

ブタ精液の長期液状保存に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

照那木拉

要旨

ブタ精液の保存法は液状保存が主な方法であり、人工授精には 5-20℃（主流は 15℃）の温域で 5-7 日間保存された精液が用いられている。これまでに、保存後の精子性状を改善するため精液希釈液について多くの研究がなされてきた。本研究では、15℃ならびにこれまで報告例の少ない 5℃での保存期間の延長を目的に、低温ショックからブタ精子を保護する添加物としてスキムミルクをモデナ修正液へ添加し、その効果を検討した。

研究 1 では、15℃でのブタ精液の液状保存におけるスキムミルクの最適濃度を検討した。モデナ修正液へスキムミルクを 0 (対照群)、7.5、15、30、50 mg/mL 添加し、最終濃度 1.0×10^8 /mL となるよう精子を調整した。試験 1: 調整後 15℃で 4 週間保存し、精子運動性、生存率、細胞膜正常性および先体膜正常性を検査した。試験 2: 15℃で 2 週間保存した精子を用い体外成熟培養したブタ卵母細胞と共に体外受精を行った。共培養後、卵母細胞を固定または染色により体外受精能および胚発育能について調べた。その結果、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加群においてスキムミルク無添加群よりも有意に高い精子運動性が認められた。また、保存 3 週目以降で精子生存率も有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。細胞膜正常性および先体膜正常性においては無添加群との間に有意差はなかった。

精子の受精能において、スキムミルク添加群保存精子の総受精率は、新鮮精子に比較して有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。また、保存精液において、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加群の総受精率は 15 mg/mL 添加群より高い傾向 ($P < 0.1$) を示したが、無添加の対照群と同等であった。胚盤胞形成率については、どの添加群間にも有意な差は認められなかった。本試験結果は、15°Cにおける豚精液の液状保存は、7.5mg/mL スキムミルク添加モデナ液が最適であり、保存 2 週間においても精子性状(精子運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性)と体外受精能が保たれることが示唆された。

研究 2 では、簡易的なブタ精液の保存方法として家庭用冷蔵庫を使用し、約 5°C 前後での保存期間の延長を目的に、モデナ修正液へのスキムミルクの添加効果を検討した。試験 1：スキムミルクを 0 (対照群)、7.5、15、30、50 mg/mL で添加したモデナ修正液で精液(最終濃度 1×10^8 精子/mL)を 5°C で 4 週間保存し、精子性状検査(運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性)を 4 週目まで各週行った。試験 2：無添加の対照群、7.5 及び 15 mg/mL スキムミルク添加群の精液を 5°C で 2 週間保存後、体外成熟培養したブタ卵母細胞と共に体外受精を行った。共培養後、卵母細胞を固定または染色により体外受精能および胚発育能について調べた。さらに、スキムミルク 7.5mg/mL 添加 5°C で 2 週間保存した精液を用い人工授精を行い受胎性を確認した。その結果、保存後 3 週間目まで、対照群と比較してスキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加群は有意に高い運動性を示した ($P < 0.05$)。更に、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加群は 4 週間保存後の精子運動性を改善した。また、スキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加群は保存 1 週間目において対照群に比べ有意に高い精子生存性を示した ($P < 0.05$)。しかし、精子細胞膜及び先体正常性においてスキムミルクの添加効果は認められなかった。5°C で 2 週間保存した精子の総受精率は対照群と比較してスキムミルク 7.5

および 15 mg/mL 添加区が高い値 ($P < 0.05$) を示した。胚盤胞発生率において、5°Cで2週間保存した精液は、対照群と比較してスキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加群が有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。また、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加区の受精率及び胚盤胞発生率は、新鮮精液と同等であった。4頭の雌豚に人工授精した結果、2頭が妊娠し、全体で8頭の正常な子豚が生まれた。しかし、その産子数は、新鮮精液に比較して低い傾向であった。

本研究において、モデナ液へのスキムミルク添加は、5°Cおよび15°Cにおけるブタ精液の液状保存に効果的であり、その濃度は 7.5 mg/mL であることを明らかにした。また、スキムミルク添加により液状保存後の精子運動性、生存性および受精能が改善されることが示唆された。さらに5°Cで2週間保存した精液により産子が作出されたことから、これまで1週間が限度であった液状保存法において、家庭用冷蔵庫でも2週間の保存が可能となることが示された。

緒論

精液の保存は、貴重な遺伝的背景を持つ家畜、野生動物種の保存ならびに家畜の生産性向上に有効な手段である。一方、人工授精（以下、AI）は高能力種雄ブタの広域利用、種雄豚改良の促進、遺伝子能力の早期判断、自然交配が不可能な種雄豚への応用、精液の遠距離輸送、種雄ブタの飼養に要する経費の節減および伝染性疾病の予防など多くの利点がある。AIに用いる精液は、短期的には5℃や15℃で液状保存され、長期的には液体窒素で凍結保存することができる[1]。ブタ凍結精液を用いたAIは、系統豚など優良種ブタの長期保存や、優良遺伝形質の導入などに利用できる技術である。また近年、液状精液による人工授精技術が普及されつつあるものの、特に夏場などの安定した精液供給の必要性から、精液の凍結保存が注目されている。しかしながら、ブタ精液の低温感受性が高いことや受胎しても産子数が少ないこと等の要因により普及が進んでいないのが現状である[2, 3]。

ブタ液状保存精液を用いたAIは、5-20℃(主流は15℃)の中温域で保存された精液が用いられている[3]。保存の間、ブタ精子は運動性や生存性の低下および膜透過性の変化等、種々の影響を受ける[4, 5]。液状保存されたブタ精液からの受胎率は、採精時の精液性状、AI時の精子数および希釈液のタイプに依存す

ると考えられる[6]。ブタ精液を長期保存するためには、低温下で適切な希釈液を用いて精子の代謝活性を下げる必要がある。これまで、エネルギー源、pH、浸透圧を確定させ、膜の保護、熱感作に対する保護及び抗生物質などを加えることで精子の保存を最適化させようと研究されてきた[7]。現在、いくつかのブタ精液希釈液が提案されているが、AI使用のための精液保存可能期間は5-7日間と短期である[8]。

活性酸素による精子の脂質過酸化は主に細胞膜のリン脂質でおこり、膜の流動性あるいは透過性などの機能に影響を及ぼすことが報告されている[9, 10]。ブタ精子細胞質膜のリン脂質は飽和脂肪酸含量が高いために、過酸化損害に感受性の高いことが報告されている[11]。すなわち、精液希釈液に適当な抗酸化剤を含まない場合、活性酸素種（ROS）が保存精液の性状に悪影響を及ぼすことが示唆されている[12]。一旦活性酸素の産生と蓄積との間のバランスが崩れると、過剰な ROS は脂質過酸化反応によって酸化防止機構の障害(酸化ストレス)が起こり、精子膜の障害、呼吸の抑制および細胞内酵素の漏出を引き起こす[13, 14]。抗酸化剤の添加は、精子保存過程で発生する酸化ストレスを抑制し、精子膜を保護するために有用であると考えられる。酵素(スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼおよびグルタチオンペルオキシターゼ (GPx))、および非酵素(アスコルビン酸、 α -トコフェロール、タウリンおよびアルブミン等)の抗酸化剤は、精子への酸化ストレスを軽減させることが報告されている[12, 13, 15]。このことから、精子保存過程で酸化ストレスを減少させる可能性があり、液状保存されたブタ精液の性状を改善することが報告されている[16]。

現在、ブタの精液保存は液状保存が未だ中心的保存方法であり、保存精子性状を改善するために精液希釈液について多くの研究がなされてきた。基本的に希釈液は、糖、蛋白質、リポ蛋白質、緩衝剤、添加物、そして細胞保護剤から

構成されており[3]、例えばブタ精液は、トリス卵黄クエン酸希釈液やトリス卵黄希釈液といったものが主流で、卵黄などの動物由来添加物を含んだ希釈液が基となっている[17]。しかしながら、卵黄は品質が一定ではなく[18]、加えて精子の運動性、生存性、細胞膜正常性に有害な影響を与えることが報告されており、卵黄中の高濃度リポ蛋白質との関連性が指摘されている[19]。卵黄に代わる化合物としてはスキムミルクがあり、これまでにマウス[20]とヤギ[21]に使用され、さらにイヌ精子の低温保存[18]においても使用されているが、ブタでの報告は少ない。

スキムミルクはウマ、ヤギ精液における精漿除去に起因するロスを補う非酵素的酸化防止剤として報告されている[12, 22]。非酵素的酸化防御機構は、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、およびビタミンを含む多くの分子によるが、それらは疎水性基および親水性基の両方をトラップ可能な種々の疎水性基であり、フェノール、チオール等とは異なる反応である[23]。これまでに、スルフヒドリル基がスキムミルクの抗酸化活性作用の一部として反応していることが報告されている[24]。さらに、スキムミルクは家畜精液を低温損傷から保護することも報告されている[25]。

一方、ブタの液状精液の保存温度は従来から15°Cが最適とされてきた。しかし、この中温保存は特殊で高価な恒温庫が必要となるため、養豚農家に新たな負担となることが考えられる。また、15°Cの保存温度においては保存日数の経過とともに精液中に細菌が増殖し、低下したpHおよび過酸化物により精子性状を傷害する。その結果、液状精液の有効な保存期間は短くなり、受胎率の低下、産子数の減少を招くことを指摘されている。精液保存温度を5°Cまでに下げられれば、家庭用冷蔵庫が利用でき精液保存は容易となるが、ブタ精液の保存温度を15°Cより低くすると低温により精子活力（主に運動性および生存性）は下が

り、自然交配と比較して受胎率の低下および産子数の減少等が誘起されると考えられる。しかしながら、AIを普及する上で、精液保存を低コストで簡易化する必要がある。また、低温（5℃程度の家庭用冷蔵庫）でブタ精液を長期保存でき、多段階希釈が不要となり取り扱いが容易となる。その精液をAIに用いた場合に、自然交配と遜色のない繁殖成績となる希釈液が開発されることが期待されている。ブタ精液の液状保存用の保存液として、モデナ液は保存性が最も優れているものの1つであることが確認されている。また、モデナ液は組成が比較的単純であり、安価なため非常に利用し易い保存液であり、日常の人工授精業務において使用されている。

しかしながら、卵黄の代わりとしてスキムミルクを添加した希釈液を用いたブタ精液の液状保存に関する研究はほとんどない。本研究の目的は、精子の運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性を指標とした精子性状を調べることにより、15℃（研究1）および5℃（研究2）で長期保存したブタ精液におけるモデナ修正液へのスキムミルクの最適添加濃度を検討した。また、5℃および15℃で2週間保存したブタ精液を体外受精及び人工授精することにより、受精能等におけるスキムミルクの添加効果を調べた。

研究 1

ブタ精液の 15℃長期液状保存におけるスキムミルク
添加効果

緒言

ブタ精液は低温に対する耐性が弱く、そのため、豚の AI 時に使用する精液は、現在も 15-20°C 前後の中温域で 5-7 日間保存された希釈精液が使用されている [3]。保存後のブタ精液の受精能は、個々の精子性状、AI 時の精子数および希釈液の種類に 3 要因に依存するとされている [26]。長期間精子を保存するためには、低温下で適切な希釈液を用いて精子の代謝活性を下げる必要がある。保存精液の性状は、遠心分離あるいは冷却過程における取り扱い方法にも影響を受けるとされ、また活性酸素の生成およびその不均衡にも関係していることが指摘されている [12]。通常、活性酸素レベルは細胞の新陳代謝における自己酸化防止機能によりコントロールされている [27]。しかしながら活性酸素の過剰産生と蓄積との間のバランスの崩れ、および酸化防止機構の障害 (酸化ストレス) が起こった場合、精子への障害と精液性状の低下が引き起こされ、精子運動性の低下、受精能の低下、そして妊娠率の低下が生じる [12, 13]。酵素 (スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼおよびグルタチオンペルオキシターゼ (GPx))、および非酵素 (アスコルビン酸、 α -トコフェロール、タウリンおよびアルブミン等) の抗酸化剤は、精子への酸化ストレスを軽減させることが報告されている [12, 13, 15]。

ブタ精液の希釈液は、基本的にグルコース (グルコース硫酸塩およびグルコース酒石酸塩) によって構成されており、Johnson ら [3] によって報告されて以降、pH、浸透圧を確定させ、エネルギー源、抗生物質などを加えることで精子の保存を最適化させようと開発されてきた [7]。精液保存液としては、卵黄系の卵黄クエン酸ソーダ糖液、または、卵黄の代替物質として牛乳系のスキムミルクに基づいた液が簡単で良好なことが明らかとなり、広く用いられるようになった。

スキムミルクはウマ[12]、ヤギ[22]精液における精漿除去に起因するロスを補う非酵素的酸化防止剤として報告されている。非酵素的酸化防御は、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、およびビタミンを含む多くの分子によるが、それらは疎水性基および親水性基の両方をトラップ可能な種々の疎水性基であり、フェノール、チオール等とは異なる反応である[23]。これまでに、スルフヒドリル基がスキムミルクの抗酸化作用の一部として反応していることが報告されている[24]。

研究1の目的は、精子の運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性を指標とした精子性状と、体外受精能を調べることにより、15℃で長期保存したブタ精液におけるスキムミルクの最適添加濃度を明らかにすることである。

材料および方法

精液採取

ブタ精液は、山口県農林総合技術センターにて、1.5歳の大ヨークシャー種ブタより採取した。ブタからの精液はモデナ修正液で3倍希釈され、採取後2時間以内に30°Cで研究室へ運搬された。モデナ修正液は、27.5 mg/mL D-フルクトース (SIGMA、St. Louis、MO、アメリカ)、6.9 mg/mL のクエン酸3ナトリウム (和光ピュア化学工業株式会社、大阪、日本)、2.35 mg/mL エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム (EDTA-2Na) (和光)、1.0 mg/mL の炭酸水素ナトリウム (和光)、2.9 mg/mL のクエン酸1水和物 (和光)、5.65 mg/mL のトリスヒドロキシメチルアミノメタン (SIGMA) および0.2 mg/mL の硫酸アミカシン (明治製菓株式会社、東京、日本) の割合で Onishi ら[28]の方法に従い作成した。精液を採取後、冷却保存まで全ての手順は30°Cで行われた。モデナ修正液で希釈した精液は、2分間、550×gで遠心分離した。上澄みを除去後、最終濃度が 3×10^8 精子/mLになるようにモデナ修正液を加え混合した。次に、最終濃度が 1×10^8 精子/mLになるよう、様々な濃度のスキムミルク (雪印乳業株式会社、札幌、日本) を添加したモデナ修正液で希釈した。さらに、希釈精液は15 mL ポリスチレン性コニカルチューブ (BD Falcon、アメリカ) に入れた。なお、急激な温度変化による精子へのショックを防ぐため、500 mL ガラスビーカーに350–400 mL 30°Cの水を入れて2分間浸け、15°Cの恒温器にいれて2または4週間保存した。下記に示すように、各サンプルの一部を保存前および週毎に精子性状分析に使用した。

精子性状の評価

スキムミルクを 0、7.5、15、30、50 mg/mL で添加した Modena 修正液で精液 (1×10^8 精子/mL) を 15°C で 4 週間保存した。精子性状検査 (運動性、生存性、細胞膜正常性、先体保持性) を 1 週間ごとに行った。冷却保存した各精液から 300 μ L ずつのサンプルを精子性状検査ごとに取り出して使用した。サンプルはピペットで混合した後、評価前に 10 分間 37 °C で温めた。サンプルはそれぞれ同じく加温した Modena 修正液で 10 倍希釈され、運動性評価のために、温めたガラスチャンバーに静置した。更に、10 μ L の精液は温めたガラスチャンバー MUR-500; マツナミ・ガラス株式会社、大阪、日本) に注入して、37°C の温めたプレートに設置した。精子の運動性は、位相差顕微鏡下で直ちに検査を行った。精子運動性は、岡村ら [29] による方法に従い下記の計算式により精子生存指数を求めた。

$$\text{精子生存指数} = \frac{100w + 75x + 50y + 25z}{100}$$

w は最活発前進運動精子の率を、x は活発前進運動精子の率、y が前進運動精子の率、z が旋回か振り子運動精子の率を挿入した。評価は、位相差顕微鏡 (100 \times : TE300; Nikon、東京、日本) を使用して、各サンプルにつき、3 か所の視野で評価しその平均を精子生存指数とした。

精子生存性の評価は、LIVE/DEAD sperm viability kit (SYBR-14/propidium iodide (PI)、LIVE/DEAD Sperm Viability Kit; Molecular Probes Inc. Eugene OR、アメリカ) を用いてキットのプロトコール [30] 評価した。Dulbecco のリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS[-]; Gibco、Grand Island、NY、アメリカ) 45 μ L と精液サンプル 5 μ L を緩徐に混合して希釈攪拌し、5 分間インキュベートした。次に SYBR-14 (ジメチルスルホキシド (DMSO) で 1:500) 3 μ L を加え攪拌、37°C で 10 分間インキュベートして一次染色を行った後、propidium iodide (蒸留水で

1:10) を加えて攪拌、5 分間インキュベートして二次染色を行った。染色した精子サンプルをスライドガラスにとり、カバーガラスをかけて鏡検した。精子生存性は、480 nm 波長励起フィルターの蛍光顕微鏡 (Optiphot-2; Nikon、東京、日本) で観察し、1 視野あたり 100 以上の精子をカウント、その中で SYBR-14 陽性で緑色に発色する精子を生存、PI 陽性で赤色に見えるものを死滅として判定した (図 1)。なお、精子は 3 視野で観察し、その平均値で生存性を評価した。

精子細胞膜の評価を Hypoosmotic swelling test (HOST) により行った[31]。精液サンプル (20 μ L) は、13.5 mg/mL の D フルクトース (SIGMA) と 7.35 mg/mL のクエン酸 3 ナトリウム (和光) に純水を加えてメスアップし、浸透圧を測定して 150 mOsm/kg に調整したもの (80 μ L) と混合し、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、サンプル 10 μ L をスライドガラスにとり、カバーガラスをかけて鏡検した。サンプル全体を鏡検して精子数の合計が 100 以上になるように位相差顕微鏡 (400 \times : TE300; Nikon) 下でカウントし、これを 3 回繰り返して、その平均値で評価した。正常な精子細胞膜は、尾部が膨化、カールした精子を陽性 (細胞膜正常)、尾部に変化がなく真直ぐなままの精子を陰性 (細胞膜異常) として判定した (図 2)。

精子先体の正常性は、fluorescein isothiocyanate-labeled peanut agglutinin (FITC-PNA; SIGMA) 染色により評価した。精子サンプルはスライドガラスに塗沫、室温で風乾させ、100%エタノールに 10 分間室温で浸漬して固定した。風乾後、D-リン酸緩衝生理食塩水 DPBS[-] で 100 倍希釈した FITC-PNA (30 μ L) で染色し、30 分間 37°C の湿潤なインキュベーター内に静置した。その後 DPBS[-] で洗い、カバーガラスをかけて 488 nm フィルター[32]の蛍光顕微鏡 (300 \times : Eclipse 300; Nikon) で鏡検した。精子頭部が FITC-PNA 陽性で緑色に染色されているものを陽性 (先体正常)、染色されていないものを陰性 (先体

異常)として判定した。精子数が 100 以上になるようカウントし、これを 3 視野以上繰り返し、その平均値で評価した (図 3)。

受精能および IVF 後の発育能の評価

液状保存後の精子受精能におけるスキムミルク濃度の影響を検討するために、各濃度のスキムミルク (0、7.5、15 mg/mL) を添加したモデナ修正液で 15°C 週間保存した精液 (1×10^8 精子/mL) を体外成熟後の卵母細胞と共に体外受精液中で共培養し、その後の受精率および胚発育率を検討した。

食肉処理場で採取したブタ卵巣を 30°C に保温した 0.9% の滅菌生理食塩水に浸し、3 時間以内に実験室に持ち帰った。卵丘卵母細胞複合体 (COCs) は、3-6 mm 大の小卵胞から、18 G 針付き 5 mL 容量のシリンジを用いて吸引採取した。COCs は、100 IU/mL ペニシリン G (明治) および 0.1 mg/mL の硫酸ストレプトマイシン (明治) 含む修正済の PBS (m-PBS; 日本全薬株式会社、福島、日本) に採集した。卵細胞質が形態的に均一および卵丘細胞を多量に備えた COCs のみを、この実験で使用した。成熟培養液は tissue culture medium (TCM) 199 を基礎培地とした。これに 10% (v/v) ブタ卵胞液、25 mM HEPES 緩衝剤 (TCM199; Invitrogen Corp、Carlsbad、CA、アメリカ)、0.6 mM システイン (SIGMA)、50 μ M ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、2 mg/mL D-ソルビトール (和光)、1 μ g/mL 17 β -estradiol (SIGMA)、50 μ M β -メルカプトエタノール (和光)、10 IU/mL 妊馬血清性腺刺激ホルモン (eCG; 川崎製薬株式会社、川崎、日本)、10 IU/mL ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG; 川崎)、50 μ g/mL ゲンタマイシン (SIGMA) を添加して使用した。選別した COCs は培養液で 3 回洗浄後、10-15 個を 100 μ L の培養液のドロップ内に移してミネラルオイルで覆い、38.5°C、5% CO₂ の気相条件下で 22 時間成熟させた後、上記のホルモンを含まない TCM199 培養液に移し、更に 22 時間

成熟させた。

体外成熟した卵母細胞との体外受精 (IVF) は菊地ら [33] の方法に従い実施した。IVF 培地は 90 mM 塩化ナトリウム、12 mM 塩化カリウム、25 mM 炭酸水素ナトリウム、0.5 mM リン酸二水素ナトリウム、0.5 mM 硫酸マグネシウム、10 mM 乳酸ナトリウム (全て和光)、3 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA; SIGMA)、5 mM カフェイン (SIGMA) および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタマイシンを添加した。体外成熟後、COCs は IVF 培地で洗浄し、10–15 個を 90 μL の IVF 培地のドロップ内に移してミネラルオイルで覆った。精子を添加する前に、約 30 分平衡静置した。5 $^{\circ}\text{C}$ で 2 週間保存した各精液サンプルは、3 mM DL-乳酸カルシウム (和光)、3 mM D-グルコース (和光)、12% ウシ胎児血清 (FBS: Invitrogen)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシンを添加、pH 7.8 に調整した TCM199 で希釈混和し、550 \times g で 2 分間遠心分離後、再希釈し 15 分間 38.5 $^{\circ}\text{C}$ で静置した。希釈精液 10 μL を、最終濃度が 5×10^6 精子/mL になるように成熟卵母細胞の入った IVF 培地のドロップ 90 μL に注入し、38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、5% O_2 及び 90% N_2 気相条件下で 20 時間共培養した。体外受精後、卵丘細胞と付着精子をピペッティングにより除去した。対照として、液状保存をしてない新鮮精子を用い上記と同様に体外受精を行った。

裸化した受精卵はスライドガラス上に置いてカバーガラスで覆い、カルノア液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1v/v) で 48–72 時間固定した。固定した胚は、アセトオルセイン (45% v/v 酢酸中に 1% オルセイン) で染色し、位相差顕微鏡下で観察した。卵細胞中に雌性前核と雄性前核の両方があるものを受精と判断し (図 4)、細胞質中の前核数及び膨化精子頭部等の数により、単精子侵入もしくは多精子侵入に分類した [34]。

他の受精卵は、豚の受精卵培養液 (PZM-5 ; 機能性ペプチド研究所、山形、日本) 100 μL のドロップに移し、ドロップそれぞれにおよそ 10 個の受精卵を入れ

た。それらを、38.5°C、5% CO₂、5% O₂および90% N₂のインキュベーターに移し、体外発生培養（IVC）を行った。受精から72時間後、分割胚を更に5% FBS添加PZM-5に移し、5日間培養して胚盤胞への発育能を評価した。体外受精から8日目に、3.7% (w/v) パラホルムアルデヒドと1% (v/v) トリトン X-100 (SIGMA) を含んだPBSで、全ての胚を15分間室温に固定処理し、0.3% (w/v) ポリビニルピロリドンを含むPBSで更に15分間洗浄した。固定・洗浄後の胚はスライドガラス上に乗せた90% (v/v) グリセロール含有1.9 μM ヘキスト 33342 (SIGMA) 内に置き、カバーガラスで覆った後、4°Cで一晩保存した。胚の観察は355 nm 波長励起フィルターの蛍光顕微鏡にて行い、全ての胚の細胞数を記録し、明瞭な胞胚腔を認め、細胞数が20以上あるものを胚盤胞と判定した (図5)。

統計分析

各試験についてそれぞれ4回以上繰り返し実施した。全てのデータは、統計分析前にアークサイン変換した。データはSAS (SAS for Windows, version 9.1; SAS Institute Japan, 東京、日本) を用い、分散分析法 (ANOVA) により検定した。各データは平均値と標準誤差 (SEM) で示し、値が $P < 0.05$ の時に有意とした。

結果

精子性状

各濃度のスキムミルク添加したモデナ修正液で保存したブタ精液の精子性状を図1に示した。スキムミルク 7.5 mg/mL 添加群は保存1週間目から4週間目まで、いずれもスキムミルク非添加群（対照群）よりも有意に高い運動性を示した ($P < 0.05$)。同様に 15 mg/mL 添加群においても保存2週間目でコントロール群より有意に高い運動性を示した ($P < 0.05$)。一方、スキムミルク 50 mg/mL 添加群は保存3週間目においてコントロール群に対して有意に低い運動性を示し ($P < 0.05$)、スキムミルク 30 mg/mL 添加群についてはコントロール群との有意な差は認められなかった (図7-A)。

スキムミルク 7.5 mg/mL 添加群は保存3、4週間目においてコントロール群に比べ有意に高い精子生存率を示した ($P < 0.05$)。しかし、50 mg/mL スキムミルク添加群は保存1週間目から3週間目までコントロール群より有意に低い生存率を示し、30 mg/mL 添加群では1、3週間目で有意に低い生存率を示した ($P < 0.05$)。15 mg/mL スキムミルク添加群においては保存2週間目以降コントロール群より高い生存性を示したが、有意差は認められなかった (図7-B)。精子の細胞膜正常性と先体正常性において、スキムミルクの添加効果は認められなかった (図7-C、D)。

受性能および IVF 後の発育能の評価

スキムミルク 0-15 mg/mL 添加モデナ修正液で 15°C 2週間保存した精液で IVF 後の受精率および胚発育の結果を表1に示した。精子の受精能において、スキムミルク添加群の保存精子の総受精率は、新鮮精子に比較して有意に低い値を

示した ($P < 0.05$)。保存精液では、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加区は 15 mg/mL 添加区より高い傾向 ($P < 0.1$) が示したが、コントロール群の保存精子と有意差が得られなかった。スキムミルク 15 mg/mL 添加区の正常精子侵入率は、新鮮精子区に比較して有意に高い値が見られたが、保存精液群ごとに有意な差は認められなかった。胚発育能においては、胚盤胞形成率に、スキムミルクの有意な添加効果は認められなかった。

考察

本研究では、15°Cで保存したブタ精液の精子性状と体外受精能を指標として、スキムミルクのモデナ液への添加効果を検討した。15°C液状保存の精液に対し、7.5 及び 15 mg/mL スキムミルクの添加が4週間目まで精子運動性を維持することを示した。更に、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加群は精子生存率を改善した。精液の液状保存の間、精子は一般的に生命維持のため、酸素を消費し代謝を行っているが、このことにより活性酸素を含む代謝産物が生み出されている[27]。活性酸素の過剰産生は、おそらく低温保存の過程で生じ[35]、保存期間が長くなるほどその量も増加すると推察される[36]。精子と精漿の防御機構は酵素的抗酸化と非酵素的抗酸化の両効果があると考えられる。一般的に、抗酸化物はフリーラジカルまたはその反応性代謝産物により、酸化物の生物学的に重要な分子を阻害する。すなわち抗酸化物は精子の保存過程における酸化ストレスを減少させ、液状保存精子の質を改善させることが推察される[37]。スキムミルクはスルフヒドリル基により作用する非酵素的抗酸化剤であると考えられてきた[12, 24]。更にスキムミルクは、カゼインやラクトース、その他の構成要素により、ヤギやウシの精子を低温ショックから保護することが示唆されている[38]。しかしながら本試験では、モデナ液に対する高濃度のスキムミルクの添加(>30mg/ml)は15°C保存の精子にとって負の効果を与えることを明らかにした。比較的高濃度のスキムミルク添加はモデナ修正液を高張にし、精子細胞からの水の流出を招き、このことが運動性低下と細胞膜障害の原因となった可能性があるかと推察された[39]。

最終的な精子性状の評価は、人工授精(AI)により妊娠と生存可能な産子を得ることであるが、精子受精能の評価法として、AIは日常的に実行可能な方法で

はないため、本試験ではAI評価法以外の方法として体外受精(IVF)を用いた[40, 41]。受精過程において、受精能獲得、先体反応、透明体接合、卵母細胞侵入などを行う際に受精能獲得が求められる。このような理由から、凍結融解した精子では、体外での精子侵入において先体正常性は精子運動性よりも重要であると考えられてきた[42]。本研究では15°Cで保存したブタ精液への7.5 mg/mL および15 mg/mL のスキムミルクの添加は、それぞれ2週間保存後に56、48の精子生存指数を示した。しかし、先体正常率は両群共に95%以上であり、コントロール群(90%以上)と著しく差のない値を示した。新鮮精液と比較してスキムミルク15 mg/mL 添加モデナ液で2週間保存した精子はより高い単精子侵入率を示した。しかしながら、単精子侵入を含む精子侵入率、胚盤胞形成率ともに2週間保存精液群間に差はなかった。精子が卵子に侵入するためには、運動性を持っていることは必要であるが、それだけでは不十分なように思われる。動物精子の受精には、複雑な精子表面の変化、運動特性の変化等を伴う受精能獲得が必須のプロセスである[43]。すなわち、高い運動性を有している場合でも、受精能獲得をしていないために受精することができなかった可能性がある。この結果は、液状保存精子の先体正常性が卵母細胞への精子侵入に極めて重要な役割を果たすという上記の推論と一致すると考えられた。

これまでの新鮮射出精液[44]、凍結融解精巣上体精液[45]を用いた場合のブタ胚の胚盤胞発生率は約12%であり、本試験においては、スキムミルク7.5 mg/mL 添加モデナ液で2週間15°C保存した精子を使用して約12%の胚盤胞形成率を得た。これは新鮮精液を使用したとき(約16%)と差はなく、このことは、スキムミルク添加モデナ液でブタ精液を2週間15°C保存しても、体外受精後の胚発育を維持できることを示唆している。一方、凍結融解精液を用いた体外受精においては26-56%の胚盤胞形成率を得たとの報告もある[34]。胚盤胞形成率の違い

は、受精能獲得の時間に関係していることが示唆されている[46]。受精能獲得は、射出精液による精液か精巣上体由来精液であるかで違い、また同じ射出精液でも種、個体、個々の精子によっても異なる[34]。更には低温保存方法によっても違いが生じる[47]。このことから、受精後の胚発育率を高めるためには新たな保存液を開発する必要があると考えられた。

本試験結果は、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加モデナ液での 15°Cにおけるブタ精子の保存は、2 週間においても精子運動性及び生存性を改善することを示唆した。しかし、細胞膜正常性、先体正常及び精子侵入においてスキムミルク添加の効果は見られなかった。

研究 2

ブタ精液の 5℃液状保存におけるスキムミルク添加 効果

緒言

ブタの繁殖では液状保存精液による AI が普及しており、使用する精液は 5-20℃（主流は 15℃）の中温域で保存された精液が用いられている[3]。AI による利点は、良好な形質の維持や肉質の均質化、生産性の向上などの経済的利益に加え、疾病の感染リスクを軽減させることである[48]。しかしながら、ブタの精液はウシなどの家畜の精液と比較して低温感作に対して感受性が高く、精液液状保存期間が 5-7 日間で[3, 49]、個体差が大きいなどの理由により、低受胎率、産子数が少ないなど、未だ解決すべき問題を抱えている。

近年では、精液の保存性の改善によって、一般農家における液状精液の利用が著しく拡大しているが、インキュベーターの普及の遅れから、家庭用冷蔵庫の利用が多く、精子活力の低下による繁殖成績の悪化が明らかとなってきた。豚精液を長期に液状保存するためには、低温下で適切な希釈液を用いて精子の代謝活性を下げる必要がある。これまでに精液の液状保存は、pH、浸透圧を最適化させ、エネルギー源、抗生物質などを加えることで精子保存を行ってきた経緯がある[3, 7]。

ブタ液状精液の保存は、15℃の中温域で行うことが一般的であるため、温度調整機能を持つ専用の恒温器が必要である。しかし、価格が高価なため、これから AI を試行しようとする農家には負担が大きく、農家で実用可能な簡易保存方法である 5℃前後(家庭用冷蔵庫内)の保存が要望されている。ブタ精液の低温保存において卵黄が低温障害防止物質として使用されているが[50]、卵黄には未知物質が含まれるほか、細菌感染等により精子活力への影響が危惧される[51, 52]。更に、卵黄の品質は一定ではなく、精子運動性及び生存性に有害な影響を与えることが報告されている[53]。これらは卵黄中の高濃度のリポ蛋白質と関

連していることが指摘されているため [31, 54]、卵黄に代わる希釈液への添加物の開発が必要である。卵黄の代替物質としては、ミルクまたスキムミルクがウマ[12]、ヤギ[22]精液の保存に用いられ、精漿除去に起因する非酵素的酸化防止要因として報告されている。これまでに、スルフヒドリル基がスキムミルクの抗酸化活性作用の一部として反応していることが報告されている[24]。

本研究の目的は、精子の運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性を指標とした精子性状を調べることにより、5°Cで長期保存したブタ精液におけるモデル修正液へスキムミルクの添加効果を検討した。また、5°Cで2週間保存したブタ精液を体外受精および体内受精により、体外胚発生及び人工授精における影響を調べた。

材料及び方法

精液採取および準備

ブタ精液は、山口県農林総合技術センターにて、1.5歳の大ヨークシャー種ブタより採取した。ブタからの精液はモデナ修正液で3倍希釈され、採取後2h以内に30°Cで研究室へ運搬された。更に、AIのための精液が同じ方法を使用して、農業・食品産業技術総合研究機構（NARO）、畜産草地研究所（NILGS、筑波、日本）で2頭の1.5歳のデュロック種ブタから採取した。モデナ修正液は、27.5 mg/mL D-フルクトース（SIGMA、St.Louis、MO、アメリカ）、6.9 mg/mL のクエン酸3ナトリウム（和光ピュア化学工業株式会社、大阪、日本）、2.35 mg/mL エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム（EDTA-2Na）（和光）、1.0 mg/mL の炭酸水素ナトリウム（和光）、2.9 mg/mL のクエン酸1水和物（和光）、5.65 mg/mL のトリスヒドロキシメチルアミノメタン（SIGMA）および0.2 mg/mL の硫酸アミカシン（明治製菓株式会社、東京、日本）の割合でOonishiら[28]の方法に従い作成した。精液を採取後、冷却保存まで全ての手順は30°Cで行われた。モデナ修正液で希釈した精液は、2分間、550×gで遠心分離した。上澄みを除去後、最終濃度が 3×10^8 精子/mLになるようにモデナ修正液を加え混合した。次に、最終濃度が 1×10^8 精子/mLになるよう、様々な濃度のスキムミルク（雪印乳業株式会社、札幌、日本）を添加したモデナ修正液で希釈した。さらに、希釈精液は15 mL ポリスチレン性コニカルチューブ（BD Falcon、アメリカ）に入れた。なお、急激な温度変化による精子へのショックを防ぐため、500 mL ガラスビーカーに350-400 mL 30°Cの水を入れて2分間浸け、5°Cの冷蔵庫に入れて2または4週間保存した。下記に示すように、各サンプルの一部を保存前および週毎に精子性状分析に使用した。

精子性状の評価

スキムミルクを 0、7.5、15、30、50 mg/mL で添加したモデナ修正液で精液 (1×10^8 精子/mL) を 15°C で 4 週間保存した。精子性状検査 (運動性、生存性、細胞膜正常性、先体保持性) を 1 週間ごとに行った。冷却保存した各精液から 300 μ L ずつのサンプルを精子性状検査ごとに取り出して使用した。サンプルはピペットで混合した後、評価前に 10 分間 37 °C で温めた。サンプルはそれぞれ同じく加温したモデナ修正液で 10 倍希釈され、運動性評価のために、温めたガラスチャンバーに静置した。更に、10 μ L の精液は温めたガラスチャンバー MUR-500; マツナミ・ガラス株式会社、大阪、日本) に注入して、37°C の温めたプレートに設置した。精子の運動性は、位相差顕微鏡下で直ちに検査を行った。精子運動性は、岡村ら [29] による方法に従い下記の計算式により精子生存指数を求めた。

$$\text{精子生存指数} = \frac{100w + 75x + 50y + 25z}{100}$$

w は最活発前進運動精子の率を、x は活発前進運動精子の率、y が前進運動精子の率、z が旋回か振り子運動精子の率を挿入した。評価は、位相差顕微鏡 (100 \times : TE300; Nikon、東京、日本) を使用して、各サンプルにつき、3 か所の視野で評価しその平均を精子生存指数とした。

精子生存性の評価は、LIVE/DEAD sperm viability kit (SYBR-14/propidium iodide (PI)、LIVE/DEAD Sperm Viability Kit; Molecular Probes Inc. Eugene OR、アメリカ) を用いてキットのプロトコール [30] 評価した。Dulbecco のリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS[-]; Gibco、Grand Island、NY、アメリカ) 45 μ L と精液サンプル 5 μ L を緩徐に混合して希釈攪拌し、5 分間インキュベートした。次

に SYBR-14 (ジメチルスルホキシド (DMSO) で 1:500) 3 μ L を加え攪拌、37°C で 10 分間インキュベートして一次染色を行った後、propidium iodide (蒸留水で 1:10) を加えて攪拌、5 分間インキュベートして二次染色を行った。染色した精子サンプルをスライドガラスにとり、カバーガラスをかけて鏡検した。精子生存性は、480 nm 波長励起フィルターの蛍光顕微鏡 (Optiphot-2; Nikon、東京、日本) で観察し、1 視野あたり 100 以上の精子をカウント、その中で SYBR-14 陽性で緑色に発色する精子を生存、PI 陽性で赤色に見えるものを死滅として判定した (図 1)。なお、精子は 3 視野で観察し、その平均値で生存性を評価した。

精子細胞膜の評価を Hypoosmotic swelling test (HOST) により行った[31]。精液サンプル (20 μ L) は、13.5 mg/mL の D フルクトース (SIGMA) と 7.35 mg/mL のクエン酸 3 ナトリウム (和光) に純水を加えてメスアップし、浸透圧を測定して 150 mOsm/kg に調整したもの (80 μ L) と混合し、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、サンプル 10 μ L をスライドガラスにとり、カバーガラスをかけて鏡検した。サンプル全体を鏡検して精子数の合計が 100 以上になるように位相差顕微鏡 (400 \times : TE300; Nikon) 下でカウントし、これを 3 回繰り返して、その平均値で評価した。正常な精子細胞膜は、尾部が膨化、カールした精子を陽性 (細胞膜正常)、尾部に変化がなく真直ぐなままの精子を陰性 (細胞膜異常) として判定した (図 2)。

精子先体の正常性は、fluorescein isothiocyanate-labeled peanut agglutinin (FITC-PNA; SIGMA) 染色により評価した。精子サンプルはスライドガラスに塗沫、室温で風乾させ、100%エタノールに 10 分間室温で浸漬して固定した。風乾後、D-リン酸緩衝生理食塩水 DPBS[-] で 100 倍希釈した FITC-PNA (30 μ L) で染色し、30 分間 37°C の湿潤なインキュベーター内に静置した。その後 DPBS[-] で洗い、カバーガラスをかけて 488 nm フィルター[32]の蛍光顕微鏡

(300× : Eclipse 300; Nikon) で鏡検した。精子頭部が FITC-PNA 陽性で緑色に染色されているものを陽性 (先体正常)、染色されていないものを陰性 (先体異常) として判定した。精子数が 100 以上になるようカウントし、これを 3 視野以上繰り返し、その平均値で評価した (図 3)。

受精能および IVF 後の発育能の評価

液状保存後の精子受精能におけるスキムミルク濃度の影響を検討するために、各濃度のスキムミルク (0、7.5、15 mg/mL) を添加したモデナ修正液で 15°C 週間保存した精液 (1×10^8 精子/mL) を体外成熟後の卵母細胞と共に体外受精液中で共培養し、その後の受精率および胚発育率を検討した。

食肉処理場で採取したブタ卵巣を 30°C に保温した 0.9% の滅菌生理食塩水に浸し、3 時間以内に実験室に持ち帰った。卵丘卵母細胞複合体 (COCs) は、3-6 mm 大の小卵胞から、18 G 針付き 5 mL 容量のシリンジを用いて吸引採取した。COCs は、100 IU/mL ペニシリン G (明治) および 0.1 mg/mL の硫酸ストレプトマイシン (明治) 含む修正済の PBS (m-PBS; 日本全薬株式会社、福島、日本) に採集した。卵細胞質が形態的に均一および卵丘細胞を多量に備えた COCs のみを、この実験で使用した。成熟培養液は tissue culture medium (TCM) 199 を基礎培地とした。これに 10% (v/v) ブタ卵胞液、25 mM HEPES 緩衝剤 (TCM199; Invitrogen Corp、Carlsbad、CA、アメリカ)、0.6 mM システイン (SIGMA)、50 μ M ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、2 mg/mL D-ソルビトール (和光)、1 μ g/mL 17 β -estradiol (SIGMA)、50 μ M β -メルカプトエタノール (和光)、10 IU/mL 妊馬血清性腺刺激ホルモン (eCG; 川崎製薬株式会社、川崎、日本)、10 IU/mL ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG; 川崎)、50 μ g/mL ゲンタマイシン (SIGMA) を添加して使用した。選別した COCs は培養液で 3 回洗浄後、10-15 個を 100 μ L の培養液のドロ

ップ内に移してミネラルオイルで覆い、38.5°C、5% CO₂の気相条件下で22時間成熟させた後、上記のホルモンを含まないTCM199培養液に移し、更に22時間成熟させた。

体外成熟した卵母細胞との体外受精(IVF)は菊地ら[33]の方法に従い実施した。IVF培地は90 mM塩化ナトリウム、12 mM塩化カリウム、25 mM炭酸水素ナトリウム、0.5 mMリン酸二水素ナトリウム、0.5 mM硫酸マグネシウム、10 mM乳酸ナトリウム(全て和光)、3 mg/mLのウシ血清アルブミン(BSA; SIGMA)、5 mMカフェイン(SIGMA)および50 µg/mLのゲンタマイシンを添加した。体外成熟後、COCsはIVF培地で洗浄し、10–15個を90 µLのIVF培地のドロップ内に移してミネラルオイルで覆った。精子を添加する前に、約30分平衡静置した。5°Cで2週間保存した各精液サンプルは、3 mM DL-乳酸カルシウム(和光)、3 mM D-グルコース(和光)、12%ウシ胎児血清(FBS: Invitrogen)、50 µg/mLゲンタマイシンを添加、pH 7.8に調整したTCM199で希釈混和し、550×gで2分間遠心分離後、再希釈し15分間38.5°Cで静置した。希釈精液10 µLを、最終濃度が 5×10^6 精子/mLになるように成熟卵母細胞の入ったIVF培地のドロップ90 µLに注入し、38.5°C、5% CO₂、5% O₂及び90% N₂気相条件下で20時間共培養した。体外受精後、卵丘細胞と付着精子をピペッティングにより除去した。対照として、液状保存をしてない新鮮精子を用い上記と同様に体外受精を行った。

裸化した受精卵はスライドガラス上に置いてカバーガラスで覆い、カルノア液(メタノール:酢酸=3:1v/v)で48–72時間固定した。固定した胚は、アセトオルセイン(45% v/v 酢酸中に1%オルセイン)で染色し、位相差顕微鏡下で観察した。卵細胞中に雌性前核と雄性前核の両方があるものを受精と判断し(図4)、細胞質中の前核数及び膨化精子頭部等の数により、単精子侵入もしくは多精子侵入に分類した[34]。

他の受精卵は、豚の受精卵培養液（PZM-5；機能性ペプチド研究所、山形、日本）100 μ L のドロップに移し、ドロップそれぞれにおよそ 10 個の受精卵を入れた。それらを、38.5°C、5% CO₂、5% O₂ および 90% N₂ のインキュベーターに移し、体外発生培養（IVC）を行った。受精から 72 時間後、分割胚を更に 5% FBS 添加 PZM-5 に移し、5 日間培養して胚盤胞への発育能を評価した。体外受精から 8 日目に、3.7% (w/v) パラホルムアルデヒドと 1% (v/v) トリトン X-100 (SIGMA) を含んだ PBS で、全ての胚を 15 分間室温に固定処理し、0.3% (w/v) ポリビニルピロリドンを含む PBS で更に 15 分間洗浄した。固定・洗浄後の胚はスライドガラス上に乗せた 90% (v/v) グリセロール含有 1.9 μ M ヘキスト 33342 (SIGMA) 内に置き、カバーガラスで覆った後、4°C で一晩保存した。胚の観察は 355 nm 波長励起フィルターの蛍光顕微鏡にて行い、全ての胚の細胞数を記録し、明瞭な胞胚腔を認め、細胞数が 20 以上あるものを胚盤胞と判定した（図 5）。

人工授精 (AI)

モデナ修正液に 7.5 mg/mL スキムミルク添加した精液を 5°C で 2 週間保存後、10 分間 1800 \times g で遠心分離し、精漿やモデナ液からなる上清を除去した後、5°C でスキムミルク無添加 50 mL のモデナ修正液により希釈した（最終濃度が 1×10^8 精子/mL）。その後、精液（50 mL の液で 50×10^9 精子/mL）を、30 分以内に 30°C まで徐々に温め、ゴム製の人工授精カテーテル（富士平工業㈱、東京、日本）を用いてブタの子宮内に注入し、人工授精を行った。発情観察は 1 日に 2 回、午前 8 時と午後 4 時に行い、一頭の雌豚においてそれぞれ 3 回の人工授精を行った。午前 8 時に発情を発見した場合は、発情発見から 1 時間以内に 1 回目、同じ日の夕方（午後 5 時ごろ）に 2 回目、翌朝（午前 9 時ごろ）に 3 回目の人工授精を行った。午後 4 時に発情を発見した場合は、発情発見から 1 時間以内

に 1 回目、翌朝（午前 9 時ごろ）に 2 回目、翌日の夕方（午後 5 時ごろ）に 3 回目の人工授精を行った。全ての雌豚は、人工授精後 40 日頃に超音波検査により妊娠の有無を判定した。

試験計画

実験 1

保存精液へのスキムミルク添加濃度の効果を検討した。スキムミルクを 0（対照群）、7.5、15、30、50 mg/mL で添加したモデナ修正液で精液（ 1×10^8 精子/ml）を 5°C で 4 週間保存し、精子性状検査（運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性）を 4 週目まで各週行った。

実験 2

保存精液を用い、体外受精後の受精率及び胚発生に及ぼすスキムミルク添加濃度の影響を調べた。精子運動指数は 2 週間保存後におよそ 50 であったが、保存の継続とともに減少した。そのため、2 週間保存した精液サンプルを実験 2 に使用した。0（対照群）、7.5 及び 15 mg/mL スキムミルク添加群の精液は 5°C で 2 週間保存後、体外成熟培養した豚卵母細胞と共に体外受精を行った。共培養後、卵母細胞を固定または染色により体外受精率および胚発育率について調べた。なお、新鮮精液をコントロールとして、体外受精に供した。

2 頭のブタ由来精液を、スキムミルク 7.5mg/mL 添加モデナ修正液で 5°C、2 週間保存後、雑種（ランドレース×大ヨークシャー）の雌ブタに人工授精を行った。コントロールとして、同ブタからの新鮮精液を用いてモデナ修正液で希釈して人工授精に供した。

統計分析

各試験についてそれぞれ 4 回以上繰り返し実施した。全てのデータは、統計分析前にアークサイン変換した。データは SAS (SAS for Windows, version 9.1; SAS Institute Japan, 東京、日本) を用い、分散分析法 (ANOVA) により検定した。各データは平均値と標準誤差 (SEM) で示し、値は $P < 0.05$ の時に有意とした。

結果

5°Cで4週間保存した液状精液の精子性状に及ぼすスキムミルクの添加効果

スキムミルクを添加した精液の精子運動性、生存性および細胞膜正常性は保存期間の延長とともに減少した（図8-A、B、C）。3週間目まで、対照群と比較してスキムミルク7.5、15 mg/mL添加群は有意に高い運動性を示した（ $P < 0.05$ ）（図8-A）。更に、スキムミルク7.5 mg/mL添加群は4週間保存後精子運動性を改善した。スキムミルク7.5および15 mg/mL添加群は保存1週間目において対照群に比べ有意に高い精子生存性を示した（ $P < 0.05$ ）（図8-B）。しかしながら、精子細胞膜及び先体正常性において顕著な有意差は認められなかった（図8-C、D）。

5°Cで2週間保存した精子の体外受精および体内受精能に及ぼすスキムミルクの添加効果

ブタ精液はスキムミルク0-15 mg/mL添加モデナ修正液で5°C、2週間保存後、体外成熟培養したブタ卵母細胞と体外受精を行った。5°Cで2週間保存した精子の受精率は対照群と比較してスキムミルク7.5、15 mg/mL添加群が高い値（ $P < 0.05$ ）を示した（表2）。しかし、正常精子侵入率と多精子侵入率については、実験区間に有意差は認められなかった。胚盤胞発生率において、5°Cで2週間保存した精液は、対照群と比較してスキムミルク7.5および15 mg/mL添加群有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）。また、スキムミルク7.5 mg/mL添加群の受精率及び胚盤胞発生率は新鮮精液と同等であった。

スキムミルク7.5 mg/mL添加モデナ修正液で5°C、2週間保存後、人工授精した結果、4頭ブタのうちに2頭が妊娠し、全体で8頭の正常な子豚が生まれた（表

3、図6)。しかし、保存精液で AI 後の産子数は、新鮮精液より低い傾向であった。

考察

本研究では、長期低温保存においてブタ精液の精子性状および受精能を改善することができた。特に、モデナ修正液への 7.5 mg/mL スキムミルクの添加により 5°C で 4 週間目まで精子運動性を維持することを可能とした。近年、ブタ精液の液状保存における活性酸素の影響が注目されている。活性酸素は精子自身（遠心分離や冷却および低温長期保存過程で）からも生成され [35, 36]、細胞膜の機能や運動性および代謝機能低下など不可逆的損傷を与えている。精子と精漿の防御機構は酵素的抗酸化と非酵素的抗酸化の両効果があると考えられる。非酵素的酸化防御は、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、およびビタミンを含む多くの分子によるが、それらは疎水性基および親水性基の両方をトラップ可能な種々の疎水性基であり、フェノール、チオール等とは異なる反応である [23]。従って、これら活性酸素の作用を抑制することにより、精子活力の低下を抑えることができる。スキムミルクはウマおよびヤギ精液に非酵素的酸化防止要因として報告されているが、同じくブタ精液を活性酸素種から保護できる。これはスキムミルクに抗酸化物質が含まれているためである [55, 56]。これまでに、スルフヒドリル基がスキムミルクの抗酸化活性作用の一部として反応していることが報告されている [24]。更にスキムミルクは、カゼインやラクトース、その他の構成要素により、ヤギやウシの精子を低温損傷から保護することが報告されている [38]。従って、スキムミルクは精子運動性に必要な細胞内物質を精液保存中適切に維持することにより、低温損傷からブタ精子を保護できる可能性が考えられる。

体外受精過程において、先体反応、透明体接合、卵母細胞侵入などを行うための受精能獲得が必要である [57]。精子の運動性および活性化は卵母細胞の透

明帯への侵入に重要であると考えられている[58]。本研究では、モデナ修正液にスキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加群で 2 週間保存した精子は、対照群より高い精子侵入率を示した。スキムミルク添加保存精液で観察された高い侵入率は、スキムミルクの効果による高い精子運動性の維持が原因と考えられる。しかし、2 週間保存した精子先体正常率は実験区間で有意差が認められなかった(図 2-D) このことより、スキムミルクの効果は精子先体正常性には影響しないと示唆された。

これまでに、新鮮な射出精液[44]あるいは凍結融解精巢上体精液[45]を用いた場合、約 12%の胚盤胞形成率が報告されている。本研究においては、スキムミルク 7.5 および 15mg/mL 添加モデナ修正液で 2 週間 5°C 保存した精子を使用してこれと同等の約 12%の胚盤胞形成率を得ることができた。これらの結果から、スキムミルク添加希釈液が低温で長期保存精子性状の維持に可能であることが示唆された。また、2 週間 5°C でスキムミルク 7.5 mg/mL 添加保存精液を用いてブタに AI を行った結果、健康な子豚を得ることができた。これまでに、10 日間 15°C で保存した精液を使用して子豚生産の成功が報告されている[59]。また別のグループは、精液を 3 週間 10°C で保存したとき、子豚生産が不可能であったと報告している[16]。今回の研究は、低温 (5°C) および保存期間 (14 日) の両方において最初の子豚生産を得た報告であると思われる。これら成果を活用することにより、液体窒素を用いて精液の凍結を行うことなく、ブタ精液の保存は短期間であるが人工授精が可能となる。しかし、今回の保存精液で AI を実施した後の産子数は、新鮮精液より低い傾向が見られた。このことから、スキムミルク以外の物質との組み合わせなど、更なる検討が必要と思われた。

本研究では、モデナ修正液に 7.5 mg/mL スキムミルクを添加することにより、5°C で 2 週間保存した精液の精子運動性及び体外・体内受精能を改善することを

実証した。しかしながら、長期保存における精子性状を改善するためには、液状保存方法の更なる改良が必要であると考えられた。

総括

本研究では、精子運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性を指標とした精子性状及び受精能（IVF 及び AI）を調べることにより、5°C および 15°C で 2 週間以上保存したブタ精液におけるモデナ修正液へのスキムミルク添加効果を検討した。

ブタ精液の保存は液状保存が未だ主流である。精液希釈液は、エネルギー基質を提供し、pH および浸透圧の変化を防止することにより、精子運動性および受精能を保護する [60]。ウマおよびイヌにおいても 4-5°C の温度範囲は精子代謝が減少し、精子運性を保護する最も良い方法と考えられている [60, 61]。また、5°C で保存された精液の細菌増殖は低下するため、抗生物質の添加は精液性状の維持に重要ではないことが報告されている [61, 62]。しかし、5°C で保存された精液の精子性状及び受精能は著しく低下するため、ブタ精液は通常 15°C で保存されている [3]。さらに、いくつかの研究ではブタ精液の液状保存が実施されているが、希釈液の最適な組成及び最も有効な添加物質がいまだ決定されていない。

ミルクを用いた希釈液は、5°C および 15°C でウマ精液の精液性状の維持に効果を示している [63, 64]。今回の研究において、モデナ修正液への 7.5 mg/mL スキムミルクの添加により 5°C および 15°C で保存 4 週間目まで精子運動性を改善することができた。さらに、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加が精子生存性に対して最も効果的であった。一方、カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、直接あるいはタンパク質のリン酸化を介して間接的に精子先体反応を引き起こすことが示唆されており、活性化運動時に細胞内濃度が上昇し、細胞内情報伝達機構における役割とともに受精における係わりが注目されている [43]。さらに、 Ca^{2+} の取り込みと同

様にアデノシン5`-三リン酸 (adenosine 5`-triphosphate:ATP) およびサイクリンクアデシノン3`、5`-一リン酸 (cyclic adenosine 3`,5`-monophosphate:cAMP) の損失は、運動性が減少した精子の特徴であることが知られている[65]。希釈と冷却は、ブタ精子膜の浸透性を増加させ[66]、冷却により膜脂質流動性に引き起こされた変化は、受精能獲得に必要であるCa²⁺、cAMPおよびATPなどの細胞内物質の膜内外の移動に影響を及ぼす可能性がある[3]。スキムミルクは、カゼインやラクトース、その他の構成要素により、ヤギやウシ精子を低温損傷から保護することが報告されている[38]。従って、スキムミルクは精子運動性および生存性に必要な細胞内物質を精液保存液中に適切に維持することにより、低温損傷からブタ精子を保護できる可能性が考えられる。しかし、精子生存性の改善は15℃で保存した精液で見られたものの(図1-B)、5℃で保存した精液でスキムミルク添加効果が認められなかった(図2-B)。従って、低温による影響は、液状保存した精液の保存温度により異なると考えられる。本研究では、モデナ修正液へのスキムミルク添加が5℃および15℃で保存精液の精子細胞膜正常および先体正常性に影響しなかった。これらのことは、スキムミルクが精子性状に必要な細胞内物質を選択的に維持することにより、低温損傷からブタ精子を保護していることが考えられた。

体外受精技術は受精卵を大量に作出できる重要な技術である。一方、体外受精は、精子および卵子の発生や生理学的動態を追跡し、詳細に受精機構を解明するための有効な手段でもある。従って、体外受精は精子の受精能を検討する最も有益な方法となる[41]。受精の第一段階では、精子が卵母細胞の透明帯に侵入し、受精部位の卵母細胞原形質膜に達するために、精子の先体反応が必要である[57]。このほか精子の運動性および活性化も透明帯への侵入に重要であると考えられる[58]。本研究において、モデナ修正液にスキムミルク7.5および

15 mg/mL添加し5°Cで2週間保存した精子は、対照群より高い精子侵入率を示したが、15°Cで2週間保存精液した群との間に差はなかった。スキムミルク添加5°Cで保存した精液で観察された精子侵入率改善効果は、スキムミルクにより維持された高い精子運動性によるものと考えられた。しかし、2週間保存した精子先体正常率は保存群間で差がないことから、スキムミルクは精子先体正常性に影響を与えないことが考えられる。15°Cで2週間保存した場合は精子に与える低温感作が比較的小さく、スキムミルクの効果が顕著ではない可能性が考えられた。また、受精の直後に卵細胞内Ca²⁺濃度の変動があり[67]、これらのCa²⁺濃度の変動は、卵細胞の表層顆粒放出を含む、多精子受精拒否および減数分裂再開を引き起こす[68]。本研究では、多精子および単精子受精率はグループ間に差のないことが観察されたが、それは卵母細胞で表層顆粒放出に必要となる精子の受精過程にスキムミルクが影響しなかったことが示唆された。

胚盤胞発生率において、5°Cで2週間保存した精液は、スキムミルク添加群が有意に高い値を示した。しかし、15°Cで2週間保存した精液間に差は認められなかった。ブタ卵母細胞の体外成熟および体外受精技術にかかわらず、胚発生率は低いと報告されている[45]。豚では、正常な体外受精胚（単精子受精）を高率に作ることは困難である。また、前核形成不全および高い多精子侵入により胚発生率が低下している[69]、更に、精液サンプル間に受精能の差があることなどが示唆されており、精子デオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid: DNA）の損傷が胚発生率の低下および遺伝子の異常と関係していると報告されている[70]。このような胚の低発生率は、精子由来のゲノムを始め損傷した遺伝子の転写と関係している[71]。抗酸化物質の減少および精子自身のROS生成増加からなる酸化ストレスは精液のDNA損傷と関連している。本研究において、2週間5°Cでスキムミルク7.5 mg/mL添加保存した精液を用いてブタにAIを行う

た結果、健康な子豚を得ることができた。現在までに、精液の希釈液の改良により精液の生存性が改善されるとともに、宅配便の発達による輸送体制の整備や輸送方法が改善され、AI センターから遠隔地であっても、当日～2日以内の精液の調達が可能となった。配達された精液をAIに用いたところ、自然交配と遜色のない繁殖成績が得られており、また1週間中温で保存した精液を使用して子豚生産が報告されている[59]。本研究は、これまでより長期間の5℃で2週間保存して子豚を得た最初の報告であるが、2週間保存精液でAIを実施した後の産子数は減少する傾向が見られた。

近年、ブタの液状精液保存における活性酸素の影響が注目されている。活性酸素は精子自身からも生成され、膜の機能低下や運動性および代謝機能の低下など不可逆的な損傷を与えている[1]。このような活性酸素による酸化ストレスは、精子のミトコンドリアおよび各ゲノムのDNAに著しい損傷を与えることが報告されており[72]、胚発生率の低下と関係していることが知られている[73]。従って、胚の初期発生においても酸化ストレスによりDNAの損傷が重大な影響を与えることが予測される[74]。さらに、ROSは精液希釈剤に適切な抗酸化物質が欠乏している場合、精液保存の間に蓄積する可能性がある。一旦ROSの生産および除去の不均衡が起きると、過剰のROS生成は精子に酸化ストレスを与える。これに対して、精子には活性酸素に対する抗酸化作用を示す酵素類が含まれ、活性酸素の傷害から精子自身を守っているが、活性酸素はこの酵素類の活性も低下させている。従って、これら活性酸素の作用を抑制することにより、精子活力の低下を抑えることができると考えられている[72]。本研究は、スキムミルクを7.5 mg/mL添加することにより5℃および15℃で4週間保存した精液の精子運動性を改善することを証明した。従って、スキムミルクに含まれる抗酸化物質によりブタ精子を過剰なROSの生成から保護していることが示唆さ

れた。さらに、スキムミルクは精子運動性に対する物理的または化学的な効果を及ぼす可能性もある。本研究において、スキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加 5°C で 2 週間保存した精液を用いた場合、体外受精後の胚盤胞形成率が高値を示した。これら結果は、スキムミルクを添加した希釈液が、低温で長期保存中の精子性状を維持するのに重要であることを示唆しているものと考えられた。

以上、液状保存したブタ精子の精子性状および受精能に及ぼすスキムミルクの効果は保存温度に依存することが判明した。モデナ修正液へのスキムミルク 7.5 mg/mL 添加は保存温度が 5°C において保存精液の精子運動性および受精能を改善する効果がみられた。しかしながら、ブタ精液の液状保存における保存方法の更なる改善が長期液状保存における精子性状の低下を防止するために必要と考えられた。

図表

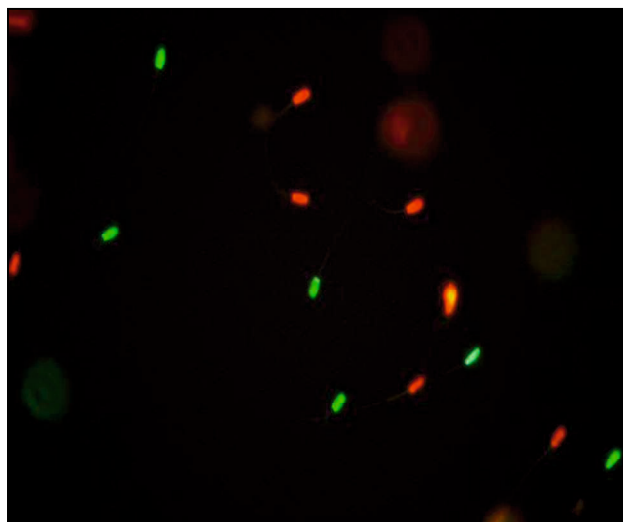


図 1. 精子生存性の評価（×200）頭部が SYBR 陽性で緑色の発色を呈するものを生存精子、PI 陽性で赤色の発色を呈するものを死滅精子として判定。



図 2. 精子膜正常性の評価。（×200）尾部がカールしているものを細胞膜正常精子として判定。

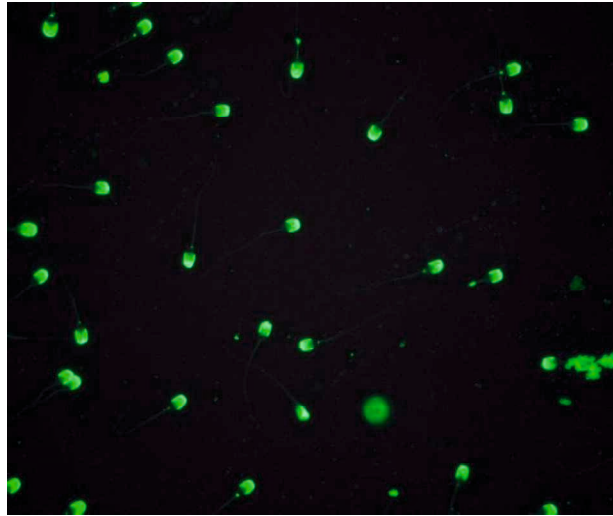


図3. 先体正常性の評価(×200)頭部がFITC-PNA陽性で緑色の発色を呈するものを先体正常精子と判定

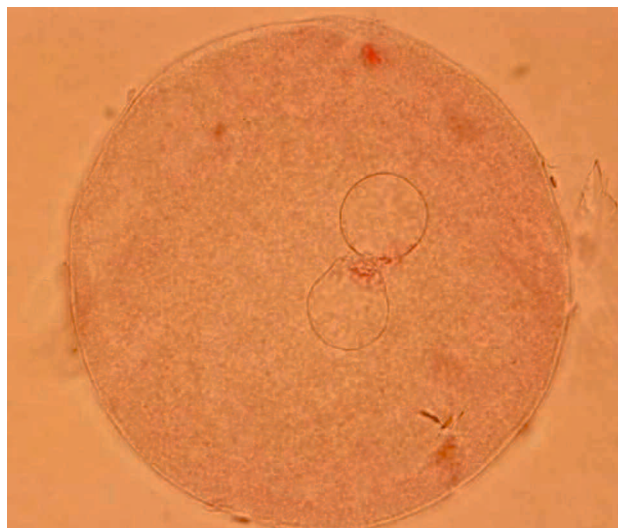


図4. アセトオルセイン染色による受精卵(×400)正常受精後に雌性前および雄性前核を形成。

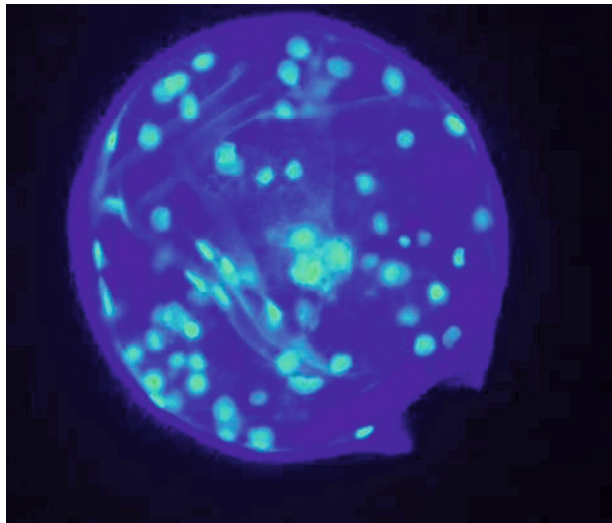
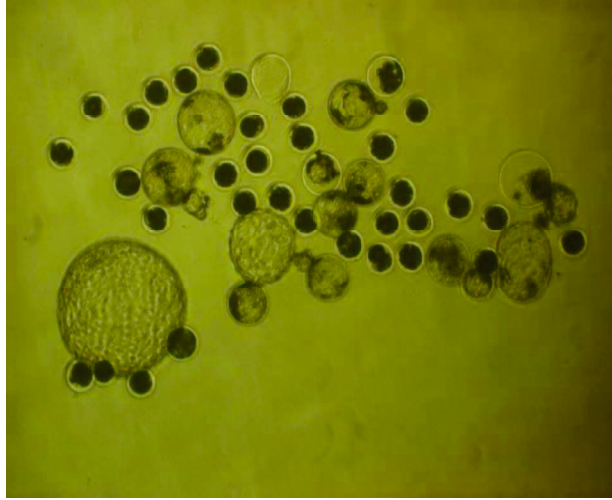
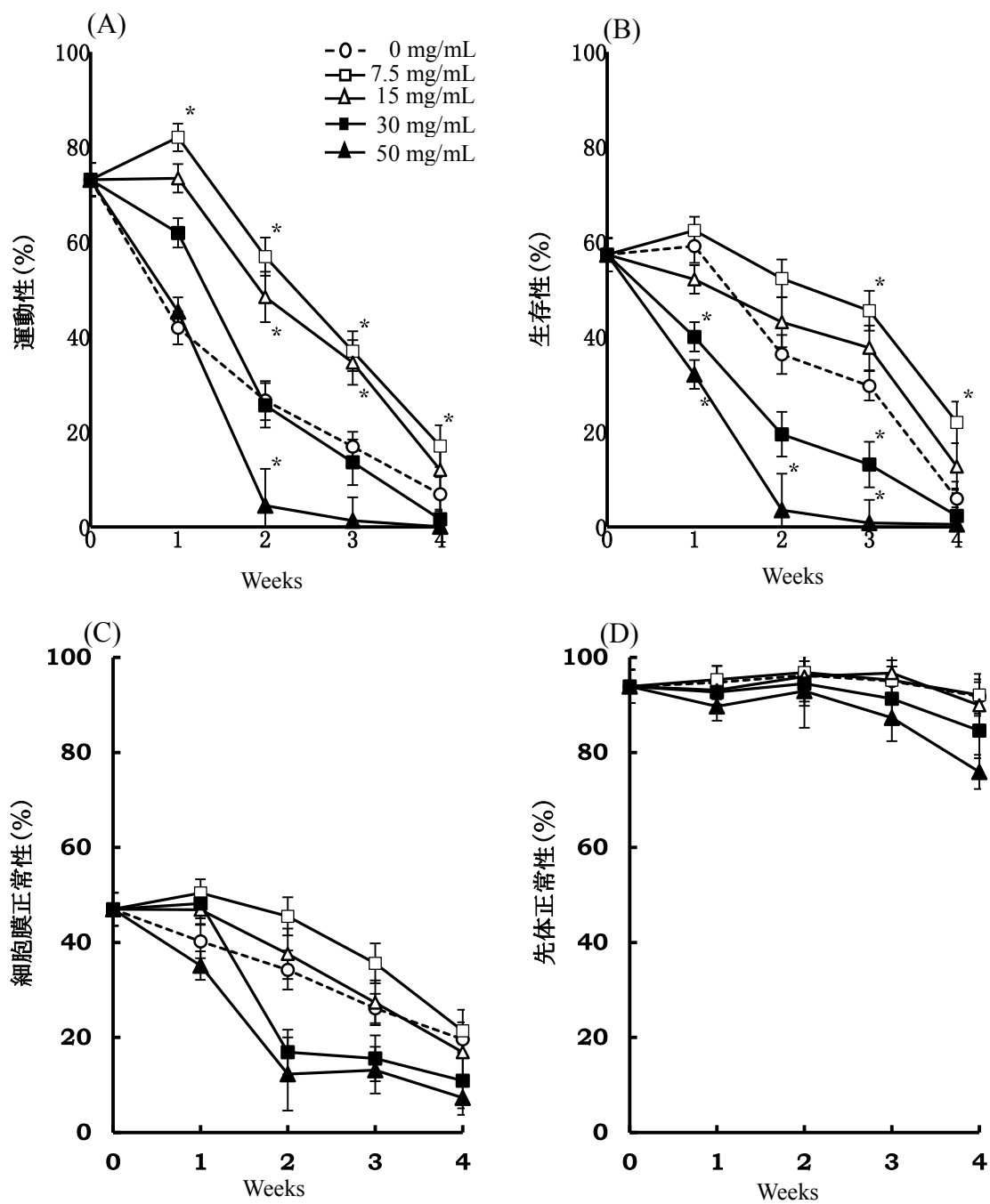


図 5. 体外受精後 8 日目に観察された胚盤胞（上図）およびヘキスト染色後の胚盤胞（下図，×400）



図6. スキムミルク 7.5 mg/mL 添加保存液で2週間5°Cで保存した精液を用い人工授精により作出した子豚。

図 7. 4 週間 15°C で保存した液状精液の精子性状



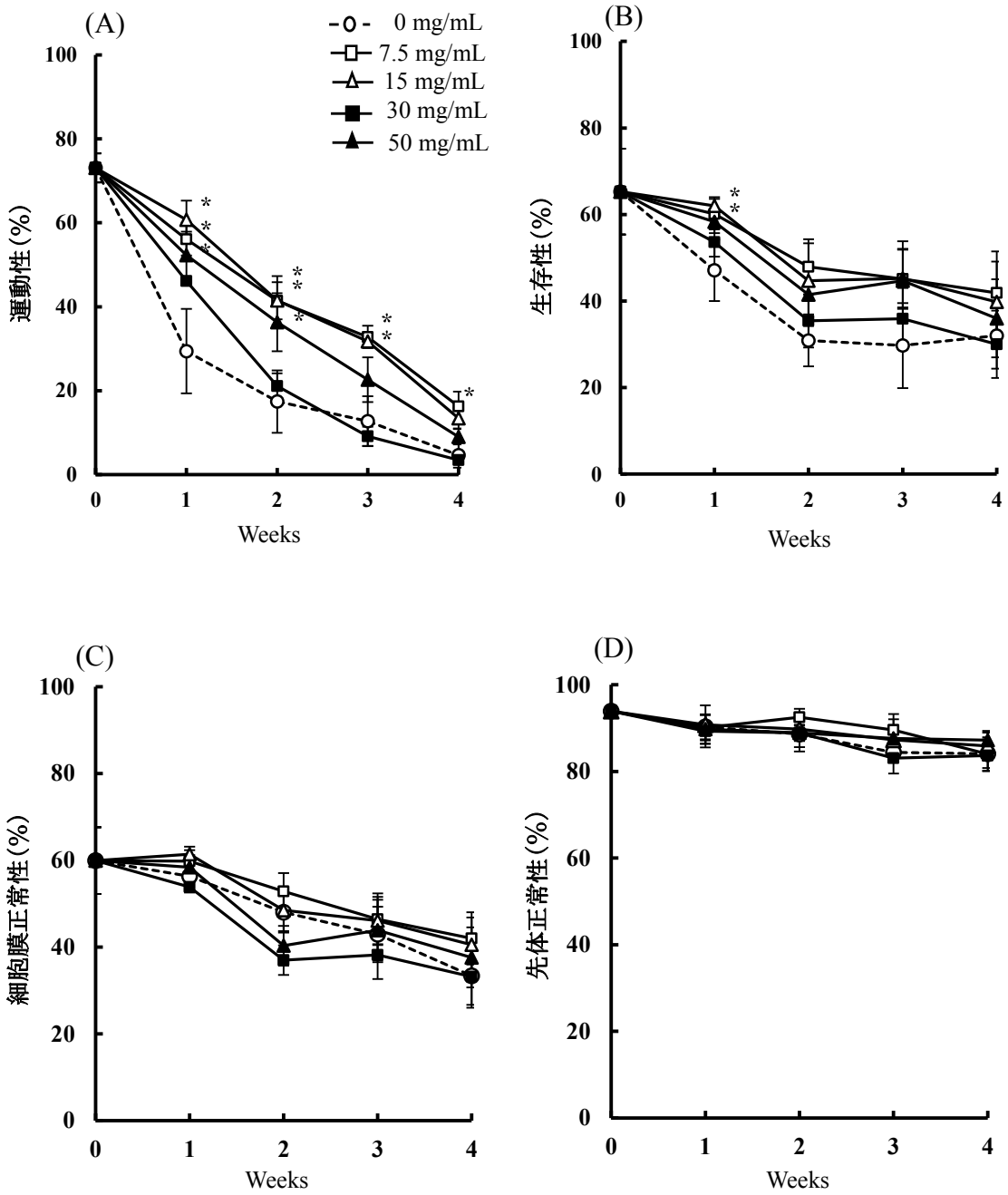
*対照 (0 mg/mL) と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

表 1. 2 週間 15°C で保存したスキムミルク添加精液が体外受精率及びその後の胚盤胞形成率に及ぼす影響

Concentration of skim milk (mg/ml)	No. oocytes examined	No. (%) oocytes fertilized		No. oocytes examined	No. blastocysts (%)
		Total	Monospermic		
Fresh	248	131 (50.7 ± 2.6) ^a	47 (32.7 ± 3.8) ^a	156	26 (15.8 ± 2.0)
0	109	33 (30.0 ± 3.8) ^b	12 (35.3 ± 2.8) ^{ab}	140	13 (8.8 ± 4.0)
7.5	111	43 (38.9 ± 1.8) ^b	18 (41.8 ± 4.3) ^{ab}	143	17 (11.8 ± 2.1)
15	107	28 (26.0 ± 3.0) ^b	13 (48.0 ± 4.8) ^b	135	15 (10.4 ± 3.4)

異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)

図8. 4週間5°Cで保存した液状精液の精子性状



*対照 (0 mg/mL) と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

表 2. 2 週間 5°C で保存したスキムミルク添加精液が体外受精率及びその後の胚盤胞形成率に及ぼす影響

Concentration No. of skim milk (mg/ml)	No. oocytes examined	No. (%) oocytes fertilized		No. oocytes examined	No. blastocysts (%)
		Total	Polyspermic		
Fresh	248	131 (51.3 ± 4.0) ^a	84 (63.8 ± 1.4)	182	29 (15.2 ± 1.8) ^a
0	106	20 (19.8 ± 2.7) ^b	9 (43.8 ± 6.3)	258	3 (1.1 ± 0.6) ^b
7.5	105	43 (41.1 ± 0.9) ^{a,c}	19 (44.7 ± 2.0)	257	40 (15.4 ± 1.5) ^a
15	102	34 (34.8 ± 6.4) ^c	14 (39.3 ± 7.4)	253	22 (7.8 ± 2.0) ^c

異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)

表 3. スキムミルク 7.5 mg/mL 添加保存液で 2 週間 5°C で保存した精液を用いた人工授精による妊娠率および子豚生産

Boar	Fresh/ storage	% pregnancy (no. of AI)	Mean no. of born normally		Piglet weights (kg)
			♂	♀	
1	Fresh	100 (3)	6.3 ± 1.2	4.7 ± 2.3	11.0 ± 2.0
	Storage	50 (2)	2.0	3.0	5
2	Fresh	100 (3)	7.7 ± 2.3	6.3 ± 2.5	14.0 ± 3.6
	Storage	50 (2)	2.0	1.0	3.0
					1.24 ± 0.05
					1.26 ± 0.05
					1.34 ± 0.05
					1.27 ± 0.16

謝辞

本研究を遂行するにあたり、まず指導教授の音井威重教授に、多大なるご指導とご助言を賜りましたことを深く感謝申し上げます。本論文のご校閲、ご指導を賜りました和田直己教授、菊地和弘教授、佐藤宏教授、高木光博准教授に深く感謝いたします。

また、試験を進めるにあたりブタ精液の採取にご協力いただきました試験を進めるにあたりブタ精液の採取にご協力いただきました山口県農林総合技術センター畜産技術部および畜産草地研究所業務二科、卵巣をご提供いただいた北九州食肉処理センターの皆様に深く感謝いたします。

最後に、谷口雅康助教、高岡亜沙子さん、そしてご協力をいただきました研究室の佐藤陽子さん、児玉理沙さん、Luu Viet Vien さん、Manita Wittayarat さん、Do Kim Lanh さん、森永浩太さん、柴田祐里さん、秋山紘平さんに感謝いたします。

引用文献

1. Maxwell WMC, W.P., *Recent progress in the preservation of ram semen*. Anim Reprod Sci, 1996(42): p. 55-65.
2. White, I.G., *Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review*. Reprod Fertil Dev, 1993. **5**(6): p. 639-58.
3. Johnson, L.A., et al., *Storage of boar semen*. Anim Reprod Sci, 2000. **62**(1-3): p. 143-72.
4. Conejo-Nava, J., et al., *Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C*. Arch Androl, 2003. **49**(4): p. 287-95.
5. Waterhouse, K.E., et al., *Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry*. Theriogenology, 2004. **62**(9): p. 1638-51.
6. Waberski D, M.S., Dirksen G, Weitze KF, Leiding C, Hahn R., *Fertility of long-term-stored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen*. Anim Reprod Sci, 1990(36): p. 145-51.
7. Szczes'niak-Fabian'czyk, B., et al., *Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure*. Reprod Biol, 2003. **3**(1): p. 81-7.
8. Review, G.J., *Semen extenders used in the artificial insemination of swine*. Span J Agric Res, 2003(1): p. 17-27.
9. Canvin, A.T. and M.M. Buhr, *Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes*. J Reprod Fertil, 1989. **85**(2): p. 533-40.
10. Vijayasathy, S. and P. Balaram, *Regional differentiation in bull sperm plasma membranes*. Biochem Biophys Res Commun, 1982. **108**(2): p. 760-9.
11. Cerolini, S., et al., *Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage*. Anim Reprod Sci, 2000. **58**(1-2): p. 99-111.
12. Bustamante Filho, I.C., et al., *Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation*. Anim Reprod, 2009. **6**(2): p. 392-9.
13. Michael, A.J., et al., *Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation*. Theriogenology, 2008. **70**(5): p. 827-35.

14. Tavilani, H., et al., *Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa*. Int Braz J Urol, 2008. **34**(4): p. 485-91.
15. Griveau, J.F., et al., *Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa*. J Reprod Fertil, 1995. **103**(1): p. 17-26.
16. Funahashi, H. and T. Sano, *Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C*. Theriogenology, 2005. **63**(6): p. 1605-16.
17. Akhter, S., et al., *In vitro evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5 degrees C diluted in soya lecithin based extender (Bioxcell(R)), tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders*. Reprod Domest Anim, 2011. **46**(1): p. 45-9.
18. Abe, Y., et al., *Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender*. J Reprod Dev, 2008. **54**(4): p. 290-4.
19. Amirat, L., et al., *Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing*. Reproduction, 2005. **129**(4): p. 535-43.
20. Nakagata, N., *Cryopreservation of mouse spermatozoa*. Mamm Genome, 2000. **11**(7): p. 572-6.
21. Dorado, J., I. Rodriguez, and M. Hidalgo, *Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination*. Theriogenology, 2007. **68**(2): p. 168-77.
22. Pellicer-Rubio, M.T., T. Magallon, and Y. Combarrous, *Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity*. J Reprod Fertil, 1997. **112**(1): p. 95-105.
23. Evelson, P., et al., *Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols*. Arch Biochem Biophys, 2001. **388**(2): p. 261-6.
24. Taylor, M.J. and T. Richardson, *Antioxidant activity of skim milk: effect of heat and resultant sulfhydryl groups*. J Dairy Sci, 1980. **63**(11): p. 1783-1795.
25. Pagl, R., et al., *Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 degrees C*. Theriogenology, 2006. **66**(5): p. 1115-22.
26. Waberski, D., et al., *[Field studies of the effect of sperm motility and morphology on the fertility of boars used for insemination]*. Tierarztl Prax, 1990. **18**(6): p. 591-4.
27. Agarwal, A., R.A. Saleh, and M.A. Bedaiwy, *Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction*. Fertil Steril, 2003. **79**(4): p. 829-43.

28. Oonishi H, H.M., Ishikawa Y, Kadoya Y, Yamada M, Moriguchi K., *Experiment in transportation of boar liquid semen with semen extender for low temperature preservation*. Bull Fukushima Anim Husband Exp Stat, 2006. **14**: p. 5-48.
29. Okamura, N., et al., *Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase*. J Biol Chem, 1985. **260**(17): p. 9699-705.
30. Blanco, J.M., et al., *Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa*. Biol Reprod, 2000. **63**(4): p. 1164-71.
31. Ahmad, Z., et al., *Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates*. Theriogenology, 2003. **59**(5-6): p. 1189-202.
32. Okazaki, T., et al., *Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality*. Theriogenology, 2009. **71**(3): p. 491-8.
33. Kikuchi, K., et al., *Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system*. Biol Reprod, 2002. **66**(4): p. 1033-41.
34. Suzuki, C., et al., *In vitro fertilization and subsequent development of porcine oocytes using cryopreserved and liquid-stored spermatozoa from various boars*. Theriogenology, 2005. **64**(6): p. 1287-96.
35. Wang, A.W., et al., *Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation*. Urology, 1997. **49**(6): p. 921-5.
36. Calamera, J.C., et al., *Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect*. Andrologia, 2001. **33**(2): p. 79-86.
37. Storey, B.T., *Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(3): p. 203-213.
38. Salamon, S. and W.M. Maxwell, *Storage of ram semen*. Anim Reprod Sci, 2000. **62**(1-3): p. 77-111.
39. Songsasen, N., et al., *Osmotic sensitivity of canine spermatozoa*. Cryobiology, 2002. **44**(1): p. 79-90.
40. Bavister, B.D. and T. Arlotto, *Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos in vitro*. Mol Reprod Dev, 1990. **25**(1): p. 45-51.
41. Xu, X., et al., *In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility*. J Anim Sci, 1998. **76**(12): p. 3079-89.
42. Ikeda, H., et al., *Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm*.

- Theriogenology, 2002. **57**(4): p. 1309-18.
43. Yanagimachi, R., *Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity*. Zygote, 1994. **2**(4): p. 371-2.
 44. Grupen, C.G., H. Nagashima, and M.B. Nottle, *Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro*. Biol Reprod, 1995. **53**(1): p. 173-8.
 45. Nagai T, T.M., *Culture of in vitro matured and fertilized pig oocytes*. Anim Reprod Sci, 1992. **12**(3): p. 1324-6.
 46. Pursel, V.G., *Effect of processing of semen on capacitation time of fresh and frozen-thawed boar spermatozoa*. J Anim Sci, 1983. **56**(5): p. 1161-6.
 47. Rota, A., et al., *In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns*. Anim Reprod Sci, 1999. **57**(3-4): p. 199-215.
 48. Vyt, P., et al., *Comparative study on five different commercial extenders for boar semen*. Reprod Domest Anim, 2004. **39**(1): p. 8-12.
 49. Waberski, D., H. Henning, and A.M. Petrunkina, *Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen*. Reprod Domest Anim, 2011. **46 Suppl 2**: p. 45-8.
 50. Sansone, G., M.J. Nastri, and A. Fabbrocini, *Storage of buffalo (Bubalus bubalis) semen*. Anim Reprod Sci, 2000. **62**(1-3): p. 55-76.
 51. Watson, P.F. and I.C. Martin, *Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen*. Theriogenology, 1976. **6**(5): p. 559-64.
 52. Smith, R.L., et al., *Influence of percent egg yolk during cooling and freezing on survival of bovine spermatozoa*. J Dairy Sci, 1979. **62**(8): p. 1297-303.
 53. Muller-Schlosser F, A.V., Hinsch E, Hinsch KD., *Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk free semen diluters for cryopreservation of bovine semen*. 34th Conference on Physiology and Pathology of Reproduction, Giessen., 2001.
 54. Bergeron, A., et al., *Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage*. Biol Reprod, 2007. **77**(1): p. 120-6.
 55. Baumber, J., et al., *The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation*. J Androl, 2000. **21**(6): p. 895-902.
 56. Kankofer, M., et al., *Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C*. Theriogenology, 2005. **63**(5): p. 1354-65.

57. Gadella, B.M. and J.P. Evans, *Membrane fusions during mammalian fertilization*. Adv Exp Med Biol, 2011. **713**: p. 65-80.
58. Suarez, S.S. and H.C. Ho, *Hyperactivation of mammalian sperm*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003. **49**(3): p. 351-6.
59. Okazaki, T., et al., *Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation*. Theriogenology, 2010. **74**(9): p. 1691-700.
60. Province, C.A., et al., *Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5 degrees C*. Theriogenology, 1984. **22**(4): p. 409-15.
61. Price, S., et al., *Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 degrees C*. Reprod Domest Anim, 2008. **43**(3): p. 261-6.
62. Aurich, C. and J. Spersger, *Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa*. Theriogenology, 2007. **67**(5): p. 912-8.
63. Aurich, C., P. Seeber, and F. Muller-Schlosser, *Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C*. Reprod Domest Anim, 2007. **42**(4): p. 445-8.
64. Batellier, F., et al., *Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 degrees C under aerobic conditions*. Theriogenology, 1998. **50**(2): p. 229-36.
65. Brokaw, C.J., *Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation*. J Cell Biochem, 1987. **35**(3): p. 175-84.
66. Ortman, K. and H. Rodriguez-Martinez, *Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags*. Zentralbl Veterinarmed A, 1994. **41**(1): p. 37-47.
67. Kurokawa, M., K. Sato, and R.A. Fissore, *Mammalian fertilization: from sperm factor to phospholipase Czeta*. Biol Cell, 2004. **96**(1): p. 37-45.
68. Gardner, A.J. and J.P. Evans, *Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm*. Reprod Fertil Dev, 2006. **18**(1-2): p. 53-61.
69. Funahashi, H. and B.N. Day, *Advances in in vitro production of pig embryos*. J Reprod Fertil Suppl, 1997. **52**: p. 271-83.
70. Loft, S., et al., *Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy*. Hum Reprod, 2003. **18**(6): p. 1265-72.
71. Movahedin, M., et al., *In vitro maturation of fresh and frozen-thawed mouse round spermatids*. Andrologia, 2004. **36**(5): p. 269-76.
72. Sawyer, D.E., et al., *Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human*

- spermatozoa*. Mutat Res, 2003. **529**(1-2): p. 21-34.
73. Filatov, M.V., et al., *Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(9): p. 825-30.
74. Lewis, S.E. and R.J. Aitken, *DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy*. Cell Tissue Res, 2005. **322**(1): p. 33-41.