

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：24201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12345

研究課題名(和文) ビタミン栄養と卵子の劣化

研究課題名(英文) Studies on relationship between vitamin nutrition and oocyte quality

研究代表者

柴田 克己 (Shibata, Katsumi)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：40131479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：(1)マウス異常卵子出現率は葉酸欠乏群と対照群の間に差は認められなかった(20.0% vs 14.6%)。卵母細胞では、葉酸輸送体が強く発現していたという報告がある。このことからマウスの葉酸欠乏食摂取は、卵母細胞の葉酸濃度までは影響しない可能性が考えられた。結論として、葉酸欠乏は卵母細胞の減数分裂に悪影響を与えないことが示唆された。

(2)軽度のビタミンB1不足状態では卵子は劣化しなかった(対照群 vs テスト群：17.1% vs 14.6%,  $p=1.00$ )。重度のビタミンB1不足では卵子の質は劣化していた(対照群 vs テスト群：13.8% vs 43.5%,  $p<0.01$ )。

研究成果の概要(英文)：(1) The frequency of abnormal oocytes was no different between the FA-deficient and control groups (20.0% vs 14.6%). It was reported that FA transporter was strongly expressed in oocytes. It is thus possible that the mice fed FA-free diets may not affect the concentration of oocyte FA. In conclusion, our study suggested that FA deficiency did not adversely affect oocyte meiosis.

(2) Oocyte meiosis was not affected by vitamin B1 deficiency when the deficiency was not accompanied by body weight loss. On the other hand, frequency of abnormal oocyte was increased by vitamin B1 deficiency when deficiency was accompanied by body weight loss (referred as severe vitamin B1 deficiency; frequency of abnormal oocyte, 13.8% vs 43.7%,  $P = 0.0071$ ). The frequency of abnormal oocytes was decreased by refeeding of a vitamin B1-containing diet (13.9% vs 22.9%,  $P = 0.503$ ). These results suggest that severe vitamin B1 deficiency inhibited meiotic maturation of oocytes, but did not damage immature oocytes.

研究分野：基礎栄養学

キーワード：卵母細胞の質 ビタミン 欠乏 卵母細胞の減数分裂 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

8種類のB群ビタミンは共同して、体内の重要な代謝や遺伝子発現の調節に関わっている。常にB群ビタミン栄養状態を良好に維持することが生き活きと生きるために大切である。申請者らはB群ビタミンの1つであるピオチンの不足・欠乏によって卵子の質が劣化することを世界で初めて明らかにした<sup>1)</sup>。さらに、見かけ上のピオチン栄養状態が回復しても卵子の劣化は回復しなかったことも報告した。ピオチン添加食の投与のタイミング、ピオチン投与量、投与期間などを適切に選べば、卵子の劣化は回復するかもしれない。そこで、卵子の劣化は可逆的であるか否かを検証する必要がある。ビタミンの栄養による卵子の劣化が可逆性を持つかどうかで、発症の予防だけでなく重症化の予防にも関わってくるからである。卵子の質の回復が望めるのは、減数分裂後に異常がでた場合である。よって、卵子の異常が減数分裂より前か後かを明らかにする。B群ビタミンはピオチン以外に7種類ある。そこで、他のB群ビタミンも卵子の質に関与しているのかを調べなければならない。

B群ビタミンの中でも「葉酸」と「ビタミンB<sub>1</sub>」は生殖に関与することから、卵子の質に関与している可能性が高い<sup>2,3)</sup>。葉酸はDNA合成やDNAのメチル化に関わっている。卵子の成熟(減数分裂)の際にDNAが複製される。この時に葉酸の必要量が高まるため、葉酸不足・欠乏状態ではDNA複製の抑制が予想される。それゆえ、葉酸不足によって卵子の質が劣化するという仮説を立てた。卵子のエネルギー源はピルビン酸であるため、ビタミンB<sub>1</sub>の関わりが高いと予想される。

## 2. 研究の目的

1. 葉酸不足・欠乏およびパントテン酸不足・欠乏によって異常卵子の出現があるかないか。

2. 葉酸不足・欠乏およびパントテン酸不足・欠乏による異常卵子は減数分裂より前か後か。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 実験動物と飼料組成

雌性ICRマウスをチャールズリバー(株)から購入した。マウスは自由摂食、自由飲水させた。室温20℃、湿度60%環境下で飼育し、明暗サイクルは12時間(明期:6時

00分~18時00分)とした。飼料組成は各実験の結果と考察に記載した。

### 3-2. 過排卵(ビタミン実験)

卵胞を成長させる作用を持つ妊馬血清ゴナドトロピン(PMSG: pregnant mare serum gonadotropin, アスカ製薬(株))を5IU/匹で19時に腹腔投与した。PMSGを投与してから46~48時間後に排卵を促すために胎盤性性腺刺激ホルモン(CG: chorionic gonadotropin アスカ製薬(株))を5IU/匹で腹腔投与した。CGを投与してから15時間後に頸椎脱臼で屠殺した。直ちに開腹し、排卵された卵母細胞がいる卵管を切り出して、FHM培地(Merck Millipore社)内で卵塊(卵母細胞と卵丘細胞の複合体)を取り出した。5%ヒアルロニダーゼを培地に加え、卵丘細胞を卵母細胞から剥がし、卵母細胞を採取した。

### 3-3. 蛍光免疫染色

採取した卵母細胞を4%パラホルムアルデヒド/PBS液に室温で15分間浸して固定した。0.2% Triton X-100/PBSに室温で20分間浸した。次に5%ヤギ血清/PBST(PBSに終濃度0.05%のTween 20を加えた溶液)に室温で1時間ブロッキングした後、4000倍に希釈したマウス抗 $\alpha$  チューブリン抗体(Cell Signaling Technology(株))に室温で1時間浸して1次抗体処理を行った。500倍に希釈したヤギ由来抗マウスIgG抗体と染色体を染めるために4'6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI:

4'6-diamidino-2-phenylindole)を加えた5%ヤギ血清/PBSTに室温で1時間浸し、2次抗体処理を行った。免疫染色済みの卵母細胞をプレパラートにのせ、封入した。共焦点顕微鏡(FV10i, オリンパス(株))で各卵母細胞の紡錘体像と染色体像を収集した。

紡錘体像および染色体像から異常卵子と正常卵子を区別した。正常卵子は紡錘体の両サイドが1点で収束し、かつ全ての染色体が同一平面上に整列している卵母細胞とした(図1.(A))。異常卵子は、紡錘体が中心体から離れている(図1.(B))、または/かつ染色体が同一平から離れている(図1.(C))卵母細胞とした。また、MII期卵子でない卵子、つまりGV期(図1.(D))やMI期の卵子も異常卵子とした。異常卵子出現率は異常卵子数/観察された卵母細胞数で求めた。

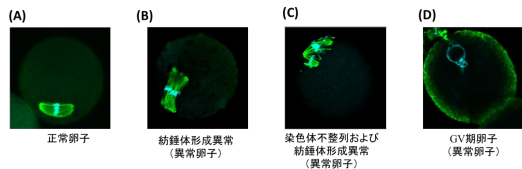


図 1 . 正常卵子と異常卵子の例

正常な MII 期卵母細胞 (B) 紡錘体形成異常 (C) 染色体不整列および紡錘体形成異常 (D) GV 期卵子 . 蛍光免疫染色により チューブリン (緑) と DAPI で染色体 (水色) を染め, 共焦点顕微鏡で観察した . (A) の紡錘体が両側に 1 点に収束し, かつ染色体が同一平面上に並んでいる . (B) (C) の紡錘体は両側 1 点に収束せず解けている . (C) は染色体が同一平面上に整列していない . (D) 青いリングは卵核胞と呼ばれ, GV 期の特徴である . 過排卵により MII 期になるはずが, GV 期のまま減数分裂が停止しているの, これも異常卵子とみなした .

#### 4 . 研究成果

##### 4-1 . 葉酸実験

###### (1) 実験動物

3 週齢 ICR 雌マウス 70 匹 (日本チャールス・リバー株式会社)

飼育条件 : 室温 20 , 湿度 60 % , 午前 6 時 ~ 午後 6 時を明, 午後 6 時 ~ 翌朝午前 6 時を暗とする明暗サイクル

ゴールドスタンダード群 (GS 群) 10 匹, 対照群 (Ctrl 群) 10 匹, 葉酸欠乏群 (FA-def 群) 15 匹に, 平均体重がほぼ等しくなるように分け, マウス用の代謝ケージとプラスチックケージでそれぞれ飼育した . プラスチックケージでは, 糞食を防ぐため, 網で作った床の上で飼育した .

###### (2) 飼料組成

Ctrl 群には 20% カゼイン食を与え, FA-def 群には葉酸欠乏食を与えた . また, 腸内細菌からの葉酸供給を抑制し, マウスが糞食した際に葉酸を摂取することを防ぐために, 抗生物質を各飼料に添加した . Day37 からは回復群として FA-def 群のうち Ctrl 群と同じ飼料を与える群を追加した . GS 群には抗生物質無添加の 20% カゼイン食を与えた

###### (3) 測定項目

飼料食投与開始日を Day1 とし, Day36 で各ケージの GS 群 5 匹, Ctrl 群 5 匹, FA-def 群 5 匹を断頭し, 屠殺した . その後 FA-def 群の 5 匹を回復群とし, Ctrl 群と同じ飼料を与えた . 飼料と水は自由摂取とし, 1 日ごとに午前 9 時 ~ 10 時に新しいものと交換し, 体重と飼料摂取量を計測した . また, 膣スミア検査を行い, 発情サイクルを求めた .

7 日おきに採尿し, 葉酸の排泄量を測定した . Day36 と Day57 において, 肝臓, 血球, 子宮, 卵巣を摂取し葉酸濃度を測定した . また, 卵母細胞の質の指標である紡錘

体と染色異常のある卵母細胞から異常卵子の割合を求めた .

卵母細胞は, Day36 と Day57 においてホルモン投与により人工的に過排卵させ, 成熟卵母細胞を採取した . これを, 蛍光免疫染色し, 蛍光顕微鏡で観察を行った . 正常な卵母細胞の減数分裂は紡錘体が中心体に 1 カ所に収束し, 染色体が同一平面上に並んでいる . 異常卵な母細胞は紡錘体が広がっており, 染色体も同一平面上に並んでいない . 未成熟卵子のまま排卵された卵母細胞も異常卵母細胞とした .

葉酸は腸内細菌からも供給される . そこで腸内細菌による葉酸供給を抑制するために抗生物質 (スクシニルサルファチアゾール) を飼料に 1% 加えた (表 1) . 実験動物には 3 週齢雌性 ICR マウスを用いた . 抗生物質を添加しない Gold standard 群 (GS 群) と 抗生物質と葉酸を添加した飼料を与えた対照群 (対照群), 抗生物質を添加するが葉酸を添加しない飼料を与えた葉酸欠乏食群に分けた . 飼育開始日を 1 日目として 58 日目まで飼育した . 流産率を卵母細胞の老化の指標とする点は, 生体の排卵や修復機構を考慮した, より実際に近い結果が得られるという利点がある . しかし, 卵母細胞の老化だけを評価することは難しい . そこで, 卵母細胞の老化の評価方法を変更し, 人工的に MII 卵子を排卵させ, 紡錘体像と染色体像から異常卵子の割合を求めた . 肝臓, 子宮, 卵巣, 血球を採取して葉酸濃度を測定した .

体重および飼料摂取量に 3 群間に差は認められなかった . また, 葉酸欠乏食群の血球, 肝臓, 子宮, に加え卵巣においても葉酸濃度は対照群に比べて低かったが, 葉酸欠乏症状の 1 つである巨赤芽球貧血が観察された個体は存在しなかった . よって本研究で作成した葉酸欠乏モデルマウスは, 欠乏症状が顕在化するほどの葉酸欠乏状態ではないが, 血球や肝臓など体内葉酸量が減少する程度の葉酸不足状態であった . 異常卵出現率は GS 群で 12.2% , 対照群で 14.6% , 葉酸欠乏食群で 20.0% であった (図 2) . よって, 葉酸不足状態は卵母細胞の減数分裂に影響しないことが明らかとなった .

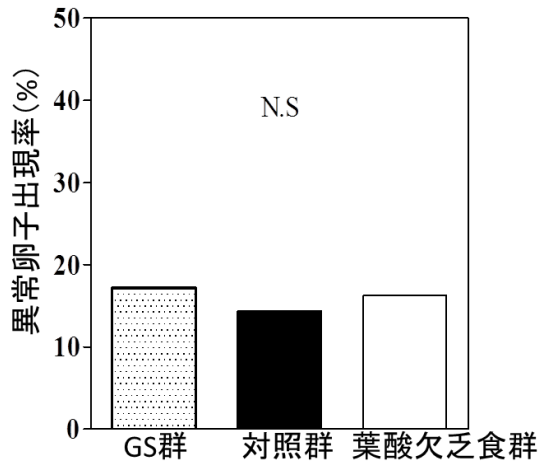


図 2 . 葉酸欠乏食を 58 日間投与した時の異常卵子出現率  
GS 群 : Gold standard 群 . GS 群 , n = 29 ; 対照群 , n = 70 ; 葉酸欠乏食群 , n = 43 . Chi-square 解析 . N.S. : 有意差なし .

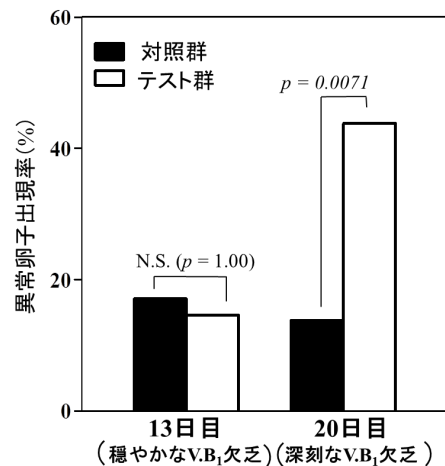
本研究で得た結果は、葉酸とダウン症の関係を否定するものであった。卵母細胞は胎児期に発生する。つまり、卵子の立場からみると、祖母の栄養状態の影響を受ける可能性がある。3 世代にわたって、葉酸栄養や葉酸代謝関連遺伝子とダウン症の関係を探っていく必要があるが、飲酒やたばこなどの交絡因子が多く、未だ結論に至っていない<sup>3)</sup>。葉酸欠乏食をマウス 30 日間投与すると血漿ホモシステイン濃度の上昇がみられる<sup>4)</sup>。これは葉酸不足状態が、代謝が滞るレベルであるかの指標となる。なぜならば、体内葉酸量が減少しても、余剰分が減少したに過ぎない可能性がある。今回、ホモシステインを測定していないため、本葉酸欠乏モデルマウスの葉酸不足状態が、貯蔵分の葉酸量が減少した段階であるのか、代謝を混乱させるほどの不足状態であったかまでは不明である。また欠乏症状の巨赤芽球貧血も起きていなかったのも、さらに長期の葉酸不足および欠乏状態は卵母細胞の減数分裂に影響を与えるかもしれない。

#### 4-2 . ビタミン B<sub>1</sub> 実験

6 週齢の雌性 ICR マウスにビタミン B<sub>1</sub> 欠乏食 (テスト群) または 20%カゼイン食 (対照群) を与えた。ビタミン B<sub>1</sub> 欠乏食投与から 11 日目からテスト群の飼料摂取量が有意に低下した。そこで体重減少が現れる前の 13 日目 (穏やかなビタミン B<sub>1</sub> 欠乏) に一部のマウスを屠殺し、臓器中のビタミン B<sub>1</sub> 量 (遊離チアミンと遊離 TDP の合計) と異常卵子出現率を調べた。ビタミン B<sub>1</sub> 欠乏食群の肝臓、子宮、卵巣中ビタミン B<sub>1</sub> 量

は対照群より低かった (表 2)。穏やかなビタミン B<sub>1</sub> 欠乏状態での異常卵子出現率は対照群とビタミン B<sub>1</sub> 欠乏群の間に差異は認められなかった (図 3 , 17.1% vs 14.6%)。

さらにビタミン B<sub>1</sub> 欠乏状態にすると、卵母細胞の老化にどのようなことが起きるのかを検証した。ビタミン B<sub>1</sub> 欠乏の指標である体重減少が 14 日目からみられ、20 日目 (深刻なビタミン B<sub>1</sub> 欠乏) には体重は 20 g 前後にまで落ちた。ビタミン B<sub>1</sub> 欠乏食投与 20 日後のテスト群肝臓中ビタミン B<sub>1</sub> 濃度は対照群の約 2.4% にまで低下していた。深刻なビタミン B<sub>1</sub> 欠乏状態での異常卵子出現率を再び調べた。テスト群の異常卵出現率は対照群の 3.2 倍に増加した (図 3 , 13.8% vs 43.5%)。序論で述べた PDH 欠損卵子のように、未成熟卵子のまま排卵された卵子が多く見られた (図 3 . GV 期卵子 0% vs 12.2%)。以上のことからビタミン B<sub>1</sub> 欠乏食投与期間によって卵母細胞の老化へおよび影響は異なることが明らかとなった。



	13日目 (穏やかなV.B <sub>1</sub> 欠乏)		20日目 (深刻なV.B <sub>1</sub> 欠乏)	
	対照群	テスト群	対照群	テスト群
紡錘体形成異常/ 染色体不整列	17.1%	14.6%	13.8%	31.3%
GV期, MI期卵子 (未成熟卵子)	0%	0%	0%	12.2%

図 3 . ビタミン B<sub>1</sub> 欠乏および回復時の異常卵子出現率

グラフの下の数値は、紡錘体形成異常および染色体形成異常の割合とGV期とMI期卵子の割合をそれぞれ示した。卵母細胞数 ; n = 29 ~ 48 / 群 . Chi-square 解析 . p 値は図中に示した . N.S. , 有意差なし

次に、卵母細胞老化環境に暴露された卵母細胞は回復するのかを検証した。ビタミン B<sub>1</sub> 欠乏食を 20 日間投与したマウスに、回復食として対照食を投与した。欠乏食投与期間とビタミン B<sub>1</sub> 再投与期間の飼料摂取



量および体重推移を図4に示した。ビタミンB<sub>1</sub>再投与により急激に飼料摂取量と体重が増加し、テスト群の体重は4日後には対照群との差は認められなかった(図4)。ビタミンB<sub>1</sub>再投与期間は20日間と42日間の2つの期間を設けた。

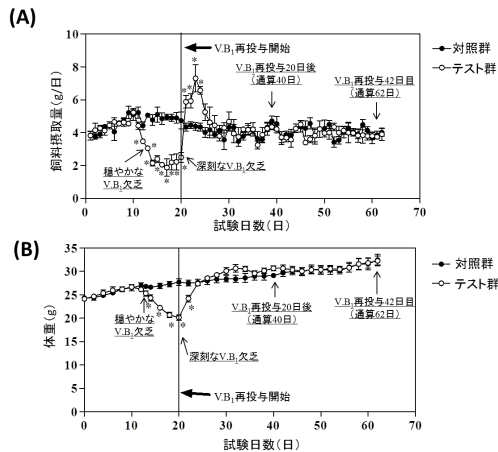
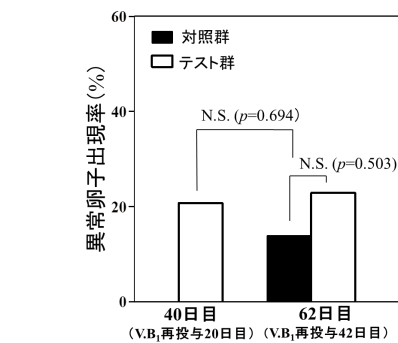


図4. 飼料摂取量と体重推移

飼料摂取量(A)と体重推移(B)。ビタミンB<sub>1</sub>欠乏症状である体重減少が認められない期間を「穏やかなビタミンB<sub>1</sub>欠乏」、体重減少が認められた期間を「深刻なビタミンB<sub>1</sub>欠乏」として矢印で示した。20日目でテスト群の飼料をビタミンB<sub>1</sub>欠乏食から対照食に変更した。ビタミンB<sub>1</sub>再投与から20日後(通算40日目)と42日後(通算62日目)を矢印で示した。値は平均値±標準偏差。n=5~11。Student *t*-test, \**p*<0.05, 対照群 vs. テスト群。



	テスト群	対照群	テスト群
紡錘体形成異常/ 染色体不整列	16.4%	8.6%	17.2%
GV期, MI期卵子 (未成熟卵子)	4.3%	5.3%	5.7%

図5. ビタミンB<sub>1</sub>欠乏および回復時の異常卵子出現率

グラフの下の数値は、紡錘体形成異常および染色体形成異常の割合とGV期とMI期卵子の割合をそれぞれ示した。卵母細胞数; n=29~48/群。Chi-square 解析。p値は図中に示した。N.S., 有意差なし

ビタミンB<sub>1</sub>再投与42日後の肝臓, 子宮, 卵巣中ビタミンB<sub>1</sub>濃度およびチアミン尿中排泄量は対照群と同等レベルにまで回復していた。ビタミンB<sub>1</sub>再投与開始から20日

後と42日後に異常卵出現率を調べた。20日後には異常卵子出現率は20.7%にまで、42日後の異常卵子出現率は22.9%までに低下した(図5)。以上のことから、ビタミンB<sub>1</sub>欠乏による卵母細胞の老化は、ビタミンB<sub>1</sub>再投与により回復することが明らかとなった。

穏やかなビタミンB<sub>1</sub>欠乏時の卵巣中のビタミンB<sub>1</sub>量はPDHのTDPに対するKm値(0.2 nmol/L<sup>5</sup>)を下回っていたことから、卵巣中のPDH活性は低下していたと考えられる。しかし予想に反し、異常卵子出現率は増加しなかった。GV期からGVBDへの移行にはピルビン酸酸化は必須ではないという報告がある<sup>6)</sup>。また、卵母細胞中には脂肪が蓄えられている<sup>7)</sup>。穏やかなビタミンB<sub>1</sub>欠乏時にはピルビン酸が代謝できなくとも脂肪がエネルギー源の代替をした可能性がある。一方、深刻なビタミンB<sub>1</sub>欠乏時には異常卵出現率は2倍以上に増加した。深刻なビタミンB<sub>1</sub>欠乏時には体重減少が起きていた。深刻なビタミンB<sub>1</sub>欠乏時には脂肪や非脂肪組織重量の減少が起きる<sup>8)</sup>。脂肪や一部のアミノ酸はアセチル-CoAになることから、PDHを介さなくてもTCA回路に流入でき、エネルギー産生に利用される。そしてついに欠乏食投与21日目には、脂肪が枯渇したと考えられる。なぜならば、GV期からGVBDへの移行には脂肪酸酸化が必要である<sup>6)</sup>。深刻なビタミンB<sub>1</sub>欠乏時にGV期卵子増加した背景には、卵母細胞中に蓄えられていた脂肪が枯渇し、脂肪酸酸化できなかったことを示しているのではないだろうか。長期の絶食状態のマウスを過排卵させた場合も同様にGV期卵子の割合が増加した<sup>7)</sup>。おそらく卵母細胞内の脂肪を使い果たしたため、ホルモン投与の刺激によって排卵はするものの卵成熟が不完全なまま排卵されたと考えられる。そして、ビタミンB<sub>1</sub>の再投与は食欲を回復させ、卵母細胞内のエネルギー源や脂肪が確保できたことで、ビタミンB<sub>1</sub>再投与から20日後の卵成熟は完遂できたと考えられる。

#### 引用文献

- 1) Tsuji A, Nakamura T, Shibata K. Biotin-deficient diet induces chromosome misalignment and spindle defects in mouse oocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015; 79:292-9.
- 2) Reeves, R. G.: Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J.*

Nutr. 1998; 127, 838S-41S.

3) Coppède F. The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Front Genet.* 2015; 6:223.

4) Teng YW, Cerdona I, Zeisel SH. Homocysteinemia in mice with genetic betaine homocysteine S-methyltransferase deficiency is independent of dietary folate intake. *J Nutr.* 2012; 142:1964-7.

5) Czerniecki J, Czygier M. Cooperation of divalent ions and thiamin diphosphate in regulation of the function of pig heart pyruvate dehydrogenase complex. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2001; 47:385-6.

6) Downs SM, Houghton FD, Humpherson PG, Leese HJ. Substrate utilization and maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes: evidence that pyruvate oxidation does not mediate meiotic induction. *J Reprod Fertil.* 1997; 110:1-10.

7) Yang X, Dunning KR, Wu LL, Hickey TE, Norman RJ, Russell DL, Liang X, Robker RL. Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reprod Fertil Dev.* 2010; 22:1262-71.

8) Liu M, Alimov AP, Wang H, Frank JA, Katz W, Xu M, Ke ZJ, Luo J. Thiamine deficiency induces anorexia by inhibiting hypothalamic AMPK. *Neuroscience.* 2014; 267:102-13.

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

Tsuji A, Noguchi R, Nakamura T, Shibata K. Folic Acid Deficiency Does Not Adversely Affect Oocyte Meiosis in Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2016;62(6):375-379. doi:10.3177/jnsv.62.375.

Tsuji A, Nakamura T, Shibata K. Effects of Mild and Severe Vitamin B<sub>1</sub> Deficiencies on the Meiotic Maturation of Mice Oocytes. *Nutr Metab Insights.* 2017;10:1-9 . 10:1178638817693824. doi: 10.1177/1178638817693824. eCollection 2017. PMID: 28469464

〔学会発表〕(計 1件)

辻愛, 中村肇伸, 柴田克己. 葉酸欠乏食を 59

日間投与しても卵子の質は劣化しない. 第70回日本栄養・食糧学会. 2016年5月13日~2016年5月15日. 武庫川女子大学.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
柴田克己 (SHIBATA Katsumi)  
滋賀県立大学・人間文化学部・生活栄養学科・教授

研究者番号: 40131479

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし