

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 高橋 利清
Name

学位論文題目： ウシ体外受精胚の生産性および品質の向上に関する研究
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

第1章 緒言

ウシの体外受精は、精子の受精能獲得や卵子成熟、その後の受精および胚の発生といった一連の過程を生体外で行う技術である。現在では、生殖細胞や受精現象、初期胚の構造解析および核移植など、多岐にわたる研究のベースとして利用されている。また、畜産の領域においても、借り腹牛に胚を非外科的に移植して産子を作出する胚移植技術の普及が進み、効率的な育種改良による優良種畜の増産や、高能力な素畜生産に活用されるなど、体外受精胚は安定的な移植可能胚の作出技術として重要視されている。

しかしながら、体外受精で作出された胚は、体内で受精・発生した体内由来の胚と比較して、耐凍性や胚移植後の受胎率が低いことが知られている。これには、細胞内の脂肪滴含有が多いことや、細胞数が少ないことなどが指摘されている。さらに、体外受精胚の効率的な作出には、受精時の精子の運動性が大きな影響を与え、種雄牛の違いによる発生率に差違があることも知られている。しかし、家畜としてのウシの生産現場では、種雄牛の能力が産子の経済性にも大きく影響し、高能力種雄牛の精液を用いた体外受精胚の生産が強く求められており、発生率が高い精子のみを利用することは出来ない。ところが、種雄牛の中には健康状態や採取直後の精液性状に異常がないものの、凍結することで著しく運動性を失う個体が存在し、効率的な利用が阻害されるケースがある。この低耐凍性を示す個体の精子に対し、有効な凍害保護作用を有する物質を検討することは、生産現場のニーズに即したウシ体外受精胚を生産する上で重要であるとともに、精子細胞の超低温保存に関して新たな知見を得られる可能性があり、その意義は大きいと考えられる。

また、体外受精由来のウシ初期胚は、活性酸素に対する感受性が強いことから、胚細胞内へ活性酸素種(ROS)が蓄積され易く、酸化ストレスにより発生障害が生じ、発生停止やDNA障害などの影響を受けることも知られている。このROSに対するアプローチとして、初期胚の発生培養時に、酸素濃度を低下させることや、培地への抗酸化物質の添加について研究が行われている。一方、脂肪滴の脂質に含まれる脂肪酸は、胚発育のエネルギー源となるものの、胚細胞内への過剰な蓄積は、体外受精胚の耐凍性低下の一因とも考えられている。脂質代謝に関しては、細胞内のミトコンドリアが深く関与しており、ミトコンドリア内で行われる酸化的代謝は、初期胚においてアデノシン三リン酸(ATP)の供給源となることが報告されている。このため、ミトコンドリア内における代謝関連物質の作用を増強させることで、効率的な脂質代謝を促進することは、胚の品質向上に効果があることが考えられる。また、自然界に存在する抗酸化作用を有する物質は多く、初期胚に有効性を示す物質を探索することは、体外受精胚の生産性向上に寄与できる。

以上のように、ウシ体外受精胚の品質向上には、胚細胞の酸化抑制や脂質代謝を高めることが有効と

考えられるほか、体外受精時に用いる精子の耐凍性向上についても、ウシ体外受精胚の有用性を高める上で検討する必要がある。そこで、本研究では体外生産したウシ初期胚を用いて、胚の酸化抑制や脂質代謝機構並びに、低耐凍性を示すウシ精子の超低温保存に着目し、ウシ精子や体外受精胚の耐凍性向上および、胚の発生能向上に対する検討を行った。

第 2 章 体外受精に用いる低耐凍性を示すウシ精液の凍結方法の検討

ウシ精液の凍結液に、不飽和脂肪酸であるリノール酸をアルブミンに吸着させたリノール酸アルブミン (LAA) を添加し、低耐凍性を示す精子への効果を検討した。供試したウシ精液は人工膺により採取し、基本希釈液は卵黄クエン酸緩衝液を用いた。採取直後に 1 次希釈、5 時間以上平衡を行いながら 4°C まで緩慢冷却し、耐凍剤であるグリセリンを含む希釈液で 2 次希釈を行った。

耐凍性が低い A 牛の精液を用いて、1 次希釈平衡時間 5 時間の慣行法を対照区とし、対照区の 1 次希釈液に LAA を 1mg/ml 添加した LAA 区、LAA 区の 1 次希釈平衡時間を 30 時間に延長した LT+LAA 区を設定し調査した。その結果、LT+LAA 区が対照区より有意に高い生存率を示した ($P<0.05$)。また、慣行法を対照区とし、対照区の平衡時間を 30 時間とする LT 区および LT+LAA 区を設定し、A 牛および耐凍性に問題がない B、C 牛の精子生存性を調査した。その結果 A 牛では LT+LAA 区において、有意に高い生存率が得られ ($P<0.05$)、B、C 牛については区間に差がなかった。

なお、低耐凍性牛 A 牛の精子は凍結前の時点で既に生存率が低下傾向を示したが、LT+LAA 処理を行った精子の生存性は有意に高い値 ($P<0.05$) で、B、C 牛精子の生存性と差が認められなかった。

さらに、A 牛の LT+LAA 処理凍結精液を用いて、体外受精、過剰排卵処理による採胚および人工授精を行った。その結果、LAA 非添加の対照区と比較して、体外および体内の受精や胚発生に差は認められず、人工授精による正常産子が得られたことから、LT+LAA で処理されたウシ精子は、体外および体内での受精能、並びに個体発生能を有していることが明らかとなった。

ウシ精子の頭部表面は細胞膜で覆われているが、寒冷ショックからウシ精子を保護するリン脂質 (ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリンなど) の重要な作用は、細胞膜の流動性を高める点にあることや、ウシ精子の凍結用希釈液に対し、還元オリゴ糖の 1 種であるシクロデキストリンを添加すると、濃度依存的に精子膜のコレステロール濃度が上昇し、冷却後の生存性が向上することが報告されている。リン脂質やコレステロールは細胞膜の構成要素であり、精子凍結用希釈液への添加剤が精子の耐凍性に影響を及ぼす可能性があることが考えられる。

イネにおいては、低温耐性が強い品種ほど原形質膜や液胞膜のリン脂質を構成するリノール酸やリノレン酸などの不飽和脂肪酸の割合が高く、逆に低温耐性が弱い品種では不飽和脂肪酸が低いことや、低温暴露によって高くなるとの報告がある。これらのことは、低温下では、細胞膜の不飽和脂肪酸が増加することによって相転移温度が低下し、細胞膜の流動性が確保されていることを示唆している。

LAA は、ウシの体外発生胚の耐凍性を向上させる効果が確認されており、ウシ体外生産胚においては、長時間培養の際に効果が大きいとの報告がある。本研究において、ウシ精子の凍結用希釈液に LAA を添加し、かつ低温 (4°C) 平衡を 30 時間行った場合 (LT+LAA 区)、耐凍性が低いウシの精子において、凍結直前および凍結・融解後の運動性が向上することが明らかとなった。これは、長期間の平衡により、細胞膜の脂質二重層にリノール酸の取り込みが増加し、膜の流動性が維持された可能性が示唆される。

また、ウシ精巣上体精子を用いた場合、5°C で 48 時間までの保存では、精子の生存性や体外受精胚の作出に問題はないものの、72 時間保存した場合には、生存性が低下したことの報告があり、ブタの場合でも精液採取後 0~1 日目より 0~2 日保存の精子では受胎率が低下するとの報告がある。本

(様式 5) (Style5)

研究においては、低耐凍性を示さないウシの精子は、4°Cで 30 時間平衡保存しても精子の運動性や体外受精胚の発生能、および人工授精時の受胎率低下などの異常が認められなかったことから、通常のウシ精子では、精液採取後 30 時間までの低温保存は、受精能に悪影響はないものと考えられた。

しかし、低耐凍性のウシ精子では低温に 5 時間暴露するだけで運動性が低下し、平衡時間を 30 時間まで延長すると、凍結直前の運動性は 5 時間暴露と同様に低下するものの、凍結後には改善が見られた。これは、低耐凍性精子においては、耐凍剤であるグリセリンが、精子頭部へ浸透するのに時間を要することが示唆される。また、LAA の作用は 5 時間平衡時には認められなかったことから、LAA が効果を発揮するには一定時間の低温暴露が必要と考えられる。これらのことから、低耐凍性を示す精子は、通常の精子と比較して、温度耐性に関わる細胞膜の脂質構成などが異なることも考えられる。

以上の結果より、ウシ精子凍結希釈液への LAA 添加並びに 30 時間の低温平衡は、耐凍性が低い個体の精子の凍結融解後生存性を改善できることが示唆され、その精子は正常な受精能や個体発生能を有することが明らかとなった。

Effect of linoleic acid albumin (LAA) and long-term equilibration (LT) to poor freezability bovine spermatozoa

Bull	Treatment	No. of trials	Semen volume (ml)	Sperm number (10 ⁸ /ml)	Motility just after collection (+++)	Motility after freezing -thawing (+++)
	Control					23.3 ± 12.5 ^a
Bull-A	LAA	3	6.7 ± 1.6	12.5 ± 2.0	83.3 ± 4.7	33.3 ± 12.5 ^a
	LT + LAA					51.7 ± 2.4 ^b

Bull-A: Individuals of poor freezability spermatozoa.

LAA: LAA was added at 1 mg/ml to the first diluent, LT: Equilibrated in the first diluent for 30 h.

+++ : The most active forward motion involving intense movement.

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Each value represents the mean ± SD.

第 3 章 ウシ体外受精胚に対して抗酸化作用を有する新規添加物質の探索

抗酸化物質である N, N-ジメチルグリシン(DMG)、 α リポ酸およびセサミンをウシ体外受精胚の初期発生培地に添加し、胚の発育に及ぼす影響について検討し、DMG の発育促進作用を見出した。さらに、DMG の最適な濃度を検討すると共に、異なる酸素濃度での胚の発育状況や細胞数、抗酸化作用について試験を行った。体外受精胚は、食肉処理場由来卵巣より卵子を採取し、20 時間の体外成熟後に 6 時間の媒精を行い、発生培養液への DMG 添加が胚発生に与える影響について調査した。実験 1 では、ブドウ糖無添加の BSA 加 mSOFaa(SOF1)で 4 日間体外培養し、その後、5%FBS およびブドウ糖 1.5mM を加えた mSOFaa(SOF2)に DMG (0.1、1、10 μ M) を加え 7 日間培養した際の胚発生率を検討した。その結果、0.1 μ M 添加区では発生率および脱出胚盤胞率が 40.3%および 40.8%となり、他の区(18.7%~31.0%および 15.0%~28.7%)と比較して有意に高くなった ($P < 0.05$)。実験 2 では、発生培地への DMG の添加時期が胚発生に与える影響を知るために、SOF1 および SOF2

(様式 5) (Style5)

いずれかおよび両方に、DMG (0.1 μ M) を添加して体外生産胚を培養した。その結果、DMG 全培養期間添加区において、発生率および脱出胚盤胞率が他の区と比較して有意に高くなった ($P < 0.05$)。以上の結果より、発生培地への 0.1 μ M DMG 添加がウシ体外生産胚の胚盤胞期への発生率および脱出胚盤胞率を向上させることが示唆された。

また、ウシ体外発生培養液への過酸化水素(H_2O_2)添加や、異なる酸素濃度(20% vs 5%)での培養条件に対して、DMG を添加した場合の胚発生や、超低温保存後の胚生存性に及ぼす影響について検討した。発生培養液は、基本液を 0.4% BSA 加 mSOFaa とし、DMG を 0.1mM 添加した区、および非添加を対照区として検討した。その結果、20%酸素濃度では DMG 非添加で胚発生率が有意に低下したが、DMG 添加により、5%酸素濃度の DMG 非添加と同等となった。また、5%酸素濃度の DMG 添加区では他の区と比較して有意に高い発生率であり ($P < 0.05$)、細胞数においても、DMG 添加により増加する傾向がみられた。 H_2O_2 添加(0.5 mM)培地では胚発生率が有意に低下したが ($P < 0.01$)、DMG 添加により回復した。このように DMG はウシ初期胚の発育に関して強い抗酸化作用を示した。

ウシにおいて、卵母細胞の体外成熟や、体外受精および初期胚の体外培養といった一連の胚体外生産の培養ステージで、酸素濃度により発育などへの違いが指摘されており、成熟時に 5%の低酸素濃度にすると卵母細胞応答能と糖代謝に関連した遺伝子の発現が変化し、胚の発育が改善することや、体外受精培地への抗酸化剤添加は、ウシ卵母細胞の前核形成率に影響を与えているとの報告もみられる。しかしながら、ヒトやマウス幹細胞では、1%という過剰な低酸素条件下では増殖能が低下し、アポトーシスも増加したことが報告されている。また近年においては、細胞に対し高濃度では有害となる物質でも、微量では有益になるホルミシスと呼ばれる効果も報告されており、抗酸化物質の関係性は、より複雑なものと考えられる。

本研究において、ウシ体外受精後の胚発育条件を酸素濃度 5%にした場合には、20%に比較して DMG 非添加でも胚発生率が有意に高く、これまでの報告を支持する結果となった。また、発生培地に DMG を添加することにより、20%および 5%いずれの区においても、発生率の有意な向上と共に、作出胚の細胞数が増加する傾向が認められた。さらに、発生培地に H_2O_2 のみを添加した区では、胚の発育が大きく阻害されたのに対し、DMG を添加することで有意な改善が見られたことから、DMG の抗酸化作用が、ウシ初期胚においても作用することが示唆された。

以上の結果から、ウシ初期胚の培養条件として、体内の酸素濃度に近いとされる 5%の酸素濃度が有効に働くと共に、DMG は胚細胞に対して抗酸化作用を有し、胚の発育や品質向上に関与していることが明らかとなった。

The effect of N, N-Dimethylglycine (DMG) in the *in vitro* culture medium[※] on development of *in vitro* produced bovine embryos

DMG (μ M)	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to the stage of		
		Cleaved	Blastocyst	Hatched Blastocyst
0.0	210	157 (74.8) ^a	65 (31.0) ^c	45 (28.7) ^h
0.1	295	233 (79.0) ^a	119 (40.3) ^d	95 (40.8) ^g
1.0	133	76 (57.1) ^b	29 (21.8) ^e	12 (15.8) ^h
10.0	107	60 (56.1) ^b	20 (18.7) ^f	9 (15.0) ^h

※ m-SOFaa.

Rate of embryos cleaved, developed to the blastocyst and hatched blastocyst stages were assessed at 48 h and 8 and 11 days after insemination, respectively.

The number of cleaved embryos was used as the denominator for the hatched blastocyst rate.

(様式 5) (Style5)

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

In vitro development of 8-to-16-cell stage bovine embryos to the blastocyst stage in the presence of H₂O₂ and N, N-Dimethylglycine (DMG)

Treatment	No. of embryos examined	No. of embryos developed to the Blastocyst stage (% ± SEM)
Control	20	13 (65.0 ± 5.5) ^a
H ₂ O ₂ (0.5 mM)	21	3 (14.3 ± 8.3) ^b
H ₂ O ₂ (0.5 mM) + DMG (0.1 μM)	21	12 (57.1 ± 8.2) ^a

H₂O₂: hydrogen peroxide.

Base medium: SOF1/SOF2, SOF1: mSOFaa supplemented with 0.3% BSA, 10 μl/ml ITS, 1 ng/ml TGFβ1, and 10 ng/ml FGF was used during 0- 96 h of IVC. SOF2: SOF1supplemented with 1.5 mM glucose (BSA was replaced with 5% FBS) was used after 96 h of IVC.

The experiments was replicated three times.

Values with different superscripts are significant ($P < 0.01$)

第 4 章 ウシ体外生産胚における脂質代謝改善に関する検討

ウシ体外発生培地へ L-カルニチンを添加した際の、初期胚発生に関する脂質代謝促進と生産胚の凍結融解後の生存性を検討するとともに、アポトーシスや代謝活性、活性酸素種 (ROS) への影響について検討した。

発生培地に 0.3、0.6 および 1.2mg/ml の L-カルニチンを添加した結果、非添加区と比較して、0.3 および 0.6mg/ml 区では、有意に胚発生率と胚盤胞の細胞数が向上した。また、生産胚を緩慢凍結し、液体窒素で保存後に融解し生存性を調査したところ、0.3 および 0.6mg/ml 区では、非添加区と比較して有意に高い生存性が示された。Nile Red 染色を用いて胚細胞内の脂質濃度を調査した結果、L-カルニチン処理した胚盤胞では、非処理の対照区と比較して蛍光度合いの減少が確認され、解析ソフトで明度解析を行ったところ、有意な低下が認められた($P < 0.05$)。

また、発生培地に 0.3 および 0.6mg/ml の濃度で L-カルニチンを添加した区では、2 細胞期胚の ROS 濃度が低下し、抗酸化作用が示された。一方、8 細胞期では胚の ROS 濃度は低下しなかったが、高濃度 (1.2mg/ml) では、ROS 濃度が有意に上昇した($P < 0.05$)。胚盤胞期では、L-カルニチン添加区と対照区の間で ROS 濃度に有意差は認められなかった。発生培地中の ROS 濃度は、培養中の細胞内の ROS 蓄積と一致し、酸化的代謝のピークは、胚盤胞期に起こることが知られている。

本研究でも同様の結果となり、L-カルニチンは ROS の蓄積に対して影響を及ぼすことが示唆される。

動物細胞では、L-カルニチンは細胞質ゾルからミトコンドリアへの脂肪酸の輸送に関与し、ミトコンドリアで脂肪酸はベータ酸化を受けることが知られる。脂肪酸のベータ酸化中にアセチル-CoA が産生され、後にクエン酸サイクルで還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)を生じるのに利用される。クエン酸サイクルで生じた NADH はその後、酸化的リン酸化に利用され、ATP を主生成物、ROS を副産物として生じる。従って、胚におけるエネルギー代謝の促進は、ROS 濃度上昇を伴い、高い細胞内 ROS 濃度が胚細胞の DNA 断片化およびアポトーシスといった細胞損傷を

引き起こし、結果として発生阻止や胚断片化の一因となる。胚発生におけるコンパクションおよび胞胚形成中のミトコンドリア活性の抑制は、ウシおよびブタで胚盤胞発生を改善することも報告されている。

また、細胞内の ROS の抑制や代謝に関しては、低酸素誘導性因子(hypoxia-inducible factor : HIF) も関与しており、HIF-1 は解糖系に関与し、ピルビン酸を乳酸に変換する LDHA といった酵素の発現上昇や、ミトコンドリアの電子伝達系の機能低下を引き起こすことで、ROS の産生を抑制することが報告されている。L-カルニチンは、細胞内の脂質代謝に関与しており、本研究においても胚盤胞期胚の脂質含量の減少が認められた。さらに、生産胚を逆転写酵素定量的 PCR 法(RT-qPCR)で調査したところ、L-カルニチン処理した胚盤胞は、ミトコンドリアの代謝関連遺伝子である *ATP6* と *COX1* の発現が増加した。

ウシ胚盤胞期胚の耐凍性について、脂質含量と相関があるとの報告もあり、本研究においても、L-カルニチンの添加により、体外生産胚の凍結・融解後の生存性が改善されたことから、胚盤胞期胚の脂質含量の低下により、耐凍性を改善する可能性が示唆された。マウスでは、L-カルニチンがミトコンドリア脂質代謝を促進することや、DNA 断片化を誘導する ROS を低減する抗酸化剤としての作用が報告されている。本研究で、脂質代謝促進によって生じる ROS 産生増加は、L-カルニチンのフリーラジカル除去作用によって緩和される可能性があることが示唆された。

以上の結果より、ウシ体外発生培地に 0.3 および 0.6mg/ml の L-カルニチンを添加することで、胚の発生率を向上させ、細胞数の増加や耐凍性の改善が示唆された。また、細胞内の脂質含有量が低下し、ミトコンドリア活性に関連する *ATP6* や *COX1* の発現が高まり、分割初期胚の ATP レベルも高まることが明らかとなった。

一方、活性酸素種(ROS)に対しても、胚細胞内の H_2O_2 濃度上昇を抑制することが示唆され、L-カルニチンは、ウシ体外受精胚の代謝活性化作用および ROS の介在物質として、二重の効果を有することが明らかとなった。

L-carnitine (mg/ml)	No of embryos examined	No. (%) of embryos ¹		
		Day 2		Day 7
		Cleaved ²	>4 cells ²	Blastocysts ²
0	468	358 (76.5 ± 3.1)	310 (66.2 ± 4.4)	151 (32.3 ± 0.9) ^a
0.3	410	310 (75.6 ± 4.8)	266 (64.9 ± 4.8)	165 (40.2 ± 2.2) ^b
0.6	426	326 (76.5 ± 2.3)	285 (66.9 ± 3.3)	190 (44.6 ± 2.7) ^b
1.2	389	290 (74.6 ± 4.7)	243 (62.5 ± 5.5)	149 (38.3 ± 3.1) ^{ab}

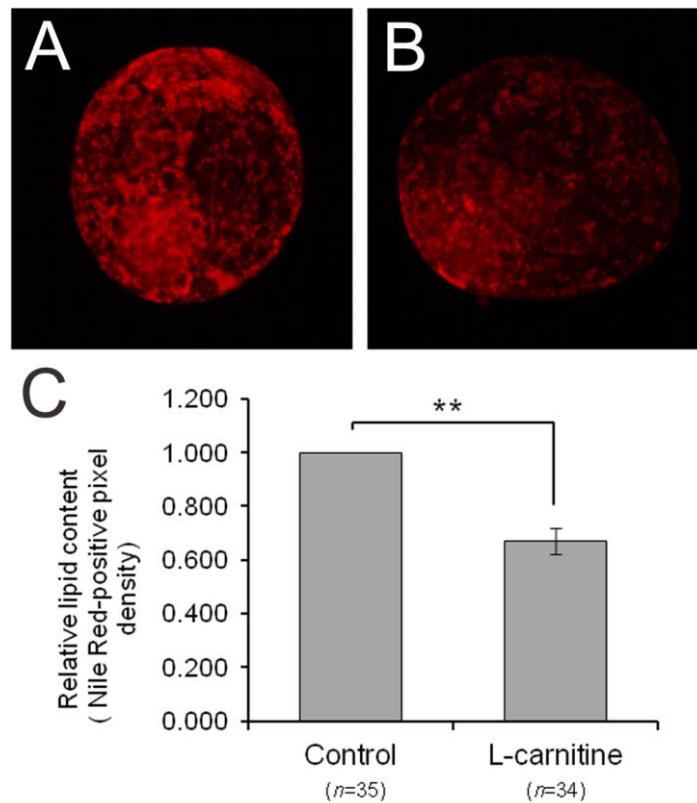
In vitro development of bovine embryos cultured in the absence or presence of L-carnitine

¹ Day 0 = day of IVF.

² Calculated from the total numbers of oocytes subjected to IVF.

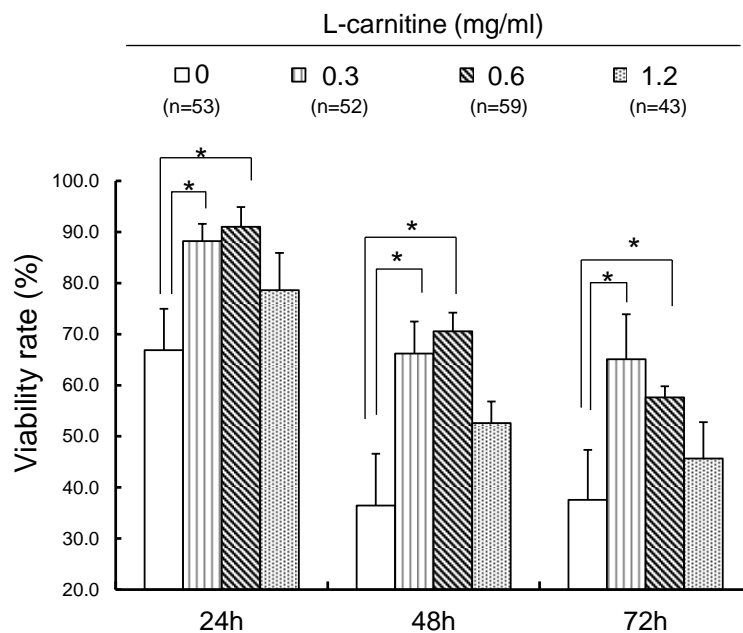
Five replications were performed. Percentage results are presented as mean ± SEM.

Significant difference is indicated by a and b in the same column ($P < 0.05$).



Images of blastocysts produced in the absence (control) (A) or presence (B) of 0.6 mg/ml L-carnitine after lipid staining by Nile red and lipid content (C) in control and L-carnitine treated blastocysts.

Total numbers of embryos assayed in each group are indicated in parenthesis. Asterisks denote significant difference between groups (**P < 0.01).



Viability rates after slow freezing of blastocysts produced in the absence or presence of L-carnitine. Survival rates were assayed at 24, 48, and 72 h after thawing. Asterisks denote significant difference between groups (*P < 0.05).

第 5 章 総括

本研究では、ウシ体外受精胚の生産性および品質の向上を図るために、低耐凍性精子の利用可能性向上、および初期胚に対する添加剤の効果について検討した。その結果、本研究より、LAA および低温での長時間平衡が、低耐凍性を示す精子の凍結保存に対し有効であることが示唆された。また、DMG および L-カルニチンを体外発生培地へ添加することにより、抗酸化作用や脂質代謝作用が補強され、胚の発生率が向上することが明らかとなった。さらに、胚盤胞期胚の細胞数が増加し、L-カルニチンは耐凍性の向上が図られることも明らかとなった。

本研究の成果を応用することにより、体外受精胚を活用した産子の生産性向上に繋がることが期待される。

(注) 要約の文量は、学位論文の文量の約 10分の1として下さい。図表や写真を含めても構いません。

(Note) The Summary should be about 10% of the entire dissertation and may include illustrations