

[成果情報名] 胚凍結保存液へのカルノシンの添加による凍結融解後のウシ体外受精由来胚盤胞の生存性の向上

[要約]ウシ体外受精胚は低温障害を受けやすいため、その凍結保存には課題がある。凍結保存液へカルノシンを添加することにより、緩慢凍結、融解後の胚の細胞死数の割合が低下、活性酸素量が低下、ミトコンドリア機能が高く保持され、その生存性が向上する。

[キーワード]ウシ体外受精胚、カルノシン、活性酸素、緩慢凍結法、ミトコンドリア

[担当]三重県畜産研究所 家畜改良繁殖研究課

[代表連絡先]電話 0598-42-2029

[区分]関東東海北陸農業・畜産草地（大家畜（うち育種・繁殖部門））

[分類]技術・参考

[背景・ねらい]

胚移植技術の発展により、凍結保存されたウシ体外受精由来胚（以下、ウシ胚）の産子数が増加している。一方で、ウシ胚は低温障害を受けやすく、その凍結保存には課題がある。さらに、生産現場では、実用性の観点から緩慢凍結法で保存された胚への要望が強い。

近年、ウシ胚の培養環境に抗酸化物質を添加することで、凍結融解後の胚の生存性を改善する取り組みが多数報告されている。しかし、胚凍結保存液への抗酸化物質を添加することで胚の生存性を改善する取り組みは少ない。そこで、抗酸化物質のカルノシンをウシ胚の胚凍結保存液へ添加し、凍結融解後の胚の生存性が向上しうるかを調査した。

[成果の内容・特徴]

1. 体外受精7日目のウシ胚盤胞期胚を材料とし、20%ウシ胎児血清、5%エチレングリコール、6%プロピレングリコールならびに0.1 Mスクロースを含むTCM199（以下、5E6P0.1MS）を用いて0.25 mLストローに胚を封入し、緩慢凍結法で保存する。凍結保存されたストローは、10秒間空気中で保持後、30℃の微温湯で融解する。融解した胚は、10%ウシ胎児血清添加KSOMを用い、個別に培養する。
2. 緩慢凍結、融解後の胚の生存性を調査した。凍結保存液にカルノシンを添加または無添加されたウシ胚の培養後0、4、24ならびに48時間後の胚の形態的な変化を実体顕微鏡下で記録、胞胚腔が再拡張した場合を生存とした。50µg/mlカルノシンを含む5E6P0.1MSで凍結保存されたウシ胚は、無処置の胚と比べ融解4、24ならびに48時間の生存胚が多い（表1）。
3. 50µg/mlカルノシンを含む5E6P0.1MSで凍結保存されたウシ胚は、無処置の胚と比べて細胞死の指標であるTUNEL陽性核の割合が低い（図1）。これらのウシ胚では、凍結融解後の胚への障害が低減している可能性が示唆された。
4. 50µg/mlカルノシンを含む5E6P0.1MSで凍結保存されたウシ胚は、無処置の胚と比べて活性酸素量の指標であるCM-H2DCFDAの蛍光が弱い（図2）。これらのウシ胚では、活性酸素量が低減している可能性が示唆された。
5. 50µg/mlカルノシンを含む5E6P0.1MSで凍結保存されたウシ胚は、無処置の胚と比べてミトコンドリア外膜の標的タンパク質であるTOMM20の蛍光が強い（図3）。また、これらのウシ胚では、ATP含有量が多い。（図4）。これらのウシ胚では、無処置の胚と比べて胚内のミトコンドリア含有量が多く、胚の再拡張に必要なATPの含有量が多いことから、胚の再拡張性（生存性）が向上したと考えられた。

[成果の参考情報]

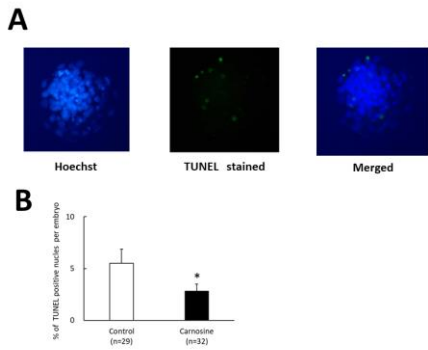
1. 緩慢凍結法で保存されたウシ胚の融解後の生存性を向上できる。
2. カルノシン処理された胚の受胎性ならびにその産子の健全性について調査が必要。

[具体的データ]

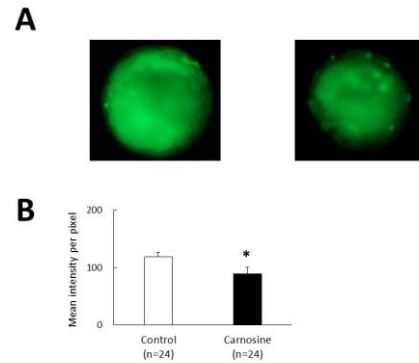
表 1. 凍結保存液へのカルノシンの添加により融解後の胚の再拡張性（生存性）が向上

	供試胚数	再拡張した胚の累積個数		
		4 時間後	24 時間後	48 時間後
無処置	67	31/67 ^a	40/67 ^a	40/67 ^a
カルノシン 5μg/ml 添加	54	23/54 ^a	29/54 ^a	29/54 ^a
カルノシン 50μg/ml 添加	54	39/54 ^b	45/54 ^b	45/54 ^b

a-b: $P < 0.05$



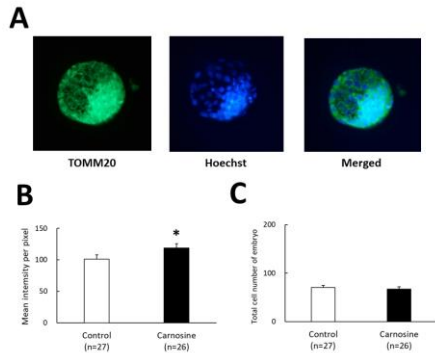
*: $P < 0.05$



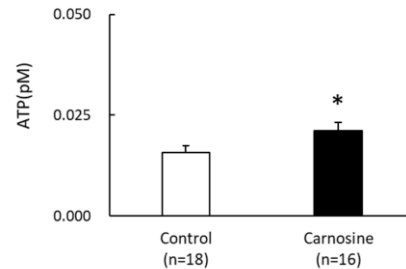
*: $P < 0.05$

図 1. 胚の細胞死数の割合が低下
(A) 代表画像、(B) 細胞死の比較

図 2. 胚の活性酸素量低下が示唆
(A) 無処置区 (左) 処置区 (右) の代表画像
(B) 蛍光強度の比較



*: $P < 0.05$



*: $P < 0.05$

図 3. ミトコンドリア含有量が多い
(A) 代表画像
(B) 蛍光強度の比較、(C) 細胞数の比較

図 4. ATP 含有量が多い

(石井利通)

[その他]

予算区分：県単経常

研究期間：2020～2023 年度

研究担当者：石井利通（三重県畜研）、松山秀一（名古屋大学）

発表論文等：Ishii T. et al. (2024) *J Reprod Dev.* 70(5): 279-285.