

# 体外発育培養液への抗酸化剤の添加は 各種哺乳動物の卵母細胞の胚発生能を向上させるか ～受精能及び初期胚の発生能向上を目指して～

内堀 翔<sup>1</sup>、西原卓志<sup>2,3</sup>、松本和也<sup>1,2</sup>

## 要 旨

生殖補助医療（ART）において、体外受精胚移植法の成功率の向上に向けて、低成熟率・低受精率・胚の形態的不良のため移植にまで至らない症例を如何に克服するかが大きな課題となっている。これまで、この課題解決に向けた基礎的研究が報告されており、活性酸素による DNA 損害、脂質過酸化、タンパク質の損傷などの卵子を取り囲む卵巣卵胞内環境の悪化が重要な要因となっていることが明らかとなっている。現在、この卵巣卵胞内環境悪化を軽減する目的で、患者に対する抗酸化剤のサプリメントの服用が試みられている。さらに、それらの抗酸化剤を直接培地に添加する試みも行われており、卵成熟能、受精能及び初期胚の発生能に対して有効性が示されている報告も認められる。そこで本論文では、哺乳動物において体外発育培養液への抗酸化剤の添加が卵母細胞の胚発生能に及ぼす影響を検討している最近の研究動向について概説する。

キーワード：活性酸素（ROS）、抗酸化剤、コエンザイム Q10、メラトニン、レスベラトロール

## 1. 緒 論

現在、不妊症治療として広く行われている生殖補助医療（ART）において、体外受精胚移植法（IVF-ET）の妊娠率は胚移植あたり 26.4%（日本産科婦人科学会 2009）とされている。この妊娠に至らない症例として、形態的に良好な胚を移植しても妊娠に至らない反復不成功例があげられるが、低成熟率・低受精率・形態的な胚の質の不良を如何に克服するかが、ARTにおける大きな課題となっている。これまで、この症例を改善するために様々な基礎的研究が行われており、特に、活性酸素種と女性生殖との関連を調べた研究では、活性酸素などの「酸化剤」とそれを消去する「酸化防止剤」の間のバランスの異常に起因する DNA 損害、脂質過酸化、タンパク質の損傷などが、卵子を取り囲む卵巣卵胞内環境の悪化を招くことが明らかとなっている<sup>(2)(11)</sup>。一般に、細胞は活性酸素種に対して抗酸化作用による防御システムを備えており、非酵素系（低分子抗酸化剤）、酵素系などを中心にして、活性酸素種から細胞を守るシステムが構築されている<sup>(35)</sup>。ARTの臨床現場では、活性酸素種から細胞を守るシステムがうまく機能していないと考えられる症例において、卵巣卵胞内環境の悪化を防ぐ試みとして、抗酸化剤のサプリメントを適用することが行われている。これまで、排卵障害、受精能及び初期胚の発生能低下、卵管障害、子宮内膜症などに起因する酸化ストレス軽減を目的としてコエンザイム Q10（Coenzyme Q10; CoQ10）、レスベラトロール、メラトニン、ビタミン E、ビタミン C などが用いられている<sup>(31)</sup>。また、それらの抗酸化剤を直接培地に添加する試み<sup>(4)(15)(21)</sup>も行われており、その卵成熟能、受精能及び初期胚の発生能に対する有効性

原稿受付 2014年2月28日

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 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 医療法人三賢会 IVF なんばクリニック 培養環境部門, 〒550-0015 大阪市西区南堀江 1-17-28

が示唆されている。

本論文では、哺乳動物の卵母細胞の胚発生能の向上を目的に、体外発育培養液に添加した抗酸化剤が受精後の胚発生に及ぼす影響を調べた最近の研究を概観して、生殖補助医療現場において今後の抗酸化剤の活用の展望について言及する。

## 2. 各抗酸化剤の体外発育培養液への添加の影響

### 2.1 体外発育培地へのコエンザイム Q10 (CoQ10) 添加が胚発生に及ぼす影響の可能性について

最近、多くのヒト疾患の中でミトコンドリア機能低下による疾患の治療において、抗酸化作用やATP産生亢進の両面からミトコンドリア機能を改善する目的で、脂溶性のビタミン様物質でキノン構造を有する補酵素コエンザイム Q10 (CoQ10) が服用されている。この CoQ10 は、細胞内ではミトコンドリアに多く分布し、複合体 I (NADH デヒドロゲナーゼ)、複合体 II (コハク酸デヒドロゲナーゼ) から複合体 III (補酵素 Q-シトクロム c レダクターゼ) の電子授受に関与し、電子伝達系の補酵素として重要な働きを有すると共に、ミトコンドリア呼吸鎖の活性を高め、ATP エネルギーの産生を高める重要な物質である<sup>(6)</sup> (図 1)。

#### Mitochondria

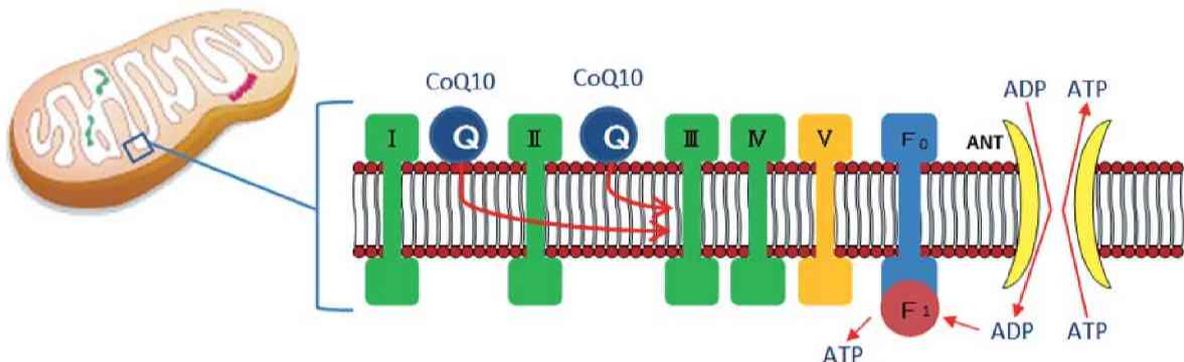


図 1. ミトコンドリアの電子伝達系と ATP 合成における CoQ10 の機能

また、ヒトの生体内で酸化型から還元型に変換されて抗酸化作用を示す CoQ10 は生体内で生合成可能な酵素でもあるが、加齢とともに CoQ10 そのものの体内生産量が低下するとともに、酸化型から還元型への変換力が低下することが明らかになっている<sup>(27)</sup>。これらのことから、ART の臨床現場において、加齢等により卵巣卵胞内の細胞のミトコンドリア機能が低下したと考えられる患者が CoQ10 を服用した場合、血中及び卵胞液中の CoQ10 量の増加によって卵巣卵胞内の細胞のミトコンドリア機能の亢進と卵巣卵胞内環境における酸化ストレスの軽減を導き、その結果獲得される卵子の卵成熟能や受精能及び初期胚の発生能の改善が期待される。

Turi らは、ヒトの卵胞液に存在する CoQ10 と卵の受精・発育と卵胞液中の CoQ10 の濃度との相関について調査し、卵胞液には CoQ10 が存在し卵の成熟や胚の質の向上と相関があったと報告した<sup>(39)</sup>。このことより卵子の成熟、受精の過程で CoQ10 のような抗酸化剤が生殖細胞の機能維持に関わっていることが示唆された。実際に、ウシの卵の培養液への CoQ10 の添加により、フリーラジカルを捕捉することでリポソーム膜の酸化ストレスを軽減させ胚発育の改善がみられたという報告<sup>(34)</sup> もあり、抗酸化と ATP の合成に関わる CoQ10 は、卵子の成熟から胚盤胞形成やその後の Hatching のプロセスに必要な物質である

ことが示唆された。以上のことより、マウスにおいても電子伝達系の必須因子であり抗酸化物質として生体内で重要な物質とされる CoQ10 の体外発育培養液への添加によるマウス卵子の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、酸化ストレスを軽減させエネルギー代謝を賦活させることで卵子の質を改善させることが示唆される。

経口投与の場合は初めから還元型の CoQ10 を服用することにより、そのまま小腸で吸収され変換される必要なく体内で CoQ10 の機能を発揮できることが明らかにされているが（図 2）、体外発育培養液への還元型 CoQ10 の添加による卵子の質の改善を目的とした研究は行われていない。現在、我々は、高純度還元型 CoQ10 をマウス卵子の体外発育培養液へ添加することで、還元型 CoQ10 の卵子に対する安全性、卵成熟能、受精能及び初期胚の発生能を確認するとともに、最終的にはヒト卵子への応用を見据えた検討を行っている。

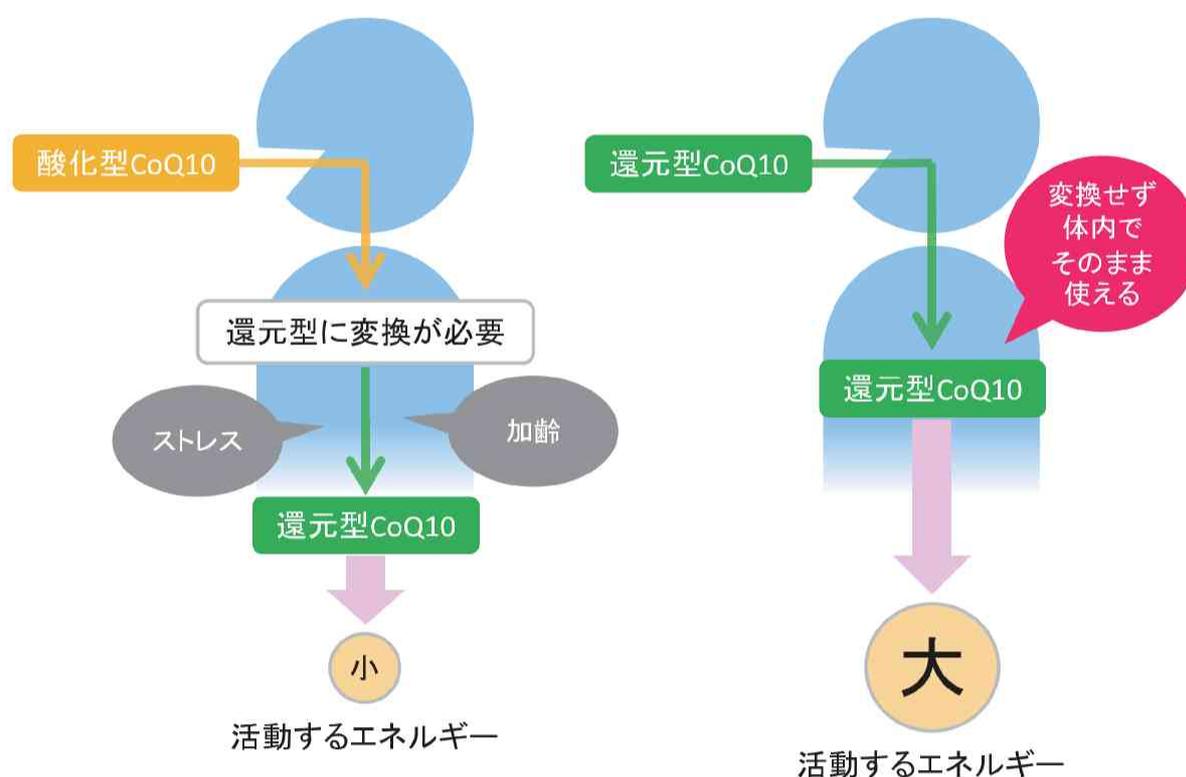


図 2. 酸化型 CoQ10 と還元型 CoQ10 が体内で発揮するエネルギー量の違い

## 2.2 体外発生培地へのメラトニン添加が胚発生に及ぼす影響について

メラトニン (N-acetyl-5-methoxytryptamine) は脳の松果体から分泌されるホルモンの 1 つで、抗酸化作用を有することが明らかとなっている。活性酸素だけではなく、一酸化窒素や過酸化脂質など様々なフリーラジカルも消去することができ、アルツハイマー病やパーキンソン病の予防効果も期待されている。また、メラトニンは直接フリーラジカルを消去した場合でも、自身が酸化されても安定で他の物質を酸化することではなく、さらにグルタチオンペルオキシダーゼなどの酵素系抗酸化剤の活性を高める効果も報告されている<sup>(29)</sup> (図 3)。このような多方面の抗酸化作用によって、細胞内のタンパク質、核内の DNA、ミトコンドリアなどのダメージを防ぐことができると考えられている。

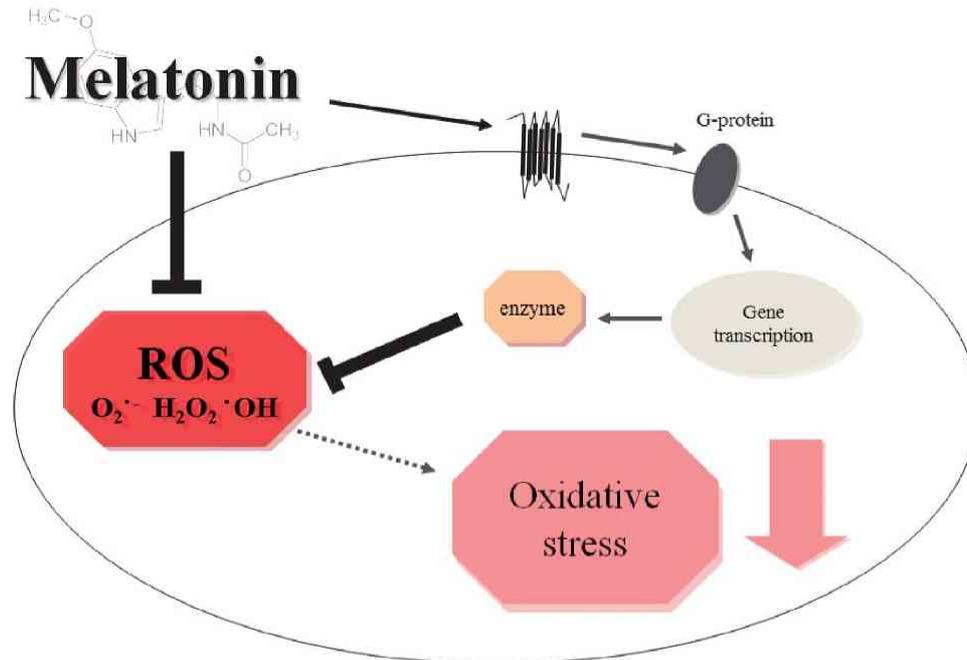


図3. 細胞内におけるメラトニンの抗酸化作用

メラトニンの服用により卵巣内における酸化ストレスを低下させ卵の質を向上させることは、臨床系の論文でも示されている。Nishihara らは、低受精率群でのメラトニンの服用前と服用後の受精率が 35.1% から 68.2% にまで上昇し、また胚移植が可能な胚の割合も服用前の 48.0% から 65.6% に改善され、結果として胚の利用率が向上したと報告している<sup>(24)</sup>。これは、メラトニンの服用による抗酸化作用が卵胞液中の活性酸素を減少させ、胚質不良例に対して卵子の質を改善させることを示唆している。また、排卵前の卵胞液には血清よりも高濃度でメラトニンが存在すること<sup>(7)</sup> や、顆粒膜細胞のレセプターを通じて卵巣の機能を調節している可能性も示唆されており<sup>(37) (38) (42)</sup>、メラトニンの生理作用が睡眠に関わる本来の働きではなく、女性生殖の生理作用に関わっていることが示唆されている。

培養液へのメラトニンの添加は、ヒト以外の哺乳動物卵子で成熟が促進されたという報告がある<sup>(17) (30)</sup>。また Kim らは、卵胞液には高濃度のメラトニンが存在し、顆粒膜細胞から分泌されていることも証明している<sup>(19)</sup>。卵胞液中の顆粒膜細胞を回収し培養することで、培養液中のメラトニン濃度が上昇し、顆粒膜細胞存在下でメラトニンが合成されていることが証明され、メラトニンの前駆体であるトリプトファン存在下で acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT) や aralkylamine N-acetyltransferase (AANAT) などのメラトニン合成のための酵素の発現が促進されていることから顆粒膜細胞によってメラトニンが合成されていることが証明された。このことから、体外成熟培養 (IVM) の際にメラトニン分泌が不十分であると、卵子の細胞質成熟に影響し核成熟との不調和による胚発生の低下が懸念され、特に IVM は通常の IVF よりも早い時期から卵子を体外に出すため、培養液へのメラトニンの添加が成熟率の向上をもたらす可能性が示唆された。実際に妊娠率・着床率の上昇もみられたことは、メラトニンが IVM 中の卵の細胞質成熟とその後の胚発育が促進したことを示唆している。

### 2.3 体外発生培地へのレスベラトロール添加が胚発生に及ぼす影響について

レスベラトロールはポリフェノールに含まれている化合物で<sup>(40)</sup>、ピーナッツ<sup>(41)</sup>、桑の実<sup>(33)</sup>、ココア<sup>(14)</sup>、イタドリ<sup>(9)</sup>などの食品に含まれており、特にブドウ<sup>(16)</sup>や赤ワイン<sup>(5)</sup>に含まれている抗酸化物

質である。レスベラトロールの生物学的重要性は、頻繁に研究されている。マウスやラットなどを用いた研究では、寿命延長<sup>(13)</sup>、抗癌<sup>(16)</sup>、抗糖尿病<sup>(26)</sup>、循環器系<sup>(36)</sup>、認知症予防<sup>(18)</sup>においてレスベラトロールが効果を持つということが明らかになっている。しかし、レスベラトロールの生物学的メカニズムについては、十分に明らかにされていない。これまでの研究でレスベラトロールはSIRT1を活性化させ、ミトコンドリア機能を保護するということが示唆されている<sup>(3)</sup>。レスベラトロールのウシの卵子成熟におよぼす効果とそのメカニズムを調べた研究においては、プロゲステロンの分泌が有意に増加し、エストラジオール-17 $\beta$ の分泌が有意に低下した。一方、成熟卵子における細胞内の活性酸素(Reactive oxygen species; ROS)レベルを有意に低下させ、グルタチオンのレベルが増加した<sup>(40)</sup>。細胞内においてグルタチオンは主な抗酸化剤の一つで、酸化還元ホメオスタシスの維持、ペルオキシドの除去、生体異物を解毒するなど中心的役割を果たしている<sup>(12)</sup>。またレスベラトロールはSIRT1の活性化物質、Sir2(silent information regulator 2)の哺乳類相同体として知られており<sup>(20)</sup>、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD<sup>+</sup>)依存性クラスIIIヒストン脱アセチル酵素として機能している<sup>(23)</sup>。SIRT1遺伝子は、顆粒膜細胞、卵丘細胞、胚盤胞において発現が確認された<sup>(40)</sup>。また、Priceらは、レスベラトロールがAMP活性化タンパク質キナーゼを刺激し、ミトコンドリア機能を向上するためには、in vivo、in vitro両状態においてSIRT1の活性化が不可欠であると示唆している<sup>(28)</sup>。動物モデルにおいてレスベラトロールで処理することで、SIRT1の発現パターンが反転する<sup>(32)</sup>。これらの結果から、レスベラトロールは、SIRT1の活性化を介することで卵子成熟、IVF後の胚発生においてその効果を及ぼすことが示唆された。

#### 2.4 体外発生培地へのビタミンCおよびビタミンE添加が胚発生に及ぼす影響について

脂溶性ビタミンの一種であるビタミンEはトコフェロールとも呼ばれ、特にD- $\alpha$ -トコフェロールは自然界に広く普遍的に存在し<sup>(1)</sup>、生殖細胞の脂質過酸化を軽減させる抗酸化物質として働くと考えられている<sup>(22)</sup>。フリーラジカルを消失させることにより、ラジカルとなったビタミンEはビタミンCなどの抗酸化物質によりビタミンEに再生されることが分かっている<sup>(8)</sup>。また、水溶性ビタミンであるビタミンCも強い還元能力を有し、スーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、ヒドロキシラジカル( $\cdot$ OH)、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)などの活性酸素類を、グルタチオン-アスコルビン酸回路によって消去することが明らかとなっている<sup>(25)</sup>。

体外発生培地へ添加したビタミンEやビタミンCの成熟、胚発育への影響を調査する目的で研究が行われており、Dalvitらは、体外成熟(IVM)における成熟、体外受精における胚発育への影響を調査する目的で、ビタミンC、ビタミンE、またはその両方を体外発生培地に添加し発生との関連を調査している<sup>(10)</sup>。卵丘・卵母細胞複合体中のビタミンEの濃度は、ビタミンCを添加することで高濃度に保たれることが分かったが、IVMにおける卵成熟は改善されなかった。また、胚盤胞到達率も、ビタミンC、ビタミンEの両方を添加した群で有意に到達率が低下している。これは、ROSがDNA損傷、脂質過酸化、タンパク質の損傷などを引き起こす一方で、生殖細胞において一定の生理作用を有していることが示唆される。

### 3. 体外発育培養液へ添加した各抗酸化剤が胚発生に及ぼす影響の分子的作用機序解明への展望

これまでに述べた現在までの知見より、体外発育培養液への抗酸化剤の添加により、各抗酸化剤が細胞内のタンパク質、核内のDNA、ミトコンドリアなどの酸化によるダメージを防ぐことによって初期胚発生における培養状態を改善させることで、細胞質成熟とその後の胚発育が促進されることが示唆された。ただし、どの抗酸化剤を用いるにしても、胚の発育不良が本当に酸化ストレスによる悪影響の結果なのか、卵子、胚内の酸化ストレスが各抗酸化剤によって軽減されているか、指標を用いて検討を行う必要があると考えられる。

サプリメントの服用は種類によっては、毎日数回を連日服用しなければならず、その費用も問題となってくる。もし、培養液への添加によって胚の質が改善されるのであれば、費用やサプリメント服用のコンプライアンスの問題も解消できると考えられる。また、経口投与と培養液の添加を合わせることで、より高い効果が得られることも考えられる。今後は、卵胞液中の抗酸化剤の活性やプロテオーム解析を進め、その結果から得られた知見と結びつけることで、培養液へ添加した抗酸化剤が胚発生に及ぼす影響の分子機構解明の切り口になることが期待される。

#### 参考文献

1. 平原文子 (1994) ビタミン E と抗酸化性, 栄養学雑誌, 52, 205-206
2. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 28
3. Alcáin FJ, Villalba JM. (2009) Sirtuin activators. *Expert Opin Ther Pat.*, 19, 403-414
4. Asgari Z, Ghasemian F, Ramezani M, Bahadori MH. (2012) The effect of melatonin on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos. *Cell J.*, 14, 203-208
5. Baur JA, Sinclair DA. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.*, 5, 493-506
6. Bentov Y, Casper RF. (2013) The aging oocyte—can mitochondrial function be improved? *Fertil Steril.*, 99, 18-22
7. Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng MH, Wurtman RJ. (1987) Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.*, 64, 865-867
8. Benzie IF, Chung WY, Strain JJ. (1999) “Antioxidant” (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *J. Nutr. Biochem.*, 10, 146-150
9. Chen H, Tuck T, Ji X, Zhou X, Kelly G, Cuerrier A, Zhang J. (2013) Quality assessment of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) grown on Prince Edward Island as a source of resveratrol. *J Agric Food Chem.*, 61, 6383-6392
10. Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P. (2005) Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Domest Anim.*, 40, 93-97
11. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. (2005) Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol.*, 3, 43
12. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 45, 51-88
13. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kistelewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.*, 425, 191-196
14. Hurst WJ, Glinski JA, Miller KB, Apgar J, Davey MH, Stuart DA. (2008) Survey of the trans-resveratrol and trans-piceid content of cocoa-containing and chocolate products. *J Agric Food Chem.*, 56, 8374-8378
15. Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh MT. (2000) The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *J Pineal Res.*, 28, 48-51
16. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Farnsworth NR, Kinghorn

- AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220
17. Kang JT, Koo OJ, Kwon DK, Park SJ, Atikuzzaman M, Gomez N, Jang G, Lee BC. (2009) Effects of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. *Reprod Fertil and Dev.*, 22, 327-328
  18. Kennedy DO, Wightman EL, Reay JL, Lietz G, Okello EJ, Wilde A, Haskell CF. (2010) Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Am J Clin Nutr.*, 91, 1590-1597
  19. Kim MK, Park EA, Kim HJ, Choi WY, Cho JH, Lee WS, Cha KY, Kim YS, Lee DR, Yoon TK. (2013) Does supplementation of in-vitro culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS? *Reprod Biomed Online*, 26, 22-29
  20. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell*, 127, 1109-1122
  21. Lee K, Wang C, Chaille JM, Machaty Z. (2010) Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *J Reprod Dev.*, 56, 330-335
  22. Lu C, Liu Y. (2002) Interaction of lipoic acid radical cations with vitamins C and E analogue and hydroxycinnamic acid derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.*, 406, 78-84
  23. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 450, 712-716
  24. Nishihara T, Hashimoto S, Ito K, Nakaoka Y, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. (2014) Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Gynecol Endocrinol*, in press
  25. Noctor G, Foyer CH. (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49, 249-279
  26. Palsamy P, Subramanian S. (2008) Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomed Pharmacother.*, 62, 598-605
  27. Parihar MS, Kunz EA, Brewer GJ. (2008) Age-related decreases in NAD (P) H and glutathione cause redox declines before ATP loss during glutamate treatment of hippocampal neurons. *J Neurosci Res.*, 86, 2339-2352
  28. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.*, 15, 675-690
  29. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.*, 36, 1-9
  30. Shi JM, Tian XZ, Zhou GB, Wang L, Gao C, Zhu SE, Zeng SM, Tian JH, Liu G. (2009) Melatonin exists

- in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *J Pineal Res.*, 47, 318-323
31. Showell MG, Brown J, Clarke J, Hart RJ. (2013) Antioxidants for female subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.*, 8, CD007807
  32. Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. (2010) Resveratrol (trans-3,5,40-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther.*, 332, 829-839
  33. Stewart JR, Arttime MC, O'Brian CA. (2003) Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J Nutr.*, 133, 2440S-2443S
  34. Stojkovic M, Westesen K, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Boxhammer K, Wolf E. (1999) Coenzyme Q (10) in submicron-sized dispersion improves development, hatching, cell proliferation, and adenosine triphosphate content of in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod.*, 2, 541-547
  35. Sugino N. (2005) Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reprod Med and Biol.*, 4, 31-44
  36. Szmitko PE, Verma S. (2005) Red wine and your heart. *Circulation*, 111, e10-11
  37. Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ. (2009) Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril.*, 92, 328-343
  38. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Aasada H, Yamagata Y, Sugino N (2013) The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *Endocr J.*, 60, 1-13
  39. Turi A, Giannubilo SR, Brugè F, Principi F, Battistoni S, Santoni F, Tranquilli AL, Littarru G, Tiano L. (2012) Coenzyme Q10 content in follicular fluid and its relationship with oocyte fertilization and embryo grading. *Arch Gynecol Obstet.*, 4, 1173-1176
  40. Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji P, Li Y, Tan D, Liu G. (2014) Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.*, 101, 577-586
  41. Wang KH, Lai YH, Chang JC, Ko TF, Shyu SL, Chiou RY. (2005) Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable. *J Agric Food Chem.*, 53, 242-246
  42. Yie SM, Niles LP, Younglai EV. (1995) Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. *J Clin Endocrinol Metab.*, 80, 1747-1749

Addition of antioxidants to culture medium improves  
oocyte and embryo quality in mammals?

Sho Uchibori<sup>1</sup>, Takuji Nishihara<sup>2,3</sup> and Kazuya Matsumoto<sup>1,2</sup>

**Abstract**

Assisted reproductive technologies are widely accepted procedures for the treatment of infertility. Unfortunately, the success rate of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) still remains limited to 30–40% due to developmental and fertilization failures and morphological abnormalities. Some studies have indicated that oxidative stress may be a cause of poor oocyte and embryo qualities. Reactive oxygen species (ROS) have been linked to DNA damage, lipid peroxidation, and protein damage leading to deterioration of ovarian reserve. Recent studies have demonstrated the potential benefit of oral supplementation of antioxidant for patients with fertilization difficulty and/or poor embryo quality. This article provides an overview of research conducted on the effectiveness of adding the antioxidants directly to culture medium.

Key words: Reactive oxygen species (ROS), Antioxidant, Coenzyme Q 10, Melatonin, Resveratrol

---

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

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

3. IVF Namba clinic, Osaka 550-0015, Japan

