

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-520522

(P2014-520522A)

(43) 公表日 平成26年8月25日 (2014. 8. 25)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04			2 G O 4 5
G O 1 N 33/48	(2006.01)	G O 1 N 33/48	M		4 B O 6 3
G O 1 N 33/483	(2006.01)	G O 1 N 33/483	C		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁)

(21) 出願番号	特願2014-517943 (P2014-517943)	(71) 出願人	508311226
(86) (22) 出願日	平成24年6月29日 (2012. 6. 29)		ケンブリッジ・エンタープライズ・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成26年2月7日 (2014. 2. 7)		イギリス国 ケンブリッジ シービー2
(86) 国際出願番号	PCT/GB2012/051533		1 ティーエヌ, トリニティ・レイン, ジ・
(87) 国際公開番号	W02013/005012		オールド・スクールズ
(87) 国際公開日	平成25年1月10日 (2013. 1. 10)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	61/503, 827		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成23年7月1日 (2011. 7. 1)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	61/577, 860	(74) 代理人	100101373
(32) 優先日	平成23年12月20日 (2011. 12. 20)		弁理士 竹内 茂雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物の胚の生存能力を予測する方法

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物の胚の発生能を評価するための方法およびシステムを提供する。本発明の方法は、一つの細胞期で、胚中の細胞質内運動および / または胚の形状の周期的な変化を測定することを含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物の胚の発生能を評価するインビトロの方法であって、該方法は、

(a) 1細胞期における胚中の細胞質内運動および/または胚の形状の周期的な変化を測定すること、および

(b) その測定値を用いて、胚の発生能を予測することを含む、上記方法。

【請求項 2】

前記細胞質内運動の測定が、単一細胞胚における平均細胞質内速度の測定である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記胚の形状の周期的な変化が、受精丘の拍動 (FC の拍動) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記測定が、2つの連続した速度ピークまたは FC の拍動を確認するのに十分な時間でなされ、さらに、2つの速度ピーク間の時間のインターバルまたは FC の拍動が計算される、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

速度ピーク間もしくは FC の拍動間の、より長いインターバルまたはより長い平均インターバルが、より優れた発生能の予測と相関する、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

速度ピーク間もしくは FC の拍動間のインターバルまたは平均インターバルと、1つまたはそれより多くの予め決定された参考値とを比較することによって、前記胚の発生能が予測される、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記速度ピークまたは FC の拍動が、胚における Ca^{2+} 一過性上昇と同時に起こる、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記平均細胞質内速度が、速度ピーク間で記録された最初の速度ピークの前、および/または記録された最後の速度ピークの後に測定され、ここで平均速度は経時的に計算され、それにより計算された速度が、平均基底細胞質内速度である、請求項 2 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

より速い平均基底細胞質内速度が、より優れた発生能の予測と相関する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記胚の発生能が、平均基底細胞質内速度と、1つまたはそれより多くの予め決定された参考値とを比較することによって予測される、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記単一細胞胚が、受精と前核の形成との間の発生ステージにある、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記単一細胞胚が、受精と受精丘の退縮との間の発生ステージにある、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記哺乳動物の胚が、受精丘形成が完了する発生ステージにある、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記発生能の予測が、受精丘が存在する期間中になされた測定に基づく、請求項 13 に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記哺乳動物の胚が、体外受精されている、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

測定を行うことが、タイムラプス画像の捕捉、それに続く定量的な画像解析を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記画像が、単一細胞胚を通る単一面から捕捉される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

画像が、単一細胞胚の中心を通る面から回収される、請求項 16 または 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

画像が、単一細胞胚の受精丘を二等分する面から回収される、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記胚が培地の小液滴中に保持された状態で画像化される、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記胚が、培地の小液滴中に単一細胞胚が緊密に詰まった集合体のなかの一つである、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記画像の捕捉が、受精の 4 時間以内に完了する、請求項 16 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記画像の捕捉が、受精の 2 時間以内に完了する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記定量的な画像解析が、粒子画像速度測定法 (PIV) を使用する、請求項 16 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記測定が、非侵襲的になされる、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記測定が、胚中に細胞内色素の非存在下でなされる、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

測定が、細胞骨格の機能に干渉することなくなされる、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

測定が、受精丘の形成に干渉することなくなされる、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記発生能を予測することが、胚が胚盤胞期まで発達すると予測される確率を決定することを含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記発生能が、その後の培養における胚の細胞分裂の速度を含む、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記発生能が、その後の 4 日の培養後に生じると予測される胚中の細胞数を含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記発生能を予測することが、胚が母となるレシピエントに移植された後に臨月まで発

50

達すると予測される確率を決定することを含む、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記方法が、受精の 2 4 時間以内に完了する、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記方法が、受精の 4 時間以内に完了する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記胚の発生能を評価するのに、胚中の細胞質内運動および / または受精丘の拍動の測定値だけが使用される、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

前記胚が、さらに培養される、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記胚の発生能を評価するのに、培養中の前記胚の発生および / または形態学の程度がさらに使用される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記哺乳動物の胚が、ヒト以外の哺乳動物の胚である、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記哺乳動物の胚が、マウス胚である、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 4 0】

前記哺乳動物の胚が、家畜の胚である、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記哺乳動物の胚が、ヒト胚である、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

哺乳動物の卵を受精させること、および請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法に従って結果得られた胚の発生能を評価することを含む、体外受精方法。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法に従って哺乳動物の胚の発生能を評価すること、および胚を母となるレシピエントに移植することを含む、補助繁殖方法。

30

【請求項 4 4】

複数の胚から 1 個またはそれより多くの胚を選択する方法であって、該方法は、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法に従って各胚の発生能を評価すること、およびそれらの予測された発生能に基づいて 1 個またはそれより多くの胚を選択することを含む、上記方法。

【請求項 4 5】

1 個またはそれより多くの前記胚が、補助繁殖方法で使用するために選択される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

胚の集合体中の 1 個またはそれより多くの胚を発生能に従って格付けする方法であって、該方法は、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法に従って集合体中の各胚の発生能を評価すること、およびその予測された発生能に基づいて各胚を格付けすることを含む、上記方法。

40

【請求項 4 7】

速度ピーク間もしくは F C の拍動間の計算されたインターバルまたは平均インターバルが、母平均インターバルまたは速度ピーク間の平均インターバルよりも長いこと、および / または、平均基底細胞質内速度が、母平均の平均基底細胞質内速度よりも速いことが、高い発生能を有する胚であることの指標である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

速度ピーク間もしくは F C の拍動間の計算されたインターバルまたは平均インターバル

50

が、少なくとも半分の標準偏差で母平均インターバルまたは速度ピーク間の平均インターバルよりも長いこと、および/または、平均基底細胞質内速度が、少なくとも半分の標準偏差で母集団の母平均の平均基底細胞質内速度よりも速いことが、高い発生能を有する胚の指標である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】

速度ピーク間または FC の拍動間のインターバルもしくは計算された平均インターバルが、少なくとも 1 の標準偏差で母平均インターバルまたは速度ピーク間の平均インターバルよりも長いこと、および/または、平均基底細胞質内速度が、少なくとも 1 の標準偏差で母平均の平均基底細胞質内速度よりも速いことが、高い発生能を有する胚の指標である、請求項 46 に記載の方法。

10

【請求項 50】

予測された発生能に基づいて、複数の胚から 1 個またはそれより多くの胚を選択することをさらに含む、請求項 46 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

1 個またはそれより多くの前記胚が、補助繁殖方法で使用するために選択される、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

請求項 1 ~ 51 のいずれか一項に記載の方法を行うためのシステムであって、該システムは、胚のタイムラプス画像を捕捉するための 1 個またはそれより多くのセンサーと、少なくとも 1 つのセンサーと連携する少なくとも 1 個のプロセッサとを含み、ここで該プロセッサは、前記画像が胚の発生能の予測値に変換されるようにコンピューターで読取り可能なインストラクションでプログラム化されている、上記システム。

20

【請求項 53】

前記胚の温度および/または pH 曝露を制御するための人工気候室を含む、請求項 52 に記載のシステム。

【請求項 54】

胚の温度を制御するための加熱台を含む、請求項 52 または 53 に記載のシステム。

【請求項 55】

1 個またはそれより多くの前記センサーが、白色の透過光を使用してタイムラプス画像を捕捉するように配置されている、請求項 52 ~ 54 のいずれか一項に記載のシステム。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物の胚の発生能を評価する方法、予測された発生能に従って複数の胚から胚を選択または格付けする方法、ならびに体外受精 (IVF) および補助繁殖の方法を提供する。さらに本発明の方法を行うためのシステムも提供される。

【背景技術】

【0002】

現在、IVF 診療所において母親になる予定の人に移植するための胚の生命力を評価するより優れた手段が求められている。一般的な標準的手段は、3 日目に発生の程度を評価して、これを、その後の発生、すなわち妊娠の成功可能性の予測変数として使用することであった。この評価の信頼性が低いために、外見上健康な胚盤胞を直接使用できるように胚盤胞期 (6 日) まで胚を培養するための IVF 診療所数の増加を招いた。このアプローチは多大な費用を要するだけでなく、このような長期わたるインビトロでの培養により胚盤胞期に不可避の危険をもたらすことがある。

40

【0003】

卵の受精後の胚における初期の現象が特徴付けられている。哺乳動物の接合体において、精子の侵入は、細胞骨格、表層粒⁷、小胞体⁸、およびミトコンドリア⁹の再編成につながる。精子の侵入は、接合体の形状の変化：第二極体 (PB) の形成；精子クロマチン上での受精丘 (FC) の突き出し¹⁷、¹⁸；および FC を二等分する軸に沿った接合体

50

の平坦化¹⁹を引き起こす。また哺乳動物の受精は、減数分裂の完了から第一の胚細胞周期の中間期に入るまでの間、遊離の細胞質内 Ca^{2+} の振動も誘発する¹⁰。 Ca^{2+} 振動は、受精直後の現象を調節だけでなく^{11~14}、着床後の発生の形態に影響を与えることも報告されている^{12、15、16}。機能的なアクチン細胞骨格と Ca^{2+} 一過性上昇(Ca^{2+} transient)の正しいパターン(特に Ca^{2+} 上昇にかかる全体の時間)とはいずれも発生に重要であることが報告されている^{12、15、16、37~39}。

【0004】

ある種の生物において、精子の侵入によって細胞質内運動(cytoplasmic movement)が起こることが説明されている。例えばウニ、ホヤ、およびカエルにおいて、細胞質内運動は、胚極性の確立などの発生現象進行の成功と関連していることが知られている^{1~6}。マウス受精卵では、ある種の細胞質内の動きが検出されている²⁰。

10

【0005】

このような受精直後に胚で起こる現象が特徴付けられているが、培養期間後の胚の発生の程度を評価することが、依然として好ましく標準的な胚の品質の評価方法である。

【発明の概要】

【0006】

本発明者等は、マウス卵への精子の侵入によって起こる細胞質内運動を特徴付けた。本発明者等はさらに、受精後に起こる胚の形状の周期的な変化も確認した。本発明者等は、このような運動の動力学は、それに続く胚の発生の成功を確実に予測するのに使用できることを見出した。

20

【0007】

第一の形態において、本発明は、哺乳動物の胚の発生能を評価するインビトロの方法を提供し、本方法は、

(a) 1細胞期で、胚の細胞質内運動および/または胚の形状の周期的な変化を測定すること、および

(b) その測定値を用いて、胚の発生能を予測することを含む。

【0008】

この方法の重要な特徴は、受精後および最初の胚細胞分裂の前の胚発生の極めて初期の段階から得た測定値を使用する点である。従って本方法は、有利に、初期かつ迅速に、胚の品質およびその後の発生成功の可能性を評価する方法を提供する。

30

【0009】

発明者等は、1細胞期におけるマウス胚中の細胞質内運動の平均速度に関するパラメータと、その後の発生成功の指標との間に有意な相関があることを確認した。

発明者等は、受精後のマウス胚で、細胞質内運動の平均速度における別個の周期的なピーク(本明細書では「速度ピーク(speed peak)」と称する)を観察した。発明者等は、速度ピーク間インターバルの長さが、胚発生の成功の予測に役立つことを見出した。より長い速度ピーク間インターバルと、より優れた発生の成功とが相関する。

【0010】

本発明の方法に係るいくつかのケースにおいて、胚の発生能は、2つの連続した速度ピークを確認するのに十分な期間にわたり、1細胞期における胚中の平均細胞質内速度(cytoplasmic speed)を測定すること、および2つの速度ピーク間のインターバルを計算することにより予測される。より長い速度ピーク間インターバルまたはより長い速度ピーク間平均インターバルと、より優れた発生能の予測とが相関する可能性がある。いくつかのケースにおいて、より短い速度ピーク間インターバルまたはより短い速度ピーク間平均インターバルと、より優れた発生能の予測とが相関する場合もある。いくつかのケースにおいて、胚の発生能は、速度ピーク間インターバルまたは速度ピーク間平均インターバルと、1つまたはそれより多くの予め決定された参考値とを比較することにより予測される。

40

【0011】

胚の受精丘が形成されるとき、速度ピークは胚の形状の周期的な変化と一致する。最も

50

驚くべきことに、速度ピークは、受精丘の拍動（ＦＣの拍動）と一致する。それゆえにＦＣの拍動などの胚の形状の周期的な変化も発生能の予測に役立つ可能性がある。

【００１２】

発生の成功と有意に相関する第二のパラメーターは、平均基底細胞質内速度（average basal cytoplasmic speed）である。これは、速度ピーク間で記録された最初の速度ピークの前、および／または最後に記録された速度ピークの後の平均速度である。発明者等は、平均基底細胞質内速度は、胚の発生の成功の予測に役立つことを見出した。より速い平均基底細胞質内速度は、より優れた発生の成功と相関する。

【００１３】

本発明の方法に係るいくつかのケースにおいて、胚の発生能は、速度ピーク間で記録された最初の速度ピークの前、および／または最後に記録された別個の速度ピークの後の、胚中の平均基底細胞質内速度を測定することによって予測される。より速い平均基底細胞質内速度と、より優れた発生能の予測とが相関する可能性がある。いくつかのケースにおいて、より遅い平均基底細胞質内速度と、より優れた発生能とが相関する可能性がある。いくつかのケースにおいて、胚の発生能は、平均基底細胞質内速度と、１つまたはそれより多くの予め決定された参考値とを比較することによって予測される。

【００１４】

発生能の予測は、これらのパラメーター両方を一緒に用いることにより改善できる。本発明の方法に係るいくつかのケースにおいて、発生能の予測は、速度ピーク間またはＦＣの拍動間のインターバルの長さと、平均基底細胞質内速度との両方に基づく。これらのパラメーターは、同時期に採取された胚の測定値を用いて計算することができた。発明者等は、一般的に、ピーク間インターバルの長さに基づいて発生能が高いまたは低いと予測された胚は、それと一致して、それらの平均基底細胞質内速度に基づいて発生能が高いまたは低いと予測されることも見出した。すなわち、これらの２つのパラメーターに基づく予測は、一致する傾向がある。

【００１５】

本発明の方法は、体外受精した卵の生命力を、受精後の初期段階で、すなわち最初の胚細胞分裂の前に予測する迅速な方法を提供し、それにより体外受精（ＩＶＦ）治療の見込みを改善することが可能である。

【００１６】

さらなる形態において、本発明は、哺乳動物の卵を受精させることと、１細胞期における胚中の細胞質内運動および／または胚の形状の周期的な変化を測定することにより結果得られた胚の発生能を予測することを含む、体外受精方法を提供する。優れた発生能を有すると予測された体外受精卵は、例えば母となる受容者に移植するために選択することができ、それによって妊娠の成功率が改善される。

【００１７】

さらに、補助繁殖方法も提供され、本方法は、１細胞期における胚中の細胞質内運動および／または胚の形状の周期的な変化を測定することにより、哺乳動物の胚の発生能を予測することと、続いて胚を母となる受容者に移植することを含む。

【００１８】

いくつかのケースにおいて、所定の胚の絶対的な品質は、胚群中の相対的な品質、例えば同じ母親から得られた卵から発生した胚群中の相対的な胚の品質よりも重要性は低い。

本発明のさらなる形態は、複数の胚から１個またはそれより多くの胚を選択する方法を提供し、本方法は、１細胞期における胚中の細胞質内運動および／または胚の形状の周期的な変化を測定することにより各胚の発生能を予測することと、それらの予測された発生能に基づいて１個またはそれより多くの胚を選択することを含む。また胚（複数可）を選択する際に、その他の要素を考慮に入れてもよい。１個またはそれより多くの胚は、補助繁殖方法で使用するために選択することができる。

【００１９】

本発明のその他の形態は、胚群中の１個またはそれより多くの胚を、それらの発生能に

10

20

30

40

50

従って格付けする方法を提供し、本方法は、1細胞期における胚中の細胞質内運動および／または胚の形状の周期的な変化を測定することにより各胚の発生能を予測することと、その予測された発生能に基づいて各胚を格付けすることを含む。1個またはそれより多くの胚はさらに、予測された発生能に基づいて選択されてもよい。1個またはそれより多くの胚は、補助繁殖方法で使用するために選択することができる。

【0020】

さらなる形態において、本発明は、本発明の方法を行うためのシステムを提供し、本システムは、胚の低速度撮影画像を捕捉するための1個またはそれより多くのセンサーと、少なくとも1つのセンサーと連携する少なくとも1個のプロセッサとを含み、このプロセッサは、前記画像が胚の発生能の予測値に変換されるようにコンピューターで読取り可能なインストラクションでプログラム化されている。

10

【0021】

以下、本発明を添付の図面を参照しながら例を挙げてより詳細に説明するが、これらに限定されない。この開示を考慮することにより多くの等価な改変およびバリエーションが当業者には明らかであると予測される。従って、明示された本発明の典型的な実施態様は、限定ではなく説明のためとみなされる。本発明の範囲から逸脱することなく説明した実施態様に様々な変化を施すことができる。本明細書において引用された全ての文書は、明確に参照により本明細書に組み入れられる。

【0022】

本発明は、説明された形態および好ましい特徴の組み合わせを含むが、このような組み合わせが明かに許容できないか、あるいは明確に回避されることが述べられている場合を除く。

20

【0023】

章の見出しは、本明細書では単に便宜上用いられているだけであり、限定として解釈されないものとする。

図面における色の言及は、単に情報として示されたに過ぎない。カラーの図面はない。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1a】図1は、マウス受精卵における細胞質内速度の振動を示す。図1aは、細胞質の運動を測定するのに用いられた相互相関画像解析アルゴリズムの略図（方法における詳細な説明）である。

30

【図1b】図1bは、解析されたMII期、すなわち第二減数分裂の分裂中期における未受精卵の概略図である。ステージ1：第二極体が形成され、FCが最初に出現する。ステージ2：FCの形成が完了する。ステージ3：FCが退縮して前核が形成される。

【図1c】図1cは、代表的な未受精卵における平均細胞質内速度を示す。

【図1d】図1dは、ステージ1～3の間の代表的な体外受精した接合体における平均細胞質内速度を示す。

【図1e】図1eは、未受精卵(MII)およびステージ1～3における接合体に代表的な、ベクトルパターンと共に示したDIC画像である。単に明確にする目的で1秒ごとにベクトルを示す。ベクトルの長さおよびバックグラウンドの色は、局所的な細胞質内運動の速度を示す。スケールバーは10μmである。

40

【図2a】図2は、平均細胞質内速度のピークはFC領域におけるアクトミオシン細胞骨格の変化に依存することを示す。図2aは、拍動するFCを有する接合体のDIC画像であり、反復的にFC（星印でマークした）が突き出て平坦になる。スケールバーは20μmである。

【図2b】図2bは、マウス受精卵における平均細胞質内速度のピーク（青色／下のライン）はFC直径の減少の始まり（緑色／上のライン）と相関することを示す。FC直径は、（a）で示されるように、FCの一方の端部において最大対称を示すポイントから細胞の他方の端部までとして測定された。

【図2c】図2cは、FC直径の変化（速度ピーク直前と、速度ピークがその最大値に到

50

達したときのタイムポイントとのFC直径の差として測定した)は、それに伴う速度ピークの振幅と相関することを示す。これらの測定値から計算されたピアソンの相関係数は0.595であり、これは統計学的に有意である($p < 0.0001$)。

【図2d】図2dは、FC皮質におけるUtrCH-EGFPの蛍光強度(青色/下のライン)は、FCが形状を変化させるにつれて(FC直径における変化で示した通り(赤色/上のライン))変動していることを示す。強度値は、焦点のシフトによって引き起こされる強度の変化を除外するために、UtrCH-EGFPとGap43-RFP(膜タンパク質)蛍光との比率として示される(詳細に関しては「方法」を参照)。星印は、UtrCH-EGFPおよびGap43-RFPの強度が測定された皮質領域の端部を示す。スケールバーは10 μ mである。

10

【図2e】図2eは、FCの下上の肩におけるMyoRLC-GFP蛍光の強度(それぞれ青色のライン、および十字記号で示された青色のライン)は、(FC直径における変化(赤色)で示されるように)FCがその形状を変化させるにつれて揺れ動くことを示す。強度の値は、UtrCH-EGFP蛍光とGap43-RFP蛍光との比率で示される。星印は、MyoRLC-GFPおよびGap43-RFPの強度が測定された領域を表示する。スケールバーは10 μ mである。

【図2f】図2fは、ノコダゾール(青色の(上の)ライン)、サイトカラシンD(赤色の(下の)ライン)、およびML-7(緑色の(中央の)ライン)で処理された代表的な接合体における平均細胞質内速度を示す。

【図2g】図2gは、タキソール(青色の(上の)ライン)、およびジャスプラキノリド(赤色の(下の)ライン)で処理された代表的な接合体における平均細胞質内速度を示す。およそ90分の時点で認識できるピークは、焦点のシフトに起因する。

20

【図3a】図3は、細胞質内速度ピークは、遊離 Ca^{2+} の振動に依存することを示す。図3aは、代表的な受精卵における、平均細胞質内速度(青色/下のライン)および遊離 Ca^{2+} レベル(緑色/上のライン)のピークを示す。

【図3b】図3bは、BAPTAMで処理された受精卵(b)における、平均細胞質内速度(青色/下のライン)および遊離 Ca^{2+} レベル(緑色/上のライン)のピークを示す。

【図3c】図3cは、SrCl₂で活性化された卵における、平均細胞質内速度(青色/下のライン)および遊離 Ca^{2+} レベル(緑色/上のライン)のピークを示す。卵をSrCl₂で活性化したところ、 Ca^{2+} 一過性上昇に付随する速度ピークは、小さいものでさえも生じなかった((c)の挿入図)。全てのグラフにおいて、 Ca^{2+} レベルの増加は、FuraRed蛍光強度の減少で示された。(b)におけるピークは、焦点のシフトに起因するものであった。

30

【図4a】図4は、高振幅の細胞質内速度ピークはFCの存在に依存することを示す。卵細胞質内精子注入法(ICSI)で処理された代表的な卵における平均細胞質内速度(青色/下のライン)および遊離 Ca^{2+} レベル(緑色/上のライン)を示す。新鮮な精子頭部を、皮質下(a)または細胞質の中心部分(b)に注入した。熱不活化した精子頭部を皮質下に注入し、卵をSrCl₂で活性化するか(c)または活性化しなかった(d)。加熱した精子頭部を注入しSrCl₂で活性化した卵において、小さい速度ピークが頻繁に現れた((c)における挿入図)。全てのグラフにおいて、 Ca^{2+} レベルの増加は、FuraRed蛍光の強度の減少で示された。

40

【図4b】同上。

【図4c】同上。

【図4d】同上。

【図5a】図5は、胚の生存能力の指標としての細胞質内運動を示す。4日培養した後、接合体で記録された平均の基底速度(a)または平均の速度ピーク間インターバル(b)と、胚中の細胞数との相関を示す。(c)(a)におけるデータにフィッティングした数学モデルであり、それによれば、平均ピーク間インターバルの様々な値を調整したところ、4日齢の胚における平均基底速度と細胞数との間に線形および二次相関があることが示

50

される。平均ピーク間インターバルは、 $+1SD$ （上のライン）、平均ピーク間インターバルは、 $+0.5SD$ （上から二番目のライン）、平均ピーク間インターバル（上から三番目のライン）、平均ピーク間インターバルは、 $-0.5SD$ （上から四番目のライン）であり、平均ピーク間インターバルは、 $-1SD$ である（下のライン）。（d）（b）におけるデータにフィッティングした数学モデルであり、それによれば、平均基底速度の様々な値について調整したところ、4日齢の胚において平均ピーク間インターバルと細胞数との間に線形相関があることが示されることが示される。平均ピーク間インターバルは、 $+1SD$ （上のライン）、平均ピーク間インターバルは、 $+0.5SD$ （上から二番目のライン）、平均ピーク間インターバル（上から三番目のライン）、平均ピーク間インターバルは、 $-0.5SD$ （上から四番目のライン）、平均ピーク間インターバルは、 $-1SD$ （下のライン）である。（c）および（d）におけるモデルのグラフ表示は、（a）および（b）それぞれにおいて赤色の括弧で指定された範囲の値に関して作製された。（e）我々のモデルに基づいて「優れた」とスコア付けされた胚から得られた卵筒（左）、および2週齢の子（右）を示す。アクチンはファロイジンで緑色に標識されており、Gata4は、内臓内胚葉を赤色にマーキングする。スケールバーは $50\mu m$ である。（f）胚移植の効率を示す。胚を、2細胞期に雌のレシピエントに移植して、6.5（青色の（塗りつぶされた）柱）または19.5 dpc（赤色の（斜線の）柱）で解剖した我々のモデルに従って、「高品質」または「低品質」とスコア付けした。

10

【図5b】同上。

20

【図5c】同上。

【図5d】同上。

【図5e】同上。

【図5f】同上。

【図6a】図6は、卵母細胞質中で、ヒト卵母細胞におけるPLC γ およびICSIによって誘導された Ca^{2+} 振動は同時に起こる一過性の運動を伴うことを示す。図6aは、オレゴングリーンBAPTADキストラン（OGBD）（任意単位）の蛍光によって測定された細胞内 Ca^{2+} の増加、およびそれに対応するPIVで測定された細胞質内運動の記録を示す。

【図6b】図6bにおけるトレースは、大きい初期の Ca^{2+} 増加とそれに伴う運動の減少を示す他の卵母細胞からの、 Ca^{2+} とPIVそれぞれの初期の様相を示す。*でマークしたスパイクは、図7の拡大目盛りで示される。

30

【図7】図7は、 Ca^{2+} 変化と細胞質内運動との同時発生の解析を示す。これらの時間の目盛りが拡大されたパネルは、図6Bの卵母細胞から得られる。第一の Ca^{2+} スパイクは長期間続き、細胞質内運動は抑制される。その後の Ca^{2+} スパイクはそれより短く、スパイクが最大になった直後に、速度ピークにおける運動の平均振幅は最大に増加する。この図示されたケースにおいて、速度ピークの最大値は、 Ca^{2+} が最大になってから20秒後に起こる。ここで留意すべきは、運動の平均振幅は、 Ca^{2+} 最大値と同じ10秒のインターバル内で加速し始めることである。

【図8】図8は、細胞質内運動のパターンを重ね合わせたヒト卵母細胞の画像である。各ベクトルマップは、あるフレームとその次のフレームとの間の10秒のインターバルにおける運動を記録する。この一対のベクトルマップは20秒間隔をあけて回収されたものであり、これらは、運動の位置を変えずに運動の方向が逆転していることを図示している。

40

【図9a】図9は、接合体における細胞質内運動を示す。FCの上の面（a）、FCを二等分する面（c）、およびFCの下の方（e）で画像化された、接合体中の平均細胞質内速度を示す。（b）、（d）、および（f）はそれぞれ（a）、（c）、および（e）において矢印でマークされたタイムポイントの細胞質内速度である。背景の色は、局所的な速度の値を示す。FCは、5時の方向に観察することができる。スケールバーは $10\mu m$ である。（g）精子が注入された卵における第一および第二の Ca^{2+} 一過性上昇の際に記録された速度ピークである。

【図9b】同上。

50

【図 9 c】同上。

【図 9 d】同上。

【図 9 e】同上。

【図 9 f】同上。

【図 9 g】同上。

【図 10】図 10 は、受精丘の皮質におけるアクチンの再構成を示す。(a) は、タイムラプス動画からのさらなる画像であり、FC における (U t r C H - E G F P で標識された) アクチンの再構成を示す。FC 形状における変化に伴う、FC 皮質における U t r C H - E G F P 強度における変化である。FC が平坦化すると (平坦化の開始は赤色のラインでマークされる)、F - アクチンを標識する U t r C H - E G F P の強度が弱くなる。FC が次第に突き出てくると、U t r C H - E G F P の強度は再び増加する。Gap 43 - R F P は、膜マーカーとして役立った。画像を 20 秒毎に取り、常に 4 番目の画像を示す。(b) は、(a) で示された FC の皮質領域をズームした画像である。スケールバーは 10 μ m である。

10

【図 11】図 11 は、受精丘の皮質におけるミオシンの再構成を示す。(a) は、タイムラプス動画からのさらなる画像であり、FC における (M y o R L C - G F P で標識された) ミオシンの再構成を示す。FC 皮質の肩における M y o R L C - G F P の強度は、FC 形状における変化に従って変化する。FC が平坦化すると (平坦化の開始は赤色のラインでマークされる)、M y o R L C - G F P の強度は弱くなる。FC が次第に突き出てくると、M y o R L C - G F P の強度は再び増加する。Gap 43 - R F P は、膜マーカーとして役立った。画像を 20 秒毎に取り、常に 2 番目の画像を示す。(b) および (c) は、(a) でそれぞれ数字 1 および 2 で示された FC の皮質領域をズームした画像である。スケールバーは 10 μ m である。

20

【図 12】図 12 は、マウス接合体における Ca^{2+} キレート化および細胞骨格阻害剤の微小管およびアクトミオシンに対する作用を示す。分裂後期の隆起が起こったら、体外受精した卵を阻害剤に移した。画像は、前もって薬物と 20 分インキュベートした直後 (20 + 0 分)、あるいは 1.5 または 3 時間インキュベートした後 (それぞれ 0 + 90 分、および 0 + 180 分) に固定された代表的な接合体の共焦点 Z - スタックス (Z-stacks) から調製された突起を示す。実験用およびコントロール接合体を同じ設定でスキャンした。ジャスプラキノリド処理した接合体のファロイジン染色では F - アクチンを示すことはできなかったが (下から 3 番目のパネル)、これは、ジャスプラキノリドはファロイジンと同じ結合部位を競合して適切な染色を妨げるためである。抗アクチン抗体での染色から、ジャスプラキノリドにより、より厚いアクチンの皮質層 (2 つの下のパネル) の形成が起こったことが明らかになった。雌性クロマチンは f で示し、雄性クロマチンは m で示した。スケールバーは 10 μ m である。

30

【図 13 a】図 13 は、D I C イメージングはマウス胚の発生に影響を与えないことを示す。図 13 a は、平均の基底速度で胚細胞期に達する確率と、平均ピーク間インターバルの調整との相互関係を証明する数学モデルである。平均ピーク間インターバルは、+ 1 S D であり (上のライン)、平均ピーク間インターバルは、+ 0.5 S D であり (上から二番目のライン)、平均ピーク間インターバル (上から三番目のライン)、平均ピーク間インターバルは、- 0.5 S D であり (上から四番目のライン)、平均ピーク間インターバルは、- 1 S D である (下のライン)。

40

【図 13 b】図 13 b は、胚細胞期 (すなわち細胞が 32 個以上) に達する確率と平均ピーク間インターバルとの相互関係を、平均基底速度の適用により証明する数学モデルである。平均ピーク間インターバルは、+ 1 S D であり (上のライン)、平均ピーク間インターバルは、+ 0.5 S D であり (上から二番目のライン)、平均ピーク間インターバル (上から三番目のライン)、平均ピーク間インターバルは、- 0.5 S D であり (上から四番目のライン)、平均ピーク間インターバルは、- 1 S D である (下のライン)。

【図 13 c】図 13 c は、受精後の様々な時点で画像化した 4 日齢の胚における平均細胞数である。

50

【図 1 3 d】図 1 3 d は、様々な細胞数を有する 4 日齢の胚の前核形成時の分布である。

【図 1 3 e】図 1 3 e は、画像化した、あるいは接合系期ではない 4 日齢の胚における平均細胞数である。

【図 1 3 f】図 1 3 f は、接合系期で画像化されたかまたは画像化されていないかによって様々な細胞数を有する 4 日齢の胚の分布である。エラーバーは、標準偏差を示す。データは、13 回の独立した実験から得た。

【図 1 4 a】図 1 4 は、PIV 法のサブピクセルでの解像である。人工的にシフトした、およびダウンサンプリングした画像のサブピクセル変位の測定に関する PIV 精度を示す。図 1 4 a は、ピクセルで示されるエラーである。

【図 1 4 b】図 1 4 b は、変位のパーセンテージで示されるエラーである。

10

【発明を実施するための形態】

【0025】

用語「胚」は、本明細書では、単一細胞である受精卵からの最も初期の哺乳動物の有機体を意味するものとして用いられる。卵は、精子と融合することにより受精する。卵を体外受精させて胚を得ることもできる。単一細胞胚は、生きた細胞である。

【0026】

本発明の方法は、あらゆる適切な哺乳動物種由来の胚に適用することができ、このような哺乳動物種としては、例えば：霊長類、例えばヒト、大型類人猿（例えばゴリラ、チンパンジー、オランウータン）、旧世界ザル、新世界ザル；げっ歯類（例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター）；ネコ；イヌ；ウサギ目（例えば、アナウサギ）；ウシ；ヒツジ；ヤギ；ウマ；ブタ；およびその他のあらゆる家畜、農業用、実験用または家庭用の哺乳動物が挙げられる。実施例で説明した研究はマウスで行ったが、予備的な結果から、ヒト単一細胞胚でも類似した細胞質内運動パターンが生じることが示された。

20

【0027】

哺乳動物の胚の「発生能」は、胚の品質の尺度である。これは、引き続き発生が成功する胚の能力の尺度である。発生の成功は、所定期間にわたり、あるいは特定の条件下で（例えば培養液中で増殖させた後か、あるいは母となるレシピエントへの胚の移植の後に）達成することができる。母となるレシピエントへの移植は、最終的に妊娠するために、母親になる予定のものに胚を移植することを意味する。母親は、胚を生じる卵（雌性配偶子）のドナーまたは源であってもよいし、あるいは代理母であってもよい。

30

【0028】

胚の発生能の予測は、引き続き発生が成功する胚の能力の予測である。発生能の予測は、胚が特定のステージまで発達する能力を有するかどうかの予測を含んでもよい。その例としては、胚を培養液中で増殖させた場合、胚が胚盤胞期に達することの予測、あるいは胚を母となるレシピエントに移植した後、胚が、卵筒期まで、または最後のステージまで発達することの予測が挙げられる。このような予測は、胚が特定の発生ステージに達すると予測される確率の決定、または所定期間中に特定の発生ステージに達すると予測される確率を含んでもよい。例えば、このような予測は、培養液中で 4 日増殖させた後、胚が胚盤胞期に達すると予測される確率を決めることもできる。その後、必ずしも胚が予測に従って培養されなくてもよい。その代わりに、胚が母となるレシピエントに移植されてもよい。このような予測は、胚が所定期間の後に到達すると予測される発生ステージの予測を含んでもよい。その例としては、培養液中での期間の後に、例えば培養液中で 1、2、3、4、5、6 日またはそれより長く増殖させた後に、胚が有すると予測される細胞の数の予測が挙げられる。

40

【0029】

いくつかのケースにおいて、発生能の予測は、胚中の細胞質内運動および/または単一胚の形状の周期的な変化の測定に基づく。その他の実施態様において、発生の予測は、これらの測定に基づくことに加えて、発生の成功を予測することが知られているその他のパラメーターも併用する。例えば、単一細胞胚で細胞質内運動および/または胚の形状の周期的な変化を測定した後、続いて胚を培養してもよく、さらに、培養液中における胚の発

50

生の程度および／または形態学を、胚の発生能を評価することに利用してもよい。

【0030】

用語「細胞質内運動」は、細胞質の流体力学的な挙動を意味する。細胞質とは、単一細胞胚中の流体相である。未受精卵または受精卵において、雌性減数分裂における第二分裂の一倍体の染色体組が脱凝縮して核膜を獲得するまで、さらに受精卵の場合は、精子クロマチンが正確にヒストンと接触して核膜に封入されるようになるまで、通常の細胞核は存在しない。このような雌性および雄性前核の形成は、最初の胚細胞分裂の前に起こる。前核が形成されるまで、本明細書で説明されているような細胞質内運動が起こる。

【0031】

用語「平均 (average)」は、本明細書で用いられる場合、中心傾向の尺度を意味する。「平均」は、平均値 (mean) および中央値 (median) を包含する。

10

「平均細胞質内速度 (average cytoplasmic speed)」は、単一細胞胚を通る単一面で測定された、あるいは細胞質全体で測定された、例えば細胞全体を通過する一続きの面で測定された、いずれかの特定の時間における平均速度を意味する。

【0032】

発明者等は、受精前、マウス卵における細胞質内運動は遅く、比較的均等であることを示した。受精は、卵中での細胞質内運動速度の劇的な周期的増加および減少を誘発する。これらの突然の周期的かつ一時的な細胞質内の流れは、その間に起こるより低い速度の運動とは異なっており、本明細書では「速度ピーク」と称する。

【0033】

20

用語「事後運動 (after-movement)」は、速度ピークの劇的な速度減少の直後に起こる可能性がある細胞質内運動を意味するが、これは、より高振幅であり、速度ピーク間に起こるそれより遅い運動と区別することができる。速度ピークは、事後運動を含む場合がある。

【0034】

速度ピークは、卵の細胞質中全体で発生しており、受精後から前核形成までおよそ4時間続く可能性がある。速度ピークは、この期間中、経時的に胚中の平均細胞質内速度を測定することによって確認することができる。速度ピークは、単一細胞胚中のあらゆる面で確認することができる。しかしながら、速度ピークの振幅は、細胞の赤道面で最大である。

30

【0035】

速度ピークの振幅は、経時的に変化する可能性がある。最初の速度ピークは、比較的高い振幅を示す可能性があり、その後速度ピークが比較的低い振幅を有する期間 (減数第二分裂の分裂後期の開始時と初期のFC伸長との間であり、本明細書において「ステージ1」と称される) が続く。FC形成が完了するか、あるいは伸長したら (本明細書において「ステージ2」と称される)、速度ピークの振幅はより大きくなる可能性がある。速度ピークの振幅は、FC退縮の間とその後減少する可能性がある (本明細書において「ステージ3」と称される)。

【0036】

40

速度ピークの急速な細胞質内運動の方向またはベクトルは、同じ受精卵で記録された速度ピーク間で異なってもよい。ステージ1の間、ベクトルは、典型的には第二極体 (PB) の発生に向かう。ステージ2の間、ベクトルは、典型的には直接FCに向かうか、あるいはわずかに入れ替わって第二極体に向かう。

【0037】

単一細胞胚中の細胞質内運動の2つの連続した速度ピークが確認されたら、それらのピーク間の時間のインターバルを測定することができる。2つより多くの連続した速度ピークが確認されたら、胚における速度ピーク間平均インターバルを決定することができる。

【0038】

受精丘 (FC) は、受精能のある精子と接触したときに受精卵表面から突き出る一過性の円錐型の突起である。

50

また速度ピークまたはFCの拍動は、胚における Ca^{2+} 一過性上昇と同時に起こる可能性がある。「平均基底細胞質内速度」は、記録された最初の速度ピークの前の期間、速度ピーク間の期間、および/または記録された最後の速度ピークの後の経時的な平均細胞質内速度である。平均基底細胞質内速度は、これらの期間の1つまたはそれより多くの間のあらゆる時点で測定することができる。本発明の方法に係るいくつかのケースにおいて、平均細胞質内速度は、記録された最初の速度ピークまで測定されるか、ある別個の速度ピークの直後から次の別個の速度ピークの開始時まで測定されるか、および/または、記録された最後の別個の速度ピークの直後に測定される。平均基底細胞質内速度は、これらの期間全体で決定してもよい。

【0039】

10

いくつかのケースにおいて、胚の発生能は、速度ピーク間もしくはFCの拍動間インターバル、速度ピーク間もしくはFCの拍動間平均インターバル、または平均基底細胞質内速度と、1つまたはそれより多くの予め決定された参考値とを比較することによって予測される。参考値は、これらのパラメーターと高いまたは低い発生能の指標との相互関係を示す以前のデータに基づいて経験的に決定することもできる。

【0040】

いくつかのケースにおいて、測定は、胚が受精と前核形成との間の発生ステージにあるときになされる。「前核形成」とは、精子と卵クロマチンとの脱凝縮、およびより小さい核小体を含む間期核の形成である。このような形成は、明視野またはDIC（微分干渉コントラスト）画像で当業者により確認することができる。

20

【0041】

いくつかのケースにおいて、単一細胞胚は、受精と受精丘の退縮との間の発生ステージにある。いくつかのケースにおいて、単一細胞胚は、極体の突き出しの後、および前核の形成の前、または受精丘の退縮の前の発生ステージにある。極体の突き出しは、卵との接触ゾーンにおける極体の端部が丸くなるときに観察され、これは、分裂溝が引き締まることを示唆している。

【0042】

いくつかのケースにおいて、胚は、受精丘形成が完了した発生ステージにある。これは、受精丘の形成と退縮との間の期間である。

いくつかのケースにおいて、発生能の予測は、受精丘が存在する期間中になされた細胞質内運動の測定に基づく。マウスにおいて、受精丘は、受精からおよそ1～1.5時間後からおよそ2時間存在する。典型的には、受精丘は、卵を体外受精させる場合、精子とインキュベートしてから約2時間後に形成が始まると予想される。本発明の方法に係るいくつかのケースにおいて、測定は、精子と卵とを共に2時間インキュベートしてした後になされる。

30

【0043】

いくつかのケースにおいて、測定することは、タイムラプス画像の捕捉、それに続く定量的な画像解析を含む。

タイムラプス画像は、単一細胞胚を通る単一面から捕捉することができる。FC形成が完了するステージ2の間、速度ピークは最も速いために最も容易に区別され、速度ピークの細胞質内運動は、典型的にはFCに向かう。また細胞の赤道面でも、速度ピークは最も速い。さらに赤道面は最大なので、最良の品質の画像が得られる。好ましくは、タイムラプス画像は、細胞中心を通る単一面から捕捉される。好ましくは、タイムラプス画像は、FCを赤道で二等分する単一面から捕捉される。

40

【0044】

本発明の方法に従って評価される胚は、実験的使用などのその後の下流の手法で使用することを意図していてもよいし、または母となるレシピエントに移植して、最終的に妊娠させるために使用することを意図していてもよい。従って、胚へのあらゆるダメージを最小化しつつ評価方法を実行することが重要である。本発明の方法は、非侵襲的であってもよい。例えば、本発明の方法の利点の一つは、細胞に添加される色素（例えば蛍光性色素

50

）がまったく存在しない状態で行うことができる点である。さらに発明者等は、受精丘の拍動と一致する速度ピークは、アクトミオシン細胞骨格の動力学に依存することを見出した。それゆえに、細胞質内運動の本来のパターンおよび胚の形状の変化に起こり得る作用を最小化するために、測定は、好ましくは、細胞骨格の機能または動力学および/または受精丘の形成に干渉しないか、あるいは干渉を最小化するような方法でなされる。

【0045】

特に好ましい実施態様において、画像化された単一細胞胚は、培地の小液滴中に単一細胞胚群が緊密に詰まった状態で保持される。好ましくは、培地の小液滴の体積は、 $30\mu\text{l}$ 未満、または $20\mu\text{l}$ 未満である。この体積は、 $5\sim 10\mu\text{l}$ の体積であってもよい。発明者等は、これは、細胞の構造的な動力学に影響を及ぼすことなく、胚の位置を安定化

10

【0046】

あるいは、胚は、培地の液滴中で1個の胚であってもよい。

培地は、一定のpHを維持するために、例えばHEPESで緩衝化されていてもよい。あるいは人工気候室を用いて安定したpHを維持してもよい。培地のpHを正しいレベルに維持するために、人工気候室には、 CO_2 、例えば $5\%\text{CO}_2$ が供給されてもよい。

【0047】

また人工気候室を用いて、イメージング中の胚の温度を調節することもできる。例えば、温度は、 $35\sim 40$ 、または $37\sim 38$ 、または約 37.5 に維持してもよい。また温度は、加熱台を用いて制御してもよい。

20

【0048】

好ましくは、画像は、胚にダメージを与えない光を用いて捕捉される。例えば、長い曝露、強い光または短波長は、活性酸素種の生産によりDNAおよび呼吸鎖にダメージを与える可能性がある。放射照度および曝露時間は、例えば速いランプのシャッター速度または発光ダイオード(LED)光源を選択すること、加えて画像回収に超高感度センサーを使用することにより最小化することができる。光学フィルターまたは単一波長のLED光源の使用により、適切な波長が選択される可能性がある。白色の透過光を用いてもよい。

【0049】

細胞質内運動および細胞の形状における変化を測定するのに適したイメージングシステムで、明視野顕微鏡を使用してもよい。あるいはこのようなシステムは、例えば微分干渉コントラスト(DIC)、ホフマン変調コントラストまたは位相差顕微鏡などの高コントラスト技術を使用してもよい。

30

【0050】

本発明のその他の利点は、最初の胚細胞分裂の前に、極めて初期の発生ステージの胚から短い期間で記録された測定値から、極めて初期に胚の発生能を評価する方法を提供する点である。いくつかのケースにおいて、関連する測定は全て、受精の6時間以内に、より好ましくは5、4、3、2または1時間内になされる。いくつかのケースにおいて、測定値は全て、胚で前核が形成される前になされる。より好ましくは、測定値は全て、FC退縮の前になされる。例えば、胚のタイムラプス画像は全て、これらの期間内に捕捉されてもよい。いくつかのケースにおいて、本方法は、発生能の予測を含む場合、受精から6日

40

【0051】

いくつかのケースにおいて、定量的画像解析は、粒子画像速度測定法(PIV)を使用する。PIVは、連続的な画像対間の、相互関係を示す画像のサブ領域に関連する、流体動力学で広く用いられている標準的な解析技術である^{21~24}。PIV解析を用いて、各画像を四角の検査領域に分割することができ、さらに順に並んだ次の画像の比較的大きい領域内で相互相関係数分布を計算することができる。相互相関係数分布のピークから、第一の画像の検査領域における材料の、第二の画像における最も可能性が高い配置が得られる。次にこれを用いて、所定時間にわたる画像間の変位ベクトルを計算することができ

50

る（図 1 A）。ピクセル領域のコントラストパターンの変位が多くピクセルで測定されるため、この技術^{2 2}、^{2 4}、^{4 8}によってサブピクセルの運動を正確に測定することが可能である。

【0052】

いくつかのケースにおいて、本発明によれば、胚群中の 1 個またはそれより多くの胚は、それらの発生能に従って格付けすることができる。各胚の発生能は、その胚群中の他の胚の発生能と比較して格付けすることができる。それにより、胚群のうちどの胚が、具体的なその後の目的とする使用に最も適しているのか、例えば妊娠するために母となるレシピエントに移植することに最も適しているのかを決定する有用な方法を提供することができる。それによって、胚の発生能に従って胚を選択することができる。

10

【0053】

本方法は、母平均（population mean）インターバルまたは平均インターバル（average interval）を速度ピーク間もしくは F C の拍動間で、および / または母平均の平均基底細胞質内速度を計算することを含んでいてもよい。本方法は、これらのパラメータに関する母標準偏差を計算することを含んでいてもよい。母集団における明白な異常値は、計算から排除してもよい。例えば、平均からの標準偏差が 1 より大きい、または標準偏差が 1 . 5 より大きい、または標準偏差が 2 より大きい、または標準偏差が 3 より大きい、あるいは計算された値の上からおよび / または下から 10 % の、計算された速度ピーク間もしくは F C の拍動間のインターバルまたは平均インターバル、または計算された平均基底細胞質内速度を有する胚は、排除してもよい。母平均および / または標準偏差を用いて、母集団中の 1 個またはそれより多くの胚の相対的な発生能を定量することができる。高い発生能を有する胚の指標は、例えば、計算された速度ピーク間のインターバルまたは平均インターバルが、母平均の速度ピーク間インターバルまたは平均インターバルよりも長いこと、および / または、平均基底細胞質内速度が母平均の平均基底細胞質内速度よりも速いことであってもよい。

20

【0054】

逆に言えば、高い発生能を有する胚の指標は、計算された速度ピーク間のインターバルまたは平均インターバルが、母平均の速度ピーク間インターバルまたは平均インターバルよりも短いこと、および / または、平均基底細胞質内速度が、母平均の平均基底細胞質内速度よりも遅いことであってもよい。

30

【0055】

同様に、高いまたは低い発生能を有する胚の指標は、それぞれ、計算されたインターバルまたは速度ピーク間の平均インターバルが、少なくとも半分、または少なくとも 3 分の 1、または少なくとも 4 分の 1、あるいは少なくとも 1、2 または 3 の標準偏差で母平均インターバルまたは速度ピーク間の平均インターバルよりも長いあるいは短いこと、および / または、平均基底細胞質内速度が、少なくとも半分、または少なくとも 3 分の 1、または少なくとも 4 分の 1 であるか、あるいは少なくとも 1、2 または 3 の標準偏差で母集団の母平均の平均基底細胞質内速度よりも速いあるいは遅いことであってもよい。

【実施例】

【0056】

新鮮なマウス受精卵の速いイメージングと、粒子画像速度測定法に基づく高度画像分析とを組み合わせるにより、受精は、精子頭部の上に形成される突起の拍動と一致する周期的な細胞質内運動を誘導することが明らかになる。我々は、これらの運動は、受精により誘導された Ca^{2+} 振動によって誘発されたアクトミオシン細胞骨格の収縮によって引き起こされることを見出した。最も重要なことに、このように運動と卵活性化現象とが関係していることにより、接合体がうまく発生するかどうかを予測するのにこのような運動を単独で使うことが可能になる。この方法は、体外受精した卵の生命力を予測するための、最も初期の最も速い非侵襲的な方法を提供するものであり、従って、IVF 治療の可能性を大いに改善することもできる。

40

【0057】

50

方法

卵および精子の回収

F1 (C57BL/6 × CBA) マウスの雌を過排卵させ、卵母細胞および接合体を上述したようにして^{4,4}回収した。単為生殖的活性化は、 Ca^{2+} / Mg^{2+} を含まず 10 mM SrCl_2 が補充された M2 培地中で卵を 4 時間インキュベートすることにより行われた。卵核胞 (GV) 期卵母細胞を卵巣から単離して 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ジブチリル環状 AMP (dbcAMP) が補充された M2 培地に入れた。精巢上体精子を F1 の雄から単離し、4 mg / ml の BSA を含む受精用培地 0.5 ml 中で受精できるようにした^{4,5}。すでに述べられたようにして^{4,4}、KSOM 培地中で胚を画像化した。イメージング前のいくつかの実験で、胚を、30 μM の BAPT A - AM (Ca^{2+} をキレート化するため)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ノコダゾール (微小管を脱重合するため)、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サイトカラシン D (F - アクチンを脱重合するため)、10 μM タキソール (微小管を安定化させるため) または 100 nM ジャスプラキノリド (F - アクチンを安定化させるため) と共に 20 分ブレインキュベートし、続いて純粋な KSOM (BAPT A 処理した胚) または各薬物を含む KSOM (上記処理した胚の残り) に移した。(ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) を阻害して、ミオシン II を活性化するために^{4,6}) ML - 7 で処理された胚を、25 μM ML - 7 と共に 20 分ブレインキュベートし、続いて、25 μM の ML - 7 含有 KSOM を含む培養皿中で、ML - 7 を吸収すると予想されるミネラルオイルで覆わないで画像化した。

10

20

30

40

50

【0058】

細胞質内運動のイメージングおよび相互相関の解析

ほとんどの実験で、倒立共焦点顕微鏡 (ツァイス (Zeiss) の LSM 510 メタ (Meta)) 下で、37.5 ° および 5 % CO_2 で、接合体を単一面で画像化した。633 nm の HeNe レーザーを用いて DIC 画像を 10 秒毎に捕捉した。遊離 Ca^{2+} イオン濃度を測定するために、胚を、5 μM の FuraRed - AM (インビトロジェン (Invitrogen)) および FuraRed 中で 20 分ブレインキュベートし、DIC 画像を 488 nm のアルゴンレーザーで同時に得た。細胞質内運動と胚の発生能との相関を試験した実験において、接合体を単一面で、透過光中で、標準的な非共焦点顕微鏡 (ツァイスのアキシオバート (Axiovert) またはデルタビジョン (Deltavision)) で、10 秒毎に 2.5 時間、画像化した。接合体の皮質および中央部分における細胞質内運動を比較した実験において、胚を、デルタビジョン顕微鏡で、11 面で、6 μm 毎に、10 秒毎に 3 時間、画像化した。表 7 に、用いられた全てのイメージングシステムの光学的な詳細を要約した。FuraRed 蛍光の強度を、イメージ J (ImageJ) ソフトウェアを用いて測定した。MatPIV v 1.6.1 から適用したアルゴリズムを用いた MATLAB (マスワークス社 (The Mathworks Inc.)、米国マサチューセッツ州ナティック) で特注のソフトウェアを用いて画像を解析した^{4,7}。アルゴリズムは、連続的な画像対間の相互関係を示す画像のサブ領域に関連する、流体動力学で広く用いられている標準的な解析技術の PIV で用いられるアルゴリズムをベースとする^{2,1-2,4}。PIV 解析において、各画像を四角の検査領域に分け、相互相関係数分布を、順に並んだ次の画像のそれより大きい領域内で計算した。相互相関係数分布のピークから、第一の画像における検査領域の材料の第二の画像における最も可能性が高い配置が得られた。次にこれを用いて、画像間の時間にわたる変位ベクトルを計算した (図 1A)。多くのピクセルにわたりピクセル領域のコントラストパターンの変位が測定されるため、この技術を用いてサブピクセルの運動を正確に測定することが可能である^{2,2、2,4、4,8}。

【0059】

粒子画像速度測定法 (PIV) 解析

MatPIV v 1.6.150 から適合させたアルゴリズムを用いた MATLAB (マスワークス社、米国マサチューセッツ州ナティック) で特注のソフトウェアを用いて、受精卵の DIC 画像を解析した。このアルゴリズムは、相互関係を示す連続的な画像対間のサブ領域に基づくパターン整合技術の使用に関連する標準的な解析技術である PIV で用

いられるアルゴリズムをベースとする（本文における方法および図 1 a を参照）。解析されたそれぞれの検査領域に関する変位を計算するために、続いて繰り返し 2 回の P I V を用いた。第一のより大きい検査領域の変位を計算し、続いてそれを、より小さい検査領域での次の反復のための探索領域の中心をどこにするかの推測値として用いた。アルゴリズムが最良のフィッティングを探す領域は、検査領域それ自身より 2 倍大きかった。図 1 a において、この図は、P I V アルゴリズムの 1 回の反復を示す。ツァイスの L S M 5 1 0 メタ共焦点顕微鏡で行われた実験では、第一の反復に 64×64 ピクセルの最初の検査領域サイズを用い、続いて第二の反復に 32×32 ピクセルの検査領域を用いた。このイメージングシステムのピクセルサイズは、 $0.35 \mu\text{m}$ であった。ツァイスのアキシオバートおよびデルタビジョン顕微鏡で行われたより大きいピクセルサイズ（それぞれ 0.64 および $0.83 \mu\text{m}$ ）での実験について、第一の反復に、 32×32 ピクセルの最初の検査領域サイズを用い、続いて第二の反復に、 16×16 ピクセルの検査領域を用いた。各細胞の中心における 11×11 ベクトルの正方形の平均振幅をとることにより、細胞質内運動の平均速度を計算した。

【0060】

P I V を使用して、速度ピーク間の期間で観察されるような極めて小さい（サブピクセルレベルの）変位を測定することの精度の試験は、より高い倍率（252 倍、すなわち対物の倍率が 63 倍であり、デジタル倍率が 4 倍である）でとられた卵の画像を用いて、画像を人工的にシフトさせ、続いて実験で用いられるのと同じレベルに（14 倍、すなわち対物の倍率が 20 倍であり、デジタル倍率が 0.7 倍である）倍率および画像解像度を低くすることによってなされた。続いて P I V を用いてシフトを測定した。エラーは、およそ 0.3 ピクセル未満の変位に関しては、変位にほぼ直線的に比例しており（図 1 4）、これは、実験的に測定された基底運動の範囲のほとんどを含むことが見出された。これは、小さい変位を測定する場合の P I V 精度を調べた他の研究と一致する^{24, 26, 51}。基底運動の順の変位（ツァイスの L S M 5 1 0 メタで $0.1 \sim 0.3$ ピクセル/フレームまたは $3.5 \sim 10.6 \text{ nm/秒}$ 、ツァイスのアキシオバートで $6.4 \sim 19.2 \text{ nm/秒}$ 、およびデルタビジョンで $8.3 \sim 24.9 \text{ nm/秒}$ ）は、 $-18.1\% \sim -15.5\%$ のエラーを示した（図 1 4）。比較目的で P I V 測定が用いられるため、これらのシステム上の過小評価は、結果またはそれらの解釈にほとんど影響しなかった。

【0061】

細胞質内速度および運動方向の解析

細胞質内速度における振動の変化を示した接合体において、平均基底速度は、事後運動の最後とそれに続く速度ピークの開始時との間のインターバルで、または最後の事後運動の後の期間に測定された（図 1 D）。速度の振動を提示しなかった接合体について、平均基底速度は全ての記録期間で計算された。ほとんどの場合、細胞質内運動の方向は、接合体で P I V によって生じた全てのベクトルの平均ベクトルに基づいて評価された。いくつかの接合体において、ベクトルは一对の渦流を形成し、続いてその方向に沿って共通の軸が形成された。極めて不規則なベクトルパターンの方向は、高い規則性を有するベクトルの大半の方向から、視覚的に評価した。

【0062】

卵細胞質内精子注入法

ライカ（Leica）の微調整装置およびライカの倒立顕微鏡を用いて、これまでに述べられたようにして I C S I を行った⁴⁹。いくつかの実験で、新たに単離した精子の代わりに熱不活化した精子（60 で 30 分）を用いた。精子懸濁液を 10% ポリビニルピロリドン（PVP、 $M_r = 360 \text{ kDa}$ ）を含む M2 培地と混合した。圧電マイクロピペット駆動ユニット（IntraCell PMAS-CT150、プライムテック（PrimeTech）、日本）を用いて精子を卵母細胞のサイトゾルに送達した。

【0063】

体外受精および胚移植

細胞質内運動と胚の発生能との相関を試験するために、 $10 \mu\text{l}$ の受精能のある精子の懸

濁液を卵丘細胞で取り囲まれた卵に添加し、続いて配偶子と共に2時間インキュベートした。阻害剤の特異性を試験する実験、またはアクチンおよびミオシンの生きた状態のイメージングを含む実験では、受精前に、卵を酸性タイロイド溶液 ($\text{pH} = 2.5$) で短時間で処理して透明帯を除去し、続いておよそ $1 \mu\text{l}$ の受精能のある精子の懸濁液と混合して、一緒に30分インキュベートした。いずれのケースにおいても、受精は、 4 mg/ml のBSAが補充された受精用培地中で行われた^{4 5}。2細胞期の胚を、精管切除した雄と交配したレシピエントのF1の雌の卵管に0.5 dpcで移した。これらを6.5 dpcまたは19.5 dpcに解剖した。

【0064】

アクチンフィラメントおよびミオシンIIの生きた状態のイメージング
EGFPに融合したユートロフィンのアクチン結合ドメイン (UtrCH - EGFP^{2 6})、GFPに融合したミオシンII調節軽鎖 (MyoRLC - GFP^{2 7})、およびRFPでタグ付けされたタンパク質マーカーGap43をコードするコンストラクト^{5 0}を、pBluescriptRN3Pベクターにクローニングし、mメッセージmマシーン (mMessage mMachine) T3キット (アンピオン (Ambion)) を用いてT3プロモーターからmRNAを合成した。mRNA (ピペット濃度は、UtrCH - EGFPおよびMyoRLC - GFPの場合、 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ であり、Gap43 - RFPの場合は、 $0.36 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である) を、GV卵母細胞に注入し、続いてこれを $150 \mu\text{g/ml}$ のdbcAMPを含むM2中でおおよそ5時間培養し、続いて洗浄し、M16培地に移して成熟させた。16時間後にMII期に達した卵母細胞を体外受精用に選択し、続いて倒立型回転円盤共焦点顕微鏡 (ツァイス) で10~15秒毎に画像化した。UtrCH - EGFP、MyoRLC - GFP、およびGap43 - RFPの蛍光強度を、イメージJソフトウェアを用いてFC皮質および細胞質中で測定した。皮質のUtrCH - EGFP、MyoRLC - GFP、およびGap43 - RFPについて得られた値を細胞質について得られたそれぞれの強度で標準化して、例えばレーザーパワーの変動などのイメージングにおけるアーティファクトによって引き起こされるあらゆる強度変化を除去した。続いて最終結果を、強度を標準化したUtrCH - EGFPとGap43 - RFPとの比率またはMyoRLC - GFPとGap43 - RFPとの比率として示して、焦点のシフトによって引き起こされるあらゆる強度変化を除去した。

【0065】

免疫染色

以前に説明された通りにして、胚を4%PFA中で固定し、透過化した^{4 4}。倒立共焦点顕微鏡 (ツァイスのLSM510メタ) を用いて胚をスキャンした。

【0066】

より詳細には、胚を4%PFA中で固定し (30分、室温または4℃で一晩)、0.2~0.5%トリトン (Triton) - X100で透過化し (30分、室温)、3%BSAまたは10%FCSでブロックした。その後、これらを以下の抗体および色素で染色した：

1) FITCで標識したマウス抗チューブリンβ抗体 (シグマ - アルドリッチ (Sigma-Aldrich)) ; 3%BSAで1:50に希釈、室温で1.5時間) ;

2) マウス抗アクチンベータ抗体 (シグマ - アルドリッチ ; 3%BSAで1:100に希釈、室温で1.5時間)

3) ヤギ抗Gata4一次抗体 (サンタクルーズ (Santa Cruz)) ; 10%FCSで1:200、4℃で一晩)、続いてアレクサフルオロ (Alexafluor) 568で標識した二次抗体 (モレキュラープローブス ; 10%FCSで1:1000、室温で1.5時間) ;

4) テキサスレッド (TexasRed) またはオレゴングリーン (OregonGreen) で標識したファロイジン (インビトロジェン (Invitrogen)) ; 1:100、室温で30分、または4℃で一晩) ;

5) ヘキスト (Hoechst) 33342 (モレキュラープローブス (Molecular Probes)) ; PBS中で100ng/ μl 、室温で30分、または4℃で一晩)。

【0067】

倒立共焦点顕微鏡（ツァイスのLSM510メタ）を用いて胚をスキャンした。

統計的分析

スチューデントのt検定、カイ二乗検定または適切な回帰モデルのいずれかを用いて統計的分析を行った。行われた実験の連続的な性質および我々が取り組もうとしている質問のアプリオリな性質のために、我々は、統計的有意性を5%レベルで評価した。平均基底速度または速度ピーク間平均インターバルと、発生4日後に生産された細胞の総数（すなわち4日齢の細胞数）との関係を決定するために、我々は、平均細胞数と説明変数の線形結合とを関連付ける対数リンク関数：平均基底速度、平均基底速度の二乗、速度ピーク間平均インターバル、速度ピーク間平均インターバルの二乗、および基底速度と速度ピーク変数との様々な相互作用を用いて負の二項モデルを胚の細胞数にフィッティングした。我々の最初の解析において、我々は、胚発生で使用されたイメージングシステム（ツァイスまたはデルタビジョン）の起こり得る交絡作用を考慮した。しかしながら、我々は、解析されたパラメーター、すなわち速度ピーク間の平均インターバルの二次効果と、画像システムとの相互作用は統計学的に有意ではなく、さらに説明能力にまったく寄与しないことを見出したために、我々はそれらを我々の最終的な解析から排除した。最終モデルと比較して記載された上記全ての変数を用いたフルモデルの尤度比検定により、対数尤度において統計学的に有意ではない変化が生じた（ $p = 0.53$ ）。細胞数データ⁵¹で観察されたバリエーションを説明するために、より標準的な細胞数のポアソン回帰モデリングに対して細胞数の負の二項モデリングを選択した。

10

20

【0068】

上述したのと同じ説明変数と、接合体が発生して胚盤胞になる（すなわち少なくとも32細胞期に達する）確率との関係を調査するために、我々はさらに、発生4日後に生産された細胞の総数を二分割して二項変数にした後にロジスティック回帰モデルをフィッティングすることによっても我々のデータを解析したところ、細胞総数が31細胞を超えたかどうかを示された。最終的なロジスティックモデルは、最終的な負の二項モデルにおける説明変数と同じ説明変数を含んでいた。最終モデルに対するフルモデルの尤度比検定は、対数尤度（ $p = 0.30$ ）において統計学的に有意ではない変化を生じる。

【0069】

実施例1

マウス卵の受精により周期的な細胞質内の動きのバーストが起こる

30

マウス卵の受精の際の細胞質内運動を特徴付けて、それらが受精に関連する他の現象に関連するのか、加えて関連する場合はどのようにして関連するのかを評価するために、我々はまず、受精直後から前核形成までの時間、卵を撮影した。続いて我々はPIV法²¹⁻²⁴に基づく高度画像分析を用いて、これらの運動を解析し、定量した（図1A）。それにより、マウス卵が受精した後、細胞質内運動の速度が劇的に周期的増加および減少を起こす（我々は、速度ピークと名付けた；図1B～D、 $n = 55$ の未受精の卵母細胞、および $n = 125$ の体外受精卵）ことが明らかになった。この一連の卵の細胞質中の迅速な繰り返し運動は、前核形成までおよそ4時間続いた。速度ピークは、最初のうちは比較的低い振幅を示したが（減数第二分裂の分裂後期から、初期のFC伸長までの間；ステージ1）、その後、FCが完全に伸張したらそれよりも有意に大きい振幅になった（ステージ2）。最後に、FC退縮中およびその後に、それらの振幅は減少した（ステージ3）（図1B、D、表1）。ステージ2において、急速な細胞質内運動はFCを二等分する赤道面で最大であり、そこから外側の面では、外に向かうほど遅くなった（図9）。PIV解析から、各速度ピークの後に、通常は4分より長く持続し、より低い振幅を示す事後運動になったことが明らかになった。ステージ3の間の運動は、速度ピークが事後運動とあまり異なっていないことが多いという点で、この規則の例外であった（図1D、表1）。さらに我々は、受精は、未受精の卵母細胞の休止レベルと比較して、平均の基底細胞質内速度（ピーク間インターバルの間、または最後に記録されたピークの後の速度）の2倍以上の増加をもたらしたことに留意した（図1C～D、表2）。

40

【0070】

50

我々の解析から、ステージ 1 の間、これらの急な細胞質内運動のベクトルは、発生中の第二極体に向かう傾向がある（17 / 25 の速度ピーク、11 の接合体）ことが明らかになった。この方向性は、ステージ 2 の間、ベクトルが直接 FC に向かうように、または場合によってはわずかに入れ替わって第二極体に向かった（64 / 65 の速度ピーク、19 の接合体）。これらのステージのいずれかにおける低振幅の事後運動またはピーク間インターバルの間に、一定したパターンはなかった。ステージ 3 において、速度ピークの方向性または何らかのパターンはもはや認められなかった（図 1 E、表 4）。大半の接合体で前核が観察されたとき（49 / 63、77.8%）（図 1 D）、これらの速度ピークは、FC 退縮後に止まった。従って、我々の結果から、マウス卵の受精は、細胞質内運動の速度ピークを誘発し、それらが最強になった時点で、精子の侵入部位の上に形成される FC 10

【0071】

実施例 2

高振幅の細胞質内速度ピークは、FC の拍動と相関し、アクトミオシン細胞骨格に依存する

ステージ 2 における急な運動の方向は、FC がこのような運動の発生に關与する可能性があることを示唆することから、次に我々はこの期間にわたる FC の形態を試験した（69 の速度ピーク、14 の接合体）。それにより、各速度ピークにおいて、FC の頂点は中心に向かって埋まり、FC が沈み込んで凸型になった接合体の領域が広がることが示された。結果として、FC の軸に沿った接合体の直径（以下、「FC 直径」と証する）は、1.28 ± 0.66 μm に減少した（その長さの 1.55 ± 0.79%）（図 2 A、C）。FC の形状はピーク間インターバル中に回復した（図 2 C）。興味深いことに、FC 直径の減少の程度は、速度ピークの振幅と直線的な関連を示した（20 の接合体、71 の解析された速度ピーク）（図 2 B）。20

【0072】

アクトミオシン細胞骨格は FC 領域で高濃度化されているため^{17、25}、我々は、アクトミオシン細胞骨格は、FC の拍動に關与する可能性があると考えた。この可能性を評価するために、我々は、FC の拍動の全体にわたり、EGFP でタグ付けされたユートロフィンのアクチン結合ドメイン（UtrCH-EGFP²⁶）または GFP でタグ付けされたミオシン II の調節軽鎖（MyoRLC-GFP²⁷）のいずれかをコードする mRNA を有する卵母細胞を注入することによりアクトミオシンを可視化した。このような卵母細胞における受精後の UtrCH-EGFP の平均蛍光強度の測定から、FC の下に存在する連続するアクチン層における振動の変化が解明された；アクチンマーカーの蛍光強度は、FC が弛緩するに従って減少し、FC が徐々に突き出るに従って増加した（図 2 D、図 10）。FC の肩の下に存在する MyoRLC-GFP の平均蛍光強度についても同様の結果を得た（図 2 E、図 11）。このような UtrCH-EGFP および MyoRLC-GFP 蛍光における変動は、その領域のアクトミオシン量における変化を反映している可能性がある。しかしながら、これらの変化は比較的小さく、一時的で反復的であるため、このような変化は、FC の拍動をもたらす FC を取り囲むアクトミオシンの収縮性を示す可能性が高い。40

【0073】

FC の運動は FC に対応する細胞質内速度ピークの範囲内で起こるため、次に我々はアクトミオシン細胞骨格が双方に關与するかどうかを試験した。この目的を達成するために、我々は、アクトミオシンと微小管の細胞骨格との両方に干渉する選択的な阻害剤を使用した。それらの特異性を免疫染色によって確認し（図 12）、表 5 にそれらの細胞周期の進行に対する作用を示す。我々は、ノコダゾールによって誘導された解重合もタキソールによって誘導された微小管の安定化も、速度ピークの動力学はわずかに変化した、速度ピークを阻害しなかったことを見出した。ノコダゾール処理により、一部の事後運動において、さらに全ての速度ピーク間インターバルにおいて細胞質内速度が増加し（n = 38、図 2 F、表 1、2）、それに対して、タキソール処理により、全てのピーク間インター 50

バルにおいて、速度ピークの振幅、一部の事後運動、および細胞質内速度が減少した ($n = 27$ 、図 2 G、表 1、2)。それに対して、サイトカラシン D を用いたアクチンの解重合またはジャスプラキノリドを用いたアクチンフィラメントの安定化により、基底速度がほぼ 3 倍減少した (図 2 F、G、表 2)。さらにサイトカラシン D の処理により、速度ピークが劇的になくなった (図 2 F)。21 の解析された接合体のうち 2 つ (9.5%) だけが焦点が合っておらず、低振幅の速度ピークが記録された。速度ピークはそれでもなおジャスプラキノリドで処理した接合体 ($n = 60$) に存在していたが、それらの振幅はコントロールにおける振幅よりも有意に低く、事後運動は実質的に検出不可能であった (図 2 G、表 1)。ほとんど全ての接合体において、またミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 阻害剤である ML-7 での処理も、細胞質内速度の振動をブロックし (16/17 の接合体、94.1%) (図 2 F)、1 つの例外的な接合体のみがはっきりしない低振幅の速度ピークを表示した。

10

【0074】

またこれらの実験から、ノコダゾールまたはタキソール処理による微小管の解重合または安定化はそれぞれ、FC の形成および / または維持のどちらにも影響を与えなかったことも明らかになった。それに対して、サイトカラシン D で処理された大多数の接合体 (20/21、95%) において FC は形成されず、これは、以前の研究と一致していた¹³。ジャスプラキノリドで処理された接合体におけるアクチンフィラメントの安定化は、それでもなお FC の形成および / または維持を許容したが、コントロールの場合ほどに顕著ではなかった。MLCK 活性が阻害された場合、FC は胚のわずかが半分 (10/17、58.8%) にしか存在せず、FC が存在した場合でも FC の発達はあまり十分ではなかった。これは、MLCK 活性は FC の形成および維持に関与するという以前の結論と一致する^{25、28}。これらの結果と合わせて、細胞質内の振動および FC の拍動はいずれも、主としてアクトミオシン細胞骨格に依存することが示される。

20

【0075】

実施例 3

細胞質内運動は Ca^{2+} 一過性上昇と相関があり、それに依存する

受精は、遊離 Ca^{2+} の振動を開始させることが知られているため^{10、29}、我々は次に、アクトミオシンが介在する速度ピークは、これらの Ca^{2+} パルスに依存するのかどうかについて取り組もうと考えた。この目的を達成するために、我々は、 Ca^{2+} 感受性の蛍光色素の FuraRed を含む受精卵をローディングし、FuraRed の蛍光および DIC 画像を同時に回収した。32 の接合体において、 Ca^{2+} の増加に伴い全ての 121 の速度ピークが発生した。 Ca^{2+} レベルがピークになると細胞質内速度は (我々の記録のインターバルの解像度の範囲内で) 正確に増加した (図 3 A)。異常に頻繁な Ca^{2+} 振動を示す一つの接合体においてのみ、一部の Ca^{2+} スパイク (4/17) が速度ピークに反映されていなかった。ICSI で受精させたいいくつかの卵で、我々は、最初の Ca^{2+} 一過性上昇に伴う速度ピークの記録を達成した。これらの速度ピークは、最初の Ca^{2+} 一過性上昇に相当するステージ 1 の速度ピークの残りよりも高振幅を示し、その後の速度ピークよりも大きかった (図 9)。

30

【0076】

Ca^{2+} 振動は細胞質内運動に必須であるかどうかを決定するために、我々は、細胞内 Ca^{2+} の基底レベルを変化させることなくカルシウム振動を阻害することが知られている Ca^{2+} キレート化剤 BAPTA をローディングした 21 の受精卵における動きを記録した³⁰。この処理により高振幅の速度ピークが阻害されたが、平均の基底細胞質内速度はコントロールに比べて 1.7 倍に上昇した (図 3 B)。BAPTA は微小管を破壊したが (図 12)、他の系で観察されたように^{31、32}、これは、速度ピークの損失に関与する可能性は低く、なぜなら特異的に微小管を破壊しても類似の現象を引き起こさないためである (上記参照)。

40

【0077】

興味深いことに、我々が $SrCl_2$ を用いてマウス卵 ($n = 47$) を活性化させて、受

50

精後に観察される Ca^{2+} 振動と類似した Ca^{2+} 振動を引き起こしたところ、 Ca^{2+} 一過性上昇のうち 30 % のみ (133 / 444) が速度ピークを伴った。さらにこれらは、極めて低い振幅を示す接合体の速度ピークと類似しておらず (図 3 C、表 1、3)、 Ca^{2+} 一過性上昇の始まりが 10 ~ 30 秒遅延することでも多かった。事後運動は、これらの Sr^{2+} によって誘導された Ca^{2+} 一過性上昇のうち 76.8 % (341 / 444) で示されたが、それらの振幅も接合体の振幅よりも低かった (表 1、3)。これは、 Ca^{2+} 振動は急速な細胞質内運動に必要であるが、 Ca^{2+} 振動は、別個の高振幅の速度ピークを誘発させるには不十分であることを示す。従って、受精により、このような動きを十分に可能にする追加の現象が起こる。

【0078】

10

実施例 4

細胞質内運動を開始させるのに機能的な精子タンパク質が必要である

細胞質内速度ピークおよび Ca^{2+} 振動の両方において精子それ自体または FC のいずれかによってなされる相対的な寄与をさらに特徴付けるために、我々は、卵の皮質の直下または細胞の中心のいずれかに精子を直接注入した。FC 形成は精子クロマチンと皮質アクチンとの相互作用に依存し、さらに距離に依存するために³³、FC は、注入された卵の前者のグループにのみ形成された。いずれのケースにおいても、注入された精子は、 Ca^{2+} 振動および卵の活性化をもたらした。しかしながら、FC を形成した卵では Ca^{2+} 一過性上昇の 97 % (101 / 104) が速度ピークを伴うのに対して ($n = 17$ 、図 4 A)、FC が無い卵では、 Ca^{2+} 一過性上昇の 71 % (207 / 290) が速度ピークを示した ($n = 35$ ；図 4 B)。重要なことには、速度ピークの平均振幅は、FC が無い卵の平均振幅よりも有意に低かったが、それに対して FC を有する卵では、振幅は、自然に受精した卵の振幅と類似していた (図 4 A B、表 1、3)。しかしながら、前核形成中の速度ピークおよび全てのステージからの事後運動の平均振幅は、両方のグループにおいて類似していたことから (表 3)、これらの特定の運動のメカニズムは FC とは無関係である可能性があることが示唆される。

20

【0079】

FC の細胞質内運動誘発への寄与をさらに詳細に分析するために、我々は、全ての機能的タンパク質が欠失しており DNA 源として役立つ熱不活化した精子頭部の注入に応答して、速度ピークが起こるかどうかを試験した。クロマチンと皮質との結合は、FC 様の形成³³を誘発するのに十分であることが知られている。その結果として、 Sr^{2+} によって活性化された皮質および卵に熱不活化した精子頭部を注入したところ、 Ca^{2+} 振動および FC 形成の両方が観察された。このような接合体において ($n = 25$)、 Ca^{2+} 一過性上昇の 60.8 % (48 / 79) において FC が存在するときに速度ピークが発生した (ステージ 2)。しかしながら、速度ピークの振幅は、比較的低いままであった (図 4 C、表 3)。興味深いことに、FC の拍動も、正常な接合体で観察された FC の拍動に比べてかなり小さく、さらに速度ピークも FC の拍動も Ca^{2+} 一過性上昇のピークとまったく同調していなかったが、10 ~ 30 秒後に起こった。 Ca^{2+} 振動は不活化精子が注入された卵では記録されず、単為生殖的活性化がなされないままであった (図 4 D)。これらの結果を総合すると、高振幅の速度ピークは FC の拍動と関連しており、精子の機能的タンパク質によって促進されることが示唆される。

30

40

【0080】

実施例 5

細胞質内運動は、胚の生命力の指標を提供する

我々が、細胞質内運動が Ca^{2+} 振動のパターンと細胞骨格の品質とに関連することを見出してから、我々は、このような運動の解析により発生の成功を予測することができるのかどうかについて興味を持った。これに取り組むために、我々は、71 個の卵を体外受精させ、FC が存在する期間中ずっとそれらの細胞質内運動を記録し、続いて胚を 4 日間培養した。まず第一に、我々は、各胚中の細胞質内運動のパターンと、そのステージでの細胞総数とを関連付けた。このから、速度ピーク間の平均インターバルの様々な値につい

50

て、平均基底速度と、胚中の細胞数との間に統計学的に有意な線形および二次効果があったこと（それぞれ $p = 0.0005$ および 0.0001 ）が明らかになった（対数スケールで；図 5 C）。発生 4 日目における平均細胞数は、横ばい状態かまたは減少した後に、平均基底速度（平均基底速度値 12.2 nm/秒 の平均から最大 1.7 の標準偏差（ $SD = 6.7 \text{ nm/秒}$ ））で増加した（図 5 A、C）。さらに、平均基底速度の様々な値またはその二乗について、発生 4 日後の平均細胞数は、速度ピーク間の平均インターバルに比例して増加した（ $1 SD$ 毎に、すなわちおよそ 7 分毎に 1.3 倍高い（ $95\% CI: 1.07 \sim 1.47$ ）； $p = 0.0045$ 、図 5 B、D）。我々は、胚盤胞期まで発達する確率を評価することによって発生の成功を調べたところ、同様の発見が観察された（図 13 A）。この解析から、平均基底速度（ $p = 0.009$ ）と、発生 4 日後に胚が胚盤胞期に達する確率の対数とは線形的な関係を有することが示唆される：胚盤胞まで発達する確率は、平均基底速度が増加するにつれて増加する。さらに我々は、 $1 SD$ 毎に速度ピーク間の平均インターバルが増加するにつれて、胚が胚盤胞まで発達する確率は、 2.3 倍増加する（ $95\% CI: 1.10 \sim 4.89$ ； $p = 0.027$ ）（図 13 B）ことを見出した。

10

20

30

40

50

【0081】

我々の細胞質内運動の記録方法が何らかの光によるダメージを引き起こす可能性を除去するために、さらに発生し得る何らかの光感受性が受精後のイメージング段階の影響を受けるのかどうかを試験するために、我々は、記録開始後の様々な時点で前核が形成された接合体の発生を比較した。我々は、平均細胞数にも、または達成される発生ステージの分布にも何らかの差があるという証拠を見出すことはできなかった（いずれか 2 種の比較グループについて $p > 0.46$ 、および $p = 0.97$ 、それぞれ図 13 C、D）。我々はさらに、画像化した（ $n = 71$ ）および画像化していない（ $n = 46$ ）胚の発生も比較して、両方のグループが同じ方法で処理されたことを確認した。両方のグループにおいて、平均細胞数（図 13 E）、加えて異なる細胞数を有する胚の分布（図 13 F）は類似していた（それぞれ $p = 0.75$ および 0.19 ）。

【0082】

最終的に、上記の結果から細胞質内運動のパターンは着床前の発生の品質の予測に役立つことが示されたため、我々は、これらの運動パターンが、どの卵が出産まで発生が成功するのかを予測できるかどうかを決定しようと試みた。この目的を達成するために、我々は、体外受精卵を画像化して解析して、体外受精卵の細胞質内の動きのパターンが優れた発生能を示すのか、あるいは不良な発生能を示すのかに従って体外受精卵をグループ分けした。優れた可能性を示す胚は、4 日培養した後に胚 1 つあたり $25 \sim 52$ （平均 32 ）個の細胞を有し、 $25 \sim 90\%$ （平均 46.5% ）のケースで胚盤胞期に達すると予測された。低品質と分類された胚は、4 日後に $9 \sim 24$ （平均 17 ）個の細胞を有し、それらの $0 \sim 25\%$ 、平均 10.7% が胚盤胞期に達すると予測されると思われる。2 つの胚群を、2 細胞期で雌のレシピエントに移植した。「低品質」とスコア付けした胚と比べて 5 倍の頻度で（ 83.3% 、 $5/6$ 対 16.7% 、 $1/6$ ）卵筒期まで（ 6.5 dpc ）発達した胚、および「低品質」とスコア付けした胚と比べてほぼ 3 倍の頻度で（ 2.77 、 87.5% 、 $21/24$ 対 31.6% 、 $6/19$ ）臨月まで（ 19.5 dpc ）発達した胚を、「高品質」とスコア付けした（図 5 E、F、表 6）。総合すると、これらの発見は、受精後の細胞質内運動は、発生の成功予測に役立ち、我々のイメージング方法は胚発生を妨げないことを示す。

【0083】

実施例 6

ヒト卵母細胞において PLCζ によって誘導された Ca^{2+} 振動は、同調する細胞質内運動を引き起こす。

【0084】

近年の証拠によれば、受精時の Ca^{2+} 振動は、精子が卵母細胞と融合した後に誘発され、それにより、卵母細胞への精子特異的なホスホリパーゼ C（PLCζ）の導入が起こ

ることが示されている^{5 2, 5 3}。次にPLC ζ は、卵質内でInsP₃生産の繰り返しサイクルを発生させ、Ca²⁺振動による繰り返しのCa²⁺放出現象を起こす^{5 2, 5 3}。最も都合のよい形態としては、精子PLC ζ は、卵母細胞にその相補的RNA(cRNA)をマイクロインジェクションすることによって導入され、この相補的RNAは卵母細胞内で数時間にわたりPLC ζ タンパク質に翻訳される^{5 4}。従って、PLC ζ のcRNAを卵母細胞に注入することによって、持続的なCa²⁺振動を引き起こすPLC ζ タンパク質が生産され、さらに平行して行われた実験で、PLC ζ は、マウス、ブタ、ウシ、およびヒト卵母細胞の桑実期および胞胚期までの胚発生を活性化することが示された^{5 4 ~ 5 7}。

【0085】

ここで我々は、精子PLC ζ のcRNAが注入されたヒト卵母細胞におけるPIVイメージングの使用を報告する。我々は、ICSI後に受精できなかったヒト卵母細胞において、それぞれのPLC ζ によって誘導されたCa²⁺一過性上昇とほぼ同調する、突然の、ただし小さい細胞質内運動を検出できることを実証する。我々が説明する方法は、ヒト卵母細胞におけるCa²⁺振動振動パターンをモニターする非侵襲的方法として発展性を有する可能性がある。

【0086】

材料および方法 (実施例6)

ヒト卵母細胞

ウェールズ大学病院 (University Hospital of Wales)、カーディフのIVFウェールズクリニックで、患者からヒト卵母細胞の提供を受けた。現行のプロジェクトおよび関連する全ての手法は、南東ウェールズ研究倫理委員会 (South East Wales Research Ethics Committee) およびヒトの受精および胚研究認可局 (Human Fertilisation and Embryology Authority) で承認されている (R0161、K.SwannおよびN.Amsの管理下)。老化した「ICSI不能の」卵母細胞および卵胞の減数分裂過程から誘導された新鮮な卵母細胞を用いた。標準条件下でICSIを行い、卵母細胞をさらに16~18時間培養した後、それらが受精したかまたは受精していないかを判断した。「新鮮な卵母細胞」は卵胞の減数分裂から誘導され、回収してから5時間以内に用いた。活性化されていないと確認された卵母細胞だけを実験に用いた。その後の1~4時間の間に、これらの卵母細胞をクリニックから研究所に移し、そこで上述したようにして卵母細胞に約10~20p1のヒトPLC ζ のcRNAをマイクロインジェクションした^{5 4, 5 5}。簡単に言えば、cRNAを、Ca²⁺感受性色素の0.5mMオレゴングリーンBAPTADキストラン (OGBD、インビトロジェン) と混合した。次にこの混合物を、マイクロピペットを用いてマイクロインジェクションした (約1 μ Mのチップ直径)。マイクロピペットの針と同じラインに連結された増幅器からの短い電気振動のパルスを利用して、マイクロピペットを卵母細胞に挿入した。次に、マイクロピペット後部に圧力パルス (20psiで約1秒間) をかけて、注入混合物の1回適用量を卵母細胞に押し出した。cRNAを、Ca²⁺感受性色素の0.5mMオレゴングリーンBAPTADキストラン (OGBD、インビトロジェン) と混合した。PLC ζ のcRNAを上記したようにして調製した^{5 4}。データ回収中に、CL-100温度制御装置 (ワーナー・インスツルメンツ (Warner Instruments)) を備えたシリーズ40クイック・チェンジ (Quick Change) イメージングチャンバーを用いて、卵母細胞を油で覆った培地の液滴中で37℃に維持した。M2培地 (シグマ) 中で卵母細胞をマイクロインジェクションし、続いて以前に説明されているようにしてHEPESで緩衝化したKSOM培地中で記録をとった^{5 9}。

【0087】

イメージングシステム

マイクロインジェクション後に、卵母細胞または接合体を、ニコン (Nikon) のTiU落射型顕微鏡 (対物20 $\times$ 0.75NA) を用いて数時間にわたり画像化した。490nmのバンドパスフィルターにハロゲンランプからの蛍光励起を通過させ、505nmのダイクロイックで反射させ、530nmのバンドパスフィルターで回収した。その他のハロゲ

10

20

30

40

50

ンランプからの白色光を用いて、卵母細胞を微分干渉位相コントラスト (DIC) 顕微鏡で可視化した。これらの光源の軌道にシャッターを置き、フィルターのホイールを蛍光励起および放出光の両方の軌道上に置いて、画像獲得中に卵母細胞が光に晒される時間がごく短くなるようにした。シャッターおよびフィルターホイールをラムダ - 10 (Lambda-10) 制御器 (サッター・インスツルメンツ (Sutter Instruments)) によって制御した。クールスナップ HQ2 (Coolsnap HQ2) CCD カメラ (フォトメトリクス (Photometrics)) を用いて、10 秒毎に高速で連続的に 100 ~ 200 ミリ秒の曝露で画像を取った。インビボ (InVivo) ソフトウェア (メディア・サイバーネティクス (Media Cybernetics)) を用いて、ラムダ - 10、画像回収、および最初の解析を制御し、画像を tiff の積層画像として保存した。

10

【0088】

イメージ J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて蛍光画像を解析し、卵母細胞全体からの色素の蛍光強度を時間に対してプロットした。細胞質中の運動を、マウス接合体における類似の運動を研究するために開発された相互相関法で解析した^{5 8}。アルゴリズムは、流体動力学的な調査における PIV 解析で用いられているアルゴリズムに基づいており、連続した画像対間の相互関係を示す画像のサブ領域を含む。この解析により、細胞質の局所領域における運動を示すベクトル分野が得られた。以前に説明されたようにして^{5 8}、卵母細胞の中心における四角の領域のベクトルの振幅の平均をとることにより運動の平均速度を計算した。ソフトウェアを MATLAB で開発され書き込まれており、このソフトウェアは、<http://users.ox.ac.uk/~zool0847/code.html> で教育機関の非営利使用のライセンスで利用できる。

20

【0089】

結果 (実施例 6)

ICSI 後に活性化できなかったヒト卵母細胞への PLCζ の cRNA のマイクロインジェクションにより、図 6 A で説明された持続的な一連の Ca^{2+} 振動が起こった。遊離 Ca^{2+} 上昇を示すスパイクの特定のパターンは卵母細胞間で多少の違いが示されたが、全般的な応答は、最初の大きい Ca^{2+} 増加、それに続いて、時間が経つに連れて次第に頻度が増加する一連のそれより小さい Ca^{2+} 一過性上昇からなっていた。この全般的な Ca^{2+} 振動パターンは、PLCζ の cRNA^{5 5} が注入されたヒト卵母細胞で以前に報告されたパターンに類似している。cRNA 注入 (記録開始の 15 ~ 20 分前) から Ca^{2+} スパイクの最初の出現への比較的長い潜伏時間、およびその後の Ca^{2+} スパイク頻度の上昇は恐らく、時間経過による PLCζ タンパク質発現の段階的な増加を反映しており、これは、これまでも PLCζ のルシフェラーゼタグを有する融合コンストラクトで経験的に実証されている^{5 4、6 0 ~ 6 2}。

30

【0090】

我々が PIV を用いて PLCζ の cRNA を注入した卵母細胞を細胞質内運動に関して解析したところ、我々は、同じ 10 秒のインターバル内で、各 Ca^{2+} 一過性上昇の直後に別個の運動が起こることを見出した (図 6 B)。これらのヒト卵母細胞において、最大の平均 PIV 速度は、 Ca^{2+} スパイクの最大値と一致するか、あるいは Ca^{2+} 一過性上昇が最大になってから 50 秒以内に起こるかのいずれかであった。合計して、この範囲内で 10 個の異なる接合体から 95 / 102 の細胞質内運動が検出された。速度ピークの平均遅れ時間は、 Ca^{2+} ピーク後 18 秒であった (10 ~ 50 秒の範囲)。注目すべきことに、卵母細胞質で検出された運動は、比較的規模が小さい：速度ピークにおける全てのベクトルの平均振幅は 40 nm / 秒を超えることはなく、さらにこれらの速度ピーク内で、局所領域は 120 nm / 秒よりも速く動くことはなかった。ほとんどの場合で Ca^{2+} 一過性上昇に伴う運動の突然の増加がみられたが、いくつかの記録において最初のスパイクで達成されたより高いレベルの Ca^{2+} は、しばしば細胞質の運動の減少を伴うことも興味深い (4 / 6 ケース) (図 6 B)。一例において、第二のピークで Ca^{2+} レベルが高いままである場合、細胞質内運動も抑制された (1 / 6) (図 6 B および 7)。

40

【0091】

50

個々の卵母細胞について、運動ベクトルは、それぞれの速度ピーク間で一定の位置にいたが、痙攣のような運動の最中に運動の方向を反転させることが多かった（図8）。しかしながら、平均の運動方向は、第一または第二極体の位置とは一致した関係を示さなかった。加えて、速度ピークにおいて小さい渦巻きが頻繁に観察された。単一面で画像化された卵母細胞が少数であったという限定を考慮すると、これらの渦巻きは、特定の卵母細胞構造とはまったく関連がなかった。

【0092】

これらのヒト卵母細胞において、ある程度の Ca^{2+} 上昇と運動との同調が共通して見出された。これは、ヒト卵母細胞における細胞質内運動は、遊離 Ca^{2+} イオンの上昇により直接的に誘導されることを示す。マウス接合体での以前の研究から、このような細胞質内運動はアクチン細胞骨格に依存し、精子および受精丘の存在大きな影響を受けることが示されている^{5,8}。速度ピーク中に形状が変化した活性化ヒト卵母細胞の領域を確認することは難しいが、記録中に細胞プロファイルの遅い進行性の変化が検出された。いくつかの記録において、細胞質の周りを動き、細胞膜の下に厚い粒状の三日月形を形成する粒状の領域を観察することができた。この外縁の三日月形も第一極体の位置に沿って移動したが、正確な三日月形の境界はあいまいであった。これらの「ICS I 不能の」卵母細胞内に可能性のある精子が存在する可能性があるのかどうか、あるいは、マウス接合体で示唆されたように、細胞質内運動において精子周辺の何らかの構造が特異的な役割を果たす可能性があるのかは不明なままである。しかしながら、我々は、卵胞の減数分裂後に得られた7つの未受精の卵母細胞におけるPLCζのcRNAによって誘導された Ca^{2+} 振動および細胞質内運動の類似の解析は行わなかった。注目すべきことに、我々は、これらの卵胞の減数分裂由来の卵母細胞で観察された41の Ca^{2+} スパイクに関連する運動をまったく検出できなかった。

【0093】

考察

ここで説明された受精後における細胞質内現象の、非侵襲的な急速なタイムラプスイメージングとPIV解析との併用により、マウス卵への精子の侵入が、細胞質内運動と関連する一連の予測外の周期的なアクトミオシン収縮を誘発させることが明らかになる。その最大速度において、これらの細胞質内運動により、同調して拍動を受ける精子の侵入部位の上に形成された突起に向かってベクトルが方向付けられる。細胞質内運動の速度ピークは、受精によって誘導された Ca^{2+} 一過性上昇とタイミングが一致しており、さらにカルシウム振動に依存する。我々は、ピーク間インターバルの解析は、非侵襲的で極めて迅速な、胚の生命力およびその発生を進行させる能力を評価する新規の方法を提供することを示す。

【0094】

MLCK阻害またはF-アクチンを安定化もしくは解重合する処理により、速度ピークおよび基底細胞質内速度の両方が減少したという我々の発見から、細胞質内運動の媒介にアクトミオシン細胞骨格が関与することは明白である。またこのような運動は、 Ca^{2+} をBAPTAでキレート化すると抑制されるために、 Ca^{2+} 一過性上昇にも依存している。可能性の一つとして、例えば Ca^{2+} /カルモジュリン依存性キナーゼII（CaMKII）または従来のプロテインキナーゼC（cPKC）などの Ca^{2+} 依存性キナーゼは、細胞骨格を調節すること¹⁰、および Ca^{2+} 振動に応答すること³⁴⁻³⁶の両方が知られていることから、これらの酵素は、運動の誘発に関与することが挙げられる。しかしながら、 Ca^{2+} 振動の振幅は受精後の期間全体にわたり類似しているが（ただし一般的にその後のスパイクよりも大きい最初の Ca^{2+} スパイクを除く²⁹）、速度ピークの振幅はFC形成の開始時に増加し、FC退縮時に減少する。さらに単為生殖的活性化によって惹起された Ca^{2+} 一過性上昇は、迅速な振動の細胞質内運動を促進するには不十分であり、これは、運動を起こすことができる追加の受精関連因子が存在するはずであるということを示唆している。

【0095】

10

20

30

40

50

活発な運動の速度ピークとアクトミオシンが介在する周期的なFCの運動とが一致するということは、これらは同じプロセスの兆候であることを示す。これはさらに、精子注入法後のFC形成の研究によっても示されている。FC形成はクロマチンと皮質タンパク質との相互作用を必要とするため³³、精子が卵に深く注入される場合は、FC形成は起こらない。従って、この方法で受精した卵は、FCを有する接合体でみられる速度ピークよりもかなり弱い速度ピークを示した。速度ピークが弱くてもなお存在するという事実は、皮質のアクトミオシンをある程度再構成させるのに十分な程度に精子クロマチンが細胞表面の近傍に存在することに起因する可能性がある。明確なFCを生産するには不十分であるが、それでもなお弱い細胞質内運動を強化することができると予想される。あるいは、速度ピークは、母由来のクロマチン上に蓄積した皮質のアクトミオシンの収縮によって誘発される可能性がある。実際に、我々は、一組の母系染色体上に形成された隆起がFCと類似した方法で振動することを頻繁に観察することができた。また、低振幅の速度ピークは、皮質に関連するのではなく、アクトミオシン細胞骨格の一般的な収縮性の作用である可能性もある。最後の2つの可能性はさらに、なぜ Sr^{2+} で活性化された単為発生胚で所定の低振幅の速度ピークが観察できるのかを説明することもできる。

【0096】

熱不活化した精子頭部が注入された Sr^{2+} で活性化された卵では、高速運動も誘発されず、FCの動きもかなり減少した。従って、精子は、熱処理によって不活性化されたFCの動きおよび細胞質内運動を促進するタンパク質に高く寄与する可能性がある。また、正常な接合体と不活化精子が注入され、続いて Sr^{2+} で活性化された胚とで観察された差は、 Ca^{2+} 一過性上昇そのものの特徴が変更されたことに起因する可能性がある。典型的な Sr^{2+} によって誘導された Ca^{2+} ピークの動力学的挙動は、受精によって誘発された Ca^{2+} ピークの動力学的挙動とは異なる。さらに、 Sr^{2+} によって誘導された Ca^{2+} 振動の頻度は、我々の条件下では極めて高く、これは、高振幅の速度ピークの生成に負の影響を与えるようである。

【0097】

我々は、細胞質内運動のタイミングおよびパターンは、胚の品質の強力な指標を提供することを見出した。我々のデータから、低い平均基底速度（10nm/秒未満；これは、アクトミオシン細胞骨格の品質が悪いことを示す）を示す胚、加えて極めて頻繁な速度ピーク（ピーク間インターバルが10分未満；これは、頻繁な Ca^{2+} 一過性上昇を反映する）を示す胚は、インビトロでは胚盤胞期まで、またはインビボでは臨月まで発達することはまれであるということが示される。この結果は、機能的なアクチン細胞骨格と Ca^{2+} 一過性上昇の正しいパターン（特に Ca^{2+} 上昇にかかる全体の時間）とはいずれも発生に重要であるという発見と一致する¹²、¹⁵、¹⁶、³⁷⁻³⁹。しかしながら、これらの要素は、蛍光色素および有害な放射線照射を用いる侵襲的な手法を含むため、研究施設や医療施設では優れた品質の胚を選択するために使用できない。従って、体外受精診療所で行なわれている現行の方法は、3日目に形態学的に胚の生存能力および増殖を評価するか、あるいは3日目の評価が信頼性が低いために5日目に評価することである⁴⁰⁻⁴²。発生の最初の2日で一連のパラメーターをイメージングおよびモニターすることによって、相当な進歩をもたらすことができる⁴³。胚の生命力およびその発生を達成する能力は、それよりもかなり短い期間で、すなわち受精前後のちょうど2時間で、非侵襲的なイメージングを用いることによって評価することができる。

【0098】

すなわち我々は、受精時のアクトミオシン細胞骨格の動的な振動の挙動を誘発することにおける精子の重要性を確認した。それに続く運動は、完全な発生能を達成する卵の能力を評価する強力な方法を提供するパターンおよびタイミングを有する。そのようなものとして、我々の方法は、補助繁殖診療所で実用的に使用できる高い可能性を有する。

【0099】

均等物

上述した詳細な説明は、当業者により本発明が実施可能になるのに十分であるとみなさ

10

20

30

40

50

れる。実施例は本発明の一形態の単なる説明を目的としているため、本発明は示された実施例に限定されることはなく、その他の機能的に同等な実施態様は本発明の範囲内である。本明細書において示され説明されたものに加えて、本発明の様々な改変が、前述の説明から当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲内に含まれるものとする。本発明の各実施態様に、本発明の利点および目的が包含されていなくてもよい。

【0100】

本明細書において開示された特許文献などの全ての参考文献は、あらゆる目的のために、特に本明細書で述べられた開示のために、それらの全体が開示に組み入れられる。

【0101】

【表1】

10

表1

コントロールおよび阻害剤で処理した接合体における速度ピークおよび事後運動の平均振幅

		速度ピークの平均振幅 ±標準偏差 (nm/秒)	事後運動の平均振幅 ±標準偏差(nm/秒)
コントロール 接合体*	ステージ1 [†] (18の接合体、45のピーク)	29.7±19.4	8.7±2.8
	ステージ2 (32の接合体、108のピーク)	44.9±25.0	12.3±5.0
	ステージ3 (55の接合体、88のピーク)	12.2±10.0	17.7±6.4
ノコダゾールで 処理した接合体	ステージ1 (3の接合体、7のピーク)	20.6±11.2	11.1±3.9
	ステージ2 (17の接合体、46のピーク)	35.2±19.3 [§]	16.6±6.8 [‡]
	ステージ3 (66の接合体、115のピーク)	10.4±8.5	21.5±6.7 [‡]
タキソールで処 理した接合体	ステージ1 (3の接合体、6のピーク)	18.0±5.0 [‡]	7.9±4.3
	ステージ2 (15の接合体、37のピーク)	29.9±21.0 [‡]	11.1±5.3
	ステージ3 (18の接合体、33のピーク)	11.5±6.5	14.3±5.8 [‡]
ジャスプラキノ リドで処理した 接合体	ステージ1 [†] (1の接合体、3のピーク)	20.9±10.1	5.2±2.1
	ステージ2 (22の接合体、50のピーク)	14.5±8.3 [‡]	4.2±1.9 [‡]
	ステージ3 (57の接合体、102のピーク)	10.8±7.6	3.8±2.8 [‡]

20

30

*速度ピークおよび事後運動の平均振幅は、解析されたステージで有意に異なる。

[†]受精後のステージは本文で説明される。

[‡]ジャスプラキノリドで処理した接合体のステージ1からの値は、ピーク/胚の数が少ないために統計処理しなかった。

[§]コントロールに対して p<0.05、[‡]コントロールに対して p<0.01、[‡]コントロールに対して p<0.0001。

40

【0102】

【 表 2 】

表 2
受精したマウス卵の基底細胞質内速度に対するCa²⁺キレート化および細胞骨格阻害剤の影響

	コントロール 接合体 (n=82)	未受精卵 (n=55)	BAPTA 処理し た接合体 (n=20)	ノコダゾール 処理した 接合体 (n=38)	タキソール 処理した 接合体 (n=27)	サイトカラシ ンD処理した 接合体 (n=21)	ジャスプラキノ リド処理した 接合体 (n=60)	ML-7 処理した 接合体 (n=17)
平均の基底細胞質内 速度±標準偏差 (nm/秒)	9.0±1.9	4.3±1.0*	15.3±3.3*	11.0±1.5*	7.7±1.7 [§]	3.1±0.6*	3.0±0.4*	A. 5.1±1.3* [†] B. 8.3±1.1 [†] ‡

A-M 期/中間期に移行する前の平均基底速度

B-M 期/中間期に移行した後の平均基底速度

*コントロールに対して p<0. 0001、[§]コントロールに対して p<0. 001、[†]コントロールに対して p<0. 05、[‡]コントロールに対して p<0. 001。

【表 3】

表 3

ICSI または SrCl_2 での活性化により得られた胚における速度ピークおよび事後運動の平均振幅

胚:	受精後のステージ	速度ピークの 平均振幅±標準偏差 (nm/秒)	事後運動の 平均振幅±標準偏差 (nm/秒)
皮質下の ICSI によって 得られた胚	ステージ 1* (6 の接合体、9 のピーク)	19.5±11.1	10.7±5.9
	ステージ 2 (14 の接合体、66 のピーク)	34.1±15.4	12.8±5.0
	延長したステージ 1† (14 の接合体、75 のピーク)	32.3±15.7	12.5±5.1
	ステージ 3 (16 の接合体、28 のピーク)	14.3±9.4	13.6±4.9
中央の細胞質への ICSI によって得られた胚	延長したステージ 1† (31 の接合体、209 のピーク)	14.6±8.2*	10.5±14.7
	ステージ 3 (31 の接合体、37 のピーク)	10.3±6.8	12.4±3.5
SrCl_2 での活性化によ って得られた胚§	延長したステージ 1† (45 の単為発生胚、 337 のピーク)	74±4.0 ^{#, †, ‡}	7.7±2.9 ^{#, **}
不活化された精子での ICSI および SrCl_2 での 活性化によって得られ た胚	ステージ 1 (10 の接合体、30 のピーク)	8.8±8.8 [†]	7.9±3.0 [#]
	ステージ 2 (16 の接合体、71 のピーク)	8.6±5.4 [#]	10.1±3.5 ^{#, ††}
	ステージ 3 (19 の接合体、71 のピーク)	7.1±4.3 [#]	13.0±7.0

*受精後のステージは本文で説明される。

†中央の細胞質に精子が注入された卵または SrCl_2 で活性化された卵ではステージ 2 (すなわち FC の完全な形成) は存在しなかったため、名称「延長したステージ 1」は、第二極体形成の開始と前核形成との間の期間を意味する。‡ SrCl_2 で活性化された卵の場合、速度ピークの総数、速度ピークがない場合は事後運動の総数が示される。§ SrCl_2 で活性化された卵では、前核が観察できるようになる前に速度ピークおよび事後運動は止まるため、ステージ 3 は解析されない。

#皮質下への ICSI により得られた接合体における類似のステージに対して、 $p < 0.001$; [†]皮質下への ICSI により得られた接合体におけるステージ 1 に対して、 $p < 0.05$; [‡]中央の細胞質への ICSI により得られた接合体に対して、 $p < 0.0001$; **中央の細胞質への ICSI により得られた接合体に対して、 $p < 0.01$; ^{††} SrCl_2 で活性化された卵における延長したステージ 1 に対して、 $p < 0.001$ 。

【 0 1 0 4 】

【表 4】

表 4

様々な受精後のステージにおける速度ピーク間のベクトルの方向

受精後の ステージ [†]	解析された速度 ピークの合計数	ベクトルが特定の方向を向いた速度ピークの数*(%) :			
		第二極体に 向かう	第二極体と FC との間	FC に向かう	特定の方向なし
ステージ 1 (11 の接合体)	25	17 [‡] (66.7)	6 (25.9)	2 [§] (7.4)	0
ステージ 2 (19 の接合体)	65	1 [†] (1.5)	22 (33.8)	42 [§] (64.6)	0
ステージ 3 (19 の接合体)	34	7 (20.6)	4 (11.8)	8 (23.5)	15 (44.1)

*運動の方向は、材料および方法で説明されているようにして判断した。

†接合体の発生のステージは本文で説明される。

‡、§ $p < 0.0001$ 。

【 0 1 0 5 】

【 表 5 】

表 5

マウスの体外受精卵における減数分裂完了時の Ca^{2+} キレート化および細胞骨格阻害剤の影響

	接合体の合計数*	第二極体を押し出せ なかった接合体(%)	第二極体を押し出し た接合体(%)
コントロール接合体	52	0	52(100)
BAPTA で処理した接合体	6	2(33.3)	4(66.7)
ノコダゾールで処理した接合体	12	7(58.3)	5(41.7)
タキソールで処理した接合体	12	12(100)	0
サイトカラシン D で処理した接合体	10	10(100)	0
ジャスプラキノリドで処理した接合体	23	23(100)	0
ML-7 で処理した接合体	13	4(30.8)	9(69.2)

*この解析には、記録開始前に第二極体を押し出していない接合体のみが用いられた。

10

【 0 1 0 6 】

20

【表 6 - 1】

表 6
胚の品質予測と実際の発生可能性との比較

番号	移植された 胚の数	平均の 基底速度 (nm/秒)	平均の速度 ピーク間イ ンターバル (nm)	培養 4 日後の 細胞数の予測 (平均±標準偏差)	培養 4 日後に胞胚期 に達する可能性の 予測(%) (平均±標準偏差)	発生が成功する 尤度の推定 (高または低)	解剖の 時期 (dpc)	胚/子 の数	再吸収 の数	移植 効率 (%)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	6	11.2	21.4	28	35~40	高	6.5	5	-	83.3
		12.3	19.1	29	40					
		11.1	25.9	32	45~50					
		13.2	20.1	33	50~55					
		16.0	20.3	39~40	65~70					
2	6	14.1	33.2	52	85~90	低	6.5	1	-	16.7
				(36±9)	(56±19)					
		6.7	9.4	9~10	0~5					
		8.6	13.6	15~16	5~10					
		10.5	9.2	17	5~10					
3	5	10.4	13.1	19	10~15	高	19.5	4	..*	80
		11.2	9.7	19	10~15					
		9.4	23.2	23~27	20~25					
				(17±5)	(11±7)					
		12.5	15.3	25~26	30~35					
		11.4	18.7	26	30~35					
		14.0	13.1	27~28	35~40					
		13.5	16.1	29~30	40~45					
		13.5	18.1	31~32	45~50					
				(28±3)	(39±7)					

【 0 1 0 7 】

10

20

30

40

【表 6 - 2】

表 6 続き

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4	9	11.2 11.4 9.8 12.8 13.9 13.8 14.7 16.2 16.8	18.8 17.8 24.6 16.7 17 17.9 17.3 17.2 19.1	25~26 25~26 26~27 28~29 31 32 33~34 36 38~39 (31±5)	25~30 25~30 30~35 35~40 45~50 50 50~55 60~65 65~70 (45±15)	高	19.5	7	—*	77.8
5	5	18.2 17.2 15.6 16.2 15.9	14.6 17.6 20.0 20.7 29.7	35~40 38 38~39 40~41 53~54 (42±7)	60~70 65~70 65~70 70~75 80~90 (71±8)	高	19.5	5	—*	100
6	5	12.3 12.7 13.7 12.4 12.8	20.5 21.9 19.7 24.8 23.7	30~31 33 33~34 35~36 36~37 (34±2)	40~45 50 50~55 55~60 55~60 (52±6)	高	19.5	5	—*	100
7	5	10.0 11.3 10.4 10.2 10.5	5.5 7.4 11.5 16.8 18.3	10~15 18 19 21~22 22~23 (19±4)	5 10 10 15~20 20 (13±6)	低	19.5	3	0	60

【 0 1 0 8 】

10

20

30

40

【表 6 - 3】

表 6 続き

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
8	6	8.1 9.4 9.2 10.1 10.2 13.3	6.4 6.4 17.1 16.4 16.0 7.4	11~12 13~14 18~19 20~21 20~21 21~22 (18±4)	0~5 0~5 10~15 15~20 15~20 20 (12±8)	低	19.5	1	2	16.7
9	4	9.5 9.2 9.8 7.2	7.3 9.7 13.3 8.0	10 14~15 14~15 18~19 (14±3)	0~5 0~5 5~10 10~15 (6±5)	低	19.5	1*	1	25
10	4	6.6 10.1 13.5 12.1	6.7 5.5 4.4 10.1	13~14 14~15 19~20 20~22 (17±4)	0~5 0~5 10~20 15~20 (9±8)	低	19.5	1#	3	25

*19.5dpc で自然に出産された。
#2 日後に死亡が確認された。

【 0 1 0 9 】

10

20

30

40

【表 7】

表 7

実験で使用されたイメージングシステムの光学的な詳細

	ツァイスの LSM510 メタ	ツァイスの アキシオパート	デルタビジョン
対物の倍率	20 倍*	20 倍	20 倍
対物の NA	0.75	0.75	0.75
コンデンサーの NA	0.55	0.55	0.55
カメラのチップサイ ズ(ピクセル)	—*	1024×1344	512×512
ビニング	—	2×2	1×1

*0.7 倍(最終倍率 14 倍)でスキャンする前にスキャン領域をデジタル処理により大きくした。

#画像を 1800×1800 ピクセルの解像度でスキャンした。

10

【 0 1 1 0 】

参考文献

1. Roegiers, F., McDougall, A. & Sardet, C. The sperm entry point defines the orientation of the calcium-induced contraction wave that directs the first phase of cytoplasmic reorganization in the ascidian egg. *Development* 121, 3457-3466 (1995).
2. Sardet, C., Paix, A., Prodon, F., Dru, P. & Chenevert, J. From oocyte to 16-cell stage: cytoplasmic and cortical reorganizations that pattern the ascidian embryo. *Dev Dyn* 236, 1716-1731 (2007).
3. Speksnijder, J.E., Sardet, C. & Jaffe, L.F. The activation wave of calcium in the ascidian egg and its role in ooplasmic segregation. *J Cell Biol* 110, 1589-1598 (1990).
4. Stack, C., Lucero, A.J. & Shuster, C.B. Calcium-responsive contractility during fertilization in sea urchin eggs. *Dev Dyn* 235, 1042-1052 (2006).
5. Weaver, C. & Kimelman, D. Move it or lose it: axis specification in *Xenopus*. *Development* 131, 3491-3499 (2004).
6. Gerhart, J. et al. Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. *Development* 107 Suppl, 37-51 (1989).
7. Abbott, A.L. & Ducibella, T. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci* 6, D792-806 (2001).
8. FitzHarris, G., Marangos, P. & Carroll, J. Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in mouse oocytes and embryos. *Mol Biol Cell* 14, 288-301 (2003).
9. Sun, Q.Y. et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 122, 155-163 (2001).
10. Ducibella, T. & Fissore, R. The roles of Ca^{2+} , downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev Biol* 315, 257-279 (2008).
11. Tombes, R.M., Simerly, C., Borisy, G.G. & Schatten, G. Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} independent in the mouse oocyte. *J Cell Biol* 117, 799-811 (1992).
12. Toth, S., Huneau, D., Banrezes, B. & Ozil, J.P. Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction* 131, 27-34 (2006).

20

30

40

50

13. Ozil, J.P. et al. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal in the mouse. *Dev Biol* 282, 39-54 (2005).
14. Ducibella, T. et al. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. *Dev Biol* 250, 280-291 (2002).
15. Ozil, J.P., Banrezes, B., Toth, S., Pan, H. & Schultz, R.M. Ca^{2+} oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev Biol* 300, 534-544 (2006).
16. Ozil, J.P. & Huneau, D. Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca^{2+} signal regime on development. *Development* 128, 917-928 (2001).
17. Maro, B., Johnson, M.H., Pickering, S.J. & Flach, G. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J Embryol Exp Morphol* 81, 211-237 (1984). 10
18. Maro, B., Johnson, M.H., Webb, M. & Flach, G. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol* 92, 11-32 (1986).
19. Gray, D. et al. First cleavage of the mouse embryo responds to change in egg shape at fertilization. *Curr Biol* 14, 397-405 (2004).
20. Deguchi, R., Shirakawa, H., Oda, S., Mohri, T. & Miyazaki, S. Spatiotemporal analysis of Ca^{2+} waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during Ca^{2+} oscillations in fertilized mouse eggs. *Dev Biol* 218, 299-313 (2000). 20
21. Raffel, M., Willert, C.E. & Kompenhans, J. (Springer, 1998).
22. Willert, C.E. & Gharib, M. Digital particle image velocimetry. *Exp Fluids* 10, 181-193 (1991).
23. Keane, R.D. & Adrian, R.J. Theory of cross-correlation analysis of PIV images. *Appl Sci Res* 49, 191-215 (1992).
24. Westerweel, J. Fundamentals of digital particle image velocimetry. *Measurement Science and Technology* 8, 1379-1392 (1997).
25. Simerly, C., Nowak, G., de Lanerolle, P. & Schatten, G. Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isoforms during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos. *Mol Biol Cell* 9, 2509-2525 (1998). 30
26. Schuh, M. & Ellenberg, J. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Curr Biol* 18, 1986-1992 (2008).
27. Tinevez, J.Y. et al. Role of cortical tension in bleb growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18581-18586 (2009).
28. Deng, M., Williams, C.J. & Schultz, R.M. Role of MAP kinase and myosin light chain kinase in chromosome-induced development of mouse egg polarity. *Dev Biol* 278, 358-366 (2005).
29. Swann, K. & Ozil, J.P. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol* 152, 183-222 (1994). 40
30. Kline, D. & Kline, J.T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 149, 80-89 (1992).
31. Furuta, A. et al. Microtubule disruption with BAPTA and dimethyl BAPTA by a calcium chelation-independent mechanism in 3T3-L1 adipocytes. *Endocr J* 56, 235-243 (2009).
32. Xu, N., Luo, K.Q. & Chang, D.C. Ca^{2+} signal blockers can inhibit M/A transition in mammalian cells by interfering with the spindle checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 737-745 (2003). 50

33. Deng, M., Suraneni, P., Schultz, R.M. & Li, R. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev Cell* 12, 301-308 (2007).
34. Halet, G., Tunwell, R., Parkinson, S.J. & Carroll, J. Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca²⁺ oscillations at fertilization in mouse eggs. *J Cell Biol* 164, 1033-1044 (2004).
35. Markoulaki, S., Matson, S. & Ducibella, T. Fertilization stimulates long-lasting oscillations of CaMKII activity in mouse eggs. *Dev Biol* 272, 15-25 (2004).
36. Markoulaki, S., Matson, S., Abbott, A.L. & Ducibella, T. Oscillatory CaMKII activity in mouse egg activation. *Dev Biol* 258, 464-474 (2003). 10
37. Shawlot, W., Deng, J.M., Fohn, L.E. & Behringer, R.R. Restricted beta-galactosidase expression of a hygromycin-lacZ gene targeted to the beta-actin locus and embryonic lethality of beta-actin mutant mice. *Transgenic Res* 7, 95-103 (1998).
38. Shmerling, D. et al. Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the beta-actin locus by Cre/lox cassette replacement. *Genesis* 42, 229-235 (2005).
39. Bunnell, T.M. & Ervasti, J.M. Delayed embryonic development and impaired cell growth and survival in Actg1 null mice. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 564-572.
40. Scott, L. Embryological strategies for overcoming recurrent assisted reproductive technology treatment failure. *Hum Fertil (Camb)* 5, 206-214 (2002). 20
41. Bromer, J.G. & Seli, E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20, 234-241 (2008).
42. Scott, L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 9, 237-249 (2003).
43. Wong, C.C. et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 28, 1115-1121.
44. Plusa, B. et al. Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci* 118, 505-515 (2005). 30
45. Fraser, L. Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Androl* 3, 412-419 (1982).
46. Kamm, K.E. & Stull, J.T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276, 4527-4530 (2001).
47. Sveen, J. An introduction to MatPIV v.1.6.1. *Mechanics and Applied Mathematics* 27 (2004).
48. Westerweel, J. Theoretical analysis of the measurement precision in particle image velocimetry. *Exp Fluids* 29, S3-S12 (2000).
49. Kimura, Y. & Yanagimachi, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 52, 709-720 (1995). 40
50. Meilhac, S.M. et al. Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 331, 210-221 (2009).
51. Lawless, J. Negative binomial and mixed Poisson regression. *Canadian Journal of Statistics* 15, 209-225 (1987).
52. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002;129:3533-3544.
53. Swann K, Saunders CM, Rogers N, Lai FA. PLC ζ (zeta): A sperm protein that t 50

riggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals. *Sem Cell & Dev. Biol.* 2006;17:264-73.

54. Yu Y, Saunders CM, Lai FA, Swann K. Preimplantation development of mouse oocytes activated by different levels of human phospholipase C ζ . *Hum Reprod* 2008;23:365-373.

55. Rogers NT, Hobson E, Pickering S., Lai FA, Braude P, Swann K. PLC ζ causes Ca^{2+} oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 2004;128:697-702.

56. Yoneda A, Kashima M, Yoshida S, Terada K, Nakagawa S, Sakamoto A, Hayakawa K, Suzuki K, Ueda J, Watanabe T. Molecular cloning, testicular expression and oocyte activation potential of porcine phospholipase C ζ . *Reproduction* 2006;132:393-401.

57. Ross PJ, Beyhan Z, Lager AE, Yoon SY, Schellander K, Fissore RA, Cibelli JB. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C ζ . *BMC Dev Biol* 2008;8:16.

58. Ajduk A, Ilozue T, Windsor S, Yu Y, Seres KB, Bomphrey RJ, Tom BD, Swann K, Thomas A, Graham C, Zernicka-Goetz M. Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nature Commun* 2011;2:417.

59. Summers MC, Bhatnagar PR, Lawitts JA, Biggers JD. Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biol Reprod* 1995;53:431-7.

60. Nomikos M, Blayney LM, Larman MG, Campbell K, Rossbach A, Saunders CM, Swann K, Lai FA. Role of Phospholipase C- ζ Domains in Ca^{2+} -dependent Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Hydrolysis and Cytoplasmic Ca^{2+} Oscillations. *J Biol Chem* 2011;280:31011-31018.

61. Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou M, Calver BL, Cumbes B, Nounesis G, Swann K, Lai FA. Male infertility-linked point mutation disrupts the Ca^{2+} oscillation-inducing and PIP(2) hydrolysis activity of sperm PLC ζ . *Biochem J* 2011;434:211-217.

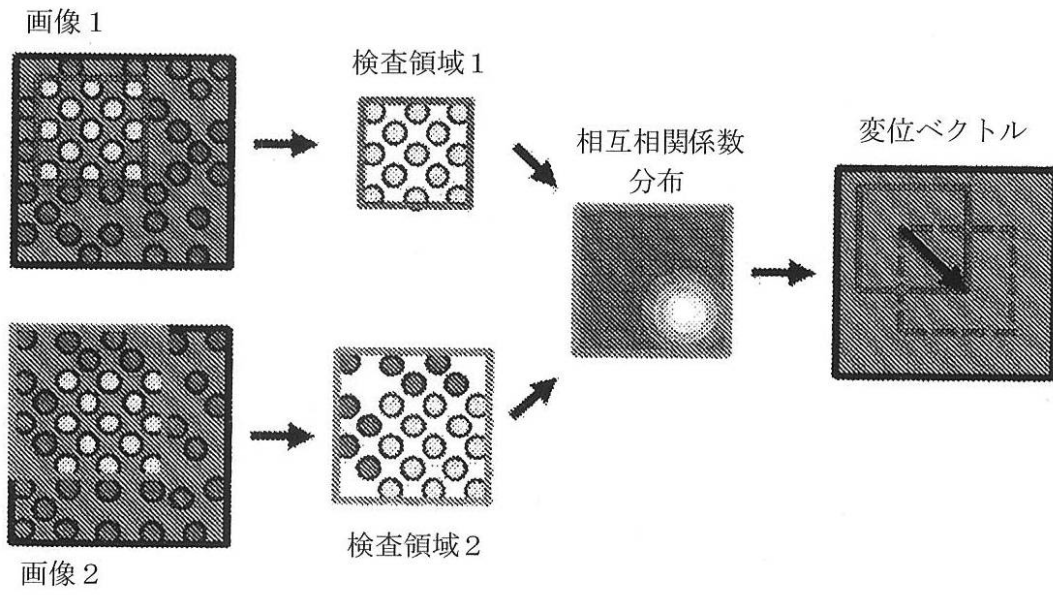
62. Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou M, Calver BL, Nounesis G, Swann K, Lai FA. Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5)P₂ requires the XY-linker region. *J Cell Sci* 2011;124:2582-90.

10

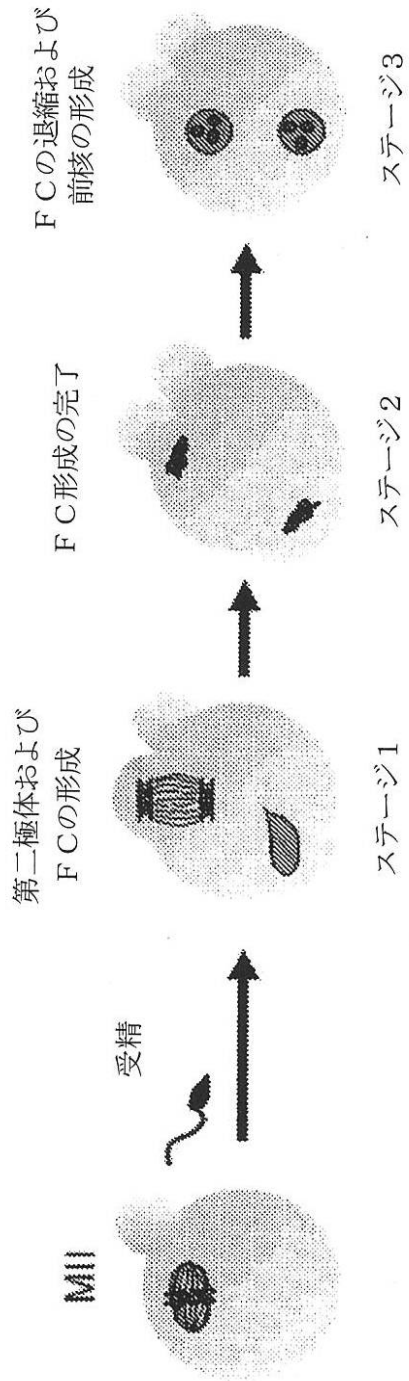
20

30

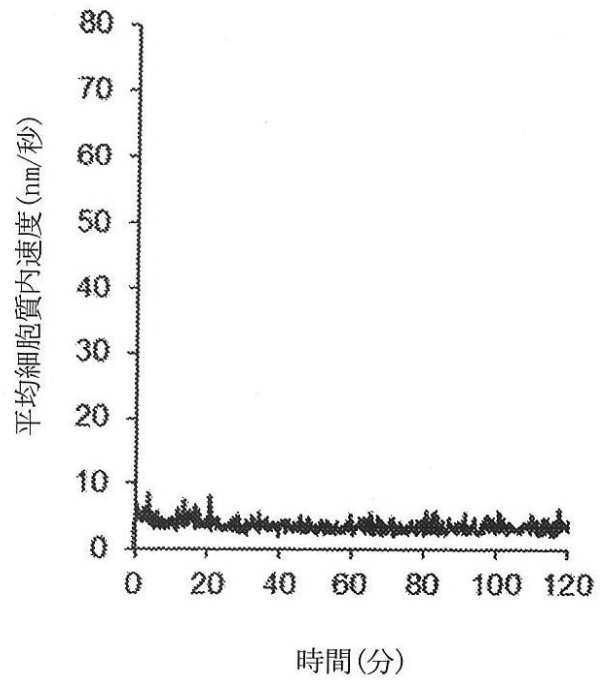
【図 1 a】



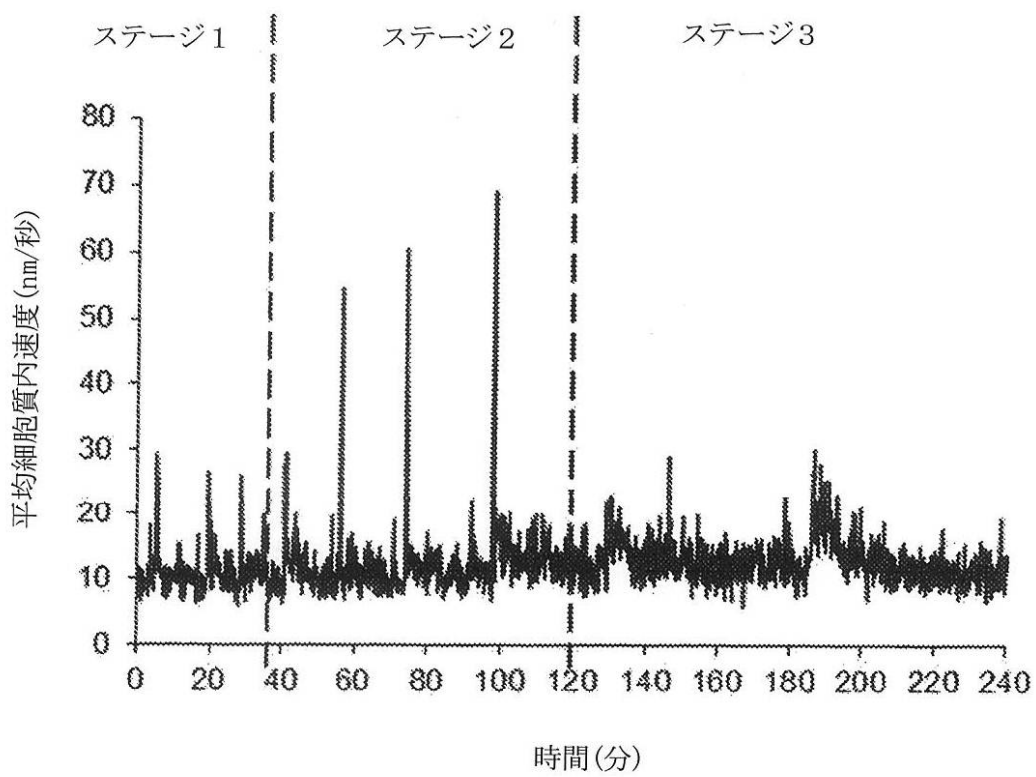
【図 1 b】



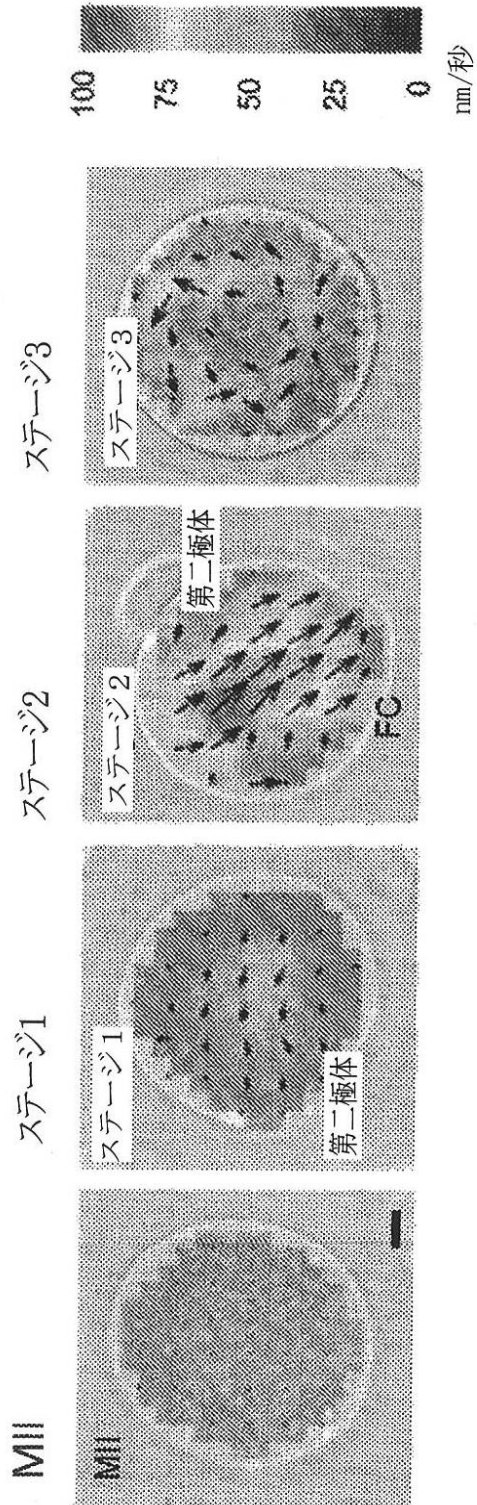
【図 1 c】



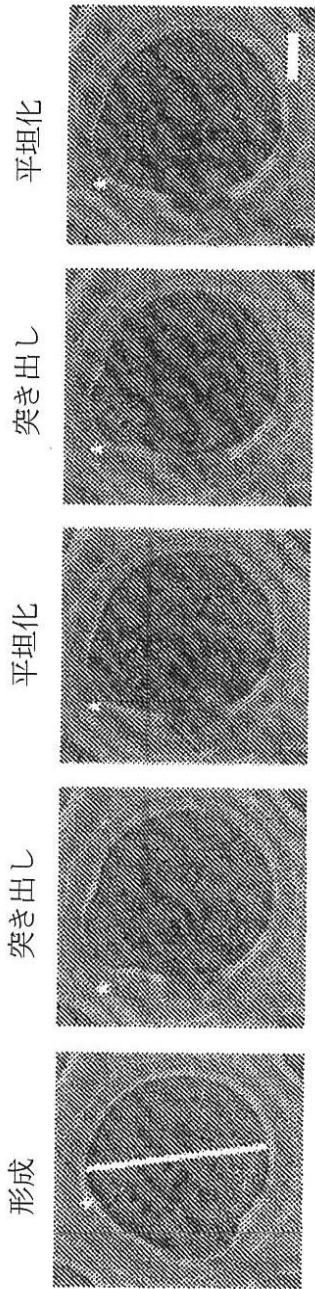
【図 1 d】



【図 1 e】

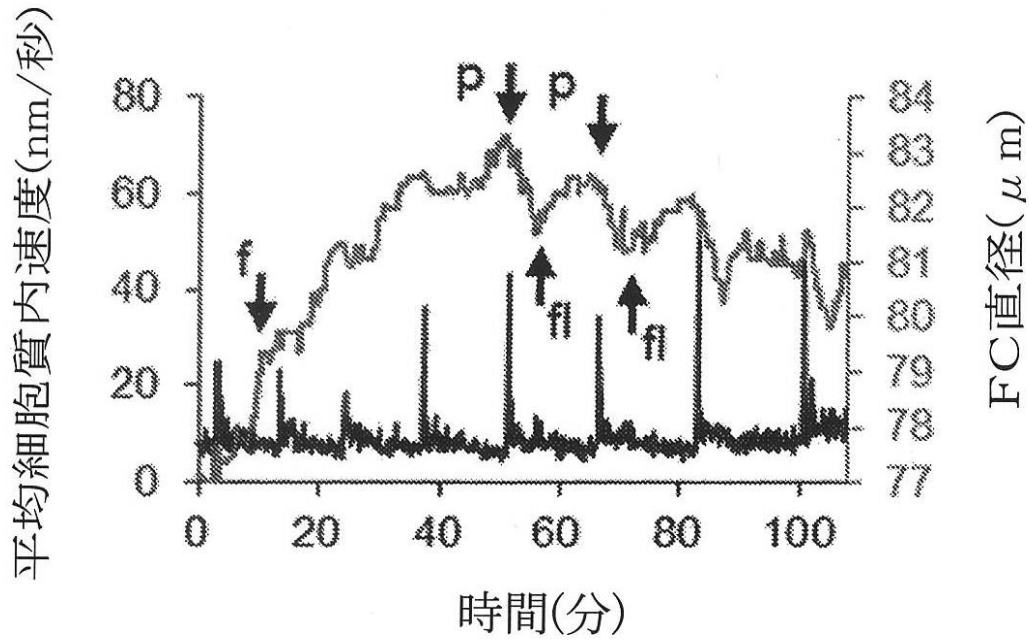


【図 2 a】

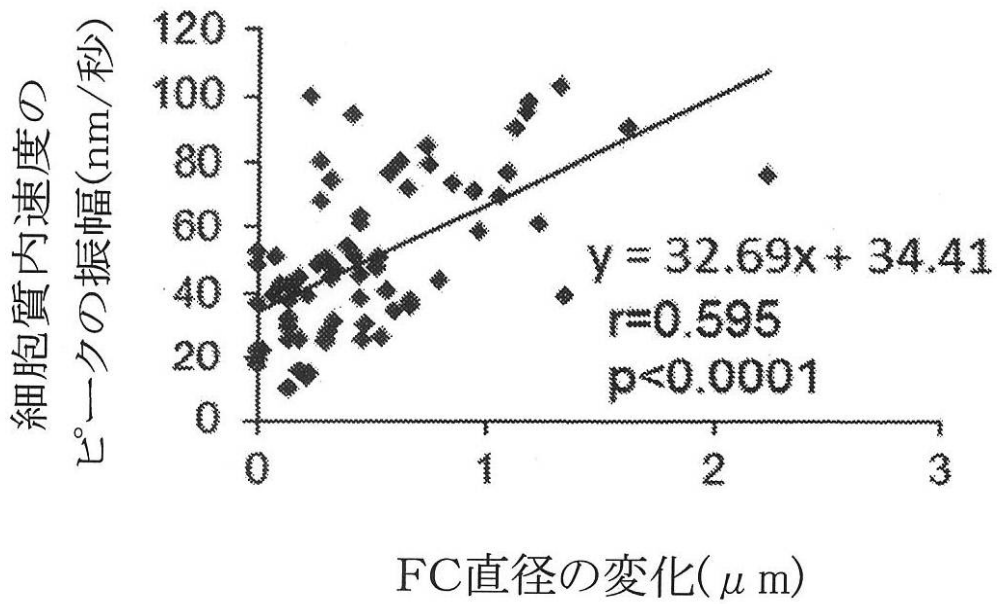


F C の形状変化：

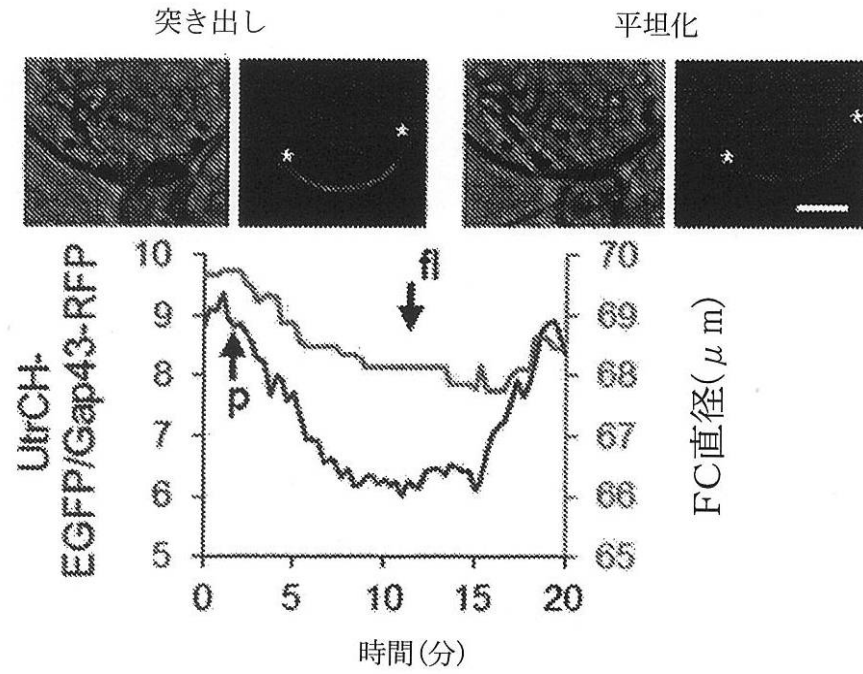
【図 2 b】



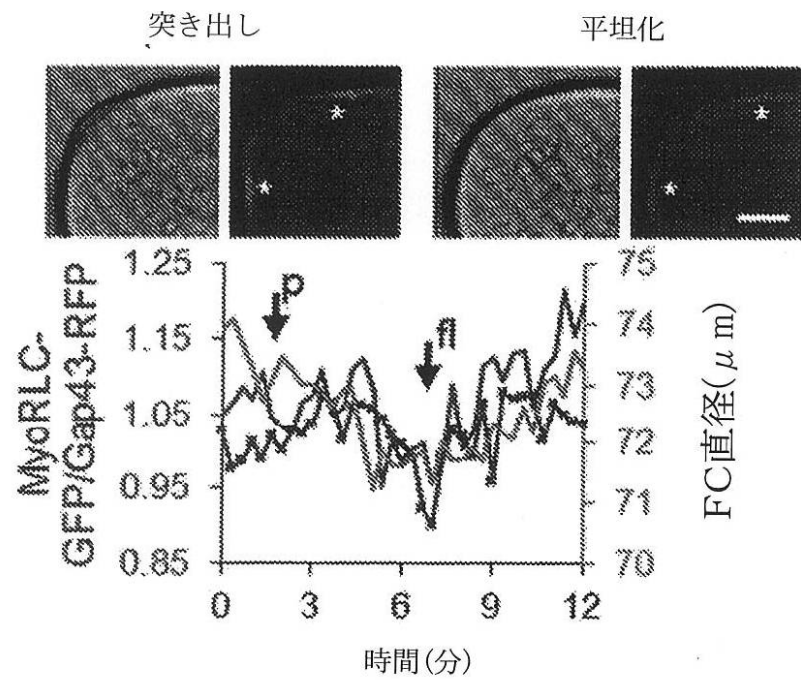
【図 2 c】



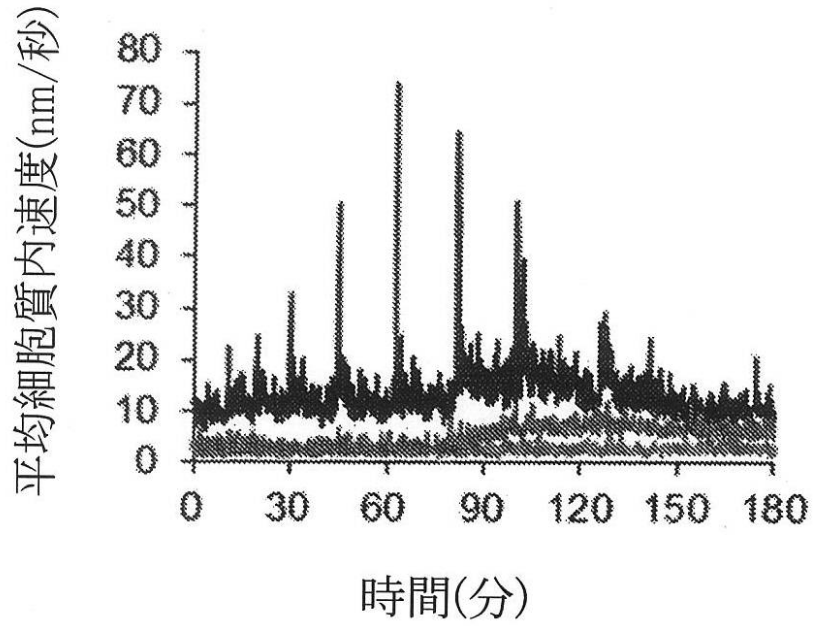
【図 2 d】



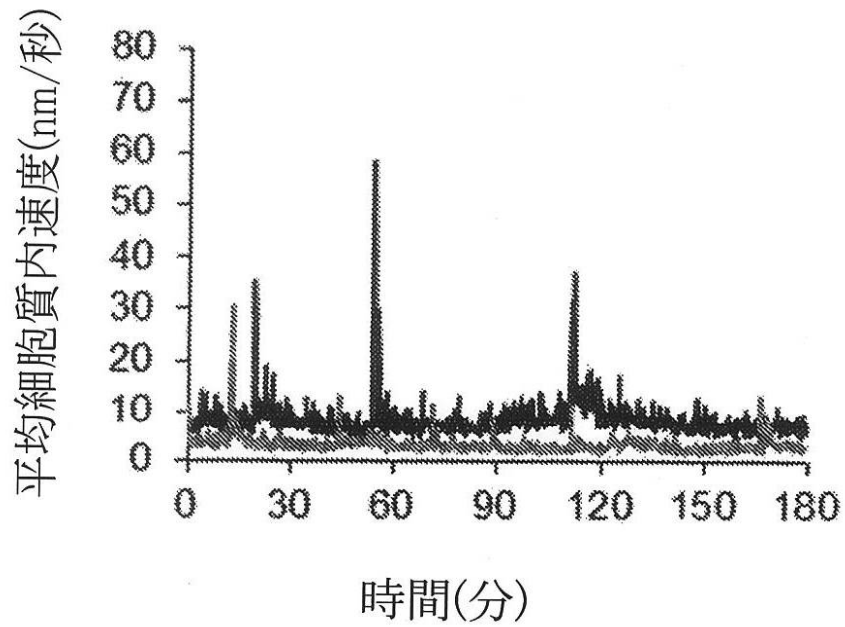
【図 2 e】



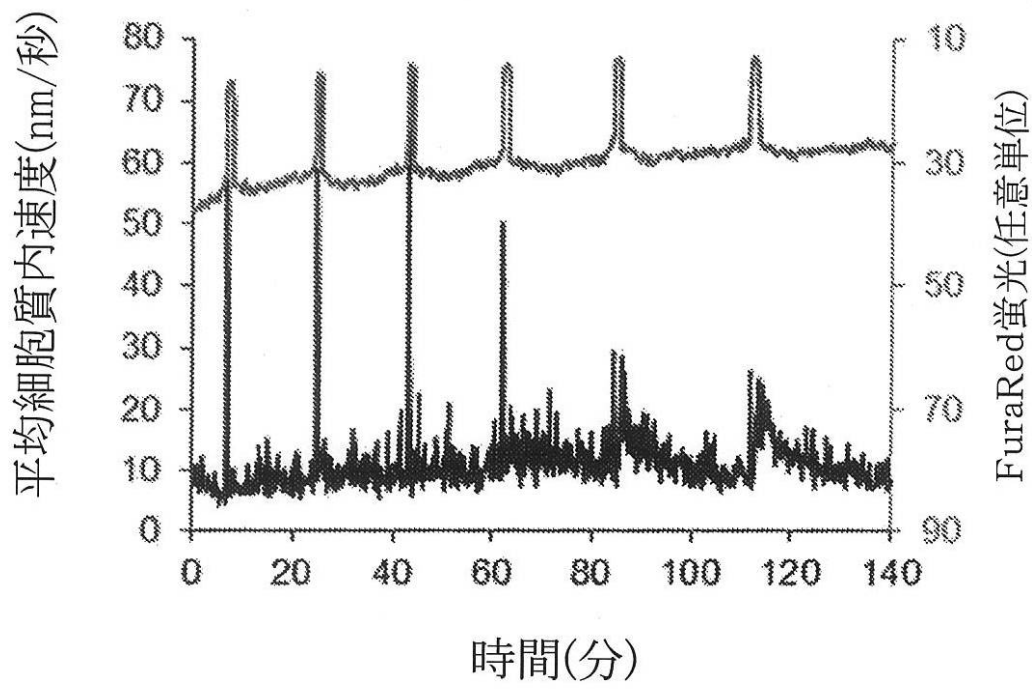
【図 2 f】



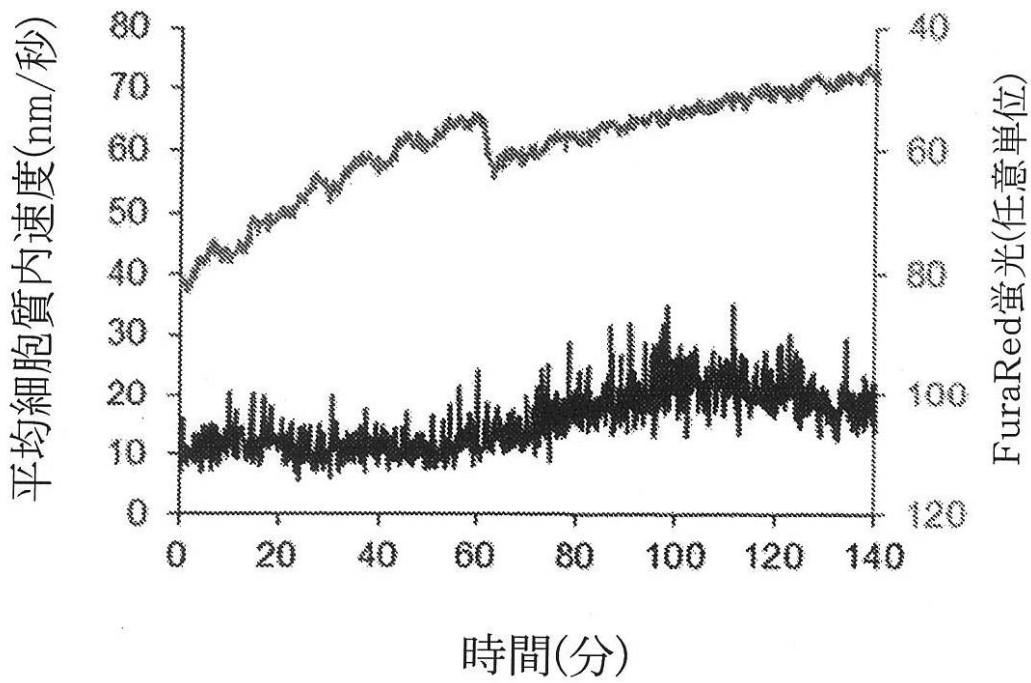
【図 2 g】



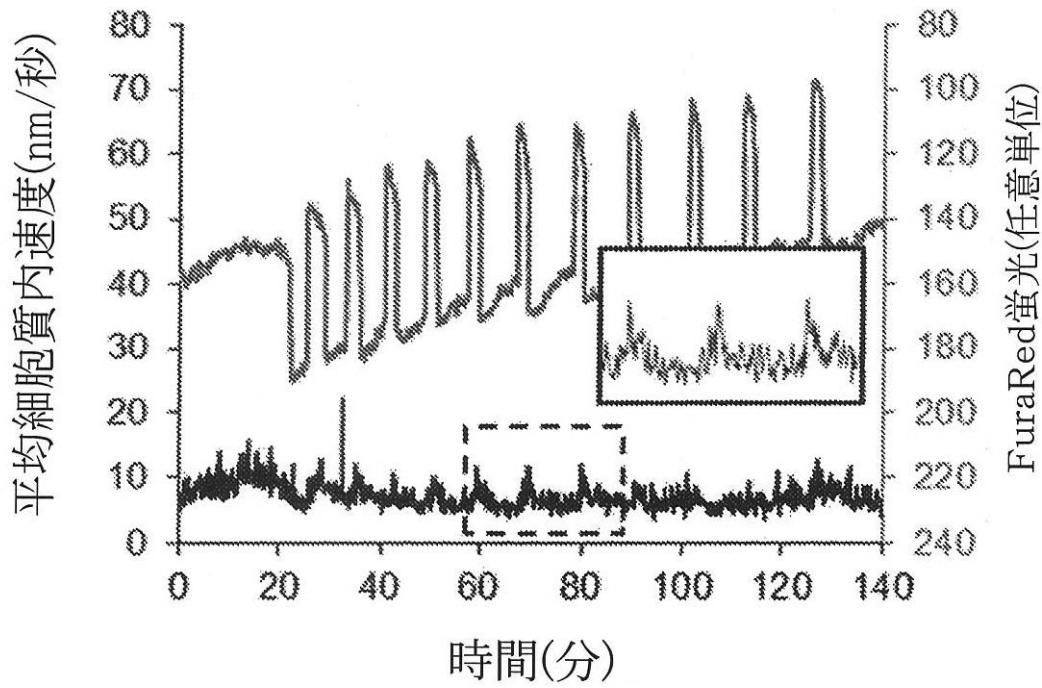
【図 3 a】



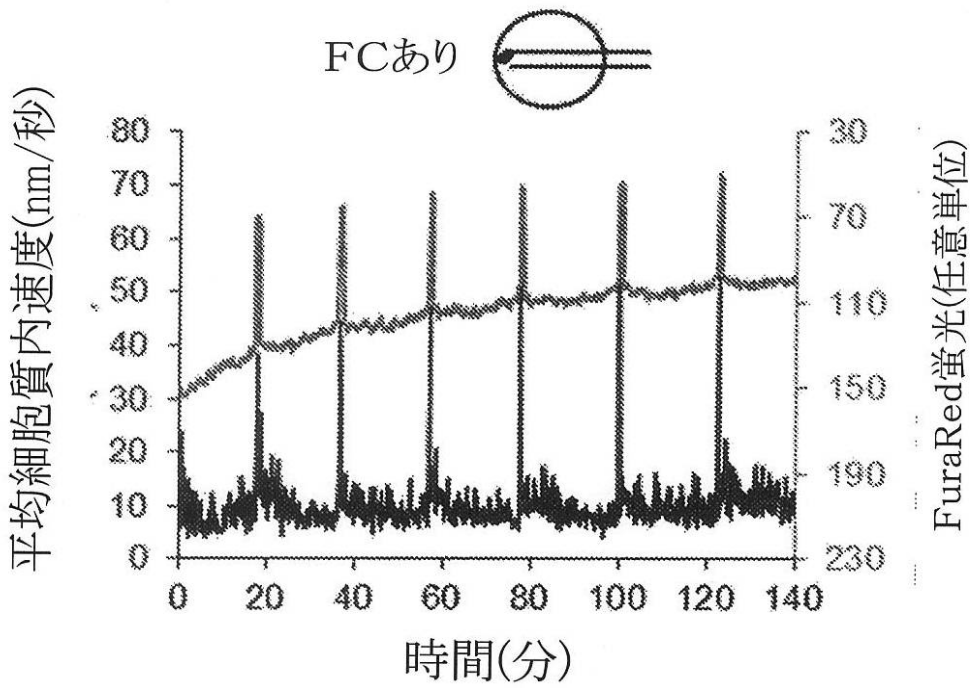
【図 3 b】



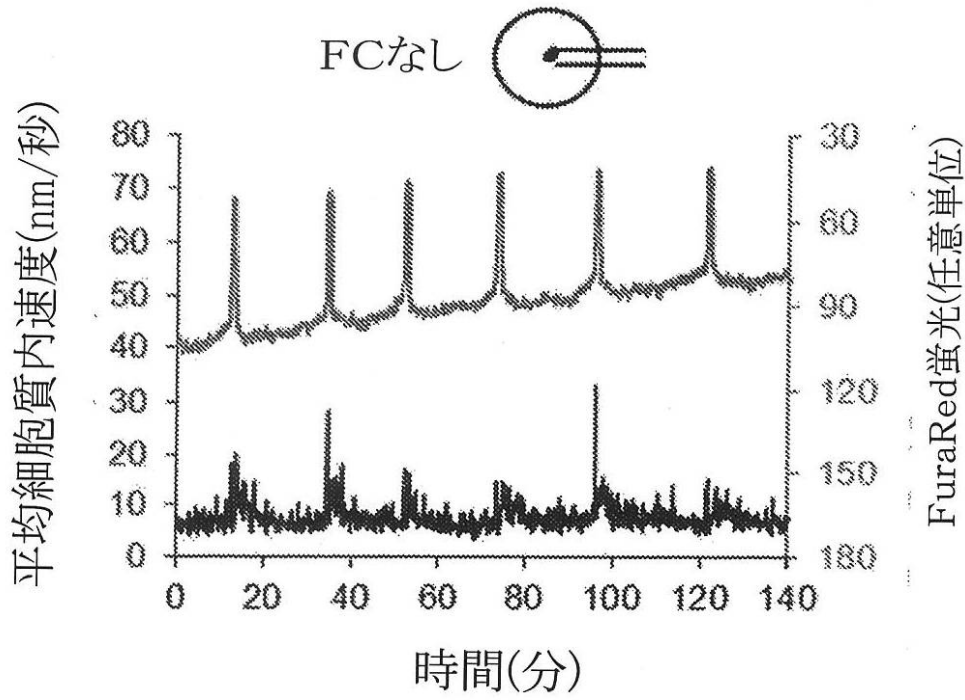
【図 3 c】



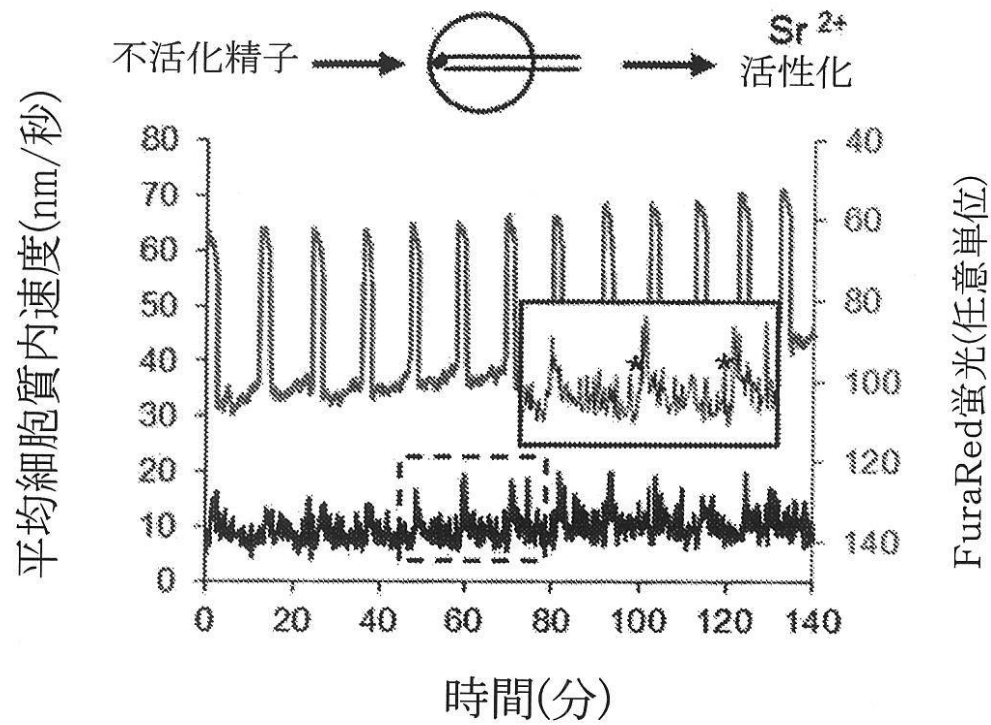
【図 4 a】



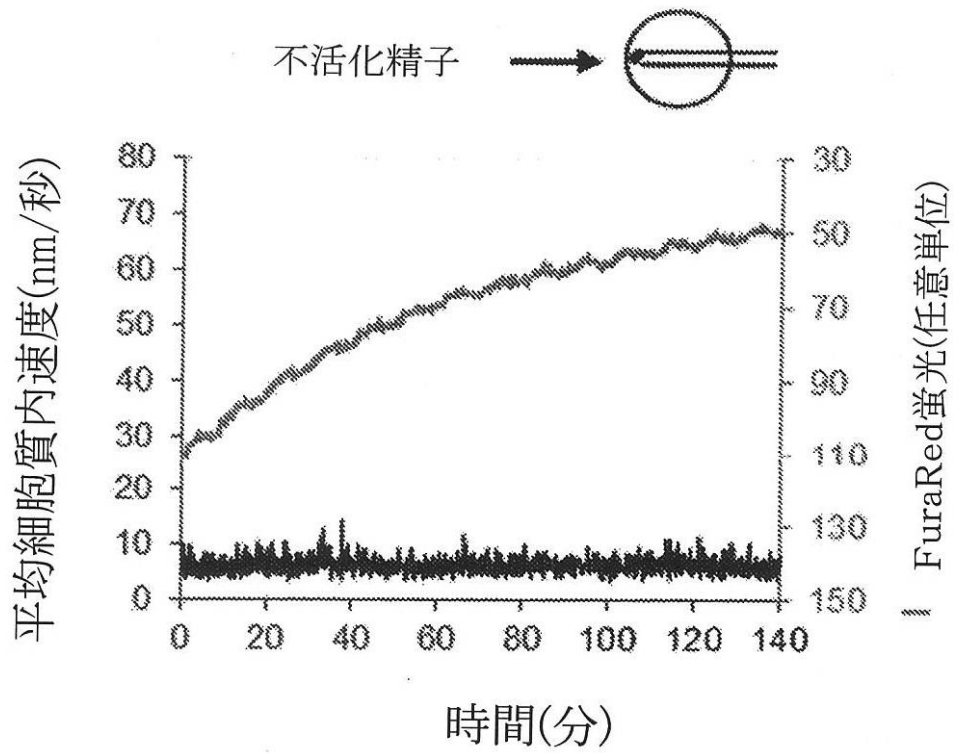
【図 4 b】



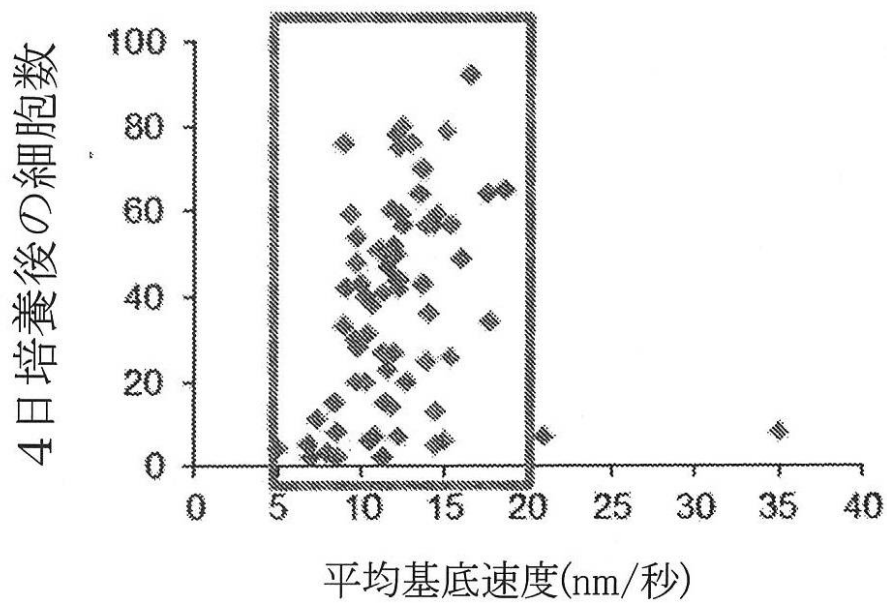
【図 4 c】



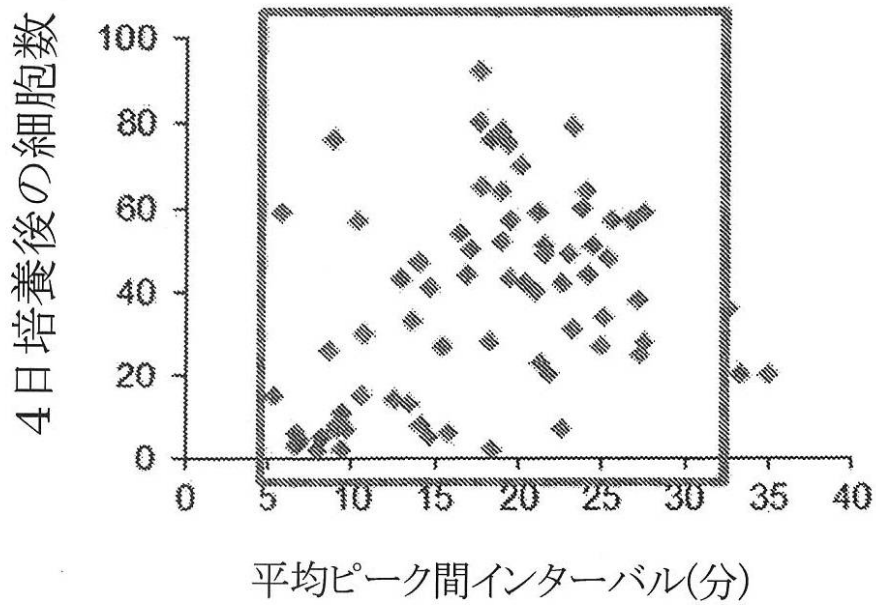
【図 4 d】



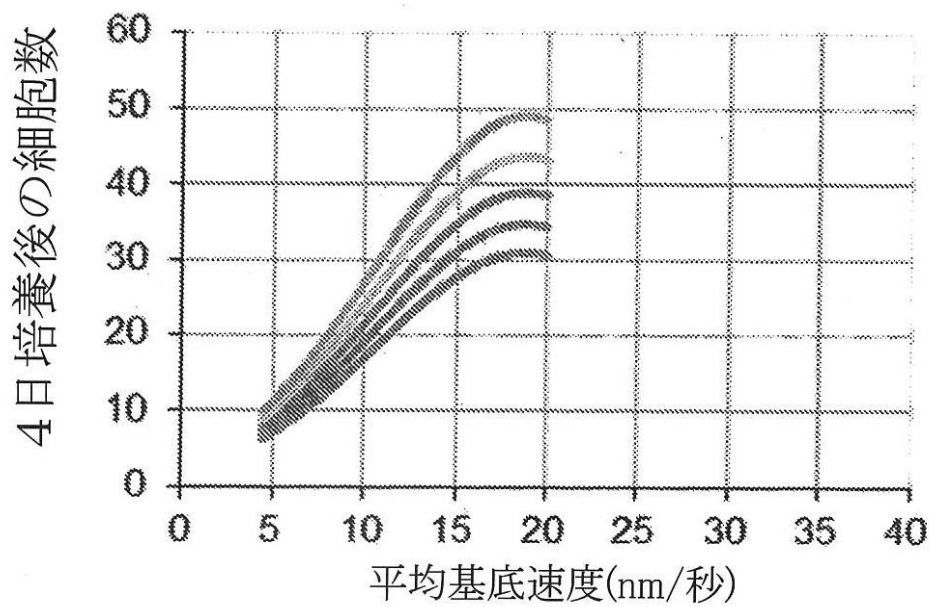
【図 5 a】



【図 5 b】

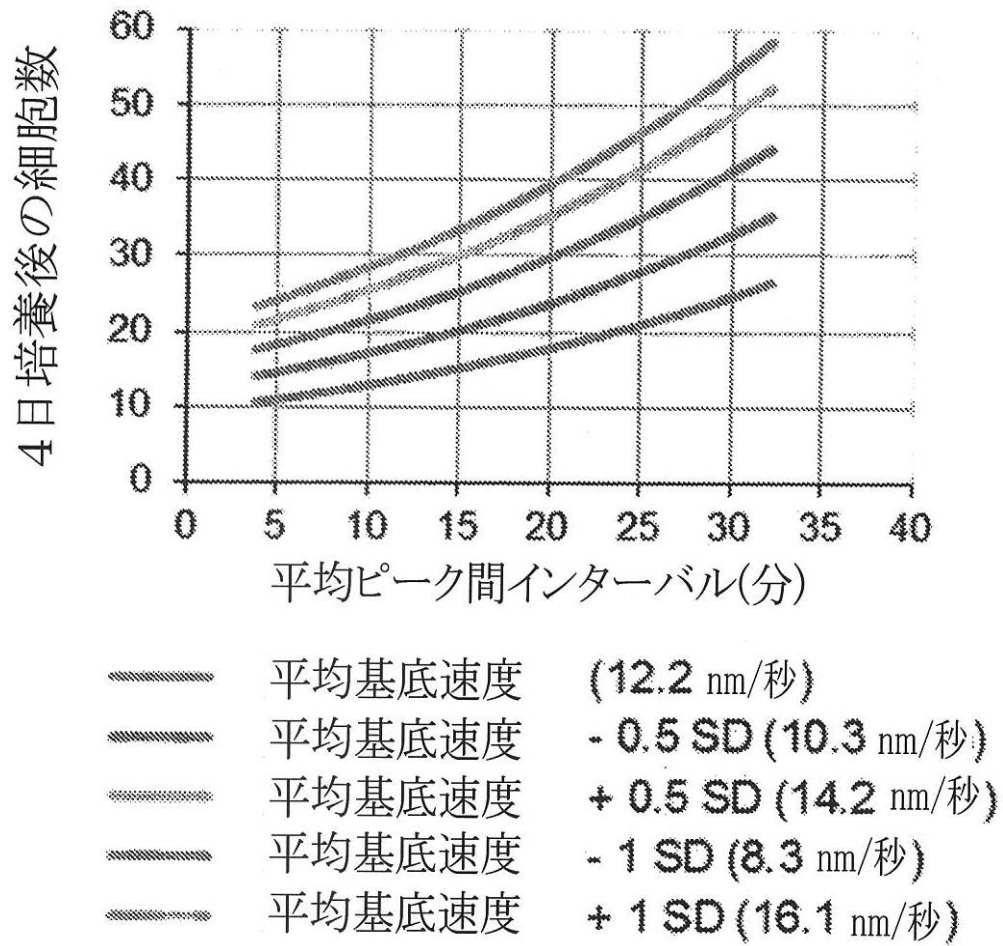


【図 5 c】

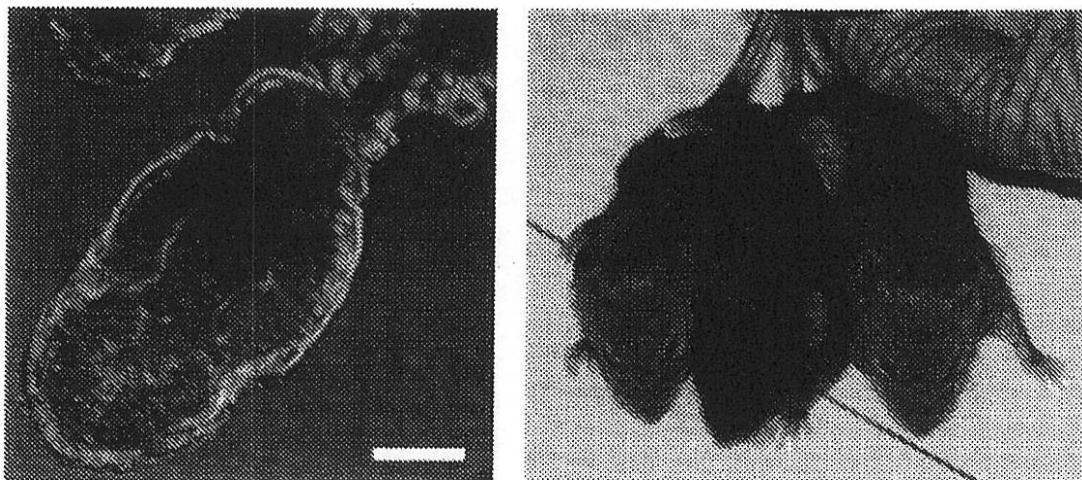


- 平均ピーク間インターバル (18.01 分)
- 平均ピーク間インターバル - 0.5 SD (14.48 分)
- 平均ピーク間インターバル + 0.5 SD (21.55 分)
- 平均ピーク間インターバル - 1 SD (10.94 分)
- 平均ピーク間インターバル + 1 SD (25.08 分)

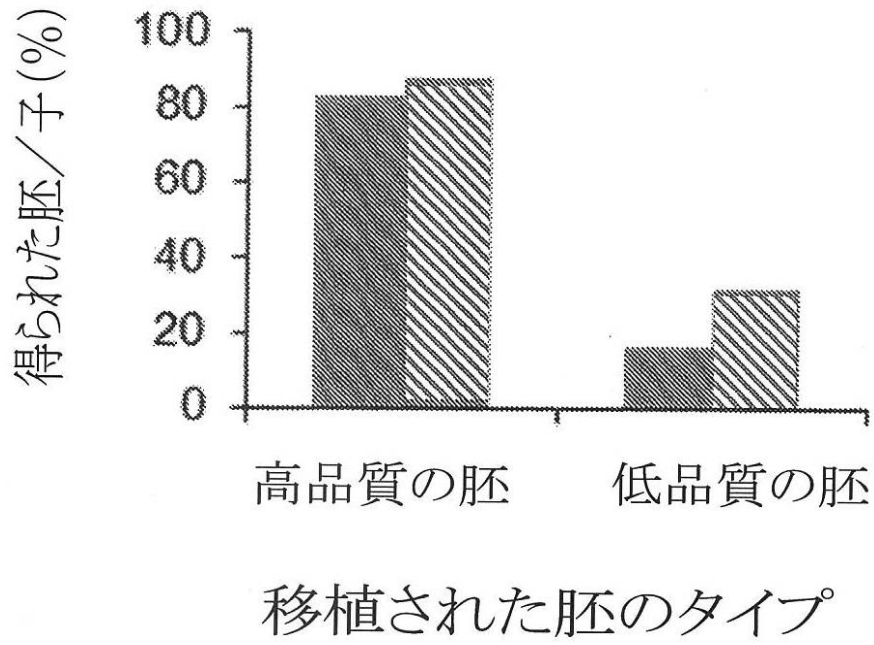
【図 5 d】



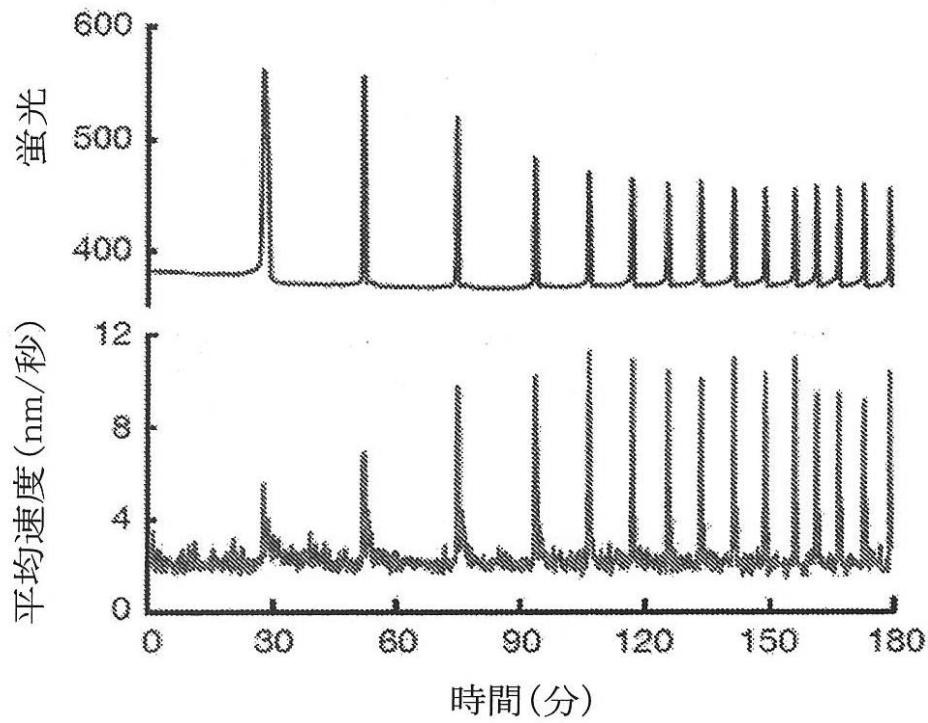
【図 5 e】



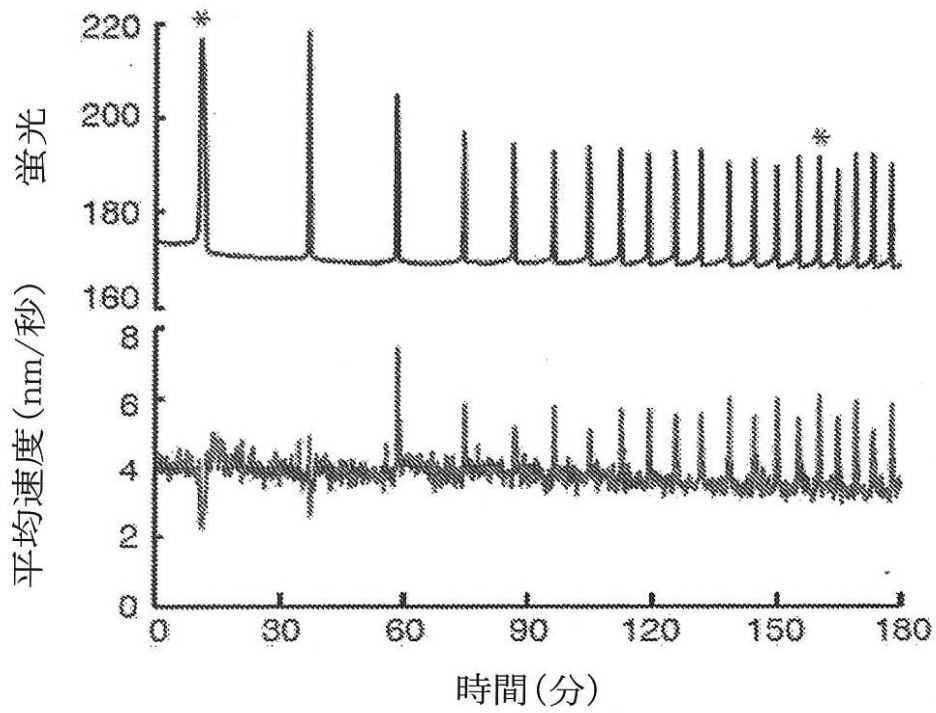
【図 5 f】



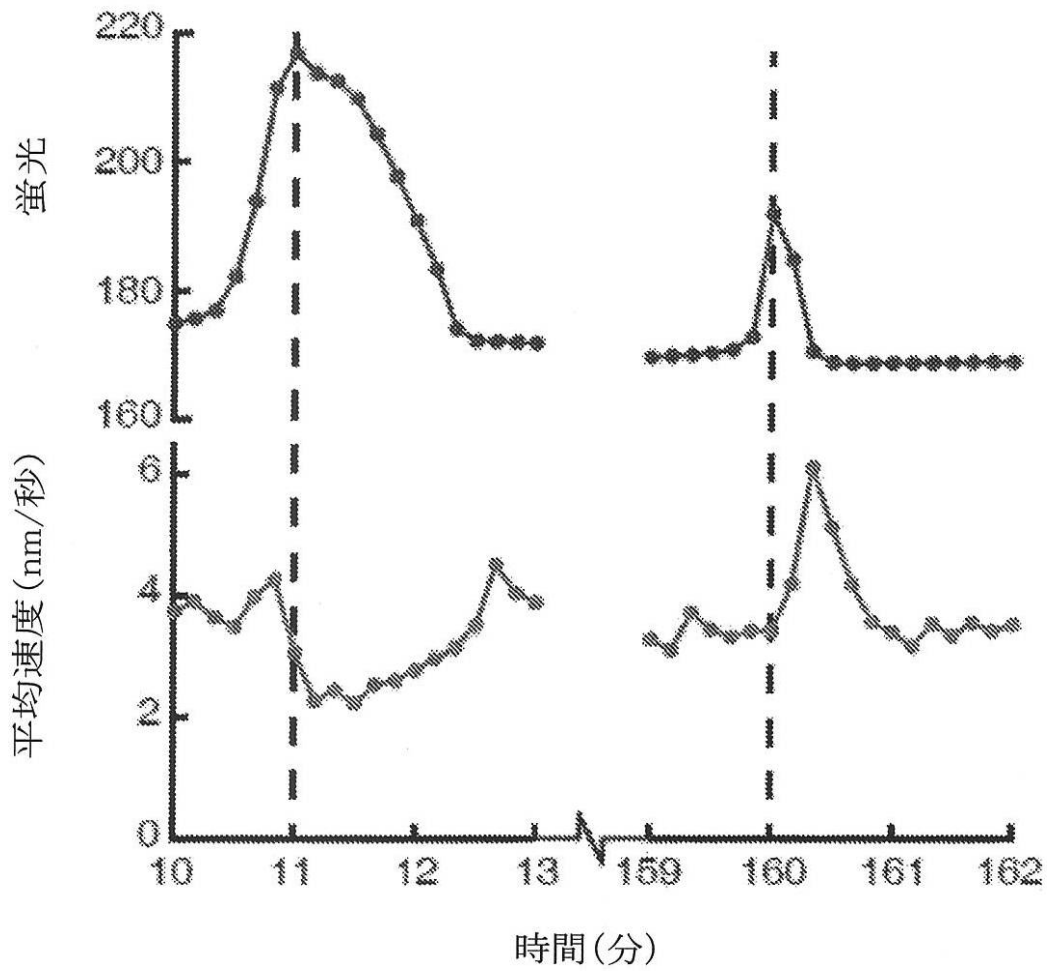
【図 6 a】



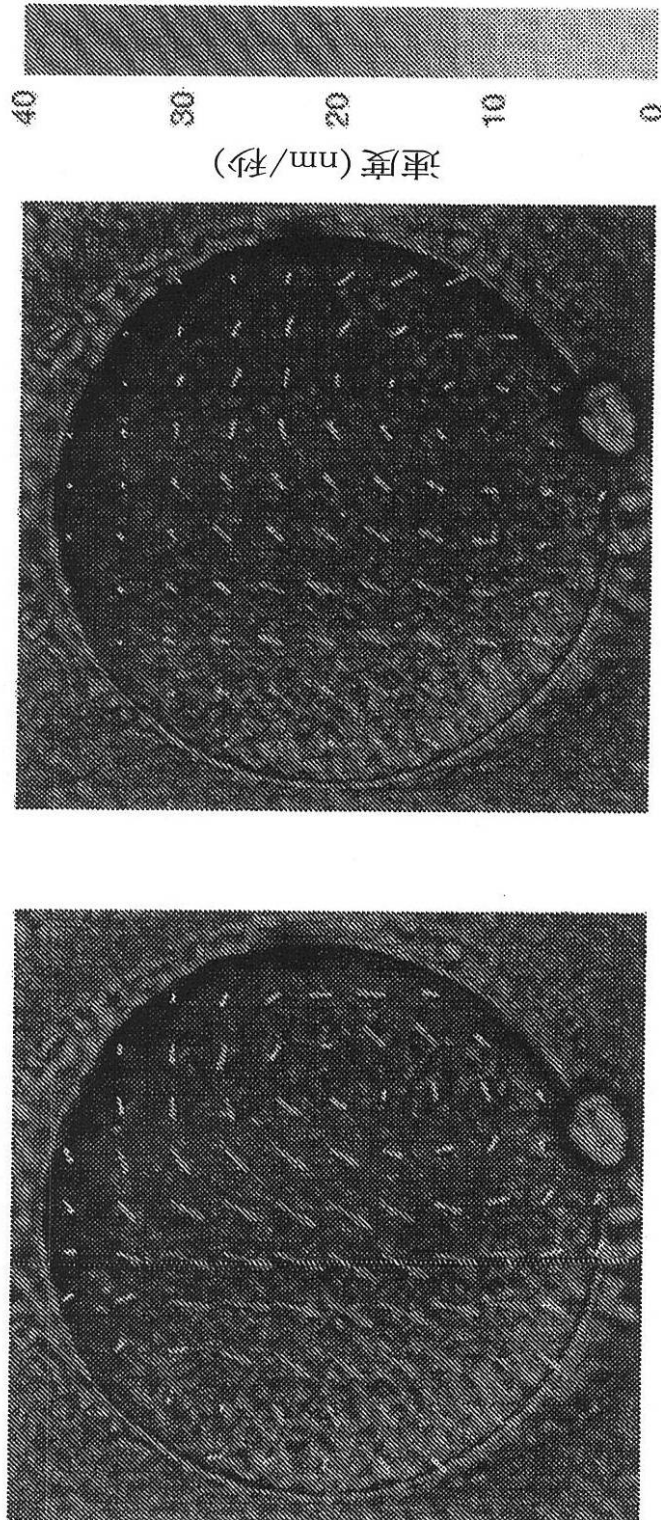
【図 6 b】



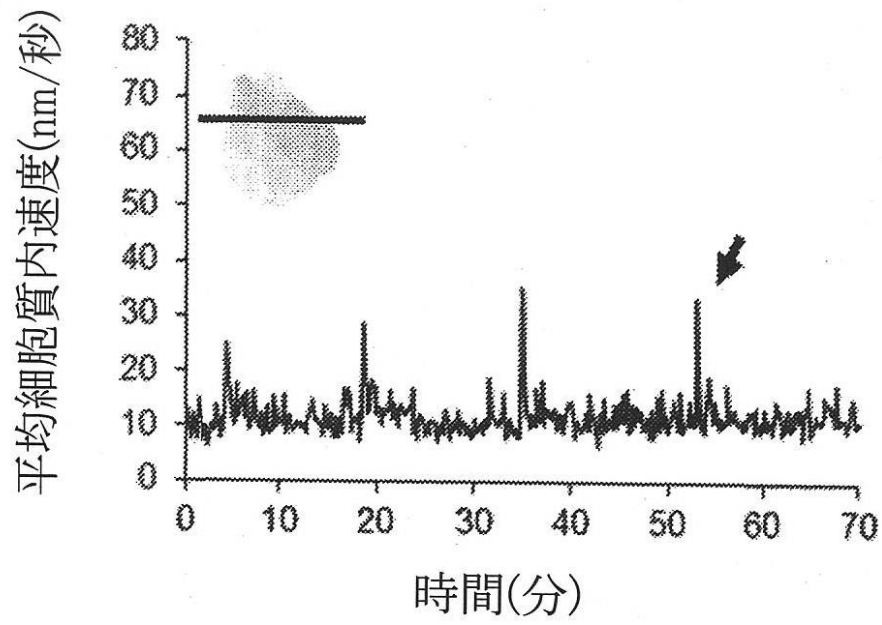
【図 7】



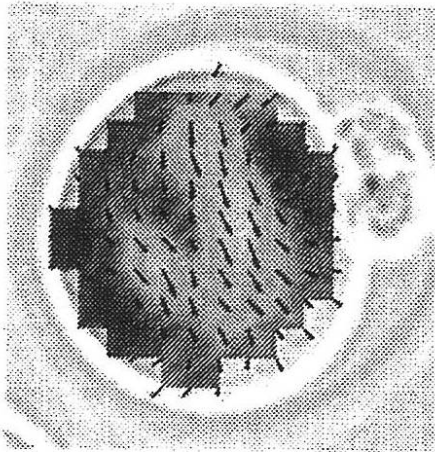
【図 8】



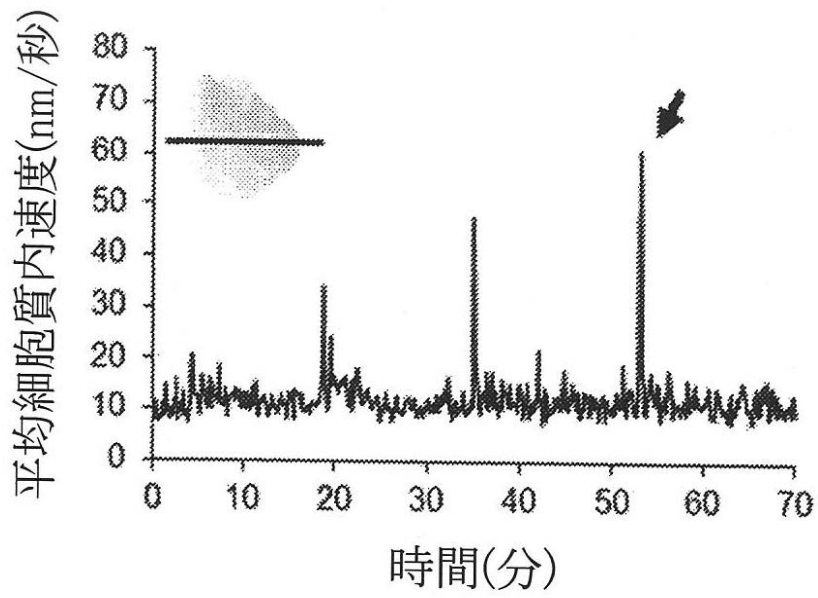
【図 9 a】



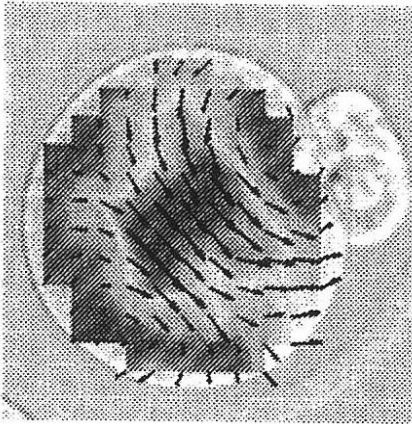
【図 9 b】



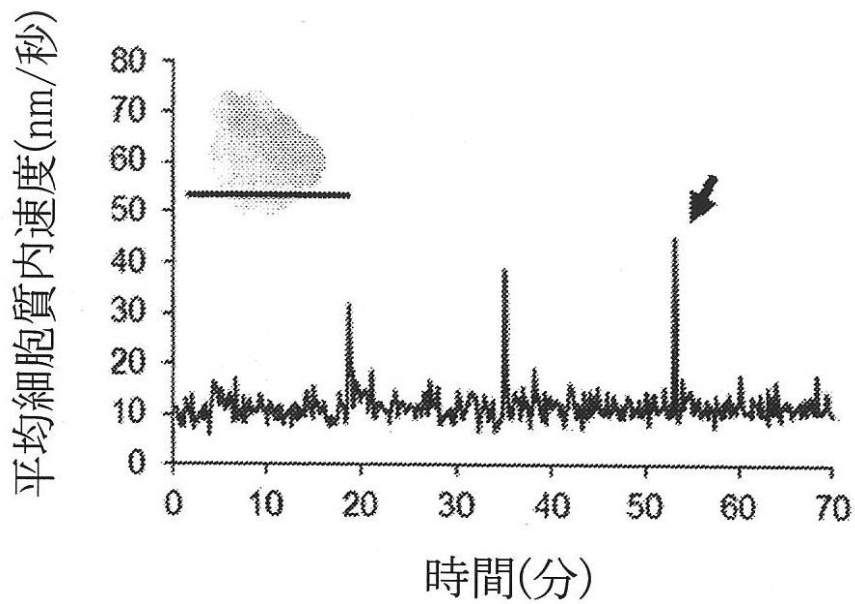
【図 9 c】



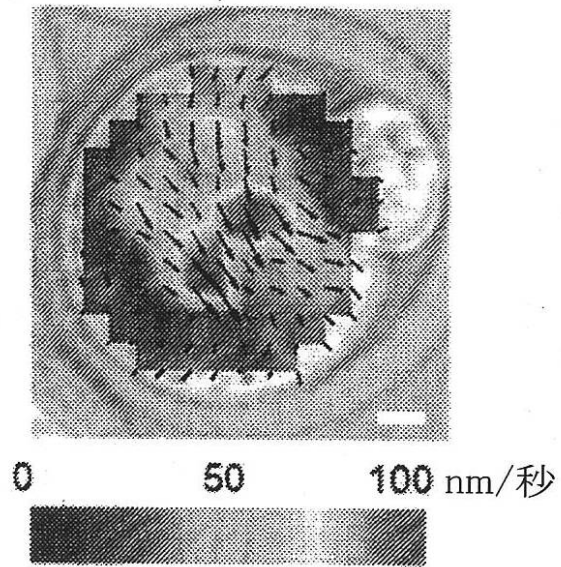
【図 9 d】



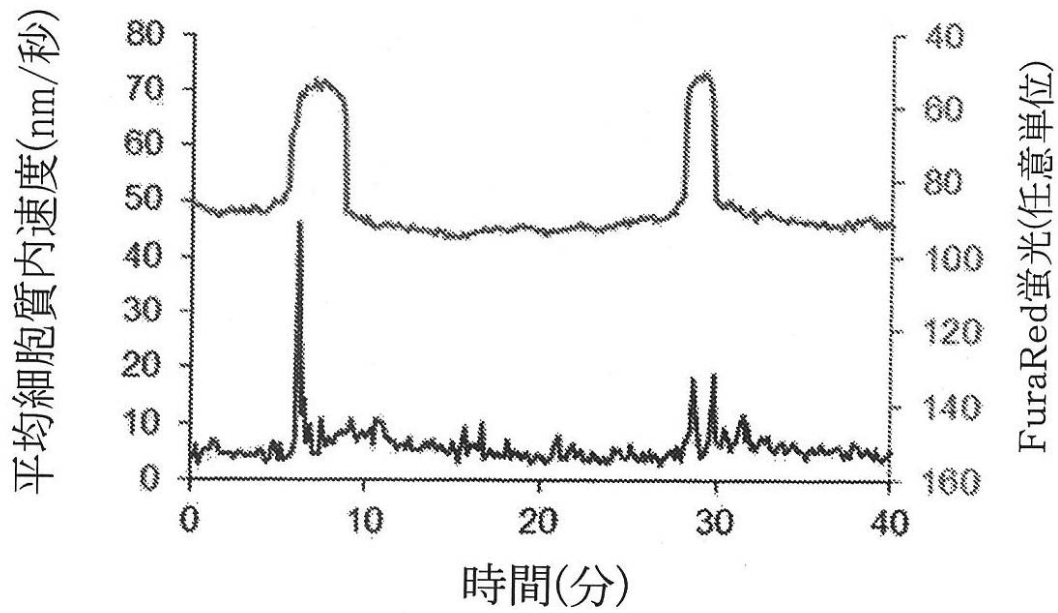
【図 9 e】



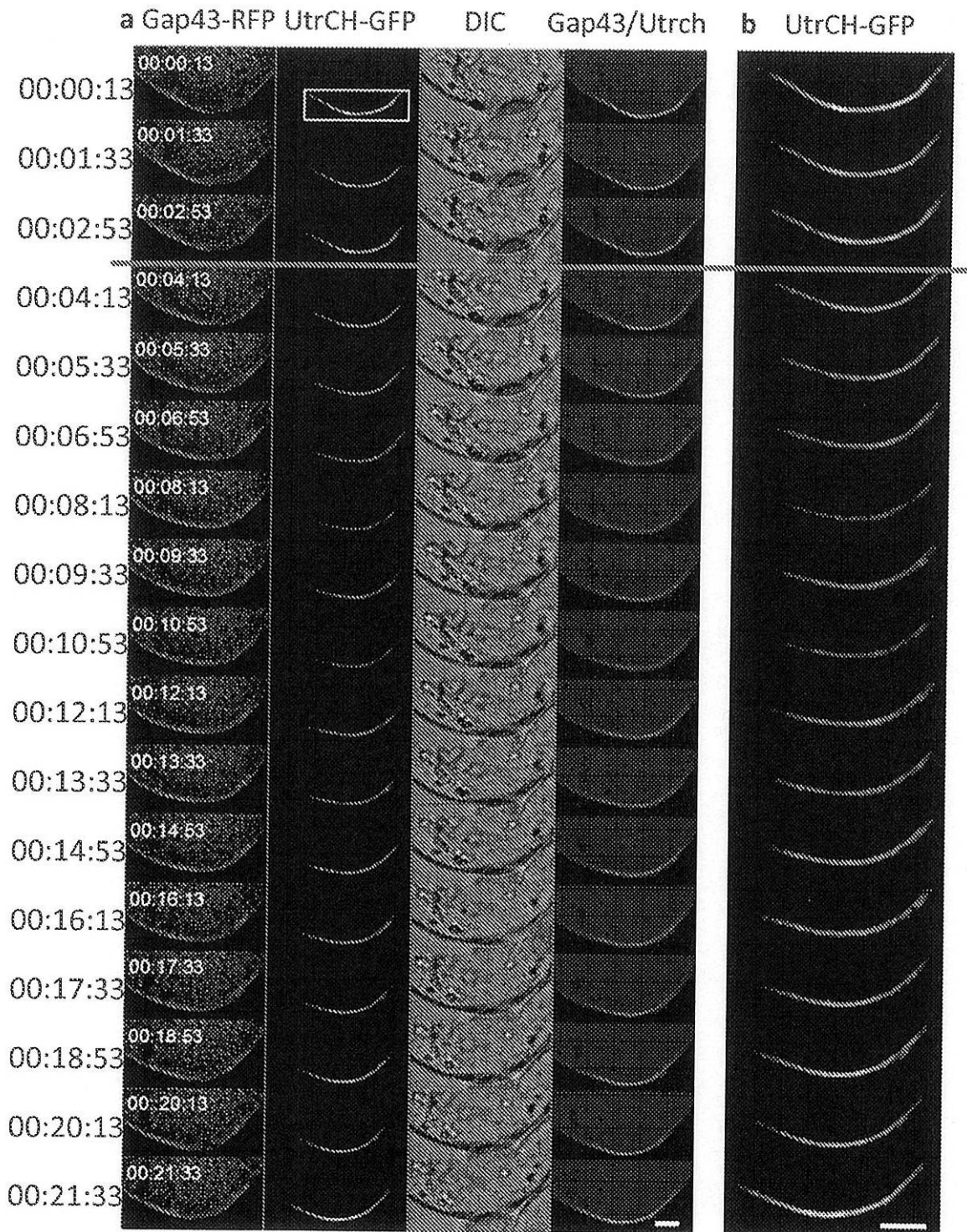
【図 9 f】



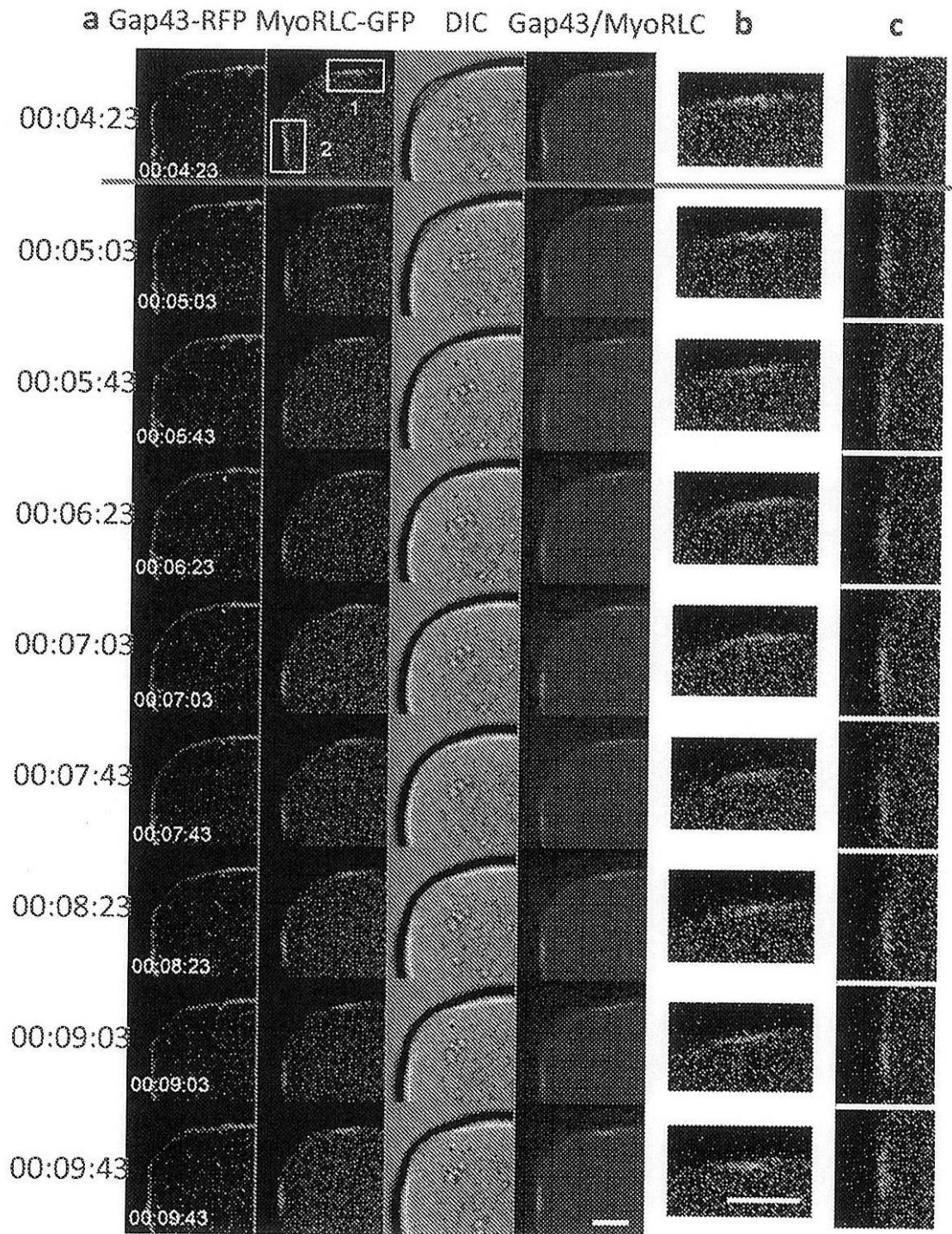
【図 9 g】



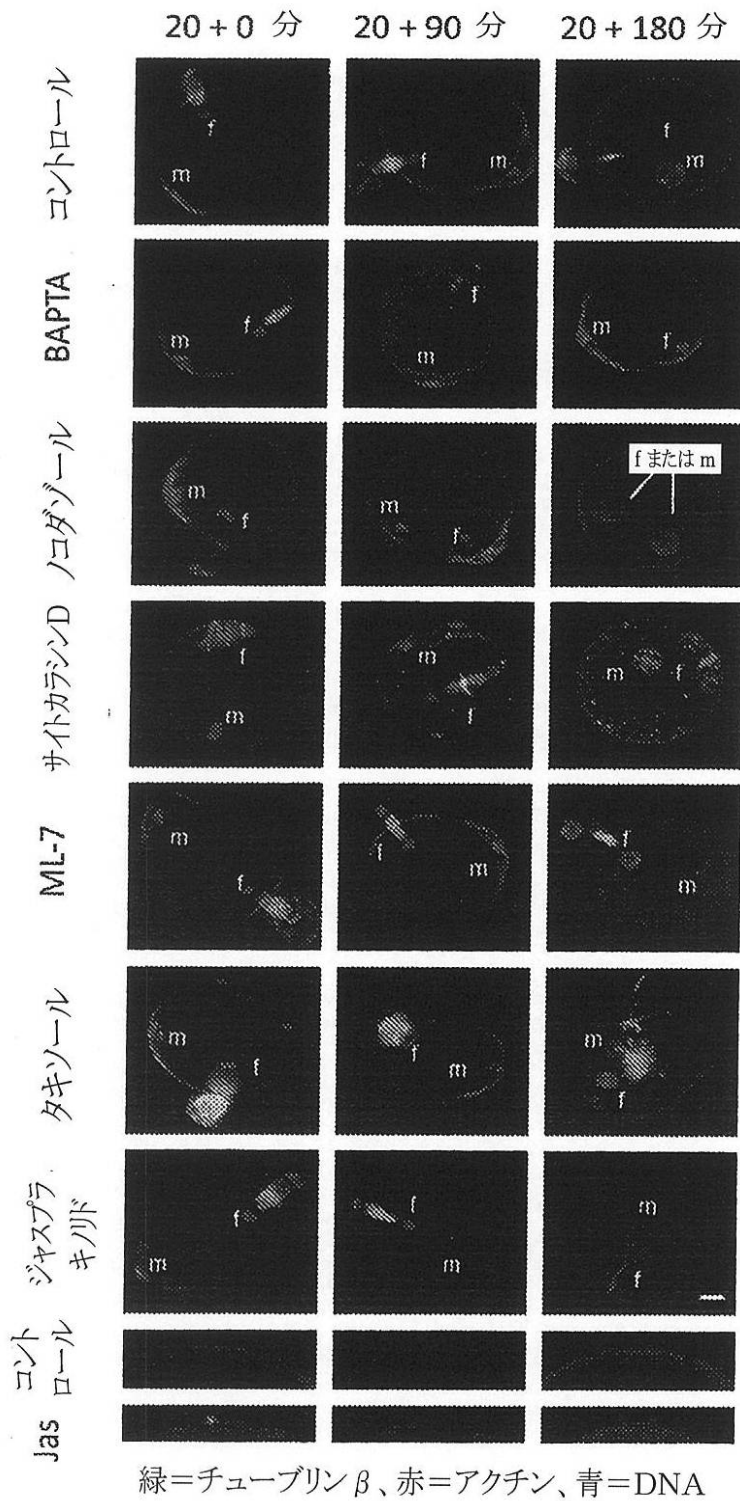
【図 10】



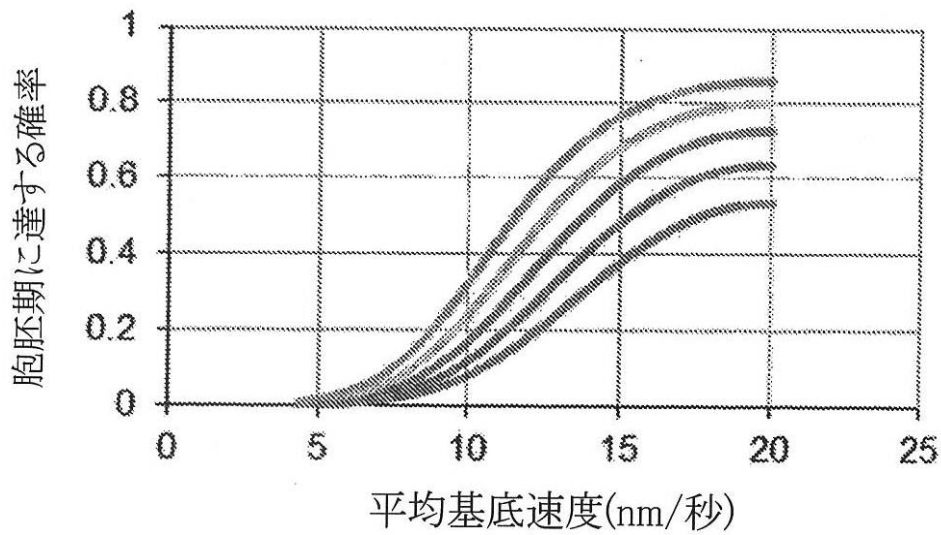
【図 11】



【図 12】

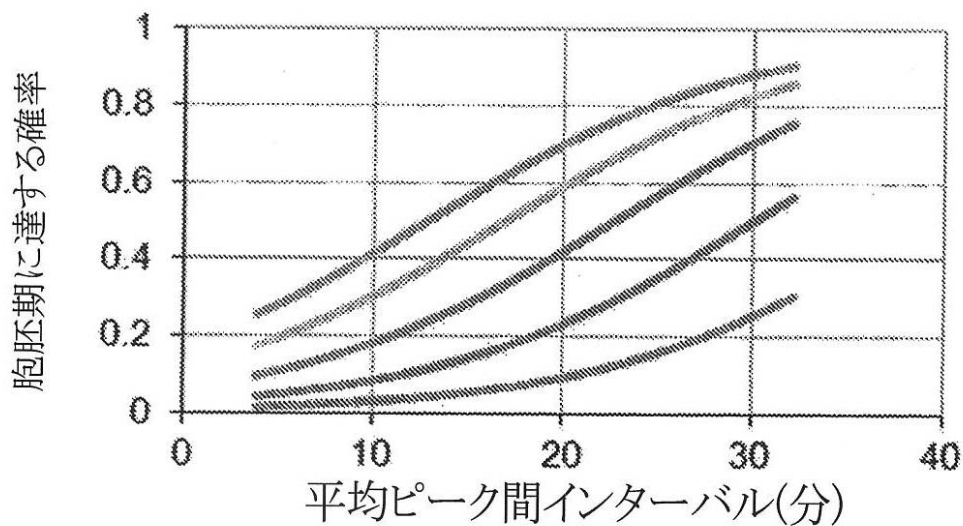


【図 1 3 a】



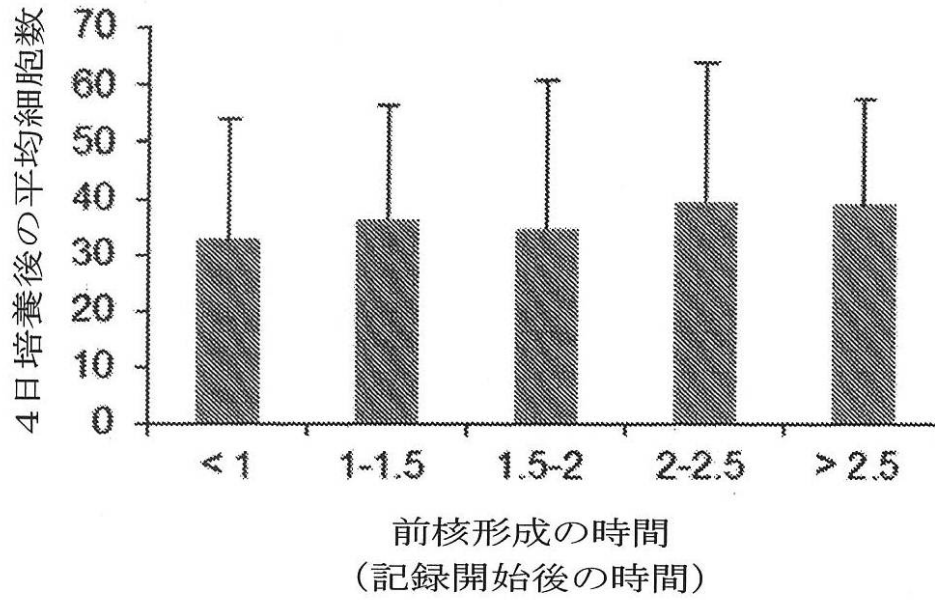
- 平均ピーク間インターバル (18.01 分)
- 平均ピーク間インターバル - 0.5 SD (14.48 分)
- 平均ピーク間インターバル + 0.5 SD (21.55 分)
- 平均ピーク間インターバル - 1 SD (10.94 分)
- 平均ピーク間インターバル + 1 SD (25.08 分)

【図 1 3 b】

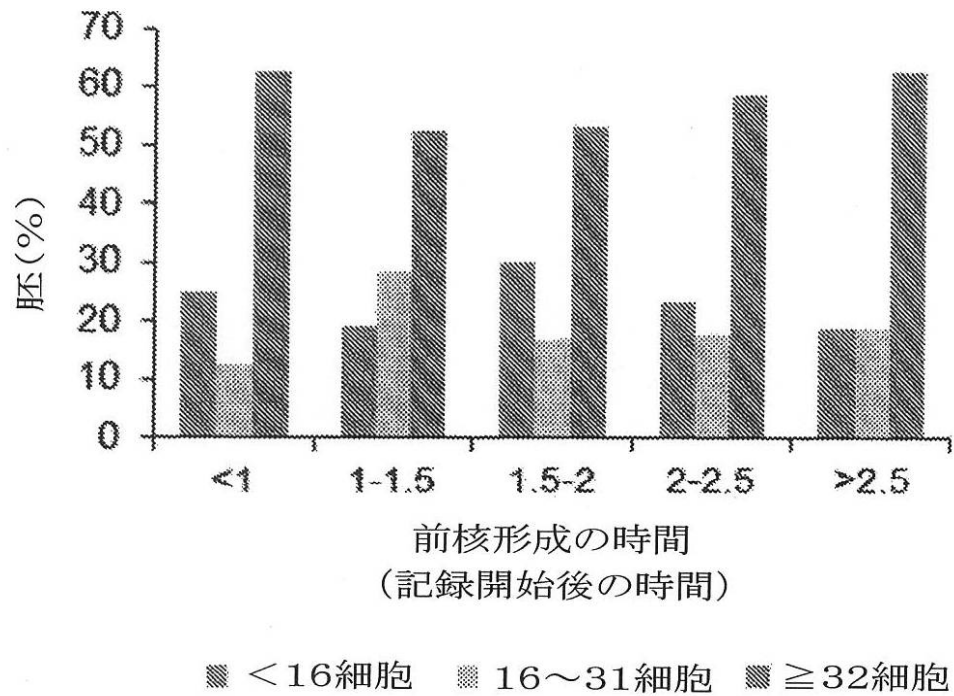


- 平均基底速度 (12.2 nm/秒)
- 平均基底速度 - 0.5 SD (10.3 nm/秒)
- 平均基底速度 + 0.5 SD (14.2 nm/秒)
- 平均基底速度 - 1 SD (8.3 nm/秒)
- 平均基底速度 + 1 SD (16.1 nm/秒)

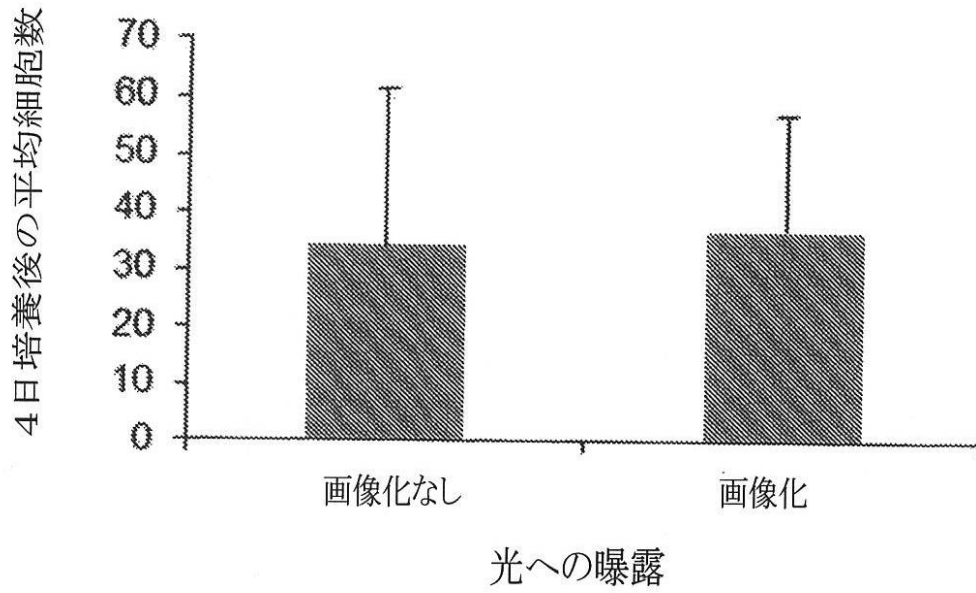
【図 1 3 c】



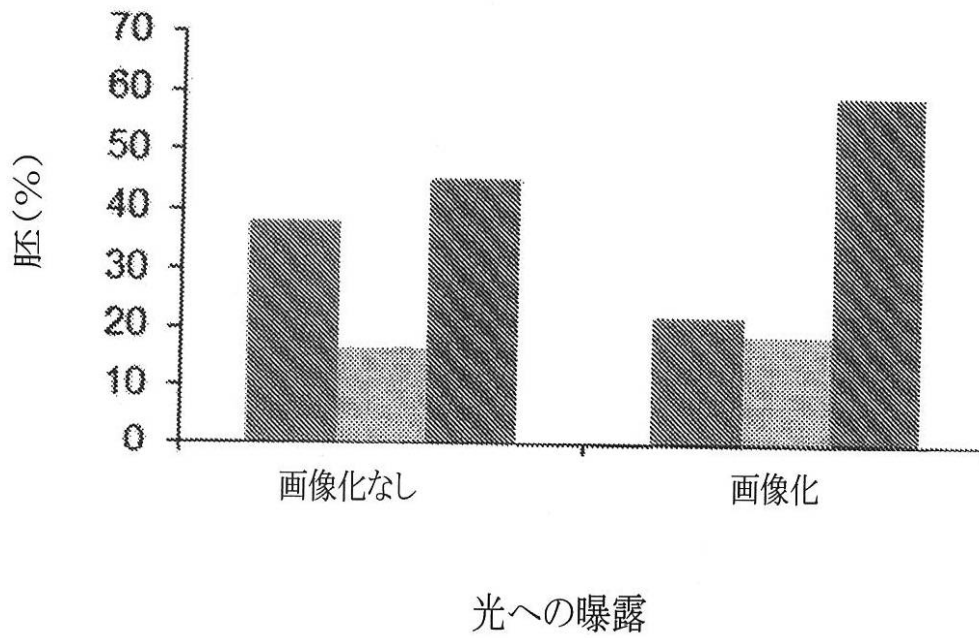
【図 1 3 d】



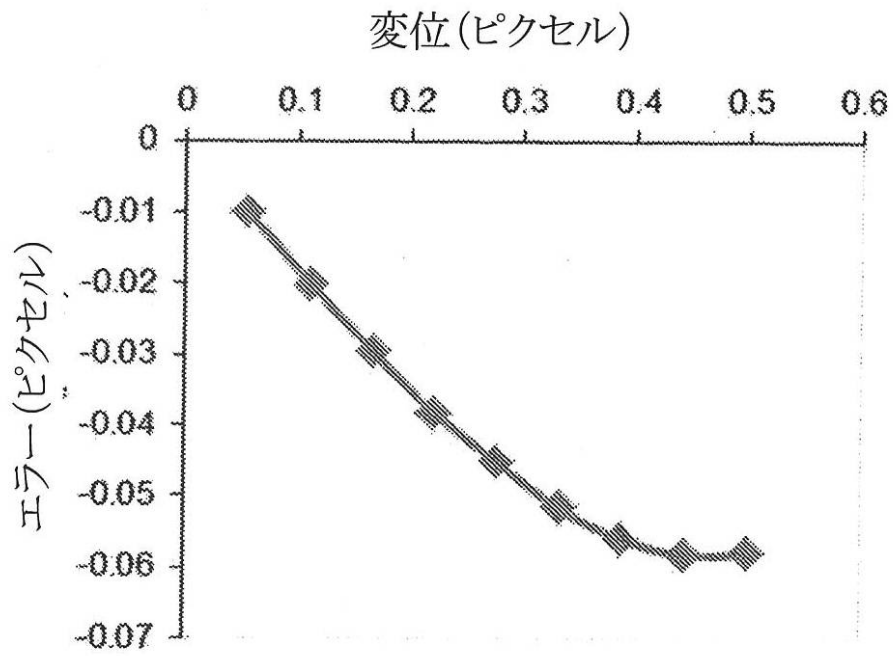
【図 1 3 e】



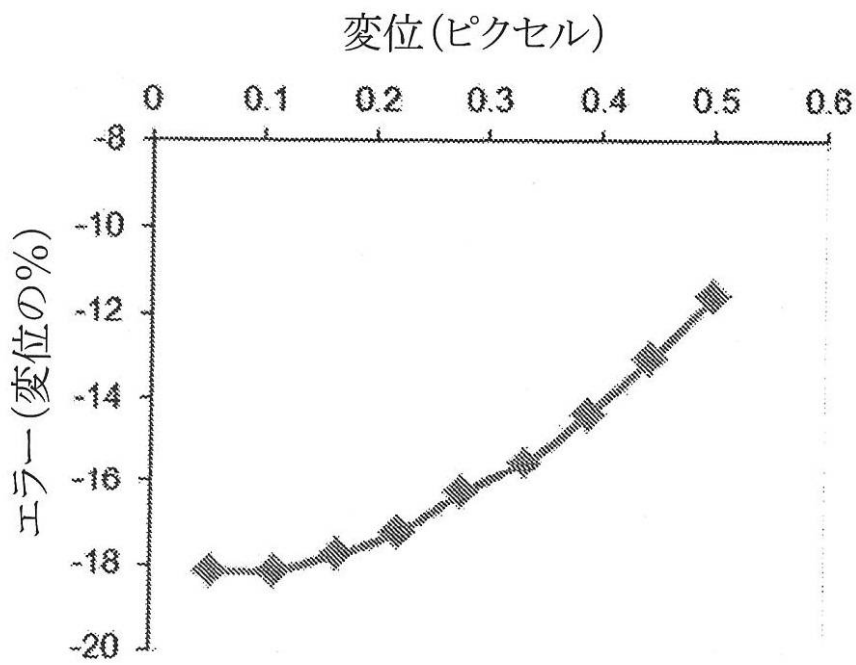
【図 1 3 f】



【図 1 4 a】



【図 1 4 b】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2012/051533

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 G01N33/483 C12N5/073 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 847 595 A1 (NORTHERN SYDNEY AND CENTRAL CO [AU]) 24 October 2007 (2007-10-24) the whole document abstract paragraph [0009] paragraph [0013] paragraph [0025] claims 1,3	1,2,4-51
A	----- US 2010/099135 A1 (KATZ-JAFFE MANDY [US] ET AL) 22 April 2010 (2010-04-22) the whole document abstract paragraph [0020] paragraph [0038] ----- - / - -	1,2,4-51
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 September 2012		16/11/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2012/051533**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
2, 8-10(completely); 1, 4-7, 11-55(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB2012/ 051533

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2, 8-10(completely); 1, 4-7, 11-55(partially)

methods and systems for assessing the developmental potential of a mammalian embryo, based on the measurements of cytoplasmic movements in the embryo, at the single cell stage;

2. claims: 3(completely); 1, 4-7, 11-55(partially)

methods and systems for assessing the developmental potential of a mammalian embryo, based on the measurements of periodic changes in the shape of the embryo, at the single cell stage.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/051533

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/025736 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; WONG CONNIE C [US]; LOEWKE KEVIN E []) 3 March 2011 (2011-03-03)	52-55
A	the whole document abstract paragraph [0056] - paragraph [0057] paragraph [0079] paragraph [0276]; figure 35 -----	1,2,4-51
X	ANNA AJDUK ET AL: "Fertilization Triggers Oscillatory Changes in Velocity of Cytoplasmic Movements in a Mouse Egg.", BIOLOGY OF REPRODUCTION, vol. 81, 1 July 2009 (2009-07-01), XP055037221, ISSN: 0006-3363	52-55
A	the whole document -----	1,2,4-51
X	TATSUO NAKAHARA ET AL: "Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos", JOURNAL OF ASSISTED REPRODUCTION AND GENETICS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 27, no. 2-3, 2 February 2010 (2010-02-02), pages 93-96, XP019790372, ISSN: 1573-7330	52-55
	the whole document abstract page 94, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 -----	
T	ANNA AJDUK ET AL: "Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 2, 9 August 2011 (2011-08-09), page 417, XP055037190, DOI: 10.1038/ncomms1424	
	the whole document -----	
T	A AJDUK ET AL: "Advances in embryo selection methods", F1000 BIOLOGY REPORTS, vol. 4, no. 11, 1 June 2012 (2012-06-01), XP055037194, DOI: 10.3410/B4-11)	
	the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/051533

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1847595	A1	24-10-2007	AT 454632 T	15-01-2010
			EP 1847595 A1	24-10-2007
			US 2007254309 A1	01-11-2007

US 2010099135	A1	22-04-2010	NONE	

WO 2011025736	A1	03-03-2011	AU 2010286740 A1	24-11-2011
			CA 2761231 A1	03-03-2011
			CN 102576027 A	11-07-2012
			EP 2430454 A1	21-03-2012
			KR 20120066023 A	21-06-2012
			SG 178536 A1	29-03-2012
			US 2011092762 A1	21-04-2011
			US 2011105834 A1	05-05-2011
			US 2012094326 A1	19-04-2012
			US 2012095287 A1	19-04-2012
			WO 2011025736 A1	03-03-2011

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 ゼルニッカ - ゲッツ, マグダレナ

イギリス国ケンブリッジシャー シービー 2 1 キューエヌ, ケンブリッジ, ガードン・インスティテュート, ウェルカム・トラスト/キャンサー・リサーチ・ユーケイ

(72)発明者 アジドック, アンナ

ポーランド国 0 2 - 7 6 1 ワルシャワ, マルタンスカ 5 ミエシュカニェ 3

(72)発明者 グラハム, クリス

イギリス国オックスフォードシャー オーエックス 1 3 ピーエス, サウス・パークス・ロード, ティンバーゲン・ビルディング, ユニバーシティ・オブ・オックスフォード, デパートメント・オブ・ブーロージー

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA27 AA40 BA13 BB20 BB50 BB51 CB01 CB14 CB17

DA36 DB07 FA16 FA19 FA29 FB12 GB01 GB02 GB03 GC15

JA01

4B063 QA05 QA18 QQ08 QR72 QR77 QS36 QS39 QX01