

学 位 論 文 要 旨

氏名 Do Thi Kim Lanh

題 目 : **Studies of antioxidant effects during in vitro maturation on the development of porcine embryos**

論文要旨 :

Recent studies have demonstrated that, antioxidant supplementation could improve the in vitro embryo development in many species. The present studies were conducted to investigate the effects of sericin, melatonin, and astaxanthin on the development of porcine embryos when supplemented during in vitro maturation (IVM).

The first study aimed to examine the effects of sericin supplementation during in vitro oocyte maturation on the nuclear maturation, fertilization, and development of porcine oocytes. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured in maturation medium supplemented with 0 (control), 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, or 5.0% sericin and were then subjected to in vitro fertilization and embryo culture. More COCs matured with 1.0% sericin underwent germinal vesicle breakdown and reached metaphase II compared with the control COCs matured without sericin ($P < 0.01$). The proportions of oocytes with DNA-fragmented nuclei did not differ between the groups, regardless of the sericin level. The total fertilization rate of oocytes matured with 1.0% sericin was higher ($P < 0.05$) than that of oocytes matured with 0.1%, 2.5%, and 5.0% sericin. Supplementation with more than 1.0% sericin decreased the DNA fragmentation index of the blastocysts compared with the control group ($P < 0.05$). However, the supplementation of the maturation medium with sericin had no beneficial effects on the cleavage, development to the blastocyst stage, and the total cell number of the embryos. Our findings indicate that supplementation with 1.0% sericin during maturation culture may improve the nuclear maturation and the quality of the embryos but does not affect blastocyst formation.

Melatonin has been reported to improve the in vitro development of embryos in some species. The present study was conducted to investigate the effect of melatonin supplementation during IVM and development culture on the development and quality of porcine embryos. In the first experiment, when the in vitro-fertilized embryos were cultured with different concentrations of melatonin (0, 10, 25, and 50 ng/ml) for 8 days, the blastocyst formation rate of embryos cultured with 25 ng/ml melatonin (10.7%) was significantly increased ($p < 0.05$) compared to the control embryos cultured without melatonin (4.2%). The proportion of DNA-fragmented nuclei in blastocysts derived from embryos cultured with 50 ng/ml melatonin was significantly lower ($p < 0.05$) than that of embryos cultured without melatonin (2.1% vs. 7.2%). In the second experiment, when oocytes were cultured in the

maturation medium supplemented with different concentrations of melatonin (0, 10, 25, and 50 ng/ml), fertilized, and then cultured with 25 ng/ml melatonin for 8 days, there were no significant differences in the rates of cleavage and blastocyst formation among the groups. However, the proportions (2.7%-5.4%) of DNA-fragmented nuclei in blastocysts derived from oocytes matured with melatonin were significantly decreased ($p < 0.05$) compared to those (8.9%) from oocytes matured without melatonin, irrespective of the concentration of melatonin. Our results suggest that supplementation of the culture media with melatonin (25 ng/ml) during IVM and development has beneficial effects on the developmental competence and quality of porcine embryos.

Heat stress can lead to a variety of disorders in reproductive functions such as impairment of oocyte maturation, fertilization, and embryonic development. Astaxanthin, one of the most common carotenoids, elicits antioxidant effects on the cellular viability and embryonic development. This study was conducted to investigate the effects of astaxanthin on maturation, fertilization and development of porcine oocytes matured in vitro under heat stress conditions, and then fertilized and cultured under standard conditions. Porcine oocytes were cultured in maturation medium supplemented with different concentrations of astaxanthin (0, 0.25, 0.5 or 1 ppm) for 46 h at either 38.5 or 41 °C. In comparison to oocytes cultured at 38.5 °C, the exposure of porcine oocytes to 41.0 °C during IVM significantly inhibited their maturation and development of fertilized oocytes to the blastocyst stage. Supplementation of maturation medium with astaxanthin (0.5 ppm) significantly improved oocyte maturation, fertilization and development to the blastocysts stage in both oocyte groups. However, the total cell number and the apoptosis index of blastocysts did not differ among groups. Moreover, astaxanthin (0.5 ppm) significantly increased the rate of oocytes reached metaphase II and decreased proportion of apoptotic oocytes exposed to H₂O₂ (1.0 mM) during IVM. In summary, we demonstrated that supplementation of the maturation medium with astaxanthin (0.5 ppm) exerted antioxidative effects and improved the ability of maturation, fertilization, and development of porcine oocytes exposed to heat stress.

In conclusions, our findings indicated that the supplementation of antioxidant during in vitro maturation or development has significant benefits on the developmental competence of the porcine embryos by reducing oxidative stress, which is a major detrimental effect on in-vitro culture system. Supplementation with either 1.0% sericin, 25 ng/ml melatonin, or 0.5 ppm astaxanthin has particularly beneficial effects on oocyte maturation, fertilization, and their development to the blastocyst stage. Astaxanthin may be further effective for the protection of porcine oocytes that are exposed to heat stress or H₂O₂.

学位論文審査の結果の要旨

| | |
|---|---|
| 氏 名 | Do Thi Kim Lanh |
| 審 査 委 員 | 主 査：山口大学 教授 山本 芳実 |
| | 副 査：山口大学 教授 佐藤 宏 |
| | 副 査：山口大学 教授 田浦 保穂 |
| | 副 査：山口大学 教授 高木 光博 |
| | 副 査：農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 主席研究員 菊地 和弘 |
| 題 目 | <p>Studies of antioxidant effects during in vitro maturation on the development of porcine embryos (豚胚の発育に及ぼす体外成熟過程での抗酸化効果に関する研究)</p> |
| <p>審査結果の要旨：</p> <p>暑熱等のストレス環境下では初期胚発生や生殖細胞レベルで悪影響を及ぼし、細胞内活性酸素の増加に伴って発生初期胚の死滅を引き起こす。近年、様々な抗酸化物質の活性酸素除去作用が研究されており、抗酸化物質を用いた生体内の胚発育環境の改善が期待できるようになってきた。そこで本研究では、抗酸化物質の一つであるシルク由来のセリシン、松果腺から分泌されるメラトニンおよびカルテノイドの一種のアスタキサンチンを成熟培地に添加することにより、豚胚の発育能の改善を試みている。</p> <p>研究 1 では、成熟培地へのセリシン添加が体外成熟、体外受精および胚発育に及ぼす影響を調べた。無添加（対照）、0.1、0.5、1.0、2.5 および 5.0% (w/v) セリシンを添加した成熟培地で豚卵母細胞を培養し、体外受精および体外培養を行った結果、体外成熟後に 1% 添加群で卵核胞崩壊および第二減数分裂中期に達する割合が対照に比較して増加し、セリシンの添加濃度にかかわらず成熟卵子における DNA 崩壊率の低下が認められた。さらに、1% 添加群から発生した胚盤胞における DNA 崩壊率は対照に比較して低下した。しかしながら、セリシン添加は、体外受精後の胚発育率を改善しなかった。これらのことから、成熟培養過程での 1% セリシン添加は、核成熟および胚の品質を改善するが、胚盤胞形成率を向上させるものでないことが判明した。</p> <p>研究 2 では、成熟培地および発生培地へのメラトニン添加が体外成熟、体外受精および胚発育に及ぼす影響を調べた。体外受精胚を用い、無添加（対照）、0、10、25 および 50 ng/ml のメラトニンを添加した発生培地で 8 日間培養した結果、25 ng/ml 添加群で胚盤胞形成率が増</p> | |

加し、50 ng/ml 添加群由来の胚盤胞における DNA 崩壊率の低下が認められた。次に、同濃度のメラトニンを添加した成熟培地で培養した卵母細胞を体外受精後、25 ng/ml メラトニン添加の発生培地で培養した結果、胚盤胞形成率に差は認められなかったが、成熟培地へのメラトニン添加により DNA 崩壊率の低下が認められた。このことから、成熟・発生培地へのメラトニン添加は、胚発育能及び品質を向上させることが判明している。

研究 3 では、高温での成熟培養条件下でのアスタキサンチン添加効果を検討した。無添加(対照)、0.25、0.5、および 1 ppm アスタキサンチンを添加した成熟培地で 38.5℃ (対照) および 41℃ の温度条件下で豚卵母細胞を培養し、体外受精および体外培養を行った結果、41℃ の温度条件下で成熟培養された卵母細胞の成熟率及び発生率は低下し、0.5 ppm アスタキサンチンを添加することにより、高温化培養条件でも成熟率、受精率および発生率が改善されることが認められた。さらに、成熟培養過程で 1.0mM 過酸化水素に暴露した卵母細胞の成熟率およびアポトーシス発生率は 0.5 ppm アスタキサンチン添加により改善されることが確認された。このことから、0.5 ppm アスタキサンチン添加は卵母細胞への酸化ストレスを低減することにより、高温ストレス条件下の卵母細胞の成熟およびその後の胚発生を改善すると推察した。

本研究は、起源の異なる 3 種類の抗酸化物質について、いずれも豚卵母細胞の成熟過程での添加効果を検討し、抗酸化的効果として胚の発育や品質を改善したと推定している。また、その効果的な濃度は、1%セリシン、25ng/ml メラトニン、0.5 ppm アスタキサンチンであった。さらに、3 種類の抗酸化物質の中でも、暑熱ストレスにおいてはアスタキサンチンがより効果的ではないかと推察している。

これら抗酸化剤効果の検証は、畜産領域での暑熱対策とし国際的に高く評価されており、世界的な温暖化に伴う高温飼養下での繁殖障害の対策として、また高品質の胚生産方法として寄与すると考えられることから、本論文は博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしいと判断された。