

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450380

研究課題名(和文)近赤外光照射による哺乳動物初期胚発生制御機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the effects of near-infrared laser irradiation on the in vitro development of mammalian embryos

研究代表者

横尾 正樹 (Yokoo, Masaki)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10396541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：体外で作出された受精卵の品質は低いことから、受精卵の品質を改善するための技術開発が求められている。我々は、近赤外光照射が哺乳動物受精卵の品質におよぼす影響について調査した。その結果、近赤外光を受精卵に照射することで、受精卵の発生能力を改善することが明らかとなった。その効果は発生ステージで異なっており、特に、発生が進んだ受精卵(胚盤胞)で顕著であった。さらに、近赤外光を照射した胚盤胞を移植し、受胎成績が改善されること、得られた産子が正常であることを明らかとした。これらの研究成果は、我々の技術が哺乳動物受精卵の品質改善技術として有用であることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Establishing an improved in vitro method is required for increasing the quality of embryos, and will contribute to enhancing reproductive efficiency in humans and domestic animals. In the present study, we assessed the effects of near-infrared laser irradiation on the in vitro development of mammalian embryos. Our study revealed that near-infrared laser irradiation of blastocyst stage embryos had positive effects on their subsequent development. Moreover, we revealed that near-infrared laser irradiation of blastocyst stage embryos improved live birth rates after embryo transfer. These results support that our method may be useful for improving the quality of embryos and contribute to improvements in reproductive technologies in mammals.

研究分野：動物生殖科学

キーワード：近赤外光 初期胚発生 マウス 家畜

1. 研究開始当初の背景

今日、体外で受精卵を生産して産子を得る受精卵移植技術は、畜産分野では優良家畜の増産や家畜改良に、医療分野(産婦人科領域)では不妊治療に欠かせない技術となっている。しかしながら、体外における受精卵の人為的操作は、受精卵の品質(生存性、活力)の低下、さらには治療成績の低下にもつながっていると考えられ、体外で作出された受精卵の品質を改善させることができる技術が強く求められている。

ミトコンドリアはATPを産生する重要な細胞内小器官であり、受精卵のエネルギー代謝の中心として重要な役割を果たしている。受精卵の発生過程では、細胞内のミトコンドリアが形態的に成熟し、活性も上昇する。また、受精卵のミトコンドリア活性は受精卵の孵化や着床能力とも関連していることが報告されている。これらのことから、受精卵の品質は、細胞内のミトコンドリア活性に依存していることが報告されている。つまり、体外で作出された受精卵の品質を改善させるためにはミトコンドリアをターゲットとした技術開発が必要であると考えられる。

このような研究背景のもと、これまでに我々は受精卵の品質(生存性、活力)に関する細胞学的、生化学的解析に取り組んできている。受精卵の品質に関する一連の研究において、我々は、近赤外光(波長: 904nm)がマウス受精卵のミトコンドリア機能を改善させる働きがあることを見出した。近赤外光とは700nm~1000nmの波長をもつ光で、医学領域では古くから創傷治癒や疼痛緩和を促すために広く使用されている。その作用機序の詳細は解明されていないが、最近、ミトコンドリア電子伝達系のシトクロムcオキシダーゼ活性を改善させることが報告された。これらの研究成果は、受精卵に対して近赤外を照射することにより、受精卵の品質を改善できる可能性を示唆している。しかし、近赤外光照射が受精卵の発生能力におよぼす影響や作用機序、さらには、受精卵や産子に対する安全性については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳動物の受精卵に対する近赤外光照射の効果を解明することにある。

(1) 近赤外光照射が受精卵の発生能力におよぼす影響

これまでの研究成果から、近赤外光が受精卵の品質を改善することが示唆される。そこで、近赤外光を照射したマウスおよびウシの受精卵を体外培養し、その後の発生能力にどのような影響をおよぼすのかを明らかにする。

(2) 近赤外光照射が受精卵の正常性におよ

ぼす影響

近赤外光を照射した受精卵の正常性が維持されているかどうかを評価するため、マウスを用いて受精卵移植試験を実施し、近赤外光を照射した受精卵の受胎性および得られた産子の正常性について明らかにする。

3. 研究の方法

受精卵に対して近赤外を照射することにより、受精卵の品質を改善できる可能性が示唆される。そこで、近赤外光が哺乳動物の受精卵の発生能に及ぼす影響を解析した。具体的には、体外受精で作出したウシ受精卵に対し、近赤外光(904nm)を1分間もしくは3分間照射し、照射48時間後の胚盤胞、孵化胚盤胞への発生率を評価した。さらに、受精卵の発生能力におよぼす近赤外光の影響を詳しく調査するため、受精卵の発生過程をタイムラプス受精卵観察装置でビデオ撮影し、発生速度および胚盤胞の構成細胞数について解析した。

また、同様の試験をマウス受精卵でも実施した。子宮灌流で得られたマウス2細胞期胚を体外培養し、2細胞期胚、8細胞胚、桑実胚、胚盤胞の各発生段階の受精卵に近赤外光(904nm)を1分間照射し、その後の孵化胚盤胞への発生能力をタイムラプス受精卵観察装置で解析した。さらに、近赤外光を照射した受精卵の正常性を明らかにするため、受精卵移植試験を実施した。近赤外光を1分間照射したマウス胚盤胞(10個前後)を仮親雌マウス(ICR系統)の片側子宮へ移植し、受胎率を解析した。さらに、得られた産子の成長や繁殖能力の有無についても調査した。なお、近赤外光を照射しなかった受精卵を移植した場合を対照区として評価した。

4. 研究成果

(1) 近赤外光照射がウシ体外受精卵の発生能力におよぼす影響

表1に示すように、体外受精5日目もしくは体外受精7日目で1分間照射した受精卵(1分照射区)および3分間照射した受精卵(3分照射区)の照射48時間後の胚盤胞発生率は、いずれも対照区と比べて有意な値を示した。良質な受精卵の割合を示す孵化胚盤胞発生率についても、対照区と比較して改善が見られた。

したがって、近赤外光を照射した試験区の胚盤胞発生率は、1分照射区および3分照射区のいずれも、近赤外光を照射しなかった対照区と比較して、培養成績が向上することが明らかとなった。特に、3分照射区では、体外受精5日目と体外受精7日目のいずれの照射タイミングでも対照区と比較して有意に発生率が向上した。また、近赤外光を照射した試験区では、より発育が進んだ孵化胚盤

胞が多く観察された。

また、体外受精7日目の3分間照射区で、照射48時間後の胚盤胞（孵化胚盤胞）の構成細胞数を解析したところ、対照区と比較して、近赤外光を照射した試験区で有意に多いことが明らかとなった（図1）。さらに、体外受精7日目の3分間照射区で、孵化胚盤胞に到達するまでの所要時間を観察したところ、近赤外光を照射した試験区で孵化胚盤胞までの到達時間が有意に短く、発生速度が向上することが明らかとなった（図2、3）。

以上のことから、近赤外光のウシ体外受精卵の発生能力を改善する効果が明らかとなり、近赤外光を短時間照射するだけで、ウシ体外受精卵の品質を簡便に向上できることが示唆された。

表1. ウシ体外受精卵の発生能力におよぼす近赤外光照射の影響

照射時期	照射時間	受精卵数	培養9日目	
			胚盤胞数 (%)	脱出胚盤胞数 (%)
対照区	0分	107	20 (18.7) ^a	2 (1.9) ^c
培養5日目	1分	96	28 (29.2) ^{ab}	10 (10.4) ^d
	3分	97	34 (35.1) ^{bc}	8 (8.2) ^d
培養7日目	1分	93	24 (25.8) ^{ac}	7 (7.5) ^{cd}
	3分	103	41 (39.8) ^b	11 (10.7) ^d

(a-b, c-d: P<0.05)

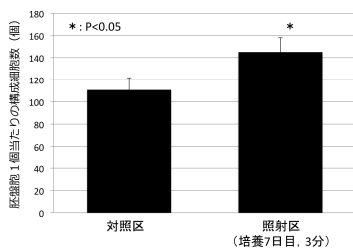


図1. 近赤外光照射がウシ体外受精卵の構成細胞数におよぼす影響

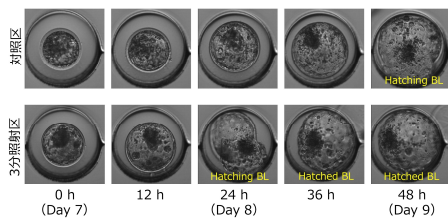


図2. 近赤外光照射がウシ体外受精卵の発生におよぼす影響

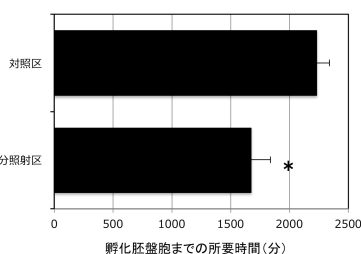


図3. 近赤外光照射がウシ体外受精卵の発生速度におよぼす影響

(2) 近赤外光照射がマウス受精卵の発生能力におよぼす影響

マウス受精卵においても、近赤外光照射の影響を解析した。近赤外光を照射したマウス胚は近赤外を照射しなかった受精卵と比較して、孵化胚盤胞に到達するまでの所要時間が短くなる傾向があった。特に、発生ステージが進んだ受精卵で効果が認められ、胚盤胞で照射した場合の所要時間は対照区と比較して有意に低い値を示した（図4）。

以上のことから、近赤外光はマウス受精卵においても発生能力を改善する効果があることが明らかとなった。特に効果が認められたのは胚盤胞であり、ウシ体外受精卵の実験結果と一致した。前述のように近赤外光の作用は細胞内のミトコンドリアをターゲットとしていることが報告されている。一方、受精卵のミトコンドリアは、桑実胚から胚盤胞にかけて機能的に成熟することも知られている。したがって、本研究で観察された近赤外光の作用は、ミトコンドリア機能が成熟した胚盤胞で、より効果が発揮されたと考えられた。

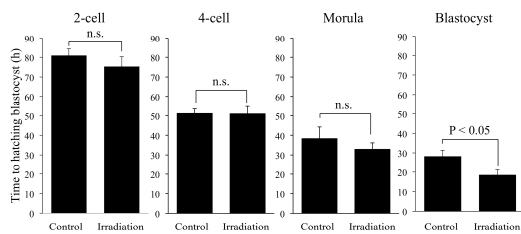


図4. 近赤外光照射がウシ体外受精卵の発生速度におよぼす影響

(3) 近赤外光照射が受精卵の正常性におよぼす影響

ここまでの研究結果から、近赤外光が哺乳動物受精卵の品質を改善する効果を有していることが明らかとなった。しかし、近赤外光を照射した受精卵を移植して受胎することができるのか、正常な産子は得られるのかという疑問が残されていた。そこで、近赤外光を照射した受精卵の正常性を評価するため、マウス受精卵の移植試験を実施した。近赤外光を1分間照射したマウス胚盤胞を移植したところ、対照区と比較して、受胎率、産子率のいずれも高い傾向が認められた。特に、産子率は対照区と比較して有意に高い値を示した（表2）。

また、得られた産子の成長を観察したところ、対照区および照射区で得られた産子の体重増加に差異は認められなかった（図5）。さらに、照射区の産子の交配試験を実施した

が、繁殖能力に異常は認められなかった。

以上、マウス受精卵移植試験の結果から、受精卵に近赤外光を短時間照射するだけで、受胎性を向上させることが可能であることが示唆された。さらに、近赤外光を照射した胚盤胞由来の産子は正常であり、受精卵に対する近赤外光の照射技術は安全であることが示唆された。

表2. 受胎率、産子率におよぼす近赤外光照射の影響

	No. of recipients	No. of transferred blastocysts	No. of pregnancy mice	Pregnancy rate (%)	No. of live pups	Live pups (%)
Control	17	182	14	82.4	54	29.7
Irradiation	18	195	18	100	92	47.2*

(*: P<0.05)

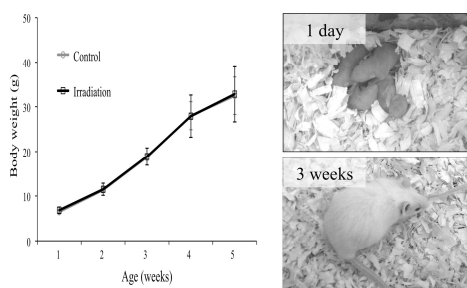


図5. 産子の成長におよぼす近赤外光照射の影響

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3件)

1. Masaki Yokoo, Miho Mori. Near-infrared laser irradiation improves the development of mouse pre-implantation embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 2017; 487; 415-418.
2. 横尾 正樹, 村上 拓也, 花倉 聡一. 日本短角種における過剰排卵処理の反応性に関する研究. *東北畜産学会報*, 査読有, 2016; 66: 33-39.
3. 横尾 正樹. 発情時の累積歩数と受胎性の関係. *臨床獣医(緑書房)*, 査読無, 2015, 33; 28-31.

[学会発表](計6件)

1. Masaki Yokoo, Miho Mori, Kurara Saga. Effects of near-infrared laser irradiation on the in vitro

development of mouse embryos. The 17th Animal Science Congress of AAAP. Fukuoka (Japan), 22-25 August 2016.

2. 横尾 正樹, 花倉 聡一, 佐藤 勝祥. 体外発生培地へのリポ酸添加がウシ受精卵の発生におよぼす影響. 第109回日本繁殖生物学会, 麻布大学(神奈川県相模原市), 2016年9月11日-15日.
3. 横尾 正樹, 森 美穂. マウス初期胚への近赤外照射が体外発生および受胎性に及ぼす影響. 第57回日本卵子学会, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市), 2016年5月14日-15日.
4. 横尾 正樹, 村上 拓也, 花倉 聡一, 小池 晶琴. 日本短角種繁殖牛のFSH反応性に関する研究. 第65回東北畜産学会, 東北大学(宮城県仙台市), 2015年8月27日-28日.
5. 横尾 正樹, 中村 彰太, 佐藤 寿春, 花倉 聡一. ウシ体外受精卵の初期発生能におよぼす近赤外光刺激の影響. 第108回日本繁殖生物学会, 宮崎大学(宮城県宮崎市), 2015年9月17日-20日.
6. 横尾 正樹, 井上 遙, 工藤 恵利子, 花倉 聡一, 小池 晶琴. ウシ体外成熟培地へのクロロゲン酸添加が初期胚発生におよぼす影響. 第119回日本畜産学会, 宇都宮大学(栃木県宇都宮市), 2015年3月28日-30日.

[図書](計1件)

1. 横尾 正樹, 清水 隆, 佐藤 英明. II 生殖系列細胞1生物における生殖戦略. 日本卵子学会編, 生殖補助医療(ART)-胚培養の理論と実際. 近代出版; 2017; 29-36.

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 哺乳動物の胚処理方法及び胚
 発明者: 横尾 正樹
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 2015-024211
 出願年月日: 2015年2月10日
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

横尾 正樹 (YOKOO, Masaki)
 秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
 研究者番号: 10396541