

ブタ体外成熟卵母細胞のガラス化保存におけるラクトフェリンの効果

根岸 真奈美¹・石川 禎将¹・平賀 孔¹・杉村 智史²・原 健士朗¹・種村 健太郎^{1*}

¹ 東北大学大学院農学研究科

宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1 〒981-8555

² 東京農工大学大学院農学研究科

東京都府中市幸町 3-5-8 〒183-8509

2015 年 11 月 16 日受付, 2016 年 2 月 25 日受理

要 約

畜産分野において、未受精卵のガラス化保存は、遺伝資源の保存や生産効率の向上に貢献することができる。しかし、ブタ成熟卵母細胞は低温暴露により透明帯や細胞膜、紡錘体等に傷害を受けることが報告されており、それら低温傷害の一因として低温暴露による酸化ストレスの増大が疑われている。これまでに、我々は、母乳に含まれる鉄結合性糖タンパク質であるラクトフェリン (LF) を体外成熟培地に添加することで、ブタ卵母細胞の酸化ストレスを軽減し、核成熟率を向上させることに成功している。

本研究では、LF がブタ体外成熟卵母細胞のガラス化保存の成績改善に有効であるか検討する為、LF 添加による低温傷害の軽減を試みた。

ブタ未成熟卵母細胞を体外成熟培養した後、得られた成熟卵母細胞をガラス化保存した。これを融解後、①実体顕微鏡下で、細胞膜・透明帯を観察・評価した。また、②染色体および紡錘糸を免疫組織化学により可視化後、それぞれの形態的正常性を評価した。

実験の結果、① LF 添加区で、非添加区と比較して、細胞膜・透明帯の正常率の有意な向上 ($p<0.05$) が観察された。一方、②染色体および紡錘糸の正常率は、非添加区と比較して LF 添加による有意な差はいずれも認められなかった。本研究により、LF がブタ体外成熟卵母細胞のガラス化保存において、細胞膜・透明帯の保護に効果的であることが示され、将来的なブタの優良遺伝資源の保存や生産効率向上へ貢献が期待された。

キーワード：ガラス化保存、体外成熟、ブタ、ラクトフェリン、卵母細胞

東北畜産学会報 66(1): 7～15 2016

緒 言

生殖細胞や受精卵を超低温下で凍結保存もしくはガラス化保存する技術は、優良形質をもつ家畜資源の有効活用や希少動物の遺伝子保存に有効である。1949 年に Polge らによって、グリセリンの凍害保護作用が報告

されて以降、生殖細胞や受精卵の超低温保存技術に関する研究が多々報告されてきた。現在、こうした超低温保存には、主に緩慢凍結法とガラス化保存法が用いられている。緩慢凍結法は、凝固点よりやや高い温度の植氷処理で潜熱による急激な温度変化を防ぎ、凍害保護物質とともに緩慢に (0.3～2.0℃/分) 冷却していくことにより、致命傷となりうる細胞内氷晶形成を抑制する方法で、1972 年に Whittingham らが初めて凍結・融解後のマウス胚から産仔の作製に成功させた。一方、ガラス化保存法は、高濃度の凍害保護物質を用い、直接液体窒素に浸

* 連絡者：種村健太郎 (たねむら けんたろう)
(東北大学大学院農学研究科)
〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1
Tel 022-717-8686 Fax 022-717-8685
E-mail: kentaro@m.tohoku.ac.jp

漬した際の急激な温度下降により氷晶形成を防ぐことができるため、短時間での操作が可能となる方法であり、1985年にRallとFahyにより初めてマウス胚の保存が報告された。ガラス化保存法は、緩慢凍結法と比較して、氷晶形成による細胞の損傷を排除できるという大きな利点がある(Kuwayama, 2007)。

こうした超低温保存技術を用いて細胞の代謝を完全に停止させて体外で半永久的に保存できれば、胚移植や体外受精などにおいて適時にこれらを融解して利用することが可能となり、家畜や実験動物などの系統維持に要する労力、費用、場所を大幅に軽減でき、家畜生産や育種改良の効率化、さらには経済的効果が期待できる。特に、一個体あたりの数が雄性配偶子に比較して極端に少ない哺乳類の雌性配偶子において、体外でその機能を保持したまま長期保存することが可能であれば、優良遺伝資源保存の点でも家畜生産に大きな利益をもたらす。また、未受精卵の長期保存は、保存・融解後に雌雄の組み合わせを選択でき、育種改良の多様化が期待できる。

近年の超低温保存技術の発展により、ブタでは、すでにガラス化保存をした初期胚から子豚を得ることに成功している(Nagashimaら, 2007)。しかし、未受精卵に関しては、ガラス化保存後に高い生存率を得ることに成功しているものの、透明帯や細胞骨格、ミトコンドリア機能、抗酸化能等の異常が見られ、低温傷害の軽減について未だ改善の余地が残されている(Somfaiら, 2012)。

ラクトフェリン(Lactoferrin: LF)は、哺乳類の母乳に高濃度で含まれる鉄結合性の糖タンパク質である。抗酸化物質の一つとされ、キレート反応により、生体内で過剰になった遊離の鉄イオンを取り除き、ヒドロキシラジカルの産生を抑制することで抗酸化作用を示すことが知られている(Gutteridgeら, 1981)。また、ブタ卵母細胞が脂肪滴として大量に含んでいるトリグリセリドが脂肪酸とグリセロールに分解される過程において、脂肪分解酵素リパーゼの働きを阻害するペリリピンタンパクの遺伝子発現を低下させることで、脂質代謝を促進すると考えられている(Onoら, 2013)。我々の研究室では、ラクトフェリンをブタ卵母細胞の体外成熟培地に添加することで酸化ストレスを軽減し、核成熟率を向上させることに成功している(Ishikawaら, 2014)。

そこで、本研究では、ブタ卵母細胞に焦点を当て、その質の向上について効果が報告されているラクトフェリンが、ガラス化保存に対して有効であるかを検討することを目的とし、体外成熟培養(*in vitro* maturation; IVM)を行ったブタ卵母細胞をガラス化保存し、ラクトフェリンの添加による低温傷害への影響を解析した。その際、評価の指標として、1. 細胞膜・透明帯の正常性、2.

紡錘体の正常性を解析した。

材料および方法

1. ブタ未成熟卵母細胞の採取

仙台市中央卸売市場食肉市場で採取したブタ卵巣を、38.5℃に保持しながら2時間以内に研究室へ運搬した。18ゲージ注射針付10mlシリンジ(テルモ)を用いて、直径3~6mmの胞状卵胞の内容物を吸引し、卵丘細胞-卵母細胞複合体(cumulus-oocyte complexes: COCs)を含む細胞懸濁液を採取した。同液を、15ml遠沈管(日本ジェネティクス)に移し、38.5℃で10分間静置後、上清(卵胞液)を除去して得た沈殿物を0.1%(w/v)ポリビニルアルコール(PVA、シグマアルドリッチ)を添加したリン酸緩衝生理食塩水(PBS、ナカライテスク)(PBS-PVA)で3回洗浄し、希釈懸濁液を得た。同液を、94mmペトリ皿(グライナー)に移し、38.5℃に維持しながら、実体顕微鏡(SZX16、オリンパス)下で、卵母細胞の周囲に複数層の卵丘細胞が付着したCOCsを選抜した。

2. 未成熟卵母細胞の体外成熟培養

(*in vitro* maturation: IVM)

未成熟卵母細胞の体外成熟培養は、Yazakiら(2013)の方法に一部修正を加えた培養法で行った。

20 μ M β -メルカプトエタノール(シグマアルドリッチ)、0.09mg/ml L-システイン(シグマアルドリッチ)、0.5%(w/v)インスリン(Gibco-BRL)、10%(v/v)ブタ卵胞液、10 IU/ml eCG(セロトロピン、あすか製薬)、10 IU/ml hCG(プベローゲン、日本全薬工業)、1 mM dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP、シグマアルドリッチ)を含むウシ血清アルブミン(BSA)不含のNCSU-23成熟培地(PettersとWells, 1993)で22時間、さらに同培地からeCG、hCGおよびdbcAMPを除いた培地で22時間培養した。全ての成熟培地は、流動パラフィン(ナカライテスク)で覆い、38.5℃の湿潤したインキュベーター内で培養した(95%空気、5%CO₂)。培養後のCOCsを、0.1%(w/v)ヒアルロニダーゼ(シグマアルドリッチ)を添加したPBI培地(Quinnら, 1982)に移した後、ボルテックスミキサーを用いて3分間攪拌し、COCsから卵丘細胞を剥離した裸化卵母細胞を得た。同卵母細胞を、PBS-PVAで洗浄後、実体顕微鏡(SZX16、オリンパス)下で極体を放出している第2減数分裂中期の成熟卵母細胞を選別し、以後の実験に供した。

3. 成熟卵母細胞のガラス化保存および融解

ガラス化保存は、Hiroseら(2013)の方法に修正を加

えたクライオトップ法で行った。

成熟卵母細胞を、15% (v/v) エチレングリコール (EG、ナカライテスク) および 20% (v/v) ウシ胎子血清 (FBS、ジェミニバイオ) 添加 PB1 溶液で、室温にて 5 分間平衡後、30% (v/v) EG、20%FBS、0.5mol/l スクロース (和光純薬) 添加 PB1 溶液 (ガラス化液) へ移し、少量のガラス化液とともに支持体のクライオトップ (北里バイオファルマ) の先端へと載せ、液体窒素へ投入した。卵母細胞をガラス化液へと移し液体窒素へ投入するまでの時間は、1 分以内とした。

融解については、液体窒素中で 3 日以上保存した卵母細胞を 38.5℃ に加温した 20% (v/v) FBS および 1.0mol/l スクロース添加 PB1 溶液にクライオトップごと 1 分間浸した後、20% (v/v) FBS および 0.5mol/l スクロース添加 PB1 溶液で 38.5℃ にて 3 分間、さらに 20% (v/v) FBS 添加 PB1 溶液で 5 分間洗浄した。

4. 免疫組織化学による染色体と紡錘糸の観察

卵母細胞を、0.2% (v/v) TritonX-100 (和光純薬) および 4% (w/v) パラフォルムアルデヒド (シグマアルドリッチ) 添加 PBS-PVA で室温にて 90 分間固定した後、PBS-PVA で 3 回洗浄した。固定した卵母細胞を、1% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA、シグマアルドリッチ) 添加 PBS-PVA (BSA-PBS-PVA) に 10% (v/v) FBS を添加したブロッキング液で室温にて 45 分間処理後、ブロッキング溶液で 1/200 倍に希釈した抗 α -Tubulin 抗体 (シグマアルドリッチ) で 4℃ にて一晚処理した。さらに、BSA-PBS-PVA で 3 回洗浄した後、BSA-PBS-PVA で 1/50 倍に希釈した Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (サーモフィッシュサイエンティフィック) で室温にて 40 分間処理した。最後に、0.1% TritonX-100 添加 BSA-PBS-PVA で 3 回洗浄後、10 μ g/ml propidium iodide (PI、和光純薬) で室温にて 60 分間、核染色を施した。染色した卵母細胞は、BSA-PBS-PVA で 3 回洗浄した後、少量の BSA-PBS-PVA とともにスライドガラ

ス上に移し、カバーガラスを被せて封入した。卵母細胞の染色体および紡錘糸の形態は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710、Zeiss) を用いて観察した。

5. 実験計画

実験 1：IVM およびガラス化保存・融解処理過程におけるラクトフェリン添加が融解後の細胞膜・透明帯の形態的正常性に及ぼす影響

細胞膜・透明帯の損傷は、正常な受精・発生阻害を誘発すると考えられている (Carroll ら, 1990) ことから、ガラス化保存・融解後のブタ体外成熟卵母細胞の細胞膜・透明帯の形態的正常性に対するラクトフェリン処理の効果を明らかにすることを目的とし、以下の 2 つの処理区を設け実験を行った (図 1)。

1. 非添加区 (対照区): 体外成熟培地、ガラス化前処理、融解処理で用いるいずれの培地にも、ラクトフェリンを添加しなかった。
2. ラクトフェリン添加区: 体外成熟培養、ガラス化前処理、融解処理で用いる全溶液に、終濃度 1.0 μ g/ml となるようにラクトフェリン (和光純薬) を添加した。

ラクトフェリンの添加濃度は、Yazaki ら (2013)、Ishikawa ら (2014) 報告を参考に設定した。いずれの処理区も、ラクトフェリン添加の有無以外は同じ方法・手順で体外成熟培養、ガラス化前処理、液体窒素への浸漬、融解処理を施した後、実体顕微鏡下で卵母細胞の細胞膜と透明帯の形態を観察した。

細胞膜および透明帯の表面が滑らかで細胞内容物の細胞外への漏出が認められない卵母細胞を正常 (図 2 A)、そして正常卵母細胞と判断されなかった卵母細胞 (例えば、細胞膜が破損し細胞内容物が卵母腔に漏出した卵母細胞 (図 2 B) や、細胞膜と透明帯が破損し細胞内容物が透明帯外に漏出した卵母細胞 (図 2 C) など) を異常と判定し、2 つの処理区それぞれにおいて形態的正常率を算出した。

実験 2：IVM およびガラス化保存・融解処理過程におけ

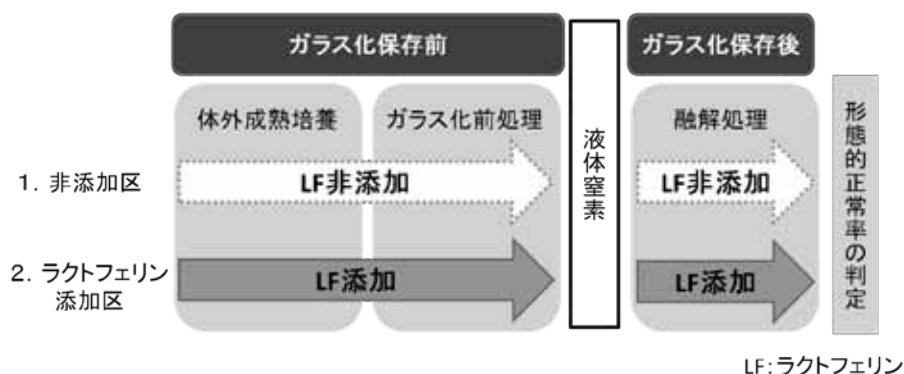


図 1 実験 1 および 2 の処理区の概要

るラクトフェリン添加が融解後の紡錘体の正常性に及ぼす影響

ブタ体外成熟卵母細胞のガラス化保存・融解後には、紡錘体の傷害が頻繁に観察される (Smith と Silva E Silva, 2004 ; Galeati ら, 2011) が、将来的に産仔を得るためには、紡錘体の保護が必要である。そこで、本実験では、ガラス化保存・融解後のブタ体外成熟卵母細胞の紡錘体保護におけるラクトフェリン処理の効果を解明することを目的とし、実験1と同様に、以下の2つの処理区を設け実験を行った (図1)。

1. 非添加区(対照区): 体外成熟培地、ガラス化前処理、融解処理で用いるいずれの培地にも、ラクトフェリンを添加しなかった。

2. ラクトフェリン添加区: 体外成熟培養、ガラス化前処理、融解処理で用いる全溶液に、終濃度 $1.0 \mu\text{g/ml}$ となるようにラクトフェリンを添加した。

いずれの処理区も、ラクトフェリンの添加の有無以外は同じ方法・手順で体外成熟培養、ガラス化前処理、液

体室素への浸漬、融解処理を施した後、共焦点レーザー顕微鏡で染色体と紡錘糸の形態をそれぞれ観察した。

核は、染色体が細胞内の1か所に集合し、かつ、染色体どうしが接し凝縮が認められない卵母細胞を染色体正常 (図3 A,B)、そして染色体正常卵母細胞と判断されなかった卵母細胞 (例えば、染色体が細胞内に散在している卵母細胞 (図3 C)、密に凝縮している卵母細胞 (図3 D) など) を染色体異常と判定し、2つの処理区それぞれの染色体正常率を算出した (図3 E)。

紡錘糸は、2つの紡錘体極から染色体に向かって伸び、染色体をその赤道面に留めて紡錘形をしている卵母細胞を紡錘糸正常 (図3 A)、そして、紡錘糸正常卵母細胞と判断されなかった卵母細胞 (例えば、多極紡錘体を形成している卵母細胞 (図3 B)、染色体を赤道面に留めていない卵母細胞 (図3 C)、紡錘糸の数が明らかに少ない卵母細胞 (図3 D) など) を紡錘糸異常と判定し、2つの処理区それぞれの紡錘糸正常率を算出した。

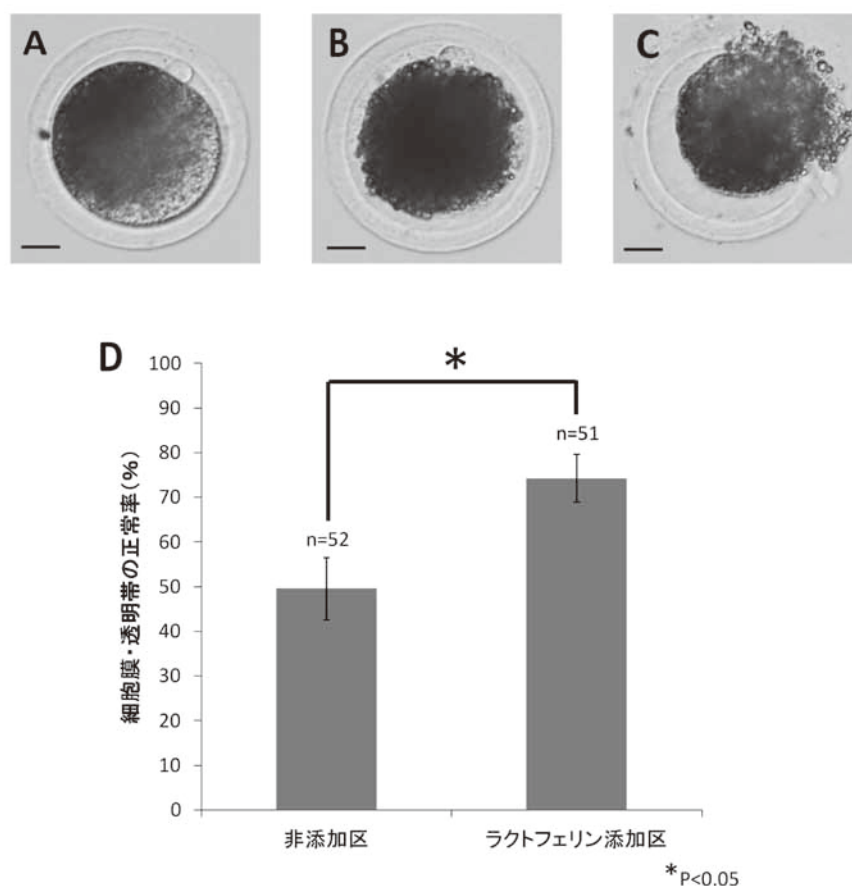


図2 ラクトフェリン添加によるガラス化保存・融解後のブタ成熟卵母細胞の細胞膜・透明帯の形態的正常性への影響

(A) 形態的正常卵母細胞の一例。細胞膜および透明帯の表面が滑らかであり、かつ明瞭な囲卵腔が観察できる。(B) 異常卵母細胞の一例。細胞膜が破れ、細胞質が囲卵腔に漏出している。(C) 異常卵母細胞の一例。透明帯が破れ、細胞質が透明帯外に漏出している。(A) から (C) において、黒線は $25 \mu\text{m}$ を示す。(D) 各処理区におけるガラス化・融解後の細胞膜・透明帯の形態的正常率。アスタリスクは有意差 ($p < 0.05$) を示す。n は、検討した卵母細胞の総数を示す。

6. 統計解析

全てのデータは、分散分析によって有意差が認められたものについて、最小有意差法を用いて平均値の差の検定を行った。なお、 $p < 0.05$ の場合のみ有意性があると判断した。

結 果

実験1：IVM およびガラス化保存・融解処理過程におけるラクトフェリン添加が融解後の細胞膜・透明帯の形態的正常性に及ぼす影響

卵母細胞の細胞膜および透明帯の形態的正常率について、非添加区(平均 $\pm$ 標準誤差: $49.53 \pm 6.99\%$)と比べて、ラクトフェリン添加区 ($74.20 \pm 5.34\%$) では有意な向上が認められた(図2D)。

実験2：IVM およびガラス化保存・融解処理過程におけるラクトフェリン添加が融解後の紡錘体の正常性に及ぼす影響

卵母細胞の染色体の形態的正常率について、非添加区(平均 $\pm$ 標準誤差: $67.96 \pm 4.15\%$)とラクトフェリン添

加区 ($63.35 \pm 4.30\%$) 間で有意な差は認められなかった(図3E)。同様に、紡錘系の形態的正常率も非添加区($33.37 \pm 8.41\%$)とラクトフェリン添加区 ($23.17 \pm 8.28\%$) の間に有意な差は認められなかった(図3F)。

考 察

卵母細胞の長期保存は、生物多様性の保護と遺伝資源の管理に重要な応用技術であり、畜産でのその活用が期待されていることから、ブタにおけるガラス化保存技術もさらなる改良が求められている。しかし、一般に、ブタ卵母細胞は極端に低温感受性が高いことが知られており、他の家畜と比較して、超低温下での細胞機能の停止を経て正常に受精・発生する割合が少ないことが報告されている(Kohaya ら, 2011; Hirose ら, 2013; Chankitisakul ら, 2013)。このため、ガラス化保存後に受精・発生へとステップを進めることができる有効数を少しでも多く確保することが重要であり、常温に戻した際の機能回復を高め、正常な形態や機能を保持した卵母細胞を得ることが求められている。

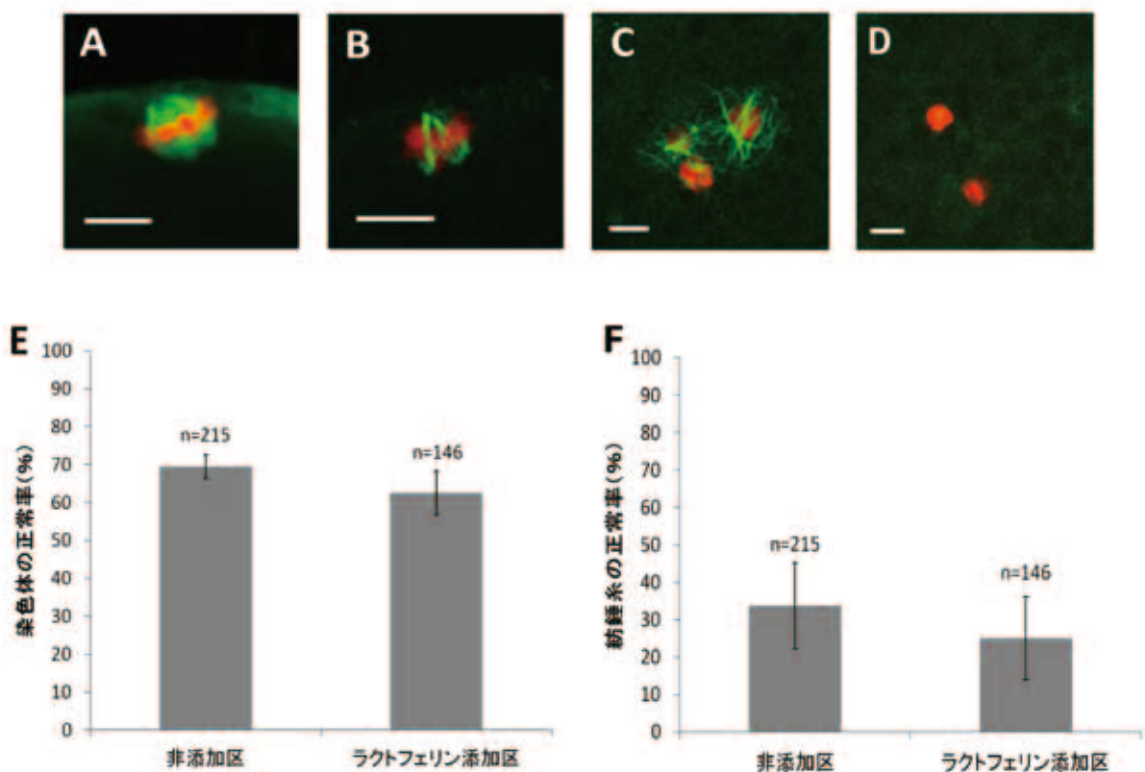


図3 ラクトフェリン添加によるガラス化保存・融解後のブタ成熟卵母細胞の染色体および紡錘系の形態的正常性への影響

(A) 形態的正常卵母細胞の一例。樽型の紡錘体が形成されており、染色体がその赤道面に整列している。(B) 異常卵母細胞の一例。多極紡錘体を形成している。(C) 異常卵母細胞の一例。紡錘糸が散在しており、紡錘体極の形成が認められない。(D) 異常卵母細胞の一例。染色体が凝縮している。また、紡錘糸の形成が認められない。(A) から (D) において、染色体 (PI) は赤色、紡錘糸 (α -チューブリン) は緑色で示す。(E) 各処理区におけるガラス化・融解後の染色体の形態的正常率。(F) 各処理区におけるガラス化・融解後の紡錘系の形態的正常率。n は、検討した卵母細胞の総数を示す。

細胞膜・透明帯損傷と紡錘体形成異常は、正常な受精・発生を阻害すると考えられている (Carroll ら, 1990 ; Galeati ら, 2011)。細胞膜は、細胞の形態を保つ役割のほか、外部環境との境界として、選択的透過性により細胞内部の恒常性の保持、受容体を介しての細胞外からのシグナル受容など、細胞にとって重要な役割を担っている。そのため、細胞膜を正常に維持することは、細胞の存命に欠かすことが出来ない。また、透明帯は受精後の多精子侵入を防ぐ役割を担っており、特にブタのように多精子受精が問題となっている種では、ガラス化保存を経た後も卵母細胞の透明帯の形態や機能を保持することは重要である (Wassarman, 1990 ; Smith と Silva E Silva, 2004)。さらに、正常な受精・発生には、減数分裂時の正常な染色体分配が必要であり、卵母細胞の紡錘体の形成異常は異常な染色体分配を引き起こし、第二極体の正常な放出を妨げるため致命的である (Smith と Silva E Silva, 2004)。こうした理由から、ガラス化保存に供した卵母細胞を用いて将来的に胚や子の作出を成功させるためには、紡錘体を正常に形成する機能を保持または回復させることが求められる。

そこで、我々は、ブタ体外成熟卵母細胞のガラス化保存のさらなる成績向上に向けた第一段階として、細胞膜・透明帯および紡錘体における低温傷害の軽減を目指し、本研究においてラクトフェリンがこれら低温傷害に与える影響について解析した。

本研究では、過去の報告と同様に、ブタ卵母細胞は液体窒素によるガラス化保存・融解によって細胞表面 (透明帯の破損 Dhali ら, 2000 ; Smith と Silva E Silva, 2004)・内部 (紡錘体形異常 Galeati ら, 2011) とともに明らかな傷害を受けた。しかし、実験 1 の結果から、ラクトフェリンにはガラス化保存時の透明帯や細胞膜に生じる傷害を軽減する効果があることが示唆された。

ブタ卵母細胞がガラス化保存により傷害を受ける要因のひとつとして、酸化ストレスが考えられ、2002 年には Ahn らが、凍結保存をしたマウス二細胞期胚において細胞内の H_2O_2 レベルの上昇とそれによる発生障害の誘導を報告している。さらに、ブタ成熟卵母細胞においても、ガラス化保存・融解後には活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の活性化レベルが上昇することが報告されている。(Gupta ら, 2010)。ROS の蓄積は、 Ca^{2+} の増加の一因となることが報告されており (Ermak と Davies, 2002 ; Takahashi ら, 2003)、ガラス化保存時には、 Ca^{2+} の増加による透明帯硬化とそれに伴う受精・発生率の低下が報告されている (Larman ら, 2006)。このことから、ガラス化保存時の低温暴露における ROS の増加が透明帯の硬化の一因となり脆弱化・損傷を引き起こし

たことが推察される。また、ROS は、脂質、特に、細胞膜のリン脂質を酸化し破壊することから (Slater, 1984)、ガラス化保存においても細胞膜損傷の一因となったと考えられる。ブタ卵母細胞や胚は、他の動物種と比較しても脂肪滴として脂質をかなり多く含んでいる (McEvoy ら, 2000) ことが知られており、ROS の一種である H_2O_2 は、脂質を標的として脂質過酸化を引き起こす (Gutteridge, 1995 ; Takahashi ら, 2003)。この脂質過酸化は重篤な酸化ストレスの一つである。つまり、ブタ卵母細胞は、ROS の標的となる脂質を多く含むことから、酸化ストレスの影響を受けやすいことが推察される。

脂肪滴や酸化ストレスとガラス化保存との関連は、これまでも報告されており、物理的な脂肪滴除去がブタ胚 (Nagashima ら, 1994 ; Nagashima ら, 2007) や成熟卵母細胞 (Ren ら, 2015) のガラス化保存後の生存率と発生率を改善するのに効果的であることが明らかとなっている。また、脂質代謝促進作用や抗酸化作用をもつ化学物質の添加によるガラス化保存の改善も行われており、2006 年には、Men らが脂質代謝を促進するフォルスコリンの使用により、ブタ胚の低温傷害が改善されたと報告しているほか、脂質代謝促進作用や抗酸化作用のある L-カルニチン (Somfai ら, 2011) がウシ体外成熟卵母細胞のガラス化保存において、その後の発生率を改善することが報告されている (Chankitisakul ら, 2013)。このことから、脂質代謝促進作用や抗酸化作用を持つ化学物質の添加は、ガラス化保存における低温傷害の軽減を期待できる。

本研究で使用したラクトフェリンは、抗酸化作用 (Gutteridge ら, 1981)、脂質代謝促進作用 (Ono ら, 2013) をもつことが報告されている。つまり、ラクトフェリンを培地に添加することにより、ガラス化保存時に生じる酸化ストレスが軽減され、細胞膜・透明帯の低温傷害の改善に繋がったと推察される。

一方、実験 2 では、ラクトフェリン添加による紡錘体の保護効果は得られなかった (図 3 E,F)。図 3 B ~ D に示したような紡錘体形成異常は、ガラス化保存時に頻繁に起こることが分かっている (Galeati ら, 2011 ; Rojas ら, 2004)。一般に、成熟卵母細胞は、受精時に精子が卵細胞質内に取り込まれることによって生じる Ca^{2+} の一過性の濃度上昇が繰り返されることで、第二減数分裂中期での停止が解かれる (Miyazaki と Ito, 2006 ; Swann と Yu, 2008)。しかし、卵母細胞は、ガラス化保存 (Larman ら, 2006) や ROS (Ermak と Davies, 2002 ; Takahashi ら, 2003) によって Ca^{2+} の増加が引き起こされるため、紡錘体の混乱が生じたのではないかと我々は推察した。これに対し、抗酸化作用をもつラクトフェリンの効果を

期待したが、本研究では認められなかった。この課題について、マウス卵母細胞のガラス化保存では、一度低温傷害を受けた状態からの再形成・機能回復が起こることが報告されており（Chen ら, 2003）、ブタの成熟卵母細胞においても、ガラス化保存・融解後に紡錘体を回復するメカニズムや手法について研究をさらに進めていく必要がある。

本研究で、我々は、ラクトフェリンを用いてガラス化保存後の低温傷害の軽減を試みた。ラクトフェリンの効果として得られた透明帯・細胞膜の保護作用は、ガラス化保存後に受精・発生へとステップを進めることができる卵母細胞の有効数の確保に繋がり、ブタ成熟卵母細胞のガラス化保存における全体的な成績向上に向けた1つのステップとして貢献できると考えている。

謝 辞

本研究の実施にあたり、材料として用いたブタ卵巣を提供して頂いた、仙台市中央卸売市場・食肉市場の皆様深く感謝いたします。

引用文献

- Ahn HJ, Sohn IP, Kwon HC, Jo DH, Park YD, Min CK. Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. *Mol Reprod Dev.*, 61(4):466-76. 2002.
- Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil.*, 90(2):547-53. 1990.
- Chankitisakul V, Somfai T, Inaba Y, Techakumphu M, Nagai T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology.*, 79(4):590-8. 2013.
- Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing--a review article. *Mol Cell Endocrinol.*, 202(1-2):101-7. 2003.
- Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. *Anim Reprod Sci.*, 63(3-4):159-65. 2000.
- Ermak G, Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol.*, 38(10):713-21. 2002.
- Galeati G, Spinaci M, Vallorani C, Bucci D, Porcu E, Tamani C. Pig oocyte vitrification by cryotop method: effects on viability, spindle and chromosome configuration and *in vitro* fertilization. *Anim Reprod Sci.*, 127(1-2):43-9. 2011.
- Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and *in vitro* development of oocytes vitrified before or after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.*, 93(8):2602-7. 2010.
- Gutteridge JM, Paterson SK, Segal AW, Halliwell B. Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochem J.*, 199(1):259-61. 1981.
- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.*, 41(12 Pt 2):1819-28. 1995.
- Hirose M, Kamoshita M, Fujiwara K, Kato T, Nakamura A, Wojcikiewicz RJ, Parys JB, Ito J, Kashiwazaki N. Vitrification procedure decreases inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, resulting in low fertility of pig oocytes. *Anim Sci J.*, 84(10):693-701. 2013.
- Ishikawa S, Machida R, Hiraga K, Hiradate Y, Suda Y, Tanemura K. Hanging drop monoculture for selection of optimal antioxidants during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim.*, 49(2):e26-30. 2014.
- Kohaya N, Fujiwara K, Ito J, Kashiwazaki N. High developmental rates of mouse oocytes cryopreserved by an optimized vitrification protocol: the effects of cryoprotectants, calcium and cumulus cells. *J Reprod Dev.*, 57(6):675-80. 2011.
- Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology.*, 67(1):73-80. 2007.
- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction.*, 131(1):53-61. 2006.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil.*, 118(1):163-70. 2000.
- Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology.*, 66(8):2008-16. 2006.
- Miyazaki S, Ito M. Calcium signals for egg activation in

- mammals. *J Pharmacol Sci.*, 100(5):545-52. 2006.
- Nagashima H, Hiruma K, Saito H, Tomii R, Ueno S, Nakayama N. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biol Reprod.*, 76 (5):900-5. 2007.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod.*, 51(4):618-22. 1994.
- Ono T, Fujisaki C, Ishihara Y, Ikoma K, Morishita S, Murakoshi M, Sugiyama K, Kato H, Miyashita K, Yoshida T, Nishino H. Potent lipolytic activity of lactoferrin in mature adipocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 77(3):566-71. 2013.
- Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl.*, 48:61-73. 1993.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.*, 164 (4172) : 666. 1994.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil.*, 66(1):161-8. 1982.
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature.*, 313(6003):573-5. 1985.
- Ren L, Fu B, Ma H, Liu D. Effects of mechanical delipation in porcine oocytes on mitochondrial distribution, ROS activity and viability after vitrification. *Cryo Letters.*, 36(1):30-6. 2015.
- Rojas C, Palomo MJ, Albarracín JL, Mogas T. Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology.*, 49(3):211-20. 2004.
- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.*, 222(1):1-15. 1984.
- Smith GD, Silva E Silva CA. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online.*, 9(2):171-8. 2004.
- Somfai T, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, Dang-Nguyen TQ, Geshi M, Kikuchi K, Nagai T. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during *in vitro* maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev.*, 23(7):912-20. 2011.
- Somfai T, Kikuchi K, Nagai T. Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes. *J Reprod Dev.*, 58 (1) :17-24. 2012.
- Swann K, Yu Y. The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *Int J Dev Biol.* 52(5-6):585-94. 2008.
- Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev.*, 66(2):143-52. 2003.
- Wassarman PM. Profile of a mammalian sperm receptor. *Development.*, 108(1):1-17. 1990.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.*, 178(4059):411-4. 1972.
- Yazaki T, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. L-carnitine improves hydrogen peroxide-induced impairment of nuclear maturation in porcine oocytes. *Anim Sci J.*, 84(5):395-402. 2013.

Lactoferrin improves cryo-tolerance of *in vitro* matured porcine oocytes during vitrification.

Manami NEGISHI¹, Sadamasa ISHIKAWA¹, Kou HIRAGA¹, Satoshi SUGIMURA²,
Kenshiro HARA¹ and Kentaro TANEMURA¹

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,
1-1 Tsutsumidori Amamiya-machi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 981-8555, Japan

² Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology,
3-5-8 Saiwaicho, Fuchu, Tokyo, 183-8509, Japan

Correspondences: Kentaro TANEMURA,
Tel.: +81-22-717-8686; Fax: +81-22-717-8685, E-mail address: kentaro@m.tohoku.ac.jp

Summary

Vitrification of oocytes is a technique that will help us to preserve genetic resources and produce livestock efficiently. However, vitrified porcine oocytes often show serious damage of zona pellucida, membrane, a spindle or something by low temperature, and that limit to the production of blastocyst stage embryos. One of the possible causes is the accumulation of oxidative stress by exposing low temperature. Previously, we revealed that *in vitro* maturation (IVM) with Lactoferrin (LF) reduced oxidative stress of porcine oocytes. In this study, we examined whether LF is efficient vitrification of *in vitro* matured (IVM) porcine oocytes at the metaphase II (MII) stage.

We matured, vitrified and re-warmed porcine oocytes *in vitro* with or without LF. Then, we evaluated the morphology of oocytes under stereo microscope, and observed the distribution of chromosome and that of meiotic spindle by confocal laser scanning microscope, respectively.

We found the increased rate of oocytes with normal membrane and zona pellucida by addition of LF ($p<0.05$). On the other hand, we never found the improvements in the dynamics of chromosome and the spindle by addition of LF.

In conclusion, our results suggest that LF is effective in the improvement of membrane and zona pellucida damage during vitrification of porcine oocytes. We believe that vitrification with LF is useful for preservation of porcine genetic diversity and production of piglets in the future.

Key word: *in vitro* maturation, lactoferrin, oocyte, pig, vitrification