

ウシ体外受精胚の発生能に及ぼすスーパーオキシドジスムターゼの影響

福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊

要 約

スーパーオキシドアニオンラジカルを消去するウシ赤血球由来及びヒト由来のスーパーオキシドジスムターゼ(以下SODという)を体外成熟後, 体外受精したウシ初期胚の体外培養時の培養液中に添加したところ, 以下の結果を得た.

- 1 ウシ赤血球由来SOD, ヒト由来SODともに約300 unit/mlの濃度で胚の発育を向上させる傾向があった. 特に, ウシ赤血球由来SODでは, 8細胞期胚への発生率が無添加区に対して有意に($P<0.05$)高かった. このことから, ウシ赤血球由来SODは, 分割直後から8細胞期までの胚発生の比較的早い時期に効果を示すことが示唆された.
- 2 酸素濃度を5%, 20%と40%の培養条件下でSODを添加したところ, 培養72時間後の5細胞期以上胚発生率では全ての酸素濃度区でSOD添加区が高い傾向を示したが, その後の胚盤胞への発生率は, 40%酸素濃度区での培養において, SOD添加によっても胚の発生率は, 改善されなかった. また, 5%酸素濃度区では, 胚盤胞率は, SOD添加区で有意($P<0.05$)に低かった.

Effects of Superoxide Dismutase on the Development Ability of Bovine Embryos Matured, Fertilized and Developed in Vitro

Moriyuki FUKUSHIMA, Keiichiro TOMINAGA and Yutaka HATAYA

Summary

When superoxide dismutase (SOD), derived from bovine erythrocyte or human's is added to the culture medium at culture of IVM-IVF embryos, we had the following results.

- (1) There was the determination that development of embryo elevates with the addition of SOD (about 300 unit/ml) derived from both bovine and human's. Especially, when SOD derived from bovine erythrocyte was added to a culture medium, the incidence of development to 8-cell stage was significantly higher than that of the no-addition group. It was suggested that addition to the culture medium of SOD derived from bovine erythrocyte was effective in early development of bovine IVM-IVF embryos.
- (2) When SOD was added during the culture medium, the developmental rate of embryos after 72 hours from IVF was high, but there was no effect of additional culture, under 5-40% oxygen concentration.

キーワード: スーパーオキシドジスムターゼ, ウシ初期胚, 体外受精, 体外培養, 酸素濃度

緒 言

ウシ体外受精・体外培養胚の体外発生時の酸素濃度を低下させたり, 共培養により局所的に酸素濃度を低下させることが, その後の胚盤胞率を改善したと報告されている^{2, 7, 9, 12)}. 本来5%程度の低酸素濃度下で发育する胚を空気中のような高酸素濃度(約20%)で培養すると種々の酸素毒性が発現されることが知られている⁶⁾. こ

のような酸素毒性を低減するために, 活性酸素種の一つであるスーパーオキシドアニオンラジカルを消去するスーパーオキシドジスムターゼ(以下SODという)を使用することによって, マウス2-cellブロックを解除したり, 胚発生率が向上したとする報告がなされている^{5, 10, 11)}.

そこで, 本研究では, 体外受精初期胚の体外発生能に及ぼすSODの添加効果について検討した.

本試験の実施にあたり, ヒト由来SODを提供いただいた萩原健康科学研究所の関係各位に感謝します.

材料及び方法

既報³⁾に準じて、体外成熟・体外受精・体外培養を実施した。

1 卵母細胞の体外成熟

屠畜場で、屠殺後30分以内に卵巣を採取し、37℃に保温した滅菌生理食塩水中に入れて、実験室に持ち帰った。卵巣表面の直径5mm以下の小卵胞に18Gの注射針の付いた5ml注射器を刺して卵胞液とともに卵母細胞を吸引採取した。なお、注射器にはあらかじめ1mlの修正したDulbeccoのリン酸緩衝食塩水(以下m-PBSという)を吸引しておいた。卵母細胞はm-PBSで洗浄した後、緊密な卵丘細胞層に包まれたもののみを選別して成熟培地に入れた。卵母細胞の基礎成熟培地には、10%非働化牛胎児血清、抗生物質(結晶ペニシリンGカリウム100iu/ml, 硫酸ストレプトマイシン100μg/ml, 明治製薬)添加25mmol/lヘPes緩衝TCM-199(GIBCO)を用いた。これらの卵母細胞を成熟培地で2回以上洗浄した後、流動パラフィンで被った100μlの培養液中へ入れ、5%CO₂2, 95%空気の気相下の加湿型、37℃及び39℃の炭酸ガス培養器内で24時間成熟培養を行った。

2 精子処理と授精

当场繋養の1頭の種雄牛から採取した同一ロットの0.5mlのプラスチックストローに保存された凍結精液を37℃の温湯中に15秒間浸漬して融解し、小試験管内で、カフェイン(安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェインを50%として計算, Sigma)を2.5mmol/l, ヘパリン(Sigma)を2.5μg/ml及び牛血清アルブミン(Fraction V, Sigma)を2.5mg/ml加えた修正タイロード液(BO液)¹⁾で2回洗浄した。洗浄後精子濃度をBO液で5×10⁶/mlに調整し、精子浮遊液を100μlの小滴にして滅菌流動パラフィンで被い、39℃の炭酸ガス培養器内で2~3時間プレインキュベーションした。授精の際に、成熟培養の完了した卵母細胞をBO液で洗浄した後、精子懸濁ドロップ中に入れた。

3 体外受精胚の体外培養

卵は授精の5時間後、発生培地に移してさらに培養した。発生培地には25mmol/lヘPes緩衝TCM-199(GIBCO)に、新生子牛血清(三菱化成株)を1%と抗生物質(結晶ペニシリンGカリウム100iu/ml,

硫酸ストレプトマイシン100μg/ml, 明治製薬)とを加えた。授精72時間目に卵丘細胞層を除去後、さらに48時間毎に発生培地を置換して、ドロップ内で体外培養を継続した。

実験計画

実験1: ウシ赤血球由来SODとヒト由来SODの培養液への添加によるウシ体外受精初期胚の発育に及ぼす影響

授精5時間目の体外受精胚を0~1200unit/mlウシ赤血球由来SOD(Sigma)と0~635unit/mlヒト由来SOD(萩原健康科学研究所)を添加した培養液中で培養した。培養液の交換は、48時間毎に行い、授精の72時間後と7日後に胚の発生を観察した。

実験2: ウシ赤血球由来SODと酸素濃度がウシ体外受精由来初期胚の発育に及ぼす影響

授精5時間目の体外受精胚を0又は300unit/mlウシ赤血球由来SODを添加した培養液中で培養した。気相については、酸素濃度を5%(5%O₂, 5%CO₂, 90%N₂), 20%(20%O₂, 5%CO₂, 75%N₂)及び40%(40%O₂, 5%CO₂, 55%N₂)の3区を設定した。培養液の交換は、48時間毎に行い、授精の72時間後と7日後に胚の発生を観察した。

結果

実験1: ウシ赤血球由来SODとヒト由来SODの培養液への添加によるウシ体外受精初期胚の発育に及ぼす影響

ウシ赤血球由来SODの培養液への添加結果を表1に、ヒト由来SODの培養液への添加による結果を表2に示した。ウシ赤血球由来SODでは、150~300unit/mlで無添加区に比較して8細胞期への発生率が有意に増加した。さらに胚盤胞への発生率については、300unit/ml

表1 スーパーオキシドジスムターゼ*(SOD)添加量がウシ体外受精胚発生能に及ぼす影響

SOD量 unit/ml	試験 回数	供試 卵数	1-3細胞 期胚数	4-7細胞 期胚数	8細胞期胚数 (%)	胚盤胞数 (%)
0	3	99	30	41	28 (28.3) ^b	20 (20.2) ^{a,b}
150	3	103	37	19	47 (45.6) ^a	22 (21.4) ^{a,b}
300	3	110	34	26	50 (45.5) ^a	32 (29.1) ^a
600	3	113	42	32	39 (34.5) ^{a,b}	19 (16.8) ^b
1200	3	118	41	38	39 (33.1) ^{a,b}	16 (13.6) ^b

a, b: 異符号間に有意差(P<0.05).

*: ウシ赤血球由来SOD

表2 スーパーオキシドジスムターゼ* (SOD) 添加量がウシ体外受精胚発生能に及ぼす影響

SOD 量 unit/ml	試験 回数	供試 卵数	1-3細胞 期胚数	4-7細胞 期胚数	8細胞期胚数 (%)	胚盤胞数 (%)
0	4	179	60	51	68 (38.3) ^{a,b}	49 (27.4) ^{a,b}
79	4	182	76	45	61 (33.9) ^b	41 (22.5) ^b
159	4	179	65	49	65 (36.3) ^b	39 (21.8) ^b
317	4	180	49	46	85 (47.0) ^a	65 (36.1) ^a
635	4	177	53	53	71 (40.1) ^{a,b}	60 (33.9) ^a

a, b: 異符号間に有意差 (P<0.05).

*: ヒト由来 SOD

表3 酸素濃度とスーパーオキシドジスムターゼ添加が胚発生に及ぼす影響

酸素濃度	SOD 量 unit/ml	供試卵数	5-cell ≤ 胚数 (%)	胚盤胞数 (%)
5%	0	96	57 (59.4) ^{a,b}	25 (26.0) ^a
	300	98	64 (65.3) ^a	13 (13.3) ^b
20%	0	95	46 (48.4) ^b	22 (23.2) ^{a,b}
	300	96	53 (55.2) ^{a,b}	22 (22.9) ^{a,b}
40%	0	92	46 (50.0) ^b	0 (0) ^c
	300	94	49 (52.1) ^{a,b}	0 (0) ^c

a, b, c: 異符号間に有意差 (P<0.05).

添加区が 600 unit/ml 以上添加区に比較して有意に高い発生率を示したが、無添加区に対しては有意な差は認められなかった。ヒト由来 SOD については、317 unit/ml 添加区が高い傾向にあったが、無添加区との間には有意な差は認められなかった。

実験2：ウシ赤血球由来 SOD と酸素濃度がウシ体外受精由来初期胚の発育に及ぼす影響

低酸素濃度下(酸素濃度 5%区)や高酸素濃度下(酸素濃度 40%区)における SOD の影響について検討した。表3に示すように各酸素濃度下で5細胞期までの胚発生率は、SOD 添加区が有意差は認められないものの高い傾向が認められた。しかし、胚盤胞期までの発生率では、高酸素濃度下での SOD の積極的な効果は認められなかった。また、低酸素下における SOD の添加は、胚盤胞までの発育を抑制した。

考 察

ヒト由来及びウシ赤血球由来 SOD を用いて培養液中に種々の濃度で添加したところ、両者ともに約 300 unit/ml 添加区で高い傾向を示した。特に、ウシ赤血球由来 SOD では、8細胞期までの発生率が無添加区に比較して有意 (P<0.05) に高かった。このことから、ウシ赤

血球由来 SOD は、分割直後から8細胞期までのウシ体外受精胚発生の比較的早い時期に効果を示すことが示唆された。浜野ら⁴⁾は、SOD と異なり、還元剤の一つであるβ-メルカプトエタノールを用いて、2細胞期、8細胞期と16細胞期を培養したところ、2細胞期では添加により発生率が大きく改善しなかったものの、8細胞期及び16細胞期では顕著な添加効果があったと報告している。SOD とβ-メルカプトエタノールの間で作用機序が異なるが、胚のステージに依存した還元剤利用性の変化のあることが示唆された。

ウシ赤血球由来 SOD を用いた実験2において、5、20及び40%酸素濃度下での SOD の添加効果を検討した。各濃度とも授精72時間までの5細胞期以上の胚発生率は、SOD 添加区が高い傾向にあったが、有意な差ではなかった。また、高酸素濃度下での SOD 添加による胚発生率の向上が期待されたが、本実験系では SOD 添加による胚発生率の改善は認められなかった。

野中⁸⁾が示すように、活性酸素種には多くの種類が存在することが知られている。今回は、スーパーオキシドアニオンラジカルの除去物質である SOD を用いて実験を行った。しかしながら、生態系では他に幾つかの活性酸素が存在しているため SOD でスーパーオキシドアニオンラジカルのみを除去しても十分な発生促進効果が得られなかったことが考えられる。

さらに、低酸素濃度下においては、SOD 添加による胚盤胞率の低下が観察された。原因は明らかではないが、今回の実験では、卵丘細胞との共培養系を用いたので、このような共培養系では胚がシャーレ底面に存在する卵丘細胞と接した形で存在することになる。その結果、局所的に低酸素濃度の状態を生み出し、胚発生に対する SOD の効果を低減、さらに、培養条件の低下を誘起させたと考えられた。

以上の結果より、ウシ赤血球由来 SOD、ヒト由来 SOD ともに約 300 unit/ml の濃度で胚の発育を向上させる傾向があった。特に、ウシ赤血球由来 SOD では、8細胞期胚への発生率が無添加区に対して有意に (P<0.05) 高かった。このことから、ウシ赤血球由来 SOD は、分割直後から8細胞期までの胚発生の比較的早い時期に効果を示すことが明らかとなった。

引用文献

- (1) Brackett, B. G. and G. Oliphant (1975) : Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro : Biol Reprod 12, 260-274
- (2) 福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊(1988) : 体外で成熟, 受精した牛卵子の成熟及び発生に及ぼす酸素濃度の影響第74回家畜繁殖学会講演要旨 68
- (3) 福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊(1989) : 牛卵母細胞の体外受精及びその後の胚発育能におよぼす培養温度の影響:繁殖技術研誌 11, 12-16
- (4) 浜野晴三・桑山正成・高橋昌志・永井 卓・岡野彰・岡村直進(1992) : ウシ体外受精胚の体外培養に及ぼす β -メルカプトエタノールの影響と移植試験 : 第7回東日本家畜受精卵移植技術研究大会講演要旨 65
- (5) 松本央・野田洋一・馬岡 陽・辰巳賢一・岸 淳二・森 崇英(1989) : Superoxide Dismutaseによるマウス2-cellブロック解除の機構について:哺乳卵研誌 6, 65-66
- (6) 松尾光芳(1987) : 酸素毒性:活性酸素(医歯薬出版株式会社) 241-258
- (7) Nakao H, Nakatsuji N (1990) : Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos : Theriogenology, 33, 591-600
- (8) 野中美智子(1987) : 抗酸化物質と老化予防 : 研究ジャーナル, 5-12
- (9) Thompson, J. G. E., A. C. Simpson, P. A. Pugh, P. E. Donnelly and H. R. Tervit (1990) : Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos : J. Reprod. Fert., 89, 573-578
- (10) 豊田 裕・東 貞宏・板垣佳明(1989) : 体外におけるマウス初期胚の発生に及ぼすスーパーオキシドジスムターゼ及びカタラーゼの効果について : 第107回日本獣医学会講演要旨 47
- (11) 馬岡 陽・野田洋一・松本 央・岸 淳二・辰巳賢一・森 崇英(1989) : 低酸素濃度培養系におけるマウス2-cellブロック解除について:哺乳卵研誌 6, 67-68
- (12) Voelkel, S. A. and Y. X. Hu (1992) : Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems : Theriogenology, 37, 1117-1131