

## オイルの品質管理の重要性について

Dean Morbeck Ph.D

私たちは、技術が驚くほど発達した時代に生きています。今、私たちが遭遇するほとんどすべてのものが、人の手による精緻な奇跡だと言えます。複雑な培養用メディウム、遺伝子組換えタンパク質、胚培養用にカスタムされたディッシュ、さらにはタイムラプスインキュベーターまでが登場していますが、その一方で、オイルについては、50年以上前に初めて使用されてから基本的には変わっていません。ただ、その複雑な性質についての私たちの理解は変わりつつあります。

オイル製品には品質管理が必要です<sup>1</sup>。過酸化価試験が導入され、エンドユーザーは今日、品質がより確実に保証されたオイルを入手できるようになりました。さらに、化学的フィンガープリント法などの新しい分析法により、胚毒性物質や不飽和炭素鎖の有無が検査できる可能性も出てきました<sup>2</sup>。



---

「オイルが水に浮くように、嘘から真実が浮かび上がる（嘘から出た誠）。」

Miguel de Cervantes

---

## オイルはどこから得られ、その名称に意味はあるのか

現在、胚培養に使用されている市販のオイルはすべて、石油科学の専門家が「ホワイトオイル」と呼ぶものです。原油は強烈な熱にさらされると沸騰し、沸点に応じて各留分に分離して回収されます。私たちの関心の対象である留分、つまりホワイトオイルの沸点は200°C超で、ほぼ不活性となるように処理されます。追加処理や検査が行われ、医薬品グレードや工業グレードのオイルが生産されます。

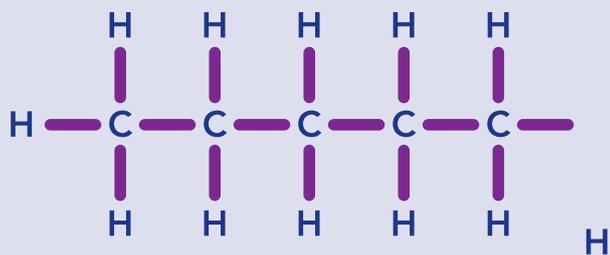
医薬品グレードとは、そのオイルがヒトへの臨床使用、最も一般的には腸の潤滑剤としての使用に適していることを意味します。生殖補助医療技術 (ART) の世界では、医療用ホワイトオイルはミネラルオイルとパラフィンオイルという2つの名称で知られています。米国薬局方 (USP) 収載のミネラルオイルのモノグラフ及び欧州薬局方 (Ph Eur.) 収載のパラフィンオイルのモノグラフによると、この2つのオイルは全く同じで、CAS 番号も同じです (CAS 8042-47-5)。

実は、パラフィンオイルとミネラルオイルはいずれも直鎖炭化水素 (アルカン、つまりパラフィン) と環状炭化水素 (シクロアルカン、つまりナフテン) の混合物です。これら2つの油成分は1つの非常に重要な特性を共有しています。いずれの成分も定義上は完全に飽和しており、酸素と反応し活性化する可能性はほとんどありません。ART 業界で使用されるミネラルオイルやパラフィンオイルには、パラフィン系炭化水素が約70%、ナフテン系炭化水素が約30%含まれています。オイルの品質はその不活性度、つまり飽和の度合いによってある程度決定されます。

オイルの精製過程で生じる3つ目の炭化水素に、多環芳香族炭化水素 (PAH) があります。PAH は、例えばベンゼンのように反応性の高い分子であるため、最終製品中のPAHが検出不可であることを保証するために USP 及び Ph Eur. の両モノグラフで同じ試験の実施が義務付けられています。

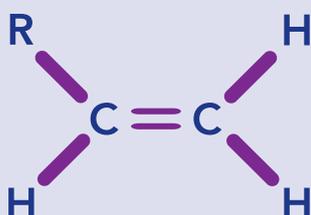
図 1

飽和鎖式炭化水素

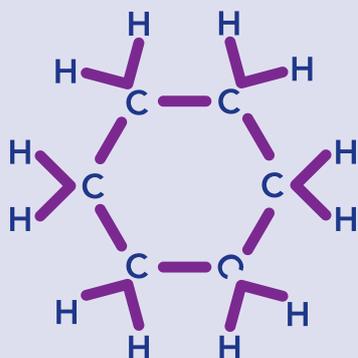


アルカン

不飽和鎖式炭化水素



環状炭化水素



ナフテン炭化水素—シクロアルカン

## オイルが不活性であるはずなら、なぜ品質問題が議論されるのか

明らかかなことが1つあります。オイルの炭化水素が、アルケン、シクロアルケンあるいはPAHのいずれであっても、完全に飽和していない場合、培養物に有毒な過酸化物を生じさせる酸化の影響を受けやすくなります。わかりやすい例として、オリーブオイルは一価不飽和で、時間とともに酸化し、酸敗につながります。オリーブオイルには使用期限があり、最終的には酸化し、酸敗します。

対照的に、ミネラルオイルが完全に飽和していて、易酸化性の炭素を含んでいない場合、そのオイルは不活性で、酸化には多量のエネルギーが必要になります。完全に飽和したオイルの安定性を示すために、実施したすべての品質管理試験において、2008年に購入した同一バッチのオイルを対照として使用しました。また、同じロットのオイル1本を1週間、紫外線に曝露させましたが、いまだに過酸化物の生成は見られず、毒性も示されていません。

オイルには2種類の毒素があります。汚染物質と、過酸化物と呼ばれる反応分子です。10年以上前、メイヨー・クリニックの私の研究室で研究用グレードのミネラルオイルのバッチに含まれる汚染物質が初めて特定されました<sup>3</sup>。このオイルは医薬品卸売会社から入手したもので、ここではART用製品のサプライヤーほど厳密なオイル検査は実施されていませんでした。このオイルから界面活性剤であるトリトンX-100が高水準で検出されましたが、これは、オイル又はオイルを入れたボトルの製造過程で使用された洗浄剤のキャリーオーバーだと考えられます。

オイルというものは疎水性が高く、他の疎水性分子を容易に取り込んでしまいます。これは問題となる可能性をはらんでおり、製造者はそのオイルが大気中濃度の高い有毒な揮発性有機化合物(VOC)に曝露しないようにサプライチェーンを厳しく管理する必要がありますし、また当然のことながら、毒性を確認する精度の高い品質管理検査の実施も必要となります。ここで期待されるのは、徹底した品質管理による出荷前の毒性検出です。オイルの品質を向上させるもう一つの方法は洗浄です。私たちの研究から、オイルを洗浄することでトリトンX-100の濃度が減少し、過酸化物を含んだオイルの毒性が低下することが示されています<sup>3</sup>。

過酸化物は、オイルに毒性を生じさせる何よりも一般的な原因物質です<sup>4,5,6</sup>。オイルは、ART用製品の製造者に納入される前に、精製工場が高圧水素添加処理され、二重結合、つまりアルケンがすべて、単結合の炭素鎖(アルカン)に効果的に還元されます。オイルに含まれる異なった炭化水素の均質性により、アルカンをアルケンから分離することは実質的には不可能で、不飽和アルケンの有無を検査しても、正確な結果を得ることはできません。この分野では、フーリエ変換赤外分光法(FTIR)、核磁気共鳴法(NMR)、ガスクロマトグラフ/水素炎イオン化型検出法(GC-FID)などの先端分析法が有望だと考えられます。

## オイルサプライヤーに期待すべきこと

上述の通り、サプライヤーには配送時や取扱い時にオイルの各バッチの完全性が保証されるように頑健な工程を設けることが期待されます<sup>7</sup>。施設に新しいロットが入ると、品質を保証するためにバッチの徹底検査を行う必要があります。同一ロット内の全容器について検査を適用しなければなりません。

徹底検査には、体外受精 (IVF) ラボで使用する全製品に適用される、無菌性、エンドトキシンレベル、マウスエンブリオアッセイ (MEA) などの標準検査が含まれます。オイルについては、その性質から、品質保証のためにこれ以外の検査が必要となります。私の研究から、標準的な MEA では過酸化物質に対する感度がヒト胚に対する

感度ほど高くなく、アッセイを 24 ~ 48 時間延長することで感度が向上することがわかりました<sup>8</sup>。

毒性に対する感度を高める追加検査には、胚盤胞細胞数、内細胞塊 (ICM) 増殖アッセイ<sup>9</sup>、非近交系マウス株の胚の使用<sup>10</sup> 又はタイムラプス QC 分析<sup>11</sup> などがあります。つまり、より広範な生物検定試験を期待すべきなのです。

今日、私たちはオイルサプライヤーに、オイルの毒性を検出する最低限の品質管理として過酸化物質の検査を行うとともに、より高度な生物検定の実施を求めることができます。そして私たちはエンドユーザーとして、製造者の使用説明書に従ってオイルを保管することが重要なのです。

検査名	定義	パラメータ
 マウスエンブリオアッセイ (MEA)	マウス胚培養及び胚盤胞形成の評価	96 時間後の胚盤胞形成率が 80% 以上
 時間を延長したマウスエンブリオアッセイ (eMEA)	マウス胚培養及び胚盤胞形成の評価	144 時間後の胚盤胞孵化
 エンドトキシン試験 Ph Eur、USP	細菌毒素の検査	0.1 EU/mL 未満
 無菌性試験 Ph Eur、USP	細菌増殖の検査	14 日後に増殖が認められないこと

## 要約

今日使用されているオイルは、50年以上前に初めて使用されたオイルと基本的には同じであるものの、製造者が厳格な検査と品質管理を適応することで、臨床使用に適した品質のオイルの供給がされることが期待できます。

## 参考文献

1. Morbeck DE, Leonard PH. Culture systems: Mineral oil overlay. *Methods Mol Biol.* 2012;912:325–31.
2. Elder K, Woodward B, Van Den Bergh M. *Troubleshooting and Problem-Solving in the IVF Laboratory.* Cambridge University Press. 2015(1): 37-38.
3. Morbeck DE, Khan Z, Barnidge DR, Walker DL. Washing mineral oil reduces contaminants and embryotoxicity. *Fertil Steril.* 2010;94(7):2747–52.
4. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Peroxidation of mineral oil used in droplet culture is detrimental to fertilization and embryo development. *Fertil Steril.* 2007;88(3):741–3.
5. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Damage of embryo development caused by peroxidized mineral oil and its association with albumin in culture. *Fertil Steril.* 2009;91(5):1745–9.
6. Hughes PM, Morbeck DE, Hudson SBA, Fredrickson JR, Walker DL, Coddington CC. Peroxides in mineral oil used for in vitro fertilization: Defining limits of standard quality control assays. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(2–3):87–92.
7. Morbeck DE. Importance of supply integrity for in vitro fertilization and embryo culture. *Semin Reprod Med.* 2012;30(3):182–90.
8. Ainsworth AJ, Fredrickson JR, Morbeck DE. Improved detection of mineral oil toxicity using an extended mouse embryo assay. *J Assist Reprod Genet [Internet].* 2017;1–7.
9. Gada RP MD, Daftary GS MD, Walker DL MS, Lacey JM BA, Matern D MD PhD, Morbeck DE PhD. Potential of inner cell mass outgrowth and amino acid turnover as markers of quality in the in vitro fertilization laboratory. *Fertil Steril* 2012;98(4):0015-0282.
10. Khan Z, Morbeck DE, Walker DL, Fredrickson JR, Stewart EA, Coddington CC. Mouse embryos and in vitro stress: does mouse strain matter? *Fertil Steril [Internet].* 2010;94(4, Supplement):S58.
11. Wolff HS, Fredrickson JR, Walker DL, Morbeck DE. Advances in quality control: mouse embryo morphokinetics are sensitive markers of in vitro stress. *Hum Reprod [Internet].* 2013/04/19. 2013;28(7):1776–82



### Dean E Morbeck Ph.D MBA

Dean はニュージーランド、オークランドにある Fertility Associates の Scientific Director で、オークランド大学、産婦人科学の名誉講師です。1992 年、ノースカロライナ州立大学で生理学の博士号を取得後、1993 年及び 1995 年にミネソタ州の Mayo Clinic で 2 つの主任研究員の職を歴任しました。

これ以降、数多くの医学生、研修医、研究員の教師及びメンターを務めてきました。

1995 年以降、米国の様々なクリニックで Laboratory Director、准教授、コンサルタントを務め、2015 年には MBA を取得しました。そのキャリアを通して、米国生殖医学会議 (ASRM)、Alpha、臨床エンブリオロジスト学会 (ACE) を含む様々な専門家及び地域団体、委員会、サービスの一員及び議長として数多くの貢献を果たしてきました。また、多くの査読付き論文、本、抄録、報告書及び出版物の著者でもあります。