

体外発生培地へのアスタキサンチン添加が その後のウシ胚発生に及ぼす影響

○宮下 覚司¹⁾・西井 里衣¹⁾・富樫 伶¹⁾・後藤 綾子¹⁾・岡田 徹²⁾・小山 久一¹⁾・
堂地 修¹⁾
(¹⁾ 酪農学園大学・²⁾ あすか製薬)

はじめに

ウシ体外受精胚を効率的に生産し利用するためには、発生率の高い培養系が不可欠である。体外受精によって得られた胚と生体内で発育した胚を移植したときの受胎率は、体外培養によって得られた胚の方が低く^{5,11)}、また、体外受精由来胚は体内受精由来胚に比べて品質が低いといわれている^{2, 6)}。体外成熟培養開始前に未成熟卵子は、細胞質内顆粒の均一性、卵丘細胞の付着状態および形状等によって品質が判定される。未成熟卵子において細胞内顆粒の不均一なものや卵丘細胞の付着が不十分なものは成熟率および受精率が低下することが知られている⁴⁾。

近年、酸化ストレスの防止を目的とした培養液への抗酸化剤添加が試みられている¹³⁾。胚の品質に影響を及ぼす抗酸化剤として β -カロテン¹⁰⁾、 β メルカプトエタノール¹³⁾、システアミン¹³⁾、ビタミンC¹⁷⁾、ビタミンE^{10, 17)}およびアスタキサンチン^{7,8)}などが報告されている。抗酸化剤の中でもアスタキサンチンは、強い抗酸化能を持ち、細胞膜表面および膜内で効率よく活性酸素を消去することが知られている¹⁶⁾。抗酸化剤の利用はヒト生殖補助医療や生体内卵子吸引法によって得られる少数低ランク卵子の有効利用につながると考えられる。

そこで本研究では、低ランク卵子を用いて体外発生培地へのアスタキサンチン添加がその後のウシ胚発育に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 卵子の採取

卵巣は、食肉処理場由来卵巣の卵巣間膜を除去してから36.0℃に保温した滅菌生理食塩水で数回洗浄したのち、滅菌した紙タオルで完全に水分を除去した。未成熟卵子は、18Gの注射針を装着した5 mL シリンジに3%子牛血清（以下、CS）を添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液（以下、D-PBS；21300-025、Gibco）を約1 mL 吸引してシリンジ内を洗浄したのち直径2~6 mmの卵胞から未成熟卵子を吸引採取した。

2. 卵子品質

卵子の品質は、卵丘細胞が2層以上付着し細胞質が均一なものをグレード1、卵丘細胞が1~2層以上付着し細胞質が均一なものまたは細胞質の一部に変性部位があるものをグレード2、卵丘細胞がわずかしか付着しておらず、細胞質が均一または卵丘細胞が付着し細胞質が不均一なものをグレード3とし、さらに卵丘細胞が付着していないものまたはほとんど付着していないものおよび膨張した卵丘細胞が付着したものをグレード4として4種類に選別した。体外発生培養には、未成熟卵子のグレード3を用いた。

3. 体外培養

1) 体外成熟培養

採取した未成熟卵子は3% CSを添加したD-PBSで3回洗浄したのち、FSH（アントリン10、川崎三鷹）0.02 AU/mL および5% CSを添加したヘベス緩衝液 TCM-199（12340-030、Gibco）で2回洗浄した。洗浄した未成熟卵子は、60 mm プラスチックシャーレ（1007、Falcon）に100 μ Lの成熟培養液のドロップを作製し、流動パラフィン（26114-75、ナカライテスク）で覆ったものに20個ずつ入れた。体外成熟培養は38.5℃、5% CO₂の気相条件

下で 20 時間行った。

2) 体外受精

(1) 精子の洗浄

体外受精には 1 頭のホルスタイン種雄牛の凍結精液を用いた。また、凍結精液は 37℃ の温湯に 30 秒間浸漬して融解した。融解した精液は Takahashi ら¹⁵⁾ の方法に準じて、パーコール溶液 (17-0891-01、GE Healthcare Bio-Sciences AB) および 10 倍濃度の BO 液¹⁾ を用い、90%パーコール溶液を作製した。さらに、45%パーコール溶液は 1 倍濃度の BO 液と 90%パーコール溶液を同量加えて作製した。精子の重層は、15 mL のプラスチック遠沈管 (Corning) に 45%パーコール溶液を入れたのち 90%パーコール溶液を底に入れ、45%パーコールの上に精液を 470 μ L 重層した。重層した精液は 2000 rpm で 20 分間遠心分離を行ったのち、上清をアスピレーターで吸引、除去した。

(2) 精子の受精能誘起法

精子の受精能誘起法には、Brackett and Oliphant¹⁾ の方法を一部修正して用いた。すなわち、パーコールで洗浄した精子に 10 mM ヒポタウリン (H-1384、Sigma) およびノボヘパリンを添加した精子洗浄液を 6 mL 加え、1800 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引、除去した。

(3) 精子濃度調整

洗浄した精液は、ヒポタウリンおよびノボヘパリン (A138、持田製薬) 添加 BO 液で 6×10^6 /mL の濃度に調節したのち、さらに等量の 20 mg/mL ウシ血清アルブミン (以下、BSA ; A-4378、Sigma) 添加 BO 液を加えて最終濃度を 3×10^6 /mL に調整し、精子浮遊液とした。

(4) 体外受精

精子浮遊液で 60 mm プラスチックシャーレに 100 μ L のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものを体外受精培地とした。成熟卵子は BSA 10 mg/mL を添加した BO 液で 3 回洗浄したのち、1 ドロップあたり 20 個ずつ入れ成熟培養と同様の気相条件下で 18 時間媒精を行った。

3) 体外発生培養

体外発生培養には、5% CS を添加した CR1aa⁹⁾ を用いた。媒精を終了した卵子は 3% CS を添加した D-PBS を 2 mL 入れたガラス遠沈管に移し、ボルテックスミキサーで 2 分 30 秒間攪拌、卵丘細胞を完全に除去したのち 2 回洗浄後、発生培養液で 3 回洗浄した。発生培養は、5% CS を添加した CR1aa を標準発生培養液とし、これにアスタキサンチンを 0 ppm、25 ppm、25 ppm、100 ppm 添加したものをそれぞれ 0 ppm 区、25 ppm 区、25 ppm 区および 100 ppm 区とした。発生培地は 60 mm プラスチックシャーレに 100 μ L のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものを用いた。発生培養は 1 ドロップあたり 20 個の卵子を入れ、38.5℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ の気相条件下で行った。

発生検査は媒精日を 0 日目として 2 および 3 日目に倒立顕微鏡下で卵子を観察し、2 細胞期、3 および 4 細胞期、5 細胞期以上に発育した胚の割合を調べ、卵割率は培養した 3 日目までに発生した総卵子数に対する総卵割数の割合とした。また、7、8 および 9 日目に胚盤胞発生率を調べた。

4. 胚盤胞の細胞数測定

細胞数測定には、体外受精日を 0 日として 7 および 8 日目に発生した胚盤胞を無作為に用いた。胚盤胞は、空気乾燥法により細胞数を測定した¹⁴⁾。すなわち、胚盤胞を室温下で 3% CS 添加 0.9% クエン酸ナトリウム溶液の低張液に約 10 分間浸漬した。次に 35 mm プラスチックシャーレ (Greiner, 627161) に少量の固定液 I (メタノール、酢酸および超純水を 10 : 3 : 7 の割合で混合したもの) を入れ、透明帯が薄くなるまで浸漬した。次に、スライドガラス上に胚とともに少量の固定液 I がドロップ状になるように置き、ピペットの先端でドロップに触れることにより胚細胞を展開した。固定液 I を乾燥させたのち固定液 II (メタノールおよび酢酸を 3 : 1 の割合で混合させたもの) をスライドガラスに滴下し風乾した。固定液 II の滴下を数回繰り返したのち、空気乾燥によっ

て完全に乾燥させた。細胞染色はスライドガラス全体を 5%ギムザ溶液 (Merck) で覆って 1 時間放置したのち、スライドガラスの裏面から二次蒸留水を用いて染色液を洗い流した。細胞数は光学顕微鏡下で測定した。

5. 統計分析

卵割率、胚盤胞率および卵割数に占める胚盤胞発生数は χ^2 検定を用いて、細胞数はt検定で統計処理を行った。

結 果

体外発生培地へのアスタキサンチン添加量の違いが卵割率および胚盤胞発生率に及ぼす影響を表 1 に示した。卵割率は、2.5 ppm 区が 25 ppm 区および 100 ppm 区に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。体外発生培地へのアスタキサンチン添加量の違いが胚盤胞の細胞数に及ぼす影響を図 1 に示した。胚盤胞の細胞数は、2.5 ppm 区が他の区よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

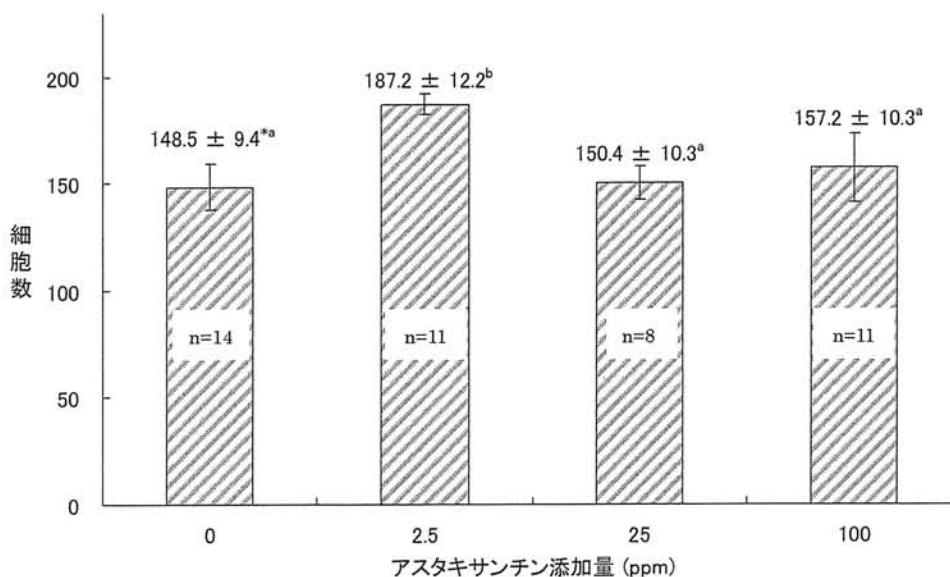
考 察

体外発生培地への抗酸化剤添加を検討した報告が複数なされている。これまで抗酸化作用のある β メルカプトエタノール¹³⁾、システアミン¹³⁾、ビタミンC¹⁷⁾、ビタミンE¹⁷⁾およびアスタキサンチン⁷⁾など発生培養液への添加が報告されている。本研究では、体外発生培地へのアスタキサンチン添加が低品質卵子を用いた体外受精由来胚の発生に及ぼす影響を検討した。抗酸化剤の主な働きは細胞内の DNA 損傷および脂質過酸化の防止¹²⁾であり、

表 1. 体外発生培地へのアスタキサンチン添加がグレード 3 卵子の胚発生に及ぼす影響

アスタキサンチン添加量 (ppm)	総卵子数	卵割数 (%)	胚盤胞発生数 (%)	胚盤胞発生数/卵割数 (%)
0	279	193 (69.2) ^{a, b}	63 (22.6)	63/193 (32.6)
2.5	260	195 (75.0) ^a	69 (26.5)	69/195 (35.4)
25	260	172 (66.2) ^b	58 (22.3)	58/172 (33.7)
100	280	184 (65.7) ^b	78 (27.9)	78/184 (42.4)

^{a, b}: 異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)



*: 平均値 ± 標準誤差

^{a, b}: 異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)

図 1. 体外発生培地へのアスタキサンチン添加が胚盤胞の細胞数に及ぼす影響

胚発生率の向上や胚の品質向上に効果的であると考えられる。アスタキサンチンも一重項酸素消去と脂質過酸化抑制の効果がある¹⁹⁾ ことが明らかにされており、体外発生培地への添加においても同様の効果が期待できると考えられる。

胚発生率は、抗酸化剤を過剰に添加した場合に悪影響を及ぼすことが知られている¹³⁾。しかし、本研究で用いたアスタキサンチン濃度では無添加区と添加区間での卵割率、胚盤胞発生率に有意な差がみられなかったことから胚発生への悪影響は認められなかった。

家田³⁾らは、体外発生培地へビタミンC（アスコルビン酸）を添加することで胚盤胞発生率向上効果が得られたと報告した。また、高橋ら¹³⁾は初期胚ヘシステアミンを添加することで細胞内還元物質であるグルタチオン合成の促進効果が得られており、初期胚への発育促進効果を報告した。本研究ではアスタキサンチン添加濃度2.5 ppm 区の卵割率が最も高かったが、無添加区との間に差がなかった。また、アスタキサンチン添加による胚盤胞発生率への有意な向上は認められなかった。

Ulloa ら¹⁶⁾はウシ胚において胚盤胞の細胞数が多いものは発育速度が早く、染色体異常発生率が低いと報告した¹⁶⁾。本研究では、アスタキサンチン2.5 ppm 添加区の胚盤胞の細胞数が有意多かった。これらの結果から低品質卵子を用いた場合、アスタキサンチン2.5 ppm 添加区の卵割率が高く胚盤胞の細胞数が多かったことから、体外受精後の胚発生に何らかの効果が期待できる可能性があると考えられた。

本研究ではアスタキサンチン添加による卵割率、胚盤胞発生率の向上は明らかにできなかった。しかし、アスタキサンチン2.5 ppm 添加区の胚盤胞の細胞数が多かったことから、アスタキサンチン添加が胚の品質向上に効果のあることが期待される。今後、体外発生培地のアスタキサンチン添加が胚発生率や胚品質及ぼす影響について明らかにするためにさらに詳細な検討を進める必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ウシ卵巣の提供にご協力頂きました北海道畜産公社道央事業所、北海道早来食肉衛生検査所、ならびに凍結精液を提供にご協力いただきましたジェネティクス北海道の方々に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Brackett, B. G., Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12; 260-274.
- 2) Greve, T., Avery, B. and Callesen, H. 1993. Viability of in-vivo and in-vitro produced bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, 28; 164-169.
- 3) Ieda, S., Dochi, O., Hariyama, A., Imai, K. and Koyama, H. 2001. Effect of ascorbic acid in culture medium on the development of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 55: 335.
- 4) 加藤博己, 細井美彦, 内海恭三, 入谷 明. 1992. ウシ体外成熟, 体外受精卵の発育に対する体外成熟時の顆粒膜細胞, 卵丘細胞及び放線肝細胞の影響. *家畜繁殖技術研究会誌*, 14 : 20-28.
- 5) Leibo, S. P. and Loskutoff, N. M. 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39; 81-94.
- 6) Massip, A., Mermillod, P. and Dinnyes, A. 1995. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 10, 3004-3011.
- 7) 行川貴浩, 鈴木皓子, 池田俊太郎, 杉本実紀, 久米新一. 2008. ウシ初期胚に対する暑熱ストレスの影響とアスタキサンチン製剤による緩解効果. *J Reprod Dev.* 54 ; J79.
- 8) 西貝正彦. 2010. 黒毛和種供胚牛へのアスタキサンチン給与が採胚成績に及ぼす影響. *北海道牛受精卵移植研究会会報*, 29 : 7-10.
- 9) Rosenkrans, C. F. Jr, Zeng, G. Q , Macnamara, G. T., Schoff, P. K., First, N. L. 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, 49, 459-462.
- 10) Sales, J. N., Dias, L. M., Viveiros, A. T., Pereira, M. N., Souza, J. C. 2008. Embryo production and quality of

- Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocopherol. *Anim. Reprod. Sci.*, 106: 77-89.
- 11) Schmidt, M., Greve, T., Avery, B., Beckers, J. F., Sulon, J. and Hansen, H. B. 1996. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 46, 527-539.
 - 12) 高橋昌志. 2002. 酸化ストレスが関わる成熟, 受精, 初期発生とその制御による効率的初期胚生産へのアプローチ. *日本胚移植学雑誌*, 24 : 49-57.
 - 13) 高橋昌志. 2009. β メルカプトエタノールが毒劇物指定を受けての家畜生殖細胞操作・培養への対応. *日本胚移植学雑誌*, 31 : 127-133.
 - 14) Takahashi Y, First NL. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, phluvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-973.
 - 15) Takahashi, Y., Hisimura, M., Matui, M., Tanaka, H., Kanagawa, H. 1996. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.*, 58: 897-902.
 - 16) Ulloa, Ulloa, CM., Yoshizawa, M., Yamashita, A., Hama, S., Mitsui, A., Hashi, C., Abe, H., Hoshi, H., Fukui, E., Matsumoto, H. 2008. Blastocyst production from in vitro-produced day-2 bovine embryos classified by cleavage stage, and cytogenetical evaluation of the resultant day-8 blastocysts. *J. Reprod. Dev.*, 54: 465-72.
 - 17) Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, J. M., Agarwal, A., Sharma, R. K. 2002. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil. Steril.*, 78: 1272-1277.
 - 18) Wolf, M. A., Asoh, S., Hiranuma, H., Ohsawa, I., Iio, K., Satou, A., Ishikura, M., Ohta, S. 2010. Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *J. nutr. biochem.*, 21: 381-389.
 - 19) 矢澤一良. 2009. アスタキサンチンの科学. 初版. 31-35, 64-65, 119-129. 成山堂書店. 東京.