

—総説—

特集：加齢と生殖

# 母体の加齢に伴うヒト受精卵ミトコンドリア機能の低下 Mitochondrial function of human embryos decreases with maternal age

橋本 周

Shu Hashimoto

大阪公立大学大学院医学研究科 〒545-8585 大阪市

Reproductive Science Graduate School of Medicine, Osaka Metropolitan University, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

**要旨：**女性の加齢に伴う生殖能の低下は、卵子の染色体異数性の増加や、ミトコンドリア機能の低下によると考えられている。しかし、母体の加齢とその胚のミトコンドリア機能との関係は不明であった。そこで、母体年齢と胚のミトコンドリア機能との関係およびL-カルニチンのミトコンドリア機能への影響について検討した。胚のいずれの発育ステージにおいても母体年齢とミトコンドリアDNAのコピー数には関係は認められなかったが、桑実胚の酸素消費率（OCR）は母体年齢とともに減少した。また、母体年齢とともに桑実胚から胚盤胞への発育速度も低下した。培養液へのL-カルニチン添加により、桑実胚のOCRが増加し、形態的に良好な胚盤胞形成率が改善した。単一胚盤胞移植後、L-カルニチン添加培地で培養した胚から29人の健常児が誕生した。桑実胚におけるミトコンドリア機能は母体加齢とともに低下しており、L-カルニチンはこれに対抗し得る有望な培養液添加物であることが示唆された。

**キーワード：**母体年齢、ミトコンドリア機能、酸素消費速度

**Abstract:** The fertility of women decreases with age because of an increase in the incidence of aneuploidy, and a putative decrease in the mitochondrial activity of oocytes. The relationship between maternal aging and the mitochondrial function of their embryos remains unknown. Here, we assessed the relationship between maternal age and mitochondrial function in oocytes and embryos as well as the effect of L-carnitine on mitochondrial function. Although there were no direct relationships between maternal age and copy numbers of mitochondrial DNA at any embryo stage, the oxygen consumption rates (OCRs) of morulae decreased with maternal age. In a retrospective analysis, the development rate decreased from morulae to blastocysts along with maternal age. Addition of L-carnitine to the culture medium significantly increased the OCRs of morulae and improved the morphologically good blastocyst formation rate per zygote compared with sibling embryos. Twenty-nine healthy babies were born from embryos cultured in L-carnitine-supplemented medium after single embryo transfers. Thus, mitochondrial function in morulae decreased with maternal age, and we suggest that L-carnitine is a promising culture medium supplement that might be able to counteract this.

**Key words:** Maternal age, Mitochondrial function, Oxygen consumption rate

## はじめに

女性の生殖能は年齢とともに低下する<sup>1)</sup>。高齢の女性から得られた胚の発育不良の主な原因の一つは、減数分裂の際に

姉妹染色体が早期に分離することによって生じる染色体異常の増加であるとされている<sup>2,3)</sup>。また、加齢に伴う卵母細胞のミトコンドリア機能の低下も、胚の発育能低下の理由として提唱されている<sup>4-7)</sup>。母体加齢による卵子ミトコンドリアへの悪影響は、ミトコンドリアの膨潤、空胞化、クリステの変化などの形態異常<sup>8,9)</sup>、ミトコンドリアDNA (mtDNA) のコピー数減少の可能性などが報告されている<sup>10,11)</sup>。

哺乳類の細胞では、アデノシン三リン酸 (ATP) は主にミトコンドリアの電子伝達系によって合成される。したがっ

(受付 2022年4月25日／受理 2022年7月7日)

別刷請求先：〒545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-4-3

大阪公立大学大学院医学研究科

e-mail: shu@omu.ac.jp

て、発生途上の胚の酸素消費率 (OCR) を測定することは、胚の正常性や発生能を評価するための有効な手段となり得る<sup>12-18)</sup>。また、着床前胚のミトコンドリア機能は、胚盤胞期に発達が進むにつれて、特に胚性遺伝子活性化後に増加することが示されている<sup>12-14, 18)</sup>。しかし、母体の加齢が胚のミトコンドリア機能に及ぼす影響については十分に理解されていない。

ミトコンドリア機能障害はミトコンドリアおよび/またはゲノムDNAの損傷、酸化ストレスに起因する細胞膜損傷<sup>19)</sup>、子宮内膜症<sup>20)</sup>および炎症の増加により生じるとされるホルモン不均衡<sup>21)</sup>などの様々な要因によって誘発される<sup>22)</sup>。細胞の損傷や老化は、エネルギー代謝の障害によって引き起こされる可能性がある<sup>23)</sup>。細胞内のATP合成にはグルコースとアミノ酸も利用されるが、脂肪酸はグルコースやアミノ酸に比べてβ酸化を介して多量のATPを供給する。しかし、遊離型の脂肪酸は界面活性剤様の作用を持ち、細胞膜/脂質二重膜を損ない、ミトコンドリア機能障害や細胞の老化を誘発する可能性がある<sup>24)</sup>。

L-カルニチンは、アシルカルニチンを形成し、β酸化を促進することにより、遊離脂肪酸の膜毒性を低減し、細胞障害を緩和する重要な役割を果たす<sup>25, 26)</sup>。哺乳類の血漿中や様々な組織、特に骨格筋や心筋に偏在し、ミトコンドリア障害やミトコンドリアが引き起こすアポトーシスを抑制する<sup>27)</sup>。最近の研究では、L-カルニチンは*in vitro*での卵子の成長<sup>28, 29)</sup>、成熟<sup>30)</sup>および胚の発生にも重要な役割を果たすことが示されている<sup>30-32)</sup>。しかし、L-カルニチンのこのような有益な作用が、母体の高齢化に起因するミトコンドリア機能の低下を回復させるかどうかについては、依然として不明であった。そこで、我々は母体年齢と発育中の胚のミトコンドリア機能との関係を明らかにし、ヒト胚のミトコンドリア機能に対するL-カルニチンの効果を検討した。本総説で紹介する研究データは医療法人三慧会倫理委員会の承認を得た後に、日本産科婦人科学会に登録された研究から得られたものである。

### 胚のOCRとmtDNAコピー数に対する母体年齢の影響

母体年齢と卵子および胚のミトコンドリア機能との関係を評価するために、74組のカップルから提供された卵子14個 (11カップル)、細胞質内精子注入 (ICSI) 後3日目の6-8細胞期の胚13個 (10カップル)、4日目の桑実胚30個 (24カップル)、5日目の拡張胚盤胞34個 (29カップル) をそれぞれ研究に使用した。透明帯に付着した精子からのmtDNAの混入を避けるため、本研究ではすべてICSIで授精した胚を解析に用いた。なお、不妊の原因が子宮内膜症、早発性卵巣不全、ホルモンバランスの崩れであると報告された女性の胚は除外している。

卵母細胞および異なるステージの発育胚におけるmtDNAコピー数は、母体年齢と相関を示さなかった (図1a-d)。同様に、母体年齢と卵子および胚のミトコンドリアで消費さ

れるミトコンドリアOCR (mtOCR) との間には、桑実胚を除いて関係は見られなかった (図1e, f, h)<sup>33)</sup>。しかし、ICSI後4日目の桑実胚のmtOCRは、母体年齢の上昇とともに減少した ( $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.4499$ ; 図1g)。

### 桑実胚のOCRとその発育との関係： OCRの高い桑実胚の発生能は高いのか？

胚の発育を阻害する可能性のあるマイトトキシンを使用せずに桑実胚のOCRを測定後、桑実胚から胚盤胞期までの形態変化像を記録した。母体年齢の影響を避けるため、卵子採取時の女性の年齢が34歳から35.9歳の19組のカップルから提供された受精卵を使用した。桑実胚でのOCRが多いほど、中期胚盤胞期までの発育に要する時間が短くなることが示された ( $r^2 = 0.236$ ,  $P < 0.05$ ; 図2a)<sup>33)</sup>。なお中期胚盤胞の定義は、胞胚腔の大きさが胚盤胞の半分になったときとした。

### 桑実胚から胚盤胞までの発育能： 後方視的な臨床データの解析

母体年齢が胚の形態的变化にどのように影響するかを調べるため、桑実胚から胚盤胞期までの発育率および形態的に良好な胚盤胞 (Gardener分類3AA以上でCを含まない胚盤胞) が形成される率を2つの年齢層の女性間 (37歳未満：若齢群,  $n = 280$  vs. 37歳以上：高齢群,  $n = 251$ ) で後方視的に比較した。その結果受精後5日目の胚盤胞への発育率は若齢群が81.1%に対し高齢群54.1%、形態学的に良好な胚盤胞形成率は若齢群30.7%に対し高齢群21.9%となり、母親の年齢とともに著しく低下することが明らかとなった ( $P < 0.05$ ; 図2b, c)<sup>34)</sup>。6日目の胚盤胞形成率は若齢群92.1%に対し高齢群84.1%、形態的に良好な胚盤胞への発育率も若齢群38.2%に対し高齢群27.5%と、低下していた ( $P < 0.01$ )。

### 桑実胚のOCRに及ぼすL-カルニチンの影響

L-カルニチンは細胞質からミトコンドリアマトリックスに遊離脂肪酸を輸送し、β酸化によるNADHとFADH<sub>2</sub>の合成、電子伝達系によるATPの合成につながる。我々は、培養液への1 mM L-カルニチンの添加により、桑実胚のOCRを改善するかどうかを調べた<sup>34)</sup>。顕微授精後3日目の6-8細胞期胚をL-カルニチン添加または無添加で18時間培養した。その結果、L-カルニチンを添加した場合 ( $1.18 \pm 0.13$  fmol/sec; 図3a)、無添加の場合 ( $1.09 \pm 0.1$  fmol/sec) と比較して、桑実胚のmtOCRが増加した ( $P < 0.05$ )<sup>34)</sup>。一方で、L-カルニチン添加はmtDNAのコピー数に影響しなかった ( $P > 0.05$ , L-カルニチン  $66,507 \pm 50,128$  vs. 対照  $44,706 \pm 26,366$ )。

### L-カルニチンが胚の発育能に及ぼす影響

L-カルニチンは、遊離脂肪酸をミトコンドリアマトリックスに輸送するだけでなく、その膜毒性を低下させ<sup>25, 26)</sup>、細胞障害を軽減させる重要な役割を担っている。ここでは、L-カルニチンが母体年齢に伴う胚の生存率低下を回復させる

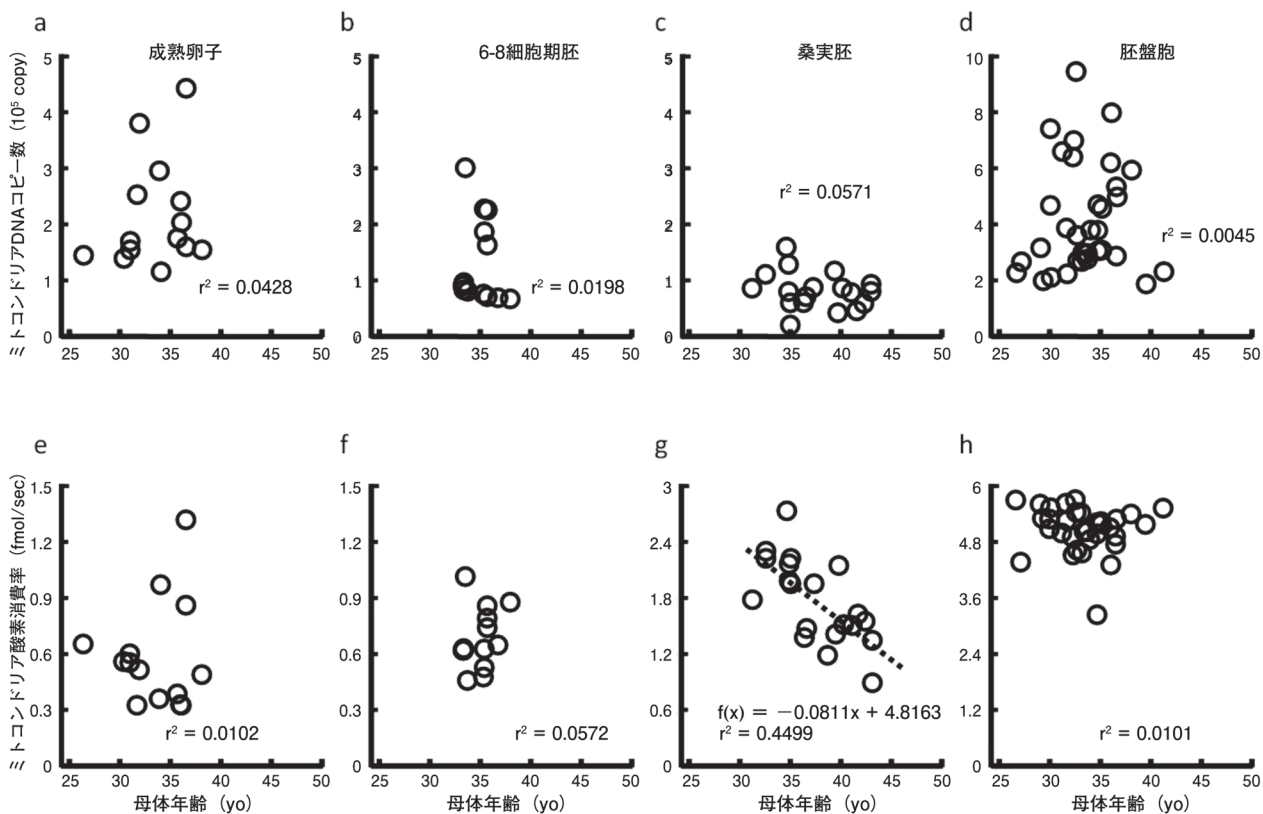


図1 母体年齢と卵子または胚のミトコンドリアDNA (mtDNA) コピー数あるいはミトコンドリア酸素消費率 (mtOCR) との関係 (a, e) 母体年齢とその卵子のmtDNA コピー数あるいはmtOCRの関係 (n = 14); (b, f) 受精後3日目の6-8細胞期胚 (n = 13); (c, g) 4日目の桑実胚 (n = 21); (d, h) 5日目の拡張胚盤胞 (n = 34). ICSI後4日目の桑実胚のmtOCRは母体年齢とともに減少した (mtOCR:  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.4499$ ) (g). なお、透明帯上の精子mtDNAの混入を避けるため、ICSIで受精した胚のみを用いた。

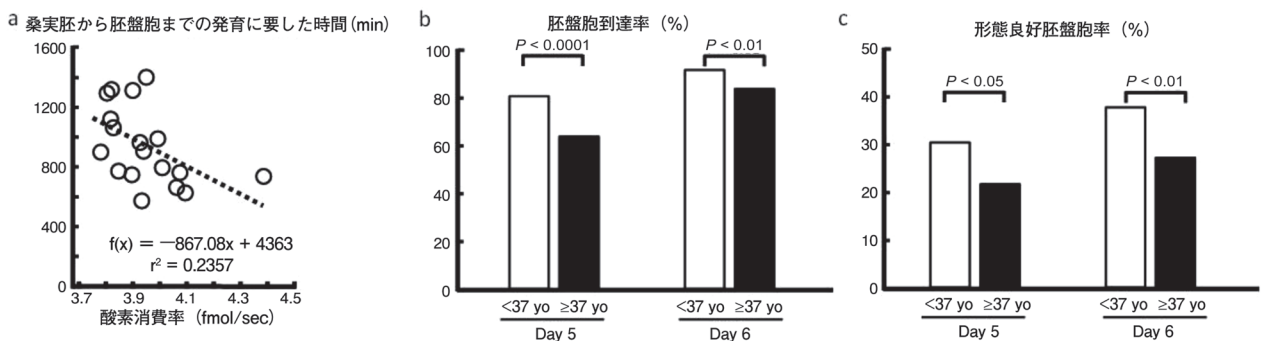


図2 桑実胚の酸素消費率と発育速度 (a) ならびに母体年齢が桑実胚から胚盤胞への発育に及ぼす影響 (b, c) (a) マイトトキシンなしで桑実胚のOCRを測定し、桑実胚から胚盤胞への形態変化を10分ごとに記録した。OCRが多いほど、OCR測定から中期胚盤胞までの発育に要する時間が短くなった ( $r^2 = 0.236$ ,  $P < 0.05$ )。 (b) 桑実胚から胚盤胞への発生率と (c) 形態的に良好な胚盤胞への発生率を、2つの母体年齢グループ (37歳未満: n = 280 vs. 37歳以上: n = 251) 間で後方視的に比較検討した。その結果、受精後5日目における桑実胚から胚盤胞への発育率および形態学的に良好な胚盤胞への発生率は、母体年齢とともに低下した ( $P < 0.05$ , 胚盤胞形成率: 若齢群81.1% vs. 高齢群54.1%, 形態的良好胚盤胞率: 若齢群30.7% vs. 高齢群21.9%)。また、6日目においても母体年齢とともに低下した ( $P < 0.05$  胚盤胞形成率: 若齢群92.1% vs. 高齢群84.1%, 形態的良好胚盤胞率: 若齢群38.2% vs. 高齢群27.5%)。

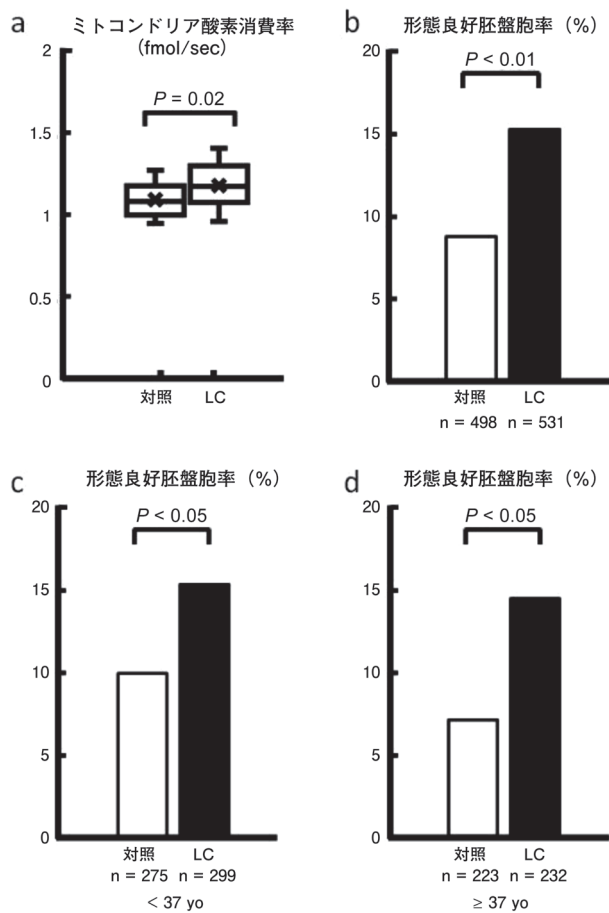


図3 L-カルニチンは桑実胚のミトコンドリア機能および胚の発育能を高めた

(a) 同一採卵周期で得られた受精後3日目の6-8細胞期胚をL-カルニチン無添加 (n = 19) またはL-カルニチン添加 (LC 1 mM: n = 19) で18時間培養した. 対照の桑実胚 (1.09 ± 0.1 fmol/sec) に比べて, L-カルニチンを添加した桑実胚のmtOCRは増加した (1.18 ± 0.13 fmol/sec,  $P = 0.02$ ). (b) 正常受精卵を1 mM L-カルニチン添加または無添加で5日間培養し, 発育を前向きに調べた. 形態的に良好な胚盤胞への発育率は有意に高くなった ( $P < 0.01$ , b). 若齢群 (37歳未満, c) と高齢群 (37歳以上, d) とを別々に比較した場合でも同様の結果が得られた.

かを検討した<sup>34)</sup>. 正常受精した胚を1 mM L-カルニチン添加または無添加で5日間培養し, 胚の発生を調べた. また, 胚盤胞期までの発育率および形態的に良好な胚盤胞の割合を, 若齢群 (37歳未満) と高齢群 (37歳以上) の女性で比較した. L-カルニチンは, 5日目の形態的に良好な胚盤胞率を有意に向上させた (図3b)<sup>34)</sup>. また, L-カルニチン添加による発育能の向上は, 若齢群または高齢群のみで評価した場合にも観察された (図3c, d).

これらの形態的に良好な胚盤胞は, L-カルニチンを添加せずに培養した胚盤胞と同じ発育能を移植後も有するのだろうか? この疑問に答えるため, 単一胚盤胞移植後の発育

表1 L-カルニチンを添加した培養液で発育した単一胚盤胞移植後の発育能

	母体年齢	移植周期数	着床数	出生児数
対照	35.3 yo	68	33 (44%)	26 (38%)
L-カルニチン	35.9 yo	85	35 (41%)	29 (34%)

を後方視的に評価した. 着床率 (L-カルニチン 41% vs. 対照 44%; 表1) および生児獲得率 (L-カルニチン34% vs. 対照 38%) はL-カルニチン無添加で培養した胚で得られたものと同等であった. また, 出生時に外表奇形は観察されなかった.

### 考 察

我々はヒト桑実胚のミトコンドリア機能が母体加齢とともに低下し, 培養液へのL-カルニチン添加により改善することを見出した. 母体年齢は, 受精後3日目の8細胞期までのどの段階においても, mtDNAのコピー数やmtOCRとの関連は示さなかった. ヒトやマウスにおいては, 8細胞期までmtOCRは低いままである<sup>18, 35)</sup>. ヒト胚のミトコンドリア機能が8細胞期まで低いというデータは, ヒトのミトコンドリア機能が, 8細胞期<sup>18)</sup>または胚盤胞期の胚性遺伝子活性化後に上昇するというこれまでの知見を裏付けている<sup>9, 36)</sup>. ヒト胚のOCRが8細胞期以降に劇的に上昇する<sup>18)</sup>. それ故, ヒト胚のミトコンドリア機能障害は, 母体の加齢とともに, 8細胞期以降にある程度顕在化する可能性がある. また, 胚盤胞の胞胚腔の形成は細胞のNa/K-ATPase活性に依存し, 多量のATPを必要とする<sup>37)</sup>. これらのことから, ミトコンドリア機能が低下した桑実胚では, 図2に示すように, 胞胚腔が形成されないか, その開始が遅れる可能性がある. 十分なミトコンドリア機能を持たない4日目の胚は翌日, 拡張胚盤胞に到達できないため, 5日目の拡張胚盤胞は母体年齢に関係なく高いミトコンドリア機能を有していたと考えられる (図1). L-カルニチンは, 遊離脂肪酸をミトコンドリアマトリックスに輸送するだけでなく, その膜毒性を軽減する重要な役割を果たす<sup>25, 26)</sup>. そこで, 低下したミトコンドリア機能の回復を目指して, mtOCRおよび発生能に対するL-カルニチンの効果を調べた. L-カルニチンにより, ミトコンドリア機能が改善し, 胚盤胞形成率が上昇した (図3). 細胞の活動には大量のATPが必須であり, ATPは脂肪酸を材料にして, ミトコンドリアマトリックスでのβ酸化とミトコンドリア内膜の電子伝達系を経て合成される. しかし, 遊離の長鎖脂肪酸は疎水性の陰イオンであり, 陰イオン性界面活性剤に似た性質を示し, 細胞膜の構造と機能を損なう<sup>38)</sup>. また, ミトコンドリア膜の破壊は, 電子伝達系からの電子漏洩を引き起こす<sup>39, 40)</sup>. さらに, 酸化ストレスは脂質の過酸化とリン脂質の分解を引き起こす<sup>41)</sup>. L-カルニチンは遊離脂肪酸からアシルカルニチンを形成し, これをミトコンドリアマトリックスに移行させ, β酸化を促進することで遊離脂肪酸による膜障害を緩和し, 細胞障害を減少させる重要な役割を果たす<sup>25, 26)</sup>. L-カルニチンを投与すると, *in vitro* および



*in vivo*において、マウスのミトコンドリアおよび細胞への酸化病的変が緩和されている<sup>42)</sup>。また、L-カルニチンの投与は、抗がん剤を投与されたげっ歯類の酸化不全や組織損傷を軽減している<sup>27)</sup>。さらに、筋萎縮性側索硬化症で老化が促進されたマウスの老化を遅らせている<sup>43)</sup>。これらのことから、L-カルニチンは生体内のミトコンドリア、細胞、組織に対する酸化病的傷害を緩和する好ましい効果を有することが示唆されている。

L-カルニチンは*in vitro*において、我々のデータと同様に、卵子の成長、成熟および胚の発育をサポートし<sup>28-32)</sup>、その経口投与においては、マウスの自然老化に伴う病理現象を緩和し<sup>24)</sup>、ヒトの不妊症を緩和することが見出されている<sup>44)</sup>。我々はL-カルニチンがミトコンドリア機能を保護し、ヒトの卵子および胚の品質と発生能を向上させると同様の効果を見いだしている<sup>34)</sup>。これらの知見はL-カルニチンの防衛的役割が、ミトコンドリアおよびその周辺で選択的に発揮されている可能性を示している。したがって、L-カルニチンの防衛的役割はミトコンドリア周辺の有害な遊離脂肪酸の蓄積を緩和する能力、および/または母体加齢とともに増加する酸化ストレス条件下での細胞の生存に必要なエネルギー供給を改善する能力を示している可能性がある。臨床的観点から、L-カルニチンにより形態的に改善された胚がより多く移植用を選択された。我々は、このような胚が正常な生児発生能を保持しているかどうかを評価するために、移植後の胚発生を後方視的に解析した。L-カルニチン添加培養液で培養した胚の移植後の発生は、従来のプロトコールで得られたものと同様であった(表1)。この結果は、L-カルニチンの培養液への添加が胚の形態を改善するだけでなく、生児までの発育に悪影響を及ぼさないことを示している。

母体加齢に伴う胚のミトコンドリア機能低下が明らかになった。また、L-カルニチンは母体年齢に伴う胚の発生能の低下を回復させる有望な培養液添加物となることが期待される。

本総説は日本学術振興会科学研究費(JSP-RFTF17K0814および20K09674)により実施されたMorimoto et al., 2020<sup>33)</sup>とMorimoto et al., 2021<sup>34)</sup>のデータを中心に考察している。

## 文 献

- 1) Cimadomo, D., Fabozzi, G., Vaiarelli, A., Ubaldi, N., Ubaldi, F.M. and Rienzi, L. (2018): Impact of maternal age on oocyte and embryo competence. *Front. Endocrinol.*, 9, 327.
- 2) Nagaoka, S.I., Hassold, T.J. and Hunt, P.A. (2012): Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.*, 13, 493–504.
- 3) Sakakibara, Y., Hashimoto, S., Nakaoka, Y., Kouznetsova, A., Höög, C. and Kitajima, T.S. (2015): Bivalent separation into univalents precedes age-related meiosis I errors in oocytes. *Nat. Commun.*, 6, 7550.
- 4) Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. and Ames, B.N. (1994): Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 10771–10778.
- 5) Bartmann, A.K., Romão, G.S., Ramos, Eda S. and Ferriani, R.A. (2004): Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 21, 79–83.
- 6) May-Panloup, P., Chrétien, M.F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthiery, Y. and Reynier, P. (2005): Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Hum. Reprod.*, 20, 593–597.
- 7) Bentov, Y., Yavorska, T., Esfandiari, N., Jurisicova, A. and Casper, R.F. (2011): The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 28, 773–783.
- 8) Müller-Höcker, J., Schäfer, S., Weis, S., Münscher, C. and Strowitzki, T. (1996): Morphological-cytochemical and molecular genetic analyses of mitochondria in isolated human oocytes in the reproductive age. *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 951–958.
- 9) Van Blerkom, J. (2011): Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, 11, 797–813.
- 10) Chan, C.C., Liu, V.W., Lau, E.Y., Yeung, W.S. Ng, E.H. and Ho, P.C. (2005): Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 11, 843–846.
- 11) Murakoshi, Y., Sueoka, K., Takahashi, K., Sato, S., Sakurai, T., Tajima, H. and Yoshimura, Y. (2013): Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 30, 1367–1375.
- 12) Thompson, J.G., Partridge, R.J., Houghton, F.D., Cox, C.I. and Leese H.J. (1996): Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 106, 299–306.
- 13) Trimarchi, J.R., Liu, L., Porterfield, D.M., Smith, P.J. and Keefe, D.L. (2000): Oxidative phosphorylation-dependent and-independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 62, 1866–1874.
- 14) Ottosen, L.D., Hindkjaer, J., Lindenberg, S. and Ingerslev, H.J. (2007): Murine pre-embryo oxygen consumption and developmental competence. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 24, 359–365.
- 15) Magnusson, C., Hillensjö, T., Hamberger, L. and Nilsson, L. (1986): Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 1, 183–184.
- 16) Yamanaka, M., Hashimoto, S., Amo, A., Ito-Sasaki, T., Abe, H. and Morimoto, Y. (2011): Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum. Reprod.*, 26, 3366–3371.
- 17) Maezawa, T., Yamanaka, M., Hashimoto, S., Amo, A., Ohgaki, A., Nakaoka, Y., Fukuda, A., Ikeda, T., Inoue, M. and Morimoto, Y. (2014): Possible selection of viable human blastocysts after vitrification by monitoring morphological changes. *J. Assist. Reprod.*

- Genet., 31, 1099–1104.
- 18) Hashimoto, S., Morimoto, N., Yamanaka, M., Matsumoto, H., Yamochi, T., Goto, H., Inoue, M., Nakaoka, Y., Shibahara, H. and Morimoto, Y. (2017): Quantitative and qualitative changes of mitochondria in human preimplantation embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 34, 573–580.
  - 19) Bratic, A. and Larsson, N.G. (2013): The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest.* 123 951–957.
  - 20) Xu, B., Guo, N., Zhang, X.M., Shi, W., Tong, X.H., Iqbal, F. and Liu, Y.S. (2015): Oocyte quality is decreased in women with minimal or mild endometriosis. *Sci. Rep.*, 5, 10779.
  - 21) Zárate, S., Astiz, M., Magnani, N., Imsen, M., Merino, F., Álvarez, S., Reinés, A. and Seilicovich, A. (2017): Hormone deprivation alters mitochondrial function and lipid profile in the hippocampus. *J. Endocrinol.*, 233, 1–14.
  - 22) Jang, J.Y., Blum, A., Liu, J. and Finkel, T. (2018): The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.*, 128, 3662–3670.
  - 23) Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S.J., Fabbri, E., Navas, P. and Ferrucci, L. (2015): Reconsidering the role of mitochondria in aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci.*, 70, 1334–1342.
  - 24) Miyamoto, K., Sato, E.F., Kasahara, E., Jikumaru, M., Hiramoto, K., Tabata, H., Katsuragi, M., Odo, S., Utsumi, K. and Inoue, M. (2010): Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 49, 674–681.
  - 25) Bremer, J. (1983): Carnitine--metabolism and functions. *Physiol. Rev.*, 63, 1420–1480.
  - 26) Vanella, A., Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Di, Giacomo, C., Sorrenti, V. and Barcellona, M.L. (2000): L-propionyl-carnitine as superoxide scavenger antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol. Toxicol.*, 16, 99–104.
  - 27) Chang, B., Nishikawa, M., Nishiguchi, S. and Inoue, M. (2005): L-Carnitine inhibits hepatocarcinogenesis via protection of mitochondria. *Int. J. Cancer*, 113, 719–729.
  - 28) Hashimoto, S. (2009): Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J. Reprod. Dev.*, 55, 1–10.
  - 29) Dunning, K.R., Akison, L.K., Russell, D.L., Norman, R.J. and Robker, R.L. (2011): Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to l-carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice. *Biol. Reprod.*, 85, 548–555.
  - 30) Dunning, K.R., Cashman, K., Russell, D.L., Thompson, J.G., Norman, R.J. and Robker, R.L. (2010): Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol. Reprod.*, 83, 909–918.
  - 31) Abdelrazik, H., Sharma, R., Mahfouz, R. and Agarwal, A. (2008): L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 91, 589–596.
  - 32) Kim, M.K., Park, J.K., Paek, S.K., Kim, J.W., Kwak, I.P., Lee, H.J., Lyu, S.W. and Lee, W.S. (2018): Effects and pregnancy outcomes of L-carnitine supplementation in culture media for human embryo development from in vitro fertilization. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 44, 2059–2066.
  - 33) Morimoto, N., Hashimoto, S., Yamanaka, M., Nakano, T., Satoh, M., Nakaoka, Y., Iwata, H., Fukui, A., Morimoto, Y. and Shibahara, H. (2020): Mitochondrial oxygen consumption rate of human embryos declines with maternal age. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 37, 1815–1821.
  - 34) Morimoto, N., Hashimoto, S., Yamanaka, M., Satoh, M., Nakaoka, Y., Fukui, A., Morimoto, Y. and Shibahara, H. (2021): Treatment with Laevo (L)-carnitine reverses the mitochondrial function of human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 38, 71–78.
  - 35) Ottosen, L.D., Hindkjaer, J., Lindenberg, S. and Ingerslev, H.J. (2007): Murine pre-embryo oxygen consumption and developmental competence. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 24, 359–365.
  - 36) Sathananthan, A.H. and Trounson, A.O. (2000): Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Hum. Reprod.*, 15, 148–159.
  - 37) Watson, A.J. (1992): The cell biology of blastocyst development. *Mol. Reprod. Dev.*, 33, 492–504.
  - 38) Furuno, T., Kanno, T., Arita, K., Asami, M., Utsumi, T., Doi, Y., Inoue, M. and Utsumi, K. (2001): Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1037–1046.
  - 39) Moraes, C.T., Ricci, E., Petruzzella, V., Shanske, S., DiMauro, S., Schon, E.A. and Bonilla, E. (1992): Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nat. Genet.*, 1, 359–367.
  - 40) Esposito, L.A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B.A., Wallace, D.C. (1999): Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4820–4825.
  - 41) Pacifici, E.H., McLeod, L.L. and Sevanian, A. (1994): Lipid hydroperoxide-induced peroxidation and turnover of endothelial cell phospholipids. *Free Radic. Biol. Med.*, 17, 297–309.
  - 42) Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Hiramoto, K., Kashiwagi, A. and Utsumi, K. (2004): Free radical theory of apoptosis and metamorphosis. *Redox Rep.*, 9, 237–247.
  - 43) Kira, Y., Nishikawa, M., Ochi, A., Sato, E. and Inoue, M. (2006): L-carnitine suppresses the onset of neuromuscular degeneration and increases the life span of mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.*, 1070, 206–214.
  - 44) Kitano, Y., Hashimoto, S., Matsumoto, H., Yamochi, T., Yamanaka, M., Nakaoka, Y., Fukuda, A., Inoue, M., Ikeda, T. and Morimoto, Y. (2018): Oral administration of L-carnitine improves the clinical outcome of fertility in patients with IVF treatment. *Gynecol. Endocrinol.*, 34, 684–688.