

## L-カルニチン添加体外成熟培地が マウス卵子細胞質内活性酸素種に与える影響

井上 達也<sup>1</sup>、東 里 香<sup>2</sup>、野田 義博<sup>3</sup>、  
西村 愛美<sup>4</sup>、梶本 みずき<sup>1</sup>、小橋 朱里<sup>1</sup>、  
折杉 卓哉<sup>1</sup>、細井 美彦<sup>1,2,5</sup>、安齋 政幸<sup>5</sup>

### 要 旨

本研究では、私たちが以前報告した、修正 TaM 培地へ L-カルニチンを添加した体外成熟培地を用いたマウス未成熟卵子への体外成熟培養をおこない、卵子細胞質内で産生される活性酸素種に与える影響を検討した。修正 TaM 培地へ L-カルニチンをそれぞれ 1mM, 2mM, 5mM, 10mM 添加し体外成熟培養をおこなった結果、82~98%が正常な MII 期卵子へと発生した。次に、各 L-カルニチン添加区において、正常に発生した体外成熟卵子は、卵子細胞質内における活性酸素種の産生を蛍光輝度より測定した。その結果、活性酸素種の産生は、それぞれ  $353.61 \pm 15.34 \sim 415.62 \pm 25.82$  pixel の蛍光強度を発しており、全ての L-カルニチン添加区は、非添加区 ( $581.82 \pm 43.33$  pixel) と比較し過剰な活性酸素種の産生を抑制することが示された。

キーワード：マウス、未成熟卵子、体外成熟、L-カルニチン、活性酸素種

### 1. 緒 論

近年、生殖補助医療を目的とした様々な生殖工学技術の普及により、その技術向上の観点から卵子における代謝や発生機構における研究の重要性が高まっている。山田らは、卵子の発生過程において、内在性酸化ストレスがミトコンドリア機能を低下させることで質的障害を起こすことを示している<sup>(1)</sup>。この要因の一つとして、卵子細胞質内で産生過剰となった活性酸素種がタンパク質や脂質などの細胞組織を酸化的に修飾し、卵子への生理機能に異常をもたらしている<sup>(2)</sup>。また、卵巣内卵子あるいは排卵される卵子内における活性酸素種の産生は、加齢と共に増加することにより、その後の細胞質へのミトコンドリア機能低下あるいはそのエネルギー供給の枯渇化が進行する<sup>(3)</sup>。Miki らは、卵巣内から得られる排卵前の未成熟卵子を用いた体外成熟操作へ複数の培地を混合することにより、ミトコンドリア分布の正常性が保持することを示した<sup>(4)</sup>。我々も卵巣内卵子の有効利用を目的として、成熟齢に達した ICR 系マウス卵巣から GV 期卵子を回収し、修正 TaM 培地へ L-カルニチンを添加した体外成熟培地で培養したところ、胚盤胞期胚への発生成績の改善と正常な産子への発生を認めた<sup>(5)</sup>。これらの結果は、添加した L-カルニチンが活性酸素種の酸化的修飾を抑制し、胚盤胞期胚の細胞数を減少させている TNF- $\alpha$  のアポトーシス誘導を抑制していると考えられた<sup>(6,7)</sup>。しかし、活性酸素種による影響は、体内における LH サージによって惹起される排卵前のシグナルにおいて、活性酸素種の卵巣内産生が必要不可欠であることから<sup>(8)</sup>、体外成熟操作において卵子細胞質内の活性酸素種量の調整が必要であることが考えられる。

原稿受付 2016年2月15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. (地独) 東京都健康長寿医療センター研究所 実験動物施設 〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2
4. 関西医科大学付属生命研究所 〒573-1010 大阪府枚方市新町 2-5-1
5. 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

本実験では、L-カルニチン添加体外成熟培地を用いて、成熟齢に達した雌マウスから回収した未成熟卵子の体外成熟培養をおこない、卵子細胞質内で産生される活性酸素種に与える影響を検討した。

## 2. 材料および方法

### (1) 供試動物

本実験に関する供する実験動物の飼養と管理および動物実験の立案や苦痛度の管理は、近畿大学動物実験規定に基づき実施された。

供試動物として、成熟齢に達した ICR 雌マウス (株) 紀和実験動物研究所) を用いた。マウスは、清浄度のある飼育室へ搬入後、12.5 時間照明下において 1 週間以上順化した後 (明期: 7:00-19:30、暗期: 19:30-7:00)、実験に供試した。飼育環境は、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50% 管理下における空調システムにおいて、飼料 (CRF1R: オリエンタル酵母工業 (株)) を不断給餌とし、飲料水は自由摂取させた。

### (2) 体外成熟培地の調整

体外成熟培地の調整は、Miki らが開発した  $\alpha$ MEM 培地および TYH 培地をそれぞれ等量ずつ混合した TaM 培地<sup>(4)</sup> を基本として、5% FBS を添加した修正 TaM (mTaM) 培地を用いた<sup>(9)</sup>。次に、L-カルニチン (ロンザジャパン (株)) の添加は、松浦ら<sup>(5)</sup> の方法に準じておこなった。すなわち、調整した mTaM 培地へ、それぞれ、1mM, 2mM, 5mM, 10mM となるように L-カルニチンを添加した。調整された各体外成熟培地は、炭酸ガスインキュベーター内 ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  in air) で平衡されたものを使用した。

### (3) 体外成熟操作

成熟齢に達した ICR 雌マウスに、血清性性腺刺激ホルモン (セロトロピン: あすか製薬 (株)) を 7.5 単位となるように、腹腔内投与した。血清性性腺刺激ホルモン投与 46 時間後、卵巣を摘出し、mCZB-HEPES 培地へ 0.1% Hyaluronidase (SIGMA) を添加した採卵用培地内で卵巣を細切することにより、未成熟卵子 (以下、GV 期卵子) を回収した。得られた GV 期卵子は、同培地内においてキャピラリーによるピペッティング操作により卵丘細胞を除去した後、各濃度に調整した L-カルニチンを添加した mTaM 培地内に移し、炭酸ガスインキュベーター内 ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  in air) で 16 時間体外成熟培養をおこなった。体外成熟操作後、回収した卵子は、卵核胞崩壊および第一極体の放出を指標にし、形態学的に正常に発生した MII 期卵子を確認した<sup>(10)</sup>。正常に発生したそれぞれの卵子は、新鮮な各濃度に調整された L-カルニチン添加 mTaM 培地内へ移し、活性酸素種の検出操作に供試するまで培養した。

### (4) 活性酸素種の検出

活性酸素種の検出は、Noda ら<sup>(11)</sup> の方法を修正しておこなった。活性酸素種の検出には、CM-H2DCFDA (C6827: Molecular Probes) を用いた。CM-H2DCFDA (以下、DCFDA) は、DMSO を用いて 1mM となるように溶解した。次に、調整した 1mM DCFDA を mKSOM 培地内に  $1\mu\text{M}$  となるように添加した。この培地内へ L-カルニチンを添加した各体外成熟培地で正常に発生した MII 期卵子を直ちに移し、炭酸ガスインキュベーター内 ( $37.0^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  in air) で 10 分間培養した。その後、MII 期卵子を mKSOM 培地内で洗浄し、ガラスチャンバー上に  $5\mu\text{L}$  滴下した mKSOM 培地ドロップ内に各卵子を移し、蛍光顕微鏡下 (Leica: DMI 6000B) にて MII 期卵子細胞質内に産生した活性酸素種を可視化した。さらに、蛍光検出された活性酸素種の産生量は、LAS-AF ソフトウェア (Leica) を用いて蛍光輝度 (Pixel) を測定することにより求めた。

### (5) 統計学的解析

本実験操作における全ての統計学的処理は、Stat View-J 5.0 ソフトウェアにより、各実験区について分散分析値を求めた後、Fisher の PLSD により有意差の検定をおこなった。なお、統計学的な有意差の表値については、5%水準以下とした。

## 3. 結 果

各濃度の L-カルニチンを添加した mTaM 体外成熟培地による ICR マウスの未成熟卵子を用いた体外成熟成績を表 1 に示した。各濃度の L-カルニチン添加体外成熟培地を用いた卵核胞崩壊率は、それぞれ 87～98%であり、非添加区 (91% : 41/45) と比較し有意な差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。また、体外成熟率は、それぞれ、82～98%が形態学的に正常な MII 期卵子へと成熟することを確認した。また、L-カルニチン非添加区において MII 期へ発生した体外成熟卵子 89% (40/45) と比較して、有意な差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

表 1. L-カルニチン添加体外成熟培地における体外成熟成績

添加濃度	GV 期卵子数	卵核胞崩壊数 (%)	MI I 期卵子発生数 (%)
0mM (非添加)	45	41 (91)	40 (89)
1mM	45	39 (87)	37 (82)
2mM	45	42 (93)	41 (91)
5mM	45	44 (98)	44 (98)
10mM	45	44 (98)	42 (93)
n = 3			P > 0.05

表 2 には、各 L-カルニチン添加 mTaM 培地において発生した体外成熟卵子を用いて、卵子細胞質内活性酸素種の産生を DCFDA により検出した。L-カルニチン添加区のそれぞれは、1mM では 409.62 pixel の平均輝度であり、2mM では、415.62 pixel、5mM では、353.61 pixel、10mM では、357.92 pixel の平均輝度を示した。いずれの L-カルニチン添加においても、非添加区 (581.82 pixel) と比較し、卵子細胞質内活性酸素種の産生を有意に抑制した。

表 2. L-カルニチン添加体外成熟培地における卵子細胞質内活性酸素種の蛍光輝度成績

添加濃度	0mM (非添加)	1mM	2mM	5mM	10mM
平均輝度	581.82 ± 43.33 <sup>a</sup>	409.62 ± 24.00 <sup>b</sup>	415.62 ± 25.82 <sup>b</sup>	353.61 ± 15.34 <sup>b</sup>	357.92 ± 11.54 <sup>b</sup>
n = 3					
単位: pixel Mean ± SEM 異文字間で有意差有り (P < 0.05)					

図1には、過剰排卵処置で得られた排卵卵子と比較した場合における卵子細胞質内活性酸素種の産生比較値を示した。5mM (353.61 pixel) および 10mM (357.92 pixel) L-カルニチン添加区において、排卵卵子 (481.72 pixel) と比較して、有意な差が認められた ( $P < 0.05$ )。

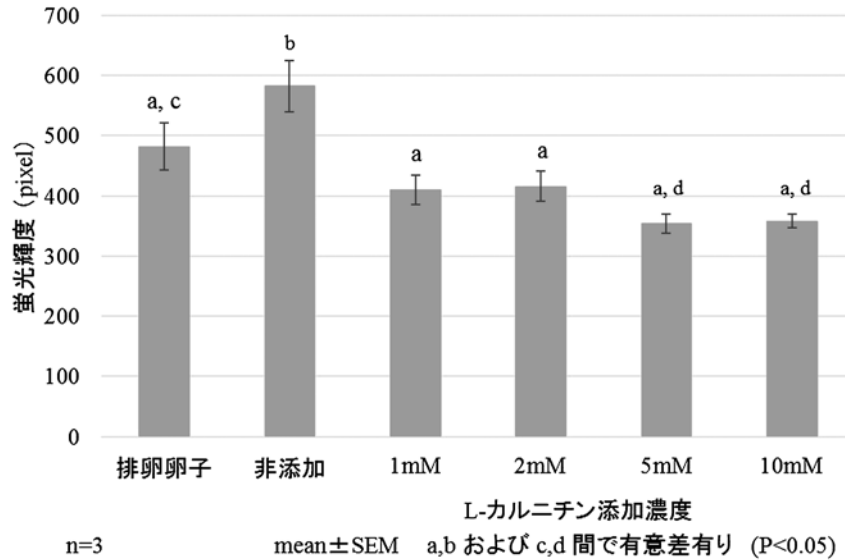


図1. L-カルニチン添加体外成熟培地における卵子細胞質内活性酸素種への影響

#### 4. 考 察

排卵過程は、結果的に卵丘細胞によって囲まれている成熟卵子の放出を引き起こす下垂体における黄体形成ホルモン (LH) の中間期サージによって惹起される<sup>(12)</sup>。活性酸素種の産生は、マクロファージ・好中球のような炎症性細胞に起源をもち、ラット卵巣では、排卵前における卵胞において LH サージが誘起される前に、マクロファージや好中球が著しく増加することが示されており<sup>(13)</sup>、それらの枯渇は排卵に障害を起こす要因となる<sup>(14, 15)</sup>。しかし、体外操作および培養等において蓄積した活性酸素種は、ミトコンドリア NAD<sup>+</sup>を枯渇する Mitochondrial permeability transition pore を通じてミトコンドリア機能不全を誘引する<sup>(16)</sup>。一方、初期胚のエネルギー代謝は、発生段階に応じて変化してピルビン酸代謝や 8 細胞期以降のグルコース代謝が ATP 産生源となっており、ATP レベルの低下が卵子の質や発生能を低下させる。同様に体外成熟由来卵子においても初期発生は、体内成熟卵子と比較して低率である<sup>(17, 18)</sup>。本来、体内で成熟する卵子は LH サージ後すぐに、減数分裂を再開し卵核胞崩壊、染色体凝集そして第一極体放出がおこり、来るべき受精・胚発育に備えるが、体外で成熟する卵子では、この過程において LH サージの影響を受けていないところに違いがある。卵子は LH 受容体を発現していないため、卵巣体細胞に作用し、そこから産生される局在因子がパラクライン作用により、卵子の機能を調整していると考えられている<sup>(19)</sup>。近年、LH 刺激により顆粒膜細胞と莖膜細胞から insulin-like 3 が産生され、卵核胞崩壊を促進させることが明らかとなった<sup>(20)</sup>。また、第一減数分裂終了時まで、受精および胚発育能に細胞質の成熟が重要とされているが、これは初期卵胞の発育に必須である Brain-derived neurotrophic factor がパラクライン因子として卵子に作用し、第一減数分裂と細胞質の成熟を誘導することが明らかにされている<sup>(21)</sup>。体外成熟卵子における初期胚発生は、体内成熟卵子と比較して低率を示す。これは、体外成熟卵子における核成熟が、形態学的観点より受精および初期発生を引き起こすために十分な状態であるにもかかわらず、

活性酸素種の過剰産生が要因となっている細胞質成熟の不十分さが指摘されている<sup>(22)</sup>。これらから、体外成熟卵子は、LH サージを受ける時に蓄積する体内成熟卵子内活性酸素種量より、体外成熟培養中に蓄積される活性酸素種量が大きいため、初期胚発生が低率であると考えられる。

体内成熟卵子内における活性酸素種量は、LH サージにおけるパラクライン因子によるもので調整されていると考えられるが、本実験における L-カルニチンが卵子細胞質内の活性酸素種量を抑制した要因として、脱アセチル化酵素である Sirtuin ファミリーに属する SIRT3<sup>(23)</sup> が関係していると考えられる。Sirt3 は、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の制御に加え、ミトコンドリアマトリクスに局在する抗酸化酵素 Mn-SOD (Sod2) などの抗酸化機能持つ因子の機能調節を介して活性酸素種の消去機構に働くことが知られており<sup>(17)</sup>、さらに、受精後の現象に移行した時、母性由来の SIRT3 は体外受精と培養中において酸化ストレス状況に対し、初期胚の保護における重要なタンパク質として明らかにされている<sup>(24)</sup>。この SIRT3 は、ステロイド産生の代謝と還元状態の保護として働いており<sup>(25)</sup>、炎症に関連する排卵時の LH を引き起こすシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) はステロイド産生細胞におけるオキシゲナーゼ反応の副産物である活性酸素種を産生することから<sup>(26, 27)</sup>、細胞質内の活性酸素種量を適正值に調整する機構を担っていることが考えられる。また、Sirt3 の発現は骨格筋において、アセチル-L-カルニチン添加により上昇することが認められている<sup>(27)</sup>。これは、グルコースや脂肪酸の分解によって産生されたミトコンドリア内のアセチル-CoA が、カルニチンアセチルトランスフェラーゼ (CAT) の作用により、L-カルニチンと結合してアセチル-L-カルニチンとしてミトコンドリア外の細胞質に輸送され、核に移行し、アセチル-L-カルニチンが、L-カルニチンとアセチル-CoA に分解され、アセチル-CoA はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) の作用によってヒストンをアセチル化したものと考えられる<sup>(28)</sup>。さらに、この過程における L-カルニチンとアセチル-CoA への分解に、脱アセチル化酵素である SIRT3 が働き、分解されたアセチル-CoA のヒストンアセチル化が SOD-2 などの抗酸化因子を活性化させたと推測される。これらから本実験において、体外成熟培地への L-カルニチン添加は、Sirt3 の発現を上昇させ、抗酸化因子を活性化させることにより、活性酸素種量を抑制したと思われた。

## 5. 結 論

本研究では、L-カルニチンを添加した体外成熟培地におけるマウス未成熟卵子の体外成熟培養を行い、正常に発生した MII 期卵子内の活性酸素種量を検討した。その結果、L-カルニチンを 1-10mM 添加した場合、体外成熟過程における卵子細胞質内活性酸素種の過剰な産生を抑制した。さらに、2mM L-カルニチン添加においては、排卵卵子に近い卵細胞質内活性酸素種の産生であった。これらの結果から、体内成熟卵子内の活性酸素種量への調整を目的とした体外成熟培地の確立が必要であることが示唆された。

## 6. 謝 辞

本実験に関して、適切なご助言を賜りました (株) 紀和実験動物研究所 中川隆生先生に感謝申し上げます。

## 7. 参考文献

1. 山田 (福永) 朝子、浜谷 敏生、山田 満稔、久慈 直昭、吉村 泰典 (2013) マウス加齢卵におけるテロメア長の解析. 日本生殖内分泌学会雑誌 18, 5-10.
2. Baughman, J.M., Mootha, V.K. (2006) Buffering mitochondrial DNA variation. *Nat.Genet.* 38, 1232-1233.
3. T, Hamatani, G, Falco, M G. Carter., H, Akutsu., C A. Stagg., A A. Sharov., D B. Dudekula., V, VanBuren., Minoru, S.H. (2004) Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human Molecular Genetics* 13, 2263-2278.
4. Miki, H., Ogonuki, M., Inoue, K., Baba, T., Ogura, A. (2006) Improvement of Cumulus-free Oocyte Maturation In Vitro and Its Application to Microinsemination with Primary Spermatocytes in mice. *J.Reprod. Dev.* 52, 239-248.
5. 松浦悟、西村愛美、石東祐太、杉本奈央、中家雅隆、東雅志、三谷匡、細井美彦、安齋政幸 (2012) L-カルニチン添加体外成熟培地がマウス未成熟卵子由来初期胚の発生に与える影響. 近畿大学先端技術総合研究所紀要 17, 9-16.
6. Somfai, T., Kaneda, M., Akagi, S., Akagi, A., Watanabe, S., Haraguchi, S., Mizutani, E., Dang-Nguyen TQ., Geshi, M., Kikushi, K., Nagai, T. (2011) Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Rerod Fertil Dev.* 23, 912-920.
7. Abdelrazik, H., Aharma, R., Mahfouz, R., Agarwal, A. (2009) L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil.Steril.* 91, 859-896.
8. Shkolnik K1., Tadmor A., Ben-Dor S., Nevo N., Galiani D., Dekel N. (2011) Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25, 1462-1467.
9. Ishizuka, Y., Nishimura, M., Matsumoto, K., Miyashita, M., Takeo, T., Nakagata, N., Hosoi, Y., Anzai, M. (2013) The influence of reduced glutathione fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes. *Theriogenology* 80, 421-426.
10. 西村愛美、大本夏未、西山有依、柳美穂、三谷匡、細井美彦、入谷明、安齋政幸 (2010) C57BL/6 系未成熟卵子を用いた成熟後におけるレーザー穿孔処理・体外受精方法の検討. 近畿大学先端技術総合研究所紀要 15, 7-35.
11. Noda, Y., Ota, K., Shirasawa, T., Shimizu, T. (2012) Copper/zinc superoxide dismutase insufficiency impairs progesterone secretion and fertility in female mice. *Biol. Reprod.* 86, 1-8.
12. Russell, DL., Robker, RL. (2007) Molecular mechanisms of ovulation: Co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update.* 13, 289-312.
13. Brännström, M., Mayrhofer, G., Robertson, SA. (1993) Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. *Biol Reprod.* 48, 277-286.
14. Van der Hoek KH., Maddocks, S., Woodhouse, CM., van Rooijin N., Robertson, SA., Norman, RJ. (2000) Intrabursal injection of clodronate liposomes causes macrophage depletion and inhibits ovulation in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 62, 1059-1066.
15. Brännström, M., Bonello, N., Norman, RJ., Robertson, SA. (1995) Reduction of ovulation rate in the rat by administration of a neutrophil-depleting monoclonal antibody. *J Reprod Immunol.* 29, 265-270.

16. Di Lisa F., Menabo, R., Canton, M., Barile, M., Bernardi, P. (2001) Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic  $\text{NAD}^+$  and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem.* 276, 2571–2575.
17. 河村悠美子、栗原裕基 (2012) 初期胚における脱アセチル化酵素を介したミトコンドリア機能調節の意義. *J.Mamm.Ova Res.* 29, 161–169.
18. T, Takahashi., H, Igarashi., J, Kawagoe., M, Amita., S, Hara., H, Kurachi. (2009) Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro in associated with impaired calcium homeostasis. *Bio Rirod.* 80, 493–502.
19. Kawamura, K., Kumagai, J., Sudo, S., Chun, SY., Pisarska, M., Morita, H., Toppari, J., Fu P., Wade JD., Bathgate, RA., Hsueh, AJ. (2004) Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 7323–7328.
20. Park, JY., Su, YQ., Ariga, M., Law, E., Jin, SL., Conti, M. (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science.* 303, 682–684.
21. 河村和弘、河村七美、Aaron JW Hsueh、田中俊誠 (2006) 卵巣由来 Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) による卵成熟機構の解明. *日本生殖内分泌学会雑誌* 11, 39–42.
22. Carrie, L., Bivens, M., Grondahl, C., Murray, A., Blume, T., Su, Y., Eppig, J. (2004) Meiosis-Activating Sterol Promotes the Metaphase I to Metaphase II Transition and Preimplantation Developmental Competence of Mouse Oocytes Maturing in vitro. *Biol. Reprod.* 70, 1458–1464.
23. Zhang, L., Han, L., Ma, R., Hou, X., Yu, Y., Sun, S., Xu, Y., Schesl, T., Molvey, KH., Wang, Q. (2015) Sirt3 prevents maternal obesity-associated oxidative stress and meiotic defects in mouse oocytes. *Cell cycle.* 14, 2959–2968.
24. C, Tatone., G Di Emidio., M, Vitti., M Di Carlo., S, Santini, Jr., A M D'Alessandro., S, Falone., F, Amicarelli. (2015) Sirtuin Functions in Female Fertility: Possible Role in Oxidative Stress and Aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2015, 659–687.
25. Baud, L., Ardaillou, R. (1986) Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *Am J Physiol.* 251, 765–776.
26. Hanukoglu, I. (2006) Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev.* 38, 171–196.
27. D, Macconi., L, Perico., L, Longaretti., M, Morigi., P, Cassis., S, Buelli., N, Perico., G, Remuzzi., A, Benigni. (2015) Sirtuin3 Dysfunction Is the Key Determinant of Skeletal Muscle Insulin Resistance by Angiotensin II. *PLoS One* 10, e0127172.
28. Madiraju, P., Pande, SV., Prentki, M., Madiraju, SR. (2009) Mitochondrial acetylcarnitine provides acetyl groups for nuclear histone acetylation. *Epigenetics.* 16, 399–403.

## 英文抄録

Effect of *in vitro* maturation medium containing L-carnitine on reactive oxygen species in immature oocytes

Tatsuya Inoue<sup>1</sup>, Rika Azuma<sup>2</sup>, Yoshihiro Noda<sup>3</sup>, Manami Nishimura<sup>4</sup>, Mizuki Kajimoto<sup>1</sup>, Akari Obashi<sup>1</sup>, Takuya Orisugi<sup>1</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>1,2,5</sup>, Masayuki Anzai<sup>5</sup>

## Abstract

In this study, we investigated the effect of L-carnitine in IVM medium (modified TaM; mTaM) on the production of reactive oxygen species (ROS) in ooplasm during *in vitro* maturation (IVM) of immature oocytes. IVM culture in mTaM containing 1-10 mM L-carnitine showed well maturation rate ranged from 82% to 98%. Then, MII oocytes normally developed in mTaM containing L-carnitine were measured the yield of ROS in ooplasm by oxidized DCFDA detection assay with a fluorescence microscope. As a result, fluorescence intensity of L-carnitine-treated groups ranged from 353.61 to 415.62 pixels in comparison to 581.82 pixels in L-carnitine-free control experiment. Furthermore, *in vitro* matured oocytes treated with L-carnitine showed lower fluorescence intensity than ovulated oocytes. In conclusion, it can be considered that L-carnitine in IVM medium reduces an excessive yield of ROS in ooplasm in *in vitro* maturation of immature oocytes.

Key Word: mouse, immature oocytes, *in vitro* maturation, L-carnitine, reactive oxygen species

---

1. Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

3. Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

4. Institute of Biomedical Science, Kansai Medical University, 2-5-1 Shinmachi, Hirakata, Osaka 573-1010, Japan

5. Institute of Advanced Technology, Kindai University, 14-1 Minamiakasaka, Kainan, Wakayama 642-0017, Japan