

## ウシ血清アルブミン非添加培地を用いた L- カルニチン添加 における体外受精および発生能の検討

東 佳 澄<sup>1</sup>、西 村 愛 美<sup>2</sup>、木 我 敬 太<sup>1</sup>、中 川 隆 生<sup>3</sup>、  
永 井 匡<sup>4</sup>、岸 昌 生<sup>5</sup>、細 井 美 彦<sup>1,2,6</sup>、安 齋 政 幸<sup>6</sup>

### 要 約

本研究では、ICR 系統マウスを用いた体外受精ならびに、初期胚の体外培養について検討した。体外受精では、常法により過剰排卵処置を施した成熟雌マウスより卵を回収し、前培養を行うことにより、受精能を獲得させた精子と共に培養し、受精させた。精子前培養培地および受精培地からウシ血清アルブミンを除き、L- カルニチンを添加した修正 HTF 培地を用いた。その結果、L- カルニチン添加濃度 0mM では 48% (162/337)、1mM では 12% (35/294)、2mM では 0% (0/311)、5mM では 0% (0/292)、10mM では 0% (0/270) の受精率が得られた。続いて胚培養を行った結果、L- カルニチン添加濃度 0mM では 78% (127/162)、1mM では 57% (20/35) であり、2mM、5mM、10mM では胚の発生には至らなかった。次に、高分子物質の PVA を 0.1% 添加した培地でも同様の実験を行い、L- カルニチン添加濃度 0mM では 25% (96/390)、0.1mM では 25% (91/362)、0.5mM では 30% (77/256)、1mM では 34% (117/347) の受精率が得られた。続いて胚培養を行った結果、L- カルニチン添加濃度 0mM では 80% (76/95)、0.1mM では 81% (74/91)、0.5mM では 95% (70/74)、1mM では 73% (85/117) が胚盤胞期胚へ発生した。これらの結果から、L- カルニチン高濃度における受精阻害を呈することが明らかとなった。また、L- カルニチンに高分子物質である PVA を添加することで、ウシ血清アルブミンの代替物質になる可能性が示唆された。

### 緒 言

現在、マウスの体外受精<sup>1)</sup> やその後の体外における胚培養培地<sup>2)</sup> は、栄養分、緩衝能、等張性、無菌状態の 4 つの要求を全て満たしたものでなければならない<sup>3)</sup>。様々な受精用培地あるいは胚発生用培地には、動物の体液や組織液由来の天然培地<sup>3)</sup> と、既知の正確な組成に従って物質を溶解させて作る合成培地<sup>3)</sup> がある。合成培地を使用し半永久的に細胞を培養するという最終目的に到達するために、多くの研究が重ねられてきたが未だ実現されておらず<sup>3)</sup>、現在合成培地には、わずかな比率で血清や生体タンパク質を添加することで体外での細胞の長期培養の欲求を満たしている<sup>3)</sup>。しかし、マウスにおいては系統による受精の差が認められ<sup>4, 5)</sup>、培地中に含まれるアルブミンや血清の添加による pH の変動や熱産生そして浸透圧等の安定性が問題点として指摘されている<sup>6, 7)</sup>。これらを近年では、代謝促進に関る、アミノ酸の添加による胚培養液の開発がされつつあり<sup>8)</sup>、体外培養における複数のアミノ酸の有効利用が検討されている<sup>9)</sup>。生体内で有用な L- カルニチンは、脂肪の代謝に必要な不可欠な物質として自然界に多く存在している<sup>10, 11, 12)</sup>。脂肪はエネルギー源として重要な役割を果たしており、主としてミトコンドリア内で代謝される。しかし、長鎖脂肪酸は単独ではミトコンドリアに入ることが出来ず、骨格筋に多く存在し、脂肪の

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学大学院生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 株式会社紀和実験動物研究所 〒640-1473 和歌山県海草郡紀美野町毛原宮 486

4. 株式会社日本医化器械製作所 〒583-0841 大阪府羽曳野市駒ヶ谷 5-73

5. 近畿大学生石農場 〒643-0531 和歌山県有田郡有田川町楠本 1643-21

6. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

$\beta$ 酸化に関与する L-カルニチンと結合して初めてミトコンドリア膜を通過することが出来る<sup>13, 14)</sup>。L-カルニチンは、体内でリジンとメチオニンを前駆物質として肝臓と腎臓で生合成されるか、肉食の食事から供給される。L-カルニチンの生体内での効果として、ラットに L-カルニチン、生理食塩水をそれぞれ腹腔内注入後の精巣に放射線を照射すると、L-カルニチンを注入したラットでは、生殖細胞のアポトーシスと形態学的変化の有意な減少が報告されている<sup>15)</sup>。また、塩化カドミウムを腹腔内注入した雄ラットに L-カルニチンを腹腔内注入すると、未処理と比較し精巣上体尾部の精子数、生存数、細胞増殖数の増加が確認されている<sup>16)</sup>。

そこで、本実験ではウシ血清アルブミン (BSA) 非添加による単一組成の単純合成培地の作成を目的に、L-カルニチン添加による体外受精および体外での初期胚発生における効果を検討し、さらに高分子物質ポリビニルアルコールおよび L-カルニチン含有受精培地によるその後の体外受精および体外での初期胚発生の検討を行なった。

## 材料および方法

### 1：供試動物

本研究では、成熟週齢の Jcl:MCH (ICR) (日本クレア (株)) および Kwi:ICR (株) 紀和実験動物研究所の雌マウスを供試した。また、同系統である成熟週齢の雄マウスを用いた。なお、実験の立案および実験動物の飼養および管理に関しては、近畿大学動物実験規定に準じて実施した。

### 2：前培養培地、受精培地の調整

体外受精を行う際に既知の HTF 培地 (以下、HTF) を基本培地<sup>17)</sup> して、ウシ血清アルブミン (以下、BSA) を除くことにより修正 HTF 培地 (以下、mHTF) を調整した。調整した mHTF 培地は、50mL シリンジ (TERUMO:SS50-ESZ) に 0.22  $\mu$ m フィルター (MILLIPORE:SLV033RS) を装着し濾過滅菌を行った。この mHTF 培地を基に L-カルニチン (ロンザジャパン株式会社:L-カルニチン結晶性粉末) をそれぞれ、0mM/mL、1mM/mL、2mM/mL、5mM/mL、10mM/mL 添加した mHTF (L-カルニチン) を調整した。次に、この BSA 非添加 mHTF 培地にポリビニルアルコール (以下、PVA;SIGMA:P5288-100G) を 0.1% 添加し<sup>18)</sup> 同様に、フィルター濾過滅菌処理を行った。続いて、調整した各培地は、5mL シリンジ (TERUMO:SS05-SZ) に 0.22  $\mu$ m フィルター (MILLIPORE:SLV033RS) を装着し濾過滅菌処理を施した (表 1)。また、調整された各受精培地、精子前培養培地は、35mm ペトリディッシュ (FALCON:351008) に 200  $\mu$ L 滴下し、ミネラルオイル (SIGMA:M8410-1L) で被い、37℃、5% 炭酸ガスインキュベーター内にて、3 時間以上気相を平衡させたものを用いた。

### 3：精子懸濁液の調整

精子懸濁液の調整は、豊田らの方法に従った<sup>1)</sup>。すなわち、成熟雄マウスより精巣上体尾部を摘出後、尾部のトリミングを行い余分な血液や、体液を取り除いた。精巣上体尾部より解剖針を用いて精子塊を採取し、予め通気しておいた前培養培地に導入後、約 1.5 時間、37℃、5% 炭酸ガスインキュベーター内にて培養し、精子を拡散させ、受精能を獲得させた。

### 4：体外受精操作

体外受精操作は、豊田らの方法に従った<sup>1)</sup>。実験に供試する成熟雌マウスに 7.5 単位の PMSG (妊馬血清性腺刺激ホルモン:動物用セロトロピン あすか製薬(株)) を腹腔内投与し、48 時間後に 7.5 単位の

hCG（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン：ゴナトロピン筋注用 あすか製薬(株)）を腹腔内に投与した。hCG 投与 14 ～ 16 時間後に成熟雌マウスより、卵管を摘出し組織の余分な血液や体液を取り除いた。35mm ペトリディッシュのミネラルオイルの部分に、摘出した卵管を入れ、卵管膨大部より卵子卵丘細胞複合体を受精培地内に導入した。次に、受精能を獲得させた精子懸濁液を、精子濃度 200 精子 /  $\mu$ L に調整し媒精した。媒精後 6 時間後、KSOM（アーク・リソース(株)）胚培養培地に移し、卵子の選別と洗浄を行い、雌雄両前核を確認後、引き続き 37℃、5%炭酸ガスインキュベーター内にて培養を行い、初期胚の発生を観察した。

Reagent	メーカー	Cat.No.	Lot.No.	mg/100mL	mM
NaCl	Wako	191-01665	CDQ 4694	593.8	101.6
KCl	Wako	169-03542	SDJ5033	36.9	4.96
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	Wako	039-00431	KLQ3279	59.9	4.08
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Wako	165-04242	EWG7339	5	0.37
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	Wako	197-01302	CEM3340	4.9	0.2
NaHCO <sub>3</sub>	Wako	197-01302	CDK3985	210	25
Glucose	Wako	041-00595	TCE4475	50	2.78
Na-Pyruvate	Wako	199-03062	PAK 0394	3.7	0.33
Na-Lactate 60%	nacalai tesque	31605-72	M9A2573	0.34mL	21.4
Penicillin	明治製菓株式会社	PGSD 302	—	7.5	—
Streptomycin	明治製菓株式会社	SSD 525	—	5	—
BSA	nacalai tesque	01859-76	MOH9390	400	—
0.5% phenol red	SIGMA	P0290 100ml	53K2363	0.04mL	—
PVA	SIGMA	024k0002	P5288-100G	100	0.1%

表 1. 前培養培地、受精培地の組成表

## 結 果

各 L-カルニチン添加濃度における体外受精成績、胚発生成績を表 2 に示した。コントロール区では、62% (244/392)、L-カルニチン添加濃度 0mM では 48% (163/337)、1mM では 12% (35/294) の受精成績であったのに対し、2mM では 0% (0/311)、5mM では 0% (0/292)、10mM では 0% (0/270) と受精卵の獲得に至らなかった。さらに HTF 培地に L-カルニチンを 1mM 添加した前培養、受精培地では、69% (131/189) の受精成績が得られ、L-カルニチン添加濃度が 2mM 以上になると受精しないことが再確認された。また、各区より得られた受精卵の胚発生成績は、コントロール区では、91% (221/243)、L-カルニチン添加濃度 0mM では 90% (145/162)、1mM では 74% (26/35) であり、対照区 HTF 培地に L-カルニチンを 1mM 添加した前培養、受精培地では、98% (129/131) が 2 細胞期胚へ発生し、コントロール区より通常の HTF 培地に L-カルニチンを添加した培地が胚発生の良いことが示された。胚盤胞期胚率はコントロール区では、88% (214/243)、L-カルニチン添加濃度 0mM では 78% (127/162)、1mM では 57% (20/35) であった。さらに HTF 培地に L-カルニチンを 1mM 添加した前培養、受精培地では 92% (121/131) となった。胚盤胞期胚率も 2 細胞期胚率と同様にコントロール区より通常の HTF 培地に L-カルニチンを添加した培地において発生率が良いことが示された。

次に、PVA を 0.1% 添加した前培養培地、受精培地での体外受精成績を表 3 に示した。L-カルニチン添

加濃度 0mM では 25% (96/390)、0.1mM では 25% (91/362)、0.5mM では 30% (77/256)、1mM では 34% (117/347) の受精率が得られた。各区より得られた受精卵の胚発生成績は、L- カルニチン添加濃度 0mM では 93% (88/95)、0.1mM では 96% (87/91)、0.5mM では 96% (74/77)、1mM では 90% (105/117) の受精卵が 2 細胞期胚へ発生し、その後の胚盤胞期胚への発生は、L- カルニチン添加濃度 0mM では 80% (76/95)、0.1mM では 81% (74/91)、0.5mM では 91% (70/77)、1mM では 73% (85/117) となった。

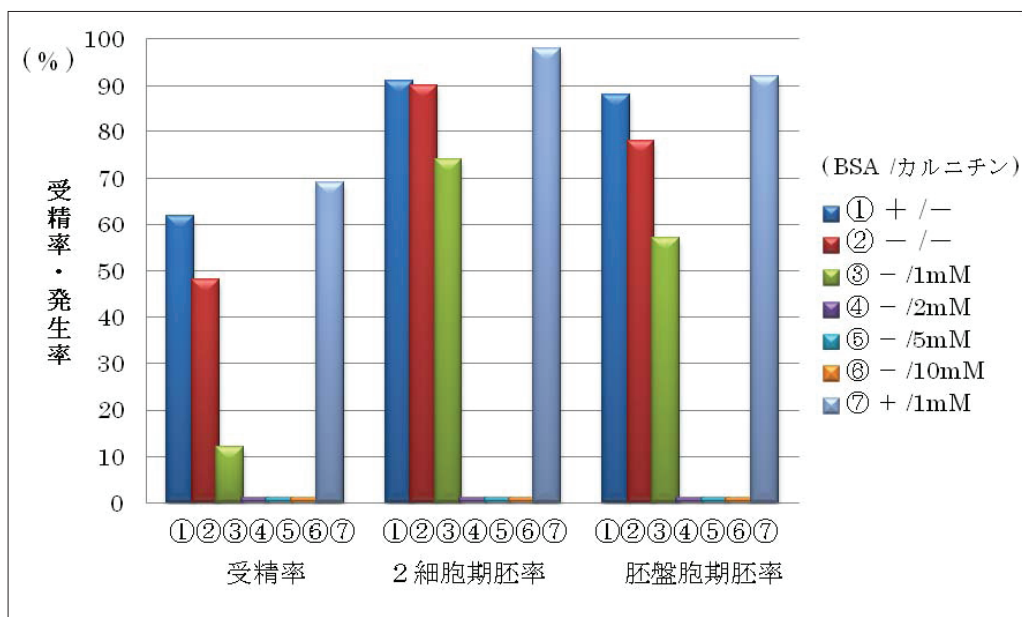


表 2. 各濃度のカルニチンを添加した体外受精および発生成績

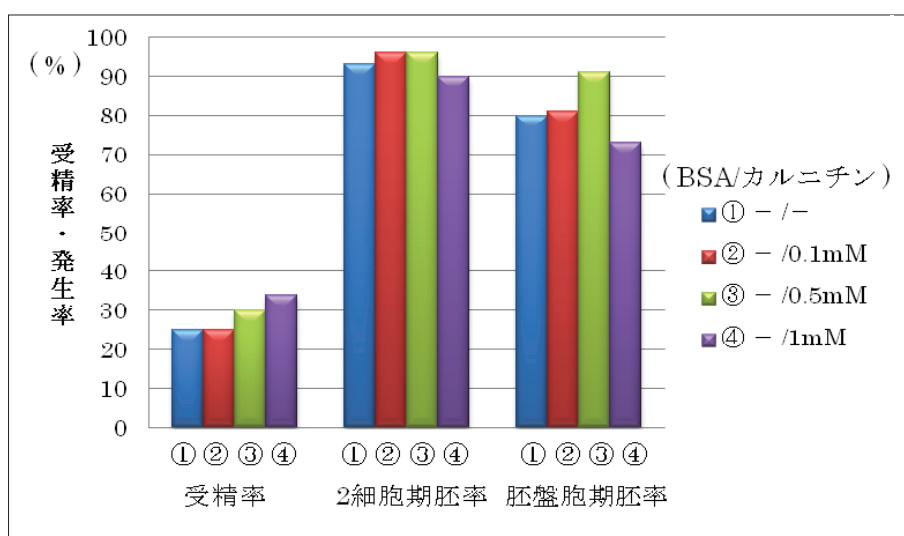


表 3. PVA0.1% 添加し各濃度のカルニチンを添加した体外受精および発生成績

## 考 察

各濃度の L-カルニチンを BSA 非添加培地に添加したときの体外受精の結果より、高濃度での L-カルニチン添加は受精を阻害することが示された。採精後から媒精時にかけて経時的に精子の運動性が失われていたことが原因と考えられ、このことは培地の浸透圧が高くなると精子の生存性、運動性が低下するという報告もされている<sup>19)</sup>。私達も、本実験に使用した L-カルニチン添加培地の浸透圧を測定した結果、164.0～303.7mOsm の範囲であり、mHTF 培地の浸透圧 (295.3mOsm) と比較し L-カルニチン添加による差異が認められた (未発表)。このことより、L-カルニチン濃度が、精子前培養培地の浸透圧の差異におよぼす精子の運動性低下を誘引し、受精を阻害したと考えられた。また、L-カルニチンを供試動物体内に注入した *in vivo* での様々な研究結果では、L-カルニチンの効果が証明されている<sup>15, 16)</sup>。しかし、本研究は体外操作における L-カルニチンの BSA の代替物質としての効果を検討したが、BSA、L-カルニチン共に添加していない培地と L-カルニチンを 1mM 添加した培地の受精成績を比較すると、L-カルニチンを添加した場合、受精率が低くなっていることより L-カルニチンのみでは BSA の代替物質にはならないと示唆された。しかし PVA を 0.1%、L-カルニチン共に添加すると発生率が向上した。さらに今までにも報告されている、PVA を 1% 添加した培地での体外受精においても発生率が維持された。これらは L-カルニチンによる抗酸化作用や、アポトーシスからの細胞保護効果<sup>20)</sup> によるものと思われ、さらに L-カルニチンには、腫瘍壊死因子である TNF- $\alpha$  の誘導抑制作用もあり、初期胚の活性化が維持されると思われる。この TNF- $\alpha$  は、サイトカインの 1 つで単球、マクロファージ、血管内皮細胞、脂肪細胞などから生産され、TNF- $\alpha$  は TNF 受容体を介してミトコンドリアの透過性転換を促進する。ミトコンドリア内膜の透過性亢進により、ミトコンドリアの膜間スペースからシトクロム c が放出されアポトーシスを誘導する。その他の作用においてもミトコンドリア膜の安定化、細胞小器官へのエネルギー供給があり<sup>20)</sup>、卵子および胚での小器官への伝達系譜の改善を誘起していると考えられた。

L-カルニチンと高分子である PVA を共に添加することで代替物質になる可能性があると思われた。これは、L-カルニチンの分子量が 161.2 であるのに対して、BSA の分子量は約 66,000<sup>21)</sup> で高分子物質としての保護効果が不足すると考えられ、高分子物質である PVA の添加が有効に働くと思われる。また今回提示した代替候補の他、カルシウム濃度を高濃度にすることや、PVA 以外の高分子物質であるポリビニルピロリドン<sup>22)</sup> やヒアルロン酸の添加<sup>23)</sup> あるいはそれらの組み合わせ、そして濃度の詳細な検討により、今後、BSA の代替になる合成培地の開発が進むものと思われる。

## 謝 辞

本実験に関して、株式会社紀和実験動物研究所、東雅志氏には、実験動物の飼養と管理に関してアドバイスを賜りました、ここに感謝申し上げます。

## 参 考 文 献

1. 豊田裕, 横山峯介, 星冬四朗. (1971). マウス卵子の体外受精に関する研究 I. 精巣上体精子による受精成績. 家畜繁殖誌. 16:147-151.
2. Whittingham DG. Culture of mouse ova. (1971). J Reprod Fertil Suppl. 14:7-21.
3. J. A. シャープ著, 木村資重利, 加藤淑裕訳. (1981). 動物組織培養. pp10-20.
4. Moriguchi Y., Suzuki H., Togashi M, Adachi J. (1989). Strain differences in the recovery rate of

- embryos and the development after freezing and thawing by vitrification method in mice. *J Mamm Ova Res.* 6:83-84.
- 5 . Suzuki H. Frozen transgenic mice and their transport. (1997). *Kitasato J Vet Med Ani Sci.* 4:47-63.
  - 6 . Brinster RL. (1965). Studies on the development of mouse embryos in vitro. I . The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *J. Exp. Zool.* 158:49-58.
  - 7 . Beckman LS. and Day BN. (1993). Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology.* 39:611-622.
  - 8 . Biggers JD., McGinnis LK. and Raffin M. (2000). Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex potimized medium. *Bio. Reprod.* 63:281-293.
  - 9 . Lane M. and Gardner DK. (1997). Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J. Reprod. Fertil.* 109:153-164.
  10. Borum PR. (1983). Carnitine. *Ann Rev Nutr.* 3:233-259.
  11. Bremer J. (1983). Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev.* 63:1420-1480.
  12. Rebouche CJ. (2004). Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 1033:30-41.
  13. Bremer J. (1962). Carnitine in intermediary metabolism. The metabolism of fatty acid esters of carnitine by mitochondria. *J. Biol. chem.* 237:3628-3623.
  14. Fritz IB., Yue KT. (1964). Effects of carnitine on acetyl-CoA oxidation by heart muscle mitochondria. *Am. J. Physiol.* 206:531-535.
  15. Kanter M., Yeter TT., Parlar S. (2010). Antiapoptotic effect of L-carnitine on testicular irradiation in rats. *J Mol Hist.* 41:121-128.
  16. Yari A., Asadi MH., Bahadoran H., Dashtnavard H., Imai H., Naghii MR. (2010). Cadmium Toxicity in spermatogenesis and Protective Effects of L-carnitine in Adult Male Rats. *Biol Trace Elem Res.* 137:216-225.
  17. Quinn P., Kerin JF., Warnes GM. (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil steril.* 44:493-498.
  18. Takahashi Y., Hishinuma M., Matsui M., Tanaka H., Kanagawa H. (1996). Development of In Vitro Matured/Fertilized Bovine Embryos in a Chemically Defined Medium :Influence of Oxygen Concentration in the Gas Atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.* 58:897-902.
  19. Bavister B D. (1974). The effect of variations in culture conditions on the motility of hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 38:431-440.
  20. Abdelrazik H., Aharma R., Mahfouz R., Agarawal A. (2009). L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil Steril.* 91:859-896.
  21. Andrews P. (1965). The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem J.* 96:595-606.
  22. Hashimoto S., Ohsumi K., Tsuji Y., Harauma N., Miyata Y., Fukuda A., Hosoi Y., Iritani A., Morimoto Y. (2007). Growing porcine oocyte-granulosa cell complexes acquired meiotic competence during in vitro culture. *J Reprod Dev.* 53:379-384.
  23. Friedler S., Schachter M., Strassburger D., Esther K., Ron El R., Raziel A. (2007). A randomized clinical trial comparing recombinant hyaluronan/recombinant albumin versus human tubal fluid for cleavage

---

stage embryo transfer in patients with multiple IVF-embryo transfer failure. Hum Reprod. 22:2444-2448.

## 英文要旨

Study on fertilization and embryo culture in without albumin HTF medium  
from using L-Carnitine.

Kasumi Higashi<sup>1</sup>, Manami Nishimura<sup>2</sup>, Keita Kiga<sup>1</sup>, Takao Nakagawa<sup>3</sup>,  
Tadashi Nagai<sup>4</sup>, Masao Kishi<sup>5</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>1, 2, 6</sup>, Masayuki Anzai<sup>6</sup>

## Abstract

The present study examined in vitro fertilization that used the ICR mouse and the *in vitro* culture of the early embryo. Newly ovulated eggs from mature mouse injected PMSG and hCG were inseminated in vitro with spermatozoa recovered from the cauda epididymidis of mature males. Preculture medium of sperm and fertilization medium added the L-carnitine without bovine serum albumin. Percentage of fertilization were 48% (162/337) at L-carnitine 0mM and 12% (35/294) at L-carnitine 1mM. Following the percentage of blastocyst were 78% (127/162) and 57% (20/35). Next, the same experiment was performed using the medium that added 0.1% PVA of polymeric mass. Results of the fertilization rate were 24% (95/390) at L-carnitine 0mM and 25% (91/362) at L-carnitine 0.1mM and 30% (77/256) at L-carnitine 0.5mM and 34% (117/347) at L-carnitine 1mM. Following the rate of developed to blastocysts stage were 73-95%. When the high density L-carnitine from these results, it was shown not to retard of fertilization. Moreover, L-carnitine was indicated the possibility for a substitute of bovine serum albumin by adding PVA.

---

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

3. Kiwa Laboratory Animal Co, Ltd., Wakayama 640-1473, Japan

4. Nihon Medical & Chemical Instruments Co, Ltd., Komagaya, Habikino, Osaka, 583-0841, Japan

5. Oishi farm, Kinki University, Aridagawa-cho, Arida-gun, Wakayama, 643-0531, Japan

6. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 642-0017, Japan