

## ウシ体外胚生産における発生培地への還元型グルタチオンの低濃度添加

福島宜彦<sup>1)</sup>・井上剛一<sup>1)</sup>・白石 徹<sup>1)</sup>・大川智章<sup>2)</sup>

摘要:ウシ体外胚生産における発生培地に、抗酸化物質である還元型グルタチオン(GSH)を既報より低濃度(100  $\mu$ M及び1  $\mu$ M)で添加し、低酸素条件(5%)下で培養して、その後の胚の発生状況を調査した。媒精後2日における卵割率については、非添加区との間に有意差は認められなかったが、媒精後9日までの胚盤胞発生率、脱出胚盤胞率は100  $\mu$ M区で有意に高かった。低酸素条件(5%)下では、酸素濃度無調整で行われた既報の1/10以下の低濃度GSH添加でも抗酸化作用を発揮し、胚の生産性を向上させることが確認された。

キーワード: ウシ、体外胚生産、発生培地、還元型グルタチオン、胚盤胞発生率

### 緒言

畜産の現場において、優秀な遺伝資源を後代に継承する目的で体外胚生産技術が活用されている。特に近年、肉用牛生産頭数確保の目的で、乳用牛への移植用として「黒毛和種」体外胚の需要が高まっている。しかしながら本技術における胚盤胞発生率は実施機関による差が大きく、移植後の受胎率は従来の体内胚と比較して5~10%程度低い<sup>1)</sup>。このため、胚の生産効率及び品質向上技術が求められている。

体外培養環境下においては生体本来の防御機構が十分機能しないため<sup>2)</sup>、活性酸素種(ROS)による酸化ストレスが卵子の発育に悪影響を及ぼす<sup>3,4)</sup>と考えられている。生体内に存在するトリペプチドであるGSHは、ROSと反応し、還元、消去する抗酸化物質として働く<sup>5)</sup>。

体外胚生産における胚盤胞発生率を向上させる目的で、GSHを成熟培養<sup>6-8)</sup>、媒精<sup>6,9)</sup>、発生培養<sup>6,10,11)</sup>の各工程の培地に添加する試みがおこなわれているが、一部培養方法、条件が異なることもあり、その有効性は報告によって差がある。またこれらの報告における発生培地への添加濃度については、生体内での存在濃度よりはるかに高い1~7mMの間で検討されている<sup>6,10,11)</sup>。

そこで本研究ではウシ体外胚生産における発生培養について、低酸素条件(5%)下で、GSHを既往の報告より低い100 $\mu$ M以下の濃度で培地に添加することにより、生体内環境に近い培養条件での胚発生状況を調査した。

### 材料及び方法

#### 1 供試材料

名古屋市中央卸売市場南部市場で2019年2月21日、3月14日及び6月13日にと殺された「黒毛和種」及び交雑種雌牛の卵巢35個を供試した。

#### 2 体外受精操作手順

##### (1) 卵子吸引、成熟培養

と体より摘出された卵巢を抗生物質(ペニシリンGカリウム10万単位/mL、硫酸ストレプトマイシン0.1 g力価/mL)を添加した生理食塩液で洗浄し、保温容器内で同液に浸漬し、実験室まで運搬した。実験室内で再度洗浄し、18Gの注射針をつけた5 mLシリンジポンプに30°Cに加温した3%ウシ胎子血清(FBS、Sigma-Aldrich社、アメリカ)加ダルベッコリン酸緩衝食塩水(D-PBS、Sigma-Aldrich社、アメリカ)1 mLを予め吸引しておき、卵巢内部に存在する卵胞を穿刺し、卵胞液を吸引、回収した。回収液は50 mLのコニカルチューブに投入し、3分間以上静置した。沈殿物をスポイトで吸引し、3%FBS加D-PBSを入れた90 mmシャーレに少量ずつ分けて滴下し、1カ所ずつ双眼実体顕微鏡で卵丘細胞-卵子複合体(COCs)を検索した。COCsは5%FBS加199培地(Thermo Fisher Scientific社、アメリカ)を入れた35 mmシャーレ内で3回洗浄した後、流動パラフィン(ナカライテスク株式会社、京都府)4 mLを入れた35 mmシャーレ中に作成した5%FBS加199培地の100  $\mu$ Lドロップ中にて、38.5°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度飽和気相下で20時間成熟培養した。

##### (2) 媒精

液体室素を入れた専用容器で保管した凍結精液(芳之國、一般社団法人畜改改良事業団、東京都)を38°Cの温湯で融解し、15 mLのコニカルチューブで媒精液IVF-100(株式会社機能性ペプチド研究所、山形県)5 mLと混合、2000 rpm(537 $\times$ g)、5分間遠心分離した。上清を吸引、除去し、再度IVF-100を5 mL加え2000 rpm、5分間遠心分離、上清を除去後、IVF-100を1 mL加えた。ここから50  $\mu$ Lを採り、3%食塩

<sup>1)</sup> 畜産研究部 <sup>2)</sup> 畜産研究部(現畜産総合センター)

液で100倍希釈し、顕微鏡下で精子数を計測、元の精子液の精子濃度が $1 \times 10^7$ 個/mLとなるようIVF-100で希釈した。あらかじめIVF-100の50  $\mu$ Lドロップを媒精の1時間以上前に38.5°C、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーターで保温しておき、希釈した精子液50  $\mu$ Lを各ドロップに追加することで精子濃度 $5 \times 10^6$ 個/mLの精子液ドロップとした。成熟培養を終えたCOCsをIVF-100で2回洗浄し、1ドロップあたりCOCsが10個程度となるよう精子液ドロップへ移動した。インキュベーターにて、38.5°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度飽和気相下で6時間培養することにより受精処理した。

### (3) 発生培養

発生培地は、「牛の受精卵移植技術マニュアル」<sup>12)</sup>に準じて調整したCR1aaを使用し、媒精後に卵周囲の卵丘細胞を剥離、除去する非共培養の手法で行った。すなわち、6 mLの蓋付き試験管にCR1aa500  $\mu$ Lとともに媒精後の卵を入れ、ボルテックスミキサーで4分間攪拌することで、卵周囲に付着した卵丘細胞を剥離した。1ドロップあたり卵が10個程度となるようCR1aaの100  $\mu$ Lドロップへ移動し、38.5°C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、湿度飽和気相下で培養し、媒精後2日に卵割の有無を、7~9日に胚盤胞及び脱出胚盤胞への発育を判定した。

### 3 試験区分

発生培地にGSH(L-Glutathione reduced, Sigma-Aldrich社、アメリカ)を100  $\mu$ M、1  $\mu$ M添加した区と非添加区を設定した。ボルテックスミキサーによる卵丘細胞の剥離も発生培地と同じGSH添加濃度の培地中で行なった。

### 4 統計処理

培養に供した卵数に対する卵割率、胚盤胞発生率、脱出胚盤胞率を調査した。各区間の比率の差についてはFisherの正確確率検定を行い、有意差が認められた場合はRyanの方法により多重比較を実施した。

媒精後2日における卵割率を表1に、媒精後9日までの胚盤胞発生率及び脱出胚盤胞率を表2に示した。卵割率は3区ともほぼ同等であったが、胚盤胞発生率及び脱出胚盤胞率は100  $\mu$ M区で有意に高かった。

Liら<sup>10)</sup>及びSunら<sup>11)</sup>は本研究と同じく非共培養の手法において、発生培地へのGSH添加により、卵割率は上昇しなかったが、胚盤胞発生率が向上したことを報告している。一方Luvoniら<sup>9)</sup>は、発生培養時に受精卵を卵丘細胞とともに培養する共培養の手技において、発生培地にGSHを添加したところ、胚盤胞発生率のみならず卵割率も有意に上昇したとしている。ハムスターなどでは卵丘細胞中にGSHが豊富に存在していることが確認されており<sup>13)</sup>、媒精後2日以内の初期卵割の時期における卵丘細胞の有無が、GSHの抗酸化作用に何らかの影響を与えた結果、細胞分裂が促進された可能性が推察される。しかしながら現在では、共培養により生産された胚は、その後過大子など成長に異常をきたす恐れがある<sup>14)</sup>ことから、非共培養による胚生産が主流となっており、実用的な手法においてはGSHの発生培地への添加は卵割率には大きな影響を与えないと考えられる。

発生培地に添加するGSH濃度と胚盤胞発生率について、Sunら<sup>11)</sup>はGSHを添加しなかった対照区31.54%に対し、1 mM、3 mM、5 mM、7 mMの4つの各濃度のGSHを添加したところ、41.05%、51.38%、45.80%、35.33%で3 mM区が最も高かったとのデータを得ている。Liら<sup>10)</sup>は対照区33.67%、1 mM区45.33%だったとしている。本研究におけるGSH100 $\mu$ Mという添加濃度はこれら報告の1/10以下であるが、胚盤胞発生率は無添加区より10ポイント以上向上し、両報告の1 mM区と遜色ない結果であった。発生培地に添加されたGSHが抗酸化作用を通して胚の発育を促進する機序としては、培地中のROSを低下させ<sup>11)</sup>、細胞膜の過酸化を防止すること、またそれによりROSの受精卵・胚内への移行を抑えることで細胞内GSHの消費を抑える<sup>11)</sup>ことなど主に細胞

## 結果及び考察

表1 媒精後2日における卵割率

	供試卵数 A	卵割の状況			卵割率 (B+C)/A(%)
		未受精卵及び 変性卵	2~4 細胞 B	5 細胞以上 C	
非添加区	139	34	39	66	75.5
1 $\mu$ M 区	133	33	38	62	75.2
100 $\mu$ M 区	136	36	34	66	73.5

各区とも3回の手技による結果を集計

表2 胚発生検査成績

供試卵数 A	胚盤胞発生数				計 E	胚盤胞 発生率 E/A (%)	脱出胚 盤胞数 F	脱出胚 盤胞率 F/A(%)
	媒精後日数			計				
	7日	8日	9日					
非添加区	139	36	4	1	41	29.5 <sup>a</sup>	22	15.8 <sup>c</sup>
1 μM 区	133	32	4	1	37	27.8 <sup>a</sup>	15	11.3 <sup>c</sup>
100 μM 区	136	54	5	1	60	44.1 <sup>b</sup>	43	31.6 <sup>D</sup>

各区とも3回の手技による結果を集計

同列内の異符号間 有意差あり(a-b:  $P < 0.05$ , C-D:  $P < 0.01$ )

外での働きが考えられている。生体内におけるGSH濃度は細胞内で最大10 mM、細胞外ではその数百分の一以下の5~25 μM<sup>9)</sup>とされている。すなわちGSH100 μMという濃度は、生体内で受精卵・胚が存在する環境下より高い設定である。さらに本研究では前述の両報告と異なり、培養中のROS発生を抑制できる低酸素条件<sup>15)</sup> (5%)下で発生培養を行っており、低いGSH濃度でも培地中のROSを還元し、高い発育促進効果を発揮したものと考えられる。

またSunら<sup>11)</sup>はGSH7mMという高濃度の添加では、卵割率、16細胞までの発育が対照区より抑えられており、過剰なGSH添加により酸化還元平衡が崩れたり、培地のpHが低下するなど弊害もあることを示しており、低濃度のGSH添加は、受精卵や胚にとってより安全な手法であると思われる。

脱出胚盤胞率については、既報における記載がないため比較はできないが、本研究では100 μM区で顕著に高くなっている。GSHの添加により、胚を構成する細胞数が増加し、胚の直径が増大すること<sup>11)</sup>などが知られており、今回の結果も、GSHの添加による胚の品質向上を反映して、旺盛な発育を示したものと考える。

以上のことから、ウシの体外胚生産において、発生培地へGSHを100 μM添加し低酸素条件下で培養した今回の方法は、生体内環境に近い培養法であり、ウシ体外胚を効率的に、またより安全に生産できることが確認された。

## 引用文献

1. 農林水産省. 牛受精卵移植実施状況. (2016). [https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_katiku/attach/pdf/index-10.pdf](https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/attach/pdf/index-10.pdf) (2021.8.31参照)
2. 星宏良. 哺乳動物胚の酸化ストレス障害とその制御. 化学と生物. 38(2), 99-104(1998)
3. Mantikou, E., Bontekoe, S., van Wely, M., Seshadri, S., Repping, S. and Mastenbroek, S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. Human Reproductive Update. 19(3), 209(2013)
4. 日高健雅. ウシ経腔採卵・体外成熟による効率的な和牛胚生産に関する研究: 個体差の要因と改善. 県立広島大学大学院総合学術研究科生命システム科学専攻博士論文. (2018)
5. 渡辺文太, 平竹潤. グルタチオン代謝とチオールケミストリー病態との関係、創薬標的としての価値. 化学と生物. 53(6), 354-361(2015)
6. Luvoni, G. C., Keskinetepe, L. and Brackett, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. Molecular Reproduction and Development. 43, 437-443(1996)
7. 真方文絵, 小牧春菜, 出田篤司. グルタチオンエチルエステルは加齢により低下したウシ卵子の胚発生能を向上させる. 日本IVF学会雑誌. 20(2), 2-5(2017)
8. ボラジギンサラントガ, 加藤大樹, 緒方和子, 山口美緒, 原明日香, 佐藤あかね, 福森理加, 長尾慶和. 肝障害により発生能が低下したウシ卵子の成熟培地におけるグルタチオンエチルエステル添加の影響. 日本繁殖生物学会講演要旨集, 108(0), OR1-36(2015)
9. Kim, I. H., Langendonck, A. Van, Soom, A. Van, Vanroose, G., Casi, A. L., Hendriksen, P. J. M. and Bevers, M. M. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. Theriogenology. 52(3), 537-547(1999)
10. Li, F., Cui, L., Yu, D., Hao, H., Liu, Y., Zhao, X., Pang, Y., Zhu, H. and Du, W. Exogenous glutathione improves intracellular glutathione synthesis via the γ-glutamyl cycle in

- bovine zygotes and cleavage embryos. *Journal of Cellular Physiology*. 234(5), 7384-7394(2019)
11. Sun, W., Pang, Y., Liu, Y., Hao, H., Zhao, X., Qin, T., Zhu, H. and Du, W. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after in vitro fertilization. *Theriogenology*. 84(5), 716-723(2015)
12. 愛知県畜産総合センター 技術指導部人工妊娠課編. 牛の受精卵移植技術マニュアル改訂第5版. p.84(2010)
13. Zuelke, K. A. and Perreault, S. D. Hamster oocyte and cumulus cell glutathione concentrations increase rapidly during in vivo meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 50, 144 (1994).
14. Behboodie, E., Anderson, G. B., BonDurant, R. H., Cargill, S. L., Kreuscher, B. R., Medrano, J. F. and Murray, J. D. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*. 44, 227-232(1995)
15. Thompson, J. G. E., Simpson, A. C., Pugh, P. A., Donnelly, P. E. and Tervit, H. R. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 89, 573-578(1990)