

ISSN 2185-6230 (Online)

# Journal of REPRODUCTION ENGINEERING

June 2015  
Vol. 17, No. 1: 1-12

J. Reprod. Engineer.

Japan Society for  
Reproduction Engineering

**SRE**



## Japan Society for Reproduction Engineering

<http://sreprod.jp/Index.htm>

### --- Honorary Member ---

Tomonori IMAMICHI  
Takayoshi INO

Shyoso OGAWA  
Shuetsu SUZUKI

### --- Special Advisory Board ---

Masayuki GOTO

### --- Board of the Council ---

(from April 1, 2013 to March 2016)

**Chief:** Naomi KASHIWAZAKI

Kiyoshi AKIYAMA  
Kenji FURUI  
Hiroaki INUI  
Bunpei ISHIZUKA  
Junya ITO  
Masahiro KANEDA  
Kazuhiro KIKUCHI  
Yoshiharu MORIMOTO

Hiroshi NAGASHIMA  
Tatsuya OSHIO  
Junko OTSUKI  
Koji SUGIURA  
Akihiro TADA  
Hitoshi USHIJIMA  
Hiroaki YOSHIDA

### Auditors

Katsuhiko HAYASHI

Tsutomu TAKESHIMA

### Office

Azabu University  
Laboratory of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine  
Sagamihara 252-5201, Japan.

TEL: +81-42-769-2339 FAX: +81-42-769-1762

# Journal of REPRODUCTION ENGINEERING **JRE**

<http://sreprod.jp/Contents.htm>

## --- Editorial Board ---

### Co-Editors-in-Chief

For human medicine:

Kenji FURUI, MD & Ph.D., Clinic Mama

For animal & basic studies:

Kazuhiro KIKUCHI, DVM & Ph.D., National Institute of Agrobiological Sciences

### Managing Editor

Michiko NAKAI, Ph.D., National Institute of Agrobiological Sciences

### Editorial Board Members

Horoaki INUI, MD & Ph.D., Inui Maternity Clinic

Tatsuya OHSIO, MD & Ph.D., Tokyo Bay Ladies Clinic, Nihon University

Kunihiko TOMINAGA, MD & Ph.D., Loma Linda Clinic

Junya ITO, Ph.D., Azabu University

Hitoshi USHIJIMA, Ph.D., Nippon Veterinary and Life Science University

Katsuhiko HAYASHI, Ph.D., Kyoto University

Masahiro Kaneda, DVM & Ph.D., Tokyo University of Agriculture and Technology

### Editorial Office

National Institute of Agrobiological Sciences

Division of Animal Sciences, Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

TEL: +81-298-838-7447 FAX: +81-29-838-7408

**J. Reprod. Engineer.**  
**2015; Volume 17, Number 1**

**Contents**

= Original Article =

**Masayasu TANIGUCHI and Takeshige OTOI**

Influence of large follicles on oestrus induction and ovulation after  
embryo collection in superovulated Japanese Black cows

1-5

= 短報 =

中田久美子

培養液中のノルエピネフリン量測定によるヒト胚盤胞の評価方法

7-12

= Original Article =

# Influence of large follicles on oestrus induction and ovulation after embryo collection in superovulated Japanese Black cows

Masayasu TANIGUCHI<sup>†</sup> and Takeshige OTOI

Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, Yamaguchi, 753-8515, Japan

<sup>†</sup>Correspondence: masa0810@yamaguchi-u.ac.jp

## ABSTRACT

This study evaluated whether large follicles (LF; greater than 18 mm in diameter) affect the return to oestrus and ovulation after embryo collection. Eleven superovulated Japanese Black cows were used as donors. Group 1 had LF (N = 6), and Group 2 had no LF (N = 5). All cows received 0.5 mg prostaglandin F<sub>2</sub>α after embryo collection. No differences were observed between the two groups with regard to the superovulatory response and hormonal state at the time of embryo collection. Moreover, the interval to luteolysis, defined by plasma progesterone levels lower than 1ng/mL, did not differ between the two groups. However, the interval from embryo collection to the appearance of the dominant follicle, to oestrus and to ovulation was longer in Group 1. The present results suggest that the presence of LF prolongs the interval to the appearance of the new dominant follicle, thereby delaying oestrus and ovulation induction after embryo collection.

**Key words:** large follicles, after embryo collection

## INTRODUCTION

Multiple ovulation and embryo transfer programs have been used worldwide to hasten genetic improvement and increase the number of offspring from highly valued donor cows. Rapid return to oestrus and regular cyclicity after embryo collection shortens the calving interval of donor cows and improves the efficiency of embryo production [2,4,5]. In superovulated cows, prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) (dinoplost) or its analogues (cloprostenol and fenprostalene) have been used to induce oestrus after embryo collection [1,2,5]. However, the interval from embryo collection to oestrus after F<sub>2</sub>α treatment was considerably prolonged compared to normal cyclic cows [3,6]. Several strategies using PGF<sub>2</sub>α after embryo collection to shorten the interval to oestrus induction have been studied. Some authors have reported the effect of different analogues of PGF<sub>2</sub>α [5,6]. Others have evaluated the timing of PGF<sub>2</sub>α treatment or dosage of

PGF<sub>2</sub>α [8,10]. Previous studies have demonstrated that 60–70% of superovulated cows exhibited oestrus within 10 days after PGF<sub>2</sub>α treatment [1,2]. This study was designed to evaluate whether large follicles (LF) present at the time of embryo collection affect oestrus induction and ovulation after embryo collection in Japanese Black donor cows.

## MATERIALS AND METHODS

Eleven Japanese Black cows were used as the donors in this experiment. Superovulation treatments were initiated mid-cycle (9–12 days after oestrus) by treatment with 21 Armour units of follicle stimulating hormone (Antrin-R10; Kyoritsu Seiyaku Corp., Tokyo, Japan) administered intramuscularly in seven injections of decreasing doses at 12-h intervals. On the third day, the cows received 0.5 mg PGF<sub>2</sub>α (cloprostenol, Resipron-C, Asuka Seiyaku Corp., Tokyo, Japan) to induce regression of the corpus luteum and were artificially

Submitted: February 11, 2015

Accepted: March 24, 2015

Advance Publication: March 27, 2015

inseminated 60–72 h later. Embryos were collected 7 days after artificial insemination (Day 0).

All cows received 0.5 mg  $F_2\alpha$  immediately after embryo collection and were allocated to one of two groups: cows (N = 6) with one or more LF greater than 18 mm in diameter (Group 1) and cows (N = 5) with no large follicles (Group 2). Oestrus was detected by visual observation performed twice daily after embryo collection. The collected ova/embryos were evaluated for fertilization and grade quality (excellent, good, fair, poor, and degenerated) according to the guidelines of the International Embryo Transfer Society [11]. Ovarian follicular populations were examined using a real-time B-mode scanner equipped with a 5.0-MHz transducer (Aloka SSD-500, ALOKA Co., Ltd., Tokyo, Japan). The size and number of ovarian follicles >5 mm were recorded, as were the size and number of follicles and the presence or absence of corpora lutea (CL). The cystic structure with the hyperechogenic luteinized wall was classified into the CL. Emergence of a follicular wave was defined as the day that the dominant follicle was retrospectively identified at a diameter of 5 mm [14]. Ovarian ultrasonographic examinations and blood sample collection were performed every day from Day 0 to next ovulation.

Just prior to ultrasonography, blood samples were collected from the coccygeal vein, put on ice for up to 1 h, and then centrifuged at 3000 rpm for 30 min at 4 °C. Plasma was separated and stored at –80 °C. Plasma progesterone (P4) and oestradiol (E2) concentrations were measured with a time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) system as previously reported [15]. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 6.6% and 8.4%, respectively, for P4 and 10.2% and 17.4%, respectively, for E2. These measurements were taken once daily until the next ovulation. Data are expressed as mean values  $\pm$  standard error of means (SEM). The mean values concerning the concentrations of hormones and ovaries after embryo collection between the two groups were analyzed using Student's t-test. The dynamic state of P4 and E2 were analysed by repeated analysis of variance using the GLM procedure of SAS (SAS for Windows, version 9.1, SAS Inst. Japan, Inc., Tokyo, Japan). The statistical model included follicle size and day and two-way interactions. When significant interactions were not observed between the two

parameters, they were excluded from the model. Values of  $P < 0.05$  were considered to be significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

The numbers of collected ova/embryos between Groups 1 and 2 were not significantly different ( $13.5 \pm 3.3$  and  $10.0 \pm 3.3$ ), or in transferable embryos ( $5.7 \pm 1.7$  and  $4.6 \pm 2.2$ ), nor were there differences in the percentages of transferable embryos ( $50.0 \pm 12.7\%$  and  $36.0 \pm 11.4\%$ ), as previously reported [13].

Misra *et al.* [12] reported that in superovulated buffalo, an increase in the number of ovulations (>5) significantly delayed the return to oestrus. However, in this study, more than 5 ova/embryos were collected from all of the cows. In agreement with Maciel *et al.* [9], all donors returned to oestrus and ovulation occurred within 13 days after embryo collection.

As shown in Figure 1, ultrasonographic examination indicated that all follicles present at the time of embryo collection regressed regardless of their size and that induced oestrus was detected with a new dominant follicle (DF). These results are in agreement with previous reports [10]. Moreover, Lucy *et al.* [8] reported that ovarian remnants of superovulation (CL and nonovulated follicles) remain on the ovary for 25 days from the day of artificial insemination. Likewise, these follicles at the time of embryo collection could be due to the lack of ovulation.

Group 1 had more follicles ( $P < 0.05$ ) than did Group 2 and the diameter of the largest follicle was greater ( $P < 0.05$ ). The number of CL and the concentration of P4 at the time of embryo collection did not differ between the two groups (Table 1).

The results of daily plasma P4 and E2 concentrations are shown in Figure 2. The plasma P4 concentration on day 0 were higher than other days in Group 1 and Group 2 respectively ( $P < 0.01$ ). The effect of  $PGF_{2\alpha}$  on luteolysis was assessed by the reduced CL sizes detected by ultrasonography and by a decrease of P4 concentration on the following days [7]. The dynamic state of plasma P4 and E2 did not differ between the two groups. Moreover, the average interval from embryo collection to luteolysis ( $P4 < 1$  ng/ml) did not differ between the two groups, as reported in previous studies [9]. However, Group 2 had longer ( $P < 0.05$ ) intervals

**Table 1.** The dynamic state of hormones and ovaries after embryo collection

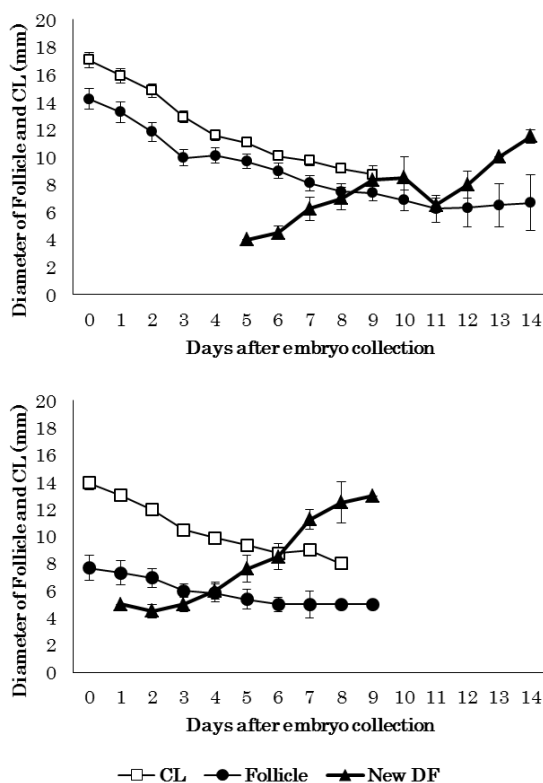
	Group (n)	
	Group 1 <sup>#</sup> (6)	Group 2 <sup>§</sup> (5)
Number of follicles*	9.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.5 <sup>b</sup>
Number of corpus lutea*	7.0 ± 1.6	6.8 ± 1.0
Diameter of largest follicle (mm)*	20.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	10.6 ± 1.9 <sup>b</sup>
Concentration of E2 (pg/ml)*	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.3
Concentration of P4 (ng/ml)*	22.8 ± 4.4	13.6 ± 3.3
Days until P4 <1 ng/ml**	4.0 ± 0.7	3.6 ± 0.7
Days until appearance of the dominant follicle**	5.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.7 <sup>b</sup>
Day of oestrus**	10.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	7.2 ± 0.7 <sup>b</sup>
Day of ovulation**	11.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.7 <sup>b</sup>

<sup>#</sup> 18 mm < <sup>§</sup> <18 mm

\* Ovarian and hormonal status at the time of embryo collection.

\*\* The interval from embryo collection.

<sup>a,b</sup> Values with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



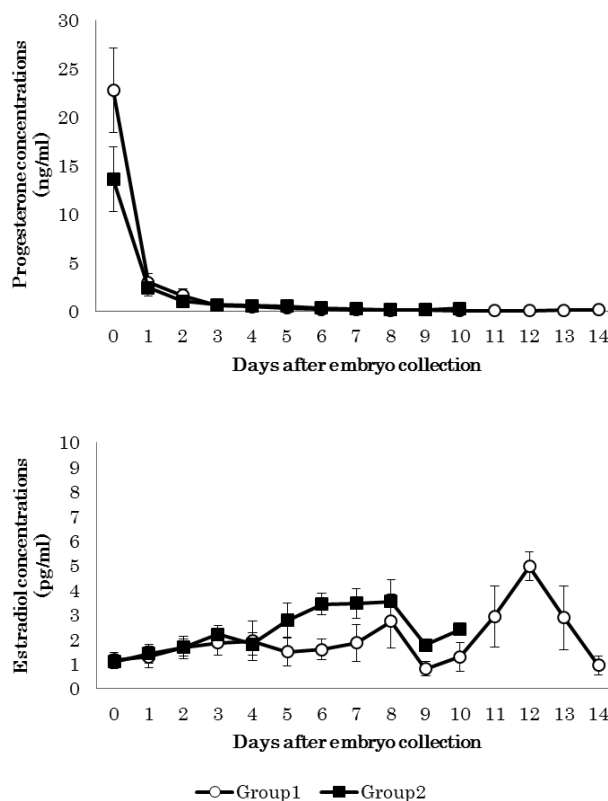
**Figure 1.** Mean ±SEM profiles of corpora lutea (CL:□), follicles present at the time of embryo collection (●) and new dominant follicle (DF: ▲) diameters after embryo collection to next ovulation in Group 1 (cows with one or more large follicles >18 mm in diameter) and Group 2 (cows with no large follicles).

from treatment to the first ovulation. Maciel et al. [9] suggested that the ovulating follicle started to grow 3 to 4 days after PGF<sub>2α</sub> injection, and, in very few cases, those present at the time of embryo collection reached ovulation. It is reasonable to suggest that this delay to the

first ovulation may be attributable to the interval from PGF<sub>2α</sub> treatment to the appearance of the new DF (Table1).

It has been shown that exogenous oestradiol and progesterone can control the follicular wave. The high

## Ovarian activity after embryo collection



**Figure 2.** Mean  $\pm$  SEM. profiles of plasma concentrations of progesterone (P4) and estradiol (E2) after embryo collection to next ovulation in Group 1 ( $\circ$ ) and Group 2 ( $\blacksquare$ ).

concentration of oestrogen and progesterone induces regression of FSH-dependent follicles (by oestrogen) and LH-dependent follicles (by the synergistic action of oestrogen and progesterone), followed by emergence of a new follicular wave after FSH resurgence [14]. It would perhaps have been expected that the amount of oestradiol would be higher in Group 1 since their ovaries clearly had more large follicles. However, no such difference in plasma oestradiol concentration at the time of embryo collection was detected in the present study. Furthermore, it did not differ from the density of a luteal phase in normal oestrus cycle cows. Therefore, other intrafollicular factors (*e.g.*, inhibin) which suppress FSH release from pituitary [16] may prolong the interval to the appearance of the new dominant follicle.

In conclusion, the presence of LF at the time of embryo collection may delay oestrus induction and subsequent first ovulation after embryo collection, which is attributed to the interval from treatment to the appearance of the new DF. However, the underlying mechanism remains unclear. In future studies, we intend to investigate other effectors of LF.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Emi Sasaki for assistance with hormonal analyses.

## REFERENCES

1. **Ali Dinar M, Diskin MG, McDonagh T, Sreenan JM.** Oestrous and ovarian responses in repeatedly superovulated cows (abstract). *Theriogenology*. 1987; 27: 201.
2. **Chupin D, Touze JL, Procureur R.** Early rebreeding of donor cows (abstract). *Theriogenology*. 1984; 21: 231.
3. **Desaulniers DM, Guay P, Vaillancourt D.** Estrus induction with prostaglandin F2alpha, cloprostenol or fenprostalene during the normal estrous cycle, superovulation and after embryo collection. *Theriogenology*. 1990; 34: 667–682.
4. **Dorn CG, Martin LA, Farr JM, Kraemer DC.** Maintenance of calving interval in superovulated-cattle (abstract). *Theriogenology*. 1990; 33: 218.
5. **Halbert GW, Leslie KE, Walton JS, Betteridge KJ.** Evaluation of return to estrus in superovulated dairy heifers following prostaglandin treatment (abstract). *Theriogenology*. 1989; 31: 201.
6. **Jones AL, Staples TR, Page RD.** Enhanced return to oestrus in superovulated heifers using fenprostalene (abstract). *Theriogenology*. 1986; 25: 161.
7. **Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ.** Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and



- plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*. 1990; 33: 1269–1278.
8. **Lucy MC, Macmillan KL, Thatcher WW, Drost M, Tan HS.** Effect of timing of prostaglandin PGF 2 alpha injection subsequent to embryo collection on the resumption of normal follicular development following superovulatory treatment in cattle. *Theriogenology*. 1990; 34: 7–19.
  9. **Maciel M, Gustafsson H, Rodriguez-Martinez H.** Ovarian activity in superovulated dairy cattle following cloprostenol injection on the day of embryo collection. *J. Reprod. Dev.* 1996; 42: 73–80.
  10. **Mapletoft RJ, Bo GA, Willmott N, Pierson RA.** The effect of dose of cloprostenol on return to oestrus of superovulated donor cows (abstract). *Theriogenology*. 1991; 35: 237.
  11. **Stringfellow DA, Seidel SM.** Manual of the international embryo transfer society (3rd ed.) International Embryo Transfer Society, Savoy, IL, 1998.
  12. **Misra AK, Pant HC.** Estrus induction following PGF2alpha treatment in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2003; 59: 1203–1207.
  13. **Otoi T, Koyama N, Yamamoto K, Tachikawa S, Suzuki T.** Superovulatory responses in Japanese black beef cows following largest follicle aspiration or human chorionic gonadotrophin (hCG) treatment. *J. Vet. Med. Sci.* 1998; 60: 961–963.
  14. **Taniguchi M, Ikeda A, Arikawa E, Shimizu R, Seki M, Karaki M, Rajamahendran R, Otoi T.** Ovarian follicular and corpus luteum changes, progesterone concentrations, estrus and ovulation following oestradiol benzoate/progesterone based treatment protocol in cross-bred cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 99: 389–394.
  15. **Takahashi T, Hamanaka S, Imai K, Hashizume K.** A direct time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) for measuring plasma oestradiol-17beta concentrations in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 2004; 66: 225–229.
  16. **Lussier J, Carruthers T, Murphy B.** Effects of bovine follicular fluid and partially purified bovine inhibin on FSH and LH release by bovine pituitary cells in culture. *Reprod Nutr Dev* 1993; 33: 109–119.



Japan Society for Reproduction Engineering



= 短報 =

## 培養液中のノルエピネフリン量測定によるヒト胚盤胞の評価方法 The method for evaluating human blastocyst by norepinephrine level in blastocyst culture medium

中田久美子  
Kumiko NAKATA

山下湘南夢クリニック 高度生殖医療研究所, 〒251-0025 神奈川県藤沢市  
k\_nakata@hotmail.com

### 要旨

現在の高度生殖医療において主流になっている胚盤胞移植では、移植胚の選択は形態的評価に基づいて行われている。しかし、形態学的手法による胚評価が必ずしも正確でないことは知られており、多胎防止のためのSingle embryo transferの社会的要請からも、胚に対して非侵襲的で、より正確な胚評価法の確立が求められている。本研究では、Liquid Chromatography Hybrid Mass Spectrometry (LC-Hybrid-MS)法(超高速液体クロマトグラフmaXis3G、ブルガー・ダルトニクス社製)にて培養液中の成分を検出し、同定および定量を行った。さらに当該胚を移植した妊娠成績と比較検討することで、新たな非侵襲的化的胚盤胞評価法の確立を試みた。その結果、ヒト胚盤胞培養液中からノルエピネフリンが初めて同定された。さらに、発育停止胚および胚盤胞移植後に妊娠非継続だった胚盤胞の培養液からは、妊娠継続した胚盤胞培養液よりも有意に高い濃度のノルエピネフリンが検出された。ノルエピネフリンの胚での発現を調べるためにマウス胚盤胞においてノルエピネフリンの合成酵素であるDopamine- $\beta$ -Hydroxylase (DBH)の免疫蛍光染色を行った。マウス胚盤胞だけでなくヒト胚盤胞においても同様にDBHの発現が確認された。培養液中のヒト胚由来の代謝成分として、ノルエピネフリンが検出されたという報告はなく、なおかつ妊娠との相関性が示されたのは本研究が初めてである。以上から、胚盤胞培養後に廃棄する培養液からのノルエピネフリン量を定量することは、胚盤胞の新たな評価方法となることが示唆された。

**キーワード:** 胚盤胞, 胚評価, LC-Hybrid-MS法, ノルエピネフリン, Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase

### 序論

女性の社会進出による晩婚化とそれに伴う挙児希望年齢の高齢化は不妊の要因となっている。このため、不妊治療を受けている患者総数は近年顕著に増加しており、例えば、平成16年の体外受精による出生児が18,168人で総出生児数の1.64%であったのに対し、平成22年は28,945人で総出生児の2.7%に達するまでになっている[6]。生殖医療に起因する問題点のひとつに多胎がある。多胎は排卵誘発剤を使用したTiming治療や人工授精あるいは体外受精や顕微授精等高度生殖医療における複数胚移植によっておこるが、未熟児や低体重児の増加、妊娠性高血圧症など妊娠合併症の増加、帝王切開率の増加など様々な産科的リスクを上

昇させる。このため、高度生殖医療では多胎の防止が大きな課題となっており、単一胚移植(Single Embryo Transfer, SET)がこの課題の解決法として注目されてきた。しかし、移植胚数を減らすことは治療成績の低下につながることから、単一胚の移植でも妊娠率の低下を最小にする良質な移植胚選択法の開発が急務となっている。現在、移植胚の選択はGardner分類[5]やVeck分類[13]など形態学基準に基づいて行われている。しかし、形態学的良好胚で妊娠せず、形態学的に劣るとされた胚の移植で妊娠することは臨床的にしばしば経験され、この事実は形態学的分類法の限界を示している。このため胚のViability妊孕性を正確に反映し、かつ胚に負担を与えない非侵襲的機能的胚評価法の開発が待望

投稿日: 2013年11月11日  
掲載決定日: 2015年5月26日  
ウェブサイト事前公開日: 2015年5月29日

表 1. ヒト胚盤胞の発生培養液から LC-Hybrid-MS 法により検出された成分結果

No.	検出時間 m/z	化学式	物質名
1	233.0926	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	? (fragment of ?1)
2	251.0304	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	?
3	136.0762	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO	Acetoanilide?
4	175.0243	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	aconitic acid
5	205.0977	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N-Acetyl-Tryptophan fragment
6	175.1195	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Arginine
7	197.1014	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>2</sub>	Arginine Na salt
8	133.0613	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Asparagine
9	134.0453	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	Aspartic acid
10	162.1130	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub>	carnitine
11	149.0603	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	Cinnamic acid
12	193.0348	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	citric acid
13	215.0162	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> NaO <sub>7</sub>	citric acid Na salt
14	210.0611	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>7</sub>	citric acid NH <sub>4</sub> salt
15	241.0317	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	Cystine
16	167.0933	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O	FAMP (N-Formyl-amino-aminomethyl-methylpyrimidine)
17	180.0872	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub>	Glucosamin
18	147.0770	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Glutamine
19	203.0532	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NaO <sub>6</sub>	Hexose Na salt
20	156.0773	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Histidine
21	188.0706	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	indoleacrylic acid
22	245.0921	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	indolylacryloyl Glycine (IAG)
23	132.1025	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>	Leucine/Isoleucine
24	154.0844	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NNaO <sub>2</sub>	Leucine/Isoleucine Na salt
25	147.1134	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Lysine
26	169.0953	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>2</sub>	Lysine Na salt
27	150.0589	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub> S	Methionine
28	218.1141	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	N-Acetyl Citrulline
29	240.0956	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>2</sub>	N-acetyl citrulline Na salt
30	247.1083	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	N-Acetyl Tryptophan
31	269.0902	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>3</sub>	N-Acetyl Tryptophan Na salt
32	170.0818	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>	Norepinephrine
33	220.1179	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>5</sub>	Panthenic acid
34	166.0868	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	Phenylalanine
35	188.0682	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NNaO <sub>2</sub>	Phenylalanine Na salt
36	116.0712	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	Proline
37	138.0531	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NNaO <sub>2</sub>	Proline Na salt
38	263.0967	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> OS	Thiamin aldehyde
39	120.0661	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub>	Threonine
40	182.0817	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>	Tyrosine
41	204.0637	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NNaO <sub>3</sub>	Tyrosine Na salt
42	118.0869	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	Valine

されている。最近、プロテオームやメタボローム的なアプローチにより培養胚から分泌されるタンパク質の同定を行い、良好胚の化学的機能的選択法の開発が試みられてきたが、未だ新評価法の確立には至っていない。

このような現状の中で、本研究では、ヒトならびにマウス胚を用い、胚培養液中に培養胚から代謝される微量な物質を超高速液体クロマトグラフmaXis3Gにより同定、定量し、ノルエピネフリンであることを特定することを目的とした。胚でのノルエピネフリンの局在を調べ、胚から

分泌される物質であることを確認し、その結果を後方視的に臨床成績と比較した。本研究の結果は、非侵襲的にかつ胚のViability妊孕性を正確に反映する化学的機能的胚評価法になる可能性がある。

## 材料と方法

### 対象患者と胚の培養方法

2011年10月から2012年7月までに自然周期またはクロミフェン周期にて卵巣刺激し、単一胚盤胞移植を施

行した33周期を対象とした。患者の平均年齢は $36 \pm 4.8$ 歳であった。患者から採取した卵子に体外受精および顕微授精を施行し、20時間後に2前核形成の確認により正常受精と判断した。

受精卵子は、分割まで50  $\mu$ lのQuinn's Advantage Protein Plus Cleavage Medium (SAGE, IVF Inc, Trumbull, CT, USA)で培養した。その後、20  $\mu$ lのQuinn's Advantage Blastocyst Mediumにより3日間から5日間培養し、発育良好胚盤胞を得られた際の培養液、21サンプルを実験区(妊娠継続区、妊娠非継続区)とした。

妊娠非継続区は、判定日の血液検査で $\beta$ hCGが10 mIU/ml以下とした。また、胚盤胞に到達しなかった胚を発育停止胚とし、発育停止胚を5日間培養していた培養液、7サンプルをネガティブコントロール(発育停止区)とした。培養条件は37.5  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>で行った。胚を培養していた培養液はそれぞれ、エッペンドルフチューブに移した。患者の非特定化のため、それぞれの培養液をID番号で区別した。それらは、測定までマイナス30  $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

#### 培養液の解析方法

LC-Hybrid-MS法による測定前に、凍結保存した各区の培養液を室温で自然解凍した。また、胚を培養していない培養液を培養液測定のコントロールとした。培養液20  $\mu$ lに対して、1回の測定を3  $\mu$ lとし、3回測定した。測定結果からコントロールとした培養液中に含まれる成分を除き、特異的な成分を選別した[7,9]。物質の分子量からの特定には、NIST (National Institute of Standards and Technology)とChemSpiderの化学物質のデータベースを使用した。その結果、ノルエピネフリンであることが確定し、購入したノルエピネフリンと同一であることを確認した。

#### マウス体外受精胚の作製方法

ICRマウス(Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan)から採取した卵子および精子を実験に使用した。すべてのマウスは自由給水・自由給餌、明暗周期の調整されたSPF環境下で飼育された(明期は午前7時から午後9時、暗期は午後9時から午前7時)。本実験は麻布大学実験動物委員会の承認のもと、実験動物ガイドラインに則り、施行された。

ICR雌マウスに7.5 IUのEquine Chorionic Gonadotropin (eCG; PEAMEX, Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., Fukushima, Japan)を投与し、その48時間後に7.5 IUのhuman chorionic gonadotropin (hCG; Novartis Pharma K.K., Tokyo, Japan)を投与し、過排卵処理を行った。hCG投与から14時間後にICRマウスの卵管膨大部より採卵し、200  $\mu$ lのTYH [12]中で卵丘卵子複合体

を培養した。ICR雄マウスから精巣上体尾部を摘出し、TYH中に精子を分散させ、採卵の1時間に前培養を行った。体外受精の条件は精子濃度が $3 \times 10^6$ 精子/mlとなるように、卵丘卵子複合体を培養している培養液に、精子を含む培養液を添加した。体外受精の培養条件は37.5  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>とした。体外受精から8時間後、2前核形成の確認された卵子を正常受精卵子と判断した。KSOM [4]で、マウス受精卵子を5日間培養し、胚盤胞を作成した。体外発生培養条件は37.5  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>とした。

#### 免疫蛍光染色

マウスについては体外発生培養5日目の拡張期および孵化中の胚盤胞を用いた。ヒト胚盤胞は、研究用に提供することの同意を得た胚10個、発育良好胚盤胞および発育退行胚盤胞を用いた。マウスおよびヒト胚盤胞をPBS (Nissui, Tokyo, Japan)に0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (Sigma)を添加したメディウム(以下、PBS-PVA)で3回洗浄し、PBS-PVAに2% (w/v) paraformaldehyde (Sigma), 0.2% (v/v) Triton X-100 (Sigma)をそれぞれ添加し、常温で60分間、固定した。再びPBS-PVAで3回洗浄し、PBS-PVAに2.5% (v/v) Tween 20 (GE Healthcare, Bio sciences, AB, USA)を添加したメディウムを用いて常温で2分間、静置した。その後、PBS-PVAで3回洗浄、PBS-PVAに1% (w/v) BSA (Sigma)を添加したメディウム(以下、PBS-BSA)を用いて4  $^{\circ}$ Cで2時間静置した。その後、PBS-BSAに10% (v/v) goat serum (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada)を添加したメディウムを用いて常温で40分間、blockingを行った。PBS-BSAにPBS-BSA: 1<sup>st</sup> antibody Dopamine- $\beta$ -Hydroxirase Antibody (DBH: Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, USA) = 100:1となるように1<sup>st</sup> antibodyを添加し、4  $^{\circ}$ Cで16時間以上、保存した。PBS-BSAで3回洗浄後、PBS-BSAにPBS-BSA:2<sup>nd</sup> antibody (Alexa 488 anti-rabbit IgG, Life technologies, Carlsbad, CA, USA) = 100:1となるように2<sup>nd</sup> antibodyを添加し、常温で60分間静置した。PBS-BSAで3回洗浄、PBS-BSAにPBS-BSA: Propidium Iodide (PI: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) = 100:1となるようにPIを添加し、常温で60分間静置した。PBS-BSAで3回洗浄し、Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いてスライドグラスにホールマウントした後、レーザー顕微鏡(Laica Co. Ltd., DMI6000B and TCS-SP5)で発現および局在を観察した[8]。

#### 統計処理

各区の統計処理には、Welch's t-testを用いた。

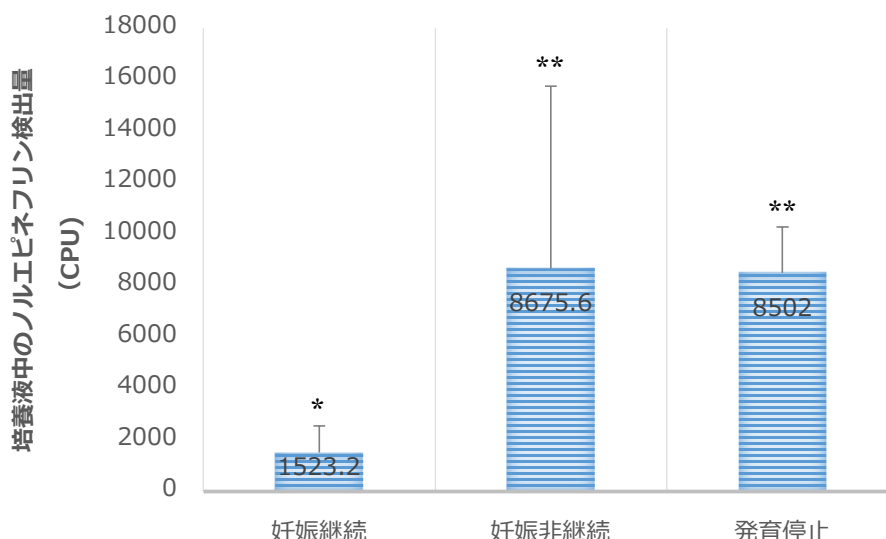


図1. ヒト胚盤胞培養液からのノルエピネフリンの検出量の比較

胚盤胞移植後の培養液から分泌されたノルエピネフリン検出量(Count per unit, CPU)について、妊娠継続区、非継続区、発育停止区のそれぞれの量を示した。妊娠継続区(n=13)の培養液中のノルエピネフリン値は  $1523.2 \pm 1027.3$  CPU (平均  $\pm$  SE)。移植後、妊娠非継続区(n = 8)の培養液のノルエピネフリン値は、 $8675.6 \pm 7075.8$  CPU。発育停止区(n = 7)のノルエピネフリン値は、 $8502 \pm 1769.4$  CPUであった。\*、\*\* P<0.05。

## 結果

培養液の成分解析結果から、表1に示すように培養液成分以外の代謝産物が42種類同定された。そのうち、代謝産物と考えられる物質は、ノルエピネフリン、N-Formyl-amino-aminomethyl-methylpyrimidine (FAMP)、Glucosamine、indolylacryloyl Glycine (IAG)、Panthothenic acid、Thiamin aldehydeであった。

図1に示したように、妊娠継続区(n=13)の培養液中のノルエピネフリン値は $1523.2 \pm 1027.3$  CPU (count per unit)(平均  $\pm$  SE)であった。移植後、妊娠非継続区(n = 8)の培養液のノルエピネフリン値は、 $8675.6 \pm 7075.8$  CPUであった。両区において、有意な差が確認された(P < 0.05)。また、発育停止区(n = 7)のノルエピネフリン値は、 $8502 \pm 1769.4$  CPUであった。妊娠非継続区の培養液と発育停止区の培養液とで、ノルエピネフリン値に有意な差は見られなかった。免疫蛍光染色画像から、ノルエピネフリンの合成酵素であるDBHがマウスの拡張期胚盤胞、脱出中の胚盤胞およびヒトの発育良好胚盤胞と発育退行胚盤胞において内部細胞塊と栄養膜細胞の両方に確認された。

## 考察

胚盤胞を評価する上で最も望ましいのは、胚そのものを被検体とせず、非侵襲的に判定できることであり、培養液中に含まれる胚からの分泌物は、条件を満たす有力な検体である。実験では、胚盤胞培養後に廃棄さ

れる培養液をサンプルとして、超高速液体クロマトグラフィーを用いた解析により培養液中に特異的に含まれる成分の同定を行い、更にその定量を実施したところ、ノルエピネフリン(ノルアドレナリン)を含む42種類の物質を確認した。

ノルエピネフリンが実際に胚盤胞から分泌されているかどうかは、本研究で蛍光免疫組織化学的に検討した結果から明らかとなった。まず、マウスの胚盤胞について、拡張胚盤胞および孵化中胚盤胞において、DBHの発現を確認した(図2)。さらに、ヒト良好胚盤胞および発育退行胚盤胞においても、内部細胞塊及び栄養膜細胞のどちらにも細胞内でのDBHの発現を確認した(図3)。このことから、ヒト胚特有の分泌物質ではなく、他の哺乳類の胚においてもノルエピネフリンが分泌される可能性が示唆された。また、分割期で発育を停止した割球においては、DBHが強発現している他、割球と透明帯の間にもDBHの発現が確認できた。

本研究から、妊娠継続区と非継続区において、培養液中の胚から分泌されるノルエピネフリン分泌量に有意な差があることがわかった。しかしながら、ノルエピネフリン値が1343 CPUという検体が存在し、妊娠継続区と同等の数値であったにもかかわらず、妊娠は継続しなかった。その理由として、この胚に由来する卵子は48歳の患者から採取されたものであったことから、胚そのものに加えて患者母体側の何らかの要因により、妊娠の継続が困難であったと考える。



していない培養液で培養した胚の細胞内でも、ノルエピネフリンが合成されていることが確認された。トランスポーターやレセプターが正常に働かない胚、細胞内部のノルエピネフリンが代謝あるいは排出されずに蓄積した胚の場合は発育が停止するのではないかと考える。

胚のノルエピネフリントランスポーターの正常な機能は、着床と子宮内膜の形成に関与していることが報告されている[1]。つまり、マウスのような多胎妊娠、ヒトのような単胎妊娠であっても、一つの胚自身が分泌するノルエピネフリン量、胚のノルエピネフリントランスポーターやレセプターの機能が正常であることが妊娠継続において重要であると考えられる。

以上のことから、ヒトの胚盤胞を評価する新規バイオマーカーとしてのノルエピネフリンの定量は、優先的に移植する胚の選択を可能にする、新たなヒト胚盤胞評価法の確立に成功したと考えられる。しかしながら、着床から妊娠の間の胚と母体との相互関係はノルエピネフリンという一要素で、すべて評価できるものではない。今後も、ノルエピネフリン以外にも指標となる成分、条件などを解析し、検討していきたいと考える。

## 謝辞

胚盤胞培養液の収集に協力いただいた、山下湘南夢クリニック培養室の中山順樹、池上加代子、中西彩、阿部睦、渡邊ひとみ、培養液の成分解析にご指導いただいた慈恵医科大学の岩本武夫先生、マウス胚での実験に協力いただいた麻布大学の柏崎直巳先生、伊藤潤哉先生、広瀬匡彦、ヒト胚盤胞の免疫蛍光染色に協力いただいた金沢大学の井上章史先生、徳田良子、皆様に感謝致します。最後に終始熱心にご指導いただいた山下湘南夢クリニック院長の山下直樹先生に心より感謝致します。

## 参考文献

1. **Bottalico B, Pilka R, Larsson I, Casslen B, Marsal K, Hansson SR.** Plasma membrane and vesicular monoamine transporters in normal endometrium and early pregnancy decidua. *Mol. Hum. Reprod.* 2003; 9: 389–394.
2. **Buznikov GA, Kost AN, Kucherova NF, Mndzhoyan AL, Suvorov NN, Berdysheva LV.** The role of neurohumours in early embryogenesis. 3. Pharmacological analysis of the role of neurohumours in cleavage divisions. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970; 23: 549–569.
3. **Cikos S, Reháč P, Czikková S, Veselá J, Koppel J.** Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. *Reproduction* 2007; 133: 1139–1147.
4. **Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD.** Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol. Reprod.* 1994; 50: 1027–1033.
5. **Gardner DK, Schoolcraft WB.** In vitro culture of human blastocyst. In: Jansen R, Mortimer D, eds. *Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond 1999.* Carnforth: Parthenon Press, 1999; 378–388.
6. **平成25年度倫理委員会.** 登録・調査小委員会報告(2012年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2014年7月における登録施設名). *日産婦誌* 2014; 66: 2450–2453.
7. **Iriyama K, Yoshiura M, Iwamoto T, Ozaki Y.** [Electrochemical detection method]. *Seikagaku (in Japanese).* 1985; 57: 607–609.
8. **Ito J, Yoon SY, Lee B, Vanderheyden V, Vermassen E, Wojcikiewicz R, Alfandari D, De Smedt H, Parys JB, Fissore RA.** Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1, a widespread  $Ca^{2+}$  channel, is a novel substrate of polo-like kinase 1 in eggs. *Dev. Biol.* 2008; 320: 402–413.
9. **Iwamoto T, Yoshiura M, Iriyama K.** A simple, rapid and sensitive method for the determination of rat serum uric acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 1983; 278: 156–159.
10. **Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR.** Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998; 95: 10990–10995.
11. **Sieber-Blum M, Ren Z.** Norepinephrine transporter expression and function in noradrenergic cell differentiation. *Mol. Cell Biochem.* 2000; 212: 61–70.
12. **Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T.** Studies on fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 1971; 16: 147–151.
13. **Veeck LL.** Oocyte Assessment and Biological Performance. *Ann. NY Acad. Sci.* 1988; 541: 259–295.





Journal of  
REPRODUCTION  
ENGINEERING

JRE

**Journal of REPRODUCTION ENGINEERING** 生殖工学会誌

2015年6月発行

発行者：日本生殖工学会 (SRE)

代表：柏崎 直巳

発行所：日本生殖工学会 (SRE)

〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71

麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内

TEL: 042-769-2339 FAX: 042-769-1762

J R E