

ISSN 2185-6230 (Online)

Journal of REPRODUCTION ENGINEERING

December 2011
Vol. 14, No. 2: 13–36

J. Reprod. Engineer.

Japan Society for
Reproduction Engineering

SRE



Japan Society for Reproduction Engineering

<http://sre.ac.affrc.go.jp/Index.htm>

--- Honorary Member ---

Tomonori IMAMICHI

--- Special Advisory Board ---

Takayoshi INO

Shyoso OGAWA

Shuetsu SUZUKI

--- Board of the Council ---

(from April 1, 2010 to March 2012)

Chief: Naomi KASHIWAZAKI

Kiyoshi AKIYAMA	Yoshiharu MORIMOTO
Kenji FURUI	Tatsuya OSHIO
Masayuki GOTO	Junko OTSUKI
Hiroaki INUI	Akihiro TADA
Bunpei ISHIZUKA	Tsutomu TAKESHIMA
Takayuki ISHIKAWA	Naoki TAKESHITA
Junya ITO	Hitoshi USHIJIMA
Kazuhiro KIKUCHI	Hiroaki YOSHIDA

Auditors

Takuhei KIZAKI

Katsuhiko HAYASHI

Office

Azabu University
Laboratory of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine
Sagamihara 252-5201, Japan.
TEL: +81-42-769-2339 FAX: +81-42-769-1762

--- Editorial Board ---

Co-Editors-in-Chief

For human medicine:

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

For animal & basic studies:

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

Managing Editor

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

Editorial Board Members

Katsuhiko HAYASHI, Ph.D., Kyoto University

Takayuki ISHIKAWA, Kyono Art Clinic

Junya ITO, Ph.D., Azabu University

Jinji MIZUNO, Ph.D., Inui Maternity Clinic

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

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

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

Editorial Office

National Institute of Agrobiological Sciences

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

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

J. Reprod. Engineer.
2011; Volume 14, Number 2

Contents

= ミニレビュー =

藤田 陽子, 根岸 広明, 島田 昌之

精子の自然免疫機構 —Toll like receptor による細菌感染の認識とその受精抑制作用—

13-18

= Original Paper =

Hiroaki INUI, Jinji MIZUNO, Suong-Hyu HYON, Kazuaki MATSUMURA, Eiko KIKUCHI, Kaori NOGUCHI, Yuri TANJI, Kazuyuki AKAISHI, Ken ANZAI, Yoshinobu MURAYAMA

Development of a Low Toxicity and Completely Serum-Free Vitrification System Combining a Cryo-Nano-Hole Vitrification Container with Antifreeze Polyamino-acid (Carboxylated Poly-L-Lysine) for assisted reproductive technology (ART)

19-28

= ミニレビュー =

菊地 和弘, ソムファイ タマス, 中井 美智子, 永井 卓

体外で成熟・受精したブタ卵の異常と修復について

29-36

= ミニレビュー =

精子の自然免疫機構 —Toll like receptorによる細菌感染の認識とその受精抑制作用—

Innate immune functions of sperm –Toll like receptor family expressed on sperm recognize bacteria infection to decrease fertilization ability–

藤田 陽子^{1,2,†}, 根岸 広明², 島田 昌之¹

Yoko FUJITA^{1,2,†}, Hiroaki NEGISHI² and Masayuki SHIMADA¹

¹広島大学大学院生物圏科学研究科 生殖内分泌学, 〒739-8528 広島県東広島市

²ウイメンズ・クリニック大泉学園, 〒178-0063 東京都練馬区

†責任著者: y_fujita@kiyosenomori.com

要旨

精液は細菌により感染されていること、またその細菌感染が妊娠率の低下のみでなく、凍結精液や液状保存精子の運動性をも低下させることが知られている。ペニシリンなどの溶菌性抗生物質が精子の洗浄液や保存液へ添加されているが、その効果は部分的であるため、精液への細菌感染と精子の機能との関係は不明な点が多い。我々のこれまでの研究から、精液にグラム陰性菌やグラム陽性菌が検出され、さらにそれぞれが放出する内毒素が検出された。ブタ、マウス、ヒト精子における内毒素の受容体であるTLR2/4の発現を検出した結果、精子先体部に局在していた。さらに、TLR2/4のそれぞれのリガンドである内毒素の添加は、いずれの種においても精子の先体部を損傷させ、Caspase活性によるアポトーシスを引き起こし、精子生存率を低下させた。さらに、TLR4、TLR2/4ノックアウトマウスを用いた研究から、TLR2/4がそれぞれのリガンドを特異的に認識し精子生存性に影響を与えることが示され、体内および体外での受精能にも影響を与えることが明らかとなった。これらのことから、精子はTLR2/4を発現し、それが精液中の細菌感染を認識し、アポトーシスにより生存性を低下させるという、精子の初期免疫応答が初めて明らかとなった。我々は、精子の凍結保存や液状保存において、処理液や保存液中への溶菌性抗生物質とPMB複合処理が、人工授精や体外受精における受胎率や受精率を向上させることも確認していることから、精子の自然免疫応答の解析は、ヒトの高度生殖補助医療にも大きく貢献するものであると考えられる。

キーワード: peptidoglycan, lipopolysaccharide, sperm motility, sperm apoptosis, Toll-like receptor

序論

生殖器の細菌感染は、男性不妊要因の1つとなっている[5,10,11,24]。重篤な精巣への細菌感染は、精子形成不全を引き起こし、副生殖器官への細菌感染は、精漿成分の変性により、精液中の精子機能が低下する[4,25]。一方、細菌感染している精液の中には、白血球数が集積し、膿精液症となる症例も認められ、これらの精液中の精子運動性も低下することが報告されている[29]。白血球は、非自己(感染細菌など)の存在をpattern recognition receptorであるToll-like Receptor (TLR)により認識し、サイトカイン、ケモカインの分泌を誘

起する[33,34]。このときに分泌されるサイトカインの一種であるTNF- α は、多くの細胞の膜表面に発現するtype1-TNFRと結合することにより、アポトーシスを誘導する[1]。精子にもtype1-TNFRが発現しており、ヒト射出精液中にTNF- α を加えると、精子運動性が低下し、アポトーシスを起こした精子の割合が上昇することが報告されている[28]。これらのことから、精漿中の細菌感染による精子運動性の低下は、白血球からのサイトカインの分泌による自然免疫応答によって誘起されていると考えられてきた。

投稿日: 2011年11月17日

掲載決定日: 2011年12月20日

ウェブサイト事前公開日: 2011年12月21日

表1. 精液中細菌感染頻度と精液所見への影響

	グラム陽性菌	グラム陰性菌	細菌感染なし	
精液量 (ml)	2.48	2.70	2.70	N.S
精子数 (×106/ml)	87.65	82.44	121.44	N.S
運動率 (%)	54.01	58.14	43.14	N.S
奇形率 (%)	45.73	43.29	43.14	N.S
白血球数 (×106/ml)	0.8	1.38	0.42	<i>P</i> < 0.05
TUNEL 陽性率 (%)	22.0	N.D.	13.4	<i>P</i> < 0.05

全検査数 372 症例のうち、非感染症例は 253 症例で感染症例は 119 症例であった。感染症例のうち、グラム陽性菌感染は 110 症例(29.5%)でグラム陰性菌感染は 9 症例(2.4%)であった。

近年、免疫細胞以外においてもTLR familyなどの免疫細胞関連遺伝子が発現し、それぞれの器官で重要な生理的役割を果たしていることが報告されている。排卵後の卵丘細胞卵子複合体においては、卵丘細胞にTLR2とTLR4が発現し、受精過程で産生される短鎖ヒアルロン酸により活性化され、ケモカイン類を発現・分泌する[31,32]。精子には、それら卵丘細胞が分泌するケモカイン類に対する受容体が発現し、ケモカインにより精子は卵近傍に誘引され、受精能を獲得する[32,35]。これらのことから、受精には、免疫機能に関わる遺伝子の発現が必要であり、精子も免疫細胞様の機能を有していると推察された。

本ミニレビューでは、私達がこれまで明らかとしてきた「精子は、自身に発現するTLR2とTLR4を介して細菌が放出する毒素を感知し、その結果アポトーシスの誘導と受精能を低下させる自然免疫機構を有する」という研究成果を紹介し、それから考えられる精子の最適処理法について考察する。

ヒト精液中の細菌感染と精子の運動性、精子の自然免疫能

ウイメンズ・クリニック大泉学園において、体外受精プログラムの精液検査施行時にインフォームドコンセントを得た患者(n=372)において、細菌検査を行った。その結果、119症例において、精液中に細菌感染が認められた。その内訳としては、グラム陽性菌感染症例は29.6% (110/372)、グラム陰性菌感染症例は2.4% (9/372)であった。細菌感染症例における精液所見では、精子数、精液量、射出直後の精子運動性および精液中の白血球数への影響は認められなかったが、TUNEL陽性率ではグラム陽性菌感染症例において有意に高い値を示した(表1)。De Francesco等は、147人の患者で精液検査を行い、その時の白血球数と細菌感染との間に有意な関係は認められないが、精子の運動性は低下することを報告している[9]。一方、重度の副生殖器官における

細菌感染は、精液中の白血球数の増加を引き起こし、白血球の分泌するTNF- α の作用により、精子の運動性低下が引き起こされる[29]。したがって、我々の結果を含む上記の報告から、重度の細菌感染とは異なり、軽度のそれでは、細菌が放出する毒素を白血球非依存的に精子自身が感知し、運動性の低下とアポトーシスを誘起している可能性が示された。

グラム陽性菌は、溶菌時に細胞膜成分のペプチドグリカンを放出し、これが毒素として作用する[19,20]。そこで、ヒト精液中におけるペプチドグリカン濃度を測定した結果、血清中の濃度と比較して、高濃度に含まれている症例が多く認められた。また、グラム陰性菌が放出する内毒素であるlipopolysaccharide(以下LPS)は、グラム陽性菌においても放出するものがあるとの報告から[14,27]、精液中のLPS濃度の測定も行った。その結果、LPS濃度は、ペプチドグリカンと同様に精液中で高濃度に含まれる症例が認められた。そこで、これら細菌性の毒素と精子との関係を明瞭化する目的で、細菌感染フリーの精液を用いて、合成ペプチドグリカンであるPam3cysあるいはLPSの添加実験を行った。Pam3cysあるいはLPS処理は、コントロールの無処理群と比較して、精子運動性を有意に低下させ、TUNEL陽性率を有意に上昇させた。これらのことから、精液中には細菌の内毒素であるLPS、ペプチドグリカンが高濃度に検出される症例が存在すること、その毒素により精子運動性の低下やアポトーシスが誘起されることが示された。LPSの毒性は、リポドA構造に依存していること、PMBは、リポドA構造に直接的に結合し、その毒性を低下させることが報告されている[16,23]。そこで、LPS濃度が比較的高濃度な症例に対して、LPSの中和剤であるpolymyxin B(以下PMB)処理を行った。その結果、精子運動性の低下が抑制され、TUNEL陽性率が低下した。これらの結果から、細菌感染症例においては、細菌が放出する毒素により、精子が直接的にアポトーシスを誘起していることが示された。

精子の自然免疫機構

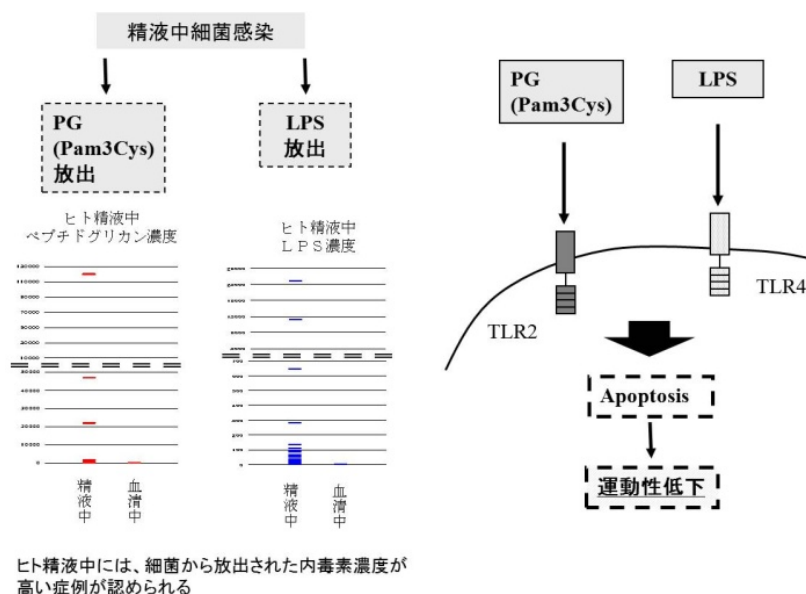


図1. ヒト精液中の内毒素放出と精子への影響について

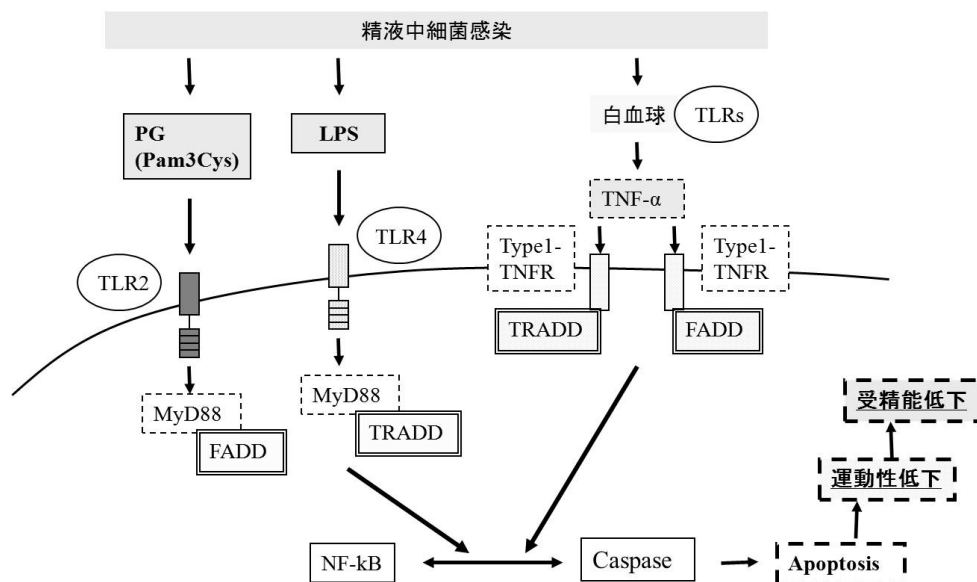


図2. マウス精子のTLR2/4の作用について

LPSの受容体としてTLR4が、PG受容体としてはTLR2が知られている[18,29,30,34]。そこで、ヒト精子にこれら受容体が発現しているか否かを、mRNAおよびタンパク質レベルで検討した。ヒト精子のRNAを抽出し、逆転写後、特異的プライマーを用いたPCR法によりTLR2とTLR4の発現を検出した。その結果、特異的なPCR産物が得られ、そのシーケンス解析からヒト精子がTLR2とTLR4を発現していることが明確化された。しかし、精子には翻訳されない擬似的RNAが存在することから、western blottingにより、タンパク質レベルでの発現も検討した。抗ヒトTLR2抗体により、ポジティブコントロールとして用いたヒト白血球サンプルと同様の110 kDa

付近にバンドが検出された。さらに、TLR4においても85 kDaのバンドが検出された。Western blottingに用いたものと同じ抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果、TLR2とTLR4は共に先体部位に局在していることが示された(図1)。

マウス精子を用いたTLRsの詳細な機能解析

ヒト精子にTLRsが発現し、それらが細菌を放出する内毒素を認識していること、その受容体の活性化により精子の運動性の低下とDNAの損傷を増加させることが示された。そこで、これらの詳細な作用機序と受精への直接的な影響を明らかにするために、マウスをモデルと

した基礎的研究を行った。

マウス精子にもTLR2とTLR4がmRNAおよびタンパク質レベルで発現し、それらは先体部位に局在していた。そこで、Tlr2とTlr4の遺伝子欠損マウスを用いて、それらの機能性を受精能力を含めて検討した。野生型マウス、Tlr2ノックアウトマウス、Tlr2/4ダブルノックアウトマウスの精巣上体精子を回収し、それぞれのリガンドであるLPSあるいはPam3cys添加培地で培養し、その精子の運動性、TUNEL陽性率、体外受精能の検討を行った。その結果、野生型マウスでは、LPSあるいはPam3cys処理区において、無処理区と比較して運動性が有意に低下し、TUNEL陽性率は有意に増加した。Tlr4ノックアウトマウスでは、LPS処理区では運動性の低下、TUNEL陽性率の増加は認められず、Tlr2/4ダブルノックアウトマウスにおいては、LPS、Pam3cysどちらの処理区においても、運動性の低下、TUNEL陽性率の増加は認められなかった。これらのことからマウス精子に発現するTLR2とTLR4が、それぞれのリガンドを特異的に認識し、精子運動性の低下やアポトーシスを誘起していることが明確化された。この結果は、免疫細胞から分泌されるサイトカイン・ケモカインからの影響を受けていない精巣上体精子の体外培養における実験結果であり、細菌が放出する毒素が直接的に精子を刺激し、精子機能性を低下させることが示された。

マクロファージなどの免疫細胞では、細菌により活性化したTLRsはMYD88を介してNF- κ Bのリン酸化や、caspase3を活性化し、アポトーシスを誘起する[2]。マウス精子においても、LPSもしくはPam3cysのどちらの刺激においてもNF- κ Bのリン酸化とcaspase3の分解による活性型への移行が認められたことから、精子に発現するTLR2とTLR4は、マクロファージと同様のシグナル伝達系を活性化させていると考えられた。免疫細胞において、TLR2とTLR4がMYD88を介して活性化するシグナル伝達経路としてTNFR-1 associated death domain protein (TRADD)がある。物質名から推察できるようにTRADDは、MYD88のみでなく、Type I TNFRにも直接的に結合し、活性化する因子である[7,17]。実際にTradd欠損マウスは、TNF- α もしくはTLR4のリガンドのどちらの刺激に対しても、NF- κ Bとcaspase3の活性化が起らないことが報告されている[12]。TLR2においてはFas-associated death domain protein(FADD)系がアポトーシス誘起に関与するが[2]、この経路もまたTNF- α により活性化されることが報告されている[3,28]。さらに、精液中の白血球によるTNF- α の分泌は、精子のType I TNFRを介してアポトーシスを誘起する[3,28]。これらのことから、精液中に細菌から放出され内毒素が存在すると、白血球が集積しTNF- α が分泌されることと、内毒素が直接精子のTLRsを刺激することにより両経路が活性化し、精子のア

ポトーシスが誘起されると考えられる。一方、LPSやpam3cysは、TLRsを介して細胞内のCa²⁺を上昇させるとの報告もある[8]。精子内のCa²⁺濃度の急激な上昇は、精子膜の変化を引き起こし、精子のネクロシスを誘起する[22]。したがって、精子TLRsを介した精子の運動性の低下は、caspase3の活性化によるアポトーシスと、Ca²⁺濃度の上昇によるネクロシスによるものと考えられる。

ヒトの体外受精において、高頻度に精子アポトーシスが起きている症例では、受精率の低下、移植胚の流産率の上昇が認められる[6]。そこで、細菌感染に伴う細菌性毒素に曝された精子の受精能力について検討を行った。体外受精を行うため、野生型雌マウスにeCGとhCGを投与し、hCG投与16時間後に卵管から成熟卵を回収した。精子は、Tlr4ノックアウトマウス、Tlr2/4ダブルノックアウトマウスおよび野生型マウスの精巣上体から回収し、BSA含有の前培養液にLPSあるいはPam3Cys添加条件で受精能獲得処理を行った。この前培養した精子を用いて体外受精を行い、媒精12時間後に前核形成によって受精を確認した。受精率は野生型マウス精子では、コントロールの無処理区と比較してLPSあるいはPam3cys処理により有意に低い値を示した。Tlr4ノックアウトマウスの精子をLPSで処理した時、受精率の低下は認められず、Tlr2/4ダブルノックアウトマウスの精子では、LPSあるいはPam3cysで処理した場合にも、受精率の低下は認められなかった。体内での精子受精能を検討するため、マウス精巣上体精子を不活化した大腸菌と供培養し、それを外科的人工授精に用いた。その結果、不活化大腸菌と供培養した精子を注入した子宮や卵管での炎症反応は認められなかったが、大腸菌数に依存して受精率が低下した。しかし、LPSの中和剤であるPMBを大腸菌との供培養下に添加した時、受精率の低下が抑制された。これらのことからマウス精子に発現するTLR2とTLR4は、それぞれのリガンドである内毒素を認識することにより、受精能を低下させることが示された(図2)。

人および家畜の精子処理法への応用

ブタは凍結精液を用いた人工授精が実用化技術に至っていないことから、ウシとは異なり液状精液を15°Cで保存して、それを用いた人工授精が行われている。このブタの液状精液は、1週間程度の保存が可能であるが、個体によっては3日間程度で、精子の運動性が急速に低下する場合がある。この液状保存における保存可能期間について、抗生物質を添加しているにも関わらず、射出直後の精液中の細菌数が負の影響をもたらしていることが明らかとなった[26]。ブタ精液においては、

70%以上の個体から細菌感染が認められ、その多くはグラム陰性菌である。射出精液を3時間以上37°Cで培養すると、ペニシリンGやアミカマイシン添加条件にも関わらず射出時の細菌数と培養後の運動性に負の相関が認められる。この抗生物質の添加により、グラム陰性菌が放出するLPS濃度が精液中で上昇し、この上昇と精子の運動性低下はLPSの中和剤であるPMBにより完全に抑制される。さらに、マウスやヒト精子と同様にブタ精子の先体部位にもTLR4が発現していることから、ブタ精液中に感染した細菌は内毒素を放出し、それが精子に作用して、精子の機能性を失わせていることが示された。したがって、15°Cの保存条件においても抗生物質が細菌の増殖を抑制するが、内毒素の放出を促進するために、細菌感染数が高値な精液では保存可能期間が短くなったと考えられる。

そこで、この15°C保存時にPMBを既存の保存液に添加することにより、いずれの個体から採取した精液においても長期間の精子保存を可能とした。また、実験レベルではあるが、この保存液を用いた時、保存10日目の精液の人工授精で受胎率が80%以上の成績が得られた。さらに、射出精液の洗浄および希釈液にこのPMBを添加し、凍結精液を作製する手法を開発した[26]。これは、ブタにおいては、15分間程度のLPS刺激期間で、細胞膜の変性が誘起されることから、これが、ブタ精子の凍結保存を困難にしている原因と考えたからである。その結果、融解後の生存性が維持され、人工授精による受胎率も向上することが明らかとなった。我々はブタ射出精液を常温輸送し、それを1日あるいは2日後に凍結する技術の確立を目指しているが、このPMBなどの内毒素による精子への負の影響を緩和させる処理が解決へのキーとなると考えて開発を進めている。

ヒト精液の処理においても、マウスおよびヒトにおける基礎的知見に加えて、上述のブタにおける知見を参考にすることが必要である。すなわち、ヒト精漿中には、グラム陽性菌が多く含まれ、その内毒素であるペプチドグリカンも高濃度で含まれていた。さらに、ヒト精漿中には、LPSと強く結合し、その活性を変化させ可溶性のsCD14 (soluble CD 14 α , β)や[15]、LBPが存在することが報告されており[21]、これらの複合体は今回測定した遊離LPSとは異なるため、精漿中には検出値以上のLPSが存在している可能性が推測される。したがって、ヒト精子においてもできるだけ射出後ただちに内毒素を不活化する、あるいは精子から分離する必要がある。ブタにおいては、感染細菌はグラム陰性菌が主であり、その内毒であるLPSの中和剤であるPMBが利用可能である。しかし、ヒトではグラム陽性菌が多く、ペプチドグリカンが精子に負の影響を与えていた[13]。ペプチドグリカンは、タンパク

質が混在していない試験管内では、プロテアーゼにより不活化することができる。しかし、生体成分中では中和する薬剤は今のところ存在しない。一方、TLR2とTLR4へのリガンド結合を抑制する、あるいは下流シグナル系を特異的に阻害することは将来応用できる可能性がある。すなわち、TLR2あるいはTLR4に対する中和抗体を精液処理液に添加する方法や[32]、敗血症の治療薬を用いる方法である。敗血症は細菌感染症の治療時に抗生物質により急激に細菌性の(内)毒素が放出され、重篤な症例では死に至る疾患である。現在治験段階にある薬剤は、TLR2およびTLR4の下流を標的とする化合物であり、これがヒト精液の処理に利用できるかもしれない。しかし、現状においては、採精直後の精液から速やかに精漿と精子を分離するだけでなく、同時に精漿中の細菌や内毒素を除去するため、密度勾配遠心法を行うことが有効であると考えられる。

これらのことをまとめると、精子にはいくつかの免疫様の作用があり、TLRsの発現もその1つである。精子に発現しているTLR2/4は、精漿中の細菌から放出される内毒素を認識し、運動性を低下させアポトーシスを誘起している。このように機能性が失われた精子は受精能も低下することが示された。ヒト生殖医療でも精子の質の低下はその後の胚発生や妊娠率へ影響を及ぼすと考えられ、ART成功のためには、ARTに用いる精子の処理を検討することが必要であると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出基礎的研究推進事業 発展型研究として、実施した。

参考文献

1. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 745–756.
2. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999 30; 285: 736–739.
3. Allam JP, Fronhoffs F, Fathy A, Novak N, Oltermann I, Bieber T, Schuppe HC and Haidl G. High percentage of apoptotic spermatozoa in ejaculates from men with chronic genital tract inflammation. *Andrologia* 2008; 40: 329–334.
4. Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 2000; 53: 1167–1176.
5. Anderson DJ, Hill JA. Cell-mediated immunity in infertility. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 1988; 17: 22–30.
6. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L,

- Flamigni C and Coticchio G.** Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2876–2881.
7. **Chen NJ, Chio II, Lin WJ, Duncan G, Chau H, Katz D, Huang HL, Pike KA, Hao Z, Su YW, Yamamoto K, de Pooter RF, Zúñiga-Pflücker JC, Wakeham A, Yeh WC, Mak TW.** Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2008; 105: 12429–12434.
 8. **Chun J, Prince A.** Activation of Ca²⁺-dependent signaling by TLR2. *J. Immunol.* 2006; 177: 1330–1337.
 9. **De Francesco MA, Negrini R, Ravizzola G, Galli P, Manca N.** Bacterial species present in the lower male genital tract: a five-year retrospective study. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care* 2011; 16: 47–53.
 10. **Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB and Weidner W.** Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr. Opin. Urol.* 2000; 10: 39–44.
 11. **Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero M and Galdiero F.** Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? *Lancet Infect. Dis.* 2005; 5: 53–57.
 12. **Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermöhlen O, Kranidioti K, Kollias G, Tschopp J and Pasparakis M.** Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 1037–1046.
 13. **Fujita Y, Mihara T, Okazaki T, Shitanaka M, Kushino R, Ikeda C, Negishi H, Liu Z, Richards JS, Shimada M.** Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Hum. Reprod.* 2011; 26: 2799–8206.
 14. **Ginsburg I.** The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *APMIS* 2002; 110: 753–770.
 15. **Harris CL, Vigar MA, Rey Nores JE, Horejsi V, Labeta MO, Morgan BP.** The lipopolysaccharide co-receptor CD14 is present and functional in seminal plasma and expressed on spermatozoa. *Immunology* 2001; 104: 317–323
 16. **Hosseinzadeh S, Pacey AA, Eley A.** Chlamydia trachomatis-induced death of human spermatozoa is caused primarily by lipopolysaccharide. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52: 193–200.
 17. **Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV.** TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 1996; 4: 387–396.
 18. **Iwaki D, Mitsuzawa H, Murakami S, Sano H, Konishi M, Akino T, Kuroki Y.** The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 24315–24320.
 19. **Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C.** Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 305–315.
 20. **Lefrancier P, Bricas E.** Synthesis of the peptidic subunit of cell wall peptidoglycan of 3 gram positive bacteria and of peptides of analogous structure. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1967; 49: 1257–1271.
 21. **Malm J, Nordahl EA, Bjartell A, Sørensen OE, Frohm B, Dentener MA, Egesten A.** Lipopolysaccharide-binding protein is produced in the epididymis and associated with spermatozoa and prostasomes. *J. Reprod. Immunol.* 2005; 66: 33–43.
 22. **Mishra DP, Pal R, Shara C.** Changes in cytosolic Ca²⁺ levels regulate Bcl-xS and Bcl-xL expression in spermatogenic cells during apoptosis death. *J. Biol. Chem.* 2006; 123: 315–322.
 23. **Morrison D.C., D.M. Jacobs.** Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 1976; 13: 813–818.
 24. **Ochsendorf FR.** Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* 2008; 40: 72–75.
 25. **Ochsendorf FR.** Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update* 1999; 5: 399–420.
 26. **Okazaki T, Mihara T, Fujita Y, Yoshida S, Teshima H, Shimada M.** Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar T sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology.* 2010; 74: 1691–1700.
 27. **Osborn MJ, Rosen SM, Rothfield L, Zeleznick LD, Horecker BL.** Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall. *Science* 1964; 145: 783–789.
 28. **Perdichizzi A, Nicoletti F, La Vignera S, Barone N, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE.** Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. *J. Clin. Immunol.* 2007; 27: 152–162.
 29. **Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG.** Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 2002; 78: 1215–1224.
 30. **Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ.** Peptidoglycan and lipoteichoic acid induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 17406–17409.
 31. **Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robanya I, Richards JS.** Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: 3228–3239.
 32. **Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Noma N, Kawashima I, Mori T, Richards JS.** Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development* 2008; 135: 2001–2011.
 33. **Takeda K, Akira S.** TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 2004; 16: 3–9.
 34. **Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 2005; 17: 1–14.
 35. **Tamba S, Yodoi R, Segi-Nishida E, Ichikawa A, Narumiya S, Sugimoto Y.** Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2008; 105: 14539–14544.

= Original Article =

Development of a low toxicity and completely serum-free vitrification system combining a Cryo-Nano-Hole vitrification container with antifreeze polyamino-acid (carboxylated poly-L-lysine) for assisted reproductive technology (ART)

Hiroaki INUI^{1,†}, Jinji MIZUNO¹, Suong-Hyu HYON²,
Kazuaki MATSUMURA³, Eiko KIKUCHI¹, Kaori NOGUCHI¹, Yuri TANJI¹,
Kazuyuki AKAISHI¹, Ken ANZAI¹ and Yoshinobu MURAYAMA⁴

¹Inui Maternity Clinic, Inui Institute for Frontier Reproductive Medicine and Infertility, Koriyama, Fukushima 963-8026, Japan.

²Kyoto University, Department of Medical Simulation Engineering, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto, Kyoto 606-8507, Japan.

³School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Nomi, Ishikawa 923-1292, Japan.

⁴Nihon University, Faculty of Engineering, NEWCAT Institute, Koriyama, Fukushima 963-8642, Japan

† Correspondence: inui-mc.1223@lake.ocn.ne.jp

ABSTRACT

In protocols for conventional vitrification, cells can be injured easily because of toxicity to the cells and dehydration due to high concentration of cryoprotectant agents (CPA). In this study, we describe a novel vitrification system, achieving ultra rapid cooling rates with minimal concentration of CPA, in which a Cryo-Nano-Hole vitrification container and carboxylated poly-L-lysine (PLL: Antifreeze Polyamino-acid) are used. The Cryo-Nano-Hole vitrification container (10 nl/hole) enabled vitrification of mouse and human blastocysts using a completely serum-free medium and a low concentration of CPA (15 or 20% ethylene glycol (EG) + 10% PLL) in the range used for slow freezing. The survival rates of mouse and human blastocysts after vitrification with this system are similar to those in conventional vitrification protocols with 47% CPA (15% EG + 15% dimethyl sulfoxide (DMSO) + 17% (0.5M) Sucrose with 20% serum). These results indicate that a Cryo-Nano-Hole vitrification system with carboxylated PLL is useful tool for the safe and reliable cryopreservation of human embryos. Our experiments demonstrate the importance of accurate minimum volume control and use of low concentration of CPA in the vitrification. In conclusion, mouse and human blastocysts can be cryopreserved successfully in a Cryo-Nano-Hole vitrification container with a low concentration of CPA solution without serum. It is expected that this system will be efficiently used for human ART.

Key words: vitrification, low toxicity, serum-free, Cryo-Nano-Hole vitrification container, antifreeze polyamino-acid (carboxylated poly-L-lysine)

INTRODUCTION

In assisted reproductive technology (ART), the cryopreservation of oocytes/embryos has made it possible to implant them into the best uterine

environment and is one of the therapeutic technologies required to obtain a high pregnancy rate. The vitrification method was reported by Luyet in 1937 [14], but it took a long time until the method was practically used on

Submitted: November 18, 2011

Accepted: December 29, 2011

Advance Publication in Website: December 30, 2011

embryos [24]. There is close causality between the CPA concentrations needed for vitrification and the volume and the cooling rate during vitrification. If the volume during vitrification is reduced, the cooling rate increases, making it possible to reduce the concentration of CPA required for vitrification [4,10,25]. In order to reduce the concentration of CPA, plans to reduce the amount of solution have been devised during the last decade, and various kinds of vitrification containers have been invented and used for clinical purposes [11,12,15,22,26, 27].

The Cryotop method, which is currently considered to be one of the global standard methods, has made it possible to reduce the concentration of cell membrane-permeating CPA added to the vitrification solution by half to 30% (15% ethylene glycol (EG) + 15% dimethyl sulfoxide (DMSO)) [10,11]. However, a concentration of 17% (0.5 M) of disaccharide (either sucrose or trehalose) is required for the vitrification solution, as a cell membrane-nonpermeating CPA. The total concentration of CPA is 47.1%, and the total osmotic pressure is 4000 mOsmol/kg, which is much higher than that of the culture medium (260–300 mOsmol/kg), causing concern about the toxicity of the CPA to the ovum/embryo, and the possibility of osmotic shock.

Recently, Matsumura *et al.* developed an antifreeze polyamino acid (carboxylated poly-L-lysine: PLL) [16,17], an amphoteric macromolecular compound containing both cationic and anionic substituents (polyampholyte), by chemically modifying polylysine, a CPA which is highly safe and frequently used as a food additive in substitution for DMSO, which had raised concerns of toxicity. In other words, polylysine was made to react with succinic anhydride to block more than approximately 50% of its amino groups. Since PLL has an affinity for cells because of its amino groups, it has a protective effect on the cell membrane; and in addition, because it also contains a large number of carboxyl groups in its molecule, it has a high affinity for water and helps excrete the intracellular water outside immediately when the cells are being frozen. They reported that since a low toxic CPA is used as a substitute for DMSO, PLL is effective in the cryopreservation of many cultured cells such as L929, MG63, HT1680, B16F1, Caco2, MC3T3, and KB cells. In addition, it has been reported that PLL can also be applied to the vitrification of human induced

pluripotent stem cells (iPS cells) [18].

In this study, we developed a vitrification system in which toxicity and osmotic shock could be suppressed as much as possible by combining the use of Cryo-Nano-Hole vitrification containers and carboxylated PLL, and we examined the system's efficacy and safety by using mouse and human blastocysts.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of mouse blastocysts

The sampling of mouse expanded blastocysts was conducted in accordance with the operating manual for the handling of mouse embryos [1].

Preparation of human blastocysts

The experiments were performed after approval to conduct research was obtained from the hospital's ethics committee and to the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. After informed consent was obtained from patients, day 5 or day 6 (day 0 means a fertilization day) blastocysts (fresh or preserved by vitrification), which would be waste, were used for vitrification experiments.

Cryo-Nano-Hole vitrification containers

Figure 1A and 1B shows a picture of a Cryo-Nano-Hole vitrification container [19, 20], and Figure 2 shows the operation method. The container was manufactured by injection molding a highly safe resin (patent application was completed in 2009). The size of the distal portion designed to carry the ovum was as follows: length: 6 mm, width: 0.5 mm, thickness: 150 μm or 200 μm . It was perforated with 250 μm -diameter holes at intervals of 0.5 mm from its tip. Each perforating hole had a cylindrical shape (diameter at the bottom \times height = 250 $\mu\text{m} \times$ 150 μm), and a volume of approximately 10 nl.

Vitrification method

The mouse and human blastocysts were allowed to cool to room temperature for 5 min in a basic culture medium (HBM). HBM was added 12 mM HEPES (Dojindo, 346-00015) and 8 mM Na-HEPES (Wako, 105593) into a complete serum-free basic culture medium (BM) [7]. We used a vitrification solution (VS) made of a mixture of HBM (0.1% PVA (Sigma, P8136), 1% Ficoll 70 (GE health care Bio sciences AB, 17-0310-10), and 0.05% Hyaluronan (Nakalai tesque, 18237-41) were added), 15% EG (Sigma, 324558) as a

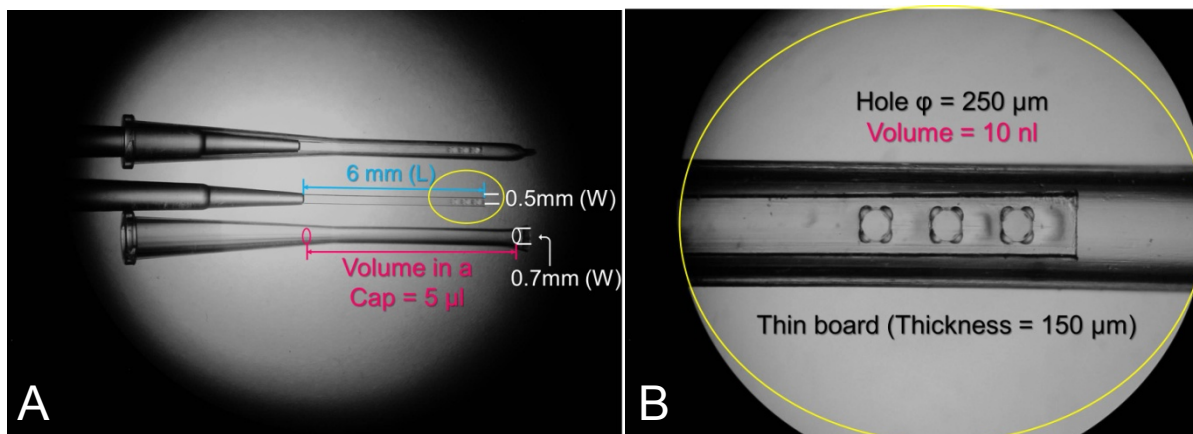


Figure 1. The appearance (A) and the magnification (B) of Cryo-Nano-Hole vitrification container. The size of the distal portion designed to carry the ovum was as follows: length: 6 mm, width: 0.5 mm, thickness: 150 μm or 200 μm . It was perforated with 250 μm -diameter holes at intervals of 0.5 mm from its tip. Each perforating hole had a cylindrical shape (diameter at the bottom \times height = 250 μm \times 150 μm), and a volume of approximately 10 nl.

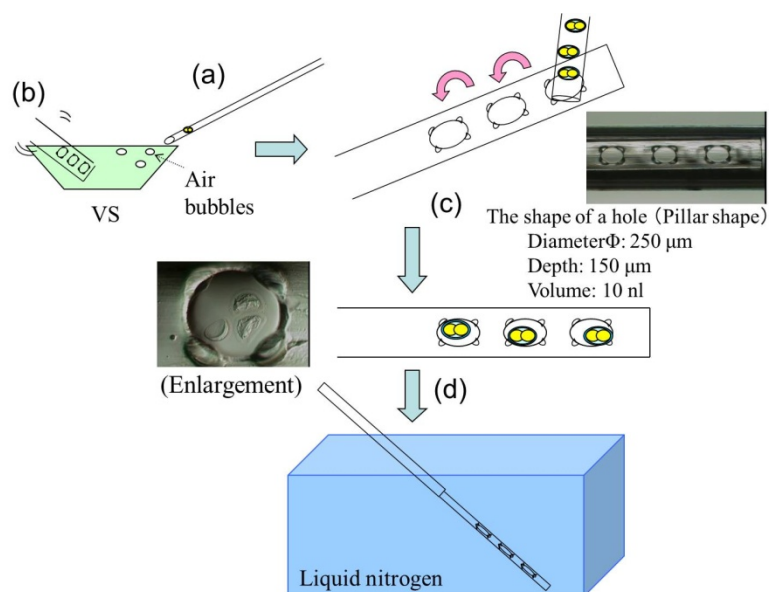


Figure 2. Protocols for Cryo-Nano-Hole vitrification container
 (a) Ovum/embryo were held in the pipette,
 (b) The container was swung, and air in a hole is removed, and filled with vitrification solution (VS) solution,
 (c) Put ovum/embryo in the hole with very small amount of VS solution,
 (d) It's put in liquid nitrogen promptly after held ovum/embryo in the hole.

CPA, and 10% carboxylated PLL. The oocyte and embryo manipulations were all performed at room temperature. First, mouse expanded blastocysts were immersed in Equilibration solution (ES: 15% EG solution) for 5–10 min for equilibration, equilibrated for 3 min in a VS (total CPA is 25% consisting of 15% EG + 10% PLL), transferred into the hole of a Cryo-Nano-Hole vitrification container that had been filled with VS solution beforehand, and immediately put into liquid nitrogen for storage directly. Two controls were used: VS (total CPA is 32% consisting of 7.5% EG + 7.5% DMSO + 0.5 M Sucrose [17%]) previously

described by Mizuno *et al.* [19] was used as control number 1, and VS (total CPA is 47% consisting of 15% EG + 15% DMSO + 0.5 M Sucrose [17%]) (Vitrification Kit: Kitazato Corporation, Fuji, Japan) previously described by Kuwayama *et al.* [11] was used as control number 2.

Human blastocysts were equilibrated by immersion in ES (15% EG solution) for 8–10 min, subjected to equilibration treatment for 3 min in a VS solution (20% or 15% EG + 10% PLL + 0.2 M (7%) Sucrose), transferred into the hole of a Cryo-Nano-Hole vitrification container that had been filled with VS

Development of new vitrification system

Table. The results of vitrified mouse blastocysts using various vitrification and warming solutions with a Cryo-Nano-Hole container and carboxylated poly-L-lysine.

Groups	Sucrose concentration (M)	Dilution steps	Total number of blastocysts examined	% (No.) of Survived blastocysts	% (No.) of developed blastocysts	Average total cell number*	% of offspring production** (No. offspring /total transferred embryos)
Experiment group ^a	1	3	50	98 (49)	94 (47)	86.2	48.6 (18/37)
	0.5	2	50	100 (50)	96 (48)	89.8	55.2 (21/38)
	0.25	1	50	96 (48)	92 (46)	82.6	48.5 (18/36)
	0	0	50	90 (45)	86 (43)	88.2	48.5 (16/33)
Control group-1 ^b	1	3	50	100 (50)	98 (49)	84.2	48.7 (19/39)
	0.5	2	50	96 (48)	94 (47)	91.6	56.8 (21/37)
	0.25	1	50	98 (49)	94 (47)	85.3	48.6 (18/37)
Control group-2 ^c	1	2	50	98 (49)	96 (48)	84.0	47.4 (18/38)

*Ten embryos were evaluated. **All offspring produced normally in all 8 groups.

^a15% ethylene glycol (EG) + 10% carboxylated poly-L-lysine, complete serum free (total CPA: 25%). ^b7.5% EG + 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) + sucrose 0.5 M (17%), complete serum free (total CPA: 32%) (Mizuno et al. [19]). ^c15% EG + 15% DMSO + 0.5 M (17%) sucrose + 20% serum (total CPA: 47%) (Vitrification Kit: Kitazato Corporation, Fuji, Japan).

No difference was found among 8 groups in each column.

solution (10 nl or less) beforehand, and immediately and directly put into liquid nitrogen for storage.

Warming

Mouse and human blastocysts that had been vitrified and stored in Cryo-Nano-Hole vitrification containers were warmed at room temperature and were equilibrated for 1 min by direct immersion into a warming solution (WS: HBM containing disaccharides (sucrose or trehalose) at 4 different concentrations, namely 1 M, 0.5 M, 0.25 M, and 0 M), which had been warmed at 37°C. After warming was performed, when the disaccharides (sucrose or trehalose) were at a concentration of 1 M in the WS, the concentrations were decreased stepwise in 3 steps to 0.5 M and 0.25 M. At a concentration of 0.5 M, equilibration was performed in 2 steps (at 0.5 M and at 0.25 M), for 3 min each. Finally, washing was performed 3 times in a 20- μ l microdrop prepared with BM [7], and cell culture was performed continuously from the stage of expanding blastocysts up the stage of hatching blastocysts.

Evaluation of the viability of mouse and human blastocysts preserved by vitrification

The vitrified embryos were photographed before vitrification, immediately after warming, and after 12–24 hours of incubation (Figures 3 and 4). Viability was evaluated on the basis of the morphological observation

from the pictures, and the survival rate and the growth rate were calculated. Blastocyst survival was defined by its expansion, intact cellular membrane, and normal zona pellucida. Its growth was defined by its development, expansion and hatching.

Quality Evaluation of mouse and human blastocysts preserved by vitrification

For quality evaluation, some of the embryos that survived and developed were fixed on glass slides, and the total cell number (TCN) of blastocysts was counted by nuclear fluorescence staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, D9542).

The outcomes of the transplantation of vitrified mouse embryos in recipients were as follows: The blastocysts that survived and developed after vitrification and warming were transplanted into the uterus of the recipient female ICR mice (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) under general anesthesia (third day of pseudopregnancy after mating with vasectomized ICR,males (CLEA Japan) = 2 days after confirmation of mating). Next, in the afternoon of the 16th day after transplantation, in order to prevent the newborn mice from being killed and eaten by the mothers, the embryos were collected by cesarean section, and their normality was confirmed. The extracted fetuses were nurtured and fed by foster parent mice that had been prepared in

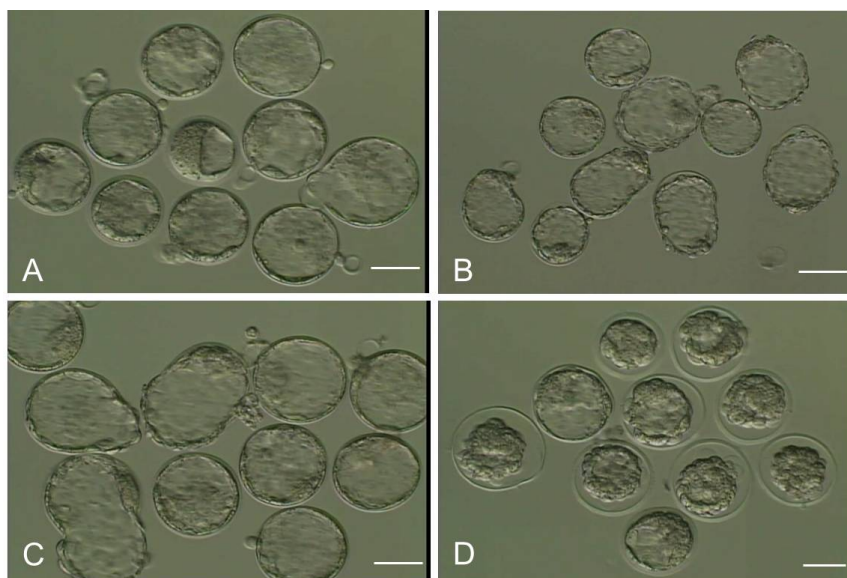


Figure 3. The survivability after vitrification of the mouse blastocyst which carried out vitrification preservation by the Cryo-Nano-Hole vitrification container and carboxylated PLL (15% EG + 10% PLL and no Sucrose (Total CPA 25%))
 A) Before vitrification, B) After vitrification, C) 24 h after vitrification and D) 48 h after vitrification. Scale bars represent 100 μ m.

advance. The young mice that were obtained by implantation of vitrified embryos were observed and examined for the presence or absence of external malformation or behavioral disorders during their developmental process and were confirmed to be normal.

Statistical analysis

A chi-square (χ^2) test with Yates's correction was used, and a value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Viability of mouse blastocysts after vitrification

The survivability and growth of mouse blastocysts after vitrification were calculated from the results obtained from 10 replications (using a total of 400 samples). Table shows the survival rate, the growth rate, and the mean total cell number of mouse blastocysts after vitrification, the live offspring production rate, and the rate of production of normal offspring. Regarding the survival rate, the growth rate, the mean total cell number, the live offspring production rate, and the rate of production of normal offspring in each experimental lot (total CPA 32%), similar results were obtained with the VS used in control 1 (total CPA 32%: 7.5% EG + 7.5% DMSO + 0.5 M (17%)sucrose) [19] and the VS used in control 2 (total CPA 47%: 15% EG + 15% DMSO +

0.5M (17%) sucrose, Kitazato Vitrification Kit), and no difference was found. The differences in the types of disaccharide (sucrose or trehalose) used in the WS and the differences in the concentrations (4 concentrations, including 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, and 0 M) had no influence on the survival rate, growth rate, mean total cell count, live offspring production rate, and the rate of production of normal offspring. In addition, the offspring born in all the experimental lots were all normal, and the observation of the course of their growth showed no external malformation or behavioral disorder, and it was confirmed that they had reproductive ability. The normal offspring rate was 100% in all experimental groups.

Viability of day 5 and day 6 human blastocysts after vitrification

Eight fresh human blastocysts were vitrified in a Cryo-Nano-Hole vitrification system, and as a result, all 8 were viable, including 5 from the lot using a VS containing 20% EG + 10% PLL + 0.2M (7%) sucrose, and 3 from the lot using a VS containing 15% EG + 10% PLL + 0.2 M (7%) sucrose. The cultures showed good growth and morphology after 12-24 h of continuous culture, and there was no morphological change that would indicate damage caused by vitrification (Figure 3). In addition, 10 human blastocysts that had been stored by vitrification were re-vitrified in a Cryo-Nano-Hole vitrification system, and as a result, all 10 lots using a VS

Development of new vitrification system

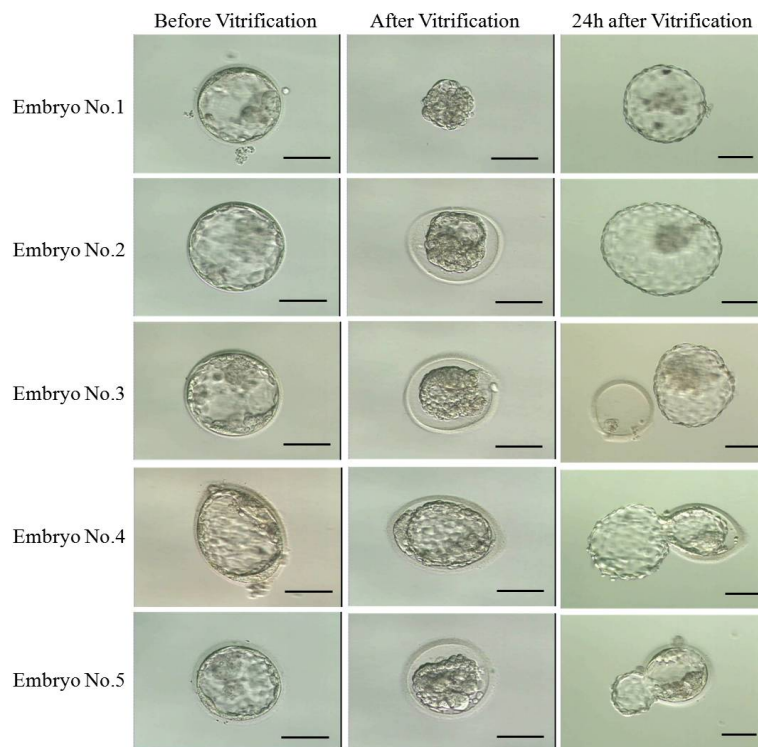


Figure 4. The survivability after vitrification of the human blastocyst which carried out vitrification preservation by the Cryo-Nano-Hole vitrification container and carboxylated PLL (20% EG + 10% PLL +0.2M (7%) Sucrose (total CPA: 37%))
The cultures showed good growth and morphology after 12–24 h of continuous culture, and there was no morphological change that would indicate damage caused by vitrification. Scale bars represent 100 μ m.

containing 20% EG + 10% PLL + 0.2 M (7%) sucrose were viable and showed good growth and morphology after 16-20 h of continuous culture. There was no morphological change indicating damage caused by storage by vitrification.

DISCUSSION

In the 1990s, cryopreservation techniques for assisted reproductive technology (ART) started to switch over from slow freezing methods to vitrification. As for vitrification containers, containers of various shapes have been developed from straws in order to reduce the working volume during vitrification [10–12,15,22,25–27]. The disadvantage of vitrification is that it causes cytotoxicity and osmotic shock due to high concentrations of CPA. To solve this problem, the amount of cooling fluid was reduced and the cooling rate was accelerated in order to make it possible to reduce the concentrations of CPA, and various reports have been made regarding methods for preserving oocytes/embryos in very small amounts of vitrification solution [11,12,15, 22,24,26,27].

The relation between the container and the cooling rate during vitrification has been reported by many researchers [11,12,15,22,26,27]. Rall and Fahy [24] reported for the first time that they successfully achieved the vitrification of mouse embryos by using 0.25-ml straws and a vitrification solution containing a 6.5 M CPA cocktail in a container, and that the cooling rate was then 2,500°C/min. Under the same conditions, when slush nitrogen was used as a refrigerant, the cooling rate was 4,000°C/min; with the open pulled straw (OPS) method, [27] the cooling rate was 5,300°C/min; and when the OPS method and slush nitrogen were combined, the cooling rate was 10,000–20,000°C/min [21]. With the grid method for electron microscopes [4], the cooling rate was 11,000-14,000°C/min, and in a combination of slush nitrogen and the grid method for electron microscopes, the cooling rate was 24,000–30,000°C/min [2].

Kuwayama *et al.* [10] used the Cryotop method to reduce the volume during vitrification from 1.5 μ l as in the OPS method [27] to less than 0.1 μ l (=100 nl), to reduce the cooling rate from 16,000°C/min to

23,000°C/min, and to accelerate the speed of the warming process from 14,000°C/min to 42,000°C/min. They reported that as a result, the viability rate of human oocytes at the metaphase-II (MII) stage after vitrification improved [3]. However, in both reports, the total concentration of CPA added was higher than 47%.

Meanwhile, Risco *et al.* [25] reported that they achieved a cooling rate of 250,000°C/min by using a highly heat-conductive quartz capillary (diameter, 0.18 mm; thickness, 0.01mm) as a vitrification container and slush nitrogen (−205 to −210°C) as a refrigerant; that they were able to reduce to 2 M the concentration of CPA (propanediol) required for vitrification, and that this fact was consistent with Bartron's theory [3] on the cooling rate-dependence of the molar concentration of CPA, which is essential for vitrification.

In addition, Demirci *et al.* [5] have previously reported that by taking a cell storage solution containing lymphocytic cells, mouse embryonic stem (ES) cells, cell lines derived from fetal skin, liver cell lines, and atrial cell lines of monkeys, and by dropping droplets of the storage solution directly into liquid nitrogen and by filtering it through the desired filter size, it is possible to store the cells in very small droplets measuring 100-200 µm in diameter, and to vitrify the cells by using low concentrations of CPA (1.5 M propanediol). However, because this method consists of dropping very small droplets directly into liquid nitrogen, there were problems such as the need for special equipment, the difficulty to ensure that all droplets are the same volume, the low utilization rate of the cells due to the fact that droplets larger than the prescribed size are discarded, and the fact that the process of collection of droplets after their filtration to the prescribed size are time-consuming. However, in the vitrification of oocytes/embryos, the problem is that even if their viability rate after storage is good, the subsequent embryonic development rate and the offspring yield after implantation are known to be low; and Demirci *et al.* [5] did not mention anything about the application of the process to germinal cells and fertilized egg cells. These reports described attempts to reduce CPA, but because some kind of human-derived serum components were used in order to protect the cells during vitrification, the possibility of infection by unknown viruses cannot be denied.

In order to overcome the problems faced by existing vitrification systems, Mizuno *et al.* tried to develop a

completely serum-free vitrification system with low-toxicity, and in order to minimize the volume used during conventional vitrification from the order of microliters to the order of nanoliters, they developed Cryo-Nano-Hole vitrification containers [19,20]. A plated-through hole was opened at the tip of the container, the volume of the vitrification solution was minimized, and the container was made so that it could easily hold a volume of vitrification solution of 10 nl or less. The base solution of the complete serum-free vitrification solution was a complete serum-free culture medium [7] into which we added PVA, hyaluronan, and Ficoll, which are substitutes for serum components such as albumin, and which have cytoprotective properties during vitrification. In vitrification systems that have been developed and used in clinical settings so far, 30% or higher concentrations of CPA were required in order to prevent ice crystal formation during vitrification [8,10,11]. It has been revealed that through the development of Cryo-Nano-Hole vitrification containers, it could be reduced to less than half, namely 15% or 12% (approximately the same as in the slow freezing method [19,20]), both in mouse oocytes/embryos and human oocytes/embryos. Reports from studies of mouse embryo transfers have also confirmed the safety of the containers. The factor that contributed to the high viability rates of mouse and human oocytes/embryos was suggested to be the fact that Cryo-Nano-containers minimized the vitrification volume to less than 10 nl in a stable manner. As a result, the conditions allowed much faster cooling and warming than in the Cryotop method [8,10,11]; thus, there was less exposure to temperature ranges that have harmful effects on the viability of oocytes/embryos [3,24].

It is generally recognized that when a solution changes and becomes solid during vitrification, its volume does not change; however, because research papers pertaining to areas of low-temperature physics and cryobiology have reported that microscopic deformations and cracks also occur during vitrification [23], additional innovations were necessary in order to ensure that oocytes/embryos are not damaged by such deformations and cracks occurring during vitrification or warming. Through the use of Cryo-Nano-Hole vitrification containers, oocytes/embryos are vitrified while being stored in a cylindrical hole of about 10 nl of volume, and this might have reduced the deformations.

Recently, Lee *et al.* [13] reported that they successfully achieved the vitrification of metaphase II (MII) mouse oocytes by using highly heat-conductive quartz (crystal) capillaries in vitrification containers, slush nitrogen (prepared by vacuum treatment at -210°C) as a refrigerant, and 1, 2-propanediol + 0.5M (17.1%) trehalose containing a concentration of CPA similar to that in storage by slow freezing (total concentration of CPA: 28.5%). However, this method requires the use of specific quartz capillaries that are not commercially available and of slush nitrogen that needs to be prepared with equipment designed specifically for that purpose.

There have been numerous reports on the efforts to develop vitrification containers [10–12,15,22,25–27], but there are no reports of the development of CPA for vitrification solutions with low toxicity and that cause less osmotic shock. In the future, there is an urgent need to search for and adopt CPA other than the existing DMSO, EG, propanediol, sucrose, and trehalose, which would have low or no toxicity, and which would cause less or no osmotic shock. Matsumura *et al.* have developed carboxylated PLL, a unique amphoteric polyelectrolyte [16,17]. Carboxylated PLL has a protective effect on the cell membrane because of its affinity for cells due to amino (cation) radicals. In addition, because of the large number of carboxyl (anion) radicals inside its molecule, it has a high affinity for water, and because it helps excrete the intracellular water outside immediately when the cells are being frozen, it has a protective effect on cells during cryopreservation [16,17]. Previous reports have shown that since carboxylated PLL is a low-toxicity CPA used as an alternative to DMSO under completely serum-free conditions, it is effective in the cryopreservation of human iPS cells and a large number of cultured cells such as L929, MG63, HT1680, B16F1, Caco2, MC3T3, and KB cells [16–18].

In this study, mouse blastocysts were vitrified by combining the use of Cryo-Nano-Hole vitrification containers and carboxylated PLL, and it was found that by using a VS into which only 15% EG + 10% PLL were added, the resulting viability rate after vitrification, implantation rate, mean total cell count, rate of production of live offspring after transplantation were similar to those obtained with Kitasato Vitri kit which is considered to be in accordance with global standards (using Cryotop and in which 15% EG + 15% DMSO +

0.5 M sucrose were added to the VS) (Table). In addition, the offsprings that were born from the transplantation of mouse blastocysts were all normal, and the observation of the course of their growth showed that there were no individuals with external malformations or behavioral disorders, and that by mating, they had normal reproductive ability, confirming the safety of the vitrification system described in this study. Furthermore, to determine whether this vitrification system can be applied to human assisted reproductive technology, human blastocysts that were handled as waste were vitrified as a preliminary experiment, and the results showed a viability rate of 100% (n=18) after vitrification. The vitrified human blastocysts showed good growth and morphology after 12 h of incubation at warm temperature; there were no morphological changes that indicated damage caused by vitrification, indicating that the method was effective on human blastocysts as it was on mouse embryos (Figure 3).

Interestingly, the conventional vitrification solution procedures requires the use of about 30% intracellular penetrating CPA, and in addition, as extracellular CPA, about 0.5 M (17.1%) of disaccharides such as sucrose or trehalose are needed. These cause an intracellular dehydration and a severe shrinkage of the cells. Then, the osmotic pressure reaches 4000 mOsmol/kg, which is much higher than that of the culture medium (260–300 mOsmol/kg), and which, along with toxicity, causes concern about a possible osmotic shock in the ovum/embryo. On the other hand, because the osmotic pressure reaches lower than 1000 mOsmol/kg by addition of 10% carboxylated PLL, dehydration by removal of free water (which is necessary for vitrification) is performed, but this does not cause a severe shrinkage like during the use of disaccharides such as 0.5 M (17.1%) sucrose or trehalose [18]. Because carboxylated PLL are polyelectrolytes with both cationic and anionic substituents (polyampholytes), they exert a cryoprotective effect due to the carboxylation activity of these 2 substituents; in other words, their protective effect on the cell membrane is due to the cellular affinity of the amino (cation) radicals, the high affinity of carboxyl (anion) radicals for water, and the dehydrating effect on intracellular free water [16,17].

The findings in this study showed the possibility of the clinical use of a complete serum-free vitrification system with low toxicity and low risk of osmotic shock. However, proficient skills and experience are needed for

the preparation and the determination of a stable volume in terms of nanoliters, and the manipulation of embryos under such conditions. In addition, preliminary experiments showed a 100% viability rate of human blastocysts after vitrification, but since the experiments were conducted on as few as 8 samples, supplementary tests on a large number of human blastocysts will be expected to be conducted in the future; and optimization and additional improvement regarding the usage of containers and carboxylated PLL will be expected to accomplish a system, which will allow a safer and highly effective vitrification.

The history of the application of the vitrification technology to human ART is new, and 10 years have passed since the first child-bearing through the vitrification method was reported in 1999 [9]. According to the statistics of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology in 2008 [6], the number of treatments using frozen embryos has shown a tendency to increase year after year, and the treatment outcome was better than that using fresh embryos.

In this study, we achieved production of offsprings by combining the use of Cryo-Nano-Hole vitrification containers and PLL in a transplantation of mouse blastocysts, which had been vitrified using a vitrification solution without DMSO or sucrose as additives; and reproduction tests on the offsprings confirmed the safety of the vitrification system described in this study.

This study will potentially open the door to the development of low-toxicity, highly safe, and completely serum-free methods for the vitrification of human ovum, spermatozooids, and embryos. Clinical applications are expected in the future.

REFERENCES

1. **Andras N, Gertsenstein M, Vintelsten K, Behringer R.** Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual (3rd edition), Cold spring Harver laboratory Press, Yew York, 2002, pp. 186–187.
2. **Arav A, Zeron Y, Ocheretny A.** A new device method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2000; 53: 248.
3. **Bartron P.** Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. *Cryobiology*. 1986; 23: 88–102.
4. **Berejnov V, Hussein NS, Alsied OA, Thorne RE.** Effect of cryoprotectant concentration and cooling rate on vitrification of aqueous solutions. *J. Appl. Crystallogr.* 2006; 39: 244–251.
5. **Demirci U, Montesano G.** Cell encapsulating droplet vitrification. *Lab. Chip*. 2007; 7: 1428–1433.
6. Ethics Committee Report. *Jpn. J. Obst. Gyn. Res.* 2010; 62: 1821–1849.
7. **Inui H, Nakamura H, Mizuno J, Yoshida R, Akaishi K, Watanabe N, Kikuchi K, Anzai K.** The Development of a Serum-Free Medium for ART. *Jpn. J. Fertil. Implant.* 2008; 25: 23–26.
8. **Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E.** High survival rate of vitrified human oocytes results in pregnancy. *Fertil. Steril.* 2003; 80: 223–224.
9. **Kuleshova L, Gianaroli L, Magri C, Ferraretti A, Trounson A.** Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 3077–3079.
10. **Kuwayama M, Vajita G, Kato O, Leibo SP.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*. 2005; 11: 300–308.
11. **Kuwayama M, Kato O.** All round vitrification of human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genetic.* 2000; 17: 477.
12. **Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK.** Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 1999; 72: 1073–1078.
13. **Lee HJ, Elmoazzen H, Wright D, Biggers J, Rueda BR, Heo YS, Toner M, Toth TI.** Ultra-rapid vitrification of mouse oocytes in low cryoprotectant concentrations. *Reprod. Biomed. Online*. 2010; 20: 201–208.
14. **Luyet BJ.** The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica*. 1937; 1: 1–14.
15. **Martino A, Songsasen N, Leibo SP.** Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 1996; 54: 1059–1069.
16. **Matsumura K, Hyon SH.** Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with anti freeze protein properties. *Biomaterials*. 2009; 30:4842–4849.
17. **Matsumura, K, Bae JY, Hyon SH.** Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell transplantation. *Cell transplantation*. 2010; 19: 691–699.
18. **Matsumura K, Sugai H, Hyon S.** Cryopreservative composition for cell and tissue. 2009, PCT/JP2009/002941, WO2009/157209A1.
19. **Mizuno J, Inui H, Nakamura H, Akaishi K, Anzai K, Kikuchi K, Watanabe Y, Noguchi K, Murayama Y.** Development of a Low Toxicity and Serum-Free Vitrification System for ART: Using a Cryo-Nano-Hole Vitrification Container. *Jpn. J. Fertil. Implant.* 2009; 26: 32–40.
20. **Mizuno J, Inui H, Akaishi K, Anzai K, Kikuchi K, Watanabe Y, Noguchi K, Murayama Y.** Development of a Closed Vitrification System with a Low Toxicity and Completely Serum-Free Vitrification Solution for ART: Using Closed Cryo Nano Hole Vitrification Containers. *Jpn. J. Fertil. Implant.* 2010; 27: 67–72.
21. **Nowshari MA, Bren G.** Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. *Hum. Reprod.* 2001; 15: 2368–2373.
22. **Papis K, Shimizu M, Izaike Y.** Factors affecting the bovine oocytes vitrified in droplet. *Theriogenology*. 2000; 54: 651–658.

Development of new vitrification system

23. **Rabin Y, Steif PS, Jorge KC, Jimenez-Rios J, Palastro MC.** Fracture formation in vitrified thin films of cryoprotectants. *Cryobiology*. 2006; 53(1): 75–95.
24. **Rall WF, Fahy GM.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Nature*. 1985; 313: 573–575.
25. **Risco R, Elmoazzen H, Doughty M, He X, Toner M.** Thermal performance of quartz capillaries for vitrification. *Cryobiology*. 2007; 55: 222–229.
26. **Tominaga K, Hamada Y.** Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* 2001; 47: 267–273.
27. **Vajita G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobson H, Greve T, Callesen H.** Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998; 51: 53–58.



Japan Society for Reproduction Engineering

= ミニレビュー =

体外で成熟・受精したブタ卵の異常と修復について Abnormality and recovery of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*

菊地 和弘^{1,†}, ソムファイ タマス², 中井 美智子¹, 永井 卓²

Kazuhiro KIKUCHI^{1, †}, Tamas SOMFAI², Michiko NAKAI¹ and Takashi NAGAI²

¹独立行政法人 農業生物資源研究所 動物科学研究領域, 〒305-8602 茨城県つくば市

²独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 家畜育種繁殖研究領域,
〒305-0901 茨城県つくば市

[†]責任著者: kiku@affrc.go.jp

要旨

家畜・大動物、特にウシでは、体外胚生産技術いわゆる卵母細胞(以下、卵)を体外成熟・受精し、さらにその受精卵を体外培養して胚を作製する技術が、子畜生産の現場に導入されている。ブタにおいても、この技術が遺伝資源の保存や利用上で重要な技術となっている。いずれにおいても作製された体外生産胚は正常な発生を担保するものであることが求められる。しかしながら、特にブタでは正常な胚を効率的に作製する上で2つの重大な問題点が残っている。1つは多精子受精、もう1つは未成熟卵への精子侵入に起因する体外生産胚の異常な倍数性の問題である。いずれも異常倍体(多倍体)の胚となり、胚発生の過程で発生を停止し死滅してしまうと考えられている。これらの問題点を回避するためには、体外受精の前に成熟卵を慎重に選抜すること、そして受精の過程が正常に進行しているかどうか(多精子侵入でないか、あるいは1個の雄性前核が形成されているか)を確実に確認して正常受精卵を選抜することが重要となる。ところが、私たちの最近の研究では、多精子受精に由来した受精卵(多倍体卵と考えられる)のいくつかは、正常な発生能を有する2倍体胚へ発生することを確認している。しかし、多精子受精卵が正常な2倍体胚へと発生する機構についてはあまりよく知られていない。この機構を解明することにより、ブタに限らず他の動物種も含めて、体外胚生産技術、体外成熟卵を用いた形質転換やクローン動物作製といった技術の効率化、さらにはヒトの生殖補助技術の進展にも貢献するものと期待される。本レビューでは、ブタにおける体外成熟ならびに体外受精においていかに異常倍体胚が生じるかについて解説し、さらに胚発生過程での倍数性修復の可能性について検討を行う。

キーワード: ブタ, 体外胚生産, 染色体異常, 多精子受精, 減数分裂

体外生産ブタ胚の正常性について

ブタ卵を体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)・体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)後に体外培養(*in vitro* culture, IVC)、すなわち体外胚生産(*in vitro* production, IVP)することにより胚盤胞を作出できることはMattioli *et al.* (1989)[32]により初めて報告された。その後、IVP胚を2–4細胞期でレシピエントに移植し子豚がえられた[11,12,32,55]。さらに、胚盤胞期胚の移植による産子作出例が報告されている[21,31]。その後もIVCの改良が

進んでおり、その効率は向上している。しかしながら、IVMやIVFに関して未だ多くの問題を抱えており、それらが胚の低発生能につながり、胚の作製効率や品質の低下を招いていると考えられる。したがって、結果的に胚をレシピエントに移植しても胚の喪失を招くことになる。この問題の主な原因の一つとして、IVP胚の倍数性の異常があげられる。IVP由来の胚盤胞のうち、45.9%が異常倍体(abnormal ploidy)細胞を含むもので、21.2%が多倍体(polyploidy)であること、さらに多倍体胚では

投稿日: 2011年12月27日

掲載決定日: 2011年12月30日

ウェブサイト事前公開日: 2011年12月30日

細胞数が少ない、サイズが小さい、発生速度が遅いなどの影響があることが報告されている[52]。胚の倍数性の異常の原因として、1) IVF中に生じる多精子侵入、2) 第二減数分裂中期(metaphase-II, M-II)以前の未成熟段階で静止している卵への受精によるものと考えられている(図1)。これらの問題を回避するには、卵の未成熟段階での減数分裂静止を防止すること(成熟卵を確実に得ること)、さらに、IVM-IVFで頻発する多精子侵入を防止することが根本的な対処法となるが、現段階の技術をもってしても困難であると考えられる。一方で、このような一部に異常胚が含まれる条件下で胚を作製し、その中から胎子さらには産子への発生・発育を保証する胚のみを選別するというアプローチも重要である。一般には、M-IIまで成熟した卵に、一つの精子が侵入(単精子侵入)した場合に正常な胚が発生すると考えられている。しかしながら、倍数性に異常のある胚でも発生過程でその問題が解決されれば、それを産子作出に利用することも考慮したい。なぜならば、稀少な遺伝資源の場合、IVPの適用には限られた卵巣や精巣からできるだけ多くの配偶子を回収しそれを利用しなければならないからである。古くから倍数性異常の哺乳動物胚が着床後も生存したとの報告がある [3,14,39]。しかし、その詳細や機序は不明なままである。本ミニレビューでは、ブタのIVPにおいて、多精子受精ならびに成熟に至る前の未成熟段階の卵への精子侵入により引き起こされる倍数性異常胚が作られる過程について、先の報告[23]に基づき考察を深める。さらに、ブタのIVPの効率を上げるために、これらの卵の利用についても検討する。

多精子侵入

多精子侵入の成立と制御

多精子侵入とは2つあるいはそれ以上の精子が卵細胞質内に侵入すること、多精子受精とは多精子侵入より引き起こされる受精現象をさす。ブタIVPにおける多精子受精は他の動物種にくらべて顕著で、長らく課題となっている。通常行われるIVFでは卵の周りにきわめて多数の精子が存在し、精子濃度と媒精時間を制御することが多精子侵入の回避には必須である[38]。私たちの研究室で行っているIVFの系では、通常 1×10^5 精子/mlで3時間の媒精を行う。この条件下では、精子は2時間後から卵細胞質内に侵入し、4時間後に約80%の精子侵入卵が得られ、60%は多精子侵入卵である。つまり、20%は単精子侵入卵となる[21,22]。もちろん、使用する精子のロット、処理法、IVF液等により異なってくる。精子のみならず、通常は卵管内で得られる多精子侵入を防止する機序がIVM卵の透明帯には備わっていないため、精子が侵入しても透明帯反応が起こらず多精子侵

入を許容する要因となる[9]。多精子侵入を人為的に防除するため種々の手法が考案されてきた。多くは、卵管内での受精を体外で再現する試みで、ごく少数の受精能獲得精子を卵にアプライさせるものである。例えば、climbing-over-a-wall (COW)法[13]、ストローIVF法[30]あるいはマイクロ流路を使用したIVF法[4]がある。また、卵管内の糖タンパクで卵そのものを処理して透明帯の特性を改善させることも試みられた[26,33]。さらに、卵管上皮細胞[37]、卵管分泌液[24]、卵管特異的な糖タンパク[26,33]、卵胞液[12]、ヒアルロン酸[49]で精子を処理し、精子の受精能獲得、先体の状態や透明帯との結合を制御した。しかしながら、現在でもIVM卵への多精子侵入を完全に防除できるという状況には至っていない。

多精子受精卵の胚発生

単精子受精と多精子受精を区別する最も信頼できる方法は、侵入精子頭部あるいはそれから派生する雄性前核(male pronucleus, MPN)を観察して識別する方法である。残念ながら、ブタやウシなどの動物では卵細胞質内に多量の脂肪滴を含むために実体顕微鏡等でそれらを観察することができない。Hoechst 33342などの蛍光色素を用いた生体染色により精子頭部やMPNを検出する方法がある。しかし、已然として脂肪滴の存在で不鮮明であること、さらには蛍光を落射するため、その後の発生能に影響を与えるという報告[7,40,51,54]があり、実用的な手法ではないと考えられる。その他、哺乳動物卵を遠心処理し、脂肪滴を卵細胞質の辺縁に寄せて、細胞質の大部分を可視化するという方法もある[5]。この方法は、蛍光観察を伴わないため、比較的安全であると考えられる。ブタ卵では、雌雄両前核はIVF後5時間より観察できるようになり、前核形成率は8時間後にプラトーに達し[22]、その後、雌雄前核融合(syngamy)の直前まで存在する。雌雄前核融合の時期は正確には特定されていないが、第一卵割がIVF後20時間頃より観られることから[6]、その直前であると考えられる。そこで、実際にIVF後の胚にこの方法を適用し、単精子侵入卵と多精子侵入卵を区別することが可能かどうかを調べた。IVF後10時間で、極体が2個放出されている卵(成熟卵が精子侵入により活性化された卵と考えられる)を選別し、 $10,000 \times g$ で20分間の遠心処理をおこなった。前核の数により1個(one pronucleus; 1PN)、2個(two pronuclei; 2PN)ならびに3個以上(multiple pronuclei; PPN)の卵を選別した。これらをそれぞれ固定・染色により観察し比較したところ約80%で選別の結果が一致した[44]。また、遠心処理そのものは発生率に影響を及ぼさなかった[43]。この遠心処理・直接前核を観察する選別手法は効果的であると考えられた。

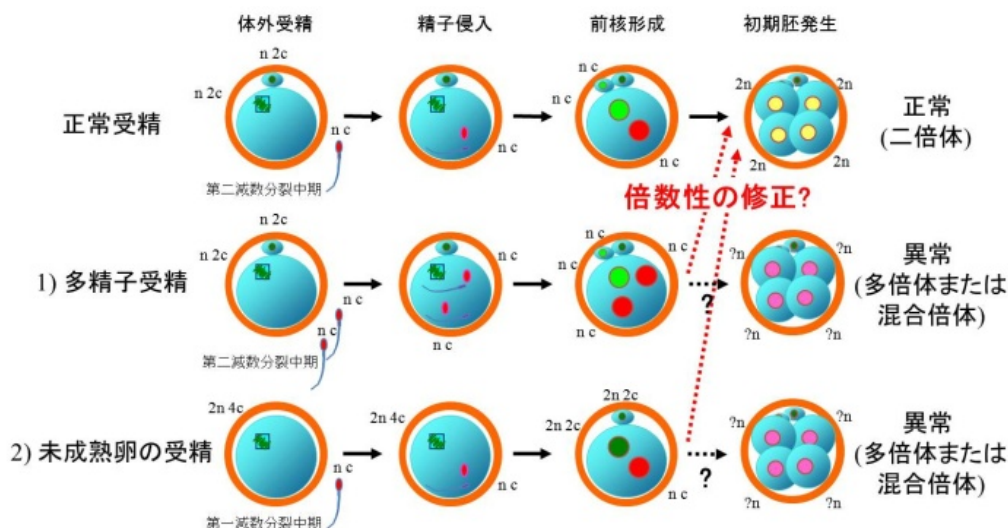


図 1. ブタ卵の体外胚生産において胚に倍索性の異常が生じる機構

正常受精では第二減数分裂中期で精子が 1 個侵入する。成熟卵は第二極体を放出し減数分裂を完了する。卵と精子からは半数体(n)の染色体(あるいはクロマチン)が 1 組(c)ずつ供出される。これらは前核期で DNA 合成がおこる(2n 4c となる)が雌雄前核融合ののち体細胞分裂(卵割)により分けられるため、割球は 2 倍体(2n 2c)となる。1)多精子受精や 2)未成熟卵の受精では、それぞれ精子と卵からのクロマチンを多く含むため正常ではない染色体数となる。そのため前核形成や卵割後の割球に倍索性の異常が生じることが考えられる。

表 1. 2もしくは多前核を有する受精卵を体外培養して得られたブタ胚盤胞の割球数ならびに核数

遠心処理後の前核の数	卵割した胚 (%) ^a	実体顕微鏡による観察 (%) ^b			固定・核染色による観察			
		2細胞	3細胞	4細胞 ≤	多核割球を有する胚 (%) ^b	無核割球を有する胚 (%) ^b	胚あたりの割球数	胚あたりの核数
2	77.7 ± 6.0 ^c	56.0 ± 6.0 ^c	22.0 ± 6.1	24.9 ± 7.0 ^c	6.9 ± 3.4	34.4 ± 3.1 ^c	2.8 ± 0.1 ^c	2.3 ± 0.1
3 ≤	59.7 ± 6.4 ^d	26.7 ± 4.1 ^d	25.8 ± 3.9	47.7 ± 6.6 ^d	13.9 ± 1.3	57.6 ± 3.8 ^d	3.4 ± 0.1 ^d	2.5 ± 0.1

すべての胚は体外受精後36時間で固定して検査した。平均 ± 標準誤差で表示した。

^a使用した胚に対する割合。^b卵割した胚に対する割合。^{c,d}それぞれの列において異符号間で有意差あり(P < 0.05)。

Somfai *et al.* (2008) [44]より改変。

そこで、前核数により受精卵を分別し別々に培養を行った。1PN卵ならびに2PN卵(それぞれ、単為発生卵ならびに単精子受精卵と考えられる)の卵割率は、PPN卵(多精子受精卵と考えられる)よりも有意に高かった[44]。さらに、2PN卵の胚盤胞への発生率は、前核を有しない卵(未受精卵、0PN卵)あるいはPPN卵よりも高かったが、1PN卵とは差がなかった。ただし、得られた胚盤胞の細胞数に差がなく、胚の品質は同等と思われた。2PN卵とPPN卵の染色体検査を行ったところ、2PN卵から発生した胚盤胞の73.8%は2倍体(diploidy)であり、12.5%は2倍体の細胞を含む混合倍体(mixoploidy)であった。この数値から計算すると、2PN卵から発生した場合、得られた胚盤胞のうち86.3%の胚は2倍体(2n)細胞を含む。ところが、PPN卵の場合は、31.3%が2倍体細胞を含む胚であり、14.5%が2倍体細胞を含む混合倍体であった。同様に計算すると、PPN卵の場合は胚盤胞のうち45.8%が2倍体細胞を含む。これらの結果は、2PN卵だけではなくPPN卵からも2倍体胚が発生でき、正常な胎子や産子を得られる可能性を示している。この私たちのデータ

は、ブタのIVPでは多精子受精に起因すると考えられる染色体異常、多くは多倍体が高率に引き起こされるという報告に一致する[34,41]。また、PPN卵は胚盤胞期まで体外で発生可能である[14]。これらの知見は、IVPで得られる胚盤胞の一部には多精子受精胚が含まれることを示している。さらに、PPN卵をレシピエントに移植した場合、受精後40日で胎子の体細胞を調べるとすべての胎子は2倍体であり、さらに出産した子豚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[14]。PPN卵は、体内で発生が進行する間に、侵入精子数が多いという悪影響が中和されることを示している[15]。実際に、IVP胚として2PN卵ならびに前核を3つ有する卵(3PN卵)をレシピエントに移植したところ、産子を得ることに成功した[46]。2PN胚に加え3PN胚も産子へ発生したものと考えられ、多精子受精卵が利用可能であることを示唆している。

多精子受精卵の倍索性修復の機序

多精子受精卵が発生過程で正常な2倍体に修復される機序は未解明な部分が多い。多精子受精卵の倍数

表2. 極体の有無により分別したブタ卵の体外受精後もしくは電気刺激後の活性化

成熟培養 (時間)	極体	処置	活性化卵 (% ^a)	1極体放出卵 (% ^b)	2極体放出卵 (% ^b)
24	-	体外受精	6.2 ± 1.5 ^d	80.0 ± 16.7 ^c	20.0 ± 16.7 ^d
48	-	体外受精	68.6 ± 10.8 ^c	90.0 ± 1.7 ^d	10.0 ± 1.7 ^d
48	+	体外受精	61.8 ± 13.8 ^c	5.2 ± 2.3 ^d	94.9 ± 2.3 ^c
24	-	電気刺激	0 ^f	-	-
48	-	電気刺激	52.9 ± 5.0 ^e	73.0 ± 9.7 ^e	13.5 ± 4.7 ^f
48	+	電気刺激	80.5 ± 4.8 ^e	8.9 ± 2.6 ^f	79.0 ± 6.7 ^e

すべての胚は体外受精後10時間で固定して検査した。平均 ± 標準誤差で表示した。

^a使用した卵に対する割合。b 活性化卵に対する割合。

^{c,d,e,f}それぞれの列において異符号間で有意差あり(P < 0.05)。Kikuchi *et al.* (1999) [20]より改変。

表3. 極体の有無により分別したブタ卵を体外受精し、6日間培養して得られた胚盤胞の染色体解析

極体の 有無	胚盤胞数	解析したM期染色体の数 (胚盤胞あたりの数)	判定されたM期染色体の数(%)				
			総数 ^a	1倍体 ^b	2倍体 ^b	3倍体 ^b	4倍体 ^b
-	66	132 (2.0)	100 (78.8) ^c	16 (16.0)	44 (44.0) ^d	34 (34.0) ^c	6 (6.0)
+	122	241 (2.0)	155 (64.3) ^d	29 (18.7)	108 (69.7) ^c	13 (8.4) ^d	5 (3.2)

^a解析したM期染色体の数に対する割合。^b 判定可能であったM期染色体の総数に対する割合。

^{c,d}それぞれの列において異符号間で有意差あり(P < 0.05)。Somfai *et al.* (2005) [41]より改変。

性は、第一卵割直前の前核の位置により左右されることが報告されている[15]。この現象は、異なった卵割の様式たとえば三極性(tripolar)あるいは四極性(tetrapolar)といった異常な卵割様式が関与すると考えられている。これらの胚では、第一卵割の後にそれぞれの割球の倍数性が、2倍体、多倍体あるいは混合倍体などさまざまな状態となり、それらの割球を持つ胚が卵割を繰り返すと考えられる[9, 15]。初期の胚発生では、これら倍数性に異常がある割球が胎生期に細胞分裂を停止し、一方で正常な2倍体を有する割球のみが発生に関与するものと考えられている。したがって、混合倍体胚でも2倍体細胞を有すれば胎子や産子へと発生すると考えられる[9, 15]。また、別な機序も想定されており、Kola *et al.* (1987) [25]は、ヒトの受精卵が三極性の卵割をすると分裂後の割球の染色体数に異常がおこること、また、多精子受精卵でも2細胞期への移行時すなわち第一卵割時に、余剰な割球一つが突出することにより胚が2倍体化することを報告している。ウシでもIVP胚で同様な報告が得られている[45]。Funahashi (2003) [9]はさらに別な可能性として、多精子侵入した精子のうち余剰な精子では精子頭部が脱凝縮せず、MPN形成をおこなってもこれらは前核融合に関与しないため、その後のM期染色体像の形成や卵割には関与しないと報告している。このような精子由来の余剰な核は、2細胞期胚の一方の割球の中にそのままの形でとどまり、その後ライソゾームが関与する機序で消滅することになる。現時点でのブタのIVP系では、約15-30%のIVM-IVF卵が胚盤胞期にまで発生をするが、その形態的な所見は多様である。部分的な断片化が認められる胚(partially fragmented

embryos)があり、その断片化した部分には核があつたり、なかつたりという特徴を示す[21, 41, 44]。最近の私たちの報告[44]では、IVF後36時間で観察すると、単精子受精卵は多精子受精卵に比べて2細胞期へと高率に卵割する。一方で、4つあるいはそれ以上の割球を持つ胚の割合は、単精子受精卵に比べて多精子受精卵で高い。これらの胚を核染色後に観察すると、2核あるいはそれ以上の多核割球を有する胚の率は、単精子受精卵と多精子受精卵の間で差が無く、無核の割球(断片化の一つの根拠と考えられる)の率は、単精子受精卵に比べ多精子受精卵で高かった。さらに、割球数については、単精子受精卵に比べ多精子受精卵で多く、胚1個あたりの核の平均数は2実験区間で差がなかった(表1)。これらの結果より、多精子受精では部分的な胚の断片化が起こることが示唆された。この現象が倍数性の修復機序に重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、この現象と初期の胚発生の段階で倍数性の修復が起こるということに関連づけるためにはさらなる研究が必要である。

卵成熟完了前の受精

“M-I静止”卵の細胞質成熟度

これまで私たちが用いてきているIVM系では、30時間でM-II卵いわゆる成熟卵が初めて出現し、その後成熟卵率は36時間で最大値となり、通常IVFを行う44-46時間にかけて一定値をとる[19]。この間、約35%の卵はM-IIに達せず、約25%の卵は第一極体を放出しないがM期染色体を有し、見た目はM-Iの状

ブタ卵の異常と修復

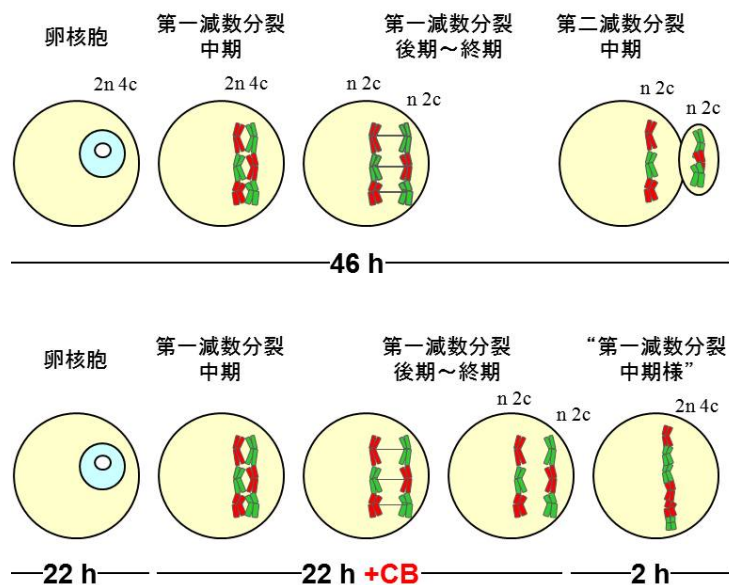


図 2. ブタ卵の成熟培養時のサイトカラシン B(CB)の有無による染色体の挙動の違い

通常の成熟培養では、卵核胞卵は卵核胞崩壊後、母方ならびに父方由来の相同染色体が並び(第一減数分裂中期)、相同染色体は両極に移動し1組は卵のクロマチンとして卵細胞質内にとどまり、もう1組は極体として放出される。この状態が第二減数分裂中期である。この際の核相ならびに染色体はそれぞれ $n\ 2c$ の構造をとる。一方、CB を添加すると極体が放出されずに両組の染色体が卵細胞質内に止まる。その後、CB を除去するとこれらの染色体が合流する。この場合、第一減数分裂中期で観られる相同染色体が対合した様式をとらず、それぞれの染色体が個別に存在するため、体細胞同様、38本の染色体がならんだM期像を呈する($2n\ 4c$ の構造をとる)。Somfai *et al.* (2006) [42]より改変。

態にとどまっているように見受けられる。私たちは、この状態の卵を“第一減数分裂中期(metaphase-I, M-I) 静止(M-I arrest)”卵と称した[20]。通常、多くの動物種では、減数分裂はM-IIで静止し精子侵入を待つ。一方で、M-I静止卵もいくつかの動物種でたびたび認められ、採卵や排卵時期と卵胞周期が一致しない、あるいは卵の成長不足(結果的に卵の直径が小さい)などさまざまな要因でおこることが知られている[8,35,47,50]。使用する培養液が不適切など培養条件の不正によるストレスによっても引き起こされることがある[1,2,20]。ブタ卵でよく知られている現象であるが、ある種の系統(LT/Sv系やLT関連の系統)のマウスの卵が、高頻度でM-I静止を起こすことが知られている[16,17]。

成熟卵(M-II卵)は、第一極体を直接観察することで、未成熟の卵と区別することができる。ブタ卵では、選別のエラーは極体有りだと判別されたもののうち6%以内である[20]。この手法は、前述のクロマチンを蛍光色素で染色し蛍光観察下でM-II卵を選別する方法と比較し、簡便で蛍光を落射することがないためその後の発生能に影響を与えないと言う点で優れた方法である。この方法で、“M-I静止”卵を選別し、研究を行った。この“M-I静止”卵はM-II卵と同様に細胞質成熟を完了していると考えられる[20]。つまり、“M-I静止”卵においても、電気刺激による単為発生

刺激を加えた場合は極体を1個放出し雌性前核(FPN)を形成する。IVF後もやはり極体を1個放出しFPNならびにMPNを形成する。この前核形成について時間やその様式は、“M-I静止”卵と成熟卵で違わなかった[41]。さらに、通常、M-II卵は活性化されると第一極体に比べクロマチンが凝縮している第二極体を放出するが、“M-I静止”卵が活性化されて放出される極体もこの特徴を有している。このことから、極体放出前の細胞質の成熟度が極体の形態にも反映されていると考えられている。一方、通常の出現時期である24時間で得られる、いわゆる“新鮮な”M-I卵ではIVFや単為発生を施してもほとんど卵の活性化は誘起されない(表2)。以上の観察結果より、ブタ卵では減数分裂において核の成熟が完了するかどうかにかかわらず、一定時間を経過すると細胞質成熟が完了することが示唆された。卵の活性化を制御する因子として成熟促進因子(maturation promoting factor, MPF)が挙げられる。M-II卵ではMPFが合成され高いまま維持されるためM期に静止するが、精子侵入や電気刺激による卵の活性化によりMPFが分解されるため、間期つまり前核期に移行する。実際にMPFを測定すると、“M-I静止”卵やM-II卵よりも“新鮮な”M-I卵では高い値が測定される。すなわち、“M-I静止”卵やM-II卵では“新鮮な”M-I卵より容易に活性化がおこる。“新鮮な”M-I卵に侵入した精子

頭部は脱凝縮後に再凝縮、場合によってはM期染色体様に変化する[20]。この様に、“M-I静止”卵では、細胞質成熟が進みM-II卵と同様に適度なMPF活性を維持すること、活性化により前核形成をすることが明かになった。しかし、このような受精卵は減数分裂が完了されないため、多精子受精と同様に核相に異常が生じると思われる。そこで、胚発生が進むのかを検討した。また、なぜ第二極体を放出せずに細胞質成熟が進むのかについても検討を行った。

“M-I静止”卵の発生成能について

“M-I静止”ブタ卵は通常のM-II卵と同様にIVF後に胚盤胞へと発生する[41]。しかしながら、その発生成能(胚盤胞発生率)は低く、さらには胚盤胞の細胞が少ないという点でM-II卵よりも劣ると考えられる。マウスでも“M-I静止”卵は胚盤胞へと発生することが報告されている[8]。“M-I静止”卵をIVFして得られた胚盤胞の染色体標本を解析すると、染色体数の異常が認められ、特に3倍体細胞の率が増加している[41](表3)。マウスでも同様な報告がなされている[8]。“M-I静止”卵は、二母性(digynic)の3倍体胚を形成すると考えられている。Kaufman *et al.* (1989) [18]は、マウスの二母性3倍体胚は、正常に受精した2倍体胚と比較して形態的に正常であるが大きさはやや小さいことを報告しており、今回のブタの事例が近似するものと考えられる。

このように、ブタ胚の倍数性は胚発生成能と関連することが示唆される。“M-I静止”卵でも発生の過程で倍数性の修復機構があるかどうかについては確認されていない。一方で、この“M-I静止”卵からIVFにより発生した場合も、2倍体胚あるいは多倍体胚でも2倍体細胞が含まれることが確認されていることから[41]、その後の胎子や産子への発生が十分に期待される。詳細な検討が望まれる。

卵成熟が完了する前に“M-I静止”となる機構

私たちは、“M-I静止”卵が出現する機構として、“M-I静止”卵では極体放出がされないという事実から、極体放出に関与する細胞骨格つまりアクチンの制御に何らかの異常があるのではないかと仮定した。そこで、“M-I静止”卵を実験的に作出することにした。“M-I静止”卵の作出には、アクチンの重合阻害剤であるcytochalasin-B (CB)を使用した。この薬物は、哺乳動物の卵をM-Iで静止させるとの報告がある[53]。実験的に作出した“M-I静止”卵(培養時間は計46時間)、IVMを33時間行って回収した“真の”M-I卵、さらに46時間IVMを行ったM-II卵を経時的にサンプリングし染色体の挙動を比較したところ、CB処理卵では、

相同染色体の解離はおこるものの第一極体の放出がおこらず、2組の染色体のセットが卵細胞質内にとどまる。さらに、この2組のセットは後に合流して、2n 4c(2倍体で4つの染色体を有する)のM期染色体を形成する[42] (図2)。実際には、“M-I静止”卵の染色体像は38本を有し、“真のM-I”卵ではリング状に相同染色体が対合した状態のものが19本、M-II卵では卵細胞質内の染色体19本と放出された第一極体内にも染色体19本が観察される。また、CBを用いないで48時間培養して得られた“M-I静止”卵もCB処理卵と同様な染色体であったことが確認されている(Somfai *et al.*, 未発表)。Kubiak *et al.* (1991) [27]は、CBと類似な薬物であるcytochalasin-Dを用い、マウスでも同様な報告をしている。このように“M-I静止”卵の染色体構造は、2つの染色分体を有する染色体構造をとっており、相同染色体が2組である、すなわち2倍体である点を除けば、M-II卵のそれに類似する。これらの結果は、Sosnowski *et al.* (2003) [48]やLechniak *et al.* (2007) [29]でのブタ卵の報告と一致している。M-IからM-II移行する際に、いくつかの卵では染色体の分離がおこっても何らかの機構が働き、相同染色体の1組が極体として放出されずに卵細胞質内に残り結果的に2組が合流するためと考えられる。また、この異常は培養時間を延長させると、より頻発することも私たちの報告を裏付けるものである。これらの事から私たちが定義してきた“M-I静止”卵という表現[20, 41]は、“M-I様(M-I-like)”卵と称した方がよいと考えられる。ブタやマウスだけではなく、ヒトにおいても未成熟の状態でとどまりM-II期に達しないことが不妊の一要因となっている[36]。いずれにせよ、成熟過程における紡錘糸形成と極体放出の異常によるものと考えられるので、さらなる研究が必要である。

結論

私たちの研究結果では、ブタのIVPにおいて、胚盤胞に発生可能であることは必ずしも完全な指標とは成り得ないことを示している。なぜなら、多倍体胚も胚盤胞期にまで発生するためである。IVFに供するM-II卵を慎重に選ぶこと、IVF時の多精子侵入を可能な限りモニターすることが重要であると思われる。これらはIVFだけではなく、IVM技術を使ったクローンや遺伝子導入の際にも重要な事項となる。IVP胚の信頼性ならびに効率化をめざすために、これからもIVM-IVF系における核と細胞質成熟の関連について研究するとともに、発生過程で異常が修復される機構についても解明する必要がある。

謝辞

本研究を遂行ならびに本レビューを作成するにあたり、居在家義昭、吉澤緑、柏崎直巳、金子浩之、野口純子、淵本大一郎、伊藤潤哉、M. Fahrudin、N. W. K. Karja、大沼克彦、小沢学、前泊直樹ならびに谷原史倫氏に感謝いたします。

参考文献

1. **Bae IH, Foote RH.** Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. *J. Reprod. Fertil.* 1980; 59: 11–13.
2. **Bagger PV, Byskov AG, Christiansen MD.** Maturation of mouse oocytes *in vitro* is influenced by alkalization during their isolation. *J. Reprod. Fertil.* 1987; 80: 251–255.
3. **Bomsel-Helmreich O.** Fate of heteroploid embryos. *Advanc. Biosci.* 1971; 6: 381–403.
4. **Clark SG, Haubert K, Beebe DJ, Ferguson CE, Wheeler MB.** Reduction of polyspermic penetration using biomimetic microfluidic technology during *in vitro* fertilization. *Lab. Chip.* 2005; 5: 1229–1232.
5. **Cran DG.** The distribution of organelles in mammalian oocytes following centrifugation prior to injection of foreign DNA. *Gamete Res.* 1987; 18: 67–76.
6. **Dang-Nguyen TQ, Kikuchi K, Somfai T, Ozawa M, Nakai M, Maedomari N, Viet-Linh N, Kanai Y, Nguyen BX, Nagai T.** Evaluation of developmental competence of *in vitro*-produced porcine embryos based on the timing, pattern and evenness of the first cleavage and onset of the second cleavage. *J. Reprod. Dev.* 2010; 56:593-600.
7. **Ebert KM, Hammer RE, Papaioannou VE.** A simple method for counting nuclei in the preimplantation mouse embryo. *Experientia* 1985; 41: 1207–1209.
8. **Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F.** Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 1994; 164: 1–9.
9. **Funahashi H.** Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reprod. Fertil. Dev.* 2003; 15: 167–177.
10. **Funahashi H, Day BN.** Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 97–103.
11. **Funahashi H, Day BN.** Advances in *in vitro* production of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Supp.* 1997; 52: 271–283.
12. **Funahashi H, Kim NH, Stumpf TT, Cantley TC, Day BN.** Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 1996; 54: 1412–1419.
13. **Funahashi H, Nagai, T.** Sperm selection by a climbing-over-a-wall IVF method reduces the incidence of polyspermic penetration of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 2000; 46: 319–324.
14. **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*. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 1110–1113.
15. **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. *Biol. Reprod.* 1999; 61: 1340–1346.
16. **Hirao Y, Eppig JJ.** Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in strain LT mouse oocytes: participation of MOS. *Development* 1997; 124: 5107–5113.
17. **Hirao Y, Eppig JJ.** Analysis of the mechanism(s) of metaphase I-arrest in strain LT mouse oocytes: delay in the acquisition of competence to undergo the metaphase I/anaphase transition. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 54: 311–318.
18. **Kaufman MH, Lee KK, Speirs S.** Influence of diandric and digynic triploid genotypes on early mouse embryogenesis. *Development* 1989; 105: 137–145.
19. **Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Tojo H, Toyoda Y.** Inactivation of p34^{cdc2} kinase by the accumulation of its phosphorylated forms in porcine oocytes matured and aged *in vitro*. *Zygote* 1999; 7: 173–179.
20. **Kikuchi K, Nagai T, Ding J, Yamauchi N, Noguchi J, Izaike Y.** Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase-I. *J. Reprod. Fertil.* 1999; 116: 143–156.
21. **Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T.** Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1033–1041.
22. **Kikuchi K, Nakai M, Shimada A, Kashiwazaki N.** Production of viable porcine embryos by IVF and ICSI. *J. Mamm. Ova Res.* 2006; 23: 96–106.
23. **Kikuchi K, Somfai T, Nakai M, Nagai T.** Appearance, fate and utilization of abnormal porcine embryos produced by *in vitro* maturation and fertilization. *Reproduction Suppl.* 2009; 66: 135-147.
24. **Kim NH, Day BN, Lim JG, Lee HT, Chung KS.** Effects of oviductal fluid and heparin on the fertility and characteristics of porcine spermatozoa. *Zygote* 1997; 5: 61–65.
25. **Kola I, Trounson A, Dawson G, Rogers P.** Trippronuclear human oocytes: altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biol. Reprod.* 1987; 37: 395–401.
26. **Kouba AJ, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Buih WC.** Effects of porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy and embryonic development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2000; 63: 242–250.
27. **Kubiak J, Paldi A, Weber M, Maro B.** Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development* 1991; 111: 763–769.
28. **Lechniak D, Szczepankiewicz D, Kauss D, Szulc J, Szydlowski M.** IVM media, oocyte diameter and donor genotype at RYR1 locus in relation to the incidence of porcine diploid oocytes after maturation *in vitro*. *Theriogenology* 2005; 64: 202–212.
29. **Lechniak D, Warzych E, Pers-Kamczyc E, Sosnowski J, Antosik P, Rubes J.** Gilts and sows produce similar rate of diploid oocytes *in vitro* whereas the incidence of aneuploidy differs significantly. *Theriogenology* 2007; 68: 755–762.
30. **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. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 1580–1585.
31. **Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M, Miemillod P.** Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 2001; 56: 17–29.
 32. **Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E.** Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1989; 39: 1201–1207.
 33. **McCauley TC, Bui WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA, Day BN.** Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 828–834.
 34. **McCauley TC, Mazza MR, Didion BA, Mao J, Wu G, Coppola G, Coppola GF, Di Bernardino D, Day BN.** Chromosomal abnormalities in Day-6, *in vitro*-produced pig embryos. *Theriogenology* 2003; 60: 1569–1580.
 35. **Motlik J, Fulka J.** Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 1986; 25: 87–96.
 36. **Mrazek M, Fulka J.** Failure of oocyte maturation: possible mechanisms for oocyte maturation arrest. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 2249–2252.
 37. **Nagai T, Moor RM.** Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 26: 377–382.
 38. **Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K.** Update of *in vitro* production of porcine embryos. *Front. Biosci.* 2006; 11: 2565–2573.
 39. **Piko L, Bomsel-Helmreich O.** Triploid rat embryos and other chromosomal deviants after colchicine treatment and polyspermy. *Nature* 1960; 186: 737–739.
 40. **Smith LC.** Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 39–44.
 41. **Somfai T, Kikuchi K, Medvedev SU, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Ozawa M, Noguchi N, Kaneko H, Ohnuma K, Sato E, Nagai T.** Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 90: 307–328.
 42. **Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Karja NWK, Farhudin M, Maedomari N, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K.** Diploid porcine parthenotes produced by the inhibition of first polar body extrusion during *in vitro* maturation of follicular oocytes. *Reproduction* 2006; 132: 559–570.
 43. **Somfai T, Kashiwazaki N, Ozawa M, Nakai M, Maedomari N, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T, Kikuchi K.** Effect of centrifugation treatment before vitrification on the viability of porcine mature oocytes and zygotes produced *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 2008; 54: 149–155.
 44. **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. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 107: 131–147.
 45. **Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, Imai K.** Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern, and developmental competence during *in vitro* culture of *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2009; 21: 209–210.
 46. **Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Maedomari N, Ito J, Kashiwazaki N, Nagai T, Kikuchi K.** Live piglets derived from *in vitro*-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol. Reprod.* 2009; 80: 42–49.
 47. **Sorensen RA, Wassarman PM.** Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 1976; 50: 531–536.
 48. **Sosnowski J, Waroczyk M, Switonski.** Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 2003; 60: 571–581.
 49. **Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-Martinez H.** Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. *Int. J. Androl.* 2000; 23: 13–21.
 50. **Szybek K.** *In vitro* maturation of oocytes from sexually immature mice. *J. Endocrinol.* 1972; 54: 527–528.
 51. **Tsunoda Y, Shiosa Y, Onodera M, Nakamura K, Uchida T.** Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *J. Reprod. Fertil.* 1988; 82: 173–178.
 52. **Ulloa Ulloa 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. *J. Reprod. Dev.* 2008; 54: 22–29.
 53. **Wassarman PM, Josefowicz WJ, Letourneau GE.** Meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *J. Cell Sci.* 1976; 12: 531–545.
 54. **Yang X, Zhang L, Kovács A, Tobback C, Foote RH.** Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation. II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 27: 118–129.
 55. **Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishiaki K, Kojima T, Nagai T.** Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1993; 39: 1303–1311.



Journal of
REPRODUCTION
ENGINEERING

JRE

Journal of REPRODUCTION ENGINEERING 生殖工学会誌

2011年12月発行

発行者：日本生殖工学会 (SRE)

代表：柏崎 直巳

発行所：日本生殖工学会 (SRE)

〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71

麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内

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

J R E