

ブタ体外成熟卵子の効率的な
体外受精系の確立に関する研究

**Studies on Establishment of Effective
In Vitro Fertilization System of
In Vitro-Matured Pig Oocytes**

北地 秀基

2015

目次

略語一覧	03
和文要旨	05
英文要旨	07
第1章 序論	09
第2章 回転培養処理下で媒精したブタ体外成熟卵子の体外受精状況およびその後の体外発生状況	
2-1 緒言	17
2-2 材料および方法	19
2-3 結果	24
2-4 考察	25
2-5 図表	29
第3章 凍結前の緑茶由来ポリフェノール属による処理がブタ凍結融解精子の正常性および体外受精能に及ぼす影響	
3-1 緒言	36
3-2 材料および方法	38
3-3 結果	45
3-4 考察	47
3-5 図表	50
第4章 総合考察	55
謝辞	59
参考文献	60
附表	75

略語一覽

AI	artificial insemination
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CASA	computer aided sperm analysis
COCs	cumulus-oocyte complexes
DMSO	dimethyl sulfoxide
eCG	equine chorionic gonadotropin
EGCG	(-)-epigallo-catechin-3- <i>O</i> -gallate
EGF	epidermal growth factor
FCM	flow cytometry
FITC	fluorescence isothiocyanate
FMD	foot and mouth disease
hCG	human chorionic gonadotropin
Hepes-TLP-PVA	Hepes-buffered Tyrode solution with lactate pyruvate and polyvinyl alcohol
ICM	inner cell mass
IVF	<i>in vitro</i> fertilization
IVM	<i>in vitro</i> maturation
LEY	lactose egg yolk
LPS	lipopolysaccharide
M II	Metaphase II
mHepes-TLP-PVA	modified Hepes-TLP-PVA
mPZM-3	modified porcine zygote medium

mTCM-199	modified TCM-199
MTG	MitoTracker Green
mTLP	modified TLP
PBS	phosphate-buffered saline
PED	porcine epidemic diarrhea
pFF	pig follicular fluid
PFs	緑茶由来ポリフェノール属(polyphenols)
PI	propidium iodide
PNA	peanut agglutinin
PuFA	polyunsaturated fatty acids
PVA	polyvinyl alcohol
ROS	reactive oxidative species
SPF	specific pathogen free
TE	trophectoderm
TLP	Tyrode solution with lactate and pyruvate
UFA	unsaturated fatty acids
ZP	zonal pellucida

和文要旨

卵巣の卵胞から取り出されたブタ未成熟卵子は、体外において減数分裂を再開して第2減数分裂中期に到達し得る。また、そのようにして得られた成熟卵子は、体外において新鮮精子および凍結融解精子の侵入を受けることが可能である。しかしながら従来系では、多精子受精が頻発するため正常な受精である単一精子受精卵を得ることは極めて難しく、このことが体外成熟、体外受精および体外培養技術を用いたブタ未成熟卵子からの胚盤胞作出を妨げる最も大きな障害の一つとなっている。そこで本研究では、ブタ体外成熟卵子の効率的な体外受精系を確立することを目的とした。

最初の実験では、多精子受精の頻度を下げるために、1 rpm で回転させている200 μ L のPCRチューブ内で体外成熟卵子およびクラウン系ミニブタから採取した新鮮精子を共培養した。一部の卵子はコントロールとして、静置した同チューブ内で媒精した。その結果、精子侵入卵の割合は回転培養処理の有無の影響を受けなかったが、体外受精時にチューブを回転処理すると単一精子受精卵の割合は増加し、多精子受精卵の割合は低下した。以上の結果から、このような媒精法は体外におけるブタ正常受精卵の作出に有用であることが示された。

緑茶から抽出されたポリフェノール属は抗酸化作用を持つことが知られており、その添加は哺乳動物の細胞および臓器の保存に有効であると報告されている。そこで次の実験では、緑茶ポリフェノール属がブタ凍結融解精子の正常性維持に及ぼす影響について検討した。射出精液を種々の濃度（0、0.01、0.05、0.1 および 0.2% [w/v]）の緑茶ポリフェノール属を添加した Mulberry III 液で希釈し、15°C 下で一晩保存した後に凍結した。得られた凍結精子を 40°C 下で急速融解した後、性状の評価を行った。その結果、0.01% の緑茶ポリフェノール属を添加した溶液中で保存した精子は、緑茶ポリフェノール属無添加溶液中で保

存した精子と比較して、有意に高い生存性および先体正常性を示した。しかしながら、ミトコンドリア正常性については、これら二つの区間において差はみられなかった。0.01%の緑茶ポリフェノール属を精子保存液に添加することにより、上記の回転培養処理方法を用いて媒精した卵子においては単一精子受精が増加し、多精子受精が抑制された結果、体外培養後の胚盤胞形成率が増加した。以上の結果から、凍結前に 0.01%の緑茶ポリフェノール属を添加した溶液中で保存することにより、凍結融解による損傷からブタ精子を保護し得ることが明らかとなった。また、このような処理は、胚盤胞期まで体外発生し得るブタ正常受精卵の作出に有用であることが示された。

本研究の結果、ブタ体外成熟卵子の新しい体外受精系が確立された。この系は、体外におけるブタ胚盤胞作出効率の向上に貢献し得ると考えられる。

Studies on Establishment of Effective *In Vitro* Fertilization System of
In Vitro-Matured Pig Oocytes

ABSTRACT: In pigs, immature oocytes released from ovarian follicles can resume meiosis and reach metaphase II stage in culture, and the matured oocytes are penetrable *in vitro* by fresh and frozen-thawed spermatozoa. However, few normal fertilized oocytes are obtained under conventional systems because of the high incidence of polyspermy. This was one of the most prominent obstacles to producing pig blastocysts from immature oocytes by *in vitro* maturation, fertilization and culture. This study was carried out to establish the effective *in vitro* fertilization system of *in vitro*-matured pig oocytes.

In the first experiment, *in vitro*-matured oocytes were co-cultured with fresh spermatozoa collected from Clawn miniature pigs in a 200 μ l PCR tube which was rotated at 1 rpm to overcome the high incidence of polyspermy. Some oocytes were inseminated in the same tube without rotation as controls. The rate of total penetrated oocytes was not affected by the presence or absence of rotation. However, the presence of rotation prevented polyspermic penetration and increased monospermic penetration. These results indicated that the rotation method for *in vitro* fertilization is useful for producing normal fertilized pig oocytes *in vitro*.

Polyphenols (PFs) extracted from green tea, known to possess the powerfully potent anti-oxidants, have been reported to be effective in preservation of mammalian cells from various species and isolated organs. Therefore, it was tested whether treatment with PFs prior to freezing procedure might also be effective for maintaining the integrity of frozen-thawed boar spermatozoa in the second experiment. Ejaculates were diluted in Mulberry III medium containing various concentrations of PFs (0, 0.01, 0.05, 0.1, and 0.2% [w/v]) and then stored at 15°C overnight. The semen samples were processed, using the straw freezing procedure, and then frozen in liquid nitrogen. After rapid thawing at 40°C, the spermatozoa were subjected to several assays to evaluate semen quality. Spermatozoa stored in the medium containing 0.01% PFs exhibited significantly higher degrees of post-thawed viability and acrosomal integrity than those stored in the absence of PFs. However, no change in the mitochondrial activity was noted between the two groups. Addition of 0.01% PFs to the storage solution of spermatozoa prevented polyspermic penetration in oocytes inseminated using the rotation method, resulting in an increased blastocyst formation rate after *in vitro* culture. These results indicated that preincubation with 0.01% PFs prior to freezing procedure exerts a protective effect on boar spermatozoa by preventing injuries

associated with freezing-thawing and this method is useful for producing normal fertilized pig oocytes that can develop to the blastocyst stage *in vitro*.

In conclusion, a novel *in vitro* fertilization system for *in vitro*-matured pig oocytes has been established. This system will contribute to increase the efficacy of pig blastocyst production *in vitro*.

第 1 章

序論

家畜生産の歴史は、野生動物を捕獲し、その繁殖特性を理解・利用して人為的支配下に置くことで家畜化したことに始まる。約 50 年前から現在に至る、家畜における育種改良技術の進歩とともに、自然交配・人工授精・体外受精(IVF; *in vitro fertilization*)および胚移植と言った発生工学および繁殖生理学などを組み合わせた家畜改良の研究は目覚ましい発展を見せている。これらの研究は特にマウスおよびラットなどの実験小動物やウシで進んでおり、多くの遺伝子改変動物(Gordon *et al.* 1980)やクローン動物(Wilmot *et al.* 1997)などが作出されている。ウシに至っては生産現場において既に IVF および胚移植が実用技術として位置づけられている(Thompson 1997)。ブタにおいては Iritani *et al.* (1978)が体外で初めて精子受精能獲得の誘起に成功した。その後、雌性生殖道を用いず、体外で精子受精能を獲得させた射出精液由来精子(Pavlok 1981; Nagai *et al.* 1984)、あるいは精巣上体精子による卵子への侵入の可能性が示唆された(Nagai *et al.* 1984)。また、Cheng *et al.* (1986)は世界で初めて体内成熟・IVF 由来の胚を移植して産子を得ることに成功し、続いて Nagai *et al.* (1988)は凍結融解精子を用いた IVF にて産子を得ることに成功した。さらに、Mattioli *et al.* (1989)は体外成熟(IVM; *in vitro maturation*)・IVF 由来の 2~4 細胞期胚を移植することにより産子を得ることに成功している。これらの結果から、ブタ IVF 卵は移植後に正常な産子にまで発育する能力を持つことが明らかとなった。

近年、豚インフルエンザ、豚コレラ、豚流行性下痢(PED; porcine epidemic diarrhea)および口蹄疫(FMD; foot and mouth disease)などの家畜伝染病が世界的に流行しており、日本においても PED および FMD が大問題となった。

IVF および胚移植は、生体の移動および生体同士の接触を伴わないため、これらの疾病の伝播を防ぐことを可能とし、また、特定病原菌を保有しない SPF(Specific Pathogen Free)豚作製への応用も期待されている。さらには、クロ

ーンおよび遺伝子導入技術などの新技術を用いた経済豚の生産が検討され始めている。よって、IVF は疾病伝播の予防だけでなく、受精卵を大量に作出する基礎技術として、これらの新技術を下支えする重要な位置を占めることが予想される。加えて、食肉センターにて廃棄されるブタ卵巣および精巣などの有効利用、遺伝資源としての卵子および精子の凍結保存など、今後も畜産分野にて幅広く有効活用することが期待できる。

IVF は畜産分野だけでなく、卵子および精子の発生および生理学的動態を追跡し、受精機構を解明するための有効な手段であり、ヒトの生殖医療の学術的基礎を提供することができる。哺乳動物卵子および精子の受精前後に起こる様々な現象が究明されつつあるが、詳細に解明されていない部分も多い。すなわち、安定した IVF 系を確立することで、受精機構の解明を通して、受精および発生機構に関する基礎的知見を得ることができ、生殖介助技術としてだけではなく、様々な研究および技術に応用することが期待される。

一方、ブタ精液の凍結保存に関する研究はドライアイスおよびアルコールにて凍結(-79℃)されたウシ精子による受胎成功の報告 (Polge & Rowson 1952)後、間もなく開始された。Hess *et al.* (1957)が - 95℃のブタ凍結保存精子を用いて産子を得ることに初めて成功して以来、試行錯誤を繰り返した結果、1970 年以降著しく進歩し、受胎および産子獲得成功例の報告も多くなった。そして、希釈液の組成、グリセリン濃度、凍結融解の方法、注入精子数、注入回数、受胎率および産子数などに関する報告が増加し、技術的進歩がみられた(Pursel & Johnson 1975; Crabo & Einarsson 1971; Salamon & Visser 1974; Richter *et al.* 1975; Larsson *et al.* 1977)。ブタ精液の凍結保存方法としては、ペレット法、ストロー法およびアルミバック法の 3 つが報告されているが、現在実際に広く研究に用いられているのはペレット法およびストロー法である。これらの手法が改良さ

れ、ブタ精液の凍結保存技術は確立できたとされている(丹羽ら 1989)。しかし、ブタ精子の場合、耐凍能に個体差が大きいこと、受胎率および産子数が自然交配に比べて劣ること(Almlid & Hofmo 1995; Johnson *et al.* 2000; Roca *et al.* 2011)などの理由により、ウシのように一般農家で利用されるまでには至っていない。生産現場にてブタ凍結融解精子を実用化するためには正常な精子性状を維持し、受胎成績を向上することが課題であり、現在においても、多くの研究者により、凍結容器、希釈液に添加する糖、グリセリン濃度および凍結方法に関する基礎および実用化研究が行われている。

前述より、ブタ IVF 卵が正常な産子にまで発育することが明らかとなり、IVF および精液の凍結保存が有効活用できる技術であることが示唆された。

しかし、ブタでは正常な IVF 卵を常時高効率で作出するためには、多くの困難がある。その中には、前核形成不全(Nagai 1996)、高率で起こる多精子受精および受精卵の低発生率(Funahashi & Day 1997)、さらには、精液サンプル間(雄間)に大きな受精能の差がある(Wang *et al.* 1991)ことなどが含まれる。また、ブタ凍結保存精液においては、精子膜の流動性が冷却・加温により失われる(Canvin & Buhr 1989)、凍結融解過程で精子酵素(GOT; glutamic oxaloacetic transaminase)漏出が増加する(Bower *et al.* 1973)、精子頭部の異常が増加する(Larsson 1978; Pursel *et al.* 1978; Wilmut & Polge 1977a,b)ことなどが報告されており、凍結融解による精子の損傷が起こりやすいことが知られている。したがって、これらの問題を克服し、ブタ正常受精卵を高率に作出可能な IVF 系を確立することが求められる。

そこで本研究では、これらの問題点のうち、多精子受精および精子の凍結融解による損傷について検証することにした。

ブタの IVF では2つ以上の精子が卵細胞質と融合してしまう多精子受精と呼ばれる異常受精が頻発する現象がある(Nagai 1994; Funahashi & Day 1997)。他種類の哺乳動物では IVF 時に多精子受精は高率で起こらないため、大きな問題とはなっていない(Nagai & Moor 1990)。しかし、ブタでは体内で受精した卵子と比べ、IVM 卵子の IVF では受精率向上を目指す多精子受精の頻度増加に繋がり、結果的に正常な受精である単一精子受精率の向上に結びつかないことが重大な欠点である(Nagai 1996)。

また、IVM 卵子では、表層顆粒放出様式が体内成熟卵子とは異なっていることが報告されており(Wang *et al.* 1997)、このことが多精子受精の防御に影響を与えていると考えられる(Wang *et al.* 1998)。しかし、ブタでは体内であっても、多量の精子が受精部位に存在する場合、多精子受精が発生する(Hunter 1973)。したがって、ブタにおける多精子受精拒否機構は、必ずしも卵子側のみに依存しているのではなく精子側の要因も係わり、子宮頸管から子宮-卵管接合部での精子の選別、卵管峡部における一時的な精子の待機、排卵に伴う受精に適した精子の卵管膨大部への移動といった卵管での精子選別機構が考えられる(Hunter 1996)。同時に、多精子受精拒否機構の1つとして、卵管内の卵管液の役割も重要であると考えられる。すなわち、体内では卵子の多精子受精拒否機構と協調して、受精の場である卵管内の環境に反応した精子側の効果とが協調的に働くことで、効果的に正常な受精である単一精子受精卵を作り出している事が予想される。したがって、IVF で単一精子受精卵を効率的に作出するためには、雌生殖器内の環境が参考になると考えられる。さらに、受精の場である卵管は自身の収縮運動や繊毛運動、消化器官の運動などにより活発に動いており、それらの運動は受精環境に大きな影響を及ぼすとも報告されている(Croxatto *et al.* 1975; Rodriguez *et al.* 1982a) が、これらに関する知見は未だ少な

く、検討していく必要がある。

そこで本研究は卵管の運動に着目し、卵管運動の模倣を試みることにした。現在、ブタにおける IVF の多くは微小滴法を用いて静置状態で媒精操作を行うのが一般的とされているが、本研究では媒精中に小型回転ミキサーを用いて IVF 培地を攪拌し、卵子および精子が培地内の一定箇所には留まらないようにできないか検討した。

凍結保存したブタ精子は、上述のように凍結融解時に生存および受精能力に多大な損傷を受けてしまう。実際のところ、凍結融解の過程で、採精した射出精液の約 50%しか生き残らないとも報告されている(Johnson *et al.* 2000; Bailey *et al.* 2008)。これは精子膜の主成分である不飽和脂肪酸(UFA; unsaturated fatty acids)が、低温および凍結保存中に発生する酸化ストレスにより脂質過酸化を受けることが原因といわれており(Fraczek *et al.* 2001)、精子膜の損傷だけでなく、呼吸抑制や細胞内酵素の漏出などの多くの好ましくない状況に陥ると報告されている(Tavilani *et al.* 2008)。他の哺乳動物と比較して、ブタ精子は原形質膜のリン脂質内の UFA 濃度が高く(Cerolini *et al.* 2000)、精漿の抗酸化能力が他の哺乳動物と比べ相対的に低い(Brezezinska-Slebodzinska *et al.* 1995)ために、過酸化による損傷を受けやすいと報告されている。この問題を解決するために、精子凍結保存液にビタミン C および E (Pena *et al.* 2003; 2004)、グルタチオン(Alvarez & Storey 1989; Foote *et al.* 2002; Funahashi & Sano 2005; Gadea *et al.* 2004)、L-グルタミン(de Mercado *et al.* 2009)、L-システイン(Szczesniak-Fabianczyk *et al.* 2003; Kaeoket *et al.* 2010)およびローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)(Malo *et al.* 2010)などの抗酸化剤を添加する数多くの研究が報告されている。

そこで、本研究では強力な抗酸化剤として知られている緑茶(*Camellia sinensis*)由来ポリフェノール属(Polyphenols; PFs)に注目した。茶における効能の主要

な役割を担っているのはポリフェノールであり、中でもカテキン類は生理作用が多く報告されている。緑茶に含まれるカテキンは、主に(-)-epicatechin、(-)-epigallocatechin、(-)-epicatechin-3-O-gallate および(-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG)の4種類が大半を占めている。緑茶には乾燥重量で10~20%のカテキン類が含まれているが、その約半分をEGCGが占めている。EGCGには抗炎症性(Ho *et al.* 1992)、抗変異原性(Shiraki *et al.* 1994)、免疫調節性(Hsu 2005)、抗菌性(Osterburg *et al.* 2009)および抗発癌性(Huang *et al.* 1992; Yang & Wang 1993)の効果など、多くの生物学的機能がある。また、近年、EGCGは体内動態(Hyon *et al.* 2006; Han *et al.* 2008)および受容体(Hong *et al.* 2010)など詳細な研究が行われている。さらに、PFsは哺乳動物の細胞および臓器の保存に有効であると報告されている(Hyon & Kim 2001; Hyon 2004)。しかし、精液の保存におけるPFsの有効性に関する知見は未だ少なく、ブタにおいてはほとんどみられない。

以上のような背景から、本研究では、上述したブタIVFの問題を解決するため、以下に挙げる項目について検討を行った。

- (1) 回転培養処理下で媒精したブタ体外成熟卵子の体外受精状況およびその後の体外発生状況(第2章)
- (2) 凍結前の緑茶由来ポリフェノール属による処理がブタ凍結融解精子の正常性および体外受精能に及ぼす影響(第3章)

第2章

回転培養処理下で媒精したブタ体外成熟卵子の
体外受精状況およびその後の体外発生状況

2-1 緒言

第1章で述べたように、ブタにおけるIVMおよびIVF技術の進歩によってブタ胚盤胞の作出が可能となった(Abeydeera & Day 1997a; Abeydeera *et al.* 1998a,b 2000)。一方で、IVF中に高率(> 50%)で起こる多精子受精は、胚発生率向上の大きな障害のままである(Wang *et al.* 1994, 1998; Abeydeera & Day 1997b)。しかしながら、体内で得られた受精卵では、高率の多精子受精は滅多に観察されていない(Wang *et al.* 1998; Hunter 1990)。その理由は排卵された卵子が体内で受精する間、卵管の微小環境が多精子受精を防ぐためと考えられている(Hunter 1990)。

現在までに、ブタIVFにおける多精子受精を減らすために体内環境を模倣するいくつかの試みが報告されているが、満足な結果は得られていない(Li *et al.* 2003)。また、過剰な精子数と最適条件ではないIVMおよびIVF環境下は多精子受精を誘発する原因であるといわれている(Hunter 1990; Niwa & Wang 2001; Wang *et al.* 2003)。しかし、IVFに使用する精子濃度を減少させると、確かに多精子受精率は減少するが、それに伴って、全体の受精率自体が減少する(Abeydeera & Day 1997a)。したがって、多精子受精の発生を抑制して多くの正常な受精である単一精子受精卵を得るためには、媒精時の精子数を最適化することが重要であるといわれている(Li *et al.* 2003)。

体内受精においては、子宮頸管内に蓄積した運動型精子は受精部位、すなわち卵管膨大部へ向かうために、卵管峡部を通過しなければならない。卵管峡部は卵子と受精できるだけの活力を持った精子のみが通過することができる部位である。したがって、卵管峡部は解剖学的に受精部位に到達する精子数を制御するための精子貯蔵器と考えられている(Hunter 1991)。このように体内受精では、受精のために必要とされる精子数が、厳しく管理されている。

これとは対照的に、IVF においては高濃度の精子が受精のために使われ、たとえ卵子に多精子受精拒否機構があるとしても、多精子受精の頻度は増加してしまう。したがって、卵管の微小環境を模倣することができる IVF は、全体的な受精率を減少させることなく、多精子受精を防ぐための理想的な手法であると考えられる。体内において卵管は消化器官のようにダイナミックな蠕動運動を行っており、受精環境に大きな影響を及ぼすといわれている(Croxatto & Ortiz 1975; Rodriguez-Martinez *et al* 1982a,b; Rodriguez-Martinez 1984)。したがって、体内での受精の場である卵管の運動に着目し、卵管運動を模倣した体外受精環境を作り出すことを試みた。すなわち、IVF 培地を入れたマイクロチューブに卵子および精子を導入し、回転ミキサーを用いてマイクロチューブを穏やかに回転させることで、多精子受精を防ぎ、正常な受精である単一精子受精卵を効率的に作出することができるのではないかと考えた。

そこで本章では、ブタ IVM 卵子の IVF において、回転培養処理下で媒精することが卵子の体外受精および体外発生状況に及ぼす影響について検討した。

2-2 材料および方法

2-2-1 卵丘細胞-卵子複合体(Cumulus-oocyte complexes; COCs)の採取

および IVM

鹿児島食肉センターにて未性成熟肉用雌ブタの卵巣を採取した。ブタは電殺器を用いて電気ショックを与え失神させた後、解剖刀で動脈を切断することにより放血死させた。開腹後、直ちに卵巣を採取し、硫酸カナマイシン(100 mg/L; meiji seika, Tokyo, Japan)を添加した0.9% (w/v)生理食塩水の入った50 mLのコニカルチューブ(Thermo Fisher Scientific K.K, Kanagawa, Japan)に入れ、約33~37°Cに保温しながら、2時間以内に実験室に持ち帰った。

持ち帰った卵巣を37°Cの生理食塩水で数回洗浄後、ペーパータオルで卵巣表面に付着している血液や生理食塩水などを拭き取り、18ゲージの注射針(Terumo, Tokyo, Japan)を装着した5 mLの使い捨てシリンジ(Terumo)で卵胞(ϕ 2~5 mm)よりCOCsを卵胞液ごと吸引採取した。吸引したCOCsと卵胞液を予め滅菌してある遠沈管に溜め、静置することによりCOCsを沈下させた後、上澄みの卵胞液を取り除き、Hepes-buffered Tyrode-lactate-pyruvate (TLP) medium supplemented with polyvinyl alcohol (PVA) (Hepes-TLP-PVA) (Bavister & Yanagimachi 1977; 附表1)にて希釈および洗浄した後、COCsを含む沈殿物を滅菌シャーレ(Eiken Chemical, Tochigi, Japan)に移し、実体顕微鏡下にて卵丘細胞層に覆われ、卵細胞質の均一なCOCsのみを選抜した。選抜したCOCsはHepes-TLP-PVAで2回、3時間以上38.5°C、5% CO₂、95% Airの条件下で気層平衡したmodified TCM-199 (mTCM-199; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA; 附表2)で2回洗浄後、30 mm dish (#1008; Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ,

USA)中に作製し、流動パラフィン(Nacalai Tesque, kyoto, Japan)で覆った mTCM-199 (200 μ L)に 40 個を一群として導入し、38.5°C、5% CO₂、95% Air の条件下にて 42 時間の IVM を行った。

2-2-2 ブタ精液の採取、性状検査および液状保存

鹿児島大学農学部附属農場動物飼育棟にて飼養中のクラウン系ミニブタ (Japan Farm, Kagoshima, Japan)、雄 1 頭より擬牝台を用いた手掌圧迫法(Fig. 2-1)にて、滅菌ガーゼで膠様物を除去しながら濃厚部射出精液をコンカルチューブ (Thermo Fisher Scientific K.K)に採取した。採取した精液は約 32~35°Cで保温しながら研究室へ持ち帰り、色および臭気を確認後、コールドショックを与えないように精液と同温にした Mulberry III 精液希釈保存液 (VMD, Hoge Mauw, Belgium)により等倍希釈した。

等倍希釈後、精液の一部を取り出し、37°Cの恒温槽にて 15~20 分インキュベートした後、精子運動性、生存率、生存指数、精子数(sperm/mL)、形態、pH および浸透圧の項目について検査した。ただし、pH および浸透圧については希釈前の精液を用いた。Yeste *et al.* (2013)が提唱する品質基準(total sperm motility > 80%, progressive sperm motility > 60%, morphologically normal spermatozoa > 85%, and sperm viability > 85%)に準ずる精液の希釈液のみを気層を作らないように 1.5 mL マイクロチューブに入れ、Sealing Film (BEMIS, Oshkosh, USA)で密封後、15°Cに設定した恒温器にて、実験供試までの 1~2 日間液状保存した。

2-2-3 IVF

IVM 後の COCs を HEPES-TLP-PVA で洗浄した後、0.1% (w/v) hyaluronidase (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA) 添加 HEPES-TLP-PVA 中に導入し、ピペッティング操作により卵子から卵丘細胞を部分的に除去した。

一方、保存後の精液を 800 g 下で 5 分間遠心分離後、上澄みを除去し、精子洗浄液(附表 3)を加えて静かに攪拌した後、遠心分離を行った。再度、上澄みを除去した後、同操作を繰り返した。洗浄後、沈殿した精子をカフェイン無添加の modified TLP (mTLP; 附表 4) (Parrish *et al.* 1988) に再浮遊させ、一部を 3% NaCl 水溶液で 200 倍希釈し、トーマ型血球計算盤を用いて正常精子濃度を測定した後、mTLP にて 2×10^6 sperm/mL に希釈した。

卵子を予め 38.5°C、5% CO₂、95% Air の条件下で気層平衡を行った mTLP で 4 回洗浄後、気層平衡を行った mTLP を 180 μL 入れた 0.2 mL thin-wall PCR tube (Watson, Kobe, Japan) 中に 50~55 個を一群として導入した。同チューブに希釈精液 20 μL を静かに加えて媒精した(最終濃度 2×10^5 sperm/mL)後、培地の蒸発および CO₂ の損失を防止するために、Sealing Film にて密閉した。

試験区では、38.5°C に設定されたインキュベーター(ICV-300; AS ONE, Osaka, Japan)内に設置された小型回転ミキサー(IWAKI, Chiba, Japan; Fig. 2-2)に PCR チューブを装着し、1 rpm で回転させながら 6 時間培養した。対照区では、同様に媒精を行った PCR チューブを同インキュベーター内に静置し、6 時間培養した。なお、小型回転ミキサー設置上の関係から、一般的な IVF と異なり、培養中のインキュベーター内への CO₂ ガスの供給は行わなかった。

2-2-4 受精および発生状況の観察

媒精 6 時間後に卵子を PCR チューブから取り出し、予め気層平衡したカフェイン無添加 mTLP 中でピペッティング操作を行うことにより、透明帯(zona pellucida; ZP)に付着した精子および卵丘細胞を除去した。卵子を modified porcine zygote medium (Yoshioka *et al.* 2002, mPZM-3; 附表 5)中で 3 回洗浄後、30 mm dish (#1008; Becton Dickinson & Co.)上に作製した流動パラフィン(Nacalai Tesque)で覆った同培地の小滴(50 μ L)に移し、38.5°C・5% CO₂・5% O₂・90% N₂ の条件下で培養した。

培養 6 時間後に数個の卵子を mPZM-3 から取り出し、Hepes-TLP-PVA で洗浄後、実体顕微鏡下でホールマウント標本を作製し、カルノア液(エタノール:酢酸=3:1)を流し込んで固定した。室温下で 48~72 時間の固定後、1% (w/v)酢酸オルセイン液(附表 6)を流し込み染色を行った。染色後、微分干渉・位相差顕微鏡(Eclipse80i; Nikon, Tokyo, Japan)下で IVF 状況の観察を行った。IVF の判定は以下のように行った。第 1 極体を放出し、第 2 減数分裂中期(Metaphase II ;M II)に達した卵子の細胞質内に膨化精子頭部ならびに尾部、または雄性前核が観察された卵子を精子侵入卵、さらに第 1 および第 2 極体を放出し、雌雄両前核が各 1 個ずつ認められた卵子を単一精子受精卵とし、精子頭部および雄性前核が 2 個以上の複数個観察された卵子を多精子受精卵とした(Fig. 2-3)。

残りの卵子は発生培養を継続し、媒精 2 日後に 2~8 細胞期に達した卵子の卵割状況を 7 日目に胚盤胞形成状況を倒立顕微鏡(IX71;Olympus, Tokyo, Japan)下で観察した。

得られた胚盤胞を Hepes-TLP-PVA で洗浄後、スライドガラス上に滴下した 0.1 mg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Chemicals)添加グリセロール(附表 7)の小

滴に導入して、カバーガラスで覆い、ガラス端をマニキュア液で密封した。その後、蛍光顕微鏡下で細胞数を計測し、その数が 32 個以上あるものを胚盤胞と判定した。

2-2-5 統計学的分析

精子侵入率、多精子受精率、単一精子受精率、卵割率および胚盤胞形成率に関しては、各%データをアークサイン角変換後、一元配置分散分析および Fisher's LSD test を用いて検定した。胚盤胞細胞数の比較には t -検定を用いた。なお、 $P<0.05$ の場合に有意差があるとした。

2-3 結果

2-3-1 回転培養が体外受精に及ぼす影響

体外受精の結果を Table 2-1 に示した。対照区(83.1%)および試験区(75.2%)間で精子侵入率に有意な差は認められなかった。しかしながら、多精子受精率は対照区(48.3%)と比べ、試験区(21.0%)が有意に低い値を示した($P<0.05$)。さらに、単一精子受精率は対照区(21.2%)と比べ、試験区(44.8%)が有意に高い値を示した($P<0.05$)。

2-3-2 回転培養が体外発生に及ぼす影響

体外発生の結果を Table 2-2 に示した。対照区(52.7%)および試験区(50.5%)間で卵割率に有意な差は認められなかった。胚盤胞形成率は対照区(11.0%)と比べ、試験区(15.2%)が高くなったが、統計学的な有意差は認められなかった。また、胚盤胞細胞数に関しても、対照区(60.3 ± 5.6)および試験区(54.5 ± 5.4)間で有意な差は認められなかった。

2-4 考察

本章の結果より、ブタ IVM 卵子の IVF において、媒精時における PCR チューブおよび小型回転ミキサーを用いた回転培養は、多精子受精の頻度を減少させ、一定以上の精子侵入率を保ちながら単一精子受精卵を効率的に得られるシステムあることが示された。

IVF における多精子受精の精子側の要因として、媒精時における精子濃度の高さおよび精子の運動性が挙げられる。体内では卵管膨大部に達する精子数は 80~1,000 sperm あるのに対し、IVF では少量の IVF 培地(100 μ L)に 30~50 個の卵子および卵子 1 個当たり 2,000 sperm の精子を導入することが最適であるといわれている(Gil *et al.* 2003)。体内では精子は雌生殖器道内を移動中に選抜・制限され、運動性に優れたもののみが卵管膨大部まで達して卵子と受精することができる。しかし、IVF では精子濃度のみを調整する機会が多く、運動性による精子の選抜はほとんど行われぬ。1990 年代より、精子の移動軌跡をコンピュータ解析技術(computer Aided Sperm Analysis; CASA)を用いて評価することが可能となった(Mortimer *et al.* 1995)。いくつかの研究では、精子運動特性と受精能との関連性および運動特性の一部のパラメータによる受精能予測の可能性が検討されている(Mortimer *et al.* 1995)。しかし、精子の運動特性と受精能とのはっきりとした関連性を示すのは困難であるとする見解(Oehninger *et al.* 2000)があるため、前述のように IVF では精子濃度のみを調整する機会が多い。ヒト精子においては、運動特性パラメータに基づいて、受精能を予測することが可能であるという報告もある(Liu & Baker 1992)が、ブタ精子における運動特性と受精能との詳細な関連性は示されていない。また、雄間および同一雄であっても、精子採取反復間で IVF 能に差がみられるという報告もあり(Nagai *et al.* 1990; Wang

et al. 1991; Xu *et al.* 1996)、安定した結果を得るためには、適切な精子の処理方法を模索する必要があると考えられる。しかし、本章において確立された回転培養 IVF 系では、媒精時の精子濃度が高く、運動性による選抜も行っていないにもかかわらず、チューブを回転させるという非常に単純な手法を用いるだけで、多精子受精を軽減して単一精子受精率を向上させることに成功した。

本章の回転培養 IVF 系では、0.2 mL という小さなサイズの PCR チューブを使用することによって、卵子 1 個あたりの精子数を物理的に制限した。IVF に使用する精子数を増やすことは、運動型精子が ZP へ接着する可能性を高めるが、同時に多精子受精になる危険性も高めることになる。しかし、回転培養 IVF 系は多精子受精を防ぐことが可能なため、0.2 mL チューブより多くの精子を導入可能な 0.6 または 1.5 mL チューブを用いることにより、IVF 効率を改善し得ると考えられる。

卵子における多精子受精拒否機構の一つに透明帯反応がある。これは最初の精子が ZP を通過し、卵子細胞膜との膜融合により表層顆粒が開裂することで始まる。この透明帯反応は表層顆粒の開裂から 10~15 分以内に完成するといわれている(Wang *et al.* 1999; Coy *et al.* 2002)。おそらく、この透明帯反応の完成までに複数の精子が卵子内に侵入することが、多精子受精の頻度を上げる要因になっていると考えられる。本章の回転培養 IVF 系では、チューブを回転させることにより精子と卵子の接触機会が減少すること、あるいは運動型精子の卵子への侵入が妨害されることなどの理由から、透明帯反応完了までの時間稼ぎが可能になっていると考えられる。しかし、体内成熟卵子には備わっている多精子受精拒否機構が、IVM 卵子には備わっておらず、精子が侵入しても透明帯反応が起こらずに多精子侵入を許容する要因になっているという報告もあり(Funahashi 2003)、回転培養 IVF 系を用いることにより多精子受精を抑制できた

理由については、今後検討する必要がある。

これまでに、卵管細胞(Nagai & Moor 1990)や卵胞細胞(Wang *et al.* 1992)を精子と共培養すること、または、卵管液(Kim *et al.* 1996)や卵胞液(Funahashi & Day 1993)を IVM もしくは IVF 培地に添加することによりブタ IVF の成功率が改善されている。これらの実験は、卵管内や卵巣内の組成を模倣するように設計されており、その結果、多精子受精をある程度減少させることに成功している。しかしながら、これらの試みでは卵管および卵胞の細胞や組織液を生体から採取し準備する必要があるため、非常に手間がかかる。さらに、準備手順の違いや供試する動物の個体差などの影響により、結果に差が生じる恐れがある。また、卵管液などに存在することが知られている adenosine、精子受精能獲得を促進し、自発的先体反応を抑制することにより正常受精を促進する fertilization promoting peptide (FPP; pGlu-Glu-ProNH₂)、2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosine (CCPA; A1AdR 選択性受容体刺激薬)および N⁶-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(2-methylphenyl)-ethyl]-adenosine (DPMA; A2AdR 選択性受容体刺激薬)を IVF 培地に加えることで、多精子受精の頻度を減らすことができると報告されている (Funahashi *et al.* 2000)が、これらもまた、試薬の調整が煩雑であり手間がかかる。これとは対照的に、本章の回転培養 IVF 系は、特別な細胞、組織液および試薬を必要としないので非常に単純で便利な点が特徴的である。

IVF 成功率に及ぼす影響は多精子受精だけではなく次のような影響もあると考えられる。IVF 時、精子は時間の経過に伴い活力を失い、やがて死滅する。その死滅した精子から IVF に悪影響を及ぼす代謝物質が生成されていると考えられる。通常の IVF は静置した培養条件下で行われるので、おそらく、その代謝物質は ZP 付近に蓄積しているものと考えた。本章で着目した卵管は発情周期による内分泌のバランスにより運動性が異なり (Rodriguez. 1984; Gimeno *et al.*

1985; Langendijk *et al.* 2002)、発情三日目の卵管では卵管峡部と膨大部-峡部接合部は強く頻度の高い相動性収縮を見せ、膨大部は弱いながら運動性を示すことが報告されている(Rodriguez *et al.* 1982)。また、卵管の不規則な収縮がホルモンや栄養素、卵子(胚)を攪拌して単一精子の受精や初期発生に都合の良い環境を作る可能性があるとする報告もある(Muglia *et al.* 2001)。したがって、体内ではZP周辺に蓄積する死滅した精子由来の有毒な代謝物質の濃度を下げ、死滅した精子からの直接的影響が軽減されているものと考えられる。本章の回転培養IVF系では、媒精中にチューブを回転させることによって生じるIVF培地の攪拌により、死滅した精子由来の有毒な代謝物質をZP周辺より拡散することで、卵子は死滅した精子からの直接的影響が軽減され、体内での受精と同様に受精のバランスを保っているものと考えられる。

本章の回転培養IVF系は、効果的に多精子受精を防ぎ、正常な受精である単一精子受精率を向上させたが、IVF後の卵割率および胚盤胞形成率は回転の有無による影響を受けなかった。おそらく、以下のような重大な問題点が関係しているものと考えられる。ブタ多精子受精卵が体内および体外において卵割し、胚盤胞へ発達し得ることが報告されている(Han *et al.* 1999a,b; Funahashi 2003; Somfai *et al.* 2008)。多精子受精卵由来胚盤胞および単一精子受精卵由来胚盤胞との間で形態的な差はみられないが、Inner cell mass (ICM)とTrophectoderm (TE)の比率を調べた結果、前者は後者と比較してICMの比率が小さくなるといわれている(Han *et al.* 1999a)。さらに、多精子受精による異常倍体(abnormal ploidy)および多倍体(poly ploidy)受精卵のみならず、異常受精卵が胚盤胞へ発生することが明らかとなっており、それらは細胞数が少ない、サイズが小さいおよび発生速度が遅いなどと報告されている(Ulloa *et al.* 2008)。加えて、3個以上の前核を持つ受精卵を選抜して、レシピエントに移植したところ、受精後40日で胎子

の体細胞を調べると全ての胎子は2倍体であり、さらに出産した子ブタの血液サンプルを調べると2倍体であったとの興味深い報告がある(Han *et al.* 1999a)。これらの報告から、本章の回転培養 IVF 系にて胚盤胞形成率に有意な差がみられなかったのは、対照区において何らかの理由によって、これらの異常受精卵が数多く胚盤胞に発生したためと考えられる。

したがって、本章では回転培養 IVF 系を用いて得られた胚盤胞の ICM および TE の比率を検討しなかったため、今後、この点について検討する必要がある。また、前核形成時に異常受精卵を非侵襲的に識別し除外する方法を検討し、回転培養 IVF 系の有用性をさらに証明する必要があると考える。

2-5 图表



Fig. 2-1 The sperm-rich fractions of ejaculates were obtained from Clawn miniature pigs using the gloved-hand method.

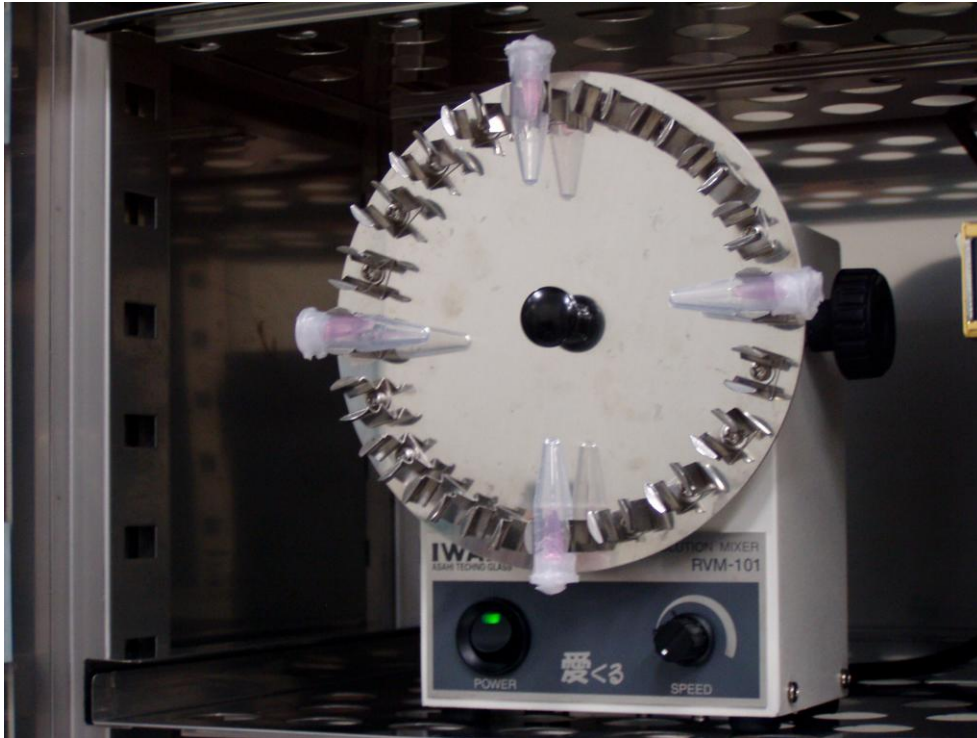


Fig. 2-2 A new IVF system based on rotation of a small tube containing IVF medium, porcine spermatozoa, and porcine oocytes. The rotation mixer was placed within an incubator at 38.5°C and rotated at 1 rpm.

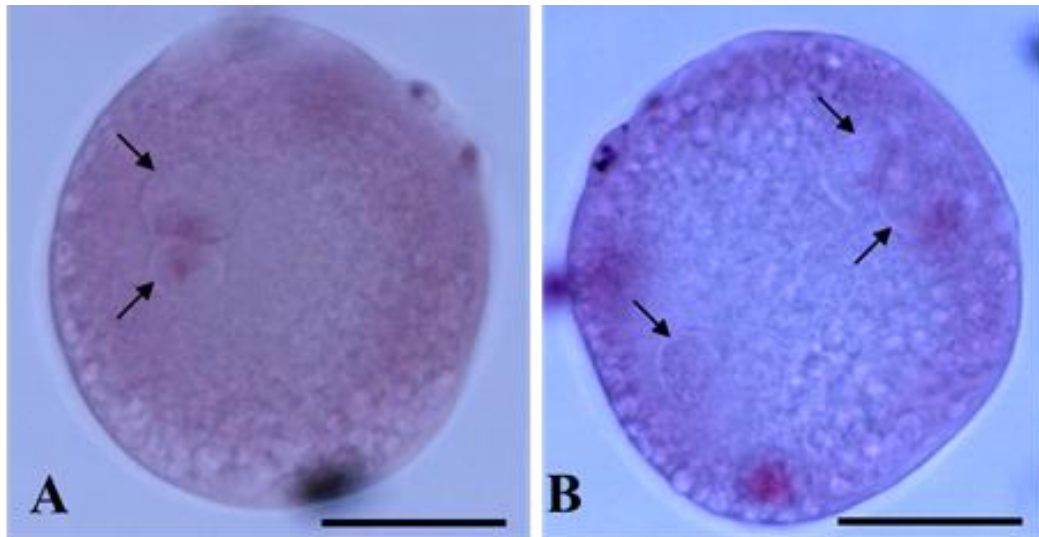


Fig. 2-3 Staining of oocytes 12 h after IVF with 1% orcein. (A), An oocyte normally fertilized. (B), An oocyte exhibiting polyspermic fertilization. Arrows indicate nuclei. Bar = 100 μm .

Table 2-1 Results of IVF in static (Control) and rotating (Experiment) systems

IVF Treatment ¹	No. of oocytes tested	% (no.) of oocytes penetrated ²	% (no.) of polyspermic Oocytes ³	% (no.) of monospermic oocytes ⁴
Control	118	83.1 (98)	48.3 ^a (57)	21.2 ^a (25)
Experiment	105	75.2 (79)	21.0 ^b (22)	44.8 ^b (47)

¹ IVF was performed using a rolling culture method with a PCR tube and rotation mixer (Experimental group), as described in Materials and Methods. Simultaneously, a second PCR tube containing oocytes/spermatozoa was cultured at 38.5°C (Control group). Experiments were repeated 8 times.

² Oocytes having two or more nuclei/swollen heads/sperm tails in their cytoplasm and plasma membrane were designated as penetrated oocytes.

³ Oocytes with more than one male pronuclei or sperm heads in their cytoplasm and plasma membrane were designated as polyspermic oocytes.

⁴ Oocytes with both male and female pronuclei (one each) were designated as monospermic oocytes.

^{a,b} Values with different superscripts within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2-2 *In vitro* development of porcine oocytes after IVF in a static (Control) and rotating (Experiment) IVF systems

IVF Treatment ¹	No. of oocytes cultured	% (no.) of oocytes cleaved ²	% (no.) of blastocysts ³	Mean no. of cells in blastocysts ⁴
Control	283	52.7 (149)	11.0 (31)	60.3 ± 5.6
Experiment	283	50.5 (143)	15.2 (43)	54.5 ± 5.4

¹ Treatment is the same as described in Table 2-1. Experiments were repeated a total of 8 times.

² Oocytes developing to 2-cell stage 48 h after IVF are designated as oocytes cleaved.

³ Oocytes developing to blastocyst stage 7 days after IVF are designated as blastocysts.

⁴ Total no. of cells in blastocysts were assessed by staining with Hoechst 33342, as described in Materials and Methods. Data are expressed as means ± SEM.

第3章

凍結前の緑茶由来ポリフェノール属による処理が
ブタ凍結融解精子の正常性および体外受精能に及ぼす影響

3-1 緒言

精子の凍結保存技術は(1) 精子バンク、(2)一定の品質保証がなされた精液の商業的供給、および(3)人工授精(artificial insemination; AI)技術を用いた品種改良計画、これら3つの連携を通して遺伝資源の保存を促進するといわれている(Holt 1997; Bailey *et al.* 2008)。しかしながら、凍結融解精子を用いたAIでは、新鮮な精子を用いた場合より低い受精率および産子数になると報告されている(Almlid & Hofmo 1995; Johnson *et al.* 2000)。

精液を凍結保存すると、精子膜上で起こる物理的および化学的変化が引き起こす活性酸素種(reactive oxidative species; ROS)による酸化ストレスが生じるといわれており(Watson 1995)、凍結および融解処理中に産生される過剰なROSによる脂質過酸化が原因で、精子の運動性、生存能力、DNA正常性および受精能力が低下することが報告されている(Agarwal *et al.* 2004)。一般的に、細胞内では発生したROSを除去し、酸化状態から還元状態に戻す種々の抗酸化物質が産生され、恒常性を維持する機能を持っていることが知られている。したがって、ROSによる酸化ストレス刺激は、必ずしも障害を誘導するものではなく、細胞内のレドックスバランスを維持する機構が重要となる。しかし、ブタの精子は高度不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids; PuFA)の含有量が多く、精漿の抗酸化能力も不十分なため、コールドショックに弱いといわれている(Roca *et al.* 2005)。また、PuFA含有量が多いため、ブタ精子は過剰なROSが原因で脂質過酸化されやすく、精子形成障害を起こしやすいと報告されている(Baumber *et al.* 2000)。

これらの調査結果から、精液を過剰なROSから効率的に保護し得る抗酸化剤を含む保存液を使用することにより、保存中における精子の品質低下を克服できる可能性が提唱されている。したがって、多数の研究においてブタ精子の凍結保存培地として、幅広い効果を持つ抗酸化剤(Vitamin C, Vitamin Eおよびcatalaseなど)の有無が調べられた(Großfeld *et al.* 2008)。

第1章にて述べたように、強力な抗酸化剤として知られている緑茶(*Camellia*

sinensis)から抽出させるポリフェノール属(Polyphenols; PFs)は、乾燥茶葉から抽出可能な固形物の30~40%を構成しており、抗炎症性(Ho *et al.* 1992)、抗変異原性(Shiraki *et al.* 1994)および抗発癌性(Huang *et al.* 1992; Yang & Wang 1993)の効果など、多くの生物学的機能を持つ。また、PFsは哺乳類の多種多様な細胞および臓器の保存に有用であると報告されている(Hyon & Kim 2001; Hyon 2004)。さらに、PFsは室温下での血管、角膜、神経、膵臓ランゲルハンス島、関節軟骨および心筋などの組織保存を促進する(Hyon 2004; Zhang *et al.* 2004; Ikeguchi *et al.* 2005; Han *et al.* 2005a,b; Hyon *et al.* 2006)が、興味深いことに、PFsは5°C下におけるイヌ精子の長期液状保存にも有効であることが報告されている(Wittayarat *et al.* 2013)。

また、本研究の先行研究において、PFsは長期液状保存したミニブタ射出精液における先体異常の発生率を減少し得ることが示唆された(鈴木 2001)。

したがって本章では、PFsが凍結および融解による損傷からブタ精子を保護し得るという仮説を検証するために、精子を種々の濃度のPFsを添加した精液保存液で希釈して15°C下で一晩前培養した後に凍結し、融解後の生存性、ミトコンドリア正常性および先体正常性を比較した。さらに、前章で開発した回転培養IVF系を用いて、PFs添加保存液中での前培養がブタ凍結融解精子の体外受精能に及ぼす影響について検討した。

3-2 材料および方法

3-2-1 緑茶抽出 PFs の調整

緑茶から抽出されたPFsの粉末は、Pharma Foods Internationalから購入した(PF-TP90, Kyoto, Japan)。

Hyon & Kim (2001)によると、同粉末は(-)-epigallo-catechin-3-*O*-gallate (EGCG) (28%), (-)-gallocatechin-3-*O*-gallate (11.6%), (-)-epicatechin-3-*O*-gallate (4.6%), (-)-epigallocatechin (15.0%), (+)-gallocatechin (14.8%), (-)-epicatechin (7.0%)および (+)-catechin (9.5%)を含有しており、純度90%以上である。

このPFs粉末を0.2% (w/v)でMulberry IIIに溶解し、完全に溶けたことを確認した後、精子前培養用ストック液とした。ストック液は供試するまで - 20°Cで保存した。融解後、ストック液中のPFs濃度が0, 0.01, 0.05, 0.1, および0.2% (w/v)となるようにMulberry IIIにて希釈し、実験に供試した。

3-2-2 ブタ精液の採取、前培養および凍結保存

クラウン系ミニブタ(A;3歳およびB;8歳)から、2-2-2と同様の方法を用いて濃厚部射出精液を遠心チューブ(Ina Optika, Osaka, Japan)に採取した。その後、2-2-2と同様の方法を用いて性状検査を行い、運動性80%以上、形態異常が15%以下の精液を以下の実験に供試した。

精液(精子濃度 $\sim 2 \times 10^8$ sperm/mL)を5種類の濃度 [0, 0.01, 0.05, 0.1, および0.2%(w/v)]のPFsを添加したMulberry IIIで等倍希釈し、気層を作らないようにマイクロチューブに入れ、Sealing Film(BEMIS)にて密封した後、15°Cに設定した恒温器にて、PFsの精子への吸着を促すため一晩保存(前培養)した。なお、精子に対するPFsの最終濃度はそれぞれ0, 0.005, 0.025, 0.05および0.1% (w/v)PFsとなるが、これらの区を0%区、0.01%区、0.05%区、0.1%区および0.2%区と表記す

ることとした。

Westendorf *et al.* (1975)および丹羽ら (1989)の既報に若干の修正を加えた方法を用いて、精液の凍結処理を行った。

前培養後の精液を遠心分離(800 g・14分・15°C)し、上澄み液を除去した後、予め15°Cに冷却した8.8% (w/v) lactose, 20% (v/v) egg yolkおよび100 µg/mL kanamycin (Meiji Seika, Tokyo, Japan)から成るlactose egg yolk (LEY)を500 µL加え、静かに混和した。予め15°Cに冷却したプログラムフリーザー(ET-1N:Fujihira Industry Co., Ltd, Tokyo, Japan)にマイクロチューブを入れ、1.5時間かけて徐々に5°Cまで冷却した後、さらに5°C下で1時間維持した。

1時間後、予め5°Cに冷却した1.5% (v/v) Equex STM[®] (Nova Chemical Sales Inc., Scituate, USA; Buranaamnuay *et al.* 2009)および6% (v/v) glycerol (Nacalai Tesque)を添加したLEYを等量(500 µL)加えて静かに混和後、直ちに1 mL使い捨てシリンジ(Nipro, Osaka, Japan)へ充填した。

シリンジ内の気泡を中心に移動した後、直ちに液体窒素を入れた発泡スチロール容器の液体窒素液面約4cm上に置いた凍結架台にシリンジを載せ、発泡スチロールの蓋を閉じて30分間の気化熱凍結を行った。

30分後、発泡スチロールから取り出したシリンジを直ちに液体窒素タンク(-196°C)中に入れ、実験に供試するまで保管した。

3-2-3 凍結精子の融解および希釈

液体窒素タンクから取り出したシリンジを40°Cの温湯に50秒間浸漬して融解した後、直ちに予め37°Cに加温したMulberry III (5 mL)を入れた15 mLチューブ(Ina Optika)に精液を押し出し、37°Cに設定した恒温槽中で振とう培養した。

なお、振とう培養時間はフローサイトメトリー(flow cytometry; FCM)分析に用いる場合は30分間、IVFに用いる場合は15~30分間とした。振とう培養後、遠心分離(800 g・5分)を行い、上澄みを除去した。

FCMの場合は、modified HEPES-TLP-PVA (mHEPES-TLP-PVA; 附表8)を加えて、

静かに攪拌した後、1.5 mLマイクロチューブに移し、遠心分離を行った。再度、上澄みを除去した後、同操作を繰り返した。洗浄後、mHepes-TLP-PVAで 1×10^7 sperm/mLに希釈した。

IVFの場合は、精子洗浄液(附表3)を加えて、静かに攪拌した後、1.5 mLマイクロチューブに移し、遠心分離を行った。再度、上澄みを除去した後、同操作を繰り返した。洗浄後、カフェイン無添加のmTLP(附表4)で 2×10^7 sperm/mLに希釈した。

3-2-4 精子の蛍光染色

4種類の蛍光色素試薬を用いて、精子機能の分析を行った。それぞれの蛍光色素試薬の調製については以下のように行った。

・SYBR-14 & Propidium iodide (PI): LIVE/DEAD Sperm Viability Kit:L-7011,

Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA

精子生存能力の評価はSYBR-14とPIを用いた二重染色法によって行った(Garner & Johnson 1995)。SYBR-14は正常な細胞膜より細胞内に透過し、核を緑色に蛍光染色する特性を持っているため、精子の生存性分析に用いた。SYBR-14をDimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA)に溶解して1 mM stock solutionを作製し、小分けして供試するまで -20°C で遮光凍結保存した。1 mM stock solutionを融解後、DMSOにて $50 \mu\text{M}$ に希釈したものをworking solutionとして分析に供試した。

PIはSYBR-14と異なり、生細胞の無傷の原形質膜からは取り込まれない特異的な染色液である。しかし、細胞が損傷を受けた時に透過できるようになり、核を赤色に蛍光染色する特性を持っている。この特性を利用し死細胞染色液として用いた(Garner *et al.* 1994; Garner & Johnson 1995)。PIを滅菌蒸留水に溶解し

て2.4 mM stock solutionを作製し、小分けして供試するまで-20℃で遮光凍結保存した。

室温・暗所下で精液(2.5×10^5 sperm/25 μ L)を0.6 mLチューブに入れ、SYBR-14 working solution (1 μ L)、PI stock solution (1 μ L)およびmHepes-TLP-PVA (25 μ L)を添加して、同環境下で20分間静置後、mHepes-TLP-PVA (200 μ L)を添加して、1時間以内にフローサイトメーターを用いて分析した。

• **MitoTracker Green (MTG): Mito Tracker Green FM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA**

ミトコンドリア正常性の評価は、MTGとPIを用いた二重染色法によって行った。このMTG試薬は、共焦点顕微鏡法およびFCMにおいて一般的に用いられるミトコンドリア選択的蛍光標識である(Garner *et al.* 1997; Scorrano *et al.* 1999; Vizler *et al.* 2002)。MTGはミトコンドリア代謝活性を持つ細胞のミトコンドリア内部に取り込まれ、緑色に蛍光発色する特性を持っている。MTGはDMSOに溶解して1 mM stock solutionを作製し、小分けして供試するまで-20℃で遮光凍結保存した。1 mM stock solutionを融解後、DMSOにて50 μ Mに希釈したものをworking solutionとして分析に供試した。室温・暗所下で精液(2.5×10^5 sperm/25 μ L)を0.6 mLチューブに入れ、MTG working solution (1 μ L)、PI stock solution (1 μ L)およびmHepes-TLP-PVA (25 μ L)を添加して、同環境下で20分間静置後、mHepes-TLP-PVA (200 μ L)を添加して、1時間以内にフローサイトメーターを用いて分析した。

• **Peanut agglutinin-fluorescence isothiocyanate (FITC-PNA): L-7381; Sigma-Aldrich Chemical**

精子先体正常性の評価は、FITC-PNAとPIを用いた二重染色法によって行った(Cheng *et al.* 1996)。精子先端部にはPNAで識別できる成分が存在し、原形質膜および先体外膜が正常な精子はFITC-PNAに染色されない。しかし、原形質膜

および先体外膜が損傷すると、先体内の物質がFITC-PNAで染色される (Mortimer *et al.* 1987)。FITC-PNAをphosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4, Sigma-Aldrich Chemical)に溶解して10 µg/mL stock solutionを作製し、小分けして供試するまで-20°Cで遮光凍結保存した。室温・暗所下で精液(2.5×10^5 sperm/25µL)を0.6 mLチューブに入れ、FITC-PNA stock solution (1 µL)、PI stock solution (1 µL)およびmHepes-TLP-PVA (25 µL)を添加して、同環境下で20分間静置後、mHepes-TLP-PVA (200 µL)を添加して、1時間以内にフローサイトメーターを用いて分析した。

なお、SYBR-14+PI、MTG+PIおよびFITC-PNA+PIによって染色した精子を Fig. 3-1に示した。

3-2-5 FCM 分析

FCM分析はCoulter Epics XL cytometer (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA; Fig. 3-2)を用いて、Graham *et al.* (1990)およびMétézeau *et al.* (1991)の手法に基づいて行った。メーターに搭載されている15 mWアルゴン・イオンレーザーは488 nmで動作させ、フルオロフォアを励起した。SYBR-14、MTGおよびFITC-PNAの蛍光を検出するためFL-1センサー(525 nmの帯域フィルター)を、PIの蛍光を検出するためFL-4センサー(670 nmの帯域フィルター)を用いた。また、1サンプルにつき100,000イベントのデータを収集し、さらに各サンプルにつき3反復のデータを記録した。フローサイトメーターから得られたデータは余計な細胞片および凝集物等のデータを除外するために、Expo32ADC (Beckman Coulter Inc.) 解析ソフトを用いて再分析を行った。

得られたデータは、検出された蛍光細胞集団(SYBR-14 vs PI、MTG vs PIおよび FITC-PNA vs PI)について四分割された図面に表示された。

3-2-6 IVF、発生培養および発生状況の観察

COCs 採取および IVM は 2-2-1 と同様の方法を用いて行った。

IVF は 2-2-3 と同様の方法を用いて行った。なお、予備試験の結果から、精子の最終濃度を 1×10^6 sperm/mL に調整した。また、発生培養および発生状況の観察は 2-2-4 と同様の方法を用いて行った。

3-2-7 実験デザイン

試験1 精液保存液中におけるPFsの濃度が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響

精液保存液に0、0.01、0.05、0.1および0.2% (w/v)PFsを添加する5区を設けた。なお、精子に対するPFsの最終濃度はそれぞれ0、0.005、0.025、0.05および0.1% (w/v)PFsとなるが、これらの区を0%区、0.01%区、0.05%区、0.1%区および0.2%区と表記することとした。

それぞれの精液保存液中で前培養した後に凍結融解した精子の性状を比較するため、フローサイトメーターを用いて生存率、ミトコンドリア正常性および先体正常性について分析を行った。

試験2 精液保存液中のPFsが凍結融解精子の体外受精能に及ぼす影響

試験1の結果から、精液保存液に0および0.01%のPFsを添加する2区を設けた。なお、精子に対するPFsの最終濃度はそれぞれ0および0.005% (w/v)PFsとなるが、これらの区を0%区および0.01%区と表記することとした。

それぞれの保存液中で前培養した後に凍結融解した精子の体外受精能を比較するため、第2章で開発した回転培養IVF系を用いて、IVM卵子に媒精し、精子侵

入率、多精子受精率および単一精子受精率を調べた。さらに、得られた受精卵を培養して卵割率、胚盤胞形成率および胚盤胞細胞数を比較した。

なお、精液は試験開始時にブタBが体調不良にて死亡したため、ブタAの精液のみを試験に用いた。

3-2-8 統計学的分析

FCMのデータ(生存率、ミトコンドリア正常性および先体正常性)は平均 ± SEMで表示した。

FCMの各%データに関してはアークサイン角変換後に一元配置分散分析を用いて検定した。精子侵入率、多精子受精率、単一精子受精率、卵割率および胚盤胞形成率の各%データに関しては、アークサイン角変換後に一元配置分散分析およびFisher's LSD testを用いて検定した。胚盤胞細胞数の比較には t -検定を用いた。なお、 $P<0.05$ の場合に有意差があるとした。

3-3 結果

3-3-1 精液保存液中における PFs の濃度が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響

PFsの各濃度区間で、融解後の精子運動性に差はみられなかった(未発表データ)。FCM分析結果はFig.3-3に示した。また、生存率、ミトコンドリア正常性および先体正常性の結果をTable. 3-1に示した。

生存能力は、ブタAおよびBのいずれにおいても、0.01%区(A: $42.1 \pm 1.1\%$; B: $54.1 \pm 1.1\%$)が対照区(A: $36.5 \pm 1.4\%$; B: $46.6 \pm 1.9\%$)と比較して有意に高い値を示した($P < 0.05$)。

ミトコンドリア正常性は、ブタBにおいて0.01、0.05および0.1%区($54.8 \pm 1.9\%$ 、 $51.6 \pm 2.5\%$ 、 $44.5 \pm 1.9\%$)は対照区($49.4 \pm 2.3\%$)と比較して有意な差は認められなかった。しかし、0.01%区は対照区と比較して高くなる傾向がみられた。また、0.2%区($37.6 \pm 1.5\%$)は対照区($49.4 \pm 2.3\%$)と比較して有意に低い値を示した($P < 0.05$)。同様に、ブタAにおいても0.01、0.05および0.1%区($51.6 \pm 0.7\%$ 、 $47.2 \pm 2.1\%$ 、 $44.8 \pm 3.1\%$)は対照区($44.3 \pm 3.5\%$)と比較して有意な差は認められず、0.01%区は対照区と比較して高くなる傾向がみられ、0.2%区($35.3 \pm 3.0\%$)は対照区($44.3 \pm 3.5\%$)と比較して有意に低い値を示した($P < 0.05$)。

先体正常性は、ブタBにおいて0.01%区($52.2 \pm 0.9\%$)は対照区($44.5 \pm 1.9\%$)と比較して有意に高い値を示し($P < 0.05$)、0.1%区($36.9 \pm 2.8\%$)および0.2%区($37.2 \pm 2.5\%$)は対照区と比較して比べき有意に低い値を示した($P < 0.05$)。同様に、ブタAにおいても0.01%区($39.0 \pm 1.3\%$)は対照区($34.2 \pm 0.9\%$)と比較して有意に高い値を示し($P < 0.05$)、0.2%区($26.5 \pm 1.8\%$)は対照区と比較して有意に低い値を示した($P < 0.05$)。

3-3-2 精液保存液中のPFsが凍結融解精子の体外受精能に及ぼす影響

IVFの結果をTable. 3-2に示し、体外発生の結果をTable. 3-3に示した。
なお、試験開始時にブタBが体調不良にて死亡したため、ブタAの結果のみを示した。

精子侵入率は、0.01%区(61.0%)および0%区(71.1%)間に有意な差は認められなかった。しかしながら、多精子受精率は、0.01%区(24.0%)が0%区(53.1%)と比較して有意に低い値を示し($P<0.05$)、単一精子受精率は、0.01%区(76.0%)が0%区(37.5%)と比較して有意に高い値を示した($P<0.05$)。受精後の卵割率は、0.01%区(38.4%)および0%区(38.4%)間に有意な差は認められなかった。しかしながら、胚盤胞形成率は、0.01%区(20.2%)が0%区(12.1%)と比較して有意に高い値を示した($P<0.05$)。胚盤胞細胞数は、0.01%区(68.9 ± 11.2)および対照区(54.6 ± 5.6)間に有意な差は認められなかった。

3-4 考察

本章の結果より、精液保存液への0.01% PFsの添加は、ブタ凍結保存精子の正常性維持に有用であることが示された。

第1章および緒言にて述べたように、ブタ凍結保存精子は、精子膜の流動性が冷却および加温により失われる、凍結および融解の過程で精子酵素漏出が増加する、精子頭部の異常が増加するといわれている。また、精子が運動性を得るためには、ミトコンドリアのATP生産過程が必要であるが、その過程でROS、特にスーパーオキシドアニオン(O_2^-)を生成される(Storey 2008)。ROSは精液中の白血球によっても産出され(Aitken *et al.* 1992)、精子膜の流動性を低下させるといわれている(Zalata *et al.* 1998)。さらに、原形質膜がPuFAを豊富に含んでいる(Cerolini *et al.* 2000; Parks & Graham 1992)ため、ブタ精子はROSの過剰発生により脂質過酸化されやすい(Halliwell & Gutteridge 1984)。しかし、PFsには抗酸化作用があり、精子が受けるこのような酸化ストレスを防いだ可能性が考えられる。

PFs 合成物は脂質二分子層、細胞外マトリックスおよび種々の細胞膜レセプターに簡単に吸収されることが知られている。したがって、精子膜成分に PFs が吸収されることによって、ROS により引き起こされる脂質膜の過酸化 (Hyon 2004) が抑制された結果、凍結および融解による損傷から精子が保護された可能性が考えられる。しかしながら、本章の結果より精液保存液への 0.1% (w/v) 以上の PFs 添加は精子に障害を与えることが示唆された。これは、PFs に濃度依存的な低減があるという報告(Wang *et al.* 2007)に一致する結果となった。

近年、70%以上のブタにおいて精液の細菌感染が認められ、その多くはグラム陰性菌であることが報告された。採精後、精液保存液中に添加された抗生物質によって菌が死滅することにより、その内毒素である lipopolysaccharide(LPS)が放出され、その結果、精子の機能が失われる。ブタ精子においては、15分程度

の LPS 刺激で細胞膜に変性が誘起され、これが凍結保存を困難にしている (Okazaki *et al.* 2010)。このことから、PFs は抗菌性に加え、LPS の毒性を中和する機能を持っている可能性も考えられる。

0.01% PFsの添加は、精子侵入率に影響を及ぼすことなく、多精子受精率の減少および単一精子受精率の向上をもたらし、その結果、IVF後の胚盤胞形成率が改善した。しかしながら、精液保存液へのPFs添加が凍結融解精子のIVFに与えるメカニズムは、明らかにされていない。おそらく、回転培養IVF系による多精子受精の減少効果に加え、PFsが融解直後の精子を通常の射出精子のような状態に維持させる効果を持つことによるものと考えられる。したがって今後、0.01% PFsの添加が融解後30分以上培養した凍結融解精子の受精能力に及ぼす影響について検討したいと考えている。

今後、PFs中のどの成分が効果的であるのかを特定することが必要である。前述したように、PFs は EGCG、(-)-gallo catechin-3-*O*-gallate、(-)-epicatechin-3-*O*-gallate、(-)-epigallocatechin、(+)-gallo catechin、(-)-epicatechin および(+)-catechinのようないくつかの成分を含んでいるが、中でもEGCGの含有量が高い。興味深いことに、種々の濃度のEGCGを添加したIVF培地でブタ凍結融解精子を培養したところ、50 μ Mの添加により精子侵入率および精子運動性が向上した(Kaedei *et al.* 2012)。それゆえに、PFsの代わりにEGCGを精液保存液に添加した場合にも精子膜の正常性が維持されるのかを調べることは、重要であると考えられる。また、0.01%のPFsを添加した精液保存液で前培養した凍結融解精子に由来するブタ受精卵が、産子にまで発生し得るか検証することも必要である。予備試験において、凍結保存液(LEY)へのPFs添加を試みたが十分な効果がみられなかった。おそらく、溶媒によっても効果が異なるものと考えられる。

イヌ精液の低温長期保存にはPFsとビタミンCの組み合わせが有効であると報告されている(Wittayarat *et al.* 2012)ことより、ブタにおいても0.01% PFsと他の抗酸化剤(ビタミンC、ビタミンEおよびグルタチオンなど)を組み合わせるこ

とにより、凍結融解精子の正常性をさらに向上させることが可能であると考えられる。しかし、PFsが精液保存期間における酸化ストレスなどを防ぐ特定のメカニズムは明白ではなく、抗酸化剤が精子に与える影響は活力、受精能獲得および先体反応など多岐にわたり、非常に複雑である。それらの作用機序の解明は今後の精子保存技術の改善に役立つものと考えられる。

3-5 図表

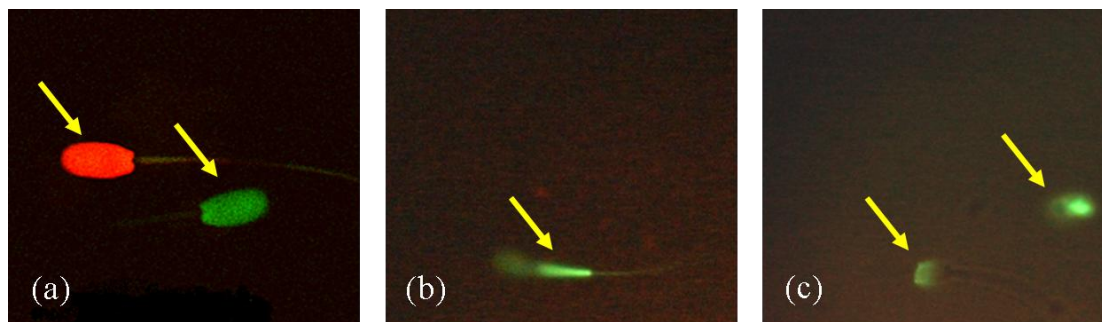


Fig. 3-1 Representative photograph of fluorescent stained sperm

Live spermatozoa remained unstained by PI, but exhibit SYBR-14-derived green fluorescence, as depicted in Fig. 3-1a (arrows).

Spermatozoa with a normal mitochondria express green fluorescence in its mid- piece, as depicted in Fig. 3-1b (arrow).

Spermatozoa with an intact acrosome have no fluorescence, and spermatozoa with a damaged acrosome exhibit green fluorescence, as depicted in Fig. 3-1c (arrows).



Fig. 3-2 Representative photograph of Flowcytometer system

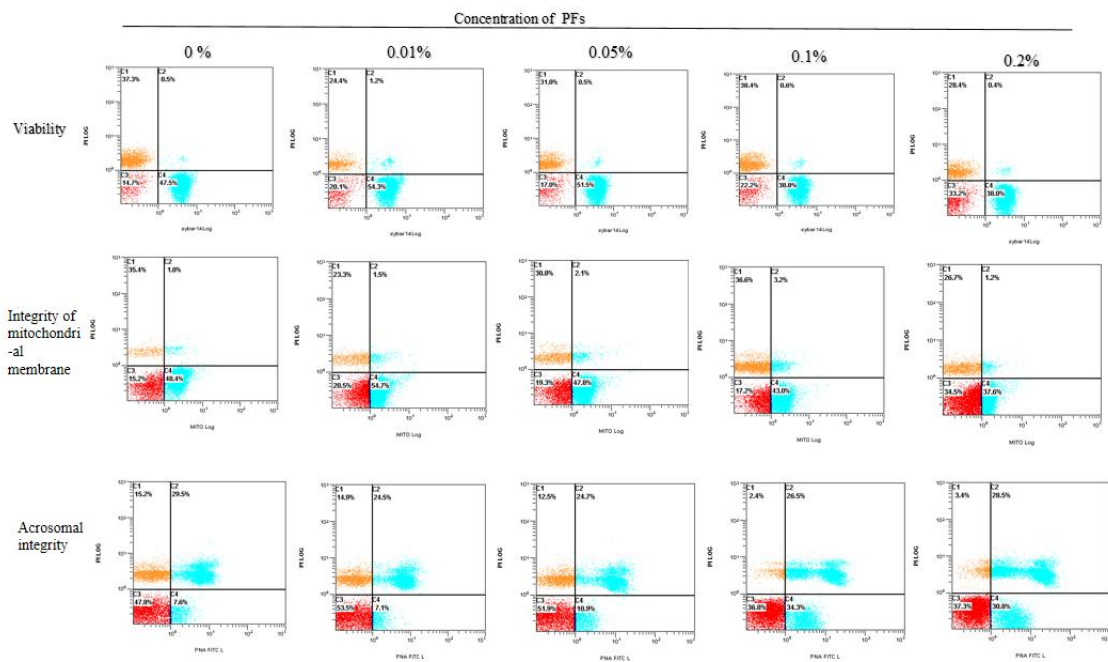


Fig. 3-3 The results of flow cytometric analysis of sperm after pre-incubation with semen extender supplemented with various amounts (0, 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2%) of PFs.

Data shown are one of the three consecutive trials. Viability of sperm was evaluated by inspecting the percentages in the C4 quadrant.

Integrity of mitochondrial membrane was evaluated by inspecting the percentages in the C4 quadrant.

Acrosomal integrity was evaluated by inspecting the percentages in the C3 quadrant.

Table. 3-1 Effects of preincubation of boar semen with various amounts of green tea-derived PFs prior to freezing procedure on post-thaw sperm quality

Adult boar individuals (age) ¹	Concentration (%) of PFs in semen extender	Viability (%)	Integrity of mitochondrial membrane (%)	Acrosomal integrity (%)
A (3 years)	0	36.5 ± 1.4 ^a	44.3 ± 3.5 ^a	34.2 ± 0.9 ^a
	0.01	42.1 ± 1.1 ^b	51.6 ± 0.7 ^a	39.0 ± 1.3 ^b
	0.05	37.4 ± 0.1 ^{ab}	47.2 ± 2.1 ^a	33.3 ± 1.2 ^a
	0.1	38.3 ± 2.1 ^{ab}	44.8 ± 3.1 ^a	34.9 ± 1.7 ^{ab}
	0.2	28.7 ± 2.4 ^c	35.3 ± 3.0 ^b	26.5 ± 1.8 ^c
.....				
B (8 years)	0	46.6 ± 1.9 ^a	49.4 ± 2.3 ^{ab}	44.5 ± 1.9 ^a
	0.01	54.1 ± 1.1 ^b	54.8 ± 1.9 ^b	52.2 ± 0.9 ^b
	0.05	51.5 ± 1.7 ^{ab}	51.6 ± 2.5 ^b	49.6 ± 1.7 ^{ab}
	0.1	39.0 ± 3.2 ^c	44.5 ± 1.9 ^a	36.9 ± 2.8 ^c
	0.2	37.5 ± 2.5 ^c	37.6 ± 1.5 ^c	37.2 ± 2.5 ^c

¹After thawing, sperm quality (viability, integrity of mitochondrial membrane and acrosomal integrity) was evaluated by flow cytometric analysis. Mean percentage ± SEM of each parameter for sperm quality is provided for different amounts of PFs dissolved in the semen extender. Experiments were repeated 3 times.

^{a-c} Values with different superscripts within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table. 3-2 Effects of preincubation of boar semen with 0 or 0.01% PFs prior to freezing procedure on the fertilizing ability of post-thawed sperm

Concentration (%) of PFs in semen extender ¹	No. of oocytes tested	% (no.) of oocytes penetrated ²	% (no.) of polyspermic oocytes ³	% (no.) of monospermic oocytes ⁴
0	45	71.1 (32)	53.1 ^a (17)	37.5 ^a (12)
0.01	41	61.0 (25)	24.0 ^b (6)	76.0 ^b (19)

¹ IVF was performed using a rolling method with a PCR tube and rotation mixer, as described in Materials and Methods. Sperm used are derived from the boar A shown in Table 3-1. Experiments were repeated 5 times.

² Oocytes having two or more nuclei/swollen heads/sperm tails in their cytoplasm and plasma membrane are designated as “penetrated oocytes”.

³ Oocytes with more than two nuclei/swollen heads/sperm tails in their cytoplasm and plasma membrane are designated as “polyspermic oocytes”.

⁴ Oocytes with both one male and one female pronucleus were designated as “monospermic oocytes”.

^{a,b} Values with different superscripts with in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table. 3-3 Effects of preincubation of boar semen with 0 or 0.01% PFs prior to freezing procedure on *in vitro* development of porcine oocytes fertilized with the post-thawed sperm

Concentration (%) of PFs in semen extender ¹	No. of oocytes tested	% (no.) of oocytes cleaved ²	% (no.) of blastocysts developed ³	Total no. of cells in developing blastocysts ⁴
0	99	38.4 (38)	12.1 ^a (12)	54.6±5.6
0.01	99	38.4 (38)	20.2 ^b (20)	68.9±11.2

¹ IVF was performed using a rolling method with a PCR tube and rotation mixer, as described in Materials and Methods. Sperm used are derived from Boar A shown in Table 3-1. Experiments were repeated 5 times.

² Oocytes developing to 2-cell stage 48 h after IVF are designated as oocytes cleaved.

³ Oocytes developing to blastocyst stage 7 days after IVF are designated as blastocysts.

⁴ Total no. of cells in blastocysts were assessed by staining with Hoechst 33342, as described in Materials and Methods. Data are expressed as means ± SEM.

^{ab} Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

第4章

総合考察

本研究は、ブタ IVM 卵子の IVF において頻発する多精子受精を卵管運動の模倣により軽減し、効率的に単一精子受精卵を得ることおよび、ブタ精液の凍結融解時に起こる精子の損傷を軽減し、精子正常性を維持することで効率的に受精卵および胚盤胞を作出することを検討した。この研究を通じて、以下に示すような2つの新知見を得ることに成功した。

第一に、ブタ IVM 卵子の IVF において、回転培養処理下で媒精することによって、精子侵入率を一定以上に保ちながら多精子受精の頻度を減少させ、正常な受精である単一精子受精卵を効率的に得られることを見出した(第2章)。

第二に、0.01% PFs 添加精液保存液で前培養することによって、ブタ凍結融解精子の生存能力および先体正常性を維持することが可能となり、その結果、受精および発生状況を改善し得ることが明かとなった(第3章)。

以下では各章で得られた結果について、さらなる考察を行った。

まず、一番目の知見に関して考察する。第2章において確立された回転培養 IVF 系では、精子濃度が 2×10^5 sperm/mL と多く、運動性による選抜も行っていないにもかかわらず、チューブを回転させるという非常に単純な手法を用いるだけで、多精子受精を軽減して単一精子受精率を向上させることに成功した。また、特別な細胞、組織液および試薬を必要としないので非常に単純で便利な点が特徴的である。しかし、以下に挙げるような欠点があり、さらなる検証が必要である。

- ①精子濃度が減少すると従来の IVF 同様、受精率が低下する。
- ②雄間および、同一雄での精子採取反復間で体外受精能に差がみられる。
- ③ミキサーの回転速度を上げると、遠心力により卵子および精子がチューブ先端に集まり、多精子受精率の減少につながらない。

④媒精中、培地中のガス交換が行えないため、培地の気層を一定に保つ方法が必要である。

①および②に関しては、解決策を見出すため、従来の IVF 系と同様にさらなる検討が必要である。

③に関しては、予備試験の結果より、卵子が穏やかに培地中を移動するように回転速度を 1 rpm に設定したが、供試精子の性状を考慮に入れた最適化を検討する必要がある。

④に関しては、密閉条件下で卵子および 2×10^5 sperm/mL の精子との 6 時間の共培養を行ったが、受精卵を得ることができ胚盤胞期まで発生することが確認された。しかし、精子が多く酸素を消費することが知られており (池上 1978)、卵子に及ぼす影響の有無を検討する必要がある。おそらく、胚盤胞形成率に差がみられなかった一因だと考えられる。

さらに、多精子受精を抑制した要因を検討するため、ZP 結合精子数を調べる必要がある。今後、これらの点について検討し、回転培養 IVF 系の有用性をさらに証明する必要があると考える。

次に二番目の知見について考察する。第 3 章において微量 PFs がブタ精子の凍結保存期間中の性状を維持することに有益であることが示されたが、既存の知見も少なく、PFs による精子保護のメカニズムは明らかではない。したがって、以下に、追加考察を行った。

第 2 章の実験区が第 3 章、試験 2 の 0% 区に相当する。第 2 章の実験区では、多精子受精率が 21.0% と有意に低下しているが、0% 区では、多精子受精率が 53.1% となっている。また、胚盤胞形成率は 0.01% 区(20.2%)が 0% 区(12.1%)と比較して有意に高い値を示し ($P < 0.05$)、第 1 章の記述および第 2 章の結果と矛盾が生じている。さらに、Table. 3-1 より 0% 区は先体に異常を認める精子が多い。

すなわち、逆に多精子受精率が減少すると考えられ、結果に矛盾が生じている。

おそらく、多精子受精率および胚盤胞形成率の矛盾は、雄間および同一雄であっても、精子採取反復間で IVF 能に差がみられる(Nagai *et al.* 1990; Wang *et al.* 1991; Xu *et al.* 1996)ことが原因であると考えられる。第2章(ブタ B)および第3章(ブタ A)で用いたブタが異なったために発生した矛盾だと推察される。また、0%区で多精子受精率が減少しなかった原因は、不明である。したがって、今後、さらなる詳細な検証が必要である。

一般的にカテキン類には細胞毒性があることが知られている。すなわち、至適濃度以上のカテキン類の添加は細胞障害を引き起こす。第3章はHyon & Kim (2001)およびHyon (2004)などの報告を参考にPFs処理濃度の設定を行った。しかし、多くの研究と同様に生理学的メカニズムを検証することなく、PFsの及ぼす影響を観察するにとどまったため、詳細な考察が困難となった。

近年、PFsは抗酸化作用とは逆の酸化促進作用を持ち、複雑多岐にわたるメカニズムのため、特定のメカニズムを定めることは非常に困難であると報告されており(Kim *et al.* 2014)、それらの作用機序の解明は今後の精子保存技術の改善に役立つものと考えられる。

以上のような問題点を検証することで、本研究で得られた知見は、ブタIVM卵子の効率的なIVF系の確立に大きく貢献すると考えられる。

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文を執筆するにあたり、実験の機会・場所を提供して下さると共に、ご助言・ご指導を賜りました鹿児島大学農学部生物生産学科家畜繁殖学研究室の三好和睦准教授、大久津昌治准教授に心から感謝致します。また、研究・論文を進めるにあたり、多大なるご助力を頂きました鹿児島大学医学部医用ミニブタ・先端医療開発研究センターの佐藤正宏教授に深く謝意を表します。ご多忙の中、本論文の審査をして頂きました琉球大学農学部の建本秀樹教授、鹿児島大学水産学部の上西由翁教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、貴重な供試ブタ卵巣の提供・採取にご協力して頂きました鹿児島食肉センターの職員の皆様に深く感謝致します。

そして、花岡 良さん、日高知保さん、鈴木正和さん、野中太輔さんには本研究の先駆けとなる実験を担当して下さいました。また、森 和幸さん、内之倉 拓さんには実験で多大なるご尽力を頂きました。ここに、感謝の意を表します。

最後に、本研究にご協力を頂いた鹿児島大学農学部生物生産学科家畜繁殖学研究室の諸氏を含め、全ての方々に心よりに感謝致します。

参考文献

- Abeydeera LR, Day BN.** Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1997a; 57: 729-734.
- Abeydeera LR, Day BN.** *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*. 1997b; 48: 537-544.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN.** Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 1998a; 51: 395-401.
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN.** Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 1998b; 58: 1316-1320.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CA, Prather RS, Day BN.** Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*. 2000; 54: 787-797.
- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM.** Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*. 2004; 8: 616-627.
- Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW.** Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *Journal of reproduction & fertility*. 1992; 94: 451-462.
- Almlid T, Hofmo PO.** A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 1995; 31: 169-173.

- Alvarez JG, Storey BT.** Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete research.* 1989; 23: 77-90.
- Bailey JL, Lessar C, Jacques J, Breque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL.** Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology.* 2008; 70: 1251-1259.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology.* 2000; 21: 895-902.
- Bavister BD, Yanagimachi R.** The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro.* *Biology of Reproduction.* 1977; 16: 228-237.
- Bower RE Jr, Crabo BG, Pace MM, Graham EF.** Effects of dilution and glycerol on the release of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) from boar spermatozoa. *Journal of animal science.* 1973; 36: 319-324.
- Brezezińska-Slebodzińska E, Slebodziński AB, Pietras B, Wieczorek G.** Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological trace element research.* 1995; 47: 69-74.
- Buranaamnuay K, Tummaruk P, Singlor J, Rodriguez-Martinez H, Techakumphu M.** Effects of Straw Volume and Equex-STM[®] on Boar Sperm Quality after Cryopreservation. *Reproduction in domestic animals.* 2009; 44: 69-73
- Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R.** Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science.* 2000; 58: 99-111.

- Cheng FP, Fazeli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B.** Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*. 1996; 17: 674-682.
- Cheng WTK, Moor RM, Polge C.** In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology*. 1986; 25: 146.
- Coy P, Gadea J, Romar R, Matas C, Garcia E.** Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Biology of Reproduction*. 2002; 124: 279-288.
- Crabo B and Einarsson S.** Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta veterinaria scandinavica*. 1971; 12: 125-127.
- Croxatto HB, Ortiz ME.** Egg transport in the fallopian tube. *Gynecologic Investigation*. 1975; 6: 215-225.
- de Mercado E, Hernandez M, Sanz E, Rodriguez A, Gomez E, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J.** Evaluation of L-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal reproduction science*. 2009; 115: 149-157.
- Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT.** Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal reproduction science*. 2002; 71: 13-23.
- Fraczek M, Szkutnik D, Sanocka D, Kurpisz M.** Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. *Ginekologia polska*. 2001; 72: 73-79.
- Funahashi H.** Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reproduction, Fertility and Development*. 2003; 15: 167-177.
- Funahashi H, Day BN.** Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993; 99: 97-103.

- Funahashi H, Day BN.** Advances in in vitro production of pig embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement.* 1997; 52: 271-283
- Funahashi H, Fujiwara T, Nagai T.** Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization promoting peptide receptors reduces the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. *Biology of Reproduction.* 2000; 63: 1157-1163.
- Funahashi H, Sano T.** Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology.* 2005; 63: 1605-1616.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S.** Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.* 2004; 62: 690-701.
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL.** Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology.* 1994; 15: 620-629.
- Garner DL, Johnson LA.** Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction.* 1995; 53: 276-284.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE.** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction.* 1997; 57: 1401-1406.
- Gil MA, Abeydeera LR, Day BN, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA.** Effect of the volume of the medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology.* 2003; 60: 767-776.
- Gimeno MF, Franchi AM, Sterin-Speziale NB, Gonzalez ET, Speziale EH, Gimeno AL.** Sow (*Sus scrofa*) follicular fluid: prostaglandin content and effect on the motility of isolated oviducts. *Prostaglandins.* 1985; 29: 831-846.

- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ., Barbosa JA, Ruddle FH.** Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA.* 1980; 77: 7380-7384.
- Canvin AT, Buhr MM.** Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *Journal of reproduction and fertility.* 1989; 85: 533-540.
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH.** Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction.* 1990; 43: 55-64.
- Großfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WM, Rath D.** New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology.* 2008; 70: 1225-1233.
- Halliwell B, Gutteridge JM.** Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 1984; 1: 1396-1397.
- Han DW, Kim HH, Lee MH, Baek HS, Lee KY, Hyon SH, Park JC.** Protection of osteoblastic cells from freeze/thaw cycle/induced oxidative stress by green tea polyphenol. *Biotechnology Letters.* 2005; 27: 655-660.
- Han DW, Matsumura K, Kim B, Hyon SH.** Time-dependent intracellular trafficking of FITC-conjugated epigallocatechin-3-O-gallate in L-929 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2008; 16: 9652–9659
- Han DW, Park YH, Kim JK, Jung TG, Lee KY, Hyon SH, Park JC.** Long-term preservation of human saphenous vein by green tea polyphenol under physiological conditions. *Tissue Engineering.* 2005; 11: 1054-1064.
- Han YM, Abeydeera LR, Kim JH, Moon HB, Cabot RA, Day BN, Prather RS.** Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced in vitro. *Biology of Reproduction.* 1999a; 60: 1110-1113.
- Han YM, Wang WH, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Murphy C, Day BN, Prather RS.** Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biology of Reproduction.* 1999b; 61: 1340-1346.

- Hess EA, Ludwick TM, Teague HS.** Motility of Boar Spermatozoa as Influenced by Semen Freezing Procedures. *Journal of Animal Science*. 1960; 19: 926-931.
- Ho CT, Chen Q, Shi H, Zhang KQ, Rosen RT.** Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Preventive Medicine*. 1992; 21: 520-525.
- Holt WV.** Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 1997; 9: 309-319.
- Hong Byun E, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H.** TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *The Journal of immunology*. 2010; 185: 33-45.
- Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Finnegan-Olive T, Lou YR, Mitchell JM, Laskin JD, Newmark H, Yang CS, Conney AH.** Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis*. 1992; 13: 947-954.
- Hunter RHF.** Fertilization of pig eggs *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1990; 40: 211-226.
- Hunter RH.** Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *The Journal of experimental zoology*. 1973; 183: 57-63.
- Hunter RH.** Oviduct function in pigs with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Molecular Reproduction and Development*. 1991; 29: 385-391.
- Hunter RH.** Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Molecular reproduction and development*. 1996; 44: 417-422.
- Hsu S.** Green tea and the skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005; 52: 1049-1059.

- Hyon SH, Kim DH.** Long-term preservation of rat pancreatic islets under physiological conditions. *Journal of Biotechnology*. 2001; 23: 241-246.
- Hyon SH.** A non-frozen living tissue bank for allotransplantation using green tea polyphenols. *Yonsei Medical Journal*. 2004; 45: 1025-1034.
- Hyon SH, Kim DH, Cui W, Matsumura K, Kim JY, Tsutsumi S.** Preservation of rat aortic tissue transplant with green tea polyphenols. *Cell Transplantation*. 2006; 15: 881-883.
- Ikeguchi R, Kakinoki R, Matsumoto T, Hyon SH, Nakamura T.** Peripheral nerve allografts stored in green tea polyphenol solution. *Transplantation*. 2005; 79: 688-695.
- Iritani A, Niwa K, Imai H.** Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *Journal of reproduction and fertility*. 1978; 54:379-383.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC.** Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 62: 143-172.
- Kaedei Y, Naito M, Naoi H, Sato Y, Taniguchi M, Tanihara F, Kikuchi K, Nagai T, Otoi T.** Effects of (-)-epigallocatechin gallate on the motility and penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa incubated in the fertilization medium. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47: 880-886.
- Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M.** Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian journal of andrology*. 2010; 12: 760-765.
- Kim HS, Quon MJ, Kim JA.** New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*. 2014; 2: 187-195.

- Kim JY, Kina T, Iwanaga Y, Noguchi H, Matsumura K, Hyon SH.** Tea polyphenol inhibits allostimulation in mixed lymphocyte culture. *Cell Transplantation*. 2007; 16: 75-83.
- Kim NH, Funahashi H, Abeydeera LR, Moon SJ, Prather RS, Day BN.** Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1996; 107: 79-86.
- Langendijk P, Bouwman EG, Kidson A, Kirkwood RN, Soede NM, Kemp B.** Role of myometrial activity in sperm transport through the genital tract and in fertilization in sows. *Biology of Reproduction*. 2002; 123: 683-690.
- Larsson K.** Deep-freezing of boar semen. *Cryobiology*. 1978; 15: 352-354.
- Larsson K, Einarsson S, Swensson T.** The development of a practicable method for deepfreezing of boar spermatozoa. *Nordisk veterinærmedicin*. 1977; 29: 113-118.
- Li YH, Ma W, Li M, Hou Y, Jiao LH, Wang WH.** Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new *in vitro* fertilization (IVF) system: straw IVF. *Biology of Reproduction*. 2003; 69: 1580-1585.
- Liu DY, Baker HW.** Tests of human sperm function and fertilization *in vitro*. *Fertility and sterility*. 1992; 58: 465-483.
- Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I, Espinosa E.** Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*. 2010; 61: 142-147.
- Mortimer D, Aitken RJ, Mortimer ST, Pacey AA.** Workshop report: clinical CASA--the quest for consensus. *Reproduction fertility and development*. 1995; 7: 951-959.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E.** Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*. 1989; 31: 1201-1207.

- Métézeau P , Cotinot C, Colas G, Azoulay M, Kiefer H, Goldberg ME, Kirszenbaum M.** Improvement of flow cytometry analysis and sorting of bull spermatozoa by optical monitoring of cell orientation as evaluated by DNA specific probing. *Molecular Reproduction and Development*. 1991; 30: 250-257.
- Mortimer D, Curtis EF, Miller RG.** Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *Journal of reproduction & fertility*. 1987; 81: 127-135.
- Muglia U, Motta PM.** A new morpho-functional classification of the Follpian tubebased on its three-dimensional myoarchitecture. *Histology and histopathology*. 2001;16: 227-237.
- Nagai T.** Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology*. 1994; 41: 73-78
- Nagai T.** In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Animal reproduction science*. 1996; 42: 153-163.
- Nagai T, Moor RM.** Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 1990; 26: 377-381.
- Nagai T, Niwa K, Iritani A.** Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *Journal of reproduction and fertility*. 1984; 70: 271-275.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A.** In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*. 1988; 84: 585-591.
- Nagai T, Takahashi T, Shioya Y, Oguri N.** Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. *Theriogenology*. 1990; 34: 195-204.

- Niwa K, Wang WH.** Cortical granules and cortical reaction in pig oocytes. In: Miyamoto H, Manabe N (eds), *Reproductive Biotechnology* 2001; pp.27-34. Hokuto Shobo. Kyoto, Japan.
- Oehninger S, Franken DR, Sayed E, Barroso G, Kolm P.** Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Human reproduction update*. 2000; 6: 160-168.
- Okazaki T, Mihara T, Fujita Y, Yoshida S, Teshima H, Shimada M.** Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology*. 2010; 74: 1691-1700.
- Osterburg A, Gardner J, Hyon SH, Neely A, Babcock G.** Highly antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates are killed by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Clinical microbiology and infection*. 2009; 15: 341-346.
- Parrish JJ, Parrish JS, Winer MA, First NL.** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*. 1988; 38: 1171-1180.
- Parks JE, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 1992; 38: 209-222.
- Pavlok A.** Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated in vitro. *International journal of fertility*. 1981; 26: 101-106.
- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H.** Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal reproduction science*. 2003; 78: 85-98.

- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H.** Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*. 2004; 12: 117-124.
- Polge C, Rowson LEA.** Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature*. 1952; 169: 626-627.
- Pursel VG, Johnson LA.** Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*. 1975; 40: 99-102.
- Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA.** Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *Journal of animal science*. 1978; 47: 198-202.
- Richter L, Romeny E, Weitze KF, Zimmermann F.** Deep freezing of boar sperm. VII. Laboratory and field experiments using the Hülsenberg VIII extender. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. 1975; 82: 155-162.
- Roca J, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA.** Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reproduction in domestic animals*. 2011; 46: 79–83.
- Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA.** Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal of Andrology*. 2005; 26: 15-24.
- Rodriguez-Martinez H, Einarsson S, Larsson B.** Spontaneous motility of the oviduct in the anaesthetized pig. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1982a; 66: 615-624.
- Rodriguez-Martinez H, Einarsson S, Larsson B, Akusu M, Settergren I.** Spontaneous motility of the pig oviduct *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 1982b; 26: 98-104.

- Rodriguez-Martinez H.** Effects of adrenergic agents on the *in vitro* motility of porcine oviducts. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A.* 1984; 31: 91-104.
- Salamon S, Visser D.** Fertility after surgical insemination with frozen boar semen. *Australian journal of biological sciences.* 1974; 27: 499-504.
- Scorrano L, Petronilli V, Colonna R, Di Lisa F, Bernardi P.** Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex I. Implications for the mechanism of cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274: 24657-24663.
- Shiraki M, Hara Y, Osawa T, Kumon H, Nakayama T, Kawakishi S.** Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea. *Mutation Research.* 1994; 323: 29-34.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Fahrudin M, Nakai M, Maedomari N, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K.** In vitro development of polyspermic porcine oocytes: Relationship between early fragmentation and excessive number of penetrating spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 2008; 107: 131-147.
- Storey BT.** Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *International journal of Developmental Biology.* 2008; 52: 427-437.
- Szcześniak-Fabiańczyk B, Bochenek M, Smorag Z, Ryszka F.** Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reproductive biology.* 2003; 3: 81-87.
- Tavilani H, Goodarzi MT, Doosti M, Vaisi-Raygani A, Hassanzadeh T, Salimi S, Joshaghani HR.** Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online.* 2008; 16: 649-656.

- Thompson JG.** Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction fertility and development.* 1997; 9: 341-354.
- Ulloa Ullo CM, Yoshizawa M, Komoriya E, Mitsui A, Nagai T, Kikuchi K.** The blastocyst production rate and incidence of chromosomal abnormalities by developmental stage in *in vitro* produced porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development.* 2008; 54: 22-29.
- Vizler C, Nagy T, Kusz E, Glavinas H, Duda E.** Flow cytometric cytotoxicity assay for measuring mammalian and avian NK cell activity. *Cytometry.* 2002; 47: 158-162
- Wang WH, Abeydeera LR, Okuda K, Niwa K.** Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction.* 1994; 50: 510-515.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN.** Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. *Molecular Reproduction and Development.* 1998; 49: 308-316.
- Wang WH, Day BN, Wu GM.** How does polyspermy happen in mammalian oocytes. *Microscopy Research and Technique.* 2003; 61: 335-341.
- Wang WH, Hosoe M, Shioya Y.** Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *Journal of reproduction and fertility.* 1997; 109: 247-255.
- Wang WH, Machaty Z, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN.** Time course of cortical and zona reactions of pig oocytes upon intracellular calcium increase induced by thimerosal. *Zygote.* 1999; 7: 79-86.
- Wang WH, Niwa K, Okuda K.** In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility.* 1991; 93: 491-496.

- Wang WH, Uchida M, Niwa K.** Effects of follicle cells on *in vitro* penetration of pig oocytes by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*. 1992; 38: 125-131.
- Wang ZG, Yu SD, Xu ZR.** Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 40: 1079-1085.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*. 1995; 7: 871-891.
- Westendorf P, Richter L, Treu H.** [Deep freezing of boar sperm. Laboratory and insemination results using the Hülsenberger paillete method]. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. 1975; 82: 261-267.
- Wilmot I, Polge C.** The low temperature preservation of boar spermatozoa. 1. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. *Cryobiology*. 1977a; 14: 471-478.
- Wilmot I, Polge C.** The low temperature preservation of boar spermatozoa. 3. The fertilizing capacity of frozen and thawed boar semen. *Cryobiology*. 1977b; 14: 483-491.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810-813.
- Wittayarat M, Kimura T, Kodama R, Namula Z, Chatdarong K, Techakumphu M, Sato Y, Taniguchi M, Otoi T.** Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin C in combination with green tea polyphenol. *CryoLetters*. 2012; 33: 318-326.
- Wittayarat M, Ito A, Kimura T, Namula Z, Luu VV, Do LT, Sato Y, Taniguchi M, Otoi T.** Effects of green tea polyphenol on the quality of canine semen after long-term storage at 5°C. *Reproductive Biology*. 2013; 13: 251-254.

Xu X, Ding J, Seth PC, Harbison DS, Foxcroft GR. In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology*. 1996; 45: 745-755.

Yang CS and Wang ZY. Tea and cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993; 85: 1038-1049.

Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Gil JER. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*. 2013; 79: 929-939.

Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biology of Reproduction*. 2002; 66: 112-119.

Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonjans F, Comhaire FH. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *International journal of andrology*. 1998; 21: 154-162.

Zhang G, Matsumoto S, Hyon SH, Qualley SA, Upshaw L, Strong DM, Reems JA. Polyphenol, an extract of green tea, increases culture recovery rates of isolated islets from nonhuman primate pancreata and marginal grade human pancreata. *Cell Transplantation*. 2004; 13: 145-152.

池上順子,加藤征史郎,入谷明,西川義正. 嫌氣的条件下における牛精子浮遊液の溶存酸素濃度について. 日本畜産学会報. 1978; 49: 665-669.

鈴木正和. クラウン系ミニブタ射出精子の長期液状保存に関する研究. 鹿児島大学農学部卒業論文. 2001.

丹羽太左衛門監修. 豚凍結精液利用技術マニュアル. 日本家畜人工授精師協会, 1989; 東京,日本.

附表

附表 1. Hepes-TLP-PVA の組成

Components	g/L	mM
PVA	1.000	
Amikacin sulfate	0.100	
0.5% Phenol red solution	[1.000 mL]	
Hepes (Na salt)	1.300	5.000
Hepes (free-acid)	1.920	5.000
NaCl	6.660	114.000
KCl	0.240	3.160
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.294	2.000
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.100	0.500
Na lactate	[1.850 mL]	10.000
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.057	0.350
D-Glucose	0.900	5.000
NaHCO ₃	0.170	2.000
Na pyruvate	0.0012	0.010

附表 2. mTCM-199 の組成

Components	g/L	mM
TCM-199	9.500	
PVA	1.000	
Amikacin sulfate	0.100	
D-Glucose	0.550	3.053
NaHCO ₃	2.100	24.705
Na pyruvate	0.100	0.910
L-cystein	0.100	0.570
eCG	10 IU/mL	
hCG	10 IU/mL	
EGF	0.01 µg/mL	
pFF*	10% (v/v)	

*The pFF was prepared by aspirating follicular fluid from antral follicles that were 3 to 7 mm in diameter from prepubertal gilt ovaries and collecting the supernatant after centrifugation (1,900 g, 20 min). The supernatant was then filtered and stored at -20°C until further use.

附表 3. 精子洗淨液の組成

Components	g/L	mM
NaCl	9.080	155.423
BSA (Fatty acid free)	0.100	
Kanamycin sulfate	0.100	

附表 4. mTLP の組成

Components	g/L	mM
Amikacin sulfate	0.100	
0.5% Phenol red solution	[1.000 mL]	
NaCl	6.660	113.769
KCl	0.240	3.219
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.334	2.272
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.000	5.000
Na lactate	[1.850 mL]	10.000
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.057	0.350
D-Glucose	0.900	5.000
NaHCO ₃	2.100	25.070
Na pyruvate	0.0012	0.010
Caffeine	0.389	2.000
BSA (Fatty acid free)	3.000	

附表 5. mPZM-3 の組成

Components	g/L	mM
NaCl	6.322	108.000
KCl	0.746	10.000
KH ₂ PO ₄	0.048	0.350
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.099	0.400
0.5% Phenol red solution	[1.000 mL]	
L-glutamine	0.146	1.000
Hypotaurine	0.546	5.000
Na-pyruvate	0.240	2.181
Ca(lactate) ₂ · 5H ₂ O	0.218	2.000
Basal medium amino acids	[20.00 mL]	
Minimum essential medium nonessential amino acids	[10.00 mL]	
Amikacin sulfate	0.050	
NaHCO ₃	2.106	25.070
BSA (Fraction V)	3.000	

附表 6. 固定染色用酢酸オルセイン液の組成

Components	g/L	mM
Orcein	10.0	
Acetic acid	[450.0 mL]	

附表 7. 胚盤胞蛍光染色固定液の組成

Components	g/L	mM
Hoechst 33342	[100.0 mg/L]	
Glycerol	[900.0 mL]	
PBS	[100.0 mL]	

附表 8. 精子洗淨用 mHepes-TLP-PVA 液の組成

Components	g/L	mM
PVA	1.000	
Amikacin sulfate	0.100	
Hepes (Na salt)	1.300	5.000
Hepes (free-acid)	1.920	5.000
NaCl	6.660	114.000
KCl	0.240	3.160
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.294	2.000
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.100	0.500
Na lactate	[1.850 mL]	10.000
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.057	0.350
D-Glucose	0.900	5.000
NaHCO ₃	0.170	2.000
Na pyruvate	1.000	9.088