44 流の Veeck 分類 (Veeck, 1999) や Gardner 分類 (Gardner and Schoolcraft, 1999) をはじめと  
45 する形態評価法は、定性的かつ主観的で判定がばらつくうえ (Sakkas and Gardner,  
46 2013)、定点観察のため発生中に生じた異常を把握することができない。また、インキ  
47 ュベータ外に取り出して観察するため、環境変化による胚への悪影響が懸念される。  
48 これらの欠点を克服するため、近年はタイムラプス装置を用いて胚発育を継続的に観  
49 察する形態動態評価法が普及している。その利点として、観察中インキュベータから  
50 取り出さないため安定した環境で培養が継続できることや、発生速度や卵割異常の発  
51 生時期及び重篤度等の発生動態情報を取得できることが挙げられる。しかしながら、  
52 タイムラプスの発生動態情報に基づき選択した胚と、従来の形態評価法で選択した胚  
53 の移植結果を比較したメタアナリシスによると、タイムラプス評価の優位性は認めら  
54 れていない (臨床的妊娠率オッズ比 0.97、95%信頼区間 0.67–1.42) (Armstrong *et al.*,  
55 2019)。すなわち、タイムラプス撮影による変質胚の選別精度は従来の形態評価法の域  
56 を出ないと考えられる。流産の主要因である染色体異常を把握する方法として、着床  
57 前染色体異数性検査 (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy, PGT-A) が存在する

58 が、一部の割球を採取するため胚への侵襲性が問題となるケースがあり、さらに割球  
59 間で染色体の構成が異なる染色体モザイシズムが認められるなど、結果が胚全体の状  
60 態を反映しているとは言い難い (Popovic *et al.*, 2020)。着床前胚はその発生過程で細胞  
61 内の構造やエピゲノム、代謝等がダイナミックに変化するため (Chason *et al.*, 2011)、一  
62 時点だけではなく、可能な限り多くの時空間情報を捉えて評価することが望ましい。

63 蛍光プローブを用いたライブセルイメージング技術は、上記の課題を解決可能な強  
64 力な評価法になりうるが、着床前胚は環境変化に脆弱であり、わずかな温度変化や励  
65 起光の照射によって容易に発生が遅延・停止することが課題となる。山縣らは、侵襲  
66 性の低いマルチビームスキャンが可能なスピニングディスク式共焦点スキャナユニッ  
67 トを用い、培養温度や蛍光プローブの濃度、励起光のパワー、照射時間、撮影間隔等  
68 を詳細に検討することで、マウス胚の染色体の長期間ライブセルイメージングを可能  
69 とした (Yamagata *et al.*, 2009b; Yamagata *et al.*, 2005)。本法の最大の利点は、画像に含ま  
70 れる膨大な量の時空間情報を適切に画像処理し数値化することで、形態からはわから  
71 ない異常を客観的かつ経時的に定量可能であり、観察後に胚移植すれば出生の成否や  
72 その後の発育状態との関連性を知ることができることにある (Yao *et al.*, 2015)。

73 ATP は全ての生物において普遍的なエネルギー運搬物質であり、生体分子の合成・  
74 分解・修復をはじめ、あらゆる生命活動に利用されている。これらの ATP 産生経路の  
75 異常は、染色体分配異常、受精・卵割・着床不全など様々な異常を引き起こし、胚発  
76 生率や出生率低下の要因になることが示唆されている (Tilly and Sinclair, 2013; van der  
77 Reest *et al.*, 2021)。また、ART 児の疾患リスク上昇の原因と言われている胚のエピゲノ  
78 ム変化は、エネルギー代謝によって制御されていることが最近明らかとなってきた

79 (Bruna de Lima *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2022; Pladevall-Morera and Zylicz, 2022; Zhao *et al.*,  
80 2023; Zhao *et al.*, 2021)。よって、ATP 濃度をモニタリングすれば、胚の変質を把握する  
81 ことができるようになり、培養環境改善の指標になるのではないかと考えた。しかし  
82 ながら、従来の ATP 測定法では胚を破碎する必要があり、ATP 測定後に胚発生を観察  
83 することや胚移植により産仔を得てエピゲノム変化と将来の疾患リスクとの関連性を  
84 評価することができなかった。そこで本研究では、マウス着床前胚の前核期から胚盤  
85 胞期までの ATP 濃度を低侵襲かつ高い時空間分解能で個別観察できるライブセルイメ  
86 ージング法を構築し、その有用性を評価した。第 2 章第 1 節では、ライブセルイメ  
87 ジングの条件設定と侵襲性・妥当性及び分解能の検討結果を示す。第 2 章第 2 節で  
88 は、正常胚と低質な胚(発生停止胚、発生遅延胚、老化胚)との ATP 濃度の比較結果や  
89 培養環境(酸素濃度、培養液、培養液のグルコース濃度)を変更した際の胚の ATP 濃度  
90 の変動及び出生の成否との関連性を示す。また、胚の ATP 濃度と遺伝子発現の関連性  
91 を検討した結果を示す。

92 染色体異常は、胚発生停止や流産の要因と考えられており (Yang *et al.*, 2021)、実際  
93 マウス胚のライブセルイメージングでも初期卵割の時期に染色体分配異常が認められ  
94 た胚はその後発生しづらいことが明らかになっている (Mashiko *et al.*, 2020; Yamagata *et*  
95 *al.*, 2009a)。ただし、マウス以外の動物種の胚では、長期間ライブセルイメージングを  
96 実施した報告がなく、染色体異常が生じるタイミングや頻度、染色体異常の重篤度に  
97 ついては詳しく調べられていなかった。これらを明らかにすれば、具体的な介入ポイ  
98 ントが定まり、培養環境改善のきっかけになると考えた。そこで本研究では、ART の  
99 成績向上が切望されているウシを対象として着床前胚の核・染色体ライブセルイメー



100 ジング法を構築し、異常の頻度やタイミング及びその後の発生への影響について詳細  
101 に検討した。第3章第1節では、ウシ胚観察のためのライブセルイメージングの条件  
102 設定とウシ胚の発生過程における核・染色体の異常と胚発生との関連性を調べた結果  
103 を述べる。第3章第2節では、ウシ胚の染色体分配異常に注目し、異常の重症度と着  
104 床前胚発生及び産子獲得能との関連性を調べた結果を述べる。

105 **第2章 マウス着床前胚の ATP ライブセルイメージング技術の構築と検証**

106 本章の内容は、多重公表を禁止する学術ジャーナルへ投稿するため、学術ジャーナ  
107 ルへ掲載後に公表する。

### 108 第3章 ウシ着床前胚の核・染色体ライブセルイメージング技術の構築と検証

109 本章は、CC BY 4.0 のライセンス及び Elsevier 社の著者の権利

110 (<https://beta.elsevier.com/about/policies-and-standards/copyright?trial=true>) に基づき、

111 Scientific Reports 及び BBRC に掲載済みの自身の論文 (Yao *et al.*, 2018b; Yao *et al.*, 2022)

112 の内容を一部転載した。

113

### 114 第1節 ウシ着床前胚の核・染色体ライブセルイメージング技術の構築

#### 115 第1項 緒言

116 畜産業では、牛乳や牛肉の品質や生産効率向上のため、人工授精などの繁殖技術の  
117 改良が進められてきた。その中でも供卵牛から得た受精卵を別の雌牛の子宮内に移植  
118 して子を得る胚移植 (embryo transfer, ET) は、能力の優れた雌牛を種畜として一度に多  
119 くの優良子牛を生産できる技術である。ET に供する胚は、体内由来のものと IVF で作  
120 出したものの2種類あるが、近年は短期間かつ低コストで大量の胚を生産可能な IVF  
121 胚のニーズが高まっている。国際胚移植学会 (International Embryo Transfer Society,  
122 IETS) の報告によると、2016年の時点では体内由来胚と IVF 胚の割合は同程度であっ  
123 たが、2021年ではおおよそ8割が IVF 由来となっている (Rabel *et al.*, 2023)。しかし、  
124 IVF 胚をレシピエントに移植した場合の妊娠率は体内由来胚より平均 25% (範囲 10–  
125 40%) 低いことが報告されている (Ealy *et al.*, 2019)。ウィスコンシン州の ReproMoney  
126 プログラムによると、妊娠率が 1% 異なると酪農牛では 1 頭あたり年間約 25 米ドルの  
127 差が生じることが示されている (Baruselli *et al.*, 2020)。IVF 胚の受胎率低下に伴う国レ  
128 ベルでの損失は無視できず、受胎率向上は喫緊の課題である。体内由来胚と比べて

129 IVF 胚の受胎率が低い原因は、受精卵の培養環境が未熟なことに加え、生児に至らな  
130 い品質の低い胚を移植したことが原因のひとつだと考えられている (Ealy *et al.*, 2019;  
131 Rabel *et al.*, 2023)。したがって、妊娠率を向上させるには、生育可能な受精卵を評価す  
132 る技術を開発し、その技術を用いて IVF 胚を選別するとともに培養環境を改善する試  
133 みが有効だと考えられる。

134 一般的にウシの胚の品質評価は、IETS が推奨する形態学的な等級付け (Stringfellow  
135 *et al.*, 2010) によって行われる。この方法は、発育ステージ、色調、割球の輪郭の明瞭  
136 さや変性細胞の割合によって評価するが、主観的で判定がばらつくうえ、移植可能 (コ  
137 ード 1 またはコード 2) と判定された胚の妊娠成功率は 30~50%に留まっている  
138 (Ferraz *et al.*, 2016; Sugimura *et al.*, 2017a)。そこで、桑実胚や胚盤胞から一部の割球を生  
139 検しオミクス解析 (ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス等) を実施  
140 し、良質な胚を選別する試みが行われているが、割球生検による胚への侵襲性が問題  
141 となる場合がある (Rabel *et al.*, 2023)。さらに割球間にはモザイシズムがあることが知  
142 られており (Gleicher *et al.*, 2021)、得られた結果が胚全体の状態を反映しているとは限  
143 らない。

144 杉村らは、ウシ胚のタイムラプス撮影解析を用いて、第 1 卵割のタイミングや割球  
145 数、lag-phase (第 4 もしくは第 5 細胞周期に認められる胚の一時休止期)、開始時の割球  
146 数などの形態動態指標 (morphokinetic indicators, MKIs) が、有用なマーカーであること  
147 を見出した。MKIs に基づき胚を選別し ET した場合の受胎率は 60%であった  
148 (Sugimura *et al.*, 2012; Sugimura *et al.*, 2017a)。すなわち、ウシ IVF 胚の評価の信頼性と  
149 客観性の点で、MKIs を使用することは IETS の形態学的等級付けを使用するよりも優

150 れた方法である可能性がある。しかし、タイムラプス撮影によって得られる生物学的  
151 情報は限られている。特にウシ胚は、細胞質の脂肪が豊富であり、可視光では流産の  
152 原因となる前核 (pronuclei, PN) 数の異常を見分けることができないといった問題があ  
153 った。

154 近年、我々は蛍光プローブをコードする mRNA と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせ  
155 せることで、マウスの核/染色体ダイナミクスを長期間ライブセルイメージングする技  
156 術を開発した (Yamagata *et al.*, 2009a; Yamagata *et al.*, 2009b)。この方法により、第 1 卵  
157 割時に染色体分配異常 (abnormal chromosome segregation, ACS) を起こしたマウス胚のほ  
158 とんどが、移植後に生存能力を持たないことが明らかになった (Yamagata *et al.*,  
159 2009a)。そこで本節では、ウシ IVF 胚の核/染色体異常を評価可能なライブセルイメー  
160 ジング法の構築を試みた。

161

## 162 **第2項 材料及び方法**

### 163 **倫理声明**

164 本研究は、東京農工大学及び国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の  
165 実験動物委員会により承認された。

166

### 167 **化学物質**

168 メーカーを記載していない化学物質は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入し  
169 た。

170

171 **卵子の採取**

172 黒毛和種または黒毛和種×ホルスタイン種の卵巢を屠畜場から採取し、実験室に運  
173 び、洗浄後、生理的食塩水で保存した。卵子卵丘細胞複合体 (cumulus oocyte  
174 complexes, COCs) は、19 ゲージの注射針を装着した 10 mL シリンジを用いて、小卵胞  
175 (直径 2-6 mm) から吸引した (Sugimura *et al.*, 2010)。

176

177 **卵子の輸送及び体外成熟 (in vitro maturation, IVM)**

178 COCs は IVM しながら近畿大学へ陸送した (図 14A)。IVM 培地は、25 mM HEPES 緩  
179 衝 TCM199 (M199; Gibco, Scotland, UK) に 5%子牛血清 (CS; Gibco) 及び 0.1 IU/mL 組換  
180 えヒト卵胞刺激ホルモン (FSH) (Follistim; MSD, Tokyo, Japan) を添加したものを使用し  
181 た。COCs を平底マイクロチューブ (TreffLab, Degersheim, Switzerland) に移し、500 µL  
182 の IVM 培地 (20-40 COCs/tube) を加え、300 µL のパラフィンオイルで被覆した。チュ  
183 ーブを細胞培養輸送器 (01213900; Fujihira, Tokyo, Japan) に入れ、38.5°C に調節して出  
184 荷した。近畿大学に到着後、チューブは温度を 38.5°C、CO<sub>2</sub> 濃度を 5%に設定した加湿  
185 型インキュベータ (APM-30DR; Astec) に移し、IVM に必要な期間 (最大 22 時間) 継続培  
186 養した。

187

188 **IVF**

189 IVF は過去の報告と同様に行った (Sugimura *et al.*, 2012)。IVM の 22 時間後、黒毛和  
190 種雄牛の射出精子を融解し、3 mL の 90% Percoll 溶液 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)  
191 中、750 × g で 10 分間遠心した。遠心後、ペレットを再懸濁し、10 mM のヒポタウリ

192 ンと 4 U/mL のヘパリン (Novo-Heparin Injection 1000; Aventis Pharma, Tokyo, Japan) を添  
193 加した 6 mL の精子洗浄液 (Brackett and Oliphant solution, BO) (Brackett and Oliphant,  
194 1975) 中で、 $550 \times g$  で 5 分間遠心した。その後、ペレットを精子洗浄液及び 20 mg/mL  
195 のウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を添加した BO 液に懸濁し、最終濃  
196 度が  $3 \times 10^6$  精子/mL になるようにした。この懸濁液 (100  $\mu$ L) をパラフィンオイル下の  
197 35 mm ディッシュ上に分注した。COCs を 10 mg/mL BSA を添加した BO で 2 回洗浄  
198 し、35 mm ディッシュに作製した精子懸濁液に加え、温度を 38.5°C、CO<sub>2</sub> 濃度を 5% に  
199 設定した加湿型インキュベーター (Astec) 中で 6 時間培養した。

200

#### 201 mRNA の作製

202 EGFP- $\alpha$ -tubulin 及び Histone H2B-mCherry をコードする mRNA の調製は、以前の報告  
203 に従った (Yamagata *et al.*, 2005)。mRNA は、RiboMAX™ Large Scale RNA Production  
204 Systems-T7 (Promega, Madison, USA) を用いて合成した。各 mRNA の 5'末端は Ribo  
205 m7G Cap Analog (Promega) を用いてキャップした。合成した RNA は、フェノール-クロ  
206 ロホルム処理後ゲルろ過 (MicroSpin™ G-25; GE Healthcare) を用いて精製した。

207

#### 208 受精卵への mRNA のマイクロインジェクション

209 IVF 後の卵子は、胚培養液である 5% CS 及び 0.3% BSA を添加したフェノールレ  
210 ドを含まない Charles Rosenkrans 1 with amino acid (CR1aa) 培地 (Rosenkrans *et al.*, 1993)  
211 中で、ガラスピペットでピペッティングすることにより、卵丘細胞と精子を除去し  
212 た。mRNA (各 5 ng/ $\mu$ L) を、HEPES 緩衝 CZB 培地中 (Chatot *et al.*, 1989)、ピエゾマニピ

213 ュレーター (PMM-150FU; Prime Tech, Ibaraki, Japan) を用いて、IVF 後 4 時間以内に受精  
214 卵の細胞質内に注入した。

215

## 216 ライブセルイメージング

217 胚がイメージング中に移動して視野から外れるのを防ぐため、高分子フリーの培地  
218 では胚が部材に貼り付く性質を利用して胚を固定した。まず、タンパク質 (BSA 及び  
219 CS) フリーの CR1aa を 2.5  $\mu$ L ずつ一体成型フィルムボトムディッシュ (FD20301;  
220 Matsunami Glass, Osaka, Japan) の底に滴下し、胚を入れてガラスキャピラリーの先端で  
221 整列させた後、10% CS 及び 0.6% BSA を含む CR1aa を 2.5  $\mu$ L ずつ追加した。ディッシ  
222 ュは、6% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、89% N<sub>2</sub>、飽和湿度、38.5°C に設定したボックス型共焦点レー  
223 ザー顕微鏡 (CV1000) 内に設置し、以下のパラメーターで、10 分間隔で 8 日間、三次  
224 元撮影した。レンズ 20 倍 (UPLSAP 20XO; Olympus, Tokyo, Japan)、EGFP- $\alpha$ -tubulin 及び  
225 Histone H2B-mCherry の励起波長 488 nm 及び 561 nm、蛍光波長 525/50 nm 及び 617/73  
226 nm、レーザー出力 0.05 mW 及び 0.10 mW、露光時間 50 msec 及び 100 msec、ゲイン  
227 100% 及び 100%、z 範囲 150  $\mu$ m 及び 150  $\mu$ m、スライス数 31 及び 31。なお、観察前に  
228 は光パワーメータ (3664; Hioki E.E. Corp., Nagano, Japan) を用いてレンズ直上のレーザ  
229 ーパワーを測定し、励起光の出力を調整した。

230

## 231 核型分析

232 染色体の調整及び評価は過去の報告に従った (Sugimura *et al.*, 2012)。胚盤胞は、5%  
233 CS 及び 60 ng/mL vinblastine sulfate (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を添加した



234 CR1aa で 14–17 時間培養した。その後胚盤胞を洗浄し、1% (w/v) クエン酸ナトリウム  
235 溶液中で 15 分間インキュベートし、0.02 mL の酢酸メタノール (1:1 [v/v] 酢酸/メタノー  
236 ル) を 0.4 mL のクエン酸ナトリウムの低張溶液に加えて固定した。胚盤胞を飽和湿度  
237 の空气中でスライドガラス上に置き、直ちにごく少量の酢酸を滴下して各細胞を分離  
238 した後、酢酸アルコール (1:3 [v/v] 酢酸/メタノール) で再固定した。完全に乾燥させた  
239 後、染色体サンプルを蒸留水中 2% (w/w) ギムザ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で  
240 10 分間染色した。

241 各胚について、損傷及び重なりのない割球の metaphase を油浸明視野顕微鏡で 1,000  
242 倍で観察し、染色体数を決定した。すべての核が 2 組の染色体 ( $2n = 60$ ) または 1 組の  
243 染色体 ( $n = 30$ ) を含む胚をそれぞれ diploid または haploid とし、全ての核が  $3n$ 、 $4n$  ま  
244 たは  $5n$  以上を含む胚を polyploid とした。 $2n$  と  $3n$  以上または  $1n$  の細胞が混在する胚  
245 は、mixploid と判定した。

246

#### 247 画像解析

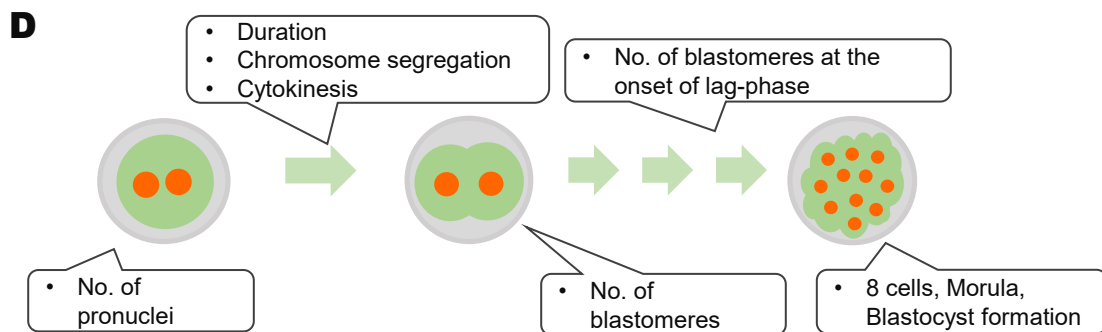
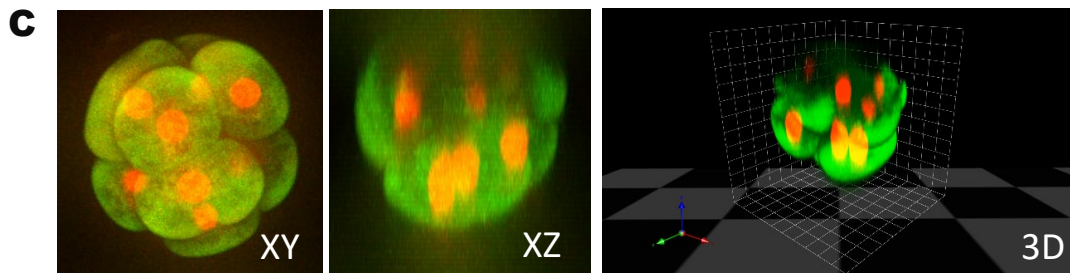
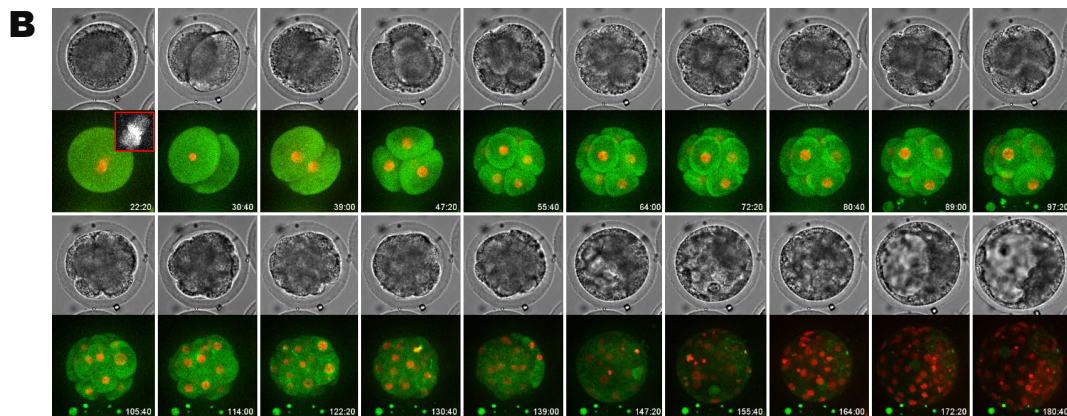
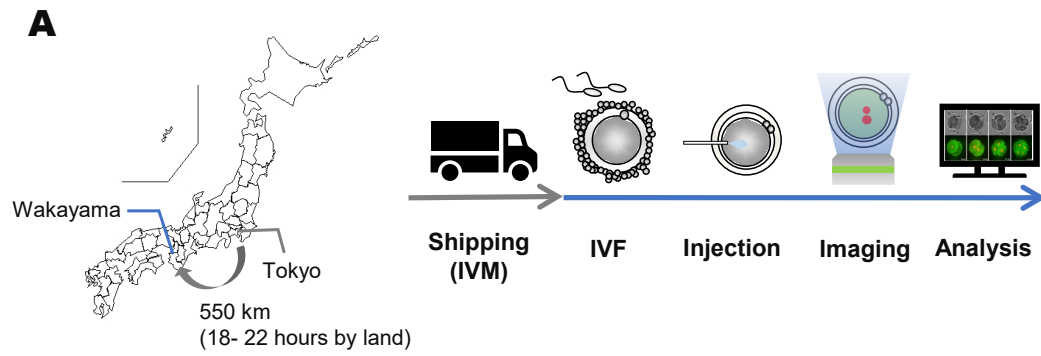
248 2D/3D 画像は、ImageJ/Fiji 画像解析プラットフォーム (Schindelin *et al.*, 2012) または  
249 Volocity ソフトウェア (PerkinElmer, MA, USA) により構築した (図 14B, C)。2D/3D 画  
250 像は任意のポイントでレトロスペクティブに解析した (図 14D)。

251

#### 252 統計解析

253 全ての統計解析は R 統計ソフト version 3.2.4 もしくは version 4.3.1 (R Core Team,  
254 2020) を用いて行った。特に指定のない限り、stats パッケージ内の関数を使用した。胚

255 盤胞形成率はカイ 2 乗検定を用いて比較した。第 1 卵割のタイミングは Wilcoxon 順位  
256 和検定を用いて比較した。第 1 卵割のタイミングと割球数に関連する変数は、重回帰  
257 分析及び多変量ロジスティック回帰分析により同定した。Lag-phase の割球数と関連す  
258 る変数は、ordinal パッケージ (version 2022.11-16) の clm 関数を用いた累積ロジスティ  
259 ック回帰分析により同定した。分散拡大要因 (variance inflation factor, VIF) は、car パッ  
260 ケージ (version 3.1-2) の vif 関数を用いて算出した。第 1 卵割のタイミングのカットオ  
261 フ値は、pROC パッケージ (version 1.18.4) の roc 関数と coords 関数で決定した。P 値  
262 <.05 を有意とした。なお、図 14A の日本地図は、R (version 3.2.4) の Nippon パッケー  
263 ジの JapanPrefecturesMap 関数で作成した。



#### 図 4 実験の概要

東京農工大学では、食肉処理場由来の卵巣から卵子卵丘細胞複合体 (cumulus oocyte complexes, COCs) を採取した。採取した COCs は体外成熟 (in vitro maturation, IVM) させながら近畿大学に輸送した。到着後、IVF を 6 時間行い、極体が観察された卵子に mRNA を注入し、CV1000 によるライブセルイメージングを 8 日間行った。得られた画像をレトロスペクティブに解析した (A)。Histone H2B-mCherry と EGFP- $\alpha$ -tubulin をコードする mRNA を注入した 369 個の胚の 3D ライブセルイメージングを 1 細胞期から胚盤胞期まで 8 日間行った。3D 画像の 2D への投影には、maximum intensity projections (MIP) を用いた。赤は Histone H2B-mCherry (核/染色体)、緑は EGFP- $\alpha$ -Tubulin (微小管) を表す (B)。8 細胞胚の 2D/3D 画像は、ImageJ/Fiji と Volocity ソフトウェアを用いて構築した。イメージング条件を最適化することで、脂質に富んだウシ胚において、z 軸方向に一番上の核/染色体画像まで取得することができた (C)。前核 (pronuclei, PN) 数、第 1 卵割のタイミング・染色体分配・細胞質分裂、第 1 卵割終了時の割球数、lag-phase 開始時の割球数をレトロスペクティブに観察した (D)。

265

### 266 第3項 結果

#### 267 輸送中の IVM がウシ胚の体外発育に及ぼす影響

268 本研究では食肉処理場由来の卵巣から東京農工大学で COCs を採取し、IVM させな  
269 がら近大に細胞輸送装置に入れて輸送した。到着後、IVF を 6 時間行い、極体が観察  
270 された卵子に mRNA を注入し、CV1000 によるライブセルイメージングを 8 日間行っ  
271 た。得られた画像をレトロスペクティブに解析した (図 14)。実施に先駆け、細胞輸送  
272 中に IVM を実施した卵子の発育能力を確認したところ、CO<sub>2</sub> インキュベータを用いた  
273 従来の IVM システムから得られたものと同様であった (表 1)。

274

275

276

277

278

279

280 表 1 IVM 中の細胞輸送がウシ胚の体外発生に及ぼす影響

Instrument	IVM system	No. of cultured oocytes (replicates)	Percentage of embryos (mean ± SD%)			
			Cleavage at day 2		Developed to blastocyst stage at day 8	
			Total	4-cell <	Total	Expanded stage
CO <sub>2</sub> incubator	Petri dish	105 (5)	71.8 ± 13.7	57.6 ± 14.0	23.4 ± 9.5	13.0 ± 6.7
Cell transporter	Microtube	136 (5)	70.1 ± 10.3	56.8 ± 10.1	29.0 ± 11.9	18.3 ± 1.5

281

282 ライブセルイメージングがウシ胚の体外発生に及ぼす影響

283 次に、ライブセルイメージングが胚発生に与える影響を評価するため、培養液量と  
 284 mRNA 注入の影響を調べた。培養液量は、これまでマウスで検討してきた条件と同じ  
 285 く (Yamagata *et al.*, 2009b)、5 μL で 4 個の胚を培養できることが確認できた (

286 表 2)。また、通常のインキュベータを用いた培養では、ウシ胚の胚盤胞発生に注入  
 287 操作の悪影響は見られなかった (表 3)。その後、最適なイメージング条件を決定する  
 288 ために、Histone H2B-mCherry 及び EGFP-α-tubulin の mRNA プローブを注入した胚を、  
 289 波長の異なるレーザーに様々な時間曝露した。488 nm で 50 msec、561 nm で 100 msec  
 290 照射したとき、胚盤胞到達率は最も良好であった (表 3)。この発育能力は、ライブセ  
 291 ルイメージングに曝露しなかった胚と比較して劣っていなかった ( $P > .05$ )。ET の予備  
 292 評価では、31 日目と 45 日目に胎児心拍を伴う妊娠が診断された (図 15)。この最適化  
 293 されたイメージング条件をその後の解析に用いた。

294

295

296

297

298 表2 体外ウシ胚発生における培養液量の影響

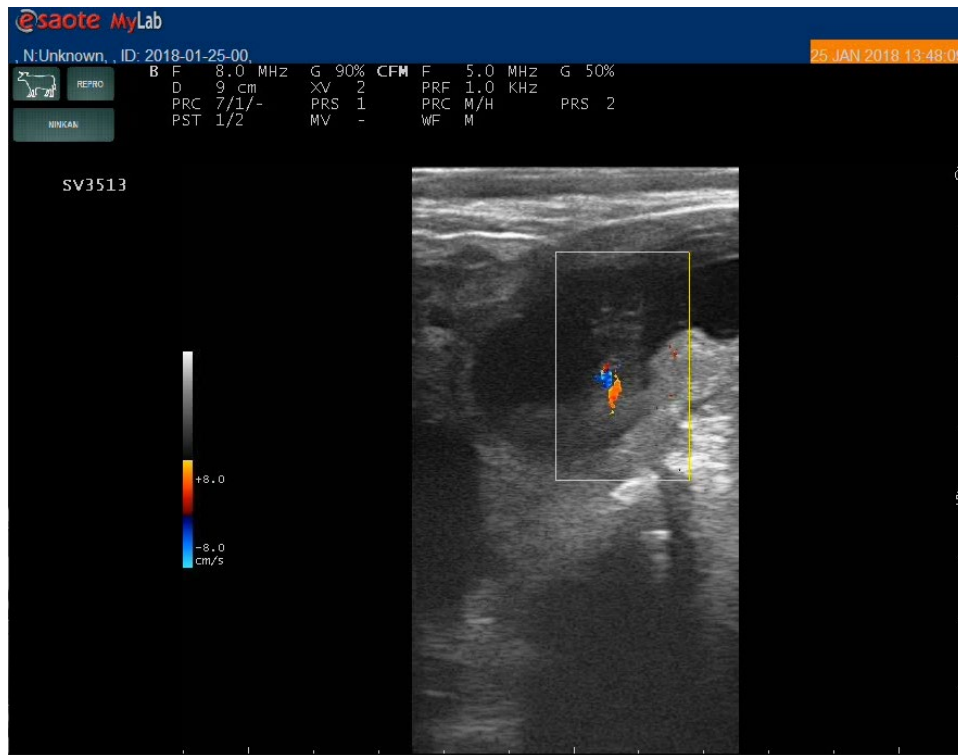
Culture volume (μL)	No. of cultured oocytes (replicates)	Percentage of embryos (mean ± SD%)			
		Cleavage at day 2		Developed to blastocyst stage at day 8	
		Total	4-cell <	Total	Expanded stage
5	60 (5)	70.0 ± 9.5	58.3 ± 4.6	33.3 ± 5.9	25.0 ± 8.3
10	60 (5)	80.0 ± 7.5	65.0 ± 3.7	33.3 ± 8.3	26.7 ± 10.9
20	60 (5)	75.0 ± 13.2	60.0 ± 10.9	41.7 ± 5.9	38.3 ± 4.6

299

300 表3 ウシ胚発生におけるライブセルイメージングの効果

Incubator	Exposure time (msec)		Z slices	Sharm injection	mRNA injection	No. of blastocysts/cultured (%)
	488 nm	561 nm				
	Conventional incubator	-				
	-	-	-	+	-	22/68 (32.4%)
Imaging system (CV1000)	-	-	-	-	+	15/48 (31.3%)
	150	150	31	-	+	7/42 (16.7%)
	100	100	31	-	+	3/24 (12.5%)
	50	100	31	-	+	19/52 (36.5%)

301



302

図 5 ライブセルイメージングしたウシ IVF 胚の移植後のレシピエントの妊娠状態の観察

染色体分配異常 (abnormal chromosome segregation, ACS) や前核 (pronuclei, PN) 数異常などが認められなかった胚を移植に供し、45 日目にカラードップラー超音波により妊娠状態を観察した。

303

304 異常受精及び第 1 卵割の異常とその後の体外発育能力との関係

305 PN 数、染色体分配、第 1 卵割時の細胞質分裂、及び第 1 卵割後の割球数に異常のある胚の発育能力を解析した (図 16)。48%の胚 (177/369) に異常 PN 数 (0 PN=13.6%、1 PN=19.5%、multi-PN ( $\geq 3$ ) =14.9%) が認められ、そのうち 13.0%が胚盤胞期まで発育した。この値は、正常な PN 数を有する胚の胚盤胞到達率 22.4% (43/192 個) よりも有意に低かった ( $P = .02$ )。PN が 0 個、1 個、2 個、複数個 ( $\geq 3$ ) の胚の胚盤胞形成率は、それぞれ 18.0% (9/50)、9.7% (7/72)、22.4% (43/192)、12.7% (7/55) であった (表 4)。

311 ACS は 30.6%の胚で発生し、そのほとんどは 8 細胞期の前に発育を停止し、胚盤胞に  
312 発育した胚はわずか 6.2%であった。8.1%の胚で第 1 卵割時の細胞質分裂に異常がみ  
313 られ、これらの胚のほとんど全てが 8 細胞期の前に発育を停止した (図 16B)。プロテ  
314 ンホスファターゼ 2A を阻害することで染色体異常を誘導するオカダ酸 (Li *et al.*, 2009;  
315 Takemoto *et al.*, 2009) を IVM 期及び胚培養 (in vitro culture, IVC) 期に処理すると、細胞  
316 質分裂異常や ACS が増加し、2 細胞期から 8 細胞期までの胚発生も阻害された (表 5 及  
317 び表 6)。第 1 卵割終了時、22.2%の胚が異常な数の割球を有し、そのうち 13.4%が胚盤  
318 胞に発育した。これは、割球数が正常な胚の胚盤胞到達率 (19.2%、 $P = .23$ ) と比較し  
319 て、有意差はなかった。多変量解析の結果、胚盤胞の発育は、第 1 卵割時の 1 PN 及び  
320 ACS の有無と関連していることが示された (表 7)。これらの結果から、異常な第 1 卵  
321 割と胚発育不良の関係が示唆された。

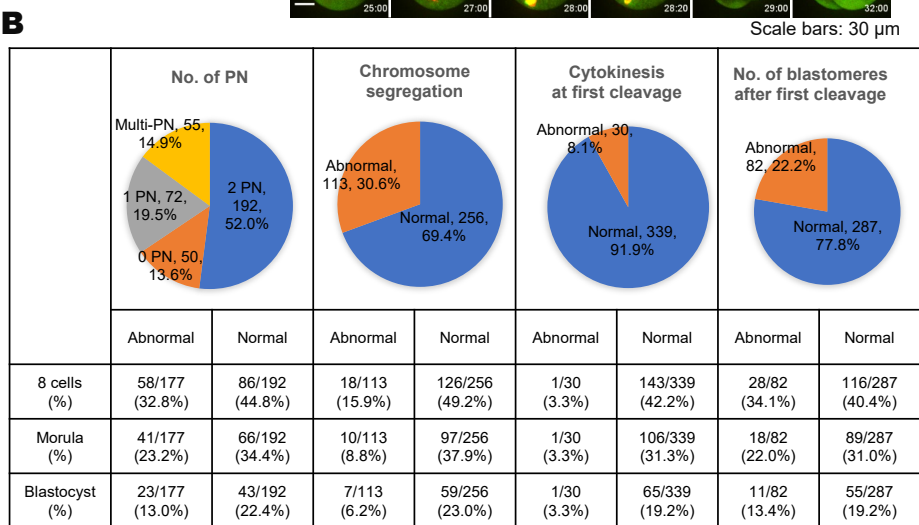
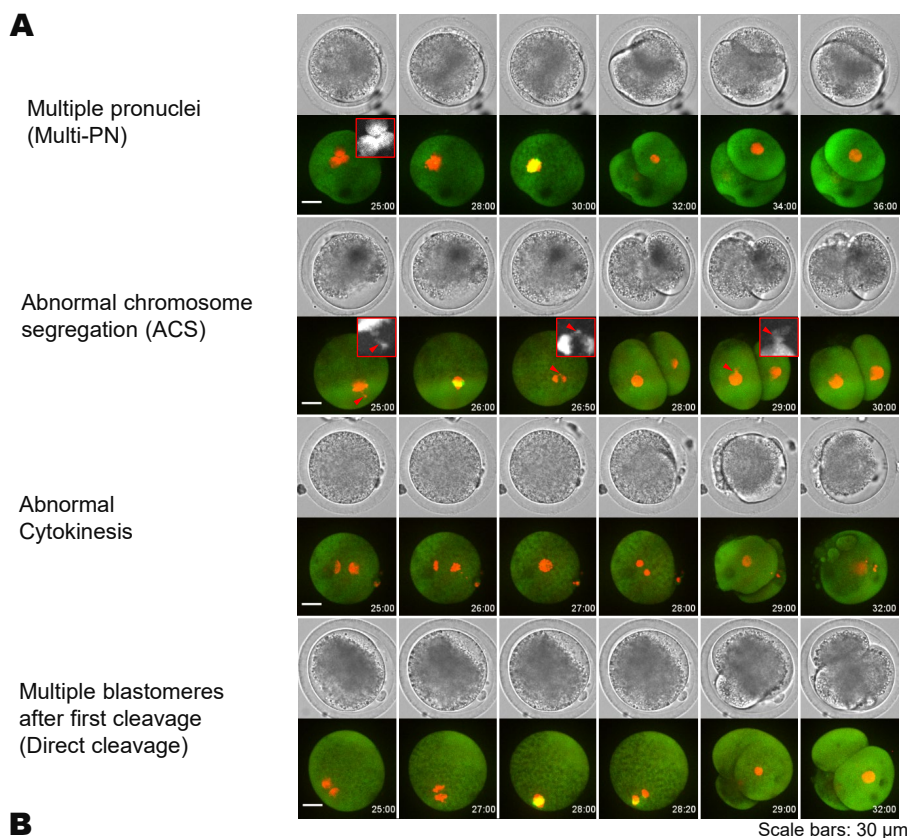


図 6 第 1 卵割時の異常とその後の体外発育との相関

PN 数は 0 (0 PN)、1 (1 PN)、2 (2 PN)、3 個以上 (multi-PN) に分類し、2 PN 以外を前核数異常と定義した。ACS は、染色体の一部が metaphase plate とずれている状態、または anaphase で染色体の一部が遅れている状態と定義した。赤矢頭は微小核様構造を示す。細胞質分裂の異常とは、染色体の分離が起こった後、細胞質の分裂が完了せず、割球数が増加しなかった場合をいう。割球数の異常は、第 1 卵割終了時に 3 個以上の割球が観察された場合 direct cleavage と定義した。スケールバーは 30  $\mu$ m (A)。第 1 卵割が正常及び異常であった受精卵の割合と、その後の 8 細胞期、桑実期、胚盤胞期までの発育能力を算出した (B)。



324 表 4 第 1 卵割時の PN 数及び ACS の有無と胚盤胞期までの発育能力

No. of PN	ACS	No. of observed oocytes	No. of observed blastocysts (%)
0	Yes	7	0 (0.0)
	No	43	9 (20.9)
	Total	50	9 (18.0)
1	Yes	18	0 (0.0)
	No	54	7 (13.0)
	Total	72	7 (9.7)
2	Yes	57	5 (8.8)
	No	135	38 (28.1)
	Total	192	43 (22.4)
≥3	Yes	31	2 (6.5)
	No	24	5 (20.8)
	Total	55	7 (12.7)

325

326 表 5 ウシ胚の体外発生に及ぼすオカダ酸の影響

Okadaic acid (μM)	Treated period	Analyzed	First cleavage (%)	≥8cell (%)	≥Morula (%)	≥Blastocyst (%)
0.00	–	23	22 (95.7)	15 (65.2)	13 (56.5)	12 (52.2)
0.02	IVC	25	23 (92.0)	14 (56.0)	6 (24.0)	0 (0.0)
0.04	IVC	27	26 (96.3)	13 (48.1)	2 (7.4)	0 (0.0)
0.05	IVM	19	18 (94.7)	4 (21.1)	3 (15.8)	2 (10.5)

327 胚発生はライブセルイメージングで 8 日間観察

328

329 表 6 オカダ酸が第 1 卵割から桑実胚までの異常分裂に及ぼす影響

Okadaic acid (μM)	Treated period	Abnormal cytokinesis at first cleavage (%)	Multi-divison at first cleavage (%)	ACS at first cleavage (%)	ACS up to morula (%)	Severe ACS up to morula (%)
0.00	–	1/22 (4.5)	3/22 (13.6)	7/22 (31.8)	10/22 (45.5)	9/22 (40.9)
0.02	IVC	3/23 (13.0)	4/23 (17.4)	9/23 (39.1)	22/23 (95.7)	19/23 (82.6)
0.04	IVC	4/26 (15.4)	6/26 (23.1)	8/26 (30.8)	24/26 (92.3)	20/26 (76.9)
0.05	IVM	6/18 (33.3)	4/18 (22.2)	7/18 (38.9)	15/18 (83.3)	10/18 (55.6)

330 胚発生はライブセルイメージングで 8 日間観察

331

332

333

334

335 表 7 多変量ロジスティック回帰分析による胚盤胞への発生に関連する変数の探索

Variables	Estimate <sup>a</sup> (95% CI <sup>b</sup> )	OR <sub>adj</sub> <sup>c</sup> (95% CI)	VIF <sup>d</sup>	P-value
(Intercept)	-0.84 (-1.23, -0.47)	–	–	<.001
0 PN [Yes]	-0.48 (-1.34, 0.30)	0.62 (0.27, 1.40)	1.07	.25
1 PN [Yes]	-1.09 (-2.03, -0.28)	0.34 (0.14, 0.80)	1.05	.01
Multi-PN [Yes]	-0.16 (-1.24, 0.83)	0.85 (0.31, 2.36)	1.37	.75
ACS [Yes]	-1.43 (-2.36, -0.64)	0.24 (0.10, 0.56)	1.05	<.001
Abnormal cytokinesis [Yes]	-1.49 (-4.40, 0.15)	0.23 (0.03, 1.75)	1.01	.15
Direct cleavage [Yes]	-0.30 (-1.17, 0.49)	0.74 (0.33, 1.69)	1.30	.48

336 <sup>a</sup> Coefficient estimate

337 <sup>b</sup> 95% confidence interval

338 <sup>c</sup> Adjusted odds ratio

339 <sup>d</sup> Variance inflation factor

340

341 **第 1 卵割のタイミングと割球数及び lag-phase の割球数に関連する因子**

342 多変量解析の結果、第 1 卵割のタイミングは PN が 1 個の胚と ACS に関連すること  
 343 がわかった (表 8)。PN が 1 個の胚 (図 17A) または ACS を有する胚 (図 17B) の第 1 卵  
 344 割のタイミングは、これらの異常がない胚に比べて有意に遅かった (それぞれ  $P = .008$   
 345 及び  $P < .001$ )。第 1 卵割後に観察された 3 個以上の割球 (direct cleavage) は、multi-PN  
 346 と関連していた (表 9)。図 17C に示すように、direct cleavage を起こした胚の 47.6% が  
 347 multi-PN を有していたのに対し、2 割球胚の 5.6% だけが multi-PN を有していた。興味  
 348 深いことに、multi-PN 胚では 2 つの PN のみが syngamy (雌雄前核の結合) に関与し、そ  
 349 れぞれの位置で紡錘体を形成し、direct cleavage を起こした (図 17F)。Lag-phase 開始時  
 350 の割球数は、multi-PN 数及び ACS と関連していた (表 10)。Lag-phase に 3–5 個及び 6–8  
 351 個の割球をもつ胚のうち、multi-PN をもつ胚はそれぞれ 6.2% 及び 11.5% であり、9–16  
 352 個の割球もつ胚の 29.2% が multi-PN を有していた (図 17D)。一方、lag-phase に 6–8 個  
 353 及び 9–16 個の胚盤胞を持つ胚のうち、第 1 卵割時に ACS を生じたのはそれぞれ 12.4%  
 354 及び 16.7% であり、3–5 個の胚盤胞を持つ胚では 23.5% が ACS を受けた (図 17E)。これ  
 355 らの結果は、MKIs は PN 数や ACS に強く影響されることを示している。

356 表 8 多変量回帰分析による第 1 卵割のタイミングに関連する因子の探索

Variables	Estimate (95% CI)	VIF	P-value
(Intercept)	31.80 (30.60, 33.00)	–	<.001
0 PN [Yes]	2.45 (0.11, 4.80)	1.11	.04
1 PN [Yes]	4.44 (2.42, 6.47)	1.11	<.001
Multi-PN [Yes]	-0.75 (-3.33, 1.82)	1.45	.56
ACS [Yes]	4.99 (3.22, 6.76)	1.14	<.001
Abnormal cytokinesis [Yes]	2.11 (-0.78, 5.00)	1.07	.15
Direct cleavage [Yes]	0.71 (-1.40, 2.83)	1.34	.51

357

358 表 9 第 1 卵割終了時の direct cleavage に関連する因子の探索

Variables	Estimate (95% CI)	OR <sub>adj</sub> (95% CI)	VIF	P-value
(Intercept)	-1.95 (-2.44, -1.50)	–	–	<.001
0 PN [Yes]	0.64 (-0.19, 1.42)	1.89 (0.85, 4.19)	1.16	.12
1 PN [Yes]	-0.53 (-1.55, 0.35)	0.59 (0.23, 1.50)	1.10	.27
Multi-PN [Yes]	2.67 (1.97, 3.42)	14.44 (7.00, 29.81)	1.18	<.001
ACS [Yes]	0.36 (-0.28, 0.98)	1.43 (0.76, 2.68)	1.12	.27
Abnormal cytokinesis [Yes]	-0.21 (-1.35, 0.82)	0.81 (0.28, 2.37)	1.06	.70

359

360 表 10 Lag-phase の割球数に関連する因子の探索

Variables	Estimate (95% CI)	OR <sub>adj</sub> (95% CI)	VIF	P-value
3–5   6–8	-0.53 (-0.92, -0.15)	0.59 (0.40, 0.86)	–	.006
6–8   9–16	2.25 (1.72, 2.77)	9.45 (5.59, 16.00)	–	<.001
0 PN [Yes]	0.57 (-0.23, 1.37)	1.76 (0.79, 3.92)	1.13	.17
1 PN [Yes]	-0.18 (-0.90, 0.54)	0.83 (0.41, 1.71)	1.10	.62
Multi-PN [Yes]	1.85 (0.71, 3.00)	6.39 (2.03, 20.00)	1.71	.001
ACS [Yes]	-0.89 (-1.65, -0.14)	0.41 (0.19, 0.87)	1.09	.02
Abnormal cytokinesis [Yes]	0.36 (-1.76, 2.47)	1.43 (0.17, 11.90)	1.02	.74
Direct cleavage [Yes]	-0.38 (-1.22, 0.46)	0.68 (0.29, 1.59)	1.63	.38

361

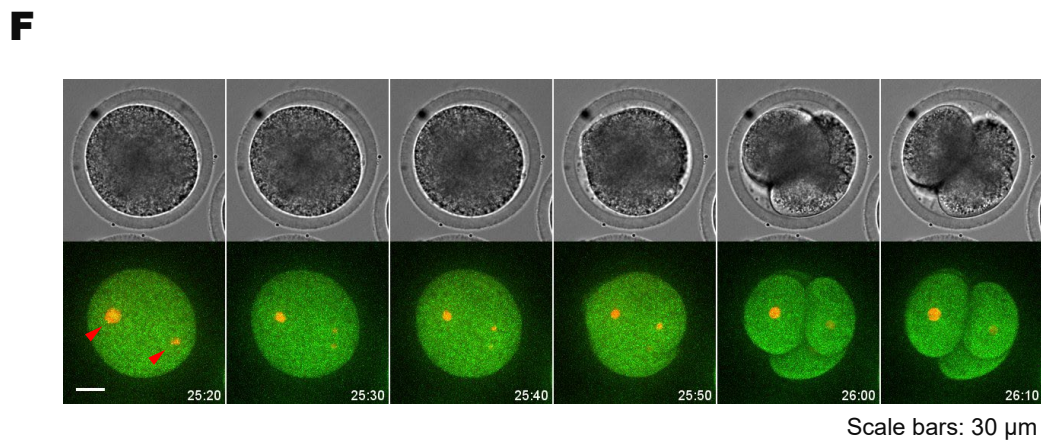
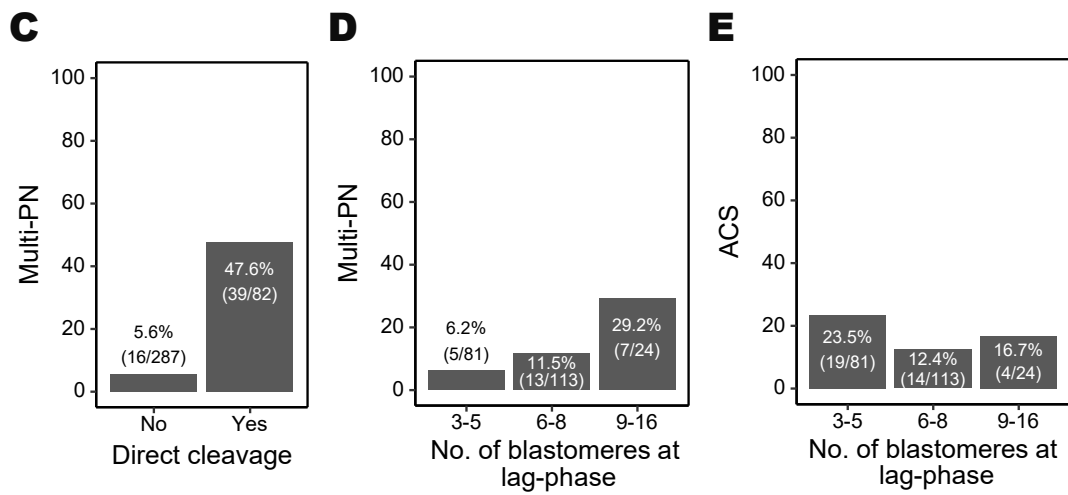
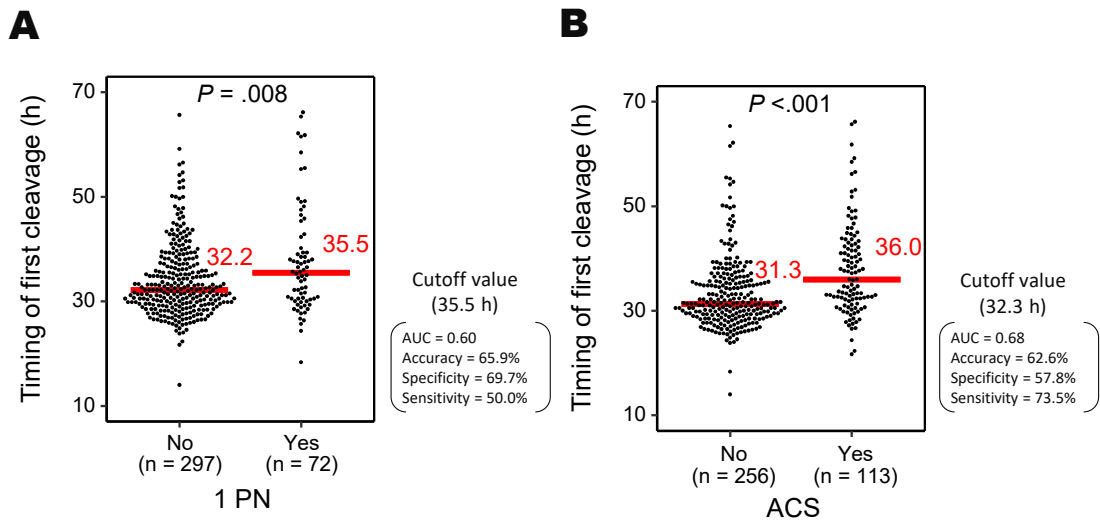


図7 形態動態指標 (morphokinetic indicators, MKIs) と PN 数及び ACS との関係  
1 PN 胚もしくは ACS 胚とそれ以外の胚における、第1卵割のタイミングをそれぞれ (A) 及び (B)、direct cleavage と multi-PN、lag-phase の割球数と multi-PN 及び ACS の関係をそれぞれ (C)、(D) 及び (E) に示した。Multi-PN 胚は、近傍の2つのPNのみが syngamy に関与し、それぞれの位置で紡錘体を形成し direct cleavage を起こした (F)。赤矢頭は M 期染色体を示す。スケールバーは 30  $\mu\text{m}$ 。

363

#### 364 形態学的に移植可能と判定された胚の品質と核・染色体異常との関係

365 形態学的に移植可能と判定された胚盤胞における核・染色体異常の頻度を調べた。

366 IETS 基準によると、ACS、PN 数異常、及び ACS と PN 数異常の両方を示した胚盤胞

367 の集団は、それぞれ 7.3%、36.4%、1.8%であった (図 18A)。一方、MKIs で評価した胚

368 盤胞では、ACS が 7.3%、PN 数異常が 26.8%であった (図 18A)。興味深いことに、

369 IETS 基準では 9.1%の胚盤胞に multi-PN が認められたが、MKIs による評価では multi-

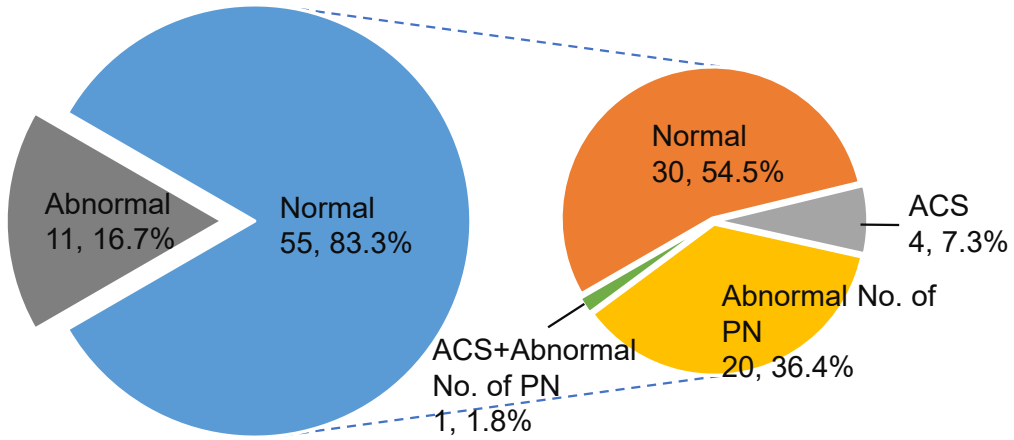
370 PN の胚盤胞は認められなかった (図 18B)。したがって、MKIs を用いた胚の品質評価

371 により、multi-PN 胚を選択するリスクを低減できる可能性がある。いずれにせよ、

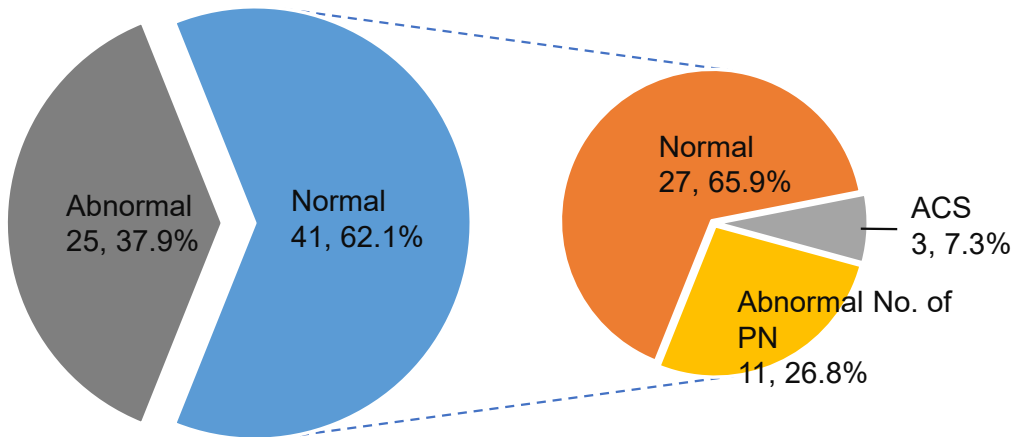
372 IETS 基準及び MKIs で核/染色体異常胚を見分けるのは困難であることがわかった。

**A**

**IETS**



**MKIs**



**B**

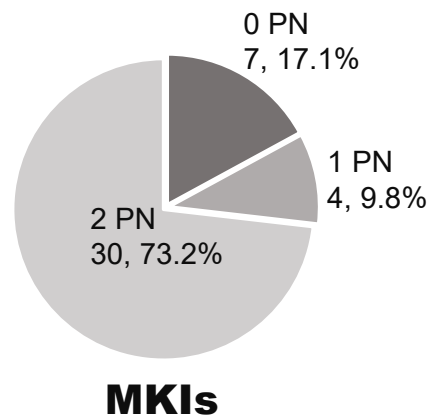
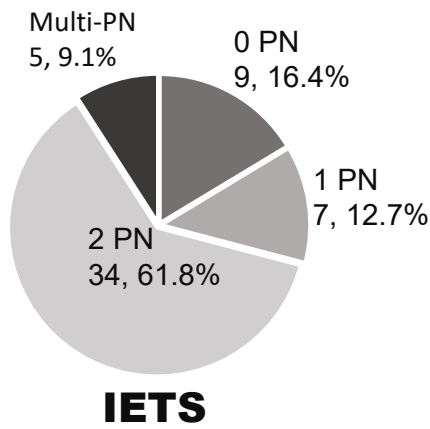


図 8 国際胚移植学会 (International Embryo Transfer Society, IETS) の基準及び MKIs に  
より移植可能 (正常) と判定された胚盤胞の異常 PN 及び ACS の頻度

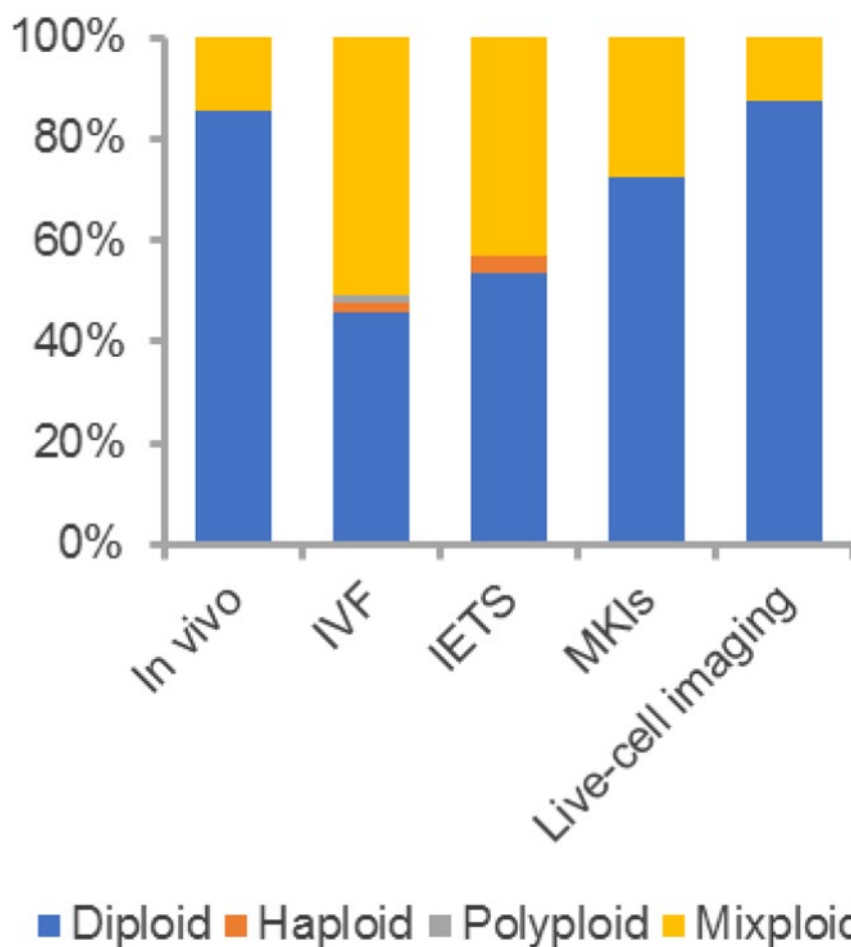
IETS の基準では、コード 1 及び 2 を正常と定義した。MKIs の基準では、受精後  
32.3 時間以内に第 1 卵割を起し、第 1 卵割後の割球数が 2 個、lag-phase 開始時の  
割球数が 6-8 個の胚盤胞を正常と定義した。右の円グラフは、形態学的に正常と判  
定された胚盤胞のうち、PN 数異常または ACS を有する胚盤胞の集団を示す (A)。  
IETS 基準または MKIs で正常と判定された胚盤胞のうち、前核期の 0 PN、1 PN、2  
PN、multi-PN の割合を示す (B)。

374

### 375 胚の評価法と胚盤胞の倍数性との関係

376 体内由来胚盤胞、IVF 由来胚盤胞、IETS、MKIs、ライブセルイメージングで選択し  
377 た IVF 由来胚盤胞をギムザ染色による核型分析したところ、ライブセルイメージング  
378 で選択した胚盤胞の正倍数性が最も高く、*in vivo* 由来胚盤胞に近い値であった (図  
379 19)。

380



381

図9 *In vivo* 及び *in vitro* 由来胚盤胞の倍数性  
 体内由来胚盤胞 (*in vivo*: n = 14)、IVF 由来胚盤胞 (IVF: n = 61)、それぞれ IETS、MKIs、ライブセルイメージングで選択した IVF 由来胚盤胞 (IETS: n = 28、MKIs: n = 29、Live-cell imaging: n = 8) をギムザ染色により核型分析した。IETS は、コード 1 とコード 2 の胚盤胞を選択した。MKIs では、IVF 後 32.3 時間以内に第 1 卵割し、卵割後の割球数が 2 個、かつ lag-phase の割球数が 6 個の胚盤胞を選択した。ライブセルイメージングでは、2 個の前核を有し第 1 卵割後の割球数が 2 個で、染色体分配と細胞質分裂に異常がなく、かつ lag-phase で 6 個の割球であった胚を選択した。

382

383 **第4項 考察**

384 ヒトの ART では、PN 数が胚の発生能力を予測するための重要な条件である。しか  
 385 し、ウシ胚の細胞質は脂質が豊富で褐色のため、明視野顕微鏡による PN の観察は困  
 386 難であった。本研究では、Histone H2B-mCherry により PN 数を判別することができ



387 た。PN 数異常胚は、2 PN 胚と比較して高頻度に胚発生に異常が認められた。具体的  
388 には、胚盤胞到達率は 0 PN、1 PN、2 PN、multi-PN でそれぞれ 18.0% (9/50)、9.7%  
389 (7/72)、22.4% (43/192)、12.7% (7/55) であった (表 4)。PN が 1 個や 3 個以上など、異常  
390 な数の PN を持つ胚の発生能力が低いことは、以前のヒトの研究で報告されたことと  
391 一致していた (Yao *et al.*, 2016)。異常な数の PN を持つ胚は、IVM/IVF が適切に進行し  
392 なかった結果である可能性がある (Coy *et al.*, 2008; Tšuiiko *et al.*, 2017)。

393 体外胚発生中の ACS は、マウス ART において胚の生存性の評価に有効であること  
394 が示されている (Mizutani *et al.*, 2012; Yamagata *et al.*, 2009a)。ウシ IVF 胚にオカダ酸を  
395 加えて重度の ACS を誘導すると、その後の発育が低下した (表 5 及び表 6)。ACS は  
396 通常のウシ IVF 条件下の胚でも卵割時に観察され、胚盤胞への発生能力が低下した。

397 第 1 卵割タイミングの遅れが胚盤胞形成と妊娠成立に関与することはよく知られて  
398 いる (Booth *et al.*, 2007; Sugimura *et al.*, 2012; Sugimura *et al.*, 2017a; Wong *et al.*, 2010)。

399 我々は、第 1 卵割の遅延と ACS の関係を観察した。ブタ胚を用いた研究では、二本鎖  
400 DNA 切断と胚の卵割遅延及び胚盤胞形成の低下との間に相関関係が認められている  
401 (Bohrer *et al.*, 2015)。体細胞では、ACS 中にしばしば観察される微小核は、二本鎖  
402 DNA 切断を含む DNA 損傷によって形成され、DNA 修復のために紡錘体チェックポイ  
403 ント (spindle assembly check point, SAC) によって有糸分裂の遅延と延長が引き起こされ  
404 る (Ganem and Pellman, 2012)。したがって、第 1 卵割のタイミングが遅れるのは、受精  
405 の前後で DNA 損傷によって SAC が活性化された結果かもしれない。

406 以前の研究では、第 1 卵割時に 3–4 個の細胞に直接卵割 (direct cleavage) した胚は染  
407 色体異常の発生率が高く、移植後の生存率が低いことが報告されている (Kola *et al.*,

408 1987; Sugimura *et al.*, 2012; Sugimura *et al.*, 2017a)。本研究では、direct cleavage に multi-  
409 PN 数が関与していることを確認した。ヒト胚の研究でも、ほとんどの 3 PN が 3 つの  
410 割球に分裂することが報告されている (Kola *et al.*, 1987)。Direct cleavage の約半数は  
411 multi-PN 胚であったが、2 割球の胚では multi-PN はほとんど観察されなかった。この  
412 ように、第 1 卵割後の割球数は multi-PN を予測するのに有用であると考えられる。

413 Lag-phase (第 4-5 細胞周期に認められる胚発生の一時的休止期) は、ウシの胚性ゲノム  
414 活性化に対応する。杉村らは、lag-phase における割球数の少なさが、胚盤胞における  
415 アポトーシスの発生率の高さと関連していることを示した (Sugimura *et al.*, 2012)。今  
416 回、表 10 及び図 17E の解析から、ACS と lag-phase の割球数の少なさとの関係が明ら  
417 かになった。二本鎖切断などの DNA 損傷が ACS を引き起こし (Yamagata *et al.*,  
418 2009a)、胚のアポトーシスを誘導する可能性が報告されており (Wang *et al.*, 2013)、こ  
419 れがアポトーシスが頻発する原因である可能性がある。

420 本研究では、形態学的に移植可能と判定された胚に ACS や異常 PN 数などの核・染  
421 色体異常が観察された。このように、形態学的評価のみでは、核・染色体異常を判断  
422 することは難しいかもしれない。実際、胚盤胞の核型分析から、mixploidy の率は *in*  
423 *vivo* 胚の 14.3% (2/14) 及びライブセルイメージングにより選択された胚の 12.5% (1/8)  
424 であったのに対し、IETS 及び MKIs により選択された胚では、それぞれ 42.9% (12/28)  
425 及び 27.6% (8/29) であった (図 19)。興味深いことに、multi-PN 胚は MKIs で選択された  
426 胚に含まなかったことから、IETS 基準のような形態学的「スナップショット」評価  
427 の代わりに、time lapse cinematography で胚発生をモニタリングすることで、ヒト ART  
428 において移植対象から除外されている multi-PN 胚をウシでも除外できる可能性がある

429 (Yao *et al.*, 2016)。

430 結論として、このライブセルイメージング技術は、核/前核が可視顕微鏡で観察で  
431 きないウシ胚において、核/染色体の動態と胚発生の関連を分析するのに有用であると  
432 考えられる。

## 433 第2節 ウシ着床前胚の核・染色体ライブセルイメージング技術の検証

### 434 第1項 緒言

435 ヒトやウシの ART において、染色体異数性の頻度が高いことが報告されており、胚  
436 に関連する妊娠喪失の主な原因となっている可能性がある (McCoy *et al.*, 2015; Tšuiiko *et*  
437 *al.*, 2017; Vanneste *et al.*, 2009b)。ほとんどの異数性は着床前胚の有糸分裂の際に生じる  
438 ことがよく知られている (Vanneste *et al.*, 2009b)。有糸分裂に起因する異数性は、胚発  
439 生初期の染色体不安定性による ACS に起因すると考えられているが、その発生機序や  
440 起源については詳しく分かっていない (Destouni *et al.*, 2016; Vanneste *et al.*, 2009a)。

441 我々のグループでは、マウスモデルを用いて、Histone H2B-mCherry を用いたライブ  
442 セルイメージングにより、初期卵割時の ACS とその後の胚発生との関係を解析した  
443 (Mashiko *et al.*, 2020)。その結果、発生初期において重篤な ACS が認められた胚は胚盤  
444 胞到達率が低下するが、胚盤胞まで到達した ACS 胚を移植すると生まれうることが示  
445 された (Mashiko *et al.*, 2020)。しかしながら、ヒトやウシのような非げっ歯類哺乳動物  
446 における、初期卵割時の ACS の重篤度とその後の胚発生との関係は不明である。

447 ウシは、ヒトに次いで ART を利用している哺乳類である。げっ歯類とは異なり、ヒ  
448 トとウシは卵子の大きさ、受精における精子中心体の機能、着床前胚の発生動態にお  
449 いて類似している (Cavazza *et al.*, 2021; Suzuki *et al.*, 2021)。しかし、ヒト胚を用いた研  
450 究には、倫理的配慮や利用可能な生物学的材料の不足などの限界がある。したがっ  
451 て、ウシは染色体異数性に起因する ART 失敗を理解するための貴重な情報を提供する  
452 優れたモデルとなり得る。我々は前節で、ウシの核/染色体ダイナミクスを可視化する  
453 ための長期ライブセルイメージング技術を構築した (Yao *et al.*, 2018b)。そこで本節で

454 は、ウシの着床前胚発生において、初期卵割時の ACS の重篤度を評価し、その後の胚  
455 発生と産仔獲得能を評価した。

456

## 457 **第2項 材料及び方法**

### 458 **倫理声明**

459 本研究は、東京農工大学及び国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の  
460 実験動物委員会により承認された。

461

### 462 **化学物質**

463 メーカーを記載していない化学物質は Sigma-Aldrich から購入した。

464

### 465 **卵子採取**

466 黒毛和種及び黒毛和種×ホルスタイン種の卵巢を食肉処理場から取得し、小卵胞 (直  
467 径 2-6 mm) から COCs を吸引した (Sugimura *et al.*, 2010)。

468

### 469 **卵子の輸送及び IVM**

470 第3章第1節第2項の卵子の輸送及び体外成熟 (in vitro maturation, IVM) を参照。

471

### 472 **IVF**

473 第3章第1節第2項の IVF を参照。

474

## 475 mRNA の作製

476 Histone H2B-mCherry をコードする mRNA の調製は、第 3 章第 1 節第 2 項の mRNA  
477 の作製を参照。

478

## 479 受精卵への mRNA のマイクロインジェクション

480 第 3 章第 1 節第 2 項の受精卵への mRNA のマイクロインジェクションを参照。ただ  
481 し、前節とは異なり、本節では EGFP- $\alpha$ -tubulin をコードする mRNA はインジェクシ  
482 ョンしなかった。

483

## 484 ライブセルイメージング

485 胚がイメージング中に移動して視野から外れるのを防ぐため、高分子フリーの培地  
486 では胚が部材に貼り付く性質を利用して胚を固定した。まず、タンパク質 (BSA 及び  
487 CS) フリーの CR1aa を 2.5  $\mu$ L ずつ一体成型フィルムボトムディッシュの底に滴下し、  
488 胚を入れてガラスキャピラリーの先端で整列させた後、タンパク質を倍量 (10% CS 及  
489 び 0.6% BSA) 含む CR1aa を 2.5  $\mu$ L ずつ追加した。ディッシュは、6% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、  
490 89% N<sub>2</sub>、飽和湿度、38.5°C に設定したインキュベーションチャンバーを備えたボック  
491 ス型共焦点レーザー顕微鏡 (CV1000; Yokogawa Electric Corp., Tokyo, Japan) 内に設置  
492 し、以下のパラメーターで、10 分間隔で 4 日間、三次元撮影した。Histone H2B-  
493 mCherry の励起波長 561 nm、蛍光波長 617/73 nm、レーザー出力 0.10 mW、露光時間  
494 100 ms、ゲイン 100%、z 範囲 120  $\mu$ m、スライス数 25。なお、観察前には光パワーメ  
495 ータを用いてレンズ直上のレーザーパワーを測定し、励起光の出力を調整した。

496 ライブセルイメージング後、胚を 5% CS と 0.3% BSA を添加した CR1aa で数回洗浄  
497 し、125  $\mu$ L の 5%CS と 0.3% BSA を添加した CR1aa を入れたマイクロウェル培養ディ  
498 ッシュ (LinKID micro25; Dai Nippon Printing, Kashiwa, Japan) に入れた (Sugimura *et al.*,  
499 2010). 胚は、6% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、89% N<sub>2</sub>、飽和湿度、38.5°C に設定したインキュベータ  
500 ー (Astec) でさらに 4 日間培養した。

501

## 502 画像解析

503 2D/3D 画像は、ImageJ/Fiji 画像解析プラットフォーム (Schindelin *et al.*, 2012) を用い  
504 て構築した。これらの画像をレトロスペクティブに解析し、第 1、2、3 卵割の ACS を  
505 調べた。本節では、前核が 2 つある胚を解析対象とした。

506

## 507 ガラス化及び融解

508 ライブセルイメージングで観察した 7-8 日目の胚盤胞を、Cryotop ガラス化キット  
509 (VT-505; Kitazato BioPharma, Shizuoka, Japan) を用いて、製造元の指示に従ってガラス化  
510 し、液体窒素中に保存した。胚は、製造元の説明書 (VT-506) に従って融解し、20% 牛  
511 胎児血清 (CELLect fetal bovine serum gold; MP Biomedical, Ohio, USA) を添加した 25 mM  
512 HEPES 緩衝 TCM199 で 60 分間回復培養した。

513

## 514 胚移植及び妊娠診断

515 レシピエントは黒毛和種を用いた。胚移植は 8 日目 (0 日目 = 発情開始) に訓練され  
516 た技術者により行われた。胚は、IETS が推奨する形態学的品質コード 1 または 2 に基

517 づいて選択された。胚は、0.25 mL のプラスチック製ストローに装填し、ウシ胚用子宮  
518 深部注入カテーテル (YT gun, YAMANETECH, Nagano, Japan) で非外科的に卵胞黄体を  
519 有する卵巢と同側の子宮角に移植した (レシピエントあたり 1 個の胚を移植)。妊娠の  
520 診断は、30–40 日目及び 60–70 日目 (それぞれ胚移植 21–31 日目及び 53–63 日目以降)  
521 に超音波検査で胎児心拍を観察した。

522

### 523 PCR

524 Histone H2B-mCherry mRNA プローブを注入した胚に由来する子牛の各臓器を 1 cm  
525 角に切断し、凍結保存した。子牛から血液サンプル 10 mL を採取した。これらを溶解  
526 バッファー (50 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, 0.1 mg/mL  
527 proteinase K, 0.08 mg/mL RNase A) に入れ、50°C で一晩インキュベートした。抽出し  
528 たゲノム DNA をフェノール-クロロホルムで 2 回処理し、エタノール沈殿させた。  
529 Tris-EDTA (TE) に溶解後、DNA 濃度を 0.3 µg/µL に調整した。12.5 µL の PCR 反応液  
530 (KOD Fx Neo; TOYOBO) に対して 1 µL の DNA 溶液を使用した。PCR は、94°C で 3 分  
531 間、94°C で 30 秒間、65°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間のサイクルを 40 回繰り返した。  
532 使用したプライマーセットは、mCherry の増幅には 5'-  
533 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG-3'及び 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGCC-  
534 3'、PCR コントロールとしての GAPDH の増幅には 5'-  
535 ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACGG-3'及び 5'-GCAAGACCACAGGGCTGCAGCT-3'を用  
536 いた。pcDNA3.1-H2B-mCherry プラスミド及びイメージング (-) ウシ筋肉を、それぞれ  
537 陽性及び陰性対照として使用した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で泳動・可視



538 化した。

539

#### 540 ウェスタンブロッティング

541 凍結した臓器サンプルを 5 mm 角に切り、タンパク質抽出バッファー (9 M 尿素及び  
542 30 mM DTT) を加えてホモジナイズした。サンプルをローディングバッファーと混合  
543 し、電気泳動のために SDS-ポリアクリルアミドゲルにロードした。タンパク質を  
544 PVDF 膜に転写し (Trans-Blot Turbo Mini 0.2  $\mu$  m PVDF Transfer Packs; Bio-Rad, Hercules,  
545 CA)、Tris 緩衝生理食塩水/3% ウシ血清アルブミン/0.1% Tween 20 でブロッキングし  
546 た。PVDF 膜は、1:3000 に希釈した抗 mCherry ウサギ mAb (Cell Signaling Technology,  
547 MA, USA) と 1:2500 に希釈した抗 GAPDH マウス mAb と 4°C で一晩インキュベート  
548 し、続いて 1:5000 に希釈したヤギ抗ウサギ IgG IRDye™ 800 (Abcam, MA, USA) 及び  
549 1:5000 に希釈したヤギ抗マウス IgG StarBright700 (Bio-Rad) と室温で 1 時間インキュベ  
550 ートした。その後、PVDF 膜を 0.1% Tween 20 を含む Tris 緩衝生理食塩水で洗浄し、  
551 Fusion FX イメージングシステム (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) を用いてスキ  
552 ャンした。

553

#### 554 統計解析

555 全ての統計解析は R 統計ソフト version 4.0.5 もしくは version 4.3.1 (R Core Team,  
556 2020) を用いて行った。特に指定のない限り、使用した関数は全て stats パッケージの  
557 ものを利用した。各ステージにおける発生率は、カイ 2 乗検定を用いて重症度 0 と比  
558 較した。多重検定の補正には holm 法を用いた。卵割のタイミングは Steel 検定を用い

559 て重症度 0 と比較した。  $P < .05$  を統計的に有意とみなした。

560

### 561 第3項 結果

#### 562 ウシ IVF 胚ライブセルイメージング条件の改良

563 ヒトやウシを含む非げっ歯類哺乳類では、初期卵割時の ACS とその後の胚発生との  
564 関係はまだ解明されていない。そこで我々は、ウシの着床前胚における染色体分配の  
565 ダイナミクスを非侵襲的にイメージングできる技術を前節で開発した。

566 前節では、488 nm で励起する EGFP- $\alpha$ -tubulin と 561 nm で励起する Histone H2B-  
567 mCherry を用いて、核/染色体ダイナミクスを可視化することに成功した。しかし、488  
568 nm 励起の光毒性は 561 nm 励起よりも高いことが報告されている (Hatano *et al.*, 2022)。  
569 本研究では、胚への光毒性を軽減するため、Histone H2B-mCherry のみを注入し、核/染  
570 色体を可視化した。488 nm と 561 nm の両方の励起波長を照射した場合の胚盤胞形成  
571 率は 17.9%であったが、561 nm 単独では 21.5%と高い傾向にあった (表 11)。

572

573 表 11 異なる波長でライブセルイメージングを行った際のウシ IVF 胚の胚盤胞形成率

Probe	Excitation (nm)	No. of cultured	No. of blastocyst (%)	Reference
Histone H2B-mCherry and EGFP- $\alpha$ -tubulin	561, 488	369	66 (17.9)	(Yao <i>et al.</i> , 2018b)
Histone H2B-mCherry	561	311	67 (21.5)	Present study

574

575

576 ACS の重篤度 (severity) と着床前胚発生能との関連性

577 第 1 卵割期、第 2 卵割期、第 3 卵割期、及び第 1-3 卵割期の ACS の severity (図 20A,  
578 B) 及び頻度と胚盤胞における ACS の割合 (図 20C)、及び ACS の severity とその後の胚  
579 発生を解析した (図 20D)。マウスの研究と同様に、metaphase における染色体の配列異  
580 常 (misalign chromosome) と anaphase における染色体分配の遅延 (lagging chromosome)  
581 が観察された (図 20B) (Mashiko *et al.*, 2020)。これらの ACS は severity に応じて 4 つの  
582 カテゴリーに分類した (図 20B)。各卵割期において、28%、45%、39%の胚が ACS を  
583 起こし、67%の胚は第 3 卵割までに 1 回以上 ACS を起こした。さらに、ACS を起こし  
584 た胚の約 70%が severity2 及び 3 であり、微小核が認められた。ACS を持つ胚の発生率  
585 は、染色体分配が正常な胚よりも低かった (図 20D)。ACS の severity 3 のような多発性  
586 あるいは大型の微小核を持つ胚は、胚盤胞期まで発育することはほとんどなく、胚ゲ  
587 ノムが活性化する前と思われる 8 細胞期以前に発育が停止しているようであった (図  
588 20C, D)。

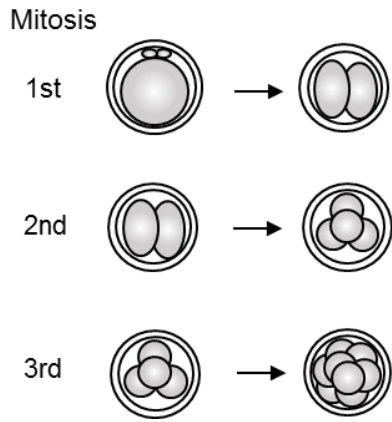
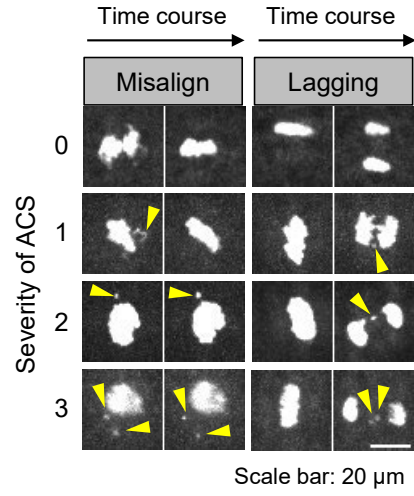
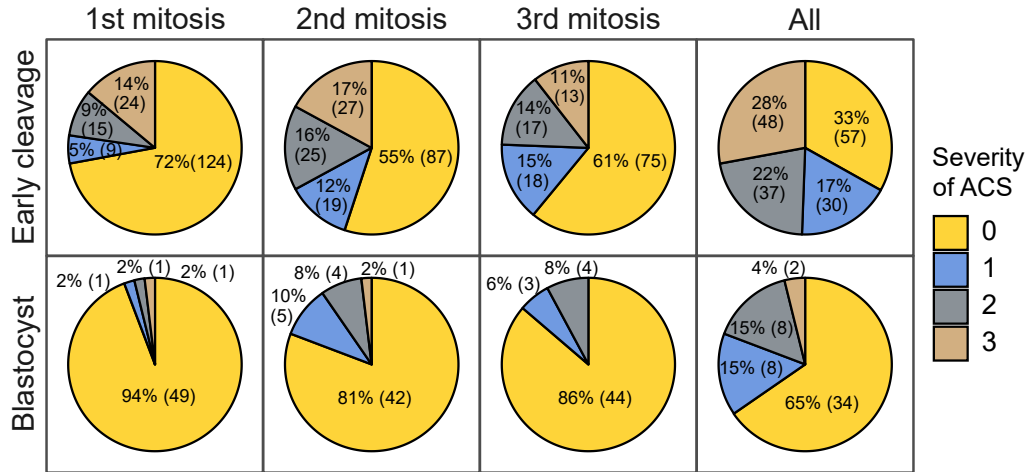
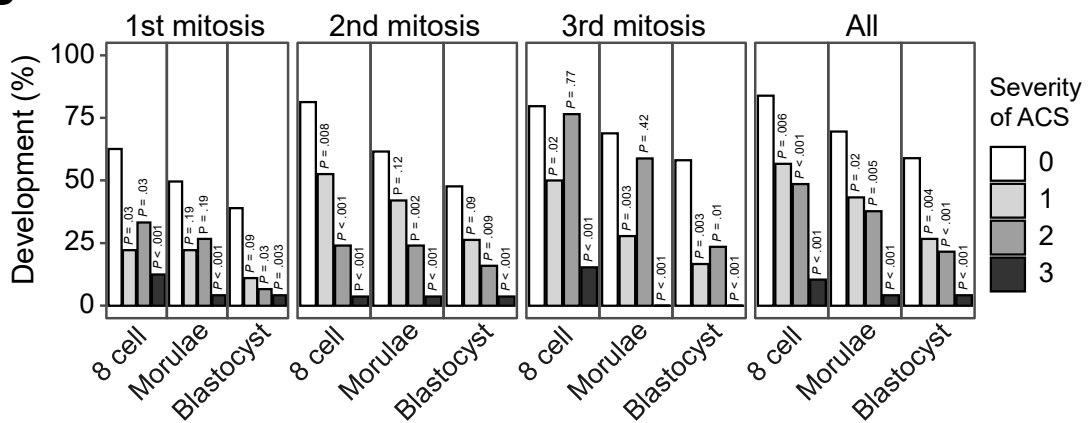
**A****B****C****D**

図 10 第 3 卵割までの ACS の頻度と重篤度 (severity) とその後の *in vitro* 胚発生能  
染色体分配は、第 1 卵割 (1 細胞から 2 細胞)、第 2 卵割 (2 細胞から 4 細胞)、第 3 卵  
割 (4 細胞から 8 細胞) で観察した (A)。左と右の 2 列はそれぞれ、metaphase の  
misalign chromosome と anaphase の lagging chromosome を示す。正常な染色体分配  
(ACS なし) を 0、1 つ以上の染色体が切断されどちらかの核に戻った ACS を 1、微  
小核を伴う ACS のうち 1 つ以上の染色体が完全に分離し 1 つの小さな微小核 (核の  
10%以下) を形成しているものを 2、1 つ以上の染色体が 2 つ以上の微小核もしくは  
1 つ以上の大きな微小核 (核の 10%以上) を形成しているものを 3 と定義した。切断  
された染色体を矢頭で示す (B)。第 1、2、3 卵割期における ACS の頻度 (上段) と  
ACS を持つ胚盤胞の割合 (下段)。「All」は第 1 卵割から第 3 卵割までの ACS の  
severity の最大値 (C)。各卵割期における ACS の severity と、8 細胞期、桑実期、胚  
盤胞期までの胚発生率 (D)。

590

#### 591 ACS の severity と胚発生速度との関連性

592 非げっ歯類では、初期卵割時の ACS と発生動態との関係は不明である。本研究で  
593 は、第 1 卵割期及び第 2 卵割期で複数または大きな微小核形成を引き起こす重度の  
594 ACS が、それぞれ 1 細胞期及び 4 細胞期の発生速度を有意に延長することがわかった  
595 (図 21)。

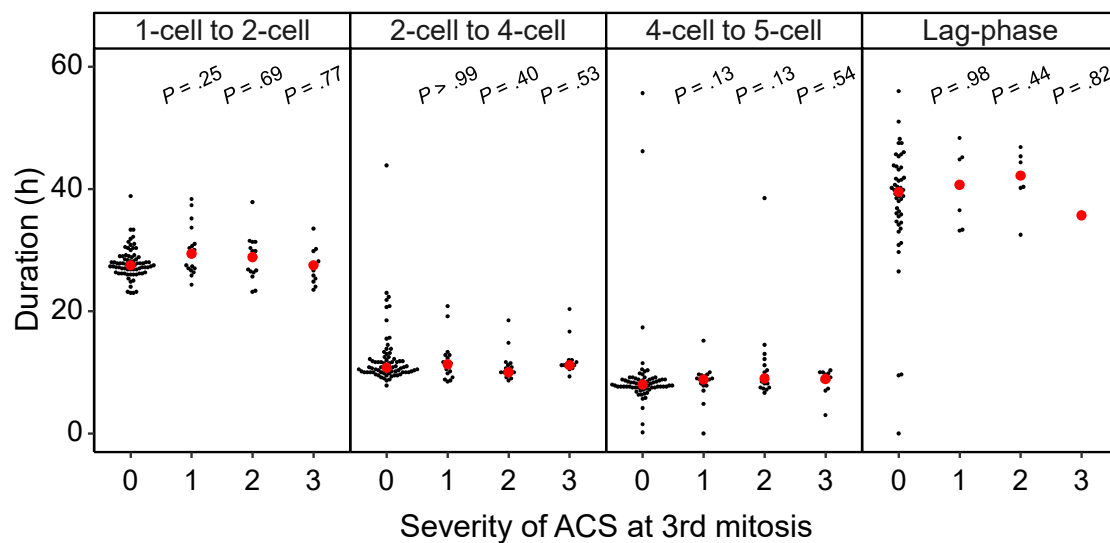
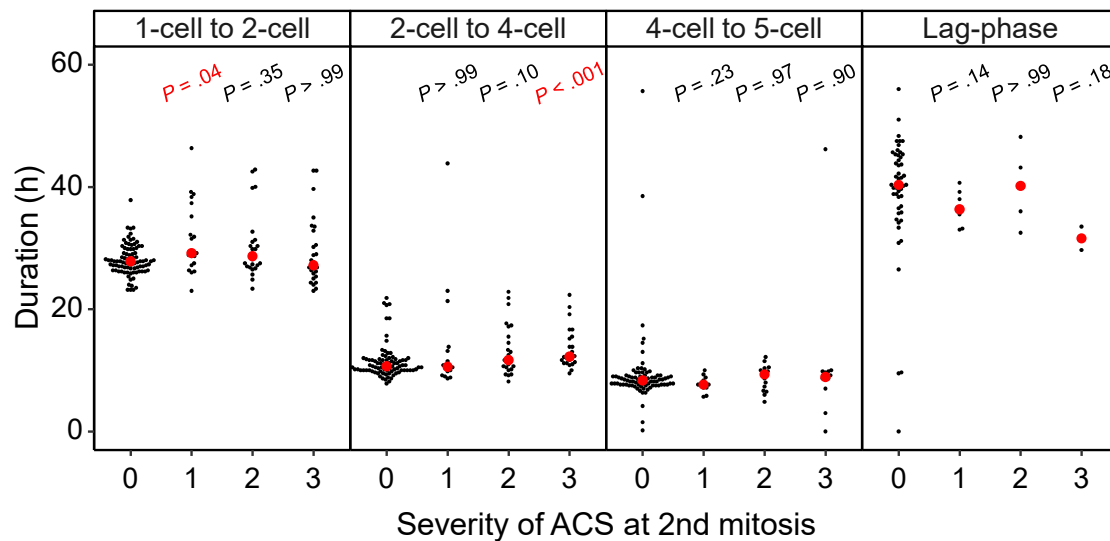
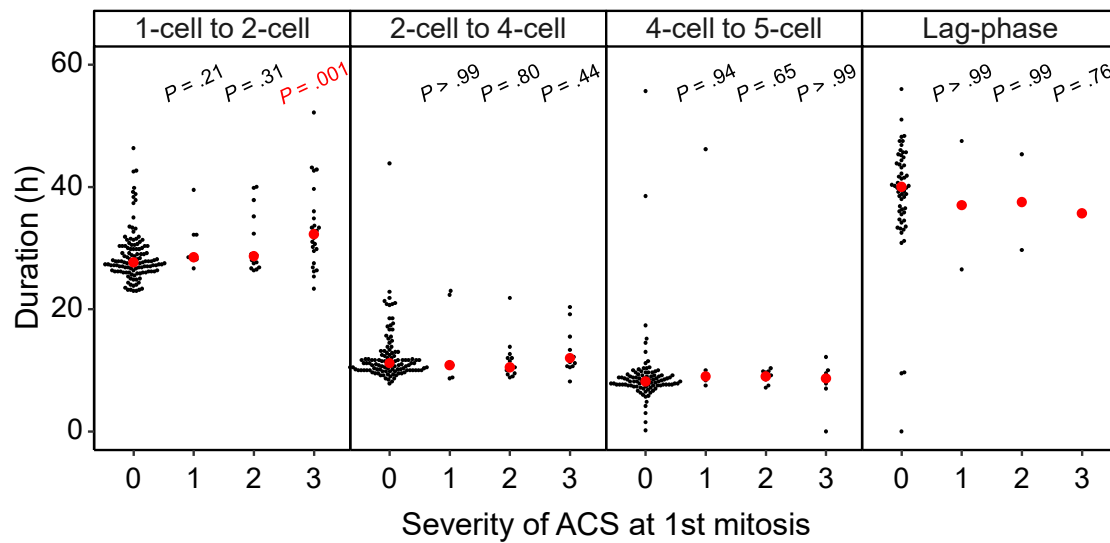


図 11 初期卵割で確認された ACS の severity と発生速度の関係

第 1 卵割 (1 細胞から 2 細胞、上段)、第 2 卵割 (2 細胞から 4 細胞、中段)、第 3 卵割 (4 細胞から 8 細胞、下段) で認められた ACS の severity 別に 1 細胞から 2 細胞、2 細胞から 4 細胞、4 細胞から 5 細胞、lag-phase (第 2 卵割以降に認められる胚の一時休止期) の所要時間 (h) を示した。図中の *P* 値は Steel 検定により severity 0 と比較した

597

#### 598 ライブセルイメージング後のウシ IVF 胚から産仔作出

599 IETS コード 1/2 の胚盤胞のうち、ライブセルイメージングで第 1-3 卵割の間に ACS  
600 が認められなかった胚 7 個と第 2 卵割以降に severity 1 もしくは 2 の ACS が認められた  
601 胚 3 個を、一つずつ計 10 頭のレシピエントに移植した (図 22A 及び B、表 12)。その  
602 結果、40%の確率で形態的に正常な子牛が得られた (表 12、表 13、図 22C)。さらに、  
603 注入したプローブ由来の DNA とタンパク質は、作出した子孫の全ての組織で確認され  
604 なかったことから (図 22D 及び E)、得られた子孫は、過去のマウスを用いた報告と同  
605 様 (Yamagata *et al.*, 2009b)、トランスジェニックではないことが示された。今回、ウシ  
606 の体外受精胚から核/染色体イメージングを用いて、齧歯類以外の動物で初めて子孫を  
607 残すことに成功した (表 12、表 13、図 22A 及び C)。

608 表 12 ウシ体外受精胚の ACS の severity と着床前胚発生及び胚移植の成績

ID	Syngamy	Severity of ACS at mitosis				Stage*1	Quality code*2	Duration (hour)			Pregnancy	Calving	Sex	Gestation period (day)	Birth weight (kg)	Placental weight (kg)
		1st	2nd	3rd	All			1-cell	2-cell	4-cell						
E1	No	0	0	0	0	B	1	26.2	11.7	11.8	Yes	No	—	—	—	—
E2	Yes	0	1	0	1	B	1	27.5	10.7	10.7	Yes	Yes	Male	290	46.5	6.7
E3	Yes	0	0	0	0	EB	2	30.5	10.2	10.5	No	No	—	—	—	—
E4	Yes	0	0	0	0	B	1	27.3	10.8	18.5	No	No	—	—	—	—
E5	Yes	0	0	0	0	B	1	29	10.2	10.7	Yes	Yes	Male	284	37.9	1.32
E6	Yes	0	0	1	1	EB	2	27.3	10	10.2	No	No	—	—	—	—
E7	Yes	0	0	0	0	B	1	27.8	9.3	9.7	Yes	No	Female	—	—	—
E8	Yes	0	0	0	0	B	1	27.2	10.2	10.3	Yes	Yes	Female	285	33.3	—
E9	Yes	0	2	0	2	B	1	27.5	11.3	12.5	Yes	Yes	Female	294	44.4	5.3
E10	Yes	0	0	0	0	B	1	27.5	11	11	No	No	—	—	—	—

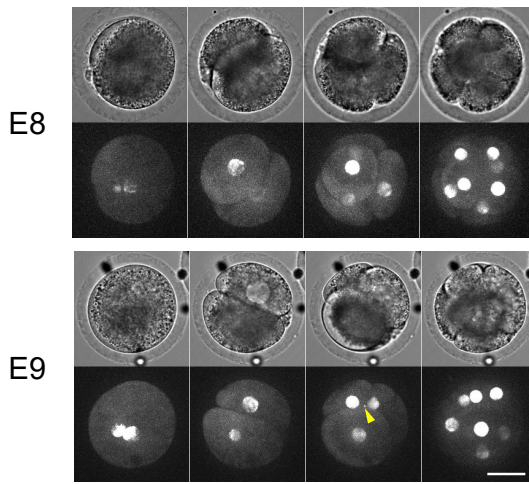
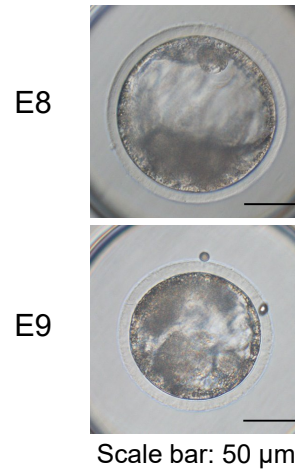
609 \*1 B: blastocyst, EB: early blastocyst

610 \*2 IETS の形態評価



611 表 13 ライブセルイメージングによる胚移植後の妊娠率と分娩率

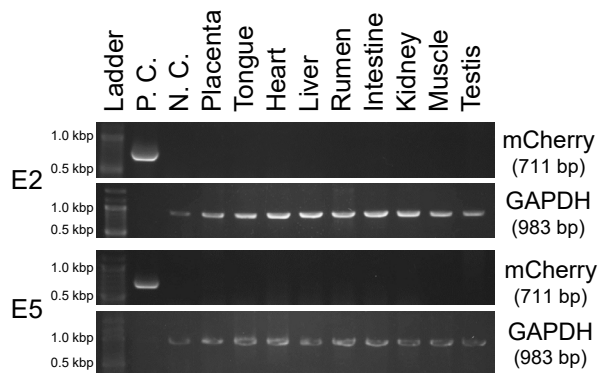
ACS	No. of embryo transferred	No. of pregnancies (%)	No. calving (%)
No	7	4 (57.1)	2 (28.6)
Yes	3	2 (66.7)	2 (66.7)
Total	10	6 (60.0)	4 (40.0)

**A**Scale bar: 50  $\mu$ m**B**Scale bar: 50  $\mu$ m**C**

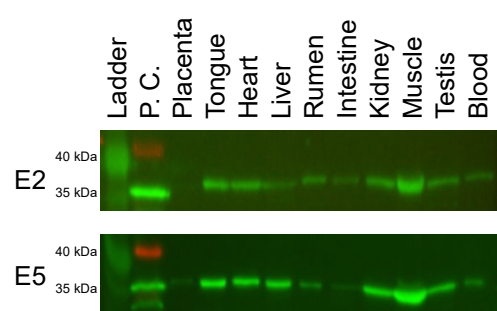
E8



E9

**D**

P. C. : mCherry plasmid  
 N. C. : Imaging (-) bovine muscle

**E**

Red : anti-mCherry antibody  
 Green: anti-GAPDH antibody  
 P. C. : ES cells with Histone H2B-mCherry

図 12 ライブセルイメージングを行ったウシ IVF 胚とそこから生まれた子牛  
ライブセルイメージングで得た卵割中のウシ IVF 胚の明視野 (上段) 及び蛍光 (下段)  
タイムラプス画像 (A) と胚盤胞の明視野画像 (B)、及びレシピエントに移植して生  
まれた子牛 (C)。E8 は卵割中に ACS が確認されなかった胚、E9 は 2 回目の有糸分  
裂で ACS (severity 2) が確認された胚。矢頭は微小核を示す。E8 及び E9 に由来する  
子孫は、それぞれ Chromosome から "Chromo" 及び "Some" と命名した。これらの写真  
はそれぞれ生後 7 日目と 15 日目のものである。バーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。注入したプ  
ローブである mCherry の DNA とタンパク質を子牛の各組織で確認した結果 (D,  
E)。各組織は E2 及び E5 に由来する雄の子牛から採取した。

613

#### 614 第4項 考察

615 ウシ胚のイメージング耐性はマウス胚よりも高いと言われているが (Ross *et al.*,  
616 2006)、産子を得ることを目的にした場合、毒性の高いことが明らかになっている 488  
617 nm の短波長の励起光照射 (表 3) (Hatano *et al.*, 2022) は避けるべきである。

618 マウスの研究では、第 3 卵割までの ACS の頻度は 75% で、そのうち 38% に微小核が  
619 認められ第 1 卵割での出現はまれであったことから (Mashiko *et al.*, 2020)、ウシ胚はげ  
620 っ歯類胚よりも重篤な ACS を起こしやすいことが示唆される。マウス胚とは異なり、  
621 ウシやヒト胚は、セントロソーム、ダイニン、微小管、核膜複合体によって駆動され  
622 る雌雄前核内での親ゲノムのクラスタ化 (雌雄前核界面へのゲノムの濃縮) が ACS のな  
623 い細胞分裂に必要であるが、その行程でエラーが生じやすいことが報告されている  
624 (Cavazza *et al.*, 2021)。

625 ACS を有する胚の初期卵割における発生能は、染色体分配が正常な胚よりも低かつ  
626 た (図 20D)。これは増子らによるマウス研究の結果と同様である (Mashiko *et al.*,  
627 2020)。ACS の severity 3 のような複数あるいは大きな微小核を持つ胚は、胚盤胞期ま  
628 で発育することはほとんどなかった (図 20C 及び D)。これらの胚の多くは、胚ゲノム  
629 が活性化する前の 8 細胞期以前に発育が停止していた。このことは、ヒトやウシの

630 ART 由来胚における着床前胚喪失率の高さと、初期卵割時の微小核形成との関係を強  
631 く示唆している (Ferré *et al.*, 2020; Hardy *et al.*, 2001; Wilcox *et al.*, 2020)。初期卵割時の  
632 微小核の出現は、モザイクを含む染色体異数性に関連していることが示唆されている  
633 (Brooks *et al.*, 2022; Mashiko *et al.*, 2020)。言い換えれば、着床前胚の損失は、微小核に  
634 由来する染色体異数性によって引き起こされる可能性がある。ART 由来の胚における  
635 微小核形成の原因とメカニズムについて、さらなる理解が必要である。

636 第 1 分裂期及び第 2 分裂期で多発性または大型の小核形成を引き起こす重度の ACS  
637 が、それぞれ 1 細胞期及び 4 細胞期の期間を有意に延長した (図 21)。このことから、  
638 SAC に依存した細胞分裂の遅延の可能性が示唆された (Cavazza *et al.*, 2021)。このこと  
639 は、マウス初期胚では SAC が染色体の誤凝集に反応しないため、微小核形成が卵割速  
640 度に影響を及ぼさないことが示されているマウスモデルと矛盾する (Vázquez-Diez *et*  
641 *al.*, 2016)。一方、ヒトでは、初回有糸分裂期間の延長と染色体異数性との関連が示唆  
642 されている (Vera-Rodriguez *et al.*, 2015)。さらに、ウシの胚で卵割が遅れたものは発生  
643 能力が低いことが報告されており (Suzuki *et al.*, 2021)、微小核形成に伴う ACS による  
644 染色体異数性に関係している可能性がある (Cavazza *et al.*, 2021)。このことは、ヒトに  
645 おいて最初の有糸分裂の期間の延長が異数性のバイオマーカーとなる可能性があるこ  
646 とを説明するかもしれない (Vera-Rodriguez *et al.*, 2015)。

647 杉村らの報告では、可視光のタイムラプスシネマトグラフィーを用いて観察したコ  
648 ード 1/2 胚を移植した場合の妊娠率は 31.8%–59.6%であり (Sugimura *et al.*, 2017a)、ライ  
649 ブセルイメージングは移植後の胚発生において有害ではないことが示唆される。正常  
650 な染色体分配を示す胚を移植した場合、妊娠率と出産率はそれぞれ 57.1%と 28.6%で

651 あった。一方、第2卵割でACSを示した3つの胚のうち2つからは、産子が得られた  
652 (表13、図22C)。マウスモデルの研究では、ACSを持つ胚からの子孫も報告されてお  
653 り、初期卵割でのACSが胚盤胞移植後の発育に必ずしも悪影響を与えないことが示唆  
654 されている (Mashiko *et al.*, 2020)。ACS胚から産子が得られた理由として、染色体異常  
655 のある割球は自己修復機構によって発生中に排除された可能性がある (Bolton *et al.*,  
656 2016; Nagai *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021)。今後、胚移植の回数を増やし、非げっ歯類モ  
657 デル哺乳動物であるウシのACSと移植後の発育の関係を明らかにする必要がある。興  
658 味深いことに、ACSがないにもかかわらず、妊娠確認後に流産した例があった。この  
659 胚の詳細な形態動態を調べたところ、1細胞内で雌雄前核が結合することなく、2つの  
660 割球に割れていた (表12)。ヒトでは、前核の移動とARTの結果との関係が示唆されて  
661 いる (Barberet *et al.*, 2019)。染色体分配だけでなく、前核の移動とその後の発生との関  
662 係を解析することは重要な課題であろう。

663

### 664 第3節 小括

665 本研究では、蛍光共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ウシIVF胚の非侵襲的な長期ラ  
666 イブセルイメージングに成功した。この技術により、ウシ胚の核/染色体ダイナミクス  
667 を最長8日間可視化することができ、PN数やACSがその後の体外胚発生に関与して  
668 いること、PN数の異常やACSを加味して胚を評価することで従来法より高精度に正  
669 倍数性の胚を見分けることができることを明らかにした。また、ウシの着床前胚形成  
670 において、初期卵割時の多発性あるいは大型の微小核形成 (ACSの severity 3) は致命的  
671 な特徴となりうることを確認した。

672 着床前胚の核/染色体ライブセルイメージング法は、PN数の異常やACSとその後の  
673 発生との関係、有糸分裂における染色体異数性の起源、および医療や家畜生産のため  
674 のARTにおける生存可能な胚の作出法と選択法をさらに理解するための強力なツール  
675 となるであろう。

676 第4章 総括

677 本研究では、培養環境改善の指標とするために、胚の質に関与するとされている  
678 ATP と染色体異常を生きのまま観察できる技術を開発し、マウスもしくはウシで検証  
679 した。

680 第3章では、ウシ ART の培養環境の改善の指標とするため、ウシ胚の核/染色体ライ  
681 ブセルイメージング技術を構築した。本技術は、形態学的には判別できない ACS や異  
682 常 PN 数などの核・染色体異常を評価できた。PN 数異常及び ACS と胚発生との関連性  
683 を調べた結果、PN 数異常胚の約 1 割は形態良好な移植可能胚盤胞に発生するのに対し  
684 (図 16B)、微小核を伴う重度な ACS 胚は移植前に発生が停止することがわかった(図  
685 20D、severity 3)。すなわち、ACS は着床前胚発生停止の指標、PN 数異常は受胎率低下  
686 の指標になることが示唆される。いずれの異常もウシの ART 成功率を低下させる要因  
687 になるため、異常低減を目指して ART 技術の改良が必要であろう。ウシ IVF 胚の ACS  
688 の頻度 (30.6%) は、マウス IVF 胚 (1.7-3.5%) より高かった (Yamagata *et al.*, 2009a)。マ  
689 ウスの研究では、ACS は精子ゲノムの二本鎖 DNA 切断によって引き起こされ、その  
690 発生率は精子を凍結融解サイクルにさらすことによって上昇することが報告されてる  
691 (Yamagata *et al.*, 2009a)。本研究では、体外受精に凍結精液が使用されており、これが  
692 ACS が高頻度に生じた一因となっている可能性がある。また、IVM は染色体異数性の  
693 頻度を増加させることも報告されている (Tšuiiko *et al.*, 2017)。マウスを用いた研究で  
694 は、生体内で成熟した卵子を使用しているのに対し (Mashiko *et al.*, 2020)、本研究では  
695 体外で成熟させた卵子を用いた。したがって、本研究では、*in vitro* での卵子の成熟が  
696 不十分であったことが関係している可能性がある。本研究では約半数の卵子で PN 数

697 の異常が認められたが、その原因も IVM/IVF が適切に進行しなかった結果である可能  
698 性がある (Coy *et al.*, 2008; Tšuiiko *et al.*, 2017)。今後、PN 数の異常や ACS を抑制しウシ  
699 胚の発生率や受胎率の向上を目指すには、精子凍結や IVM、IVF 技術のさらなる改善  
700 が必要であろう (Ferraz *et al.*, 2017; Sugimura *et al.*, 2017b; Sugimura *et al.*, 2014)。本イメ  
701 ー징技術を用いれば、従来の形態学的評価ではわからない核・染色体の異常の頻  
702 度や重症度とそれらの発生への影響を観察出来るため、培養環境改善の指標となるだ  
703 ろう。

704 本研究では、着床前胚の前核期から胚盤胞期までの ATP 濃度及び核・染色体を低侵  
705 襲かつ高い時空間分解能で個別観察できるライブセルイメージング法を構築し、現在  
706 問題となっている ART 成績の低下や ART 児の疾患発症リスク増加への対策を講ずる  
707 うえで有用な技術になることを確認した。本技術が、今後の ART 発展の一助となるこ  
708 とを期待する。



709 参考文献

710

711 Adamson, G.D., de Mouzon, J., Chambers, G.M., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R.,  
712 Ishihara, O., Banker, M., and Dyer, S. (2018). International committee for monitoring  
713 assisted reproductive technology: World report on assisted reproductive technology, 2011.  
714 *Fertil. Steril.* *110*, 1067–1080.

715 Armstrong, S., Bhide, P., Jordan, V., Pacey, A., Marjoribanks, J., and Farquhar, C. (2019).  
716 Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction.  
717 *Cochrane Database Syst. Rev.* *5*, CD011320.

718 Baak, N.A., Cantineau, A.E., Farquhar, C., and Brison, D.R. (2019). Temperature of  
719 embryo culture for assisted reproduction. The Cochrane database of systematic reviews *9*,  
720 CD012192.

721 Banker, M., Dyer, S., Chambers, G.M., Ishihara, O., Kupka, M., de Mouzon, J., Zegers-  
722 Hochschild, F., and Adamson, G.D. (2021). International committee for monitoring assisted  
723 reproductive technologies (ICMART): World report on assisted reproductive technologies,  
724 2013. *Fertil. Steril.* *116*, 741–756.

725 Barberet, J., Bruno, C., Valot, E., Antunes-Nunes, C., Jonval, L., Chammas, J., Choux, C.,  
726 Ginod, P., Sagot, P., Soudry-Faure, A., and Fauque, P. (2019). Can novel early non-invasive  
727 biomarkers of embryo quality be identified with time-lapse imaging to predict live birth?  
728 *Hum. Reprod.* *34*, 1439–1449.

729 Baruselli, P.S., Ferreira, R.M., Vieira, L.M., Souza, A.H., Bó, G.A., and Rodrigues, C.A.  
730 (2020). Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*  
731 *155*, 1–11.

732 Berntsen, S., Söderström-Anttila, V., Wennerholm, U.-B., Laivuori, H., Loft, A., Oldereid,  
733 N.B., Romundstad, L.B., Bergh, C., and Pinborg, A. (2019). The health of children  
734 conceived by ART: ‘The chicken or the egg?’. *Hum. Reprod. Update* *25*, 137–158.

735 Bohrer, R.C., Coutinho, A.R.S., Duggavathi, R., and Bordignon, V. (2015). The incidence  
736 of DNA double-strand breaks is higher in late-cleaving and less developmentally competent  
737 porcine embryos<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* *93*, 1–8.

738 Bolton, H., Graham, S.J.L., Van der Aa, N., Kumar, P., Theunis, K., Fernandez Gallardo,  
739 E., Voet, T., and Zernicka-Goetz, M. (2016). Mouse model of chromosome mosaicism  
740 reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential.  
741 *Nat. Commun.* *7*, 11165.

742 Booth, P.J., Watson, T.J., and Leese, H.J. (2007). Prediction of porcine blastocyst formation

- 743 using morphological, kinetic, and amino acid depletion and appearance criteria determined  
744 during the early cleavage of in vitro-produced embryos. *Biol. Reprod.* 77, 765–779.
- 745 Brackett, B.G., and Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol.*  
746 *Reprod.* 12, 260–274.
- 747 Brooks, K.E., Daughtry, B.L., Davis, B., Yan, M.Y., Fei, S.S., Shepherd, S., Carbone, L.,  
748 and Chavez, S.L. (2022). Molecular contribution to embryonic aneuploidy and karyotypic  
749 complexity in initial cleavage divisions of mammalian development. *Development* 149,  
750 dev198341.
- 751 Bruna de Lima, C., Cristina Dos Santos, É., and Sirard, M.-A. (2023). Dohad: A menagerie  
752 of adaptations and perspectives: The interplay between early embryo metabolism and  
753 mitoepigenetic programming of development. *Reproduction* 166, F15–F26.
- 754 Cavazza, T., Takeda, Y., Politi, A.Z., Aushev, M., Aldag, P., Baker, C., Choudhary, M.,  
755 Bucevičius, J., Lukinavičius, G., Elder, K., *et al.* (2021). Parental genome unification is  
756 highly error-prone in mammalian embryos. *Cell* 184, 2860–2877.
- 757 Ceelen, M., van Weissenbruch, M.M., Prein, J., Smit, J.J., Vermeiden, J.P.W.,  
758 Spreeuwenberg, M., van Leeuwen, F.E., and Delemarre-van de Waal, H.A. (2009). Growth  
759 during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at  
760 age 8–18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile  
761 parents. *Hum. Reprod.* 24, 2788–2795.
- 762 Chambers, G.M., Dyer, S., Zegers-Hochschild, F., de Mouzon, J., Ishihara, O., Banker, M.,  
763 Mansour, R., Kupka, M.S., and Adamson, G.D. (2021). International committee for  
764 monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive  
765 technology, 2014†. *Hum. Reprod.* 36, 2921–2934.
- 766 Chason, R.J., Csokmay, J., Segars, J.H., DeCherney, A.H., and Armant, D.R. (2011).  
767 Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and  
768 development. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 412–420.
- 769 Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L., and Torres, I. (1989). An improved  
770 culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J.*  
771 *Reprod. Fertil.* 86, 679–688.
- 772 Chi, H.-J., Park, J.-S., Yoo, C.-S., Kwak, S.-J., Son, H.-J., Kim, S.-G., Sim, C.-H., Lee, K.-  
773 H., and Koo, D.-B. (2020). Effect of evaporation-induced osmotic changes in culture media  
774 in a dry-type incubator on clinical outcomes in in vitro fertilization-embryo transfer cycles.  
775 *Clin Exp Reprod Med* 47, 284–292.
- 776 Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullón, L., Matás, C., and

777 Avilés, M. (2008). Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona  
778 pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc.*  
779 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15809–15814.

780 de Mouzon, J., Chambers, G.M., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Banker,  
781 M., Dyer, S., Kupka, M., and Adamson, G.D. (2020). International committee for  
782 monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive  
783 technology 2012 † . *Hum. Reprod.* *35*, 1900–1913.

784 de Mouzon, J., Lancaster, P., Nygren, K.G., Sullivan, E., Zegers-Hochschild, F., Mansour,  
785 R., Ishihara, O., and Adamson, D. (2009). World collaborative report on assisted  
786 reproductive technology, 2002. *Hum. Reprod.* *24*, 2310–2320.

787 Destouni, A., Zamani Esteki, M., Catteeuw, M., Tšuiiko, O., Dimitriadou, E., Smits, K.,  
788 Kurg, A., Salumets, A., Van Soom, A., Voet, T., and Vermeesch, J.R. (2016). Zygotes  
789 segregate entire parental genomes in distinct blastomere lineages causing cleavage-stage  
790 chimerism and mixoploidy. *Genome Res.* *26*, 567–578.

791 Dyer, S., Chambers, G.M., de Mouzon, J., Nygren, K.G., Zegers-Hochschild, F., Mansour,  
792 R., Ishihara, O., Banker, M., and Adamson, G.D. (2016). International committee for  
793 monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive  
794 technology 2008, 2009 and 2010. *Hum. Reprod.* *31*, 1588–1609.

795 Ealy, A.D., Wooldridge, L.K., and McCoski, S.R. (2019). Board invited review: Post-  
796 transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *J. Anim. Sci.* *97*, 2555–2568.

797 European society of human reproduction and embryology. ART factsheet. (2023).  
798 <https://www.eshre.eu/Europe/Factsheets-and-infographics>.

799 Ferraz, M.A., Henning, H.H., Costa, P.F., Malda, J., Melchels, F.P., Wubbolts, R., Stout,  
800 T.A., Vos, P.L., and Gadella, B.M. (2017). Improved bovine embryo production in an  
801 oviduct-on-a-chip system: Prevention of poly-spermic fertilization and parthenogenic  
802 activation. *Lab on a Chip* *17*, 905–916.

803 Ferraz, P.A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J.E.P., Chebel, R.C., and  
804 Galvão, K.N. (2016). Factors affecting the success of a large embryo transfer program in  
805 holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the united states.  
806 *Theriogenology* *86*, 1834–1841.

807 Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Strøbech, L.B., Hyttel, P., Mermillod, P., and Ross, P.J. (2020).  
808 Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: Reproductive  
809 biotechnology history and methods. *Animal* *14*, 991–1004.

810 Fleming, T.P., Watkins, A.J., Velazquez, M.A., Mathers, J.C., Prentice, A.M., Stephenson,

811 J., Barker, M., Saffery, R., Yajnik, C.S., Eckert, J.J., *et al.* (2018). Origins of lifetime health  
812 around the time of conception: Causes and consequences. *Lancet* 391, 1842–1852.

813 Ganem, N.J., and Pellman, D. (2012). Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA  
814 damage. *J. Cell Biol.* 199, 871–881.

815 Gardner, D.K., and Schoolcraft, W.B. (1999). Culture and transfer of human blastocysts.  
816 *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 11, 307–311.

817 Gleicher, N., Patrizio, P., and Brivanlou, A. (2021). Preimplantation genetic testing for  
818 aneuploidy – a castle built on sand. *Trends Mol. Med.* 27, 731–742.

819 Guo, X.-Y., Liu, X.-M., Jin, L., Wang, T.-T., Ullah, K., Sheng, J.-Z., and Huang, H.-F.  
820 (2017). Cardiovascular and metabolic profiles of offspring conceived by assisted  
821 reproductive technologies: A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 107, 622–  
822 631.

823 Hann, M., Roberts, S.A., D’Souza, S.W., Clayton, P., Macklon, N., and Brison, D.R. (2018).  
824 The growth of assisted reproductive treatment-conceived children from birth to 5 years: A  
825 national cohort study. *BMC Medicine* 16, 224.

826 Hardy, K., Spanos, S., Becker, D., Iannelli, P., Winston, R.M.L., and Stark, J. (2001). From  
827 cell death to embryo arrest: Mathematical models of human preimplantation embryo  
828 development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1655–1660.

829 Hatano, Y., Mashiko, D., Tokoro, M., Yao, T., and Yamagata, K. (2022). Chromosome  
830 counting in the mouse zygote using low-invasive super-resolution live-cell imaging. *Genes*  
831 *Cells* 27, 214–228.

832 Ishihara, O., Adamson, G.D., Dyer, S., de Mouzon, J., Nygren, K.G., Sullivan, E.A.,  
833 Zegers-Hochschild, F., and Mansour, R. (2015). International committee for monitoring  
834 assisted reproductive technologies: World report on assisted reproductive technologies,  
835 2007. *Fertil. Steril.* 103, 402–413.

836 Kawagoe, Y., Kawashima, I., Sato, Y., Okamoto, N., Matsubara, K., and Kawamura, K.  
837 (2020). CXCL5-CXCR2 signaling is a senescence-associated secretory phenotype in  
838 preimplantation embryos. *Aging Cell* 19, e13240.

839 Kola, I., Trounson, A., Dawson, G., and Rogers, P. (1987). Trippronuclear human oocytes:  
840 Altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biol. Reprod.* 37,  
841 395–401.

842 Lane, M., Robker, R.L., and Robertson, S.A. (2014). Parenting from before conception.  
843 *Science* 345, 756–760.

844 Li, G.-P., Yang, S., Liu, Y., Sessions, B.R., White, K.L., and Bunch, T.D. (2009). Nicotine  
845 combined with okadaic acid or taxol adversely affects bovine oocyte maturation and  
846 subsequent embryo development. *Fertil. Steril.* *92*, 798–805.

847 Li, J., Zhang, J., Hou, W., Yang, X., Liu, X., Zhang, Y., Gao, M., Zong, M., Dong, Z., Liu,  
848 Z., *et al.* (2022). Metabolic control of histone acetylation for precise and timely regulation  
849 of minor zga in early mammalian embryos. *Cell Discov.* *8*, 96.

850 Mansour, R., Ishihara, O., Adamson, G.D., Dyer, S., de Mouzon, J., Nygren, K.G., Sullivan,  
851 E., and Zegers-Hochschild, F. (2014). International committee for monitoring assisted  
852 reproductive technologies world report: Assisted reproductive technology 2006. *Hum.*  
853 *Reprod.* *29*, 1536–1551.

854 Mashiko, D., Ikeda, Z., Yao, T., Tokoro, M., Fukunaga, N., Asada, Y., and Yamagata, K.  
855 (2020). Chromosome segregation error during early cleavage in mouse pre-implantation  
856 embryo does not necessarily cause developmental failure after blastocyst stage. *Sci. Rep.*  
857 *10*, 854.

858 McCoy, R.C., Demko, Z.P., Ryan, A., Banjevic, M., Hill, M., Sigurjonsson, S., Rabinowitz,  
859 M., and Petrov, D.A. (2015). Evidence of selection against complex mitotic-origin  
860 aneuploidy during preimplantation development. *PLoS Genet.* *11*, e1005601.

861 Mizutani, E., Yamagata, K., Ono, T., Akagi, S., Geshi, M., and Wakayama, T. (2012).  
862 Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term  
863 developmental failure of mouse clones. *Dev. Biol.* *364*, 56–65.

864 Nagai, H., Okada, M., Nagai, Y., Sakuraba, Y., Okae, H., Suzuki, R., and Sugimura, S.  
865 (2021). Abnormal cleavage is involved in the self-correction of bovine preimplantation  
866 embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *562*, 76–82.

867 Ng, K.Y.B., Mingels, R., Morgan, H., Macklon, N., and Cheong, Y. (2018). In vivo oxygen,  
868 temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in  
869 human conception: A systematic review. *Hum. Reprod. Update* *24*, 15–34.

870 Nygren, K.G., Sullivan, E., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Adamson,  
871 G.D., and de Mouzon, J. (2011). International committee for monitoring assisted  
872 reproductive technology (ICMART) world report: Assisted reproductive technology 2003.  
873 *Fertil. Steril.* *95*, 2209–2222.

874 Pladevall-Morera, D., and Zylicz, J.J. (2022). Chromatin as a sensor of metabolic changes  
875 during early development. *Front. Cell Dev. Biol.* *10*, 1014498.

876 Popovic, M., Dhaenens, L., Boel, A., Menten, B., and Heindryckx, B. (2020).  
877 Chromosomal mosaicism in human blastocysts: The ultimate diagnostic dilemma. *Hum.*

878           Reprod. Update 26, 313–334.

879           R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing.  
880           <https://www.R-project.org/index.html>.

881           Rabel, R.A.C., Marchioretto, P.V., Bangert, E.A., Wilson, K., Milner, D.J., and Wheeler,  
882           M.B. (2023). Pre-implantation bovine embryo evaluation—;from optics to omics and  
883           beyond. *Animals* 13, 2102.

884           Rosenkrans, C.F., Jr, Zeng, G.Q., McNamara, G.T., Schoff, P.K., and First, N.L. (1993).  
885           Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 49,  
886           459–462.

887           Ross, P.J., Perez, G.I., Ko, T., Yoo, M.S., and Cibelli, J.B. (2006). Full developmental  
888           potential of mammalian preimplantation embryos is maintained after imaging using a  
889           spinning-disk confocal microscope. *Biotechniques* 41, 741–750.

890           Sakkas, D., and Gardner, D. (2013). Limitations and benefits of morphologic embryo  
891           assessment strategies: How far can morphological assessment go in the identification of  
892           viable embryos? In *Human gametes and preimplantation embryos*, D.K. Gardner, D.  
893           Sakkas, E. Seli, and D. Wells, eds. (Springer), pp. 55–64.

894           Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T.,  
895           Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: An open-source  
896           platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.

897           Stringfellow, D.A., Givens, M.D., and International Embryo Transfer, S. (2010). *Manual*  
898           *of the international embryo transfer society : A procedural guide and general information*  
899           *for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*, 4th Edition  
900           (International Embryo Transfer Society Savory, Ill.).

901           Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Somfai, T., Inaba, Y., Hirayama, M., Yamanouchi, T.,  
902           Matsuda, H., Kobayashi, S., Aikawa, Y., *et al.* (2012). Promising system for selecting  
903           healthy *in vitro*–fertilized embryos in cattle. *PLoS ONE* 7, e36627.

904           Sugimura, S., Akai, T., and Imai, K. (2017a). Selection of viable *in vitro*-fertilized bovine  
905           embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *J. Reprod. Dev.* 63, 353–  
906           357.

907           Sugimura, S., Akai, T., Somfai, T., Hirayama, M., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hattori, H.,  
908           Kobayashi, S., Hashiyada, Y., Konishi, K., and Imai, K. (2010). Time-lapse  
909           cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: A novel tool for  
910           tracking the development of individual bovine embryos. *Biol. Reprod.* 83, 970–978.

911 Sugimura, S., Kobayashi, N., Okae, H., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kojima, T., Yajima,  
912 A., Hashiyada, Y., Kaneda, M., Sato, K., *et al.* (2017b). Transcriptomic signature of the  
913 follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental  
914 competence. *Sci. Rep.* *7*, 6815.

915 Sugimura, S., Ritter, L.J., Sutton-McDowall, M.L., Mottershead, D.G., Thompson, J.G.,  
916 and Gilchrist, R.B. (2014). Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15  
917 to increase bovine oocyte developmental competence: Effects on gap junction-mediated  
918 metabolite supply. *Mol. Hum. Reprod.* *20*, 499–513.

919 Suzuki, R., Okada, M., Nagai, H., Kobayashi, J., and Sugimura, S. (2021). Morphokinetic  
920 analysis of pronuclei using time-lapse cinematography in bovine zygotes. *Theriogenology*  
921 *166*, 55–63.

922 Swain, J.E. (2020). A comparison of embryo culture incubators for the IVF laboratory. In  
923 Textbook of assisted reproduction, G.N. Allahbadia, B. Ata, S.R. Lindheim, B.J. Woodward,  
924 and B. Bhagavath, eds. (Springer Singapore), pp. 693–706.

925 Takemoto, A., Maeshima, K., Ikehara, T., Yamaguchi, K., Murayama, A., Imamura, S.,  
926 Imamoto, N., Yokoyama, S., Hirano, T., Watanabe, Y., *et al.* (2009). The chromosomal  
927 association of condensin ii is regulated by a noncatalytic function of pp2a. *Nat. Struct. Mol.*  
928 *Biol.* *16*, 1302–1308.

929 Tilly, Jonathan L., and Sinclair, David A. (2013). Germline energetics, aging, and female  
930 infertility. *Cell Metab.* *17*, 838–850.

931 Tšuiiko, O., Catteeuw, M., Zamani Esteki, M., Destouni, A., Bogado Pascottini, O.,  
932 Besenfelder, U., Havlicek, V., Smits, K., Kurg, A., Salumets, A., *et al.* (2017). Genome  
933 stability of bovine in vivo-conceived cleavage-stage embryos is higher compared to in  
934 vitro-produced embryos. *Hum. Reprod.* *32*, 2348–2357.

935 Utsunomiya, T., Yao, T., Itoh, H., Kai, Y., Kumasako, Y., Setoguchi, M., Nakagata, N., Abe,  
936 H., Ishikawa, M., Kyono, K., *et al.* (2022). Creation, effects on embryo quality, and clinical  
937 outcomes of a new embryo culture medium with 31 optimized components derived from  
938 human oviduct fluid: A prospective multicenter randomized trial. *Reprod. Med. Biol.* *21*,  
939 e12459.

940 van der Reest, J., Nardini Cecchino, G., Haigis, M.C., and Kordowitzki, P. (2021).  
941 Mitochondria: Their relevance during oocyte ageing. *Ageing Res. Rev.* *70*, 101378.

942 Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S.,  
943 Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., *et al.* (2009a). Chromosome instability is common in  
944 human cleavage-stage embryos. *Nat. Med.* *15*, 577–583.

945 Vanneste, E., Voet, T., Melotte, C., Debrock, S., Sermon, K., Staessen, C., Liebaers, I.,  
946 Fryns, J.-P., D'Hooghe, T., and Vermeesch, J.R. (2009b). What next for preimplantation  
947 genetic screening? High mitotic chromosome instability rate provides the biological basis  
948 for the low success rate. *Hum. Reprod.* *24*, 2679–2682.

949 Vázquez-Diez, C., Yamagata, K., Trivedi, S., Haverfield, J., and FitzHarris, G. (2016).  
950 Micronucleus formation causes perpetual unilateral chromosome inheritance in mouse  
951 embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 626–631.

952 Veeck, L.L. (1999). Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In *An*  
953 *atlas of human gametes and conceptuses: An illustrated reference for assisted reproductive*  
954 *technology.*, L.L. Veeck, ed. (Parthenon Publishing), pp. 46–51.

955 Vera-Rodriguez, M., Chavez, S.L., Rubio, C., Pera, R.A.R., and Simon, C. (2015).  
956 Prediction model for aneuploidy in early human embryo development revealed by single-  
957 cell analysis. *Nat. Commun.* *6*, 7601.

958 Wang, Z.-W., Ma, X.-S., Ma, J.-Y., Luo, Y.-B., Lin, F., Wang, Z.-B., Fan, H.-Y., Schatten,  
959 H., and Sun, Q.-Y. (2013). Laser microbeam-induced DNA damage inhibits cell division in  
960 fertilized eggs and early embryos. *Cell Cycle* *12*, 3336–3344.

961 Wilcox, A.J., Harmon, Q., Doody, K., Wolf, D.P., and Adashi, E.Y. (2020). Preimplantation  
962 loss of fertilized human ova: Estimating the unobservable. *Hum. Reprod.* *35*, 743–750.

963 Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., and Pera,  
964 R.A.R. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome  
965 activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* *28*, 1115–1121.

966 Yamagata, K., Suetsugu, R., and Wakayama, T. (2009a). Assessment of chromosomal  
967 integrity using a novel live-cell imaging technique in mouse embryos produced by  
968 intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* *24*, 2490–2499.

969 Yamagata, K., Suetsugu, R., and Wakayama, T. (2009b). Long-term, six-dimensional live-  
970 cell imaging for the mouse preimplantation embryo that does not affect full-term  
971 development. *J. Reprod. Dev.* *55*, 343–350.

972 Yamagata, K., Yamazaki, T., Yamashita, M., Hara, Y., Ogonuki, N., and Ogura, A. (2005).  
973 Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis* *43*, 71–  
974 79.

975 Yang, M., Rito, T., Metzger, J., Naftaly, J., Soman, R., Hu, J., Albertini, D.F., Barad, D.H.,  
976 Brivanlou, A.H., and Gleicher, N. (2021). Depletion of aneuploid cells in human embryos  
977 and gastruloids. *Nat. Cell Biol.* *23*, 314–321.



978 Yao, G., Xu, J., Xin, Z., Niu, W., Shi, S., Jin, H., Song, W., Wang, E., Yang, Q., Chen, L.,  
979 and Sun, Y. (2016). Developmental potential of clinically discarded human embryos and  
980 associated chromosomal analysis. *Sci. Rep.* 6, 23995.

981 Yao, T., and Asayama, Y. (2016). Human preimplantation embryo culture media: Past,  
982 present, and future. *J. Mamm. Ova Res.* 33, 17–34.

983 Yao, T., and Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and  
984 current issues. *Reprod. Med. Biol.* 16, 99–117.

985 Yao, T., Asayama, Y., Sugiyama, Y., Kumasako, Y., and Utsunomiya, T. (2018a). Embryo  
986 culture media based on the composition of human oviductal fluid contribute to improving  
987 the viability of mouse embryos. *Hum. Reprod.* 33, i220–i221.

988 Yao, T., Suzuki, R., Furuta, N., Suzuki, Y., Kabe, K., Tokoro, M., Sugawara, A., Yajima, A.,  
989 Nagasawa, T., Matoba, S., *et al.* (2018b). Live-cell imaging of nuclear–chromosomal  
990 dynamics in bovine in vitro fertilised embryos. *Sci. Rep.* 8, 7460.

991 Yao, T., Ueda, A., Khurchabilig, A., Mashiko, D., Tokoro, M., Nagai, H., Sho, T., Matoba,  
992 S., Yamagata, K., and Sugimura, S. (2022). Micronucleus formation during early cleavage  
993 division is a potential hallmark of preimplantation embryonic loss in cattle. *Biochem.*  
994 *Biophys. Res. Commun.* 617, 25–32.

995 Yao, T., Ueda, J., Kobayashi, T.J., Hori, M., and Yamagata, K. (2015). Quantitative  
996 assessment of embryo quality based on a live-cell imaging technique. *J. Mamm. Ova Res.*  
997 32, 149–157.

998 Zhang, Y., Bai, J., Cui, Z., Li, Y., Gao, Q., Miao, Y., and Xiong, B. (2023). Polyamine  
999 metabolite spermidine rejuvenates oocyte quality by enhancing mitophagy during female  
1000 reproductive aging. *Nat. Aging* 3, 1372–1386.

1001 Zhao, J., Wang, W., Zhang, L., Zhang, J., Sturmey, R., and Zhang, J. (2023). Dynamic  
1002 metabolism during early mammalian embryogenesis. *Development* 150.

1003 Zhao, J., Yao, K., Yu, H., Zhang, L., Xu, Y., Chen, L., Sun, Z., Zhu, Y., Zhang, C., Qian, Y.,  
1004 *et al.* (2021). Metabolic remodelling during early mouse embryo development. *Nat. Metab.*  
1005 3, 1372–1384.  
1006

1007 **謝辞**

1008

1009 本研究を遂行するにあたり終始適切にご指導をいただきました、近畿大学生物理工  
1010 学部教授、山縣一夫博士に深く感謝申し上げます。

1011

1012 本論文を審査していただきました、近畿大学生物理工学部教授の三谷匡博士、中西  
1013 章博士、並びに諸手続きをご担当いただきました近畿大学生物理工学部教授の石丸恵  
1014 博士、星岳彦博士、大和勝幸博士に深く感謝申し上げます。

1015

1016 本研究に不可欠な ATeam プローブを開発された京都大学大学院生命科学研究科准教  
1017 授の今村博臣博士、ATeam を用いた実験開始に際し数々のご助言をいただきました国  
1018 立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所特任部長の山本正道博士に深く感謝  
1019 申し上げます。

1020

1021 ATP イメージング後の単一胚 RNA-seq を快く引き受けていただきました奈良県立医  
1022 科大学発生・再生医学講座教授の栗本一基博士、准教授の小林久人博士、京都大学 iPS  
1023 細胞研究所未来生命科学開拓部門准教授の山本拓也博士に深く感謝申し上げます。

1024

1025 ウシ胚を用いた研究について、終始適切にご指導をいただきました、東京農工大学  
1026 グローバルイノベーション研究院教授の杉村智史博士、独立行政法人家畜改良センタ  
1027 ー技術専門役の的場理子博士に深く感謝申し上げます。

1028

1029 終始適切なお助言、ご討論を賜りました、医療法人浅田レディースクリニック浅田  
1030 生殖医療研究所の野老美紀子博士、大阪大学微生物病研究所特任助教の増子大輔博士  
1031 に深く感謝申し上げます。

1032

1033 本研究を通して、多大なるご支援及びご指導を頂きました、発生遺伝子工学研究室  
1034 事務員、和田友里様、井出友美様、山崎緩奈様、発生遺伝子工学研究室内の鈴木由華  
1035 様、廣地郁哉様、清水祐稀様、永田咲様及び学生の皆様に深く感謝致します。

1036

1037 最後に、本論文執筆を支えてくれた家族に深く感謝します。