

マウス初期胚の胞胚腔の形成および透明帯脱出に及ぼすグルタミンの効果

誌名	Journal of mammalian ova research = 日本哺乳動物卵子学会誌
ISSN	13417738
著者	榊田, 信也 小柳, 深
巻/号	23巻2号
掲載ページ	p. 74-78
発行年月	2006年4月

マウス初期胚の胞胚腔の形成および透明帯脱出に及ぼすグルタミンの効果

梶田 信也¹・小柳 深¹

¹九州東海大学農学部 熊本県阿蘇郡 〒869-1404

要旨：培地へのグルタミンの添加がマウス初期胚の胞胚腔の形成および透明帯脱出に及ぼす効果を検討した。その結果、1細胞期および2細胞期からグルタミン添加培地で培養すると、桑実期から脱出胚盤胞期に至る各ステージへの発生率は、グルタミン無添加培地で培養したものよりも高くなった。4細胞期、8細胞期および桑実期の各ステージからグルタミン添加培地で培養した場合の拡張胚盤胞期までの発生率は、グルタミン無添加培地で培養したものと同等であったが、グルタミン添加培地における透明帯脱出率は、グルタミン無添加培地のものよりも高いか、高くなる傾向を示した。また、初期胚盤胞期、胚盤胞期および拡張胚盤胞期からグルタミン添加培地で培養した場合の胚の透明帯脱出率も、グルタミン無添加培地で培養したものよりも高くなった。これらのことより、2細胞期以前に胚をグルタミン添加培地で培養すると、桑実胚形成率および胞胚腔の形成率だけでなく胚盤胞の透明帯脱出率も向上するものと考えられた。また、胚の透明帯脱出時にはグルタミンが効率的に利用されていることが推察された。
キーワード：マウス胚、グルタミン、胞胚腔の形成、透明帯脱出

緒言

グルタミンは1~2細胞期のマウス胚に取り込まれ、その取り込み量は胚盤胞期に増大することが知られている^{1,2)}。1~2細胞期胚によるグルタミンの取り込みは培地にグルコース、ピルビン酸および乳酸が存在すると阻害されるが、胚盤胞によるグルタミンの取り込みはこれらの成分が存在していても阻害されないことが報告されている¹⁾。また、Chatotら²⁾は、培地へのグルコースの添加は1~2細胞期胚および胚盤胞によるグルタミンの取り込みを阻害しないことを報告している。一方、DuとWales³⁾は培地にグルコースが存在すると2細胞期胚によるグルタミンからのCO₂産生量は増大するが、胚盤胞によるグルタミンからのCO₂産生量は低下することを報告している。

培地へのグルタミンの添加は1細胞期胚の胚盤胞への発生率を上昇させることが報告されている⁴⁻⁶⁾。これに対し、培地へのグルタミンの添加は胚盤胞への発生に効果がないとの報告^{7,8)}とグルタミンの添加は胚発生に有害であるとの報告⁹⁾もあり、このような差が生じるのは用いるマウスの系統によって胚のグルタミン代謝能が異なるためであると考えられている⁹⁾。

牛血清アルブミン含有培地にイーグル培地の非必須アミノ酸とグルタミンを加えると胚盤胞の透明帯脱出率が上昇することから^{10,11)}、非必須アミノ酸とグルタミンは胚を保護する作用と呼吸基質として利用されることにより胚発生を支持するものと考えられている¹¹⁾。

グルタミンの胚発生に及ぼす影響は胚盤胞への発生率によって検討されてきている。Biggersら¹²⁾によれば、ポリビニールアルコール含有培地にグルタミンを添加しても胚の透明帯脱出率は極めて低いとされている。しかしながら、グルタミンが胚の透明帯脱出に及ぼす効果については十分に検討されていない。

本研究は、培養したマウスの初期胚について、グルタミンが胞胚腔の形成に及ぼす影響を検討するとともに、グルタミンが胚盤胞の透明帯脱出に及ぼす有効性を検討したものである。

材料および方法

1) 供試動物

本研究にはddY系の9~30週齢の雌マウスと10~53週齢の雄マウスを用いた。マウスは23℃、14L:10Dの条件下で飼育された。

2) 胚の採取

5 IUのウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG, 帝国臓器製薬株式会社, 東京)を腹腔内に投与後48時間に5 IUのヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG, 帝国臓器製薬株式会社)を腹腔内に投与することにより過剰排卵処理を施した。hCG投与後直ちに雄と同居させ、翌朝陰栓が確認できたものを頸椎脱臼によりhCG投与後18~20時間に屠殺した。その後、卵管膨大部を切開し、胚・卵丘細胞複合体を採取した。卵丘細胞は0.1%ヒアルロニダーゼ(H-6254, Sigma, USA)

(受付 2006年1月26日/受理 2006年2月24日)
別刷請求先：〒869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽
九州東海大学農学部
e-mail: smasuda@ktmail.ktokai-u.ac.jp

Table 1. Effect of supplementation of glutamine on the development of mouse 1-cell embryos

PVA	BSA	Gln	No. of embryos cultured	Percentage of embryos develop to								
				2 ¹⁾	4 ¹⁾	8 ¹⁾	M ¹⁾	E-B ¹⁾	B ¹⁾	Exp-B ¹⁾	Part-HB ¹⁾	Comp-HB ¹⁾
+	-	+	46	100	100	100	100 ^a	100 ^a	91.3 ^a	91.3 ^a	50.0 ^b	8.7 ^{bc}
+	-	-	45	100	97.8	93.3	84.4 ^b	73.3 ^b	48.9 ^b	46.7 ^b	6.7 ^c	0.0 ^c
-	+	+	46	100	95.7	95.7	95.7 ^{ab}	95.7 ^a	95.7 ^a	93.5 ^a	76.1 ^a	39.1 ^a
-	+	-	51	100	100	100	98.0 ^a	94.1 ^a	86.3 ^a	80.4 ^a	35.3 ^b	11.8 ^b

¹⁾2: 2-cell, 4: 4-cell, 8: 8-cell, M: morula, E-B: early blastocyst, B: blastocyst, Exp-B: expanded blastocyst, Part-HB: partially hatched blastocyst, Comp-HB: completely hatched blastocyst. ^{a, b, c}Calculated using Fisher's exact probability test. Means with different superscript letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of supplementation of glutamine on the developmental speed of mouse 1-cell embryos

PVA	BSA	Gln	No. of embryos examined ¹⁾	Time required to develop to the following stages (h) ²⁾						
				2 ³⁾	4 ³⁾	8 ³⁾	M ³⁾	E-B ³⁾	B ³⁾	Exp-B ³⁾
+	-	+	42	14.1 ± 2.9	36.6 ± 2.2	50.7 ± 4.6 ^a	67.0 ± 5.3 ^{ab}	77.0 ± 4.9 ^a	82.4 ± 9.4 ^a	85.6 ± 9.1 ^a
+	-	-	21	15.4 ± 3.0	38.3 ± 3.0	57.4 ± 7.0 ^b	70.3 ± 3.4 ^b	81.4 ± 5.6 ^b	89.4 ± 4.2 ^b	93.4 ± 7.0 ^b
-	+	+	43	14.0 ± 2.8	36.3 ± 2.6	51.9 ± 4.7 ^a	65.3 ± 4.8 ^a	74.8 ± 5.3 ^a	81.5 ± 9.3 ^a	84.3 ± 8.8 ^a
-	+	-	41	14.8 ± 3.0	37.3 ± 2.5	55.9 ± 5.8 ^b	68.6 ± 8.5 ^{ab}	76.5 ± 8.1 ^a	90.3 ± 8.9 ^b	93.2 ± 8.8 ^b

¹⁾Only includes the number of embryos that developed to expanded blastocysts. ²⁾Values are expressed as mean ± standard deviation. ³⁾2: 2-cell, 4: 4-cell, 8: 8-cell, M: morula, E-B: early blastocyst, B: blastocyst, Exp-B: expanded blastocyst. ^{a, b}Means with different superscript letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

処理により除去し、形態的に正常な1細胞期胚を選抜した。

3) 培養液

本研究に使用した培養液は50 μM EDTA含有HoppeとPittsの液¹³⁾であり、これに0.5 mg/mlのポリビニールアルコール (PVA, MW. 30,000 ~ 70,000. P-8136. Sigma), あるいは3.0 mg/mlのウシ血清アルブミン (BSA, A-6003. Sigma)を添加した。培養液作製に用いた塩類と有機物はナカライテスク株式会社製 (Guaranteed Reagent, 京都)であり、ペニシリンとストレプトマイシンは明治製菓株式会社製 (東京)である。

4) 実験1

グルタミンがマウス初期胚の発生に及ぼす効果の有無を検討するため、PVAあるいはBSA含有培地に1.0 mMのグルタミンを添加し、これらの培地とグルタミンを添加していない培地における1細胞期胚の発生能を比較した。胚の発生ステージは培養開始から6時間毎に観察し、胚の発生速度を算出した。

5) 実験2

グルタミン無添加PVA含有培地を用いて1細胞期胚を培養し、2細胞期、4細胞期、8細胞期、桑実期、初期胚盤胞期、胚盤胞期および拡張胚盤胞期まで発生した胚を、それぞれ1.0 mMグルタミン添加培地で培養し、脱出胚盤胞期までの発生能をグルタミン無添加培地で培養したものと比較した。

胚はBrinster¹⁴⁾の方法に準拠してCO₂インキュベーター内 (37°C, 5%CO₂ + 95%air) で培養した。

6) 統計処理

得られたデータは、Yatesの補正をしたχ²検定法、Fisherの直接確率検定法あるいはTukey検定法 (Statistica 03J for windows, StatSoft, 東京)を用いて、それぞれ有意水準5%で検定した。

結果

PVA含有培地において、桑実期から脱出胚盤胞期に至る各ステージへの発生率は、グルタミンを添加しないものに比べて添加したもので明らかに高かった (表1)。一方、BSA含有培地においては、拡張胚盤胞期までの各ステージへの発生率はグルタミン添加培地と無添加培地で差はなかったが、脱出中および脱出胚盤胞への発生率はグルタミン添加培地の方が高かった。また、グルタミン無添加BSA含有培地での桑実期以降の発生率はグルタミン無添加PVA含有培地での発生率よりも高かった。

拡張胚盤胞期までの各ステージへの発生速度は、PVAあるいはBSA含有培地にグルタミンを添加した場合にはそれぞれ相違なかった。しかし、8細胞期、胚盤胞期および拡張胚盤胞期への発生速度は、PVAあるいはBSA含有培地にグルタミンを添加しなかった場合と比較して、PVAあるいはBSA含有培地にグルタミンを添加した場合の方が速かった (表2)。

Table 3. Effect of glutamine on the development of mouse preimplantation embryos from the 1-cell to the blastocyst stages

Stage of embryo cultured	Gln	No. of embryos cultured	Percentage of embryos develop to								
			2 ¹⁾	4 ¹⁾	8 ¹⁾	M ¹⁾	E-B ¹⁾	B ¹⁾	Exp-B ¹⁾	Part-HB ¹⁾	Comp-HB ¹⁾
1 ¹⁾	+	113	99.1	98.2	98.2	97.3 ^a	88.5 ^A	80.5 ^A	77.0 ^A	46.0 ^A	7.1 ^a
	-	114	98.2	95.6	93.0	86.8 ^b	75.4 ^B	52.8 ^B	47.4 ^B	6.1 ^B	0.0 ^b
2 ¹⁾	+	54		98.1	98.1	98.1 ^a	96.3 ^a	96.3 ^a	94.4 ^a	63.0 ^A	29.6 ^a
	-	53		92.5	92.5	81.1 ^b	81.1 ^b	75.5 ^b	73.6 ^b	35.8 ^B	3.8 ^b
4 ¹⁾	+	50			100	98.0	94.0	94.0	92.0	68.0 ^A	34.0 ^a
	-	51			100	100	100	94.1	88.2	11.8 ^B	0.0 ^b
8 ¹⁾	+	51				100	100	98.0	94.1	62.7 ^A	21.6 ^a
	-	51				98.0	98.0	92.2	86.3	11.8 ^B	2.0 ^b
M ¹⁾	+	37					89.2	89.2	83.8	40.5	10.8
	-	36					94.4	88.9	83.3	22.2	0.0
E-B ¹⁾	+	25						100	100	88.0 ^a	32.0 ^a
	-	26						96.2	96.2	57.7 ^b	7.7 ^b
B ¹⁾	+	47							100	93.6 ^a	34.0 ^a
	-	47							100	53.2 ^b	6.4 ^b
Exp-B ¹⁾	+	43								93.0 ^a	55.8 ^a
	-	36								72.2 ^b	5.6 ^b

¹⁾1: 1-cell, 2: 2-cell, 4: 4-cell, 8: 8-cell, M: morula, E-B: early blastocyst, B: blastocyst, Exp-B: expanded blastocyst, Part-HB: partially hatched blastocyst, Comp-HB: completely hatched blastocyst. ^{A, B, a, b}Means with different superscript letters within the same column and the same line are significantly different ($P < 0.05$). ^{A, B}Calculated using Yates' correction for continuity. ^{a, b}Calculated using Fisher's exact probability test.

1および2細胞期からグルタミン添加培地で培養を開始した場合、桑実期以降脱出胚盤胞期までの各ステージへの発生率は、グルタミン無添加培地のそれらよりも高かった(表3)。4細胞期から胚盤胞期までの各ステージからグルタミン添加培地で培養した場合、拡張胚盤胞期までの各ステージへの発生率はグルタミン無添加培地のものと同等であったが、脱出胚盤胞への発生率は高いか、高くなる傾向を示した。さらに、拡張胚盤胞期からグルタミン添加培地で培養を開始した場合でも、脱出中および脱出胚盤胞への発生率はグルタミン無添加培地のものよりも明らかに高かった。

考 察

培地へのグルタミン添加は、CF-1×B6SJL/F1/Jマウス胚⁴⁾およびMF-1×HC-CFLPマウス胚⁶⁾の胚盤胞への発生には有効であるが、F₁×Q₅マウス胚の胚盤胞への発生には効果がないとともに⁷⁾、MF-1×MF-1マウス胚の発生には有害であることが報告されている⁹⁾。本研究の結果、PVA添加培地でddY系マウスの1細胞期胚を培養した場合、グルタミン添加の効果は桑実期以降の胚発生ステージにおいてみられ、グルタミン添加培地での桑実期から脱出胚盤胞期に至る各ステージへの発生率はグルタミン無添加培地でのものよりも高くなった。したがって、培地へのグルタミンの添加はddY系マウス胚の発生にとっては有効であると考えられる。

一方、BSA含有培地で1細胞期胚を培養した場合、グルタミン添加の効果は拡張胚盤胞期までの胚発生ステージに

おいてはみられず、グルタミン添加培地でのこれらのステージへの胚発生率はグルタミン無添加培地でのものと同様であった。本研究において、グルタミン無添加BSA含有培地での桑実期以降への胚発生率は、グルタミン無添加PVA含有培地でのものよりも高くなった。したがって、BSAはPVAよりも胚発生を支持する効果が高く、BSA含有培地ではグルタミン添加の効果が拡張胚盤胞期までに現れなかったものと考えられる。

1細胞期から4細胞期の間、培地からグルタミンを除くと桑実胚および胚盤胞への発生率が低下することより、グルタミンは胚発生の初期にその後の発生にとって重要な役割を演ずるものと考えられている^{2, 4)}。一方、グルコースは胚発生の初期に培地に存在すると胚発生に有害であると報告されている^{4, 9, 15, 16)}。しかし、グルコースの存在下では2細胞期胚によるグルタミンからのCO₂産生量は増大することが知られている³⁾。本研究では、1~2細胞期からグルタミン添加培地で培養すると、桑実期以降脱出胚盤胞期までの各ステージへの発生率がグルタミン無添加培地のものよりも高くなった。したがって、グルコースの存在により、1~2細胞期胚によって効率的に利用されるグルタミンは、桑実胚および胚盤胞の形成時だけでなく胚の透明帯脱出時にも効果を及ぼしており、胚発生初期のグルコースの有害性も克服できたものと考えられる。

Biggersら¹²⁾は、グルタミン添加PVA含有培地で1細胞期胚を培養した場合、胚盤胞への発生は支持されるが、胚の

透明帯脱出率は1.3%と著しく低いこと、また、この培地にイーグル培地に含まれる必須アミノ酸と非必須アミノ酸を添加するか、あるいはPVAのかわりにBSAを添加すると、胚の透明帯脱出率はそれぞれ23.3および12.7%に高まることを報告している。彼等は添加したアミノ酸およびBSAの効果として、1) アミノ酸の供給、2) 毒性のある金属とのキレート結合、3) フリーラジカルの除去を挙げている。しかしながら、本研究では1細胞期から胚盤胞期のいずれのステージからグルタミン添加培地で培養しても、胚の透明帯脱出率はグルタミン無添加培地のものよりも高いか、高くなる傾向を示した。胚盤胞によるグルタミンからのCO₂産生量は2細胞期胚の2.5倍から10倍となること³⁾、さらにグルタミンは呼吸基質としてだけではなく、フリーラジカルによる脂質の酸化を防ぎ³⁾、イオンをキレート結合する作用があると考えられている⁶⁾。したがって、グルタミンはddY系マウス胚の発生において、胚盤胞期に呼吸基質として大量に利用されることに加えて、BSAおよびイーグル培地に添加されるアミノ酸と同様の作用を発揮して胚発生を支持し、結果として、胚の透明帯脱出率を高めた可能性が示唆される。

さらに、本研究では拡張胚盤胞期からグルタミン添加培地で培養した場合でも、胚の透明帯脱出率はグルタミン無添加培地のものよりも高くなった。このことは、胚の透明帯脱出時にはグルタミンが効率的に利用されていることを示唆している。

文 献

- Gardner, D.K., Clarke, R.N., Lechene, C.P. and Biggers, J.D. (1989): Development of a noninvasive ultramicrofluorometric method for measuring net uptake of glutamine by single preimplantation mouse embryos. *Gamete Res.*, 24, 427-438.
- Chatot, C.L., Tasca, R.J. and Ziomek, C.A. (1990): Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium. *J. Reprod. Fert.*, 89, 335-346.
- Du, Z.F. and Wales, R.G. (1993): Effect of culture from the zygote stage on the metabolism of glucose and glutamine by 2-cell embryos and blastocysts recovered from outbred or F₁ hybrid female mice. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5, 555-565.
- Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L. and Torres, I. (1989): An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 86, 679-688.
- Chatot, C.L., Lewis, J.L., Torres, I. and Ziomek, C.A. (1990): Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.*, 42, 432-440.
- Nasr-Esfahani, M.H., Winston, N.J. and Johnson, M.H. (1992): Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 96, 219-231.
- Du, Z.F. and Wales, R.G. (1993): Some effects of genotype and composition of the culture medium on the development of mouse zygotes *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5, 405-415.
- Devreker, F. and Hardy, K. (1997): Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 57, 921-928.
- Brown, J.J.G. and Whittingham, D.G. (1992): The dynamic provision of different energy substrates improves development of one-cell random-bred mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 95, 503-511.
- Gardner, D.K. and Lane, M. (1993): Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol. Reprod.*, 48, 377-385.
- Lane, M. and Gardner, D.K. (1997): Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J. Reprod. Fert.*, 109, 153-164.
- Biggers, J.D., Summers, M.C. and McGinnis, L.K. (1997): Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. *Hum. Reprod. Update*, 3, 125-135.
- Hoppe, P.C. and Pitts, S. (1973): Fertilization *in vitro* and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8, 420-426.
- Brinster, R.L. (1965): Studies on the development of mouse embryos *in vitro* IV. Interaction of energy sources. *J. Reprod. Fert.*, 10, 227-240.
- Leppens-Luisier, G. and Sakkas, D. (1997): Development, glycolytic activity, and viability of preimplantation mouse embryos subjected to different periods of glucose starvation. *Biol. Reprod.*, 56, 589-596.
- Masuda, S. and Koyanagi, F. (2005): Effect of time of the addition of glucose to a medium on the development of 1-cell stage mouse embryos. *Animal Sci. J.*, 76, 413-417.

Effects of Glutamine on Blastocoele Formation and Hatching in Mouse Preimplantation Embryos

Shinya Masuda and Fukashi Koyanagi

School of Agriculture, Kyushu Tokai University, Minamiaso-mura, Kumamoto 869-1404, Japan

The effects of glutamine supplementation on the blastocoele formation and hatching of mouse preimplantation embryos were investigated. When culturing the 1-cell or 2-cell stage embryos in glutamine-supplemented media, the incidence of development to each stage from the morula stage to the completely hatched blastocyst stage was higher than for culturing in media without glutamine supplementation. When culturing 4-cell stage, 8-cell stage or morula stage embryos in glutamine-supplemented media, percentage of development up to the expanded blastocyst stage was comparable to culturing in media without glutamine supplementation, but the hatching rate for the glutamine-supplemented media was higher or tended to be higher

compared to culturing in media without glutamine supplementation. Further, culturing in glutamine-supplemented media from the early blastocyst stage, the blastocyst stage or the expanded blastocyst stage resulted in a higher hatching rate compared to culturing in media without glutamine supplementation. These findings suggest that culturing in glutamine-supplemented media before the 2-cell stage, leads to improvements not only in the rates of morula formation and blastocoele formation, but also the rate of hatching. Further, efficient usage of glutamine appears to be elevated during the course of hatching.

Key words: Mouse embryo, Glutamine, Blastocoele formation, Hatching